HAL
open science

Complexation des cations lanthanides trivalents par des ligands d'origine biologique pour l'IRM :Structure, thermodynamique et méthodes

Célia Bonnet

To cite this version:

Célia Bonnet. Complexation des cations lanthanides trivalents par des ligands d'origine biologique pour l'IRM :Structure, thermodynamique et méthodes. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00089144

HAL Id: tel-00089144

https://theses.hal.science/tel-00089144

Submitted on 10 Aug 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : CHIMIE

Présentée et soutenue publiquement

par

Célia BONNET

le 6 juillet 2006

Complexation des cations lanthanides trivalents par des ligands d'origine biologique pour l'IRM : Structure, thermodynamique et méthodes

---

COMPOSITION DU JURY

Mme E. JAKAB-TOTH	Rapporteur
Mr R. ZIESSEL	Rapporteur
Mr G. SERRATRICE	Examinateur
Mr M. PORT	Examinateur
Mr P.H. FRIES	Directeur de thèse
Mme P. DELANGLE	Co-directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Reconnaissance Ionique, Service de Chimie Inorganique et Biologique, Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09 (France)

Remerciements

J'ai effectué ce travail de thèse au laboratoire de reconnaisance ionique du CEA Grenoble dirigé par Pascale Maldivi, que je remercie pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

Je voudrais remercier Mme Eva Toth et Mr Raymond Ziessel pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de porter ce jugement sur ce travail de thèse. Je remercie également Mrs Guy Serratrice et Marc Port d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Pour la relecture attentive de ce manuscrit, je remercie Pascale, Pascal, Hélène, Olivier et Paul.

Je souhaite remercier Pascal Fries, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait partager son immense connaissance de la chimie des solutions, et pour m'avoir initié aux calculs et aux interprétations de relaxivité. Les innombrables discussions que nous avons partagées ont toujours été très enrichissantes. Merci pour le temps que vous m'avez consacré, pour votre patience et pour vos explications éclairées.

Je remercie également Pascale Delangle, qui a co-dirigé cette thèse, pour m'avoir guidée et initiée aux joies de la recherche au cours de ces années passées au laboratoire. Merci pour ta rigueur scientifique qui m'a beaucoup appris et pour tout le temps que tu as passé sur mon sujet tant pour les expériences que pour la rédaction du manuscrit.

Merci à Andrée Gadelle, la « maman » des cyclodextrines modifiées, sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu.

Un immense merci à Olivier Sénèque pour la synthèse du peptide cyclique, pour ses conseils pour la résolution des structures RMN, et pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons eues.

Je voudrais remercier Alexandre Moral, mon stagiaire et mon « bras droit » quand le mien m'a fait défaut…

Un très grand merci à Serge Gambarelli pour m'avoir initié aux joies de la RPE dans une bonne humeur toujours constante ! Des collaborations comme celle-ci, j'en aimerais d'autres !

Merci à Serge Crouzy pour la résolution de la structure du peptide libre, à Jacques Pécaut pour la structure cristallographique du Lu_2ACX, et à Colette, le « cœur » du laboratoire pour la réalisation des spectres de masse.

Merci à Emilie, la « grande prêtresse de l'informatique » pour avoir toujours été présente pour les problèmes informatiques, et autres…

Merci à Pierre-Alain pour ses dépannages RMN toujours efficaces, et pour ses explications éclairées. Merci également à Zohra, la « magicienne » du SCIB pour tous les problèmes administratifs.

Enfin, merci à tous les gens du laboratoire pour les bons moments passés ensemble en particulier au cours des « pauses thé », je pense surtout à Tut-Tut, ma cobureau, mais aussi à

Laurence, Aline, Pierre, Cathy et Claire. Je n'oublie pas non plus Andréa, Fabien, Jean-Philippe, Marinella, Florence, Marie, Christelle, Chen, Gregory, Louise, Nick…

Pour terminer, je voudrais remercier ma famille, en particulier mes parents et mes sœurs, pour m'avoir soutenue pendant ces années pas toujours faciles, ainsi que tous mes amis qui se reconnaitront ici.

Cette recherche a été effectuée dans le cadre européen de l'Action EC COST D-18 "Lanthanide Chemistry for Diagnosis and Therapy" et du réseau d'excellence "European Molecular Imaging Laboratories" (EMIL) et a été financée par le CEA.

Abréviations

ABHF	Ayant-Belorizky-Hwang-Freed
ACX	Hexakis(2-O-carboxyméthyle-3,6-anhydro)-α-cyclodextrine
ADN	Acide désoxyribo-nucléique
BCX	Heptakis(2-O-carboxyméthyle-3,6-anhydro)-β-cyclodextrine
Bu_4NCl	Tétrabutylammonium
CaM	Calmoduline
CC	Champ cristallin
DL_{50}	Dose létale 50
DMF	Diméthylformamide
DOTA	1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tetraacétate
DTPA	Diéthylène triamine pentaacétate
DTPA-BMA	Diéthylène triamine bisamide tétraacétate
EDTA	Ethylène diamine-tétraacétate
EN	Ethylène diamine
EXSY	Exchange spectroscopy
HEPES	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-(2-étanesulfonique)
HMQC	Heteronuclear multi quanta coherence
HSA	Human serum albumin
IR	Infra-Rouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique nucléaire
IS	Inner-sphere
LBT	Lanthanide binding tag
Ln(III)	Cations lanthanides(III)
MES	Acide 4-morpholine éthanesulfonique
NMRD	Nuclear magnetic relaxation dispersion
NOE	Effet Overhauser nucléaire
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
OS	Outer-sphere
PA	Peptide acide c(GEWDPGDREP)
RAFT	Regioselectively addressable functionnalized template
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
PMF	Potentiel de force moyenne
PRE	Paramagnetic relaxation enhancement
ROESY	Rotating frame Overhauser effect spectroscopy
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
RX	Rayons X
SMB	Solomon-Bloembergen-Morgan
TAFI	Carboxypeptidase B
tBuOH	*Tert*-butanol
TFA	Acide trifluoroacétique
TMA^+	Tétraméthylammonium
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultra-Violet
ZFS	Zero field splitting
2S	Second-sphere

SOMMAIRE

INTRODUCTION **9**

CHAPITRE 1 : LES LANTHANIDES (III) **19**

I. PROPRIETES 21
I.1. Généralités *21*
I.2. Propriétés magnétiques et spectroscopiques des Ln(III) *26*
I.3. Complexation des lanthanides *28*
I.4. Propriétés de luminescence des complexes de Ln(III) *32*
I.5. Applications aux sondes luminescentes *37*
I.6. La RMN des complexes de Lanthanides(III) *41*
II. APPLICATIONS A LA DYNAMIQUE DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE : LES AGENTS DE CONTRASTE POUR L'IRM 50
II.1. Les propriétés magnétiques des agents de contraste *50*
II.2. Toxicité des agents de contraste à base de Gd(III) *54*
II.3. Mécanisme de relaxivité des complexes de Gd(III) *56*
II.4. Paramètres influant sur la relaxivité *61*
II.5. Détermination des paramètres de relaxation *67*

CHAPITRE 2 : NOUVELLES METHODES RELAXOMETRIQUES POUR LA CARACTERISATION D'INTERACTIONS SUPRAMOLECULAIRES EN SOLUTION **75**

I. POURQUOI DES DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES ? 77
I.1. Intérêt de l'utilisation des sondes *77*
I.2. Présentation des sondes utilisées *78*
II. DETERMINATION DE DIVERSES PROPRIETES MOLECULAIRES D'UN COMPLEXE PARAMAGNETIQUE 80
II.1. Charge électrique *80*
II.2. Equilibre de formation et structure *85*
II.3. Equilibre de transmétallation *99*
II.4. Temps de relaxation électronique *111*
III. BILAN ET PERSPECTIVES 116

CHAPITRE 3 : COMPLEXATION DES LANTHANIDES(III) PAR DES CYCLODEXTRINES MODIFIEES **119**

I. CYCLODEXTRINES ET LANTHANIDES A TRAVERS LA LITTERATURE 121
I.1. Présentation des cyclodextrines naturelles *121*
I.2. Complexes de lanthanides et cyclodextrines *123*
I.3. Les per(3,6-anhydro)-cyclodextrines *128*
II. MOLECULES ETUDIEES : OBJECTIF DU TRAVAIL 130
III. L'ACX : ETUDE THERMODYNAMIQUE 132
III.1. Etude des ligands libres *132*
III.2. Etude des complexes formés *133*
III.3. Confirmation de la spéciation par spectrométrie de masse *137*
III.4. Sélectivité vis-à-vis des cations biologiques *139*
IV. ETUDE STRUCTURALE 141
IV.1. Etude en solution par RMN du proton en fonction du rapport métal/ligand *141*
IV.2. Le complexe bimétallique M_2L *143*
IV.3. Structure de l'hydroxocomplexe $[Ln_2ACX(OH)_2]$ *147*
IV.4. Le complexe monométallique ML *150*
V. DETERMINATION DU NOMBRE DE MOLECULES D'EAU EN PREMIERE SPHERE DE COORDINATION DANS LE COMPLEXE MONOMETALLIQUE 152

V.1. Mesures par RMN de l'oxygène 17 ..... *152*
V.2. Mesures par luminescence *154*
V.3. Formation d'agrégats à fortes concentrations ? *156*
V.4. Conclusion *157*
VI. PROPRIETES DE RELAXATION DE L'ACX 158
VI.1. Relaxivité à haut champ (400 MHz) *158*
VI.2. Profil de relaxivité en fonction du champ *161*
VII. EFFET DES ALCALINS 167
VII.1. L'effet du potassium *167*
VII.2. Les autres alcalins *171*
VIII. ETUDE COMPLETE DE LA BCX 175
VIII.1. Effet du milieu et de la concentration *175*
VIII.2. Etude thermodynamique *175*
VIII.3. Etude structurale *177*
VIII.4. Propriétés de relaxation à haut champ *178*
VIII.5. L'origine de la relaxivité : des associations par liaisons hydrogène *179*
IX. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : LES PROPRIETES PARTICULIERES ET LES MYSTERES DE CES COMPLEXES 185

CHAPITRE 4 : COMPLEXATION DES LANTHANIDES(III) PAR UN DECAPEPTIDE CYCLIQUE 187

I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE 189
I.1. La calmoduline : une protéine à Ca^{2+} attractive pour la complexation des Ln(III) *189*
I.2. Peptides et lanthanides(III) *190*
I.3. Le RAFT : un décapeptide cyclique pouvant être fonctionnalisé régiosélectivement *197*
I.4. Choix du peptide et objectifs *198*
I.5. Synthèse du peptide *200*
II. STRUCTURE ET FLEXIBILITE DU PEPTIDE LIBRE 201
II.1. Détermination de la structure par RMN *201*
II.2. Résultats *204*
III. ETUDE DE LA COMPLEXATION DES LANTHANIDES(III) 210
III.1. Résultats *210*
III.2. Discussion *216*
IV. PROPRIETES DE RELAXATION DU COMPLEXE PEPTIDIQUE 218
IV.1. Relaxivité à haut champ *218*
IV.2. Etude relaxométrique *219*
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 224

CONCLUSION GENERALE 227

PARTIE EXPERIMENTALE 233

I. SYNTHESE DES LIGANDS 235
I.1. Synthèse des cyclodextrines modifiées *235*
I.2. Synthèse du peptide c(GEWDPGDREP) *236*
II. DOSAGES DES SOLUTIONS UTILISEES 237
Sels métalliques (dosages complexométriques) *237*
Peptide (dosage UV) *238*
III. ETUDES POTENTIOMETRIQUES 238
III.1. Matériel utilisé *238*
III.2. Calibration de l'électrode *239*
III.3. Dosages *239*
IV. SPECTROMETRIE DE MASSE ELECTROSPRAY (ES-MS) 240
V. LUMINESCENCE 241
V.1. Mesure du nombre de molécules d'eau coordonnées aux cations Eu(III) et Tb(III) *241*
V.2. Mesure de constantes de complexation du ligand peptidique *242*
VI. SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE 243
VI.1. Spectromètres RMN utilisés *243*
VI.2. Mesures de temps de relaxation *244*

VI.3. Mesures de coefficients de diffusion *247*
VI.4. Profils NMRD *248*
VI.5. Expériences de développements méthodologiques *249*
VI.6. RMN des complexes de cyclodextrine *251*
VI.7. Applications au peptide *253*
VII. SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE 254
VII.1. Principe de la RPE et appareillage utilisé *254*
VII.2. Mesures RPE réalisées *255*
VIII. DIFFRACTION AUX RAYONS X 256

ANNEXES 259

ANNEXE 1 : CONSTANTES D'EQUILIBRE.FORMALISME POUR LES EQUILIBRES DE COMPLEXATION 261
ANNEXE 2 : RELAXATION MONOEXPONENTIELLE DE L'AIMANTATION LONGITUDINALE SELON LE FORMALISME DE LUZ ET MEIBOOM 264
ANNEXE 3 : DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES 267
ANNEXE 4 : LES ACIDES AMINES 277

BIBLIOGRAPHIE 279

Introduction générale

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou IRM est un exemple remarquable des retombées que peuvent avoir les grandes découvertes de la physique fondamentale. Près de 30 ans après les premiers travaux sur la résonance magnétique nucléaire, l'IRM livre ses premières images en 1973 et fait son apparition en milieu hospitalier une dizaine d'années plus tard. Cette technique non invasive permet d'observer avec une précision anatomique de l'ordre du millimètre l'intérieur du corps humain. L'IRM est non seulement la technique d'imagerie donnant les informations anatomiques les plus riches, mais elle permet également d'obtenir des informations sur l'organisation spatiale des vaisseaux cérébraux (angiographie IRM), sur l'architecture fine du tissu neuronal et ses changements à l'échelle microscopique (IRM de diffusion), ou la distribution du sang dans le cerveau (IRM fonctionnelle). Indispensable aux diagnostics de nombreuses pathologies comme les tumeurs, angiomes, ou accidents vasculaires, elle a également été le point de départ de toute l'étude du fonctionnement du cerveau. La recherche en neurosciences s'appuie en effet sur une observation en temps réel des variations de l'oxygénation du sang, qui met en avant les zones du cerveau stimulées (Figure 1).

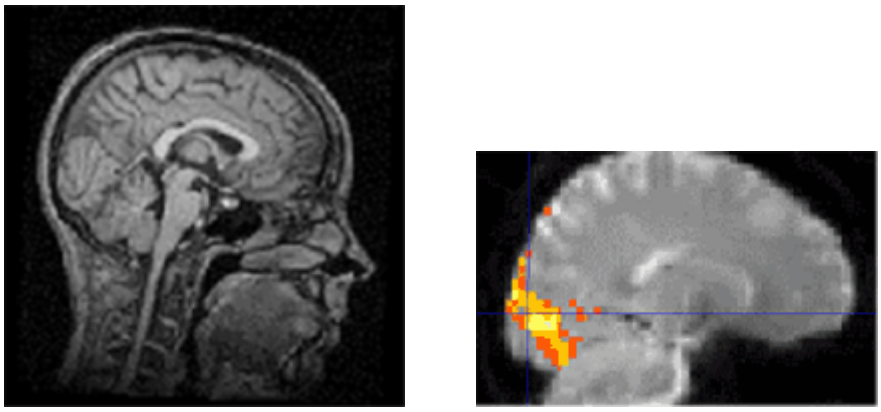


Figure 1 : Coupe sagittale de cerveau obtenue en IRM anatomique (à gauche) et réponse à un stimuli lumineux observée en IRM fonctionnelle (à droite).

L'IRM est basée sur la détection de signaux de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), c'est à dire de l'aimantation des spins nucléaires, localisés dans l'espace. Pour l'IRM anatomique, ce sont les spins nucléaires des protons de l'eau qui sont détectés. En effet, le corps humain étant fait essentiellement d'eau et de graisse, les atomes d'hydrogène en représentent 63%. Le patient est placé dans un champ magnétique intense B (1,5 T pour la plupart des appareils cliniques actuellement vendus). L'application d'un gradient de champ magnétique selon les trois directions de l'espace permet de repérer la position spatiale des

protons des molécules d'eau en fonction de leurs fréquences de résonance. Si le patient reste suffisamment immobile, l'eau peut ainsi être localisée dans ses différents tissus. A la différence du scanner à rayons X, qui utilise des rayons ionisants et ne montre qu'un seul type de contraste, au moins trois paramètres entrent en jeu pour la définition du contraste en IRM :

- La densité de protons : les tissus riches en eau produiront un signal intense.
- Le temps de retour à l'équilibre longitudinal de l'aimantation des protons (T_1) : les signaux sont d'autant plus intenses que la vitesse de retour à l'équilibre longitudinal, $1/T_1$, est élevé.
- Le temps de retour à l'équilibre transversal de l'aimantation des protons (T_2) : les signaux sont d'autant plus intenses que la vitesse de retour à l'équilibre transversal, $1/T_2$, est faible.

Le contraste de l'image peut être modulé en faisant varier l'importance relative des paramètres tissulaires. Ces paramètres, constants pour un tissu donné, sont toutefois altérés par des processus pathologiques qui seront détectables par IRM. Le principal inconvénient de l'IRM reste sa faible sensibilité. Malgré une résolution spatiale excellente, il est souvent nécessaire de réaliser une acquisition relativement longue sur le patient (environ 20 min) pour obtenir à la fois une sensibilité (rapport signal sur bruit) et une résolution spatiale suffisantes. C'est pour cette raison que dans de nombreux cas (à part pour l'imagerie fonctionnelle cérébrale) il est nécessaire d'injecter un agent de contraste au patient par voie intraveineuse. Cette molécule, aux propriétés magnétiques particulières (paramagnétisme), va se localiser dans des zones spécifiques (malades) et modifier les vitesses de retour à l'équilibre longitudinales et transversales des protons de son entourage, créant ainsi un contraste spécifique à ces zones. La combinaison d'un contraste accru et d'une vitesse de retour à l'équilibre transversal plus rapide va permettre de réaliser des acquisitions plus courtes et de meilleure qualité. L'efficacité d'un agent de contraste, autrement dit sa capacité à augmenter les vitesses de relaxation des protons des molécules d'eau voisines, est appelée relaxivité. Actuellement près de 30% des examens IRM requièrent l'utilisation d'un agent de contraste.

C'est ainsi que le gadolinium(III), un lanthanide paramagnétique jusqu'alors inutilisé, s'est trouvé au centre d'une révolution médicale de première importance. Depuis l'approbation du premier agent de contraste à base de Gd(III) en 1988, le $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$, 30 tonnes de gadolinium ont ainsi été administrées à des patients à travers le monde.

Les agents de contraste peuvent être classés en fonction de leurs propriétés magnétiques, de leur biodistribution et de leurs effets sur les images, comme le montre la Figure 2.

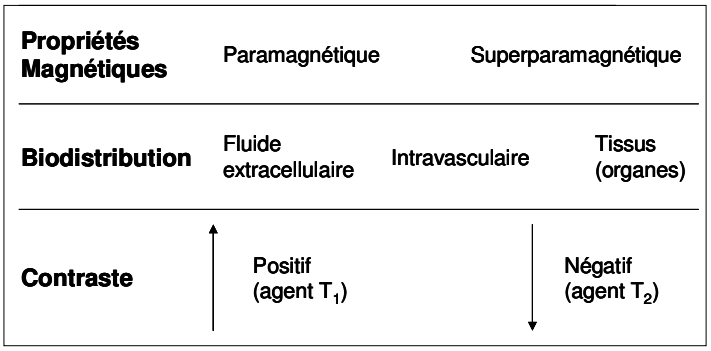


Figure 2 : Classification des agents de contraste pour l'IRM en fonction de leurs propriétés magnétiques et de leur biodistribution.

Il existe des agents de type T_1 et T_2, suivant qu'ils affectent la vitesse de relaxation longitudinale $1/T_1$, ou transversale $1/T_2$. Les signaux IRM augmentent quand $1/T_1$ augmente et diminuent quand $1/T_2$ augmente (Figure 3). Les séquences impulsionelles mettant en avant les changements de T_1 sont des séquences pondérées T_1, alors que celles mettant en avant les agents T_2 sont des séquences pondérées T_2. Suivant leur nature chimique, les agents de contraste vont être plus efficace en T_1 ou en T_2. En général les agents de contraste qui augmentent $1/T_1$ et $1/T_2$ de la même manière sont mieux visualisés par des séquences pondérées T_1, car les changements de $1/T_1$ sont plus importants que ceux de $1/T_2$ dans les tissus. Les progrès dans le domaine de l'IRM ont plutôt favorisé les agents T_1. En effet, dans un souci d'améliorer la résolution spatiale et la sensibilité dans le même temps, il faut utiliser des séquences de mesures toujours plus rapides. Or, la vitesse de relaxation longitudinale correspond à une vitesse de retour à l'équilibre de l'aimantation, alors que la vitesse de relaxation transversale correspond à un simple déphasage de l'aimantation. Diminuer le temps de retour à l'équilibre longitudinal permet de diminuer le délai entre chaque impulsion et de réaliser des acquisitions plus rapides.

La biodistribution des agents de contraste est essentielle car c'est elle qui va déterminer son utilisation. L'idéal serait bien sûr d'avoir un agent de contraste très ciblé, allant se localiser uniquement sur une zone malade. En pratique, la biodistribution va dépendre essentiellement de la taille de l'agent de contraste. La plupart des agents de contraste commerciaux sont des agents extracellulaires de petite taille, diffusant rapidement du sang au liquide interstitiel. Ces

agents sont utilisés typiquement pour la détection de tumeurs dans le cerveau. En effet, la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) empêche la diffusion de ces espèces dans le cerveau lorsqu'elle est intacte. En présence d'une tumeur cette barrière est lésée et l'agent de contraste s'accumule dans la zone malade. Ces agents sont éliminés par les reins au bout de 80 minutes environ.

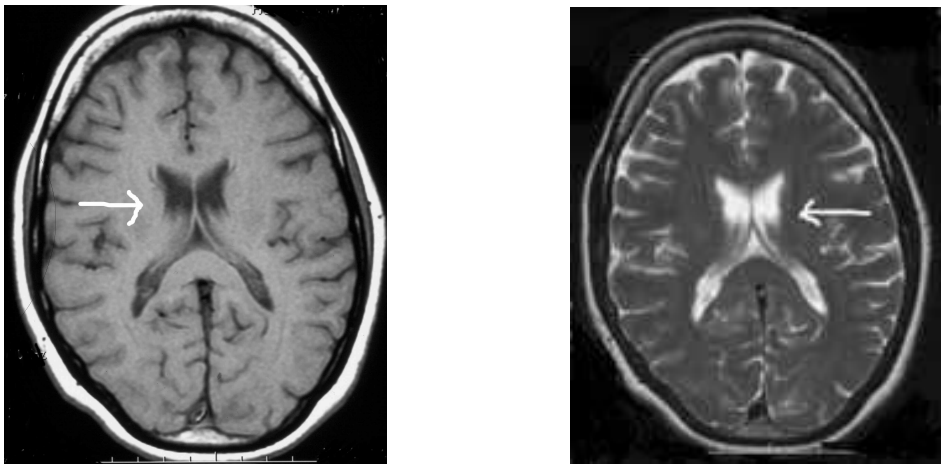


Figure 3 : Coupe IRM de cerveau en l'absence d'agents de contraste. Observation par une séquence T_1 (à gauche) : la graisse est hyperintense; le liquide du sytème ventriculaire (flêche) est hypointense. Séquence T_2 (à droite) : la graisse est hypointense; le liquide du sytème ventriculaire est hyperintense.

La deuxième grande classe d'agents commerciaux regroupe les agents intravasculaires qui sont plus gros que les précédents, empêchant ainsi la diffusion dans le liquide interstitiel. Ils restent plus longtemps dans le sang, donnant ainsi la possibilité de réaliser des acquisitions longues et d'améliorer la résolution spatiale ou le rapport signal/bruit. Ces agents ont été développés pour leurs potentialités dans le domaine de l'angiographie (imagerie des vaisseaux sanguins). Ils représentent en effet une alternative très intéressante à l'angiographie par rayons X. Cette dernière technique nécessite une ponction d'artère et d'importants volumes d'agent de contraste iodé doivent être injectés rapidement pour créer le contraste. En plus d'être onéreuse, l'angiographie par rayons X est douloureuse. Lors de l'angiographie IRM, le contraste est créé par une simple injection intraveineuse. L'agent de contraste commercial (MS-325) se lie à l'albumine de sérum, augmentant ainsi sa durée de vie dans le sang. La Figure 4 représente le contraste obtenu avec le MS-325 en comparaison avec un agent de contraste extracellulaire. L'augmentation de la durée de vie permet l'utilisation de séquences haute résolution imageant tous les détails du système vasculaire.[1]

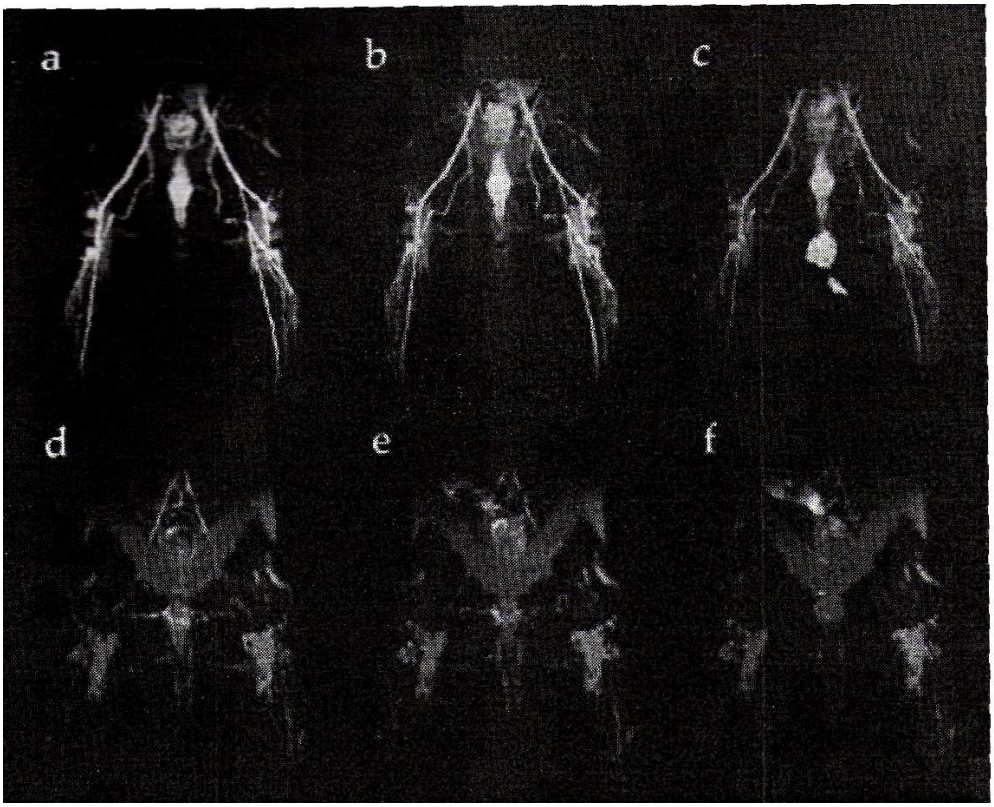


Figure 4 : Images par résonance magnétique d'arrières trains de lapin après injection soit de MS-325 (0,025 mmol.kg^{-1} ; a-c), soit de GdDTPA (0,1 mmol.kg^{-1} ; d-f). Les images ont été enregistrées 5 (a,d), 30 (b,e) et 60 min après injection (c,f). La différence de contraste est flagrante entre le MS-325 et le Gd(DTPA).[1]

Les recherches actuelles dans ce domaine visent à obtenir des agents de contraste ciblant un tissu particulier ou à développer des agents de contraste dits bifonctionnels. Une des fonctionnalités permet la complexation du centre paramagnétique et l'autre permet de reconnaître spécifiquement une protéine par exemple. La Figure 5 présente un bel exemple de ciblage d'un site endothélial (cellules recouvrant la paroi interne des vaisseaux et du cœur), marqueur spécifique de l'angiogenèse, autrement dit du développement de réseaux vasculaires dans les processus pathologiques. La présence du récepteur endothélial $\alpha_v\beta_3$ est liée à une certaine catégorie de tumeur. La sonde utilisée dans ce travail est un liposome polymérisé avec des molécules contenant du Gd(III). Le récepteur endothélial $\alpha_v\beta_3$ est reconnu par un anticorps lié à une biotine, elle-même reconnue par l'avidine à la surface du liposome. Cette approche, testée sur le lapin, permet une détection accrue et plus détaillée de cancer à travers une imagerie de type vasculaire (angiographie).[2]

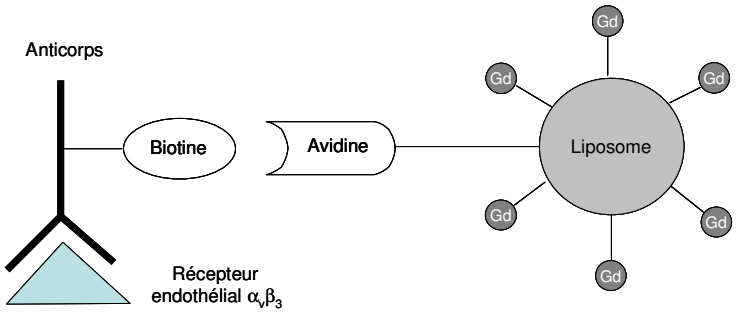


Figure 5 : Ciblage du récepteur endothélial $\alpha_v\beta_3$ comme marqueur spécifique de l'angiogenèse.[2]

En plus d'un meilleur ciblage, les efforts actuels de la recherche dans le domaine des agents de contraste portent sur leur efficacité (relaxivité). Une meilleure relaxivité doit permettre de diminuer les quantités injectées et/ou d'obtenir un meilleur contraste des zones à explorer. Pour cela, deux buts sont principalement poursuivis :

- au niveau des applications cliniques, aux champs B de 1,5 T, atteindre l'efficacité maximale prévue par la théorie, mais non atteinte actuellement pour des raisons pratiques.
- au niveau de la recherche animale, avoir une efficacité beaucoup plus importante que celle des agents actuels aux champs des imageurs animaux ($B \geq 7$ T). Cela permettrait d'atteindre une meilleure sensibilité et donc une meilleure résolution temporelle dans le même temps.

L'IRM a donc permis des progrès indéniables dans le domaine de la médecine diagnostique. Bon nombre de ces progrès n'auraient pas eu lieu sans l'aide des agents de contraste, et de la recherche fondamentale en amont, concernant la compréhension de leur mécanisme d'action. Afin de toujours mieux prévoir quelles molécules seront actives et intéressantes, il est essentiel d'arriver à relier la structure des molécules à leurs propriétés, ainsi que de comprendre les interactions que ces molécules subissent en solution. Dans ce cadre, nous avons choisi de nous intéresser à la complexation des Ln(III) par de nouveaux ligands d'origine biologique pour l'IRM. Cette étude se situe tant du point de vue thermodynamique, structural, que de celui du développement de nouvelles méthodes pour la caractérisation de ces complexes labiles en solution, caractérisation qui représente un véritable challenge de la chimie actuelle.

Au cours du premier chapitre de ce manuscrit, nous allons nous attacher à comprendre les propriétés exceptionnelles de la famille des lanthanides dont le gadolinium est issu. Nous verrons que malgré leur comportement chimique très similaire, les Ln(III) possèdent des richesses insoupçonnées au niveau de leurs propriétés spectroscopiques qui rendent leur utilisation incontournable aussi bien dans le domaine des sondes fluorescentes que dans celui des agents de contraste pour l'IRM. Le but de cette partie n'est pas de dresser un bilan exhaustif de l'utilisation des lanthanides, mais bien de donner les directions générales qui sous-tendent la recherche actuelle dans ce domaine.

Au cours de la deuxième partie, nous verrons que la relaxivité, paramètre caractéristique des agents de contraste exploitée dans le domaine de l'IRM, est en fait un outil beaucoup plus général, permettant de mettre en évidence des interactions supramoléculaires en solution. Des mesures de temps de relaxation sur des sondes nucléaires judicieusement choisies nous permettront non seulement de déterminer des paramètres essentiels à la caractérisation d'un agent de contraste, mais également de déterminer de faibles constantes d'association en solution, ou de relier la dynamique à la taille et à la charge des espèces présentes.

Enfin, les deux dernières parties se focaliseront sur l'étude de systèmes complexes, labiles possédant des plateformes dérivées de molécules biologiques comme les cyclodextrines (sucres) ou les peptides. Cette étude fondamentale s'intéresse aux propriétés de coordination de ces nouveaux systèmes afin de caractériser les complexes formés en solution. Les propriétés de relaxivité seront également étudiées puisque ces nouveaux complexes présentent des relaxivités élevées, en particulier à haut champ. Cette étude n'a toutefois pas la prétention de présenter de nouveaux agents de contraste à visée médicale puisque les complexes formés sont trop peu stables thermodynamiquement, mais se veut exploratrice de nouvelles familles de ligands. Nous avons en effet voulu évaluer les potentialités des complexes formés, rationaliser les fortes relaxivités afin de voir s'il est nécessaire de poursuivre dans cette voie par la suite, en modifiant le ligand de façon chimique afin d'obtenir des complexes plus stables.

1

Les Lanthanides (III)

I. PROPRIETES 21
I.1. Généralités *21*
I.1.1. Définition 21
I.1.2. Configuration électronique 23
I.1.3. Propriétés chimiques des lanthanides(III) 23
I.2. Propriétés magnétiques et spectroscopiques des Ln(III) *26*
I.3. Complexation des lanthanides *28*
I.3.1. Le principe clé-serrure 29
I.3.2. Le concept d'ajustement induit 30
I.4. Propriétés de luminescence des complexes de Ln(III) *32*
I.4.1. Définition 32
I.4.2. La luminescence des Ln(III) 33
I.4.3. Exalter la luminescence des lanthanides : l'effet antenne 34
I.4.4. Extinction de la luminescence par H_2O 35
I.5. Applications aux sondes luminescentes *37*
I.5.1. Détection analytique 37
I.5.2. Tests immunologiques 39
I.5.3. Les techniques d'imagerie 40
I.6. La RMN des complexes de Lanthanides(III) *41*
I.6.1. Déplacement chimique paramagnétique 42
I.6.2. Temps de relaxation44
I.6.3. Les Ln(III) comme sondes pour la résolution de structure 47
II. APPLICATIONS A LA DYNAMIQUE DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE : LES AGENTS DE CONTRASTE POUR L'IRM 50
II.1. Les propriétés magnétiques des agents de contraste *50*
II.1.1. Les agents paramagnétiques 50
II.1.2. Les agents superparamagnétiques 52
II.2. Toxicité des agents de contraste à base de Gd(III) *54*
II.3. Mécanisme de relaxivité des complexes de Gd(III) *56*
II.3.1. Mécanisme de sphère interne (IS) 57
II.3.2. Mécanisme de sphère externe (OS) 59
II.3.3. Mécanisme de seconde sphère (2S) 60
II.4. Paramètres influant sur la relaxivité *61*
II.4.1. Nombre de molécules d'eau coordonnées en sphère interne, q 61
II.4.2. Distance Gd(III)-proton, r_{GdH} 63
II.4.3. Temps de corrélation rotationnelle, τ_R 63
II.4.4. Vitesse d'échange des molécules d'eau, k_{ex} 64
II.4.5. Temps de relaxation électronique, T_{ie}66
II.5. Détermination des paramètres de relaxation *67*
II.5.1. Profils NMRD 67
II.5.2. Détermination des paramètres influant la relaxivité 68
II.5.3. Exemples de profils NMRD 71

Cette première partie a pour but de présenter quelques applications choisies de la chimie des Ln(III). Pour cela, nous verrons dans un premier temps, les propriétés très générales de ces Ln(III) expliquant un comportement chimique similaire au sein de la série, mais en revanche des propriétés physiques (spectroscopiques) variées qui en font toute leur richesse. Ainsi, le contrôle de la sphère de coordination des complexes de Ln(III) est essentiel pour orienter les applications. Nous nous intéresserons plus particulièrement à deux types d'applications de ces complexes pouvant offrir des débouchés dans l'imagerie médicale : les agents luminescents, et surtout les agents de contraste pour l'IRM.

I. Propriétés

I.1. Généralités

I.1.1. Définition

Les éléments f regroupent deux familles dans la classification périodique des éléments chimiques de Mendeleïev : les lanthanides (15 éléments allant du lanthane au lutécium et de numéro atomique variant de 57 à 71) et les actinides (15 éléments allant de l'actinium au lawrencium et de numéro atomique variant de 89 à 103). Ces deux familles sont représentées en jaune dans le tableau périodique (Figure 1.1).

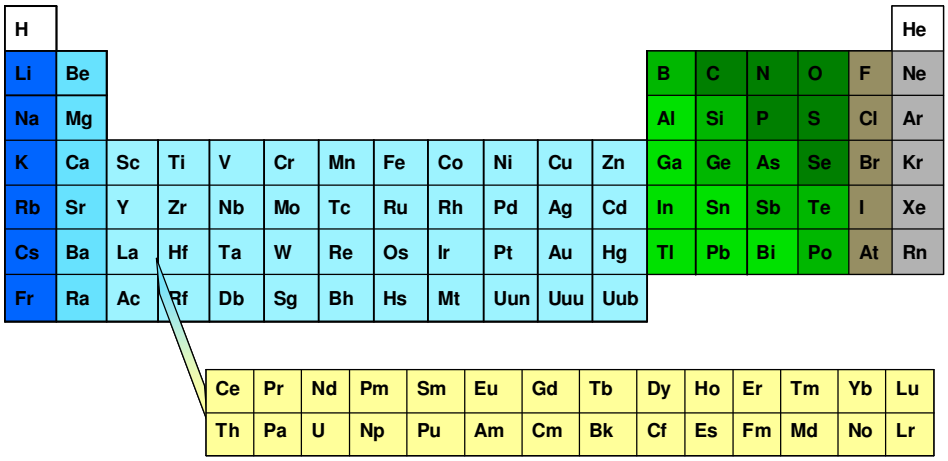


Figure 1.1 : Classification périodique des éléments de Mendeleïev.

Il faut noter que parmi les actinides, seuls les premiers de la série, jusqu'à l'uranium, se trouvent à l'état naturel. Tous les actinides plus lourds sont générés de façon artificielle dans

un réacteur nucléaire, et sont radioactifs. Les applications des actinides concernent essentiellement l'industrie nucléaire et ne sont pas l'objet de ce manuscrit. Nous nous concentrerons donc sur les lanthanides par la suite.

Tableau 1.1 : Abondance naturelle A des lanthanides dans la croûte terrestre.[3]

Elément	Ln	A ($\mu g.g^{-1}$)
lanthane	La	18,0
cérium	Ce	46,0
praséodyme	Pr	6,0
néodyme	Nd	24,0
prométhium	Pm	0*
samarium	Sm	6,5
europium	Eu	1,0
gadolinium	Gd	6,5
terbium	Tb	1,0
dysprosium	Dy	4,5
holmium	Ho	1,0
erbium	Er	2,5
thulium	Tm	0,1
ytterbium	Yb	2,5
lutécium	Lu	0,9

* élément artificiel

La quasi identité des propriétés physiques et chimiques de l'yttrium et du scandium avec celles des lanthanides conduit naturellement à regrouper ces 17 éléments sous le nom de « terres rares ». Ce nom est historiquement associé à la difficulté que les chimistes avaient à les isoler sous une autre forme que l'oxyde, très réfractaire (terre en ancienne chimie). L'épithète rare rappelle leur faible concentration dans les minerais, bien que l'abondance naturelle soit globalement plus importante que celle de l'argent, du cuivre, du plomb ou de l'or (Tableau 1.1).

I.1.2. Configuration électronique

La configuration électronique des lanthanides correspond au remplissage progressif de la couche 4f qui est blindée par les couches externes $5s^2$ $5p^6$.

Tableau 1.2 : Configuration électronique des lanthanides.

Lanthanide	Configuration électronique
La	[Xe] $5d^1$ $6s^2$
Ce	[Xe] $5d^1$ $6s^2$ $4f^1$
Pr	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^3$
Nd	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^4$
Pm	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^5$
Sm	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^6$
Eu	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^7$
Gd	[Xe] $5d^1$ $6s^2$ $4f^7$
Tb	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^9$
Dy	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^{10}$
Ho	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^{11}$
Er	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^{12}$
Tm	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^{13}$
Yb	[Xe] $5d^0$ $6s^2$ $4f^{14}$
Lu	[Xe] $5d^1$ $6s^2$ $4f^{14}$

Les lanthanides existent tous majoritairement à l'état trivalent et présentent alors la configuration électronique [Xe] $5p^0$ $6s^0$ $4f^n$. Ainsi, ces ions lanthanides trivalents (notés Ln^{3+} ou Ln(III)) auxquels nous nous intéresserons dans la suite de ce manuscrit présentent une remarquable homogénéité de leurs propriétés chimiques.

I.1.3. Propriétés chimiques des lanthanides(III)

Les électrons de « valence » des orbitales 4f sont « enfouis » dans le nuage électronique et sont donc très peu sensibles à l'environnement chimique. Ceci a plusieurs conséquences.

Tout d'abord les ions lanthanides sont des acides durs dans la classification de Pearson des acides et bases durs et mous. Ils vont donc interagir préférentiellement avec des ligands durs, contenant entre autres des atomes donneurs d'oxygène (eau, carboxylates, alcoolates,...). Une

de ces conséquences est leur très forte enthalpie d'hydratation (voir Tableau 1.3).[3] Leur forte acidité au sens de Lewis conduit également à une activation d'atomes d'hydrogène présents sur les molécules d'eau coordonnées au cation métallique, favorisant ainsi la formation d'hydroxocomplexes. Ces hydroxocomplexes de lanthanides sont insolubles à partir de pH de l'ordre de 6. Les constantes d'hydrolyse β_{10-1} (voir annexe 1 pour le formalisme thermodynamique) des Ln(III) sont très élevées et sont également données dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Enthalpies d'hydratation et constantes d'hydrolyse des Ln(III).[3,4]

Lanthanide	$-\Delta H^0_{hyd}$(kJ.mol^{-1})	$-\log\beta_{10-1}$
La	3326	9,10
Ce	3380	10,60
Pr	3421	8,59
Nd	3454	8,47
Pm	3482	8,38
Sm	3512	8,38
Eu	3538	8,35
Gd	3567	8,39
Tb	3600	8,20
Dy	3634	8,14
Ho	3663	8,08
Er	3692	8,03
Tm	3717	7,99
Yb	3740	7,96
Lu	3759	7,94

Une autre conséquence de la profondeur des orbitales 4f est que le champ cristallin est très faible, de l'ordre de quelques centaines de cm^{-1}, contre 5000 à 30 000 cm^{-1} pour les métaux de transition. D'un point de vue structural, les liaisons métal-ligand présentent une absence de directionnalité. La position des différents ligands dans la sphère de coordination est conditionnée essentiellement par les interactions électrostatiques et stériques entre le cation métallique et les ligands. Ceux-ci s'organisent au mieux autour du cation métallique de façon à minimiser l'énergie électrostatique et les interactions stériques répulsives.

Enfin, la taille de l'ion varie de façon monotone tout au long de la série. En effet, du début à la fin de la série, le rayon ionique décroît régulièrement. Ce phénomène est appelé « contraction lanthanidique ». Ce rayon ionique est un paramètre effectif, fonction du nombre de coordination (CN) des lanthanides(III) en solution, qui représente le nombre de liaisons métal-ligand (voir Tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Rayons ioniques (en Å) des ions lanthanides(III) pour différents nombres de coordination, CN.[5]

Lanthanide	CN = 6	CN = 7	CN = 8	CN = 9	CN = 10	CN = 12
La	1,032	1,100	1,160	1,216	1,270	1,360
Ce	1,010	1,070	1,143	1,196	1,250	1,340
Pr	0,990		1,126	1,179		
Nd	0,983		1,109	1,163		1,270
Sm	0,958	1,020	1,079	1,132		1,240
Eu	0,947	1,010	1,066	1,120		
Gd	0,938	1,000	1,053	1,107		
Tb	0,923	0,980	1,040	1,095		
Dy	0,912	0,970	1,027	1,083		
Ho	0,901		1,015	1,072	1,120	
Er	0,890	0,945	1,004	1,062		
Tm	0,880		0,994	1,052		
Yb	0,868	0,925	0,985	1,042		
Lu	0,861		0,977	1,032		

Les nombres de coordination les plus fréquents des lanthanides(III) sont 8 ou 9, mais ils peuvent varier de 6 à 12. Pour un ion donné, lorsque ce nombre de coordination passe de 6 à 12, le rayon ionique augmente de 0,3 Å environ. Les lanthanides s'adaptent à différents environnements, ce qui leur vaut le surnom de « caméléons » de la chimie de coordination.

Pour résumer, ce sont les interactions électrostatiques, qui ne sont pas des interactions spécifiques, qui gouvernent la chimie de coordination des lanthanides. En revanche, malgré des propriétés chimiques très similaires tout au long de la série, les propriétés magnétiques et spectroscopiques des lanthanides diffèrent grandement.

I.2. Propriétés magnétiques et spectroscopiques des Ln(III)

Les ions Ln(III) de configuration électronique $4f^n$ sont paramagnétiques dans leur état fondamental, à l'exception du lanthane(III) et du lutécium(III). Chaque électron 4f est caractérisé par les 4 nombres quantiques n = 4, l = 3 , m_l et m_s. Il est possible de décrire les niveaux d'énergie électronique des ions Ln(III) par un traitement de perturbation d'intensité décroissante : la répulsion électronique, le couplage entre le spin et l'orbite de l'électron, le champ cristallin dû au ligand. Les ions libres sont alors caractérisés par leur multiplicité de spin S, leur moment angulaire orbitalaire L, et leur moment cinétique total $\vec{J} = \vec{L} + \vec{S}$, avec $|L - S| \leq J \leq |L + S|$. Grâce à l'ensemble de ces trois nombres quantiques, il est alors possible de décrire les niveaux d'énergie de l'ion libre, qui ne sont que très peu perturbés par les effets de champ cristallin. Les différents niveaux d'énergie possibles dans le cas de l'Eu(III) sont représentés Figure 1.2.

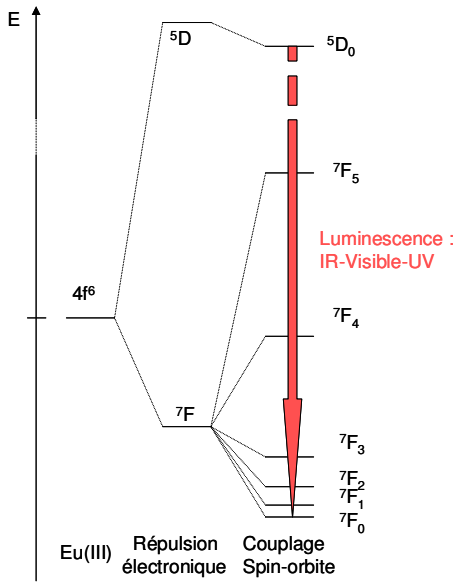


Figure 1.2 : Représentation des niveaux électroniques $^{2S+1}L_J$ des Ln(III) sur l'exemple de l'Eu(III), avec la technique associée pour observer les transitions possibles entre niveaux électroniques.

Le moment magnétique μ_J de l'ion est donné par l'équation 1.1 et la valeur du facteur de Landé correspondant g_J, par l'équation 1.2.[6]

$$\mu_J = g_J \sqrt{J(J+1)} \qquad \textbf{équation 1.1}$$

$$g_J = \frac{3}{2} + \frac{S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \qquad \textbf{équation 1.2}$$

Les niveaux fondamentaux des Ln(III) ainsi que les moments magnétiques théoriques et expérimentaux sont regroupés dans le Tableau 1.5.

Tableau 1.5 : Propriétés électroniques des ions Ln(III) (g_J et μ_J sont calculés à partir des équations 1.1 et 1.2 ; μ_J^{exp} provient de la référence[7], les moments magnétiques sont exprimés en magnéton de Bohr).

Ion	Configuration	Terme fondamental $^{2S+1}L_J$	g_J	μ_J	μ_J^{exp}
Ce^{3+}	$4f^1$	$^2F_{5/2}$	6/7	2,54	2,46
Pr^{3+}	$4f^2$	$^{31}H_4$	4/5	3,58	3,47
Nd^{3+}	$4f^3$	$^4I_{9/2}$	8/11	3,62	3,52
Pm^{3+}	$4f^4$	$^5I_4$	3/5	2,68	-
Sm^{3+}	$4f^5$	$^6H_{5/2}$	2/7	0,84	1,58
Eu^{3+}	$4f^6$	$^7F_0$	0	0	3,54
Gd^{3+}	$4f^7$	$^8S_{7/2}$	2	7,84	7,90
Tb^{3+}	$4f^8$	$^7F_6$	3/2	9,72	9,60
Dy^{3+}	$4f^9$	$^6H_{15/2}$	4/3	10,65	10,30
Ho^{3+}	$4f^{10}$	$^5I_8$	5/4	10,61	10,40
Er^{3+}	$4f^{11}$	$^4I_{15/2}$	6/5	9,60	9,40
Tm^{3+}	$4f^{12}$	$^3H_6$	7/6	7,56	7,00
Yb^{3+}	$4f^{13}$	$^2F_{7/2}$	8/7	4,53	4,30

Les moments magnétiques théoriques et expérimentaux du samarium(III) et de l'europium(III) sont différents. Pour ces deux ions, la proximité des premiers états excités fait qu'ils sont peuplés à température ambiante et la formule de l'équation 1.1 ne peut plus être appliquée.

Ces propriétés électroniques et magnétiques sont caractéristiques de chaque ion Ln(III). La combinaison de ces propriétés spécifiques et de propriétés chimiques similaires en fait une famille à part. Tout d'abord au niveau de l'analyse structurale, dans un complexe de Ln(III) donné, le cation pourra être remplacé par un autre lanthanide(III) aux propriétés magnétiques et spectroscopiques intéressantes, sans que le comportement chimique du complexe ne soit altéré de façon significative. Ensuite, ces ions sont capables de s'adapter à tous les environnements et peuvent ainsi être introduits dans des édifices ioniques, moléculaires, et supramoléculaires où leurs propriétés spectroscopiques pourront être observées.

I.3. Complexation des lanthanides

La connaissance de la sphère de coordination des Ln(III) est cruciale puisque c'est elle qui guidera les applications potentielles de ces complexes. De façon très générale, la formation de complexes définis, autrement dit stables thermodynamiquement et cinétiquement, est recherchée car elle permet un vaste champ d'applications. Il faut donc veiller à saturer la première sphère de coordination et à maximiser la force de l'interaction Ln-Ligand. Cela amène à considérer des ligands possédant plusieurs atomes donneurs durs. D'autre part, pour que la formation d'un complexe ait lieu, il faut que l'énergie mise en jeu lors de la réaction soit minimale. La variation d'énergie est due aux variations d'entropie et d'enthalpie. En solution aqueuse, pour la complexation de Ln(III) par des ligands ioniques, ces variations sont le plus souvent gouvernées par les changements d'hydratation, à la fois du ligand et du cation métallique. La complexation conduit à une diminution de l'hydratation, donc à une entropie positive qui est un facteur favorable à cette complexation. Mais cette déshydratation est également endothermique, et la formation de liaisons entre le cation et le ligand ne suffit pas toujours à compenser les enthalpies d'hydratation élevées des lanthanides(III). Le processus de complexation est très souvent gouverné par l'entropie, il est donc avantageux d'avoir recours à des ligands polydentes et ainsi de bénéficier de l'effet chélate.

En plus des agents chélatants classiques tels que les poly(aminocarboxylates) ou β-dicétonates, différentes stratégies ont été développées pour la conception de complexes de lanthanides mono ou polymétalliques. Ces approches peuvent être regroupées en trois catégories :

- l'utilisation de ligands macrocycliques préorganisés (éther couronnes ou cryptands) ou prédisposés (calixarènes fonctionnalisés avec des bras complexants),
- l'utilisation de podands,
- l'utilisation de procédés d'auto-assemblage.

Ces approches reposent sur deux principes qui vont être développés par la suite, le principe clé-serrure et le principe d'ajustement induit.

I.3.1. Le principe clé-serrure

Comme les Ln(III) sont sphériques, l'idée est d'appliquer le concept clé-serrure mis en avant par Fischer en 1894, et déjà utilisé pour la complexation sélective des alcalins. Le ligand monocyclique ou polycyclique doit posséder assez d'atomes donneurs pour compléter la majorité de la sphère de coordination du cation métallique, mais il doit également s'adapter parfaitement au diamètre de l'ion Ln(III) considéré (voir Figure 1.3).

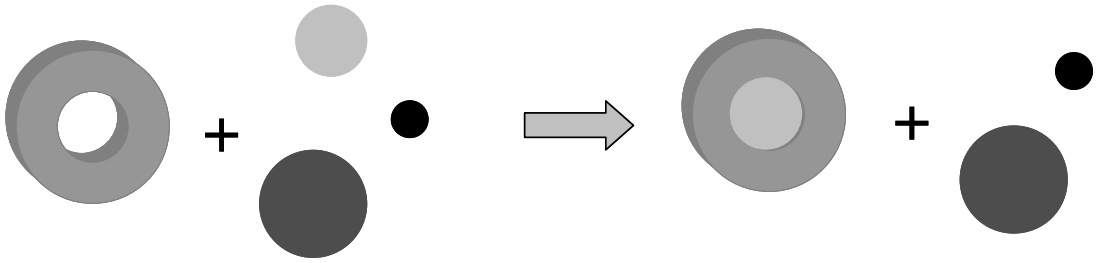
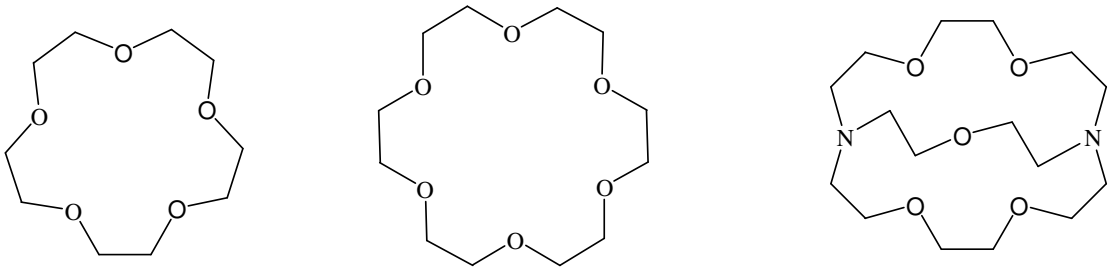


Figure 1.3 : Illustration schématique du principe clé-serrure (Emil Fischer, 1894).

L'application de ce principe aux éléments 4f a toutefois été décevante en raison de la faible variation de taille des ions au sein de la série. Une famille de ligands connus, les éthers couronnes, a été étudiée dans ce cadre. Pour une taille de cavité donnée, par exemple l'éther couronne 18C6 (Figure 1.4), la variation d'affinité le long de la série est donnée par : $\Delta\log\beta_{110}$(La-Lu) = 1,25.[8] De plus, une différence de stabilité du même ordre de grandeur est rapportée pour l'éther couronne 15C5 (Figure 1.4), $\Delta\log\beta_{110}$(La-Lu) = 0,7. En fait, l'addition d'un groupement $–CH_2-CH_2-O-$ agrandit la cavité d'un éther couronne de 0,5-0,7 Å, ce qui est supérieur à la différence de diamètre ionique entre le La(III) et le Lu(III). En d'autres termes, la taille de la cavité des ethers couronnes ne peut pas être ajustée assez finement pour s'adapter à un ion Ln(III) donné.



15C5 **18C6** **[2,2,1]**

Figure 1.4 : Structure chimique de deux éthers couronnes monocycliques, 15C5 et 18C6, et d'un cryptand tridimensionnel [2,2,1].

Le passage à des cavités tridimensionnelles ne permet pas de résoudre ce problème. Par exemple, tous les Ln(III) ont une affinité telle que $\log \beta_{110} = 6{,}5$ pour le cryptand [2,2,1] (Figure 1.4).[8] La cavité est en effet légèrement trop grande pour les Ln(III) les plus petits et légèrement trop petite pour les plus volumineux, mais arrive plus ou moins à s'adapter à chaque ion en raison de la flexibilité des chaînes liées aux atomes d'azote.
Les affinités et sélectivités obtenues avec ces ligands restent donc très faibles.

I.3.2. Le concept d'ajustement induit

Le concept d'ajustement induit est né dans les années 60 et prend en compte la flexibilité du ligand. L'image associée est l'ajustement d'une main dans un gant :[9] le ligand peut « s'enrouler » autour de l'ion, formant ainsi une cavité mieux adaptée à la taille de l'ion. L'utilisation de ce principe a donné naissance à de nombreuses familles de ligands (Figure 1.5).

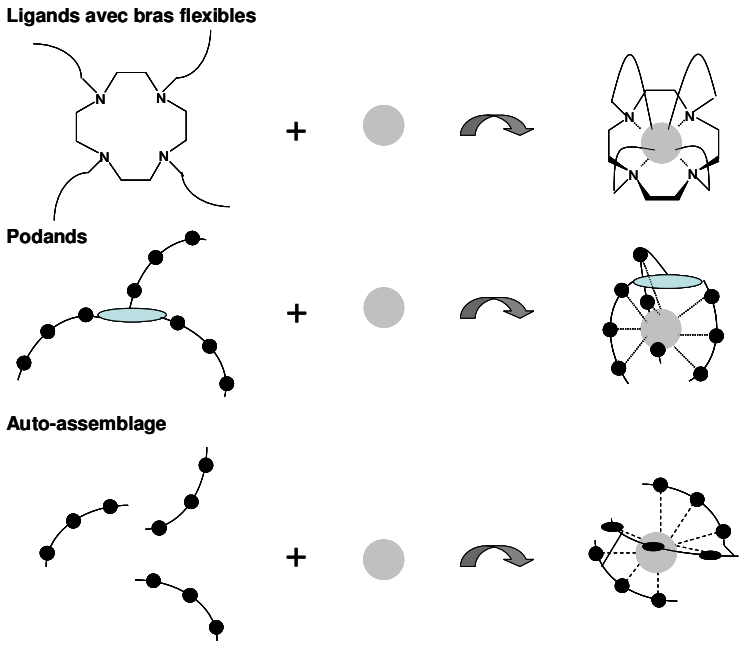
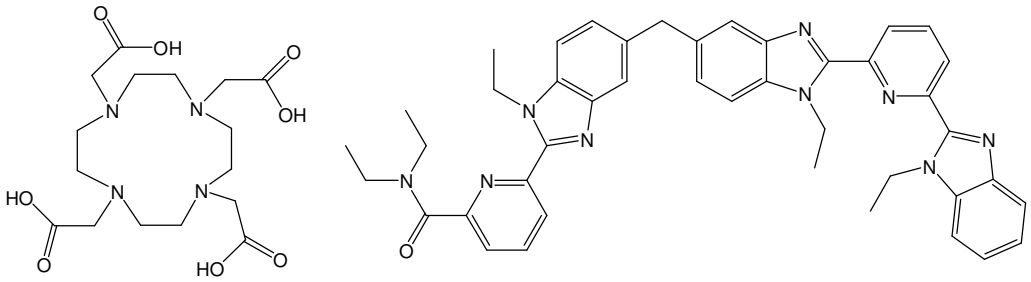


Figure 1.5 : Représentation schématique de ligands flexibles induisant la formation d'une cavité.

Tout d'abord, des macrocycles plus grands donc plus flexibles que les éthers couronnes, ont été développés. Les calixarènes par exemple permettent de former des complexes bimétalliques, mais leur formation implique d'importants réarrangements qui ne sont pas très favorables entropiquement.[10] Pour minimiser cette énergie de réorganisation, des bras

flexibles ont été greffés sur des petits macrocycles comme les cyclen ou les calix[4]- et calix[5]arènes. De très grandes constantes de stabilité sont ainsi obtenues pour le complexe Ln(DOTA) par exemple (Figure 1.6), log β_{110} = 25,3, ce qui en fait un très bon candidat pour les applications dans le domaine de l'IRM, comme nous le verrons par la suite.



DOTA **L^{AB}**

Figure 1.6 : Représentation d'un ligand macrocyclique avec bras flexible (DOTA) et d'un ligand utilisé dans les processus d'auto-assemblage (L^{AB}).

Lorsqu'un édifice requiert la présence de bras monodentes ou tridentes, leur greffage sur un macrocycle volumineux n'est pas forcément optimum, et les podands construits à partir d'un site d'ancrage beaucoup plus petit (souvent un simple atome) se révèlent plus efficaces. Un avantage de l'utilisation des podands est que le nombre d'atomes donneurs peut être aisément ajusté en faisant varier à la fois le nombre de bras et leur denticité. Bon nombre de ces ligands sont basés sur des unités bipyridines et sont ensuite utilisés en luminescence. C'est le cas des ligands **L3**[11] (Figure 1.11, p:39) et **L5** (Figure 1.13**,** p:40)**.**[12]

Enfin, la dernière méthode de complexation efficace est de tirer parti à la fois du fort champ électrique créé par les ions Ln(III) et des interactions entre les ligands pour auto-assembler des petites unités coordinantes autour du centre métallique. Des ligands dissymétriques comme $\mathbf{L^{AB}}$ (Figure 1.6) possèdent deux unités de coordination de force différente, ce qui permet de reconnaître simultanément des lanthanides différents. Ainsi un excès de concentration de plus de 90% par rapport à la distribution statistique est observée en faveur de l'espèce hétérobimétallique [LaLu($\mathbf{L^{AB}}$)$_3$].[13] Il est remarquable que l'unité tridente la plus molle, la bis(benzimidazoyl)pyridine, se lie toujours au plus gros, donc au plus mou des Ln(III). En choisissant l'Eu(III) comme au moins un des deux cations, ces hélicates peuvent être envisagés comme sondes luminescentes.[3]

Après avoir passé en revue les différentes méthodes de complexation des Ln(III), nous allons nous attacher plus particulièrement à deux techniques spectroscopiques permettant à la fois d'étudier ces complexes, et d'offrir un large éventail d'applications : la luminescence et la RMN. Ces deux techniques se situent dans des gammes d'énergie différentes. La luminescence est une technique reposant sur les transitions entre états électroniques de la molécule et l'énergie impliquée est de l'ordre de l'électron-volt. La RMN repose sur les transitions entre niveaux énergétiques du noyau observé, à proximité du Ln(III), et l'énergie impliquée est 100 000 fois plus faible.

I.4. Propriétés de luminescence des complexes de Ln(III)

Afin d'appréhender pleinement leurs applications dans le domaine des sondes luminescentes, il nous faut d'abord nous intéresser aux propriétés de luminescence des cations métalliques en jeu.

I.4.1. Définition

Lorsqu'une substance absorbe de l'énergie électromagnétique dans la gamme IR-visible-UV, il en résulte un état électronique d'énergie supérieure appelé état excité. Cet état est instable et les électrons vont retourner dans leur état fondamental par deux types de mécanismes : des processus non radiatifs qui peuvent être physiques (échauffement) ou chimiques (réaction chimique), et des processus radiatifs. C'est cette émission d'un photon qui est appelé luminescence. Le schéma de Jablonski illustre ces différents moyens de retour à l'équilibre (Figure 1.7).

L'état électronique fondamental de la molécule est désigné par S_0, c'est un singulet de spin pour la plupart des molécules étudiées. L'absorption de lumière fait passer la molécule dans un état excité S_1, également singulet. La désexcitation radiative peut se faire à partir de cet état et sans changement de spin total moléculaire électronique, le phénomène est alors appelé fluorescence. Il est également possible de passer par l'état triplet avant la désexcitation radiative : l'émission se fait cette fois avec changement de spin, c'est la phosphorescence.

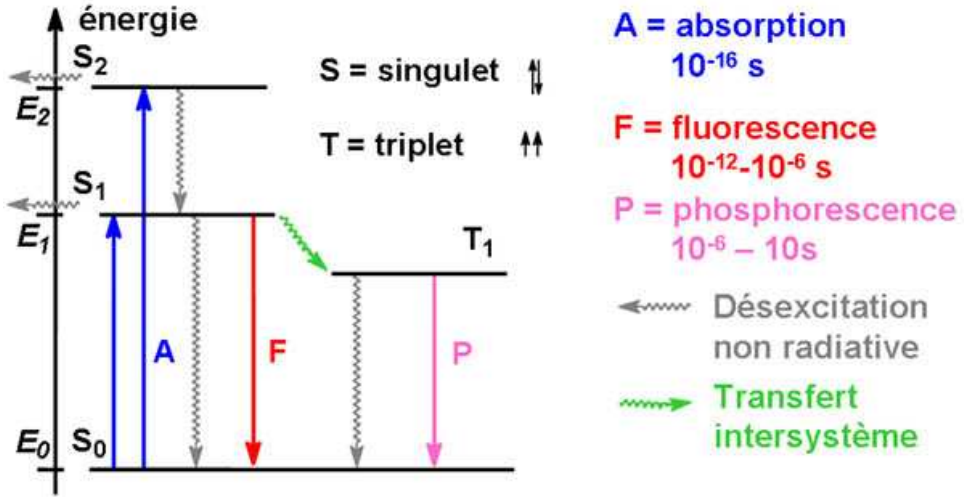


Figure 1.7 : Schéma de Jablonski pour des composés organiques à couches fermées

D'un point de vue pratique, ces phénomènes ne se passent pas à la même échelle de temps. La durée de vie d'un état excité, τ, est définie comme le temps nécessaire pour qu'une fraction 1/e des molécules excitées retournent à l'état fondamental. La fluorescence est caractérisée par une durée de vie d'un état excité comprise entre 10^{-12} et 10^{-6} s, alors que la durée de vie d'un état excité phosphorest est de l'ordre de 10^{-6}-10 s.

I.4.2. La luminescence des Ln(III)

Tous les Ln(III), exceptés le La(III) et le Lu(III) sont luminescents, mais certains sont plus efficaces que d'autres, c'est à dire ont un meilleur rendement quantique de luminescence. Les propriétés d'émission de l'ion Ln(III) sont gouvernées par la facilité avec laquelle les états excités peuvent être peuplés, et les désexcitations non radiatives évitées. La différence d'énergie entre les niveaux luminescents et le niveau fondamental sera donc en grande partie responsable des propriétés de luminescence de ces ions. Plus la différence d'énergie est faible, plus il est aisé d'avoir des processus de désexcitation non radiatifs, par exemple à travers les vibrations des liaisons O-H. La Figure 1.8 représente les diagrammes d'énergie partiels des ions Ln(III).

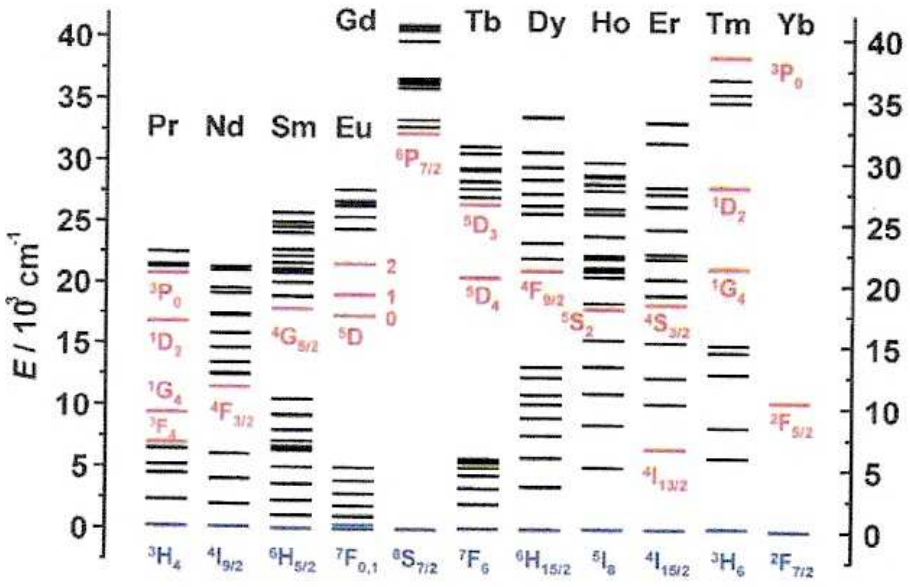


Figure 1.8 : Diagramme partiel d'énergie pour les ions Ln(III) aqueux.[14] Les principaux niveaux luminescents sont représentés en rouge alors que le niveau fondamental est indiqué en bleu.

L'Eu(III) et le Tb(III) émettent tous deux dans le visible, respectivement dans le rouge et dans le vert, ce qui les place en première position pour les sondes luminescentes. Le Gd(III) émet dans l'ultraviolet (UV) et sa luminescence n'est pas très utile car elle interfère avec les processus d'absorption ou d'émission des composés organiques et biologiques. Le Sm(III) et le Dy(III) sont également utilisés pour les analyses immunitaires basées sur la luminescence résolue dans le temps. Les ions Nd(III), Er(III) et Yb(III) émettent dans le proche infrarouge et sont particulièrement intéressants pour la construction de lasers (en particulier le Nd(III)) et les matériaux de télécommunications, mais également dans le domaine émergent des sondes luminescentes pour l'imagerie de tissus *in vivo* et la détection de cancers.[14]

I.4.3. Exalter la luminescence des lanthanides : l'effet antenne

Toutefois, il n'est pas possible d'utiliser les Ln(III) seuls pour obtenir une luminescence efficace en vue d'applications dans le domaine du visible ou de l'infrarouge (IR). Les rendements quantiques sont toujours faibles.

En effet, trois types de transitions sont possibles avec des systèmes contenant des Ln(III) :

- Des transitions à transfert de charge entre le ligand et le cation métallique et vice-versa. Ces transitions n'ont lieu que pour les Ln(III) facilement réductibles ou

oxydables. Elles demandent donc une énergie importante et ne sont pas observées dans la plupart des cas.

- Des transitions d-f. Elles ont également lieu à des longueurs d'onde trop faibles pour être observées.
- Des transitions f-f. Ce sont les transitions qui sont couramment étudiées et auxquelles nous nous intéresserons exclusivement par la suite.

Ces transitions entre électrons appartenant à la même sous-couche f sont théoriquement interdites par les règles de sélection électrique dipolaire. Cependant, ces règles de sélection peuvent être relaxées en raison du couplage des états électroniques avec les états vibrationnels, ou des mélanges entre fonctions d'onde de différents nombres quantiques J, ou de différentes parités. Ainsi, même si l'interdiction peut être transgressée, l'excitation directe du Ln(III) ne produit jamais de matériaux très luminescents.

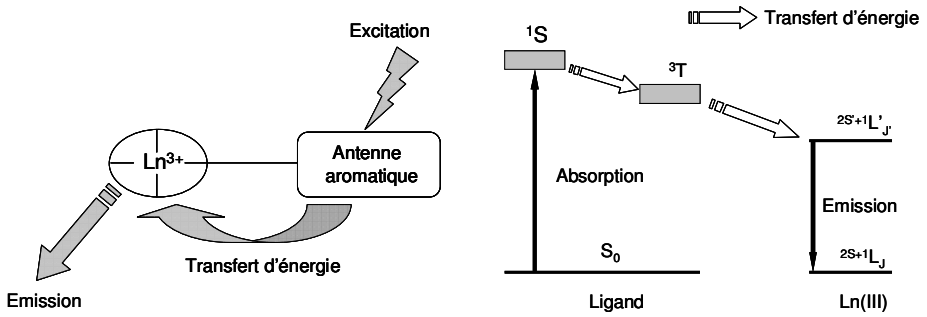


Figure 1.9 : Schéma de l'effet antenne. Représentation simplifiée des transferts d'énergie au niveau moléculaire (gauche) et électronique (droite).

Une excitation indirecte (également appelée effet antenne), se déroulant en trois étapes, est nécessaire. Le Ln(III) doit être complexé par un ligand organique possédant un groupe qui absorbe de la lumière (groupe chromophore) et qui soit situé dans l'environnement immédiat du cation. Ensuite, l'énergie absorbée par le chromophore est transférée sur un ou plusieurs des états excités du cation métallique, et enfin le cation émet de la lumière (Figure 1.9).

I.4.4. Extinction de la luminescence par H_2O

Pour s'assurer que le système est vraiment efficace, il faut également contrôler les processus de désactivation non radiatifs. Le taux de désactivation global, qui est l'inverse du temps de vie, est donné par l'équation 1.3.

$$k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}} = k^r + \sum_n k_n^{nr} = k^r + \sum_i k_i^{vibr}(T) + \sum_j k_j^{tep}(T) + \sum_l k'^{nr}_l(T) \qquad \textbf{équation 1.3}$$

avec k^r et k^{nr} les constantes de désactivation radiatives et non radiatives respectivement ; vibr désigne les processus de vibrations, tep, les transferts électroniques photoinduits ; k' est la constante associée à tous les autres processus de désactivation non radiatifs.

La désactivation par vibration est le problème majeur, en particulier à travers les vibrations de l'oscillateur O-H présent sur les solvants alcooliques ou l'eau. En effet, la fréquence de vibrations de la liaison O-H est de 3000 cm^{-1} pour une différence d'énergie entre les états excités et le fondamental de 12 300 cm^{-1} pour l'Eu(III) et 14 800 cm^{-1} pour le Tb(III). Quatre ou cinq oscillateurs O-H suffisent donc pour une désexcitation non radiative. Il faut noter que le Tb(III) sera un peu plus efficace que l'Eu(III) car la désexcitation non radiative due aux vibrateurs O-H est un peu plus difficile. Cependant, l'Eu(III) est plus utile pour la détermination d'environnement chimique car les spectres sont simplifiés, le premier état excité $^5D_0$ n'étant pas dégénéré.
Un des moyens utilisés pour obtenir un complexe le plus luminescent possible est d'empêcher l'accès des molécules d'eau au centre métallique par un ligand encapsulant.

Si la désexcitation par les oscillateurs O-H des molécules d'eau est un inconvénient pour les applications de luminescence, elle est à l'origine d'une méthode très utile pour la détermination du nombre de molécules d'eau directement liées au cation métallique. Pour cela, l'hypothèse suivante est faite : les vibrations O-D ne provoquent pas de désexcitation et tous les autres phénomènes de désexcitation sont les mêmes dans D_2O et dans H_2O. Dans D_2O, l'équation 1.3 devient alors :

$$k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}} = k^r + \sum_n k_n^{nr} = k^r + \sum_j k_j^{tep}(T) + \sum_l k'^{nr}_l(T) \qquad \textbf{équation 1.4}$$

Le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique peut alors être évalué d'après l'équation 1.5.

$$q = A(k_{H_2O} - k_{D_2O} - B) \qquad \textbf{équation 1. 5}$$

Les paramètres A et B sont phénoménologiques et dépendent du Ln(III) considéré.[15-17]

Les applications des sondes luminescentes sont très nombreuses, et nous n'en citerons ici que quelques exemples pour illustrer les domaines de la détection analytique, des tests

immunologiques, et de l'imagerie. La luminescence des Ln(III) dans le proche IR est un domaine émergent attractif. Malgré la faiblesse relative de leur temps de vie (de la nanoseconde à la microseconde), et la faible différence d'énergie entre le niveau excité et le niveau fondamental favorisant les processus de désexcitations non radiatives, ces ions peuvent être excités par des chromophores absorbant dans le visible. Au niveau des applications biologiques, cela permet une pénétration plus importante dans les tissus, ainsi qu'une sensibilité accrue.[18-20] Nous ne parlerons pas ici de ces nouvelles applications.

I.5. Applications aux sondes luminescentes

Cette partie, non exhaustive, va aborder trois aspects des applications des Ln(III) en tant que sondes luminescentes : la détection analytique, les tests immunologiques et les techniques d'imagerie par luminescence.

I.5.1. Détection analytique

Pour les détecteurs analytiques fluorescents, la luminescence du cation métallique est modulée par un processus dépendant de la concentration de l'espèce à analyser, et met en jeu une association réversible avec le cation. Les trois principaux mécanismes de modulation de la luminescence sont représentés sur la Figure 1.10.

La première possibilité est une action directe sur le lanthanide (Figure 1.10.a). Comme l'intensité de luminescence est grandement affectée par le nombre de molécules d'eau coordonnées au centre métallique, il est possible d'avoir une espèce à analyser qui se coordonne sur le cation à la place de l'eau et l'intensité de luminescence augmente alors fortement. Ensuite, il est possible d'agir sur les propriétés photophysiques du ligand : l'espèce à analyser se lie au ligand et provoque ainsi une variation de ses niveaux d'énergie singulet et/ou triplet altérant le transfert d'énergie et donc le processus de luminescence (Figure 1.10.b). Enfin, la dernière possibilité est que l'espèce à analyser soit elle-même utilisée comme chromophore pour augmenter la luminescence du Ln(III) (Figure 1.10.c).

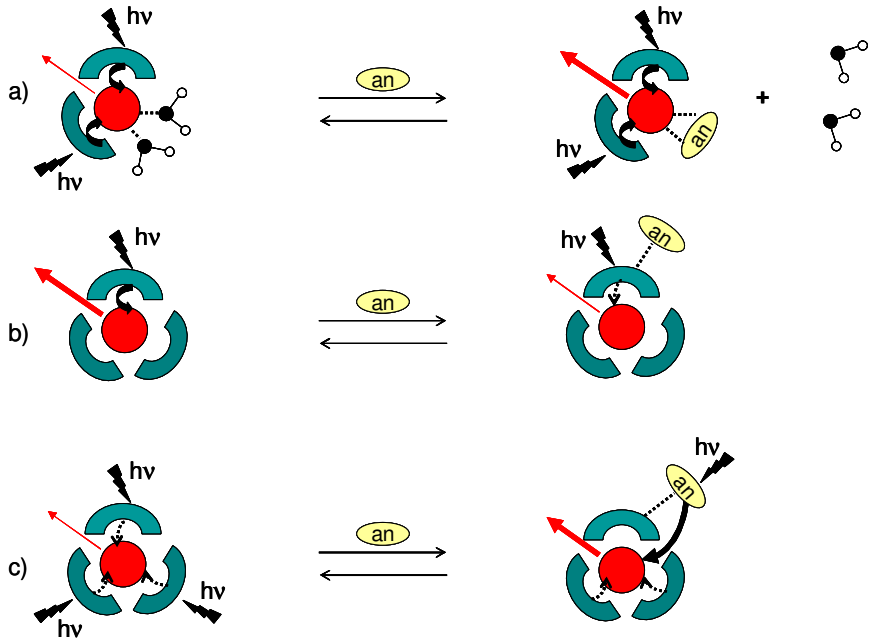


Figure 1.10 : Modulation de la luminescence des Ln(III) par l'association réversible à une espèce à analyser (an) : (a) influence directe sur la luminescence du lanthanide, (b) influence sur les propriétés photophysiques du ligand, (c) addition d'un chromophore à analyser sur un complexe de Ln(III) peu luminescent.

Par exemple, le déplacement de molécules d'eau de la sphère de coordination peut être utilisé pour détecter des cations métalliques, le pH, ou encore des anions. Ainsi, les courts temps de vie de luminescence du complexe Tb**L1** (Figure 1.11) montrent la présence d'une molécule d'eau en l'absence d'alcalins en solution. Lorsque les cations potassium ou sodium sont ajoutés à la solution, leur complexation par l'éther couronne, et peut être par les groupements carbonyles, entraîne une gêne stérique qui bloque le neuvième site de coordination et empêche l'approche de la molécule d'eau. Le temps de vie augmente alors considérablement, signalant ainsi la présence de ces alcalins à partir de concentrations de l'ordre 1 à 10 mmol.L^{-1}.[21]

De même, la luminescence de Eu**L2** (Figure 1.11) va varier dans la gamme de pH 5,5-7,5. Le changement du nombre de molécules d'eau directement coordonnées au cation va en effet passer de 2 à 0 en raison de la coordination du groupement arylsulfonamide.[22,23]

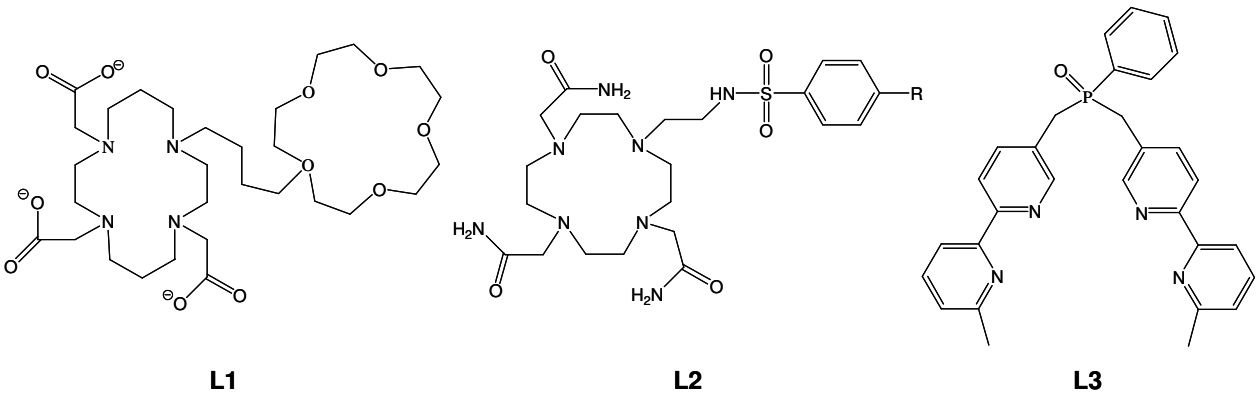


Figure 1.11 : Structure chimique d'un ligand pour la détection de cations (L1), de pH (L2) et d'anions (L3).

Dans le complexe Eu**L3** (Figure 1.11), le fragment bipyridine est un chromophore efficace pour le transfert d'énergie. La sphère de coordination du complexe n'est pas saturée, ce qui permet la coordination d'anions. Les propriétés photophysiques de ces complexes dépendent grandement de la nature de l'anion en solution. La présence de deux équivalents de nitrate provoque par exemple une augmentation de onze fois l'intensité de luminescence initiale.[11]

I.5.2. Tests immunologiques

Les tests immunologiques reposent sur une réaction biochimique entre un antigène (à analyser) et un anticorps spécifique. Dans les tests immunologiques luminescents, l'anticorps est marqué avec un complexe de Ln(III).

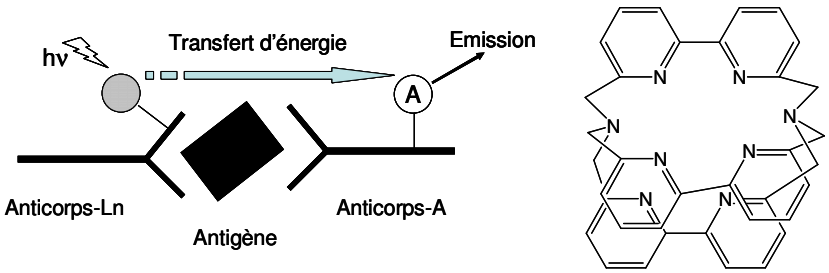


Figure 1.12 : Principe des test immunologiques homogènes en une seule étape, et ligand utilisé pour complexer le Ln(III).

Les premières méthodes se déroulaient en deux étapes, avant qu'un processus plus simple ne soit proposé (Figure 1.12) : un complexe d'Eu(III) avec un cryptand tris(bipyridine) est lié à un anticorps spécifique alors qu'un accepteur, la phycobiliprotéine, est greffé sur un second anticorps spécifique. La réaction biochimique avec l'antigène amène ces deux entités à

proximité l'une de l'autre et un transfert d'énergie a lieu. Ainsi, la prolactine par exemple peut être détectée avec une sensibilité similaire à celle obtenue avec des marqueurs radioactifs, moins de 0,3 µg par litre.[24]

I.5.3. Les techniques d'imagerie

En ajoutant deux dimensions spatiales à ces procédures analytiques, il est possible de réaliser de l'imagerie par luminescence. Les complexes de Ln(III) sont très intéressants du fait que ce sont des sondes très sensibles pour tous les tests biologiques et qu'ils ont des temps de vie de luminescence plus longs que les sondes fluorescentes classiques. Ainsi, les signaux provenant des Ln(III) peuvent être séparés de ceux provenant des tissus biologiques ou des composants optiques en utilisant de la luminescence résolue en temps. L'utilisation de la microscopie luminescente permet d'obtenir une résolution spatiale inférieure à la dimension de la cellule, rendant possible la localisation précise de la substance à analyser ainsi que la détermination de sa concentration.[25]

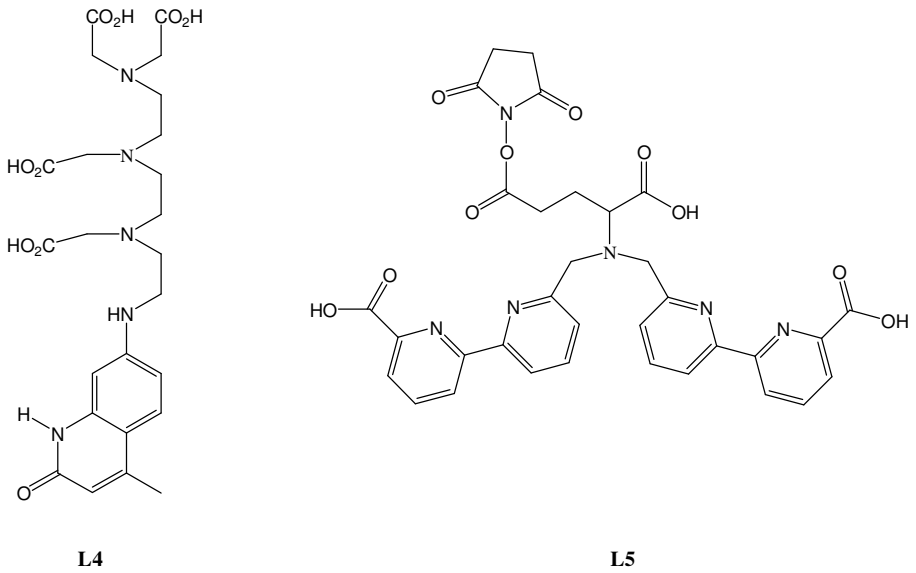


Figure 1.13 : Exemples de ligands utilisés pour la microscopie par luminescence.

Le complexe Eu**L4** (Figure 1.13) s'est révélé être une excellente sonde pour la résolution spatiale et temporelle.[26] D'autres marqueurs luminescents pour la microscopie ont été proposés, tous visant la sélectivité. Par exemple, le complexe Eu**L5** (Figure 1.13) peut être

facilement couplé à l'albumine de sérum bovin (BSA) avec un rapport Ln : BSA supérieur à 8, ce qui en fait un très bon candidat pour la microscopie résolue en temps.[12]

Pour résumer, les complexes de Ln(III) présentent des propriétés de luminescence exceptionnelles, qui ont pu être exploitées dans des domaines aussi variés que l'analyse ou le milieu médical (imagerie, tests immunologiques). Avant de nous intéresser à une autre application majeure du domaine médical, les agents de contraste pour l'IRM, il est nécessaire d'étudier les propriétés de RMN particulières crées par les complexes de Ln(III). Bien que les ions ne soient pas directement observables par RMN, ils induisent des propriétés particulières sur les noyaux environnants, observables par RMN.

I.6. La RMN des complexes de Lanthanides(III)

La RMN est une technique spectroscopique qui s'intéresse aux transitions énergétiques entre les niveaux Zeeman des spins nucléaires placés dans un champ magnétique. Ces transitions se font dans le domaine des ondes radio et sont caractéristiques de la nature et de l'environnement chimique du noyau considéré. Les propriétés des noyaux qui sont étudiés dans ce manuscrit sont données dans le Tableau 1.6.

Tableau 1.6 : Propriétés RMN de certains noyaux.

Noyau	Spin (I)	Sensibilité relative (γ/γ_H)	Fréquence ν_0 dans un champ de 9,4 T (MHz)	Abondance naturelle (%)
^{1}H	1/2	1	400	99,98
^{13}C	1/2	$1,59.10^{-2}$	100,6	1,11
^{19}F	1/2	0,834	376,5	100
^{17}O	5/2	$2,91.10^{-2}$	54,25	$3,7.10^{-2}$

L'étude des fréquences de résonance et des réseaux de couplages qui existent entre les spins de la molécule permet d'obtenir des informations sur sa structure et sa dynamique.
La proximité d'un métal paramagnétique avec les noyaux observés a une forte influence sur l'allure des spectres RMN. Il existe un couplage hyperfin entre le spin du noyau étudié et le spin de l'électron célibataire appartenant au cation métallique. Ce couplage hyperfin provient

à la fois d'interactions dipolaires (à travers l'espace) et d'interactions de contact (provenant du réarrangement électronique à travers les liaisons). Son influence se ressent sur le déplacement chimique du spin nucléaire étudié et sur la relaxation de ces spins, qui influe sur la largeur de raie. En effet, deux temps de relaxation simples provenant de différents mécanismes de retour à l'équilibre peuvent être définis : le temps de relaxation longitudinale T_1, et le temps de relaxation transversale T_2. Le temps de relaxation longitudinale correspond au temps caractéristique de retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale macroscopique après perturbation. Le temps de relaxation transversale correspond au temps caractéristique de décroissance de l'aimantation transversale macroscopique après perturbation et est proportionnel à l'inverse de la largeur de raie. Pour des molécules de petites tailles, et dans la plupart des liquides étudiés dans ce manuscrit, T_1 et T_2 sont du même ordre de grandeur.[27]

Soit H_1, l'intensité de l'hamiltonien de couplage hyperfin. Il peut se décomposer selon l'équation 1.6.

$$H_1 = \underbrace{H_{1moy}}_{\text{Déplacement Chimique}} + \underbrace{\|\Delta H_1(t)\|}_{\text{Temps de relaxation}} \qquad \textbf{équation 1.6}$$

Sa valeur moyenne donne lieu au déplacement chimique paramagnétique, et ses fluctuations temporelles autour de la valeur moyenne dans le repère du laboratoire produisent les augmentations de relaxation d'origine paramagnétique.[27]

I.6.1. Déplacement chimique paramagnétique

Le déplacement chimique d'un noyau i possédant un spin nucléaire localisé au voisinage d'un lanthanide j possédant des électrons célibataires est la somme d'une contribution diamagnétique (due à tout l'environnement en l'absence du Ln(III)) et d'une contribution paramagnétique (due à la proximité du Ln(III)) :

$$\delta = \delta_i^{dia} + \delta_{ij}^{para} \qquad \textbf{équation 1.7}$$

Le déplacement chimique paramagnétique (δ_{ij}^{para}) est lui-même la somme de deux contributions (équation 1.8) :

(1) une contribution de contact à travers les liaisons, δ_{ij}^{c}, qui est associée à une faible délocalisation du spin électronique sur le ligand. L'expression de ce terme est donnée par l'équation 1.9.

(2) une contribution de pseudo-contact à travers l'espace, δ_{ij}^{pc}, résultant de l'interaction dipolaire moyenne existant entre les moments magnétiques électronique et nucléaire (Equation 1.10).

$$\delta_{ij}^{para} = \delta_{ij}^{c} + \delta_{ij}^{pc} \qquad \textbf{équation 1.8}$$

$$\delta_{ij}^{c} = -\frac{A_i}{\hbar\gamma_i B_0}\langle S_Z \rangle_j \qquad \textbf{équation 1.9}$$

où A_i est la constante de Fermi, B_0 le champ magnétique appliqué, γ_i le rapport gyromagnétique du noyau i, et $\langle S_Z \rangle_j$ la projection du spin électronique sur l'axe z dont les valeurs sont tabulées pour l'ion libre à 300 K.[28]

$$\delta_{ij}^{pc} = \frac{1}{2N_A}\left[\underbrace{\left(\chi_{zz}^{j} - \frac{1}{3}Tr\chi^{j}\right)}_{\text{Anisotropie paramagnétique axiale}}\underbrace{\left(\frac{3\cos^2\theta_i - 1}{r_i^3}\right)}_{\text{facteur géométrique}} + \underbrace{\left(\chi_{xx}^{j} - \chi_{yy}^{j}\right)}_{\text{Anisotropie paramagnétique rhombique}}\underbrace{\left(\frac{\sin^2\theta_i \cos 2\Phi_i}{r_i^3}\right)}_{\text{facteur géométrique}}\right] \qquad \textbf{équation 1.10}$$

Les $\chi_{\alpha\alpha}^{j}$ sont les composantes du tenseur de susceptibilité magnétique dans le système d'axes magnétiques principaux, avec le lanthanide situé à l'origine du repère. θ_i, Φ_i et r_i sont les coordonnées polaires du noyau i dans le même référentiel et N_A est le nombre d'Avogadro.

Les anisotropies de susceptibilité magnétique ont été modélisées par Bleaney et donnent des corrélations simples avec les paramètres de champ cristallin.[29] L'équation 1.8 se transforme ainsi en l'équation 1.11 pour des complexes de symétrie axiale.

$$\delta_{ij}^{para} = F_i\langle S_z \rangle_j + C_j G_i \qquad \textbf{équation 1.11}$$

Les paramètres $\langle S_z \rangle$ et C (facteur de Bleaney) ne dépendent que de la configuration électronique $4f^n$ du lanthanide considéré. Les paramètres F et G dépendent du noyau observé.

F est relié à la constante de couplage de contact entre le noyau considéré et l'électron, et G aux coefficients de champ cristallin ainsi qu'à la géométrie du ligand.

Le δ_{ij}^{para} va être différent pour chaque Ln(III), et les proportions des contributions de contact et de pseudo-contact pour chaque ion sont représentées Figure 1.14.

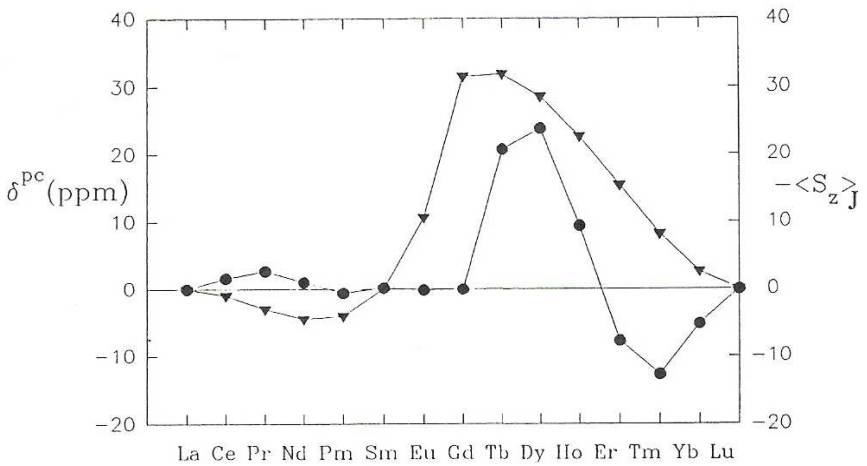


Figure 1.14 : Déplacement chimique paramagnétique calculé : terme de pseudo-contact (●) et -$\langle S_z \rangle$ (▼) proportionnel au terme de contact.[28]

La part de chacune des contributions dépend également du noyau observé par RMN. La contribution de contact ne sera dominante que pour les noyaux pouvant être directement coordonnés au cation métallique, en particulier pour l'oxygène ^{17}O. Cette contribution diminue fortement avec le nombre de liaisons entre le centre paramagnétique et le noyau observé.

I.6.2. Temps de relaxation

De même que pour le déplacement chimique, la vitesse de relaxation longitudinale ou transversale d'un spin i au voisinage d'un élément paramagnétique est la somme d'une contribution diamagnétique et d'une contribution paramagnétique (équation 1.12).

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + \left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} \qquad i = 1,2 \qquad \textbf{équation 1.12}$$

L'augmentation paramagnétique de relaxation $\left(\frac{1}{T_i}\right)_{para}$ sera simplement désignée par l'acronyme anglais PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement).

Les équations complètes de relaxation pour des complexes paramagnétiques seront données dans le paragraphe suivant (II), mais il faut noter que la PRE est proportionnelle au nombre quantique J (équation 1.13).

$$PRE \propto \gamma_i^2 \gamma_e^2 J(J+1) \qquad \textbf{équation 1.13}$$

avec γ_i et γ_e les rapports gyromagnétiques du noyau observé et de l'électron respectivement.

Si le nombre quantique J était le seul paramètre important, la PRE en présence de Dy(III) ou d'Ho(III) devrait être maximale puisque J = 15/2 et 8 respectivement, grâce aux contributions importantes du moment électronique angulaire. Or, expérimentalement, c'est le Gd(III) (J=7/2) qui entraîne les relaxivités les plus élevées.
En effet, l'influence de l'espèce paramagnétique sur la PRE des spins nucléaires est également modulée par son temps de relaxation électronique T_e. Les électrons 4f ont à leur disposition différents niveaux d'énergie Zeeman électronique (voir I.2.). Ils vont peupler en partie le niveau Zeeman électronique de plus basse énergie, mais ils vont également séjourner dans les niveaux Zeeman électronique d'énergie plus élevée. Ces changements vont impliquer des changements d'orientation du moment magnétique électronique. Le temps typique passé sur chaque niveau est appelé temps de relaxation électronique T_e. La relaxation électronique implique donc une fluctuation du champ magnétique créé par les électrons 4f au niveau du noyau. Cette fluctuation provoque une atténuation de la PRE.

Plus précisément, un temps de relaxation est relié aux fluctuations temporelles de l'hamiltonien approprié $\|\Delta H(t)\|$ selon l'équation 1.14.

$$\left(\frac{1}{T}\right)_{para} = \left(\frac{\|\Delta H(t)\|}{\hbar}\right)^2 \tau_c \qquad \textbf{équation 1.14}$$

τ_c est le temps de corrélation de $\Delta H(t)$: la corrélation de ces fluctuations entre un temps initial arbitraire $t = 0$ et un temps ultérieur $t > 0$ est maximale pour des temps t courts, puis elle

décroît au cours du temps jusqu'à s'annuler. Le temps de corrélation est le temps caractéristique de cette décroissance.

Ainsi, pour le spin nucléaire, l'hamiltonien pertinent est celui de couplage hyperfin H_1, et le temps de corrélation est donné par l'équation 1.15.

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_{mvt}} + \frac{1}{T_e} \qquad \textbf{équation 1.15}$$

où τ_{mvt} est le temps de corrélation rotationnelle ou translationnelle de l'espèce contenant le spin nucléaire par rapport à l'ion Ln(III).

L'équation 1.14 se transforme alors en équation 1.16.

$$\left(\frac{1}{T}\right)_{para} = \left(\frac{\|\Delta H_1(t)\|}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{1}{\tau_{mvt}} + \frac{1}{T_e}\right)^{-1} \qquad \textbf{équation 1.16}$$

Pour les complexes classiques, de faible poids moléculaire, $\tau_{mvt} \approx 10^{-10}$ s.[1]

Pour exprimer le temps de relaxation électronique, il faut cette fois se placer du point de vue des électrons f. L'hamiltonien pertinent devient l'hamiltonien de perturbation de l'énergie Zeeman électronique (PZE) : c'est l'hamiltonien de champ cristallin (CC). Il existe toutefois une exception pour le Gd(III), élément pour lequel le nombre quantique L est nul : ce sont alors des effets d'ordre supérieur donnant naissance à l'éclatement des niveaux en champ nul (Zero Field Splitting en anglais ou ZFS) qui sont pris en compte.
Alors, le temps de relaxation électronique s'exprime par l'équation 1.17.

$$\left(\frac{1}{T_e}\right) = \left(\frac{\|\Delta H_{PZE}^{statique}(t)\|}{\hbar}\right)^2 \tau_{rot} + \left(\frac{\|\Delta H_{PZE}^{fluctuant}(t)\|}{\hbar}\right)^2 \tau_{vib} \qquad \textbf{équation 1.17}$$

τ_{rot} et τ_{vib} étant les temps de corrélations rotationnelle et vibrationnelle du composé paramagnétique.

Pour les Ln(III) autres que le Gd(III), le champ cristallin provoque un éclatement des niveaux de l'ordre de 500 à 1000 cm^{-1}.[30] Comme nous l'avons vu, dans le cas du Gd(III), il n'y a pas de levée de dégénérescence directe due au CC, mais des effets d'ordres supérieurs donnant lieu au ZFS. L'éclatement reste cependant limité, il est de l'ordre de 0,01 à 0,1 cm^{-1}.[31] Ceci

explique que le Gd(III) possède un temps de relaxation électronique très long, $T_e \approx 10^{-10}$-10^{-9} s, par rapport à celui des autres Ln(III) ($T_e \approx 10^{-13}$-10^{-12} s).

Ainsi, en reprenant l'équation 1.15 à bas champ, dans le cas des Ln(III) différents du Gd(III), $\frac{1}{T_e} >> \frac{1}{\tau_{mvt}}$, donc, $\tau_c = T_e$. D'après l'équation 1.16, la PRE sera proportionnelle à T_e, donc sera très faible. Pour le Gd(III), ($1/\tau_{mvt}$) est du même ordre de grandeur que ($1/T_e$). τ_c sera donc au moins 3 ordres de grandeur supérieur à celui des autres Ln(III), et par conséquent, la PRE du noyau observé sera également importante.

Pour conclure, la vitesse de relaxation des spins nucléaires est maximale (très rapide) lorsque le Ln(III) est le Gd(III). Comme la largeur de raie est proportionnelle à l'inverse du temps de relaxation, les spectres RMN en présence de Gd(III) sont (très) élargis, et parfois inobservables.

I.6.3. Les Ln(III) comme sondes pour la résolution de structure

Les lanthanides, à l'exception du Gd(III), ont des temps de relaxation électronique très courts, qui impliquent un assez faible élargissement des raies du spectre du noyau observé, en particulier pour la première moitié de la série. Le déplacement chimique paramagnétique, en particulier pour la RMN du proton, est dominé par la contribution de pseudo-contact, qui dépend principalement de la géométrie du ligand coordonné. Cette propriété de ces Ln(III) fait d'eux des agents de déplacement chimique paramagnétique de choix et explique leur utilité dans le domaine de la chimie inorganique structurale.[28]

Les premières observations de complexes de Ln(III) en tant qu'agents de déplacement chimique remontent à 1969. La présence du complexe tris(dipivaloylmethanato)europium(III) ($Eu(dpm)_3$) (Figure 1.15) provoque d'importantes variations des fréquences de résonance des protons du cholestérol.[7]

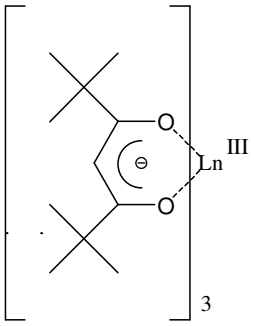


Figure 1.15 : Le tris(dipivaloylmethanato)europium(III), agent de déplacement chimique paramagnétique.

Comme nous l'avons vu précédemment, les déplacements chimiques ne sont pas les mêmes en fonction du lanthanide choisi. Le Tableau 1.7 regroupe les déplacements chimiques des protons H_2 de la 4-vinyl-picoline en présence de complexes $Ln(dpm)_3$ ainsi que les largeurs de raie à mi-hauteur.

Tableau 1.7 : Déplacement chimique paramagnétique et largeur de raie à mi-hauteur des protons H_2 de la 4-picoline en présence de chaque agent paramagnétique $Ln(dpm)_3$.[7]

Ln(III)	δ_{Hj}^{para} (ppm)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)
Pr	+6,6	5,6
Nd	+3,2	4,0
Sm	+0,8	4,4
Eu	-3,5	5,0
Gd	≈ 0	
Tb	+30,7	96
Dy	+33,8	200
Ho	+24,0	50
Er	-9,1	50
Tm	-23,6	65
Yb	-11,0	12

D'après ce tableau, le début de la série des Ln(III) provoque des δ_{Hj}^{para} plus faibles que ceux de la fin de la série. Le Sm(III) et le Nd(III) n'induisent que peu de déplacement alors que le Pr(III) provoque des déplacements importants. L'Eu(III) entraîne des déplacements chimiques paramagnétiques dans le sens opposé à ceux des Ln(III) précédemment cités. Ensuite les lanthanides de la deuxième partie de la série se divisent en deux groupes : le Tb(III), le

Dy(III) et l'Ho(III), qui provoquent des déplacements dans le sens opposé à ceux provoqués par l'Er(III), le Tm(III) et l'Yb(III). Les déplacements les plus importants sont obtenus pour le Tm(III) et le Dy(III).

Pour résoudre des structures de complexes de Ln(III), il est donc très important de jouer avec les paramètres spectrales et temps de relaxation. Des composés de Tb(III) ou Yb(III) vont permettre de séparer un grand nombre de pics en les dispersant sur une large fenêtre spectrale. Cependant, les spectres bidimensionnels sont plus difficiles, voire impossibles, à obtenir car les noyaux observés ont un temps de relaxation trop court.

Le Gd(III) est un cas particulier, puisqu'il entraîne des PRE très élevées. Cette propriété est un handicap pour l'étude des complexes à longue durée de vie (raies si larges que le spectre disparaît), mais se révèle en fait très intéressante pour l'étude des complexes labiles. Cette propriété a également conduit à de nombreuses applications en tant que sonde de reconnaissance de dynamique. En effet, le Gd(III) permet d'obtenir indirectement des informations sur les distances entre le noyau observé et le cation, sur la vitesse d'échange de molécules directement coordonnées au centre métallique, ainsi que sur les temps de corrélation caractéristiques des systèmes considérés. Ce sont également ces PRE élevées qui ont amené à utiliser les complexes de Gd(III) comme agents de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire médicale (IRM).

II. Applications à la dynamique de reconnaissance moléculaire : les agents de contraste pour l'IRM

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, les efforts actuels pour le développement de nouveaux agents de contraste pour l'IRM se concentrent sur des molécules toujours plus efficaces. Or, l'efficacité d'un agent de contraste, autrement dit sa capacité à augmenter la vitesse de relaxation des spins nucléaires environnants par unité de concentration du complexe se nomme relaxivité, et est définie par l'équation suivante :

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} = r_i[Ln] \qquad i = 1,2 \qquad \textbf{équation 1.18}$$

où r_i s'exprime en $mmol^{-1}.L^{-1}.s$.

r_1 est la relaxivité longitudinale, alors que r_2 est la relaxivité transversale.

[Ln] représente la concentration totale en espèce paramagnétique exprimée en $mmol.L^{-1}$.

Avant de voir quels sont les mécanismes de relaxivité en jeu dans les complexes de Gd(III), nous allons nous intéresser aux propriétés magnétiques, ainsi qu'à la toxicité de ces agents de contraste.

II.1. Les propriétés magnétiques des agents de contraste

Les propriétés magnétiques de l'agent de contraste sont le premier paramètre crucial pour définir leur efficacité. Nous avons vu précédemment que la relaxivité est proportionnelle à S(S+1) (ou J(J+1) pour les Ln(III) pour lesquels le nombre quantique pertinent est J = L+S). L'idée pour avoir un agent de contraste efficace est donc d'avoir un nombre quantique S maximal. Soit S est intrinsèquement grand, soit il faut coupler N spins S qui, grâce à la coopérativité, vont former un superspin S' = NS. Il existe alors deux classes d'agents de contraste : les agents paramagnétiques et les agents superparamagnétiques.

I.1.1. Les agents paramagnétiques

Nous avons vu qu'au sein de la famille des Ln(III), le Gd(III) se distinguait grâce à son spin élevé (S = 7/2) et son temps de relaxation électronique long ($Te \approx 10^{-9}$ s). Les agents de

contraste à base de Gd(III) sont des agents de type T_1. C'est la famille d'agents de contraste la plus utilisée actuellement et pour laquelle la relaxivité à 20 MHz (0,5 T) se situe autour de 4 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$, pour les produits médicaux commercialisés. Le Tableau 1.8 et la Figure 1.16 donnent la structure et la classification de quelques agents de contraste utilisés actuellement pour le diagnostic médical.

Tableau 1.8 : Complexes de Gd(III) approuvés cliniquement en tant qu'agents de contraste pour l'IRM, relaxivités à 20 MHz, pH = 7,3 et 25 °C.[1]

Formule chimique	Nom commercial	Biodistribution	r_1($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)
[Gd(**DTPA**)(H_2O)]$^{2-}$	Magnevist	extracellulaire	4,3
[Gd(**DOTA**)(H_2O)]$^{-}$	Dotarem	extracellulaire	4,2
[Gd(**DTPA-BMA**)(H_2O)]	Omniscan	extracellulaire	4,39
[Gd(**HP-DO3A**)(H_2O)]	ProHance	extracellulaire	3,7*
[Gd(**BOPTA**)(H_2O)]$^{2-}$	MultiHance	hépatobiliaire/ extracellulaire	5,2

* Valeur mesurée à 40 °C.

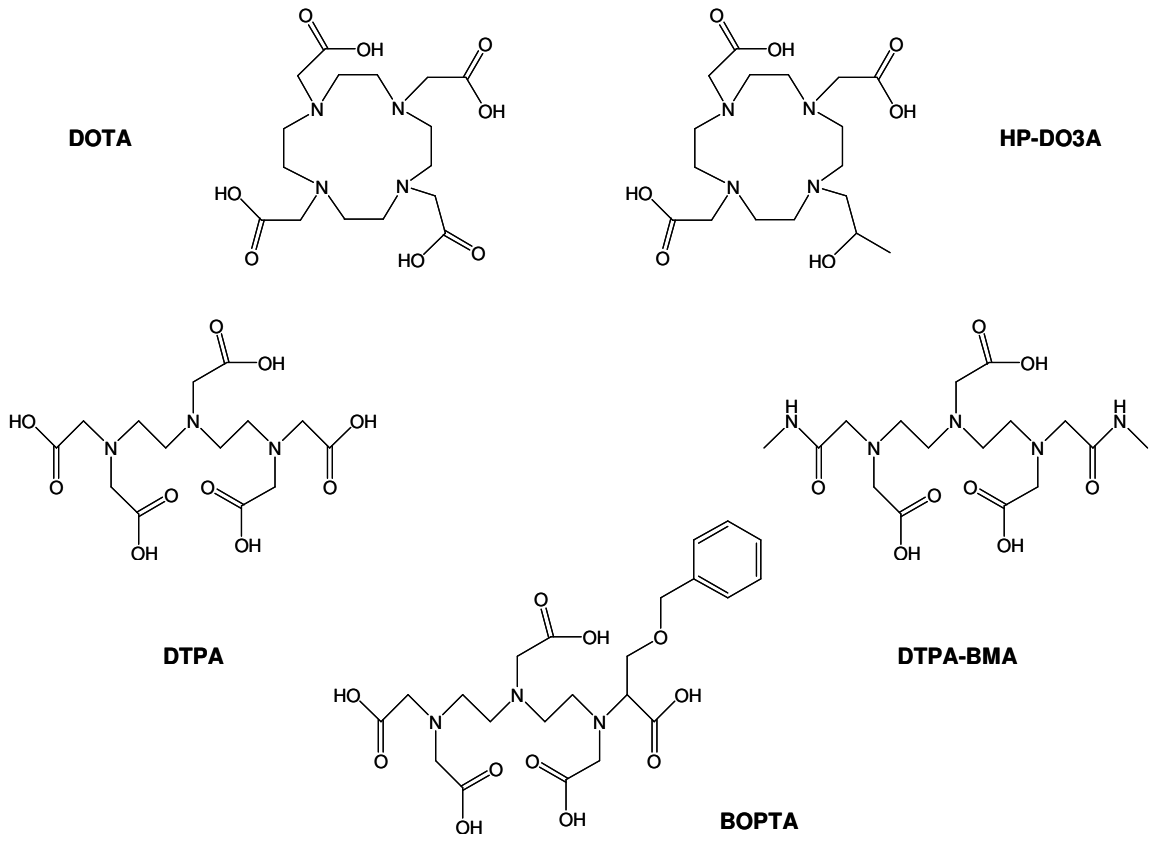
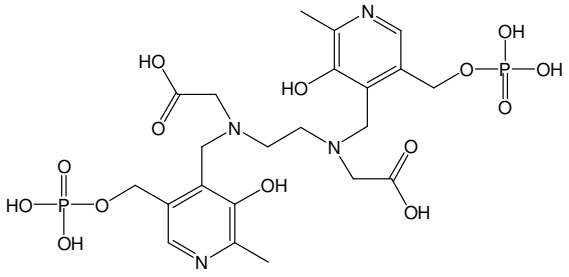


Figure 1.16 : Formules chimiques de quelques ligands dont les complexes avec le Gd(III) ont été approuvés cliniquement en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

Le Mn(II) possède également un spin élevé (S = 5/2). Pourtant seul un agent de contraste à base de Mn(II) a été approuvé cliniquement, le [Mn(**DPDP**)] (Figure 1.17). C'est un agent extracellulaire qui ne passe pas une barrière hémato-encéphalique saine, et qui est excrété par les reins et le foie. Il est très efficace pour la détection de tumeurs du foie.[32]



DPDP

Figure 1.17 : Ligand dont le complexe formé avec le Mn(II) a été approuvé cliniquement en tant qu'agent de contraste pour l'IRM.

Des études de faisabilité ont par la suite montré que malgré un spin électronique plus faible, il est possible d'obtenir des relaxivités peu inférieures à celles des complexes de Gd(III) correspondants. Ainsi à 25 °C, et au pH physiologique (7,4), la relaxivité est 3,6 et 1,6 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$ pour les complexes [Mn(**EDTA**)(**BOM**)]$^{2-}$ et [Mn(**DO3A**)(**BOM**)$_3$]$^-$ respectivement. Le BOM est un substituant benzoxyméthyle connu pour former des interactions non covalentes avec l'albumine de sérum humain. Les relaxivités en présence d'albumine s'élèvent alors respectivement à 55,3 et 8,1 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$.[33]

I.1.2. Les agents superparamagnétiques

La coopérativité entre les moments de spins individuels est cruciale pour la formation d'un superspin. Cette coopérativité n'a pas encore été observée pour les complexes paramagnétiques multimétalliques dans les conditions physiologiques, mais elle est rencontrée très fréquemment dans les oxydes de fer inorganiques comme Fe_3O_4.

Les agents superparamagnétiques sont des particules composées d'un coeur formé de grains ou de cristaux paramagnétiques de Fe_3O_4. Ce coeur est enfoui dans une enveloppe protectrice qui empêche l'agglomération et gouverne éventuellement le ciblage. Il est très important de distinguer la taille du coeur, qui régit les propriétés de contraste, de la taille de la particule qui gouverne la biodistribution et la cinétique d'élimination. Il existe trois types de particules magnétiques utilisées comme agents de contraste, les très petites particules (Ultra Small

Particles of Iron Oxide ou USPIO), les petites particules (Small Particles of Iron Oxide ou SPIO), et les grosses particules (Figure 1.18). Les SPIO et USPIO ont des tailles très inférieures au micromètre et permettent des injections par voie intraveineuse alors que le diamètre des grosses particules peut atteindre plusieurs micromètres, limitant ainsi leur utilisation à l'exploration des voies gastro-intestinales.

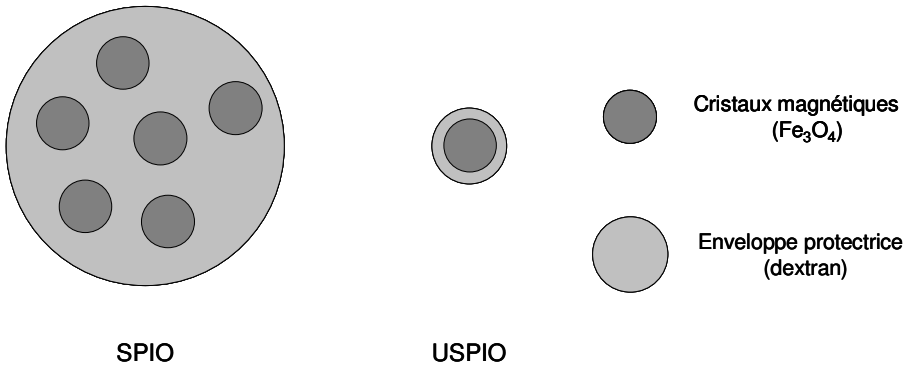


Figure 1.18 : Structure schématique de SPIO et USPIO.

Ces particules superparamagnétiques sont en général des agents de type T_2 car la relaxivité transversale r_2 est beaucoup plus élevée que la relaxivité longitudinale r_1 pour ces systèmes, comme le montre le Tableau 1.9.

Tableau 1.9 : Quelques caractéristiques des agents de contraste superparamagnétiques ; les relaxivités ont été mesurées à un champ magnétique de 0,5 T.

Type de particule	Nom	d_{coeur} (nm)	$d_{particule}$ (nm)	r_1 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)	r_2 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)	T (°C)	Solvant
USPIO	Sinerem	4,3-4,9	50	22,7	53,1	25	agar (0,5%)
SPIO	Endorem	4,3-4,8	200	24	107	37	
SPIO	Resovist	4,2	62	20	190	37	plasma

L'originalité de ces agents superparamagnétiques est le ciblage du système phagocytaire des monocytes (SPM), qui joue un rôle important dans l'élimination de matériaux particulaires circulant dans le sang. Le foie et la ratte possèdent à eux deux 80% des cellules formant le SPM. Les SPIO vont ainsi révéler des métastases du foie et de la rate par réduction ou absence d'activité phagocytaire. Les USPIO, de plus petites tailles, sont internalisées

sélectivement dans les hépatocytes (principales cellules du foie), apportant ainsi des informations anatomiques ainsi que des informations sur la fonction hépatique.[34]

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons exclusivement aux composés paramagnétiques de Gd(III). Nous verrons tout d'abord les conditions d'absence de toxicité nécessaires pour la commercialisation d'un agent de contraste. Afin d'optimiser la synthèse de nouveaux agents de contraste, nous nous intéresserons aux mécanismes de relaxivité des complexes à base de Gd(III). Ceci nous permettra de comprendre quels sont les paramètres importants à contrôler et quels sont les enjeux majeurs de la chimie des agents de contraste.

II.2. Toxicité des agents de contraste à base de Gd(III)

Pour un examen IRM, l'agent de contraste est injecté par voie intraveineuse, mais il se distribue ensuite dans les espaces extracellulaires et intravasculaires. Les doses requises sont en général de 0,1 à 0,3 $mmol.kg^{-1}$ et la concentration de la solution injectée est importante (environ 0,5 $mol.L^{-1}$). Le complexe doit absolument être soluble à ces concentrations. Le deuxième point crucial est la stabilité cinétique et thermodynamique du complexe injecté. L'aqua-ion Gd^{3+} est très toxique. Sa toxicité provient essentiellement de la similitude de son rayon ionique avec celui du Ca(II). Il se substitue donc au calcium(II) dans le corps humain et empêche, entre autre, la transmission neuromusculaire en bloquant les canaux du calcium(II). Il est également connu pour interagir avec les protéines du sérum, et pour se déposer de façon irréversible, sous forme de sels insolubles, sur les os, le foie et la rate. Le complexe injecté doit donc être thermodynamiquement stable et cinétiquement inerte pour que la concentration de Gd(III) libre soit limitée. Ces contraintes sont donc très fortes et impliquent de nombreux tests cliniques, d'un coût actuel d'au moins cent millions de dollars, avant la mise sur le marché.

Les constantes de stabilité thermodynamique ainsi que les doses létales 50 (LD_{50} est la quantité à injecter pour tuer la moitié des rats traités) des complexes commerciaux mentionnés précédemment sont regroupées dans le Tableau 1.10.

Tableau 1.10 : Constantes de stabilité, de sélectivité et LD_{50} de quelques complexes commerciaux.[1]

Complexe	Log β_{110}	LD_{50} (mmol.kg^{-1})	Log K_{sel}
[Gd(**DTPA**)(H_2O)]$^{2-}$	22,46	5,6	7,04
[Gd(**DOTA**)(H_2O)]$^{-}$	25,3	11	8,3
[Gd(**DTPA-BMA**)(H_2O)]	16,85	14,8	9,04
[Gd(**HP-DO3A**)(H_2O)]$^{-}$	23,8	12	6,95

Deux conclusions s'imposent : tout d'abord, les doses létales des complexes sont en pratique au minimum 50 fois supérieures aux doses injectées. D'autre part, ces doses létales ne peuvent pas être simplement corrélées aux constantes de stabilité des complexes. Il a été montré qu'une constante de stabilité conditionnelle (constante prenant en compte des conditions spécifiques, comme le pH par exemple) peut être reliée à la sélectivité d'un ligand pour le Gd(III) au détriment des cations endogènes. En effet, pour simuler le milieu physiologique, il est nécessaire de considérer la compétition vis-à-vis des cations Ca^{2+}, Zn^{2+} et Cu^{2+}qui peuvent entrainer la décomplexation du Gd(III). Ainsi la constante de sélectivité conditionnelle K_{sel}, prenant en compte les effets de pH (protonations du ligand), et les principales réactions secondaires avec les cations précédemment cités, est désormais utilisée couramment, et définie comme suit :

$$K_{sel} = \beta_{GdL}(\alpha_H^{-1} + \alpha_{Ca}^{-1} + \alpha_{Zn}^{-1} + \alpha_{Cu}^{-1})^{-1} \qquad \textbf{équation 1.19}$$

où $\alpha_H^{-1} = 1 + K_{a1}[H^+] + K_{a1}K_{a2}[H^+]^2 + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[H^+]^3 + ...$

$\alpha_{Ca}^{-1} = \beta_{CaL}[Ca^{2+}]$

$\alpha_{Zn}^{-1} = \beta_{ZnL}[Zn^{2+}]$

$\alpha_{Cu}^{-1} = \beta_{CuL}[Cu^{2+}]$

$[Ca^{2+}] = 2,5$ mmol.L^{-1}

$[Zn^{2+}] = 50$ µmol.L^{-1}

$[Cu^{2+}] = 1$ µmol.L^{-1}

Les concentrations mentionnées sont les concentrations physiologiques et le pH est de 7,4.[35]

Ainsi, le complexe ayant la plus forte constante de sélectivité, le Gd(**DTPA-BMA**), est également celui possédant la LD_{50} la plus élevée. Cet argument n'est toutefois plus valable pour les complexes Gd**DOTA** et Gd**DO3A** car l'inertie cinétique de ces macrocycles est

importante. La prise en compte de la sélectivité est justifiée si les complexes étudiés ont une cinétique telle que la transmétallation puisse avoir lieu lors de leur durée de vie *in vivo*.

Des stabilités thermodynamique et cinétique élevées sont des conditions nécessaires pour espérer une faible toxicité et donc une commercialisation des complexes en tant qu'agent de contraste. Par ailleurs, un bon agent de contraste doit posséder des valeurs intéressantes de relaxivité. Pour comprendre les valeurs de relaxivité données dans le Tableau 1.8, il est nécessaire d'examiner les mécanismes de relaxivité des complexes de Gd(III). Il convient de rappeler que ces mécanismes sont abordés en considérant l'interaction avec des molécules d'eau dans le cadre des agents de contraste pour l'IRM, mais ils sont toutefois beaucoup plus généraux et peuvent être appliqués à l'interaction avec n'importe quel soluté présent dans le milieu.

II.3. Mécanisme de relaxivité des complexes de Gd(III)

La contribution principale de la relaxation des protons de l'eau provient des interactions entre le spin nucléaire I des protons et le spin électronique S du cation métallique. Cette interaction d'origine dipolaire diminue rapidement avec la distance r_{IS} entre I et S, en r_{IS}^{-3}. Ainsi, toute interaction chimique spécifique qui va amener les protons à proximité du centre paramagnétique va favoriser la relaxation. Dans le cas des complexes de Gd(III), cette interaction spécifique correspond à la coordination de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du cation métallique. Les protons de ces molécules sont soumis à un mécanisme très efficace de relaxation appelé mécanisme de sphère interne ou inner-sphere (IS) en anglais. Lorsque les molécules d'eau coordonnées s'échangent avec celles de l'eau environnante, comme le montre la Figure 1.19, les nouvelles molécules d'eau coordonnées subissent à leur tour le mécanisme IS. Les molécules de solvant environnantes ressentent également les effets du paramagnétisme modulé par des phénomènes de diffusion à proximité du centre métallique. Cette fois le mécanisme de relaxation associé est appelé mécanisme de sphère externe ou outer-sphere (OS).

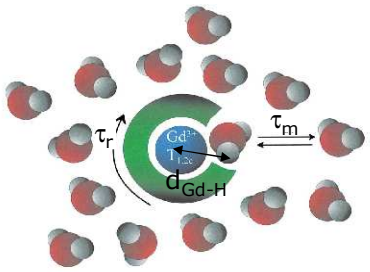


Figure 1.19 : Représentation schématique d'un complexe de Gd(III) avec une molécule d'eau en première sphère de coordination. τ_R est le temps de corrélation rotationnelle du complexe, τ_m est la durée de vie de la molécule coordonnée en première sphère alors que $T_{1,2e}$ sont les temps de relaxation électronique du Gd(III).

L'augmentation paramagnétique de relaxation (PRE) est alors la somme de deux termes (équation 1.20), il en est de même pour la relaxivité (équation 1.21)

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} = \left(\frac{1}{T_i}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_i}\right)^{OS} \qquad \textbf{équation 1.20}$$

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} \qquad \textbf{équation 1.21}$$

avec i=1,2 et IS, OS rappelant respectivement le mécanisme de sphère interne et de sphère externe.

Il existe également un troisième mécanisme de relaxation, le mécanisme de seconde sphère (2S). Ce mécanisme concerne les molécules de solvant qui ne sont pas directement coordonnées au cation métallique mais qui restent un certain temps à proximité, en raison d'interactions spécifiques (souvent des liaisons hydrogène) avec le ligand ou avec les molécules de solvant en première sphère de coordination. Ce mécanisme est négligeable dans la plupart des cas, et souvent traité conjointement avec le mécanisme OS.

Les agents de contraste à base de Gd(III) étant principalement des agents de type T_1, nous nous limiterons aux équations de relaxivité longitudinale dans la description des trois mécanismes.

I.3.1. Mécanisme de sphère interne (IS)

La contribution de sphère interne à la relaxation provient de l'échange chimique des molécules d'eau liées au centre métallique avec celles de l'eau environnante. Le problème est ramené à l'étude de l'échange entre deux sites. L'un des sites (l'eau solvant ou eau libre) est

beaucoup plus peuplé que l'autre (l'eau liée), et le signal observé correspond à celui de l'eau libre.

L'augmentation paramagnétique de relaxation de sphère interne longitudinale des protons de l'eau est la suivante :

$$\frac{1}{T_1^{IS}} = \frac{qP_m}{T_{1m} + \tau_m} \qquad \textbf{équation 1.22}$$

où P_m est la fraction molaire de molécules de solvant directement liées au cation métallique, q le nombre de molécules d'eau liées par centre métallique, T_{1m} le temps de relaxation longitudinale du proton qui serait observé si la molécule d'eau portant ce proton était coordonnée au Gd(III) de manière permanente et τ_m le temps de vie de la molécule d'eau coordonnée.[36,37]

La relaxation des protons de l'eau liée est gouvernée par une interaction dipôle-dipôle et une interaction scalaire ou de contact, toutes deux dépendantes du champ magnétique. Le Gd(III) formant des liaisons de nature ionique avec l'eau, les protons se trouvent relativement éloignés du centre paramagnétique et l'interaction de contact est négligeable. Le temps de relaxation des protons de l'eau liée peut donc, dans une bonne approximation, être considéré comme dépendant uniquement de l'interaction dipolaire.[38]

Le temps de relaxation est donné par les équations de Solomon-Bloembergen modifiées :

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{5}\frac{\gamma_I{}^2 g^2 \mu_B{}^2 S(S+1)}{(r_{GdH})^6}\left[\frac{\tau_{c1}}{\left(1+\omega_I{}^2\tau_{c2}{}^2\right)} + \frac{7}{3}\frac{\tau_{c2}}{\left(1+\omega_s{}^2\tau_{c2}{}^2\right)}\right] \qquad \textbf{équation 1.23}$$

où r_{GdH} représente la distance entre le spin I (du proton observé) et le spin S (spin électronique du cation métallique), et τ_{c1}, τ_{c2} sont des temps de corrélation reliés aux processus moléculaires dynamiques et définis de la façon suivante :

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_R} \qquad (\tau_R << \tau_m) \qquad \textbf{équation 1.24}$$

où T_{1e} et T_{2e} sont les temps de relaxation électronique longitudinale et transversale du Gd(III), τ_R est le temps de corrélation rotationnelle du complexe.

Les temps de relaxation électronique sont donnés par les équations 1.25-1.28 .[39,40]

$$\frac{1}{T_{1e}} = 2C\left(\frac{1}{1+\omega_S^2\tau_v^2} + \frac{4}{1+4\omega_S^2\tau_v^2}\right) \qquad \textbf{équation 1.25}$$

$$\frac{1}{T_{2e}} = C\left(\frac{5}{1+\omega_S^2\tau_v^2} + \frac{2}{1+4\omega_S^2\tau_v^2} + 3\right)$$ **équation 1.26**

$$C = \frac{1}{50}\Delta^2\tau_v\left[4S(S+1)-3\right]$$ **équation 1.27**

où Δ^2 est le carré de l'amplitude d'éclatement en champ nul (ZFS), et τ_v est le temps de corrélation pour la modulation de l'interaction ZFS. Cette modulation provient des vibrations du complexe. Ces équations ne prennent en compte que la partie fluctuante du ZFS dans le repère moléculaire, sans tenir compte de la partie statique. Certains auteurs expriment C en fonction de la limite à bas champ du temps de relaxation électronique, τ_{S0} :

$$C = \frac{1}{10\tau_{S0}}$$

avec

$$\frac{1}{\tau_{S0}} = \frac{1}{5}\Delta^2\tau_v\left[4S(S+1)-3\right]$$ **équation 1.28**

L'ensemble de ces équations constitue la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM).

D'après ce mécanisme de sphère interne, les paramètres importants à contrôler pour maximiser la relaxivité sont :

- le nombre q d'hydratation du complexe,
- la distance spin nucléaire-spin électronique, r_{IS},
- le temps de corrélation rotationnelle du complexe τ_R,
- la vitesse d'échange τ_m des molécules d'eau coordonnées au cation,
- les temps de relaxation électronique T_{1e} et T_{2e}.

I.3.2. Mécanisme de sphère externe (OS)

Seule contribution à la relaxivité lorsque le complexe n'a pas de molécules d'eau directement liées à son centre métallique, le mécanisme de sphère externe met en jeu le couplage dipolaire électron-noyau lorsque les molécules de solvant diffusent près du complexe. La distance minimale d'approche entre la molécule d'eau et Gd^{3+}, a_{GdH}, ainsi que le coefficient de diffusion de la molécule d'eau par rapport au complexe, D, sont les paramètres à considérer.

Le temps caractéristique sera un temps de corrélation diffusionnelle, tel que $\tau = a_{GdH}^2/D$. Le taux de relaxation $1/T_1$ est donné par l'équation 1.29.

$$\frac{1}{T_1^{OS}} = \frac{8\pi}{5}\gamma_I^2\gamma_S^2\hbar^2 S(S+1)\left[j\left(\frac{1}{T_{1e}} + i\omega_I\right) + \frac{7}{3} j\left(\frac{1}{T_{2e}} + i\omega_S\right)\right] \qquad \textbf{équation 1.29}$$

La densité spectrale $j(\sigma)$ est la transformée de Fourier des fonctions de corrélation temporelle. Une expression simple existe pour ces densités spectrales dans le cadre du modèle de Gd(III) et de protons aux centres de sphères dures (les interactions électrostatiques ou spécifiques ne sont pas prises en compte) :

$$j(\sigma) = \frac{10^{-6} N}{D a_{GdH}} \mathrm{Re}\left[\frac{4+x}{3(9+9x+4x^2+x^3)}\right] \text{ avec } x \equiv \sqrt{\sigma\tau} \qquad \textbf{équation 1.30}$$

N représente le nombre d'Avogadro, $D = D_I + D_S$ est le coefficient de diffusion relatif exprimé comme la somme des coefficients de diffusion de l'espèce contenant le noyau observé et de l'espèce contenant le Gd(III), a_{GdH} est la distance minimale d'approche entre un proton d'eau coordonnée et le Gd(III).

L'ensemble de ces équations (1.29-1.30) représente le modèle de Ayant-Belorisky-Hwang-Freed (ABHF).[41-45]

D'autre part, il faut noter que l'approximation de sphère externe est difficilement applicable aux molécules d'eau de seconde sphère surtout lorsque ce nombre de molécules est important. Ces molécules présentent en effet des interactions non négligeables avec le complexe et ne seront pas correctement représentées par un simple modèle de sphères dures, il est donc nécessaire d'introduire un mécanisme de seconde sphère.

I.3.3. Mécanisme de seconde sphère (2S)

Des interactions fortes entre les molécules d'eau et les bras liant le cation ne permettent pas de traiter ces molécules par un pur modèle diffusionnel de type OS. Ces molécules doivent être prises en compte de la même manière que les molécules présentes en première sphère de coordination, avec un modèle de diffusion rotationnelle. L'équation 1.21 a alors été remplacée par l'équation suivante : [46,47]

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{2S} + r_i^{OS} \qquad \textbf{équation 1.31}$$

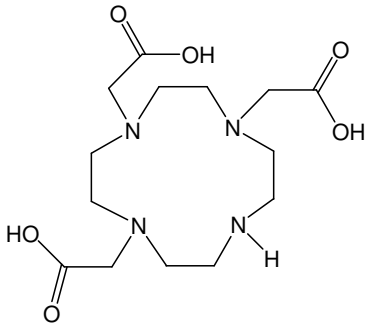
où r_i^{2S} correspond à la contribution des molécules d'eau en seconde sphère de coordination. Le terme de seconde sphère n'est pas bien approprié car il ne désigne pas une sphère complète mais seulement les molécules d'eau à proximité du centre paramagnétique. En première approximation, la contribution de seconde sphère est calculée comme celle de sphère interne en ajustant toutefois la vitesse d'échange et la distance. Il faut noter que l'orientation des molécules n'est pas la même en seconde sphère qu'en sphère interne. Dans ce cas, ce sont les protons qui sont plus proches du cation métallique que les oxygènes.

II.4. Paramètres influant sur la relaxivité

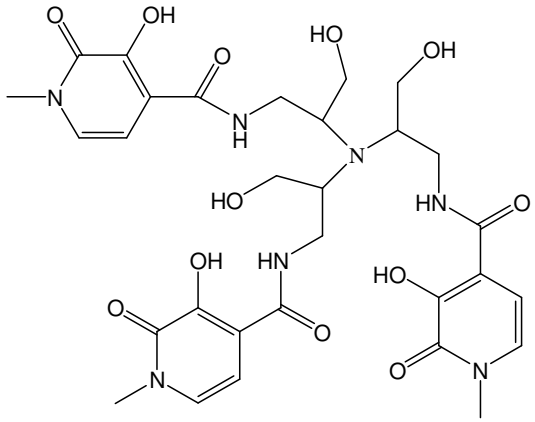
Nous venons de voir que de nombreux paramètres interviennent dans les équations de relaxivité, en particulier les paramètres régissant le mécanisme de sphère interne. Nous allons nous intéresser à optimiser ces paramètres afin d'obtenir, pour un complexe donné, la relaxivité la plus élevée possible.

I.4.1. Nombre de molécules d'eau coordonnées en sphère interne, q

Ce nombre est directement proportionnel à la relaxivité de sphère interne. Il semble donc à première vue qu'il soit souhaitable d'avoir un nombre maximal de molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique. Toutefois, cette augmentation du nombre de molécules d'eau coordonnées, s'accompagne d'une diminution de stabilité et d'une labilité cinétique préjudiciable à l'éventuelle commercialisation de l'agent de contraste. En pratique, les principaux agents commerciaux possèdent une molécule d'eau en première sphère de coordination. Il est possible d'envisager des complexes en possédant deux, mais au-delà, la perte de stabilité semble trop importante. Sur la Figure 1.20 sont représentés les ligands **DO3A** et **L-Ser$_3$-TREN-Me$_3$-3,2-HOPO**. Les complexes de Gd(III) correspondants possèdent deux molécules d'eau en première sphère de coordination et leurs relaxivités sont respectivement 28 et 91% plus importantes que celles des complexes Gd**DOTA** ou Gd**DTPA**.[48,49] La différence entre les deux ligands s'explique par la différence de poids moléculaire et donc de temps de corrélation rotationnelle, paramètre que nous étudierons en détail par la suite.



DO3A

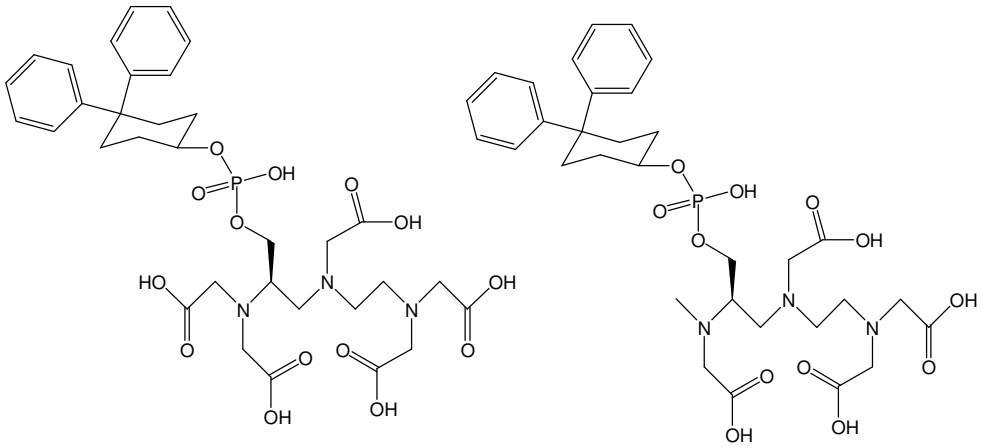


L-Ser$_3$-TREN-Me$_3$-3,2-HOPO

Figure 1.20 : Formule chimique des ligands DO3A et L-Ser$_3$-TREN-Me$_3$-3,2-HOPO pour lesquels q = 2.

Toutefois, l'effet de passer de une à deux molécules d'eau liées au Gd(III) n'est pas si trivial. Dans certains cas, la présence de deux molécules d'eau conduit à une diminution de la relaxivité, en raison de la variation du temps de vie ou de la vitesse d'échange de ces molécules d'eau.

Les ligands **L6** et **L7** (voir Figure 1.21) (Gd**L6** est le composé MS-325 qui est commercialisé pour l'imagerie des vaisseaux sanguins) diffèrent uniquement par un bras carboxylate qui est remplacé par un groupement méthyle dans **L7**.



L6 **L7**

Figure 1.21 : Structure chimique des ligands L6 et L7.

Ces composés possèdent respectivement une et deux molécules d'eau. Leurs relaxivités ont été mesurées en présence d'albumine de sérum humain à pH = 7,4, 35 °C et 20 MHz. Elles sont respectivement de 41,5 et 22 mmol^{-1}.L.s^{-1}, alors que les temps de vie sont de 69 et

1160 ns.[50] La relaxivité étant inversement proportionnelle au temps de vie, dans ce cas c'est le temps de vie des molécules d'eau qui devient le facteur limitant. Nous verrons lors de l'étude de ce paramètre ce qui peut expliquer une telle différence.

I.4.2. Distance Gd(III)-proton, r_{GdH}

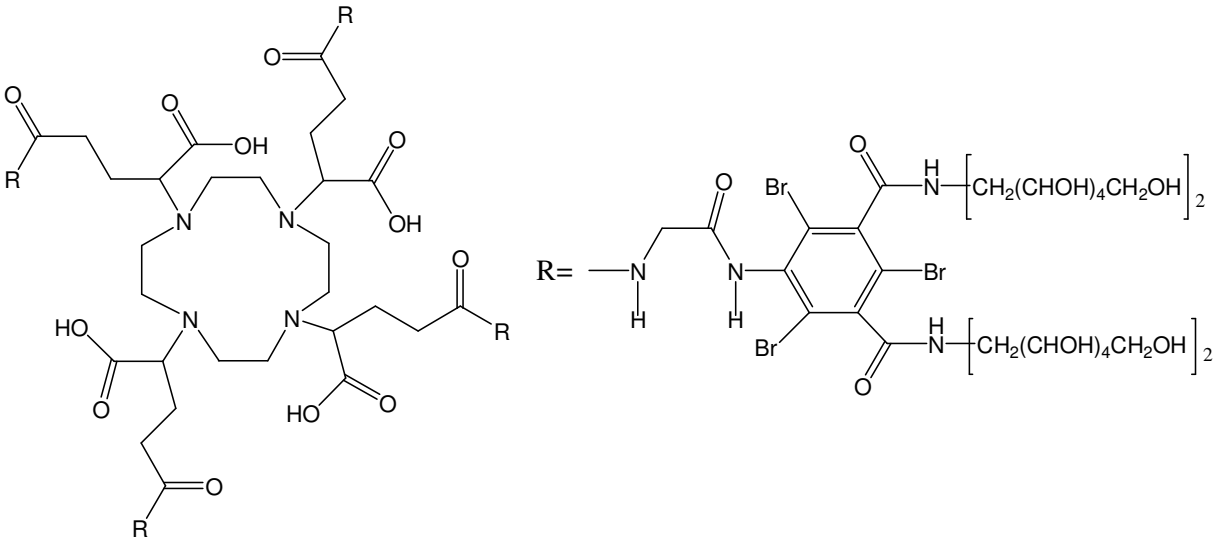
La relaxivité IS est une fonction de $(r_{GdH})^{-6}$. Ainsi une diminution de la distance de 0,1 Å correspond à une augmentation de 20% de la relaxivité. Ce paramètre a donc une influence importante, mais il est assez difficile à contrôler. En théorie, une augmentation de l'angle de torsion entre le plan du complexe et la molécule d'eau doit entraîner une diminution de la distance. Il est cependant impossible de contrôler d'aussi faibles changements structuraux. En pratique pour les ligands polyaminocarboxylates usuels, une valeur de ce paramètre comprise entre 3,0 et 3,2 Å semble physiquement raisonnable.

I.4.3. Temps de corrélation rotationnelle, τ_R

Le temps de corrélation rotationnelle τ_R gouverne la relaxivité aux champs supérieurs à 0,5-1 T. Les valeurs de τ_R sont données dans le Tableau 1.11 pour quelques agents de contraste commerciaux.

Il a été montré que, pour atteindre des relaxivités très élevées, il est nécessaire d'avoir des temps de corrélation rotationnelle de l'ordre de la ns. La principale idée pour augmenter ce temps de corrélation rotationnelle a été de greffer les complexes de Gd(III) de façon covalente ou non covalente à des substrats macromoléculaires. Ces macromolécules, qui doivent être biocompatibles et peu toxiques, peuvent être des protéines ou des peptides, des polyaminoacides, des oligo ou polysaccharides cycliques ou non, des micelles, des liposomes, des dendrimères, ou des polymères synthétiques linéaires.

Ainsi le **P760** (Figure 1.22) présente un τ_R de 2 ns et sa relaxivité est grandement augmentée par rapport à celle du **DOTA** (r_1 = 25 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$).[51]



P760

Figure 1.22 : Formule chimique du P760.

Greffer le complexe sur des macromolécules permet également d'allonger le temps de vie de ces complexes en milieu intravasculaire, ce qui est indispensable pour la réalisation d'angiographie IRM.

Enfin, l'association à des protéines présente l'intérêt de pouvoir faire du ciblage. La plupart des associations non covalentes sont réalisées en introduisant le groupement **BOM** (benzoxyméthyle) qui est connu pour former des interactions non covalentes avec l'albumine de sérum humain ou bovin. Ainsi la relaxivité du [Gd(**DOTA**)(**BOM**)$_3$(H_2O)]$^-$ passe de 7 à 50 mmol^{-1}.L.s^{-1} en l'absence ou en présence d'albumine à pH 7, 25 °C et 20 MHz.[38]

I.4.4. Vitesse d'échange des molécules d'eau, k_{ex}

La vitesse d'échange des molécules d'eau k_{ex} est définie comme l'inverse de leur temps de vie τ_m. Ce temps de vie joue un rôle important dans la détermination de la relaxivité : il module l'efficacité de l'échange chimique entre les molécules en sphère interne et le solvant environnant (équation 1.22).

Pour comprendre comment ce paramètre peut être contrôlé, voyons d'abord sous quelle forme peut avoir lieu l'échange. Il existe deux mécanismes limites entrant en jeu dans l'échange des molécules d'eau :

- un mécanisme dissociatif pour lequel la molécule d'eau en première sphère quitte le cation métallique avant qu'une autre ne la remplace,

- un mécanisme associatif pour lequel une molécule d'eau arrive sur le cation métallique avant que celle déjà présente ne l'ait quitté.

Le mécanisme réel se situe souvent entre ces deux formes limites. Les valeurs de temps de vie des molécules d'eau dans les complexes poly(aminocarboxylates) peuvent varier entre 10 ns pour les plus courts et 2000 ns pour les plus longs (complexe Gd(**DTPA-BMA**)). Les valeurs de quelques complexes commerciaux sont regroupées dans le Tableau 1.11.

Tableau 1.11 : Durée de vie, temps de corrélation rotationnelle, temps de relaxation électronique en champ nul, et relaxivité à 20 MHz de quelques poly(aminocarboxylates) usuels à 25 °C.[1]

Ligand	τ_m (ns)	τ_R (ps)	τ_{S0} (ps)	r_1 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)
DTPA	303	58	72	4,3
DOTA	244	77	473	4,2
DTPA-BMA	2222	66	81	4,39
BOPTA$^-$	290	88	76	5,2

Le complexe Gd**DOTAM** (ligand DOTA dans lequel les bras carboxylates ont été remplacés par des bras amides) a un temps de résidence très court (17 ns), qui se rapproche de celui de l'aqua complexe. Pour essayer de comprendre ces valeurs, il faut se référer aux mécanismes d'échange.

Les molécules d'eau du complexe $Gd(H_2O)_n$ s'échangent par un mécanisme associatif. Or, le nombre de coordination du Gd(III) se situe entre 8 et 9, le passage de 8 à 9 molécules d'eau ne demande que très peu d'énergie.

Pour les complexes de Gd(III) possédant un nombre de coordination de 9, le mécanisme est à caractère dissociatif. En général, ces complexes au nombre de coordination de 8 sont très peu stables, donc une énergie d'activation importante est nécessaire pour que la molécule d'eau se dissocie du cation métallique. La vitesse d'échange diminue alors. Un autre facteur entrant en jeu est la rigidité de la sphère de coordination. Dans le complexe $Gd(H_2O)_n$, le réarrangement de la sphère de coordination flexible demande peu d'énergie, alors que pour les polyaminocarboxylates, la rigidité est plus importante et le réarrangement demande une énergie plus élevée.

Toutefois, même au sein de la série des polyaminocarboxylates, il existe des disparités importantes. Le complexe Gd(**DTPA-BMA**) montre un temps de vie dix fois plus élevé que celui de Gd**DTPA**. Le même type de phénomène est observé pour **L6** et **L7**. Dans les deux cas, un groupement carboxylate est remplacé par un amide ou un méthyle moins coordonnant.

La distance Gd-O_{amide} est plus grande que celle Gd-$O_{carboxylate}$, la première sphère de coordination est ainsi moins encombrée. Or, dans les processus dissociatifs, l'encombrement est essentiel puisqu'il favorise le départ de la molécule d'eau. Les effets de charge viennent s'ajouter à ces effets d'encombrement : une charge négative va également accélérer un processus dissociatif.

Lorsque la vitesse d'échange devient trop faible, le temps de résidence devient du même ordre de grandeur que T_{1m}, et la relaxivité est limitée par cette vitesse d'échange. Ceci est particulièrement vrai lorsque le temps de corrélation rotationnelle est long. Ainsi pour que la vitesse d'échange soit la plus rapide possible et ne limite pas la valeur de la relaxivité, les complexes nonacoordinés visés doivent être chargés négativement et avoir une sphère de coordination encombrée. Cependant, tous les facteurs influençant la vitesse d'échange sont loin d'être connus et compris.

I.4.5. Temps de relaxation électronique, T_{ie}

Le dernier paramètre influant la relaxivité et déterminant aux champs inférieurs à 0,2-0,3 T, est le temps de relaxation électronique. Les valeurs des temps de relaxation électronique en champ nul τ_{S0} sont les seules à être tabulées et comparées puisque T_{ie} dépend du champ. Pour obtenir une relaxivité maximale, il faut avoir un temps de relaxation électronique le plus long possible. Les valeurs de τ_{S0} de quelques complexes commerciaux sont reportées dans le Tableau 1.11. Quelques généralisations peuvent être faites : les complexes de type Gd**DOTA** très symétriques ont tous des τ_{S0} longs alors que les complexes de type Gd**DTPA** asymétriques présentent des τ_{S0} faibles. Ainsi, les complexes de type Gd**DOTA** montrent des relaxivités élevées à bas champ. Cependant, des dérivés de **DOTA** portant des fonctions phosphonates ne présentent pas ces effets. Il semble donc que la symétrie ne soit pas le seul paramètre entrant en jeu. De façon générale, accroître la rigidité d'un complexe revient à diminuer son taux de relaxation électronique, au moins aux faibles températures.[1] Il reste cependant très difficile de contrôler ce paramètre de façon prévisible.

Tous ces paramètres sont donc très importants à déterminer pour rationaliser la relaxivité d'un agent de contraste. Le paragraphe suivant détaille les méthodes de mesure de chacun de ces paramètres.

II.5. Détermination des paramètres de relaxation

I.5.1. Profils NMRD

Les variations de champ magnétique n'affectent pas la chimie de l'échantillon étudié et constituent donc un procédé valable pour l'étudier et la séparation des différents mécanismes d'interactions et des processus dynamiques influençant la relaxivité de l'échantillon. La mesure des temps de relaxation en fonction du champ magnétique appliqué est appelée relaxométrie. Un profil relaxométrique est un tracé de la vitesse de relaxation du spin du noyau observé en fonction du champ magnétique (sur une échelle logarithmique). Ce tracé est également appelé profil de dispersion de relaxation magnétique nucléaire ou plus couramment, d'après l'anglais, profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion).

Les mesures de temps de relaxation se font de façon routinière dans la gamme de 0,47 à 18,8 T (20 à 800 MHz ^{1}H), pour laquelle des spectromètres RMN commerciaux sont disponibles. Il est encore possible de construire des spectromètres de laboratoire efficaces jusqu'à 0,046 T (2 MHz). Cependant, les profils NMRD de solutions paramagnétiques montrent souvent des comportements intéressants à des fréquences inférieures à 2 MHz. Cela a conduit au développement de techniques expérimentales spéciales utilisant un cyclage rapide de champ magnétique. Bien que le principe général de la technique ait été développé dès la fin des années 60, il a fallu attendre 10 ans avant que le premier relaxomètre n'apparaisse en laboratoire. Des relaxomètres commerciaux, fabriqués par la société italienne STELAR, sont maintenant disponibles depuis le milieu des années 1990. Le laboratoire est équipé de ce matériel depuis 2004. Le principe de fonctionnement du relaxomètre est détaillé dans la partie expérimentale.

Ainsi que nous l'avons vu au cours du paragraphe précédent, la dépendance en champ de la relaxivité est fonction de nombreux paramètres. Par conséquent, les profils NMRD peuvent être d'un grand secours dans la détermination de ces paramètres. Ainsi, pour la contribution de sphère interne, le temps de relaxation électronique domine l'interaction dipôle-dipôle à bas champ et détermine la dispersion pour des fréquences de Larmor du proton de 3-4 MHz. A des champs plus élevés, c'est le temps de corrélation rotationnelle qui est dominant et détermine la dispersion autour de 30 MHz.[38]

Les profils NMRD sont donc l'outil de base à la caractérisation d'un agent de contraste. Toutefois, devant la complexité et l'intrication du nombre de paramètres gouvernant la relaxivité, il est souvent difficile de les obtenir de façon pertinente sur les seuls profils NMRD. En particulier, il est très difficile de séparer les contributions relatives de sphère

interne et de sphère externe. Il est donc nécessaire de déterminer un maximum de paramètres de façon indépendante et d'ajuster les paramètres manquants par l'utilisation des profils NMRD pour ne pas arriver à des ajustements corrects par hasard !

I.5.2. Détermination des paramètres influant la relaxivité

Plusieurs techniques se révèlent d'une grande aide pour la détermination indépendante des paramètres importants influençant la relaxivité : la RMN de l'oxygène ^{17}O, la RPE et la luminescence.

Caractérisation de l'hydratation des complexes

Il existe deux méthodes pour la détermination du nombre de molécules d'eau directement coordonnées au cation métallique, q. La première utilise le déplacement chimique paramagnétique des Ln(III). Pour les ions Ln(III) paramagnétiques, et lorsque le noyau observé est l'oxygène ^{17}O, la contribution de contact est dominante et elle est indépendante de la nature du ligand considéré ainsi que des autres ligands liés au cation. Le Dy(III) est un cas particulier intéressant, puisque la contribution de contact est dominante (> 85 %) et une séparation laborieuse des termes de contact et de pseudo contact peut ainsi être évitée. De façon générale, le tracé du déplacement chimique paramagnétique de l'oxygène ^{17}O d'une solution contenant un complexe de Dy(III) en fonction de la concentration en ce complexe donne une droite de pente proportionnelle au nombre de molécules d'eau coordonnées.

La deuxième méthode se base sur des mesures de luminescence. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I.I.4.4. les temps de vie de luminescence dans H_2O et D_2O sont liés de façon empirique au nombre de molécules d'eau en sphère interne (équation 1.5). Une simple mesure de temps de vie dans chacun des deux solvants (H_2O et D_2O) permet donc de déterminer ce nombre de molécules d'eau directement liées au cation métallique.

Détermination de la distance Gd-H

Elle est très difficile à déterminer expérimentalement à mieux que 0,02 Å, et dans la plupart des cas, des approximations sont utilisées. La diffraction aux rayons X ou des études par diffraction de neutrons permettent d'obtenir la distance Gd-O assez facilement. Cependant, le calcul de la distance Gd-H reste difficile car l'angle entre le plan de la molécule et la liaison Gd-O n'est pas bien défini en solution. Des expériences de diffraction de neutrons permettent,

en principe, la détermination de la distance Gd-H. Des expériences ESEEM (Electron Spin-Echo Envelope Modulation) de RPE ont également été utilisées pour déterminer des distances Gd-D, mais les distances trouvées sont faibles par rapport aux résultats obtenus par diffraction de neutrons.[1]

Détermination de la vitesse d'échange

Elle peut être obtenue directement à partir de mesures de temps de relaxation transversale de l'oxygène ^{17}O en fonction de la température. Les mesures du déplacement chimique moyen entre un oxygène libre et un oxygène appartenant à une molécule d'eau directement coordonnée au centre métallique, ainsi que du temps de relaxation transversale comparé à celui d'une référence, permettent de déterminer le temps de résidence ou la vitesse d'échange des molécules d'eau.

Deux zones sont typiques : - les basses températures ou région de lente cinétique d'échange dans laquelle la contribution dominante à la vitesse de relaxation transversale est τ_m.

- les hautes températures ou région de cinétique rapide dans laquelle la contribution dominante est cette fois le taux de relaxation d'une molécule d'eau qui serait coordonnée pendant un temps infini sur le cation.[38]

Détermination du temps de corrélation rotationnelle

Ce paramètre n'est pas aisé à déterminer de façon indépendante et bien que plusieurs méthodes existent pour le déterminer, aucune n'est complètement satisfaisante.

Tout d'abord, le temps de corrélation rotationnelle (dérivant du coefficient de diffusion rotationnelle D^R) est relié au rayon effectif de la molécule grâce à l'équation de Debye-Stokes valable pour les molécules sphériques :

$$\tau_R = \frac{1}{6D^R} = \frac{4\pi a_{hyd}^3 \eta f_R}{3k_B T} \qquad \textbf{équation 1.32}$$

où k_B représente la constante de Boltzmann,

η représente la viscosité macroscopique de la solution,

f_R représente le facteur de microviscosité,

a_{hyd} représente le rayon hydrodynamique effectif du soluté considéré.

La difficulté réside dans l'estimation précise du rayon hydrodynamique a_{hyd}, et de la microviscosité f_R qui peut être très différente de 1.

Ensuite, il est possible de déterminer τ_R par son influence sur le temps de relaxation longitudinale, par RMN de l'oxygène ^{17}O. Le principal avantage est qu'il est possible de travailler directement sur des complexes de Gd(III). Les inconvénients sont de deux sortes : cette détermination requiert la connaissance de la distance Gd-O et de la constante de couplage quadrupolaire. Dans les faits, les valeurs de τ_R mesurées par cette méthode sont souvent 50% plus petites que celles mesurées par ajustement des profils NMRD. Leur comparaison entre complexes de Gd(III) similaires est toutefois pertinente.

Enfin, des mesures de temps de relaxation par RMN du ^{13}C ou du ^{2}H sont également possibles pour déterminer τ_R. L'inconvénient est qu'il faut travailler sur des composés diamagnétiques équivalents aux complexes de Gd(III) (complexes d'Y(III), de La(III) ou de Lu(III)) et que ces noyaux sont peu sensibles vu leur abondance naturelle.

Un autre problème a également été soulevé récemment : il est possible que la rotation indépendante de la molécule d'eau coordonnée autour de l'axe Gd-O ait une influence sur la relaxivité et soit un frein à l'obtention de relaxivités très élevées.[38]

En pratique, le temps de corrélation rotationnelle est souvent obtenu par ajustement du profil NMRD.

Détermination du temps de relaxation électronique

Ce paramètre est crucial à bas champ, et pourtant très difficile à déterminer pour deux raisons. Tout d'abord, il n'existe pas de théorie valable quelles que soient les conditions. Les équations 1.25 et 1.26 sont applicables dans un très petit nombre de situations, en dehors desquelles une théorie beaucoup plus complexe doit être utilisée.[52] Ensuite, de nombreux problèmes techniques sont rencontrés pour la détermination de ce paramètre de façon indépendante. Le temps de relaxation électronique longitudinale est difficilement accessible expérimentalement. Il peut être dérivé de la relaxation électronique transversale, qui est accessible par des mesures de largeur de raie RPE. Des enregistrements de spectres multichamps, multifréquences sont souvent indispensables, et exigent des spectromètres RPE rarement disponibles. Cette détermination est de plus limitée par la validité du modèle SBM (Solomon-Bloembergen-Morgan).

I.5.3. Exemples de profils NMRD

Les profils NMRD d'agents de contraste commerciaux sont représentés Figure 1.23. Etant donné que la relaxivité est limitée par le temps de corrélation rotationnelle τ_R aux fréquences élevées (> 10 MHz), tous les profils se rejoignent dans le cas de ces complexes de poids moléculaires semblables. La vitesse d'échange des molécules d'eau du Gd(**DTPA-BMA**), qui est un ordre de grandeur plus petite que celle des autres complexes, n'a pas d'influence étant donné que la rotation est le facteur limitant. Aux fréquences plus faibles, c'est le temps de relaxation électronique qui est déterminant. C'est ainsi que le Gd(**DOTA**), qui présente un temps de relaxation électronique très grand a une relaxivité beaucoup plus élevée que celle des autres ligands linéaires.

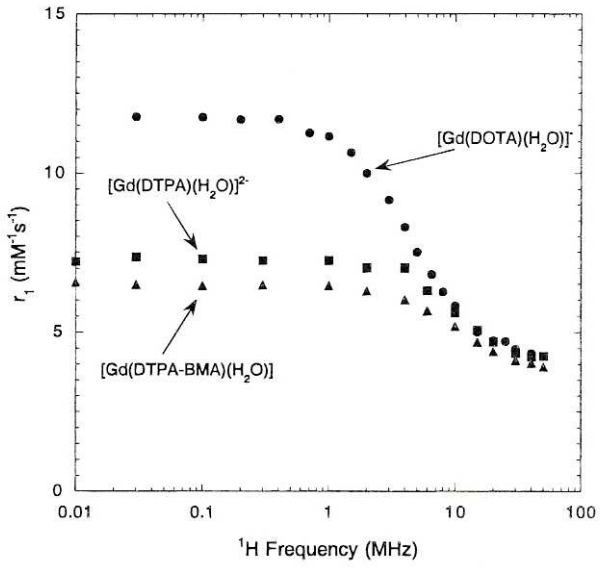


Figure 1.23 : Profils NMRD de 3 complexes de Gd(III) commerciaux (Gd(DTPA-BMA), Gd(DOTA), Gd(DTPA)) à 25 °C.[1]

Les profils NMRD de macromolécules dérivées du **DTPA** (**DTPA-BA-$(CH_2)_n$**, qui est un ligand **DTPA** dans lequel deux fonctions carboxylates ont été remplacées par des fonctions amides sur lesquelles des chaînes alkyles contenant n carbones sont accrochées) sont représentés Figure 1.24.

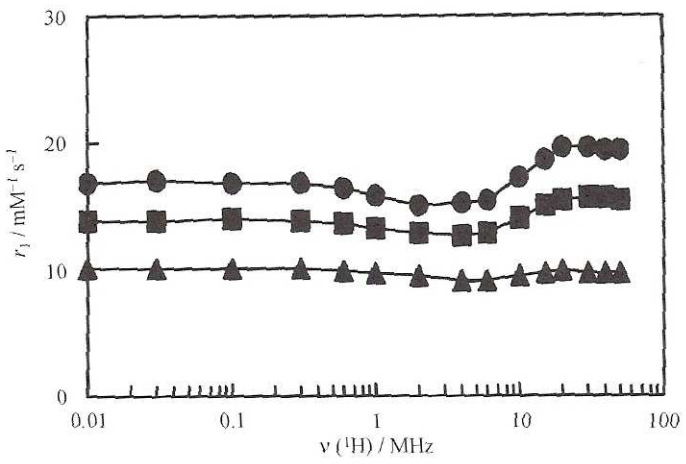


Figure 1.24 : Profils NMRD des complexes, [Gd(DTPA-BA)-$(CH_2)_n]_x$ (n = 6 (▲), 10(■), et 12 (●)) à T = 308 K.[38]

Les relaxivités obtenues sont élevées et les maxima observés à haut champ pour les polymères avec n = 10 et 12 sont caractéristiques de longs temps de corrélation rotationnelle.

La deuxième génération d'agents de contraste commerciaux est celle où les temps de corrélation rotationnelle ont été grandement augmentés. Cela a permis de multiplier par 3 ou 4 les relaxivités précédentes. Cependant, l'augmentation est plus faible que celle qui était initialement attendue, en particulier à cause du manque de rigidité des complexes formés. Le temps de corrélation rotationnelle effectif du vecteur Gd-H est alors plus important que celui de la molécule entière. D'autre part, même pour ces τ_R non optimaux, la vitesse d'échange trop lente des molécules d'eau en première sphère de coordination commence à être limitante pour la relaxivité.

Ainsi, si les paramètres influant sur la relaxivité des complexes de Gd(III) sont bien connus, ils ne sont pas toujours aisément contrôlables. Un point crucial reste la description de la relaxation électronique pour laquelle une théorie au-delà de l'approximation SBM est absolument nécessaire.

Ensuite, malgré la connaissance de l'ensemble de ces paramètres, les relaxivités théoriques optimales souhaitées n'ont toujours pas été atteintes. Le développement de ligands originaux différents des polyaminocarboxylates usuels pourrait permettre une avancée dans le domaine de la course aux fortes relaxivités.

Le travail présenté par la suite s'articule autour de deux axes principaux :

- une étude méthodologique concernant les mesures de relaxivité, et permettant d'étudier des interactions supramoléculaires en solution.
- une étude fondamentale consacrée à deux nouvelles familles de ligands possédant des plates-formes dont les unités de base sont des entités biologiques (sucre et acide aminé) pour évaluer les propriétés nouvelles, ainsi que les potentialités de ces systèmes dans le domaine des agents de contraste pour l'IRM.

2

Nouvelles méthodes relaxométriques pour la caractérisation d'interactions supramoléculaires en solution

I. POURQUOI DES DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES ? 77
I.1. Intérêt de l'utilisation des sondes *77*
I.2. Présentation des sondes utilisées *78*
II. DETERMINATION DE DIVERSES PROPRIETES MOLECULAIRES D'UN COMPLEXE PARAMAGNETIQUE 80
II.1. Charge électrique *80*
II.1.1. Analyse qualitative 82
II.1.2. Interprétation théorique 83
II.2. Equilibre de formation et structure *85*
II.2.1. Principe et notations 85
II.2.2. Problème de deux sites en échange 87
II.2.3. Expressions des vitesses de relaxation 88
II.2.4. Interprétation 93
II.2.5. Conclusion 98
II.3. Equilibre de transmétallation *99*
II.3.1. Principe 99
II.3.2. Validation de la méthode : transmétallation avec du Lu(III) 99
II.3.3. Transmétallation en présence de Zn(II) 106
II.3.4. Conclusion 110
II.4. Temps de relaxation électronique *111*
II.4.1. Problématique 111
II.4.2. Théorie 112
II.4.3. Application au complexe GdDTPA 115
III. BILAN ET PERSPECTIVES 116

I. Pourquoi des développements méthodologiques ?

La caractérisation d'interactions supramoléculaires en solution représente un véritable défi de la chimie actuelle. En effet, il s'agit d'interactions faibles très difficiles à déterminer par des techniques potentiométriques et spectroscopiques classiques. Or, ces interactions sont très intéressantes puisqu'elles sont à la base de la reconnaissance au sein des protéines et, plus généralement, du vivant.

Dans ce travail, nous proposons de nouvelles méthodes relaxométriques basées sur la relaxivité de spins nucléaires portés par des solutés sondes afin de mettre en évidence ces interactions faibles sur des objets simples. D'un point de vue méthodologique, tous les mécanismes et toutes les équations de relaxation qui ont été vues dans le premier chapitre peuvent s'appliquer à n'importe quel noyau observable par RMN, à proximité d'un complexe paramagnétique. Dans le cas particulier des agents de contraste pour l'IRM, nous nous intéressions aux protons des molécules d'eau puisque ce sont eux qui sont détectés pour réaliser des images anatomiques, mais ces relations sont beaucoup plus générales.

Notre approche s'appuie ici sur des mesures de relaxivité de spins nucléaires appartenant à de petites molécules organiques judicieusement choisies afin d'obtenir diverses informations moléculaires, thermodynamiques, structurales et dynamiques, cruciales pour caractériser les complexes de Gd(III) et leurs interactions en solution.

Dans le cas particulier des applications à l'IRM, ces informations complémentaires doivent fournir une description plus rigoureuse de la relaxivité des protons de l'eau induite par les complexes de Gd(III) en diminuant le nombre de paramètres ajustables de la relaxivité théorique. A plus long terme, nous espérons que ces développements aideront à l'optimisation de nouveauxagents de contraste.

I.1. Intérêt de l'utilisation des sondes

Des études menées précédemment au laboratoire ont montré l'intérêt des études de relaxométrie sur des sondes de type sphère externe et ont validé cette approche.[53] Le travail précédemment réalisé a porté exclusivement sur la sonde tétraméthylammonium, chargée positivement (TMA^+) et considérée comme sphérique. La dynamique en solution a été mise en évidence par des mesures de relaxivité à 400 MHz des protons du TMA^+ en présence de

Gd^{3+} et en présence de complexes de Gd(III) avec les ions nitrates. D'un point de vue électrostatique, le TMA^+, qui est fortement repoussé par le Gd^{3+}, l'est moins par les complexes de cet ion avec des nitrates. La relaxivité des protons du TMA^+, qui est proportionnelle à r^{-6}, augmente donc de façon significative lorsque Gd^{3+} est mis en présence de nitrates, permettant de suivre cet équilibre de complexation. La théorie habituelle de la relaxation dipolaire à haut champ (équation 1.29 en considérant T_{1e} et T_{2e} infinis), combinée aux effets électrostatiques coulombiens, donne des relaxivités théoriques en accord avec l'expérience à 10% près. Les erreurs sont dues aux incertitudes des modèles moléculaires employés, mais il faut souligner que cette adéquation est remarquable car il n'y a pas de paramètres ajustables.[54]

En plus de son utilisation comme sonde de la charge d'un complexe de Gd(III), le TMA^+ a ensuite permis l'étude d'autres propriétés de l'ensemble des Ln(III). Ainsi, l'étude des déplacements chimiques paramagnétiques des protons du TMA^+ a permis de calculer, pour l'ensemble de la série des Ln(III), le paramètre d'éclatement de champ cristallin.[30]

Enfin, les mesures de temps de relaxation ont permis d'estimer aisément leurs vitesses de relaxation électronique. L'avantage d'utiliser un soluté sonde de type sphère externe est de pouvoir s'affranchir d'un certain nombre de paramètres inclus dans le mécanisme de sphère interne : en effet, l'étude des protons de l'eau ne peut se faire sans paramètres ajustables étant donné que les mécanismes de sphère interne et de sphère externe doivent être traités simultanément, et qu'il est difficile de mesurer indépendamment la contribution de sphère interne.

Les travaux qui suivent illustreront l'intérêt de l'utilisation des sondes pour la détermination d'un grand nombre de paramètres moléculaires importants, tant au niveau de la théorie de la relaxation, qu'au niveau de la modélisation de la dynamique spatiale dans les liquides.

I.2. Présentation des sondes utilisées

Nous nous proposons d'utiliser ici de nouvelles sondes aux propriétés intéressantes que nous allons détailler.

Tout d'abord, les sondes portent deux types de noyaux observables par RMN : le proton et le fluor. Les noyaux ^1H et ^{19}F présentent une abondance naturelle de 100 %, un spin nucléaire $I = 1/2$, et des rapports gyromagnétiques $\gamma_H = 26{,}7522128.10^7$ rad.s^{-1}.T^{-1} et $\gamma_F = 25{,}18148.10^7$ rad.s^{-1}.T^{-1}. Le principal intérêt des sondes fluorées réside dans la possibilité

de travailler dans l'eau légère. Ensuite, il est souvent possible d'avoir des molécules portant à la fois des protons et des fluors, permettant sur un même échantillon de croiser les observations faites sur l'hydrogène ^{1}H et le fluor ^{19}F. C'est pourquoi les sondes de la série $CF_xH_{(3-x)}COO^-$ ($0 \leq x \leq 3$) ont été utilisées.

Certaines de ces sondes peuvent complexer faiblement le métal, et présentent alors l'intérêt de pouvoir être des sondes soit de dynamique intermoléculaire, soit de dynamique intramoléculaire. Elles vont donc permettre à la fois de caractériser des équilibres de complexation en solution, de déterminer des paramètres structuraux (sondes intramoléculaires), et de renseigner sur la dynamique intermoléculaire en solution (sondes intermoléculaires).

Enfin, des sondes de charges +1, 0, et -1 ont été choisies, ce qui permet d'étudier simultanément des effets de charge (interactions coulombiennes), et des effets de taille (encombrement stérique) en solution. La seule sonde chargée positivement qui a été envisagée est le TMA^+. Les sondes de charges négatives $CF_3SO_3^-$ et $CH_3SO_3^-$ ont été utilisées, en plus des sondes de type $CF_xH_{(3-x)}COO^-$ décrites précédemment. Enfin, les sondes neutres utilisées ont des diamètres variant en moyenne de 4,5 à 6 Å, afin de pouvoir tester l'encombrement stérique : le méthanol (MeOH), le *tert*-butanol (*t*BuOH), le dioxane et le pentaérythritol ou tétrakis(hydroxyméthyl)méthane (Figure 2.1).

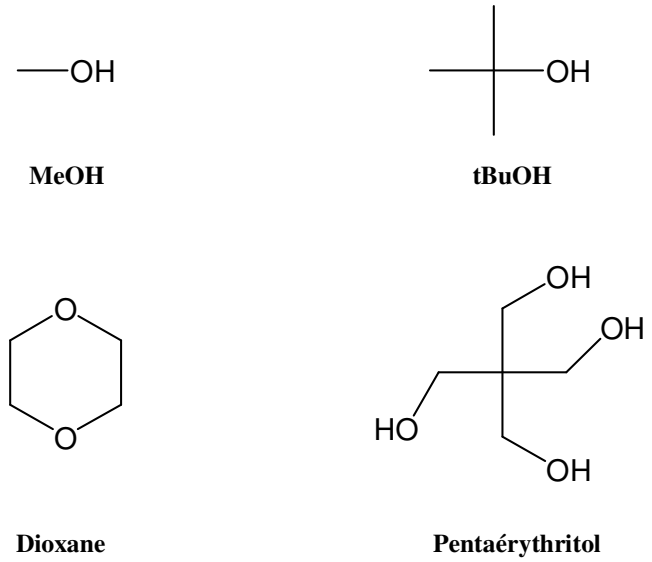


Figure 2.1 : Structure chimique des sondes neutres utilisées.

Les sondes envisagées auront une dynamique spatiale par rapport aux complexes, soit de type sphère externe pure, soit de type sphère interne et sphère externe. Nous appliquerons donc les

formalismes de la seule relaxation OS ou de la relaxation IS et OS (équations 1.29 et 1.22-1.24), en considérant, à haut champ, des temps de relaxation électronique longitudinale et transversale infiniment longs.

Dans un premier temps, avec des sondes de type sphère externe, nous verrons comment modéliser la dynamique intermoléculaire en solution sur les exemples de l'aqua-ion Gd^{3+} et d'un autre complexe modèle, le GdDTPA. Nous étudierons plus précisément les interactions en solution de ces complexes avec des sondes chargées positivement, négativement ou avec des sondes neutres. Nous nous intéresserons par la suite à la mise en évidence d'équilibres de complexation. Pour cela, les sondes intermoléculaires et intramoléculaires de type $CF_xH_{(3-x)}COO^-$ seront utilisées, et permettront de montrer l'effet de l'électronégativité du fluor sur la complexation, ainsi que de déterminer la structure des complexes formés en solution. Des équilibres de transmétallation seront également suivis de cette manière. Enfin, nous nous intéresserons à la détermination des temps de relaxation électronique avec des sondes neutres, ayant avec le complexe une dynamique intermoléculaire purement de sphère externe.

II. Détermination de diverses propriétés moléculaires d'un complexe paramagnétique

II.1. Charge électrique

Des mesures de temps de relaxation à force ionique constante ([KCl] = 0,1 mol.L^{-1}) sur des sondes portant diverses charges ont été effectuées en présence de [DTPA] = 2,1 mmol.L^{-1}. L'évolution des augmentations paramagnétiques de relaxation (PRE) est représentée sur la Figure 2.2, en fonction de la concentration croissante de Gd(III) ajoutée.

Tout d'abord, nous remarquons deux zones sur le graphique, correspondant à des concentrations en Gd(III) inférieures et supérieures à la concentration en DTPA. Ceci est cohérent avec la formation d'un complexe GdDTPA pour [Gd] < [DTPA], puis à la présence de Gd(III) libre en solution pour [Gd] > [DTPA].

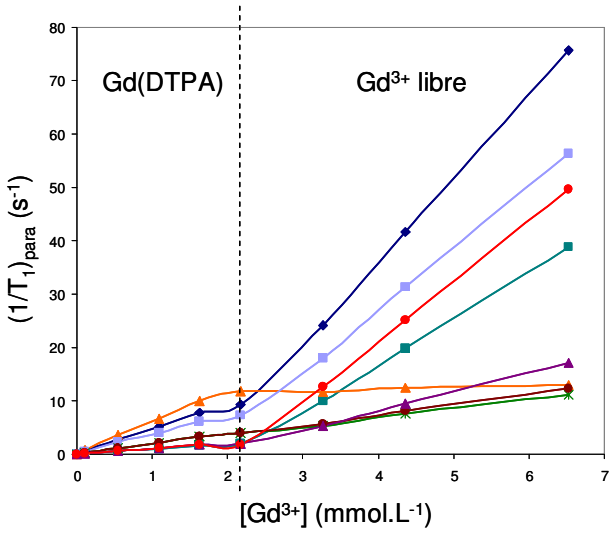


Figure 2.2 : Augmentations paramagnétiques de relaxation longitudinale, mesurées à 400 MHz et 25 °C, en fonction de [Gd^{3+}] et en présence de [DTPA] = 2,08 mmol.L^{-1}, [KCl] = 0,1 mol.L^{-1} sur les sondes suivantes à la concentration de 10 mmol.L^{-1} : HOD (◆), pentaérythritol (■), CF_3COO^-(●), $CH_3SO_3^-$ (■), Me_4N^+ (▲), $CF_3SO_3^-$ (▲), dioxane (●), *t*BuOH (✱).

D'autre part, sur chacune de ces zones, la PRE croît linéairement avec la concentration en Gd(III), ce qui est cohérent avec le fait que la force ionique est maintenue constante et que dans chacune des zones, seule une espèce varie en fonction des concentrations croissantes en Gd(III) ajoutées. Cela permet de déterminer des relaxivités pour chacune des sondes en présence soit de $Gd(DTPA)^{2-}$ (sur la zone [Gd] < [DTPA]), soit de l'aqua-ion Gd^{3+} (sur la zone [Gd] > [DTPA]). Ces relaxivités sont données dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Relaxivités longitudinales expérimentales et théoriques du proton et du fluor des sondes en présence de GdDTPA, et de Gd(III) mesurées à 25 °C, et 400 MHz.

Sonde	r_1 (GdDTPA) expérimentale (mmol^{-1}.L.s^{-1})	r_1 (GdDTPA) théorique (mmol^{-1}.L.s^{-1})	r_1 (Gd^{3+}) expérimentale (mmol^{-1}.L.s^{-1})	r_1 (Gd^{3+}) théorique (mmol^{-1}.L.s^{-1})
HOD	4,80(7)		15,0(5)	
pentaérythritol	3,80(5)	1,54	11,41(2)	1,59
dioxane	2,07(2)	1,44	1,96(5)	1,59
***t*BuOH**	2,06(1)	1,51	1,70(3)	1,68
TMA^+	6,0(1)	4,08	0,77(3)	0,59
$CF_3SO_3^-$	1,10(5)	0,67	3,50(5)	5,75
CF_3COO^-	1,10(5)	0,75	9,5(5)	10,4
$CH_3SO_3^-$	1,04(1)	0,74	3,50(5)	8,9

De façon très globale, nous pouvons remarquer que pour la zone [Gd] < [DTPA], par ordre de relaxivité décroissante, nous trouvons la sonde chargée positivement, les sondes neutres, et les sondes chargées négativement. Pour la zone [Gd] > [DTPA], c'est exactement l'inverse : à l'exception de l'eau et du pentaérythritol, ce sont les sondes chargées négativement qui ont les relaxivités les plus élevées, et la sonde chargé positivement qui a la relaxivité la plus faible. La relaxivité dépend de la distance r entre le spin I considéré et le Gd(III) par un facteur en r^{-6}, pondéré par la probabilité de distribution relative de la sonde par rapport au complexe. Or ces probabilités sont gouvernées par les effets d'attraction et de répulsion coulombiennes (voir Figure 2.3).

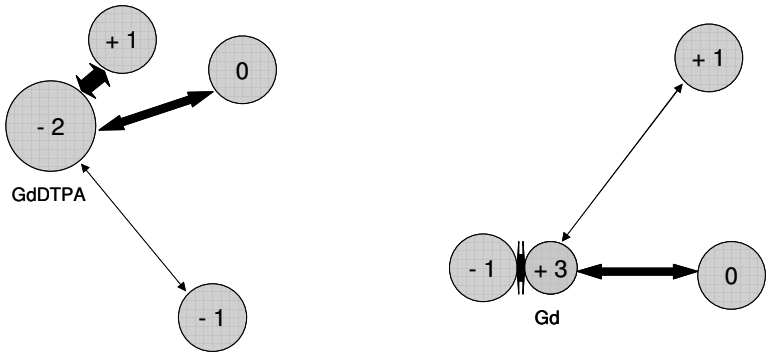


Figure 2.3 : Représentation schématique des distances intermoléculaires de probabilité importante dues aux attractions et répulsions coulombiennes entre des sondes de différentes charges dans le cas du GdDTPA (à gauche) et du Gd(III) (à droite).

Nous allons maintenant étudier les relaxivités en présence de chacun des complexes plus en détail.

I.1.1. Analyse qualitative

- *Relaxivité en présence du complexe $Gd(DTPA)^{2-}$*

La sonde tétraméthylammonium présente la relaxivité la plus élevée (6,0 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$), ce qui est en accord avec l'attraction +1/-2. Au niveau des sondes neutres, deux catégories apparaissent : l'eau et le pentaérythritol présentent des relaxivités élevées ($r_1 \approx$ 5-6 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$), et le *tert*-butanol et le dioxane présentent des relaxivités plus faibles ($r_1 \approx 2$ $mmol^{-1}.L.s^{-1}$). Nous avons vu au cours du chapitre précédent que l'eau jouait un rôle particulier, puisqu'il existe un équilibre entre des molécules d'eau libres et des molécules d'eau liées au cation métallique, ce qui explique la relaxivité élevée. D'après les résultats observés, le même phénomène pourrait avoir lieu avec le pentaérythritol, en considérant des

associations par liaisons hydrogènes entre les hydrogènes des alcools du pentaérythritol, et les atomes donneurs (oxygène ou azote) du ligand DTPA.

La relaxivité des deux autres sondes neutres (dioxane et *t*BuOH) est déterminée par le simple mouvement brownien de ces sondes et du complexe (il n'y a pas d'attraction ou de répulsion notable). Enfin, les sondes chargées négativement ont une relaxivité encore plus faible ($r_1 \approx 1$ mmol^{-1}.L.s^{-1}), puisqu'il existe une répulsion coulombienne -1/-2 vis-à-vis du complexe $GdDTPA^{2-}$.

- *Relaxivité en présence de l'aqua-ion Gd^{3+}*

Les possibilités d'association que nous avons déjà vues avec le complexe GdDTPA, mais qui sont encore beaucoup plus importantes avec l'aqua-ion, expliquent pourquoi les sondes eau et pentaérythritol ont les relaxivités les plus élevées.

Hormis ces deux sondes, ce sont bien les sondes chargées négativement qui présentent les relaxivités les plus importantes, traduisant de grandes probabilités de contact avec l'aqua-ion. Parmi les trois sondes étudiées, $CF_3SO_3^-$, $CH_3SO_3^-$ et CF_3COO^-, la première a une relaxivité plus faible que les deux autres. Ceci s'explique en partie par les groupes SO_3^- et CF_3 plus volumineux que les groupes COO^- et CH_3, et donc la molécules est susceptible d'avoir une énergie électrostatique de contact significativement plus positive que les autres sondes, et donc une moins forte probabilité de contact.[55,56]

Nous allons désormais interpréter ces mesures de façon quantitative à l'aide d'un modèle théorique.

I.1.2. Interprétation théorique

Nous avons mesuré la relaxivité des protons HOD. Comme nous l'avons vu qualitativement, pour les deux complexes, elle est systématiquement supérieure aux relaxivités des autres sondes neutres à cause d'une contribution de sphère interne importante,[1] qui ne peut pas être analysée par une simple étude de relaxation RMN à une seule fréquence. Nous n'interpréterons donc pas ces valeurs ici. Pour interpréter les fortes variations observées de relaxivité en fonction de l'interaction charge-charge entre le soluté sonde et le complexe de Gd(III), il faut aller au-delà du modèle simple ABHF, qui décrit seulement la diffusion relative de deux sphères dures dans un continuum visqueux. Il faut tenir compte de

l'interaction effective entre les deux espèces, encore appelée potentiel de force moyenne (PMF). Ce PMF est égal à leur énergie potentielle de Coulomb dans le vide après atténuation par l'écrantage diélectrique de l'eau et l'écrantage de Debye des ions spectateurs, et après modulation spatiale par la solvatation des molécules d'eau de nature discrète.[55,56] Pour calculer une approximation de ce PMF, il faut choisir un modèle moléculaire de solution liquide. Nous approximons ici les espèces en interactions par des sphères dures ayant des volumes proches de ceux de leurs modèles moléculaires compacts et portant les charges électriques expérimentales en leurs centres. Les molécules d'eau sont aussi décrites par des sphères dures portant en leurs centres les dipôles et quadripôles électriques expérimentaux et une polarisabilité moyenne expérimentale. Nous avons calculé les relaxivités théoriques pour les différentes paires soluté sonde/complexe de Gd(III), en supposant que les deux espèces en interaction ont :

- une fonction de distribution de paire égale à l'exponentielle de Boltzmann de leur PMF obtenu à l'aide d'une approximation RHNC (Reference Hyper Natted Chain) de la théorie des équations intégrales des liquides,[56]
- un mouvement de diffusion relative contraint par leur PMF, avec un coefficient de diffusion relative *D* pris égal à la somme des coefficients d'auto-diffusion mesurés des deux espèces.[55]

Les valeurs des coefficients de diffusion mesurés des différentes sondes sont regroupées dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Coefficients de diffusion des différentes sondes mesurés dans D_2O à 25 °C, et 400 MHz

Sonde	D (10^{-5} $cm^2.s^{-1}$)
HOD	1,75(9)
pentaérythritol	0,64(2)
dioxane	0,89(3)
***t*BuOH**	0,72(2)
TMA^+	0,92(3)
$CF_3SO_3^-$	0,83(3)
CF_3COO^-	0,79(2)
$CH_3SO_3^-$	0,96(3)

Les valeurs théoriques de relaxivité de ce modèle purement de sphère externe (OS) sont présentées dans le Tableau 2.1. Pour les deux complexes, sauf pour le soluté sonde pentaérythritol, les effets de charge, qui entraînent une variation des valeurs de la relaxivité de plus d'un ordre de grandeur, sont remarquablement prédits, souvent à 30 % près, par la théorie qui est sans paramètre ajustable ! Les différences observées, en particulier pour la paire $CF_3SO_3^-$ / Gd^{3+} aqua, et bien sûr dans le cas du pentaérythritol, peuvent s'expliquer en partie par la simplicté du modèle moléculaire, qui néglige l'anisotropie de forme et de distribution de charge électrique des molécules, ou encore les attractions moléculaires dispersives en $1/r^6$.[57] Dans le cas du pentaérythritol, les quatre groupes –OH peuvent aussi donner lieu à des liaisons hydrogène avec la sphère d'hydratation de l'aqua-ion Gd^{3+} ou avec le ligand $DTPA^{5-}$.

Le bon accord entre théorie et expérience montre qu'il est possible d'expliquer les valeurs de relaxivité par des mouvements en solution dépendant des interactions moléculaires (coulombiennes). De façon purement qualitative, l'utilisation de sondes de charges différentes permet donc de mettre en évidence des changements d'espèces en solution en fonction de la concentration en Gd(III) ajoutée, lorsque les espèces mises en jeu portent des charges différentes.

Après avoir déterminé des dynamiques en solution avec des sondes principalement de sphère externe par rapport aux complexes paramagnétiques, nous allons nous attacher à l'étude d'équilibres thermodynamiques en solution. Pour cela, nous utilisons les sondes de types $CF_xH_{(3-x)}COO^-$ qui pourront complexer faiblement l'aqua-ion Gd^{3+}. Les sondes deviendront alors des ligands du cation métallique et nous étudierons les équilibres de formation des complexes correspondants en solution, ainsi que la structure de ces complexes.

II.2. Equilibre de formation et structure

I.2.1. Principe et notations

Le but de cette étude est de déterminer, avec le minimum de travail expérimental, de faibles constantes de formation de complexes de Gd(III) par des études d'augmentation paramagnétique de relaxation (PRE) des spins nucléaires des ligands. Pour valider cette méthode, les constantes thermodynamiques de formation de complexes de Gd(III) avec le

groupement carboxylate COO^- de l'acétate et de ses dérivés fluorés ont été évaluées en fonction du nombre d'atomes de fluor. Pour cela, les taux de relaxation $R_1^{L,I}$ du spin nucléaire I (I = ^1H ou ^{19}F) de ces ligands L ont été mesurés en fonction de la concentration en Gd(III) à 400 MHz. Les concentrations de Gd^{3+}, acétate CH_3COO^- (a), monofluoroacétate CFH_2COO^- (mfa, très toxique), difluoroacétate CF_2HCOO^- (dfa), et trifluoroacétate CF_3COO^- (tfa) seront notées respectivement c_{Gd}, c_a, c_{mfa}, c_{dfa}, et c_{tfa}. Les mesures sont réalisées de telle sorte que $c_a = c_{mfa} = c_{dfa} = c_{tfa} = 10$ mmol.L^{-1}, et que $0 \leq c_{Gd} \leq 1{,}15$ mmol.L^{-1}. La force ionique est maintenue constante par KCl 0,1 mol.L^{-1}.

Les valeurs expérimentales de PRE $R_1^{L,I}$ du fluor et du proton sont représentées Figure 2.4.

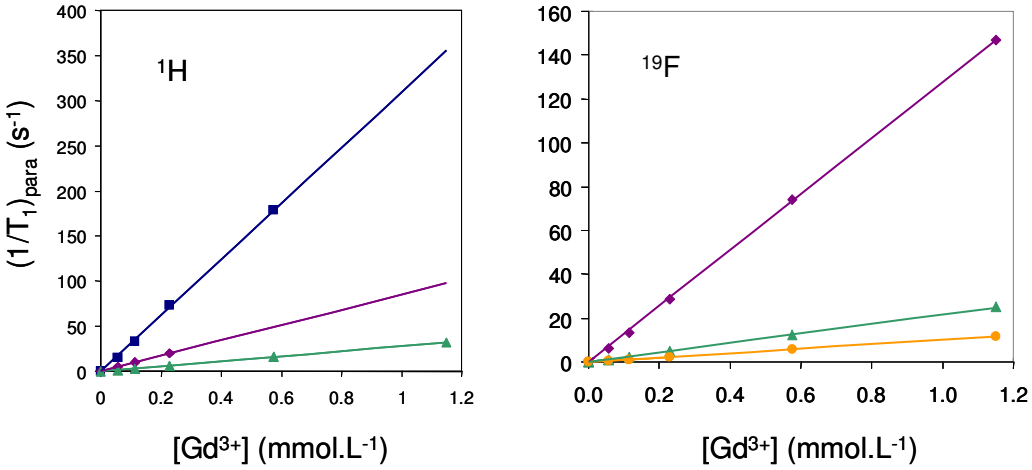


Figure 2.4 : Taux de relaxation à 400 MHz et 25 °C, des spins ^1H (gauche) et ^{19}F (droite) portés par les sondes acétate (a : ■), monofluoroacétate (mfa : w), difluoroacétate (dfa :▲), et trifluoroacétate (tfa :●). [a] = [mfa] = [dfa] = [tfa] = 10 mmol.L^{-1}, [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}.

Dans les deux cas, la PRE décroît avec le nombre d'atomes de fluor présents sur le ligand. Cette tendance s'explique par l'électonégativité des atomes de fluor, qui diminue le caractère donneur du groupement COO^- en faisant décroître sa densité électronique, ce qui entraîne la décroissance de la constante de formation du complexe. Dans ce qui suit, une interprétation quantitative de ces données va nous apporter des informations sur la thermodynamique d'équilibre et la structure des complexes GdL.

Pour chacun des ligands L = a, mfa, dfa, tfa, la formation des complexes GdL est gouvernée par l'équilibre thermodynamique suivant :

$$Gd + L = GdL \qquad \textbf{équation 2.1}$$

Avec la constante thermodynamique d'équilibre :

$$K_{\mathrm{L}} = \frac{[\mathrm{GdL}]}{[\mathrm{Gd}][\mathrm{L}]} \qquad \textbf{équation 2.2}$$

Remarque : pour des raisons d'allègement d'écriture, les conventions de notation thermodynamique développées dans l'annexe 1 ne seront pas appliquées dans ce paragraphe.

D'autre part, la loi de la conservation en ligand permet d'écrire une troisième équation :

$$[\mathrm{L}] + [\mathrm{GdL}] = c_{\mathrm{L}} \qquad \textbf{équation 2.3}$$

I.2.2. Problème de deux sites en échange

Pour interpréter les mesures de PRE, il faut considérer que chaque ligand L est en échange chimique dynamique selon l'équation d'équilibre 2.1, entre deux environnements de relaxation différent : un état lié (« bound » en anglais, noté b) dans lequel L est lié au Gd(III) et un état libre (« free » en anglais, noté f) dans lequel L a un mouvement de translation libre par rapport à l'aqua-ion Gd^{3+} et aux complexes GdL. La théorie de la relaxation du spin nucléaire I du ligand L est particulièrement simple si les processus dynamiques à l'origine de la relaxation sont indépendants l'un de l'autre dans les deux environnements.[36,58,59] Dans ce cas, I a un taux de relaxation spécifique à chacun des environnements. Nous noterons ici les taux de relaxation de I dans les états b et f respectivement, $R_{\alpha}^{\mathrm{L},I,\mathrm{b}}$ et $R_{\alpha}^{\mathrm{L},I,\mathrm{f}}$ (α = 1,2), ou plus simplement R_{α}^{b} et R_{α}^{f}, lorsqu'il n'y a pas de risques de confusion.

Soient $M_{\mathrm{b}z}$ et $M_{\mathrm{f}z}$, les aimantations longitudinales du spin nucléaire I, respectivement dans l'état libre et dans l'état lié. Ces aimantations sont solutions du système d'équations différentielles couplées de Luz et Meiboom (LM) :[59]

$$\begin{cases} \dfrac{\partial M_{\mathrm{b}z}}{\partial t} = -R_1^{\mathrm{b}}\left(M_{\mathrm{b}z} - M_{\mathrm{b,eq}}\right) - \dfrac{M_{\mathrm{b}z}}{\tau_{\mathrm{b}}} + \dfrac{M_{\mathrm{f}z}}{\tau_{\mathrm{f}}} \\ \dfrac{\partial M_{\mathrm{f}z}}{\partial t} = +\dfrac{M_{\mathrm{b}z}}{\tau_{\mathrm{b}}} - R_1^{\mathrm{f}}\left(M_{\mathrm{f}z} - M_{\mathrm{f,eq}}\right) - \dfrac{M_{\mathrm{f}z}}{\tau_{\mathrm{f}}} \end{cases} \qquad \textbf{équation 2.4}$$

$M_{\mathrm{b,eq}}$ et $M_{\mathrm{f,eq}}$ sont les aimantations à l'équilibre. τ_{b} et τ_{f}, représentent les temps de vie du ligand L dans l'état libre et dans l'état lié.

Ces temps de vie satisfont au principe très général du bilan détaillé :

$$\frac{M_{\mathrm{b,eq}}}{\tau_{\mathrm{b}}} = \frac{M_{\mathrm{f,eq}}}{\tau_{\mathrm{f}}} \qquad \textbf{équation 2.5}$$

Comme τ_b est le temps de vie de coordination du ligand L au cation métallique, il correspond en fait au temps de résidence des molécules d'eau τ_m liées au cation Gd(III) dont nous avons parlé dans le cas particulier de l'eau au cours du premier chapitre. Nous conserverons la notation τ_m par la suite.

Le but est de résoudre ce système d'équation couplé le plus simplement possible. Pour cela, il faut d'abord déterminer R_α^{b} et R_α^{f}.

I.2.3. Expressions des vitesses de relaxation

- *Relaxivité de I appartenant à un ligand complexé,* R_α^b

Le taux de relaxation d'un spin I d'un ligand L dans l'état lié b est la somme de trois contributions :

$$R_\alpha^b = R_{\alpha 0}^b + R_{\alpha m} + R_{\alpha p}^{b,OS} \qquad \textbf{équation 2.6}$$

$R_{\alpha 0}^{\mathrm{b}}$ est la contribution diamagnétique, $R_{\alpha m}$ est la contribution provenant de l'Hamiltonien de couplage H_m de I avec le métal Gd(III) lié à L, et $R_{\alpha p}^{\mathrm{b,OS}}$ est la contribution de sphère externe (OS) provenant de tous les autres ions Gd^{3+} qui ne sont pas complexés par L (voir

Figure 2.5).

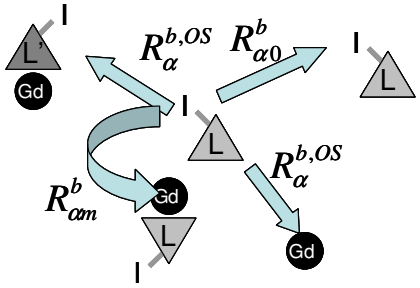


Figure 2.5 : Représentation schématique des différentes contributions à la relaxation d'un spin I porté par un ligand L lié à un Gd(III).

De façon générale, la distance r_I, entre Gd^{3+} et I, est suffisamment courte pour que H_m soit très important et donc que $R_{\alpha 0}^{\mathrm{b}}$ et $R_{\alpha p}^{\mathrm{b,OS}}$ soient beaucoup plus faibles que $R_{\alpha m}$. Dans ces conditions, R_α^{b} peut alors s'écrire :

$$R_{\alpha}^{\mathrm{b}} \cong R_{\alpha\mathrm{m}} \equiv 1/T_{\alpha\mathrm{m}}$$ **équation 2.7**

où $T_{\alpha m}$ le temps de relaxation usuel de I dans l'état lié, donné par l'équation 1.23.

A haut champ, son expression se réduit à l'équation :

$$R_{1\mathrm{m}} = \frac{8\pi}{5}\gamma_I^2\gamma_S^2\hbar^2 S(S+1)\frac{1}{4\pi r_I^6}\mathrm{Re}\left[\frac{1}{(1/\tau_{\mathrm{R}})+i\omega_I}\right]$$ **équation 2.8**

- *Relaxivité de I appartenant à un ligand libre*

Le taux de relaxation R_{α}^{f} d'un spin I appartenant à un ligand L libre est la somme de deux contributions :

$$R_{\alpha}^{\mathrm{f}} = R_{\alpha 0} + R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}$$ **équation 2.9**

$R_{\alpha 0}$ est la contribution diamagnétique, et $R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}$ est la PRE de sphère externe (OS) due à l'ensemble des ions Gd^{3+}. Ce dernier terme est lui-même la somme de deux contributions : $R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd})$ due aux aqua-ions, et $R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'})$ due aux différents complexes GdL' avec L' = a, mfa, dfa, tfa (voir

Figure 2.6)

$$R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}} = R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd}) + \sum_{\mathrm{L'=a,mfa,dfa,tfa}} R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'})$$ **équation 2.10**

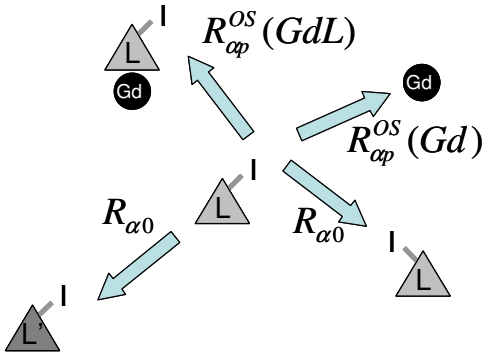


Figure 2.6 : Représentation schématique des différentes contributions à la relaxation d'un spin I porté par un ligand libre L.

Soit $r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd})$ la relaxivité OS due aux aqua-ions et $r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'})$ celle due aux complexes GdL'. Les relaxivités sont définies par les deux équations suivantes :

$$R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd}) \equiv [\mathrm{Gd}]\, r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd}),\ R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'}) \equiv [\mathrm{GdL'}]\, r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'}) \qquad \textbf{équation 2.11}$$

Les équations 2.10 et 2.11 permettent alors d'écrire :

$$R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}} = [\mathrm{Gd}]\, r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd}) + \sum_{\mathrm{L'=a,mfa,dfa,tfa}} [\mathrm{GdL'}]\, r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'}) \qquad \textbf{équation 2.12}$$

Dans le cadre de cette étude, des expressions approchées des relaxivités OS sont suffisantes, car elles ne vont jouer qu'un rôle secondaire dans les calculs, comme nous le verrons par la suite. Trois approximations vont nous permettre de simplifier l'équation précédente.

(1) Tous les ligands L portent la même charge -1 et ont des tailles similaires. Il en est de même pour tous les complexes GdL' qui ont une charge -2. La dynamique intermoléculaire OS de l'aqua-ion Gd^{3+}, et du ligand L est donc indépendante de la nature de L. De même, la dynamique intermoléculaire du complexe GdL', et du ligand L est indépendante de la nature de L et de L'. Par conséquent, les noyaux ^{1}H et ^{19}F des ligands L ont la même dynamique spatiale OS vis-à-vis des aqua-ions et des ions Gd^{3+} des différents complexes GdL'. Cela permet une première simplification, à savoir que les expressions de $r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd})$ et $r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'})$ sont indépendantes de L et L' pour un spin I donné.

(2) D'autre part, les effets du couplage hyperfin de contact sur $r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{Gd})$ et $r_{\alpha}^{\mathrm{OS}}(\mathrm{GdL'})$ étant négligeables (ce qui est toujours le cas à haut champ), les relaxivités OS proviennent exclusivement des fluctuations temporelles de l'hamiltonien dipolaire entre I et S, et sont donc proportionnelles au carré du rapport gyromagnétique γ_I du spin I. Il est alors possible d'exprimer les relaxivités OS du ^{1}H en fonction de celles du ^{19}F :

$$r_{\alpha}^{\mathrm{H,OS}}(\mathrm{Gd}) = (\gamma_{\mathrm{H}}/\gamma_{\mathrm{F}})^{2}\, r_{\alpha}^{\mathrm{F,OS}}(\mathrm{Gd}),\ r_{\alpha}^{\mathrm{H,OS}}(\mathrm{GdL'}) = (\gamma_{\mathrm{H}}/\gamma_{\mathrm{F}})^{2}\, r_{\alpha}^{\mathrm{F,OS}}(\mathrm{GdL'}) \qquad \textbf{équation 2.13}$$

En utilisant les deux simplifications précédentes et en prenant en compte la loi de la conservation du Gd^{3+},

$$[\mathrm{Gd}]+\sum_{\mathrm{L=a,mfa,dfa,tfa}}[\mathrm{GdL}]=c_{\mathrm{Gd}} \qquad \textbf{équation 2.14}$$

la RPE de type OS, $R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}$, se simplifie pour prendre l'expression suivante :

$$R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}=(\gamma_I/\gamma_{\mathrm{F}})^2\left\{[\mathrm{Gd}]r_\alpha^{\mathrm{tfa,F,OS}}(\mathrm{Gd})+\left(c_{\mathrm{Gd}}-[\mathrm{Gd}]\right)r_\alpha^{\mathrm{tfa,F,OS}}(\mathrm{Gda})\right\} \qquad \textbf{équation 2.15}$$

(3) Cette expression peut encore être simplifiée en prenant en compte les considérations suivantes : le ligand L chargé négativement (L^-) ressent une attraction de Coulomb moins importante de la part de GdL'^{2+} que de la part de Gd^{3+}, du fait de sa plus faible charge positive. Par conséquent, la relaxivité OS $r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{GdL'})$ attendue est plus faible que $r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{Gd})$.[55,56] Cette réduction peut cependant être atténuée par trois effets :

- la présence de l'électrolyte support KCl maintenant la force ionique à 0,1 mol.L^{-1}, réduit significativement les effets de charge,
- le complexe GdL' est plus volumineux que l'aqua-ion Gd^{3+}, il a donc un coefficient de diffusion plus faible, provoquant un accroissement de la relaxivité $r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{GdL'})$ par rapport à la valeur qu'elle aurait eu, en considérant le même coefficient de diffusion que l'aqua-ion,
- la présence de L' n'entrave que très faiblement l'approche de L du Gd^{3+}, par le côté opposé à celui où est complexé L'.

Ainsi, les relaxivités $r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{Gd})$ et $r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{GdL'})$ sont supposées égales à $r_\alpha^{\mathrm{F,OS}}$:

$$r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{Gd})\cong r_\alpha^{\mathrm{L,F,OS}}(\mathrm{GdL'})\cong r_\alpha^{\mathrm{F,OS}}(\mathrm{Gd}) \qquad \textbf{équation 2.16}$$

D'après les équations 2.15 et 2.16, l'équation 2.12 peut s'écrire sous la forme simplifiée suivante :

$$R_{\alpha\mathrm{p}}^{\mathrm{OS}}\equiv c_{\mathrm{Gd}}r_\alpha^{\mathrm{OS}}=(\gamma_I/\gamma_F)^2\,c_{\mathrm{Gd}}r_\alpha^{\mathrm{F,OS}} \qquad \textbf{équation 2.17}$$

♦ *Expression de la vitesse de relaxation totale*

Dans cette étude, l'évolution au cours du temps de l'aimantation longitudinale M_z, qui découle du système d'équations couplées de Luz et Meiboom (équations 2.4) prend une forme particulièrement simple grâce aux deux simplifications suivantes :

(1) R_{1m} >> R_1^f , avec R_1^f , le taux de relaxation dans l'état libre est donné par l'équation 2.9. En effet, d'après les modèles moléculaires, la distance entre le spin I et le Gd^{3+} est inférieure à 5 Å dans les complexes, de sorte qu'il existe un fort couplage dipolaire entre I et Gd^{3+}, donnant lieu à un important taux de relaxation dans l'état lié, $R_1^b \cong R_{1m}$, d'après l'équation 2.8.

(2) [GdL] >> [L], car dans chaque expérience c_{Gd} est inférieure au moins d'un facteur 10 à c_L.

D'après l'annexe 2, en considérant ces deux simplifications, l'aimantation M_z décroît de façon exponentielle avec un taux de relaxation longitudinale totale R_1, donné par la somme :

$$R_1 = R_{10} + R_{1p} \qquad \textbf{équation 2.18}$$

Il s'agit des expressions classiques de relaxation que nous avons vu au cours du chapitre précédent dans le cas de l'eau, avec R_{10} la contribution diamagnétique et R_{1p}, la contribution paramagnétique, somme d'un terme de sphère interne et d'un terme de sphère externe :

$$R_{1p} = R_{1p}^{IS} + R_{1p}^{OS} \qquad \textbf{équation 2.19}$$

avec :

$$R_{1p}^{IS} \equiv \frac{[GdL]}{[L]} \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \qquad \textbf{équation 2.20}$$

et R_{1p}^{OS} exprimé par l'équation 2.17.

L'équation 2.19 peut s'écrire en terme de relaxivité :

$$r_1 = r_1^{IS} + r_1^{OS} \qquad \textbf{équation 2.21}$$

avec $r_1 \equiv R_{1p}/c_{Gd}$ et $r_1^{IS} \equiv R_{1p}^{IS}/c_{Gd}$, les relaxivités formelles totale et IS respectivement.

Les relaxivités sont formelles car elles présentent généralement des dépendances complexes en fonction des concentrations analytiques c_{Gd} et c_L, et ne sont donc pas constantes indépendamment de la valeur de c_{Gd}.

Pour relier les relaxivités aux données expérimentales, il faut les exprimer en fonction de toutes les concentrations impliquées dans le système. Le système de 9 équations 2.2, 2.3 et 2.14 permet d'exprimer les 5 concentrations $[Gd]$, $[a]$, $[mfa]$, $[dfa]$, et $[tfa]$ en fonction des cinq concentrations analytiques c_{Gd}, c_a, c_{mfa}, c_{dfa}, and c_{tfa} et des quatre constantes de formation K_L. En posant $x \equiv [Gd]$, nous avons :

$$[GdL] = \frac{K_L c_L x}{1 + K_L x} \qquad \textbf{équation 2.22}$$

et x est la solution du polynôme de degré 5 obtenu à partir des équations 2.14 et 2.22 :

$$x + \sum_{\mathrm{L=a,mfa,dfa,tfa}} \frac{K_{\mathrm{L}} c_{\mathrm{L}} x}{1 + K_{\mathrm{L}} x} = c_{\mathrm{Gd}} \qquad \textbf{équation 2.23}$$

D'après les équations 2.2 et 2.20,

$$r_1^{\mathrm{IS}} = \frac{K_{\mathrm{L}} x}{c_{\mathrm{Gd}}} \frac{1}{T_{1\mathrm{m}} + \tau_{\mathrm{m}}} \qquad \textbf{équation 2.24}$$

Dans notre cas précis, $K_{\mathrm{L}} x = [\mathrm{GdL}]/[\mathrm{L}] << 1$, de sorte que :

$$x = \frac{c_{\mathrm{Gd}}}{1 + \sum_{\mathrm{L=a,mfa,dfa,tfa}} K_{\mathrm{L}} c_{\mathrm{L}}} \text{ et } r_1^{\mathrm{IS}} \cong \frac{K_{\mathrm{L}}}{1 + \sum_{\mathrm{L=a,mfa,dfa,tfa}} K_{\mathrm{L}} c_{\mathrm{L}}} \frac{1}{T_{1\mathrm{m}} + \tau_{\mathrm{m}}} \qquad \textbf{équation 2.25}$$

Il est désormais possible de commencer l'interprétation des PRE des spins ^{1}H et ^{19}F portés par les ligands L.

I.2.4. Interprétation

Des hypothèses simplificatrices seront émises au cours du raisonnement et vérifiées de façon auto-cohérente.

Toutes les PRE observées doivent être proportionnelles aux concentrations analytiques c_{Gd}, avec le facteur de proportionalité $r_1 = r_1^{\mathrm{IS}} + r_1^{\mathrm{OS}}$. En effet, d'après les équations 2.17 et 2.25, les relaxivités r_1^{OS} et r_1^{IS} sont indépendantes de c_{Gd}. C'est bien ce qui est observé sur la Figure 2.4. Il est possible de calculer r_1^{IS} en supposant raisonnablement que la coordination du Gd(III) par le tfa est négligeable. Ainsi, $r_1^{\mathrm{tfa,F,IS}} = 0$ et $r_1^{\mathrm{F,OS}} = r_1^{\mathrm{tfa,F}} = 9.50$ s^{-1} mM^{-1}.[60] D'après les équations 2.17 et 2.21, la relaxivité IS du spin *I* peut être calculée de la façon suivante :

$$r_1^{\mathrm{IS}} = r_1 - (\gamma_I / \gamma_F)^2 \, r_1^{\mathrm{F,OS}} \qquad \textbf{équation 2.26}$$

Les facteurs de proportionnalité r_1, ainsi que les contributions IS à la relaxivité sont reportées dans le Tableau 2.3.

Le taux de relaxation intramoléculaire effectif $(T_{1m} + \tau_m)^{-1}$ de l'équation 2.25 dépend du spin I, mais est indépendant du ligand L.

Tableau 2.3 : Relaxivités mesurées à 25 °C et 400 MHz pour les spins ^{1}H et ^{19}F des dérivés acétates, en présence de Gd(III).

	r_1	(mmol^{-1}.L.s^{-1})	r_1^{IS}	(mmol^{-1}.L.s^{-1})
	^{1}H	^{19}F	^{1}H	^{19}F
CH_3COO^-	309(7)		300(7)	
CH_2FCOO^-	85,0(9)	128(4)	74,0(9)	117(3)
CHF_2COO^-	28,0(6)	21,6(7)	16,5(6)	12,0(5)
CF_3COO^-		9,5(2)		0

Le rapport de deux constantes de formation K_L et $K_{L'}$ peut alors s'écrire simplement :

$$\frac{K_{L'}}{K_L} = \frac{r_1^{L',I,IS}}{r_1^{L,I,IS}} \qquad \textbf{équation 2.27}$$

Les mesures de relaxivité du spin ^{1}H montrent par exemple que $K_{mfa} = 0.25\ K_a$ et $K_{dfa} = 0.06\ K_a$. Malheureusement, la valeur de K_a ne peut pas être déduite de l'équation 2.25, car nous ne connaissons pas le taux effectif $(T_{1m} + \tau_m)^{-1}$.

Détermination de $(T_{1m} + \tau_m)^{-1}$ et des constantes de complexation

La méthode la plus simple pour déterminer $(T_{1m} + \tau_m)^{-1}$ est d'étudier la complexation de Gd^{3+} par un unique ligand L dont la concentration c_L varie. Nous avons choisi ici de mesurer les relaxivités des protons de l'acétate, en présence d'une faible concentration de Gd(III), c_{Gd} = 0,087 mmol.L^{-1}, et pour deux concentrations en acétate différentes : c_1 = 9,94 mmol.L^{-1}, et c_2 = 39,75 mmol.L^{-1}. Les valeurs de r_1 et r_1^{IS} sont reportées dans le Tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Relaxivités mesurées à 25 °C et 400 MHz pour les spins ^{1}H de l'acétate et en présence de [Gd^{3+}] = 0,087 mmol.L^{-1}.

[CH_3COO^-] (mmol.L^{-1})	r_1 (mmol^{-1}.L.s^{-1})	r_1^{IS} (mmol^{-1}.L.s^{-1})

39,75	155(5)	132(5)
9,94	454(8)	432(7)

D'après l'équation 2.25, la constante de formation K_a peut être exprimée en fonction du rapport q des relaxivités IS $r_1^{IS}(c_2)$ et $r_1^{IS}(c_1)$:

$$K_a = \frac{1-q}{qc_2 - c_1} \text{ avec } q \equiv \frac{r_1^{IS}(c_2)}{r_1^{IS}(c_1)} \qquad \textbf{équation 2.28}$$

et l'expression de $(T_{1m} + \tau_m)^{-1}$ en découle directement:

$$(T_{1m} + \tau_m)^{-1} = \frac{1 + K_a c_a}{K_a} r_1^{IS}(c_a) \qquad \textbf{équation 2.29}$$

En appliquant l'équation précédente à $c_a = c_1$ ou c_2, nous obtenons $K_a = 310$ et $(T_{1m} + \tau_m)^{-1} = 5700(300)$ s^{-1}. D'après les valeurs des rapports $K_{L'}/K_L$ précédents, $K_{mfa} = 77$ et $K_{dfa} = 17$.

La constante d'affinité obtenue pour l'acétate est en bon accord avec les données de la littérature. En effet, par notre méthode, log K_a = 2,5(2), et la littérature donne log K_a = 2,2(1).[61] Cette dernière constante a été mesurée par potentiométrie, qui n'est pas la méthode la plus adaptée à la détermination de faibles constantes de complexation.

Même si les données concernant l'acétate sont bonnes, les résultats obtenus concernant les dérivés fluorés ne sont pas totalement satisfaisants. En effet, en regardant les informations supplémentaires apportées par les relaxivités du spin ^{19}F, nous pouvons remarquer que la relaxivité du spin ^{19}F porté par le mfa est beaucoup plus élevée que celle du spin ^{1}H porté par le même ligand, et ce en dépit de l'inégalité $\gamma_F < \gamma_H$. Cet effet est sans doute dû à la forte attraction coulombienne entre l'atome électronégatif de fluor et le Gd(III), impliquant que le groupement CFH_2 du mfa se positionne de telle sorte que le fluor soit plus proche du Gd(III) que les protons. Ainsi la distance r_H entre un atome H et le Gd(III) est plus grande dans le complexe Gdmfa, que dans le complexe Gda. Or, d'après l'équation 2.8, $R_{1m} = 1/T_{1m}$ présente une décroissance importante en r_H^{-6}, lorsque r_H augmente, et le taux de relaxation intramoléculaire R_{1m} du spin ^{1}H est plus faible dans le Gdmfa, que dans le Gda. Ainsi, la relaxivité IS du proton porté par le mfa, est plus faible que la valeur correspondant aux

atomes H ayant la même position dans le Gdmfa et dans le Gda. Ceci conduit à une baisse artificielle de la constante de formation du complexe Gdmfa. Afin de s'approcher de la géométrie du complexe Gda, dans lequel les 3 atomes H ont des positions équivalentes, la relaxivité IS mesurée sur le mfa peut être remplacée par une relaxivité IS effective, $r_{1\mathrm{eff}}^{\mathrm{mfa,H,IS}}$, prenant en compte l'attraction de l'atome F du groupement CFH_2 par Gd^{3+} :

$$r_{1\mathrm{eff}}^{\mathrm{mfa,H,IS}} \equiv \frac{1}{3}\left[2r_1^{\mathrm{mfa,H,IS}} + 1\left(\frac{\gamma_H}{\gamma_F}\right)^2 r_1^{\mathrm{mfa,F,IS}}\right] \qquad \textbf{équation 2.30}$$

De la même manière, une relaxivité effective, $r_{1\mathrm{eff}}^{\mathrm{dfa,H,IS}}$, peut être définie pour le complexe Gddfa, avec des poids respectifs de 1 et 2 pour les atomes H et F. En utilisant les relaxivités IS données dans le Tableau 2.3, $r_{1\mathrm{eff}}^{\mathrm{mfa,H,IS}}$ = 93(2) $\mathrm{mmol^{-1}.L.s^{-1}}$ et $r_{1\mathrm{eff}}^{\mathrm{dfa,H,IS}}$ = 14,5(6) $\mathrm{mmol^{-1}.L.s^{-1}}$. Les constantes de formation prennent alors les valeurs suivantes : K_{mfa} = 97 et K_{dfa} = 15, à la place de 77 et 17 respectivement.

Détermination de la distance Gd-H pour le complexe Gda

La distance Gd-H, noté r_H dans le complexe Gda se déduit des taux de relaxation intramoléculaire R_{1m} et du temps de corrélation rotationnel τ_R d'après l'équation 2.8. La valeur de $R_{1m} = 1/T_{1m}$ n'est pas connue, toutefois nous connaissons la valeur de l'expression $(T_{1\mathrm{M}} + \tau_{\mathrm{M}})^{-1}$. Il est donc possible d'écrire $R_{1m} \equiv 1/T_{1m} \cong (T_{1m} + \tau_m)^{-1}$ lorsque τ_m est négligeable devant T_{1m}. Pour vérifier cela, nous avons mesuré la PRE en fonction de la température (Figure 2.7). Ces figures se présentent souvent sous la forme de courbes en cloches, reflétant la dépendance opposée de T_{1m} et τ_m avec la température : T_{1m} décroît lorsque la température augmente, alors que τ_m croît. Avec ces données, et l'équation 2.20, il est aisé de comprendre que comme la PRE diminue avec la température, c'est que τ_m est négligeable devant T_{1m}. L'approximation $R_{1m} \equiv 1/T_{1m} \cong (T_{1m} + \tau_m)^{-1}$ = 5700 $\mathrm{s^{-1}}$, est donc valable.

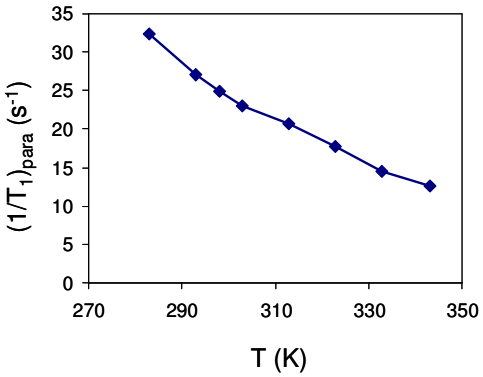


Figure 2.7 : PRE des spins ^{1}H de l'acétate [a] = 10 mmol.L^{-1}, en présence de [Gd^{3+}] = 0,05 mmol.L^{-1}.

Le temps de corrélation rotationnelle est donné par la loi de Debye-Stokes (voir équation 1.32 du chapitre 1), et il dépend de la taille du soluté, ainsi que de la viscosité du solvant. Par conséquent, le temps de corrélation rotationnelle du complexe Gda doit être similaire à celui de l'aqua-ion, dont la taille diffère peu. Plus généralement, à une température donnée, le temps de corrélation rotationnelle de Gda dans D_2O est calculé à partir de celui de l'aqua-ion dans H_2O à la même température à partir de la formule :

$$\tau_R(D_2O) = \left[\eta(D_2O)/\eta(H_2O)\right]\tau_R(H_2O) \qquad \textbf{équation 2.31}$$

A 298 K, $\tau_R(H_2O)$ = 23 ps[31] et $\eta(D_2O)/\eta(H_2O)$ = 1,23,[62] donc $\tau_R(D_2O)$ = 28 ps.

D'après l'équation 2.8, connaissant R_{1m} et τ_R, $r_H = 4{,}5(1)$ Å, en accord avec les valeurs cristallographiques de la littérature qui donnent : $4{,}7 \leq r_H \leq 5{,}0$ Å.[63] Les valeurs trouvées ici sont légèrement inférieures : ceci peut s'expliquer principalement par deux raisons :

- le temps de corrélation rotationnelle du complexe Gda est sans doute supérieur à celui de l'aqua-ion car le complexe formé est légèrement plus volumineux. Une augmentation de 25% de ce temps de corrélation (τ_R = 35 ps), donne une distance de 4,65 Å. L'accord est alors excellent.
- les données de la littérature sont en phase cristalline. Il est possible que le complexe existe sous différentes conformations en solution, et que le proton puisse s'approcher un peu plus près du centre métallique, dans certaines conformations. Or, la relaxivité étant en r_H^{-6}, à poids statistique égal, les conformations présentant un proton plus proche du cation auront un poids beaucoup plus important sur la relaxivité, diminuant ainsi artificiellement la distance r_H.

Vérifications

Bien que les résultats trouvés soient en accord avec les données de la littérature, il faut vérifier que le modèle développé est bien cohérent. Au cours de l'interprétation des résultats, nous avons fait essentiellement trois hypothèses.

(1) Afin de linéariser l'équation 2.23, nous avons fait l'hypothèse que $K_L x << 1$. Le calcul donne $K_a x = 0,06$; $K_{mfa} x = 0,02$; $K_{dfa} x = 0,0004$; $K_{tfa} x = 0$. Il était donc totalement légitime de négliger $K_L x$ devant 1.

(2) D'après l'équation 2.25, le rapport x/c_{Gd} doit rester constant quel que soit c_{Gd}. Pour $c_{Gd} = 0,0575$ mmol.L^{-1}, $x/c_{Gd} = 0,172611$ et pour $c_{Gd} = 1,15$ mmol.L^{-1}, $x/c_{Gd} = 0,17919$ soit une variation inférieure à 4% au total.

(3) Le rapport [GdL]/[L] doit être proportionnel à $K_L x$ et donc à c_{Gd} d'après les équations 2.2 et 2.23 quel que soit le ligand L. C'est cette condition qui permet de définir des relaxivités. Cette condition est remplie à 5% près quel que soit le ligand.

I.2.5. Conclusion

La faisabilité de la méthode de détermination de grandeurs thermodynamiques et structurales par des mesures de relaxivité a été étudiée sur des dérivés fluorés de l'acétate. Nous avons pu mettre en évidence une force de complexation décroissante avec le nombre d'atomes de fluor. Ceci est en accord avec des prévisions de type électrostatique : les atomes de fluor électronégatifs diminuent la charge portée par le carboxylate, ce qui résulte en une interaction électrostatique moins importante avec le Ln(III). Les constante de complexation sont telles que $\log K_a = 2,5 > \log K_{mfa} = 2,0 > \log K_{dfa} = 1,2$.

La méthode développée ici présente principalement deux avantages :

- elle est très simple : deux mesures de relaxivité suffisent à déterminer simultanément une constante de complexation, ainsi qu'une distance caractéristique.
- elle permet de déterminer de faibles constantes de complexation, dans la gamme $\log K < 3$. Il s'agit d'une gamme pour laquelle il existe peu de méthodes de détermination.[64,65]

II.3. Equilibre de transmétallation

I.3.1. Principe

Nous venons de voir comment mettre en évidence des équilibres de complexation. Il est souvent utile, en particulier lorsque des complexes trouvent des applications au niveau biologique, d'étudier des équilibres de transmétallation. Nous avons, par exemple, vu au cours du chapitre précédent, que les cations présents en milieu biologique, en particulier le Ca^{2+}, le Zn^{2+} et le Cu^{2+}, ne doivent pas entrer en compétition avec le Gd^{3+} lorsque les complexes sont utilisés en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. Il est donc très important d'arriver à suivre de façon expérimentale l'équilibre de transmétallation défini de la façon suivante :

$$GdL + M = ML + Gd \qquad \textbf{équation 2.32}$$

mettant en jeu le complexe d'intérêt en IRM GdL et le métal compétiteur M.

En général, pour définir cet équilibre, les constantes de stabilité thermodynamique β_{ml0} sont mesurées avec tous les cations métalliques précédemment cités, et c'est leur comparaison qui permet de prédire la toxicité du complexe.

Nous avons choisi de valider cette approche par une mesure de constante de transmétallation proche de 1, avant d'examiner la transmétallation par le Zn(II).

I.3.2. Validation de la méthode : transmétallation avec du Lu(III)

Dans l'article qui suit, une méthode simple de suivi de l'équilibre de transmétallation *in vitro* à pH 6,5 par des mesures de temps de relaxation de la sonde CF_3COO^- est proposée. La faisabilité de la méthode est présentée pour l'équilibre de transmétallation suivant :

$$[GdDTPA]^{2-} + Lu^{3+} = [LuDTPA]^{2-} + Gd^{3+} \qquad \textbf{équation 2.33}$$

Notons qu'une autre méthode également basée sur des mesures de temps de relaxation a été proposée pour suivre un équilibre de transmétallation. Les complexes de Gd(III) sont dissous dans une solution contenant un tampon phosphate, de sorte que les ions Gd(III) déplacés par les cations métalliques diamagnétiques du milieu biologique forment un précipité de $GdPO_4$, dont l'influence sur les temps de relaxation est négligeable.[66] Les avantages et inconvénients de notre méthode par rapport à notre méthode précédente sont également discutés.

MAGNETIC RESONANCE IN CHEMISTRY
Magn. Reson. Chem. 2003; **41**: 782–787
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/mrc.1260

A ^{19}F relaxometric study of the competition of Gd(III) and Lu(III) towards DTPA in water

Célia S. Bonnet and Pascal H. Fries*

Laboratoire de Reconnaissance Ionique, Service de Chimie Inorganique et Biologique (FRE 2600), CEA/DSM/Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 9, France

Received 7 April 2003; Revised 16 June 2003; Accepted 16 June 2003

Because of its strong Coulomb attraction by the positive Gd(III) aqua ion and its strong repulsion by the negative gadolinium diethylenetriaminepentaacetate (Gd-DTPA) complex, the trifluoroacetate anion CF_3COO^- has very different relative spatial dynamics with respect to these two species. Therefore, the Gd(III) aqua ion and Gd-DTPA complex cause very different longitudinal relaxivities of the trifluoroacetate ^{19}F nuclei. In the presence of competitor Lu(III) ions, the relaxivity difference makes it possible to assay the concentrations of Gd(III) aqua ion and Gd-DTPA complex from the measured paramagnetic relaxation rate enhancement of the trifluoroacetate ^{19}F nuclei. This experimental method allows one to characterize the present transmetallation equilibrium and it can be easily generalized to other systems. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: nuclear magnetic relaxation; ^{19}F NMR; magnetic resonance imaging; contrast agent; chelate stability; solution equilibria; transmetallation; paramagnetic relaxation enhancement

INTRODUCTION

Biocompatible complexes of paramagnetic gadolinium(III) ions are currently used as contrast agents (CAs) in about 30% of magnetic resonance imaging (MRI) examinations to enhance the natural contrast between tissues.[1] At clinical doses these species belong to one of the safest class of drugs ever developed, as long as the integrity of the complex is maintained, because the free Gd(III) ion and often the free organic ligand are individually toxic.[1–3] The Gd(III) aqua ions can inhibit neuromuscular transmission by blocking the calcium channels and deposit in the liver, kidneys, and skeleton.[1,2] Equilibria between Gd(III) and competing biological cations, such as Cu^{2+}, Ca^{2+} and Zn^{2+}, may result in a significant dissociation of Gd(III) from the complex. Moreover, as observed for gadolinium diethylenetriaminepentaacetate (Gd-DTPA) and gadolinium diethylenetriaminepentaacetate-bis(methylamide) (Gd-DTPA-BMA), the stability of open-chain Gd(III) CAs of rather fast dissociation kinetics[1] can be altered in a physiological medium containing metabolites such as ATP, known to be an extremely efficient chelator of metal ions.[4] Minimizing the decomplexation of Gd(III) from CAs is an essential step, the thermodynamics and kinetics of which should be fully characterized and understood, if possible at a molecular level. Various *in vitro* and *in vivo* methods can be employed to assay the extent of transmetallation.[1,2] In the present work, we propose a simple *in vitro* nuclear magnetic relaxation method for measuring the apparent thermodynamic constant of the transmetallation equilibrium

$$GdL + M = ML + Gd \quad (1)$$

involving the 1 : 1 GdL complex under investigation and the competing metal ion M. Here, the feasibility of the method is demonstrated in the case of the transmetallation by lutetium(III) of the Gd-DTPA complex.

*Correspondence to: Pascal H. Fries, Laboratoire de Reconnaissance Ionique, Service de Chimie Inorganique et Biologique (FRE 2600), CEA/DSM/Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: fries@drfmc.ceng.cea.fr
Contract/grant sponsor: EC COST.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Gadolinium(III) chloride hexahydrate ($GdCl_3{\cdot}6H_2O$; 99.9%), diethylenetriaminepentaacetic acid, gadolinium(III) dihydrogen salt (GdH_2DTPA; 97%), lutetium(III) chloride hexahydrate ($LuCl_3{\cdot}6H_2O$; 99.9%), and sodium trifluoroacetate ($NaCF_3CO_2$; 98%) were purchased from Aldrich. Heavy water (D_2O; 99.9% in D) was obtained from Eurisotop. MilliQ deionized water (H_2O) was prepared using a purification pack (Millipore). The amount of possible additional water in the lanthanide(III) chloride hexahydrates was checked by titrating the rare earth with a Titriplex III solution (Merck) of ethylenediaminetetraacetic (EDTA) acid, using xylenol orange as indicator.[5]

Sample preparation

The aqueous solutions containing fixed $NaCF_3CO_2$ and potassium chloride (KCl) concentrations, and variable concentrations of a given Gd(III) complex were obtained as

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

follows. A first diamagnetic stock solution (S0) with 10 mM $NaCF_3CO_2$ and 0.1 M KCl in a 95% H_2O–5% D_2O mixture was prepared. Then, by dissolving the $GdCl_3$ salt in a volume of the first stock solution S0, a second paramagnetic stock solution of 6.14 mM $GdCl_3$ was made. The samples containing the variable concentrations of Gd(III) aqua complex were obtained by mixing in 5 mm high-precision NMR tubes the appropriate volumes of the two stock solutions, dispensed by pipettes (Eppendorf Research) with continuous, adjustable volume setting. Similarly, another paramagnetic stock solution of 6.01 mM Gd-DTPA was made by dissolving the GdH_2DTPA salt in S0 and its pH adjusted to 6 by adding a small volume of 0.1 M KOH solution. The samples containing the variable concentrations of Gd-DTPA were obtained as above. Concerning the transmetallation measurements, two new stock solutions were made: (i) a stock solution of 2 mM Gd-DTPA was made by dissolving the GdH_2DTPA salt in S0 and its pH adjusted to 6 by adding a small volume of 0.1 M KOH solution; (ii) a stock solution of 4.77 mM Lu(III) aqua was made by dissolving the $LuCl_3$ salt in the 2.00 mM Gd-DTPA stock solution just prepared. Appropriate volumes of the Gd-DTPA and Lu(III) aqua stock solutions (i) and (ii) were also mixed in the NMR tubes, so as to obtain a variable Lu(III) concentration ranging from 0.2 to 1 mM, the Gd-DTPA concentration being kept constant, equal to 2.00 mM. In order to remove the paramagnetic oxygen from the solutions, the NMR tubes were degassed by gently bubbling argon for 20 min.

NMR relaxation measurements

All of the NMR experiments were carried out on a Varian Mercury 400 spectrometer at 298 K, where the ^{19}F resonance frequency is 376.48 MHz. The longitudinal relaxation times T_1 of the three equivalent ^{19}F nuclear spins $I = 1/2$ on the CF_3COO^- anions were measured by standard inversion recovery Fourier transform (IRFT), using a non-selective inversion recovery pulse sequence. For each sample, the T_1 value was computed from a three-parameter exponential fit of the recovery function tabulated for several relaxation delays. The following parameters were used in all the experiments: acquisition time of 1.1 s and spectral width of 3759 Hz. To ensure that the observed T_1 corresponded to values at chemical equilibrium, the measurements were carried out 2 days after preparing the samples and repeated 2 days later. No appreciable change was detected.

RESULTS

The experimental relaxivity values

In a given solution, let $R_1 \equiv 1/T_1$ be the longitudinal relaxation rate of the ^{19}F spin I. The measured paramagnetic relaxation enhancement (PRE) of the ^{19}F spin I is defined as the difference

$$R_{1n}^{e} \equiv R_1 - R_{10} \tag{2}$$

of the relaxation rate R_1 in the sample minus the longitudinal relaxation rate value $R_{10} \equiv 1/T_{10}$ in the diamagnetic solution S0. Here, we measured $T_{10} = 2.89$ s in S0, which contains 10 mM of $NaCF_3CO_2$ and 0.1 M KCl. In the derived samples containing the Gd(III) aqua complex, the observed relaxation times were $T_1 = 96.8$ ms, 50.3 ms, 32.9 ms, and 17.2 ms for the increasing Gd(III) concentrations $c_S = 1.02$ mM, 2.04 mM, 3.07 mM, and 6.14 mM respectively. In the derived samples containing the Gd-DTPA complex, the observed relaxation times were $T_1 = 652$ ms, 325 ms, 218 ms, and 110 ms for the increasing Gd-DTPA concentrations $c_S = 0.98$ mM, 2.00 mM, 3.01 mM, and 6.01 mM, respectively. The measured paramagnetic contributions R_{1n}^{e} are calculated from Eqn (2) and shown in Fig. 1 as a function of the Gd(III) complex concentration c_S.

They can be fitted by straight lines passing through the origin, so that

$$R_{1n}^{e} = r_1 c_S \tag{3}$$

where the slope r_1 (s^{-1} mM^{-1}) is the ^{19}F relaxivity due to the Gd(III) complex studied. The measured relaxivity is $r_1(Gd^{3+}) = 9.50$ s^{-1} mM^{-1} for the Gd aqua ion and $r_1(Gd\text{-}DTPA^{2-}) = 1.43$ s^{-1} mM^{-1} for the Gd-DTPA complex. It is a general feature that the observed relaxation rates of the nuclear spins I of the various species increase linearly with the concentration of the paramagnetic solutes in the solution.[1,2] However, as shown by the inner and outer sphere intermolecular PRE theory,[1,7–17] this property is only valid if the time fluctuations of the coupling Hamiltonian H_1 between a nuclear spin I and a Gd(III) electronic spin $S = 7/2$ are not altered when the concentration of the complex varies. These time fluctuations depend on the translational and rotational Brownian dynamics of the species carrying the I and S spins. Assume that the Gd(III) complexes remain diluted and are

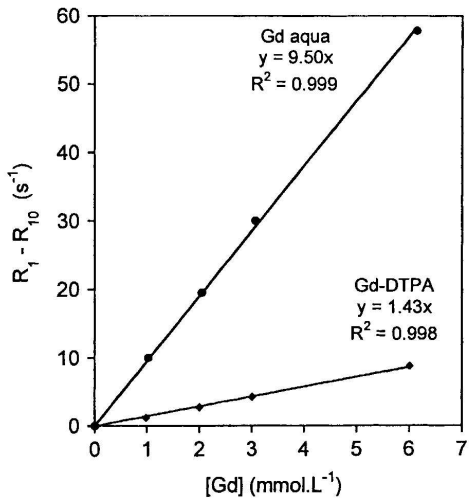


Figure 1. Measured paramagnetic relaxation rate enhancements $R_{1n}^{e} \equiv R_1 - R_{10}$ of the ^{19}F nuclei of the trifluoroacetate anion due to variable concentrations of Gd aqua cations and Gd-DTPA anions. For each Gd(III) complex, the enhancement R_{1n}^{e} increases linearly with concentration as emphasized by the value near unity of the coefficient of determination[6] R^2. Its slope is the experimental relaxivity of the ^{19}F nuclei due to the complex.

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

small entities. Then, the *near* molecular environment of the I and S species is barely affected by increasing c_S, so that the changes of the viscosity properties and packing of the molecules are very small and have negligible effects, first on the translational and rotational diffusion coefficients, and second on the intermolecular spatial correlations. Under these conditions, if the I and S species do not interact through long-range Coulomb forces, e.g. if the I species are neutral solvent or solute molecules, the time fluctuations of H_1 is quasi-independent of the concentration of the Gd(III) complex and Eqn (3) holds. On the contrary, if the I and S species are ions, then their strong Coulomb interaction is markedly modified both at short and long distances by the screening effects of the neighboring ions.[18–20] Within the Debye–Hückel screening limit, which is valid in aqueous solution up to moderate ion concentrations,[19] this screening effect is governed by the inverse κ of the Debye screening length, defined as[19,20]

$$\kappa \equiv \left(\frac{8\pi^2 e^2 N_{\text{Avogadro}} \hat{I}}{1000 k_B T \varepsilon} \right)^{1/2} \tag{4}$$

where e is the charge unit, k_B the Boltzmann constant, ε the macroscopic dielectric constant, and $\hat{I}$ the ionic strength of the solution, given by

$$\hat{I} \equiv \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \tag{5}$$

where the index i runs over all the charged species of concentrations c_i and charge numbers z_i. Approximate the ions carrying the I and S spins as hard spheres of diameters d_I, d_S with centered charges $q_I \equiv z_I e$, $q_S \equiv z_S e$. Let R be the distance between the centers of the ions and $b \equiv (d_I + d_S)/2$ their collision diameter. In a solution containing a finite concentration (FC) of the various charged species i, the effective potential $w_{IS}^{\text{FC}}(R)$ between the two interacting ions, also termed to potential of mean force[18–20] (PMF), is defined in the Debye–Hückel screening limit as[19,20]

$$w_{IS}^{\text{FC}}(R) \equiv \begin{cases} \infty & \text{if } R < b \\ w_{IS}^{\text{ID}}(R) + \dfrac{q_I q_S}{\varepsilon R} \left\{ \dfrac{\exp[-\kappa(R-b)]}{1+\kappa b} - 1 \right\} & \text{if } R \geq b \end{cases} \tag{6}$$

where $w_{IS}^{\text{ID}}(R)$ is the infinite dilution (ID) limit of the ion–ion PMF, which corresponds to the extreme situation where the I and S ions are the only charged species in the solution. The term $(q_I q_S/\varepsilon R)\{\ldots\}$ in Eqn (6) for $R \geq b$ represents the Debye–Hückel screening of the ID interaction $w_{IS}^{\text{ID}}(R)$ caused by all the other ions approximated as a continuous charge distribution. In this work, the diamagnetic solution S0 has an ionic strength $\hat{I}_0 = 0.11$ mol l^{-1}, due to the concentrations 0.01 M Na^+,CF_3COO^- and 0.1 M K^+,Cl^-, which are also present in all the paramagnetic solutions. In the samples containing the Gd^{3+},3Cl^- salt, we have $\hat{I}$(Gd aqua) $= 0.11 + 6c_S$ with $c_S = [Gd^{3+}]$, whereas in those containing the 2K^+,Gd-DTPA^{2-} salt, $\hat{I}$(Gd-DTPA) $= 0.11 + 3\,c_S$ with $c_S =$ [Gd-DTPA^{2-}]. Thus, $\hat{I}$ ranges between 0.11 and 0.146, so that $\sqrt{\hat{I}}$ and κ are constant to within ±7%. According to Eqn (6), the PMF of the attractive pair $CF_3COO^-/[Gd(H_2O)_8]^{3+}$, or that of the repulsive pair CF_3COO^-/Gd-DTPA^{2-}, is quasi-independent of the ionic strength, so that the corresponding PRE R_{In}^{e} should increase linearly with c_S as observed in Fig. 1.

Transmetallation

Three solutions were prepared with the fixed analytical concentrations $[NaCF_3CO_2] = 0.01$ M, [KCl] = 0.1 M, $[\text{Gd-DTPA}]_0 = [K_2\text{GdDTPA}]_0 = 2$ mM and the variable analytical concentrations $[\text{Lu}]_0 = [LuCl_3]_0 = 0.198$ mM, 0.497 mM, and 1.00 mM of $LuCl_3$, giving rise to the ^{19}F T_1 values 234 ms, 183 ms, and 138 ms respectively. For each lanthanide Ln(III) ion, the formation of the 1:1 Ln-DTPA complex is described by the equilibrium equation

$$\text{Ln} + \text{DTPA} = \text{Ln-DTPA} \tag{7}$$

At an ionic strength 0.100 mol l^{-1} and a temperature 298 K, the formation constants of Ln-DTPA are[21] ln $K_{\text{Gd}} = 22.5$ and ln $K_{\text{Lu}} = 22.4$ for the Gd(III) and Lu(III) aqua ions respectively. At this thermodynamic state the equilibrium constant K of the transmetallation reaction given by Eqn (1) with L = DTPA and M = Lu is

$$K = \frac{K_{\text{Lu}}}{K_{\text{Gd}}} = 10^{-0.1} = 0.8 \tag{8}$$

Now, turn to the expression for the PRE R_{In}^{e} in terms of (i) the concentrations [Gd^{3+}], [Gd-DTPA^{2-}] of the Gd(III) aqua ions and Gd-DTPA complexes, and (ii) the relaxivities $r_1(Gd^{3+})$, r_1(Gd-DTPA^{2-}). In the present solutions of nearly constant ionic strength, the contributions of the paramagnetic ions Gd^{3+} aqua $\equiv Gd(H_2O)_8{}^{3+}$ and Gd-DTPA^{2-} to R_{In}^{e} increase linearly with their concentrations [Gd^{3+}] and [Gd-DTPA^{2-}], so that

$$R_{\text{In}}^{\text{e}} = [\text{Gd-DTPA}^{2-}] r_1(\text{Gd-DTPA}^{2-}) + [Gd^{3+}] r_1(Gd^{3+}) \tag{9}$$

Assume that the relaxivity values are known from previous measurements and the concentrations [Gd^{3+}] and [Gd-DTPA^{2-}] can be obtained from an independent speciation model. Then, R_{In}^{e} can be deduced from Eqn (9). Conversely, if [Gd-DTPA^{2-}] is fully determined by [Gd^{3+}], e.g. through the simple equation of Gd conservation

$$[\text{Gd-DTPA}^{2-}] = [\text{Gd-DTPA}]_0 - [Gd^{3+}] \tag{10}$$

then, [Gd^{3+}] can be calculated again from Eqn (9), using the measured value of R_{In}^{e}. The various concentrations involved in the transmetallation equilibrium Eqn (1) and the equilibrium constant K follow immediately.

The PRE R_{In}^{e} of the ^{19}F nuclear spins of CF_3COO^- are reported in Table 1 for the three solutions where the competition of Gd^{3+} and Lu^{3+} towards DTPA is investigated.

The observed marked increase of R_{In}^{e} with the addition of the Lu^{3+} aqua ions is easily explained by the appearance of $Gd(H_2O)_8{}^{3+}$ ions resulting from the dissociation of the Gd^{3+} ions from the Gd-DTPA complexes and the replacement of these Gd^{3+} ions by Lu^{3+} ions to form Lu-DTPA complexes. As more and more Lu^{3+} aqua ions are dissolved in the

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 1. Variation of the paramagnetic relaxation rate enhancement R^e_{1n} of the ^{19}F trifluoroacetate nuclei with the addition of increasing concentration $[Lu]_0$ of $LuCl_3$ salt. The theoretical values of the SM1 and SM2 speciation models were calculated with the formation constants[21] $\log K_{Gd} = 22.5$ and $\log K_{Lu} = 22.4$ of the Gd-DTPA and Lu-DTPA complexes

	R^e_{1n} (s^{-1})		
$[Lu]_0$ (mM)	Experiment	SM1 model	SM2 model
0.198	3.92	4.11	4.38
0.497	5.13	5.53	6.04
1.00	6.88	7.29	8.07

solution, there is an increase of $[Gd(H_2O)_8{}^{3+}]$ compensated by an equal decrease of $[Gd\text{-}DTPA^{2-}]$. Now, the $Gd(H_2O)_8{}^{3+}$ and CF_3COO^- ions with their charges of opposite signs have a strong Coulomb attraction to one another. Therefore, they often experience long-time collisions[18–20] during which the distance r between the ^{19}F spin I and the Gd(III) electronic spin S becomes short, so that the coupling Hamiltonian H_1, in particular[13] its dipolar contribution, is high and provides a very efficient relaxivity $r_1(Gd^{3+}) = 9.50\ s^{-1}\ mM^{-1}$. On the contrary, the $Gd\text{-}DTPA^{2-}$ and CF_3COO^- ions with their charges of same signs strongly repel one another, so that the I–S distance r is rarely short. The coupling Hamiltonian H_1 remains rather small and gives rise to a six times smaller relaxivity $r_1(Gd\text{-}DTPA^{2-}) = 1.43\ s^{-1}\ mM^{-1}$. The transmetallation implies the replacement of the $Gd\text{-}DTPA^{2-}$ anions by the $Gd(H_2O)_8{}^{3+}$ cations, which are much more efficient relaxation agents for the ^{19}F spins of CF_3COO^-, and thus the observed marked increase of R^e_{1n} as Lu^{3+} is added in the solution.

Speciation models

The quantitative explanation of R^e_{1n} in terms of the transmetallation rests on speciation models (SMx). It is assumed that the transmetallation equilibrium constant keeps the same value $K = 0.8$ given by Eqn (7) in the three paramagnetic solutions of slightly higher ionic strengths. In a given solution, let $[Gd\text{-}DTPA]_0$ and $[Lu]_0$ be the analytical concentrations of the Gd-DTPA complexes and the Lu(III) aqua ions respectively. The simplest possible speciation model (SM1) consists in assuming that the Ln(III) species reduce to the minimum number of four species: $Gd(H_2O)_8{}^{3+}$, $Gd\text{-}DTPA^{2-}$, $Lu(H_2O)_8{}^{3+}$, $Lu\text{-}DTPA^{2-}$. Because the equilibrium constant can be written as $K \equiv 1 + \varepsilon$ with $|\varepsilon| \ll 1$, a straightforward calculation shows that the actual concentrations $[Gd^{3+}]$ and $[Gd\text{-}DTPA^{2-}]$ of the Gd(III) aqua ions and Gd-DTPA complexes at the thermodynamic equilibrium are given by the approximate equation

$$[Gd^{3+}] \cong K\frac{[Lu]_0}{[Gd\text{-}DTPA]_0 + [Lu]_0}[Gd\text{-}DTPA]_0 \qquad (11)$$

and by Eqn (10) expressing the Gd conservation. The theoretical values of R^e_{1n} within the SM1 model are derived from Eqn (9), using the concentrations of $Gd(H_2O)_8{}^{3+}$ and $Gd\text{-}DTPA^{2-}$ calculated by Eqns (10) and (11), together with the corresponding relaxivities. As shown in Table 1, they are in good agreement with the experimental data.

In a more sophisticated model (SM2), we account for the five acidity constants[3] $pK_a = 1.58, 2.48, 4.21, 8.35, 10.21$ of the acidic form H_5DTPA of the ligand and the formation of the metal complexes with the formation constants[21] K_{Gd} and K_{Lu}. We also consider the possible formation of the complexes $Ln\text{-}HDTPA^-$ (Ln = Gd, Lu) from the Ln(III) aqua ion and $HDTPA^{4-}$ with formation constants of similar magnitudes[3] as K_{Gd} and K_{Lu}. The concentrations of the various species can be computed as a function of pH, using the Hyperquad simulation and speciation (HySS) software.[22] In the pH range used here, i.e. slightly above 6, the HySS calculations confirm that the Ln(III) species different from the four species of SM1 have concentrations $<10^{-7}$ M and can be safely neglected. The theoretical values of R^e_{1n} within the SM2 model are obtained from Eqn (9), using the concentrations of $Gd(H_2O)_8{}^{3+}$ and $Gd\text{-}DTPA^{2-}$ computed from the HySS software. They are very near the SM1 values and again in good agreement with their experimental counterparts, as shown in Table 1.

Finally, the accuracy of the method has to be considered. The experimental values of the formation constant K_{Gd} ranges[3,21] between 22.2 and 23, and the precision[21] of K_{Lu} should be analogous. In the model SM2, it is tempting to vary the $\log K_{Gd}$ and $\log K_{Lu}$ values by 0.1, so that $\log K_{Gd} = 22.4$ instead of 22.5 and $\log K_{Lu} = 22.5$ instead 22.4. Then, the new theoretical SM2 values of R^e_{1n} agree to within about 5% with the experimental data. The accord is nearly perfect. In the case of metal ions of similar affinity towards the ligand, the transmetallation equilibrium constants derived from the relaxometric method can be more accurate than those calculated from the complex formation constants, as paramagnetic relaxation enhancement here directly probes the competition of the two metal ions.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The applicability of the present relaxivity method to the transmetallation of Gd complexes of arbitrary electric charges, together with its precision concerning the associated equilibrium constants K, rests on the following simple mathematical analysis. For the transmetallation equilibrium given by Eqn (1), consider the typical situation where the initial analytical concentrations of complexes and aqua ions are $[GdL]_0$, $[M]_0$, $[Gd^{3+}]_0 = 0$, $[ML]_0 = 0$. The formation of ML complexes is accompanied by the release of the same amount of Gd^{3+} aqua ions, so that here we have $[ML] = [Gd^{3+}]$. The transmetallation equilibrium constant is given by

$$K = \frac{[Gd^{3+}]^2}{([GdL]_0 - [Gd^{3+}])([M]_0 - [Gd^{3+}])} \qquad (12)$$

For DTPA, the PRE R^e_{1n} is given by Eqn (9). For an arbitrary ligand L this expression becomes

$$R^e_{1n} = [GdL]r_1(GdL) + [Gd^{3+}]r_1(Gd^{3+}) \qquad (13)$$

where $r_1(GdL)$ is the relaxivity due to the GdL complex. Since $[GdL] = [GdL]_0 - [Gd^{3+}]$, the PRE can be rewritten as

$$R^e_{1n} = R^e_{1n}(0) + [Gd^{3+}]\Delta r_1 \qquad (14)$$

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

where $R^{e}_{1n}(0) \equiv [GdL]_0 r_1(GdL)$ is the PRE caused by the sole GdL complexes without transmetallation and $\Delta r_1 \equiv r_1(Gd^{3+}) - r_1(GdL)$ the increase of relaxivity due to the replacement of GdL complexes by Gd^{3+} aqua ions. The concentration of Gd^{3+} aqua ions reads

$$[Gd^{3+}] = \frac{R^{e}_{1n} - R^{e}_{1n}(0)}{\Delta r_1} \quad (15)$$

A precise determination of $[Gd^{3+}]$ requires the variations $R^{e}_{1n} - R^{e}_{1n}(0)$ and Δr_1 to be large enough to be measured with accuracy. The Coulomb attraction of the CF_3COO^- anion by the Gd^{3+} aqua ion is exceptionally strong, because this Gd complex has a high positive charge and the smallest possible size. Therefore, $r_1(Gd^{3+})$ is expected to be significantly larger than $r_1(GdL)$, not only for negatively charged complexes such as Gd-DTPA^{2-} or Gd-DOTA$^-$, but also for neutral complexes such as Gd-DTPA-BMA, and even for positively charged complexes.

Now, to turn to the precision of the method. The main error in the determination of $[Gd^{3+}]$ through Eqn (15) stems from the measurement of the PRE R^{e}_{1n}, because $R^{e}_{1n}(0)$ and Δr_1 are expressed in terms of relaxivities, i.e. PRE slopes, which can be fitted with a quite high accuracy provided that the PRE values are measured for large numbers of concentrations of GdL complexes and Gd^{3+} aqua ions. Let ε be the relative error of R^{e}_{1n}. As in Table 1, consider a typical $[M]_0$ concentration such that $R^{e}_{1n} - R^{e}_{1n}(0) \geq R^{e}_{1n}(0)$. Neglecting the errors of $R^{e}_{1n}(0)$ and Δr_1, the relative error of $[Gd^{3+}]$ verifies the inequality $\Delta[Gd^{3+}]/[Gd^{3+}] \leq 2\varepsilon$. The accurate determination of K through Eqn (12) needs the concentration differences $[GdL]_0 - [Gd^{3+}]$ and $[M]_0 - [Gd^{3+}]$ to be large enough, e.g. $[GdL]_0 - [Gd^{3+}] \geq \rho[GdL]_0$ and $[M]_0 - [Gd^{3+}] \geq \rho[M]_0$ with $\rho \geq 0.3$ to 0.5. Indeed, neglecting the errors of $[GdL]_0$ and $[M]_0$, the relative errors of $[GdL]_0 - [Gd^{3+}]$ and $[M]_0 - [Gd^{3+}]$ obey the inequalities $\Delta(c_0 - [Gd^{3+}])/(c_0 - [Gd^{3+}]) \leq \{(1-\rho)/\rho\}\Delta[Gd^{3+}]/[Gd^{3+}]$ with $c_0 = [GdL]_0$ and $[M]_0$ respectively. From a practical point of view, note that the condition $[M]_0 - [Gd^{3+}] = [M]_0 - [ML] \geq \rho[M]_0$ implies $K < 10$. For $K \gg 10$, the transmetallation is nearly total and the relaxivity method using the CF_3COO^- probe anion cannot distinguish between different large K values. In this case, other probe solutes, leading to $r_1(GdL) > r_1(Gd^{3+})$, can be envisaged. To sum up, we find $\Delta K/K \leq 8\varepsilon$ and 12ε for $\rho = 0.5$ and 0.3 respectively. For a given NMR spectrometer, the precision ε in the measurement of a single PRE R^{e}_{1n} should be of the order of 2 to 3%, leading to $\Delta K/K \leq 20$ to 30% and $\Delta(pK) = \pm 0.1$.

It is useful to compare the pros and cons of the present relaxivity method involving heteronuclei on solute species with the relaxometric protocol of Muller and co-workers[2] using the water protons. The key point of their protocol is to dissolve the Gd complexes in a phosphate-buffered solution, so that the Gd^{3+} ions displaced by the biological diamagnetic metal cations form insoluble $GdPO_4$, the influence of which on the paramagnetic relaxation enhancement is negligible. Then, the decrease of the measured relaxation rate is attributed to the Gd^{3+}, which have become 'silent' because of their precipitation. The protocol of Muller and co-workers[2] has the following favorable aspects: (a) the kinetics of transmetallation can be monitored by simply comparing the water proton relaxation rate values without and with the biological metal cations; (b) the protocol rests on the water proton relaxivity values at 20 MHz, which are standard quantities in the science of MRI contrast agents. In brief, it is simple and based on well-known observables. The present method can be useful for the following reasons: (i) It allows one to study the transmetallation equilibrium in solution and determine the equilibrium constant, in addition to the transmetallation kinetics if the latter is sufficiently slow with respect to the measured relaxation times. (ii) It rests on the relaxation times of dilute heteronuclei, which can be measured on very common high-field spectrometers without the difficulties arising from the radiation damping caused by the numerous water protons.[15] In particular, a detuned ^1H probe is sufficient to measure the longitudinal relaxation times of ^{19}F nuclei. (iii) Changing the solutes and/or resonating nuclei makes it possible to cross-check various determinations of the equilibrium constant. (iv) Small metal displacements can be detected because of the quite large difference in relaxivity between a GdL complex and the Gd aqua ion.

We have successfully applied a heteronuclear relaxometric method to the competition of the Gd(III) and Lu(III) cations towards DTPA in aqueous solution. The paramagnetic relaxation enhancement allows one to explore the equilibrium properties, which were satisfactorily interpreted in our system by using thermodynamic data derived from independent studies. The method can be generalized easily.

Acknowledgements

We thank Dr P. Delangle for fruitful discussions on speciation in solution. This research was carried out in the framework of the EC COST Action D-18 'Lanthanide chemistry for diagnosis and therapy'.

REFERENCES

1. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. *Chem. Rev.* 1999; **99**: 2293.
2. Laurent S, Vander Elst L, Copoix F, Muller RN. *Invest. Radiol.* 2001; **36**: 115.
3. Bianchi A, Calabi L, Corana F, Fontana S, Losi P, Maiocchi A, Paleari L, Valtancoli B. *Coord. Chem. Rev.* 2000; **204**: 309.
4. Vander Elst L, Van Haverbeke Y, Goudemant JF, Muller RN. *Magn. Reson. Med.* 1994; **31**: 437.
5. Shetty SY, Sathe RM. *Talanta* 1976; **23**: 46.
6. Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA, Vetterling WT. *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press: Cambridge, 1990; chapters 13 and 14.
7. Abragam A. *The Principles of Nuclear Magnetism*. Oxford University Press: Oxford, 1961; chapter VIII.
8. Ayant Y, Belorizky E, Alizon J, Gallice J. *J. Phys. (Paris)* 1975; **36**: 991.
9. Hwang LP, Freed JH. *J. Chem. Phys.* 1975; **63**: 4017.
10. Albrand JP, Taïeb MC, Fries PH, Belorizky E. *J. Chem. Phys.* 1983; **78**: 5809.
11. Kowalewski J, Nordenskiöld L, Benetis N, Westlund PO. *Prog. NMR Spectrosc.* 1985; **17**: 141.
12. Banci L, Bertini I, Luchinat C. *Nuclear and Electron Relaxation*. VCH: Weinheim, 1991; chapter 5.
13. Jeannin M, Belorizky E, Fries PH, Gorecki W. *J. Phys. II Fr.* 1993; **3**: 1511.
14. Rast S, Belorizky E, Fries PH, Travers JP. *J. Phys. Chem. B* 2001; **105**: 1978.

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

15. Canet D, Boubel JC, Canet-Soulas E. *La RMN: Concepts, méthodes et applications*. Dunod: Paris, 2002; chapter 4.
16. Borel A, Yerly F, Helm L, Merbach AE. *J. Am. Chem. Soc*. 2002; **124**: 2042.
17. Kruk D, Kowalewski J. *J. Chem. Phys*. 2002; **117**: 1194.
18. Fries PH, Patey GN. *J. Chem. Phys*. 1984; **80**: 6253.
19. Sacco A, Belorizky E, Jeannin M, Gorecki W, Fries PH. *J. Phys. II Fr*. 1997; **7**: 1299.
20. Fries PH, Richardi J, Rast S, Belorizky E. *Pure Appl. Chem*. 2001; **73**: 1689.
21. Smith RM, Martell AE. *Sci. Total Environ*. 1987; **64**: 125.
22. Alderighi L, Gans P, Ienco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A. *Coord. Chem. Rev*. 1999; **184**: 311.

Ayant montré son potentiel, la méthode a été appliquée à des cations présents en milieu biologique comme le Zn^{2+} et le Ca^{2+} (en milieu biologique, $[Ca^{2+}] = 2{,}5$ mmol.L^{-1}, $[Zn^{2+}] = 50$ µmol.L^{-1}). Les mesures ont été réalisées comme dans l'article précédent mais en utilisant cette fois l'ensemble des sondes $CF_xH_{3-x}COO^-$.

Transmétallation en présence de Zn(II)

L'équilibre étudié est le suivant :

$$[GdDTPA]^{2-} + Zn^{2+} = [ZnDTPA]^{3-} + Gd^{3+} \qquad \textbf{équation 2.34}$$

D'après la littérature,[67] la constante attendue pour cet équilibre de transmétallation est donnée par l'équation suivante :

$$K = \frac{\beta_{110}^{Zn}}{\beta_{110}^{Gd}} \approx 10^{-4} \qquad \textbf{équation 2.35}$$

Contrairement à l'exemple précédent, cet équilibre de transmétallation a été étudié à l'aide de toutes les sondes de type $CF_xH_{(3-x)}COO^-$. Dans ce but, trois solutions à un pH de 5 ont été préparées. Ces solutions contenaient 10 mmol.L^{-1} de chaque sonde de type $CF_xH_{(3-x)}COO^-$, 0,1 mol.L^{-1} de KCl, 0,97 mmol.L^{-1} de Gd, 1,16 mmol.L^{-1} de DTPA, et respectivement 4,81 mmol.L^{-1}, 9,63 mmol.L^{-1}, et 19,25 mmol.L^{-1} de Zn^{2+}.

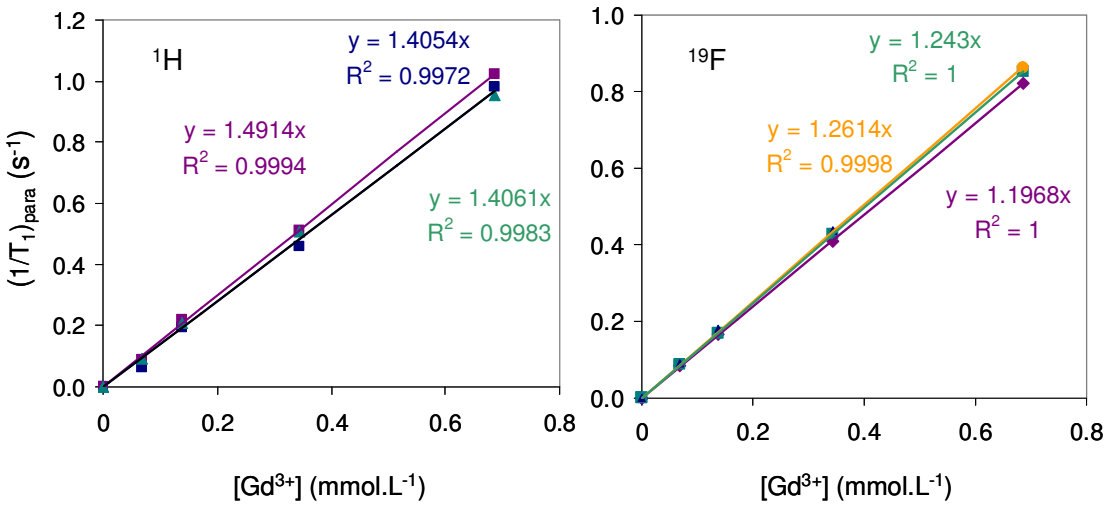


Figure 2.8 : Taux de relaxation mesurés à 400 MHz et 25 °C, en fonction de $[Gd^{3+}]$ et en présence de [DTPA] = 0,96 mmol.L^{-1}, pour les spins ^1H (gauche) et ^{19}F (droite) portés par les sondes acétate (a : ■), monofluoroacétate (mfa : w), difluoroacétate (dfa :▲), et trifluoroacétate (tfa :●). [a] = [mfa] = [dfa] = [tfa] = 10 mmol.L^{-1}, [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}.

Afin de pouvoir quantifier la transmétallation, il est essentiel de connaître la relaxivité de chacune des sondes en présence de Gd^{3+} et de Gd(DTPA). Les relaxivités des sondes en présence de Gd^{3+} sont données dans la Figure 2.4 du paragraphe précédent, alors que les relaxivités en présence de Gd(DTPA) sont données dans la Figure 2.8. Les résultats expérimentaux des augmentations paramagnétiques de relaxation mesurées dans chacune des trois solutions contenant du Zn(II) sont présentés dans le Tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Augmentation paramagnétique de relaxation $R_{1p}^{*} = (\gamma_H/\gamma_I)^2 R_{1p}$ des spins I des différentes sondes mesurées en présence de [GdDTPA] = 0,97 mmol.L^{-1} et de diférentes quantités de Zn^{2+}. Les trois premières lignes correspondent à des mesures par RMN du ^{19}F, et les deux dernières par RMN du ^{1}H.

R_{1p}^{*} (s^{-1})	[Zn^{2+}] = 19,25 mmol.L^{-1}	[Zn^{2+}] = 9,63 mmol.L^{-1}	[Zn^{2+}] = 4,81 mmol.L^{-1}
CF_3COO^-	4,7(1)	3,23(7)	2,29(5)
CF_2HCOO^-	9,0(2)	5,7(2)	3,52(7)
CFH_2COO^-	45,6(9)	27,2(4)	14,7(3)
CH_3COO^-	114(3)	64(1)	33,1(7)
CF_2HCOO^-	10,2(2)	6,4(2)	3,82(8)

Les temps de relaxation des protons de la sonde CFH_2COO^- n'ont pas été mesurés car leurs signaux RMN présentent un recouvrement avec ceux de l'eau en présence de Zn^{2+}.

Au vu de ce tableau, la première constatation est que les valeurs d'augmentation paramagnétique de relaxation sont d'autant plus fortes que la sonde est plus hydrogénée. Ceci est en accord avec ce qui a été vu dans le paragraphe précédent, à savoir que les sondes totalement hydrogénées peuvent complexer le Gd(III) libre.

Etant donné que certaines sondes complexent le Gd(III), le raisonnement est un peu plus complexe que dans l'article précédent.[60]

Soient c_{Gd}, c_{Zn} et c_{P} les concentrations analytiques de Gd^{3+}, Zn^{2+} et DTPA noté P. Nous supposons que la somme des concentrations des deux ions métalliques est en excès par rapport à celle du ligand P et désignons cette concentration d'excès par

$$\Delta c \equiv c_{\mathrm{Gd}} + c_{\mathrm{Zn}} - c_{\mathrm{P}} \qquad \textbf{équation 2.36}$$

L'équation d'équilibre de transmétallation de Gd par Zn s'écrit

$$[\mathrm{Gd}][\mathrm{ZnP}] = K[\mathrm{GdP}][\mathrm{Zn}] \qquad \textbf{équation 2.37}$$

où K est la constante d'équilibre apparente.

Les concentrations des espèces Gd^{3+}, Zn^{2+} et P doivent aussi obéir à la loi de conservation de P :

$$[\mathrm{GdP}]+[\mathrm{ZnP}]=c_{\mathrm{P}} \qquad \text{équation 2.38}$$

où nous avons supposé que les constantes de formation des complexes GdP et ZnP sont suffisamment grandes pour que la concentration $[\mathrm{P}]$ de ligand P libre soit négligeable devant c_{P}.

Elles doivent aussi vérifier la loi de conservation de Zn^{2+}

$$[\mathrm{Zn}]+[\mathrm{ZnP}]=c_{\mathrm{Zn}} \qquad \textbf{équation 2.39}$$

En plus des espèces Gd^{3+}, Zn^{2+} et P directement concernées par la transmétallation, nous considérons la présence en solution de ligands sondes L qui complexent Gd^{3+} beaucoup plus faiblement que P, et qui ont une propriété mesurable (par exemple, l'augmentation paramagnétique de vitesse de relaxation longitudinale) renseignant sur la concentration $[\mathrm{GdL}]$. Nous considérons que ces sondes ne complexent pas Zn^{2+}, ce qui est raisonnable en première approximation ($\log \beta_{110} = 1{,}3$ pour la formation du complexe $ZnCH_3COO^+$).[61] Pour chaque ligand L, nous avons l'équation de formation du complexe GdL

$$[\mathrm{GdL}]=K_{\mathrm{L}}[\mathrm{Gd}][\mathrm{L}] \qquad \textbf{équation 2.40}$$

où K_{L} est la constante de formation supposée connue, ainsi que l'équation de conservation de l'espèce L

$$[\mathrm{L}]+[\mathrm{GdL}]=c_{\mathrm{L}} \qquad \textbf{équation 2.41}$$

En combinant les équations 2.40 et 2.41, la concentration de complexes GdL s'exprime en fonction de la concentration en ions Gd^{3+} libres (aqua-ions) par

$$[\mathrm{GdL}]=\frac{K_{\mathrm{L}}[\mathrm{Gd}]\,c_{\mathrm{L}}}{1+K_{\mathrm{L}}[\mathrm{Gd}]}\cong K_{\mathrm{L}}[\mathrm{Gd}]\,c_{\mathrm{L}} \qquad \textbf{équation 2.42}$$

l'approximation linéaire en $[\mathrm{Gd}]$ s'appliquant ici, car K_{L} et $[\mathrm{Gd}]$ sont suffisamment petits.

L'équation de conservation de l'ion Gd^{3+} sous ses différentes formes s'écrit

$$[\mathrm{Gd}]+\sum_{\mathrm{L}}[\mathrm{GdL}]+[\mathrm{GdP}]=c_{\mathrm{Gd}} \qquad \textbf{équation 2.43}$$

Soit x' est la concentration totale de Gd^{3+} non complexé par le ligand étudié P. Compte tenu de l'équation 2.43 et de l'expression 2.42 de $[\mathrm{GdL}]$, nous avons :

$$x' \equiv c_{\mathrm{Gd}} - [\mathrm{GdP}] = \left(1 + \sum_{\mathrm{L}} K_{\mathrm{L}} c_{\mathrm{L}}\right)[\mathrm{Gd}] \qquad \textbf{équation 2.44}$$

D'après les équations 2.36, 2.38, 2.39, les expressions des concentrations [ZnP] et [Zn] en fonction de x' sont

$$[\mathrm{ZnP}] = c_{\mathrm{P}} - c_{\mathrm{Gd}} + x', \; [\mathrm{Zn}] = \Delta c - x' \qquad \textbf{équation 2.45}$$

Remplaçant $[\mathrm{Gd}]$, $[\mathrm{ZnP}]$, $[\mathrm{GdP}]$, $[\mathrm{Zn}]$ par leurs expressions 2.44 et 2.45 en fonction de x' dans l'équation de transmétallation 2.37, celle-ci se réécrit en fonction de x'

$$x'\left(c_{\mathrm{P}} - c_{\mathrm{Gd}} + x'\right) = K'\left(c_{\mathrm{Gd}} - x'\right)\left(\Delta c - x'\right) \text{ avec } K' \equiv K\left(1 + \sum_{\mathrm{L}} K_{\mathrm{L}} c_{\mathrm{L}}\right) \qquad \textbf{équation 2.46}$$

Connaissant la constante d'équilibre K, il est possible de calculer x' comme solution de l'équation 2.46, puis les autres concentrations d'équilibre. Inversement, s'il est possible de mesurer $x \equiv [\mathrm{Gd}]$, alors il est possible de calculer x' d'après l'équation 2.44, puis obtenir K' et K d'après l'équation 2.46. Plus généralement, K peut être ajusté afin d'obtenir les valeurs mesurées de la PRE dépendant de x. Compte tenu du paragraphe II.2. (équation 2.19 et 2.25), la PRE $R_{1\mathrm{p}}$ d'un spin nucléaire I d'un ligand L s'écrit

$$R_{1\mathrm{p}} = K_{\mathrm{L}} x \frac{1}{T_{1\mathrm{m}} + \tau_{\mathrm{m}}} + x' r_1^{\mathrm{OS}}\left(\mathrm{Gd}\right) + \left(c_{\mathrm{Gd}} - x'\right) r_1^{\mathrm{OS}}\left(\mathrm{Gd(DTPA)}\right) \qquad \textbf{équation 2.47}$$

$r_1^{\mathrm{OS}}\left(\mathrm{Gd}\right)$ est la relaxivité OS due aux aqua-ions Gd^{3+} ou aux complexes GdL et $r_1^{\mathrm{OS}}\left(\mathrm{Gd(DTPA)}\right)$ est celle induite par le complexe Gd(DTPA).

Considérons maintenant l'acétate et ses dérivés fluorés. Les valeurs mesurées de $r_1^{\mathrm{OS}}\left(\mathrm{Gd}\right)$ et $r_1^{\mathrm{OS}}\left(\mathrm{Gd(DTPA)}\right)$ sont 8,5 et 1,0 pour $^{1}\mathrm{H}$, et 9,5 et 1,1 pour $^{19}\mathrm{F}$ (voir paragraphe II.1.). Le Tableau 2.6 donne les valeurs théoriques de $R_{1p}^{*} = \left(\gamma_H / \gamma_I\right)^2 R_{1p}$ obtenues pour $\mathrm{p}K \equiv -\log K = 2.95$ avec les valeurs des constantes de formation K_{L} et des vitesses de relaxation $1/T_{1\mathrm{m}}$ ($\tau_{\mathrm{m}} << T_{1\mathrm{m}}$) trouvées dans le paragraphe précédent.

Tableau 2.6 : Augmentations paramagnétiques de relaxation théoriques $R^*_{1p} = (\gamma_H/\gamma_I)^2 R_{1p}$ des spins I des différentes sondes en considérant log K = 2,95. Les trois premières lignes correspondent à des mesures par RMN du ^{19}F, et les deux dernières par RMN du ^{1}H.

R^*_{1p} (s^{-1})	[Zn^{2+}] = 19,25 mmol.L^{-1}	[Zn^{2+}] = 9,63 mmol.L^{-1}	[Zn^{2+}] = 4,81 mmol.L^{-1}
CF_3COO^-	3,5	2,7	2,15
CF_2HCOO^-	7,2	5,0	3,5
CFH_2COO^-	38,8	24,9	15,5
CH_3COO^-	85,1	54,2	33,1
CF_2HCOO^-	8,0	5,6	3,9

Etant donné l'importante variation d'énergie électrique charge/charge accompagnant la transformation des ions réactifs (-2 / +2) en ions produits (+3 / -3) lors de la transmétallation, nous avons aussi tenu compte de la variation des coefficients d'activité de ces ions lors de l'ajout de $ZnCl_2$ à l'aide des formules approchées de Debye-Hückel.[68] L'accord avec l'ensemble des valeurs mesurées est globalement très satisfaisant. En particulier, nous retrouvons bien la décroissance de R_{1p} avec l'augmentation du nombre d'atomes de fluor substituant les hydrogènes du groupe méthyle de l'acétate.

D'autre part cette valeur de constante de transmétallation donne une constante de formation du complexe ZnDTPA telle que $\log \beta_{110} = 19{,}5$, en accord avec les valeurs de la littérature.[1,35,67]

Pour l'étude de la transmétallation en présence de Ca(II), la constante de stabilité attendue pour la formation du complexe CaDTPA est de 10,75, soit douze ordres de grandeur plus faibles que celle du complexe GdDTPA. Dans ce cas, même en présence d'un fort excès de Ca(II) ([Ca^{2+}] = 20*[GdDTPA]), il n'est pas possible de détecter du Gd(III) libre. Nous touchons là à la limite de détection de la méthode.

I.3.3. Conclusion

Cette méthode d'étude des équilibres de transmétallation est très simple à mettre en oeuvre, et elle permet de déterminer rapidement et avec une précision satisfaisante des constantes d'équilibre de transmétallation proches de 1. Dans le cas du Zn(II), nous avons pu montrer

que la constante d'affinité est inférieure de trois ordres de grandeur à celle du Gd(III).Les limitations de la méthode sont données par les limites de détection du Gd(III) libre, limites variant en fonction des sondes utilisées.
En théorie il est possible de déplacer l'équilibre de transmétallation en ajoutant des quantités beaucoup plus importantes de cation métallique. Cependant, dans ce cas la force ionique ne sera plus maintenue constante et la PRE ne sera plus proportionnelle à la concentration en Gd(III) libre.

II.4. Temps de relaxation électronique

I.4.1. Problématique

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre 1, le temps de relaxation électronique est un paramètre crucial dans la détermination de la relaxivité. Il n'existe cependant pas de méthode simple permettant de mesurer expérimentalement ce paramètre et le manque de théorie valable quelles que soient les conditions est également un frein à sa bonne détermination. Actuellement, les approximations du modèle de Solomon-Blombergen-Morgan (SBM) conduisent à des expressions théoriques incorrectes de la relaxivité incluant de nombreux paramètres. Lorsque ces paramètres sont ajustés, ils peuvent prendre des valeurs qui ne sont pas acceptables physiquement, pour compenser les défauts de la théorie. L'utilisation des expressions de temps de relaxation électronique décrites dans le chapitre 1 (équations 1.25-1.26) est discutable en particulier sur le point suivant : dans le repère moléculaire du complexe GdL, l'hamiltonien moyenné dans le temps de l'éclatement en champ nul (ZFS) des niveaux du spin du Gd(III) est négligé. Dans le repère moléculaire, cet hamiltonien moyenné est indépendant du temps et donc appelé statique. Dans le repère du laboratoire les fluctuations de cet hamiltonien dues à la rotation du complexe sont le mécanisme dominant de la relaxation électronique.[52] A bas champ, il est donc nécessaire d'avoir une description correcte des fluctuations du ZFS statique pour décrire correctement la relaxivité.[69]

Au laboratoire, une méthode se basant sur la détermination indépendante de la relaxivité d'une sonde de type sphère externe a été développée pour évaluer ce temps de relaxation électronique. Cette méthode se déroule en trois étapes :

(1) détermination de la relaxivité en champ nul des protons d'une sonde ayant seulement une dynamique de sphère externe. Le temps de relaxation électronique en champ nul est alors le seul paramètre ajustable comme nous allons le voir ci-dessous.

(2) ajustement du profil NMRD complet des protons de la sonde par la théorie de Ayant-Belorizky-Hwang-Freed (ABHF) pour la relaxivité de sphère externe, en utilisant la valeur de la relaxivité électronique en champ nul précédemment déterminée.

(3) ajustement du profil NMRD des protons de l'eau avec les paramètres de relaxation électronique trouvés.

Cela permet d'éviter d'ajuster les multiples paramètres au modèle discutable de Solomon-Blombergen-Morgan à bas champ. Cette méthode a pu être validée à la fois sur le complexe de Gd(DTPA) et sur un complexe classique avec un ligand de type polyaminocarboxylate.[70,71] Nous allons maintenant expliquer la théorie développée pour l'ajustement du temps de relaxation électronique car nous l'appliquerons dans les chapitres suivants.

I.4.2. Théorie

Une descrition théorique générale de la relaxation électronique prenant en compte l'effet du ZFS statique et du mouvement de rotation du complexe est très lourde à mettre en oeuvre. Il n'en existe pas d'expressions analytiques simples. Il est toutefois possible d'obtenir des expressions relativement simples par un traitement *ad hoc*. Les expressions qui vont être utilisées ne sont donc que des approximations, mais elles ont été validées par des simulations numériques et permettent une interprétation rationnelle des profils NMRD expérimentaux. Ainsi, pour des champs suffisamment élevés ($B_0 \geq 0{,}2T$), le temps de relaxation électronique s'exprime à l'aide de $1/T_{1e}^{analyt}$:[52,72]

$$\frac{1}{T_{1e}^{analyt}} \equiv \frac{12}{5} a_2^2 \tau_r \left(\frac{1}{1+\omega_S^2 \tau_r^2} + \frac{4}{1+4\omega_S^2 \tau_r^2} \right) \qquad \textbf{équation 2.48}$$

a_2 représente l'amplitude du ZFS statique

$\tau_r = 1/6D^r$ représente le temps de corrélation rotationnelle du complexe, D^r étant son coefficient de diffusion rotationnelle.

ω_S représente la pulsation de Larmor du spin électronique.

Soit $1/T_{1e}(B_0 = 0) \equiv 1/\tau_{S0}^{\text{eff}}$, le taux de relaxation électronique effectif en champ nul. Une expression du temps de relaxation électronique valable sans restriction de champ est alors :

$$\frac{1}{T_{1e}} = \frac{1}{\tau_{S0}^{\text{eff}}} \tanh\left[\left(\frac{1}{T_{1e}^{\text{analyt}}}\right) \Big/ \left(\frac{1}{\tau_{S0}^{\text{eff}}}\right)\right] \qquad \textbf{équation 2.49}$$

Cette expression phénoménologique rend compte des principales caractéristiques du temps de relaxation électronique, à savoir :

- quand B_0 augmente $1/T_{1e}^{\text{analyt}}$ décroît rapidement à cause de sa dispersion en champ en $(\omega_S\tau_r)^{-2}$ et devient nettement plus faible que $1/\tau_{S0}^{eff}$, de sorte que l'égalité $1/T_{1e} \cong 1/T_{1e}^{\text{analyt}}$ est valable.
- $1/T_{1e}$ tend continuement vers $1/\tau_{S0}^{eff}$ quand B_0 tend vers 0.

Expérimentalement, la méthode de détermination du temps de relaxation électronique repose sur des mesures de relaxivité d'une sonde dont la PRE est seulement de type sphère externe et peut être modélisée de manière satisfaisante.

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre 1, la relaxivité de sphère externe dépend des quatre paramètres : le coefficient de diffusion translationnelle relative D, qui est la somme des coefficients de diffusion du complexe et de la sonde, le diamètre de collision entre le complexe et la sonde b, les temps de relaxation électronique T_{1e} et T_{2e} (équations 1.29-1.30). Or, en champ nul, les relaxivités électroniques longitudinale et transversale sont égales. La relaxivité de type sphère externe en champ nul va donc dépendre de cinq paramètres : D, b, $1/\tau_{S0}^{eff}$, a_2 et τ_r et son expression est donnée par l'équation 2.50.

$$r_1^{OS}(B_0 = 0) = \frac{16\pi}{3}\gamma_I^2\gamma_H^2\hbar^2 S(S+1)\frac{10^{-6}N}{Db}\frac{4+x_0}{3(9+9x_0+4x_0^2+x_0^3)} \qquad \textbf{équation 2.50}$$

avec $x_0 \equiv \sqrt{\tau/\tau_{S0}^{eff}}$

N, nombre d'Avogadro

τ, temps de corrélation diffusionnelle défini par $\tau = b^2/D$

Pour les complexes de Gd(III) dans l'eau, x_0 est typiquement de l'ordre de l'unité, de sorte que $r_1^{OS}(B_0 = 0)$ est approximativement inversement proportionnel à b.

Les coefficients de diffusion du complexe et de la sonde peuvent être mesurés par une séquence utilisant des gradients pulsés (voir partie expérimentale). Le diamètre de collision b entre le soluté sonde et le complexe est estimé à partir de modèles moléculaires compacts. Ainsi la relaxivité de sphère externe en champ nul ne dépend que du seul paramètre $1/\tau_{S0}^{eff}$ qui peut être déterminé par ajustement. Le point critiquable de cette méthode est que le diamètre de collision ne peut être qu'estimé. Comme $r_1^{OS}(B_0 = 0)$ est inversement proportionnel à b, une imprécision sur b va directement affecter la valeur de $1/\tau_{S0}^{eff}$. Pour y remédier, il est préférable de faire le rapport des relaxivités de sphère externe à bas champ et à un haut champ judicieusement choisi.

Considérons un champ magnétique de référence B_{0h} suffisamment élevé, $B_{0h} \geq 4-5T$ correspondant à une fréquence en proton de 200 MHz environ). A ce champ, trois approximations peuvent être faites :

- $\omega_I >> 1/T_{1e}$ car $1/T_{1e}$ décroît rapidement avec le champ.
- $\omega_S >> 1/\tau_{S0}^{eff} \geq 1/T_{2e}$ car $1/\tau_{S0}^{eff}$ est typiquement de l'ordre de grandeur de 10^{10} s^{-1}.[1]. Ainsi les valeurs des densités spectrales de l'équation 1.29 peuvent être exprimées approximativement de la façon suivante : $j\left(\frac{1}{T_{1e}} + i\omega_I\right) \cong j(i\omega_I)$ et $j\left(\frac{1}{T_{2e}} + i\omega_S\right) \cong j(i\omega_S)$.
- $\omega_S\tau >> \omega_I\tau$; $\omega_S\tau >> 1$ donc $j(i\omega_S) << j(i\omega_I)$.

L'expression de la relaxivité de sphère externe à haut champ prend alors l'expression suivante :

$$r_1^{OS}(B_{0h}) = \frac{8\pi}{5}\gamma_I^2\gamma_H^2\hbar^2 S(S+1)j(i\omega_I(B_{0h})) \qquad \textbf{équation 2.51}$$

Soit q_1^{OS} le rapport des relaxivités de sphère externe en champ nul et à haut champ, défini selon l'équation 2.52 :

$$q_1^{OS} \equiv \frac{3}{10}\frac{r_1^{OS}(B_0 = 0)}{r_1^{OS}(B_{0h})} \qquad \textbf{équation 2.52}$$

En posant $x_0 \equiv \sqrt{\tau/\tau_{S0}^{\mathrm{eff}}}$ et $x_h \equiv \sqrt{i\omega_I \tau}$ $x_{\mathrm{h}} \equiv \sqrt{i\omega_I (B_{0\mathrm{h}})}$, et en considérant les équations 1.29, 2.50, 2.51, l'expression de q_1^{OS} se simplifie de la façon suivante :

$$q_1^{\mathrm{OS}} = \left[\frac{4+x_0}{9+9x_0+4x_0^2+x_0^3}\right] \Big/ \mathrm{Re}\left[\frac{4+x_{\mathrm{h}}}{9+9x_{\mathrm{h}}+4x_{\mathrm{h}}^2+x_{\mathrm{h}}^3}\right] \qquad \textbf{équation 2.53}$$

La valeur de $1/\tau_{S0}^{\mathrm{eff}}$ peut être ajustée de façon indépendante à la valeur du rapport de relaxivité théorique q_1^{OS}. En pratique, les spectromètres disponibles au laboratoire nous ont permis cet ajustement sur trois rapports différents en mesurant la relaxivité aux fréquences de Larmor du proton de 200, 400 et 500 MHz.

I.4.3. Application au complexe GdDTPA

La démarche précédente a été illustrée par des mesures de temps de relaxation sur la sonde *tert*-butanol dans D_2O, à 298 K, en présence du complexe GdDTPA, afin de déterminer son temps de relaxation. Les relaxivités expérimentales mesurées en champ nul (en pratique ces relaxivités sont mesurées à 10 kHz) et à haut champ sont données dans le Tableau 2.7.

Tableau 2.7 : Relaxivités des protons du *t*BuOH en présence de GdDTPA, mesurées à 25 °C en fonction des fréquences de résonance ^{1}H.[71]

ν_H (MHz)	0,01	200	400	500
r_1 (mmol^{-1}.L.s^{-1})	3,53(5)	2,92(4)	2,31(3)	2,09(3)

Les rapports de relaxivité à bas champ et haut expérimentaux et théoriques sont rassemblés dans le Tableau 2.8.

Tableau 2.8 : Comparaison des rapports des relaxivités théoriques et expérimentales en champ nul et à haut champ.

ν_H (MHz)	$r_1(0)/r1(\nu_H)$ théorique	$r_1(0)/r_1(\nu_H)$ expérimental
200	1,21	1,21
400	1,53	1,53
500	1,70	1,69

L'accord est donc excellent à moins de 5% près pour une valeur théorique de τ_{S0} de 83 ps. La valeur déterminée est courte, ce qui compatible avec un complexe peu symétrique comme le GdDTPA. Cette valeur est en très bon accord avec la littérature qui donne un temps de relaxation électronique en champ nul, τ_{S0} de 72 ps, déterminé par ajustement des profils NMRD.[1]

Cette expérience sur un complexe très étudié permet de valider la démarche de détermination du temps de relaxation électronique en champ nul par l'utilisation de sondes de type sphère externe.

III. Bilan et perspectives

Les mesures de relaxivité effectuées sur des sondes de type sphère externe nous ont permis d'accéder à trois propriétés moléculaires d'un complexe paramagnétique à travers la dynamique en solution :

- sa charge,
- sa stabilité au travers de la transmétallation,
- la relaxation de son spin électronique.

Nous avons illustré ces approches par des études sur le complexe de Gd(DTPA).

Les mesures de relaxivité sur des sondes de type sphère interne ont permis de déterminer simultanément des constantes de complexation, ainsi qu'un paramètre structural, la distance entre le noyau observé et le Gd(III). L'étude sur des dérivés fluorés a mis en évidence le pouvoir électro-attracteur du fluor qui diminue la force de complexation.

L'utilisation des mesures de relaxivité RMN sur des sondes afin de déterminer des paramètres dynamiques et structuraux présente deux atouts majeurs. Tout d'abord, les mesures réalisées sur des sondes ayant un spectre RMN simple sont très aisées et rapides d'un point de vue expérimental, même lorsqu'elles sont en faible concentration. Ensuite, ces mesures permettent de mettre en évidence des interactions complexe/sonde faibles, sur des systèmes thermodynamiquement peu stables. Il faut souligner que les interactions doivent rester faibles, pour que la dynamique d'échange complexe/sonde soit rapide. Dans le cas contraire, le signal

RMN des sondes n'est plus détecté. La force de cette technique est de pouvoir travailler sur des paires d'espèces neutres et chargées en interaction, ce qui permet d'obtenir autant d'informations qu'il y a d'espèces.

Les expériences de mesures de constantes de complexation qui ont été présentées pourront être étendues à d'autres systèmes. Par exemple, avant de synthétiser des ligands tripodes ou tétrapodes, il peut être utile d'estimer la force de complexation d'une unité du ligand afin de voir comment la substituer de façon judicieuse afin d'obtenir la stabilité souhaitée.
Les mesures de relaxivité à haut champ sur des sondes donnent également accès à la charge du complexe de Gd(III). Cette information est utile en particulier pour suivre les formations de complexes successifs portant différentes charges. Des exemples seront donnés dans les chapitres suivants. Enfin, les déterminations de temps de relaxation électronique sont désormais utilisées de façon routinière au laboratoire, et deux exemples seront décrits dans les chapitres suivants.
Les mesures de relaxation constituent donc une technique primordiale pour la caractérisation des interactions supramoléculaires en solution et pour la difficile étude des complexes de Ln(III) peu stables. Au cours des deux prochains chapitres, nous utiliserons cette technique abondamment pour mettre en évidence des interactions spécifiques en solution, dans le cas de complexes de Ln(III) et de ligands oxygénés portés par une plate-forme à base d'unités sucres ou acides aminés.

3

Complexation des lanthanides(III) par des cyclodextrines modifiées

I. CYCLODEXTRINES ET LANTHANIDES A TRAVERS LA LITTERATURE 121
I.1. Présentation des cyclodextrines naturelles *121*
I.2. Complexes de lanthanides et cyclodextrines *123*
I.2.1. Séparation d'énantiomères 123
I.2.2. Hydrolyse de l'ADN 124
I.2.3. Luminescence 125
I.2.4. IRM 127
I.3. Les per(3,6-anhydro)-cyclodextrines *128*
II. MOLECULES ETUDIEES : OBJECTIF DU TRAVAIL 130
III. L'ACX : ETUDE THERMODYNAMIQUE 132
III.1. Etude des ligands libres *132*
III.2. Etude des complexes formés *133*
III.3. Confirmation de la spéciation par spectrométrie de masse *137*
III.4. Sélectivité vis-à-vis des cations biologiques *139*
IV. ETUDE STRUCTURALE 141
IV.1. Etude en solution par RMN du proton en fonction du rapport métal/ligand *141*
IV.2. Le complexe bimétallique M_2L *143*
IV.3. Structure de l'hydroxocomplexe $[Ln_2ACX(OH)_2]$ *147*
IV.4. Le complexe monométallique ML *150*
V. DETERMINATION DU NOMBRE DE MOLECULES D'EAU EN PREMIERE SPHERE DE COORDINATION DANS LE COMPLEXE MONOMETALLIQUE 152
V.1. Mesures par RMN de l'oxygène 17 ..... *152*
V.2. Mesures par luminescence *154*
V.3. Formation d'agrégats à fortes concentrations ? *156*
V.4. Conclusion *157*
VI. PROPRIETES DE RELAXATION DE L'ACX 158
VI.1. Relaxivité à haut champ (400 MHz) *158*
VI.2. Profil de relaxivité en fonction du champ *161*
VII. EFFET DES ALCALINS 167
VII.1. L'effet du potassium *167*
VII.2. Les autres alcalins *171*
VIII. ETUDE COMPLETE DE LA BCX 175
VIII.1. Effet du milieu et de la concentration *175*
VIII.2. Etude thermodynamique *175*
VIII.3. Etude structurale *177*
VIII.4. Propriétés de relaxation à haut champ *178*
VIII.5. L'origine de la relaxivité : des associations par liaisons hydrogène *179*
IX. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : LES PROPRIETES PARTICULIERES ET LES MYSTERES DE CES COMPLEXES 185

Ce chapitre concerne la complexation des lanthanides(III) par deux dérivés acides de cyclodextrines, molécules cycliques dont les unités de base les constituant sont des glucoses. Le glucose joue un rôle fondamental dans le fonctionnement des êtres vivants puisque c'est un générateur d'énergie, fournissant également un matériel de base pour la synthèse de substances indispensables à l'activité cellulaire. L'utilisation de ces molécules d'origine biologique devraient nous permettre de bénéficier de leur biocompatibilité. Les complexes formés entre les Ln(III) et ces deux dérivés de cyclodextrines différant uniquement par leur taille, seront caractérisés d'un point de vue thermodynamique et structural, et leurs propriétés de relaxation seront explorées, aussi bien à haut champ qu'à bas champ.

I. Cyclodextrines et lanthanides à travers la littérature

I.1. Présentation des cyclodextrines naturelles

Les cyclodextrines naturelles, objets de nombreux travaux actuels de recherche, ont été mises en évidence pour la première fois par Villiers en 1891 comme des produits de dégradation de l'amidon. Il s'agit d'oligosaccharides cycliques composés d'unités α-(1,4)-D-glucopyranosyles nommés α, β ou γ-cyclodextrine suivant le nombre d'unités glucose les composant (6, 7, 8 respectivement). Ces molécules, de forme conique, présentent une cavité hydrophobe et un contour hydrophile (voir Figure 3.1), ce qui leur confèrent des propriétés exceptionnelles d'encapsulation. Elles forment des composés d'inclusion de type hôte-invité où la cyclodextrine joue le rôle d'hôte et une molécule hydrophobe le rôle d'invité.[73]

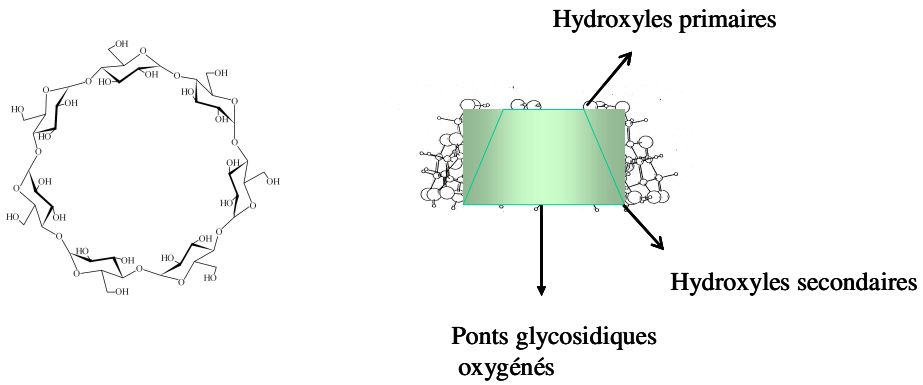


Figure 3.1 : Formule chimique et structure cristallographique de la β-cyclodextrine naturelle.

Ces molécules présentent une sélectivité vis-à-vis de substrats organiques qui dépend de la taille de leur cavité (voir Tableau 3. 1).[74]

Tableau 3. 1 : Quelques caractéristiques des cyclodextrines naturelles.

	α-cyclodextrine	β-cyclodextrine	γ-cyclodextrine
Diamètre de la cavité interne (en Å)	5,7	7,8	9,5
Diamètre du contour externe (en Å)	13,7	15,3	16,9
Masse molaire (en $g.mol^{-1}$)	966	1127	1288
Solubilité dans l'eau à 25°C (en g pour 100 mL)	14,5	1,85	23,2

Les cyclodextrines les plus utilisées en raison de leur grande disponibilité sont les β malgré leur très faible solubilité dans l'eau, du fait du réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires qu'elles peuvent développer.[74]

- **Toxicité**

Les cyclodextrines naturelles, tout comme l'amidon, sont hydrolysées lentement en unités glucoses dans le colon. Cependant, la structure cyclique et l'absence d'extrémité réductrice confèrent à ces dérivés une résistance aux enzymes amylolytiques (amylases salivaire et pancréatique) supérieure à celle des amidons natifs. Elles sont inoffensives lorsqu'elles sont administrées par voie orale. Par contre, elles se révèlent toxiques par injections intraveineuses ou intramusculaires.[73]

- **Applications industrielles**

Les propriétés d'inclusion des cyclodextrines sont exploitées en cosmétologie pour encapsuler les substances actives aux odeurs nauséabondes ou tout simplement volatiles, en pharmacie pour le transport de médicaments, en nettoyage pour l'encapsulation de molécules détergentes. Elles sont également utilisées pour les transformations de liquide en solide : en général pour les huiles essentielles qui se trouvent protégées contre l'oxydation et gardent ainsi leur arôme plus longtemps. Elles servent aussi à lutter contre les effets secondaires indésirables,

notamment pour les médicaments : par exemple, l'encapsulation des anti-inflammatoires non stéroïdiens qui sont agressifs pour l'estomac, permet d'amoindrir l'irritation.[75]

Ces molécules sont biocompatibles, solubles dans l'eau et peuvent inclure des fragments organiques dans leur cavité hydrophobe. Pour exploiter ces propriétés intéressantes, les chimistes ont élaboré de nombreux dérivés de ces cyclodextrines, en les fonctionnalisant afin d'obtenir des agents complexant les ions métalliques.

I.2. Complexes de lanthanides et cyclodextrines

Ces cyclodextrines fonctionnalisées capables de lier les ions lanthanides(III), ont particulièrement été décrites dans les domaines de la séparation d'énantiomères, de la luminescence, de l'hydrolyse de l'ADN et de l'IRM.

I.2.1. Séparation d'énantiomères

Les complexes de Dy(III) ou Yb(III) avec des dérivés de cyclodextrines permettent d'augmenter de façon très efficace la résolution énantiomérique des spectres RMN. Pour cela, un espaceur éthylènediamine (EN) lié à un DTPA pouvant complexer le lanthanide(III) est ajouté aux cyclodextrines natives (voir Figure 3.2). La substitution peut avoir lieu au niveau des hydroxyles primaires ou secondaires mais la séparation énantiomérique est plus efficace dans le second cas.

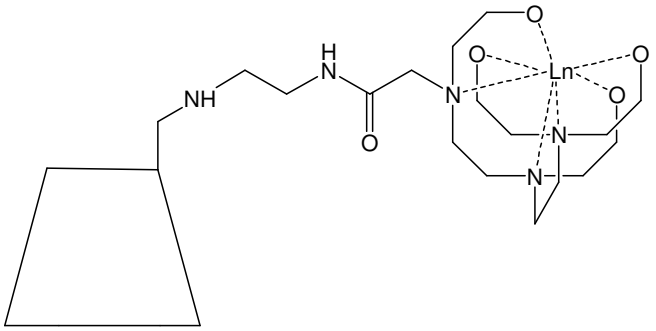


Figure 3.2 : Exemple d'agent de séparation de racémique, le 6-β-CD-EN-DTPA.

Il a été montré que le déplacement chimique induit par le lanthanide est le résultat de l'association du substrat chiral avec la cyclodextrine et non avec le lanthanide. Les déplacements chimiques les plus importants sont observés pour les substrats inclus dans la cavité de la cyclodextrine et la valeur de ces déplacements chimiques paramagnétiques peut être utilisée pour analyser la géométrie de l'association substrat-cyclodextrine.[76] Par la suite, des systèmes commerciaux de β-CD sulfonatées ou méthylcarboxylées ont prouvé leur intérêt dans ce domaine. Le lanthanide(III) est alors complexé par les groupes sulfonates ou carboxylates à l'extrémité de la cyclodextrine, et se trouve ainsi très proche du substrat chiral inclus dans la cavité. L'avantage majeur par rapport aux agents de déplacements classiques est que les concentrations de cyclodextrines et de substrat requises sont beaucoup plus faibles.[77]

I.2.2. Hydrolyse de l'ADN

Les lanthanides, et en particulier le Ce(IV), hydrolysent l'ADN de façon très efficace dans les conditions physiologiques. Les γ-cyclodextrines permettent de solubiliser le Ce(IV) à pH 7, qui sinon forme des hydroxydes insolubles, sans que le pouvoir hydrolysant ne soit altéré.[78] Des études plus poussées ont montré que la cavité ne participe pas à la solubilisation du cation métallique, mais que ce sont les groupements hydroxyles situés sur les bords de la cavité qui participent à la formation du complexe. La structure proposée pour ce type de complexe est représentée Figure 3.3.[79]

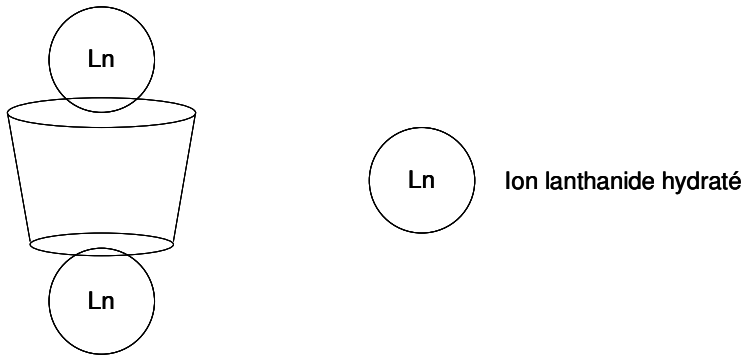


Figure 3.3 : Structure proposée pour le complexe 2/1 de Ln/γ-cyclodextrine.

C'est donc la sphère externe de la cyclodextrine qui participe à la complexation, il ne s'agit pas là d'un composé d'inclusion.

I.2.3. Luminescence

L'inclusion de chromophores organiques dans la cavité de la cyclodextrine rend possible un transfert d'énergie sur un ion Eu(III) proche spatialement (effet antenne). L'effet antenne mettant en jeu les cyclodextrines est illustré Figure 3.4.

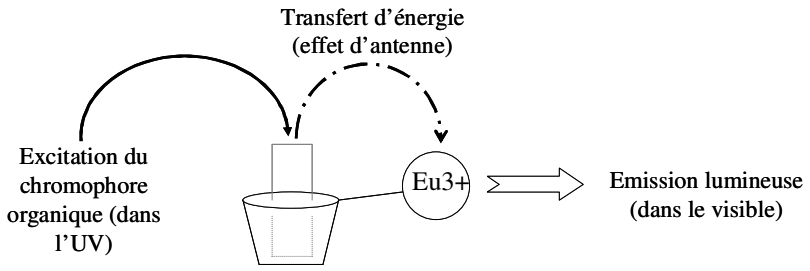
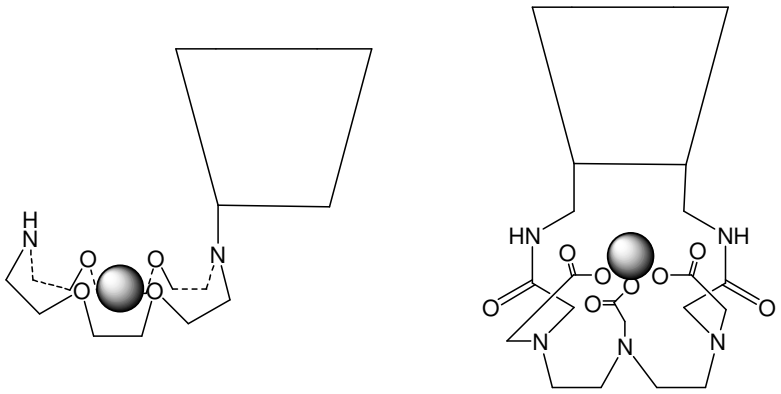


Figure 3.4 : Illustration de l'effet antenne par l'utilisation de cyclodextrines.

Dans ce cas, les cyclodextrines sont le plus souvent substituées par des bras complexant de type aminocarboxylate (DTPA, EDTA, DOTA). Le chromophore organique est excité dans l'UV ou le visible, et il transmet ensuite l'énergie absorbée au lanthanide complexé par les bras aminocarboxylates et émettant dans le visible.



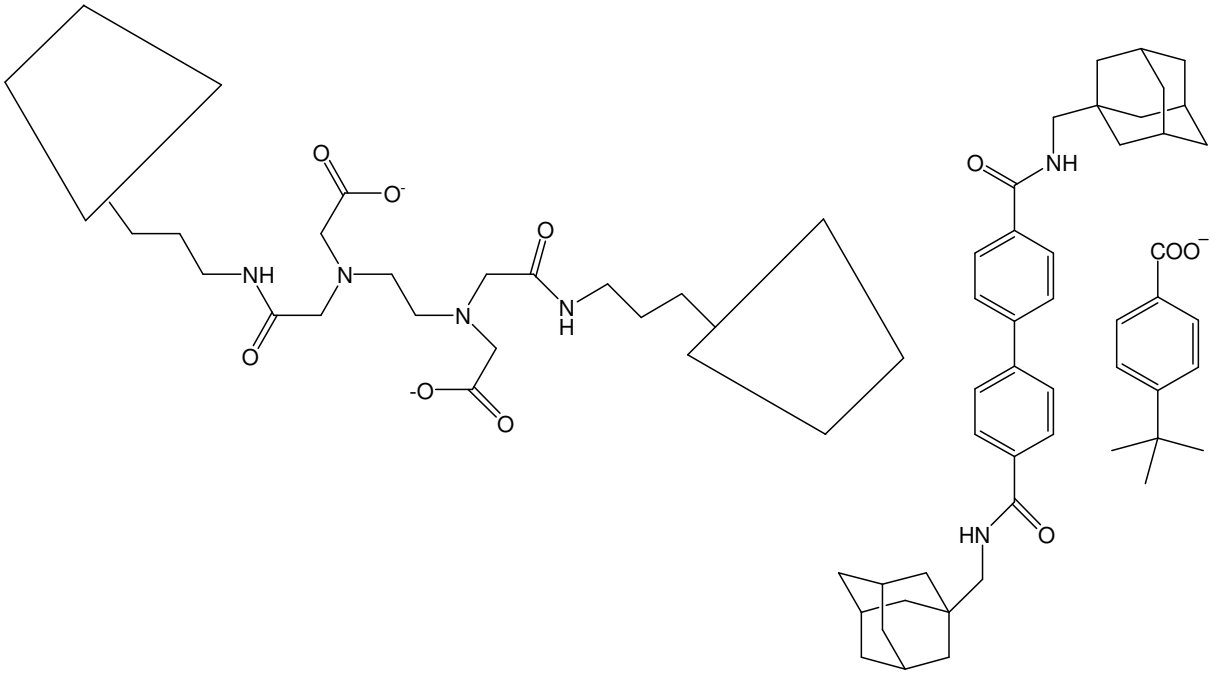
a. b.

Figure 3.5 : Cyclodextrines substituées par (a) un 1,4,10,13-tétraoxa-7,16-diazacyclooctadécane et par (b) un DTPA.

Les principaux facteurs gouvernant l'intensité du signal émis sont :

- l'association du chromophore organique et de la supramolécule,
- la section efficace d'absorption du chromophore (un biphényl est plus efficace qu'un benzène),
- la distance entre le chromophore et le métal.

Dans le cas de la Figure 3.5, la substitution par le DTPA (b) est plus efficace que la substitution par l'éther couronne (a). En effet, le lanthanide est beaucoup plus proche de la cavité de la cyclodextrine où est inclus le composé organique, et le DTPA neutralise la charge 3+ du lanthanide, qui sinon, interfère avec le composé neutre et apolaire inclus dans la cavité. La molécule (b) est utilisée comme senseur luminescent pour la détection de composés aromatiques.[80] Plus la distance entre le groupement aromatique et le lanthanide est grande, plus le transfert est lent et peut entrer en compétition avec des processus de désactivation du groupement aromatique.[81]



a. b. c.

Figure 3.6 : Cyclodextrines reliées par un bras EDTA complexant le Ln(III) (a) et chromophores inclus dans la/les cavité(s) (b et c).

L'introduction d'un bras EDTA entre deux cyclodextrines (voir Figure 3.6 a.) permet l'utilisation de chromophores bifonctionnels avec un noyau hydrophobe pouvant être inclus dans la cavité de la cyclodextrine et une ou plusieurs fonctions carboxylates ou amides pouvant lier le lanthanide complexé par l'EDTA sur un site de coordination libre (voir Figure 3.6 b. et c.). On obtient ainsi une amplification du signal réémis huit fois supérieure à celle obtenue avec une β-cyclodextrine-DTPA-Tb(III) en utilisant un simple biphényl comme chromophore. L'utilisation de chromophores comme celui de la Figure 3.6 b. permet une

association très forte entre les cyclodextrines et le chromophore car les deux cavités sont mises en jeu. Cependant même dans ce cas, la coordination du chromophore au lanthanide est une condition nécessaire pour un transfert d'énergie efficace.[82]

I.2.4. IRM

Le principe utilisé est le même que pour la luminescence, les cyclodextrines sont substituées par des bras aminocarboxylates complexant cette fois le Gd(III). L'apport des cyclodextrines dans le domaine de l'IRM est double. D'abord, l'inclusion de composés dans la cyclodextrine permet de grandement augmenter le poids moléculaire du complexe, et donc diminuer le temps de corrélation rotationnel (τ_R), ce qui est un facteur favorable à la relaxivité. Ensuite, comme le montre la Figure 3.7, il est possible d'inclure le groupement phényl (b) dans la cyclodextrine (a) et ainsi d'augmenter le nombre de Gd(III) par composé donc d'augmenter encore la relaxivité.[81]

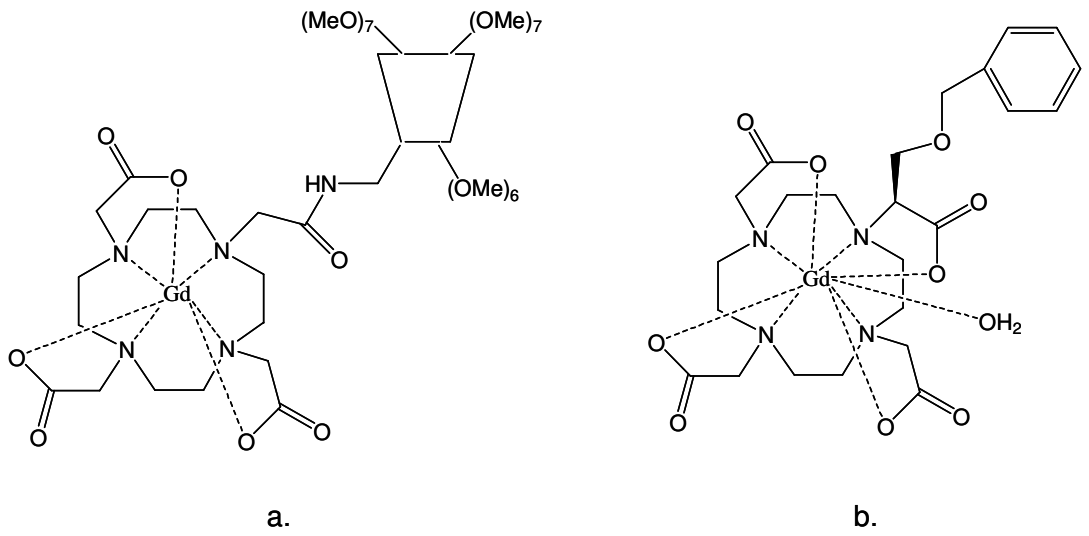


Figure 3.7 : (a) Complexe dérivé du DOTA monosubstitué par une β-cyclodextrine utilisé pour l'inclusion d'un complexe cyclique dérivé du GdBOPTA (b)

Le phénomène a été étudié à l'échelle de poly-β-cyclodextrines. Ainsi, un complexe Gd(DOTA) substitué par trois benzyloxyméthyles sur les bras carboxylates du DOTA, peut être inclus à grande échelle dans une poly-β-cyclodextrine ou même dans différents polymères de poly-β-cyclodextrine. Le temps de corrélation rotationnelle devient alors très faible et la relaxivité à 25 °C et 20 MHz passe de 7,5 $L.mmol^{-1}.s^{-1}$ pour le complexe seul à 49,0 $L.mmol^{-1}.s^{-1}$ pour le polymère.[83]

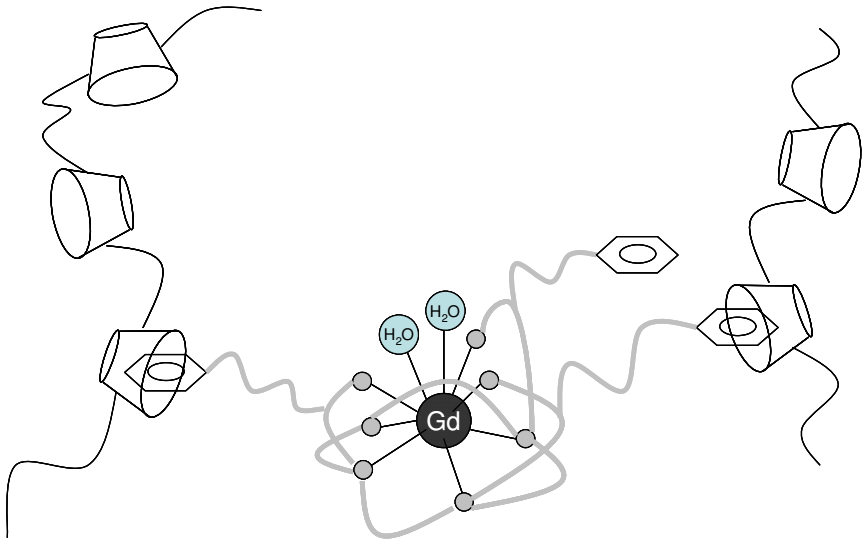


Figure 3.8 : Inclusion de complexes de GdDTPA substitués par des bras comportant des phényles dans des polymères de β-cyclodextrines.

Ainsi la coordination du cation a le plus souvent lieu par l'intermédiaire de groupements aminocarboxylates classiques et les cyclodextrines sont utilisées pour leurs propriétés d'encapsulation de composés organiques. L'interaction directe entre le cation lanthanide et la cyclodextrine est très peu décrite puisque la cavité hydrophobe n'est pas adaptée aux cations.[79,84]

I.3. Les per(3,6-anhydro)-cyclodextrines

Grâce à des modifications chimiques sélectives sur l'alcool primaire, une nouvelle génération de cyclodextrines, comme les per(3,6-anhydro)-cyclodextrines, est née. La transformation se fait en deux étapes. D'abord une substitution nucléophile sélective sur l'alcool primaire en position 6 pour obtenir le dérivé iodé, puis une deuxième substitution nucléophile de l'iode en position 6 par l'oxygène de la position 3. Le bilan peut être vu comme une déshydratation intramoléculaire de la cyclodextrine native (voir Figure 3.9).[85-87]

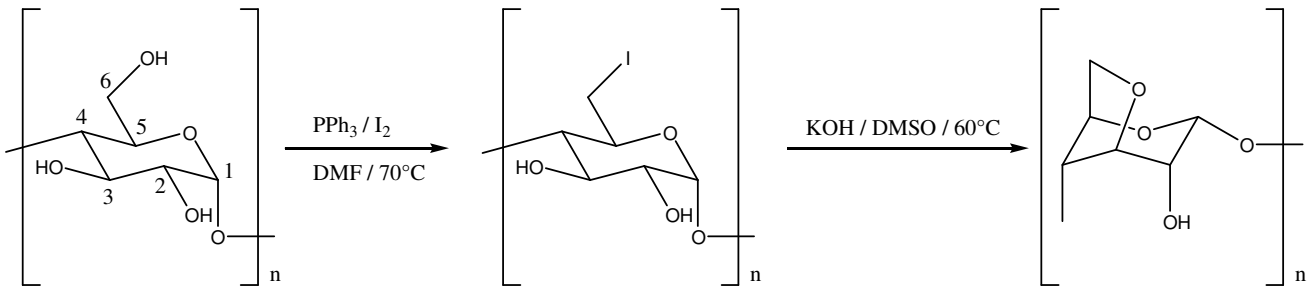


Figure 3.9 : Schéma réactionnel d'obtention d'une per(3,6-anhydro)-cyclodextrine à partir de la cyclodextrine native.

Cette déshydratation s'accompagne d'un changement important de géométrie puisque la conformation chaise du cycle D-glucopyranose est inversée et passe ainsi de $^4C_1$ à $^1C_4$. La cavité conique hydrophobe est alors remplacée par une plate-forme hydrophile capable de lier les cations métalliques (Figure 3.10).

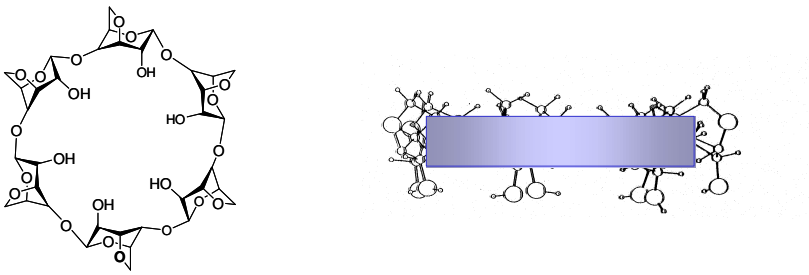


Figure 3.10 : Per(3,6-anhydro)-α-cyclodextrine et structure cristallographique de la per(3,6-anhydro)-β-cyclodextrine

Une corrélation entre le rayon du cation métallique lié et la cavité de la cyclodextrine a été mise en évidence. Ainsi, la per(3,6-anhydro)-α-cyclodextrine lie préférentiellement K^+, la per(3,6-anhydro)-β-cyclodextrine Rb^+, et la per(3,6-anhydro)-γ-cyclodextrine Cs^+. Les ions Li^+ et Na^+ ne sont liés par aucune de ces molécules.[88,89] Parallèlement à ces travaux, une structure à l'état solide de per(3,6-anhydro)-β-cyclodextrine en présence de potassium a montré l'inclusion de deux potassiums dans la cavité et la formation d'agrégats trimériques en forme de « feuille de trèfle ».[90]

La modification des cyclodextrines naturelles en per(3,6-anhydro)cyclodextrine permet donc l'inclusion d'alcalins, en particulier de potassium, dans la cavité hydrophile formée.

II. Molécules étudiées : objectif du travail

Pour renforcer l'affinité des per(3,6-anhydro)-cyclodextrines pour les cations métalliques durs comme les lanthanides(III), le groupement hydroxyle résiduel en position 2 a été substitué par un groupement méthylènecarboxylate. Pour cela la substitution nucléophile d'ordre 2 entre le chlorométhylcarboxylate et la per(3,6-anhydro)-cyclodextrine suivante a été réalisée :

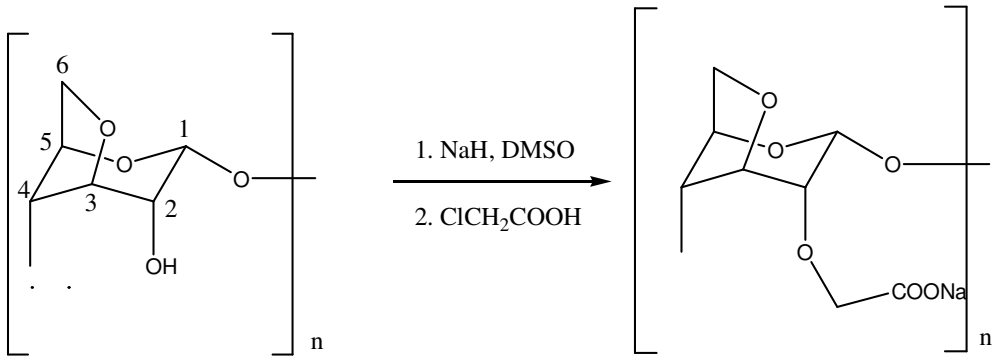


Figure 3.11 : Schéma réactionnel d'obtention de (2-O-carboxyméthyle-3,6-anhydro)-cyclodextrine à partir de per(3,6-anhydro)-cyclodextrine.

Les synthèses de l'hexakis(2-O-carboxyméthyle-3,6-anhydro)-α-cyclodextrine (ACX), et l'heptakis(2-O-carboxyméthyle-3,6-anhydro)-β-cyclodextrine (BCX) ont ainsi été mises au point et réalisées par Andrée Gadelle. [91]

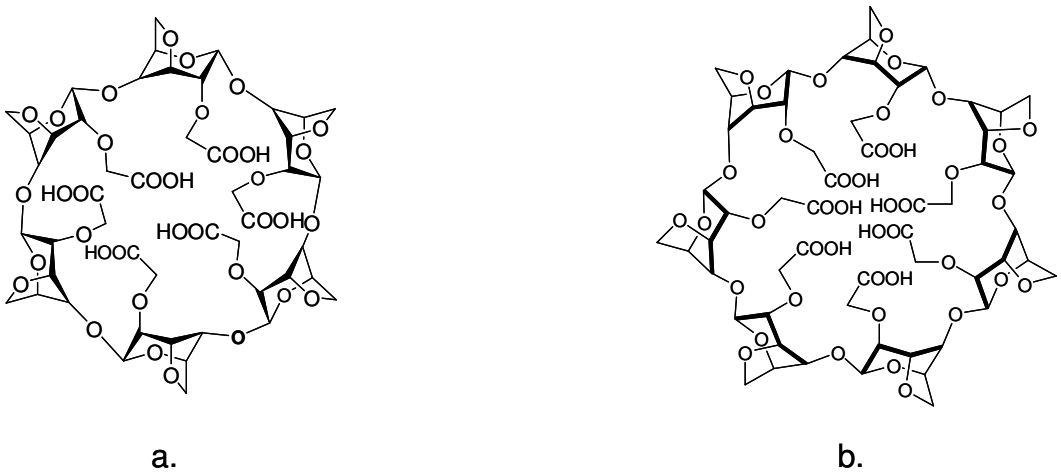
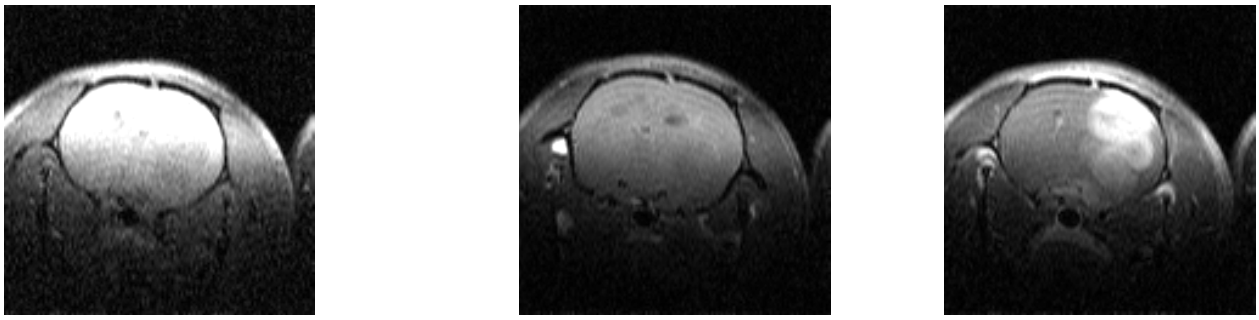


Figure 3.12 : Schéma de l'ACXH$_6$ (a) et de la BCXH$_7$ (b)

Ces molécules ont des poids moléculaires de 1212 et 1414 g.mol^{-1} respectivement. Des études ont été réalisées par Jean-Claude Debouzy (Biophysique Cellulaire et Moléculaire, CRSSA)

sur une quarantaine de souris et ont montré que leur DL_{50} est comprise entre 0,3 et 0,5 mmol.kg^{-1}. Ceci correspond à respectivement quatre et cinq fois la dose clinique injectée pour réaliser des images IRM sur petit animal. Une deuxième étude réalisée à l'échelle de 10 souris traitées par 0,4 mmol.kg^{-1} de complexe GdACX a montré que ces animaux ne présentaient pas de troubles du comportement ou de perte de poids, et qu'il n'y avait pas de mortalité au bout de sept jours. Des images IRM ont ensuite pu être enregistrées par Hanah Lahrech (Laboratoire de Neuroimagerie Fonctionnelle et Métabolique, Unité Mixte UJF/INSERM U594). Ces images ont montré les potentialités de ce type de molécule en tant qu'agent de contraste (Figure 3.13).



a. b. c.

Figure 3.13 : Images de cerveau de rat pondérées T_1 à 2,35 T (a) avant injection d'agent de contraste , (b) après injection de GdACX et (c) après injection de GdDOTA.

Le complexe GdACX reste intravasculaire même en présence d'une tumeur et avec rupture de la barrière hématoencéphalique. Ce comportement est très différent de celui du GdDOTA qui diffuse dans tout le cerveau comme le montre la Figure 3.13 c. Cette propriété classe le complexe GdACX dans la catégorie des agents intravasculaires utilisables pour l'angiographie ou l'angiogenèse. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, ce sont habituellement des complexes de grosse taille, voire greffés sur une macromolécule. Dans notre cas, l'agent est seulement de taille moyenne.

Ces résultats ont motivé une étude physicochimique fondamentale de ces nouveaux systèmes. Le but est de connaître les propriétés thermodynamiques et structurales de ces complexes et de les relier à leurs propriétés d'agents de relaxation pour l'IRM.

Les complexes formés avec l'ACX ont d'abord été étudiés de façon complète et systématique. Ces études ont ensuite été étendues aux complexes formées avec la BCX.

III. L'ACX : étude thermodynamique

Le premier problème à résoudre est d'ordre thermodynamique : quelle est la spéciation, autrement dit quelles sont les espèces en solution lorsque le ligand est mis en présence du cation, et quelle est leur stabilité ?

L'ensemble des études thermodynamiques a été réalisé à 298 K et en présence de l'électrolyte support KCl 0,1 mol.L^{-1} afin de maintenir la force ionique constante. Les conventions d'écriture utilisées pour toutes ces données thermodynamiques sont développées dans l'Annexe 1.

III.1. Etude des ligands libres

Après purification, le ligand ACX est sous forme totalement déprotonée (notée LNa_6). Les dosages sont donc réalisés par un acide fort (HCl), puis par une base forte (KOH). La superposition de ces deux courbes de dosage permet de vérifier que l'équilibre thermodynamique est atteint. Six pKa correspondant aux déprotonations successives des fonctions acides carboxyliques sont mis en évidence. Ils sont déterminés pour un pH compris entre 2 et 10 et ajustés par traitement des courbes de dosage au moyen du logiciel hyperquad 2000. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Constantes de protonation des ligands libres dans l'eau à 298 K et en milieu KCl 0,1 mol.L^{-1}.

	pKa_1	pKa_2	pKa_3	pKa_4	pKa_5	pKa_6
ACX	5,40(7)	5,02(7)	4,40(6)	4,18(8)	3,5(1)	3,1(1)

Les écarts entre deux pKa successifs sont supérieurs à l'écart statistique (écart obtenu si les protonations des groupements COOH étaient indépendantes les unes des autres : 0,38 ; 0,27 ; 0,25 ; 0,27 ; 0,38). Ceci montre l'interaction des différents groupements entre eux, malgré le grand nombre d'atomes (n=10) séparant les fonctions acides.

III.2. Etude des complexes formés

Les dosages ont été réalisés en partant de la forme totalement déprotonée du ligand, avec différentes stœchiométries en sel métallique (ρ = [métal]/[ligand] = 0,5 ; 1 ; 2 et 3) et sur une gamme de pH allant de 2 à 9. Les courbes de dosage de l'ACX par le Gd(III) en milieu acide sont présentées Figure 3.14.

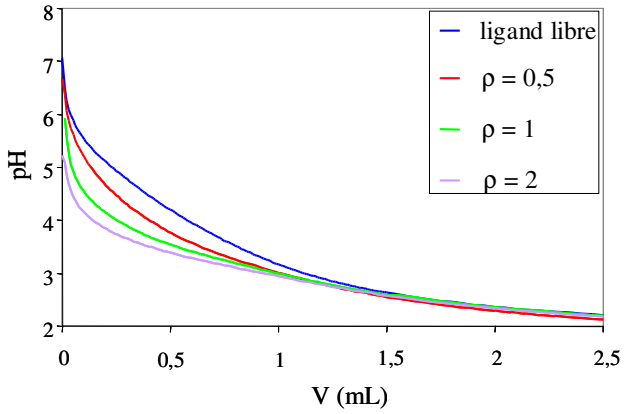


Figure 3.14 : Courbes de dosage par HCl 0,1 mol.L^{-1}à 298 K dans l'eau et à force ionique constante (KCl 0,1 mol.L^{-1}) de solutions contenant [ACX] = 10^{-3} mol.L^{-1} et [Gd] = ρ*[ACX].

Deux types de complexes sont mis en évidence par l'ajustement des courbes de dosage par hyperquad : une espèce monométallique pouvant se protonner trois fois et une espèce bimétallique. L'analyse des données expérimentales pour ρ ≤ 1 nécessite la seule introduction du complexe 1/1 Gd/L, alors que pour ρ > 1, l'ajustement ne peut se faire sans l'introduction du complexe 2/1 Gd/L.

Ces expériences ont été répétées avec les cations métalliques situés aux extrêmes de la série des lanthanides, le lanthane(III) et le lutécium(III). Les constantes de stabilité obtenues sont regroupées dans le Tableau 3.3.

Plusieurs informations peuvent être déduites de ce tableau de valeurs. Tout d'abord, quel que soit le lanthanide utilisé, les espèces formées sont les mêmes : un complexe monométallique ainsi que ses protonations, un complexe bimétallique, et des hydroxocomplexes nécessaires pour ajuster les courbes de dosages à partir d'un pH de l'ordre de 5.

La série présente très peu d'évolution au niveau des valeurs des constantes de formation des complexes. Les carboxylates étant des anions durs, dans la théorie HSAB (Hard Soft Acid Base), ils présentent une affinité maximale pour le cation le plus dur de la série, à savoir le

lutécium(III). Cet effet électrostatique jouant en faveur du lutécium(III) est probablement compensé ici par un effet de taille de cavité en faveur du lanthane(III).

Tableau 3.3 : Constantes de formation globales des complexes LnACX dans l'eau à 298 K et en milieu KCl 0,1 mol.L^{-1}. βmlh = $[Ln_m(ACX)_nH_p]/[Ln]^m[ACX]^n[H]^p$

Complexe	m	n	p	log β $_{mnp}$ (M = La)	log β $_{mnp}$ (M = Gd)	log β $_{mnp}$ (M = Lu)
M(ACX)	1	1	0	7,62(3)	7,52(5)	7,4(1)
M(ACX)H	1	1	1	11,89(8)	12,0(1)	12,0(1)
M(ACX)H_2	1	1	2	15,7(1)	15,8(1)	15,7(1)
M(ACX)H_3	1	1	3	19,3(1)	19,3(1)	19,3(2)
M(ACX)(OH)	1	1	-1	0,4(2)		1,3(1)
M_2(ACX)	2	1	0	11,7(1)	11,45(5)	10,8(3)
M_2(ACX)(OH)	2	1	-1			6,4(1)
M_2(ACX)$(OH)_2$	2	1	-2	-2,2(1)	-0,2(1)	1,5(1)

La valeur de la constante de formation du complexe monométallique est de l'ordre de 7,5 quel que soit le lanthanide envisagé. Ces complexes sont plus stables que ceux décrits avec les cyclodextrines natives (log β_{La} = 3,98 ; log β_{Gd} = 2,5 ; log β_{Lu} = 2,3).[84] Il en est de même si l'on compare à une per-3,6-anhydro-β-cyclodextrine méthylée, log β_{Pr} = 4.[92] Comme prévu, l'introduction des groupements carboxylates a permis la complexation des lanthanides avec une meilleure stabilité.

D'autre part, cette valeur est proche des descriptions de la littérature pour des ligands tripodes portant trois bras carboxylates : log $\beta_{R\text{-}TOTA\text{-}Gd}$ = 7,0(2) (voir Figure 3.15).[93]

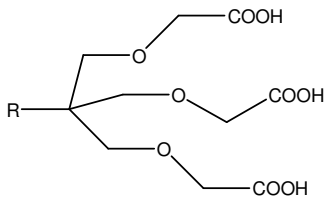


Figure 3.15 : Schéma de la molécule R-TOTA (acide trioxytriacétique) avec R = Me, Et ou Ph.

Cela suggère que trois bras carboxylates sont coordonnés dans le complexe mononucléaire et qu'ensuite, les trois protonations observées correspondent à celles des trois carboxylates non coordonnés.

Cette valeur de 7,5 est très inférieure aux constantes observées avec des aminocarboxylates classiques tels que l'EDTA ($\log \beta_{Gd} = 17,7$), le DTPA ($\log \beta_{Gd} = 22,5$) ou le DOTA ($\log \beta_{Gd} = 25,3$). Deux principales différences peuvent expliquer ce fait : la présence d'oxygène éther peu coordonants à la place d'azotes et la denticité du ligand. Très peu de ligands à sphère totalement oxygénée sont actuellement développés. Les seuls sont les ligands de type HOPO (hydroxypyridinonate) développés par Raymond. Les constantes d'affinité pour le Gd(III) se situent entre 15 et 20 (Figure 3.16).[94-96]

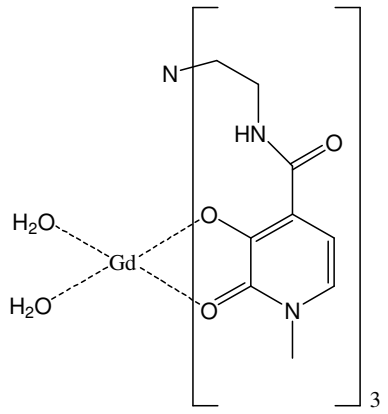


Figure 3.16 : Complexe Gd(TREN-1-Me-3,2-HOPO)(H_2O)$_2$ pour lequel $\log \beta_{Gd} = 20,3$.

Ce sont donc des complexes très stables. Ils sont hexadentates et la sphère de coordination du cation métallique est complétée par deux molécules d'eau. Il y a alors un fort effet chélate. Le DTPA ou le DOTA ont une denticité de 8. Dans notre cas, la cavité étant trop grande, seuls trois bras carboxylates semblent pouvoir se coordonner. Les oxygènes de type éther restant vont être beaucoup moins coordonnants que les carboxylates. La denticité va donc être beaucoup plus faible que dans les systèmes précédents et ce facteur est pénalisant pour la stabilité thermodynamique du système.

La taille de la cavité de l'ACX permet la complexation d'un deuxième cation métallique avec une constante globale de complexation de 11. L'introduction du deuxième cation est plus difficile que celle du premier à cause de la répulsion électrostatique entre les deux cations métalliques. $\text{Log } K_2 = \log \beta_{110} - \log \beta_{210} = 4,08$ dans le cas du Lu(III) par exemple (voir annexe 1).

Enfin, le dernier point important est la formation d'hydroxocomplexes solubles à partir d'un pH de 5, 6 et 7 respectivement pour le Lu(III), Gd(III) et La(III). L'acidité des complexes

formés (reflétée par la constante de formation des hydroxocomplexes) respecte donc l'acidité des cations Ln(III) seuls. La molécule d'eau présente sur le cation métallique est toujours plus acide dans le complexe que dans l'ion libre. En effet, la constante d'hydrolyse du complexe monométallique est de -6,1 à comparer à -7,94 pour l'ion libre lutécium $[Lu(H_2O)_8]^{3+}$ et elle est de -7,22 comparé à -9,1 dans le cas du lanthane $[La(H_2O)_9]^{3+}$. Peu d'exemples de constantes de formation d'hydroxyde sont rapportés dans la littérature car ces espèces précipitent souvent. Les quelques exemples montrent toujours une formation à des pH plus élevés : l'acide malique complexé avec le Sm(III) dans des proportions Sm/L 1/2 ne fait apparaître des hydroxocomplexes qu'à partir d'un pH de 8,5.[97]

L'ensemble de ces données thermodynamiques (espèces formées et constantes de stabilité) permet de tracer des diagrammes de spéciation. Il s'agit de la répartition des espèces en fonction du pH. La spéciation des complexes de GdACX est donnée Figure 3.17.

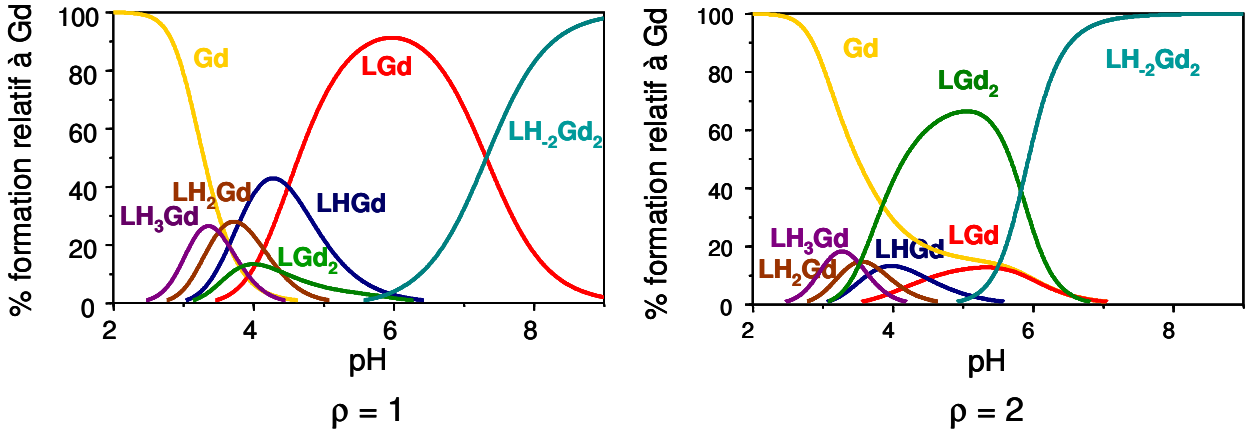


Figure 3.17 : Diagramme de spéciation dans l'eau en présence de [KCl] = 0,1 mol.L^{-1} à 298 K avec $[Gd]_0 = [ACX]_0 = \rho * 0.001$ mol.L^{-1}.

L'acidité des hydroxocomplexes formés est illustrée Figure 3.18. Bien qu'il n'y ait pas d'évidence de la formation des complexes $[La_2ACX(OH)]$ ou $[Gd_2ACX(OH)]$ par potentiométrie, la formation des bishydroxocomplexes plaide en faveur de leur présence. Ces complexes sont sans doute peu stables par rapport aux bishydroxocomplexes, comme c'est le cas pour le Lu(III). Leur introduction n'est donc pas cruciale pour un bon ajustement des données.

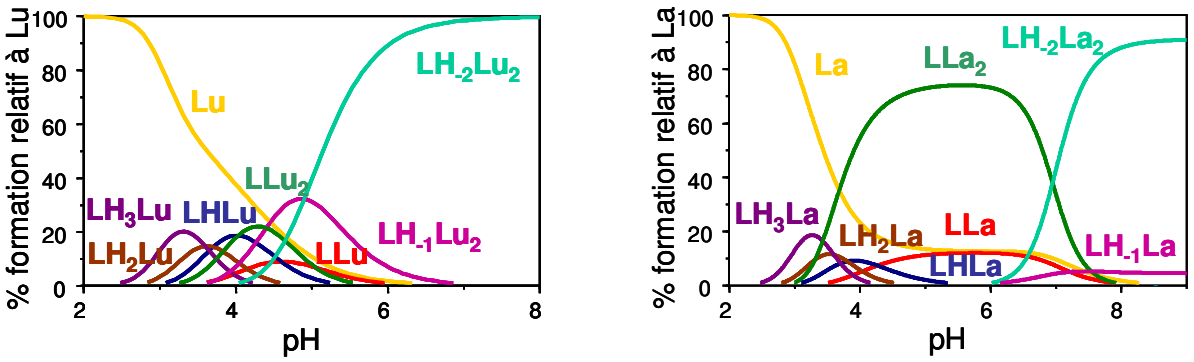


Figure 3.18 : Diagramme de spéciation dans l'eau en présence de [KCl] = 0,1 mol.L^{-1} à 298 K avec $[Ln]_0 = [ACX]_0 = \rho * 0.001$ mol.L^{-1}.

Il est remarquable de constater que le bishydroxocomplexe se forme même lorsque le rapport métal/ligand est de 1.

III.3. Confirmation de la spéciation par spectrométrie de masse

Pour confirmer la spéciation obtenue par les mesures potentiométriques, les complexes ont été caractérisés par spectrométrie de masse en mode électrospray (ES-MS). Cette technique permet de détecter les espèces en fonction du quotient de leur masse par leur charge (m/z) et utilise un mode d'ionisation très doux par désolvatation de gouttelettes chargées et application d'un champ électrique au niveau d'un capillaire chauffé. Comparée aux autres techniques d'ionisation, l'électrospray induit beaucoup moins de fragmentation, de réduction ou de démétallation car l'ionisation est réalisée à pression atmosphérique. Elle devient par conséquent une méthode adaptée à l'étude des complexes de coordination.[98]

Les ions utilisés pour la réalisation des spectres sont l'europium(III) et le terbium(III). Ce choix est motivé par la signature isotopique des éléments. L'europium présente deux isotopes dans des proportions quasi égales. Le terbium quant à lui n'a qu'un seul isotope d'abondance naturelle 100%, donc il permet l'obtention de spectres très simplifiés.

Les résultats obtenus sont similaires pour les deux cations métalliques quelle que soit la stœchiométrie. Deux modes de détection sont utilisés en parallèle : le mode positif et le mode négatif, qui permettent de détecter respectivement les espèces chargées positivement et négativement. Les résultats obtenus en mode négatif sont regroupés en fonction de la stœchiométrie métal/ligand et les spectres sont représentés Figure 3.19.

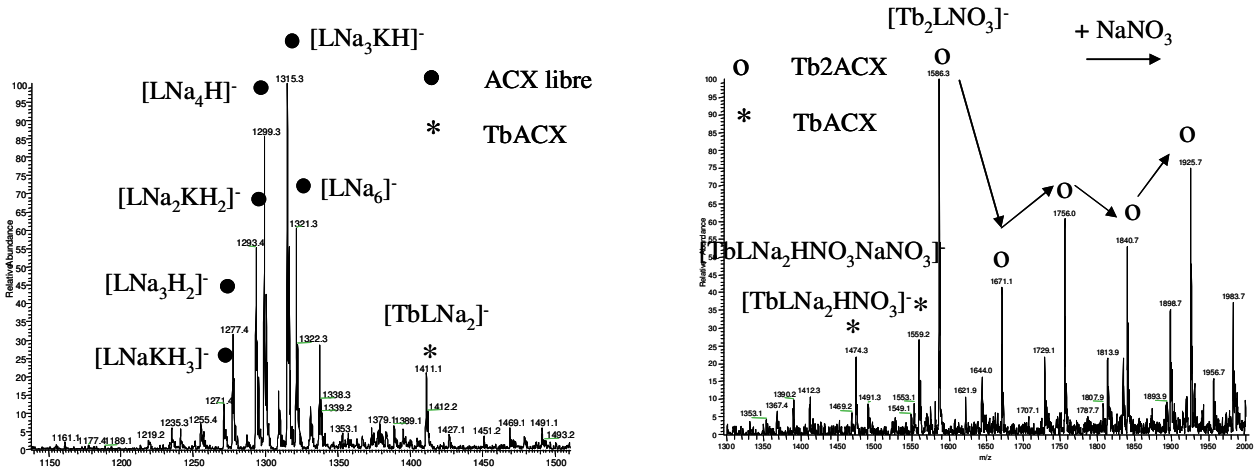


Figure 3.19 : Spectres ES-MS enregistrés en mode négatif dans l'eau d'un mélange Tb/ACX 0.5/1 (à gauche) ; 2/1 (à droite) à pH 6.

- 0,5/1 : beaucoup de ligand libre est encore détecté, et quelques signaux correspondent au complexe Ln(ACX).
- 1/1 : les pics correspondent essentiellement au complexe Ln(ACX). Une autre espèce correspondant à Ln_2ACX_2 semble apparaître, mais cette espèce n'est détectée qu'en mode positif et est probablement formée par association de deux espèces Ln(ACX).
- 2/1 : une nouvelle espèce apparaît, en plus des espèces précédentes : $Ln_2(ACX)$.

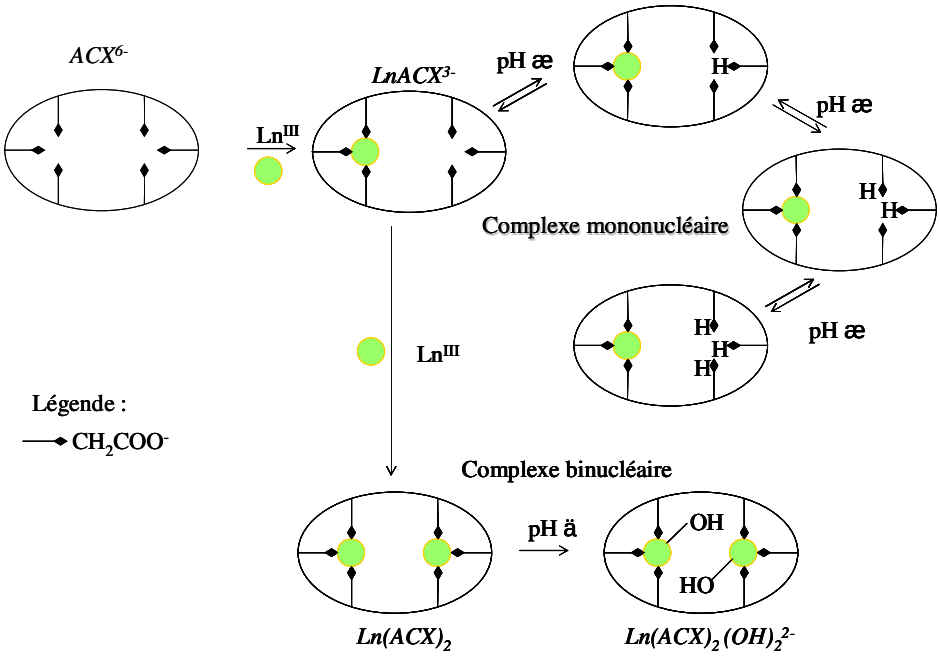


Figure 3.20 : Représentation schématique des complexes en solution en fonction des conditions expérimentales.

Ainsi la répartition des espèces formées en fonction du pH est parfaitement connue. Il est possible de contrôler la formation des espèces désirées en jouant sur la stœchiométrie et sur le pH. Un récapitulatif des espèces formées suivant les conditions est donné Figure 3.20.

Dans le cadre de l'IRM, seule l'espèce monométallique est intéressante (l'espèce bimétallique présente un risque de toxicité beaucoup plus élevé). La constante de stabilité de ce complexe est beaucoup plus faible que celle des agents de contraste utilisés usuellement dans le domaine de l'IRM, mais ce n'est pas le seul facteur entrant en jeu.

III.4. Sélectivité vis-à-vis des cations biologiques

Il a déja été démontré que l'affinité seule n'était pas un critère suffisant pour expliquer la toxicité du complexe métallique. Ainsi, le DTPA-BMA qui a une constante de stabilité plus faible que le DTPA (log β_{GdDTPA} = 22,46 et log $\beta_{GdDTPA\text{-}BMA}$ = 16,85) a pourtant une dose létale 50 plus importante (5,6 contre 14,8 mmol.kg^{-1}).[1]

Tableau 3.4 : Constantes de formation globales des complexes M-ACX dans l'eau à 298 K et en milieu KCl 0,1 mol.L^{-1}. $\beta_{110} = [M_m(ACX)_nH_p]/[M]^m[ACX]^n[H]^p$

complexe	m	n	p	log β_{mnp} (M = Ca)	log β_{mnp} (M = Cu)	log β_{mnp} (M = Zn)
M(ACX)	1	1	0	3,7(1)	6,35 (5)	5,0(1)
M(ACX)H	1	1	1	9,3(1)	11,08(6)	10,0(1)
M(ACX)H_2	1	1	2	13,7(1)	15,25(7)	14,5(0)
M(ACX)H_3	1	1	3	17,5(2)	18,8(1)	18,5(0)
M(ACX)H_4	1	1	4	21,1(1)	22,2(1)	21,8(2)
M(ACX)(OH)	1	1	-1	-5,4(1)	-0,6(1)	
M_2(ACX)	2	1	0	6,1(3)	10,04 (3)	8,8(1)
M_2(ACX)(OH)	2	1	-1	-2,2(1)	4,6(1)	1,8(1)
M_2(ACX)$(OH)_2$	2	1	-2		-1,7(1)	

Rq : dans le cas du Ca(II), deux modèles permettent d'ajuster les données : soit en prenant en compte le complexe [Ca(ACX)(OH)], soit le complexe [Ca_2(ACX)(OH)]. Ces deux complexes ne sont pas présents simultanément.

De nombreux autres ions sont présents dans le milieu biologique, et il est donc nécessaire de considérer la sélectivité du ligand pour le gadolinium en présence de ces autres ions. Les principaux cations du milieu biologique pouvant entrer en compétition avec les lanthanides sont le calcium(II), le cuivre(II) et le zinc(II). Des mesures potentiométriques similaires à celles réalisées sur les lanthanides(III) ont été effectuées avec ces métaux de transition. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.4.

Quelques valeurs de constante de stabilité avec les ligands EDTA, DTPA, DTPA-BMA sont données dans le Tableau 3.5 pour comparaison.

Tableau 3.5 : Constantes de stabilité log β_{110} de différents ligands aminocarboxylates avec les cations biologiques Cu^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} en comparaison avec Gd^{3+}.

Complexe	EDTA	DTPA	DTPA-BMA
GdL	17,35	22,4	16,86
CuL	18,78	21,1	13,05
ZnL	16,5	18,2	12,04
CaL	10,65	10,75	7,17

Dans tous les cas, les complexes de Gd(III) sont plus stables que ceux de Cu(II), qui sont eux-même plus stables que ceux Zn(II). Les complexes les moins stables sont ceux de Ca(II).

La constante de sélectivité, définie selon l'équation 1.25 peut être calculée à pH 7,4 et en considérant les concentrations physiologiques ($[Ca^{2+}]$ = 2,5 mmol.L^{-1}, $[Cu^{2+}]$ = 1 µmol.L^{-1}, $[Zn^{2+}]$ = 50 µmol.L^{-1}). Cette constante de sélectivité a été calculée dans le cas de l'ACX, et est reportée dans le Tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Stabilité, sélectivité et DL_{50} de quelques complexes

Ligand	log β_{110}	log K_{sel}	DL_{50} (mmol.kg^{-1})
DTPA	22,45	7,04	5,6
DTPA-BMA	16,85	9,04	14,8
ACX	7,52	6,20	0,4[a]
EDTA	17,27	4,23	0,3

a) ref [99]

Cette valeur de K_{sel} est intéressante puisqu'elle surpasse de loin celle de l'EDTA. Cela vient principalement de la constante de stabilité avec le Zn(II) qui est très faible en comparaison de celle du Gd(III) dans le cas de l'ACX. En effet, dans tous les cas les constantes d'affinité avec le Ca(II) sont très faibles et les constantes d'affinité avec le Cu(II) n'ont que peu d'importance étant donné la faible concentration du cation Cu^{2+} en milieu physiologique. C'est donc la constante d'affinité pour le Zn(II) qui est déterminante. Or, dans le cas de l'EDTA, il n'y a qu'une différence inférieure à un ordre de grandeur entre les constantes d'affinité des complexes GdEDTA et ZnEDTA. Dans le cas de l'ACX, la différence est de 2,5 ordres de grandeur. Cela permet donc d'obtenir une constante de sélectivité telle que la DL_{50} soit du même ordre de grandeur que celle de l'EDTA, alors que la constante de stabilité est inférieure de dix ordres de grandeur. Il est important de noter que cela a permis de réaliser les images sur petit animal comme nous l'avons vu en introduction, puisque cette DL_{50} correspond environ à quatre fois la dose injectée.

Pour aller plus loin dans la compréhension des propriétés du système, il est nécessaire de s'intéresser à la structure des espèces formées.

IV. Etude structurale

IV.1. Etude en solution par RMN du proton en fonction du rapport métal/ligand

Le ligand libre a été parfaitement caractérisé par RMN du proton et du carbone 13. Toutes les unités sont équivalentes, et le ligand présente une symétrie C_6. Son attribution complète est donnée en partie expérimentale.

Les spectres RMN du proton enregistrés pour plusieurs rapports $\rho = \frac{[métal]}{[ligand]}$, présentent, quel que soit le cation métallique (La^{3+}, Sm^{3+}, Eu^{3+}, Yb^{3+}, Lu^{3+}), une différence de comportement pour $\rho < 1$ et $\rho > 1$ qui corrobore les données obtenues par potentiométrie, à savoir la formation d'un complexe monométallique, puis celle d'un complexe bimétallique (Figure 3.21).

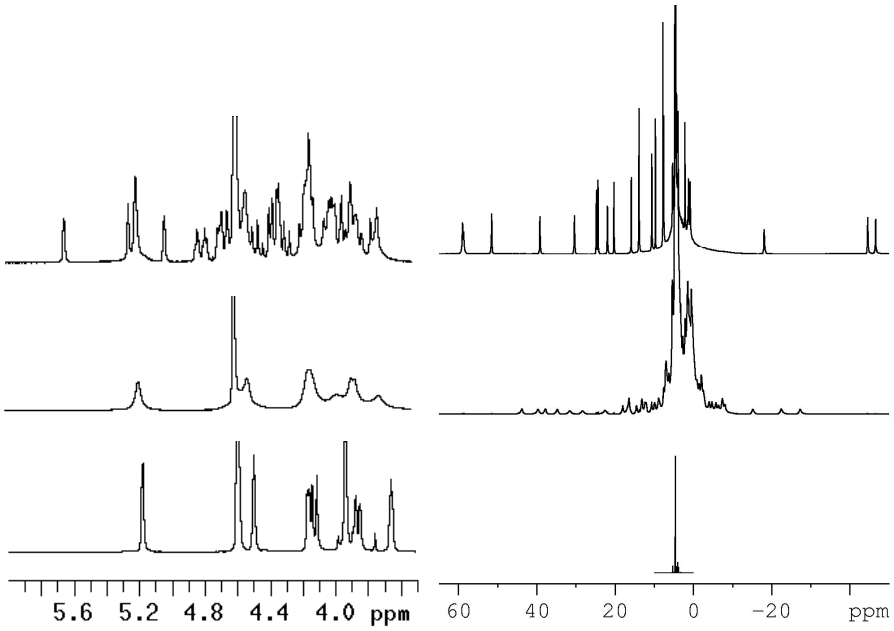


Figure 3.21 : Dosage RMN à 400 MHz de l'ACX par le lutécium (à gauche) et l'ytterbium (à droite) dans D_2O à 25 °C. De bas en haut ρ = [métal]/[ligand] = 0 ; 1 ; 2 et [ACX] = 5 mmol.L^{-1}.

♦ ρ < 1 : M + L = ML où ML représente l'ensemble des espèces monométalliques.

Pour les complexes du lanthane et du lutécium, le spectre observé est similaire à celui du ligand libre, mais tous les signaux sont considérablement élargis. Cet élargissement peut être attribué à la présence d'un équilibre rapide en solution correspondant à :

- un échange entre le ligand libre et le complexe mononucléaire,
- un échange entre les différents états de protonation du complexe,
- un mouvement du cation dans la cavité qui est symbolisé Figure 3. 22.

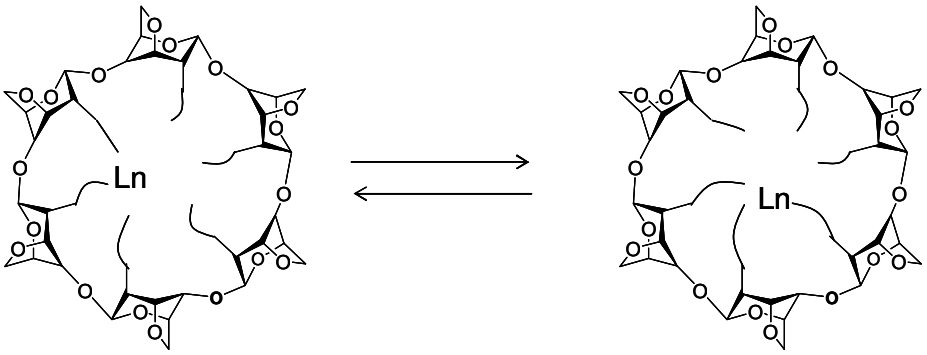


Figure 3. 22 : Mouvement du cation dans la cavité du complexe LnACX (les bras sont modélisés).

Les protons des complexes de l'ytterbium(III) sont répartis sur une grande fenêtre spectrale (90 ppm) ce qui permet le décompte des signaux car il n'y a pas de recouvrements. Dans ce cas le décompte donne 54 pics pour 54 protons, ce qui indique une absence totale de symétrie.

- $\rho > 1$: ML + M = M_2L

Une autre espèce apparaît et devient très vite majoritaire. Les pics sont beaucoup plus fins que précédemment, ce qui suggère que l'espèce obtenue est plus figée que le complexe 1/1. En effet, cette fois tous les carboxylates semblent impliqués dans la complexation, il n'y a donc plus de protonation possible, ni de mouvement du cation dans la cavité.
Le décompte des pics du spectre de l'Yb(III) donne 27 pics pour 54 protons. Ceci montre que le complexe Yb_2L possède une symétrie C_2 (voir Figure 3.23).

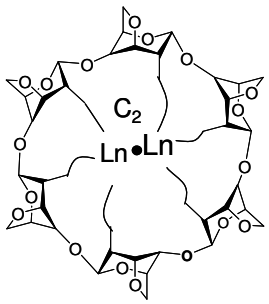


Figure 3.23 : Schéma géométrique du complexe Ln_2ACX (les bras sont modélisés).

Les structures des différents complexes vont être développées plus précisément dans les paragraphes suivants, en commençant par les espèces bimétalliques, M_2L et $M_2L(OH)_2$ et en terminant par les espèces monométalliques MLH_n (n = 0, 1, 2, 3).

IV.2. Le complexe bimétallique M_2L

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'espèce bimétallique, le spectre RMN du complexe de lutécium est étudié. Ce cation métallique est en effet diamagnétique et permet la réalisation d'expériences bidimensionnelles. L'expérience TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) met en évidence les couplages *J* et permet d'identifier tous les protons d'une unité de la cyclodextrine. Le transfert de cohérence de l'aimantation est effectué par l'application d'un temps de mélange suffisamment long (200 ms) pour que tous les protons

d'une même unité soient corrélés. Trois systèmes de spins différents sont bien mis en évidence, mais du fait des nombreux recouvrements de pics, l'attribution du spectre sur cette seule expérience est impossible.

Ensuite, des expériences mettant en évidence le couplage dipolaire ont été réalisées. Le spectre NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY), permettant de corréler les spins proches spatialement (pour $d_{HH} < 5$ Å) par transfert d'aimantation *via* le couplage dipolaire, n'apporte que peu d'informations dans ce cas. En effet, les taches de corrélation sont très peu intenses, car $\omega\tau_c$ est de l'ordre de 1 (avec τ_c, le temps de corrélation du mouvement moléculaire et ω, la fréquence du noyau observé) et l'effet NOE est quasiment nul. L'expérience ROESY (qui est en fait une NOESY dans le repère tournant) constitue une bonne alternative car elle a l'avantage de donner un effet de couplage dipolaire toujours positif quel que soit le produit $\omega\tau_c$ et des corrélations beaucoup plus intenses. Lors de cette expérience, le décalage du champ radiofréquence sur un bord du spectre permet de supprimer les transferts d'aimantation de type TOCSY qui viennent se superposer aux taches ROE.[100,101]

Enfin, les spectres ^{13}C découplés du proton (DEPT, édition spectrale sur les carbones, et gHMQC, corrélation proton-carbone) confirment la symétrie C_2 : par exemple seuls 3 signaux sont détectés pour les carbones quaternaires (C=O). L'attribution du spectre RMN du proton est proposée Figure 3.24.

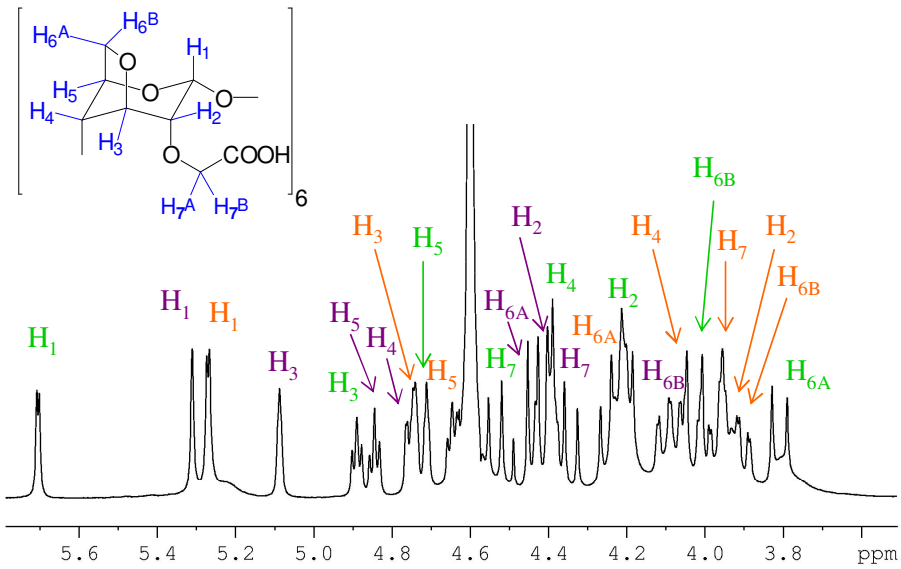


Figure 3.24 : Spectre proton à 400 MHz du complexe Lu_2ACX (les différents systèmes de spins sont représentés avec des couleurs différentes) dans D_20 et à 25 °C.

Au niveau de la géométrie, trois systèmes de spins différents, d'intensités équivalentes, sont mis en évidence. En y ajoutant les observations de la potentiométrie et le fait que le complexe n'est pas dynamique (signaux fins et bien résolus), cela revient à dire que chaque cation métallique est coordonné à 3 unités « glucose ».

Une structure par diffraction aux rayons X du complexe Lu_2(ACX) a pu être réalisée et a permis de confirmer ce qui avait été trouvé en solution, à savoir la présence d'un axe C_2 et la coordination de chaque cation métallique à 3 unités de la cyclodextrine. La Figure 3.25 représente la structure de ce complexe neutre bimétallique.

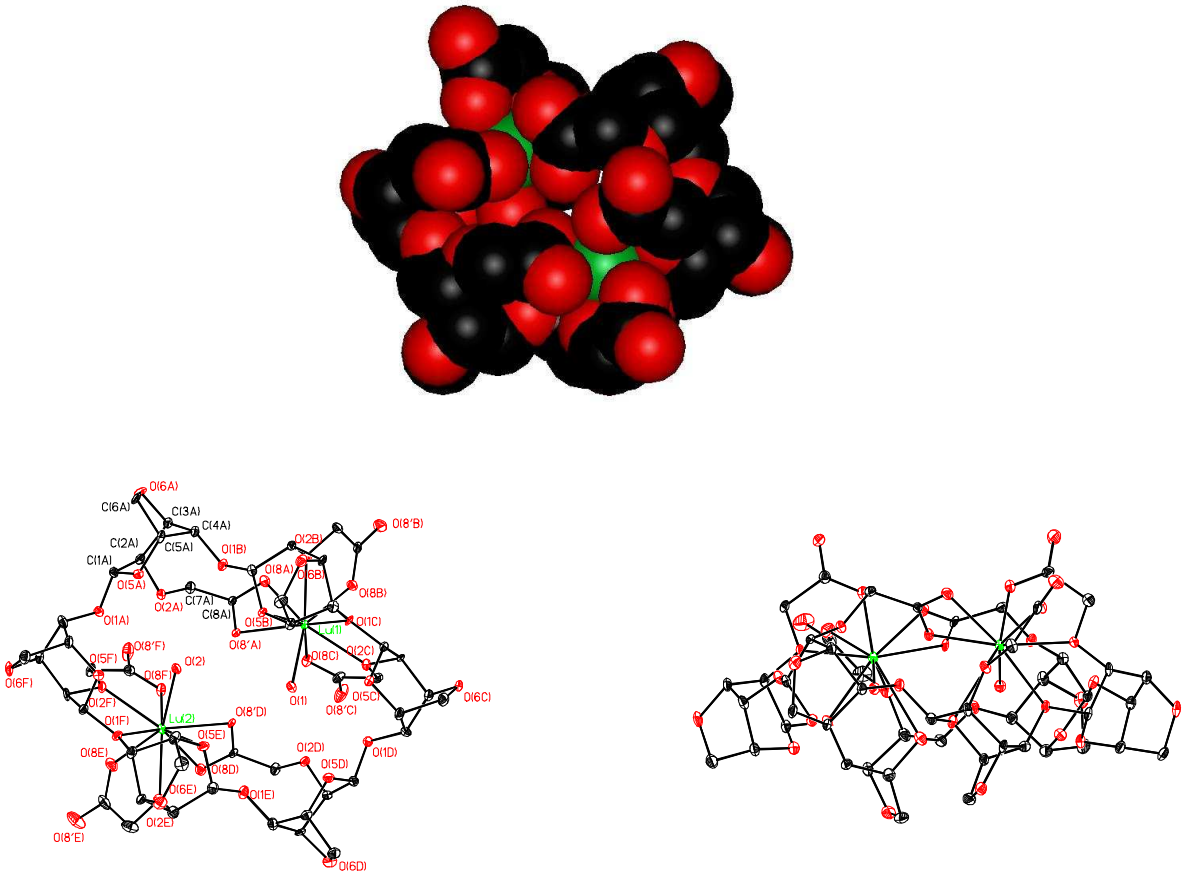


Figure 3.25 : Structure cristallographique du complexe [Lu_2(ACX)(H_2O)$_2$]. Les hydrogènes, ainsi que les molécules d'eau ont été omis pour faciliter la lecture.

Le complexe n'est pas sphérique, mais allongé selon un axe perpendiculaire à la distance entre les deux cations Lu(III). La structure montre également que les deux cations lutécium sont enfouis à l'intérieur de la cavité. Chaque Lu(III) présente un nombre de coordination de

9. Chaque cation est coordonné par 3 fonctions carboxylates (une bidente et deux monodentes) et 4 oxygènes neutres (liaison glycosidique, cycle glucose et deux groupements OCH_2) qui se répartissent sur 3 unités de la cyclodextrine. La sphère de coordination est complétée par une molécule d'eau. Le polyhèdre de coordination est un antiprisme à base carrée chapeautée.[102]

La distance entre les 2 Lu(III) est 5,74 Å, ce qui est plus long que dans les autres composés binucléaires de lutécium décrits dans la littérature.[103] Ainsi le complexe peut être vu comme deux sous-unités indépendantes.

Les principales distances entre le cation métallique et la sphère de coordination sont reportées dans le Tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Distances du centre métallique aux oxygènes coordonnés en Å dans le complexe $[Lu_2ACX(H_2O)_2]$.

Lu(1)-O(8C)	2,245(5)	Lu(1)-O(2C)	2,394(5)
Lu(1)-O(8B)	2,245(4)	Lu(1)-O(8A)	2,403(5)
Lu(1)-O(8'A)	2,272(4)	Lu(1)-O(2B)	2,420(4)
Lu(1)-O(1)	2,318(4)	Lu(1)-O(5B)	2,728(4)
Lu(1)-O(1C)	2,392(4)		

La distance entre le Lu(III) et l'oxygène de la molécule d'eau est 2,32 Å, ce qui correspond à la distance moyenne relevée dans la littérature pour les complexes de nombre de coordination de 9 possédant une molécule d'eau.[104] La distance moyenne Lu-O(carboxylate monodente) est 2,24 Å, ce qui est légèrement plus court que les distances relevées dans la littérature pour des ligands aminocarboxylates.[105,106] Les distances avec les oxygènes éther de la liaison glycosidique et du groupement OCH_2 sont de l'ordre de 2,38-2,43 Å, ce qui est plus court que les distances Ln-O pour des éther-couronnes ou des polyéthers linéaires rapportées dans la littérature.[107] La distance la plus longue est celle avec l'oxygène de l'hétérocycle D-glucopyranoside, sans doute à cause des contraintes stériques imposées par la position intracyclique de cet atome. Ces données montrent que les cations lutécium sont vraiment enfouis dans la cavité et sont en interactions fortes non seulement avec les oxygènes des fonctions carboxylates mais également avec les oxygènes éther de la plate-forme cyclodextrine.

IV.3. Structure de l'hydroxocomplexe [$Ln_2ACX(OH)_2$]

A des pH de l'ordre de 5 ou 7 suivant les cations métalliques, un bishydroxocomplexe se forme. Sa stabilité est telle que ce composé se forme même sans que le cation métallique soit en excès par rapport au ligand (voir Figure 3.18). Devant une telle stabilité, la question qui se pose est de savoir si les hydroxydes sont pontants ou non. La structure à l'état solide montre une distance entre les deux cations métalliques de 5,76 Å, qui est incompatible avec la formation de ponts μ-hydroxos. Les structures cristallographiques trouvées dans la littérature donnent 3,6 Å pour une distance Yb-Yb dans un complexe avec pont μ-hydroxo.[108] La formation de ce type de complexe impliquerait donc un changement important de géométrie de la molécule (voir Figure 3.26). L'idée est d'arriver à observer un rapprochement des deux cations pour montrer la formation de ce pont μ-hydroxo. Seulement, il n'est pas aisé d'arriver à déterminer des distances en solution. Les cations métalliques étudiés étant paramagnétiques, des interactions entre Gd(III) ont déjà été mises en évidence dans la littérature par RPE.[109]

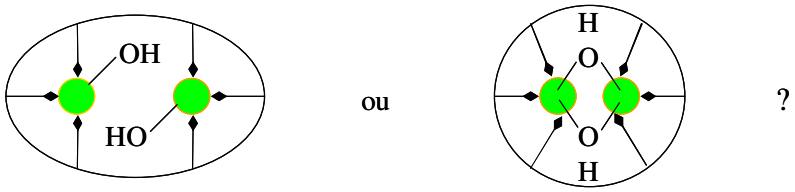


Figure 3.26 : Structures proposées pour les bishydroxocomplexes avec des hydroxydes pontants ou non.

L'interaction entre deux centres métalliques paramagnétiques peut être mise en évidence par la variation des temps de relaxation électronique, en particulier la largeur de raie du spectre RPE en solution. Il existe diverses contributions à cette largeur de raie : l'éclatement du champ cristallin en champ nul (zero-field splitting ou ZFS) imposé par la structure, les fluctuations temporelles de ce ZFS induites par les rotations et les vibrations du complexe, et l'interaction dipolaire Gd-Gd modulée par la rotation du complexe. C'est cette dernière interaction qui nous intéresse puisqu'elle varie en $(1/r_{GdGd})^6$. Il a été montré que l'interaction Gd(III)-Gd(III) peut être séparée des autres facteurs de relaxation en remplaçant un Gd(III) par un Y(III) similaire dans les composés bimétalliques.[110,111] En effet, les rayons ioniques de ces deux cations étant très proches (1,053 Å pour Gd(III) et 1,019 Å pour Y(III)[5]), la structure moléculaire et la dynamique de ces complexes doivent également être similaires.

Dans notre cas, au vu des faibles variations de spéciation au sein de la série des lanthanides, il est légitime de considérer que les mêmes espèces vont être formées avec des affinités comparables dans le cas de l'Y(III). Ainsi le dopage d'un complexe bimétallique d'Y(III) avec 10% d'ions Gd(III) permettra à 95% des ions Gd(III) de se trouver dans le complexe hétéronucléaire GdY et la contribution du complexe homonucléaire Gd_2 pourra être négligée. Quatre types d'échantillons ont été préparés :

- un échantillon homobimétallique acide Gd_2ACX à pH 4,5 dans lequel le complexe bimétallique est présent à 90%, et l'hydroxyde à moins de 1%,
- un échantillon homobimétallique basique $Gd_2ACX(OH)_2$ à pH 8. D'après le diagramme de spéciation, seul l'hydroxocomplexe est présent,
- un échantillon hétérobimétallique acide GdYACX à pH 4,5,
- un échantillon hétérobimétallique basique $GdYACX(OH)_2$ à pH 8.

Soit ΔH_{pp} la largeur des pics des spectres RPE. Appelons $\Delta(H_{struct})_A$ et $\Delta(H_{struct})_B$ la largeur due à tous les effets structuraux (autres que les effets dipolaires) respectivement en milieu acide et basique, $\Delta(H_{dip})_A$ et $\Delta(H_{dip})_B$ la largeur de raie due aux interactions dipolaires donc à la distance entre les deux Gd(III) en milieu acide et basique respectivement.

Les largeurs de raie dans les différents échantillons sont donc les suivantes :

- Gd_2ACX : $\Delta H_{pp} = \Delta(H_{struct})_A + \Delta(H_{dip})_A$
- $Gd_2ACX(OH)_2$: $\Delta H_{pp} = \Delta(H_{struct})_B + \Delta(H_{dip})_B$
- GdYACX : $\Delta H_{pp} = \Delta(H_{struct})_A$
- $GdYACX(OH)_2$: $\Delta H_{pp} = \Delta(H_{struct})_B$

Les échantillons préparés ainsi que les relations entre eux sont récapitulés Figure 3.27.

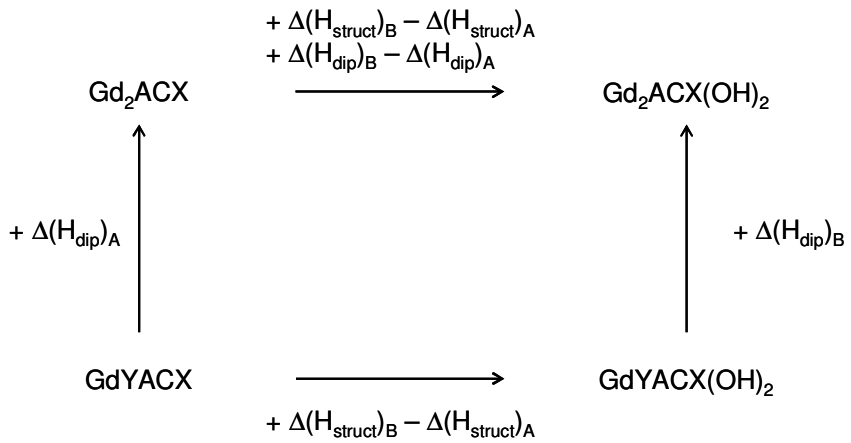


Figure 3.27 : Schéma des 4 complexes étudiés et contributions à la largeur de raie.

Ainsi la comparaison des largeurs de raie Gd_2ACX – GdYACX en milieu acide et Gd_2ACX – GdYACX en milieu basique ($\Delta(\Delta H_{pp}) = \Delta(H_{dip})_A - \Delta(H_{dip})_B$) rendra compte d'une différence de distance Gd-Gd entre les deux milieux.

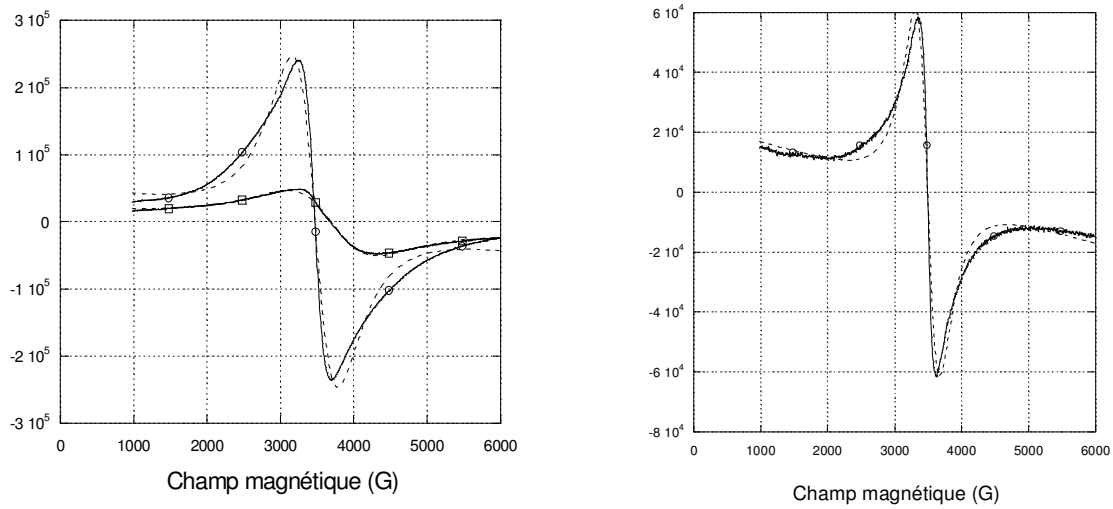


Figure 3.28 : Spectres RPE en bande X et à 25 °C des complexes Gd_2ACX (ronds) et $Gd_2ACX(OH)_2$ (carrés) à gauche et du complexe GdYACX à droite (P = 20 mW, modulation d'amplitude 10 G, fréquence de modulation 100 kHz). Les ajustements sont représentés en pointillés.

Les spectres RPE des complexes de Gd_2ACX et $Gd_2ACX(OH)_2$ sont totalement différents (voir Figure 3.28). Il y a une augmentation très nette de la largeur de raie. Dans une première approximation, les largeurs de raies sont calculées par l'ajustement d'une dérivée de Lorentzienne. Dans le complexe Gd_2ACX, ΔH_{pp} = 520 G, alors que dans le complexe GdYACX, ΔH_{pp} = 310 G. Cela signifie que malgré la distance de 5,7 Å entre les deux centres métalliques, il y a tout de même une légère interaction Gd-Gd responsable de l'élargissement de 210 G. Le spectre de $Gd_2ACX(OH)_2$ présente une largeur de raie de 1000 G. Malheureusement le spectre de $GdYACX(OH)_2$ n'a pas pu être détecté pour des raisons de sensibilité. En effet, le spectre est également élargi par rapport à celui de GdYACX, et comme un élargissement d'un facteur 2 diminue l'intensité d'un facteur 4, nous sommes en limite de détection. Des expériences en solution plus concentrée ont été faites sans plus de résultats.

Il n'en reste pas moins que la largeur de raie observée dans le complexe $Gd_2ACX(OH)_2$ est remarquable par rapport aux largeurs classiques de l'ordre de 500 ou 600 G observées pour des distances Gd-Gd de 6,6-6,7 Å.[111] En l'absence de ce quatrième spectre, il est cependant très difficile de conclure sur cette expérience, l'élargissement observé peut être dû à la

présence d'un OH^- coordonnant, comme il peut être lié au rapprochement des deux centres métalliques pour former un pont.

Des expériences complémentaires de type EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) pourront être envisagées pour prouver ce rapprochement entre Gd(III) de façon moins équivoque.

IV.4. Le complexe monométallique ML

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe IV.1. , le complexe monométallique présente une symétrie C_1 et le cation ne se situe pas au centre de la cyclodextrine. Dans ce cas, la RMN du complexe de lutécium n'apporte pas d'informations structurales car une seule unité « moyenne » est détectée en solution. Des expériences complémentaires ont donc été réalisées dans le but d'obtenir la structure de ce complexe.

Tout d'abord, une expérience EXSY (EXchange SpectroscopY), avec des temps de mélange courts (5 ms) permet d'observer l'échange rapide de protons entre sites chimiquement équivalents avec des cations métalliques paramagnétiques (Eu^{3+} et Yb^{3+}). De nombreuses taches de corrélation sont visibles, confirmant donc l'existence de multiples échanges dans ces complexes.

D'autres expériences, à l'aide d'impulsions sélectives, ont également été réalisées sur les complexes de l'Eu(III). Sachant que le complexe est en échange avec le ligand libre selon Eu + ACX = EuACX, il serait judicieux d'exciter un signal du ligand libre. Le nombre de pics présents dans la zone diamagnétique rend impossible l'excitation sélective d'un seul signal. C'est donc le pic à – 1,1 ppm qui a été excité sélectivement. Cette excitation conduit à une perte d'intensité de 12 autres signaux. Le déplacement chimique du pic touché dans la zone diamagnétique montre que le proton excité correspond au groupe H_{7A}-H_{7B} (Figure 3.24). Les 12 autres signaux touchés résonnent entre -1 et 11,8 ppm (voir Figure 3.29) et correspondent au complexe.

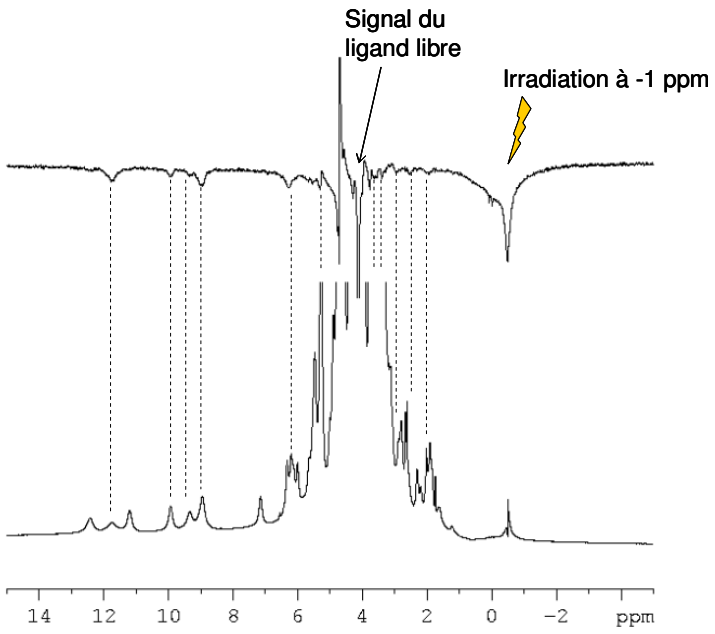


Figure 3.29 : Spectre à 400 MHz et 25 °C du complexe EuACX dans D_20 (en bas). Expérience NOE avec irradiation sélective du signal à -1 ppm à 34 dB (en haut); temps de mélange NOE de 20 ms.

Cette expérience prouve donc encore une fois que le ligand libre est en échange avec le complexe mais ne permet pas une attribution complète du spectre. Il serait nécessaire d'obtenir les corrélations *J* pour avoir la structure du complexe, mais devant la labilité de ce système (les expériences NOESY et EXSY ont été faites avec des temps très courts), il n'a pas été possible d'aller plus loin au niveau des expériences RMN.

Les résultats de RMN et de potentiométrie permettent de considérer raisonnablement la structure du complexe monométallique en solution équivalente à celle obtenue à l'état solide pour le complexe bimétallique, mais avec un seul des deux « compartiments » occupés par le cation métallique, et donc une possibilité de mouvement dans la cavité. Cependant, rien n'indique que tous les oxygènes éther coordonnants dans la structure à l'état solide le soient également en solution pour le complexe monométallique, comme pour le complexe bimétallique.

V. Détermination du nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination dans le complexe monométallique

Pour mieux caractériser la sphère de coordination de ce complexe en solution, il est intéressant de connaître le nombre de molécules d'eau (q) directement liées au cation métallique. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, il existe deux méthodes pour le déterminer, la RMN de l'oxygène ^{17}O et la luminescence. Nous avons utilisé les deux méthodes en parallèle et comparé leurs avantages et leurs inconvénients.

V.1. Mesures par RMN de l'oxygène 17

Il a déjà été montré que pour les ions lanthanides paramagnétiques, la contribution de contact au déplacement chimique paramagnétique d'un noyau d'oxygène ^{17}O (δ_{OLn}^{para}) peut être considérée comme indépendante de la nature du ligand en question et de celle des autres ligands coordonnés au Ln(III).[112,113] Ainsi ce déplacement chimique paramagnétique de l'oxygène ^{17}O peut être utilisé pour déterminer la stœchiométrie du complexe. Des complexes de Dy(III) sont habituellement utilisés car le Dy(III) présente l'avantage d'avoir une contribution de contact largement dominante dans le déplacement chimique paramagnétique total. Cela évite tout un travail laborieux de séparation de la contribution de contact de celle de pseudo contact. Lorsque les complexes formés ont des constantes de stabilité suffisamment élevées, il est possible de déterminer le nombre de molécules d'eau coordonnées au Dy(III) en suivant δ_{OLn}^{para} de l'eau en fonction de la concentration en complexe.

L'addition de complexes de Dy(III) à l'eau résulte en un déplacement du signal RMN de l'oxygène ^{17}O vers les basses fréquences. L'échange des molécules d'eau est rapide à l'échelle de temps de la RMN. Ainsi δ_{OLn}^{para} d'un complexe $Dy(ligand)_n(H_2O)_q$ est donné par l'équation 3.1 :

$$\delta_{OLn}^{para} = q\Delta \frac{[Dy(ligand)_n(H_2O)_q]}{[H_2O]} \qquad \textbf{équation 3.1}$$

Δ est le déplacement chimique paramagnétique de l'oxygène ^{17}O lié au complexe.[114]

Les concentrations en complexe utilisées sont inférieures à 150 mmol.L^{-1}, [H_2O] est ainsi constante et le tracé de δ_{OLn}^{para} en fonction de [Dy(ligand)$_n$(H_2O)$_q$] est une droite de pente qΔ/[H_2O]. Des mesures similaires sur le Dy(III) aqueux permettent de déterminer la valeur de Δ/[H_2O], sachant qu'il y a 8 molécules d'eau sur le métal.[115]

Les mesures de déplacement chimique ont été faites par ajout de Dy(III) et à concentration en ligand constante. La concentration en ligand doit être élevée ([ACX] = 30 mmol.L^{-1}) pour que le déplacement chimique puisse être mesurable. Dans notre cas, tant que le cation métallique est en défaut par rapport au ligand, ρ = [métal]/[ligand] < 1, seul le complexe DyACX est formé et de façon quantitative.

Dans cette zone, Dy + L = DyL avec [DyL] = [Dy]$_0$ et [Dy] ~ 0

Par application de l'équation 3.1, $\delta_{OLn}^{para} = q\Delta\frac{[Dy]_0}{[H_2O]}$. Le tracé de δ_{OLn}^{para} en fonction de [Dy]$_0$ est une droite de pente qΔ/[H_2O].

Ensuite, pour $1 < \rho < 2$, il y a un mélange de DyACX et Dy_2ACX et il n'existe aucune relation simple.

Enfin, pour $\rho > 2$, [Dy_2L] = [L]$_0$ et [Dy] = [Dy]$_0$ – [L]$_0$.

L'équation 3.1 devient donc : $\delta_{OLn}^{para} = q\Delta\frac{[Dy]_0}{[H_2O]} - q\Delta\frac{[L]_0}{[H_2O]}$. La pente de la droite δ_{OLn}^{para} en fonction de [Dy]$_0$ est donnée par le nombre de molécules d'eau du Dy(III) libre et l'ordonnée à l'origine par qΔ[L]$_0$/[H_2O].

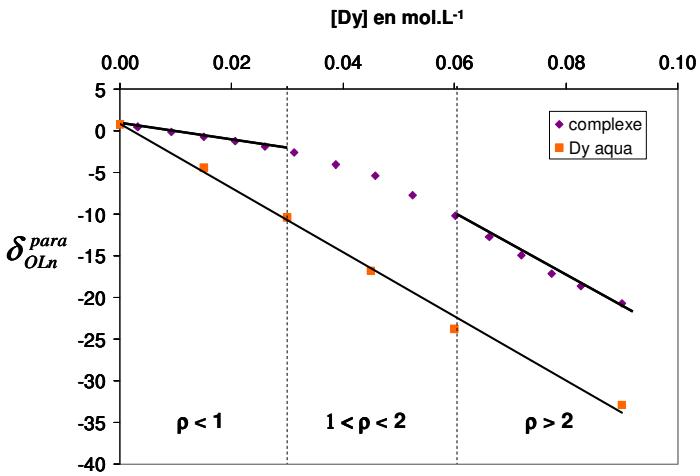


Figure 3.30 : Courbes de déplacement chimique paramagnétique de l'oxygène ^{17}O enregistrées à 25 °C et 400 MHz en fonction de [Dy] et en présence de [ACX] = 30 mmol.L^{-1} et [KCl] = 1 mol.L^{-1}

Avant un équivalent de métal, la pente de δ_{OLn}^{para} en fonction de [Dy] est de 105,5 ppm.mol.L^{-1}, ce qui correspond à un nombre de molécule d'eau coordonné sur le centre métallique de 2,1. Entre 1 et 2 équivalents, plusieurs espèces sont présentes et il ne s'agit plus d'une droite. Au-delà de 2 équivalents, la pente trouvée est bien celle de l'aqua-ion Dy(III).

V.2. Mesures par luminescence

Afin de confirmer ce résultat obtenu par RMN, des mesures de luminescence sur des complexes de Tb(III) et d'Eu(III) ont également été réalisées.

Nous avons vu en première partie que la présence de vibrateurs OH (donc de molécules d'eau) inhibe l'intensité de luminescence émise par les lanthanides. Il est donc possible d'accéder au paramètre q par des mesures de temps de vie de luminescence effectuées sur des complexes d'Eu(III) et de Tb(III).

Les mesures ne sont pas réalisées dans la même gamme de concentration que par la méthode précédente : [ACX] = 1,5 mmol.L^{-1}, [Métal] = 1 mmol.L^{-1}. Dans le cas de l'europium, le cation métallique est excité directement à 396 nm (ε = 2,77 L.mol^{-1}.cm^{-1}) et l'émission est observée à 616 nm (transition la plus intense $^5D_0$-$^7F_2$). Pour le terbium, l'excitation a lieu à 368 nm (ε = 0,34 L.mol^{-1}.cm^{-1}) et 215 nm (ε = 300 L.mol^{-1}.cm^{-1}) et l'émission à 545 nm (transition la plus intense, $^5D_4$-$^7F_5$). Les résultats obtenus sont similaires pour les deux excitations. Les valeurs des temps de vie obtenues sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 3. 8 : Temps de vie des complexes de l'ACX mesurés dans H_2O et D_2O en présence de KCl 0,1 mol.L^{-1}.

temps de vie en ms	Eu(III)	Tb(III)
H_2O	0,21(1)	0,60(1)
D_2O	1,95(1)	1,43(1)

Le nombre de molécules d'eau liées au centre métallique est relié de façon empirique aux temps de vie mesurés dans l'eau légère et dans l'eau lourde.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, il existe trois formules empiriques pour déterminer le nombre de molécules d'eau coordonnées dans le cas de l'Eu(III) et deux dans le cas du Tb(III). Ces formules ont toutes la forme générique suivante :

$$q = A(\tau_{H2O}^{-1} - \tau_{D2O}^{-1} - B)$$ **équation 3.2**

Les formules les plus anciennes ont été déterminées par Horrocks sur une série de ligands à l'état cristallin :[15]

$$q(Eu) = 1{,}05(\tau_{H2O}^{-1} - \tau_{D2O}^{-1})$$

$$q(Tb) = 4{,}2(\tau_{H2O}^{-1} - \tau_{D2O}^{-1})$$

Ces formules ont ensuite été améliorées par l'équipe de Parker, et elles ont été déterminées en solution sur une série de ligands polyaminocarboxylates possédant une ou zéro molécule d'eau.[16]

$$q(Eu) = 1{,}2(\tau_{H2O}^{-1} - \tau_{D2O}^{-1} - 0{,}25)$$

$$q(Tb) = 5(\tau_{H2O}^{-1} - \tau_{D2O}^{-1} - 0{,}06)$$

Enfin, l'équipe d'Horrocks a proposé une dernière formule pour l'Eu(III).[17]

$$q(Eu) = 1{,}11(\tau_{H2O}^{-1} - \tau_{D2O}^{-1} - 0{,}3)$$

Les résultats en fonction des formules utilisées pour le calcul sont regroupés dans le Tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Calcul du nombre de molécules d'eau coordonnées en fonction des différentes formules empiriques disponibles.

q	Horrocks	Parker	Horrocks corrigé
Eu	4,5(5)	4,8(3)	4,4(3)
Tb	4,1(5)	4,5(3)	

Les résultats obtenus par les différents calculs sont très proches. Par la suite, nous garderons la formule d'Horrocks corrigée pour l'Eu(III) et la formule de Parker pour le Tb(III).

Si nous analysons les valeurs obtenues, des résultats très similaires sont obtenus avec ces deux ions : $q_{Eu} = 4{,}4(3)$ et $q_{Tb} = 4{,}5(3)$ en présence de KCl 0,1 mol.L^{-1}. Ce nombre n'est pas un entier car il s'agit d'une valeur moyenne provenant d'échanges en solution.

V.3. Formation d'agrégats à fortes concentrations ?

Cette valeur de 4,5 mesurée sur deux complexes diffère grandement de celle obtenue par RMN de l'oxygène ^{17}O (2,1). La seule différence entre les deux types d'expérience est la concentration de travail : 30 mmol.L^{-1} pour la RMN et 1 mmol.L^{-1} pour la luminescence. Par mesure de précaution, des mesures de luminescence ont été réalisées à 30 mmol.L^{-1}, et le nombre de molécules d'eau associées au cation métallique est de 2. Il y a donc là un véritable effet de concentration.

Etant donné que le nombre de molécules d'eau est plus faible à forte concentration, la première idée venant à l'esprit est qu'il se forme des agrégats aux concentrations élevées limitant ainsi l'accès du cation métallique aux molécules d'eau (Figure 3.31).

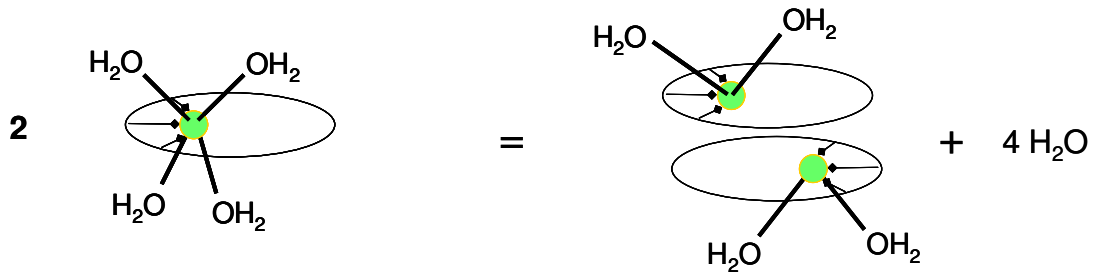


Figure 3.31 : Schéma de dimérisation pouvant expliquer la variation du nombre de molécules d'eau coordonnées au centre métallique en fonction de la concentration.

Pour vérifier cette hypothèse des mesures de coefficients de diffusion ont été réalisées en utilisant une séquence d'échos stimulés simples basée sur des gradients bipolaires (voir partie expérimentale).[116]

La formule de Stokes-Einstein (équation 3.3) permet de relier le coefficient de diffusion translationnelle d'une particule à son rayon hydrodynamique. Cette formule s'applique rigoureusement dans le cas d'une particule sphérique.

$$D^t = \frac{k_B T}{6\pi a_{hyd} \eta \ f_t} \qquad \textbf{équation 3.3}$$

où k_B représente la constante de Boltzmann

η représente la viscosité du milieu

a_{hyd} représente le rayon hydrodynamique du soluté considéré

f_t représente le facteur de microviscosité

Le coefficient de diffusion translationnelle de la particule sphérique est donc inversement proportionnel à son rayon. Si un dimère est formé, le volume est multiplié par 2, ce qui induit une variation de $2^{1/3}$, à savoir 25% sur le rayon et donc sur le coefficient de diffusion. Dans notre cas, l'approximation à des sphères est certes grossière, mais elle permet d'avoir une idée sur les effets recherchés.

Les mesures ont été faites dans D_2O en présence de KCl, sur les complexes de LuACX à des concentrations de 1 mmol.L^{-1} et 30 mmol.L^{-1}, ainsi que sur l'eau. Les mesures de coefficient de diffusion de l'eau permettent de prendre en compte les effets de viscosité pouvant également jouer sur les coefficients de diffusion des solutés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Coefficients de diffusion du complexe LuACX et de l'eau en fonction de la concentration en complexe.

[LuACX] (mmol.L^{-1})	D_{LuACX}($cm^2.s^{-1}$)	D_{HOD}($cm^2.s^{-1}$)
1	0,24(1)	1,60(8)
30	0,16(1)	1,00(5)

La variation des coefficients de diffusion de l'eau en fonction de la concentration est de l'ordre de 40%. La variation des coefficients de diffusion des complexes est de 46%. L'écart entre les deux est donc 6%, ce qui est correspond à l'erreur expérimentale. Ces mesures de coefficients de diffusion ne montrent pas d'effets forts en faveur de la formation d'agrégats à forte concentration, mais la théorie utilisée est rigoureusement valable pour des molécules sphériques ce qui n'est pas notre cas. Ces expériences ne permettent donc pas de dresser des conclusions franches. Si la formation d'agrégats est à exclure, nous nous trouvons face à une question qui n'est pas résolue à l'heure actuelle : quel phénomène chimique peut expliquer la variation du nombre de molécules d'eau associées au Ln(III) ?

V.4. Conclusion

Le système est très dépendant de la concentration et ce constat reste inexpliqué en terme de mécanisme moléculaire. Cela souligne l'importance de confronter plusieurs méthodes pour la détermination d'un paramètre afin d'éviter les interprétations erronées. En effet, il était très

tentant de conclure sur la seule mesure par RMN de l'oxygène ^{17}O que deux molécules d'eau seulement étaient coordonnées au cation métallique. Toutefois, aux concentrations auxquelles nous travaillons la plupart du temps (1 mmol.L^{-1}), il y a 4,5 molécules d'eau associées au cation métallique. Des mesures à des concentrations de 0,1 mmol.L^{-1} ont également été faites et les résultats trouvés sont similaires à ceux obtenus à 1 mmol.L^{-1}. Cela permet d'affirmer qu'entre 0,1 et 1 mmol.L^{-1}, ce sera bien la même espèce chimique qui sera étudiée.

Si nous reprenons les résultats obtenus à faible concentration (1 mmol.L^{-1}), et que nous comparons la structure obtenue à celle obtenue pour le complexe bimétallique par rayons X, le nombre de molécules d'eau coordonnés au cation métallique passe de 4,5 à 1. Le cation métallique est donc beaucoup moins enfoui dans la cavité en solution qu'à l'état cristallin. La même conclusion que dans le paragraphe précédent peut être mise en avant : il y a sans doute des liaisons entre le cation métallique et les oxygènes éther qui disparaissent en solution. Enfin pour terminer, la grande accessibilité du cation métallique aux molécules d'eau est à mettre en relation à la fois avec la faible stabilité et la labilité du système.

VI. Propriétés de relaxation de l'ACX

Maintenant que nous avons des informations sur la structure des complexes, le paramètre important à déterminer pour comprendre les propriétés du complexe utilisé en IRM est bien sûr la relaxivité. Elle a été caractérisée à haut champ, puis ses variations ont été étudiées en fonction du champ par relaxométrie avec cyclage de champ.

VI.1. Relaxivité à haut champ (400 MHz)

Les mesures de temps de relaxation effectuées à haut champ (400 MHz) nous apportent diverses informations. Elles donnent une idée du pouvoir relaxant du complexe étudié, mais en plus elles apportent des renseignements concernant le nombre d'espèces présentes en solution, ainsi que la charge de ces espèces. En effet, lorsqu'un seul type de complexe est présent en solution, le temps de relaxation est proportionnel à la concentration en [Gd^{3+}]. Par contre, ce n'est plus vrai dès qu'il y a un mélange de plusieurs types de complexes. Il est également possible de mesurer le temps de relaxation de protons de solutés sondes chargés

positivement, négativement, ou non chargés qui s'approchent plus ou moins près du centre métallique suivant sa charge globale.

Des mesures ont été effectuées, à concentration en ligand constante ([ACX] = 2 mmol.L^{-1}), en faisant varier la quantité de cation métallique et en présence de solutés sondes chargés négativement (méthanesulfonate), positivement (tétraméthylammonium) et neutre (*tert*-butanol).

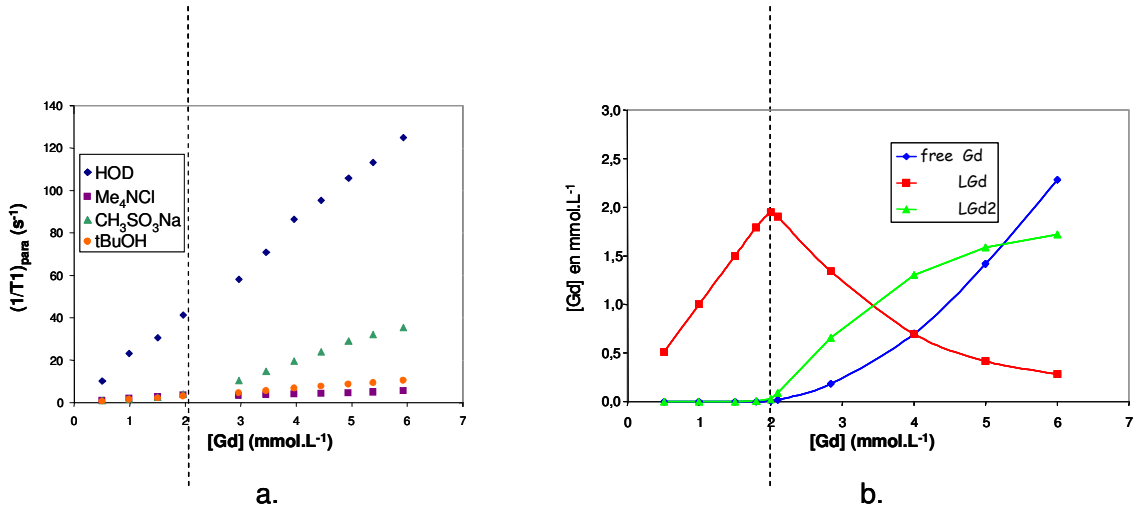


Figure 3.32 : (a) Augmentation paramagnétique de relaxation à 400 MHz et 298 K, en fonction de [Gd^{3+}] et pour [ACX] = 2 mmol.L^{-1} en présence de [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}; (b) Diagramme de spéciation dans les mêmes conditions.

Tout d'abord, jusqu'à un rapport 1/1 métal/ligand (c'est à dire [Gd^{3+}] = 2 mmol.L^{-1}), 1/T_1 est proportionnel à [Gd^{3+}] que ce soit pour l'eau ou pour les sondes (Figure 3.32). Ceci confirme bien qu'à faible concentration en gadolinium, une seule espèce est présente : le complexe 1/1. Ensuite, à un équivalent, une brisure de pente apparaît dans le cas des solutés sondes et indique la formation d'autres espèces. D'après le diagramme de spéciation, cela correspond à la formation de Gd^{3+} libre et de Gd_2(ACX).

En présence de l'espèce Gd(ACX), la relaxivité de HOD dans D_2O est de 20,7(5) mmol^{-1}.L.s^{-1}, valeur très élevée par rapport aux valeurs de relaxivité observées avec l'aqua-ion Gd(III) (r_{1Gd}(HOD) = 14,5(1) mmol^{-1}.L.s^{-1}) ou avec GdDTPA, ($r_{1GdDTPA}$(HOD) = 4,8(1) mmol^{-1}.L.s^{-1}).

Grâce au diagramme de spéciation, la valeur de relaxivité générée par le complexe binucléaire peut être calculée. En effet, sur cette zone, l'équation ci-dessous est vérifiée :

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{para} = r_{1GdACX}[GdACX] + 2r_{1Gd_2ACX}[Gd_2ACX] + r_{1Gd^{3+}}[Gd^{3+}] \qquad \textbf{équation 3. 4}$$

La seule inconnue étant la relaxivité du complexe bimétallique, le calcul donne une valeur de 20 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$, ce qui correspond à une relaxivité par Gd(III) équivalente à celle du complexe monométallique.

Les taux de relaxation paramagnétique des sondes autres que HOD sont représentés en fonction de $[Gd^{3+}]$ Figure 3.33 avec une échelle dilatée de l'axe des y.

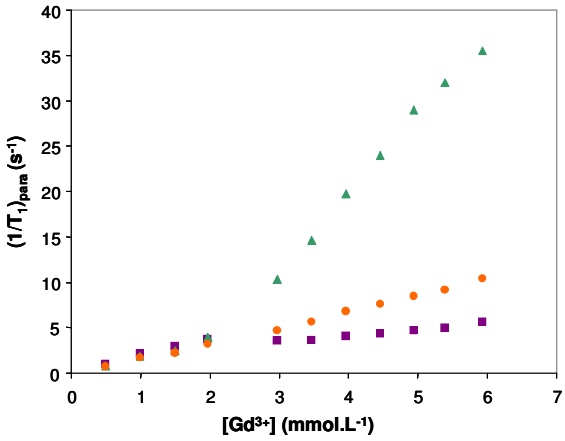


Figure 3.33 : Zoom de la figure 3.27 : Augmentation paramagnétique de relaxation des protons des sondes méthanesulfonate (▲), *tert*-butanol (●), et tétraméthylammonium (■) réalisées à 298 K pour une concentration en ACX de 2 $mmol.L^{-1}$ en présence de KCl 0,1 $mol.L^{-1}$.

Les valeurs des relaxivités des différentes sondes en présence du complexe GdACX sont données dans le Tableau 3.11. Les relaxivités de ces mêmes sondes en présence de l'aqua-ion Gd^{3+} ou en présence de GdDTPA sont rappelées pour comparaison.

Tableau 3.11 : Relaxivité des protons des différentes sondes mesurées avec [GdACX] ou [Gd] ou [GdDTPA] = 2 $mmol.L^{1}$ et en présence de [KCl] = 0,1 $mol.L^{1}$.

r_1 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)	$GdACX^{3-}$	Gd^{3+}	$GdDTPA^{2-}$
$r_1(CH_3SO_3^-)$	1,83(5)	8,55(4)	1,04(1)
$r_1(TMA^+)$	1,95(1)	0,77(1)	6,0(1)
r_1(*t*BuOH)	1,57(5)	1,72(1)	2,06(1)

Les valeurs de relaxivité obtenues en présence de GdACX diffèrent très peu en fonction de la sonde considérée même si le complexe possède 3 charges négatives. Ceci s'explique par la taille de la molécule, qui joue deux rôles. Tout d'abord, plus la molécule considérée est grosse, plus les charges sont délocalisées sur l'ensemble de la molécule, donc moins les effets

coulombiens sont importants. De plus, quand la molécule est plus volumineuse, les solutés sondes restent toujours loin du centre métallique, car l'attraction se fait par la couronne du ligand. Ainsi, le GdDTPA, qui est moins chargé que le GdACX, induit des effets de relaxivité plus importants car il est de plus petite taille.
Les effets induits par Gd^{3+} sont les plus importants car la charge est concentrée seulement sur l'ion et l'aqua-ion est beaucoup plus petit que les précédents. D'ailleurs, sur la Figure 3.33, lorsque $[Gd^{3+}] > [ACX]$, les effets sont beaucoup plus importants car il y a du Gd^{3+} libre en solution.

Pour comprendre l'origine de la valeur importante de la relaxivité, un profil de relaxivité des protons de l'eau en présence du complexe GdACX en fonction du champ a été réalisé.

VI.2. Profil de relaxivité en fonction du champ

Afin d'analyser le profil de relaxivité des protons de l'eau avec un minimum de paramètres ajustables, une mesure de relaxivité de protons de la sonde *tert*-butanol en présence de GdACX et KCl a également été effectuée en vue de la détermination indépendante du temps de relaxation électronique comme cela a été vu au chapitre 2. Le *tert*-butanol a été choisi pour trois raisons :

- il a une structure quasi-sphérique,
- il contient neuf protons équivalents qui donnent lieu à un signal important pour les mesures à bas champ, même à des concentrations de l'ordre de 0,4 $mol.L^{-1}$. Cela permet de garder la concentration de la sonde assez faible pour ne pas perturber la microdynamique du complexe GdACX,
- très peu d'associations avec le complexe sont attendues si bien que la relaxivité sera purement de type sphère externe.

La détermination des paramètres dynamiques et l'ajustement de la relaxivité vont se dérouler en trois étapes. La première étape est l'analyse des relaxivités du *tert*-butanol à différents champs pour déterminer le temps de relaxation électronique. Ensuite, l'ajustement de la courbe expérimentale du *tert*-butanol sera réalisé en utilisant un modèle de relaxation de type

sphère externe. Cela permet de valider les paramètres dynamiques et structuraux du complexe GdACX. Enfin, la dernière étape est l'analyse du profil de relaxivité de l'eau.

♦ **Analyse du profil de relaxivité des protons du *tert*-butanol**

Le profil de relaxivité des protons de $(CH_3)_3COD$ dans une solution de GdACX dans H_2O à 298 K est donné Figure 3.34. L'équation régissant la relaxation de sphère externe a été vue au cours du chapitre précédent. Les paramètres importants sont les suivants :

- le temps de corrélation rotationnelle du complexe τ_R, qui dépend de son facteur de microviscosité f_R, et qui influe sur le temps de relaxation électronique,
- les coefficients de diffusion translationnelle D^t du complexe et de la sonde considérés,
- le diamètre de collision b du complexe et de la sonde,
- la distance minimale d'approche entre les protons considérés et le Gd(III), a_{GdH},
- les temps de relaxation électronique T_e et τ_{s0} sa valeur en champ nul.

Détermination de b :

Afin de déterminer le diamètre de collision entre le *tert*-butanol et le complexe, il est nécessaire de connaître les dimensions des deux molécules. Les dimensions du complexe ont été calculées à partir de la structure cristallographique du complexe Lu_2ACX. Si la molécule est assimilée à une sphère, un rayon effectif de 5,9 Å est calculé. Le rayon du *tert*-butanol est estimé à partir de modèles moléculaires compacts à 2,8 Å, ce qui donne un diamètre de collision de 8,7 Å.

Détermination de a_{GdH} :

Dans le modèle de Ayant-Belorizky-Hwang-Freed pour la détermination de la relaxivité de sphère externe, ce n'est toutefois pas le diamètre de collision qui doit être pris en compte mais la distance minimale d'approche entre les protons du *tert*-butanol et le Gd(III). Cette distance est estimée à partir du diamètre de collision. Sachant que le complexe GdACX n'est pas sphérique mais plutôt aplati, la distance minimale d'approche est inférieure au diamètre de collision. Elle sera déterminée par ajustement du profil théorique aux valeurs expérimentales.

Détermination des coefficients de diffusion translationnels :

Les coefficients de diffusion du complexe LuACX (complexe diamagnétique supposé analogue au complexe GdACX) et de la sonde $(CH_3)_3COD$ sont mesurés par RMN à l'aide d'une séquence d'échos stimulés simples utilisant des gradients bipolaires (voir partie expérimentale)[116]: $D^t = 0{,}238(5).10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$ et $0{,}57(1).10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$ respectivement.

La formule de Stokes-Einstein (équation 3.3), qui s'applique rigoureusement dans le cas de particules sphériques, permet ici de calculer le rayon hydrodynamique, a_{hyd}, d'un soluté connaissant son coefficient de diffusion.

Le coefficient de microviscosité est calculé en comparant le rayon cristallographique a_{crist} au rayon hydrodynamique a_{hyd} de l'espèce. La microviscosité évaluée ainsi est $f_t = 1{,}42$. Pour la plupart des solvants, l'inégalité $f_t < 1$ est vérifiée.[117] La présence d'un rayon hydrodynamique important dans ce cas signifie que le complexe est fortement hydraté et entraîne avec lui un cortège important de molécules d'eau.

Détermination de τ_R :

La microviscosité translationnelle étant élevée, il n'est pas déraisonnable de considérer que si le complexe diffuse lentement, il tourne lentement également. D'où l'hypothèse $f_r = f_t$. Le coefficient de diffusion rotationnelle est alors calculé (voir équation 1.32) : $D^R = 6{,}41.10^8$ s^{-1} dans H_2O.

Par suite, $\tau_R = \dfrac{1}{6D^R} = 260$ ps dans H_2O.

Détermination de τ_{S0} et T_e :

Le seul paramètre inconnu reste maintenant le temps de relaxation électronique. Pour l'évaluer, les rapports des valeurs de relaxation à haut champ et en champ nul (en pratique champ très faible, de l'ordre de 3.10^{-4} T) ont été calculés et comparés aux valeurs expérimentales. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, ce calcul permet de s'affranchir de la distance minimale d'approche qui reste un paramètre délicat à estimer. Un très bon accord est obtenu pour un temps de relaxation électronique en champ nul, τ_{S0} de 110 ps. Cette valeur classe le complexe dans les composés à temps de relaxation électronique court. Pour comparaison, $\tau_{S0} = 72$ ps pour le DTPA et $\tau_{S0} = 430$ ps pour le DOTA qui est totalement symétrique.[1] Cette valeur semble raisonnable sur de simples considérations de symétrie. En effet, le ligand ACX présente seulement un axe de symétrie C_6 qu'il perd en complexant le cation métallique (symétrie C_1).

Nous avons vérifié que le diamètre de collision avait peu d'effets sur la détermination du temps de relaxation électronique : une variation de 30% de b entraîne des variations inférieures à 10% sur le temps de relaxation électronique.
Les variations de T_e en fonction de la fréquence sont ensuite gouvernées par τ_R.

A l'aide de tous ces paramètres, il est désormais possible de réaliser un ajustement du profil expérimental de relaxation en fonction du champ (voir Figure 3.34).

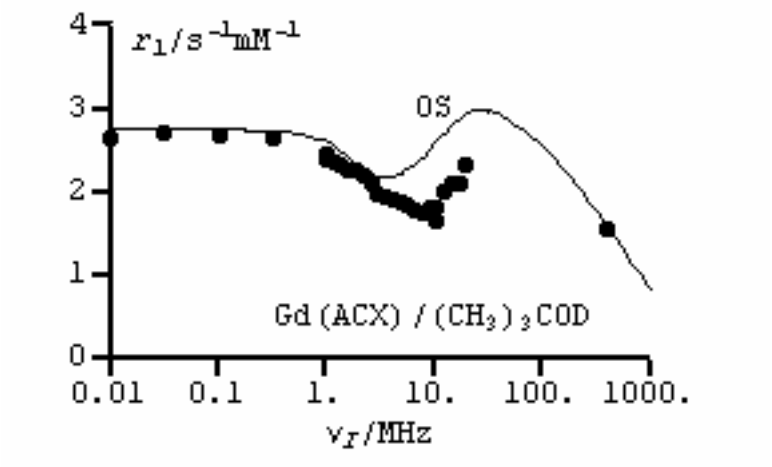


Figure 3.34 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité du *tert*-butanol dans H_2O, [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}, avec a_{GdH} = 6,5 Å, et τ_{S0} = 110 ps.

Le meilleur ajustement, à haut champ et bas champ, est obtenu pour une distance minimale d'approche a_{GdH} de 6,5 Å. Le mauvais ajustement aux champs intermédiaires n'est pas surprenant car la relaxivité est très sensible dans ce domaine aux imperfections des modèles de dynamique spatiale intermoléculaire et, en dessous de 10 MHz, de relaxation électronique. L'accord entre théorie et expérience à bas champ et haut champ est néanmoins bon et permet de valider les paramètres de type sphère externe du complexe.

♦ **<u>Analyse du profil de relaxivité des protons de l'eau</u>**

ü <u>Relaxivité de sphère externe</u>

Pour l'analyse de la relaxivité de l'eau, tous les paramètres précédents sont gardés sauf le coefficient de diffusion du *tert*-butanol qui est remplacé par celui de l'eau (1,87 cm^2.s^{-1})[118] et la distance minimale d'approche entre le Gd(III) et les protons de l'eau, a_{GdH}, car la molécule d'eau est plus petite que celle de *tert*-butanol. Cette fois, nous postulons a_{GdH} = 4,0 Å. Nous

vérifions par la suite que cette valeur postulée n'a que très peu d'influence sur la relaxivité car il existe une très forte contribution de sphère interne.

ü Relaxivité de sphère interne

Les équations de relaxation de sphère interne ont été vues dans le chapitre précédent. Les paramètres importants, en plus de ceux déterminés pour la seconde sphère, sont :

- le nombre de molécules d'eau coordonnées au centre métallique, q.
- la vitesse d'échange de ces molécules d'eau, τ_m
- la distance entre le Gd(III) et les protons de l'eau en première sphère de coordination, r_{GdH}

Il y a 4,5 molécules d'eau coordonnées au centre métallique (q = 4,5 mesuré par luminescence). r_{GdH} est fixée à 3,2 Å, distance classique observée pour les agents de contraste usuels.[1] La valeur de τ_m est fixée à 20 ns, valeur très courte prenant en compte le fait que la sphère de coordination est très hydratée et donc que l'échange des molécules d'eau n'est pas contraint. Pour comparaison, la vitesse d'échange des molécules d'eau de l'aqua-ion est 1,2 ns.[1] Un ajustement théorique du profil expérimental a alors pu être réalisé (voir Figure 3.35)

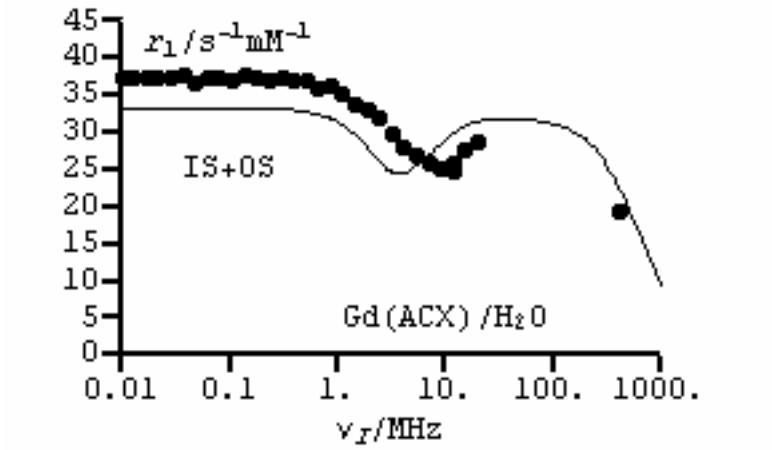


Figure 3.35 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité de l'eau dans H_2O, [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}, avec q = 4,5, r_{GdH} = 3,2 Å, a_{GdH} = 4 Å, τ_R = 260 ps et τ_{S0} = 110 ps.

Nous avons vérifié que la valeur du temps de corrélation rotationnelle était correcte en faisant varier ce temps autour de la valeur de 260 ps. Les variations de 50% autour de cette valeur sont représentées sur la Figure 3.36.

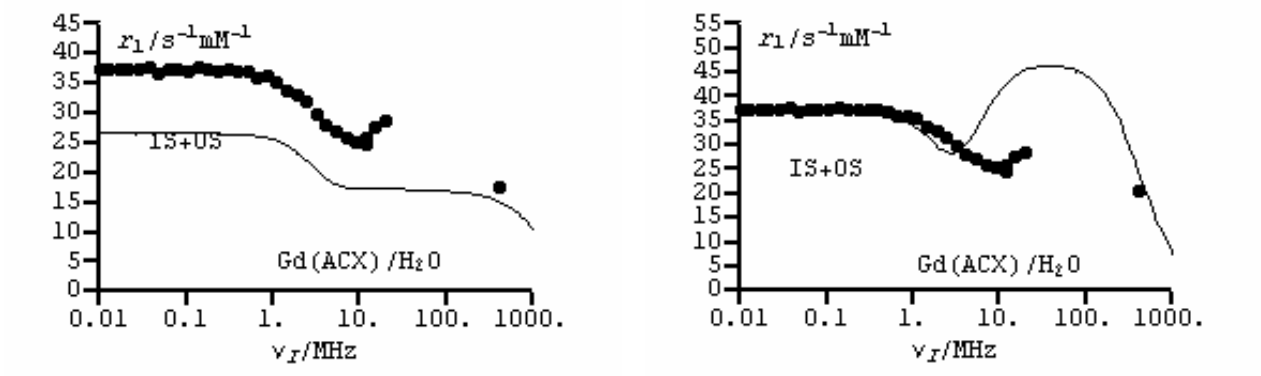


Figure 3.36 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité de l'eau avec les mêmes paramètres que précédemment sauf τ_R = 130 ps (à gauche) et τ_R = 290 ps (à droite).

Les ajustements entre profils expérimentaux et théoriques sont mauvais lorsque τ_R diffère de la valeur calculée. Par ajustements successifs, nous avons pu montré que la valeur de τ_R était fiable à 20% près. D'autre part, nous avons vérifié que pour ces temps de corrélation rotationnelle, la vitesse d'échange τ_m n'avait pas d'influence sue le profil théorique.

Les profils théoriques de relaxivité diffèrent davantage des valeurs expérimentales que dans la plupart des analyses publiées. Cela s'explique par trois raisons :
(1) la rusticité des modèles de dynamique spatiale conçus pour un complexe sphérique et appliqués au complexe GdACX qui est notablement anisotrope,
(2) le caractère effectif et empirique du modèle de relaxation électronique,
(3) l'ajustement simultané plus exigeant de deux profils au lieu d'un seul pour lequel les paramètres de relaxation électronique sont simplement choisis pour obtenir le meilleur accord possible avec l'expérience.

Pour conclure sur ces expériences, la relaxivité élevée de l'eau s'explique de façon classique, en considérant un temps de corrélation rotationnelle en accord avec la masse molaire du complexe et surtout en considérant le nombre élevé de molécules d'eau directement coordonnées au cation métallique.

VII. Effet des alcalins

Toutes les études précédemment décrites ont été effectuées en présence de KCl 0,1 mol.L^{-1}. Si ce système est bien compris dans ce milieu, il reste des zones d'ombre sur les interactions intermoléculaires en jeu, et en particulier sur l'effet des alcalins sur les propriétés de ces systèmes.

VII.1. L'effet du potassium

Il a très vite été mis en évidence que la présence du cation K^+ était cruciale lors des mesures de relaxivité de l'eau induite par le complexe GdACX à haut champ. Une expérience similaire à celle décrite dans la partie VI.1. a été réalisée en l'absence de KCl. Les relaxivités obtenues pour les protons de l'eau et des différentes sondes sont regroupées dans le Tableau 3.12.

Tableau 3.12 : Relaxivités induites par le complexe GdACX sur différentes sondes en présence et en absence de K^+.

sonde	r_1 [KCl] = 0,1 mol.L^{-1} (mmol^{-1}.L.s^{-1})	r_1 [KCl] = 0 mol.L^{-1} (mmol^{-1}.L.s^{-1})
HOD	20,7(5)	7,25(5)
$(CH_3)_4NCl$	1,95(5)	1,45(7)
CH_3SO_3Na	1,83(5)	1,22(2)
***t*BuOH**	1,57(5)	1,17(7)

La relaxivité induite sur l'eau est donc multipliée par 3 en présence de K^+.

Pour essayer de comprendre ces effets, une expérience de mesure de temps de relaxation à concentration constante en GdACX (2 mmol.L^{-1}) et en faisant varier la concentration de KCl a donc été réalisée (Figure 3.37).

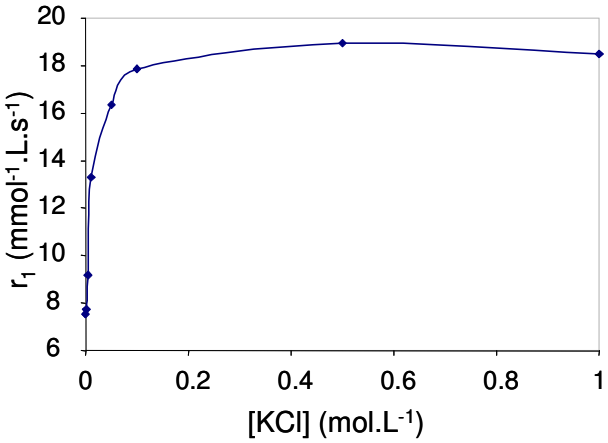


Figure 3.37 : Courbe de relaxivité de l'eau induite par GdACX à une concentration de 2 mmol.L^{-1} en fonction de [KCl] enregistrée à 400 MHz et 298 K.

La relaxivité augmente avec [K^+] et atteint un plateau à partir de [K^+] = 0,1 mol.L^{-1}. L'évolution observée indique qu'il existe un complexe de faible relaxivité en l'absence de K^+ en équilibre avec un complexe de relaxivité élevée en présence de concentrations élevées en KCl. Ceci permet de justifier *a posteriori* toutes les études dans KCl 0,1 mol.L^{-1} : le plateau est atteint pour cette concentration, et l'espèce étudiée précédemment est donc celle de relaxivité élevée.

Pour essayer d'interpréter ce phénomène au niveau moléculaire, des mesures de nombre de molécules d'eau coordonnées au centre métallique ont été effectuées par luminescence, comme précédemment. Ces mesures ont montré qu'en l'absence de potassium, il y a 1,5 molécules d'eau coordonnées au centre métallique, contre 4,5 en présence de potassium. Cette différence d'un facteur 3 au niveau du nombre de molécules d'eau coordonnées permet aisément d'expliquer la différence d'un facteur 3 observée sur la relaxivité. Mais quel est le changement structural induit par le potassium pour expliquer ces résultats ?

Deux hypothèses sont proposées et vont être développées par la suite.

- Sachant que le cation métallique est beaucoup moins accessible aux molécules d'eau en présence de potassium, la première hypothèse est une association entre deux complexes GdACX pour former un dimère qui emprisonnerait le Gd(III) et réduirait ainsi l'accès des molécules d'eau. En effet, les bras carboxylates du deuxième complexe participeraient également à la coordination du Gd(III) et limiteraient le nombre de molécules d'eau

coordonnées à 1 ou 2 (Figure 3.38). Il s'agit en réalité de la même hypothèse que celle postulée à forte concentration en complexe, mais la cause est différente.

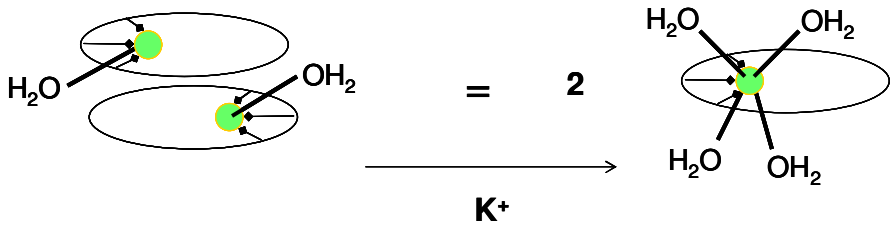


Figure 3.38 : Dimérisation des complexes GdACX en l'absence de KCl, réduisant ainsi l'accès des molécules d'eau au centre métallique.

Comme dans le cas de l'étude en fonction de la concentration, la formation de dimères est vérifiée par des mesures de coefficients de diffusion translationnelle. La formation de dimères sera signalée par des variations de l'ordre de 25 % des coefficients de diffusion.

Les mesures ont été faites dans D_2O en présence et en absence de KCl, à la fois sur l'ACX libre, les complexes de LuACX et sur l'eau. Les mesures de coefficient de diffusion de l'eau permettent de vérifier qu'il n'y a pas d'effets importants de viscosité pouvant jouer sur les coefficients de diffusion des solutés.

Tableau 3.13 : Coefficients de diffusion de l'ACX, du complexe LuACX à la concentration de 1 mmol.L^{-1}, de l'eau mesurés par une séquence d'échos stimulée en présence et en absence de KCl.

[KCl] (mol.L^{-1})	D_{ACX} (10^5.cm^2.s^{-1})	D_{LuACX} (10^5.cm^2.s^{-1})	D_{HOD} (10^5.cm^2.s^{-1})
0	0,26(1)	0,243(8)	1,61(5)
0,1	0,25(1)	0,238(8)	1,58(5)

D'après les coefficients de diffusion de l'eau, il n'y a pas de variations de la viscosité du milieu suivant la présence ou l'absence de KCl. Les variations observées sur les coefficients de diffusion des complexes ou des ligands sont de l'ordre de 2%, ce qui n'est absolument pas significatif. La mesure de coefficients de diffusion permet donc d'exclure la formation de dimères en absence de KCl.

- La deuxième hypothèse est de considérer une inclusion du potassium dans la cavité de la cyclodextrine, qui pourrait conduire à un réarrangement structural important du complexe. Afin de mettre en évidence la formation des complexes KACX et KGdACX, des expériences

de potentiométrie ont été réalisées avec un sel de fond volumineux, le chlorure de tétrabutylammonium, pour éviter toute inclusion.

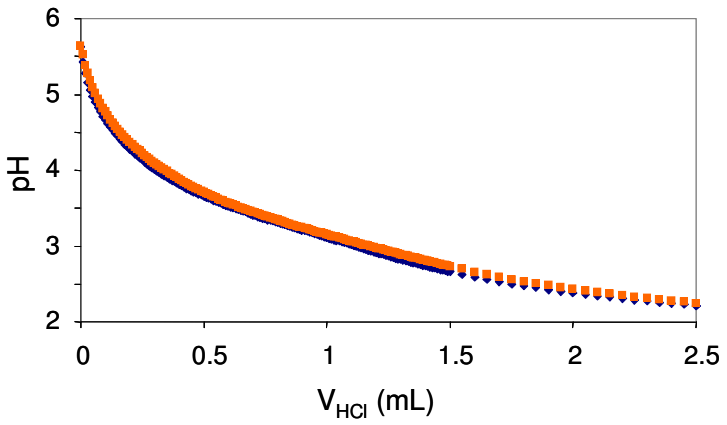


Figure 3.39 : Effet du sel de fond : Courbes de dosage par HCl 0,1 mol.L^{-1} à 298 K de solutions contenant [ACX] = [Gd] = 10^{-3} mol.L^{-1} et [Gd] = [ACX] dans l'eau et à force ionique constante ■ KCl 0,1 mol.L^{-1} ou w Bu_4NCl 0,1 mol.L^{-1}.

L'analyse de la courbe de dosage du ligand libre conduit aux mêmes pKa qu'en présence de KCl. Des dosages avec un équivalent de Gd(III) ont ensuite été réalisés en milieu Bu_4NCl 0,1 mol.L^{-1}. La comparaison de ce dosage avec celui réalisé en présence de KCl 0,1 mol.L^{-1} est représentée Figure 3.39 : les courbes sont superposables et les constantes de stabilité similaires. La thermodynamique de complexation du Gd(III) n'est donc pas perturbée par la présence de l'alcalin.

Cependant, les effets observés sur la relaxivité ne sont visibles qu'en fort excès de potassium (il est utilisé à la concentration de 0,1 mol.L^{-1}). Si l'on suppose que l'évolution de relaxivité de la Figure 3.37 est due à la formation d'un complexe avec K^+, alors ces données peuvent être analysées à l'aide du logiciel Specfit en considérant l'équilibre :

$$GdACX + n\ K = GdACXK_n$$

Par exemple, pour n = 1, la formation d'un complexe GdACXK peut être modélisée avec une constante de formation de 80. Cette constante d'association est très faible par rapport à la constante de formation de GdACX. Ceci est en accord avec la structure du complexe d'inclusion entre la per-3,6-β-cyclodextrine et K^+ publiée dans la littérature.[90] Cette structure ne montre en effet que des interactions entre K^+ et des oxygènes de type éther, qui sont bien des interactions faibles. D'autre part, ces interactions ne provoquent pas de transfert de protons, justifiant ainsi qu'aucune différence de complexation en présence ou absence de K^+

n'ait pu être observée par potentiométrie. La relaxivité se révèle ici une sonde puissante pour voir des effets de structure non détectables par des techniques classiques.

Cette inclusion est une première explication aux différences observées en présence ou en absence de KCl. Il est possible que, lorsque le potassium est inclus dans la cavité, le gadolinium soit plus exposé aux molécules d'eau que lorsqu'il est seul dans la cavité.
Pour essayer de rationaliser ces effets d'inclusion, la relaxivité et le nombre de molécules d'eau coordonnées au Gd(III) ont été mesurés en présence d'autres alcalins.

VII.2. Les autres alcalins

Les effets attendus selon l'alcalin utilisé sont des effets de taille. Les cations lithium, sodium et césium ont ainsi été testés, de même que le tétrabutylammonium. Les rayons ioniques des différents cations sont rappelés dans le Tableau 3.14.

Tableau 3.14 : Rayons ioniques de différents cations métalliques.

Cation	Li^+	Na^+	K^+	Cs^+
Rayon ionique (pm)	68	97	133	167

Des mesures systématiques de relaxivité en fonction de la concentration en cation et en présence du complexe GdACX ont été effectuées. Les résultats sont regroupés dans la Figure 3.40.
Les variations de relaxivité sont très différentes suivant le sel de fond utilisé. Les courbes en présence de Li^+ et K^+ sont similaires et résultent d'un équilibre entre deux espèces : GdACX et $GdACXK_n$ ou $GdACXLi_n$. La seule différence est que le plateau de relaxivité est atteint pour $[Li^+] = 2$ mol.L^{-1}, contre 0,1 mol.L^{-1} avec K^+. Les variations de relaxivité en présence de Li^+ peuvent être analysées comme celle de K^+ : par exemple pour n =1, la formation du complexe GdACXLi peut être modélisée avec une constante de formation de 3. L'inclusion est donc moins favorable qu'avec K^+.

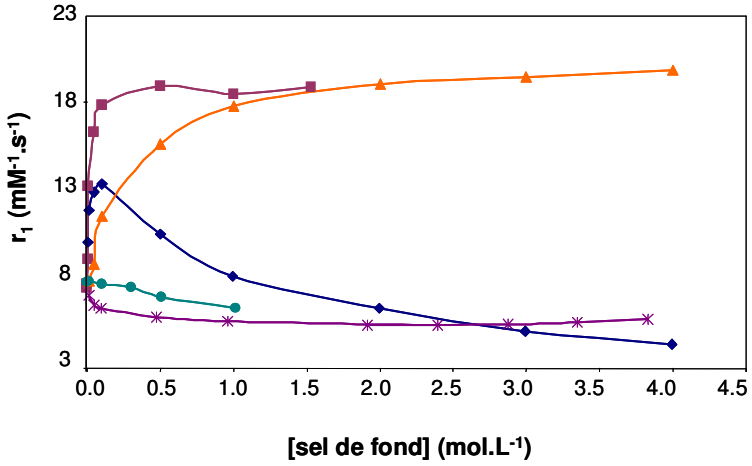


Figure 3.40 : Courbe de relaxivité de l'eau, à 400 MHz et 298 K, induite par le complexe GdACX ([Gd3+] = [ACX] = 1 mmol.L^{-1}) et en présence de concentrations variables en cations, ■ K^+, ▲ Li^+, w Cs^+, ✳ Na^+, ● $(CH_3)_4N^+$.

La relaxivité varie très peu en fonction de [Bu_4N^+], qui est une molécule très volumineuse et qui ne peut pas être incluse dans la cavité de la cyclodextrine. Le fait que la relaxivité varie peu en fonction de [Na^+] également est plus surprenant. S'il y a réellement un seul effet de taille, Na^+ devrait être inclus dans le complexe avec une constante de formation comprise entre 3 et 80. La taille n'est donc pas le seul facteur entrant en jeu dans cette inclusion.
D'autre part, Cs^+ provoque un comportement très particulier sur la relaxivité qui augmente, passe par un maximum et finit par diminuer pour atteindre un plateau différent de sa valeur initiale. Il semble que dans ce cas là il y ait au moins trois espèces différentes en équilibre.

Même si les raisons profondes de l'inclusion ne sont pas comprises au niveau moléculaire, nous avons essayé de voir si les variations du nombre de molécules d'eau coordonnées au Gd(III) en présence des alcalins peuvent expliquer complètement les variations de relaxivité. Ces expériences ont été effectuées par mesures de temps de vie de luminescence sur des complexes de Tb(III) à la concentration de 0,9 mmol. L^{-1} et en présence du cation métallique souhaité à la concentration de 0,1 mol.L^{-1}. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.15.

Tableau 3.15 : Mesure des temps de vie de luminescence du complexe [TbACX] = 2 mmol.L^{-1} en présence de cations Na^+, K^+ ou Bu_4N^+ à la concentration de 0,1 mol.L^{-1}, ou de [Li^+] = 2 mol.L^{-1} ou [Cs^+] = 1 mol.L^{-1}.

cation	Li^+	Na^+	K^+	Cs^+	Bu_4N^+
τ H_2O (s)	1,69(2)	4,01(3)	0,60(1)	3,49(6)	3,13(4)
τ D_2O (s)	5,36(7)	7,44(9)	1,43(2)	6,54(9)	7,15(8)
q	1,7(2)	0,3(1)	4,5(5)	0,4(1)	0,6(1)

Les résultats obtenus pour les cations Na^+, Bu_4N^+ et Cs^+ sont cohérents avec ce qui est observé en absence de sel de fond. En effet, dans ce cas, il y a une seule molécule d'eau sur le cation métallique comme en présence de Bu_4N^+. Or, il n'y a pas d'inclusion avec ce cation, la relaxivité reste constante. En présence de Na^+ et de Cs^+, il y a moins d'une molécule d'eau, ce qui est également cohérent avec la relaxivité qui chute très peu par rapport à l'état initial sans cation. Par contre, le cas du cation Li^+ reste inexplicable. D'après les courbes de relaxivité de la Figure 3.40, un nombre de molécules d'eau coordonnées identiques à celui trouvé en présence de potassium était attendu. Les mesures ont été faites à nouveau avec une concentration plus faible en Li^+ (0,1 mol.L^{-1}), mais les résultats sont similaires. La seule explication possible à une relaxivité aussi forte en présence de Li^+ est que le cation très électropositif et polarisant induise une forte variation de la vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées au Gd(III) avoisinant. Ceci ne reste qu'une simple hypothèse et pourrait être prouvé par des mesures de vitesse d'échange par RMN de l'oxygène 17. Toutefois ces mesures doivent être faites à des concentrations élevées (de l'ordre de 50 mmol.L^{-1}),[119] et comme nous l'avons vu précédemment en présence de K^+, il y a de fortes chances qu'en présence de Li^+ il y ait également des changements d'espèces en fonction de la concentration.

L'étude des complexes formés avec l'ACX est donc particulièrement délicate en raison de la double dépendance en concentration et avec le milieu environnant. Il est très difficile de comprendre toutes les interactions moléculaires en jeu dans ces systèmes labiles, et la chimie manque cruellement d'outils à ce stade. Il faut néanmoins souligner que les techniques classiques comme la potentiométrie, la RMN ou la RPE ont permis de comprendre le système de façon globale. La potentiométrie a permis de dresser une liste des complexes présents en fonction des concentrations respectives en cation métallique et en ligand, ainsi qu'en fonction du pH. Cela permet d'orienter la formation d'un complexe ou d'un autre en fonction des conditions choisies. La RMN et la cristallographie aux rayons X nous ont permis de considérer la structure du complexe monométallique équivalente à celle du complexe bimétallique obtenue à l'état solide mais avec un seul des deux « compartiments » occupés. La RPE et la potentiométrie ont permis de mettre en évidence de façon non ambiguë la présence d'hydroxocomplexes à des pH élevés, même si nous n'avons pas de preuve pour savoir s'il s'agit d'hydroxocomplexes pontants ou non. Enfin, la valeur de la constante de sélectivité du système nous a permis de comprendre comment il est possible d'injecter ce

complexe à des rats sans les tuer. Cela explique également en partie l'obtention d'images IRM, malgré la faible constante de stabilité thermodynamique du complexe.

Dans un deuxième temps, des mesures de relaxivité ont permis de mettre en évidence des interactions faibles en solution non détectables par les techniques précédentes. Nous avons ainsi pu montrer que les cations K^+ et Li^+ étaient inlus dans la cavité du complexe GdACX, alors que ce n'est pas le cas avec le cation Na^+. A une exception près (en présence de Li^+), nous avons pu montrer que les relaxivités observées à haut champ étaient en accord avec le nombre de molécules d'eau présentes en première sphère de coordination. Enfin, une étude relaxométrique complète du complexe GdACX en milieu KCl 0,1 $mol.L^{-1}$ a montré que les relaxivités élevées étaient expliquables en terme de mécanisme de sphère interne et externe, en considérant des paramètres classiques. Les résultats obtenus avec les images IRM nous faisaient pourtant soupçonner un effet important de seconde sphère en accord avec l'hydrophilie de la molécule, et qui auraient expliqués que l'agent reste intravasculaire. Malgré un coefficient de microviscosité élevé indiquant que le complexe entraîne avec lui un grand nombre de molécules d'eau, augmentant ainsi sa taille et sa masse molaire et ralentissant voire empêchant sa diffusion à travers les parois des vaisseaux sanguins, nous n'avons aucune preuve permettant d'affirmer cela avec certitude.

Nous nous proposons donc pour essayer de résoudre cette question d'étudier un système très similaire, la BCX, qui possède une unité « sucre » supplémentaire.

VIII. Etude complète de la BCX

La compréhension du système ACX est très complexe et délicate en raison de sa dépendance en fonction du milieu et de la concentration, mais en est-il de même pour le système BCX très semblable chimiquement mais possèdant toutefois une unité supplémentaire ?

VIII.1. Effet du milieu et de la concentration

Les premières vérifications ont concerné les effets de sels de fond et de concentration. Aucune dépendance significative en fonction du sel de fond n'a été mise en évidence par mesures de relaxivité. Il en est de même pour les dépendances en concentration. Le système BCX semble donc beaucoup plus simple que celui de l'ACX et permettra peut être de nous éclairer sur les interactions spécifiques en solution.
Le début de l'étude est similaire à la précédente. Il faut d'abord s'intéresser aux espèces formées et à leur stabilité, ensuite à leur structure avant de passer à la compréhension des propriétés de relaxivité.

VIII.2. Etude thermodynamique

Des mesures potentiométriques ont été faites sur le ligand BCX. Les pKa trouvés sont très similaires à ceux de l'ACX et montrent également une interaction entre les différentes fonctions acides. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.16.

Tableau 3.16 : Constantes de protonation des lignds libres dans l'eau à 298 K et en milieu KCl 0,1 mol.L^{-1}.

	pKa_1	pKa_2	pKa_3	pKa_4	pKa_5	pKa_6	pKa_7
ACX	5,40(7)	5,02(7)	4,40(6)	4,18(8)	3,5(1)	3,1(1)	
BCX	5,72(6)	5,49(7)	4,39(9)	4,36(9)	3,6(1)	3,3(1)	2,8(1)

Des dosages ont ensuite été réalisés en présence de Gd(III) à des stœchiométries métal/ligand 0,5/1 ; 1/1 ; 2/1 ; 3/1. Les résultats, comparés à ceux obtenus avec le ligand ACX, sont regroupés dans le Tableau 3.17.

Tableau 3.17 : Constantes de formation globales des complexes GdL dans l'eau à 298 K et en milieu KCL 0,1 mol.L^{-1}. $\beta_{110} = [Gd_m(L)_nH_p]/[Gd]^m[L]^n[H]^p$.

complexe	m	n	p	log β $_{mnp}$ (L = ACX)	log β $_{mnp}$ (L = BCX)
GdL	1	1	0	7,52(5)	9,0(1)
GdLH	1	1	1	12,0(1)	13,4(1)
$GdLH_2$	1	1	2	15,8(1)	17,6(1)
$GdLH_3$	1	1	3	19,3(1)	20,9(1)
$GdLH_4$	1	1	4		24,2(1)
Gd_2L	2	1	0	11,45(5)	13, 5(1)
Gd_2LH	2	1	1		17,6(1)
$Gd_2L(OH)$	2	1	-1		6,8(1)
$Gd_2L(OH)_2$	2	1	-2	-0,2(1)	0,6(1)

Le complexe monométallique formé avec la BCX est significativement plus stable que celui formé avec l'ACX. Etant donné que le ligand est plus volumineux, il est possible qu'il puisse mieux « s'enrouler » autour du cation métallique et qu'un plus grand nombre de bras carboxylates (quatre voire même plus) que dans le complexe GdACX puissent se coordonner. Il a également été vérifié qu'un troisième cation ne pouvait pas être introduit dans la cavité pour des raisons de gêne stérique. Les diagrammes de spéciation obtenus en fonction des conditions initiales sont regroupés Figure 3.41.

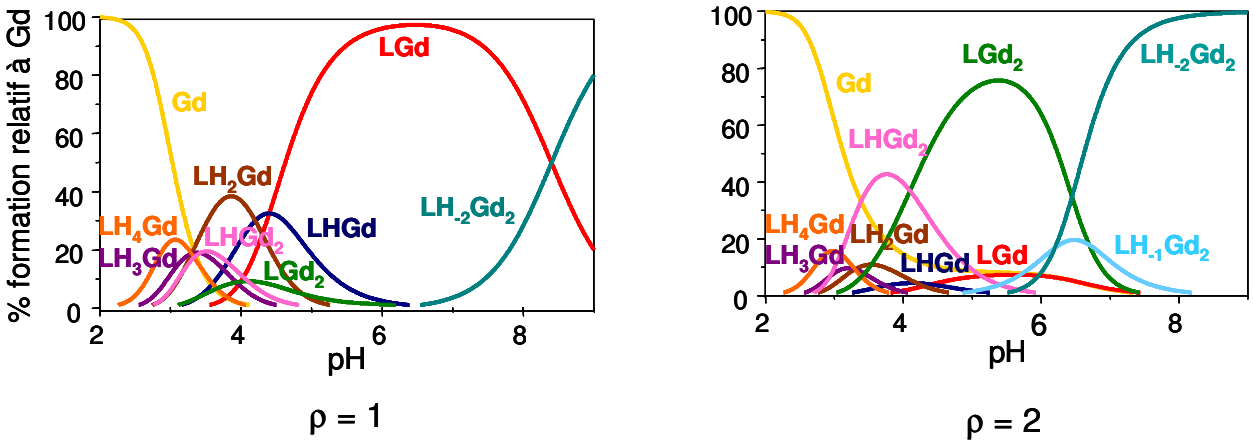


Figure 3.41 : Diagramme de spéciation dans l'eau en présence de [KCl] = 0,1 mol.L^{-1} à 298 K avec $[Gd]_0 = [ACX]_0 = \rho * 0.001$ mol.L^{-1}.

Cette spéciation a été confirmée par spectrométrie de masse ES/MS comme dans le cas de l'ACX. Les spectres sont représentés Figure 3.42.

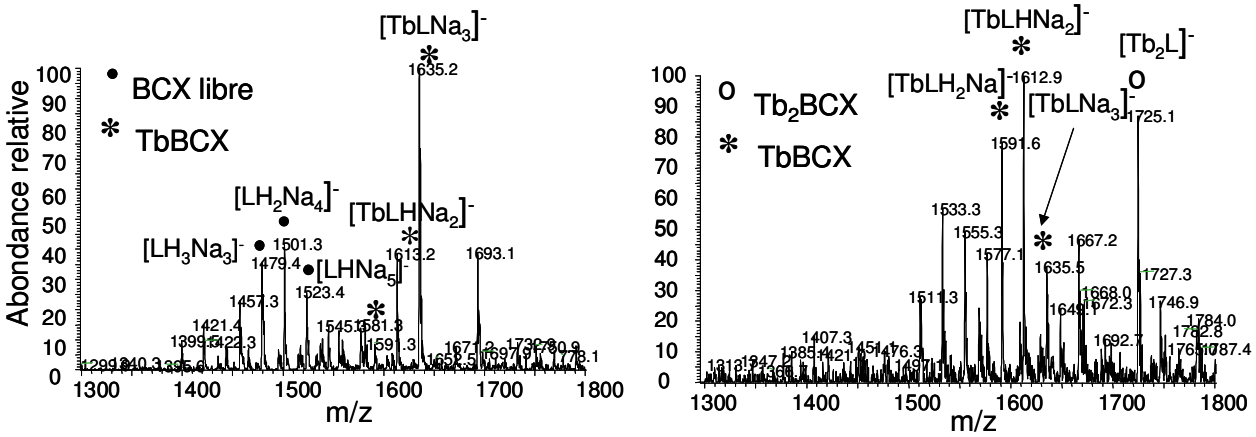


Figure 3.42 : Spectres ES-MS enregistrés en mode négatif dans l'eau d'un mélange Tb/ACX 1/1 (à gauche) ; 3/1 (à droite).

Une fois la spéciation connue, la détermination de la structure des complexes formés constitue l'étape suivante.

VIII.3. Etude structurale

Des spectres RMN du proton similaires à ceux de l'ACX ont également été enregistrés avec différents cations métalliques. La cavité étant plus grande, des problèmes de dynamique encore plus importants qu'avec le ligand ACX sont rencontrés. Les spectres ont été enregistrés pour des rapports ρ = [Métal]/[Ligand] allant de 0 à 3 par pas de 0,25. Que le cation métallique soit diamagnétique (La ou Lu) ou paramagnétique (Eu, Yb, Tm), les résultats obtenus sont identiques : le spectre est toujours similaire à celui du ligand libre mais il présente des signaux très larges, signe d'une dynamique importante au sein du complexe. Toutefois, pour $\rho > 1$, et en présence d'Yb(III) et de Tm(III) (cation provoquant un déplacement paramagnétique très important), des signaux déplacés mais toujours très larges sont observés. Malheureusement, la largeur de ces pics rend impossible tout décompte et empêche d'attribuer une symétrie au complexe. Contrairement à l'ACX, même le complexe 2/1 est dynamique en raison des 7 unités qui permettent toujours un mouvement au sein de la cavité.

Pour le complexe monométallique, le nombre de molécule d'eau coordonnées au centre métallique a été déterminé par luminescence sur un complexe de Tb(III). Les temps de vie dans H_2O et D_2O sont respectivement de 1,95(5) s et de 5,25(5) s. Ceci conduit à un nombre de molécules d'eau directement coordonnées de 1,3(1). Ce résultat est à rapprocher de ce qui a été trouvé dans le cas de l'ACX en l'absence d'alcalins, et donc sans inclusion.
Ce faible nombre de molécules d'eau coordonnées montre que le cation métallique est remarquablement encapsulé par le ligand. Cela va dans le sens des conclusions de la potentiométrie, à savoir que le ligand plus volumineux s'adapte mieux au cation métallique et que plus de bras carboxylates ou d'oxygènes éther se lient au centre métallique.

VIII.4. Propriétés de relaxation à haut champ

Des mesures ont d'abord été réalisées à 400 MHz pour évaluer les potentialités de cette molécule en tant qu'agent de contraste. La relaxivité des protons HOD en présence du complexe monométallique est de 16,0(3) $mmol^{-1}.L.s^{-1}$. Cette valeur, plus faible que celle induite par le complexe GdACX, reste du même ordre de grandeur que celle induite par le Gd^{3+} aqueux. Et surtout, le complexe ne possède qu'une seule molécule d'eau en première sphère de coordination ! Cette relaxivité ne résulte pas d'un grand nombre de molécule d'eau en première sphère de coordination comme c'est le cas pour l'ACX.

Comme nous l'avons dit au cours des chapitres précédents, il est aisé d'ajuster des profils de relaxation avec un grand nombre de paramètres. Cela peut toutefois amener à des interprétations erronées de la dynamique des systèmes. Il est donc important d'arriver à déterminer un maximum de paramètres indépendamment les uns des autres. Dans cette logique, pour déterminer le temps de relaxation électronique, des mesures systématiques de T_1, T_2 et $T_{1\rho}$ ont été effectuées non seulement sur les protons de l'eau, mais également sur ceux d'une sonde neutre, le méthanol. Ce dernier a été préféré au *tert*-butanol car il est de plus petite taille et donc permet de mieux « mimer » les mouvements de la molécule d'eau.
Les résultats des mesures sont regroupés dans le Tableau 3.18.

Tableau 3.18 : Mesures de relaxivité induite par le complexe GdBCX dans D_2O et NaCl 9 $g.L^{-1}$.

Sonde	Champ (MHz)	r_1 ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$)	r_2 ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$)	$r_{1\rho}$ ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$)
	200	3, 38(7)	4,60(9)	4,69(9)
CH_3OD	**400**	2,48(5)	4,13(9)	4,21(9)
	500	2,25(5)	4,56(9)	4,29(9)
	200	26,75(5)	38,57(7)	37,63(7)
HOD	**400**	16,79(4)	33,55(7)	32,15(7)
	500	12,91(3)	31,14(7)	33,87(7)

Ces résultats seront analysés en détail dans le paragraphe suivant, mais nous pouvons déjà remarquer qu'il existe un bon accord entre les mesures de r_2 et celles de $r_{1\rho}$ aux incertitudes de mesures près (de l'ordre de 5%). Ceci est plutôt satisfaisant car ces grandeurs sont données par la même expression théorique, mais sont mesurées par des séquences différentes.

VIII.5. L'origine de la relaxivité : des associations par liaisons hydrogène

Afin de réaliser une analyse complète du système, les temps de relaxation des protons HOD dans l'eau lourde et des protons du méthanol deutérié, en présence de [GdBCX] = 2 $mmol.L^{-1}$, et de [NaCl] = 9 $g.L^{-1}$ (expériences dans les conditions du sérum physiologique), sont mesurés au relaxomètre pour des champs variant de 10 kHz à 40 MHz. La détermination des paramètres dynamiques et l'ajustement de la relaxivité vont se dérouler en trois étapes comme dans le cas du complexe GdACX :

- détermination du temps de relaxation électronique par l'analyse des relaxivités du méthanol à différents champs,
- ajustement de la courbe expérimentale du méthanol en utilisant un modèle de relaxation de type sphère externe. Cela permet de valider les paramètres dynamiques et structuraux du complexe GdBCX,
- analyse du profil de relaxivité de l'eau.

♦ Analyse du profil de relaxivité des protons du méthanol

Le profil de relaxivité des protons de CH_3OD dans une solution de GdBCX dans D_2O à 298 K est donné Figure 3.43. Les paramètres importants régissant la relaxation de sphère externe sont explicités ci-après.

Détermination de b :

Afin de déterminer le diamètre de collision entre le méthanol et le complexe GdBCX, il est nécessaire de connaître les dimensions du complexe. Ces dernières ont été calculées à partir de la structure cristallographique du complexe Lu_2ACX, en prenant en compte l'unité « sucre » supplémentaire. Si le complexe est assimilé à une sphère, un rayon effectif de 6,2 Å est calculé. Le rayon du méthanol est estimé à 2,25 Å, ce qui donne un diamètre de collision de 8,45 Å.

Détermination de a_{GdH_r} :

La distance minimale d'approche entre les protons du méthanol et le Gd(III) est estimée à partir du diamètre de collision. Le complexe GdBCX étant aplati, la distance minimale d'approche est inférieure au diamètre de collision. Ainsi, il est encore raisonnable de considérer des distances minimales d'approche de l'ordre de 5 Å. Des valeurs plus faibles ne sont plus correctes physiquement. La valeur exacte sera déterminée par ajustement du profil théorique avec les valeurs expérimentales.

Détermination des coefficients de diffusion translationnels :

Le coefficient de diffusion du méthanol a été mesuré par RMN : $D^t = 1,13(2).10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$.[71]

Les coefficients de diffusion de la BCX et de son complexe LaBCX (complexe diamagnétique supposé identique au complexe GdBCX) sont mesurés de la même façon : $D^t = 0,215(5).10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$. Le coefficient de microviscosité est calculé en comparant ces valeurs à celles obtenues par la formule de Stokes-Einstein (équation 3.3). La microviscosité évaluée ainsi est $f_t = 1,49$. Cette valeur est similaire à celle obtenue pour l'ACX, et donc caractéristique de cette famille de ligands oxygénés et hydrophiles.

Détermination de τ_R :

Comme dans le cas de l'ACX, la microviscosité translationnelle étant élevée, l'hypothèse $f_r = f_t$ est faite. Le coefficient de diffusion rotationnelle calculé selon l'équation 1.32 est alors : $D^R = 4,23.10^8$ s^{-1}.

Enfin, $\tau_R = \frac{1}{6D^R} =$ 394 ps dans D_2O. Cette valeur est légèrement plus élevée que celle obtenue avec l'ACX (320 ps dans D_2O), ce qui est cohérent avec une molécule de plus grande taille.

Détermination de τ_{S0} et T_e :

Le seul paramètre inconnu reste maintenant le temps de relaxation électronique. Pour l'évaluer, les rapports des valeurs de relaxation à haut champ et bas champ ont été calculés et comparés aux valeurs expérimentales afin de s'affranchir de la distance minimale d'approche qui reste un paramètre délicat (voir chapitre 2). Un très bon accord est obtenu pour un temps de relaxation électronique en champ nul, τ_{S0} = 130 ps. Cette valeur est proche de celle trouvée dans le cas de l'ACX (100 ps) et classe le complexe dans les composés à temps de relaxation électronique court. De nouveau, ceci est raisonnable en se basant sur de simples considérations de symétrie : le ligand BCX présente seulement un axe de symétrie C_7 qu'il perd en complexant le métal. Les valeurs sont regroupées dans le Tableau 3.19.

Tableau 3.19 : Comparaison des rapports des relaxivités théoriques et expérimentales à haut champ et en champ nul.

νI (MHz)	$r_1(0)/r1(\nu I)$ théorique	$r_1(0)/r_1(\nu I)$ expérimental
200	1,50	1,47
400	1,96	1,99
500	2,20	2,21

L'accord entre théorie et expérience est bon à 2% près. La valeur de τ_{S0} varie dans une gamme de 10% lorsque le diamètre de collision varie de 1,5 Å. Cette détermination permet donc bien de s'affranchir de l'incertitude due à la distance minimale d'approche.

A l'aide de tous ces paramètres, il est désormais possible de réaliser un ajustement du profil expérimental de relaxation en fonction du champ.

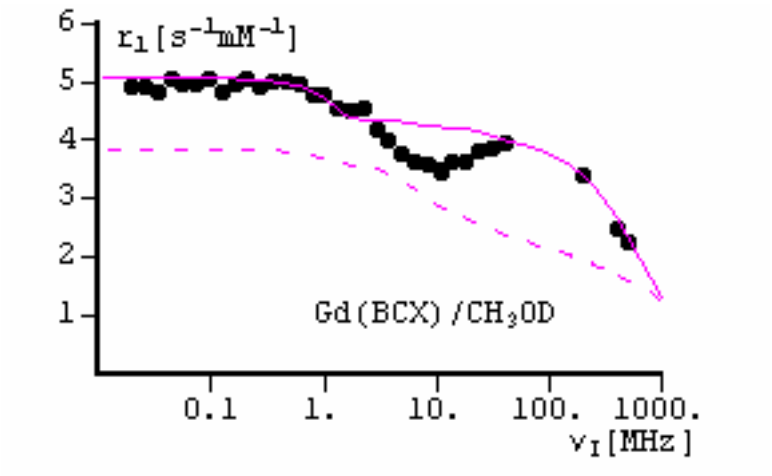


Figure 3.43 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité du méthanol dans D_2O avec a_{GdH} = 5 Å et τ_{S0} = 130 ps (pointillés) et en considérant des associations par liaisons hydrogène avec r_{ass} = 5 Å, τ_{ass} = 700 ps, qass = 0,035 et τ_R = 394 ps (ligne pleine).

Le seul paramètre ajustable est la distance minimale d'approche a_{GdH}. En donnant à a_{GdH} une valeur raisonnablement faible, a_{GdH} = 5 Å, la forme du profil n'est pas respectée et il y a une erreur de l'ordre de 20% entre les valeurs expérimentales et théoriques aussi bien à bas champ qu'à haut champ (Figure 3.43. courbe pointillée). Notons qu'en prenant une valeur de distance minimale d'approche de 4 Å, au-delà de la limite physique due à l'impénétrabilité des molécules, il est toujours impossible de reproduire la dispersion à haut champ.

Pour arriver à un ajustement meilleur (ligne pleine), il est nécessaire de considérer des associations de type liaisons hydrogène entre le complexe et la sonde méthanol. Ces liaisons hydrogène « retiennent » des molécules de méthanol à proximité du centre métallique et créent ainsi une deuxième sphère de coordination. Une représentation schématique est donnée Figure 3.44 dans le cas de molécules d'eau, mais le phénomène est exactement le même avec les molécules de méthanol.

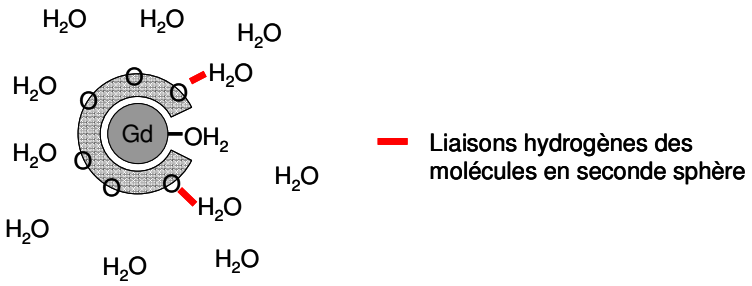


Figure 3.44 : Représentation schématique des associations par liaisons hydrogènes entre le complexe et l'eau, formant ainsi une deuxième sphère de « coordination ».

Pour définir complètement ces associations, il faut considérer un temps d'association τ_{ass}, une distance minimale d'approche entre le centre métallique et le proton de la sonde associée r_{ass}, et enfin un nombre de molécules associées q_{ass}. Ces trois paramètres sont ajustés afin de reproduire au mieux le profil expérimental : r_{ass} = 5 Å ; τ_{ass} = 700 ps, et q_{ass} = 0,034. Dans ce cas le nombre de molécules associées est très faible mais tout de même nécessaire à un bon ajustement des données expérimentales.

La validité du modèle utilisé est vérifiée par le calcul théorique de la relaxivité transversale. Ainsi à 200 MHz et 400 MHz, la théorie donne r_2 = 4,54 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ et r_2 = 4,18 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$, en très bon accord avec les valeurs expérimentales, 4,60 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ 4,13 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ respectivement (voir Tableau 3.18). L'erreur d'ajustement observée pour les champs intermédiaires vient des imperfections du modèle de mouvements et de relaxation électronique en fonction du champ.

Ces mesures sur la sonde méthanol ont donc permis de déterminer de façon indépendante un temps de relaxation électronique de 130 ps, et d'évaluer la contribution de sphère externe de cette sonde. La contribution pour l'eau ne sera pas la même, mais les paramètres dynamiques du complexe (τ_{S0}, τ_R, D^t, f^t) ont pu être validés par cette approche, et seront gardés par la suite.

♦ **Analyse du profil de relaxivité des protons de l'eau**

ü Relaxivité de sphère externe

Pour l'analyse de la relaxivité de l'eau, tous les paramètres précédents sont gardés, sauf le coefficient de diffusion du méthanol, qui est remplacé par celui de l'eau, et la distance minimale d'approche entre le Gd(III) et les protons de l'eau, a_{GdH}, car la molécule d'eau est plus petite que celle de méthanol. La valeur la plus petite physiquement acceptable est gardée, et a_{GdH} = 3,5 Å.

ü Relaxivité de sphère interne

Il n'y a qu'une seule molécule d'eau coordonnée au centre métallique (q = 1, mesuré par luminescence). r_{GdH} est fixée à 3,1 Å, distance classique observée pour les agents de contraste

usuels.[1] La vitesse d'échange des molécules d'eau est fixée à 5 ns, ce qui est très rapide par rapport aux valeurs de 100 ns trouvées pour les agents de contraste type DOTA ou DTPA.[1] Même avec cette valeur extrême de τ_m, il n'est pas possible d'ajuster le profil expérimental avec la théorie (voir la courbe pointillée Figure 3.45). Nous avons également essayé de donner à τ_R une valeur maximale (500 ps), et il y a toujours un écart d'un facteur 2 au moins entre expérience et théorie.

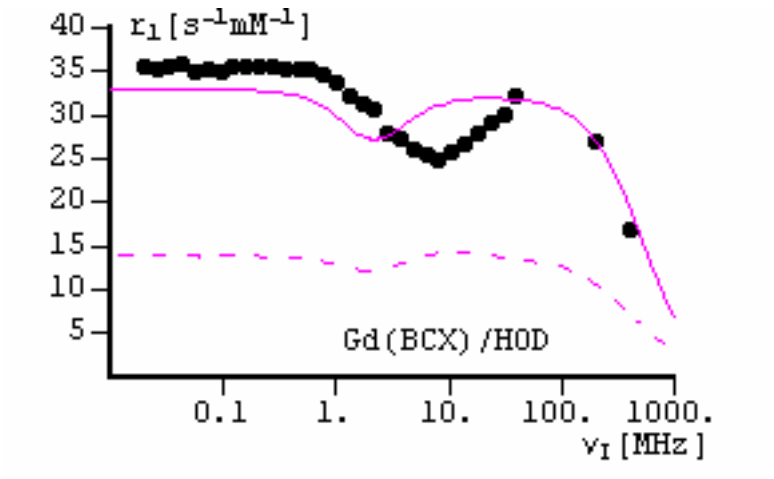


Figure 3.45 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité de HOD dans D_2O, q = 1, τ_M = 5 ns, τ_R = 394 ps, τ_{s0} = 130 ps, r_{GdH} = 3,1 Å (pointillés) et en considérant des associations par liaisons hydrogène avec q_{ass} = 6, τ_{ass} = 700 ps, r_{ass} = 5 Å (ligne pleine).

Pour arriver à un ajustement correct, il faut considérer des molécules d'eau en seconde sphère liées par liaisons hydrogènes sur le complexe à proximité du Gd(III). Comme précédemment, τ_{ass}, r_{ass} et q_{ass} sont ajustés pour obtenir une bonne reproduction du profil expérimental : q_{ass} = 6, τ_{ass} = 700 ps et r_{ass} = 3,8 Å (voir Figure 3.45 courbe pleine). Les liaisons hydrogènes sont plus fortes avec l'eau qu'avec le méthanol, ce qui se traduit par une valeur de q_{ass} beaucoup plus importante. Ceci est en accord à la fois avec la taille et la polarité des molécules.

Afin d'être critique sur la valeur du nombre de molécules d'eau présentes en seconde sphère, un calcul simple a été effectué. En prenant en compte le volume disponible pour les molécules d'eau sur une demi-sphère, de sorte que les hydrogènes soient à 3,8 Å du Gd(III), et la faible compacité de l'eau (η = 0,4), il est possible d'avoir au maximum 15 molécules d'eau. Une valeur de 6 est donc tout à fait raisonnable.

La validité du modèle est vérifiée par la comparaison des r_2 théoriques et expérimentaux. A 200 MHz, la théorie prédit 34,5 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ contre 38,6 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ expérimentalement, à

400 MHz, 30,9 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ contre 33,6 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ et enfin à 500 MHz, 29,4 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$ contre 31,1 $s^{-1}.mmol^{-1}.L$.

Des modifications significatives de l'ordre de 20% des paramètres q_{ass}, t_{ass} et r_{ass} se traduisent par une détérioration visible du profil de relaxivité théorique. Les paramètres sont donc précis à 20% près pour autant que la contribution de sphère interne ait été correctement estimée. Pour en être certain, nous envisageons de mesurer la vitesse d'échange des molécules d'eau liées au centre métallique par des expériences de RMN de l'oxygène ^{17}O comme les ont développées l'équipe de Merbach.[119] Enfin, le dernier paramètre qui pourra être accessible expérimentalement est le temps de corrélation rotationnelle du complexe. Cela demande une nouvelle synthèse de la molécule. En effet, l'idéal serait de deutérier les bras méthylcarboxylates afin de pouvoir réaliser ces mesures par RMN du deutérium.

IX. Conclusions et perspectives : les propriétés particulières et les mystères de ces complexes

La famille de ligands étudiée présente une chimie très complexe mais extrêmement riche. La complexité est principalement due à la labilité des complexes de Ln(III) formés, car la chimie manque cruellement d'outils d'étude pour ces systèmes spécifiques. Nous avons toutefois pu montrer que des mesures de relaxivité à haut champ permettent de mettre en évidence des interactions moléculaires fines en solution qui n'étaient pas décelées par d'autres méthodes d'analyse plus « classiques ».
La richesse de cette famille de ligands est mise en évidence par un simple changement de taille entre l'ACX et la BCX. Déjà au niveau des cyclodextrines natives, la β-cyclodextrine avait un statut particulier du fait du réseau de liaisons intramoléculaires développé. Ici l'accent est mis sur les importantes différences de propriétés des complexes formés avec l'ACX ou la BCX. Ainsi, les complexes formés avec l'ACX sont très sensibles à leur environnement alors que ce n'est pas le cas pour les complexes formés avec la BCX.

Les principaux mystères de ces complexes restent dans la compréhension au niveau moléculaire des interactions mises en jeu dans le système LnACX. Dans tous les cas, le

système reste très intéressant au niveau de la détection des alcalins. En effet, les alcalins sont des cations omniprésents dans les systèmes vivants. Le rôle du sodium et du potassium découle essentiellement de leur différence de concentration entre les milieux intra et extracellulaires et des processus de transport transmembranaires. La distribution des alcalins dans les compartiments intra et extracellulaires est cruciale pour l'ensemble des organismes vivants. Des développements récents ont montré un intérêt croissant pour des agents de contraste sensibles à leur environnement[120,121] ou pour l'utilisation de complexes de lanthanides comme sondes moléculaires pour la reconnaissance spécifiques d'alcalins.[122] Les complexes d'ACX présentent des potentialités dans ce domaine. En effet, grâce à ces complexes, la présence de K^+ en particulier peut être détectée par simple mesure de relaxivité.

La BCX présente un intérêt indéniable dans le domaine de la recherche IRM. Le complexe GdBCX présente à lui seul des relaxivités à 100 MHz comparables voire supérieures à celles de complexes greffés sur des macromolécules de masse moléculaires de 10 000 ou même 100 000 $g.mol^{-1}$.[1] Ce qui est particulièrement intéressant et prometteur, c'est que la relaxivité ne chute que très peu aux champs élevés. Or les développements actuels de l'IRM se dirigent vers les champs plus élevés pour gagner en résolution et sensibilité.
L'originalité de ces ligands par rapport aux polyaminocarboxylates usuels réside en la présence de nombreux oxygènes permettant la formation d'un réseau de liaisons hydrogène important. Ainsi le complexe hydrophile entraîne autour de lui tout un cortège de molécules d'eau.

Ces composés constituent donc une nouvelle classe de ligands permettant d'atteindre des relaxivités importantes. La faiblesse de ces derniers, en vue de l'application en tant qu'agents de contraste, est bien sûr leur stabilité. Si des images peuvent être réalisées *in vivo* sur l'animal, il n'est bien entendu pas question d'envisager un quelconque passage à l'homme. Il me semble toutefois intéressant de conserver les propriétés originales de la plate-forme cyclodextrine tout en augmentant la stabilité de ces complexes. Pour ce faire, une modification chimique devra être envisagée au niveau de l'oxygène portant le bras méthylcarboxylate. Ce bras pourra par exemple être remplacé par un bras méthylaminocarboxylate pour un gain en stabilité. L'idéal est que l'unité complexant le lanthanide(III) reste la plus proche possible de la cavité pour bénéficier de ces propriétés exceptionnelles.

4

Complexation des lanthanides(III) par un décapeptide cyclique

I. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE 189
I.1. La calmoduline : une protéine à Ca^{2+} attractive pour la complexation des Ln(III) *189*
I.2. Peptides et lanthanides(III) *190*
I.2.1. Sondes luminescentes 191
I.2.2. Résolution de structures RMN 193
I.2.3. Hydrolyse de l'ADN 194
I.2.4. Agents de contraste pour l'IRM 195
I.3. Le RAFT : un décapeptide cyclique pouvant être fonctionnalisé régiosélectivement *197*
I.4. Choix du peptide et objectifs *198*
I.5. Synthèse du peptide *200*
II. STRUCTURE ET FLEXIBILITE DU PEPTIDE LIBRE 201
II.1. Détermination de la structure par RMN *201*
II.1.1. Principe 201
II.2. Résultats *204*
II.2.1. Données expérimentales 204
II.2.2. Calcul de structure 207
III. ETUDE DE LA COMPLEXATION DES LANTHANIDES(III) 210
III.1. Résultats *210*
III.1.1. Mise en évidence de la complexation par RMN 210
III.1.2. Mesure des constantes d'affinité par luminescence 212
III.1.3. Détermination du nombre de molécules d'eau coordonnées au cation métallique 215
III.2. Discussion *216*
IV. PROPRIETES DE RELAXATION DU COMPLEXE PEPTIDIQUE 218
IV.1. Relaxivité à haut champ *218*
IV.2. Etude relaxométrique *219*
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 224

Cette partie décrit le développement et l'étude d'un nouveau ligand pour la complexation des Ln(III). Le ligand est constitué d'acides aminés, molécules biologiques naturelles composant les protéines et essentielles à la vie. L'étude se concentre sur un décapeptide cyclique synthétique, présentant quatre bras carboxylates. Après une présentation du contexte bibliographique dans lequel se situe le sujet, nous verrons quelle structure adopte le peptide en solution, et si elle est favorable à la complexation des Ln(III). Nous étudierons la complexation d'un point de vue thermodynamique et structural, avant d'envisager les propriétés de relaxation de ce complexe.

Remarque : La nomenclature des acides aminés à une ou trois lettres sera utilisée indifféremment dans ce chapitre. Les acides aminés naturels, leur nomenclature, ainsi que la numérotation des hydrogènes sont présentés dans l'annexe 4.

I. Contexte bibliographique

I.1. La calmoduline : une protéine à Ca^{2+} attractive pour la complexation des Ln(III)

La complexation des Ln(III) par des acides aminés est assez récente, puisque les premières études datent de la fin des années 1980. L'idée est d'exploiter les propriétés physiques exceptionnelles des Ln(III) (luminescence, magnétisme), et de les introduire en milieu biologique avec des ligands déjà adaptés à l'environnement et pouvant servir au ciblage des sites d'intérêt. Si les métaux de transition ou les alcalins sont très présents dans le corps humain, les Ln(III) en sont totalement absents. Comme le Ca(II) présente un rayon ionique similaire à celui des Ln(III), le jeu a été de substituer le Ca(II) des protéines à Ca(II) par les Ln(III), et d'étudier les complexes formés.

Le Ca(II) joue un rôle important, entre autre, dans la coagulation du sang, la contraction musculaire, ou le relarguage de neurotransmetteurs. La quantité de Ca(II) intracellulaire est régulée par une protéine : la calmoduline (CaM). Une élévation de la quantité de Ca(II) intracellulaire entraîne la formation d'un complexe Ca^{2+}-CaM qui peut interagir spécifiquement avec une centaine de protéines cibles, et moduler ainsi leur activité.[123]

La calmoduline est une protéine d'environ 150 acides aminés, et d'une masse molaire de 17000 $g.mol^{-1}$, pouvant lier jusqu'à 4, voire exceptionnellement 5 Ca(II). La protéine change de conformation lorsqu'elle lie le Ca(II), et prend une forme en « haltère », deux lobes, ou

domaines, séparés par une hélice α, représentée sur la Figure 4.1. Chaque domaine est en fait une poche hydrophobe permettant d'interagir spécifiquement avec les protéines cibles.

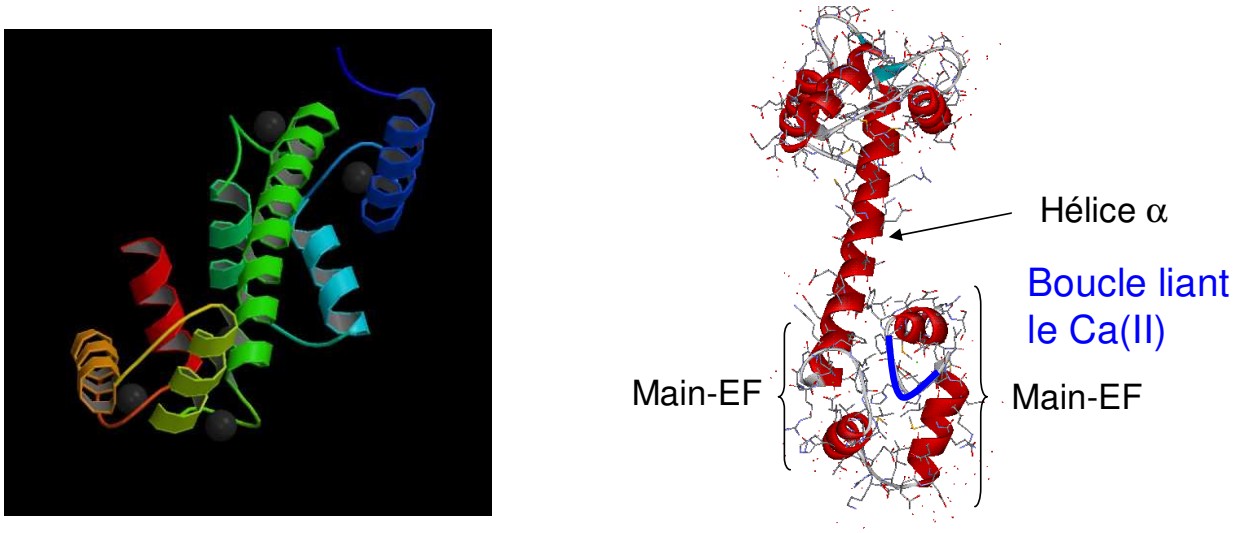


Figure 4.1 : Représentation en ruban de la structure de la calmoduline : (à gauche) avec les Ca(II) liés, (à droite) avec les chaînes latérales et les principaux motifs schématisés[124].

Chacun des lobes est constitué de deux motifs appelés main-EF. Ce motif, comportant environ trente acides aminés, est lui-même constitué de deux hélices α orthogonales (E et F, figurées respectivement par le pouce et l'index d'une main) et d'une boucle de 12 acides aminés qui lie le Ca(II) avec une affinité telle que $\log \beta_{110} \approx 6$. La sphère de coordination du Ca(II) est exclusivement oxygénée. En effet, les chaînes latérales des acides aminés des positions 1, 3, 5, 9 et 12 (trois aspartates monodentes, un glutamate bidente et une thréonine), ainsi qu'une molécule d'eau viennent lier le Ca(II).[124]

I.2. Peptides et lanthanides(III)

La structure de la boucle liant le Ca(II) dans la calmoduline a constitué le modèle de départ de nombreuses études consacrées à la complexation des Ln(III) par de petits peptides. Cette structure a été de plus en plus modifiée, suivant les applications spécifiques visées dans le domaine de la luminescence, de la résolution de structures RMN, de l'hydrolyse de l'ADN, et de l'IRM.

I.2.1. Sondes luminescentes

Les applications liées à la luminescence tirent toujours parti de l'effet antenne et mettent en jeu au moins un acide aminé avec une chaîne latérale contenant un groupement aromatique. Ils sont au nombre de quatre : l'histidine (H), la phénylalanine (F), la tyrosine (Y) et le tryptophane (W).

Les études menées par l'équipe de Szabo ont été consacrées à l'optimisation de la place et de la nature de l'acide aminé participant au transfert d'énergie de luminescence. Dans ce but, ils se sont appuyés sur une approche générique. Ils ont examiné les séquences de toutes les boucles de la main-EF connues dans le vivant, et en ont déduit la séquence consensus la plus commune : DKDGDGYIDFEE. Prenant en compte des résultats antérieurs montrant que le remplacement de l'Asp en position 3 par un Asn permettait d'augmenter l'affinité pour les Ln(III), de sorte que log β_{110}^{La} passe de 5,1 à 5,4,[125] et que le remplacement de l'Asp en position 9 par un Glu permettait d'augmenter l'intensité de luminescence,[126] ils ont étudié la séquence suivante : DK*N*GDGYI*E*FEE. La séquence examinée ne se limite cependant pas à ces seuls 12 acides aminés. En effet, pour minimiser les effets de charge sur les résidus 1 et 12, un acide aminé est ajouté à chaque bout de la boucle : une Gly est placée sur la partie N-terminale et une Leu sur la partie C-terminale. La séquence d'étude est finalement du type GDXNXDGXIEXEEL, les acides aminés X pouvant être le Trp, la Tyr, ou la Phe. Il a été montré que le transfert d'énergie le plus efficace sur le Tb(III) avait lieu avec le Trp en position 7. Cette position est en effet optimale car les deux partenaires ne sont situés qu'à 5 Å l'un de l'autre.[127] Ces boucles synthétiques insérées dans la protéine entière permettent de montrer à la fois une plus forte affinité de la boucle synthétique par rapport à la boucle naturelle pour le Tb(III), et une intensité de luminescence grandement accrue par rapport à celle observée sur la boucle seule (non incluse dans la protéine).[128]

Même si l'affinité de cette boucle pour les Ln(III) est meilleure que celle de la boucle naturelle, elle est encore loin d'être optimisée. Cela peut être pénalisant, puisque les Ln(III) vont pouvoir éventuellement se complexer sur d'autres sites de la protéine, avec un risque de dénaturation ou d'agrégation.

Le groupe d'Imperiali a alors choisi une approche différente : plutôt que d'insérer une boucle mutante à la place de la boucle naturelle dans la protéine, ils ont optimisé une séquence d'acides aminés pour la complexation des Ln(III) et additionné ce petit peptide de façon covalente à l'extrémité de la protéine d'intérêt (voir Figure 4.2).

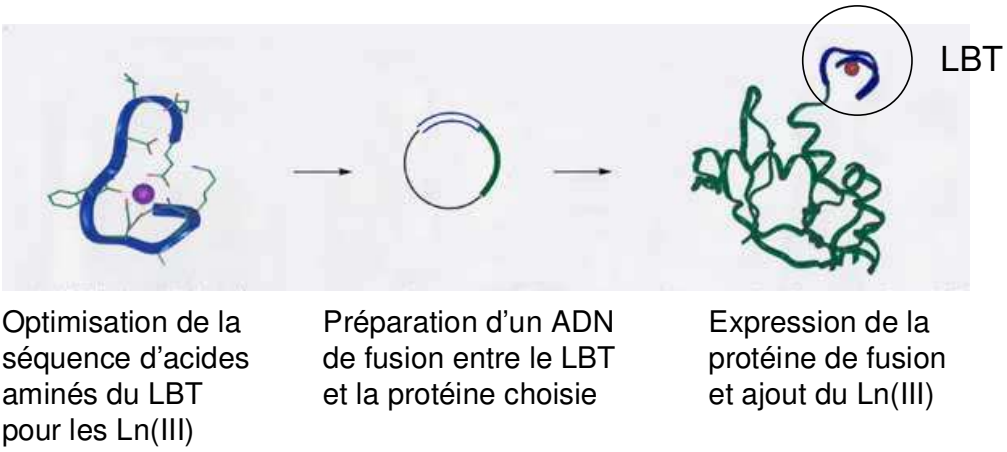


Figure 4.2 : Les LBT : optimisation pour la complexation des Ln(III), puis insertion de façon covalente à l'extrémité de la protéine d'intérêt.

Ces peptides spécifiques aux Ln(III) sont appelés des « marqueurs liant les lanthanides » ou LBTs, de l'anglais « lanthanide-binding tags ». Cette approche présente divers avantages :

- la séquence ajoutée à la protéine d'intérêt peut être surexprimée avec des méthodes standards biochimiques.
- le peptide ajouté est de petite taille (de 15 à 25 acides aminés seulement), ce qui permet de ne modifier que très peu la structure et la fonction de la protéine d'intérêt : ces LBTs ont été exprimés avec l'ubiquitin sans qu'il y ait d'altération de ses propriétés.[129]
- les LBTs sont des centres fonctionnels permettant toutes les applications propres aux Ln(III).

Les applications visées dans le cadre de la luminescence sont la localisation ou la quantification des protéines pour l'étude du protéome lorsqu'il n'existe pas de tests fonctionnels ou d'anticorps.[129]

La séquence peptidique de départ pour l'optimisation des LBTs s'inspire des travaux de Szabo, précédemment cités, et est de type : **D**X**N**X**D**X**W**X**E**XX**E**. Par exemple, le peptide de séquence DYNKDGWYEELE présente une affinité pour le Tb(III), telle que log β_{110} = 5,1. L'ajout d'acides aminés aux extrémités pour minimiser les effets de charge, ainsi qu'une optimisation progressive de tous les acides aminés de la séquence a permis d'obtenir le peptide suivant :[130]

YIDTNNDGWYEGDELLA log β_{110} = 7,2

La structure cristallographique du complexe de Tb(III) montre que le cation métallique est octacoordonné par les fonctions carboxylates des chaînes latérales de deux aspartates, d'une asparagine monodentés, par deux glutamates bidentés, et par le groupement carbonyle du squelette appartenant au Trp. Des mesures de nombre de molécules d'eau directement coordonnées au Tb(III) ont montré qu'il n'y avait pas d'eau dans la sphère de coordination, expliquant pourquoi l'intensité de luminescence est si importante (140 fois plus importante que la première génération de LBTs) et montrant que la sphère de coordination du Ln(III) est optimisée.[131]

D'autre part, l'introduction de ponts disulfures grâce à des cystéines bien positionnées dans la séquence (position 2 et 12) a permis d'obtenir un macrocycle préorganisé, présentant une affinité optimale pour le Tb(III) : $\log \beta_{110} = 8{,}7$.[130] La stabilité des complexes de Ln(III) obtenus est extrêmement sensible à la position des cystéines impliquées dans le pont disulfure.[132] Toutefois, l'introduction de cystéines peut gêner l'utilisation des peptides dans des systèmes sensibles aux conditions rédox.

I.2.2. Résolution de structures RMN

Un autre intérêt des Ln(III) est leur susceptibilité magnétique anisotrope due à leur paramagnétisme. Cette propriété peut être utilisée afin d'obtenir un faible alignement des molécules dans un champ magnétique extérieur. Cela permet de ne pas moyenner les couplages dipolaires à une valeur nulle, et ces couplages sont très utiles pour la résolution de structures et dynamique de protéines par RMN.

Les LBTs ont prouvé leur intérêt dans ce domaine puisqu'ils ont permis d'aligner une protéine de fusion (LBT-ubiquitine) dans un champ magnétique. Les métaux paramagnétiques, Tb(III), Dy(III) et Tm(III) ont été complexés à la protéine de fusion LBT-ubiquitine. Malgré les temps de relaxation courts de ces complexes, un grand nombre de signaux de l'ubiquitine sont encore visibles, et des mesures de contraintes de type couplages dipolaires résiduels ont pu être effectuées. La comparaison de données RMN avec des données cristallographiques a permis d'établir une bonne corrélation entre les deux, et de valider la méthode des LBTs pour de futures applications dans ce domaine.[133]

Les lanthanides (III) ont également été utilisés pour déterminer la structure en solution de peptides liés à une protéine humaine du cœur, la troponine, appartenant à la même famille que la calmoduline. La première étape du travail a consisté à déterminer combien de Ln(III) sont

liés à la troponine sur les sites habituels de complexation du Ca(II). Les spectres HSQC de corrélation des azotes ^{15}N avec les hydrogènes ^{1}H ont permis de suivre la disparition des signaux correspondant aux sites de liaisons des Ln(III). Il a pu être montré ainsi que le Ln(III) se lie d'abord sur le site du domaine N-terminal, avant ceux du domaine C-terminal. Par conséquent, il est possible d'obtenir une protéine métallée complexant un Yb(III) par sa partie N-terminale et deux Ca(II) par sa partie C-terminale. Le complexe Ca_2YbTroponine, mis en présence du peptide liant la troponine, a permis par mesure de couplages dipolaires résiduels d'obtenir la structure de ce peptide.[134]

I.2.3. Hydrolyse de l'ADN

Le clivage de l'ADN de façon sélective et efficace par des systèmes synthétiques est un domaine très prometteur puisqu'il trouve des applications dans le domaine de la chimiothérapie, ou des antibiotiques, pour bloquer la transcription d'un gène spécifique, et empêcher la prolifération de cellules malades. D'autre part, il s'agit d'un véritable challenge, car l'ADN est très résistant à l'hydrolyse dans les conditions physiologiques. Les Ln(III) et le Ce(IV) en particulier, qui sont des acides de Lewis durs possédant des nombres de coordination élevés, sont de très bons candidats pour l'hydrolyse de l'ADN.[135]

Les développements dans ce domaine se basent sur l'utilisation de deux motifs clés :

- le motif hélice-boucle-hélice (HTH) qui est un motif très fréquent pour la reconnaissance de l'ADN
- le motif main EF permettant de complexer les Ln(III)

Ainsi, le complexe CeP3W a prouvé son efficacité à couper l'ADN de façon sélective malgré sa petite taille, et en donnant des adduits régiosélectifs. Le peptide synthétique utilisé, P3W, est composé de 33 acides aminés, et sa séquence est la suivante :

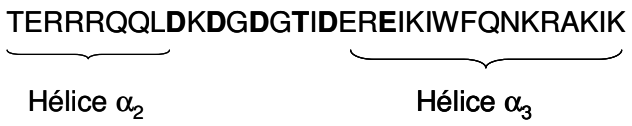


Figure 4.3 : Séquence du peptide P3W utilisé pour l'hydrolyse de l'ADN. La séquence est dérivée du motif HTH et de la boucle consensus liant le Ca(II) (motif main EF). Les résidus liant le Ca(II) sont représentés en gras.

Les constantes d'affinité de ce peptide pour l'Eu(III) et le Ce(IV) sont respectivement $\log \beta_{110} = 5{,}2$ et 5,4. Des études RMN ont montré que le peptide complexé par le Ln(III) conservait majoritairement les structures initiales main-EF et hélice-boucle-hélice.[136] Enfin, l'ADN étant clivé avec une certaine sélectivité sur les séquences, cela suggère que le motif HTH lie l'ADN avec une structure définie, et ne clive que des séquences choisies.[137]

I.2.4. Agents de contraste pour l'IRM

L'utilisation de peptides dans le domaine des agents de contraste est très attractive car elle permet à la fois de lier le complexe paramagnétique à des macromolécules biologiques (pour diminuer le temps de corrélation rotationnel et augmenter la relaxivité) et de cibler des sites d'intérêt.

Le complexe GdP3W est également un excellent candidat aux agents de contraste pour l'IRM lorsqu'il est lié à l'ADN. L'intérêt ici est que le Gd(III) est complexé au sein même du groupement cible de l'ADN (le motif HTH). Cela permet de diminuer la flexibilité interne de la molécule et d'atteindre des relaxivités plus élevées. Ainsi, la relaxivité mesurée à 20 MHz, 37 °C et pH 7,4 pour le complexe est 16,2 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$. Elle passe à 29,6 $mmol^{-1}.L.s^{-1}$ en présence d'ADN. Pour obtenir une différence de contraste similaire, il y a besoin de douze fois moins de Gd(III) avec le complexe GdP3W lié à l'ADN, qu'avec le complexe de GdDTPA. L'affinité du Gd(III) pour ce peptide est beaucoup trop faible pour envisager des applications en milieu biologique, mais ces expériences ouvrent le champ à une nouvelle classe d'agents de contraste bifonctionnels activés par leurs liaisons à l'ADN.[138]

Le ciblage reste cependant assez limité car les molécules cibles associées à des pathologies ne sont souvent présentes qu'à des concentrations insuffisantes pour être accessibles à l'IRM. Une des méthodes utilisées pour localiser une forte concentration d'agents sur ces cibles est d'exploiter les propriétés enzymatiques spécifiques du tissu visé pour convertir un agent IRM qui serait « silencieux » en un agent actif. Les peptides sont des ligands de choix puisqu'ils sont reconnus comme des entités naturelles par les enzymes.

Dans cette perspective, un agent de contraste pouvant être coupé par une enzyme humaine, la carboxypeptidase B ou TAFI, a été imaginé. Cette enzyme empêche la dégradation de caillots de sang en coupant les lysines C-terminales, normalement reconnues par les protéases naturelles. L'agent de contraste utilisé comporte quatre parties (voir Figure 4.4) :

- un groupe liant le Gd(III) avec une forte affinité (DTPA)

- une glycine (groupe de liaison)
- un groupe pouvant lier l'albumine de sérum humain (HSA)
- un groupement chargé composé de trois Lys ayant une faible affinité pour la HSA.

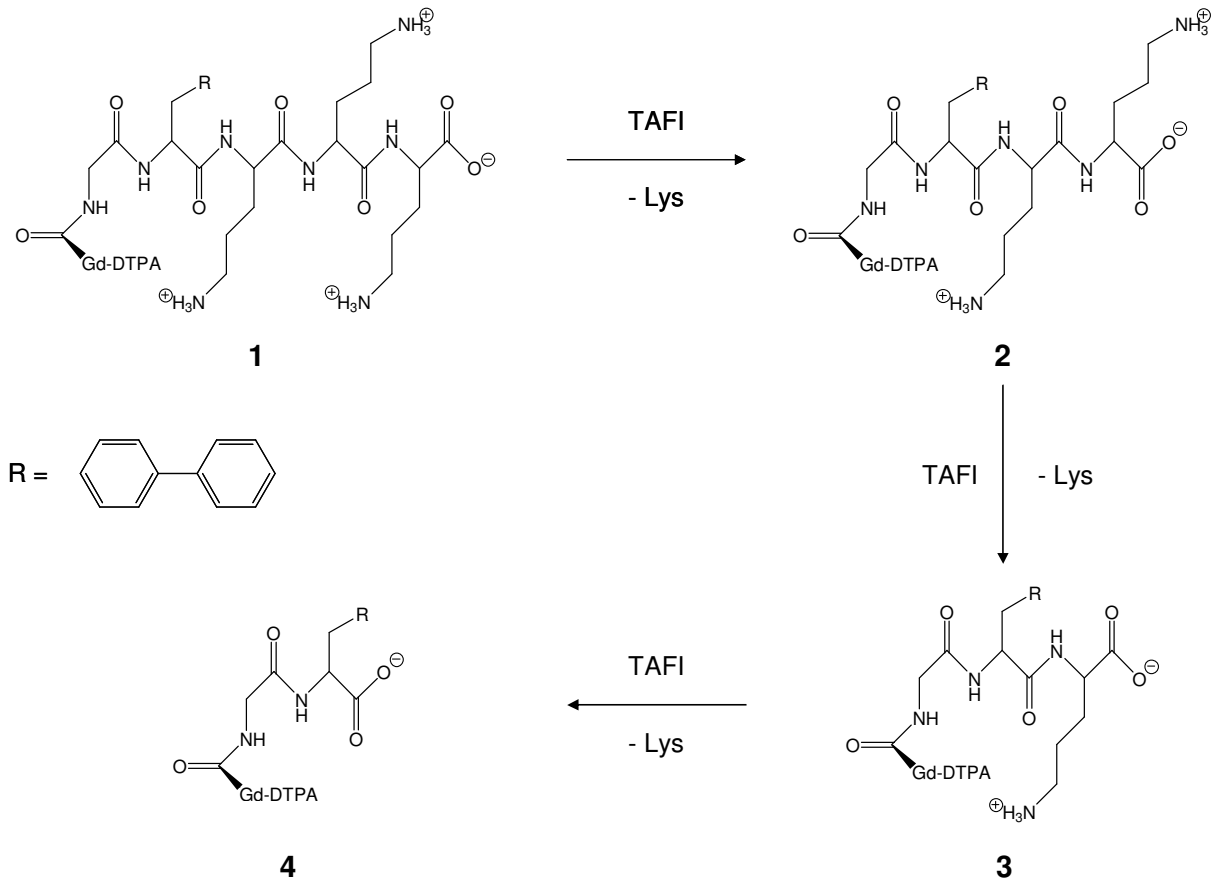


Figure 4.4 : Un agent de contraste biologiquement actif : un partie complexante, le DTPA, est liée à un acide aminé modifié liant l'albumine de sérum humain (HSA), qui peut être masqué par des Lys défavorisant la liaison à la HSA. L'activation de l'enzyme permet de cliver les Lys et de permettre l'interaction avec la HSA.

Le composé 1 se lie peu à la HSA, alors que le composé 4, dépourvu des 3 Lys par coupure de l'enzyme, se lie très bien à cette protéine. En l'absence de HSA, la relaxivité des protons de l'eau en présence des composés 1 et 4 est similaire. Cependant, en présence de HSA, la relaxivité en présence du composé 4 est augmentée de 30% par rapport à celle observée en présence du composé 1, grâce à une plus forte affinité du composé 4 pour la HSA (voir Tableau 4.1).[139]

Tableau 4.1 : Relaxivités à 20 MHz et 24 °C en absence et en présence de HSA.

Composé	r_1 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$) PBS*	r_1 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$) HSA
1	8,4	15,2
4	8,3	19,2

* Tampon phosphate salé (10 $mmol.L^{-1}$ de phosphate de sodium, 150 $mmol.L^{-1}$ de NaCl, pH 7,4)

Ainsi, ce système composé de peptides montre la possibilité de détecter une enzyme associée à une pathologie particulière.

I.3. Le RAFT : un décapeptide cyclique pouvant être fonctionnalisé régiosélectivement

La chimie des peptides et des Ln(III) est donc très riche puisqu'elle permet de cibler au mieux les protéines d'intérêt pour les applications dans le domaine biologique. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la complexation des Ln(III) par un décapeptide cyclique issu de la famille des RAFT (Regioselectively Addressable Functionnalized Templates). Ces molécules présentent deux motifs XPGX, comportant une proline et une glycine, et qui se structurent préférentiellement en coude β. Les six autres acides aminés de la molécule peuvent être substitués de façon régiosélective grâce à des protections orthogonales des chaînes latérales des peptides.[140] Ces molécules présentent une conformation préférentielle de type rectangulaire, ou étendue. Dans cette conformation, le cycle peut être considéré comme quasi-plan, avec deux faces différentes et les chaînes latérales des acides aminés présents dans le cycle sont préorientées, comme le montre la Figure 4.5.[141]

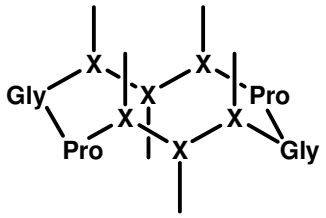


Figure 4.5 : Préorganisation des chaînes latérales dans les peptides de type RAFT.

Il a toutefois été montré plus récemment, que même s'il y a une préorganisation au sein de ces peptides, il existe une certaine flexibilité, dépendante de la nature des chaînes latérales (voir figure 4.6).[142]

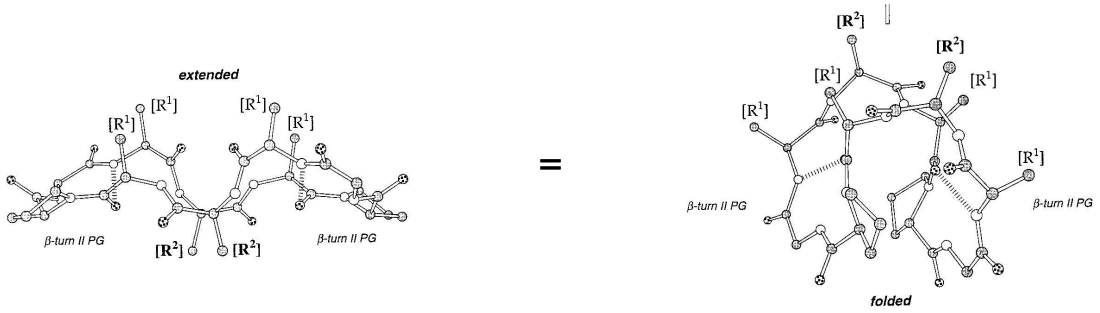


Figure 4.6 : Représentation de l'équilibre conformationnel entre les formes rectangulaire étendue (extended) et repliée (folded) des RAFTs.[142]

Les RAFTs ont déjà été utilisés comme gabarits pour l'assemblage de protéines synthétiques. Ils ont trouvé des applications dans le domaine de la détection de cations métalliques ou d'anticorps. Une des deux faces du RAFT est utilisée pour fixer la molécule sur une couche d'or, la deuxième sert à la détection. Dans le cas de la détection des cations métalliques, ce sont des résidus His qui complexent le Ni(II), alors que pour la détection d'anticorps, des antigènes spécifiques sont greffés sur le RAFT.[143]

I.4. Choix du peptide et objectifs

Nous nous sommes intéressés à un décapeptide cyclique acide, que nous noterons **PA** par la suite, et qui présente deux motifs XPGX. Ce ligand est composé de quatre acides aminés contenant des chaînes latérales acides (aspartate et glutamate) pour la complexation du Ln(III), ainsi que d'un Trp, dans le but de faire des analyses par luminescence. Enfin, pour lui conférer une meilleur solubilité, le peptide contient un acide aminé chargé, l'arginine. Le peptide **PA** a pour séquence c(GEWDPGDREP), et est représenté Figure 4.7

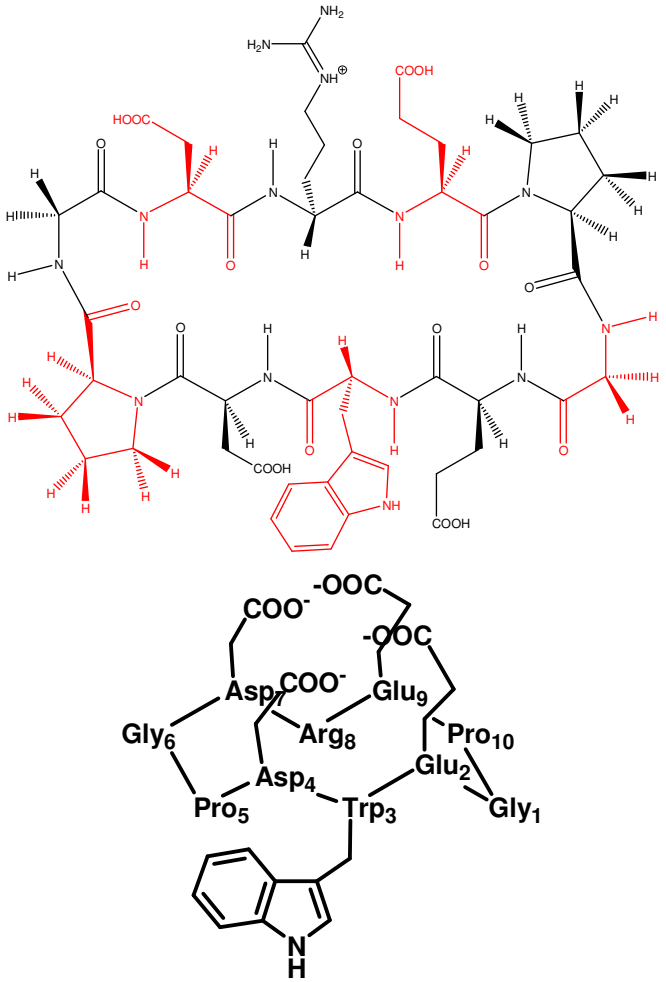


Figure 4.7 : Représentation chimique (haut) et schématique du peptide PA dans la conformation étendue (seules certaines chaînes latérales sont représentées) (bas).

Notre but ici est d'évaluer la complexation des Ln(III) par ce premier peptide, afin de voir si ces structures cycliques sont adaptées pour la complexation des Ln(III). Cette étude est en fait le début d'un projet à plus long terme visant à synthétiser des molécules bifonctionnelles (une fonctionnalité pour l'application recherchée et une fonctionnalité pour le ciblage de certaines protéines, ou de certains tissus) présentant des applications dans le domaine de la luminescence ou des agents de contraste pour l'IRM.

Ce projet est l'objet de plusieurs collaborations. Olivier Sénèque a réalisé la synthèse du peptide au laboratoire en collaboration avec l'équipe de Pascal Dumy (Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, UMR5616 Grenoble). Le calcul de structures a été réalisé en collaboration avec Serge Crouzy (Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5090, CEA Grenoble).

I.5. Synthèse du peptide

La synthèse du peptide se déroule en deux étapes : (1) obtention du peptide linéaire, (2) cyclisation.

La synthèse du peptide linéaire est une synthèse classique sur support solide, ce qui permet de neutraliser la partie C-terminale pour la réaction de couplage, et d'éliminer les réactifs excédentaires par lavage, après chaque étape. Les acides aminés protégés sur leur partie N-terminale par un groupement Fmoc (9-Fluorenylméthyloxycarbonyle) sont ajoutés un à un. La réaction de couplage est activée par la présence de PyBOP (Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate). Elle est suivie par une étape de déprotection du groupement N-terminal de l'acide aminé ajouté, avant le couplage suivant (voir Figure 4.8).

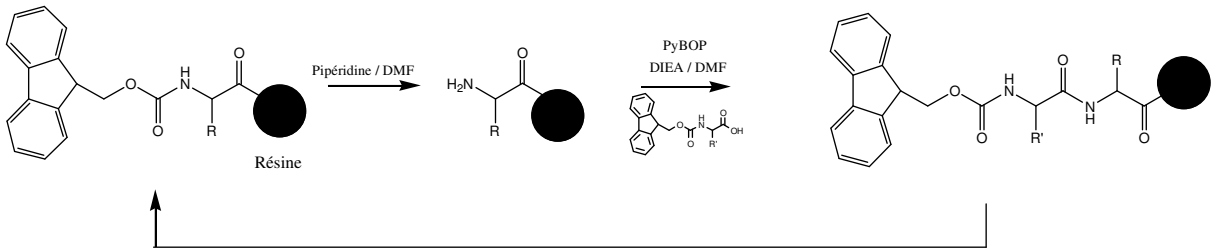


Figure 4.8 : Réaction de déprotection, puis de couplage avec un autre acide aminé protégé.

Le peptide linéaire est synthétisé en utilisant des acides aminés protégés sur les chaînes latérales lorsque cela est nécessaire, afin d'éviter toute réaction sur celles-ci. Le peptide est ensuite détaché de la résine en milieu acide doux (1% d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane). Il est cyclisé en milieu dilué, pour éviter la formation de dimères, dans le diméthylformamide. Pour terminer, le peptide cyclique est totalement déprotégé en milieu acide fort (90% d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane). Le schéma général de la synthèse est représenté Figure 4.9.

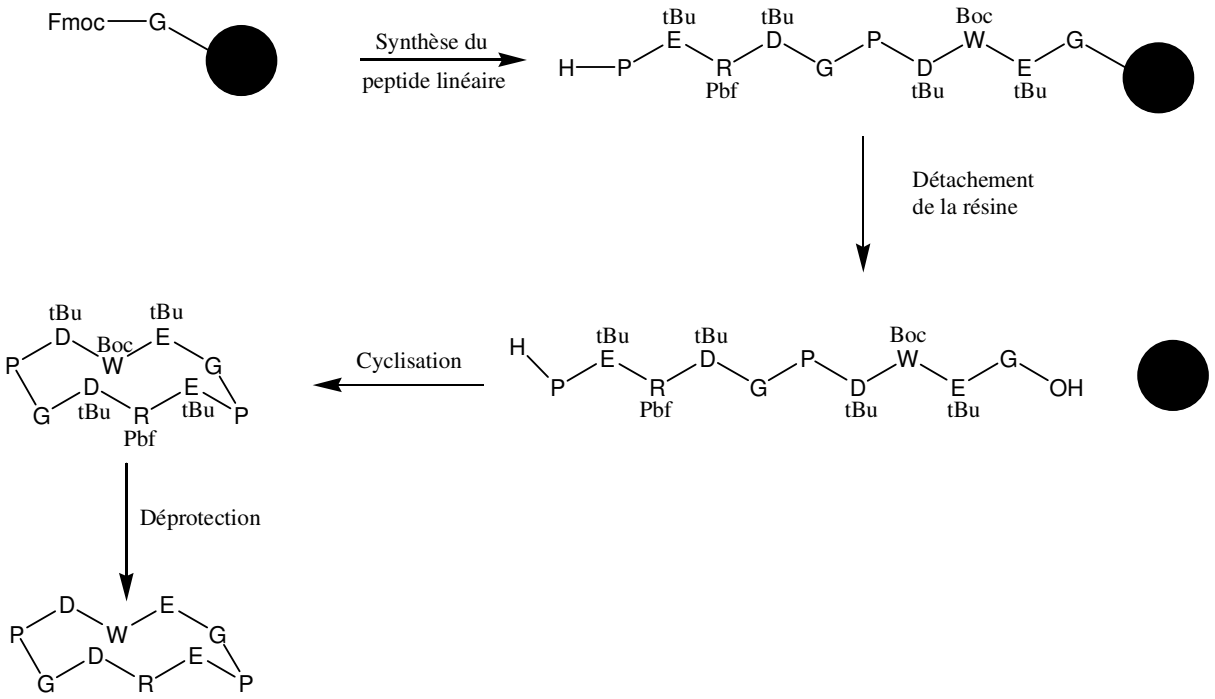


Figure 4.9 : Schéma de synthèse du peptide cyclique c(GEWDPGDREP).

Après purification par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), le peptide est obtenu sous forme acide : les quatre chaînes latérales des Asp et des Glu sont protonées. Le solide obtenu est également hydraté (environ 30% d'eau).

Les premières études effectuées ont concerné la structure du peptide libre, afin d'évaluer son degré de préorganisation, et donc ses chances de complexer les Ln(III).

II. Structure et flexibilité du peptide libre

II.1. Détermination de la structure par RMN

I.1.1. Principe

La structure du peptide libre en solution a été déterminée par des expériences RMN dans un mélange H_2O/D_2O 90/10. Il est impératif de travailler dans l'eau légère, même si une suppression du signal de l'eau est nécessaire, sinon tous les signaux des protons amides échangeables disparaissent, et l'attribution du spectre devient très difficile. La détermination

de la structure se passe en deux temps : d'abord une attribution de la fréquence de résonance de chacun des hydrogènes de la molécule par une séquence de type TOCSY, puis des détermination de distance par une séquence de type NOESY.

L'expérience TOCSY met en évidence les couplages scalaires *J* et permet d'attribuer les protons appartenant à un même acide aminé. Les mesures de couplages dipolaires (NOESY) permettent de mettre en évidence les spins proches spatialement ($d_{HH} < 5$ Å) et ainsi d'identifier l'enchaînement des acides aminés.

Le couplage dipolaire entre deux protons est également dépendant de la distance entre les deux noyaux considérés, ce qui permet de déterminer la structure de la molécule. C'est la base de l'effet NOE. Toutefois, dans ce cas précis (comme pour les cyclodextrines), une expérience NOESY n'apporte que très peu d'informations car $\omega\tau_C$ est de l'ordre de 1 (τ_C temps de corrélation du mouvement moléculaire et ω, sa fréquence), et l'effet NOE est quasiment nul. L'expérience ROESY (NOESY dans le repère tournant) constitue une bonne alternative à ce problème, comme nous l'avons vu dans le chapitre 3.

Cependant, le transfert d'aimantation peut avoir lieu soit par le couplage dipolaire, soit par le couplage scalaire (transfert d'aimantation HOHAHA). Il faut donc arriver à annuler tout transfert de type HOHAHA pour déterminer des distances de façon correcte. Cette condition est dépendante d'un paramètre expérimental : l'angle θ entre le champ magnétique statique et le champ effectif dans le repère tournant (équation 4.1).

$$\tan\theta = \frac{\omega_1}{\Delta} \qquad \textbf{équation 4.1}$$

où ω_1 est l'amplitude du champ radiofréquence effectif appliqué et Δ est la distance entre la fréquence du champ effectif et le centre de la fenêtre spectrale.

Il a été démontré que pour $\theta < 60$ °, les transferts d'aimantation via le couplage scalaire sont négligeables, et qu'un angle de 45 ° permet d'obtenir un résultat optimal.[100,101] Cela signifie que l'amplitude du champ effectif et la distance entre la fréquence du champ effectif et le centre de la fenêtre spectrale sont égales. Enfin pour que l'expérience soit quantitative et que les artéfacts soient minimisés, le champ effectif doit être appliqué alternativement à haut champ et bas champ, et de sorte que :[100]

$$\Delta = 1{,}5\delta \qquad \textbf{équation 4.2}$$

où δ représente la demi largeur spectrale.

Pour résumer, l'expérience réalisée est une t-ROESY (voir Figure 4.10) dans laquelle le champ radiofréquence est appliqué alternativement à bas et haut champ avec l'amplitude et la fréquence désirées. Le temps de mélange τ_m est ajustée à 300 ms dans le cas du peptide étudié.

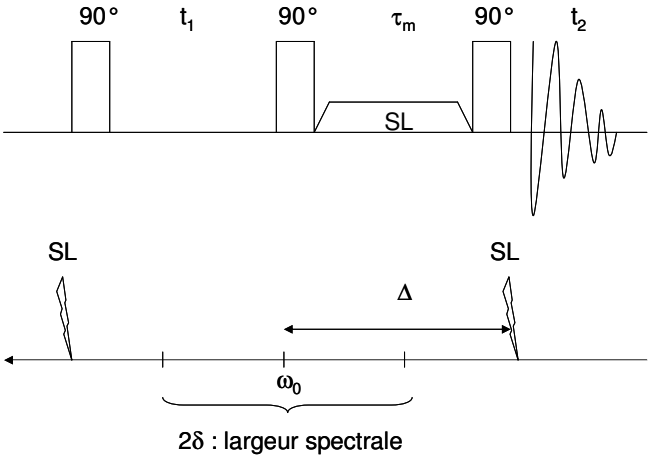


Figure 4.10 : Séquence d'impulsions de l'expérience t-ROESY (en haut), et représentation schématique de la fenêtre et des paramètres importants pour la séquence.

L'intégration des taches de corrélation permet d'obtenir des distances de façon quantitative d'après la relation de proportionnalité suivante : $I \propto \frac{1}{r^6}$. Les intensités sont calibrées d'après six distances fixes et connues, qui sont listées dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Distances de référence utilisées pour le calcul de la structure

H1/H2	r (Å)
Trp Hε1/Hδ1	2,58
Trp Hε1/Hζ2	2,84
Pro5 Hα/Hβ1	2,3
Asp7 Hβ1/Hβ2	1,8
Trp3 Hβ1/Hβ2	1,79
Pro10 Hδ1/Hδ2	1,82

Les distances calculées sont ensuite moyennées d'après l'ensemble de ces valeurs de référence, et une erreur de 15% sur la moyenne est tolérée. De plus, pour les groupements

méthyles et méthylènes non stéréospécifiquement attribués, une marge supplémentaire de 0,7 Å a été tolérée.[144]

II.2. Résultats

I.2.1. Données expérimentales

Les expériences RMN de type TOCSY et t-ROESY ont permis de proposer l'attribution reportée dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Déplacements chimiques (δ en ppm) des protons du peptide PA par RMN à 500 MHz dans H_2O/D_2O 9/1 à 298 K.

Résidu	HN	Hα	Hβ	Autres
Gly 1	8,23	3,91 ; 3,60		
Glu 2	7,64	4,23	1,91 ; 1,73	$CH_2(\gamma)$: 2,12
Trp 3	8,16	4,59	3,27 ; 3,11	$H\varepsilon_1$:10,01 ; $H\delta_1$:7,12 ; $H\varepsilon_3$:7,52 ; $H\zeta_3$:7,03; $H\eta_2$:7,7 ; $H\zeta_2$:7,38
Asp 4	7,78	4,71	2,69 ; 2,50	
Pro 5		4,16	2,18 (*pro-R*); 1,95 (*pro-S*)	$CH_2(\gamma)$: 1,85 (*pro-S*); 1,82 (*pro-R*); $CH_2(\delta)$: 3,53
Gly 6	8,39	3,86 ; 3,75		
Asp 7	7,75	4,59	2,85 ; 2,68	
Arg 8	8,34	4,10	1,79 ; 1,66	$CH_2(\gamma)$:1,48 ; $CH_2(\delta)$:3,53 ; HN(ε) :7,07
Glu 9	7,76	4,62	1,95 ; 1,69	$CH_2(\gamma)$: 2,31
Pro 10		4,20	2,19 (*pro-R*) ; 1,79 (*pro-S*)	$CH_2(\gamma)$: 1,95 ; 1,89 ; $CH_2(\delta)$: 3,70 (*pro-S*); 3,59 (*pro-R*)

Soixante dix contraintes NOE ont été mesurées, parmi lesquelles il n'y a aucune contrainte à longue distance, et seulement trois contraintes entre des hydrogènes appartenant à un acide aminé i et à un acide aminé i + 2. Or, dans les systèmes rigides, il existe un nombre important de contraintes NOE à longue distance entre des acides aminés i et i + 3, voire i + 4. Cette absence est donc signe que le peptide est peu rigide.

D'autre part, les constantes de couplage scalaire à trois liaisons $^3J_{HN,H\alpha}$ sont reliées à l'angle de torsion ϕ (CNCαC) d'après la relation de Karplus (Figure 4.11).

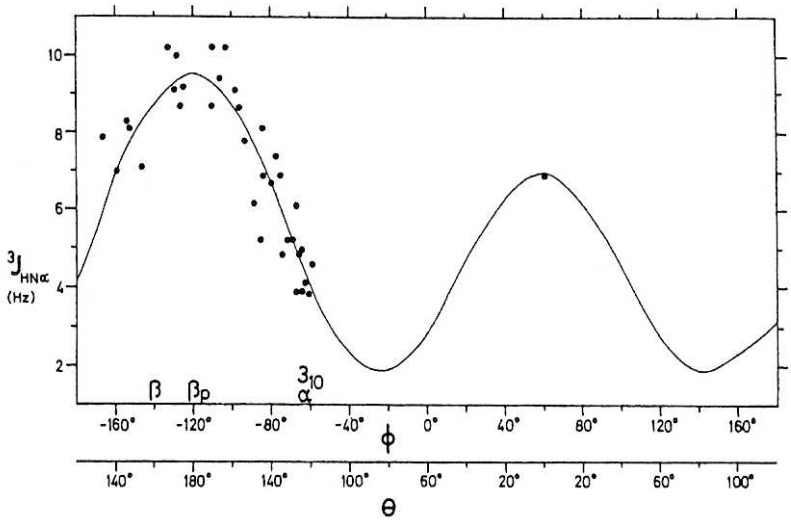


Figure 4.11 : Tracé de $^3J_{HN,H\alpha}$ en fonction de l'angle de torsion ϕ. ϕ a été obtenu à partir de structures cristallines alors que les couplages scalaires ont été obtenus à partir d'études en solution. Les structures secondaires reliées aux valeurs de ϕ sont également indiquées.

Les mesures de ces constantes sont donc un complément d'information important pour l'étude de la conformation du squelette dans les peptides. Les valeurs de constantes de couplage $^3J_{HN,H\alpha}$ inférieures à 6 Hz correspondent à des angles ϕ compris entre -90 et -40 ° et sont caractéristiques d'une hélice α. Les valeurs de constantes de couplage $^3J_{HN,H\alpha}$ supérieures à 8 Hz correspondent à des angles ϕ compris entre -180 et -120 ° et sont caractéristiques de feuillets β. Les valeurs de constantes de couplage qui se trouvent dans la zone 6-8 Hz ne permettent pas d'imposer de valeurs pour l'angle ϕ.[144] Les valeurs de constantes de couplage $^3J_{HN,H\alpha}$ mesurées pour les acides aminés composant le peptide PA sont reportées dans le Tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Constantes de couplage $^3J_{HN,H\alpha}$ (Hz) pour le peptide PA dans H_2O/D_2O 9/1 à 298 K.

Glu 2	Trp 3	Asp 4	Asp 7	Arg 8	Glu 9
8,2	7,2	7,4	7,7	7,4	8,1

Parmi les 6 constantes mesurées, seules 2 ne se situent pas dans la zone 6-8 Hz, ce qui peut être synonyme de flexibilité. Les angles ϕ des Glu 2 et 9 sont imposés entre -80 et -160 ° pour

le calcul de la structure. Ces acides aminés entourent le motif Pro10-Gly1 qui se structure préférentiellement en coude β en solution. Il semble donc que le coude Pro10-Gly1 soit plus rigide que le coude Pro5-Gly6.

Cependant, l'absence de contraintes NOE longue distance, combinée à l'absence d'angles caractéristiques de motifs bien définis suggèrent que le peptide libre n'adopte pas une conformation bien définie en solution.

Au niveau de la structure des enchaînements XPGX', d'après la conformation observée pour les sytèmes RAFT, deux coudes β de type II sont attendus.[141]

Le coude β de type II est caractérisé par trois distances :

- distance entre NH(Gly) et Hα(Pro) : 2,2 Å,
- distance entre NH(Gly) et NH(X) : 2,4 Å,
- distance entre Hα(Pro) et NH(X) : 3,3 Å.

Il existe un deuxième type de coude, le coude β de type I, se différenciant du type II par un changement de direction de la liaison NH de la Gly (voir Figure 4.12). Les distances caractéristiques de ce coude sont les suivantes :

- distance entre NH(Gly) et Hδ(Pro) : 2,6 Å,
- distance entre NH(Gly) et NH(X) : 2,4 Å,
- distance entre Hα(Pro) et NH(X) : 3,6 Å.

Ces deux coudes se différencient donc principalement par une courte distance NH(Gly)-Hα(Pro) pour le type II et une courte distance NH(Gly)-Hδ(Pro) pour le type I.[145]

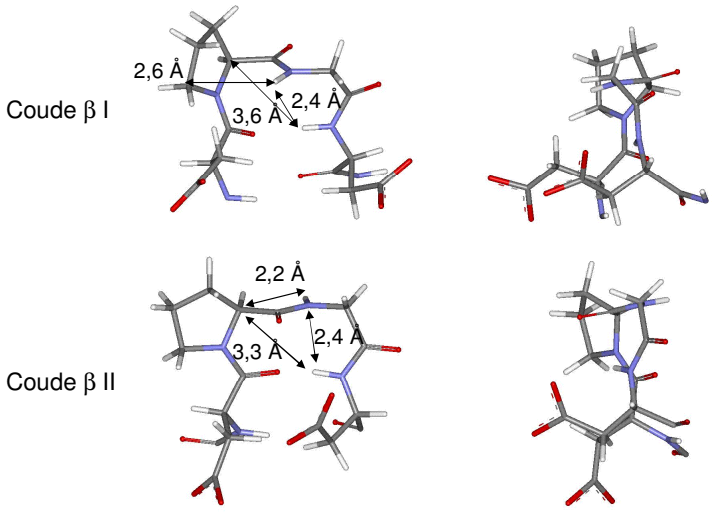


Figure 4.12 : Coudes β de type 1 (en haut), et de type 2 (en bas), et des distances caractéristiques.

Les distances observées expérimentalement pour chacun des coudes sont regroupées dans le Tableau 4.5.

Tableau 4.5 : Distances expérimentales (Å) mesurées pour PA dans H_2O/D_2O 9/1 à 298 K. $d(H1,H2)_{min}$ et $d(H1,H2)_{max}$ sont les limites hautes et basses des distances utilisées pour le calcul XPLOR.

H1	H2	d(H1,H2)	$d(H1,H2)_{min}$	$d(H1,H2)_{max}$
Pro 10 Hα	Gly 1 HN	2,02	1,72	2,32
Glu 2 HN	Gly 1 HN	2,79	2,38	3,21
Pro 10 Hα	Glu 2 HN	2,93	2,49	3,37
Pro 5 Hα	Gly 6 HN	2,1	1,78	2,41
Asp 7 HN	Gly 6 HN	2,54	2,16	2,92
Pro 5 Hα	Asp 7 HN	3,12	2,65	3,59
Pro 5 Hδ	Gly 6 HN	2,86	2,43	3,99

Pour le motif Pro10–Gly1, toutes les distances caractéristiques d'un coude β de type II sont mesurées, et nous n'observons pas de corrélation ROE entre Pro10(Hδ) et Gly1(HN). Ce coude est donc bien défini comme un coude β II. Par contre, pour le coude Pro5–Gly6, une distance caractéristique d'un coude β de type II entre Pro5(Hα) et Gly6(NH), et une distance caractéristique d'un coude β de type I entre Pro5(Hδ) et Gly6(NH) sont observées simultanément. Ceci est probablement dû à un équilibre conformationnel entre un coude β de type I et un coude β de type II comme cela a déjà été observé pour les RAFT.[142] Afin de mieux caractériser le peptide en solution, la structure a été raffinée à partir des contraintes de distance NOE et d'angles dièdres précédemment définies, avec le programme XPLOR en suivant un protocole standard de minimisation et recuit simulé.[146,147]

I.2.2. Calcul de structure

Le calcul de minimisation fournit les 17 structures de plus basses énergies dans lesquelles seule une distance NOE est violée à plus de 0,5 Å.

L'ensemble de ces structures est représenté Figure 4.13.

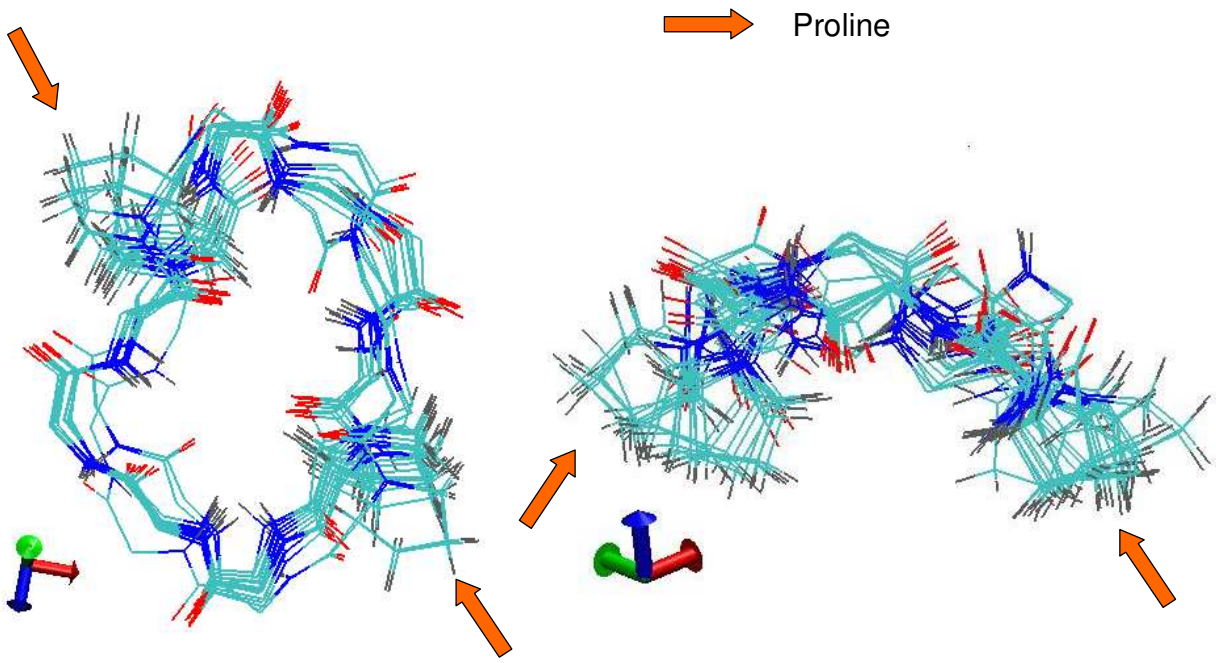


Figure 4.13 : Superposition du squelette des 17 structures de plus basses énergies vue de haut (gauche) et de profil (droite).

Ces images sont caractéristiques d'une dynamique en solution puisque l'ensemble des structures n'est pas parfaitement superposable. Au sein de ces structures de plus basse énergie, il y a toujours le coude β de type II bien défini, formé par la Pro10 et la Gly1. Le groupement carbonyle du Glu9 et le groupement NH du Glu2 pointent l'un vers l'autre ($\theta = 140°$) et, même si la distance O-H est trop grande (3,1 Å), il est raisonnable de supposer que la liaison hydrogène s'établit de temps à autre entre ces deux atomes. Le deuxième coude, Pro5-Gly6, est beaucoup moins bien défini. En effet, nous avons vu que les contraintes expérimentales sont caractéristiques d'un coude β de type II, et d'un coude β de type I simultanément. Le programme XPLOR traite ces données contradictoires en essayant de minimiser au mieux l'énergie totale, et ainsi, la conformation la plus favorable est celle qui donne un coude proche de βI en violant la distance Pro5(Hα) et Gly6(NH). Pourtant il est évident que des conformations avec un coude βII sont également présentes à la vue des données expérimentales. Mais aucun des conformères ne peut satisfaire à lui seul ces 2 distances inter-protons. Il est donc nécessaire de faire appel à la notion d'équilibre en solution entre deux formes extrêmes, le coude βI et le coude βII comme cela a déjà été montré précédemment par calculs de dynamique moléculaire sur un autre décapeptide cyclique.[142]

D'autre part, en regardant l'ensemble des conformères, on distingue deux sous-familles présentes : une famille « extended » ou rectangulaire et une famille « folded » ou repliée. Ces deux familles se distinguent essentiellement par la position des chaînes latérales par rapport au plan moyen du cycle. Dans la famille rectangulaire, les chaînes latérales des 4 aspartates et glutamates sont au dessus du plan moyen du cycle, alors que les chaînes latérales du tryptophane et de l'arginine sont en dessous. Dans la famille repliée, les chaînes latérales de deux glutamates ainsi que d'un aspartate et de l'arginine sont au dessus du plan moyen du cycle, alors que celles du tryptophane et du dernier aspartate sont en dessous (voir Figure 4. 14). Ceci montre encore une fois la flexibilité de ce peptide et est en accord avec les observations de la littérature.[142]

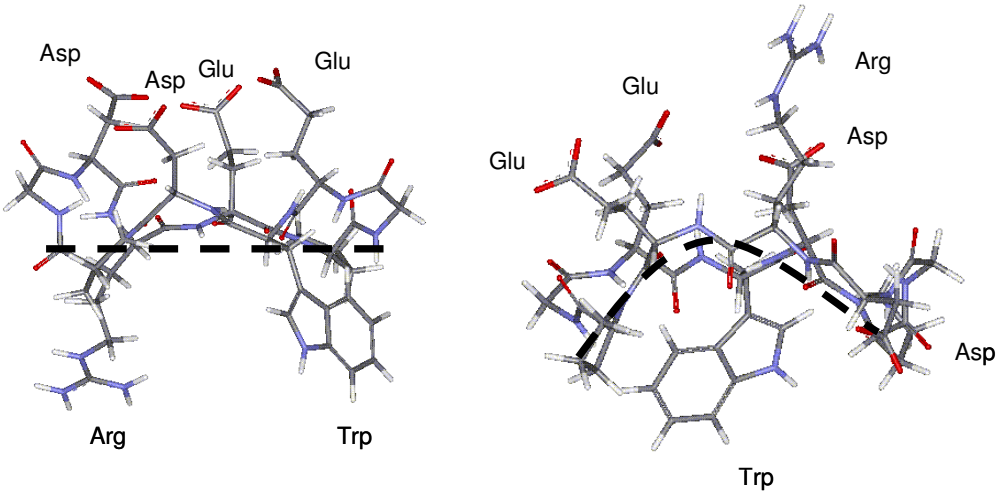


Figure 4. 14 : Représentation des deux conformations présentes en solution : rectangulaire (à gauche), et repliée (à droite).

La conformation souhaitée pour complexer les cations métalliques est bien entendu celle présentant les quatre fonctions carboxylates du même côté du plan moyen du cycle. L'orientation des chaînes latérales des 17 structures de plus basse énergie est représentée Figure 4.15. Les flèches rouges montrent les orientations des chaînes ne changeant pas de position au cours de l'équilibre conformationnel, alors que les flèches oranges symbolisent le mouvement de la chaîne latérale de l'acide aminé Asp 7.

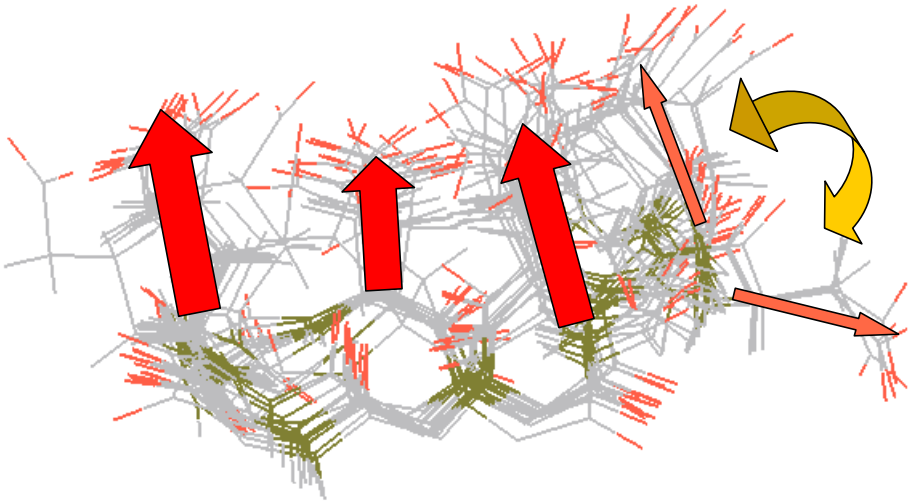


Figure 4.15 : Représentation du squelette ainsi que des chaînes latérales contenant les fonctions carboxylates et orientation de ces fonctions (les flèches oranges témoignent de l'équilibre entre les deux conformations).

Malgré cet équilibre conformationnel, il est clair d'après la figure précédente, que le peptide présente tout de même une bonne préorganisation pour complexer le lanthanide. Pour confirmer ces données, nous avons regardé la complexation des Ln(III) par ce peptide à la fois de façon qualitative par RMN et de façon quantitative par luminescence.

III. Etude de la complexation des lanthanides(III)

III.1. Résultats

I.1.1. Mise en évidence de la complexation par RMN

Afin de mettre en évidence la complexation, des spectres RMN du proton ont été enregistrés pour différents rapports ρ = [La]/[Ligand] dans D_2O. Pour cela, le peptide acide est amené à un pH de 6,5 par ajout de 4 équivalents de base (KOD), puis des ajouts de La(III) sont réalisés. Les spectres obtenus sont représentés Figure 4.16.

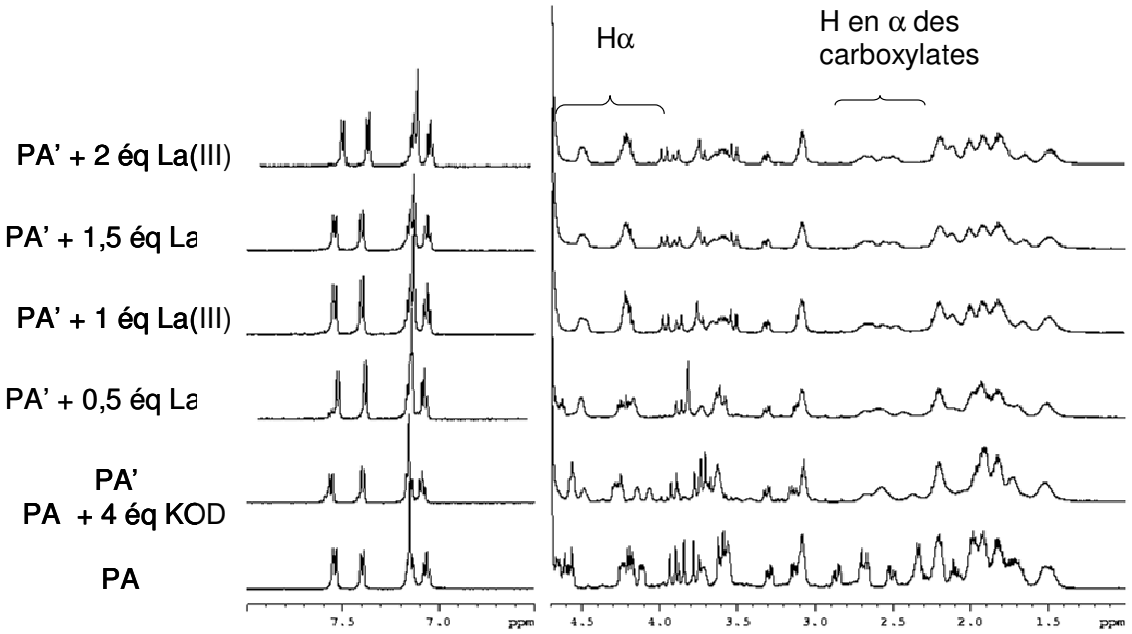


Figure 4.16 : Spectres RMN ^{1}H représentant le dosage du peptide en présence de 4 équivalents de KOD par du La(III) dans D_2O à 298 K et 500 MHz.

Les spectres ^{1}H du peptide acide PA et du peptide basifié sont différents, en particulier au niveau des H portés par les carbones en α du groupement carboxylate. Ce sont en effet ces protons qui ressentent le plus les changements d'environnement dû à la basification du peptide. L'ajout de La(III) provoque une évolution visible sur les spectres jusqu'à un équivalent, au-delà les spectres sont totalement superposables.

Pour être plus précis, les variations significatives de déplacements chimiques des hydrogènes entre le peptide basifié et l'ajout d'un équivalent de La(III) sont représentées Figure 4.17. Les variations de déplacements chimiques significatives sont observées en particulier au niveau des hydrogènes portés par les acides aminés présentant des fonctions acides (Asp et Glu), ainsi que par les Gly. Les hydrogènes portés par le Trp, l'Arg ou les Pro ne sont pas touchés. Parmi les acides aminés ayant des chaînes latérales acides, ce sont les hydrogènes portés par le Glu 2 qui présentent les variations les plus importantes. Les variations sont également significatives pour les Hβ de l'Asp 4, mais elles sont faibles pour l'Asp 7, et pour le Glu 9.

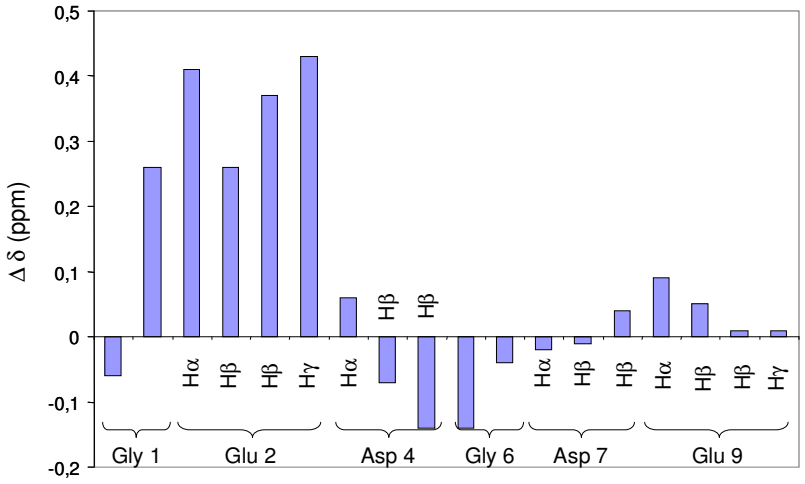


Figure 4.17 : Variations significatives de déplacement chimique entre les hydrogènes du peptide basifié PB et ceux du peptide en présence d'un équivalent de La(III) à 298 K et dans D_2O.

La disparition des signaux des protons portés par les chaînes latérales des acides aminés acides dans le solvant H_2O/D_2O 9/1, nous a empêché d'obtenir la structure RMN du complexe (dans D_2O, les signaux des protons échangeables des amides disparaissent et il y a très peu de corrélations ROE inter-résidus). En raison de la faible solubilité du complexe, les expériences RMN mettant en jeu des carbones ^{13}C en abondance naturelle (pour observer directement les carbones quaternaires des acides aminés acides) n'ont rien données.

Cependant, afin de déterminer plus précisément les espèces présentes en solution, ainsi que leurs constantes d'affinité, des dosages ont été réalisés et suivis par luminescence.

I.1.2. Mesure des constantes d'affinité par luminescence

Pour réaliser ces dosages, l'effet antenne est exploité, avec le Trp comme chromophore. Le Trp est excité à une longueur d'onde de 280 nm, puis la complexation est suivie soit par la diminution du signal de fluorescence du Trp, soit par l'augmentation du signal de phosphorescence du Tb(III) (voir Figure 4.18).

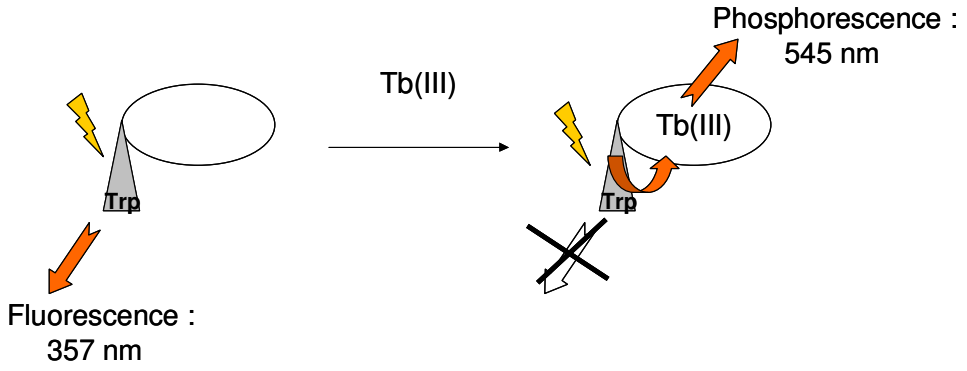


Figure 4.18 : Représentation schématique de la luminescence émise par le peptide libre et par le peptide complexé.

Les dosages sont réalisés dans des solutions tampons, MES ou HEPES, tamponnant le pH respectivement à 6,5 et 7 (voir Figure 4.19), de sorte que le peptide libre présente ses quatre fonctions acides majoritairement sous forme déprotonée.

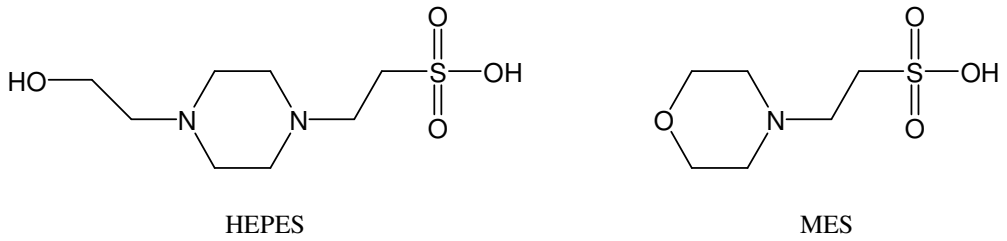


Figure 4.19 : Formule chimique de l'HEPES et du MES tamponnant respectivement le pH des solutions à 7 et 6,5.

Les solutions sont dosées par du Tb(III), en balayant les stœchiométries métal/ligand de 0 à 2,5 (voir Figure 4.20).

Quel que soit le tampon utilisé, une seule espèce TbPA a été mise en évidence, avec une constante de complexation log β_{110} = 6,3(3).

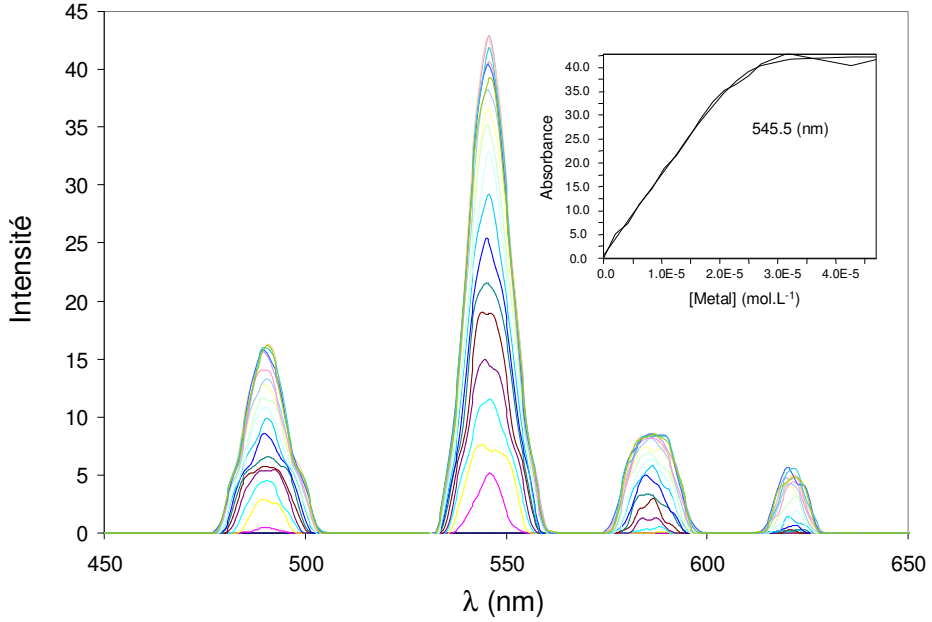


Figure 4.20 : Dosage du peptide ([PA] = 29 µmol.L^{-1}) par du Tb(III), dans une solution aqueuse à pH = 7 ([HEPES] = 10 mmol.L^{-1}) et à 298 K.

Des dosages en retour ont ensuite été effectués pour déterminer l'affinité du peptide pour l'Eu(III) et le Ca(II). La décroissance du signal émis par le Tb(III) a été suivie, en fonction de la concentration des cations dosés. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 4.6.

Tableau 4.6 : Constantes de formations globales des complexes ML dans l'eau, à 298 K, dans une solution tampon à pH 6,5 ou 7.

Espèce	log β_{110}
TbL	6,3(3)
EuL	6,8(2)
CaL	3,7(1)

Le peptide étudié présente une affinité similaire pour le Tb(III) et l'Eu(III). Cette affinité est supérieure de trois ordres de grandeur à celle obtenue pour le Ca(II), ce qui permet déjà de constater que la sélectivité de ce système pour les Ln(III) est bonne.

Afin de mieux caractériser la sphère de coordination du complexe, nous avons mesuré le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au cation métallique.

I.1.3. Détermination du nombre de molécules d'eau coordonnées au cation métallique

Comme dans le chapitre précédent, cette détermination a été faite par des mesures de temps de vie de luminescence. La procédure diffère cependant de celle utilisée pour les cyclodextrines car le solide obtenu à l'issue de la synthèse est très hydraté, et il est impossible de mesurer directement le temps de vie dans D_2O. Ce temps doit être extrapolé. Pour cela, des mesures de temps de vie sont réalisées pour une concentration en peptide de 50 µmol.L^{-1} et une concentration en Tb(III) de 25 µmol.L^{-1} dans des mélanges contenant des quantités variables de H_2O et de D_2O. Les expériences sont réalisées dans une solution tampon d'HEPES à pH = 7. Les temps de vie mesurés sont reportés dans le Tableau 4.7.

Tableau 4.7 : Temps de vie mesurés pour le complexe TbPA ([Pa] = 50µmol.L^{-1} ; [Tb] = 25µmol.L^{-1}) à pH = 7 ([HEPES] = 10 mmol.L^{-1}) en fonction du solvant.

H_2O/D_2O	100/0	89/11	78/22	67/33	50/50	30/70	13/87
τ (ms)	1,65(4)	1,75(4)	1,97(5)	2,18(5)	2,66(7)	3,65(7)	4,72(7)

Le tracé de 1/τ en fonction du solvant permet d'extrapoler le temps de vie du complexe dans D_2O (voir Figure 4.21).

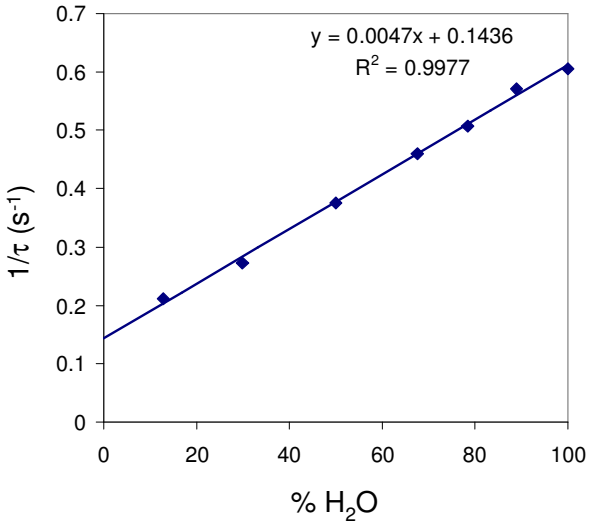


Figure 4.21 : Tracé de l'inverse du temps de vie en fonction du solvant pour la détermination du temps de vie dans D_2O.

Ainsi le temps de vie dans D_2O est de 7,0(1) ms. Les temps de vie dans H_2O et D_2O, ainsi que les formules précédemment utilisées[16] permettent alors de calculer le nombre de molécules d'eau directement coordonnées au cation : q = 2,0(2).

Des mesures similaires sont réalisées en l'absence de solution tampon et en ajustant manuellement le pH à 7 afin de vérifier que l'HEPES ne coordonne pas le cation métallique, réduisant ainsi artificiellement le nombre de molécules d'eau coordonnées. Les résultats obtenus sont similaires : les temps de vie mesurés dans H_2O et D_2O sont respectivement de 1,65(4) et 6,3(2) ms, ce qui correspond à un nombre de molécules d'eau coordonnées de 1,9(2). Enfin, pour vérifier qu'il n'y a pas d'effet de concentration, le temps de vie dans H_2O a également été mesuré pour une concentration de peptide de 400 $\mu mol.L^{-1}$, il est identique aux incertitudes près : 1,69(4) ms.

L'ensemble de ces mesures permet de conclure que le ligand encapsule bien le métal, ne laissant l'accès qu'à deux molécules d'eau.

III.2. Discussion

Le dosage réalisé par RMN ainsi que la détermination de constantes d'affinité par luminescence prouvent la formation d'un unique complexe monométallique entre le peptide et les Ln(III). Ceci montre bien que la préorganisation du peptide libre est suffisante pour complexer les Ln(III). Bien que le peptide ne soit pas inspiré des séquences naturelles de la calmoduline, son affinité pour les Ln(III) est très bonne : $\log \beta_{110} = 6,3$ avec le Tb(III) et 6,8 avec l'Eu(III). Ce résultat peut être comparé avec les données de la littérature : la meilleure affinité obtenue avec les LBTs (Lanthanide Binding Tags) linéaires, des peptides contenant 17 acides aminés ayant tous été optimisés pour la complexation des Ln(III), est $\log \beta_{110} = 7,2$.[130] Les affinités obtenues pour des motifs inspirés des calmodulines (main EF) sont de l'ordre de 5,5 pour le Tb(III) et 6,0 pour l'Eu(III). Ces mêmes ligands présentent une affinité de l'ordre de 4,5 pour le Ca(II).[132] Le système présenté ici montre à la fois une bonne affinité pour les Ln(III) et une bonne sélectivité vis-à-vis du Ca(II), ce qui est très encourageant pour les applications biologiques.

Cette bonne stabilité est à relier au faible nombre de molécules d'eau directement coordonnées au cation métallique. Le cation est protégé par une sphère de coordination qui l'encapsule bien et ne laisse l'accès qu'à deux molécules d'eau.

Le faible nombre de molécules d'eau coordonnées, ainsi que les variations de déplacement chimique des Hα, Hβ, et Hγ des Asp et des Glu plaident en faveur d'un maximum de bras carboxylates coordonnés, sans toutefois permettre d'en déterminer précisément le nombre. Des expériences RMN du ^{13}C ont été menées (^{13}C classique en détection directe pour observer le déplacement chimique des carbones quaternaires, ou gHMQC, corrélation ^{1}H-^{13}C), ainsi que les mesures par IR, permettant théoriquement de déterminer le nombre de carboxylates coordonnés ainsi que leur mode de coordination. Cependant, ces expériences n'ont pas apportées d'informations étant donné la solubilité insuffisante du complexe pour obtenir un signal correct.

Il n'en reste pas moins que les valeurs de constante de stabilité mesurées sont typiques des valeurs de la littérature pour lesquelles quatre bras carboxylates sont coordonnés. Les données structurales de la littérature sur des systèmes peptidiques complexant les lanthanides et dont nous avons parlé au cours de l'introduction sont regroupées dans le Tableau 4.8.

Tableau 4.8 : Structures et mode de détermination de complexes mettant en jeu des peptides et des Ln(III) dans la littérature.

Séquence	log β_{110}^{Tb}	q	Structure	Détermination	ref
Y**I**D**T**NN**D**GWY**E**GD**E** LLA	7,2	0	2 D monodentés ; 2 E bidentés ; carbonyles : N et W	rayons X	131
DK**D**G**D**GTIDER**E**	5,2	2	3 D monodentés ; 1 E bidenté ; carbonyle : T	RMN	136
DKDGDGYITTKE	5,4	3 et 5	3D+1E monodentés et : 2 mono et 2 bidentés	supposition	132

Nous avons deux molécules d'eau coordonnées et une affinité de 6,3. Nous proposons donc une structure avec les quatre bras carboxylates coordonnants :

- soit deux en mode bidenté, deux en mode monodenté comme le premier exemple du Tableau 4.8,

- soit trois ou quatre bras en mode monodenté avec en plus un ou deux carbonyles de fonctions amides coordonnants. La structure rectangulaire du peptide libre montre que les carbonyles des amides du Glu 9 et de l'Asp 4 pointent vers l'intérieur de la cavité et se trouvent dans une position favorable pour la coordination.

Nous avons par la suite décidé d'explorer les propriétés de relaxation à haut champ et bas champ du complexe peptidique, afin d'évaluer ses potentialités dans le domaine de l'IRM.

IV. Propriétés de relaxation du complexe peptidique

IV.1. Relaxivité à haut champ

Des mesures ont d'abord été réalisées à 400 MHz. La relaxivité des protons HOD en présence du complexe monométallique est de 22,6(2) $mmol^{-1}.L.s^{-1}$. Cette valeur est plus importante que celle induite par l'aqua-ion Gd^{3+}, ou le complexe GdBCX et elle est du même ordre de grandeur que celle induite par le complexe GdACX. Les complexes GdACX, GdBCX, et GdPA ont des tailles assez similaires, mais leur nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination diffère.

Tableau 4.9 : Rappel des relaxivités à 400 MHz et 25 °C et des nombres de molécules d'eau q directement liées au cation métallique des différents complexes.

	r_1 ($mmol^{-1}.L.s^{-1}$)	q
GdACX	20,7	4
GdBCX	16,0	1
GdPA	22,6	2

Ainsi le GdPA induit la même relaxivité que le GdACX alors qu'il possède deux fois moins de molécules d'eau en première sphère de coordination. Nous attendons donc des effets de

seconde sphère notables, mais toutefois moins important que dans le cas du complexe GdBCX.

Comme pour l'étude de la BCX, des mesures systématiques de T_1, T_2 et $T_{1\rho}$ ont été effectuées sur les protons de l'eau, et sur ceux d'une sonde neutre, le méthanol afin de déterminer le temps de relaxation électronique.
Les résultats des mesures sont regroupés dans le Tableau 4.10.

Tableau 4.10 : Mesures de relaxivité induite par le complexe GdPA dans D_2O, à pH = 7, et à 25 °C.

Sonde	Champ (MHz)	r_1 ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$)	r_2 ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$)	$r_{1\rho}$ ($s^{-1}.mmol^{-1}.L$)
	200	4,36(7)	6,00(9)	5,98(9)
CH_3OD	**400**	3,28(5)	5,42(9)	5,45(9)
	500	3,06(5)	5,58(9)	5,61(9)
	200	29,8(5)	39,9(8)	40,8(7)
HOD	**400**	21,0(4)	35,9(6)	36,5(5)
	500	18,3(5)	35,6(7)	36,6(7)

Ces résultats seront analysés en détail dans le paragraphe suivant, mais nous pouvons déjà noter le très bon accord entre les valeurs de r_2 et $r_{1\rho}$.

IV.2. Etude relaxométrique

L'étude relaxométrique suit la même démarche que celle effectuée pour le complexe GdBCX dans le chapitre précédent : détermination du temps de relaxation électronique et analyse du profil de relaxivité des protons du méthanol, analyse du profil de relaxivité des protons de l'eau. En plus des valeurs mesurées à haut champ et données dans le paragraphe précédent (Tableau 4.10), les temps de relaxation des protons HOD dans l'eau lourde et du méthanol deutérié en présence de [GdPA] = 0,9 $mmol.L^{-1}$ et à pH = 6,5 ont été mesurés au relaxomètre pour des champs variant de 10 kHz à 40 MHz.

♦ Analyse du profil de relaxivité des protons du méthanol

Le profil de relaxivité des protons de CH_3OD dans une solution de GdPA dans D_2O à 298 K est donné Figure 4.22. Les paramètres importants régissant la relaxation de sphère externe sont explicités ci-après.

Détermination de b et de a_{GdH} :

Afin de déterminer le diamètre de collision entre le méthanol et le complexe GdPA, nous utilisons les dimensions du complexe obtenues à partir de la structure du ligand libre calculée en solution. Le complexe fait environ 13 Å de long, 8 Å de large et 10 Å de haut. Si le complexe est assimilé à une sphère, un rayon effectif de 5 Å est alors calculé. C'est légèrement plus petit que pour le complexe GdBCX (r = 6,2 Å). Le rayon du méthanol est estimé à 2,25 Å. Ce qui donne un diamètre de collision de 7,25 Å.

La distance minimale d'approche est inférieure à ce diamètre de collision. Comme pour le complexe GdBCX, une valeur minimale de cette distance est estimée à 5 Å. La valeur exacte sera déterminée par ajustement des profils théoriques et expérimentaux.

Détermination des coefficients de diffusion translationnels :

Les coefficients de diffusion de PA et de son complexe LaPA (complexe diamagnétique supposé identique au complexe GdPA) sont mesurés à $D^t = 0{,}205(5).10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$. La microviscosité évaluée ainsi est $f_t = 1{,}9$. Cette valeur est plus importante que celle des complexes formés avec l'ACX et la BCX, ce qui présage déjà un important cortège de molécules d'eau autour du complexe, augmentant ainsi de façon importante son rayon hydrodynamique.

Détermination de τ_R :

Comme dans le chapitre précédent, nous observons une microviscosité translationnelle élevée. Il est raisonnable de supposer aussi une microviscosité rotationnelle élevée, pour laquelle l'hypothèse simplificatrice suivante est faite : $f_r = f_t$ est faite. D'après l'équation 1.32, $D^R = 6{,}00.10^8$ s^{-1} et $\tau_R = \frac{1}{6D^R} = 278$ ps dans D_2O.

Cette valeur est légèrement plus faible que celle obtenue pour le complexe GdBCX, ce qui est en accord avec la plus petite taille du complexe peptidique.

Détermination de τ_{S0} et T_e :

Pour évaluer le temps de relaxation électronique en champ nul, les rapports des valeurs de relaxation à haut champ et bas champ ont été calculés et comparés aux valeurs expérimentales. Un très bon accord est obtenu pour un temps de relaxation électronique en champ nul, τ_{S0} = 110 ps. Cette valeur est similaire à celle trouvée pour les complexes de cyclodextrines et est raisonnable pour un complexe sans symétrie. Les valeurs des rapports de relaxivité théoriques et expérimentaux sont regroupées dans le Tableau 4.11.

Tableau 4.11 : Comparaison des rapports des relaxivités théoriques et expérimentales à haut champ et en champ nul

νI (MHz)	$r_1(0)/r1(\nu I)$ théorique	$r_1(0)/r_1(\nu I)$ expérimental
200	1,37	1,37
400	1,78	1,82
500	1,99	1,95

L'accord est bon à moins de 3% entre théorie et expérience pour cette valeur de τ_{S0}. Les variations de T_e en fonction de la fréquence sont ensuite gouvernées par τ_R.

A l'aide de tous ces paramètres, un ajustement théorique du profil expérimental de relaxation en fonction du champ a été réalisé.

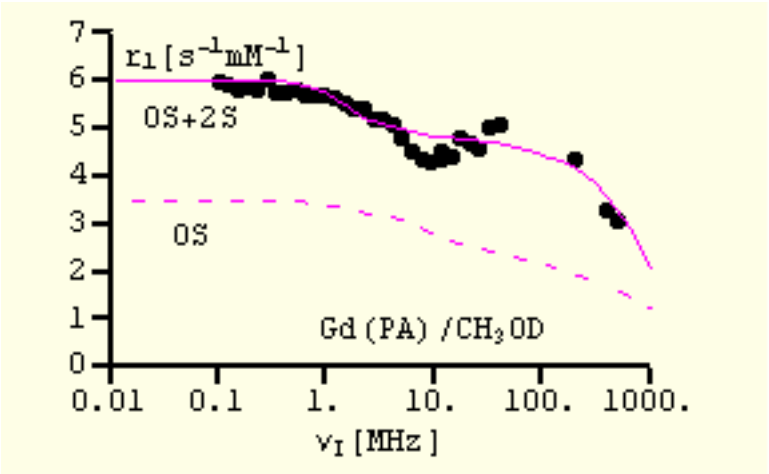


Figure 4.22 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité du méthanol avec a_{GdH} = 5 Å et τ_R = 278 ps (pointillés) et en considérant des associations par liaisons hydrogènes (ligne pleine) : q_{ass} = 0,18 ; r_{ass} = 5 Å ; τ_{ass} = 700 ps.

Le seul paramètre ajustable est la distance minimale d'approche a_{GdH}. Même en donnant à a_{GdH} la valeur minimale physiquement acceptable, $a_{GdH} = 5$ Å, la superposition des profils expérimental et théorique est mauvaise. La forme du profil n'est pas respectée et il y a une erreur de l'ordre de 40% entre les valeurs expérimentales et théoriques aussi bien à bas champ qu'à haut champ.
Il faut considérer des associations de type liaisons hydrogène entre le complexe et la sonde méthanol pour arriver à un ajustement meilleur (ligne pleine) et donc des interactions de seconde sphère comme c'était le cas pour le complexe GdBCX.

Les trois paramètres nécessaires pour définir ces associations (temps d'association, τ_{ass}, distance minimale d'approche, r_{ass}, nombre de molécules associées, $q_{ass)}$ sont ajustés afin de reproduire au mieux le profil expérimental : $r_{ass} = 5$ Å ; $\tau_{ass} = 700$ ps, et $q_{ass} = 0,18$. Dans ce cas le nombre de molécules associées est très faible mais tout de même nécessaire à un bon ajustement des données expérimentales.

La validité du modèle utilisé est vérifiée par le calcul théorique de la relaxivité transversale. Ainsi, à 200, 400 et 500 MHz, la théorie donne respectivement $r_2 = 5,38$; 5,10 ; 4,95 $mmol^{-1}.L..s^{-1}$, en bon accord avec les valeurs expérimentales : $r_2 = 6,00$; 5,42 ; 5,58 $mmol^{-1}.L..s^{-1}$.

Ces mesures sur la sonde méthanol ont donc permis de déterminer de façon indépendante un temps de relaxation électronique de 110 ps, et d'évaluer la contribution de sphère externe de cette sonde.

♦ **<u>Analyse du profil de relaxivité des protons de l'eau</u>**

ü <u>Relaxivité de sphère externe</u>

Pour l'analyse de la relaxivité de l'eau, tous les paramètres précédents sont gardés sauf le coefficient de diffusion du méthanol qui est remplacé par celui de l'eau, et la distance minimale d'approche entre le Gd(III) et les protons de l'eau, a_{GdH} est fixée à une courte distance de 3,5 Å.

ü Relaxivité de sphère interne

Il y a deux molécules d'eau coordonnées au centre métallique (q = 2, mesuré par luminescence). r_{GdH} est fixée à 3,1 Å et la vitesse d'échange des molécules d'eau est fixée à une valeur très courte de 5 ns. Même avec cette valeur extrême de τ_m, et a_{GdH}, il n'est pas possible d'ajuster le profil expérimental avec la théorie (voir la courbe pointillée Figure 4.23).

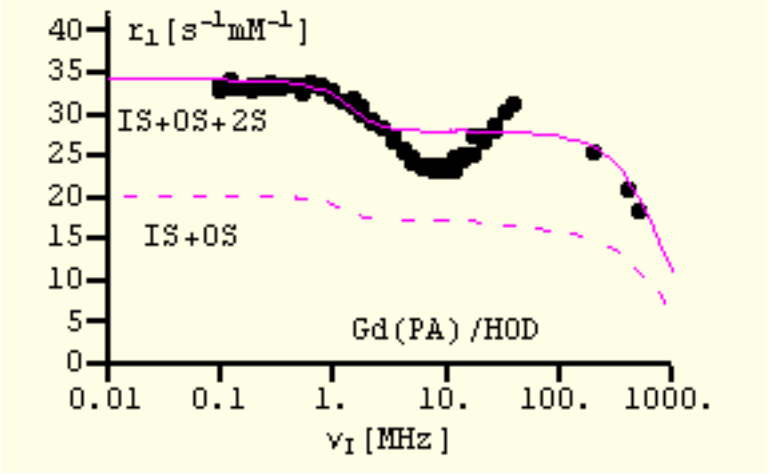


Figure 4.23 : Ajustement théorique du profil expérimental de relaxivité de HOD dans D_2O, q = 2, τ_M = 5 ns, τ_R = 278 ps, τ_{s0} = 110 ps, r_{GdH} = 3,1 Å (pointillés) et en considérant des associations par liaisons hydrogènes avec q_{ass} = 7,5, τ_{ass} = 700 ps, r_{ass} = 3,8 Å (ligne pleine).

Pour arriver à un ajustement correct, il faut considérer des molécules d'eau en seconde sphère liées par liaisons hydrogène sur le complexe à proximité du Gd(III). Comme précédemment, τ_{ass}, r_{ass} et q_{ass} sont ajustés pour obtenir une bonne reproduction du profil expérimental : q_{ass} = 7,5, τ_{ass} = 700 ps et r_{ass} = 3,8 Å (voir Figure 4.23).

Comme pour le complexe GdBCX, les liaisons hydrogène sont plus fortes avec l'eau qu'avec le méthanol en raison de la plus petite taille et de la plus grande polarité de la molécule d'eau. Il y a également légèrement plus de liaisons hydrogènes qu'avec le complexe GdBCX, pour lequel q_{ass} prenait la valeur de 6. Cette valeur de 7,5 est toutefois en bon accord avec le calcul du volume disponible pour les molécules d'eau en seconde sphère de coordination autour du Gd(III). Nous avons vu au chapitre précédent qu'il était possible d'avoir au maximum 15 molécules d'eau avec des hydrogènes à 3,8 Å du cation. D'autre part ce nombre n'est pas un entier car c'est un nombre moyen provenant d'équilibres d'échange des molécules d'eau en solution.

La validité du modèle est vérifiée par la comparaison des r_2 théoriques et expérimentaux. Ainsi, à 200, 400 et 500 MHz, la théorie donne respectivement r_2 = 31,7 ; 29,8 ;

28,7 $mmol^{-1}.L..s^{-1}$, en bon accord avec les valeurs expérimentales : r_2 = 39,9 ; 35,9 ; 35,6 $mmol^{-1}.L..s^{-1}$. L'accord est bon à 20% près, ce qui reste raisonnable compte tenu de la rusticité du modèle de mouvement.

Nous avons également vérifié qu'une variation de 20% des paramètres d'association en seconde sphère dégradait de façon visible l'ajustement du profil théorique avec les valeurs expérimentales.

Comme dans le chapitre précédent, les ajustements des profils théoriques et expérimentaux diffèrent davantage que dans la plupart des analyses publiées en raison de l'ajustement simultané plus exigeant de deux profils au lieu d'un seul pour lequel les paramètres de relaxation électronique sont simplement choisis pour obtenir le meilleur accord possible avec l'expérience.

Pour conclure, ces expériences nous ont permis de mettre en évidence une contribution importante de seconde sphère qui doit être liée au caractère hydrophile du ligand étudié.

V. Conclusion et perspectives

Cette étude est le premier exemple de complexation des Ln(III) par un RAFT, décapeptide cyclique fonctionnalisable sélectivement. Le RAFT étudié présente quatre acides aminés avec des chaînes latérales acides et est flexible en solution, ce qui n'empêche pas une préorganisation favorable à la complexation des Ln(III). Les résultats obtenus au niveau de l'affinité de ce ligand pour les Ln(III) sont très encourageants puisque les affinités sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec des ligands dont chacun des acides aminés a été optimisé ou avec des ligands inspirés des motifs naturels de la calmoduline, protéine complexant le Ca(II). Comme le ligand n'est pas inspiré de séquences naturelles, il est nettement plus ajusté aux Ln(III) qu'au Ca(II) (trois ordres de grandeur), ce qui est prometteur pour d'éventuelles applications médicales. Au niveau de la relaxivité, une contribution importante de seconde sphère a été mise en évidence, expliquant les valeurs de relaxivité élevées obtenues à haut champ, en regard de la masse moléculaire du complexe. Ces effets de seconde sphère s'expliquent par la présence de nombreux atomes donneurs (O et N) sur le

squelette carboné du peptide, permettant de « retenir » des molécules d'eau à proximité du cation métallique par des interactions de type liaisons hydrogène.

L'avantage de ces systèmes est la possibilité de les utiliser pour des applications multiples suivant les souhaits :

- sondes luminescentes : le transfert d'énergie du Trp au cation métallique rend possible ces applications. Dans ce cas, il serait intéressant d'étudier l'influence de la position du Trp sur le transfert d'énergie.
- hydrolyse de l'ADN
- agent de contraste pour l'IRM : la présence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination, ainsi que les effets de seconde sphère rendent ces applications intéressantes et novatrices.

Toutefois, quelles que soient les applications envisagées, avant d'utiliser ces systèmes en milieu biologique, je propose de modifier le peptide afin d'obtenir des affinités plus élevées. Ces affinités élevées ne pourront pas être obtenues avec des séquences d'acides aminés naturels. Il serait donc judicieux d'introduire des acides aminés synthétiques, possédant des groupes chélatants comme des aminocarboxylates sur leurs chaînes latérales (Figure 4.24).

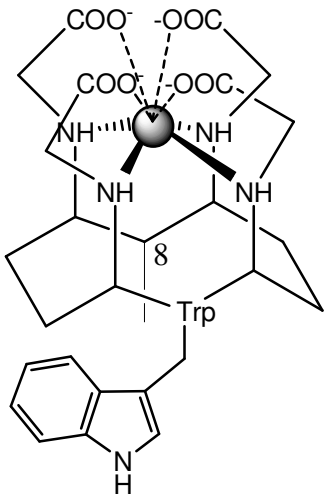


Figure 4.24 : Futur complexe envisagé pour des applications médicales.

L'avantage d'utiliser des groupes NCH_2COO^- est d'obtenir des ligands octadentes comme le DOTA ou le DTPA, et d'avoir des chances de conserver une molécule d'eau dans la première sphère de coordination pour les applications dans le domaine de l'IRM. La longueur des bras chélatant pourra être optimisée afin de toujours bénéficier des effets de seconde sphère

provenant des molécules d'eau à proximité du cation liées par liaisons hydrogène sur le squelette peptidique. D'autre part, la flexibilité du ligand pourrait permettre d'obtenir des vitesses d'échange plus grandes que celles observées sur les complexes de type GdDTPA ou GdDOTA.

Enfin, la position 8 permet d'introduire des motifs ciblant des sites biologiques judicieusement choisis (tissus particuliers pour l'IRM, ou motif reconnaissant l'ADN si des applications pour l'hydrolyse ou comme sondes luminescentes sont envisagées).Ces molécules présentent donc un intérêt pour des applications dans des domaines très variés.

Conclusion générale

Nous avons étudié la complexation des Ln(III) par de nouveaux ligands d'origine biologique, à savoir des dérivés acides de cyclodextrines, ainsi qu'un peptide cyclique acide. En plus de leur intérêt propre du point de vue de la chimie de coordination fondamentale, les complexes formés par ces ligands et le gadolinium(III) présentent une relaxivité exceptionnellement élevée. Cela nous a conduit à mettre en œuvre une panoplie de méthodes visant à caractériser la structure, la thermodynamique et la dynamique moléculaire de ces complexes.

Dans une première partie, nous avons développé de nouvelles méthodes basées sur la relaxométrie pour l'étude de ces systèmes. Ce travail a mis en évidence l'intérêt de la relaxivité comme méthode très sensible pour l'étude des interactions faibles. Les mesures effectuées ont permis de caractériser la dynamique en solution en fonction de la taille et de la charge des espèces mises en jeu, dans le cas des complexes Gd^{3+} aqua et $Gd(DTPA)^{2-}$. Si ces mesures sont aisément interprétables par une théorie moléculaire sans paramètres ajustables dans le cas de ces complexes quasi-sphériques, nous avons vu par la suite que les interprétations deviennent beaucoup plus difficiles lorsque les composés sont volumineux, non sphériques, et avec des interactions nombreuses de type liaisons hydrogène. Nous manquons alors de théories adaptées pour décrire le mouvement d'espèces qui ne peuvent pas être assimilées à des sphères, sans paramètres ajustables. Comme de nombreux facteurs entrent en jeu, toute interprétation, même qualitative, devient très délicate. L'approche thermodynamique du chimiste prend alors toute sa valeur. Nous avons en effet montré que des mesures de temps de relaxation de spins nucléaires de sondes judicieusement choisies permettaient de déterminer de faibles constantes thermodynamique de complexation en solution, ce qui n'est pas aisé à réaliser avec la plupart des méthodes classiques.

La deuxième grande partie de ce travail était consacrée à l'étude de systèmes d'origine biologique, présentant des sphères de coordination oxygénées pour la complexation des Ln(III). Nous avons choisi de nous intéresser à des dérivés acides de cyclodextrines, qui sont des molécules cycliques dont les unités de base sont des dérivés de sucres, et à un peptide acide cyclique, dont les unités de base sont des acides aminés (voir Figure 6). Les dérivés acides de cyclodextrines ACX et BCX diffèrent uniquement par leur taille ; la BCX possède une unité « sucre » supplémentaire.

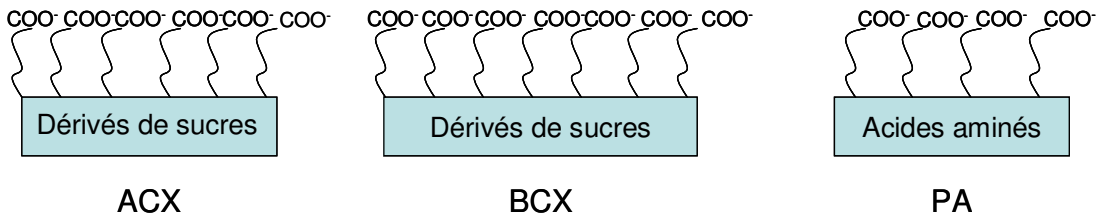


Figure 6 : Représentation schématique des différents ligands étudiés.

Les complexes de Ln(III) avec les dérivés acides de cyclodextrines ont un ou deux cations métalliques pour un unique ligand. Les constantes de formation des complexes monométalliques sont comparables à celles mettant en jeu des ligands possédant trois bras carboxylates. Toutefois, des différences fondamentales de comportement apparaissent entre les ligands ACX et BCX qui ont seulement une petite différence de taille. Il convient de rappeler qu'au niveau des propriétés des cyclodextrines naturelles, la β-cyclodextrine dont est dérivée la BCX, montre une chute de solubilité importante due au réseau de liaisons hydrogène intermoléculaire développé. Cela laisse déjà présager de la complexité de ces systèmes. Avec le ligand ACX de plus petite taille, nous avons pu obtenir la structure cristallographique du complexe bimétallique, montrant un enfouissement important des cations métalliques dans la cavité du ligand. Des mesures du nombre de molécules d'eau directement coordonnées au cation lanthanide montrent qu'en solution le cation est beaucoup moins enfoui dans la cavité, du moins en présence de potassium. En effet, ce système est très sensible à la présence et à la concentration d'ions alcalins présents dans le milieu. Des interactions spécifiques avec les ions alcalins ont pu être mises en évidence par les mesures de relaxivité. Cela souligne encore une fois la puissance de cette méthode pour l'étude d'interactions faibles en solution. La BCX, ligand de plus grande taille, ne présente pas de différences de comportement en fonction des alcalins présents. Cela nous a permis de déduire une contribution très importante de relaxation de seconde sphère à la relaxivité. Cette contribution provient de molécules d'eau qui sont associées par liaisons hydrogènes au ligand en raison de ses nombreux atomes d'oxygène, et se trouvent à proximité du cation paramagnétique. En d'autres termes, le ligand est entouré d'un cortège important de molécules d'eau qui augmentent ainsi artificiellement sa taille.

La complexation des Ln(III) par un peptide acide cyclique de la famille des RAFT a montré que ce type de système peut complexer les ions Ln(III). Les résultats obtenus sont très encourageants puisque, en dépit de son origine totalement synthétique et ne soit pas optimisé pour la complexation des Ln(III), ce peptide présente des affinités aussi bonnes pour les

Ln(III) que les systèmes d'origine naturelle, issus de la calmoduline. Malgré une certaine flexibilité, le ligand présente une préorganisation favorable à la complexation des Ln(III). Nous avons également observé une contribution importante de type seconde sphère à la relaxivité. Cette contribution s'explique comme précédemment par des liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et le ligand.

Ces contributions de seconde sphère sont donc caractéristiques de ces ligands très oxygénés. Elles permettent d'obtenir des relaxivités élevées, même à haut champ. Malgré ces résultats intéressants, il n'est pas question d'envisager l'utilisation de ces ligands comme agent de contraste pour l'IRM médicale. La stabilité des complexes est beaucoup trop faible pour cela. Les perspectives de ce travail sont donc dans la synthèse de ligands possédant une affinité beaucoup plus importante pour les lanthanides(III) en conservant l'idée originale de ce travail, à savoir l'utilisation de plate-formes oxygénées d'origine naturelle qui permet d'importants effets de seconde sphère grâce aux liaisons hydrogène formées avec les atomes électronégatifs de la plate-forme.

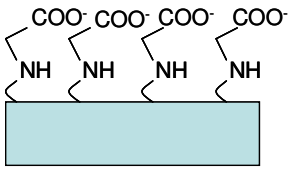


Figure 7 : Ligands futurs conservant une plate-forme d'origine biologique et possédant des bras aminocarboxylates pour assurer une meilleure stabilité thermodynamique aux complexes de Ln(III).

Partant des connaissances acquises sur ces systèmes oxygénés labiles, je propose de greffer des bras type aminocarboxylates sur les plates-formes. La taille de ces bras devra être optimisée afin que la cation métallique reste à proximité de la plate-forme, et puisse bénéficier de l'importante contribution de seconde sphère à la relaxivité.

Pour conclure, ces systèmes novateurs d'origine biologique me semblent d'un grand intérêt au point de vue de la chimie de coordination fondamentale des Ln(III). De ce point de vue, le développement et l'étude de systèmes modifiés par rapport à ce qui a été fait dans ce travail mérite d'être poursuivis. Du point de vue de l'IRM, si la stabilité de ces systèmes peut être augmentée, ces complexes ouvrent le champ à une nouvelle classe d'agent de contraste présentant des relaxivités importantes à haut champ, et totalement différente des polyaminocarboxylates usuels.

5

Partie expérimentale

I. SYNTHESE DES LIGANDS 235
I.1. Synthèse des cyclodextrines modifiées *235*
I.2. Synthèse du peptide c(GEWDPGDREP) *236*
II. DOSAGES DES SOLUTIONS UTILISEES 237
III. ETUDES POTENTIOMETRIQUES 238
III.1. Matériel utilisé *238*
III.2. Calibration de l'électrode *239*
III.3. Dosages *239*
III.3.1. Détermination des pKa du ligand 239
III.3.2. Détermination des constantes de complexation 240
III.3.3. Ajustement par Hyperquad 2000 240
IV. SPECTROMETRIE DE MASSE ELECTROSPRAY (ES-MS) 240
V. LUMINESCENCE 241
V.1. Mesure du nombre de molécules d'eau coordonnées aux cations Eu(III) et Tb(III) *241*
V.2. Mesure de constantes de complexation du ligand peptidique *242*
V.2.1. Dosages directs 242
V.2.2. Dosages par compétition (en retour) 243
V.2.3. Ajustement des constantes par Specfit 243
VI. SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE 243
VI.1. Spectromètres RMN utilisés *243*
VI.2. Mesures de temps de relaxation *244*
VI.2.1. Mesures de T_1 245
VI.2.2. Mesure de T_2 245
VI.2.3. Mesure de $T_{1\rho}$ 246
VI.3. Mesures de coefficients de diffusion *247*
VI.4. Profils NMRD *248*
VI.5. Expériences de développements méthodologiques *249*
VI.5.1. Mesures de relaxivité par RMN du proton et du fluor en vue de la transmétallation 249
VI.5.2. Relaxivité du GdDTPA en présence de sondes par RMN du proton et du fluor 250
VI.6. RMN des complexes de cyclodextrine *251*
VI.6.1. Dosage des ligands par des sels de lanthanide(III) 251
VI.6.2. Mesure du nombre de molécules d'eau coordonnées au métal par RMN de l'oxygène 17 251
VI.6.3. Mesures de T1 à 400 MHz 251
VI.6.4. Profils NMRD 252
VI.7. Applications au peptide *253*
VI.7.1. Structure du peptide libre 253
VI.7.2. Addition de métaux sur le peptide 253
VI.7.3. Mesures de T1 à 400 MHz 253
VI.7.4. Profil NMRD 254
VII. SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE 254
VII.1. Principe de la RPE et appareillage utilisé *254*
VII.2. Mesures RPE réalisées *255*
VIII. DIFFRACTION AUX RAYONS X 256

I. Synthèse des ligands

I.1. Synthèse des cyclodextrines modifiées

La per(3,6-anhydro)-α-cyclodextrine est obtenue d'après la procédure précédemment décrite dans la littérature.[85] Une solution de per(3,6-anhydro)-α-cyclodextrine (1g ; 1,15 mmol) est agitée pendant 3 heures en présence d'une solution de NaH (2 mol.L^{-1}, 7 mL) dans 10 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) anhydre à température ambiante et sous atmosphère d'argon. Le monochloroacétate de sodium (1,6 g, 14 mmol) est ensuite ajouté au mélange réactionnel. La solution obtenue est agitée 15 heures à 45 °C sous argon. Le DMSO est évaporé sous pression réduite et le résidu solide obtenu est dispersé dans l'acétone pendant une journée, puis centrifugé. La poudre résultante est dissoute dans l'eau (200 mL) et ultrafiltrée pendant 3 jours (membrane-MWCO 500, 1,5 L d'eau, Spectra/Port®CE Sterile DispoDialysers®-cellulose ester). Le produit final est lyophilisé et 1 g de produit est obtenu (54%).
Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont été attribués à l'aide de séquences COSY et gHMQC.

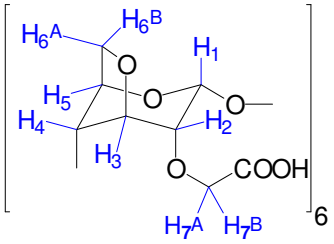


Figure 8 : Représentation schématique d'une unité de cyclodextrine modifiée.

^{1}H (D_2O, 400 MHz) : δ=5,24 ppm (d, *J* = 3 Hz, 1H, H_1) ; 4,66 (t, *J* = 5 Hz, 1H, H_3) ; 4,54 (s large, 1H, H_5) ; 4,23 (dd, *J* = 2 et 5 Hz, 1H, H_4) ; 4,19 (d, *J* = 11 Hz, 1H, H_{6b}) ; 4,03 et 3,98 (AB, *J* = 15,8, 2H, H_7) ; 3,92 (dd, *J* = 3 et 11 Hz, 1H, H_{6a}) ; 3,71 (t, *J* = 3 Hz, 1H, H_2).
^{13}C (D_2O, 400 MHz) : δ=179,7 ppm (COO^-) ; 101,0 (C_1) ; 80,7 (C_4), 77,6(C_2) ; 76,3 (C_5) ; 73,1 (CH_2) ; 72,8 (C_3) ; 70,9 (C_6)
Analyse élémentaire calculée pour $ACXNa_6.14,5\ H_2O$: C, 35,90% ; H, 5,21% ; Na, 8,59%. trouvée : C, 35,86% ; H, 5,03% ; Na, 8,53%.

La BCX est obtenue selon le même mode opératoire mais en partant de la per(3,6-anhydro)-β-cyclodextrine et en adaptant les quantités.

^{1}H (D_2O, 400 MHz) : δ=5,28 ppm (d, *J* = 2,5 Hz, 1H, H_1) ; 4,67 (H_3) ; 4,55 (s large, 1H, H_5) ; 4,25 (dd, *J* = 1,8 et 6 Hz, 1H, H_4) ; 4,18 (d, *J* = 11 Hz, 1H, H_{6b}) ; 4,05 (s large, 2H, CH_2) ; 3,94 (dd, *J* = 3 et 11 Hz, 1H, H_{6a}) ; 3,76 (t, *J* = 3 Hz, 1H, H_2).
Analyse élémentaire calculée pour $ACXNa_6.10\ H_2O$, 2 NaCl : C, 36,05% ; H, 4,48% ; Na, 8,62%. trouvée : C, 36,00% ; H, 4,41% ; Na, 9,53%.

I.2. Synthèse du peptide c(GEWDPGDREP)

Le précurseur linéaire de c(GEWDPGDREP) avec les chaînes latérales protégées H-Asp(O*t*Bu*)-Arg(Pbf*)-Glu(O*t*Bu)-Pro-Gly-Glu(O*t*Bu)-Trp(Boc*)-Asp(O*t*Bu)-Pro-Gly-OH est assemblé manuellement par synthèse peptidique en phase solide sur une résine 2-chlorotrityle (substitution 0,6 mmol.g^{-1}, 500 mg). Les réactions de couplages sont réalisées avec les acides aminés protégés sur la fonction amine par le groupement Fmoc (9-Fluorènylméthyloxycarbonyle) (2 équivalents), du PyBOP (Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) (2 équivalents) et de la DIEA (diisopropyléthylamine) (pH ≈ 8-9) dans le diméthylformamide (DMF). La réaction est répétée une fois. Les réactions de couplage sont contrôlées par des tests au TNBS (acide 2,4,6-Trinitrobenzensulfonique)[148] et suivies d'un traitement avec un mélange DMF/pyridine/Ac_2O 7/2/1. La déprotection des groupements Fmoc est réalisée avec un mélange DMF/pipéridine 4/1. Le peptide est séparé de la résine par un traitement avec un mélange CH_2Cl_2/TFA (acide trifluoroacétique) 99/1. Un résidu huileux est obtenu par évaporation de la solution. Ce dernier est dissous dans CH_2Cl_2 et précipité par de l'éther. La réaction de cyclisation est réalisée dans la DMF (350 mL) avec du PyBOP (1,5 équivalents) et de la DIEA (pH ≈ 8-9) à température ambiante pendant 2 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Finalement, la déprotection des chaînes latérales se fait dans un mélange TFA/triisopropylsilane/H_2O/*p*-crésol (93/2,5/2,5/2). Après une heure d'agitation, la solution est évaporée et l'huile jaune obtenue est précipitée dans le mélange CH_2Cl_2/Et_2O. Le solide blanc résultant est dissous dans 23 mL de H_2O et purifié par HPLC en phase inverse (Delta-Pack 300 Å 15 µm C18 particles 200 mm×25 mm, solvant A = H_2O/TFA 99,9:0.1, solvant B = CH_3CN/H_2O/TFA 90:10:0,1, débit 22 mL.min^{-1}, gradient linéaire de 5 à 60% de solvant B pendant 30 min, temps de rétention t_R = 15,4 min). La fraction collectée est lyophilisée pour

donner c(GEWDPGDREP) sous la forme d'une poudre blanche (205 mg, 60% de rendement global). ES-MS (mode positif): m/z = 1139.3 $[M+H]^+$.

*Groupements protecteurs : - OtBu : *tert*-butyloxyde
- Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyldihydrobenzofurane-5-sulfonyle
- Boc : *tert*-butyloxycarbonyle

II. Dosages des solutions utilisées

Sels métalliques (dosages complexométriques)

Toutes les solutions de sels métalliques préparées à partir des sels commerciaux sont systématiquement dosées avant d'être utilisées. Le but de ce dosage est de déterminer le taux d'hydratation, donc la masse molaire exacte du sel utilisé. La procédure pour les sels de lanthanides ($LnCl_3.6H_2O$), de zinc ($ZnSO_4.6H_2O$) et de cuivre ($CuSO_4.6H_2O$) est la suivante : Les solutions mères sont diluées dans 9 équivalents de tampon acétique ($[CH_3COOH] = [CH_3COO^-] = 0,1$ mol.L^{-1}, pH = 4,75). A cette solution sont ajoutées quelques gouttes d'un indicateur coloré, le xylénol orange. La solution est dosée par une solution de titriplex (III) ($EDTAH_2Na_2$) selon l'équation bilan suivante :

$$Gd^{3+} + EDTAH_2Na_2 = [EDTAGd]^- + 2Na^+ + 2H^+ \qquad \textbf{équation 1}$$

Lorsque $3 \leq pH \leq 5$, l'indicateur coloré est mauve quand il est complexé par le lanthanide, le zinc, ou le cuivre et jaune sinon. Après le virage de l'indicateur coloré, quelques gouttes de CH_3COONa sont ajoutées. Si la coloration jaune disparaît, le dosage doit être poursuivi.[149]

La procédure de dosage des solutions de Ca(II) est la même que celle décrite ci-dessus, simplement le pH est ajusté à 12,5 par une solution de KOH. D'autre part l'indicateur coloré utilisé est le calcon ou noir d'eriochrome bleu R (acide 1-(2-hydroxy-1-naphtylazo)-2-naphtosulfonique (40 mg dans 10 mL de méthanol). C'est un triacide de pKa 1 ; 7,3 ; 13,5 qui est bleu en solution aqueuse à pH = 12,5, et rose en présence de Ca(II).[150]

Peptide (dosage UV)

Le ligand peptidique possède un acide aminé tryptophane dont le groupement latéral indole absorbe dans l'UV à 280 nm (ε = 5690 L.mol^{-1}.cm^{-1}).[151] Cette propriété est donc utilisée pour déterminer la concentration du peptide à l'aide de la loi de Beer-Lambert. Les mesures sont effectuées sur un spectromètre UV-visible Varian Cary 50.
Les spectres sont enregistrés entre 200 et 600 nm. L'absorbance à 280 nm est ensuite directement reliée à la concentration selon la relation :

$$A = \varepsilon \times \ell \times C \qquad \textbf{équation 2}$$

avec ε : coefficient d'extinction molaire en L.mol^{-1}.cm^{-1}

ℓ : longueur de la cuve en cm

C : concentration de la solution en mol.L^{-1}

III. Etudes potentiométriques

III.1. Matériel utilisé

Un potentiomètre de type 751 GPD titrino Metrohm a été utilisé : il est équipé d'une burette automatique de 5 mL et relié à un bain thermostaté qui maintient la température de la solution à 25 °C. Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode de verre combinée Metrohm (Référence : Ag/AgCl, dans KCl 3 mol.L^{-1}). Tous les dosages sont réalisés sous atmosphère d'argon pour éliminer le CO_2 atmosphérique.
Chaque dosage est effectué avec une force ionique maintenue constante à 0,1 mol.L^{-1} (KCl, NaCl, ou Bu_4NCl). Les solutions de ligand et de métal ainsi que les solutions titrantes d'acide chlorhydrique et de potasse sont préparées dans l'eau déminéralisée obtenue par le système Millipore/MilliQ (résistivité 18 MΩ.cm). Les solutions titrantes de HCl 0,1 mol.L^{-1} et de KOH 0,1 mol.L^{-1} sont préparées par dilution d'ampoules commerciales titrées (Titrisol, Merck). La solution de KOH est changée lorsque le pourcentage de carbonate déterminé par la méthode de Gran dépasse 2% de la concentration totale de base.[4]
Pour les dosages du ligand seul, les solutions d'ACX ou de BCX sont préparées à 10^{-3} mol.L^{-1} par dissolution des poudres dans la solution de KCl 0,1 mol.L^{-1}. Pour le dosage des complexes, les solutions mères de lanthanide, de zinc, de calcium ou de cuivre à 10^{-2} mol.L^{-1} dans KCl 0,1 mol.L^{-1} sont préparées à partir des sels de lanthanide $LnCl_3.6H_2O$, de zinc

$ZnSO_4.6H_2O$, de calcium $CaCl_2.2H_2O$, ou de cuivre $CuSO_4.6H_2O$ commerciaux. Leurs concentrations précises sont ensuite déterminées par dosage complexométrique (voir II).

III.2. Calibration de l'électrode

Lors des dosages, ce n'est pas directement un pH, mais une force électromotrice E (mV) qui est mesurée. Son évolution au cours du dosage est donnée par la relation suivante :

$$E_{mesurée} = E° - f \times \frac{1000 \times RT \times Ln10}{F} \times pH \qquad \textbf{équation 3}$$

avec R = 8.314 J.K-1.mol^{-1} (constante des gaz parfaits)

T = 298 K

F = 96500 C.mol^{-1} (constante de Faraday)

E et E° sont exprimées en mV

Calibrer l'électrode signifie déterminer les paramètres E° et f caractéristiques de l'électrode utilisée et qui permettent de relier directement le potentiel mesuré au pH de la solution. Pour cela, des dosages préliminaires d'un acide fort ([HCl] = 0,1 mol.L^{-1}) par une base forte ([KOH] = 0,1 mol.L^{-1}) ont été effectués : 0,6 mL d'acide chlorhydrique sont dissous dans 20 mL d'une solution de KCl 0,1 mol.L^{-1}. Cette solution est dosée par une solution de de KOH qui est additionnée par incréments de 0,05 mL. La force électromotrice E de la solution est relevée à chaque incrément et le p[H] peut être calculé en chaque point. La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite E = f(p[H]) permettent d'accéder aux valeurs de E° et de f.
Des calibrations systématiques sont effectuées avant chaque dosage. L'électrode est considérée comme stable lorsque les valeurs de E° et f sont reproductibles sur 2 à 3 calibrations.

III.3. Dosages

I.3.1. Détermination des pKa du ligand

Une solution de 20 mL d'ACX ou BCX à 10^{-3} mol.L^{-1} (dans KCl 0,1 mol.L^{-1}) est dosée par HCl 0,1 mol.L^{-1} (incréments de 10 à 50 µL et temps d'attente entre chaque point : 2 min). Un dosage retour par KOH est réalisé systématiquement dans les mêmes conditions.

I.3.2. Détermination des constantes de complexation

Les solutions de complexes sont préparées à partir des solutions mères décrites précédemment. Les quantités introduites sont ajustées à la stoechiométrie voulue : M/L 0,5/1 ; 1/1 ; 2/1 ; 3/1. Les conditions de dosages sont similaires à celles utilisées pour le ligand seul mais avec un temps d'attente de 5 min entre chaque point. Un dosage retour par KOH et un deuxième dosage par HCl sont réalisés systématiquement avec un temps d'attente de 5 min entre chaque point, sauf dans la zone du saut de pH où ce temps est augmenté.

I.3.3. Ajustement par Hyperquad 2000[152]

Le $pH_{mesuré}$ est d'abord calculé à partir des valeurs de E° et f issues de la calibration. Ensuite, les couples de valeur volume ajouté et $pH_{mesuré}$ sont saisis dans le programme Hyperquad 2000. Les concentrations initiales en ligand, proton et métal sont fixées, ainsi que la valeur de pKw (13,78 à 298 K et force ionique 0,1 $mol.L^{-1}$). Lors de la détermination des constantes de complexation, les valeurs de pKa trouvées pour le ligand sont également fixées. Les valeurs de constantes ajustées sont prises en compte lorsqu'elles sont valables quelle que soit la stoechiométrie métal/ligand utilisée, et lorsqu'elles sont reproductibles sur plusieurs dosages.
La validité du modèle est représentée par la valeur σ indiquant l'erreur estimée dans les observations expérimentales. σ doit être proche de 1 pour que le modèle puisse être considéré comme valide.

IV. Spectrométrie de masse électrospray (ES-MS)

Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil LCQ à trappe d'ions (Thermoquest-Finnigan, San Jose, USA), muni d'une source d'ionisation électrospray. Les spectres de masse enregistrés en mode « full-scan », dans la gamme des m/z 400-2000, sont obtenus par injection à travers un tube de silice à 2-10 $\mu L.min^{-1}$. Les solutions sont analysées à la fois en mode positif et en mode négatif. La calibration du spectromètre (m/z 50-2000) est réalisée d'après la procédure standard du fournisseur (mélange de caféine, MRFA et Ultramark 1621). La température du capillaire chauffant est fixée entre 160 et 200 °C, la différence de potentiel appliquée est de 1 à 6 kV, le temps d'injection varie de 5 à 200 ms.

Les échantillons ont été préparés avec des solutions de ligand dans l'eau à 10^{-3} mol.L^{-1} et divers volumes de solutions d'$Eu(OTf)_3$, de $Lu(OTf)_3$, ou de $Tb(NO3)_3$ à 5.10^{-2} mol.L^{-1} pour atteindre la stoechiométrie souhaitée.

V. Luminescence

Toutes les mesures sont effectuées sur un fluorimètre Perkin-Elmer LS-50B possédant une lampe à xénon pulsée et un photomultiplicateur de type R928. Les cuves utilisées ont un trajet optique de 10 mm et sont systématiquement thermostatées à 25 °C.

V.1. Mesure du nombre de molécules d'eau coordonnées aux cations Eu(III) et Tb(III)

Les cations utilisés, $Eu(OTf)_3$ et $Tb(OTf)_3$, émettent dans le visible. Les longueurs d'onde d'émission sont les plus intenses de chacun des cations métalliques : 616 nm (transition $^5D_0$-$^7F_2$) pour l'Eu(III) et 545 nm (transition $^5D_4$-$^7F_5$) pour le Tb(III). Les paramètres d'enregistrement des spectres sont les suivants : un seul flash d'excitation, délai entre l'excitation et l'acquisition (td) variable de 0.01 à 10 ms, temps d'acquisition (tg) 1 ms, et ouverture des fentes de 10 nm pour l'excitation et pour l'émission.

Les complexes de cyclodextrine

Les solutions de complexe de cyclodextrine suivantes sont analysées : [M] = 0,9 [L] ; [L] = 0,1 ; 1 ;10 mmol.L^{-1} dans l'eau milliQ et dans D_2O 99,8%, en présence et en absence de KCl 0,1 mol.L^{-1}. Les mesures sont ensuite faites avec d'autres sels de fond à 0,1 mol.L^{-1} (NaCl, LiCl, CsCl et Bu_4NCl) de pureté supérieure à 99,5%.

Dans ce cas l'excitation se fait directement sur le métal, λ_{exc}(Eu) = 396 nm (ε = 2,77 L.mol^{-1}.cm^{-1}) et λ_{exc}(Tb) = 368 (ε = 0,34 L.mol^{-1}.cm^{-1}) ou 215 nm (ε = 300 L.mol^{-1}.cm^{-1}) (les résultats obtenus sont similaires dans les deux cas).

Les complexes de peptide

Les solutions de peptide analysées sont telles que [P] = 0,9 [Tb] = 50 µmol.L^{-1} dans un tampon HEPES à pH 7. Pour cela, une solution mère ([P] = 0,9 [Tb] = 400 µmol.L^{-1}, [HEPES] = 10 mmol.L^{-1}, pH =7) est diluée dans H_2O ou D_2O contenant le tampon HEPES. Différentes cuves sont préparées avec des pourcentages de D_2O : 0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 50 ; 70 ; 90%.

L'excitation a lieu sur le tryptophane, λ_{exc}(Trp) = 280 nm.

Des mesures similaires sont effectuées sans tampon en ajustant le pH à 7 à l'aide d'une solution de KOH.

V.2. Mesure de constantes de complexation du ligand peptidique

I.2.1. Dosages directs

Les dosages directs se font avec du Tb(III). Les solutions mères de métal (1.5 mmol.L^{-1}) sont préparées dans de l'eau milliQ. Elles sont ensuite injectées par incréments à une solution de 30 à 50 µmol.L^{-1} de peptide soit dans un tampon ([MES] = 10 mmol.L^{-1}, pH = 6.5, ou [HEPES] = 10 mmol.L^{-1}, pH = 7). Les incréments sont de 0,1 équivalents au départ puis de 0,2 à 0,5 équivalents par la suite pour finalement atteindre un rapport M/L de 3/1. Après chaque ajout de métal, la solution est agitée pendant 5 min, puis laissée à équilibrer à 25 °C pendant 10 min. L'excitation se fait à 280 nm, et le signal émis est enregistré entre 450 et 800 nm et moyenné sur 10 scans. Les paramètres utilisés pour l'enregistrement des spectres : un seul flash d'excitation, un délai entre l'excitation et l'acquisition (td) de 0,05 ms, un temps d'acquisition (tg) de 1 ms, et une ouverture des fentes de 10 nm pour l'émission et 5 nm pour l'excitation.

Les dosages sont également suivis par la diminution de l'intensité du signal de luminescence du Trp à 357 nm. Les fentes utilisées pour cette acquisition sont respectivement de 2,5 et 5 nm pour l'émission et l'excitation.

I.2.2. Dosages par compétition (en retour)

Pour les dosages en retour, la solution initiale contient [Tb] = 3 [P]. Des solutions d'$Eu(OTf)_3$ ou $CaCl_2.2H_2O$ sont ajoutées respectivement jusqu'à disparition totale ou disparition de 50% du signal d'émission du Tb(III) à 545 nm.

I.2.3. Ajustement des constantes par Specfit

La totalité des spectres est importée dans le programme Specfit 32. L'analyse factorielle du système permet de confirmer le nombre d'espèces absorbantes significatives. L'ajustement de l'intensité calculée aux données expérimentales à l'aide d'un algorithme des moindre-carrés non linéaire permet de déterminer les log β_{ml0} de chaque complexe.[153,154] Un dosage est considéré comme valable lorsque l'analyse factorielle est en accord avec le nombre d'espèces attendu et que l'ajustement des valeurs expérimentales au modèle converge. La valeur de la moyenne des résidus (Sigma) est de l'ordre de 0,1.

VI. Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire

VI.1. Spectromètres RMN utilisés

Différents spectromètres ont été utilisés suivant le champ, la sensibilité ou la résolution souhaitée.

- 200 MHz : spectromètre BRUKER Avance 200 (^{1}H : 200,13 MHz; ^{13}C : 50,32 MHz), impulsions ^{1}H à 90° de 7 µs.

- 400 MHz : - Mercury VARIAN 400 équipé d'une sonde directe, 4 noyaux (^{1}H : 400,12 MHz; ^{13}C : 100,62 MHz; ^{19}F : 376,48 MHz; ^{31}P : 161,97 MHz), impulsion ^{1}H à 90° de 11 µs, unité gradient selon z permettant d'atteindre au maximum 19,4 G.cm^{-1}.

  - Unity VARIAN 400 équipé d'une sonde indirecte (^{1}H : 399,96 MHz ; ^{13}C : 100,57 MHz), impulsion ^{1}H à 90° de 9 µs respectivement, unité gradient selon z permettant d'atteindre au maximum 32,0 G.cm^{-1}.

- BRUKER Avance 400 équipé d'une sonde indirecte (^{1}H : 400,14 MHz ; ^{13}C : 100,63 MHz), impulsion ^{1}H à 90° de 6 µs.

♦ 500 MHz : spectromètre BRUKER Avance 500 a été utilisé (^{1}H : 500,13 MHz; ^{13}C : 125,77 MHz), impulsion ^{1}H à 90° de 7 µs, unité gradient selon z permettant d'atteindre 64,0 $G.cm^{-1}$ au maximum.

Tous les spectromètres ont été calibrés en température et les spectres ont toujours été enregistrés à une température réelle de la sonde contrôlée à 298 K.
Pour une utilisation optimale des spectromètres, les spectres de ^{13}C ou de ^{19}F ont été enregistrés à 400 MHz sur le Mercury VARIAN. Les mesures de coefficients de diffusion ont été faites soit à 400 MHz sur le Unity VARIAN, soit à 500 MHz sur l'Avance BRUKER. Toutes les expériences concernant le peptide ont été faites à 500 MHz pour des raisons de sensibilité et de résolution. Les autres spectres ont été réalisés sur l'ensemble des spectromètres disponibles.

VI.2. Mesures de temps de relaxation

Les temps de relaxation sont des paramètres dynamiques du système étudié. Ils correspondent à des temps de retour à l'équilibre de l'aimantation après une perturbation initiale. Il existe trois types de temps de relaxation : le temps de relaxation longitudinale T_1 correspondant au temps de retour à l'équilibre selon l'axe privilégié de l'aimantation (axe z), le temps de relaxation transversale T_2 correspondant au temps de décroissance retour à l'équilibre de l'aimantation macroscopique dans le plan (x,y) et le temps de relaxation transversal $T_{1\rho}$ correspondant au temps de décroissance de l'aimantation dans le repère tournant. La principale différence entre T_2 et $T_{1\rho}$ est que dans le cas de $T_{1\rho}$, on s'affranchit de l'évolution de l'aimantation selon le couplage *J* entre noyaux.
Avant chaque expérience de ce type, l'impulsion à 90° est calibrée, et le délai d1 (délai de retour à l'équilibre) est fixé à $5*T_1$. Les solutions sont dégazées par un bullage d'argon pendant 20 min et conservées dans des tubes Young 5 mm pour éviter toute entrée de dioxygène. Le traitement des expériences a été réalisé indifféremment en intensité des pics ou en aire après avoir vérifié que les résultats obtenus étaient similaires.

I.2.1. Mesures de T_1

Les mesures ont été réalisées sur l'ensemble des spectromètres. La séquence d'inversion-récupération (Figure 9) a été utilisée. La perturbation est une impulsion à 180° qui inverse l'aimantation selon l'axe z, suivie d'une attente pendant un délai τ variable et d'une impulsion de lecture à 90°. Aq correspond au temps d'acquisition et d1 au délai de retour à l'équilibre de l'aimantation (5 à 7*T_1).

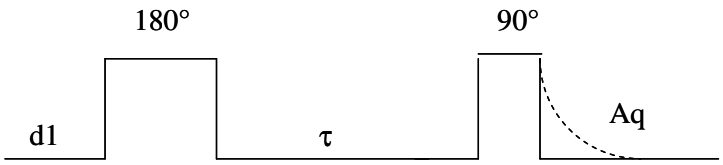


Figure 9 : séquence d'inversion récupération pour la mesure de T_1

D'après les équations de Bloch, le retour à l'équilibre de l'aimantation est régi par l'équation :

$$M_z(\tau) = M_0\left[1 - 2\exp(-\frac{\tau}{T_1})\right] \qquad \textbf{équation 4}$$

Pour chaque échantillon, les valeurs de T_1 ont été obtenues par ajustement d'une exponentielle à trois paramètres, prenant en compte le retournement imparfait de l'aimantation après l'impulsion à 180°, ceci pour des délais τ variant de quelques millisecondes à d1.

I.2.2. Mesure de T_2

Une perturbation initiale de 90° est d'abord appliquée. L'aimantation évolue ensuite selon une séquence d'écho de Carr-Purcell et Meiboom-Gill (Figure 10). Ceci permet une défocalisation, puis une refocalisation des spins dans le plan (x,y), annulant ainsi tout effet de déplacement chimique. Il ne subsiste que l'atténuation de l'aimantation transversale due à T_2.

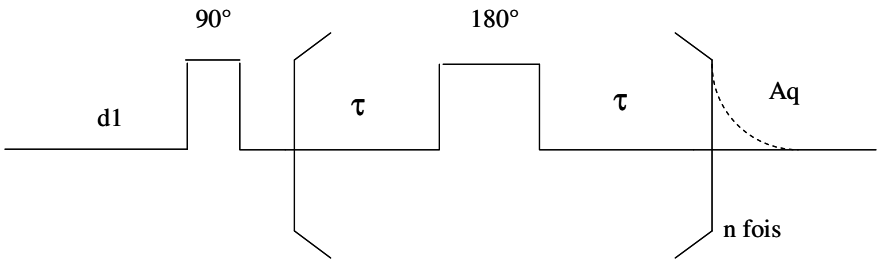


Figure 10 : Séquence Carr-Purcell et Meiboom-Gill de mesure du temps de relaxation transversale.

Le retour à l'équilibre est régi par l'équation suivante :

$$M_{x,y}(\tau) = M_0 \exp(-\frac{2n\tau}{T_2}) \qquad \textbf{équation 5}$$

De façon pratique, le temps τ est fixé à 1 ms, et l'on fait varier le nombre de fois n où la séquence est répétée. n doit être pair pour diminuer les effets de diffusion translationnelle, et est ajusté de telle sorte que le temps de la sous-séquence τ–π–τ varie entre 2 ms et d1. Le traitement s'effectue ensuite de façon similaire à celui de T_1, par un ajustement à 3 paramètres.

I.2.3. Mesure de $T_{1\rho}$

Le principal problème de la séquence de mesure de T_2 est que l'aimantation évolue selon le couplage scalaire *J* lorsque le noyau n'est pas isolé. De plus, l'évolution est perturbée par la diffusion translationnelle que nous allons voir par la suite. Pour s'affranchir de ce problème, le temps de relaxation transversale peut être mesuré par verrouillage (spin-lock) le long du champ radiofréquence.

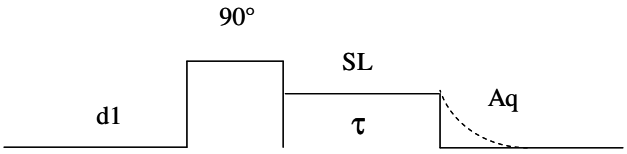


Figure 11 : Mesure du temps de relaxation transversal dans le repère tournant par spin-lock.

Après une impulsion classique à 90°, un champ radiofréquence B_1 est appliqué pendant un temps τ variable. L'aimantation précesse autour de B_1 et comme elle lui est colinéaire, elle reste fixe dans le champ tournant avec B_1. L'aimantation est alors verrouillée.

En pratique, on fait varier τ entre quelques millisecondes et d1. Le traitement est ensuite similaire aux précédents car l'aimantation évolue selon l'équation suivante :

$$S(\tau) = S_0 \exp(-\tau/T1\rho) \qquad \textbf{équation 6}$$

La puissance du spin lock appliqué couvre 4 ppm à 500 MHz (spin-lock : 2000 Hz), 7 ppm à 400 MHz (spin-lock : 2800 Hz), et 3 ppm à 200 MHz (spin-lock : 600 Hz).

VI.3. Mesures de coefficients de diffusion

Cette mesure est effectuée par une séquence d'échos stimulés simples utilisant des gradients bipolaires, et développée par Jerschow et Müller (Figure 12).[116] Les gradients bipolaires permettent une atténuation plus lente du signal en T_1 plutôt qu'en T_2.

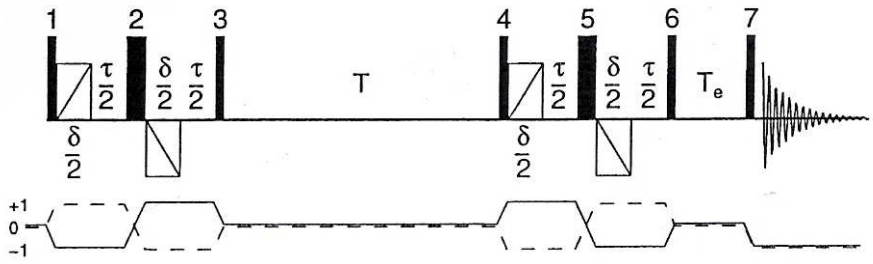


Figure 12 : Séquence d'échos stimulés pour la mesure de coefficients de diffusion et chemins de cohérence.[116]

En pratique, δ est relié au temps d'application du gradient, et T au temps de diffusion de la molécule selon l'équation 7. Nous faisons varier le gradient entre 0 et 80% de sa valeur maximale.

$$\Delta = T + \frac{2}{3}\delta + \frac{3}{4}\tau \qquad \textbf{équation 7}$$

où Δ est le temps de diffusion de la molécule.

L'atténuation du signal obéit à une loi exponentielle :

$$I = \exp(-D\gamma^2\delta^2\Delta^2G^2) \qquad \textbf{équation 8}$$

où I est l'intensité du signal observé

D est le coefficient de diffusion de la molécule en $cm^2.s^{-1}$

γ est le rapport gyromagnétique du noyau considéré en $rad.s^{-1}.G^{-1}$

G est le gradient variable appliqué en $G.cm^{-1}$

Ainsi la pente du graphique ln(I) = f(G^2) permet de trouver la valeur du coefficient de diffusion.

VI.4. Profils NMRD

Les profils NMRD ont été obtenus à 298 K entre 0,02 et 40 MHz sur un relaxomètre RMN Spinmaster FFC (Fast Field Cycling) couvrant des champs magnétiques allant de $2{,}5.10^{-4}$ à environ 1 T. Une séquence non polarisée (Figure 13) est utilisée pour les champs dont les fréquences varient entre 40 et 12 MHz, alors que pour les champs plus faibles, une séquence prépolarisée (Figure 14) est utilisée.

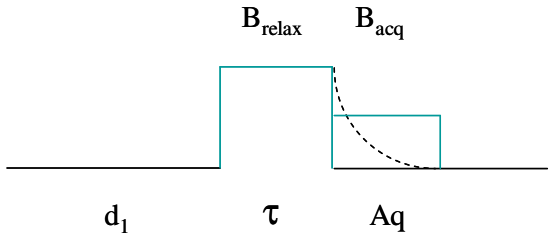


Figure 13 : Séquence de type non polarisée utilisée pour les champs dont les fréquences varient entre 12 et 40 MHz.

La fréquence du champ d'acquisition (B_{acq}) est de 20,8 MHz, celle du champ de relaxation (B_{relax}) est variable et celle du champ de polarisation (B_{pol}) est de 28 ou 35 MHz. Le délai d1 correspond à $4*T_1$ pour le temps de relaxation le plus long. Le temps de polarisation (t_{pol}) est de $4*T_1$ du champ de polarisation appliqué (B_{pol}) afin que l'aimantation atteigne son état d'équilibre. Le délai τ varie entre 0 et $4*T_1$.

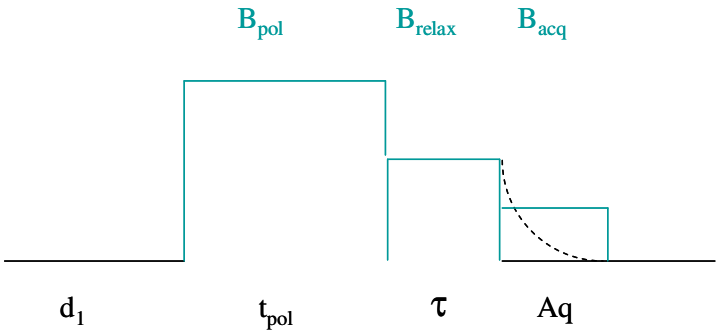


Figure 14 : Séquence prépolarisée utilisée pour les champs dont les fréquences varient entre 0,01 et 12 MHz.

Des tubes à vanne Young de 10 mm sont utilisés et les expériences sont systématiquement réalisées en présence de 4% d'eau légère environ pour les mesures effectuées sur HOD. Les points à 200, 400, et 500 MHz ont été réalisés par les séquences classiques décrites précédemment dans des tubes à vanne Young de 5 mm.

VI.5. Expériences de développements méthodologiques

I.5.1. Mesures de relaxivité par RMN du proton et du fluor en vue de la transmétallation

Pour toutes les solutions suivantes, les T_1 sont mesurés comme décrits précédemment à la fois en RMN ^{19}F et ^{1}H lorsque les deux noyaux sont présents.

Détermination de la relaxivités des sondes fluorées et protonées

Les sondes suivantes sont utilisées dans toutes les solutions à la concentration de 10 mmol.L^{-1} : CF_3COONa (98%), CFH_2COONa (98%) (très toxique), CF_2HCOOH (98%), CH_3COONa (≥99,5). Toutes les solutions sont également préparées dans KCl 0,1 mol.L^{-1} et dans un mélange H_2O/D_2O 95/5.

Les relaxivités sont mesurées en présence de Gd(III), puis de Gd(DTPA).

- Gd^{3+} :

Une solution diamagnétique S0 contenant l'ensemble des sondes est préparée. Une solution stock S1 paramagnétique est obtenue en dissolvant 1,15 mol.L^{-1} de Gd(III) dans la solution diamagnétique S0.

Les volumes adéquats de S0 et S1 sont mélangés afin d'étudier les solutions suivantes : $[Gd^{3+}]$ = 0 ; 0,058 ; 0,115 ; 0,230 ; 0,575 ; 1,15 mmol.L^{-1}.

- Gd(DTPA) :

Une solution diamagnétique S0 contenant les sondes ainsi que 0,962 mol.L^{-1} de DTPA est préparée, à pH 7-8, en ajoutant 5 equivalents de KOD au réactif $DTPAH_5$ (≥ 99%). La solution paramagnétique S1 est préparée en agitant 0,9 équivalents de $GdCl_3.6H_2O$ (99,9%) en présence d'un équivalent de DTPA de la solution S0. Le pH est contrôlé afin qu'il reste compris entre 5 et 7.

Des volumes adéquats de S0 et S1 sont mélangés afin d'étudier les solutions telles que : $[Gd^{3+}]$ = 0 ; 0,069 ; 0,137 ; 0,344 ; 0,687 mmol.L^{-1}.

Mesure de transmétallation

Pour l'étude de la transmétallation en présence de Lu(III), les solutions contiennent :

- [CF_3COONa] = 10 mmol.L^{-1},
- [KCl] = 0,1 mol.L^{-1},
- [GdDTPA] = 2,06 mmol.L^{-1},
- [Lu^{3+}] = 0 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 mmol.L^{-1}

Pour la transmétallation en présence de zinc ou de calcium, les solutions contiennent :

- [CF_3COONa] = [CF_2HCOOH] = [CFH_2COONa] = [CH_3COONa] = 10 mmol.L^{-1},
- [KCl] = 0,1 mol.L^{-1},
- [GdDTPA] = 0,97 mmol.L^{-1},
- [Zn^{2+}] = 0 ; 4,81 ; 9,63 ; 19,25 mmol.L^{-1} ou [Ca^{2+}] = 14,97 mmol.L^{-1}

Données thermodynamiques sur l'acétate (K et r_{Gd-H})

Les deux solutions suivantes sont préparées comme décrit précédemment :

- [Gd] = 8,7 mmol.L^{-1} ; [CH_3COONa] = 9,94 mmol.L^{-1}.
- [Gd] = 8,7 mmol.L^{-1} ; [CH_3COONa] = 39,75 mmol.L^{-1}.

I.5.2. Relaxivité du GdDTPA en présence de sondes par RMN du proton et du fluor

Une première solution mère S0 diamagnétique contenant uniquement les sels de fond est préparée. Pour cela, sont mélangés : 8,07 mmol.L^{-1} de méthanesulfonate de sodium, 8,04 mmol.L^{-1} de chlorure de tétrabutylammonium, 10,16 mmol.L^{-1} de pentaérythritol, 10,00 mmol.L^{-1} de tertbutanol, 10,00 mmol.L^{-1} de dioxanne, 8,63 mmol.L^{-1} de trifluoroacétate de sodium, 8,07 mmol.L^{-1} de trifluorométhanesulfonate de potassium dans KCl 0,1 mol.L^{-1} dans D_2O. 2,08 mmol.L^{-1} de $DTPAH_5$ sont ajoutés et le pH de la solution est amené à 5 par ajout de KOD. Une deuxième solution mère S1, avec les sondes, contenant 6,53 mmol.L^{-1} de $GdCl_3.6H_2O$ est complétée par la solution mère S0. Les quantités appropriées de S0 et S1 sont ensuite mélangées de sorte que :

- [Gd^{3+}] = 0 ; 0,11 ; 0,54 ; 1,09 ; 1,63 ; 2,17 ; 3,27 ; 4,36 ; 6,53 mmol.L^{-1}.

Des mesures de T_1 et T_2 sont ensuite effectuées sur chaque échantillon.

VI.6. RMN des complexes de cyclodextrine

I.6.1. Dosage des ligands par des sels de lanthanide(III)

Les échantillons sont préparés dans l'eau lourde (99,9% ^2H) avec une concentration en ligand de 5.10^{-3} mol.L^{-1}. Les quantités nécessaires de $Lu(OTf)_3$, $La(OTf)_3$, $Eu(OTf)_3$, $Yb(OTf)_3$, $Sm(OTf)_3$ sont ensuite ajoutées à la solution de ligand. Les spectres de complexes diamagnétiques (Lu et La) sont enregistrés sur une largeur de 10 ppm. L'acquisition des spectres avec des métaux paramagnétiques est réalisée d'abord sur la fenêtre spectrale maximale autorisée (100 000 Hz), puis cette fenêtre est réduite à l'étendue du spectre.

Les spectres bidimensionnels sont enregistrés avec 2048 points d'acquisition et 256 incréments, en mode absolu pour les expériences avec gradients et en mode phasé pour les autres.

Les paramètres à fixer pour les différentes expériences sont les suivants :

TOCSY	spin-lock : 200 ms et 9 kHz
NOESY/EXSY	temps de mélange : 500 ms (Lu), 50 ms (Eu) et 5 ms (Yb)
ROESY	spin-lock trapézoïdal off résonance (3 ppm) : 250 ms et 2 kHz

I.6.2. Mesure du nombre de molécules d'eau coordonnées au métal par RMN de l'oxygène 17

Une solution mère de ligand ACX à 30 mmol.L^{-1} est préparée dans D_2O. A cette solution sont ajoutées de petites quantités d'une solution concentrée de dysprosium $DyCl_3.6H_2O$ de sorte que la concentration en Dy(III) varie entre 0 et 90 mmol.L^{-1}. La fréquence du spectromètre est réglée à celle de l'oxygène 17 : 54,25 MHz. Les acquisitions sont réalisées sur une fenêtre spectrale de 10000 Hz et le déplacement de la raie d'oxygène 17 est observée. Une expérience préalable avec du Dy(III) seul permet une calibration de ce déplacement.

I.6.3. Mesures de T1 à 400 MHz

En présence de sondes

Les tubes RMN pour les mesures de relaxivité sont préparés avec des concentrations typiques de celles utilisées en potentiométrie. Ils ont les compositions suivantes :

- $[CH_3SO_3Na] = [tBuOH] = 2*[(CH_3)_4NCl] = 20$ mmol.L^{-1}
- [L] = 2,00 mmol.L^{-1}
- $[Gd^{3+}]$ = 0 ; 0,50 ; 1,00 ; 1,50 ; 2,00 ; 3,00 ; 4,00 ; 5,00 ; 6,00 mmol.L^{-1}

En fonction de la concentration en sel de fond

Cette fois, les concentrations en ligand et métal sont fixées. Chaque tube contient :

- [L] = 2,50 mmol.L^{-1}
- $[Gd^{3+}]$ = 2,00 mmol.L^{-1}
- [KCl] ou [CaCl2] = 0 ; 0,001 ; 005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 mol.L^{-1}

ou [NaCl] ou [LiCl] ou [CsCl] = 0 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 mol.L^{-1}

ou [Bu4NCl] = 0 ; 005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 mol.L^{-1}

I.6.4. Profils NMRD

ACX

Le profil de l'eau est réalisé dans le solvant H_2O/D_2O en proportions 96/4. Le tube contient $[Gd^{3+}] = 0,8*[ACX] = 0,89$ mmol.L^{-1} et [KCl] = 0,1 mol.L^{-1}.

Le profil du *t*BuOH est réalisé dans D_2O extrapure (99,97%). Le tube contient 0,4 mol.L^{-1} de *t*BuOH, 1,35 mmol.L^{-1} de Gd^{3+}, 1,46 mmol.L^{-1} d'ACX et 0,1 mol.L^{-1} de KCl.

BCX

Le profil de l'eau est réalisé dans H_2O/D_2O 4/96. La solution contient 1,15 mmol.L^{-1} de BCX, 0,92 mmol.L^{-1} de Gd(III) dans NaCl 9 g.L^{-1}. 1 mL de cette solution est mis dans un tube RMN de 10 mm, et 700 µL dans un tube RMN de 5 mm pour les mesures à partir de 200 MHz.

Le profil du méthanol est réalisé dans D_2O extrapure (99,97%). La solution contient 2,53 mmol.L^{-1} de BCX, 2,14 mmol.L^{-1} de Gd(III) et 1 mol.L^{-1} de méthanol deutérié CH_3OD dans NaCl 9 g.L^{-1}. La solution est également séparée en deux, 1 mL dans un tube de 10 mm et 700 µL dans un tube de 5 mm.

VI.7. Applications au peptide

I.7.1. Structure du peptide libre

Les spectres sont enregistrés sur le spectromètre BRUKER 500 MHz à 298 K. L'échantillon est préparé dans H_2O/D_2O 90/10 à une concentration de 8 mmol.L^{-1}. La suppression de l'eau est réalisée par l'intermédiaire d'une séquence de type watergate.[155,156] Le spectre TOCSY a été fait avec un temps de spin-lock de 70 ms[157] et le spectre t-ROESY avec un temps de mélange de 300 ms.[101,158]. Le spin-lock est fait sur une largeur spectrale de 4050 Hz avec une puissance de 13 dB. L'ensemble des spectres a été réalisé avec 512 points dans la dimension F1 et 2048 points d'acquisition.

La structure en solution a été calculée en utilisant le programme X-PLOR 3.1 et en suivant le protocole standard de minimisation d'énergie.[146] Les contraintes de distances ont été obtenues par intégration du spectre t-ROESY. Les distances Pro $H\alpha/H\beta_1$ (2,3 Å), Pro $H\delta_1/H\delta_2$ (1,82 Å), Asp $H\beta_1/H\beta_2$ (2,43 Å), Trp $H\beta_1/H\beta_2$ (1,79 Å), Trp $H\varepsilon_1/H\delta_1$ (2,58 Å), Trp $H\varepsilon_1/H\zeta_2$ (2,84 Å) sont utilisés comme références. Ces distances entre protons seront données avec une marge de 15% par rapport à leur valeur moyenne. Les contraintes d'angles ϕ sont extraites des couplages $^3J_{HN,H\alpha}$ mesurés sur le spectre RMN ^{1}H. Des corrections de pseudo atomes sont appliquées aux groupes méthyls et aux méthylènes non stéréospécifiquement attribués.[159]

I.7.2. Addition de métaux sur le peptide

Une solution de peptide à pD = 3,44 et 1 mmol.L^{-1} a été préparée dans D_2O. Cette solution est ensuite basifiée jusqu'à pD = 6-7 par ajout de 4 équivalents de KOD. Une solution concentrée (30,76 mmol.L^{-1}) de $La(OTf)_3$ est ensuite ajoutée jusqu'à atteindre 2 équivalents de métal par rapport au ligand. Des spectres RMN ^{1}H sont réalisés à chaque ajout, et si besoin des spectres TOCSY complémentaires sont effectués en avec un temps de spin-lock de 70 ms couvrant une fenêtre spectrale de 6250 Hz.

I.7.3. Mesures de T1 à 400 MHz

Une solution de peptide dans D_2O à 1,40 mmol.L^{-1} et à pD = 3,57 a été amenée après basification à un pD de 6,04. Les tubes préparés pour les mesures de temps de relaxation ont ensuite les compositions suivantes :

- $[CH_3SO_3Na] = [t\text{BuOH}] = 2*[(CH_3)_4NCl] = 20$ mmol.L^{-1}

- [Peptide] = 1,40 mmol.L^{-1}
- [Gd^{3+}] = 0 ; 0,25 ; 0,52 ; 0,76 ; 0,99 ; 1,43 ; 2,00 ; 2,53 ; 3,03 mmol.L^{-1}

I.7.4. Profil NMRD

Le profil de l'eau est réalisé dans 96% de D_2O et 4% de H_2O. La solution contient 1,25 mmol.L^{-1} de peptide de pD = 6,06, 0,88 mmol.L^{-1} de Gd(III). 1 mL de cette solution est mis dans un tube Young de 10 mm, et 700 µL dans un tube Young de 5 mm pour les mesures à partir de 200MHz.
Le profil du méthanol est réalisé dans D_2O extrapure. La solution contient 1,23 mmol.L^{-1} de peptide de pD = 6,39, 0,85 mmol.L^{-1} de Gd(III) et 1 mol.L^{-1} de méthanol deutérié CH_3OD.

VII. Spectroscopie par Résonance Paramagnétique Electronique

VII.1. Principe de la RPE et appareillage utilisé

Le principe d'un spectromètre RPE consiste à étudier l'absorption d'une onde continue hyperfréquence (dans notre cas pour la bande X, environ 3400 G pour un facteur de Landé g proche de 2) entre les niveaux Zeemann d'un échantillon paramagnétique plongé dans un champ magnétique statique et modifiable. L'onde électromagnétique générée pénètre dans une cavité résonante (Figure 15) caractérisée par un facteur de qualité Q et où se trouve placé l'échantillon en solution aqueuse. Ce dernier est introduit de façon à minimiser les perturbations diélectriques et se trouve donc dans un nœud de champ électrique et un ventre de champ magnétique. Etant donné que les études sont faites dans l'eau et que l'eau absorbe le champ électrique, cela implique de placer la solution aqueuse dans un capillaire très fin (embouts de pipette pasteur scellés) qui sont ensuite introduits dans un tube RPE classique. Ainsi l'eau reste confinée dans le plan nodal du champ électrique.

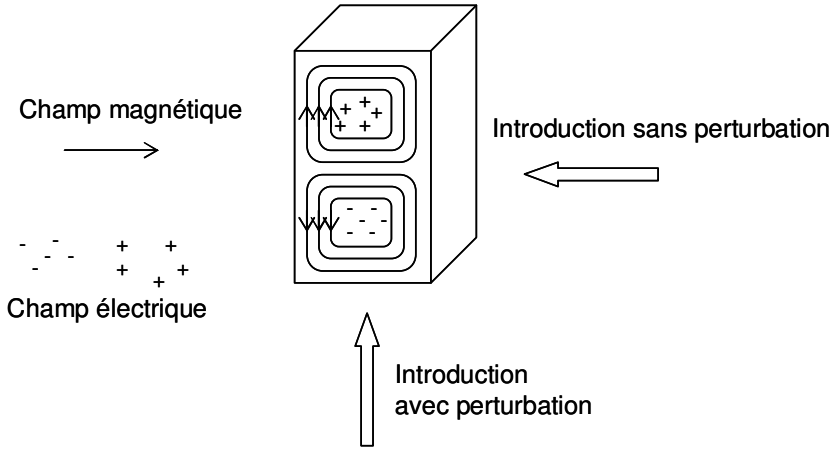


Figure 15 : Cavité RPE.

Pour réaliser un spectre RPE, on effectue un balayage du champ magnétique de 1000 à 6000 G. En l'absence de résonance, Q dépend essentiellement des pertes dues à la cavité et au reste du dispositif et ne dépend que très peu de la valeur du champ statique appliqué. La résonance va provoquer une absorption d'énergie hyperfréquence et donc abaisser Q. C'est cette modification qui est enregistrée par le spectromètre. Afin d'augmenter la sensibilité de cette expérience le champ statique est modulé à faible fréquence (environ 100 kHz) avec une intensité beaucoup plus faible que les largeurs de raies observées. Les mesures sont faites en détection synchrone. Par conséquent, on observe le signal dérivé de l'absorption qui est appelé spectre RPE.

Toutes les mesures sont réalisées à 298 K. L'appareil utilisé est un spectromètre BRUKER EMX à bande X et à cavité rectangulaire ER 4116 DM.

VII.2. Mesures RPE réalisées

Une solution S1 de Gd_2ACX à 9,78 mmol.L^{-1} en ACX et 19,78 mmol.L^{-1} en Gd(III) est préparée dans KCl 0,1 mol.L^{-1} et à pH = 4,4. Une partie de S1 est ensuite basifiée jusqu'à pH = 6,99 (solution S2). Une troisième solution mère de complexe d'yttrium diamagnétique dopé par du gadolinium a été préparée comme suit : 9,72 mmol.L^{-1} en ACX, 18,43 mmol.L^{-1} en Y(III) et 1,48 mmol.L^{-1} en Gd(III) dans KCl 0,1 mol.L^{-1} et à pH = 4,4. S3 a ensuite été basifiée comme précédemment jusqu'à un pH de 6,69.

Tous les spectres ont été réalisés avec une puissance hyperfréquence de 20 mW, une amplitude de modulation de 10 G, une fréquence de modulation de 100 kHz, et un balayage en champ de 5000 G.
Les acquisitions ont été réalisées sur 100 scans avec une soustraction systématique d'un « blanc » qui était un simple tube capillaire contenant de l'eau.

VIII. Diffraction aux rayons X

Le cristal de Lu_2ACX obtenu a été analysé à l'aide d'un diffractomètre Bruker SMART-CDD à trois cercles (radiation Mo-Kα, monochromateur graphite, $\lambda = 0{,}71073$ Å) piloté par le programme SMART 5.628.
L'acquisition a été faite à –50 °C. Les paramètres de maille sont obtenus par mesure des intensités de diffraction de trois séries de quinze images, avec un temps d'exposition de 10 s. La distance entre le cristal et le détecteur est de 5 cm. Pour la collecte complète, 606 images sont réalisées avec $\varphi = 0$; 435 images avec $\varphi = 90°$; 230 images avec $\varphi = 180°$ avec des incréments de ω de 0,3 °et un temps de pause de 30 s. Ceci permet de couvrir complètement une demi-sphère (Figure 16). A la fin de chaque collecte, les 50 premières images sont enregistrées à nouveau pour vérifier que le cristal n'a pas été détruit pendant la collecte.

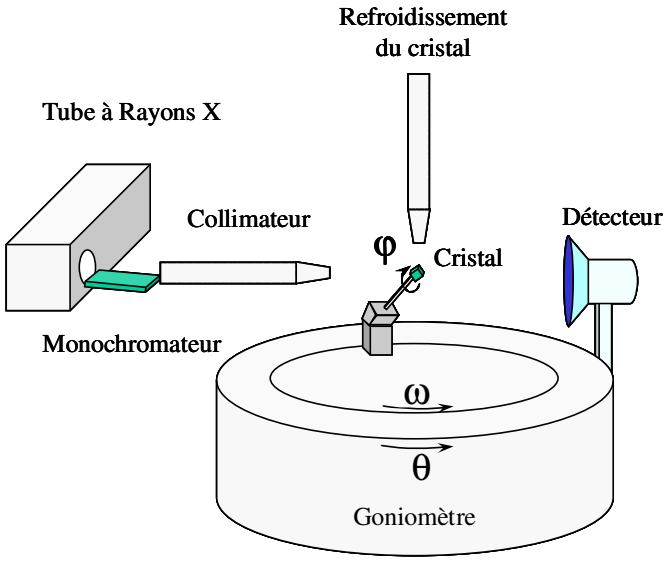


Figure 16 : diffractomètre à trois cercles.

Les images sont ensuite traitées par le programme SAINT 6.22 qui permet d'obtenir un fichier d'intensité. Sur toute la collecte, les raies uniques les plus intenses sont utilisées pour affiner les valeurs des paramètres de maille. Une correction d'absorption est réalisée grâce au programme SADABS (Bruker). Le groupe d'espace est déterminé par les raies éteintes et confirmé par la résolution de la structure. Cette dernière est effectuée dans un premier temps par les méthodes directes (programme SHELXS 6.10) qui permettent de trouver les atomes les plus lourds et est affinée ensuite par la méthode des moindres carrés (programme SHELXL). Les autres atomes sont trouvés par différence des transformées de Fourier des spectres calculés et des transformées de Fourier des spectres avec raies intenses. Les positions des atomes d'hydrogène sont ensuite calculées. La validité du modèle est donnée par la valeur du résidu R_1.

Les paramètres de résolution de la structure cristallographique sont donnés dans l'annexe 3.

Annexes

ANNEXE 1 : CONSTANTES D'EQUILIBRE.FORMALISME POUR LES EQUILIBRES DE COMPLEXATION..... 261
ANNEXE 2 : RELAXATION MONOEXPONENTIONENTIELLE DE L'AIMANTATION LONGITUDINALE AVEC LE FORMALISME DE LUZ ET MEIBOOM 264
ANNEXE 3 : DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES 267
ANNEXE 4 : LES ACIDES AMINES 277

Annexe 1 : Constantes d'équilibre.Formalisme pour les équilibres de complexation

Une constante d'équilibre K, relative à une équation bilan donnée, est le quotient des activités des espèces présentes en solution à l'équilibre. Cette « constante » est indépendante de la pression et des concentrations. Elle dépend toutefois de la température.

$$aA + bB = cC + dD \qquad K = \frac{a_C^c \times a_D^d}{a_A^a \times a_B^b} = \frac{\gamma_C^c \times \gamma_D^d}{\gamma_A^a \times \gamma_B^b} \frac{[C]^c \times [D]^d}{[A]^a \times [B]^b}$$

En travaillant en présence d'un électrolyte inerte chimiquement et en fort excès, la force ionique est maintenue constante. Le rapport des coefficients d'activités (γ_i) est considéré comme invariant. La constante d'équilibre précédente est donc remplacée par une constante d'équilibre qui s'exprime en fonction des seules concentrations de sorte qu'elle est beaucoup plus simple à déterminer expérimentalement : $K = \frac{[C]^c \times [D]^d}{[A]^a \times [B]^b}$

Les expériences de potentiométrie ont été systématiquement réalisées à force ionique constante ($\mu = 0{,}1$ mol.L^{-1}), et à température constante (298 K). Par souci de simplification, les constantes, qui seront en fait des constantes apparentes, seront notées K.

Les équilibres de complexation et de protonation peuvent s'écrire de nombreuses façons. Les conventions utilisées sont donc développées dans cette annexe. Pour des raisons de clarté, les charges du ligand L et du métal M ont été omises ; L correspond ainsi à la forme totalement déprotonée du ligand.

Il existe principalement deux types de constantes : les constantes globales et les constantes successives de formation qui sont reliées entre elles. Les constantes globales de formation sont notées β et les constantes successives K.

Constantes de formation des complexes :

En présence de métal M, la constante globale de formation β_{MLH} du complexe MLH s'écrit sous la forme détaillée ci-dessous. Les indices M, L, et H de la constante β représentent respectivement le nombre de métaux, de ligands et de protons mis en jeu lors de la formation du complexe.

β_{mlh} : $mM + lL + hH = M_mL_lH_h$ $\qquad \beta_{mlh} = \dfrac{[M_mL_lH_h]}{[M]^m[L]^l[H]^h}$

Les constantes de formation globales des complexes ML et M_2L ne faisant pas intervenir de proton s'écrivent donc :

β_{110} : $M + L = ML$ $\qquad \beta_{110} = \dfrac{[ML]}{[M][L]}$

et, β_{210} : $2M + L = M_2L$ $\qquad \beta_{210} = \dfrac{[M_2L]}{[M]^2[L]}$

Il est possible d'écrire des constantes successives de formation. Ainsi K_2 relatif à l'équilibre ci-dessous s'écrit :

K_2 : $ML + M = M_2L$ $\qquad K_2 = \dfrac{[M_2L]}{[ML][M]}$ et $K_2 = \dfrac{\beta_{210}}{\beta_{110}}$

Cas particulier des constantes de protonations :

Les constantes de protonnation ne sont que le cas particulier de ces constantes de formation pour lesquelles M = 0. Les constantes globales de protonation β_{01h} sont définies comme suit pour un ligand L présentant par exemple trois sites de protonation :

β_{011} : $L + H = LH$ avec $\beta_1 = \dfrac{[LH]}{[L][H]}$

β_{012} : $L + 2H = LH_2$ avec $\beta_2 = \dfrac{[LH_2]}{[L][H]^2}$

β_{013} : $L + 3H = LH_3$ avec $\beta_3 = \dfrac{[LH_3]}{[L][H]^3}$

Les constantes d'acidité successives sont définies comme suit :

Ka_1 : $LH = L + H$ avec $Ka_1 = \dfrac{[L][H]}{[LH]}$

Ka_2 : $LH_2 = LH + H$ avec $Ka_2 = \dfrac{[LH][H]}{[LH_2]}$

Ka_3 : $LH_3 = LH_2 + H$ avec $Ka_3 = \frac{[LH_2][H]}{[LH_3]}$

Les constantes sont reliées entre elles par les relations suivantes :

$\log\beta_{011} = pKa_1$

$\log\beta_{012} = pKa_1 + pKa_2$

$\log\beta_{013} = pKa_1 + pKa_2 + pKa_3$

Formation d'hydroxocomplexes :

L'intervention de OH^- à la place de H^+ dans les équilibres se traduit par une valeur négative de l'indice H.

Ainsi la constante de formation, également appelée constante d'hydrolyse, d'un hydroxyde métallique $\beta_{10\text{-}1}$, s'écrit :

$\beta_{10\text{-}1}$: $M + H_2O = M(OH) + H$ $\beta_{10-1} = \frac{[M(OH)][H]}{[M]}$

De la même façon, pour un complexe :

$\beta_{11\text{-}1}$: $M + L + H_2O = ML(OH) + H$ $\beta_{11-1} = \frac{[ML(OH)][H]}{[M][L]}$

Ces constantes de formations d'hydroxocomplexes peuvent être reliées aux constantes d'hydrolyse de ces complexes définies comme suit :

K_{hyd}^{ML} : $ML + H_2O = ML(OH) + H$ $K_{hyd}^{ML} = \frac{[ML(OH)][H]}{[ML]}$

et $pK_{hyd}^{ML} = \log \beta_{110} - \log \beta_{11\text{-}1}$

Annexe 2 : Relaxation monoexponentielle de l'aimantation longitudinale selon le formalisme de Luz et Meiboom

Soit un spin nucléaire appartenant à une molécule et qui est en échange entre deux états, un libre (noté f) et un lié (noté b), et dont les aimantations longitudinales, notées respectivement M_{fz} et M_{bz} sont solutions du système d'équations couplées de Luz et Meiboom.

$$\begin{cases} \dfrac{\partial M_{\mathrm{b}z}}{\partial t} = -R_1^{\mathrm{b}}\left(M_{\mathrm{b}z} - M_{\mathrm{b,eq}}\right) - \dfrac{M_{\mathrm{b}z}}{\tau_{\mathrm{b}}} + \dfrac{M_{\mathrm{f}z}}{\tau_{\mathrm{f}}} \\ \dfrac{\partial M_{\mathrm{f}z}}{\partial t} = +\dfrac{M_{\mathrm{b}z}}{\tau_{\mathrm{b}}} - R_1^{\mathrm{f}}\left(M_{\mathrm{f}z} - M_{\mathrm{f,eq}}\right) - \dfrac{M_{\mathrm{f}z}}{\tau_{\mathrm{f}}} \end{cases} \qquad \textbf{(A2-1)}$$

Dans le cas fréquent où la population de spins liés est beaucoup plus faible que la population de spins libres ($M_{b,eq} << M_{f,eq}$), le but de cette annexe est de mettre en évidence des conditions physiques simples pour lesquelles la relaxation observée est monoexponentielle.

Pour cela, deux hypothèses sont à considérer successivement :

SLM1: $R_1^{\mathrm{b}} >> R_1^{\mathrm{f}}$ et SLM2: $\tau_{\mathrm{b}} << \tau_{\mathrm{f}}$

En introduisant les aimantations résiduelles m_b et m_f,

$$\begin{cases} m_{\mathrm{b}} \equiv M_{\mathrm{b}z} - M_{\mathrm{b,eq}} \\ m_{\mathrm{f}} \equiv M_{\mathrm{f}z} - M_{\mathrm{f,eq}} \end{cases} \qquad \textbf{(A2-2)}$$

le système d'équations précédentes s'écrit :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial m_{\mathrm{b}}}{\partial t} = -R_1^{\mathrm{b}} m_{\mathrm{b}} - \dfrac{m_{\mathrm{b}}}{\tau_{\mathrm{b}}} + \dfrac{m_{\mathrm{f}}}{\tau_{\mathrm{f}}} \\ \dfrac{\partial m_{\mathrm{f}}}{\partial t} = +\dfrac{m_{\mathrm{b}}}{\tau_{\mathrm{b}}} - R_1^{\mathrm{f}} m_{\mathrm{f}} - \dfrac{m_{\mathrm{f}}}{\tau_{\mathrm{f}}} \end{cases} \qquad \textbf{A2-3}$$

D'après les conditions SML1 et SML2, les temps de relaxation effective $T_1^{'b} \equiv 1/R_1^b + 1/\tau_b$ et $T_1^{'f} \equiv 1/R_1^f + 1/\tau_f$ vérifient l'inégalité $T_1^{'b} << T_1^{'f}$. Choisissons un temps t arbitraire, et

intéressons nous à l'évolution de m_b et m_f au cours du temps. Pour $t' > t$ de sorte que $t'-t << T_1^{'f}$, $m_f(t')$ ne dispose pas d'un temps suffisant pour évoluer de sa valeur à t, de sorte que $m_f(t') \cong m_f(t)$. Ainsi, $m_b(t')$ est solution de l'équation différentielle :

$$\frac{\partial m_b}{\partial t'} = -R_1^b m_b - \frac{m_b}{\tau_b} + \frac{m_f(t)}{\tau_f} \qquad \textbf{A2-4}$$

avec la valeur initiale $m_b(t)$ telle que :

$$m_b(t') = \frac{1}{\lambda}\frac{m_f(t)}{\tau_f} + \left[m_b(t) - \frac{1}{\lambda}\frac{m_f(t)}{\tau_f}\right]\exp\left[-\lambda(t'-t)\right] \quad \text{avec} \quad \lambda \equiv R_1^b + \frac{1}{\tau_b} \qquad \textbf{A2-5}$$

Maintenant, considérons que $t'-t >> T_1^{'b}$, ce qui est possible puisque $T_1^{'b} << T_1^{'f}$, $m_b(t')$ prend une valeur constante :

$$m_b(t') = \frac{1}{\lambda}\frac{m_f(t)}{\tau_f} \qquad \textbf{A2-6}$$

Par conséquent, pour $T_1^{'b} << t'-t << T_1^{'f}$, d'après toutes les équations précédentes, $M_{fz}(t') \equiv M_{f,eq} + m_f(t')$ obéit à l'équation différentielle suivante :

$$\frac{\partial M_{fz}}{\partial t'} = -R_1\left(M_{fz} - M_{f,eq}\right) \qquad \textbf{A2-7}$$

avec

$$R_1 \equiv R_1^f + \frac{1}{\tau_f} - \frac{1}{\tau_b\tau_f}\frac{1}{R_1^b + 1/\tau_b} = \frac{\tau_b}{\tau_f}\frac{1}{T_1^b + \tau_b} + R_1^f \qquad \textbf{A2-8}$$

Pour résumer, pour un temps $t \geq 0$ arbitraire, et à l'exception d'une petite période initiale inférieure à quelques $T_1^{'b}$, période pendant laquelle $m_b(t')$ atteint sa valeur donnée par l'équation A2-6, $m_f(t')$ a une décroissance monoexponentielle, avec un temps caractéristique R_1.

De plus, l'inégalité SML2 ($\tau_b << \tau_f$), permet d'écrire que l'aimantation totale $M_z \equiv M_{bz} + M_{fz}$ est approximativement égale à M_{fz}. En effet, les aimantations M_{bz} et M_{fz} sont du même ordre de grandeur que leurs valeurs respectives à l'équilibre, $M_{b,eq}$ et $M_{f,eq}$. Or, d'après l'équation du bilan détaillé (A2-9), $M_{beq} << M_{feq}$.

$$\frac{M_{b,eq}}{\tau_b} = \frac{M_{f,eq}}{\tau_f} \qquad \textbf{A2-9}$$

Les deux hypothèses SML1 et SML2 permettent donc de démontrer la forme monoexponentielle de la relaxation de l'aimantation longitudinale.

Dans le contexte des augmentations paramagnétiques de relaxation, en notant $R_{1p}^{IS} \equiv \left(\tau_b/\tau_f\right)/\left(T_1^b + \tau_b\right)$, l'équation classique de la relaxation IS (A2-10),

$$R_{1p}^{IS} \equiv \frac{[GdL]}{[L]} \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \qquad \textbf{A2-10}$$

provient directement du principe du bilan détaillé, $\tau_b/\tau_f = [GdL]/[L]$ avec $\tau_b \equiv \tau_M$.

Annexe 3 : Données cristallographiques

Empirical formula	C48 H102.73 Lu2 O60.37
Formula weight	1995.81
Temperature	223(2) K
Wavelength	0.71073 A
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2(1)
Unit cell dimensions	a = 14.2410(14) A alpha = 90 deg.
	b = 13.9311(13) A beta = 109.168(3) deg.
	c = 20.098(2) A gamma = 90 deg.
Volume, Z	3766.3(6) A^3, 2
Density (calculated)	1.760 Mg/m^3
Absorption coefficient	2.728 mm^-1
F(000)	2031
Crystal size	0.50 x 0.10 x 0.10 mm
Theta range for data collection	2.10 to 28.90 deg.
Limiting indices	-13<=h<=19, -16<=k<=18, -25<=l<=9
Reflections collected	11031
Independent reflections	10716 [R(int) = 0.0189]
Absorption correction	Sadabs
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	10716 / 1 / 1033
Goodness-of-fit on F^2	1.050
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0316, wR2 = 0.0852
R indices (all data)	R1 = 0.0329, wR2 = 0.0858
Absolute structure parameter	-0.004(6)
Largest diff. peak and hole	1.703 and -1.858 e.A^-3

Table 2. Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (A^2) for struc. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

	x	y	z	U(eq)
Lu(1) 1	0.709135(16)	0.119037(17)	0.683948(14)	0.01429(7)
Lu(2) 1	0.383310(17)	0.076259(17)	0.790518(15)	0.01696(7)
O(1) 1	0.6884(3)	0.1692(3)	0.7882(3)	0.0195(10)
O(2) 1	0.4092(3)	0.1796(3)	0.7074(3)	0.0198(10)
O(1A) 1	0.2140(3)	0.1862(3)	0.5770(3)	0.0213(10)
O(2A) 1	0.3592(3)	0.0902(3)	0.5656(2)	0.0184(10)
O(5A) 1	0.3036(3)	0.3025(3)	0.5448(2)	0.0190(10)
O(6A) 1	0.2941(4)	0.2283(4)	0.3990(3)	0.0237(10)
O(8A) 1	0.6053(3)	0.0319(3)	0.5835(3)	0.0213(10)
O(8'A) 1	0.5454(3)	0.0877(3)	0.6631(2)	0.0160(9)
C(1A) 1	0.2441(4)	0.2181(4)	0.5217(4)	0.0167(13)
C(2A) 1	0.3033(4)	0.1369(4)	0.5018(4)	0.0160(13)
C(3A) 1	0.3644(4)	0.1801(5)	0.4580(4)	0.0198(14)
C(4A) 1	0.4321(4)	0.2630(4)	0.4940(4)	0.0182(14)
C(5A) 1	0.3516(4)	0.3352(4)	0.4959(4)	0.0190(14)
C(6A) 1	0.2873(5)	0.3276(5)	0.4197(4)	0.0239(15)
C(7A) 1	0.4281(4)	0.0189(4)	0.5598(4)	0.0197(14)
C(8A) 1	0.5308(4)	0.0481(4)	0.6037(4)	0.0142(13)
O(1B) 1	0.5042(3)	0.2364(3)	0.5599(3)	0.0205(10)
O(2B) 1	0.7035(3)	0.2073(3)	0.5790(3)	0.0187(10)
O(5B) 1	0.6085(3)	0.2890(3)	0.6633(2)	0.0180(10)
O(6B) 1	0.6946(3)	0.4664(3)	0.6133(3)	0.0236(11)
O(8B) 1	0.8162(3)	0.0613(3)	0.6331(3)	0.0227(11)
O(8'B) 1	0.8730(4)	0.0454(4)	0.5432(3)	0.0306(12)
C(1B) 1	0.5761(5)	0.3074(5)	0.5900(4)	0.0200(15)
C(2B) 1	0.6675(4)	0.3039(4)	0.5662(4)	0.0170(13)
C(3B) 1	0.7441(4)	0.3762(5)	0.6124(4)	0.0184(14)
C(4B) 1	0.7757(5)	0.3494(5)	0.6907(4)	0.0219(14)
C(5B) 1	0.6768(5)	0.3648(5)	0.7026(4)	0.0190(14)
C(6B) 1	0.6529(5)	0.4635(5)	0.6715(4)	0.0263(16)
C(7B) 1	0.7725(5)	0.1791(5)	0.5432(4)	0.0216(15)
C(8B) 1	0.8234(4)	0.0868(5)	0.5747(4)	0.0221(15)
O(1C) 1	0.8170(3)	0.2554(3)	0.7120(2)	0.0173(9)
O(2C) 1	0.8635(3)	0.0912(3)	0.7759(2)	0.0167(10)
O(5C) 1	0.8751(3)	0.2955(3)	0.8270(3)	0.0205(10)
O(6C) 1	1.0907(3)	0.2277(4)	0.8681(3)	0.0237(11)
O(8C) 1	0.7183(3)	-0.0294(3)	0.7291(3)	0.0216(10)
O(8'C) 1	0.8049(4)	-0.1541(4)	0.7859(3)	0.0436(15)
C(1C) 1	0.9043(4)	0.2574(5)	0.7717(4)	0.0175(13)
C(2C) 1	0.9459(4)	0.1551(5)	0.7876(3)	0.0158(13)
C(3C) 1	1.0184(4)	0.1524(5)	0.8621(4)	0.0223(15)
C(4C) 1	0.9699(5)	0.1843(5)	0.9165(4)	0.0192(14)
C(5C) 1	0.9533(5)	0.2901(5)	0.8953(4)	0.0224(15)
C(6C) 1	1.0559(5)	0.3150(5)	0.8934(4)	0.0244(15)
C(7C) 1	0.8907(5)	-0.0063(5)	0.7920(4)	0.0219(15)
C(8C) 1	0.7979(5)	-0.0690(5)	0.7673(4)	0.0227(15)
O(1D) 1	0.8804(3)	0.1317(3)	0.9104(2)	0.0196(10)
O(2D) 1	0.7308(3)	0.0264(3)	0.9039(2)	0.0184(10)
O(5D) 1	0.7928(3)	0.2212(3)	0.9634(3)	0.0204(10)
O(6D) 1	0.8084(4)	0.0967(4)	1.0906(3)	0.0321(13)
O(8D) 1	0.4814(3)	-0.0482(3)	0.8624(3)	0.0213(10)
O(8'D) 1	0.5492(3)	0.0558(3)	0.8097(2)	0.0157(10)
C(1D) 1	0.8523(4)	0.1374(4)	0.9710(3)	0.0163(13)
C(2D) 1	0.7899(5)	0.0472(5)	0.9722(4)	0.0187(15)
C(3D) 1	0.7323(4)	0.0667(5)	1.0247(4)	0.0210(14)

C(4D)	1	0.6648(5)	0.1554(5)	1.0078(4)	0.0233(15)
C(5D)	1	0.7465(5)	0.2324(5)	1.0177(4)	0.0237(15)
C(6D)	1	0.8176(5)	0.2017(6)	1.0904(4)	0.0285(17)
C(7D)	1	0.6601(4)	-0.0504(4)	0.8946(4)	0.0203(14)
C(8D)	1	0.5579(4)	-0.0125(5)	0.8536(4)	0.0158(13)
O(1E)	1	0.5904(3)	0.1495(4)	0.9418(3)	0.0263(12)
O(2E)	1	0.3896(3)	0.1062(3)	0.9112(3)	0.0246(11)
O(5E)	1	0.4869(3)	0.2421(3)	0.8563(3)	0.0227(11)
O(6E)	1	0.3946(4)	0.3655(4)	0.9459(3)	0.0294(12)
O(8E)	1	0.2668(4)	-0.0060(4)	0.8182(3)	0.0310(13)
O(8'E)	1	0.1902(5)	-0.0589(4)	0.8907(4)	0.0510(18)
C(1E)	1	0.5168(5)	0.2221(5)	0.9289(4)	0.0234(15)
C(2E)	1	0.4254(5)	0.1936(5)	0.9483(4)	0.0252(16)
C(3E)	1	0.3477(5)	0.2736(5)	0.9212(4)	0.0228(15)
C(4E)	1	0.3170(5)	0.2904(5)	0.8402(4)	0.0222(15)
C(5E)	1	0.4185(5)	0.3241(5)	0.8389(4)	0.0254(15)
C(6E)	1	0.4388(6)	0.4015(5)	0.8931(4)	0.0305(18)
C(7E)	1	0.3234(7)	0.0512(6)	0.9376(5)	0.038(2)
C(8E)	1	0.2556(5)	-0.0104(5)	0.8785(5)	0.0303(18)
O(1F)	1	0.2784(3)	0.2078(3)	0.7959(3)	0.0191(10)
O(2F)	1	0.2323(3)	0.0831(4)	0.6935(3)	0.0191(10)
O(5F)	1	0.2249(3)	0.3000(3)	0.6967(3)	0.0218(11)
O(6F)	1	0.0086(3)	0.2371(4)	0.6390(3)	0.0271(12)
O(8F)	1	0.3733(3)	-0.0399(4)	0.7117(3)	0.0246(11)
O(8'F)	1	0.2855(4)	-0.1321(4)	0.6219(3)	0.0371(14)
C(1F)	1	0.1937(5)	0.2324(5)	0.7390(4)	0.0193(14)
C(2F)	1	0.1495(4)	0.1407(4)	0.6970(4)	0.0216(16)
C(3F)	1	0.0789(4)	0.1712(5)	0.6264(4)	0.0208(14)
C(4F)	1	0.1291(5)	0.2319(5)	0.5832(4)	0.0215(15)
C(5F)	1	0.1484(4)	0.3213(5)	0.6298(4)	0.0218(15)
C(6F)	1	0.0457(5)	0.3357(5)	0.6368(4)	0.0281(16)
C(7F)	1	0.2024(5)	-0.0029(5)	0.6514(4)	0.0220(15)
C(8F)	1	0.2930(5)	-0.0639(5)	0.6618(4)	0.0215(14)
O(101)	1	0.0748(6)	0.0800(12)	0.3871(6)	0.149(6)
O(102)	1	0.7393(7)	0.2356(8)	0.2428(5)	0.101(3)
O(103)	0.59(2)	0.2895(11)	0.1838(10)	0.2666(8)	0.078(6)
O(104)	0.69	0.9109(9)	0.3445(8)	0.2468(5)	0.064(3)
O(105)	1	0.9144(6)	0.7976(7)	0.9253(4)	0.085(3)
O(106)	1	0.7596(5)	0.6921(6)	0.9455(4)	0.068(2)
O(107)	1	0.8444(6)	0.9776(5)	0.2064(4)	0.066(2)
O(108)	1	0.4325(6)	0.7610(5)	0.8779(4)	0.063(2)
O(109)	1	0.0355(5)	0.3734(6)	0.4054(6)	0.086(3)
O(110)	1	0.7659(6)	0.0522(5)	0.3040(4)	0.0602(19)
O(111)	1	0.4149(5)	0.1976(5)	0.1701(4)	0.0567(18)
O(112)	1	0.5406(5)	0.5049(5)	0.7892(4)	0.0546(18)
O(113)	1	0.9057(5)	0.1108(5)	0.4275(3)	0.0557(18)
O(114)	1	0.6812(5)	0.3920(5)	0.8839(4)	0.0545(18)
O(115)	1	0.9001(5)	0.3034(5)	0.4575(4)	0.0564(18)
O(116)	1	0.5525(4)	0.8519(4)	0.7251(3)	0.0332(13)
O(117)	1	0.5672(4)	0.2416(4)	0.3845(3)	0.0447(15)
O(118)	1	0.5683(4)	0.0592(4)	0.4350(3)	0.0323(12)
O(119)	1	0.0538(4)	0.9405(5)	0.9616(4)	0.0493(17)
O(120)	1	0.3840(5)	0.4455(5)	0.6610(4)	0.0499(16)
O(121)	1	0.8398(7)	0.5178(8)	0.9142(6)	0.120(4)
O(135)	0.44(2)	0.9701(10)	0.4903(10)	0.7385(8)	0.049(6)
O(134)	0.45(2)	0.9362(10)	0.5181(11)	0.7886(9)	0.054(6)
O(133)	0.50(3)	0.878(2)	0.592(2)	0.8156(13)	0.171(17)
O(132)	0.30(2)	0.0582(17)	0.2693(14)	0.2979(13)	0.056(10)
O(131)	0.35(3)	0.0971(19)	0.200(2)	0.2829(13)	0.085(12)

Table 3. Bond lengths [A] and angles [deg] for struc.

Lu(1)-O(8B)	2.245(4)
Lu(1)-O(8C)	2.245(5)
Lu(1)-O(8'A)	2.272(4)
Lu(1)-O(1)	2.318(4)
Lu(1)-O(1C)	2.392(4)
Lu(1)-O(2C)	2.394(5)
Lu(1)-O(8A)	2.403(5)
Lu(1)-O(2B)	2.420(4)
Lu(1)-C(8A)	2.709(6)
Lu(1)-O(5B)	2.728(4)
Lu(2)-O(8E)	2.232(4)
Lu(2)-O(8F)	2.236(5)
Lu(2)-O(8'D)	2.283(4)
Lu(2)-O(2)	2.325(4)
Lu(2)-O(2F)	2.384(5)
Lu(2)-O(1F)	2.390(4)
Lu(2)-O(8D)	2.391(5)
Lu(2)-O(2E)	2.433(5)
Lu(2)-C(8D)	2.692(6)
Lu(2)-O(5E)	2.825(5)
O(1A)-C(1A)	1.389(7)
O(1A)-C(4F)	1.408(7)
O(2A)-C(2A)	1.425(8)
O(2A)-C(7A)	1.427(7)
O(5A)-C(1A)	1.436(8)
O(5A)-C(5A)	1.443(7)
O(6A)-C(3A)	1.442(8)
O(6A)-C(6A)	1.457(8)
O(8A)-C(8A)	1.275(6)
O(8'A)-C(8A)	1.269(8)
C(1A)-C(2A)	1.541(7)
C(2A)-C(3A)	1.548(8)
C(3A)-C(4A)	1.525(9)
C(4A)-O(1B)	1.433(8)
C(4A)-C(5A)	1.535(8)
C(5A)-C(6A)	1.507(10)
C(7A)-C(8A)	1.495(9)
O(1B)-C(1B)	1.409(8)
O(2B)-C(2B)	1.433(7)
O(2B)-C(7B)	1.450(6)
O(5B)-C(1B)	1.415(8)
O(5B)-C(5B)	1.477(8)
O(6B)-C(3B)	1.443(8)
O(6B)-C(6B)	1.476(8)
O(8B)-C(8B)	1.262(8)
O(8'B)-C(8B)	1.235(7)
C(1B)-C(2B)	1.528(7)
C(2B)-C(3B)	1.549(9)
C(3B)-C(4B)	1.535(10)
C(4B)-O(1C)	1.442(8)
C(4B)-C(5B)	1.519(8)
O(2F)-C(7F)	1.447(8)
O(2F)-C(2F)	1.448(7)
O(5F)-C(1F)	1.433(8)
O(5F)-C(5F)	1.457(8)
O(6F)-C(3F)	1.443(7)
O(6F)-C(6F)	1.478(9)
C(5B)-C(6B)	1.502(9)
C(7B)-C(8B)	1.510(10)
O(1C)-C(1C)	1.417(8)
O(2C)-C(7C)	1.421(8)
O(2C)-C(2C)	1.430(7)
O(5C)-C(1C)	1.414(8)
O(5C)-C(5C)	1.459(9)
O(6C)-C(3C)	1.447(7)
O(6C)-C(6C)	1.466(8)
O(8C)-C(8C)	1.267(8)
O(8'C)-C(8C)	1.237(9)
C(1C)-C(2C)	1.536(9)
C(2C)-C(3C)	1.514(10)
C(3C)-C(4C)	1.539(8)
C(4C)-O(1D)	1.439(7)
C(4C)-C(5C)	1.531(9)
C(5C)-C(6C)	1.514(8)
C(7C)-C(8C)	1.526(9)
O(1D)-C(1D)	1.402(7)
O(2D)-C(2D)	1.385(8)
O(2D)-C(7D)	1.439(7)
O(5D)-C(1D)	1.420(7)
O(5D)-C(5D)	1.457(7)
O(6D)-C(6D)	1.468(10)
O(6D)-C(3D)	1.469(9)
O(8D)-C(8D)	1.261(7)
O(8'D)-C(8D)	1.277(8)
C(1D)-C(2D)	1.545(8)
C(2D)-C(3D)	1.558(8)
C(3D)-C(4D)	1.534(9)
C(4D)-O(1E)	1.402(9)
C(4D)-C(5D)	1.547(9)
C(5D)-C(6D)	1.540(11)
C(7D)-C(8D)	1.513(9)
O(1E)-C(1E)	1.418(7)
O(2E)-C(2E)	1.431(9)
O(2E)-C(7E)	1.445(8)
O(5E)-C(1E)	1.408(9)
O(5E)-C(5E)	1.467(8)
O(6E)-C(3E)	1.454(9)
O(6E)-C(6E)	1.487(9)
O(8E)-C(8E)	1.274(9)
O(8'E)-C(8E)	1.238(8)
C(1E)-C(2E)	1.528(8)
C(2E)-C(3E)	1.540(9)
C(3E)-C(4E)	1.558(10)
C(4E)-O(1F)	1.448(8)
C(4E)-C(5E)	1.529(9)
C(5E)-C(6E)	1.493(10)
C(7E)-C(8E)	1.525(12)
O(1F)-C(1F)	1.405(8)

O(8F)-C(8F)	1.294(9)
O(8'F)-C(8F)	1.225(9)
C(1F)-C(2F)	1.546(9)
C(2F)-C(3F)	1.505(10)
C(3F)-C(4F)	1.544(8)
C(4F)-C(5F)	1.529(10)
C(5F)-C(6F)	1.527(8)
C(7F)-C(8F)	1.502(9)
O(135)-O(134)	1.31(2)
O(134)-O(133)	1.53(3)
O(132)-O(131)	1.20(3)
O(8B)-Lu(1)-O(8C)	84.03(16)
O(8B)-Lu(1)-O(8'A)	131.04(17)
O(8C)-Lu(1)-O(8'A)	79.49(16)
O(8B)-Lu(1)-O(1)	145.76(17)
O(8C)-Lu(1)-O(1)	85.39(16)
O(8'A)-Lu(1)-O(1)	78.29(15)
O(8B)-Lu(1)-O(1C)	84.96(15)
O(8C)-Lu(1)-O(1C)	133.55(16)
O(8'A)-Lu(1)-O(1C)	137.48(15)
O(1)-Lu(1)-O(1C)	79.07(15)
O(8B)-Lu(1)-O(2C)	72.85(16)
O(8C)-Lu(1)-O(2C)	67.78(16)
O(8'A)-Lu(1)-O(2C)	137.54(15)
O(1)-Lu(1)-O(2C)	72.99(15)
O(1C)-Lu(1)-O(2C)	65.84(15)
O(8B)-Lu(1)-O(8A)	76.04(15)
O(8C)-Lu(1)-O(8A)	79.19(17)
O(8'A)-Lu(1)-O(8A)	55.75(14)
O(1)-Lu(1)-O(8A)	133.32(14)
O(1C)-Lu(1)-O(8A)	140.32(15)
O(2C)-Lu(1)-O(8A)	136.27(15)
O(8B)-Lu(1)-O(2B)	67.57(15)
O(8C)-Lu(1)-O(2B)	143.28(16)
O(8'A)-Lu(1)-O(2B)	101.46(15)
O(1)-Lu(1)-O(2B)	131.08(15)
O(1C)-Lu(1)-O(2B)	68.67(16)
O(2C)-Lu(1)-O(2B)	120.97(14)
O(8A)-Lu(1)-O(2B)	71.91(15)
O(8B)-Lu(1)-C(8A)	104.03(17)
O(8C)-Lu(1)-C(8A)	79.84(18)
O(8'A)-Lu(1)-C(8A)	27.79(16)
O(1)-Lu(1)-C(8A)	105.99(15)
O(1C)-Lu(1)-C(8A)	146.53(17)
O(2C)-Lu(1)-C(8A)	147.61(17)
O(8A)-Lu(1)-C(8A)	28.08(15)
O(2B)-Lu(1)-C(8A)	84.85(17)
O(8B)-Lu(1)-O(5B)	130.03(14)
O(8C)-Lu(1)-O(5B)	144.98(13)
O(8'A)-Lu(1)-O(5B)	71.49(14)
O(1)-Lu(1)-O(5B)	70.10(15)
O(1C)-Lu(1)-O(5B)	67.11(14)
O(2C)-Lu(1)-O(5B)	124.14(14)
O(8A)-Lu(1)-O(5B)	99.39(14)
O(6A)-C(3A)-C(2A)	106.2(5)
C(4A)-C(3A)-C(2A)	114.3(5)
O(1B)-C(4A)-C(3A)	113.1(5)
O(1B)-C(4A)-C(5A)	117.4(5)
C(3A)-C(4A)-C(5A)	98.4(5)
O(5A)-C(5A)-C(6A)	113.8(5)

O(2B)-Lu(1)-O(5B)	63.94(13)
C(8A)-Lu(1)-O(5B)	83.28(15)
O(8E)-Lu(2)-O(8F)	85.73(18)
O(8E)-Lu(2)-O(8'D)	134.95(18)
O(8F)-Lu(2)-O(8'D)	81.42(16)
O(8E)-Lu(2)-O(2)	143.47(18)
O(8F)-Lu(2)-O(2)	85.83(17)
O(8'D)-Lu(2)-O(2)	78.39(15)
O(8E)-Lu(2)-O(2F)	71.35(18)
O(8F)-Lu(2)-O(2F)	67.62(17)
O(8'D)-Lu(2)-O(2F)	138.45(15)
O(2)-Lu(2)-O(2F)	72.57(16)
O(8E)-Lu(2)-O(1F)	81.69(17)
O(8F)-Lu(2)-O(1F)	133.80(18)
O(8'D)-Lu(2)-O(1F)	135.70(16)
O(2)-Lu(2)-O(1F)	78.87(14)
O(2F)-Lu(2)-O(1F)	66.23(16)
O(8E)-Lu(2)-O(8D)	79.15(17)
O(8F)-Lu(2)-O(8D)	77.98(18)
O(8'D)-Lu(2)-O(8D)	56.00(14)
O(2)-Lu(2)-O(8D)	133.14(14)
O(2F)-Lu(2)-O(8D)	135.60(17)
O(1F)-Lu(2)-O(8D)	141.13(16)
O(8E)-Lu(2)-O(2E)	68.07(18)
O(8F)-Lu(2)-O(2E)	143.42(17)
O(8'D)-Lu(2)-O(2E)	98.97(15)
O(2)-Lu(2)-O(2E)	130.36(16)
O(2F)-Lu(2)-O(2E)	122.46(14)
O(1F)-Lu(2)-O(2E)	69.03(16)
O(8D)-Lu(2)-O(2E)	72.50(16)
O(8E)-Lu(2)-C(8D)	107.07(19)
O(8F)-Lu(2)-C(8D)	80.51(18)
O(8'D)-Lu(2)-C(8D)	28.24(16)
O(2)-Lu(2)-C(8D)	106.44(17)
O(2F)-Lu(2)-C(8D)	148.12(17)
O(1F)-Lu(2)-C(8D)	145.63(18)
O(8D)-Lu(2)-C(8D)	27.92(16)
O(2E)-Lu(2)-C(8D)	83.30(17)
O(8E)-Lu(2)-O(5E)	128.31(16)
O(8F)-Lu(2)-O(5E)	145.61(14)
O(8'D)-Lu(2)-O(5E)	70.76(14)
O(2)-Lu(2)-O(5E)	69.40(15)
O(2F)-Lu(2)-O(5E)	122.82(16)
O(1F)-Lu(2)-O(5E)	65.78(15)
O(8D)-Lu(2)-O(5E)	101.45(15)
O(2E)-Lu(2)-O(5E)	63.32(14)
C(8D)-Lu(2)-O(5E)	84.02(16)
C(1A)-O(1A)-C(4F)	115.3(5)
C(2A)-O(2A)-C(7A)	116.1(5)
C(1A)-O(5A)-C(5A)	113.6(5)
C(3A)-O(6A)-C(6A)	107.5(5)
C(8A)-O(8A)-Lu(1)	89.4(4)
C(8A)-O(8'A)-Lu(1)	95.6(3)
O(1A)-C(1A)-O(5A)	107.9(5)
O(1A)-C(1A)-C(2A)	108.2(5)
O(5A)-C(1A)-C(2A)	111.7(4)
O(2A)-C(2A)-C(1A)	107.0(5)
O(2A)-C(2A)-C(3A)	115.9(5)
C(1A)-C(2A)-C(3A)	108.7(5)
O(6A)-C(3A)-C(4A)	101.4(5)

O(5A)-C(5A)-C(4A)	109.5(5)
C(6A)-C(5A)-C(4A)	98.0(5)
O(6A)-C(6A)-C(5A)	106.3(5)
O(2A)-C(7A)-C(8A)	109.1(5)
O(8'A)-C(8A)-O(8A)	118.7(6)
O(8'A)-C(8A)-C(7A)	120.0(5)
O(8A)-C(8A)-C(7A)	121.3(6)
O(8'A)-C(8A)-Lu(1)	56.6(3)
O(8A)-C(8A)-Lu(1)	62.5(3)
C(7A)-C(8A)-Lu(1)	174.2(4)
C(1B)-O(1B)-C(4A)	114.5(5)
C(2B)-O(2B)-C(7B)	115.2(4)
C(2B)-O(2B)-Lu(1)	122.8(4)
C(7B)-O(2B)-Lu(1)	117.5(4)
C(1B)-O(5B)-C(5B)	111.1(5)
C(1B)-O(5B)-Lu(1)	106.9(3)
C(5B)-O(5B)-Lu(1)	108.6(3)
C(3B)-O(6B)-C(6B)	108.2(5)
C(8B)-O(8B)-Lu(1)	126.6(4)
O(1B)-C(1B)-O(5B)	105.3(5)
O(1B)-C(1B)-C(2B)	114.6(5)
O(5B)-C(1B)-C(2B)	107.4(5)
O(2B)-C(2B)-C(1B)	105.4(5)
O(2B)-C(2B)-C(3B)	111.3(5)
C(1B)-C(2B)-C(3B)	107.2(5)
O(6B)-C(3B)-C(4B)	100.3(5)
O(6B)-C(3B)-C(2B)	108.9(5)
C(4B)-C(3B)-C(2B)	111.6(5)
O(1C)-C(4B)-C(5B)	113.0(5)
O(1C)-C(4B)-C(3B)	118.6(6)
C(5B)-C(4B)-C(3B)	98.8(5)
O(5B)-C(5B)-C(6B)	114.4(6)
O(5B)-C(5B)-C(4B)	107.2(5)
C(6B)-C(5B)-C(4B)	99.1(5)
O(6B)-C(6B)-C(5B)	105.1(5)
O(2B)-C(7B)-C(8B)	109.4(5)
O(8'B)-C(8B)-O(8B)	125.4(7)
O(8'B)-C(8B)-C(7B)	117.4(6)
O(8B)-C(8B)-C(7B)	117.1(5)
C(1C)-O(1C)-C(4B)	113.1(5)
C(1C)-O(1C)-Lu(1)	122.2(4)
C(4B)-O(1C)-Lu(1)	118.9(4)
C(7C)-O(2C)-C(2C)	114.2(5)
C(7C)-O(2C)-Lu(1)	116.3(4)
C(2C)-O(2C)-Lu(1)	121.5(4)
C(1C)-O(5C)-C(5C)	112.9(5)
C(3C)-O(6C)-C(6C)	108.5(4)
C(8C)-O(8C)-Lu(1)	124.6(4)
O(5C)-C(1C)-O(1C)	105.7(4)
O(5C)-C(1C)-C(2C)	112.1(5)
O(1C)-C(1C)-C(2C)	109.3(5)
O(2C)-C(2C)-C(3C)	113.8(5)
O(2C)-C(2C)-C(1C)	107.7(4)
C(3C)-C(2C)-C(1C)	108.7(5)
C(2E)-C(3E)-C(4E)	113.6(5)
O(1F)-C(4E)-C(5E)	113.8(5)
O(1F)-C(4E)-C(3E)	116.3(6)
C(5E)-C(4E)-C(3E)	97.0(6)
O(5E)-C(5E)-C(6E)	115.8(6)
O(5E)-C(5E)-C(4E)	108.3(5)

O(6C)-C(3C)-C(2C)	107.4(5)
O(6C)-C(3C)-C(4C)	101.8(5)
C(2C)-C(3C)-C(4C)	112.0(5)
O(1D)-C(4C)-C(5C)	114.6(5)
O(1D)-C(4C)-C(3C)	112.6(5)
C(5C)-C(4C)-C(3C)	98.3(5)
O(5C)-C(5C)-C(6C)	114.2(6)
O(5C)-C(5C)-C(4C)	108.1(5)
C(6C)-C(5C)-C(4C)	99.6(5)
O(6C)-C(6C)-C(5C)	105.0(5)
O(2C)-C(7C)-C(8C)	109.3(5)
O(8'C)-C(8C)-O(8C)	124.6(7)
O(8'C)-C(8C)-C(7C)	118.3(7)
O(8C)-C(8C)-C(7C)	117.1(6)
C(1D)-O(1D)-C(4C)	113.2(5)
C(2D)-O(2D)-C(7D)	117.1(5)
C(1D)-O(5D)-C(5D)	114.2(5)
C(6D)-O(6D)-C(3D)	108.7(6)
C(8D)-O(8D)-Lu(2)	89.4(4)
C(8D)-O(8'D)-Lu(2)	94.0(3)
O(1D)-C(1D)-O(5D)	106.5(5)
O(1D)-C(1D)-C(2D)	107.3(5)
O(5D)-C(1D)-C(2D)	110.1(4)
O(2D)-C(2D)-C(1D)	108.6(5)
O(2D)-C(2D)-C(3D)	115.1(5)
C(1D)-C(2D)-C(3D)	107.6(5)
O(6D)-C(3D)-C(4D)	101.2(5)
O(6D)-C(3D)-C(2D)	105.2(5)
C(4D)-C(3D)-C(2D)	114.9(5)
O(1E)-C(4D)-C(3D)	112.8(6)
O(1E)-C(4D)-C(5D)	117.7(6)
C(3D)-C(4D)-C(5D)	98.0(5)
O(5D)-C(5D)-C(6D)	111.2(5)
O(5D)-C(5D)-C(4D)	109.6(5)
C(6D)-C(5D)-C(4D)	99.3(6)
O(6D)-C(6D)-C(5D)	104.3(6)
O(2D)-C(7D)-C(8D)	108.6(5)
O(8D)-C(8D)-O(8'D)	119.9(6)
O(8D)-C(8D)-C(7D)	120.5(6)
O(8'D)-C(8D)-C(7D)	119.6(5)
O(8D)-C(8D)-Lu(2)	62.6(3)
O(8'D)-C(8D)-Lu(2)	57.8(3)
C(7D)-C(8D)-Lu(2)	172.5(4)
C(4D)-O(1E)-C(1E)	114.5(5)
C(2E)-O(2E)-C(7E)	115.1(5)
C(2E)-O(2E)-Lu(2)	123.8(4)
C(7E)-O(2E)-Lu(2)	117.4(5)
C(1E)-O(5E)-C(5E)	110.6(5)
C(1E)-O(5E)-Lu(2)	104.9(4)
C(5E)-O(5E)-Lu(2)	108.7(4)
C(3E)-O(6E)-C(6E)	108.0(5)
C(8E)-O(8E)-Lu(2)	126.7(5)
O(5E)-C(1E)-O(1E)	106.5(5)
O(5E)-C(1E)-C(2E)	108.9(6)
O(1E)-C(1E)-C(2E)	114.2(5)
O(2E)-C(2E)-C(1E)	106.0(5)
O(2E)-C(2E)-C(3E)	109.9(6)
C(1E)-C(2E)-C(3E)	107.2(6)
O(6E)-C(3E)-C(2E)	108.7(5)
O(6E)-C(3E)-C(4E)	99.4(5)

C(6E)-C(5E)-C(4E)	99.6(5)
O(6E)-C(6E)-C(5E)	104.6(6)
O(2E)-C(7E)-C(8E)	109.6(6)
O(8'E)-C(8E)-O(8E)	123.5(8)
O(8'E)-C(8E)-C(7E)	118.6(7)
O(8E)-C(8E)-C(7E)	117.9(6)
C(1F)-O(1F)-C(4E)	111.0(5)
C(1F)-O(1F)-Lu(2)	122.1(4)
C(4E)-O(1F)-Lu(2)	121.4(4)
C(7F)-O(2F)-C(2F)	113.5(5)
C(7F)-O(2F)-Lu(2)	117.3(4)
C(2F)-O(2F)-Lu(2)	120.9(4)
C(1F)-O(5F)-C(5F)	113.4(5)
C(3F)-O(6F)-C(6F)	108.1(4)
C(8F)-O(8F)-Lu(2)	124.8(4)
O(1F)-C(1F)-O(5F)	107.0(5)
O(1F)-C(1F)-C(2F)	109.3(5)
O(5F)-C(1F)-C(2F)	111.6(5)
O(2F)-C(2F)-C(3F)	114.4(5)
O(2F)-C(2F)-C(1F)	107.0(5)
C(3F)-C(2F)-C(1F)	108.0(5)
O(6F)-C(3F)-C(2F)	107.5(5)
O(6F)-C(3F)-C(4F)	103.1(5)
C(2F)-C(3F)-C(4F)	113.3(5)
O(1A)-C(4F)-C(5F)	115.8(5)
O(1A)-C(4F)-C(3F)	111.8(5)
C(5F)-C(4F)-C(3F)	97.2(5)
O(5F)-C(5F)-C(6F)	113.0(5)
O(5F)-C(5F)-C(4F)	109.2(5)
C(6F)-C(5F)-C(4F)	100.3(5)
O(6F)-C(6F)-C(5F)	104.1(5)
O(2F)-C(7F)-C(8F)	108.2(5)
O(8'F)-C(8F)-O(8F)	124.9(6)
O(8'F)-C(8F)-C(7F)	117.5(7)
O(8F)-C(8F)-C(7F)	117.5(6)
O(135)-O(134)-O(133)	148.3(17)

Table 4. Anisotropic displacement parameters (A^2) for struc.
The anisotropic displacement factor exponent takes the form:
$-2\ pi^2\ [\ h^2\ a^{*2}\ U11 + ... + 2\ h\ k\ a^*\ b^*\ U12\ ]$

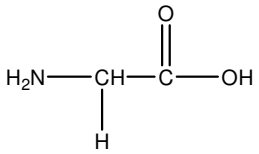
	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Lu(1)	0.01093(11)	0.01803(11)	0.01358(16)	0.00033(11)	0.00357(11)	0.00042(9)
Lu(2)	0.01259(12)	0.02079(12)	0.01842(17)	0.00011(11)	0.00635(12)	-0.00045(10)
O(1)	0.017(2)	0.022(2)	0.022(3)	0.000(2)	0.010(2)	-0.0006(17)
O(2)	0.016(2)	0.025(2)	0.021(3)	-0.0038(19)	0.009(2)	-0.0010(17)
O(1A)	0.017(2)	0.028(2)	0.021(3)	0.002(2)	0.011(2)	0.0062(17)
O(2A)	0.0142(19)	0.022(2)	0.020(3)	0.0018(18)	0.006(2)	0.0026(16)
O(5A)	0.018(2)	0.023(2)	0.015(3)	-0.0010(18)	0.005(2)	0.0002(17)
O(6A)	0.025(2)	0.029(3)	0.010(3)	0.003(2)	-0.003(2)	-0.0021(19)
O(8A)	0.019(2)	0.021(2)	0.026(3)	-0.001(2)	0.011(2)	0.0032(18)
O(8'A)	0.0132(19)	0.022(2)	0.012(3)	0.0003(18)	0.003(2)	0.0012(16)
C(1A)	0.013(3)	0.021(3)	0.015(4)	0.003(2)	0.002(3)	0.004(2)
C(2A)	0.012(3)	0.015(3)	0.017(4)	-0.004(2)	-0.001(3)	-0.001(2)
C(3A)	0.015(3)	0.024(3)	0.019(4)	0.000(3)	0.003(3)	0.004(2)
C(4A)	0.013(3)	0.023(3)	0.019(4)	0.001(3)	0.005(3)	-0.001(2)
C(5A)	0.011(3)	0.019(3)	0.022(4)	-0.002(3)	-0.002(3)	-0.002(2)
C(6A)	0.013(3)	0.029(4)	0.022(4)	0.003(3)	-0.004(3)	-0.002(2)
C(7A)	0.018(3)	0.018(3)	0.021(4)	-0.007(3)	0.006(3)	-0.001(2)
C(8A)	0.012(3)	0.016(3)	0.013(4)	-0.001(2)	0.002(3)	0.001(2)
O(1B)	0.015(2)	0.021(2)	0.022(3)	0.0051(19)	0.000(2)	-0.0013(17)
O(2B)	0.017(2)	0.022(2)	0.021(3)	0.0048(19)	0.011(2)	0.0034(17)
O(5B)	0.014(2)	0.026(2)	0.011(3)	0.0003(18)	0.000(2)	-0.0021(17)
O(6B)	0.021(2)	0.023(2)	0.021(3)	0.005(2)	0.000(2)	-0.0007(18)
O(8B)	0.022(2)	0.028(3)	0.022(3)	0.004(2)	0.012(2)	0.0057(18)
O(8'B)	0.034(3)	0.033(3)	0.030(3)	-0.004(2)	0.018(3)	0.006(2)
C(1B)	0.016(3)	0.020(3)	0.026(4)	0.000(3)	0.010(3)	0.001(2)
C(2B)	0.013(3)	0.023(3)	0.014(4)	0.009(3)	0.002(3)	0.003(2)
C(3B)	0.011(3)	0.025(3)	0.013(4)	0.001(3)	-0.003(3)	-0.003(2)
C(4B)	0.022(3)	0.017(3)	0.025(4)	0.001(3)	0.005(3)	-0.001(2)
C(5B)	0.014(3)	0.024(3)	0.015(4)	-0.004(3)	-0.001(3)	0.002(2)
C(6B)	0.027(4)	0.021(3)	0.024(5)	-0.001(3)	0.000(3)	0.004(3)
C(7B)	0.019(3)	0.032(4)	0.016(4)	0.005(3)	0.009(3)	0.005(3)
C(8B)	0.012(3)	0.031(3)	0.021(4)	-0.006(3)	0.003(3)	-0.004(2)
O(1C)	0.011(2)	0.021(2)	0.015(3)	0.0038(18)	-0.003(2)	0.0000(16)
O(2C)	0.0126(18)	0.016(2)	0.020(3)	0.0003(18)	0.004(2)	0.0017(15)
O(5C)	0.014(2)	0.026(2)	0.018(3)	0.003(2)	0.001(2)	0.0013(17)
O(6C)	0.009(2)	0.037(3)	0.022(3)	0.003(2)	0.002(2)	-0.0036(18)
O(8C)	0.016(2)	0.024(2)	0.022(3)	0.001(2)	0.003(2)	0.0025(18)
O(8'C)	0.034(3)	0.026(3)	0.052(4)	0.011(3)	-0.010(3)	0.001(2)
C(1C)	0.010(3)	0.028(3)	0.013(4)	-0.001(3)	0.001(3)	-0.004(2)
C(2C)	0.009(3)	0.027(3)	0.011(4)	0.005(2)	0.001(3)	0.000(2)
C(3C)	0.013(3)	0.027(3)	0.025(5)	0.002(3)	0.003(3)	0.000(2)
C(4C)	0.014(3)	0.027(3)	0.017(4)	0.003(3)	0.004(3)	-0.003(2)
C(5C)	0.015(3)	0.027(3)	0.023(4)	-0.008(3)	0.003(3)	-0.003(2)
C(6C)	0.018(3)	0.026(3)	0.024(4)	-0.003(3)	0.001(3)	-0.009(3)
C(7C)	0.024(3)	0.029(4)	0.011(4)	0.000(3)	0.003(3)	0.004(3)
C(8C)	0.026(4)	0.018(3)	0.019(4)	-0.002(3)	0.001(3)	-0.002(2)
O(1D)	0.015(2)	0.027(2)	0.017(3)	-0.002(2)	0.005(2)	-0.0066(17)
O(2D)	0.016(2)	0.023(2)	0.013(3)	0.0023(19)	0.001(2)	-0.0030(17)
O(5D)	0.022(2)	0.023(2)	0.016(3)	0.0001(19)	0.007(2)	0.0026(17)
O(6D)	0.031(3)	0.042(4)	0.022(3)	0.003(2)	0.007(3)	0.002(2)
O(8D)	0.017(2)	0.024(2)	0.022(3)	-0.003(2)	0.006(2)	-0.0039(18)
O(8'D)	0.0084(18)	0.023(2)	0.011(3)	-0.0012(17)	-0.002(2)	-0.0001(15)
C(1D)	0.015(3)	0.021(3)	0.011(4)	-0.003(2)	0.002(3)	0.000(2)
C(2D)	0.018(3)	0.025(3)	0.014(4)	0.000(3)	0.006(3)	0.001(2)

C(3D)	0.020(3)	0.030(4)	0.012(4)	0.007(3)	0.003(3)	0.004(3)
C(4D)	0.018(3)	0.029(3)	0.025(5)	-0.005(3)	0.009(3)	0.000(3)
C(5D)	0.024(3)	0.026(3)	0.021(4)	-0.003(3)	0.007(3)	0.001(3)
C(6D)	0.027(4)	0.039(4)	0.019(5)	-0.008(3)	0.006(4)	-0.001(3)
C(7D)	0.020(3)	0.015(3)	0.023(4)	0.000(3)	0.004(3)	-0.003(2)
C(8D)	0.012(3)	0.023(3)	0.008(4)	-0.007(2)	-0.003(3)	-0.004(2)
O(1E)	0.017(2)	0.035(3)	0.024(3)	-0.011(2)	0.002(2)	0.0062(18)
O(2E)	0.025(2)	0.028(3)	0.022(3)	-0.002(2)	0.009(2)	0.0007(19)
O(5E)	0.024(2)	0.027(3)	0.016(3)	0.003(2)	0.007(2)	0.0065(19)
O(6E)	0.031(3)	0.033(3)	0.023(3)	-0.010(2)	0.008(3)	0.006(2)
O(8E)	0.027(3)	0.030(3)	0.042(4)	0.003(2)	0.019(3)	-0.006(2)
O(8'E)	0.062(4)	0.044(3)	0.066(5)	-0.005(3)	0.046(4)	-0.019(3)
C(1E)	0.023(3)	0.023(3)	0.024(4)	0.001(3)	0.007(3)	0.005(3)
C(2E)	0.022(3)	0.031(4)	0.022(5)	-0.004(3)	0.007(3)	0.007(3)
C(3E)	0.017(3)	0.032(4)	0.018(4)	-0.004(3)	0.004(3)	0.004(3)
C(4E)	0.019(3)	0.023(3)	0.023(4)	-0.010(3)	0.004(3)	-0.001(3)
C(5E)	0.024(3)	0.025(3)	0.021(5)	0.002(3)	0.000(3)	0.002(3)
C(6E)	0.031(4)	0.025(4)	0.034(5)	-0.014(3)	0.009(4)	-0.003(3)
C(7E)	0.053(5)	0.035(4)	0.037(6)	0.004(4)	0.028(5)	-0.005(3)
C(8E)	0.029(4)	0.030(4)	0.041(5)	0.008(3)	0.024(4)	0.006(3)
O(1F)	0.018(2)	0.023(2)	0.014(3)	0.0001(19)	0.002(2)	0.0066(17)
O(2F)	0.0080(17)	0.025(2)	0.023(3)	-0.004(2)	0.0032(19)	0.0010(17)
O(5F)	0.018(2)	0.026(2)	0.020(3)	0.001(2)	0.005(2)	0.0005(18)
O(6F)	0.011(2)	0.036(3)	0.034(3)	0.000(2)	0.008(2)	0.0049(19)
O(8F)	0.017(2)	0.027(2)	0.028(3)	-0.002(2)	0.006(2)	0.0013(19)
O(8'F)	0.021(3)	0.030(3)	0.055(4)	-0.019(3)	0.004(3)	-0.002(2)
C(1F)	0.015(3)	0.030(3)	0.011(4)	-0.006(3)	0.002(3)	0.003(2)
C(2F)	0.009(3)	0.027(4)	0.031(5)	-0.004(3)	0.010(3)	-0.004(2)
C(3F)	0.010(3)	0.027(3)	0.023(4)	0.000(3)	0.002(3)	0.002(2)
C(4F)	0.015(3)	0.025(3)	0.027(5)	0.007(3)	0.009(3)	0.006(2)
C(5F)	0.015(3)	0.025(3)	0.024(5)	0.003(3)	0.005(3)	0.003(2)
C(6F)	0.022(3)	0.034(4)	0.025(5)	-0.004(3)	0.004(3)	0.006(3)
C(7F)	0.015(3)	0.025(3)	0.020(4)	-0.007(3)	-0.003(3)	-0.001(2)
C(8F)	0.019(3)	0.023(3)	0.022(4)	0.003(3)	0.006(3)	0.000(2)
O(101)	0.049(5)	0.247(16)	0.149(10)	-0.093(12)	0.030(6)	-0.027(8)
O(102)	0.102(7)	0.099(7)	0.108(8)	0.020(7)	0.045(6)	0.030(6)
O(103)	0.094(12)	0.052(8)	0.076(12)	0.014(7)	0.011(9)	0.016(7)
O(104)	0.100(9)	0.062(7)	0.019(6)	0.002(5)	0.004(6)	-0.008(6)
O(105)	0.077(6)	0.090(6)	0.057(6)	0.033(5)	-0.018(5)	-0.040(5)
O(106)	0.067(5)	0.080(6)	0.049(5)	0.020(4)	0.007(4)	-0.019(4)
O(107)	0.117(6)	0.039(4)	0.034(4)	0.003(3)	0.013(4)	-0.019(4)
O(108)	0.088(5)	0.037(4)	0.080(6)	0.009(4)	0.049(5)	-0.011(3)
O(109)	0.036(4)	0.050(4)	0.175(10)	-0.004(5)	0.038(5)	-0.009(3)
O(110)	0.077(4)	0.058(5)	0.043(5)	0.020(3)	0.016(4)	0.003(4)
O(111)	0.049(4)	0.062(4)	0.052(5)	0.007(4)	0.008(4)	0.006(3)
O(112)	0.049(4)	0.062(5)	0.041(5)	-0.001(3)	-0.002(4)	0.005(3)
O(113)	0.063(4)	0.069(5)	0.041(4)	0.010(4)	0.026(4)	-0.001(4)
O(114)	0.062(4)	0.046(4)	0.055(5)	0.011(3)	0.018(4)	0.013(3)
O(115)	0.039(3)	0.065(4)	0.053(5)	0.024(4)	-0.002(3)	-0.005(3)
O(116)	0.023(3)	0.029(3)	0.041(4)	-0.008(2)	0.003(3)	0.002(2)
O(117)	0.038(3)	0.046(3)	0.043(4)	0.020(3)	0.004(3)	-0.006(3)
O(118)	0.030(3)	0.032(3)	0.032(4)	0.001(2)	0.005(3)	0.001(2)
O(119)	0.029(3)	0.068(4)	0.050(4)	0.020(3)	0.012(3)	0.003(3)
O(120)	0.047(4)	0.054(4)	0.048(5)	-0.003(3)	0.015(3)	-0.012(3)
O(121)	0.089(7)	0.076(7)	0.131(10)	-0.001(7)	-0.050(7)	-0.011(5)
O(135)	0.043(9)	0.051(9)	0.063(13)	-0.026(8)	0.029(8)	-0.023(6)
O(134)	0.041(9)	0.052(9)	0.059(13)	0.021(8)	0.002(8)	-0.001(6)
O(133)	0.30(4)	0.14(3)	0.16(2)	-0.01(2)	0.19(3)	-0.02(2)
O(132)	0.082(17)	0.028(12)	0.08(2)	-0.021(11)	0.059(16)	-0.028(10)
O(131)	0.082(19)	0.08(2)	0.07(2)	-0.038(15)	-0.003(15)	-0.037(15)

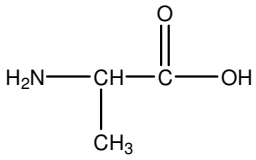
Table 5. Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters (A^2) for struc.

	x	y	z	U(eq)
H(1AA) 1	0.1850	0.2340	0.4807	0.020
H(2AA) 1	0.2556	0.0901	0.4719	0.019
H(3AA) 1	0.4015	0.1299	0.4422	0.024
H(4AA) 1	0.4670	0.2874	0.4621	0.022
H(5AA) 1	0.3792	0.4006	0.5076	0.023
H(6AA) 1	0.2183	0.3442	0.4143	0.029
H(6AB) 1	0.3112	0.3713	0.3905	0.029
H(7AA) 1	0.4244	0.0122	0.5105	0.024
H(7AB) 1	0.4115	-0.0431	0.5760	0.024
H(1BA) 1	0.5452	0.3718	0.5805	0.024
H(2BA) 1	0.6497	0.3203	0.5156	0.020
H(3BA) 1	0.8020	0.3841	0.5960	0.022
H(4BA) 1	0.8234	0.3982	0.7180	0.026
H(5BA) 1	0.6841	0.3641	0.7533	0.023
H(6BA) 1	0.5809	0.4739	0.6538	0.032
H(6BB) 1	0.6835	0.5128	0.7067	0.032
H(7BA) 1	0.8222	0.2297	0.5482	0.026
H(7BB) 1	0.7367	0.1701	0.4929	0.026
H(1CA) 1	0.9545	0.2998	0.7625	0.021
H(2CA) 1	0.9818	0.1387	0.7545	0.019
H(3CA) 1	1.0505	0.0887	0.8738	0.027
H(4CA) 1	1.0178	0.1783	0.9648	0.023
H(5CA) 1	0.9363	0.3283	0.9314	0.027
H(6CA) 1	1.0527	0.3688	0.8613	0.029
H(6CB) 1	1.1004	0.3323	0.9404	0.029
H(7CA) 1	0.9231	-0.0138	0.8429	0.026
H(7CB) 1	0.9378	-0.0261	0.7683	0.026
H(1DA) 1	0.9114	0.1411	1.0139	0.020
H(2DA) 1	0.8358	-0.0074	0.9903	0.022
H(3DA) 1	0.6961	0.0090	1.0317	0.025
H(4DA) 1	0.6335	0.1635	1.0447	0.028
H(5DA) 1	0.7205	0.2982	1.0185	0.028
H(6DA) 1	0.8861	0.2208	1.0963	0.034
H(6DB) 1	0.7978	0.2304	1.1283	0.034
H(7DA) 1	0.6608	-0.0744	0.9406	0.024
H(7DB) 1	0.6776	-0.1035	0.8688	0.024
H(1EA) 1	0.5467	0.2805	0.9555	0.028
H(2EA) 1	0.4425	0.1846	0.9998	0.030
H(3EA) 1	0.2889	0.2631	0.9363	0.027
H(4EA) 1	0.2687	0.3439	0.8264	0.027
H(5EA) 1	0.4133	0.3509	0.7922	0.030
H(6EA) 1	0.5104	0.4120	0.9148	0.037
H(6EB) 1	0.4074	0.4619	0.8722	0.037
H(7EA) 1	0.2832	0.0946	0.9555	0.046
H(7EB) 1	0.3622	0.0100	0.9764	0.046
H(1FA) 1	0.1437	0.2626	0.7568	0.023
H(2FA) 1	0.1122	0.1046	0.7226	0.026
H(3FA) 1	0.0445	0.1149	0.5990	0.025
H(4FA) 1	0.0812	0.2464	0.5360	0.026
H(5FA) 1	0.1674	0.3767	0.6061	0.026
H(6FA) 1	0.0505	0.3708	0.6801	0.034
H(6FB) 1	0.0020	0.3712	0.5964	0.034
H(7FA) 1	0.1725	0.0141	0.6016	0.026
H(7FB) 1	0.1530	-0.0382	0.6662	0.026

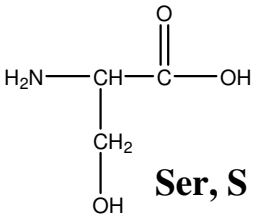
Annexe 4 : Les acides aminés



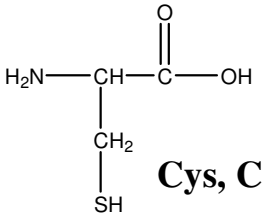
Gly, G



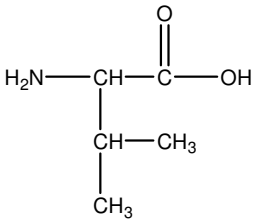
Ala, A



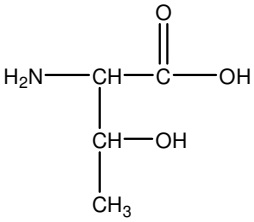
Ser, S



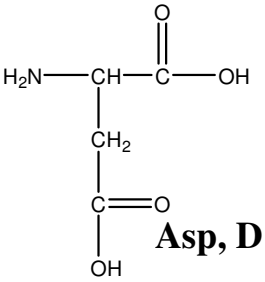
Cys, C



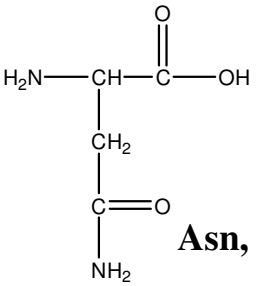
Val, V



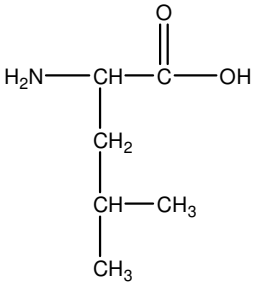
Thr, T



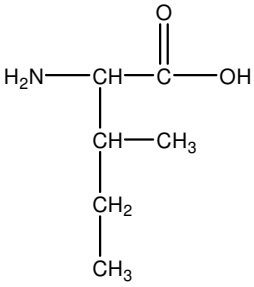
Asp, D



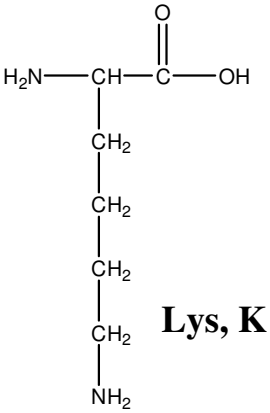
Asn, N



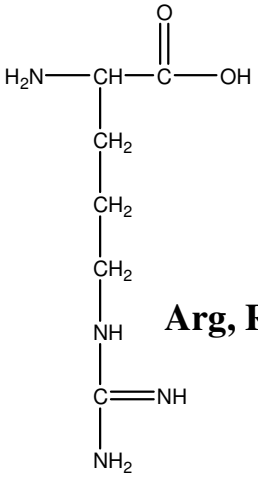
Leu, L



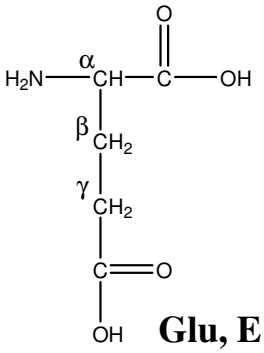
Ile, I



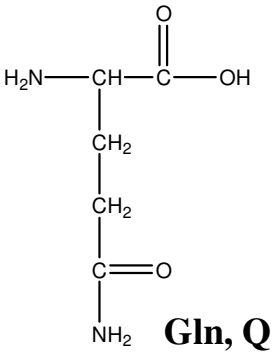
Lys, K



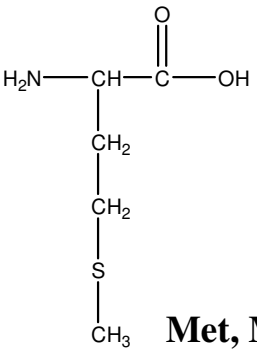
Arg, R



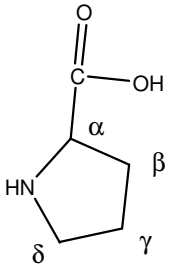
Glu, E



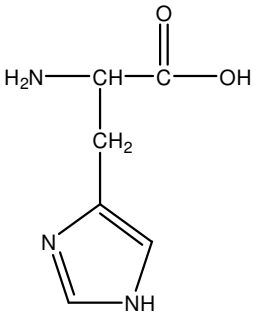
Gln, Q



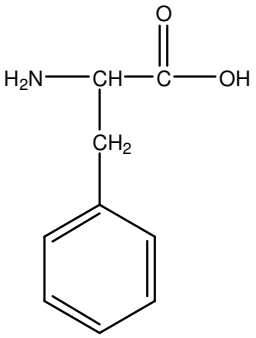
Met, M



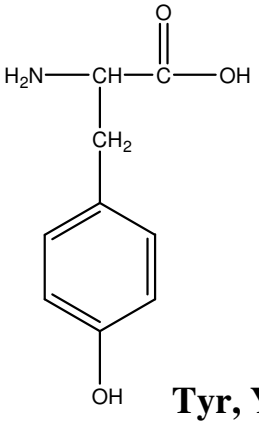
Pro, P



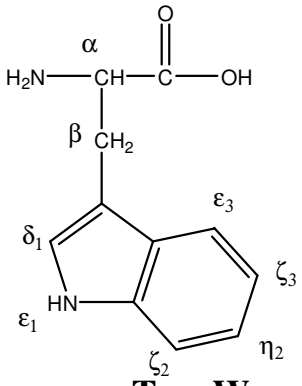
His, H



Phe, F



Tyr, Y



Trp, W

Afin de rappeler la numérotation des chaînes latérales utilisée dans le chapitre 4, les carbones du glutamate ont été numérotées (les hydrogènes portent les mêmes noms). En raison de leur numérotation particulière, les carbones de la proline et du tryptophane ont également été annotés.

Bibliographie

(1) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.

(2) Aime, S.; Botta, M.; Terreno, E. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Eldik, R. v., Bertini, I., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2005; Vol. 57.

(3) Bunzli, J. C. G. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 53-61.

(4) Martell, A. E.; Motekaitis, R. J. *Determination and use of stability constants*; VCH, 1992.

(5) Shannon, R. D. *Acta Crystallogr.* **1969**, *25*, 925.

(6) Jones, C. J. *d- and f- block chemistry*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2001; Vol. 4.

(7) Mar, G. N. L.; Horrocks, W. D.; Holm, R. H. *NMR of Paramagnetic Molecules*; Academic Press New York and London, 1973.

(8) Bünzli, J.-C. G. In *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*; Jr., K. A. G., Eyring, L., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1987; Vol. 9, p 321.

(9) Koshland, D. E. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1994**, *33*, 2375-2378.

(10) Bünzli, J.-C. G.; André, N.; Elhabiri, M.; Muller, G.; Piguet, C. *J. Alloy. Compd.* **2000**, *303-304*, 66-74.

(11) Charbonniere, L. J.; Ziessel, R.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Boehme, C.; Wipff, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7779-7788.

(12) Weibel, N.; Charbonniere, L. J.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4888-4896.

(13) Andre, N.; Jensen, T. B.; Scopelliti, R.; Imbert, D.; Elhabiri, M.; Hopfgartner, G.; Piguet, C.; Bunzli, J. C. G. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 515-529.

(14) Bunzli, J. C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048-1077.

(15) Horrocks, W. W.; Sudnik, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334.

(16) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; Sousa, A. S. d.; Williams, J. A. G.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, 493-503.

(17) Horrocks, W. D.; Supkowski, R. M. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5616-5619.

(18) Pope, S. J. A.; Coe, B. J.; Faulkner, S.; Bichenkova, E. V.; Yu, X.; Douglas, K. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9490-9491.

(19) Werts, M. H. V.; Woudenberg, R. H.; Emmerink, P. G.; van Gassel, R.; Hofstraat, J. W.; Verhoeven, J. W. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2000**, *39*, 4542-+.

(20) Pope, S. J. A.; Kenwright, A. M.; Boote, V. A.; Faulkner, S. *Dalton Trans.* **2003**, 3780-3784.

(21) Li, C.; Wong, W. T. *Chem. Commun.* **2002**, 2034-2035.

(22) Lowe, M. P.; Parker, D. *Chem. Commun.* **2000**, 707-708.

(23) Lowe, M. P.; Parker, D.; Reany, O.; Aime, S.; Botta, M.; Castellano, G.; Gianolio, E.; Pagliarin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7601-7609.

(24) Mathis, G. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1391-1397.

(25) Faulkner, S.; Pope, S. J. A.; Burton-Pye, B. P. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2005**, *40*, 1-31.

(26) Vereb, G.; Jares-Erijman, E.; Selvin, P. R.; Jovin, T. M. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2210-2222.

(27) Abragam, A. In *Les principes du magnétisme nucléaire*; nucléaires, I. n. d. s. e. t., Ed.; Presses universitaires de France: Paris, 1961, pp 267-354.

(28) Bertini, I.; Luchinat, C.; Aime, S. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, R7-&.

(29) Bleaney, B. *J. Magn. Reson.* **1972**, *8*, 91-100.

(30) Vigouroux, C.; Belorizky, E.; Fries, P. H. *Eur. Phys. J. D* **1999**, *5*, 243-255.

(31) Rast, S.; Borel, A.; Helm, L.; Belorisky, E.; Fries, P. H.; Merbach, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2637-2644.

(32) Rocklage, S. M.; Cacheris, W. P.; Quay, S. C.; Hahn, F. E.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 477-485.

(33) Aime, S.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Brocchetta, M.; Canton, S.; Fedeli, F.; Gianolio, E.; Terreno, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *7*, 58-67.

(34) Muller, R. N.; Roch, A.; Colet, J.-M.; Ouakssim, A.; Gillis, P. In *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*; Merbach, A. E., Toth, E., Eds.; Wiley: Chichester, 2001.

(35) Cacheris, W. P.; Quay, S. C.; Rocklage, S. M. *Magn. Reson. Imaging* **1990**, *8*, 467-481.

(36) Swift, T. J.; Connick, R. E. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307-&.

(37) Luz, Z.; Meiboom, S. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 366-&.

(38) Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. E. In *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*; Merbach, A. E., Toth, E., Eds.; Wiley: Chichester, 2001.

(39) Bloembergen, N.; Morgan, L. O. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 842-&.

(40) McLachlan, A. D. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* **1964**, *280*, 271-&.

(41) Ayant, Y.; Belorizky, E.; Alizon, J.; Gallice, J. *Journal De Physique* **1975**, *36*, 991-1004.

(42) Polnaszek, C. F.; Bryant, R. G. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 4038-4045.

(43) Albrand, J. P.; Taieb, M. C.; Fries, P. H.; Belorizky, E. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 5809-5815.

(44) Freed, J. H. *J. Chem. Phys.* **1978**, *68*, 4034-4037.

(45) Hwang, L. P.; Freed, J. H. *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 4017-4025.

(46) Botta, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 399-407.

(47) Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Piccinini, M.; Sisti, M.; Terreno, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1997**, *2*, 470-479.

(48) Hajela, S.; Botta, M.; Giraudo, S.; Xu, J. D.; Raymond, K. N.; Aime, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11228-11229.

(49) Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M.; Terreno, E. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, S200-S208.

(50) Caravan, P.; Amedio, J. C.; Dunham, S. U.; Greenfield, M. T.; Cloutier, N. J.; McDermid, S. A.; Spiller, M.; Zech, S. G.; Looby, R. J.; Raitsimring, A. M.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem.-Eur. J.* **2005**, *11*, 5866-5874.

(51) Vander Elst, L.; Port, M.; Raynal, I.; Simonot, C.; Muller, R. N. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 2495-2501.

(52) Fries, P. H.; Belorizky, E. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*.

(53) Vigouroux, C. In *Chimie*; Joseph Fourier: Grenoble, 1998.

(54) Vigouroux, C.; Bardet, M.; Belorizky, E.; Fries, P. H.; Guillermo, A. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *286*, 93-100.

(55) Sacco, A.; Belorizky, E.; Jeannin, M.; Gorecki, W.; Fries, P. H. *J. Phys. II* **1997**, *7*, 1299-1322.

(56) Fries, P. H.; Patey, G. N. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 6253-6266.

(57) Hansen, J.-P.; McDonald, I. R. *Theory of simple liquids*, 1986.

(58) Kowalewski, J.; Mäler, L. *Nuclear spin relaxation in liquids : theory, experiments, and applications*, 2006.

(59) Luz, Z.; Meiboom, S. *J. Chem. Phys.* **1964**, *40*, 2686-&.

(60) Bonnet, C. S.; Fries, P. H. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 782-787.

(61) Kolat, R. S.; Powell, J. E. *Inorg. Chem.* **1962**, *1*, 293-&.

(62) Marcus, Y. *Ion solvatation*, 1985.

(63) Favas, M. C.; Kepert, D. L.; Skelton, B. W.; White, A. H. *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.* **1980**, 454-458.

(64) Bravard, F.; Rosset, C.; Delangle, P. *Dalton Trans.* **2004**, 2012-2018.

(65) Rongere, P.; Moreldesrosiers, N.; Morel, J. P. *J. Chem. Soc.-Faraday Trans.* **1995**, *91*, 2771-2777.

(66) Laurent, S.; Elst, L. V.; Copoix, F.; Muller, R. N. *Invest. Radiol.* **2001**, *36*, 115-122.

(67) Smith, R. M.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E.; National Institute of standards and technology ed.; NIST Standard Reference Database, 1997.

(68) Berry, R. S.; Rice, S. A.; Ross, J. *Physical Chemistry*, 1980.

(69) Troughton, J. S.; Greenfield, M. T.; Greenwood, J. M.; Dumas, S.; Wiethoff, A. J.; Wang, J. F.; Spiller, M.; McMurry, T. J.; Caravan, P. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6313-6323.

(70) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. *Chem.-Eur. J.* **2006**, *sous presse*.

(71) Melchior, A.; Fries, P. H.; Port, M., Personnal communication : Low and high field relaxometric study of a macromolecular contrast agent for MRI.

(72) Belorizky, E.; Fries, P. H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2341-2351.

(73) Saenger, W. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1980**, *19*, 344-362.

(74) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325-1357.

(75) Duchene; Worressidjewe *J. Coord. Chem.* **1992**, *27*, 223-236.

(76) Wenzel, T. J.; Bogyo, M. S.; Lebeau, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4858-4865.

(77) Wenzel, T. J.; Amonoo, E. P.; Shariff, S. S.; Aniagyei, S. E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3099-3104.

(78) Komiyama, M.; Takarada, T. *Metal ions in biological systems* **2003**, *40*, 355-368.

(79) Yashiro, M.; Miyama, S.; Takarada, T.; Komiyama, M. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *17*, 393-397.

(80) Rudzinski, C. M.; Hartmann, W. K.; Nocera, D. G. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *171*, 115-123.

(81) Skinner, P. J.; Beeby, A.; Dickins, R. S.; Parker, D.; Aime, S.; Botta, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *2*, 1329-1338.

(82) Michels, J. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2056-2064.

(83) Aime, S.; Botta, M.; Fedeli, F.; Gianolio, E.; Terreno, E.; Anelli, P. *Chem.-Eur. J.* **2001**, *7*, 5262-5269.

(84) Fatin-Rouge, N.; Bünzli, J.-C. G. *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *293*, 53-60.

(85) Gadelle, A.; Defaye, J. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1991**, *30*, 78.

(86) Ashton, P. R.; Ellwood, P.; Staton, I.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7274-7280.

(87) Ashton, P. R.; Ellwood, P.; Staton, I.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1991**, *30*, 80-81.

(88) Yamamura, H.; Ezuka, T.; Kawase, Y.; Kawai, M.; Butsugan, Y.; Fujita, K. *Chem. Commun.* **1993**, 636-637.

(89) Yamamura, H.; Masuda, H.; Kawase, Y.; Kawai, M.; Butsugan, Y.; Einaga, H. *Chem. Commun.* **1996**, 1069-1070.

(90) Ashton, P. R.; Gattuso, G.; Königer, R.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9553-9555.

(91) Fauvelle, F.; Gadelle, A.; Pailler, Y.; AOUS, S.; Debouzy, J. C. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *00*, 1-5.

(92) Baudin, C.; Tardy, F.; Dalbiez, J. P.; Jankowski, C.; Fajolles, C.; Leclair, G.; Amekraz, B.; Perly, B.; Mauclaire, L. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 131-138.

(93) Viguier, R.; Serratrice, G.; Dupraz, A.; Dupuy, C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 1789-1795.

(94) Xu, J.; Franklin, S. J.; D. W. Whisenhunt, J.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7245-7246.

(95) Johnson, A. R.; O'Sullivan, B.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2652-2660.

(96) O'Sullivan, B.; Doble, D. M. J.; Thompson, M. K.; Siering, C.; Xu, J.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 2577-2583.

(97) Sukhno, I. V.; Buz'ko, V. Y.; Panushkin, V. T.; Gavriluk, M. B. *Russ. J. Coord. Chem.* **2004**, *30*, 591-598.

(98) Hopfgartner, G.; Piguet, C.; Henion, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *5*, 748.

(99) Debouzy, J. C., Personnal communication.

(100) Desvaux, H.; Berthault, P.; Birlirakis, N.; Goldman, M. *J. Magn. Reson.* **1994**, *108 A*, 219-229.

(101) Desvaux, H.; Berthault, P.; Birlirakis, N.; Goldman, M.; Piotto, M. *J. Magn. Reson. A* **1995**, *113*, 47-52.

(102) Bonnet, C.; Gadelle, A.; Pecaut, J.; Fries, P. H.; Delangle, P. *Chem. Commun.* **2005**, 625-627.

(103) Avecilla, F.; Blas, A. d.; Bastida, R.; Fenton, D. E.; Mahia, J.; Macias, A.; Platas, C.; Rodriguez, A.; Rodriguez-Blas, T. *Chem. Commun.* **1999**, 125-126.

(104) Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C.; Howard, J. A. K. *Chem. Rev.* **2001**, *102*, 1977-2010.

(105) Bretonnière, Y.; Mazzanti, M.; Pécaut, J.; Dunand, F. A.; Merbach, A. E. *Chem. Commun.* **2001**, 621-622.

(106) Benetollo, F.; Bombieri, G.; Calabi, L.; Aime, S.; Botta, M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 148-157.

(107) Rodgers, R. D.; Rollins, A. N.; Etzenhouser, R. D.; Voss, E. J.; Bauer, C. B. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3451-3462.

(108) Wang, R. Y.; Zhao, J. J.; Jin, T. Z.; Xu, G. X.; Zhou, Z. Y.; Zhou, X. G. *Polyhedron* **1998**, *17*, 43-47.

(109) Powell, D. H.; Dhubhghaill, O. M. N.; Pubanz, D.; Helm, L.; Lebedev, Y. S.; Schlaepfer, W.; Merbach, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9333-9346.

(110) Nicolle, G. M.; Helm, L.; Merbach, A. E. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 794-799.

(111) Nicolle, G. M.; Yerli, F.; Imbert, D.; Böttger, U.; Bünzli, J.-C. G.; Merbach, A. E. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 5453-5467.

(112) Nieuwenhuuizen, M. S.; Peters, J. A.; Sinnema, A.; Kieboom, A. P. G.; Bekkum, H. v. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 12.

(113) Peters, J. A.; Nieuwenhuizen, M. S.; Raber, D. J. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 417.

(114) Alpoim, M. C.; Urbano, A. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Peters, J. A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1992**, 463-467.

(115) Cossy, C.; Barnes, A. C.; Enderby, J. E.; Merbach, A. E. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 3254-3260.

(116) Jerschow, A.; Müller, N. *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 372-375.

(117) Gierer, A.; Wirtz, K. *Z. Naturfors. Sect. A-J. Phys. Sci.* **1953**, *8*, 532-538.

(118) Holz, M.; Weingartner, H. *J. Magn. Reson.* **1991**, *92*, 115-125.

(119) Micskei, K.; Helm, L.; Brücher, E.; Merbach, A. E. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3844-3850.

(120) Li, W.; Fraser, S. E.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1413-1414.

(121) Li, W.; Parigi, G.; Fragai, M.; Luchinat, C.; Meade, T. J. *Inorg. Chem.* **2002**, *45*, 4018-4024.

(122) Botta, M.; Casellato, U.; Scalco, C.; Tamburini, S.; Tomasin, P.; Vigato, P. A.; Aime, S.; Barge, A. *Chem.-Eur. J.* **2002**, *8*, 3917-3926.

(123) Kink, J. A.; Maley, M. E.; Preston, R. R.; Ling, K. Y.; Wallenfriedman, M. A.; Saimi, Y.; Kung, C. *Cell* **1990**, *62*, 165-174.

(124) Wilson, M. A.; Brunger, A. T. *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 1237-1256.

(125) Marsden, B. J.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D. *Biochemistry* **1988**, *27*, 4198-4206.

(126) Strynadka, N. C. J.; James, M. N. G. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 951-998.

(127) Macmanus, J. P.; Hogue, C. W.; Marsden, B. J.; Sikorska, M.; Szabo, A. G. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10358-10366.

(128) Hogue, C. W. V.; Macmanus, J. P.; Banville, D.; Szabo, A. G. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13340-13347.

(129) Franz, K. J.; Nitz, M.; Imperiali, B. *Chembiochem* **2003**, *4*, 265-271.

(130) Nitz, M.; Franz, K. J.; Maglathlin, R. L.; Imperiali, B. *Chembiochem* **2003**, *4*, 272-276.

(131) Nitz, M.; Sherawat, M.; Franz, K. J.; Peisach, E.; Allen, K. N.; Imperiali, B. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2004**, *43*, 3682-3685.

(132) Le Clainche, L.; Plancque, G.; Amekraz, B.; Moulin, C.; Pradines-Lecomte, C.; Peltier, G.; Vita, C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 334-340.

(133) Wohnert, J.; Franz, K. J.; Nitz, M.; Imperiali, B.; Schwalbe, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13338-13339.

(134) Gay, G. L.; Lindhout, D. A.; Sykes, B. D. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 640-651.

(135) Franklin, S. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 201-208.

(136) Welch, J. T.; Kearney, W. R.; Franklin, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3725-3730.

(137) Kovacic, R. T.; Welch, J. T.; Franklin, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6656-6662.

(138) Caravan, P.; Greenwood, J. M.; Welch, J. T.; Franklin, S. J. *Chem. Commun.* **2003**, 2574-2575.

(139) Nivorozhkin, A. L.; Kolodziej, A. F.; Caravan, P.; Greenfield, M. T.; Lauffer, R. B.; McMurry, T. J. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2001**, *40*, 2903-2906.

(140) Peluso, S.; Dumy, P.; Nkubana, C.; Yokokawa, Y.; Mutter, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7114-7120.

(141) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308.

(142) Nikiforovich, G. V.; Mutter, M.; Lehmann, C. *Biopolymers* **1999**, *50*, 361-372.

(143) Tuchscherer, G.; Scheibler, L.; Dumy, P.; Mutter, M. *Biopolymers* **1998**, *47*, 63-73.

(144) Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*; John Wiley & sons: New York.

(145) Wüthrich, K.; Billeter, M.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 715-740.

(146) Brünger, A. T. *X-PLOR version 3.1. A system for X-ray Crystallography and NMR.*; Yale University Press: New Haven, 1992.

(147) Brunger, A. T.; Karplus, M.; Petsko, G. A. *Acta Crystallogr. Sect. A* **1989**, *45*, 50-61.

(148) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261.

(149) Shetty, S. Y.; Sathe, R. M. *Talanta* **1976**, *23*, 46.

(150) Fosset, B.; Lefrou, C.; Masson, A.; Mingotaud, C. *Chimie physique expérimentale*; Hermann, éditeurs des sciences et des arts: Paris, 2000.

(151) Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411-2423.

(152) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.

(153) Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbuhler, A. D. *Talanta* **1985**, *32*, 1133-1139.

(154) Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbuhler, A. D. *Talanta* **1985**, *32*, 95-101.

(155) Sklenar, V.; Piotto, M.; Leppik, R.; Saudek, V. *J. Magn. Reson. A* **1993**, *102*, 241-245.

(156) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661-665.

(157) Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 355-360.

(158) Malliavin, T. E.; Desvaux, H.; Delsuc, M.-A. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 801-806.

(159) Fletcher, C. M.; Jones, D. N. M.; Diamond, R.; Neuhaus, D. *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 292-310.