



HAL
open science

Conception et Synthèse de Nouvelles Molécules Cages pour des Applications en IRM du Xénon

Léa Delacour

► **To cite this version:**

Léa Delacour. Conception et Synthèse de Nouvelles Molécules Cages pour des Applications en IRM du Xénon. Chimie organique. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : . tel-00711723

HAL Id: tel-00711723

<https://theses.hal.science/tel-00711723>

Submitted on 25 Jun 2012

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.

ORSAY

N°D'ORDRE :

UNIVERSITE DE PARIS SUD U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY
--

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par

Léa DELACOUR

pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY
Spécialité Chimie Organique

**Conception et Synthèse de Nouvelles Molécules Cages pour
des Applications en IRM du Xénon**

Soutenance le 19 septembre 2011 devant la commission d'examen composée de

MM. Dr. Patrick Berthault	Examineur
Pr. David Bonnaffé	Examineur
Dr. Thierry Brotin	Rapporteur
Dr. Jean-Luc Parrain	Rapporteur
Dr. Bernard Rousseau	Directeur de thèse

À mon grand-père, Bonpapa

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements au Docteur Patrick Berthault, au Professeur David Bonnaffé, au Docteur Thierry Brotin et au Docteur Jean-Luc Parrain, membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse et avec lesquels j'ai eu des échanges très agréables et intéressants.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au Docteur Bernard Rousseau qui m'a encadrée dans la réalisation de ces travaux. Ses conseils et sa bienveillance ont très largement contribué au bon déroulement de ces trois années, aussi bien d'un point de vue scientifique que d'un point de vue personnel.

Je remercie également toute l'équipe du Docteur Patrick Berthault: les Docteurs Yves Boulard, Céline Boutin et François-Xavier Legrand ainsi que Nawal Tassali et Estelle Léonce pour les analyses en RMN ^{129}Xe et leur grande contribution au projet cryptophane tout au long de ma thèse.

Je remercie le Docteur François Leteurtre pour sa collaboration concernant les études de toxicologie.

Je souhaite dire un grand merci à Naoko Kotera et au Docteur Ténin Traore qui furent mes collègues dans la « crypto team » mais surtout de grandes amies, et qui j'espère le resteront. Merci Naoko pour ton énorme soutien au quotidien et surtout dans les moments difficiles.

Je remercie également Sébastien Garcia qui a participé grandement au projet des cryptophanes.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Edmond Gravel pour son aide précieuse au quotidien qui m'a permis de conduire à bien ce travail.

Je remercie les Docteurs Jean-Christophe Cintrat et Éric Doris pour leurs conseils avisés tout au long de ma thèse.

Je remercie également Goulven Merer qui a contribué, dans la bonne humeur, à certaines thématiques abordées ici.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire d'analyse: David Buisson, Céline Puente, Sylvie Coudert et le Docteur Elizabeth Zekri.

J'exprime mon amicale reconnaissance à toutes les personnes que j'ai côtoyées au Laboratoire de Marquage au Tritium : Florence Pillon, Julien Alliot, Fabien Knittel, Taoran Lin, Chloé Hoffman ainsi que les Docteurs Quentin Raffy, Chloé Tanguy, Stéphanie Deville-Foillard et Sébastien Leroux.

Je remercie mon ami Pierre Lacotte pour son aide (en particulier lors de la rédaction de ce document) et pour sa bonne humeur.

J'adresse également tous mes remerciements à l'ensemble du personnel du Service de Chimie Bio-organique et de Marquage pour son accueil chaleureux, sa sympathie et sa gentillesse, qui a contribué à rendre cette thèse très agréable.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento al Doctor Magali Romañach quién me llevó a descubrir la investigación en química.

Je remercie mes parents, mes sœurs Sarah et Marie-Agnès, Florian ainsi que mes beaux-frères Koen et Olivier pour leur soutien au quotidien.

Pour terminer, je remercie mes « grandes » amies de longue date : Aurélie, Emma, Lucie et Oriane pour leur encouragement et leur aide.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	2
INTRODUCTION GÉNÉRALE	6
A. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
I. L'IRM ET SES AVANCÉES	12
1. L'imagerie médicale, historique	12
2. Principe et applications de l'IRM	13
a. Principe de la RMN	13
b. IRM anatomique	14
c. IRM fonctionnelle (IRMf).....	15
3. Comment augmenter la sensibilité de l'IRM ?	16
a. Les agents de contraste	16
i. Agents de contraste à base de gadolinium	17
ii. Les nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques.....	18
b. Les espèces hyperpolarisées	20
i. Les différentes méthodes d'hyperpolarisation.....	21
ii. Exemple d'application en IRM ¹³ C hyperpolarisé.....	22
II. LE XÉNON HYPERPOLARISÉ ET SES SYSTÈMES HÔTES	22
1. Généralités sur le xénon.....	22
2. Méthode d'hyperpolarisation par pompage optique	24
3. Biosondes pour l'IRM ¹²⁹ Xe hyperpolarisé.....	26
a. Principe de la biosonde	26
b. Les systèmes hôtes pour le xénon	27
i. Les critères de sélection.....	27
ii. Les cyclodextrines.....	28
iii. Les calixarènes	28
iv. Les hémicarcérands	29
v. Les cucurbiturils	30
vi. Les cryptophanes.....	30
c. Vers de l'IRM ¹²⁹ Xe de plus en plus sensible	36
i. HYPER-CEST.....	36
ii. Augmentation de la concentration locale en cryptophanes.....	38
iii. Augmentation de la concentration locale en cryptophanes + HYPER-CEST.....	38
III. LES CRYPTOPHANES, STRUCTURE, SYNTHÈSE ET APPLICATIONS	39
1. Les grandes avancées dans l'histoire des cryptophanes	39
2. Les dérivés de cyclotrivratriylène	41

a. Synthèse et mécanisme de formation des CTV	42
<i>i. Mécanisme de formation</i>	42
<i>ii. Différentes voies de synthèse des CTV</i>	43
b. Symétrie et chiralité	44
c. Conformation	46
3. Les cryptophanes	48
a. Stéréochimie des cryptophanes et symétrie	48
b. Différentes voies de synthèse des cryptophanes	50
<i>i. Méthode directe</i>	50
<i>ii. Méthode template</i>	52
<i>iii. Méthode par couplage</i>	55
c. Différentes voies de fonctionnalisation des cryptophanes	57
d. Les différentes biosondes par équipes	64
<i>i. Équipe de A. Pines</i>	64
<i>ii. Équipe de J-P. Dutasta & T. Brotin</i>	69
<i>iii. Équipe d'I. Dmochowski</i>	72
<i>iv. Équipe de C. Freund</i>	79
IV. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS	80
B. SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION DU CRYPTOPHANE-111	84
I. SYNTHÈSE DÉCRITE DANS LA LITTÉRATURE	84
II. NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE DU CRYPTOPHANE-111	86
1. Nouvelle stratégie de synthèse	86
a. Approche rétro-synthétique	86
b. Choix de l'alcool benzylique de départ	86
2. Schéma de synthèse	87
3. Essais de synthèse du cryptophane-222 dans les mêmes conditions de couplage	89
III. PREMIÈRE FONCTIONNALISATION DU CRYPTOPHANE-111	90
1. Synthèse de cryptophanes halogénés	90
a. Synthèse du cryptophane mono-iodé 92	91
b. Synthèse du cryptophane mono-bromé 93	92
2. Détermination de la position des halogènes par RMN ¹ H	92
IV. SYNTHÈSE D'UN NOUVEAU CRYPTOPHANE PAR CHIMIE DU PALLADIUM	95
1. Synthèse du cryptophane malonate 97	95
2. Saponification du cryptophane malonate 97	96
V. CONCLUSION	97
C. BIOSONDE POUR LA MESURE DU pH EXTRACELLULAIRE PAR IRM ¹²⁹Xe	100
I. CARTOGRAPHIE DU pH, APPLICATION AUX CELLULES CANCÉREUSES	100

1. Métabolisme de la production d'acide lactique, effet Warburg.....	100
2. Techniques de mesure du pH.....	101
a. Par des techniques classiques.....	101
b. Par IRM ¹³ C hyperpolarisé.....	102
II. MESURE DU pH EXTRACELLULAIRE PAR IRM ¹²⁹Xe	103
1. Cryptophane malonate comme biosonde à pH.....	103
2. Schéma de synthèse.....	105
a. Synthèse de la biosonde à pH par la voie 1.....	105
<i>i. Synthèse du dérivé d'acide malonique hydrosoluble.....</i>	105
<i>ii. Couplage final.....</i>	107
b. Synthèse de la biosonde à pH par la voie 2.....	108
3. Détermination des pKa et étude de l'hydrosolubilité de la biosonde à pH.....	109
a. Détermination des pKa du cryptophane 111	109
b. Étude de la solubilité du cryptophane 111 dans l'eau.....	109
4. Résultats RMN ¹²⁹ Xe.....	109
a. Spectres RMN ¹²⁹ Xe du cryptophane 111 à différents pH.....	110
b. Spectre RMN ¹²⁹ Xe du cryptophane 111 en présence de LiOH.....	111
III. CONCLUSION	112
D. BIOSONDE POUR LA DÉTECTION DU CANCER DU SEIN PAR IRM ¹²⁹Xe	116
I. LE CANCER DU SEIN ET SES TECHNIQUES DE DÉTECTION	116
1. Hydroxyapatite, cancer du sein à métastases osseuses.....	116
2. Les bis-phosphonates et leurs applications.....	116
3. Détection du cancer du sein par mammographie.....	117
4. Détection de microcalcifications à l'aide d'une sonde bimodale SPECT / NIR.....	117
II. DÉTECTION DE MICROCALCIFICATIONS PAR IRM ¹²⁹Xe	118
1. Stratégie de synthèse 1.....	119
a. Approche rétrosynthétique.....	119
b. Schéma de synthèse.....	120
2. Stratégie de synthèse 2.....	121
a. Approche rétrosynthétique.....	121
b. Synthèse du cryptophane 44	122
c. Couplage peptidique entre l'alendronate et le cryptophane 44	123
3. Résultats RMN ³¹ P.....	124
a. RMN ³¹ P du complexe alendronate avec l'hydroxyapatite.....	124
b. RMN ³¹ P du complexe 124 avec l'hydroxyapatite.....	125
4. Résultats RMN ¹²⁹ Xe.....	126
III. AUTRES APPLICATIONS DU CRYPTOPHANE 124	127

1. Biosonde pour la détection d'uranium.....	127
a. Propriétés chimiques de l'uranium.....	127
i. Degrés d'oxydation de l'uranium.....	127
ii. Diagramme de spéciation de U(VI).....	127
iii. Fluorescence de l'ion uranyle	128
b. Les bis-phosphonates, ligands de l'uranyle	129
i. Les complexes bis-phosphonates / uranyle	129
ii. Les bis-phosphonates et leur influence sur la fluorescence de l'uranyle	129
c. Résultats des tests de fluorescence	130
d. Résultats RMN ^{129}Xe	131
2. Biosonde pour la mesure du pH extracellulaire	131
IV. CONCLUSION	133
E. PLATEFORME GÉNÉRALE POUR LA SYNTHÈSE DE BIOSONDES	136
I. CONTEXTE	136
II. SYNTHÈSE DE LA PLATEFORME	137
1. Conception de la plateforme	137
2. Choix du groupement solubilisant et compatibilité avec l'encapsulation du ^{129}Xe	137
3. Nouvelle stratégie de synthèse	139
4. Synthèse de la plateforme	140
a. Synthèse de cryptophanes hydrosolubles précurseurs de biosondes.....	140
b. Synthèse du cryptophane 144	144
5. Fonctionnalisation	146
a. Réaction avec l'acide 3-azidopropanoïque	146
b. Réaction avec un azoture biotinylé.....	147
III. ÉTUDE DE LA SOLUBILITÉ EN MILIEU AQUEUX	150
IV. RÉSULTATS RMN ^{129}Xe	150
V. ÉTUDE DE TOXICITÉ	151
VI. CONCLUSION	153
F. SYNTHÈSE DE CAGES ORIGINALES	156
I. LES "CLICKTOPHANES"	157
1. "Clicktophane" en milieu organique	157
a. Synthèse du CTV 158	157
b. Synthèse du CTV 160	159
i. Chimie click en présence de cuivre	159
ii. Chimie click sans cuivre	161
2. "Clicktophane" hydrosoluble	162
3. Conclusion	164

II. CRYPTOPHANES PHOSPHORYLÉS	165
1. Concept de ces nouveaux cryptophanes	165
2. Synthèse de 169 à partir du trichlorure de phosphoryle (POCl ₃).....	165
a. Synthèse de 169 en une étape.....	165
b. Synthèse de 169 en deux étapes	166
<i>i. Synthèse du composé 171</i>	166
<i>ii. Réaction de couplage</i>	167
3. Conclusion	169
CONCLUSION GÉNÉRALE	172
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178
PARTIE EXPÉRIMENTALE	184
ANNEXES	258

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-APP: 3-aminopropylphosphonate
Bn: benzyle
BOLD: *Blood Oxygen-Level Dependent contrast*
CAs: Anhydrases Carboniques
CC: calcium-carbonate
CEST: Chemical Exchange Saturation Transfert
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CO: calcium-oxalate
CP: calcium-phosphate
CPP: calcium-pyrophosphate
CTV: cyclotrivéatrylène
CTTV: cyclotétravéatrylène
Da: dalton
DCC: dicyclocarbodiimide
DCM: dichlorométhane
DHP: dihydropyranne
DMF: diméthylformamide
DMSO: diméthylsulfoxyde
Dppp: 1,3-bis(diphénylphosphino)propane
EDCI: 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
FGD: ¹⁸F-fluoréoxyglucose
HA: hydroxyapatite
HYPER-CEST: *Hyperpolarized - Chemical Exchange Saturation Transfert*
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
IRMf: Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
ITC: *Isothermal Titration Calorimetry*
MTT: bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium
NBS: *N*-bromosuccinimide
NHS: *N*-hydroxysuccinimide
NIR: *Near Infrared*
NMDA: *N*-methyl-D-aspartate
PDN: Polarisation Dynamique Nucléaire
PEG: polyéthylène glycol
PHIP: *ParaHydrogen Induced Polarization*
pHi: pH intracellulaire

pHe: pH extracellulaire
PPTS: pyridinium *p*-toluènesulfonate
RGD: arginine - glycine - aspartate
SABRE: *Signal Amplification by Reversible Exchange*
SLRT: Spectrométrie Laser à Résolution Temporelle
SPIOs: *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*
TEA: triéthylamine
TEP: Tomographie par Émission de Positons
TEMP: Tomographie par Émission de Simple Photon
THP: tétrahydropyranyle
TIC: *Total Ion Chromatography*
Tris: (hydroxyméthyl) aminométhane
USPIOs: *Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale couramment utilisée dans le milieu hospitalier pour diagnostiquer des maladies sur des organes tels que le cerveau et les poumons. Elle est basée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et elle repose en général sur la détection des protons (^1H) présents dans le corps humain. Cette technique d'imagerie, utilisée depuis plus de trente ans (premières images IRM chez l'homme en 1977), se caractérise par une haute résolution spatiale et est devenue un outil incontournable pour l'observation de tissus en profondeur.

Cependant, le principal inconvénient de l'IRM est sa faible sensibilité. L'utilisation d'agents de contraste est souvent nécessaire afin d'améliorer la qualité de l'image et donc de faciliter le diagnostic. Les plus utilisés actuellement sont les complexes de gadolinium et les nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques. Malgré l'utilisation d'agents de contraste, l'IRM ^1H n'est pas encore suffisamment sensible pour pouvoir faire de l'imagerie à l'échelle moléculaire. La communauté scientifique s'est alors intéressée à l'utilisation d'espèces hyperpolarisées telles que l'hélium (^3He), le carbone (^{13}C) ou le xénon (^{129}Xe) pouvant permettre un gain en sensibilité important.

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'IRM du xénon (IRM ^{129}Xe). Le xénon est un gaz de spin 1/2, inerte, non toxique et déjà connu pour ses propriétés anesthésiantes et pour faire de l'imagerie des poumons humains par IRM ^{129}Xe . Il est très sensible à son environnement et possède donc une large gamme de déplacements chimiques. D'autre part, grâce à une technique d'hyperpolarisation du xénon, il est actuellement possible d'obtenir un gain en sensibilité considérable de l'ordre 10^4 à 10^5 . Cependant le xénon ne possède pas de spécificité pour une cible biologique et a donc besoin d'être "transporté". Aujourd'hui, parmi les systèmes hôtes répertoriés dans la littérature, les cryptophanes possèdent les meilleures propriétés d'encapsulation du xénon, en termes de constante d'affinité, de vitesse d'échange entrée/sortie du xénon dans la cage et de relaxation du xénon dans le cryptophane.

Les cryptophanes, dont la structure générale est présentée ci-dessous, sont des molécules cages constituées de deux unités de type cyclotribenzylène reliées entre elles par trois chaînes pontantes. Ils ont été synthétisés pour la première fois par l'équipe d'A. Collet au Collège de France au début des années 1980¹ et ces travaux se sont ensuite poursuivis au laboratoire de chimie de l'ENS Lyon dans l'équipe de J-P. Dutasta et T. Brotin.

¹ J. Gabard, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 1137

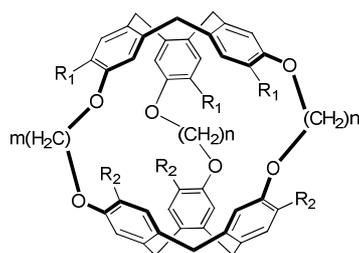


Figure 1: structure générale des cryptophanes

En 2001, l'équipe d'A. Pines à Berkeley a mis au point la première biosonde en RMN ^{129}Xe en détectant le complexe biotine – avidine à partir d'un cryptophane décoré par une molécule de biotine². Depuis, de nombreux scientifiques se sont intéressés à la synthèse de nouvelles biosondes à base de cryptophanes. À ce jour, sept équipes travaillent principalement sur cette thématique dont l'équipe de J-P. Dutasta et T. Brotin, d'A. Pines, d'I. Dmochowsky à Philadelphie, de C. Freund à Berlin, T. Holmann à Georgetown et les équipes de P. Berthault et B. Rousseau au CEA Saclay.

Parmi tous les cryptophanes synthétisés, le cryptophane-111 ($n = m = 1$, $R_1 = R_2 = \text{H}$), plus petit cryptophane, possède la plus grande affinité pour le xénon avec une constante d'association de 10^4 M^{-1} dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane à température ambiante. Ce composé a été synthétisé par l'équipe de J-P. Dutasta et T. Brotin³, en sept étapes avec un rendement global de 1,5 % et jusqu'à présent aucune biosonde n'a encore été obtenue à partir de cette molécule. C'est pourquoi, dans une première partie de ma thèse, nous nous sommes fixés comme objectif de fonctionnaliser pour la première fois le cryptophane-111 et de concevoir de nouvelles biosondes à partir de cette molécule cage. Pour ce faire, une nouvelle méthode de synthèse du cryptophane-111, plus courte et avec de meilleurs rendements, devra être développée.

D'autre part, toutes les biosondes synthétisées jusqu'à présent ont été obtenues *via* des synthèses longues, avec de faibles rendements et elles présentent souvent des problèmes d'hydrophobie. Cette faible solubilité en milieu aqueux du cryptophane peut engendrer la formation de systèmes auto-organisés, favoriser les interactions de ce dernier avec la membrane cellulaire et ainsi compromettre les applications *in vivo*. C'est pourquoi, dans une seconde partie, nous nous intéresserons à la mise au point d'une synthèse efficace de cryptophanes hydrosolubles et fonctionnalisables pouvant être vus comme une plateforme générale pour l'obtention d'un éventail de biosondes.

² M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yaoi, F. Tiani, P. G. Schultzi, *PNAS*, **2001**, 98, 10654

³ H. A. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332

Ces travaux de thèse ont été réalisés en collaboration avec plusieurs partenaires: l'équipe de T. Brotin et J-P. Dutasta à l'ENS Lyon pour la synthèse de cryptophanes, l'équipe de P. Berthault au CEA Saclay pour les expériences en RMN ^{129}Xe et F. Leteurtre au CEA Saclay pour les études de toxicité cellulaire.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'IRM ET SES AVANCÉES

1. L'imagerie médicale, historique

L'imagerie médicale est un ensemble de méthodes permettant de visualiser des processus biologiques au sein même des organismes vivants, de manière non invasive. Elle est essentielle à la compréhension des pathologies afin de mieux les diagnostiquer, les pronostiquer et les soigner. Initiée avec la radiographie par rayons X, l'imagerie médicale a bénéficié de la découverte de la radioactivité artificielle et des techniques de détection associées pour se développer. Par la suite, la découverte de la résonance magnétique nucléaire puis le développement des aimants supraconducteurs ont permis des avancées technologiques significatives dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique (Figure 2) ⁴.

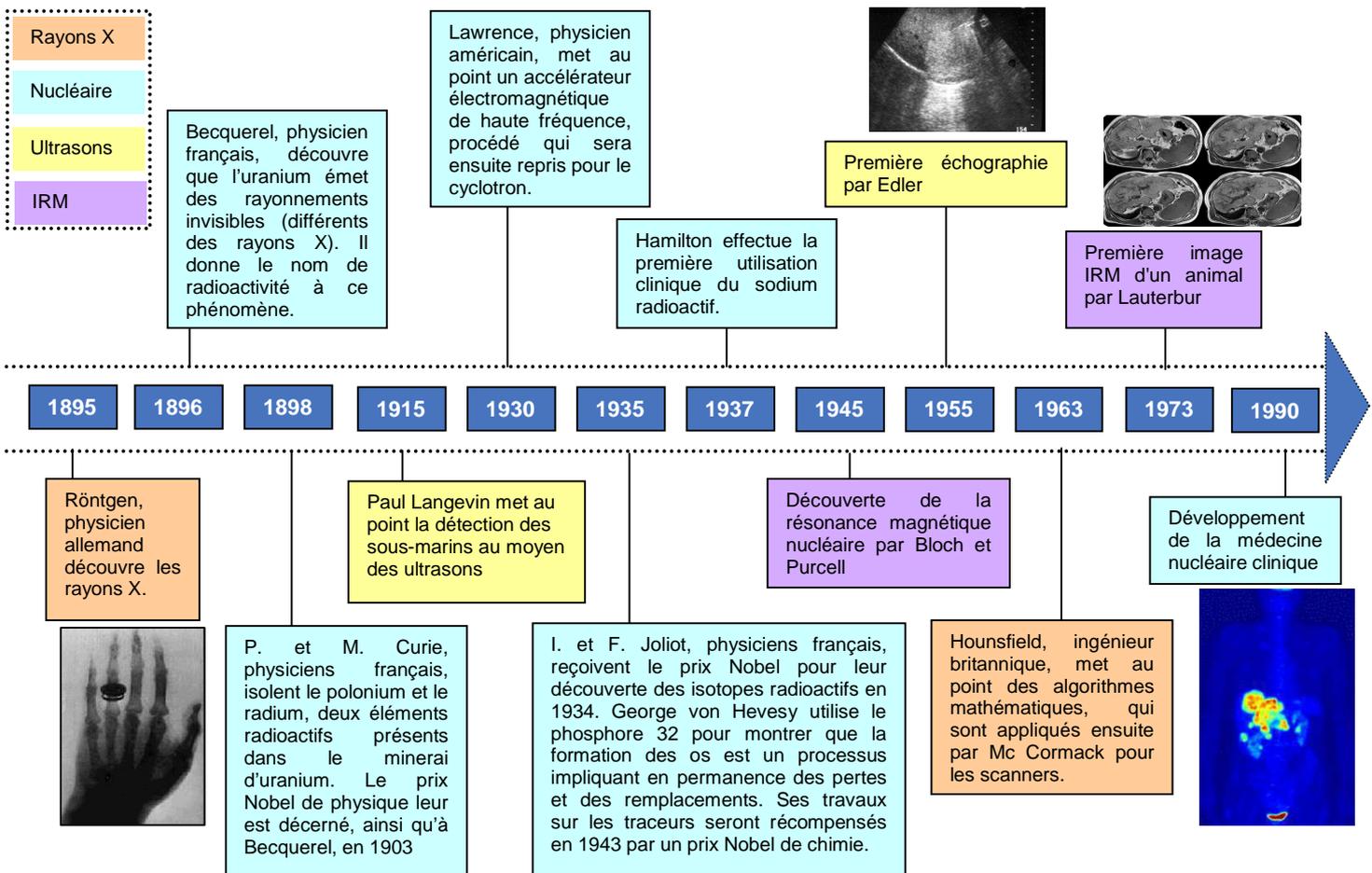


Figure 2: les grandes étapes de l'imagerie médicale^{4,5,6}

⁴ *Adsp*, n°42, mars 2003

⁵ *Clefs CEA*, N°56, 2007-2008

L'imagerie nucléaire (Tomographie par Émission de Positons et Tomographie par Émission de Simples Photons (Annexe 1)) et l'imagerie par résonance magnétique sont les deux techniques principales pouvant apporter des informations sur le fonctionnement des organes. Elles sont complémentaires et utilisées couramment en milieu hospitalier. La première possède une forte sensibilité et la seconde une très grande résolution spatiale⁷. Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la technique d'IRM.

2. Principe et applications de l'IRM

L'organisme est constitué d'atomes ou d'assemblages d'atomes (molécules). La RMN et l'IRM font appel aux propriétés magnétiques des noyaux atomiques de ces molécules. L'IRM est une technique capable d'étudier des tissus dits mous, tels que le cerveau, la moelle épinière, les muscles... Elle permet d'en connaître la structure anatomique, mais également d'en suivre le fonctionnement.

a. Principe de la RMN

En 1945, le physicien américain Félix Bloch découvre la propriété que possèdent les noyaux atomiques de se comporter comme des dipôles magnétiques lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique.

Dans le cas de la RMN du proton (RMN ¹H), sous l'action d'un champ magnétique B_0 élevé, une faible proportion des moments magnétiques des spins des protons s'alignent parallèlement au champ magnétique B_0 et donnent lieu à une aimantation longitudinale M_z selon la direction de B_0 (axe z) (Figure 3). Lorsque les moments magnétiques de spin sont ensuite soumis à une onde électromagnétique oscillante à la fréquence de résonance des protons, ceci va provoquer un basculement de l'aimantation M de manière perpendiculaire à B_0 (dans le plan xy): c'est l'aimantation transversale M_{xy} .

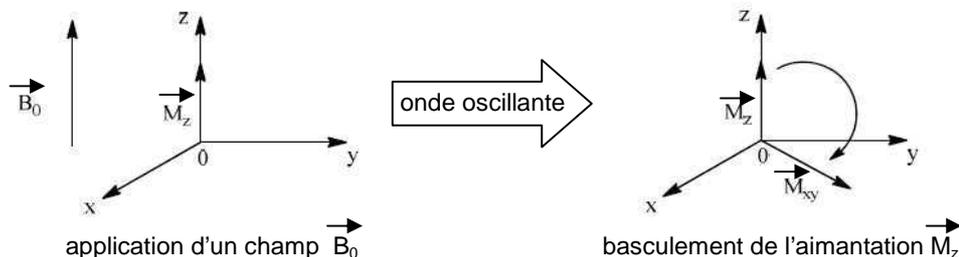


Figure 3: interaction des spins des protons avec un champ magnétique en RMN

⁶ P.C. Lauterbur, *Nature New Biol.*, **1973**, 242, 190

⁷ S. R. Meikle, F. J. Beekman, S. E. Rose, *Drug Discovery Today : Technologies*, **2006**, 3, 187

Après arrêt de l'onde oscillante, l'aimantation revient dans sa position d'équilibre sous l'action de B_0 . Ce retour à l'équilibre s'effectue suivant un mouvement de précession libre durant lequel les composantes longitudinale M_z et transversale M_{xy} de l'aimantation M varient au cours du temps (Figure 4).

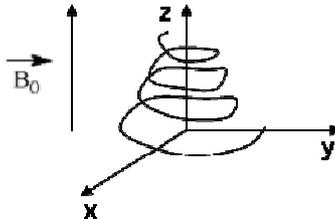


Figure 4: retour à l'équilibre

Ce phénomène, appelé relaxation, se caractérise par deux paramètres:

- temps de relaxation longitudinal T1 ou temps de relaxation « spin-réseau »
Il correspond au temps que mettent les moments magnétiques à retrouver leur alignement suivant l'axe z . Il est défini comme le temps nécessaire pour retrouver 63 % de l'aimantation longitudinale M_z car il faudrait un temps infini pour que tous les spins soient alignés de nouveau suivant z .
- temps de relaxation transversal T2 ou temps de relaxation « spin-spin »
Il s'agit du temps nécessaire pour que M_{xy} diminue jusqu'à atteindre 37 % de sa valeur initiale.

Le signal de précession libre (FID ou *Free Induction Decay*) est enregistré. À la suite d'une transformée de Fourier, un signal fonction de la fréquence de résonance représentant le spectre RMN final est ainsi obtenu.

Pour obtenir une image par résonance magnétique, le principe consiste à appliquer un champ magnétique élevé et variable dans l'espace de sorte que la fréquence de résonance change d'un point à l'autre de l'objet pour un même noyau. Avec une onde de fréquence fixe, seule une région entrera en résonance et fournira un signal. En décalant le champ magnétique, une région différente se trouvera en situation de résonance. Ceci permet de sonder une autre zone de l'objet. Le signal magnétique émis par les noyaux juste après la résonance est détecté et un traitement informatique permet de reconstruire une image tridimensionnelle présentée en coupes successives.

b. IRM anatomique

La qualité anatomique des images IRM, malgré une sensibilité intrinsèque très faible, est due à la détection des spins des noyaux d'hydrogène, constituant notamment les molécules d'eau. En

effet, l'eau représente 70 % du corps humain, et le proton ^1H étant à la fois naturellement abondant (99,99 %) et très sensible en RMN, il est relativement simple d'enregistrer le signal. Autrement dit, même si le pouvoir de détection de la RMN est faible, le nombre de molécules émettant un signal est si considérable que l'on peut détecter une image de qualité exceptionnelle (Figure 5).

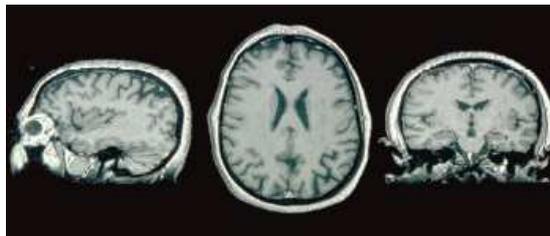


Figure 5: images du cerveau obtenues par IRM anatomique

c. IRM fonctionnelle (IRMf)

L'IRM fonctionnelle révèle l'activité des différentes structures qui composent le cerveau. Cette technique repose sur le principe selon lequel l'afflux de sang oxygéné augmente dans les zones cérébrales activées. Elle consiste à alterner des périodes d'activité avec des périodes de repos, tout en acquérant des images de l'intégralité du cerveau toutes les 1,5 à 6 secondes. La localisation des zones cérébrales activées est basée sur l'effet BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*), lié à l'effet de l'aimantation de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges sur les protons des zones environnantes.

L'hémoglobine se trouve sous deux formes:

- les globules rouges oxygénés par les poumons contiennent de l'oxyhémoglobine (molécule non active en RMN).
- les globules rouges désoxygénés par les tissus contiennent de la désoxyhémoglobine (active en RMN car dotée de propriétés paramagnétiques). En suivant la perturbation du signal de RMN émis par cette molécule, il est donc possible d'observer l'afflux de sang oxygéné qui chasse le sang désoxygéné et ainsi les zones actives (Figure 6)⁵.

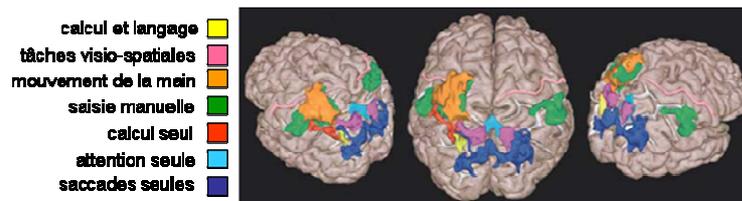


Figure 6: localisation des zones cérébrales activées lors d'une tâche par IRMf

L'IRM est donc aujourd'hui un des outils les plus performants pour le diagnostic en médecine clinique et en recherche biomédicale. Elle permet d'obtenir des images de haute résolution tout en évitant l'utilisation de traceurs radioactifs. Cependant, le principal inconvénient de l'IRM est sa faible sensibilité.

3. Comment augmenter la sensibilité de l'IRM ?

La faible sensibilité de l'IRM est intrinsèque au phénomène de résonance magnétique nucléaire et elle provient de la faible polarisation des spins même en présence d'une forte aimantation.

En effet, l'intensité du signal RMN est directement proportionnelle à la polarisation, qui dépend à son tour de la distribution de spins sur les deux états d'énergie (Équation 1).

$$P = \frac{|N_+ - N_-|}{N_+ + N_-} = \tanh\left(\frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{2 \cdot k_B \cdot T}\right)$$

Équation 1

Pour une particule de spin $I = 1/2$, N_+ et N_- représentent le nombre de spins sur les deux états de spin: $m_I = 1/2$ et $m_I = -1/2$, B_0 le champ magnétique appliqué, γ le rapport gyromagnétique, k_B la constante de Boltzmann et T la température absolue.

A l'équilibre thermodynamique, la différence de population de spins sur les deux niveaux d'énergie est très faible, entraînant par conséquent une polarisation de spin nucléaire P faible. C'est pour cela que les applications IRM sont essentiellement restreintes au proton ^1H (abondance naturelle de 100 % et un rapport gyromagnétique élevé). D'autres atomes, tels que le carbone 13 (^{13}C), l'azote 15 (^{15}N) et le phosphore 31 (^{31}P) sont difficilement utilisables à cause de leur faible rapport gyromagnétique et de leur faible abondance naturelle.

a. Les agents de contraste

Actuellement, des agents de contraste sont introduits chez les patients afin d'augmenter le rapport signal sur bruit de l'IRM. Ils ont pour but d'accélérer les vitesses de relaxation magnétiques $1/T_1$ et $1/T_2$ (ou relaxivité) des protons des molécules d'eau, c'est-à-dire de raccourcir le temps pendant lequel les spins de ces protons regagnent leur état initial après excitation par l'onde de radiofréquence. Il faut noter que ce n'est pas l'agent de contraste qui est visualisé en IRM mais son influence sur la relaxation des protons de l'eau située autour de l'agent de contraste.

Ils se divisent en deux catégories:

- **Agents de contraste positif**

Il s'agit principalement de molécules paramagnétiques, composées d'ions métalliques possédant un grand nombre d'électrons non appariés, tels que Mn^{2+} (5 électrons célibataires) et Gd^{3+} (7 électrons célibataires). Ces agents de contraste ont principalement pour effet de diminuer le temps de relaxation longitudinal T1, entraînant une augmentation de l'intensité du signal IRM.

- **Agents de contraste négatif**

Ces agents de contraste ont pour effet principal de diminuer le temps de relaxation transversale T2 des protons de l'eau et génèrent ainsi un contraste négatif en diminuant l'intensité du signal IRM. Il s'agit principalement de matériaux super paramagnétiques tels que les oxydes de fer super paramagnétiques.

i. Agents de contraste à base de gadolinium

Avec ses 7 électrons libres sur sa couche 4f, l'ion lanthanide Gd^{3+} (numéro atomique 64, masse atomique = $157,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) est de loin l'ion paramagnétique le plus utilisé pour l'IRM. Cependant, de par sa forte toxicité le gadolinium ne peut pas être administré directement. En effet, il entre en compétition avec le calcium dans les processus calcium-dépendants du corps humain (respiration, battements du cœur, contraction des muscles, coagulation...) ⁸. Pour masquer sa toxicité, il est utilisé en présence d'agents chélatants. Il existe à ce jour huit agents de contraste à base de gadolinium approuvés cliniquement (Figure 7).

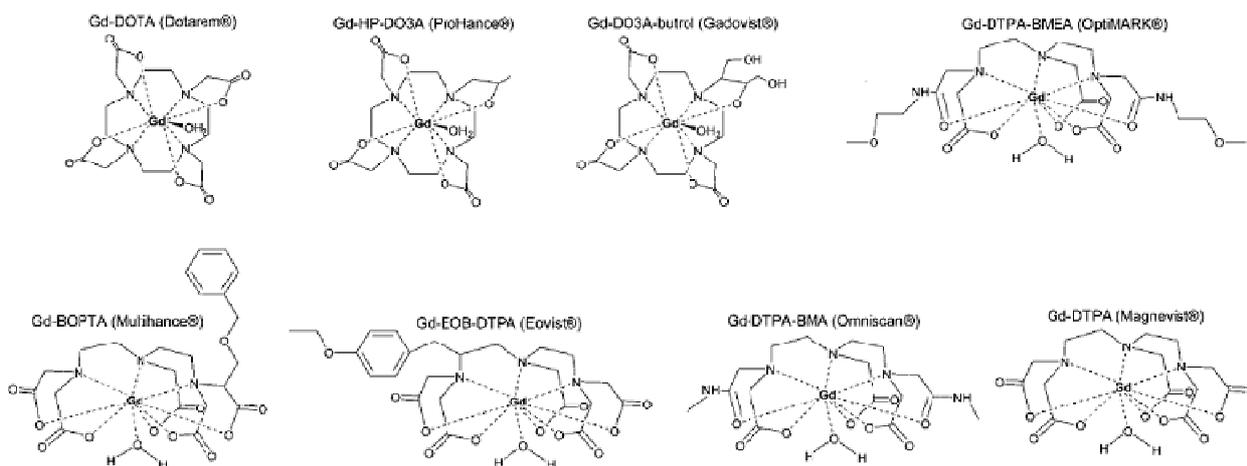


Figure 7: agents de contraste commerciaux à base de gadolinium ⁹

⁸ J.L. Barnhart, N. Kuhnert, D.A. Bakan, R.N. Berk, *Magn. Reson. Imag.*, **1987**, 5, 221

⁹ A. J. L. Villaraza, A. Bumb, M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2921

L'augmentation de la relaxivité des protons de l'eau en présence d'ions paramagnétiques peut être divisée en deux contributions (Figure 8)^{9,10} :

- La relaxivité de sphère externe due à des interactions à longue portée avec les protons des molécules d'eau libres ; la diffusion des molécules d'eau au voisinage du complexe cause des fluctuations du champ magnétique local ressenti par les protons.
- La relaxivité de sphère interne due à des interactions à courte portée avec les protons de molécules d'eau directement coordonnées au métal. Lorsqu'une ou plusieurs molécules d'eau sont coordonnées au métal, la contribution dominante est en général la relaxivité de sphère interne.

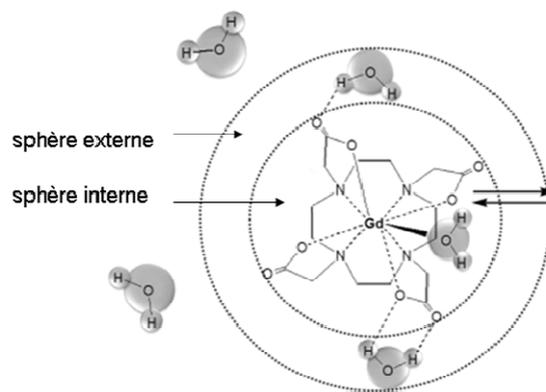


Figure 8: différentes sphères de relaxivité de l'eau⁹

D'autre part, le contraste local peut être augmenté en augmentant la concentration locale en lanthanides au moyen de structures organisées telles que des micelles ou des liposomes.

ii. Les nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques¹¹

Comme nous l'avons vu précédemment, les nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques sont des agents de contraste négatifs. L'appellation "superparamagnétique" est due à la présence de multi-domaines magnétiques individuels au sein des cristaux d'oxyde de fer. Lorsqu'un champ magnétique leur est appliqué, tous ces micro-domaines s'orientent parallèlement à ce dernier créant ainsi une très forte aimantation au sein de la particule (Figure 9). Cette forte aimantation va permettre d'augmenter la relaxivité des protons de l'eau d'un facteur 10.

¹⁰ M. Bottrill, L. Kwok, N. J. Long, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 557

¹¹ S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064.

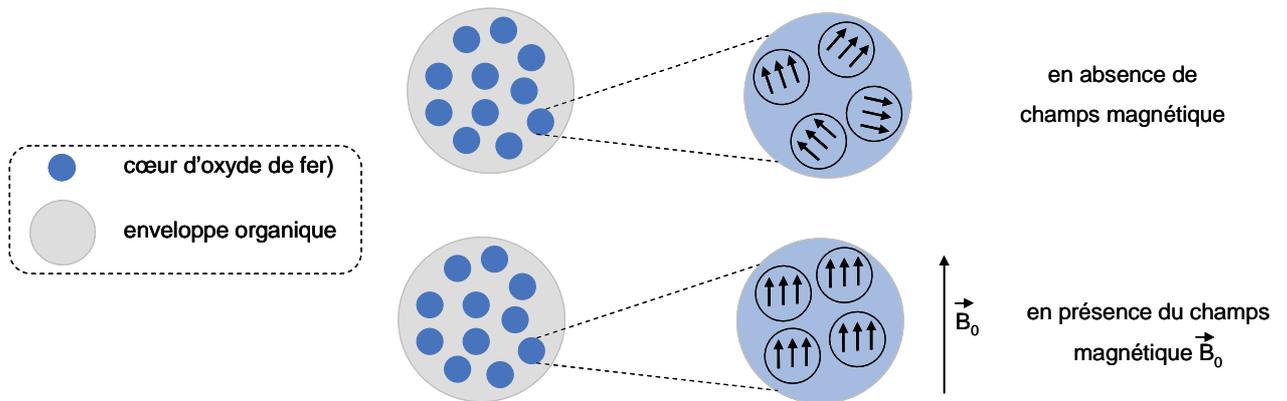


Figure 9: aimantation des nanoparticules d'oxyde de fer en présence d'un champ magnétique

Les particules d'oxyde de fer en solution à pH neutre ou acide ont tendance à s'agréger. Afin d'éviter l'agrégation et d'augmenter la biocompatibilité entre les particules et les cellules, les noyaux d'oxydes de fer sont recouverts de molécules diverses (dextran, PEG, alginate, bisphosphonates...) apportant une stabilité aux agents de contraste et améliorant l'affinité de ces composés pour les structures biologiques. Grâce à des modifications chimiques, elles peuvent également être spécifiques d'une cible biologique.

Deux classes de particules super paramagnétiques se distinguent en fonction de la taille hydrodynamique du noyau d'oxyde de fer:

- SPIOs (*Super Paramagnetic Iron Oxides*) de taille comprise entre 50 et 3 500 nm. Ces nanoparticules d'oxyde de fer sont captées par les macrophages du foie et sont généralement utilisées en imagerie hépatique (détection des lésions hépatiques de petite taille).
- USPIOs (*Ultrasmall Super Paramagnetic Iron Oxides*) de petite taille (< 50 nm.) Elles sont captées par d'autres cellules phagocytaires, notamment des ganglions (lympho-IRM).

Il existe aujourd'hui de nombreux agents de contraste commerciaux à base de nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétique (Tableau 1).

Nom	taille des particules	classification	recouvrement	application
Endorem®	150 nm	SPIO	dextran	foie
Cliavist®	60 nm	SPIO	carboxydextran	foie
Sinerem®	30	USPIO	dextran	ganglions

Tableau 1: exemples d'agents de contraste superparamagnétiques commerciaux⁹

Il existe donc à ce jour, deux systèmes d'agent de contraste couramment utilisés en milieu hospitalier: les complexes de gadolinium et les nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques. Ils sont utilisés en général à des concentrations de l'ordre de 0,5 à 2 mM et ils permettent d'augmenter la sensibilité de l'IRM en jouant sur le temps de relaxation des protons de l'eau. Cependant, malgré leur utilisation, l'IRM reste trop peu sensible pour pouvoir faire de l'imagerie à l'échelle moléculaire. Pour pallier ce problème, de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées à l'utilisation d'atomes facilement polarisables tels que le xénon 129 (^{129}Xe), le carbone 13 (^{13}C), le krypton 83 (^{83}Kr) ou encore l'hélium 3 (^3He).

b. Les espèces hyperpolarisées

Comme nous l'avons vu précédemment dans l'Équation 1, l'intensité du signal IRM est proportionnelle à la polarisation. Depuis quelques années, de nombreux scientifiques ont cherché à modifier artificiellement la distribution de population de spin sur les deux états d'énergie afin d'augmenter la polarisation P et, de ce fait, la sensibilité du signal IRM (Figure 10):

- à l'équilibre thermodynamique, la différence de population de spins est faible.
- à l'état d'hyperpolarisation, la différence de population de spins est fortement augmentée.

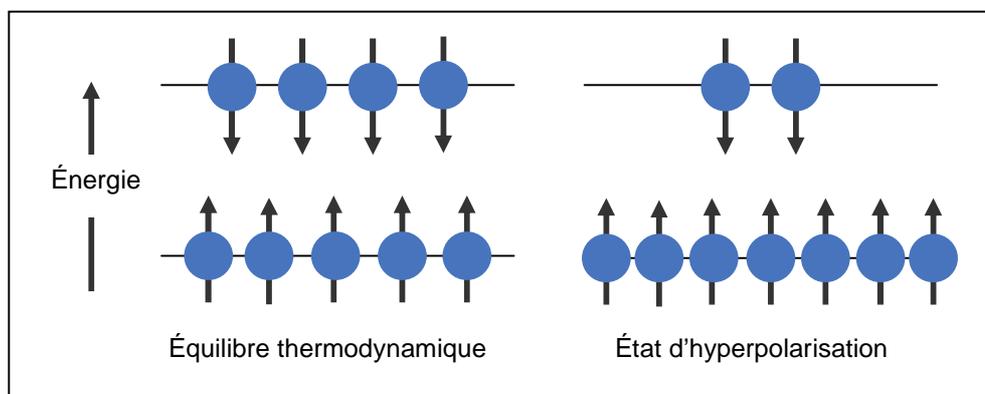


Figure 10: états d'équilibre et d'hyperpolarisation du spin

Cette méthode permet de faire de l'IRM d'atomes autres que le proton. Les isotopes utilisés actuellement dans le domaine de la recherche biomédicale sont ^3He , ^{129}Xe , ^{13}C et ^{15}N . Le choix de ces isotopes stables est conditionné essentiellement par la possibilité d'obtenir des temps de relaxation longitudinaux supérieurs à la durée de la procédure de polarisation.

i. Les différentes méthodes d'hyperpolarisation

Il existe principalement trois méthodes d'hyperpolarisation connues:

- **Polarisation dynamique nucléaire (PDN)**

C'est la méthode d'hyperpolarisation la plus utilisée à ce jour et elle permet, en principe, l'hyperpolarisation de n'importe quel noyau au sein d'une molécule. Elle consiste à transférer la polarisation d'électrons célibataires aux spins nucléaires. Jusqu'ici, la polarisation dynamique nucléaire a par exemple permis la polarisation de ^{15}N dans l'urée et de ^{89}Y dans les chélates d'yttrium(III). Cependant, seul le ^{13}C polarisé a pu être utilisé en applications IRM *in vivo*, dû notamment à sa meilleure sensibilité^{12,13}.

- **Polarisation induite par du para-hydrogène (PHIP)¹⁴**

Cette technique fait intervenir une réaction chimique en phase liquide ou en phase gaz au cours de laquelle le para-hydrogène (spins nucléaires anti-parallèles) polarisé est transféré à la molécule d'intérêt par hydrogénation. Suite à cette réaction, les deux protons transférés deviennent magnétiquement non équivalents et possèdent alors une nette polarisation pouvant être transmise aux noyaux voisins par couplage scalaire (interaction spin-spin). Malgré l'efficacité de cette méthode, ses inconvénients majeurs résident en la modification chimique du produit que l'on veut étudier et par conséquent, un choix limité de molécules à hyperpolariser.

Récemment, une avancée significative a permis de pallier ce problème grâce à l'utilisation d'une nouvelle technique dite SABRE (*Signal Amplification by Reversible Exchange*)¹⁵. Celle-ci utilise un catalyseur qui réalise l'échange entre les atomes d'hydrogène labiles de la molécule d'intérêt avec ceux du para-hydrogène. Cette technique d'échange permet donc l'obtention de molécules hyperpolarisées de manière réversible, sans modification de la structure.

- **Polarisation par pompage optique**

Cette technique est appliquée aux gaz rares tels que ^3He et ^{129}Xe et fera l'objet de la partie A. II. 2.

¹² J. Wolber, F. Ellner, B. Fridlund, A. Gram, H. Jóhannesson, G. Hansson, L.H. Hansson, M.H. Lerche, S. Mansson, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, J.H. Ardenkjaer-Larsen, *Nucl. Instrum. Methods A*, **2004**, 526, 173

¹³ E. Terreno, D. Delli Castelli, A. Viale, S. Aime, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 3019

¹⁴ R. Eisenberg, *Acc. Chem. Res.*, **1991**, 24, 110; C. R. Bowers, D. P. Weitekamp, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 5541; J. Natterer, J. Bargon, *Prog. Nuc. Mag. Res.*, **1997**, 31, 29; D. Blazina. et al., *Dalton Trans.*, **2004**, 17, 2601

¹⁵ R. W. Adams et al., *Science*, **2009**, 323, 1708; K. D. Atkinson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 13362

ii. Exemple d'application en IRM ^{13}C hyperpolarisé

L'IRM ^{13}C fait l'objet de nombreuses applications tel que la détection *in vivo* de métabolites à l'aide de pyruvate, de lactate et d'alanine marqués au ^{13}C hyperpolarisé par PDN.^{16, 17}

Le pyruvate est une molécule clé dans le processus métabolique des cellules en se transformant en alanine, lactate ou carbonate suivant l'état de la cellule. Ainsi, après injection de pyruvate marqué au ^{13}C hyperpolarisé, on peut établir une carte de la distribution spatiale du pyruvate et de ses métabolites au sein d'une tumeur P22 d'un rat par IRM ^{13}C . L'IRM ^{13}C montre une forte production de lactate et une diminution de la concentration d'alanine dans les tissus tumoraux. L'alanine se retrouve principalement dans le muscle (Figure 11).

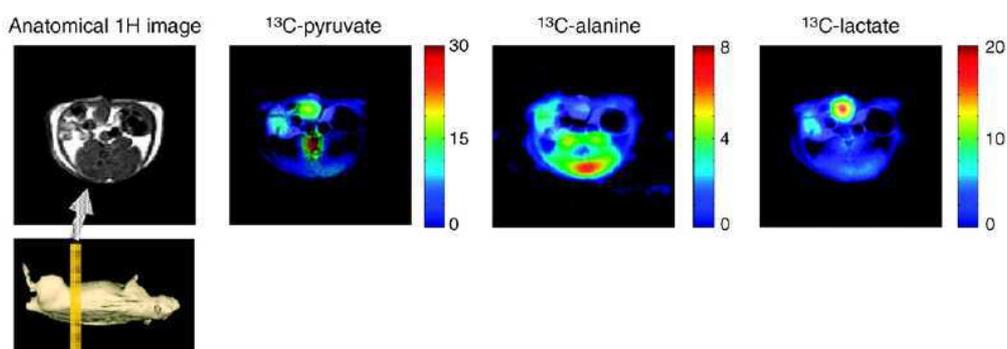


Figure 11: distribution de ^{13}C -pyruvate et de ses métabolites ^{13}C -alanine et ^{13}C -lactate après administration de pyruvate¹⁶

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à une autre espèce hyperpolarisée, le xénon 129.

II. LE XÉNON HYPERPOLARISÉ ET SES SYSTÈMES HÔTES

1. Généralités sur le xénon

Le xénon, du grec *xenos* (étranger), est un gaz rare, découvert en 1898 par Ramsay et Travers, par analyse spectrale des résidus de l'air. C'est un gaz inodore, incolore, sans saveur, chimiquement inerte et quatre fois plus dense que l'air.

Il est déjà connu dans le milieu médical pour différentes applications:

¹⁶ K. Golman, R. Zandt, M. Lerche, R. Perhson, H. Ardenkjaer-Larsen, *Cancer Res.*, **2006**, 66, 10855

¹⁷ A. Viale, S. Aime, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 14, 1

- Scintigraphie du poumon avec l'isotope radioactif émetteur gamma xénon ^{133}Xe ¹⁸

- Anesthésiant

Ses propriétés anesthésiques sont connues depuis plus de 50 ans: Cullen, en 1951, réalisait les premières anesthésies au xénon chez l'homme¹⁹. Comme la kétamine et le protoxyde d'azote (N_2O), le xénon inhibe les récepteurs glutamatergiques *N*-méthyl-D-aspartate ou NMDA (principaux récepteurs post-synaptiques au glutamate, qui est le principal neurotransmetteur excitateur chez l'homme)²⁰.

- Applications en RMN et IRM

Le xénon possède deux isotopes actifs en RMN: le xénon 129 de spin 1/2 et le xénon 131 de spin 3/2. Ces deux isotopes possèdent des abondances naturelles respectives de 26,44 % et 21,24 % et peuvent être polarisés. Le xénon 129 possédant un temps de relaxation bien plus long que le xénon 131, il reste le meilleur candidat pour des applications RMN. Dans les années 1990, les premières images de poumons humains au xénon 129 hyperpolarisé sont obtenues (Figure 12)^{21,22}.



Figure 12: (a–c) IRM *in vivo* de la cage thoracique après respiration d'un mélange de gaz contenant du ^{129}Xe hyperpolarisé (a) En gris, IRM ^1H anatomique (b) Superposition des images obtenues en IRM ^1H et ^{129}Xe où en rouge est représenté l'espace du xénon dans les poumons (c) En rouge, IRM ^{129}Xe ²².

¹⁸ K. Kawakami, *Ann. Nucl. Med.*, **1997**, *11*, 67

¹⁹ S. Cullen, E. Gross, *Science*, **1951**, *113*, 580

²⁰ R. Dickinson, B. Peterson, P. Banks, C. Simillis, JCS. Martin, C. Valenzuela, M. Maze, N. Franks, *Anesthesiology*, **2007**, *107*, 756

²¹ M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer. B. Saam, C. S. Springer, Jr, A. Wishnia, *Nature*, **1994**, *370*, 199

²² J. P. Mugler III, B. Driehuys, J. R. Brookeman, G. D. Cates, S. S. Berr, R. G. Bryant, T. M. Daniel, E. E. del Lange, J. H. Downs III, C. J. Erickson, W. Happer, D. P. Hinton, N. F. Kassel, T. Maier, C. D. Phillips, B. T. Saam, K. L. Sauer, M. E. Wagshul, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, *37*, 809

2. Méthode d'hyperpolarisation par pompage optique

A. Kastler a présenté le principe de pompage optique pour la première fois en 1950²³. Ce dernier consiste à modifier la distribution de population de spin sur les deux états d'énergie au moyen d'une irradiation des atomes par une lumière polarisée et en présence d'un champ magnétique. Une fois le régime stationnaire atteint, une forte augmentation de la polarisation électronique est obtenue. En 1959, l'équipe de M. Bouchiat a montré que des atomes alcalins dont la polarisation électronique était ainsi augmentée pouvaient transférer leur polarisation au spin nucléaire d'un gaz noble en contact direct, en phase gazeuse²⁴.

L'hyperpolarisation du spin nucléaire du ^{129}Xe est ainsi obtenue par pompage optique du rubidium (Rb) suivi du transfert de la polarisation de l'électron au spin nucléaire du xénon. Il s'agit donc d'un processus en deux étapes distinctes:

- Pompage optique d'une espèce alcaline^{25, 26}

Une cellule contenant un mélange de vapeur de rubidium, d'azote et de xénon préalablement chauffée à 100 °C est éclairée par un laser à 794 nm. Dans ces conditions et en présence d'un champ magnétique, la seule transition électronique permise concerne le rubidium (Figure 13). Elle correspond à la transition entre les niveaux de spin électronique $-1/2$ et le premier état excité de spin $+1/2$. Des collisions successives entre atomes de rubidium permettent d'égaliser les populations des états excités et ce dernier se désexcite pour retourner à l'état fondamental. Cependant, la vitesse d'excitation du spin électronique étant supérieure à la vitesse de relaxation électronique, on obtient une forte concentration de rubidium à l'état de spin électronique $+1/2$.

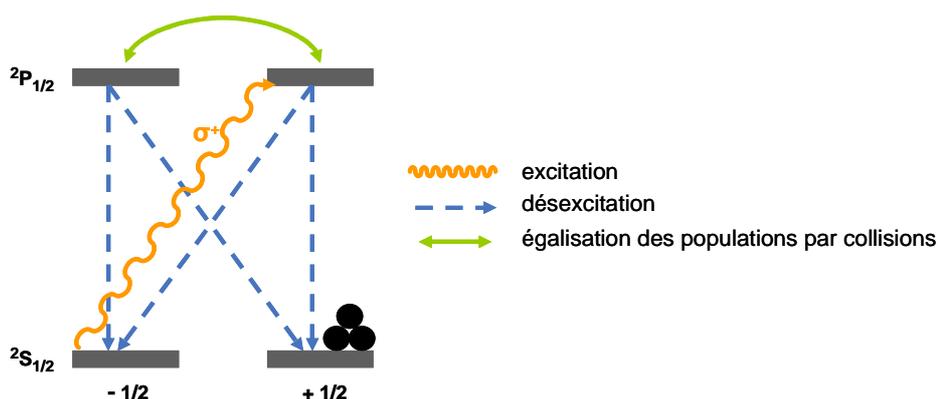


Figure 13: polarisation électronique du rubidium

²³ A. J. Kastler, *Phys. Radium*, **1950**, 11, 225

²⁴ M. A. Bouchiat, T. R. Carver, C. M. Varnum, *Phys. Rev. Lett.*, **1960**, 5, 373

²⁵ B. M. Goodson, *Journal of Magnetic Resonance*, **2002**, 155, 157

²⁶ P. Berthault, G. Hubert, H. Desvaux, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2009**, 55, 35

- Polarisation d'un spin nucléaire par échange de spins

La seconde étape fait intervenir de multiples collisions entre le rubidium et le xénon en phase gazeuse qui donnent lieu à un couplage dipolaire entre le spin électronique du métal et le spin nucléaire du gaz (Figure 14). On obtient ainsi en un temps très court, une importante concentration de xénon fortement polarisé, la relaxation nucléaire de ce dernier étant vraiment minime.

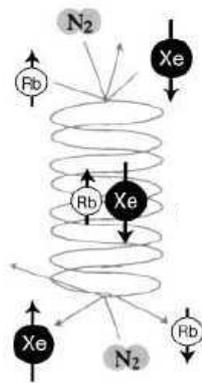
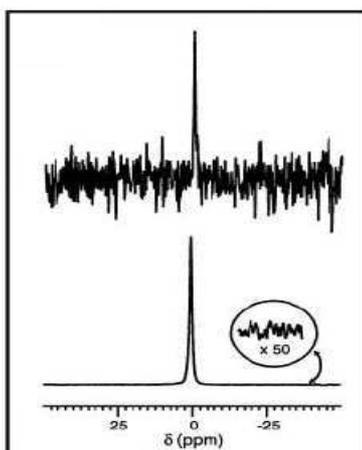


Figure 14: transfert de polarisation entre le rubidium et le xénon

Le xénon hyperpolarisé est ensuite séparé par condensation et peut être utilisé dans les expériences de RMN. Cette hyperpolarisation du xénon se traduit alors par une différence de population entre deux états d'énergie (Figure 10) et par une forte augmentation de la sensibilité du signal RMN de l'ordre de 10^4 à 10^5 fois plus intense (Figure 15).



Pour un même échantillon :

Spectre RMN ^{129}Xe classique obtenu en 1 scan

Spectre RMN ^{129}Xe hyperpolarisé obtenu en 1 scan

Figure 15: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé (en bas) et non hyperpolarisé (en haut) (7 T, 293 K)²⁵

3. Biosondes pour l'IRM ^{129}Xe hyperpolarisé

a. Principe de la biosonde

La grande sensibilité du nuage électronique du xénon à son environnement immédiat lui confère des propriétés remarquables de sonde locale: il présente une large gamme de fréquence de résonance en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve²⁷ (Figure 16).

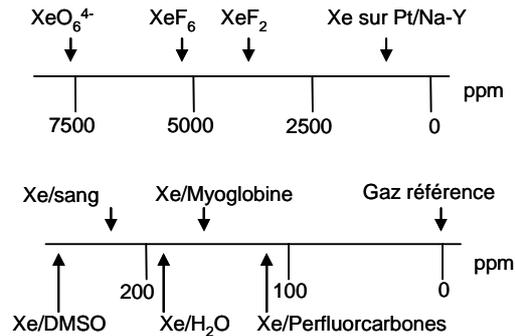


Figure 16: déplacement chimique du xénon dans différents environnements

D'autre part, le xénon ne possède pas de spécificité particulière pour des récepteurs biologiques. La détection de biomolécules d'intérêt pourra alors être réalisée à partir d'une biosonde constituée d'une molécule hôte du xénon qui sera fonctionnalisée par une antenne de reconnaissance de la cible biologique. Le xénon étant très sensible à son environnement, il possèdera un déplacement chimique différent suivant qu'il soit libre, encapsulé dans la biosonde non complexée ou encapsulé dans la biosonde complexée à la cible biologique. Il servira ainsi de signature pour localiser la cellule hôte et de ce fait la cible biologique (Figure 17).

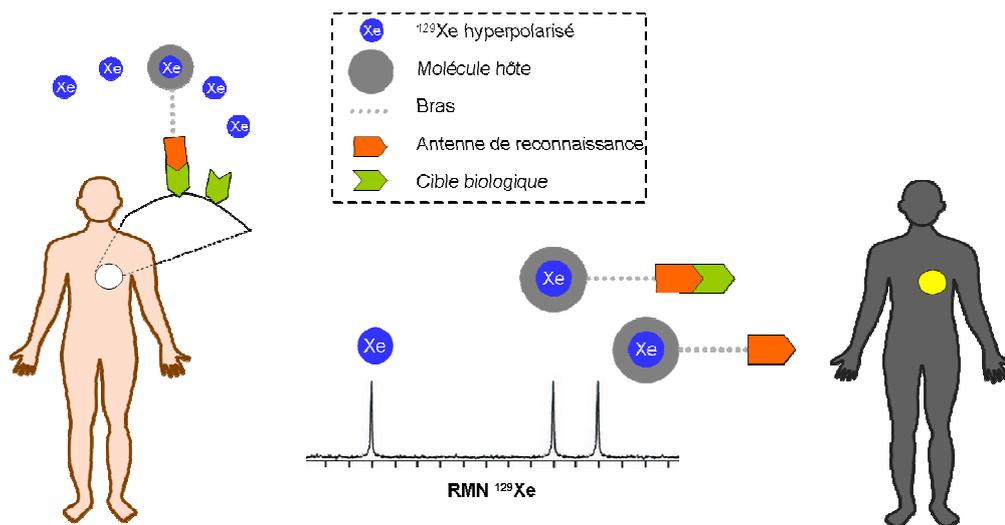


Figure 17: concept d'une biosonde IRM ^{129}Xe hyperpolarisé

²⁷ T. Pietrass, H. C. Gaede, *Adv. Mat.*, **1995**, 7, 826

b. Les systèmes hôtes pour le xénon

i. Les critères de sélection

Les critères requis pour un système hôte du xénon sont les suivants:

- Présenter la meilleure affinité possible pour le xénon. Ce paramètre est déterminé par la constante d'affinité K (M^{-1}), obtenue à partir des spectres RMN ^{129}Xe et ^1H , par ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*)²⁸ ou encore par fluorescence²⁹. Pour la suite, sauf précision, les constantes seront mesurées par RMN.
- Permettre un échange entrée / sortie du xénon dans la cage. Cet échange doit être suffisamment rapide à l'échelle de la dynamique en solution afin de recharger en permanence la molécule cage en xénon hyperpolarisé mais suffisamment lent à l'échelle de la RMN pour permettre de visualiser le phénomène d'encapsulation de ce dernier. Ce paramètre est déterminé par la vitesse d'échange entrée / sortie du xénon. Cette vitesse doit être inférieure à la différence de fréquence de résonance du xénon dans la cage et du xénon libre afin de pouvoir séparer le déplacement chimique du xénon dans la cage de celui du xénon libre.
- Minimiser la relaxation du xénon à l'intérieur de la cage.
- Permettre des différences de déplacement chimique notables entre le xénon en solution, le xénon dans la molécule hôte "seule" et le xénon dans la molécule hôte liée à sa cible biologique.
- Être soluble en milieu aqueux et être facilement adressable pour permettre des applications *in vivo*.

Pour définir la molécule cage répondant le mieux aux critères ci-dessus, on peut également s'intéresser:

- Aux travaux de J. Rebek qui a montré en 1998 l'existence d'un ratio optimal entre la taille de la molécule invitée et la taille de la molécule hôte de $0,55 \pm 0,09$ ³⁰. Le volume de van der Waals du xénon étant de 42 \AA^3 , le volume de la molécule hôte idéale serait de 76 \AA^3 .

²⁸ P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9262

²⁹ P. A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3069

³⁰ S. Mecozzi, J. Rebek Jr., *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 1016

- Au caractère hydrophobe du xénon qui le rend particulièrement sujet aux forces de London, c'est-à-dire aux interactions dipôle induit – dipôle induit. Son interaction avec les atomes d'une molécule hôte est donc source de stabilisation.

Une partie de la chimie supramoléculaire est aujourd'hui consacrée à la conception de ces molécules hôtes pour l'encapsulation de gaz³¹. Concernant le xénon, il existe à ce jour de nombreuses molécules répondant plus ou moins bien aux critères précédents.

ii. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques, issus de la dégradation enzymatique de l'amidon, constitués par l'assemblage de 6 à 12 motifs de glucose reliés par des liaisons α -1,4 (Figure 18).

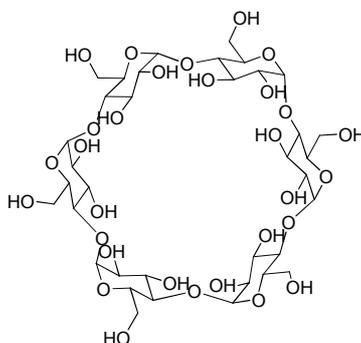


Figure 18: structure d' α -cyclodextrine

La cavité de la plus petite cyclodextrine (α -cyclodextrine, composé de 6 unités de glucose reliés en α -1,4) possède un volume compris entre 140 et 170 \AA^3 . Même s'il a été démontré que le xénon rentre bien dans la cage, le grand volume de sa cavité entraîne une vitesse d'entrée et de sortie du xénon dans la cage beaucoup trop rapide. D'autre part sa faible constante d'affinité pour le xénon d'environ 20 M^{-1} à 298 K limite son utilisation en tant que biosonde³².

iii. Les calixarènes

Les calixarènes sont des macrocycles formés de n unités phénoliques ($n = 4 - 20$) reliées entre elles par des ponts méthyléniques au niveau des positions *ortho* de la fonction hydroxyle. Ces macrocycles sont obtenus par condensation du phénol avec le formaldéhyde en milieu basique. Ils présentent une région hydrophile au niveau des groupements hydroxyle et une cavité

³¹ D.M. Rudkevich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 558

³² K. Bartik, M. Luhmer, S.J. Heyes, R. Ottinger, J. Reisse, *J. Magn. Reson. B*, **1995**, 109, 164

hydrophobe entre les noyaux benzéniques (Figure 19 - A). Cependant, comme les cyclodextrines, la vitesse d'entrée et de sortie du xénon dans la cage est beaucoup trop rapide. De plus la constante d'affinité pour le xénon est généralement trop faible. C'est le cas du calix[4]arène hydrosoluble STCAS (*4-sulfothiocalix[4]arene sodium salt*) qui présente une constante d'affinité d'environ 14 M^{-1} à 298 K dans l'eau (Figure 19 - B)³³.

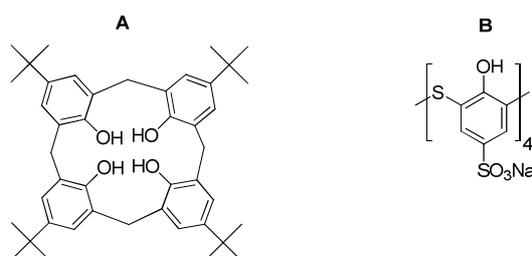


Figure 19: (A) calix[4]arène avec des substituants *para-tert*-butyle, (B) structure du STCAS

iv. Les hémicarcérands

À la différence des carcérands qui encapsulent une molécule sans qu'elle puisse ressortir même à très haute température, les hémicarcérands sont des molécules hôtes permettant l'entrée et la sortie d'une autre molécule à haute température mais formant un complexe plus ou moins solide à TA. Ils possèdent une vitesse d'échange suffisamment lente à l'échelle du déplacement chimique du xénon pour pouvoir être des systèmes hôtes prometteurs pour le xénon. C'est le cas, par exemple, de l'hémicarcérand obtenu par J. Cram en 1991, constitué de deux tétramères aromatiques reliés par une chaîne pontante. Cette molécule possède une constante d'affinité pour le xénon d'environ 200 M^{-1} dans le chloroforme à 22°C (Figure 20)³⁴.

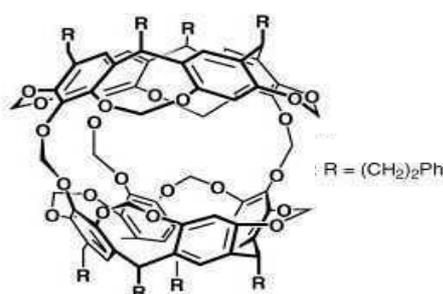


Figure 20: hémicarcérand encapsulant le xénon

³³ J. Fukotomi, Y. Adachi, A. Kaneko, A. Kimura, H. Fujiwara, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2007**, 58, 115

³⁴ D. J. Cram, M. E. Tanner, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7717

v. Les cucurbiturils

Les cucurbiturils sont obtenus par réaction du glycoluril avec le formaldéhyde en milieu acide. Leur structure générale est présentée dans la Figure 21 - A. La famille des cucurbit[n]uril (CB[n]) comprend des molécules de tailles différentes ($n = 5, 6, 7, 8$ et 10) dont le volume des cavités varie de 82 à 870 \AA^3 . D'après les travaux de J. Rebek³⁰, le plus petit cucurbituril, CB[5], semble être le mieux adapté pour l'encapsulation du xénon. Cependant la rigidité de la molécule ainsi que le portail d'entrée défini par les oxygènes des groupements carbonyles, ne sont pas favorables à l'encapsulation du xénon³⁵. Le CB[6] est le plus adapté en terme de biosonde pour l'IRM ^{129}Xe . Il possède une constante d'affinité d'environ 200 M^{-1} en milieu acide à 298 K ³⁶.

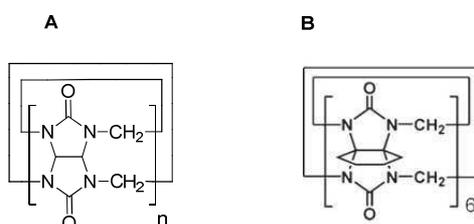


Figure 21: (A) structure générale des cucurbit[n]urils, (B) structure du CB*[6]

Récemment, le groupe de K. Kim a synthétisé un cucurbituril hydrosoluble CB*[6] possédant une constante d'affinité pour le xénon de 3000 M^{-1} mesurée par ITC (Figure 21 - B)³⁷. Ce résultat très encourageant permet ainsi d'envisager l'utilisation de certains cucurbiturils en tant que biosonde pour IRM ^{129}Xe .

vi. Les cryptophanes

Les cryptophanes ont été découverts en 1981 par le groupe d'A. Collet¹ et sont constitués de deux unités de dérivés de cyclotrivératrylène (CTV) reliées entre elles par des ponts alkylédioxy (Figure 22). La structure peut varier suivant la longueur des ponts (m et n) et selon les groupements R_1 et R_2 des cycles aromatiques. Leur cavité hydrophobe permet l'encapsulation de petites molécules neutres telles que le xénon. Ils présentent, à ce jour, les meilleures constantes d'affinité pour le xénon pouvant aller jusqu'à $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour le cryptophane-111 hydrosoluble [2]Cl₆ (Figure 22)³⁸.

³⁵ Y. Miyahara, K. Abe, T. Inazu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 3020

³⁶ M. El Haouaj, M. Luhmer, Y. Ho Ko, K. Kim, K. Bartik, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2001**, *2*, 804

³⁷ B.S. Kim, Y.H. Ko, Y. Kim, H.J. Lee, N. Selvapalam, H.C. Lee, K. Kim, *Chem Commun*, **2008**, 2756

³⁸ R. M. Fairchild, A. I. Joseph, K. Travis Holman, H. A. Fogarty, T. Brotin, J.-P. Dutasta, C. Boutin, G. Huber, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 15505

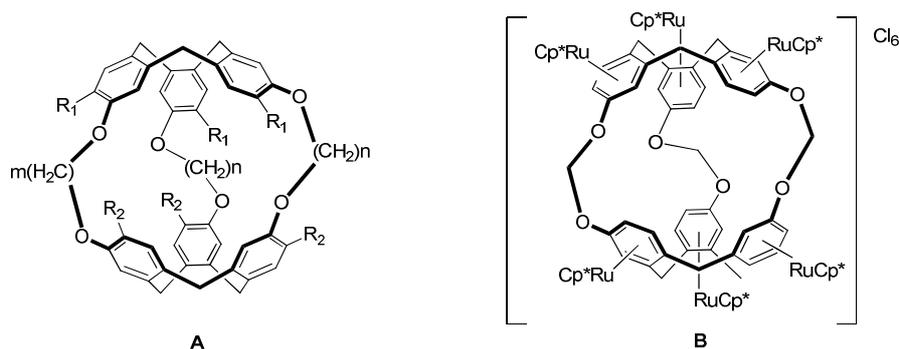


Figure 22: (A) structure générale des cryptophanes (cryptophane-111: $R_1 = R_2 = H$, $n = m = 1$; cryptophane-A: $R_1 = R_2 = OCH_3$, $n = m = 2$); (B) structure du cryptophane-111 hydrosoluble fonctionnalisé avec 6 $[(\eta^5-C_5Me_5)Ru]^{II+}$ ($[Cp^*Ru]^{+}$)³⁸

Ces cryptophanes sont donc de très bons candidats pour des biosondes d'IRM ^{129}Xe . Non fonctionnalisés, ils sont naturellement hydrophobes de par la présence de noyaux aromatiques et sont généralement étudiés dans des solvants organiques halogénés. Des modifications chimiques permettent de rendre les cryptophanes hydrosolubles en vue de futures applications biologiques. La communauté scientifique s'intéresse aujourd'hui à synthétiser des cryptophanes les mieux adaptés, en terme de taille et de fonctionnalisation, pour une encapsulation optimale du xénon. Cette encapsulation va dépendre de la constante d'affinité du cryptophane pour le gaz, de la vitesse d'échange entrée/sortie du xénon dans la cage et de la relaxation du xénon dans le cryptophane.

- L'affinité pour le xénon

Entrée	n, m	$R_1 = R_2$	Volume de la cavité (\AA^3)	$V(Xe)/V(\text{crypto})$	$K(M^{-1})$	
1	1, 1	H	81	0,52	10 000 ^{ab}	} organosolubles
2	2, 2	OCH_3	95	0,44	3000 ^a	
3	2, 3	OCH_3	102	0,41	2800 ^a	
4	2, 4	OCH_3	110	0,38	9,5 ^a	
5	3, 2	OCH_3	117	0,36	810 ^a	
6	3, 3	OCH_3	121	0,35	5-10 ^a	
7	1, 1	$H + 6[Cp^*Ru]^{+}$	81	0,52	29 000 ^b	} hydrosolubles
8	2, 2	OCH_2COOH	95	0,44	6800 ^b	
9	2, 3	OCH_2COOH	102	0,41	2200 ^b	
10	3, 2	OCH_2COOH	117	0,36	2200 ^b	
11	3, 3	OCH_2COOH	121	0,35	1000 ^b	

Tableau 2: constantes d'affinité de différents cryptophanes pour le xénon et volume interne de la cavité estimé à partir de GRASP³⁹. (ab) mesurées à 293 K dans $C_2D_2Cl_4$. (a) mesurées à 278 K dans 1,1,1,2-tétrachloroéthane- d_2 ($C_2D_2Cl_4$). (b) mesurées à 293 K dans D_2O ²⁶.

³⁹ A. Nicholls, B. Sharp, B. Honig, *Proteins*, **1991**, 11, 281

Si on s'intéresse au ratio entre le volume du xénon et le volume de la cavité, on constate qu'il se rapproche du ratio optimal de 0,55 prédit par Rebek³⁰ pour le cryptophane-111, plus petit cryptophane synthétisé à ce jour³ (Tableau 2 - entrée 1). Ce cryptophane présente la plus grande constante d'affinité pour le xénon soit 10 000 M⁻¹ à 293 K dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane-d₂ (entrée 1) ou bien 29 000 M⁻¹ à 293 K dans D₂O pour le cryptophane-111 hydrosoluble [2]Cl₆ (entrée 7). En effet, la proximité de ses noyaux aromatiques avec le xénon confère au gaz encapsulé une meilleure stabilité.

Pour les cryptophanes organosolubles -222 (cryptophane-A), -322, -332 et -333 (cryptophane-E) avec R₁ = R₂ = OCH₃ (entrées 2, 3, 5, 6), seule la longueur des ponts alkyles reliant les deux CTV changent. Plus la cavité du cryptophane est grande (ponts alkyledioxy longs), moins le xénon est stabilisé et donc moins l'affinité pour le gaz est bonne^{40,41,42}.

Pour les cavités plus grandes, tels que les cryptophanes organosolubles -224 et -333 (entrées 4 et 6), le solvant peut entrer en compétition avec le xénon, ce qui expliquerait leur faible constante d'affinité. Le volume de la cavité du cryptophane-224 ($V = 110 \text{ \AA}^3$) est plus petit que celui du cryptophane-233 ($V = 117 \text{ \AA}^3$) et pourtant sa constante d'affinité est plus faible (entrées 4 et 5). Ceci peut s'expliquer par la grande flexibilité du cryptophane-224 avec son pont butanedioxy.

De plus, la constante d'affinité est plus grande avec des cryptophanes solubles en milieu aqueux (entrées 7, 8, 9, 10, 11) qu'avec des cryptophanes organosolubles (entrées 1, 2, 3, 5, 6). Le xénon étant peu soluble dans l'eau, il préfère l'environnement hydrophobe de la cavité du cryptophane.

- La vitesse d'échange

Comme nous l'avons vu précédemment, la vitesse d'échange du xénon dans la cage doit être suffisamment lente pour pouvoir observer le phénomène d'encapsulation en RMN ¹²⁹Xe c'est-à-dire obtenir différents déplacements chimiques du xénon. Jusqu'à présent, pour tous les cryptophanes étudiés cette différence de déplacement chimique est supérieure à 112 ppm (Tableau 3).

⁴⁰ T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973

⁴¹ G. Huber, L. Beguin, H. Desvaux, T. Brotin, H. Fogarty, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, *112*, 11363

⁴² H. Desvaux, G. Huber, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *Chem. Phys. Chem.*, **2003**, *4*, 384

Cryptophanes	n, m	R ₁ = R ₂	Solvant	δ _{Xe encapsulé} (ppm)	δ _{Xe libre} - δ _{Xe encapsulé} (ppm)
-111	1, 1	H	C ₂ D ₂ Cl ₄	31	193
-[2]Cl ₆	1, 1	H	D ₂ O	308	112
-A	2, 2	OCH ₃	C ₂ D ₂ Cl ₄	63	161
-A3	2, 2	OCH ₂ COOH	D ₂ O	64	132
-E	3, 3	OCH ₃	C ₂ D ₂ Cl ₄	30	194
-E3	3, 3	OCH ₂ COOH	D ₂ O	35	161

Tableau 3: déplacement chimiques du xénon encapsulé dans différents cryptophanes à 293 K^{3,38,43,44,40}. δ_{xénon libre dans D2O} : 196 ppm et δ_{xénon libre dans C2D2Cl4} : 224 ppm.

Cette vitesse d'échange doit également être suffisamment rapide afin de remplir en permanence la cage avec du xénon hyperpolarisé « frais ». La largeur du pic obtenu sur le spectre RMN dépend directement de cette vitesse d'échange: $\Delta v_{1/2} = (\pi \times \tau)^{-1}$ avec τ le temps de résidence du xénon dans le cryptophane et $\Delta v_{1/2}$ la largeur du pic à mi-hauteur. Donc, plus le pic est large et plus la vitesse d'échange sera grande. Par exemple, le cryptophane-111 possède une vitesse d'échange plus lente que celle du cryptophane-A et donc un pic du xénon encapsulé beaucoup plus fin que celui du xénon dans le cryptophane-A (Figure 23).

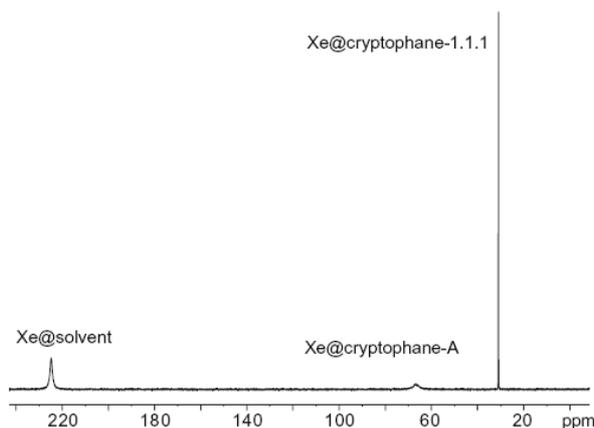


Figure 23: RMN ¹²⁹Xe d'un mélange cryptophane-A (10,2 mM) et cryptophane-111 (8,4 mM) dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane à 293 K²⁶.

⁴³ K. Bartik, M. Luhmer, J.-P. Dutasta, A. Collet, J. Reisse, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 784

⁴⁴ G. Huber, T. Brotin, L. Dubois, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6239

- La relaxation du xénon

La relaxation longitudinale T_1 du xénon est définie dans l'Équation 2:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^{\text{caged}}} \cdot X_{\text{caged}} + \frac{1}{T_1^{\text{free}}} \cdot (1 - X_{\text{caged}})$$

Équation 2: définition de la relaxation longitudinale T_1 du xénon: X_{caged} = fraction de xénon encapsulé, T_1^{caged} = temps de relaxation du xénon dans la cage, T_1^{free} = temps de relaxation du xénon libre

T_1^{free} étant très long (de l'ordre de quelques minutes), on considère que T_1^{caged} est directement proportionnel à T_1 (obtenu expérimentalement) (Équation 3).

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_1^{\text{caged}}} \cdot X_{\text{caged}}$$

Équation 3

Il est très important de travailler avec des T_1^{caged} les plus longs possibles, idéalement de l'ordre de plusieurs dizaines de secondes, afin de conserver le xénon à l'état d'hyperpolarisation le plus longtemps possible et donc de pouvoir observer le phénomène d'encapsulation de ce dernier en RMN. Comme nous l'avons vu précédemment, à l'intérieur de la cage, le xénon est stabilisé dans un environnement aromatique par les forces de London résultants des distances courtes entre le xénon et les protons aromatiques. Par ailleurs, le caractère rigide du CTV augmente le temps de corrélation xénon-proton. La combinaison de ces deux phénomènes tend à diminuer T_1^{caged} .

Les T_1^{caged} du xénon encapsulé dans différents cryptophanes sont présentés dans le Tableau 4:

Entrée	Cryptophanes	n, m	$R_1 = R_2$	Solvant	T_1^{caged} (s)
1	-111	1, 1	H	$C_2D_2Cl_4$	$12,1 \pm 0,7$
2	-222	2, 2	H	$C_2D_2Cl_4$	$3,9 \pm 0,5$ (a)
3	-A	2, 2	OCH ₃	$C_2D_2Cl_4$	$18,8 \pm 5,0$
4	-A3	2, 2	OCH ₂ COOH	D ₂ O	12,1
5	-A3D	2, 2	OCD ₂ COOH (b)	D ₂ O	17,6

Tableau 4: temps de relaxation longitudinale du xénon encapsulé dans différents cryptophanes ($T_1^{\text{encapsulé}}$) à 293 K et $11,7 T^{41}$. (a) valeur de 16 s à 295 K et $9,4 T^{45}$. (b) les ponts éthylènedioxy sont également deutérés.

⁴⁵ M. Luhmer, B.M. Goodson, Y.-Q. Song, D.D. Laws, L. Kaiser, M.C. Cyrier, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3502

Deux paramètres vont jouer sur le temps de relaxation du xénon: les substituants R_1 et R_2 portés par les cycles aromatiques et la longueur des ponts entre les deux unités de CTV (n et m).

Pour les cryptophanes-111 et -222 présentant trois protons sur chaque cycle aromatique ($R_1 = R_2 = H$), le temps de relaxation du xénon encapsulé est plus long lorsque le nombre de protons sur les ponts est petit (2 protons pour le cryptophane-111 comparés à 4 pour le cryptophane-222) (Tableau 4 - entrées 1 et 2). De plus, pour le cryptophane-111 les deux protons du pont $O-CH_2-O$ sont dirigés vers l'extérieur de la cavité, limitant ainsi les interactions avec le xénon et donc sa relaxation⁴¹.

D'autre part on constate que T_1^{caged} diminue lorsque le nombre de protons en positions R_1 et R_2 augmente. En effet, la relaxation du xénon est plus importante avec les protons aromatiques qu'avec ceux des groupements $-OCH_3$ plus éloignés de la cage et donc plus mobiles (Tableau 4 - entrées 2 et 3).

Concernant les deux cryptophanes hydrosolubles, -A3 et -A3D, on remarque que la présence des 24 atomes de deutérium sur les ponts éthylènedioxy et sur les groupements CH_2COOH permet d'augmenter le temps de relaxation T_1^{caged} de quelques secondes et donc de prolonger l'état d'hyperpolarisation du xénon (Tableau 4 - entrées 4 et 5)⁴⁴.

Le cryptophane idéal en termes de relaxation du xénon doit donc avoir le minimum de protons sur les ponts reliant les deux unités CTV et posséder des substituants avec le moins d'atomes d'hydrogène possible sur les aromatiques.

En conclusion, si l'on tient compte de la constante d'affinité et de la vitesse d'échange, les cages les mieux adaptées en milieu organique sont les cryptophanes -111 et -A et celles en milieu aqueux sont les cryptophanes $-[2]Cl_6$ et -A3. D'un point de vue de la relaxation, le cryptophane-111 en milieu organique et -A3D en milieu aqueux permettent de minimiser la dépolarisation du xénon. Ces trois paramètres sont très importants pour avoir la meilleure sensibilité possible en IRM ^{129}Xe et donc un excellent contraste pour de l'imagerie *in vivo*. Aujourd'hui, des équipes de chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'amélioration de la sensibilité en travaillant soit d'un point de vue physique sur des nouvelles techniques d'IRM ^{129}Xe hyperpolarisé, soit d'un point de vue chimique en optimisant la structure et la fonctionnalisation du cryptophane.

c. Vers de l'IRM ^{129}Xe de plus en plus sensible

i. HYPER-CEST

Le concept d'HYPER-CEST (*Hyperpolarized - Chemical Exchange Saturation Transfer*) a été développé par le groupe d'A. Pines en 2006 pour des biosondes à base de cryptophane en RMN ^{129}Xe hyperpolarisé⁴⁶.

Le principe est présenté dans la Figure 24: considérons le xénon dans deux environnements: en solution (**A**) et encapsulé dans le cryptophane (**B**). En appliquant une impulsion longue à la fréquence de résonance de **B**, sa distribution de spins va être altérée jusqu'à arriver à un système dit "de saturation" où la polarisation redevient nulle (Équation 1 page 16) et donc le signal en RMN disparaît. Le xénon hyperpolarisé encapsulé (vert) va alors se dépolariiser (rouge). Le xénon hyperpolarisé libre (bleu) va alors se dépolariiser (rouge).

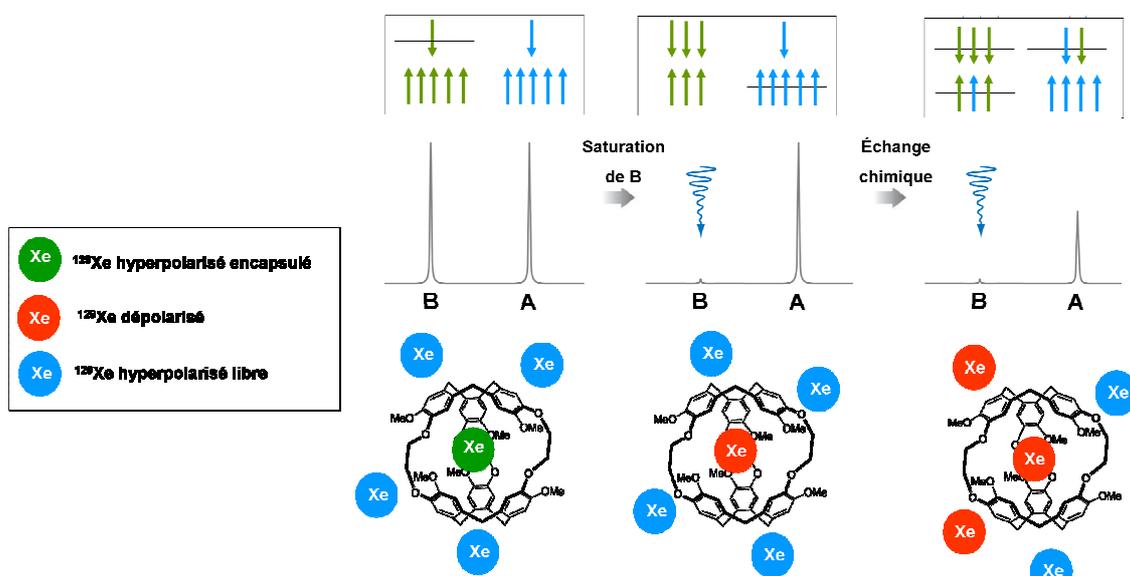


Figure 24: principe de l'HYPER-CEST appliqué aux cryptophanes en RMN ^{129}Xe

D'autre part, le xénon passant rapidement d'un environnement à l'autre, la saturation de **B** va entraîner une diminution du signal de **A**. Ainsi, toute détection d'une diminution du signal de xénon libre après saturation à la fréquence du xénon encapsulé indique la présence du cryptophane.

Cette technique de détection indirecte de la biosonde peut permettre de gagner en sensibilité en s'intéressant non plus au signal du xénon dans la cage, souvent limité par son rapport signal sur

⁴⁶ L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science*, **2006**, 314, 446

bruit, mais à la diminution du signal du xénon libre (**A**) à un temps t , facilement détectable de par sa forte concentration⁴⁷.

Cette équipe a ainsi démontré le potentiel de cette technique en s'intéressant à l'imagerie moléculaire d'une biosonde à base de cryptophane par IRM ^{129}Xe . Pour cela, un tube contenant un lit d'agarose – avidine a été divisé en deux compartiments (Figure 25 - a): seul le compartiment 2 (carré rouge) contient la biosonde (concentration de 5 μM), le compartiment 1 (carré bleu) servant de témoin. Sans phénomène de saturation (Figure 25 - b et e), le signal RMN du xénon libre est d'intensité égale dans les deux compartiments (spectre b) et l'image (e) montre la présence de xénon libre dans tout le tube. Lorsqu'une saturation à la fréquence de résonance du xénon encapsulé est appliquée, le signal du xénon libre décroît dans le compartiment contenant la biosonde alors qu'aucun changement n'apparaît dans le compartiment témoin (spectre c et image f). Une soustraction des signaux obtenus avant et après saturation (spectre d) permet d'obtenir la localisation de la biosonde (image g).

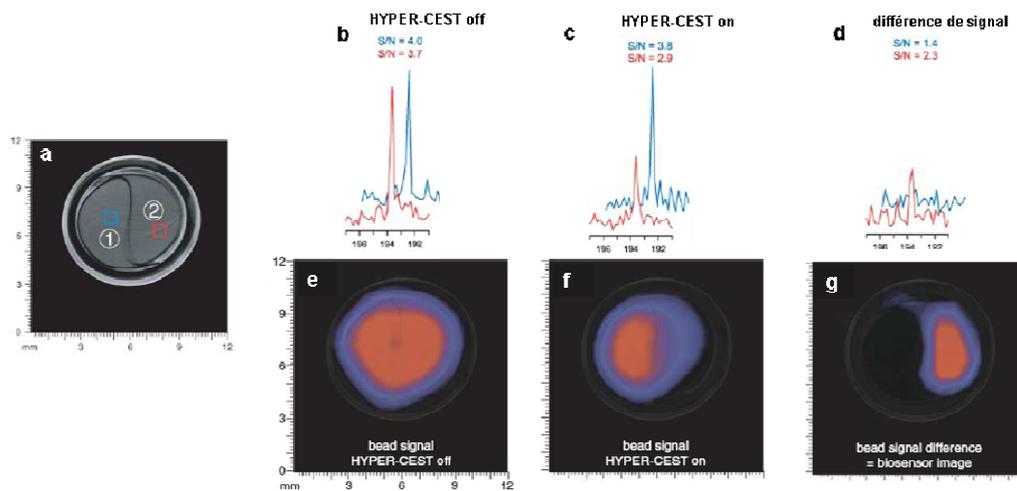


Figure 25: application de la technique d' l'HYPER-CEST

(a) lit d'agarose – avidine séparé en deux compartiments: (1) témoin, (2) avec la biosonde. (b) et (c) spectres RMN ^{129}Xe respectivement sans et avec saturation (en bleu: compartiment 1, en rouge: compartiment 2). (d) spectre RMN ^{129}Xe obtenu après soustraction de (b) et (c). (e) et (f) image IRM ^{129}Xe respectivement sans et avec saturation. (g) image obtenue après soustraction de (f) et (e).

Cette méthode très prometteuse pourrait permettre de descendre à des concentrations en biosonde de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaires, voire même quelques centaines de picomolaires.

⁴⁷ A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, 10, 391

ii. Augmentation de la concentration locale en cryptophanes

En 2006, les groupes d'A. Pines et J-M. Fréchet ont développé une nouvelle chimie supramoléculaire pouvant amplifier le signal RMN ^{129}Xe d'un facteur 8 par rapport à la biosonde d'origine en attachant de manière non covalente entre 3 et 11 cryptophanes sur un dendrimère polyamidoamine (Figure 26 - A et B)⁴⁸.

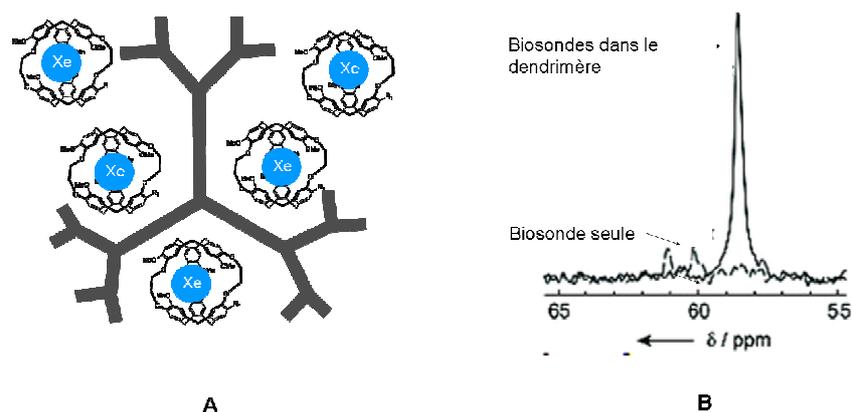


Figure 26: **A-** concentration de cryptophanes sur un dendrimère, **B-** spectres RMN ^{129}Xe de la biosonde seule (30 μM) et de biosondes greffées sur un dendrimère polyamidoamine (concentration en dendrimère 30 μM)

iii. Augmentation de la concentration en cryptophanes + HYPER-CEST

Dans une suite logique, en 2010, l'équipe d'A. Pines s'est intéressée à l'utilisation de la technique d'HYPER-CEST optimisée sur des capsides virales MS2 (enveloppe ou coque protéique d'un virus qui entoure l'acide nucléique) pouvant contenir jusqu'à 125 cryptophanes⁴⁹. Ce résultat a permis de détecter les plus faibles concentrations en biosonde jamais mesurées, de l'ordre de 0,7 pM. Il s'agit donc d'une très grande avancée dans le domaine des biosondes pour l'IRM ^{129}Xe . D'autre part, en plus d'augmenter considérablement la sensibilité du signal RMN, l'incorporation de nombreuses molécules hôtes au sein de la capsid virale permet également d'améliorer la solubilité et la biocompatibilité des cryptophanes au sein de l'organisme.

Nous venons de voir, dans cette première partie, l'avenir prometteur des cryptophanes en tant que biosondes pour l'IRM ^{129}Xe hyperpolarisé. Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse de ces molécules et à leurs applications.

⁴⁸ J. L. Mynar, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6334

⁴⁹ T. Meldrum, K. L. Seim, V. S. Bajaj, K. K. Palaniappan, W. Wu, M. B. Francis, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 5936

III. LES CRYPTOPHANES, STRUCTURE, SYNTHÈSE ET APPLICATIONS

1. Les grandes avancées dans l'histoire des cryptophanes

Dans les années 80, l'équipe d'A. Collet au Collège de France s'est intéressée à la synthèse et aux propriétés d'encapsulation de molécules originales: les cryptophanes. Après la première synthèse du cryptophane-A ((D3)-Bis(cyclotrivératrylenyl)) en 1981¹, de nouvelles méthodes ont été mises au point et ont permis l'obtention de toute une série de cryptophanes, dont les premiers cryptophanes hydrosolubles⁵⁰. Ces derniers ont été synthétisés en 1987 et trouvent encore aujourd'hui des applications très intéressantes^{51, 52}. Parmi les résultats les plus importants de l'équipe fondatrice des cryptophanes, on peut citer l'observation grâce à la RMN ¹H des phénomènes de complexation de l'acétylcholine avec le cryptophane-O hydrosoluble⁵³ et d'encapsulation du méthane dans le cryptophane-A en 1993⁵⁴. En 1998, elle s'est également intéressée à l'étude d'encapsulation du xénon dans le cryptophane-A visible par RMN ¹²⁹Xe⁴³.

En 1999, l'équipe d'A. Pines à Berkeley a utilisé la technique d'hyperpolarisation du ¹²⁹Xe permettant ainsi d'observer l'encapsulation de ce dernier dans les cryptophanes avec un gain en sensibilité considérable⁴⁵. En 2001, la même équipe a mis au point la première biosonde à base de cryptophane pour l'IRM ¹²⁹Xe afin de détecter le complexe biotine/avidine². Ces résultats sont la preuve que des images en IRM peuvent être obtenues en utilisant des biosondes encapsulant le xénon. En 2006, la technique d'HYPER-CEST pour les biosondes en RMN ¹²⁹Xe est développée dans leur laboratoire⁴⁶ et, comme nous l'avons vu précédemment, elle permet de gagner à nouveau en sensibilité en travaillant à des concentrations en cryptophane de l'ordre du nanomolaire, voire même du picomolaire.

Avec le souci de trouver le cryptophane le mieux adapté à l'encapsulation du xénon, les équipes de J-P. Dutasta et T. Brotin à l'ENS Lyon et de P. Berthault au CEA Saclay ont synthétisé et étudié en ¹²⁹Xe RMN le plus petit cryptophane connu à ce jour: le cryptophane-111³.

Des premières études de toxicité et d'internalisation cellulaire ont été réalisées en 2008 par l'équipe d'I. Dmochowski à Philadelphie sur des cryptophanes porteurs d'une séquence RGD. Ces études ont montré l'absence de toxicité de ces molécules cages et la possibilité de les internaliser dans les cellules, à des concentrations convenables pour la RMN ¹²⁹Xe (de l'ordre du µM)⁵⁵. La même année l'équipe de P. Berthault a mis au point la technique de « multiplexing »

⁵⁰ J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 219

⁵¹ A. Bouchet, T. Brotin, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 4507

⁵² A. Bouchet, T. Brotin, M. Linares, H. Ågren, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *J. Org. Chem.*, **2011**

⁵³ L. Garel, B. Lozach, J-P. Dutasta, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11652

⁵⁴ L. Garel, J-P. Dutasta, A. Collet, *Angew. Chem.*, **1993**, 32, 1169

⁵⁵ G. K. Seward, Q. Wei, I. J. Dmochowski, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2129

permettant la détection simultanée de deux cryptophanes dans deux environnements différents⁵⁶. Et c'est en 2010 que l'équipe d'I. Dmochowski a obtenu les premières structures RX d'un complexe cryptophane/¹²⁹Xe⁵⁷. La Figure 27 résume les principales étapes de la chimie des cryptophanes. La prochaine avancée significative devrait être l'application *in vivo* de nouvelles biosondes pour l'IRM ¹²⁹Xe.

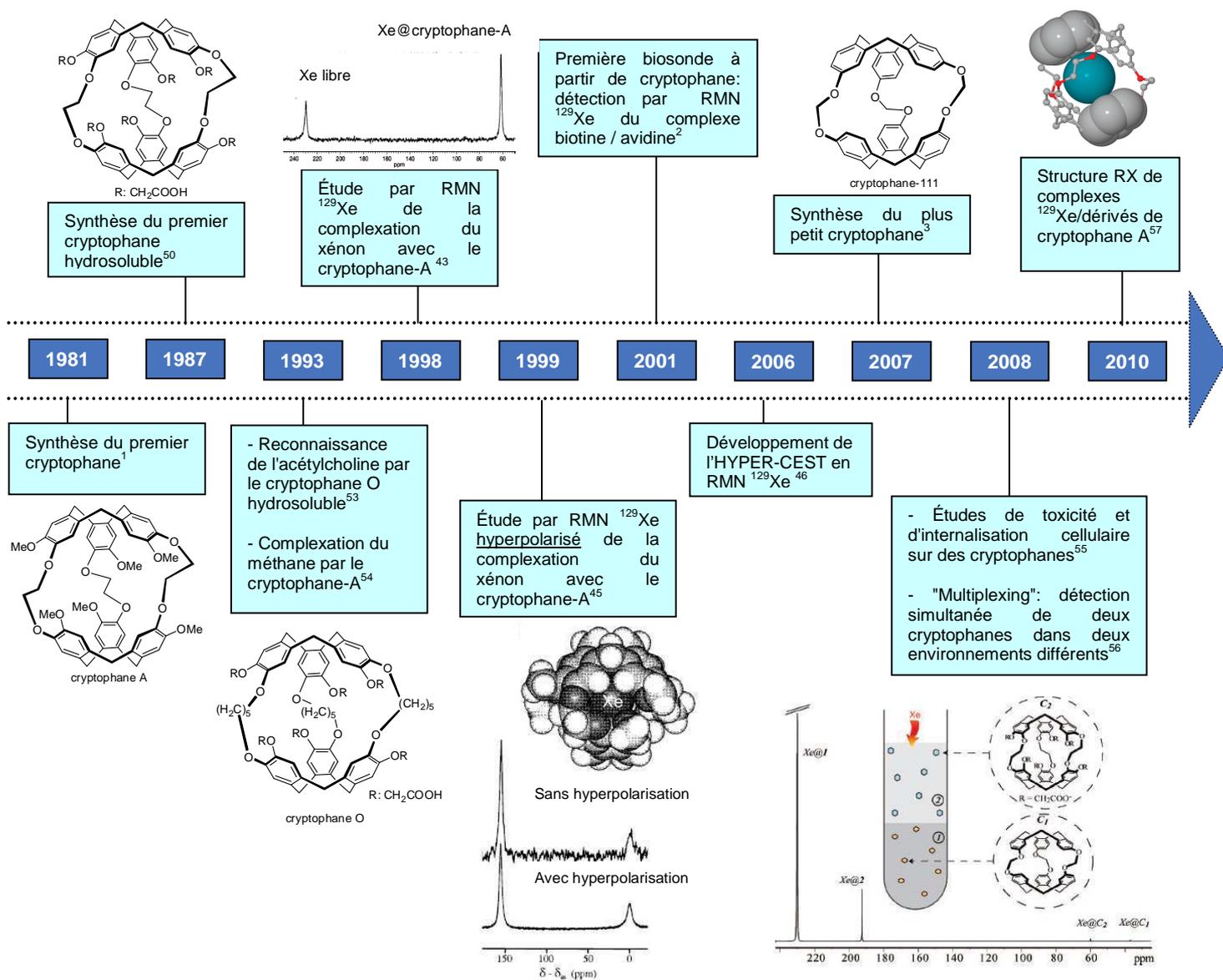


Figure 27: les grandes avancées dans l'histoire des cryptophanes

⁵⁶ P. Berthault, A. Bogaert-Buchmann, H. Desvaux, G. Huber, Y. Boulard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 16456

⁵⁷ O. Taratula, P. A. Hill, N. S. Khan, P. J. Carroll, I. J. Dmochowski, *Nat. Commun.*, **2010**, 1, 148

À ce jour, principalement sept équipes travaillent sur cette thématique dont les équipes présentées ci-dessus mais également l'équipe de B. Rousseau au CEA Saclay, de C. Freund à Berlin et de T. Holman à Georgetown. Les travaux respectifs de chacun seront présentés dans la suite de ce manuscrit.

Dans la partie qui suit seront présentés la synthèse, la structure et les applications des cryptophanes. Comme nous l'avons vu précédemment, ils sont la plupart du temps obtenus à partir des dérivés de cyclotrivratriylène.

2. Les dérivés de cyclotrivratriylène

Les cyclotrivratriylènes ont été obtenus pour la première fois par G. Robinson en 1915. À cette époque le produit avait été identifié à tort comme étant le 2,3,6,7-tétraméthoxy-9,10-dihydroanthracène⁵⁸. Ce n'est qu'en 1965, à la suite des travaux d'A. Lindsey⁵⁹, H. Erdtman⁶⁰ et A. Goldup⁶¹ que la structure des CTV a pu être clairement identifiée. (Figure 28)

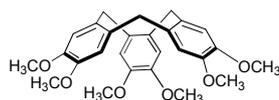


Figure 28: structure du cyclotrivratriylène

De manière générale, les molécules constituées de trois noyaux aromatiques reliés par des ponts méthylène sont appelées tribenzo(a, d, g)cyclononatriène. Suivant la nature des substituants on obtient différents dérivés de cyclotrivratriylène (Figure 29).

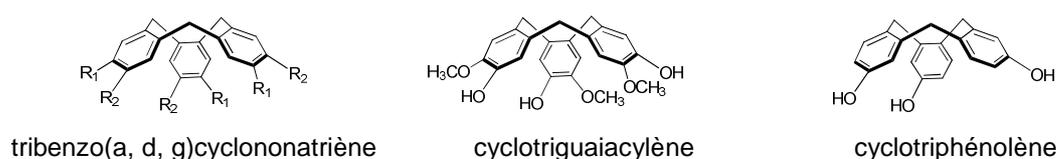


Figure 29: dérivés de cyclotrivratriylène

Par la suite, on effectuera un abus de langage en appelant CTV tous dérivés de cyclotrivratriylène.

⁵⁸ G. M. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **1915**, 102, 266

⁵⁹ A. S. Lindsey, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 1685

⁶⁰ H. Erdtman, F. Haglid, R. Ryhage, *Acta. Chem. Scand.*, **1964**, 18, 1249

⁶¹ A. Goldup, A. B. Morrison, G. W. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 3864

a. Synthèse et mécanisme de formation des CTV

i. Mécanisme de formation

Les CTV sont obtenus par cyclotrimérisation de précurseurs aromatiques: alcool benzylique ou dérivé de vétratole (Figure 30). Cette réaction a lieu en milieu acide: acide de Brønsted (HClO_4 , HCOOH , H_2SO_4) ou acide de Lewis (P_2O_5 , $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ catalytique). Le choix de l'acide dépendra des substituants R_1 et R_2 du précurseur.



Figure 30: précurseurs aromatiques des CTV

Le mécanisme envisagé est présenté dans la Figure 31: le carbocation est d'abord obtenu à partir de l'alcool benzylique ou dérivé de vétratole en milieu acide. Deux condensations successives de ce carbocation conduisent d'abord au dimère, puis au trimère linéaire. La cyclisation finale permet ensuite d'obtenir le CTV⁶².

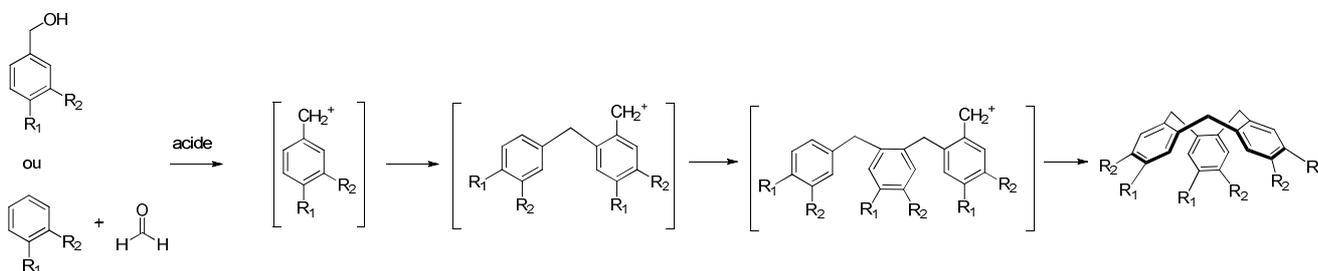


Figure 31: mécanisme proposé pour la formation de CTV

Il est important de noter que cette réaction nécessite un groupement électrodonneur sur la position R_2 du précurseur afin d'activer la position nucléophile en *para* de ce groupement, sur laquelle aura lieu la substitution électrophile de type Friedel-Crafts (Figure 32). Les groupements peuvent être $-\text{OR}$, $-\text{NRR}'$, ou $-\text{SR}$. Le groupement $-\text{OMe}$ est le plus utilisé pour la synthèse de CTV. D'autre part, la position R_1 doit être protégée afin d'éviter des substitutions électrophiles secondaires sur cette position.

⁶² A. Collet, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5725

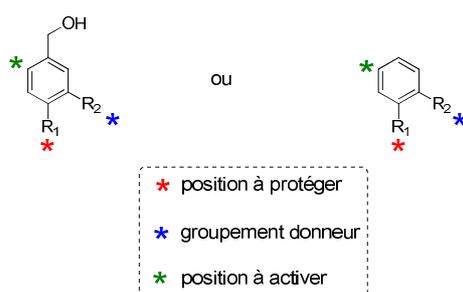


Figure 32: protection et activation de l'alcool benzylique de départ

ii. Différentes voies de synthèse des CTV

Il existe deux grandes méthodes de synthèse des CTV:

- À partir de dérivés de vérotrole et du formaldéhyde

Il s'agit d'une des méthodes publiées par G. Robinson en 1915⁵⁸. Le carbocation benzylique conduisant à la formation du CTV est obtenu par réaction d'un dérivé de vérotrole avec le formaldéhyde en milieu acide (Figure 33).

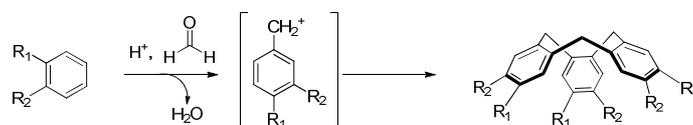


Figure 33: synthèse de CTV à partir de dérivé de vérotrole et du formaldéhyde

Cette méthode permet d'obtenir le produit désiré avec des rendements compris entre 21 % et 90 % selon les groupements R₁, R₂ et les conditions expérimentales.

- À partir d'alcool benzylique substitué

Cette deuxième voie de synthèse a été également décrite par G. Robinson en 1915⁵⁸. Le carbocation benzylique est directement formé à partir de l'alcool benzylique correspondant en milieu acide (Figure 34).

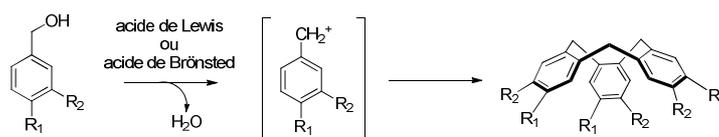


Figure 34: synthèse de CTV à partir d'alcool benzylique substitué

Aujourd'hui, il s'agit de la méthode la plus utilisée pour la synthèse de CTV et les rendements obtenus varient de 23 % à 95 % selon les groupements R_1 , R_2 et les conditions expérimentales.

Il est important de noter que, quelle que soit la méthode, la synthèse de CTV est souvent accompagnée de la formation d'oligomères cycliques de taille supérieure dont majoritairement le dérivé de cyclotétravératrylène (CTTV) (Figure 35)⁶³.

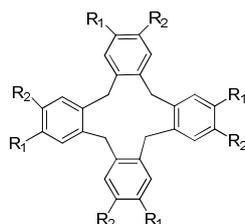


Figure 35: structure générale du CTTV

b. Symétrie et chiralité

Le cyclotrivératrylène est une molécule achirale (Figure 28). La substitution d'un des groupements méthoxy du dérivé de l'alcool benzylique ou du dérivé de vératrole par un autre groupement conduit après cyclotrimérisation à un dérivé chiral.

Selon la voie de synthèse choisie, les CTV obtenus auront des propriétés de symétrie différentes.

- À partir de dérivés de vératrole et du formaldéhyde

À partir d'un dérivé de vératrole contenant deux groupements distincts R_1 et R_2 (en bleu et rouge sur la Figure 36), il est possible de former deux cations régioisomères. Ces deux cations peuvent cycliser selon deux voies A et B. Cela conduit à l'obtention de deux paires d'énantiomères de symétrie respective C_1 et C_3 . La symétrie C_3 est obtenue suite à trois condensations successives d'un même cation (voie B). La symétrie C_1 est obtenue suite à des condensations croisées entre les deux carbocations (voie A).

⁶³ J. D. White, B.D. Gesner, *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 2273

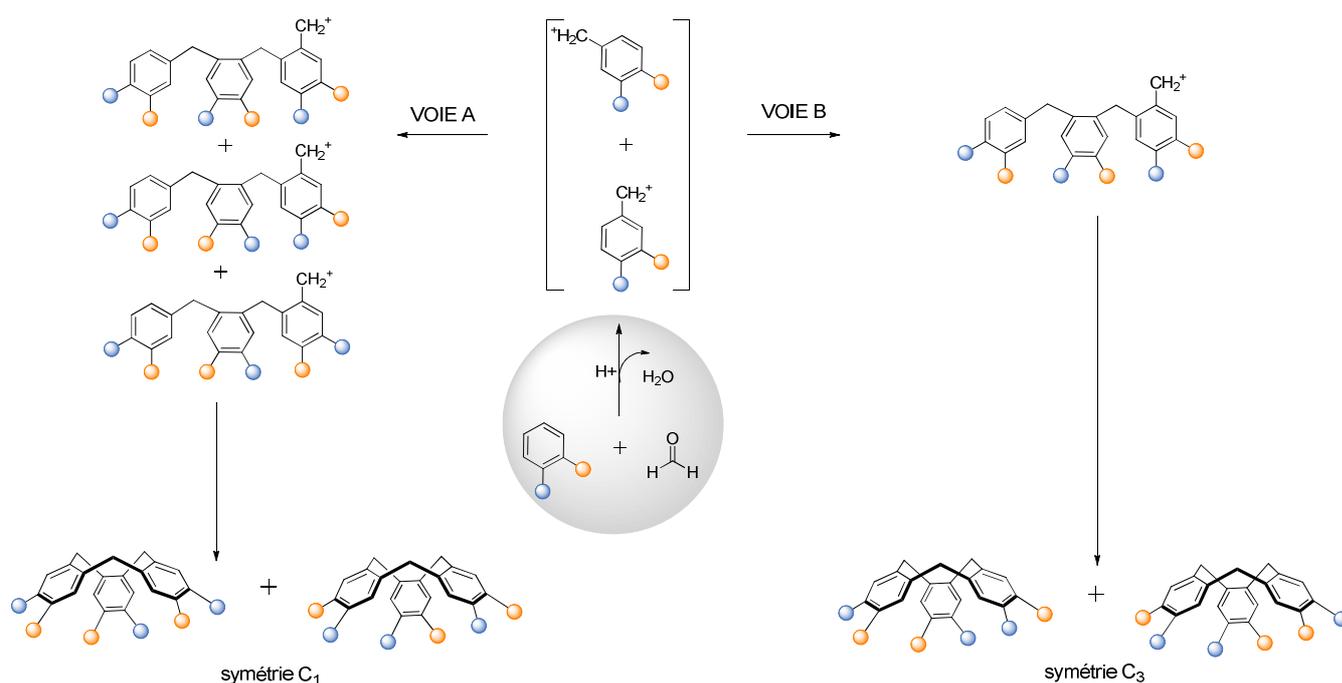


Figure 36: symétrie des CTV obtenus à partir de dérivé de vétratole et du formaldéhyde

- À partir d'alcool benzylique substitué

Dans ce cas, un seul carbocation est formé et il conduit exclusivement à la formation d'un mélange racémique de symétrie C_3 (Figure 37).

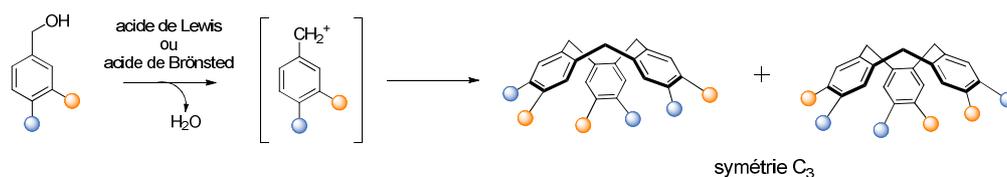


Figure 37: symétrie des CTV obtenus à partir de dérivé d'alcool benzylique

Par ailleurs, par cette voie de synthèse, des CTV énantiomériquement purs ont été préparés (Figure 38). Pour ce faire, des groupements chiraux ont été introduits soit avant cyclotrimerisation à partir d'un dérivé d'alcool vanillique chiral (Voie A)^{64,65} soit après cyclotrimerisation du CTV

⁶⁴ A. Collet, J. Jacques, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 1265

⁶⁵ A. Collet, J. Gabard, J. Jacques, M. Cesario, J. Guilhem, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1981**, 1, 1630

(Voie B)^{66,67,68} par estérification avec des composés chiraux ((*S*)-acide camphanique ou (*R*)-acide 2-phénoxypropionique). Dans les deux cas, les diastéréoisomères sont séparés par chromatographie puis après clivage des groupements chiraux, les CTV énantiomériquement purs sont obtenus.

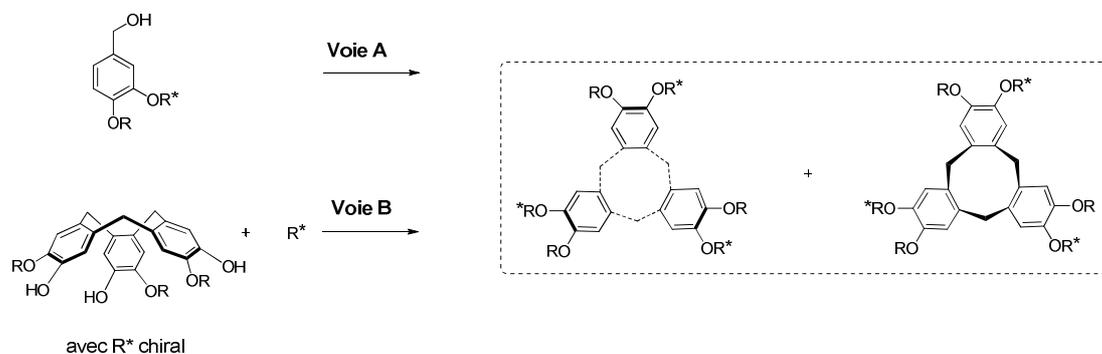


Figure 38: préparation de CTV diastéréoisomères

c. Conformation

Les CTV peuvent adopter plusieurs types de conformation: en "couronne" (*crown conformation*), en "selle de cheval" (*saddle conformation*) ou twistée (Figure 39).

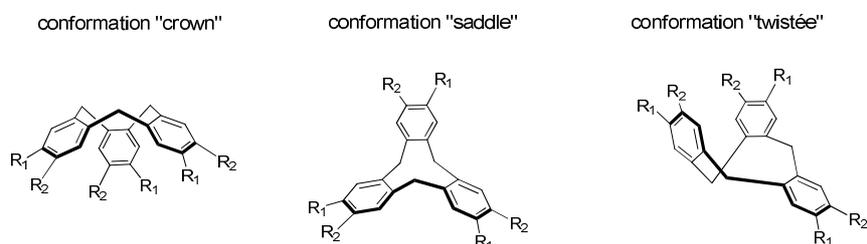


Figure 39: différentes conformations des CTV

Une racémisation des CTV énantiomériquement purs décrits précédemment a été observée. Cette racémisation s'effectue par une inter-conversion "*crown to crown*" en passant par des intermédiaires de conformations "*saddle*" et "*twistée*". Ces intermédiaires, en général non isolés, sont moins stables que la conformation "couronne" car ils induisent des interactions répulsives entre un groupement méthylène et un cycle aromatique qui lui est opposé⁶² (Figure 40).

⁶⁶ J. Canceill, A. Collet, J. Gabard, G. Gottarelli, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 1299

⁶⁷ J. Canceill, A. Collet, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 5997

⁶⁸ J. Canceill and A. Collet, *Nouv. J. Chim.*, **1986**, 10, 17

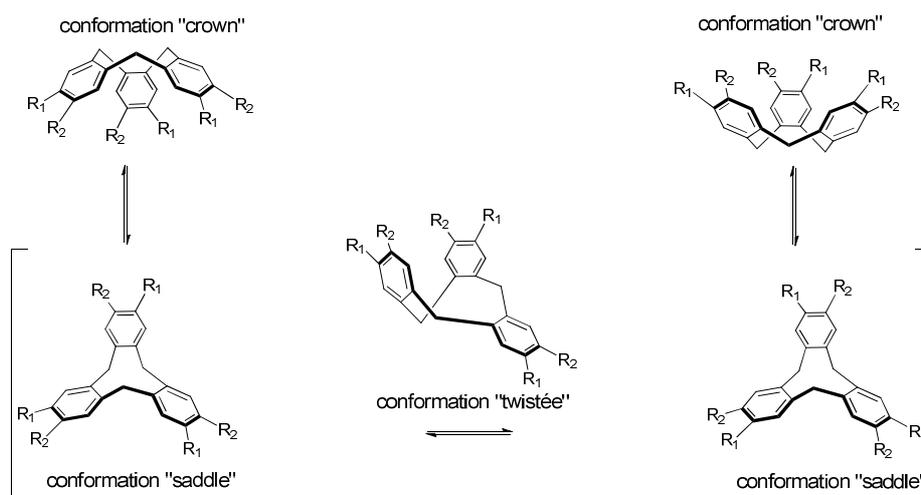


Figure 40: différentes conformations du CTV

Pour différents cryptophanes ($R_1 = \text{OCH}_3, \text{OCOCH}_3, \text{OH}$ et $R_2 = \text{OH}, \text{OCH}_3, \text{H}, \text{OCD}_3, \text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), le temps de demi-vie d'un conformère ainsi que l'énergie de la barrière d'inversion ont été calculés. Le temps de demi-vie d'un conformère unique est de l'ordre de 3 ans à 0 °C, 1 mois à 20 °C et quelques minutes à 100 °C. Les énergies de la barrière d'inversion calculées sont de l'ordre de $26,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$.⁶²

Lorsque le CTV est modifié structurellement sur un des ponts méthylène⁶⁹ ou par introduction d'un troisième substituant sur l'alcool benzylique de départ⁷⁰, la conformation "selle de cheval" permet de minimiser les énergies de répulsions dues à l'encombrement stérique et, de ce fait, est plus stable que la conformation "couronne" (Figure 41).

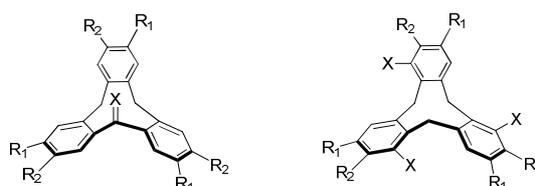


Figure 41: exemple de CTV stables en conformation *saddle*

⁶⁹ B. Cookson *et al.*, *J. Chem. Soc. B*, **1968**, 767

⁷⁰ J. F. Manville, G. E. Troughton, *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 4278

3. Les cryptophanes

a. Stéréochimie des cryptophanes et symétrie

- Configurations *syn* et *anti*

La chiralité du CTV entraîne la formation de deux cryptophanes de configuration *syn* et *anti*. Si deux unités CTV identiques sont jointes entre elles, on obtiendra un cryptophane *anti*. Dans le cas où les deux CTV sont énantiomères, le cryptophane *syn* est obtenu. La Figure 42 présente les trois stéréoisomères de configuration^{62,71, 72}.

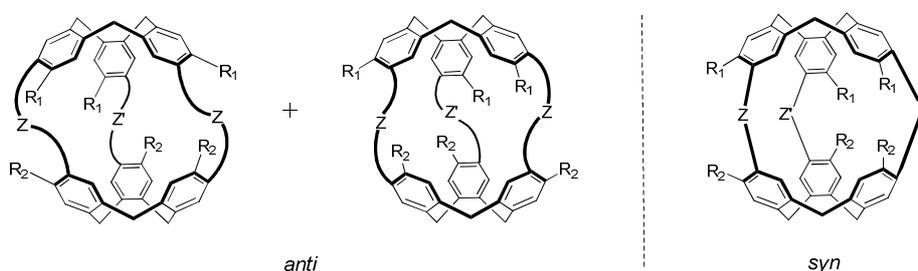


Figure 42: configurations *syn* et *anti*

- Groupes de symétrie et chiralité

Deux de ces stéréoisomères, les cryptophanes *anti*, sont énantiomères. Le troisième, le cryptophane *syn*, peut être soit un diastéréoisomère achiral (més), soit un diastéréoisomère chiral suivant les groupements R_1 , R_2 , Z et Z' ^{62, 71, 72}.

- Si $R_1 = R_2$ et $Z = Z'$, la forme *syn* est achirale et de symétrie C_{3h} alors que la forme *anti* possède une symétrie D_3 .

- Si $R_1 \neq R_2$ et $Z = Z'$, les formes *syn* et *anti* sont toutes deux chirales de symétrie C_3 .

- Si $R_1 \neq R_2$ et $Z \neq Z'$, les formes *syn* et *anti* sont toutes deux chirales de symétrie C_1 .

⁷¹ T. Brotin, J-P. Dutasta, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 88

⁷² K. T. Holman, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, **2004**

- Les conformations *out/out*, *in/out* et *in/in*

Les cryptophanes de grande taille de cavité peuvent être sujets à des changements de conformation dus à la flexibilité des CTV ^{62, 71, 72}. Différentes inversions au niveau des CTV conduisant à quatre cryptophanes topoisomères sont présentés dans la Figure 43:

- une conformation *out/out*, dans laquelle les deux CTV sont en conformation couronne et pointent les ponts méthylènes vers l'extérieur.

- une conformation *in/out*, dans laquelle un des deux CTV en conformation couronne pointe ses ponts méthylènes vers la cavité de la molécule cage.

- une conformation *in/in*, dans laquelle les deux CTV en conformation couronne pointent leurs ponts méthylènes vers la cavité de la molécule cage.

- une conformation *out/saddle* (ou selle de cheval), dans laquelle un des deux CTV est en conformation selle de cheval (Figure 40).

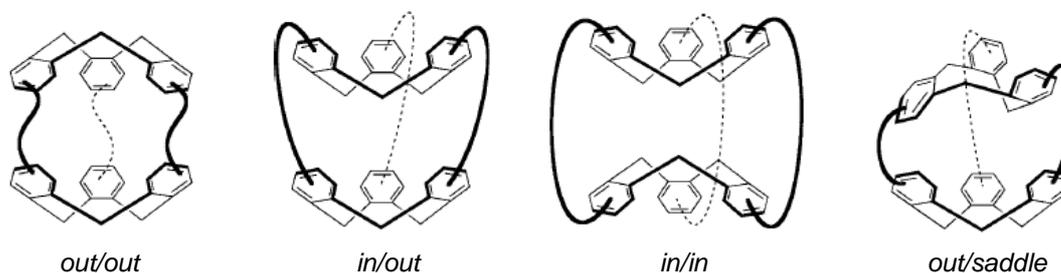


Figure 43: différentes conformations du cryptophane

Il est possible d'obtenir une conformation *out/out* à partir des composés qui possèdent une conformation *in/out*, *in/in* ou *out/saddle* lorsque, après solubilisation, ceux-ci sont chauffés ou mis en présence de gaz pouvant être encapsulé au sein de leur cavité.

b. Différentes voies de synthèse des cryptophanes

Il existe trois méthodes générales de synthèse des cryptophanes^{73, 62, 71, 72} (Figure 44). Elles utilisent toutes des dérivés l'alcool benzylique comme produit de départ.

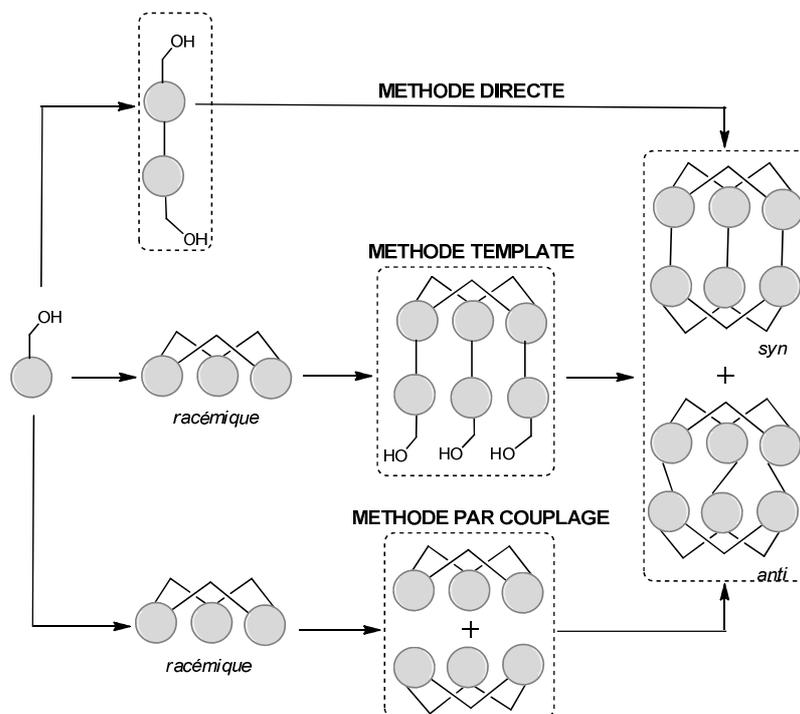


Figure 44: les trois méthodes de synthèse des cryptophanes

i. Méthode directe

Dans la méthode directe, l'alcool benzylique (par exemple l'alcool vanillique ou alcool 3-méthoxy-4-hydroxybenzylique) est d'abord transformé en "dimère", puis ce dernier est cyclotrimerisé en milieu acide pour donner le cryptophane. Cette réaction met donc en jeu le couplage de trois dimères portant chacun deux unités alcool benzylique, créant ainsi six liaisons carbone-carbone en une seule et même étape (Figure 45). Cette approche permet d'obtenir des cryptophanes avec des bras pouvant aller jusqu'à sept carbones (-O(CH₂)₇O-) mais également des bras contenant des groupements oléfiniques.

⁷³ A. Collet, J-P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Topics in Current Chemistry*, **1993**, 165

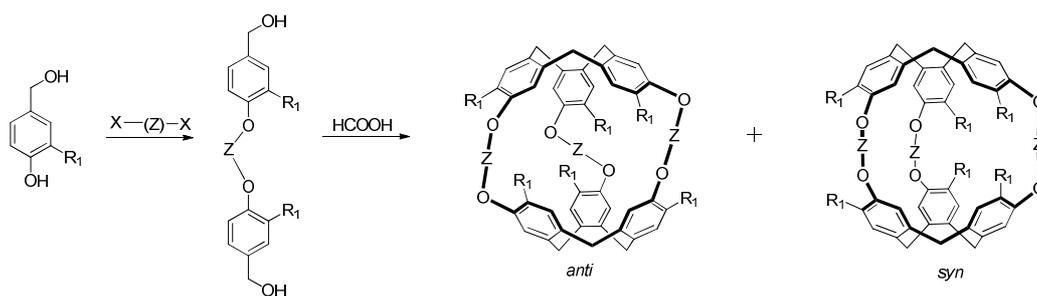


Figure 45: schéma de synthèse général par la méthode directe

Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle est restreinte à la formation de composés de symétrie D_3 ou C_{3h} . D'autre part, les rendements obtenus sont souvent faibles pour les cryptophanes de petite taille (2 – 5 % pour le cryptophane-A (structure Figure 50)). Pour le cryptophane-E (structure Figure 50) et les cryptophanes de taille plus grande, les rendements obtenus sont meilleurs (15 - 20 %) (Tableau 5)⁷³.

O-(Z)-O	<i>Anti</i> (%)	<i>Syn</i> (%)
(CH ₂) ₂	5 (cryptophane-A)	0
(CH ₂) ₃	17 (cryptophane-E)	3
(CH ₂) ₄	8	2
(CH ₂) ₅	12	6
(CH ₂) ₆	8	2
(CH ₂) ₇	5	1
(CH ₂) ₈	0	0
CH ₂ CH=CHCH ₂ (<i>E</i>)	5	1
CH ₂ CH=CHCH ₂ (<i>Z</i>)	10	8
CH ₂ C≡CCH ₂	0	0

Tableau 5: rendement des isomères *anti* et *syn* obtenus par la méthode directe ($R_1 = \text{OCH}_3$)

Malgré les inconvénients présentés précédemment, cette méthode directe reste néanmoins attractive: l'équipe de T. Holman a utilisé cette stratégie pour synthétiser un cryptophane *anti*

présentant des ponts *m*-xylylène substitué par un ester permettant l'encapsulation d'une molécule de THF (Figure 46)⁷⁴.

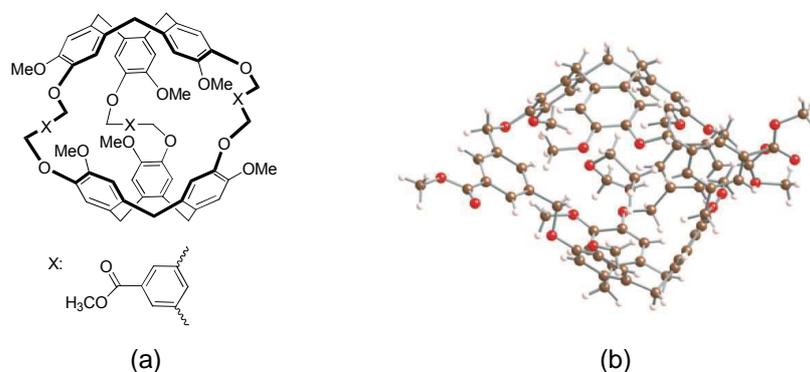


Figure 46: (a) cryptophane avec des ponts des ponts *m*-xylylène substitué par un ester (b) structure RX du cryptophane encapsulant une molécule de THF

ii. Méthode template

Il s'agit de la première méthode utilisée par l'équipe d'A. Collet pour la synthèse de cryptophanes¹. Cette approche est une méthode de synthèse multi-étapes qui nécessite la formation de deux unités cyclotrivératrylène à différents stades de la synthèse (Figure 47).

- L'alcool benzylique préalablement substitué est cyclotrimérisé en milieu acide pour donner un CTV **1**.
- Une étape de déprotection (déallylation ou déméthylation) est nécessaire afin d'obtenir les phénols libres.
- Le CTV **2** est ensuite fonctionnalisé par trois alcools benzyliques substitués (**3**) pour donner le CTV **4**. Cet intermédiaire déjà "préorganisé" en cryptophane va jouer le rôle de template pour la réaction intramoléculaire de fermeture de cycle.
- La cyclisation finale a lieu en milieu acide avec en général de bons rendements, pour donner les cryptophanes *syn* et/ou *anti* (**5** et **6**). Cette étape nécessite des conditions de dilution de l'ordre de 10^{-3} M afin de favoriser les réactions intramoléculaires et de diminuer la formation de polymères.

⁷⁴ S. T. Mough, J. C. Goeltz, K. T. Holman, *Angew. Chem.*, **2004**, 43, 5631

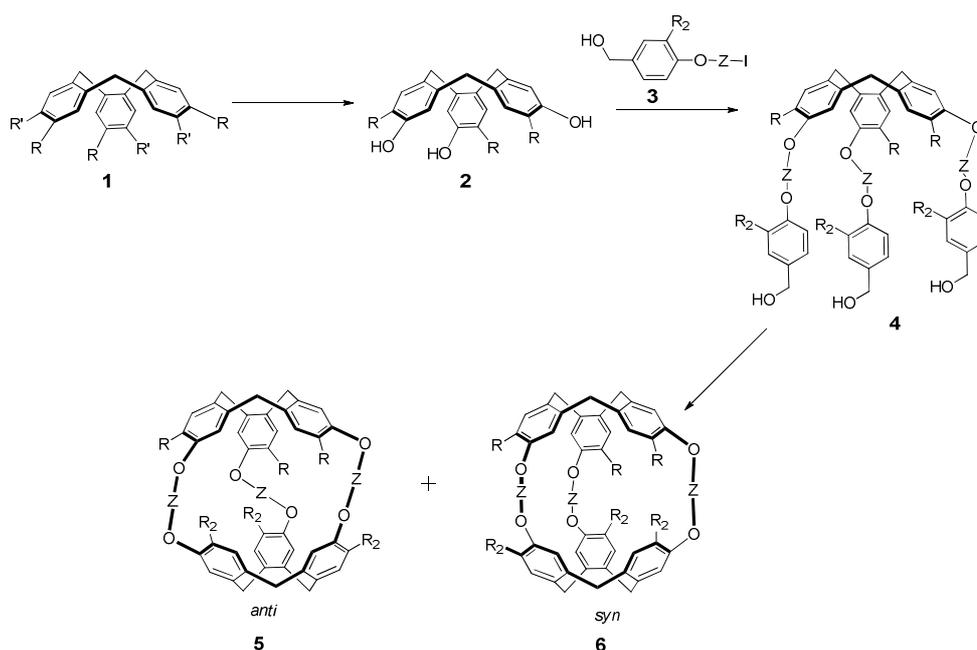


Figure 47: schéma de synthèse général par la méthode template

Cette méthode présente des avantages par rapport à la méthode directe:

- Les rendements de synthèse sont souvent bien meilleurs que ceux obtenus par la méthode directe. Par exemple, le cryptophane-A est obtenu avec un rendement de 80 % par la méthode template et de 5 % par la méthode directe (Tableau 5 et Tableau 6).

O-(Z)-O	<i>Anti</i> (%)	<i>Syn</i> (%)
(CH ₂) ₂	80 (cryptophane-A)	0
(CH ₂) ₃	27 (cryptophane-E)	50
(CH ₂) ₄	-	-
(CH ₂) ₅	21	43
(CH ₂) ₆	18	9
(CH ₂) ₇	-	-
(CH ₂) ₈	60	20
CH ₂ CH=CHCH ₂ (<i>E</i>)	34	5
CH ₂ CH=CHCH ₂ (<i>Z</i>)	25	50
CH ₂ C≡CCH ₂	43	20

Tableau 6: rendement des isomères *anti* et *syn* par la méthode template (R₁ = OCH₃)

Il est intéressant de noter que le rapport *syn* / *anti* n'est pas le même suivant les deux méthodes:

- Par la méthode template, il va dépendre entre autres de la parité du nombre de carbones du bras entre les deux CTV: si le nombre de carbone est pair, on observera majoritairement du cryptophane *anti* et si le nombre d'atome est impair on obtiendra majoritairement du *syn*. Autrement dit, la parité du nombre de carbone au niveau du bras va déterminer l'orientation de la fonction alcool réactive de alcool benzylique et donc le sens de cyclisation (dans le sens ou dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (Figure 48).

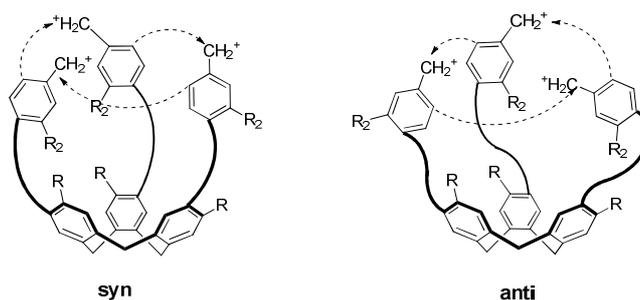


Figure 48: intermédiaires probables pour les cryptophanes *syn* et *anti* par la méthode template

- Pour la méthode directe, on n'observe pas le même phénomène, ce qui montre bien qu'on ne passe pas par le même intermédiaire réactionnel: les deux unités CTV sont formées simultanément. Les intermédiaires probables sont présentés dans la Figure 49.

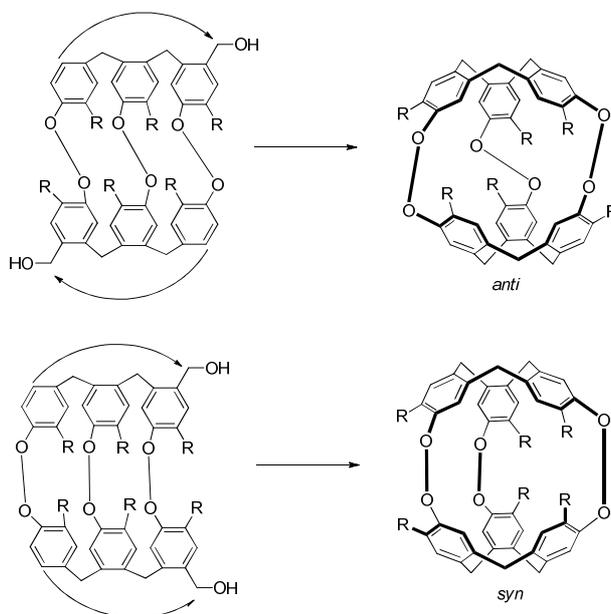


Figure 49: intermédiaires probables pour les cryptophanes *syn* et *anti* par la méthode directe

- La méthode template permet d'obtenir des cryptophanes de symétrie D_3 and C_{3h} comme le cryptophane-A, cryptophane-E mais également des composés d'autres symétries comme le cryptophane-C (symétrie C_3) ou des cryptophanes de symétrie C_2 (Figure 50).

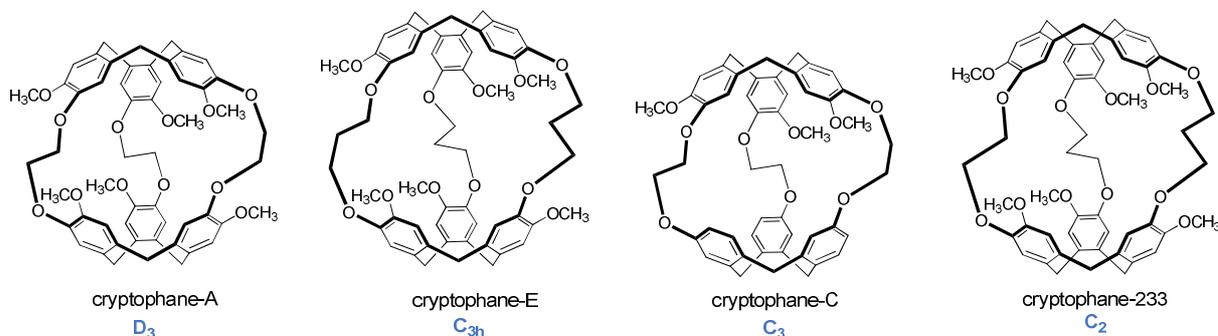


Figure 50: cryptophanes de symétrie D_3 , C_{3h} , C_3 et C_2

iii. Méthode par couplage

Cette méthode consiste à synthétiser des cryptophanes par couplage de deux sous-unités cyclotrivrétrylènes.

Elle a été décrite pour la première fois par l'équipe de Cram en 1991 qui a publié la synthèse d'un cryptophane dans lequel chaque chaîne pontante possède deux fonctions alcynes. Les cryptophanes syn (**9**) et anti (**8**) sont obtenus avec de faibles rendements de 2 % et 4 % respectivement, à partir de deux CTV tris[propargyl-éther] **7** identiques en présence d'acétate de cuivre (Figure 51)⁷⁵.

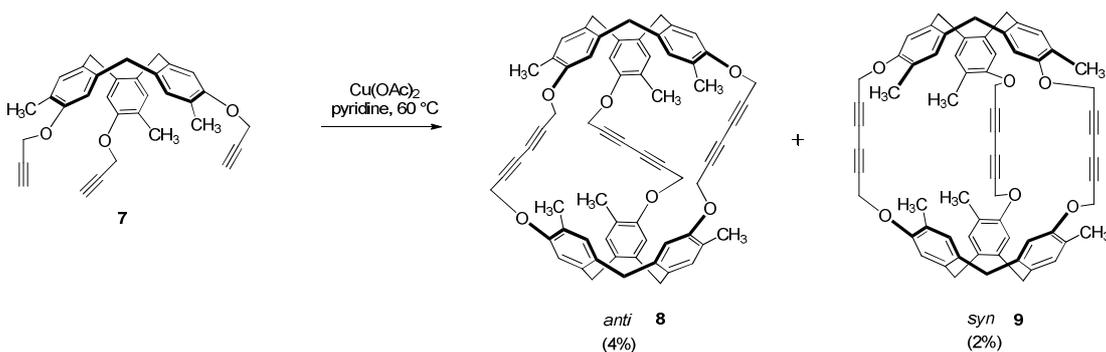


Figure 51: synthèse de cryptophane possédant deux fonctions alcynes

⁷⁵ D. Cram, M. Tanner, S. Keipert, C. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8909

Cette méthode a récemment été utilisée pour la synthèse du cryptophane-111 (**11**) à partir de deux unités de CTV **10** (Figure 52)⁷⁶. Cette synthèse sera détaillée dans la partie B.

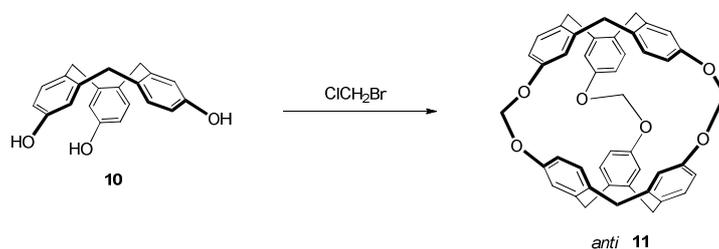


Figure 52: synthèse du cryptophane-111 par la méthode de couplage

Nous avons donc décrit dans cette partie les différentes stratégies pour synthétiser les cryptophanes. La plus couramment utilisée reste à ce jour la méthode template.

⁷⁶ H. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332

c. Différentes voies de fonctionnalisation des cryptophanes

Dans cette partie seront présentées les différentes façons d'obtenir des cryptophanes mono-, tri- ou hexa-fonctionnalisés, précurseurs de biosondes. Jusqu'à présent, ils sont obtenus à partir de cryptophanes de type 222 et sont quasiment tous synthétisés à partir du CTV **11** suivant la méthode template (Figure 53).

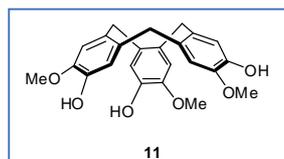


Figure 53: CTV **11**

Ce dernier est synthétisé en 3 étapes à partir de l'alcool vanillique (**12**), avec un rendement compris entre 30 et 45 % (Figure 54). La fonction phénol de **12** doit d'abord être protégée à l'aide du bromure d'allyle. En effet, la réaction de cyclotrimérisation de l'alcool vanillique non protégé ne marche pas ou très peu et ceci probablement à cause de la trop forte réactivité de la molécule en milieu acide. Une étape de cyclotrimérisation, suivie d'une déallylation de **14** permet ensuite l'obtention de **11**.

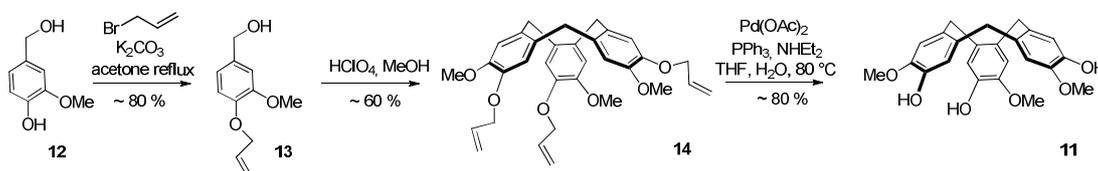


Figure 54: synthèse du CTV **11**

- **Cryptophanes mono-fonctionnalisés, précurseurs de biosonde**

Ces cryptophanes mono-fonctionnalisés ont été utilisés par les équipes d'A. Pines², J-P. Dutasta et T. Brotin⁷⁷, I. Dmochowski⁷⁸ et C. Freund⁷⁹ pour la synthèse de biosondes (Figure 55).

⁷⁷ V. Roy, T. Brotin, J-P. Dutasta, M-H.Charles, T. Delair, F. Mallet, G. Huber, H. Desvaux, Y. Boulard, P. Berthault, *ChemPhysChem*, **2007**, *8*, 2082

⁷⁸ Q. Wei, G. K. Seward, P. A. Hill, B. Patton, I. E. Dimitrov, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13274

⁷⁹ A. Schlundt, W. Kilian, M. Beyermann, J. Sticht, S. Gunther, S. Hopner, K. Falk, O. Roetzschke, L. Mitschang, C. Freund, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4142

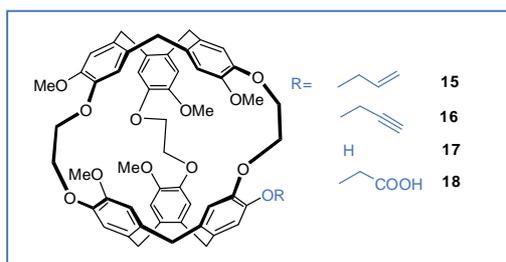


Figure 55: cryptophanes mono-fonctionnalisés **15**, **16**, **17** et **18**

Les cryptophanes **15** et **16** sont obtenus en trois étapes à partir du CTV **11** suivant le schéma de synthèse présenté dans la Figure 56(b). Il s'agit d'additionner par substitutions nucléophiles successives soit deux monomères **19** puis un monomère **20** (Figure 56(a) et (b) - voie 1), soit un monomère **21** puis deux monomères **19** (Figure 56(a) et (b) - voie 2). Enfin une cyclotrimérisation finale permet d'obtenir les cryptophanes mono-fonctionnalisés.

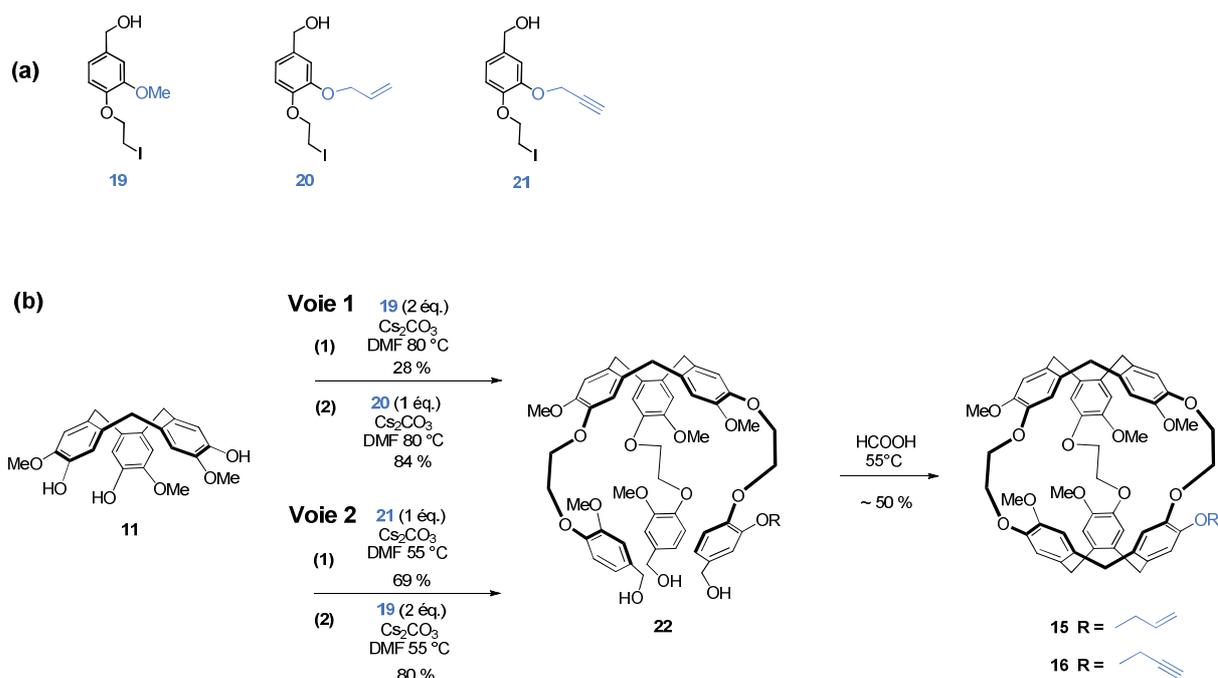


Figure 56: (a) monomères **19**, **20** et **21**, (b) synthèse des cryptophanes **15** et **16**

Le monomère **19** est synthétisé en deux étapes à partir de **12** avec un rendement d'environ 58 % (Figure 57). Les monomères **20** et **21** sont obtenus en quatre étapes à partir du dihydroxybenzaldéhyde **24** avec un rendement global d'environ 40 %⁴⁰.

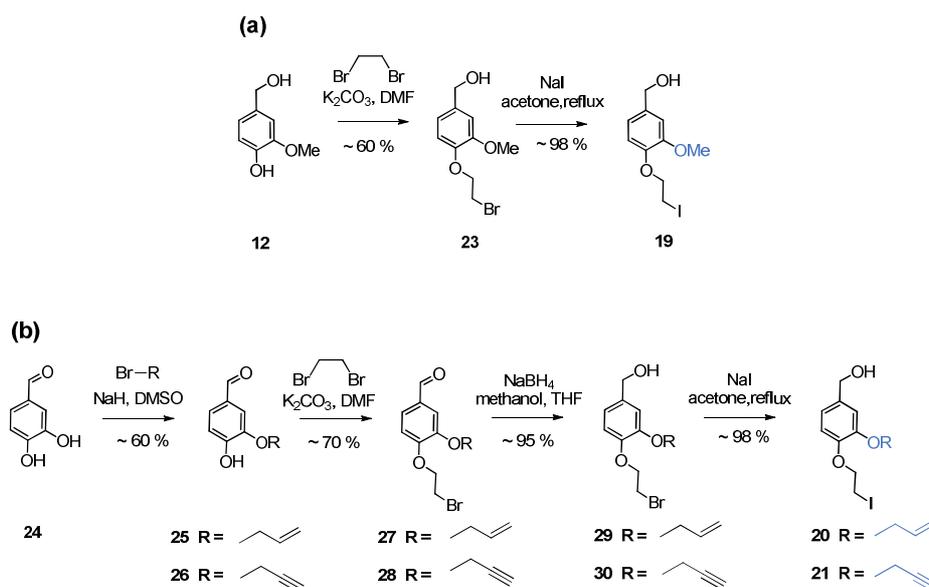


Figure 57: synthèse des monomères **19** (a), **20** et **21** (b)

Les cryptophanes **15** et **16** sont donc obtenus en 12 étapes non linéaires avec des rendements respectifs de 1,2 % et 2,9 %. Les cryptophanes **17** et **18** sont eux obtenus à partir du cryptophane **15** (Figure 58), par déprotection de la fonction allyle (**17**) puis par alkylation avec le bromoacétate de méthyle suivie d'une étape de saponification (**18**). Ils sont respectivement obtenus en 13 et 15 étapes avec des rendements d'environ 1 % et 0,5 %.

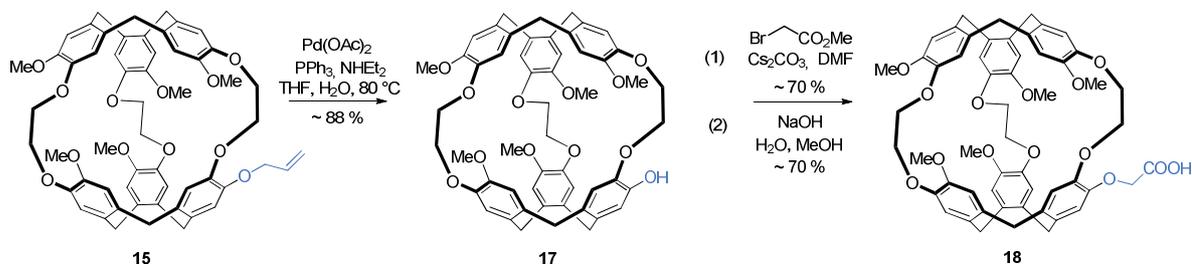


Figure 58: synthèse des cryptophanes **17** et **18**

- **Cryptophanes tri-fonctionnalisés, précurseurs de biosonde**

Les cryptophanes tri-fonctionnalisés, développés par l'équipe d'I. Dmochowski en 2007, sont présentés dans la Figure 59^{80,81, 82}.

⁸⁰ P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9262

⁸¹ P. A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 3069

⁸² O. Taratula, P. A. Hill, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 1414

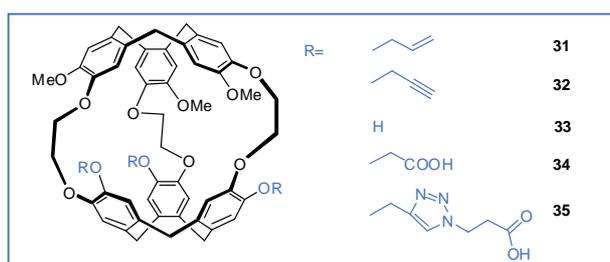


Figure 59: cryptophanes tri-fonctionnalisés

Ils peuvent être obtenus selon deux voies de synthèse:

La première voie de synthèse consiste à tri-alkyler le CTV **11** (Figure 60) avec les monomères **20** ou **21**. Une étape de cyclotrimérisation permet l'obtention des cryptophanes **31** et **32**^{80, 81} qui sont obtenus en 9 étapes non linéaires avec des rendements d'environ 4,8 %.

Voie 1

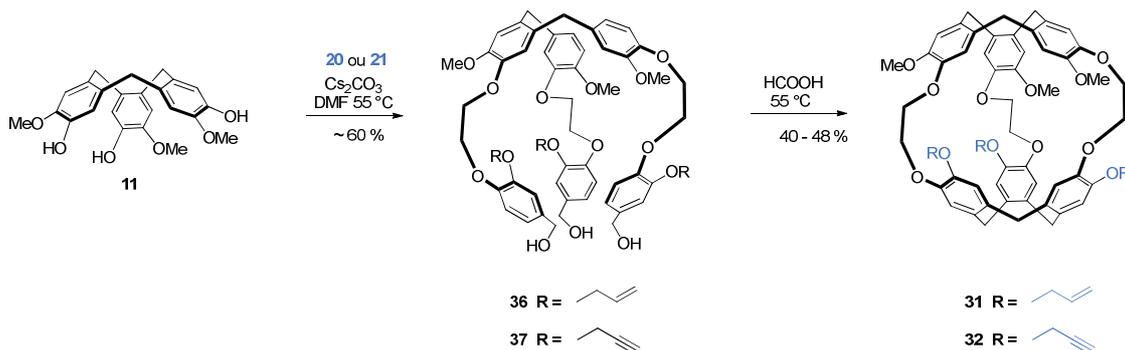


Figure 60: voie 1, synthèse des cryptophanes **31** et **32**

La seconde voie de synthèse a été décrite en 2011 par l'équipe d'I. Dmochowski (Figure 61)⁸². Elle consiste à cyclotrimériser le monomère **23** afin d'obtenir le CTV **38**. Une étape d'alkylation de ce dernier avec les monomères **25** ou **26** (Figure 57), suivie d'une étape de réduction des aldéhydes puis d'une cyclotrimérisation finale permettent d'obtenir les cryptophanes **31** et **32** en 6 étapes non linéaires avec des rendements de l'ordre de 9 %.

Voie 2

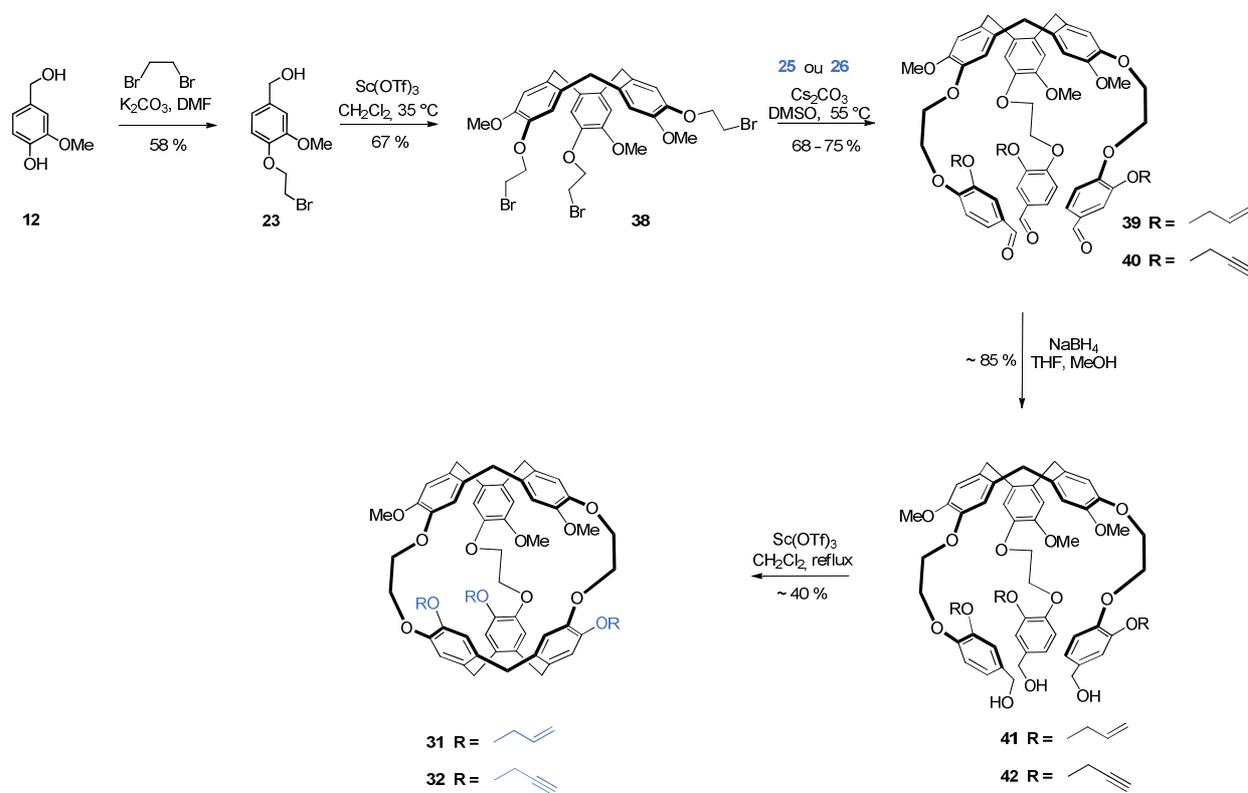


Figure 61: voie 2, synthèse des cryptophanes **31** et **32**

Cette nouvelle voie est plus rapide que la voie 1 (6 étapes comparé à 9 étapes) et permet d'obtenir des cryptophanes tri-fonctionnalisés avec de meilleurs rendements (9 % comparé à 4,5 %).

D'autre part, à partir des cryptophanes **31** et **32**, d'autres cryptophanes tri-fonctionnalisables peuvent être obtenus (Figure 62). Une étape de déprotection de la fonction allyle de **31** à l'acétate de palladium permet d'obtenir le cryptophane **33** qui, à son tour, va conduire au cryptophane **34** par alkylation avec du bromoacétate de méthyle suivie d'une saponification. Par ailleurs, trois cycloadditions de Huisgen sur le composé **32** permettent l'obtention du cryptophane **35**.

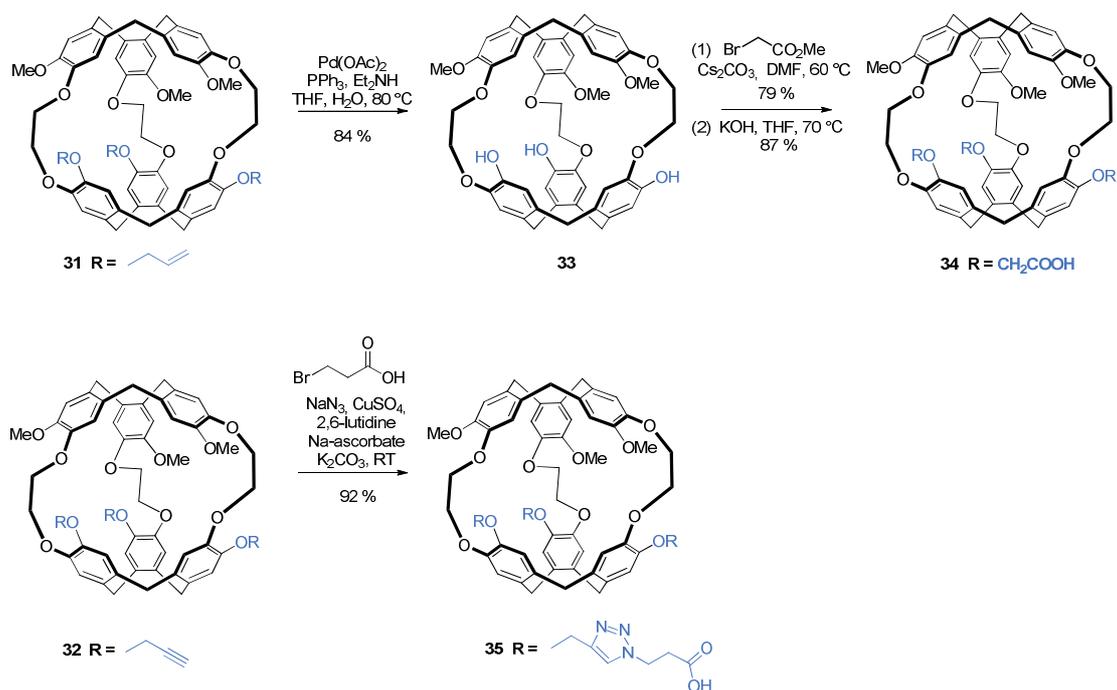


Figure 62: synthèse de nouveaux cryptophanes tri-fonctionnalisés à partir de **31** et **32**

Ces trois derniers cryptophanes présentent une meilleure solubilité aqueuse que les cryptophanes **31** et **32** et sont donc mieux adaptés pour la synthèse de biosondes.

- **Cryptophanes hexa-fonctionnalisés, précurseurs de biosonde**

Ces cryptophanes ont été décrits pour la première fois par l'équipe d'A. Collet en 1987. Il s'agit des premiers cryptophanes hydrosolubles (Figure 63)⁵⁰.

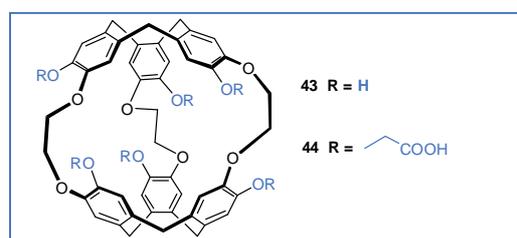


Figure 63: cryptophanes hexa-fonctionnalisés

Les cryptophanes **43** et **44** sont respectivement obtenus en 8 et 10 étapes non linéaires avec des rendements d'environ 2,9 % et 1,4 %, comme le montre le schéma de synthèse suivant (Figure 64).

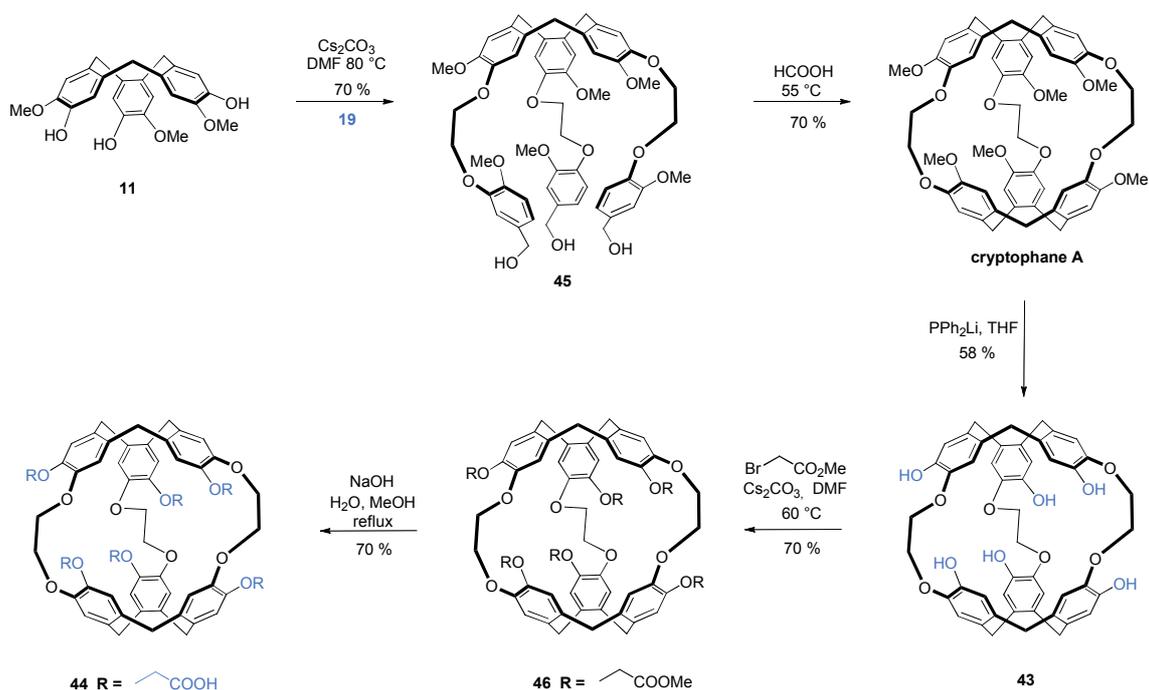


Figure 64: schéma réactionnel pour la synthèse de cryptophanes hexa-fonctionnalisables

Dans un premier cas, la présence de 6 fonctions acide carboxylique (CH_2COOH) rend la molécule **44** très sensible au pH. Dans un second cas, l'ajout de 6 fonctions hydroxy (cryptophane **43**) influence la capacité du xénon à se lier au cryptophane ainsi que la vitesse d'échange entre l'intérieur et l'extérieur de la cavité. Ces propriétés vont dépendre du monocation présent en solution, Li^+ , Na^+ , K^+ ou Cs^{+83} .

⁸³ P. Berthault, H. Desvaux, T. Wendlinger, M. Gyejacquot, A. Stopin, T. Brotin, J-P. Dutasta, Y. Boulard, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 12941

d. Les différentes biosondes par équipes

i. Équipe de A. Pines

Biosonde pour la détection du complexe biotine-avidine

Comme nous l'avons vu précédemment, l'équipe de A. Pines a présenté en 2001 la première biosonde cryptophane utilisant la RMN ^{129}Xe , capable de détecter à des concentrations de l'ordre du micromolaire la formation du complexe biotine / streptavidine². La streptavidine est une protéine tétramère de 52 800 Da purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Elle possède une très forte affinité avec la biotine (également connue sous le nom de vitamine H) avec une constante de dissociation de l'ordre de $\sim 1 \times 10^{-15}$ mol/L, se classant parmi les plus fortes interactions non-covalentes connues dans la nature.

Cette biosonde se compose d'un cœur cryptophane hydrophobe (noir), d'un bras peptidique hydrosoluble (vert) et d'une antenne de reconnaissance, la biotine (bleu) (Figure 65). Au contact de la protéine, le complexe biotine / avidine se forme, créant ainsi des changements de mouvements rotationnels et vibrationnels du cryptophane et donc entraînant une déformation et une distorsion du nuage électronique du xénon. En effet, comme nous l'avons vu précédemment (Figure 16) la sensibilité du xénon face à des perturbations de la cage est tellement grande qu'une deutération d'un groupement méthyle suffit pour avoir une signature spectrale du xénon différente⁸⁴.

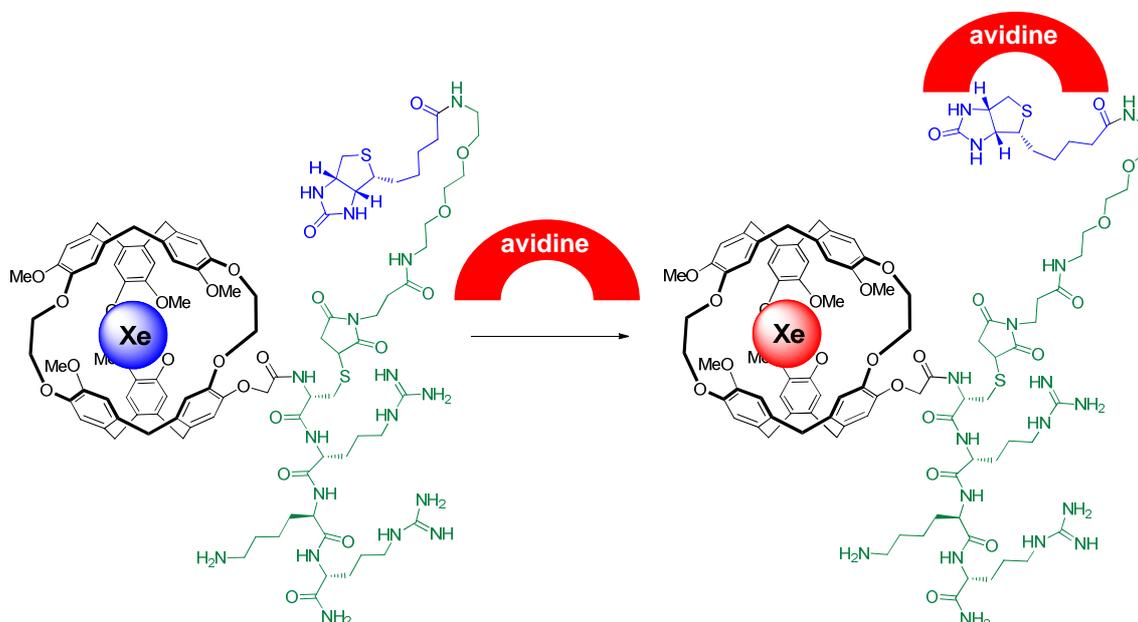


Figure 65: biosonde pour la détection du complexe biotine / avidine

⁸⁴ T. Brotin, A. Lesage, L. Emsley, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1171

Cette biosonde est obtenue en dix-sept étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse du bras peptidique hydrosoluble **47** et du dérivé de biotine **49**, avec un rendement inférieur à 0,5 % (Figure 66). Un couplage peptidique sur support solide entre le cryptophane **18** et le bras hydrosoluble constitué d'un enchaînement d'acides aminés (cystéine, arginine et lysine) **47** permet la solubilisation aqueuse partielle du cryptophane. Puis une réaction de couplage entre la fonction thiol de **48** avec le groupement maléimide de la biotine **49** permet l'obtention de la biosonde finale **50**⁸⁵.

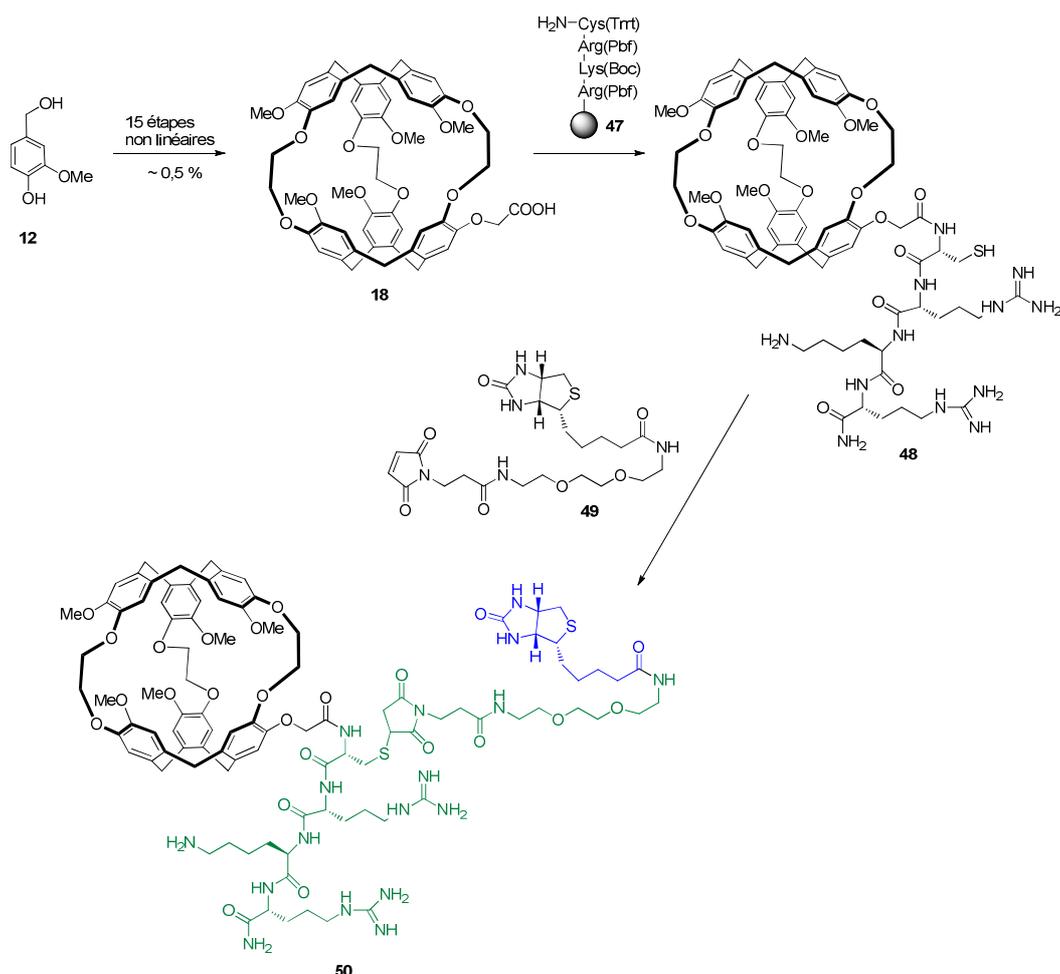


Figure 66: schéma de synthèse de la biosonde biotine/avidine

Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment le cryptophane **15** est chiral et la RMN du xénon encapsulé dans le mélange racémique ((+) et (-)) montre un seul pic (Figure 67(a)). La première paire de diastéréoisomères apparaît avec l'introduction de L-acides aminés chiraux. Le spectre RMN xénon de **48** montre alors deux pics séparés de 0,15 ppm correspondant aux deux diastéréoisomères (+)L et (-)L (Figure 67(b)). Lorsque cet intermédiaire est couplé à une

⁸⁵ M. M. Spence, E. J. Ruiz, S. M. Rubin, T. J. Lowery, N. Winssinger, P. G. Schultz, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15287

molécule de biotine **49**, un nouveau centre chiral est apporté par cette dernière, générant ainsi un nouveau mélange chiral (+)LR, (+)LS, (-)LR, (-)LS. Quatre pics distincts sur le spectre RMN ^{129}Xe apparaissent alors (Figure 67(c)). La complexation de la biotine avec l'avidine conduit à l'apparition d'une nouvelle résonance à 74 ppm (Figure 67(d) et (e)).

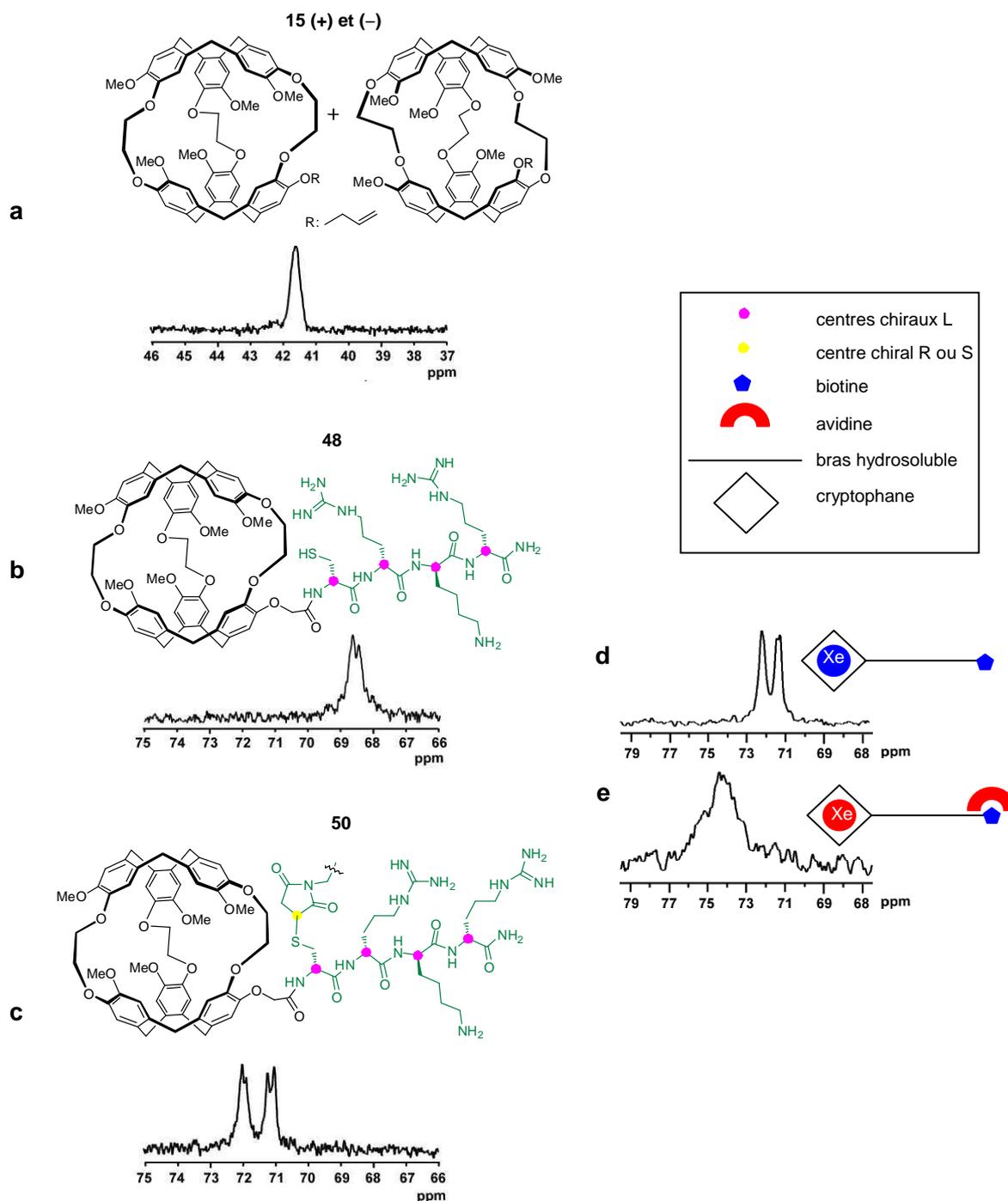


Figure 67: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé (a) **15** dans 25 % toluène / 75 % tétrachloréthane, (b) **48** dans D_2O , (c) et (d) **50** sans avidine dans D_2O et (e) **50** avec avidine dans D_2O . Tous les cryptophanes sont utilisés à des concentrations de l'ordre du μM .

C'est en utilisant la fréquence de résonance à 74 ppm qu'une image IRM ^{129}Xe de la biotine liée à sa cible biologique a été réalisée quelques années plus tard par les mêmes auteurs⁸⁶. Pour ce faire, l'équipe d'A. Pines et de D. Wemmer s'est intéressée à une biosonde biotine / avidine **51** comportant un bras entre la biotine et le cryptophane différent de celui décrit précédemment (Figure 68)⁸⁷.

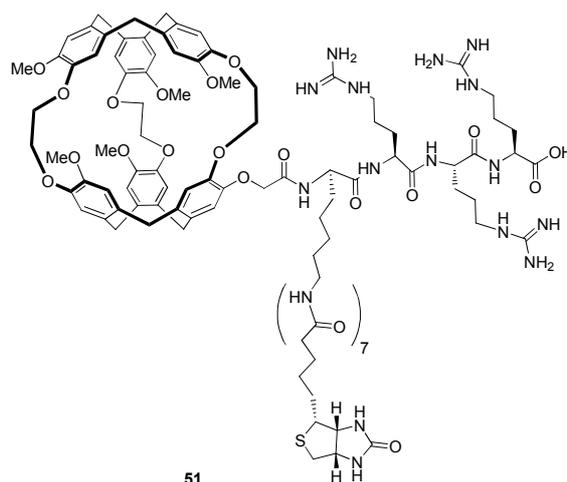


Figure 68: biosonde **51** utilisé pour faire de l'imagerie IRM ^{129}Xe du complexe biotine / avidine

Cette biosonde a été déposée sur un lit solide composé d'avidine immobilisée sur un gel d'agarose. **51** est retenue sur le gel grâce à son interaction avec la protéine. Un flux continu d'eau saturée en xénon hyperpolarisé est ensuite envoyé sur l'échantillon solide (Figure 69 (a)). Une image de la distribution spatiale de cette biosonde a été obtenue (Figure 69 (b)). Aux alentours de 200 ppm, une tache diffusant tout le long du tube correspond au xénon libre dissout dans l'agarose. À 65,4 ppm, une tache localisée entre 0,2 et 1 cm selon l'axe z correspond à **51** complexée à l'avidine. Cette image est en accord avec l'image optique du tube (Figure 69 (a)) où la région bleue représente la zone où l'avidine est immobilisée.

⁸⁶ C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 76

⁸⁷ T. J. Lowery, S. Garcia, L. Chavez, E. J. Ruiz, T. Wu, T. Brotin, J-P. Dutasta, D. S. King, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 65

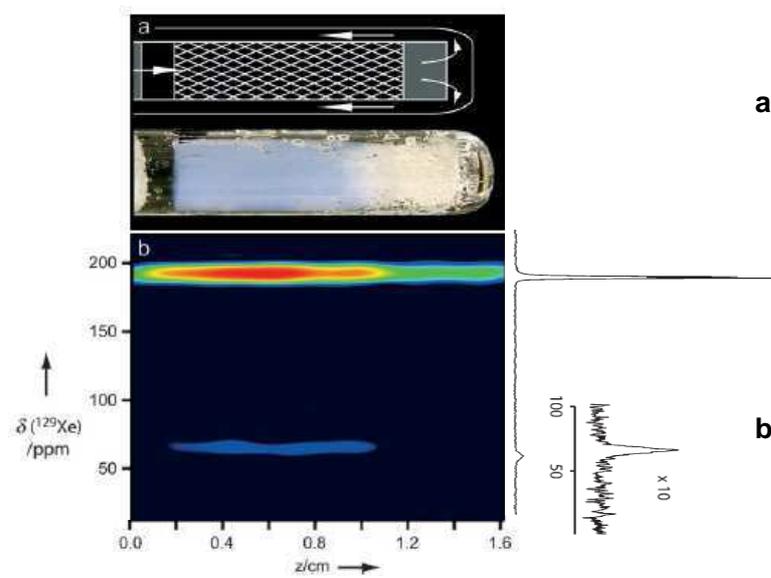


Figure 69: (a) avidine immobilisée sur support solide, (b) image par RMN ^{129}Xe hyperpolarisé de la distribution spatiale du complexe biosonde biotine / avidine

- Biosonde à brin d'ADN

L'équipe de J-P Dutasta et T. Brotin a mis au point la synthèse d'une biosonde constituée d'un cryptophane relié de manière covalente à un brin d'ADN⁷⁷. Cette biosonde reconnaît la présence du brin d'ADN complémentaire en solution, ce qui s'accompagne d'une variation du déplacement chimique du xénon encapsulé (Figure 70).

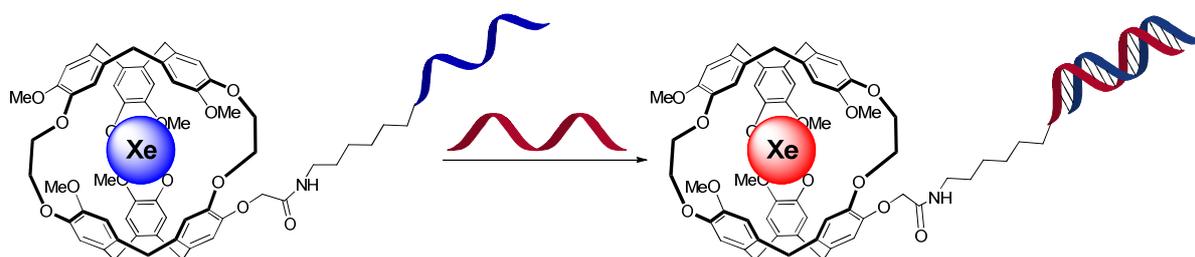


Figure 70: biosonde à brin d'ADN

Cette biosonde est obtenue en dix-sept étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse du brin d'ADN, avec un rendement inférieur à 0,5 % (Figure 66). Après l'activation du cryptophane **18** avec du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) pour former **52**, un couplage peptidique avec le brin d'ADN **53** permet d'obtenir la biosonde finale **54** (Figure 71).

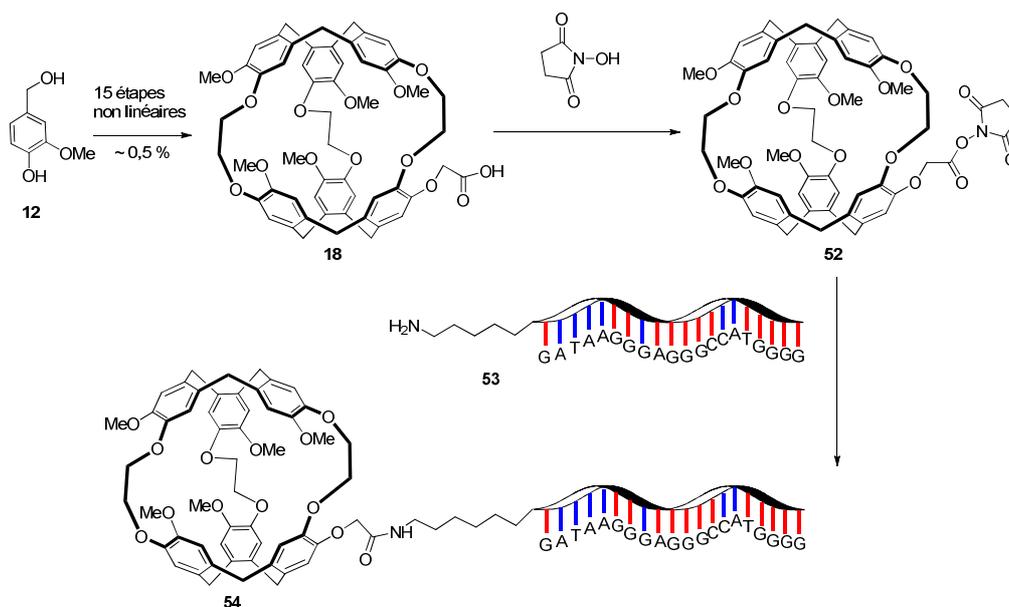


Figure 71: schéma de synthèse de la biosonde brin d'ADN

Les spectres ^{129}Xe RMN montrent à faible concentration (de l'ordre du micromolaire) un déplacement chimique du xénon différent selon l'état d'hybridation du brin d'ADN (Figure 72-1).

À plus forte concentration (de l'ordre du millimolaire), les spectres xénon de la biosonde **54** seule et en présence d'un brin non complémentaire présentent une forme particulière avec trois pics principaux (Figure 72-2). Ceci peut s'expliquer par la formation d'objet supramoléculaire de type micelle, due au fort caractère hydrophobe du cœur cryptophane et au caractère hydrophile de l'ADN. Ce phénomène n'est pas observé en présence du brin d'ADN complémentaire qui apporte une très forte solubilité aqueuse à **54**.

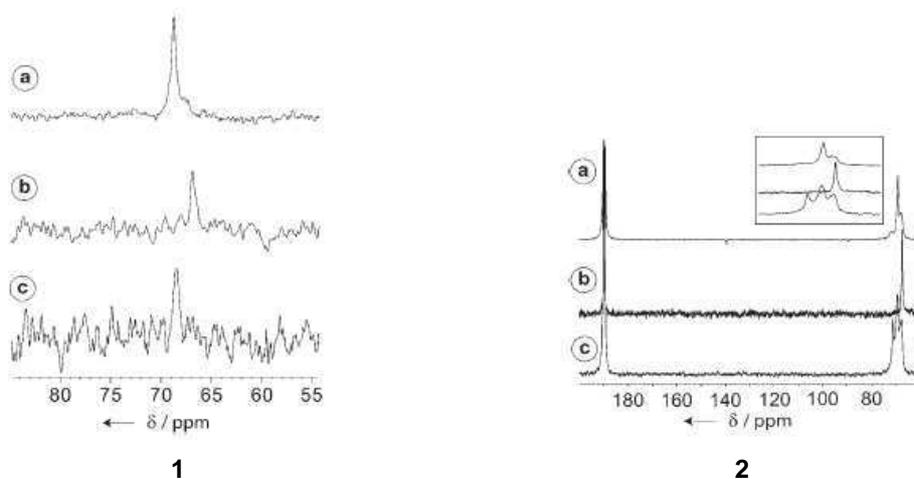


Figure 72: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé dans D_2O
1: à faible concentration ($\sim \mu\text{M}$), (a) **54** seule, (b) **54** en présence d'un brin d'ADN complémentaire, (c) **54** en présence d'un brin d'ADN non complémentaire. **2**: à haute concentration ($\sim \text{mM}$)

- Biosonde à pH

En 2010, l'équipe de J-P. Dutasta et T. Brotin, en collaboration avec l'équipe de P. Berthault, s'est intéressée au cryptophane **44** comme sonde à pH (Figure 73)⁸³. Cette biosonde pourrait permettre la localisation de cellules de faible pH (cellule entrant en acidose) par mesure du pH local autour de 4,7.

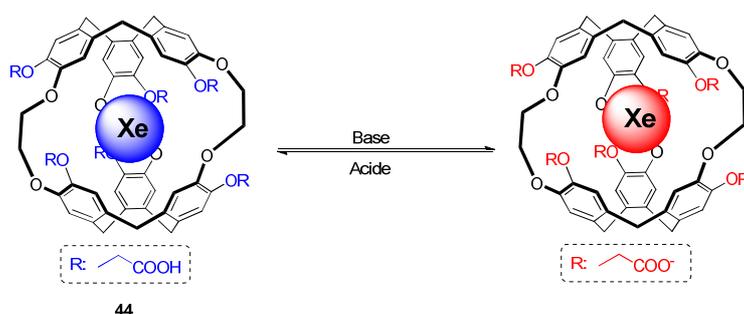


Figure 73: biosonde à pH

Cette biosonde est synthétisée 10 étapes non linéaires avec un rendement global de 1,4 % (Figure 64).

Les spectres RMN ^{129}Xe (Figure 74) montrent la sensibilité du xénon en fonction du pH de la solution. Entre un pH acide (3,5) et un pH basique (10,8), un déplacement chimique de presque 4 ppm est observé. La courbe de titration du cryptophane **44** (déplacement chimique du xénon en fonction du pH) permet de déterminer un pKa des fonctions acide du cryptophane de $4,65 \pm 0,05$, comparable aux valeurs de la littérature.

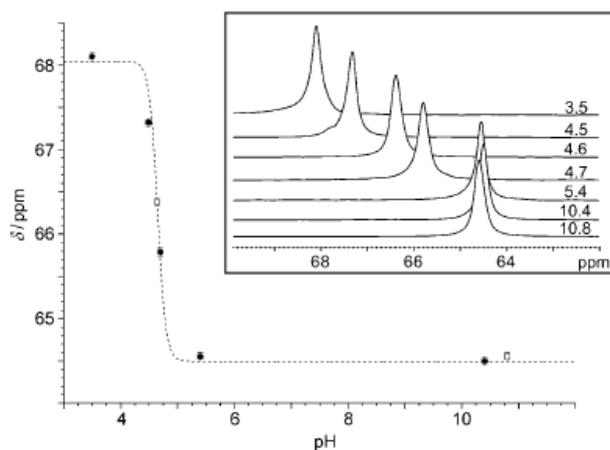


Figure 74: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé dans D_2O sur une gamme de pH de 3,5 – 10,8 et courbe de titration (déplacement chimique en fonction du pH) obtenue avec une solution de KOD. (Concentration en biosonde de 1 mM)

iii. Équipe d'I. Dmochowski

L'équipe d'I. Dmochowski s'est intéressée au design de trois biosondes à base de cryptophane pour le diagnostic précoce de cancers par IRM ^{129}Xe .

- Biosonde MMP-7

Cette équipe a mis au point, en 2006, la synthèse d'une biosonde permettant de cibler la MMP-7 (matrilysine), une métalloprotéase matricielle surexprimée à la surface de nombreuses cellules cancéreuses, en particulier celles du poumon et du colon⁷⁸.

Pour cela, un peptide reconnu spécifiquement par la MMP-7 a été attaché au cryptophane **16** pour former la biosonde **55**. Puis, sous l'action de la métalloprotéase, le peptide va être clivé pour donner **56** (Figure 75).

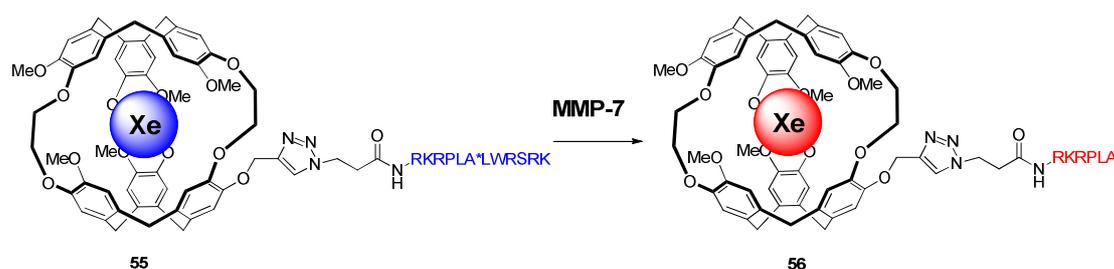


Figure 75: biosonde MMP-7

55 et **56** sont obtenues en treize étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse des peptides présentant une fonction azoture (**57** et **58**), avec un rendement de l'ordre de 1,9 % (Figure 56). Une étape finale de fonctionnalisation par cycloaddition de Huisgen avec les peptides **57** ou **58** et le cryptophane **16** portant une fonction alcyne terminal permet d'obtenir **55** et **56** (Figure 76).

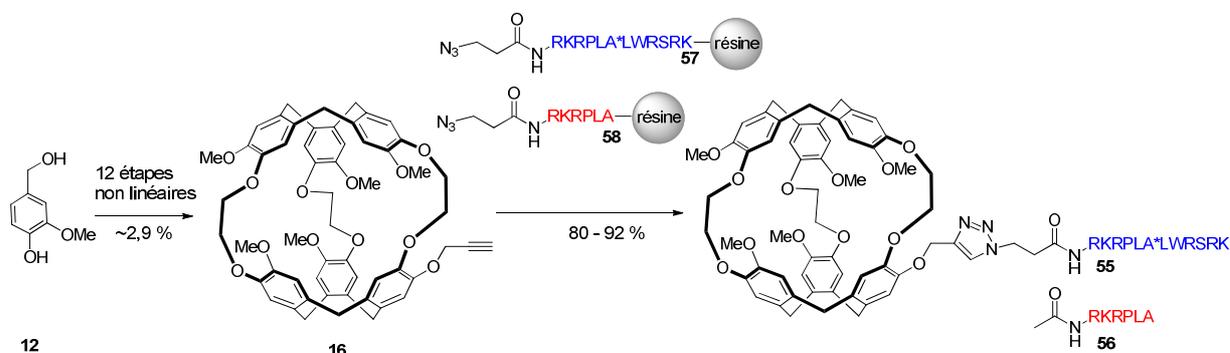


Figure 76: schéma de synthèse de la biosonde MMP-7

Comme dans le cas de la biosonde biotine / avidine, **55** et **56** sont présents sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères due à l'introduction de L-acides aminés chiraux (**57** ou **58**). La biosonde **55** montre deux résonances observées en RMN ^{129}Xe à 61,8 et 62,4 ppm (Figure 77). Lorsque le peptide porté par **55** est coupé par la MMP-7 pour conduire à **56**, deux nouvelles résonances apparaissent à 62,2 et 61,4 ppm. La faible différence de déplacement chimique du xénon entre **55** et **56** peut s'expliquer par le trop grand éloignement entre l'intérieur du cryptophane dans lequel va entrer et sortir le xénon et la séquence d'acides aminés éliminés par coupure enzymatique.

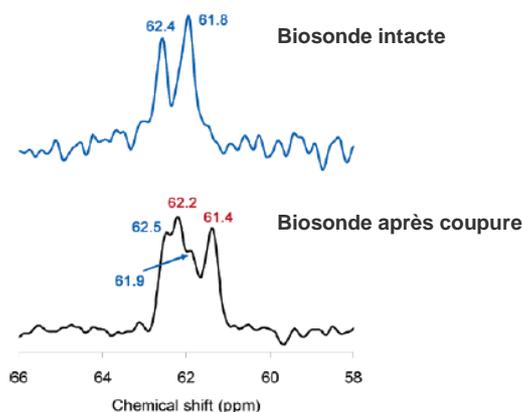


Figure 77: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé dans D_2O de **55** (en haut, 154 μM , bleu) et du mélange (en bas) **55** (I, 77 μM , bleu) avec **56** (95 μM , rouge)

- Biosonde anhydrase carbonique

Les anhydrases carboniques (CAs) sont des metalloenzymes à zinc qui catalysent la réaction d'hydratation de CO_2 pour former l'acide carbonique H_2CO_3 . Elles sont souvent surexprimées dans les cellules cancéreuses. Les principaux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique contiennent des groupements sulfonamines qui viennent coordonner l'ion Zn^{2+} . L'équipe d'I. Dmochowski a synthétisé une biosonde ciblant les anhydrases carboniques I et II.^{88, 89}

Pour ce faire, un groupement sulfonamine a été couplé à un cryptophane hydrosoluble. Ce groupement chélate Zn^{2+} et forme ainsi un nouveau complexe d'anhydrase carbonique (Figure 78).

⁸⁸ J. M. Chambers, P. A. Hill, J. A. Aaron, Z. Han, D. W. Christianson, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 563

⁸⁹ J. A. Aaron, J. M. Chambers, K. M. Jude, L. Di Costanzo, I. J. Dmochowski, D. W. Christianson *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6942

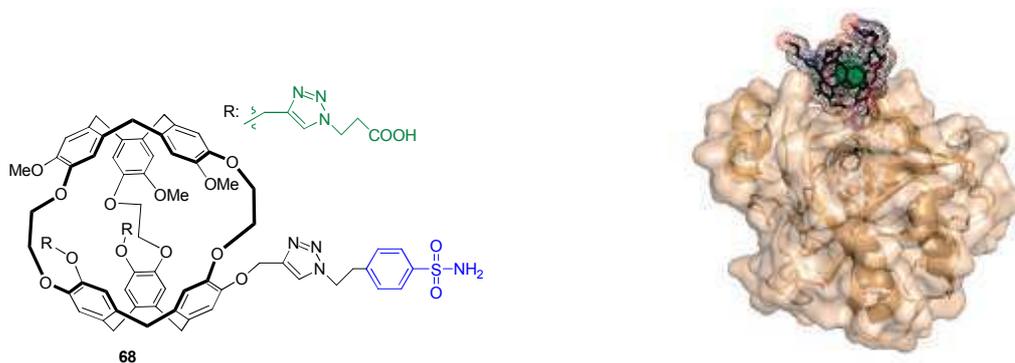


Figure 78: biosonde anhydrase carbonique - À gauche: biosonde comportant le groupement sulfonamine (bleu) et des bras solubilisants (vert) - À droite: structure cristallographique montrant les interactions du complexe **68** encapsulant du xénon avec l'anhydrase carbonique II

La biosonde est obtenue en treize étapes non linéaires avec un rendement de l'ordre de 1,2 %. Les trois triples liaisons du cryptophane **32** (Figure 60) ont été séquentiellement engagées dans une réaction de cycloaddition de Huisgen avec deux ligands azotures différents: une première réaction de chimie *click* permet d'accéder aux composés **62**, **63** et **64** portant un groupement sulfonamine (respectivement **59**, **60** et **61**). Puis une seconde cycloaddition conduit aux composés **66**, **67** et **68** portant deux groupements acide carboxylique. Chacun de ces ligands (**59**, **60**, **61** et **65**) est préalablement synthétisé en une étape. Les cryptophanes **66**, **67** et **68** se distinguent par la longueur du bras entre le cryptophane et le groupement sulfonamine (Figure 79).

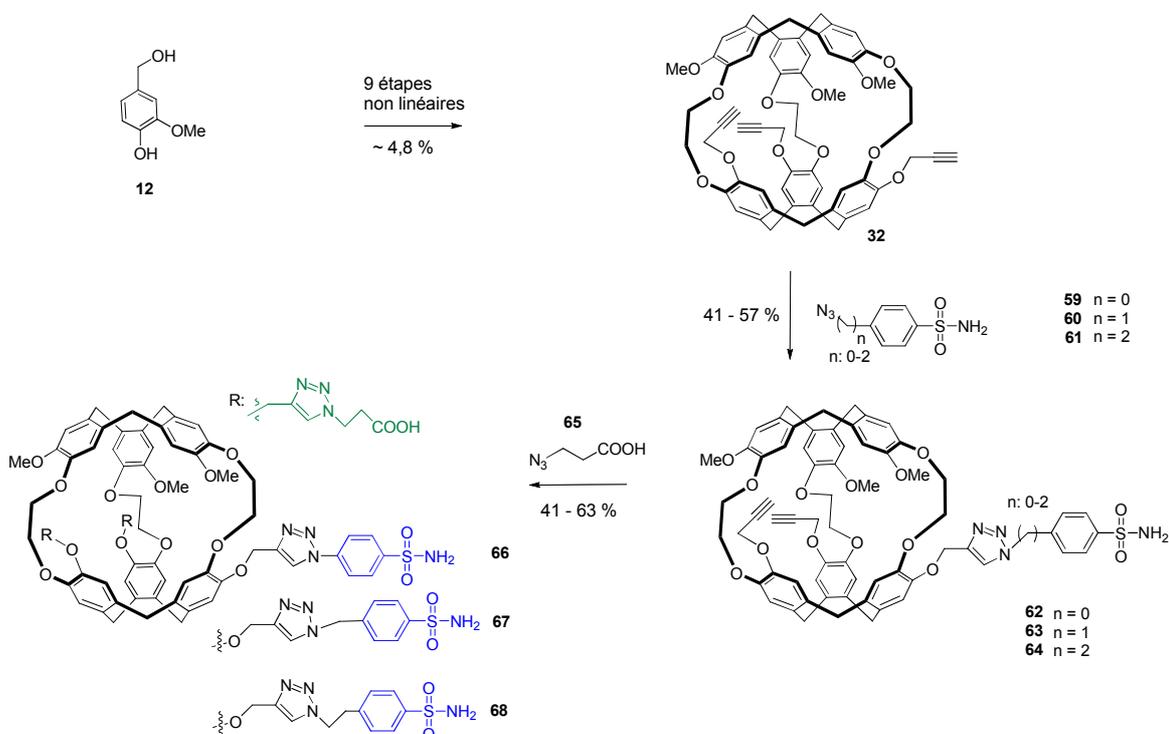


Figure 79: schéma de synthèse des biosonde **66**, **67** et **68**

Le xénon encapsulé dans **66**, **67** et **68** ne montre qu'une seule résonance respectivement à 63,5, 63,9 et 62,9 ppm (Figure 80 (a), (c), (e)). L'addition d'anhydrase carbonique dans la solution contenant la biosonde entraîne une modification du déplacement chimique du xénon de 3 à 5 ppm (Figure 80 (b), (d), (f)). Cette modification est plus importante dans le cas du cryptophane **66** qui possède le bras le plus court entre le cryptophane et le groupement sulfonamine (Figure 80 (a) et (b)).

Dans le cas du complexe entre le cryptophane **68** et l'anhydrase carbonique deux pics à 67.9 et 66.3 ppm sont observés (Figure 80 (f)). En effet, l'anhydrase carbonique étant chirale, il se forme une paire de cryptophanes diastéréoisomères.

Pour les cryptophanes **66** et **67** complexés avec l'enzyme, la formation d'un seul pic est observée. Selon Dmochowski, les deux cryptophanes énantiomères complexés sont trop proches de l'environnement de la protéine et produisent des signaux en RMN ^{129}Xe équivalents (Figure 80 (b), (d)).

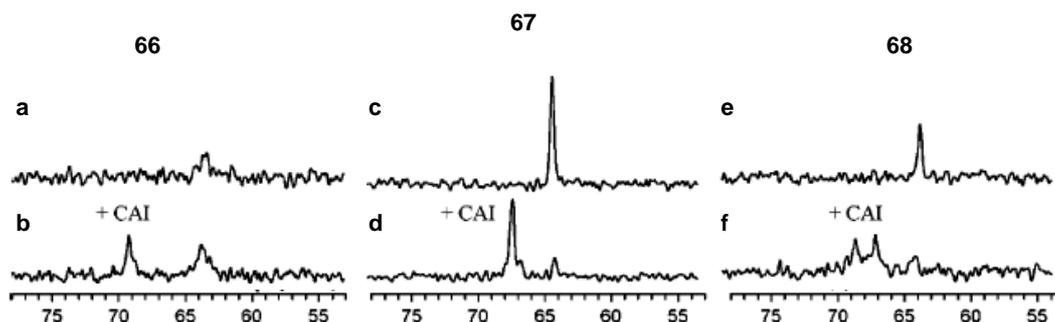


Figure 80: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé des différentes biosondes dans 50 mM d'un tampon Tris, pH 8.0 (a,c,e) spectres RMN ^{129}Xe des biosondes seules en solution, (b,d,f) spectres RMN ^{129}Xe des biosondes en présence de CAI (a) **66** seule (96 μM); (b) **66** (188 μM) et CAI (141 μM); (c) **67** seule (186 μM); (d) **67** (136 μM) et CAI (100 μM); (e) **68** seule (121 μM); (f) **68** (189 μM) et CAI (141 μM)

- **Biosonde RGD**

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques responsables de nombreux phénomènes d'adhésion d'une part entre cellules et d'autre part entre cellules et matrice extracellulaire. Leur dysfonctionnement peut engendrer des maladies telles le développement et la dispersion des tumeurs cancéreuses. En particulier, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ jouent un rôle crucial dans ces maladies. La séquence de trois acides aminés arginine - glycine - acide aspartique (RGD) correspond au site de liaison de plusieurs intégrines et a servi de base à la conception de nombreux inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

L'équipe d'I. Dmochowski s'est intéressée à la synthèse de biosondes cryptophane qui ciblent spécifiquement les cellules surexprimant les récepteurs intégrines $\alpha_v\beta_3$ à l'aide de peptide linéaire tetra-RGD⁵⁵ (Figure 81) ou de peptide cyclique RGD (Figure 82)⁹⁰.

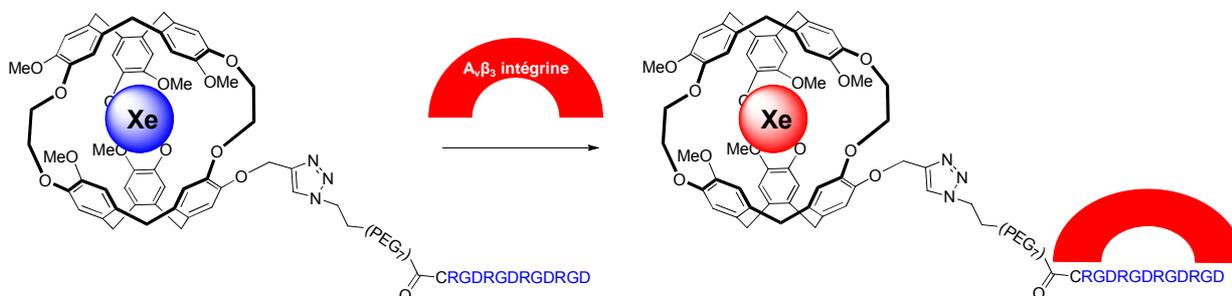


Figure 81: biosonde pour la détection du complexe peptide linéaire tétra-RGD / $\alpha_v\beta_3$ intégrine

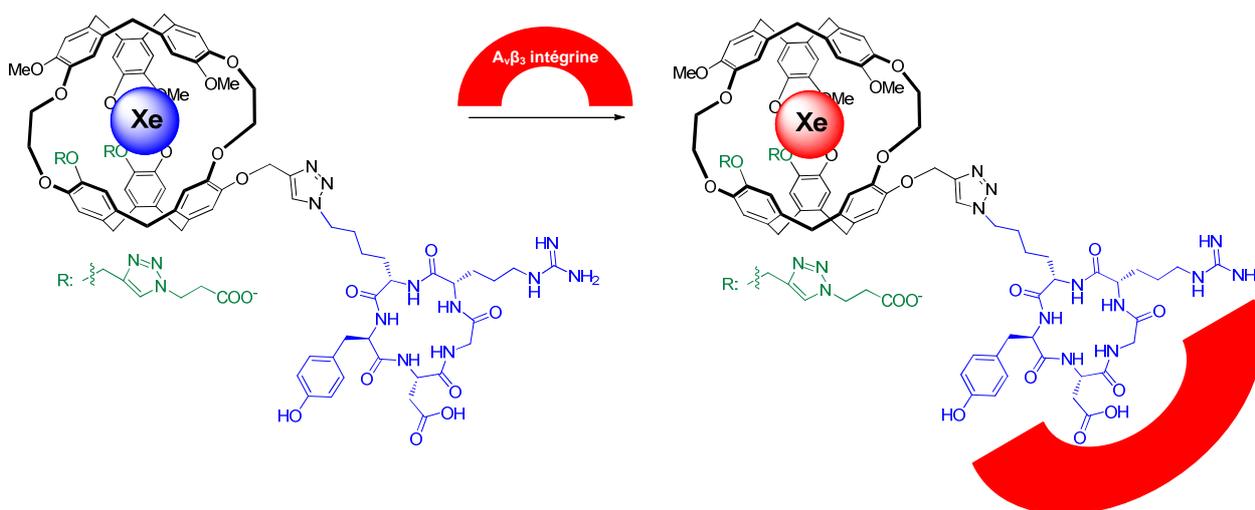


Figure 82: biosonde pour la détection du complexe peptide cyclique RGD / $\alpha_v\beta_3$ intégrine

Les RGD cycliques (c[RGDyK]) sont connus pour cibler les récepteurs intégrines $\alpha_v\beta_3$ avec une affinité environ dix fois supérieure à celle des tétra-RGD linéaires. Dans cette partie, on s'intéressera plus particulièrement à l'étude du cryptophane couplé au peptide RGD cyclique.

La biosonde **72** est obtenue en 9 étapes non linéaires, sans tenir compte de la synthèse du peptide RGD (Figure 83). Le cryptophane **32** (Figure 61) va subir trois cycloadditions de Huisgen

⁹⁰ G. K. Seward, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.*, **2011**

successives permettant de le fonctionnaliser par le RGD cyclique **69** et de le rendre partiellement hydrosoluble. Pour ce faire, une première cycloaddition conduit au composé **70** comportant le RGD **69**. Puis, une seconde cycloaddition permet d'accéder à **72** portant deux groupements acide carboxylique.

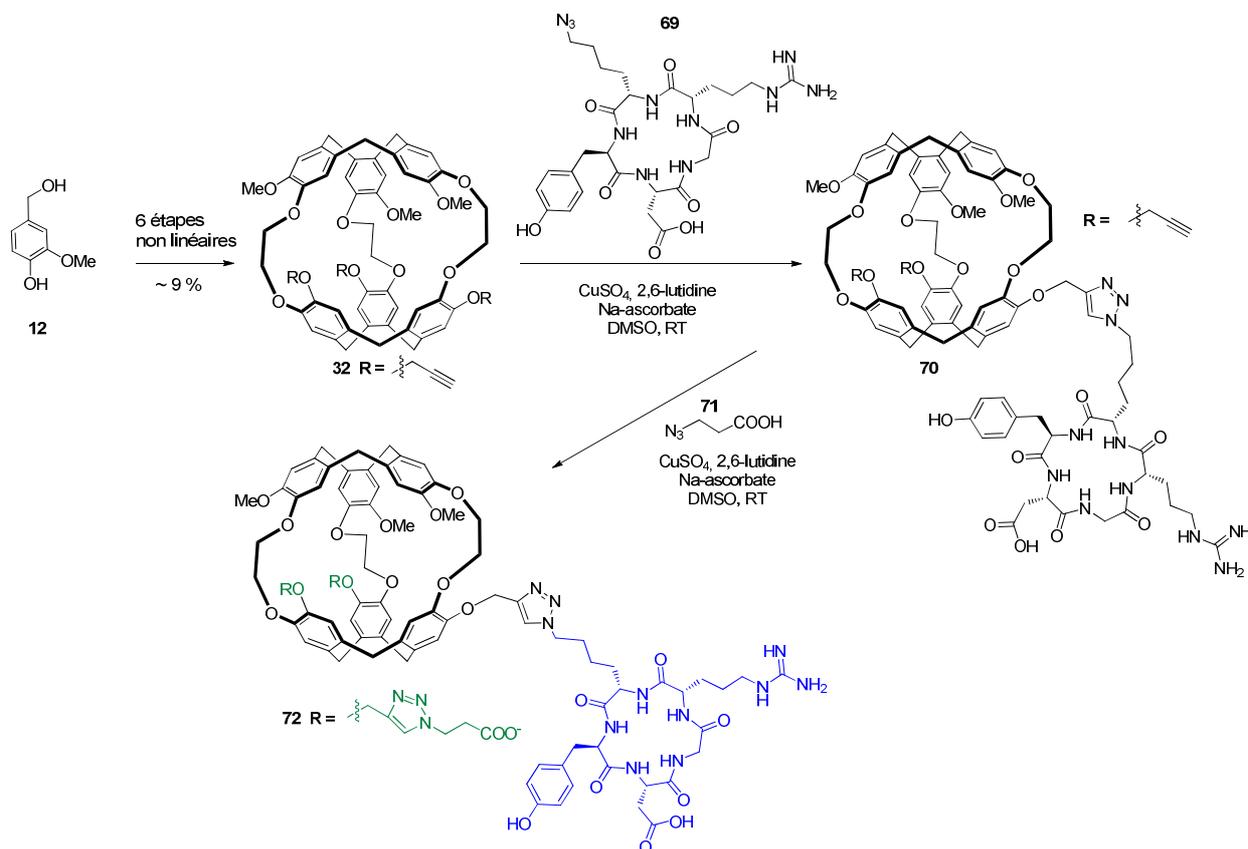


Figure 83: schéma de synthèse de la biosonde $\alpha_v\beta_3$ intégrine **72**

Le spectre RMN ¹²⁹Xe de la biosonde **72** seule montre un déplacement chimique de 65,8 ppm (voir Figure 84 (a)). En présence de récepteurs intégrines $\alpha_v\beta_3$, on observe l'apparition d'un second pic à 71,2 ppm, décalé d'environ 4 ppm par rapport au signal de **72** seule, correspondant au complexe biosonde / $\alpha_v\beta_3$ intégrine (Figure 84 (b)). Après ajout d'un excès de peptide cyclique libre c[RGDyK] dans la solution, le complexe peptide libre / intégrine se forme préférentiellement par rapport au complexe biosonde / intégrine et le pic correspondant à ce dernier disparaît (Figure 84 (c)).

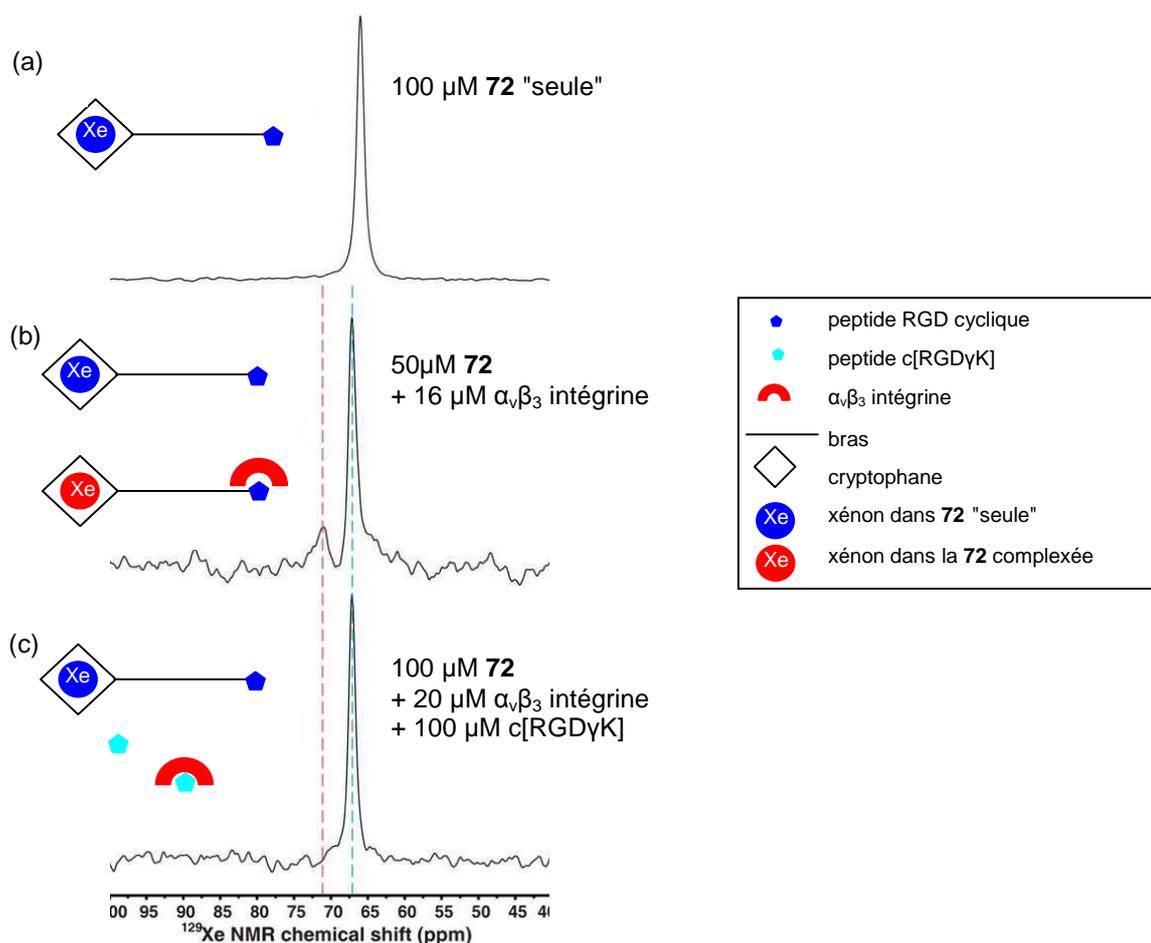


Figure 84: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé obtenus de **72** seule (a), en présence $\alpha_v\beta_3$ intégrine (b) et en présence du peptide c[RGD γ K] (c) – tampon Tris (1mM, pH 7,2)

Avec ces cryptophanes comportant des groupements RGD, l'équipe d'I. Dmochowski a également montré la possibilité d'internaliser les cryptophanes (1 μM) dans les cellules à l'aide des récepteurs intégrines.

Il est important de noter que des expériences en RMN ^{129}Xe hyperpolarisé à l'intérieur des cellules ont été réalisées pour la première fois par l'équipe de P. Berthault (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 4135). Ces résultats sont très encourageants pour les applications *in vivo* futures.

iv. Équipe de C. Freund

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sont des glycoprotéines membranaires fixant des centaines de peptides différents pour les présenter aux récepteurs des lymphocytes T. Elles peuvent jouer un rôle important dans le développement de maladies auto-immunes. L'équipe de C. Freund a mis au point en 2009 la synthèse d'une biosonde RMN ^{129}Xe pour détecter la formation du complexe peptide antigénique / protéines CMH de type II⁷⁹. Ces auteurs se sont intéressés aux interactions entre le peptide HA, de séquence PKYVKQNTLKLAT, issu de l'hémagglutinine du virus influenza, et la molécule du CMH HLA-DR1 (Figure 85).

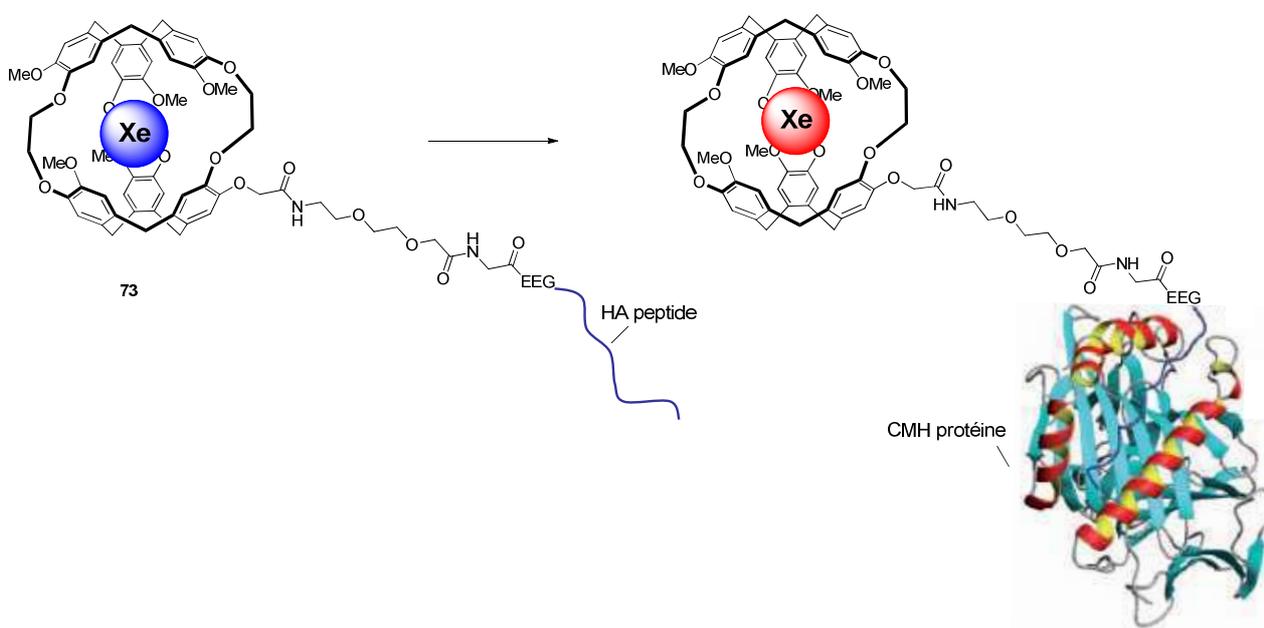


Figure 85: biosonde pour la détection du complexe peptide antigénique/CMH II

La biosonde **73** est synthétisée à partir du cryptophane **18**. Le peptide HA est couplé au cryptophane par l'intermédiaire d'un bras espaceur composé d'un petit peptide PEGylé hydrosoluble.

Le spectre RMN ^{129}Xe montre un écart de déplacement chimique de 1 ppm entre **73** seule et **73** complexée à la protéine (Figure 86).

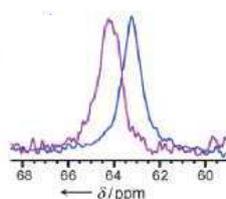


Figure 86: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé obtenus de **73** seule (bleu) et en présence de CMH (violet). Concentration en biosonde de (10 μM) dans D_2O

IV. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS

Au cours de ces dix dernières années, de nombreuses études concernant la synthèse de biosondes pour des applications en IRM ^{129}Xe ont été réalisées. En 2001, l'équipe d'A. Pines et D. Wemmer a mis au point la première biosonde en RMN ^{129}Xe pour la détection du complexe biotine / avidine en greffant une biotine sur un cryptophane². L'équipe d'I. Dmochowski a ensuite étendu le domaine d'application des biosondes avec la détection de MMP en utilisant un cryptophane décoré par un substrat enzymatique⁷⁸. Ce groupe de chercheurs a également détecté par RMN ^{129}Xe l'anhydrase carbonique à l'aide de ligands enzymatiques greffés sur des cryptophanes^{88,89}. Récemment, cette même équipe a conçu une biosonde cryptophane possédant un peptide RGD cyclique pour cibler les intégrines par RMN ^{129}Xe ⁹⁰. En parallèle, l'équipe de J-P. Dutasta et de T. Brotin a développé un cryptophane marqué par un brin d'ADN pour la reconnaissance de séquence de nucléotides spécifiques⁷⁷. Ils ont mis au point une biosonde à pH à partir d'un cryptophane comportant 6 fonctions acide carboxylique⁸³. Pour terminer, l'équipe de C.Freund a détecté par RMN ^{129}Xe les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en utilisant un ligand spécifique greffé sur un cryptophane⁷⁹.

Toutes les biosondes décrites ci-dessus ont été étudiées soit dans de l'eau, soit dans des solutions tampon, à pH physiologique. Il est également possible d'observer le phénomène d'encapsulation du xénon dans les cryptophanes dans d'autres milieux, comme le plasma humain⁹¹ ou encore dans un environnement lipidique⁹². Ces résultats sont très encourageants pour le développement de nouvelles biosondes à partir de cryptophane pour des applications *in vivo*.

Jusqu'à présent, aucune biosonde n'a encore été obtenue à partir du cryptophane-111 et aucune fonctionnalisation n'a été réalisée malgré ses excellentes propriétés d'encapsulation du xénon. C'est pourquoi, dans une première partie de ma thèse, nous nous sommes fixés comme objectif

⁹¹ P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9262

⁹² T. Meldrum, L. Schröder, P. Denger, D. E. Wemmer, A. Pines, *Journal of Magnetic Resonance*, **2010**, 205, 24

de fonctionnaliser pour la première fois le cryptophane-111 et de concevoir de nouvelles biosondes à partir de cette molécule cage.

D'autres part, toutes ces biosondes décrites précédemment ont été réalisées suivant trois grandes voies de fonctionnalisation (mono-, tri- et hexa-fonctionnalisation), mais en général les étapes sont nombreuses, les rendements faibles et souvent des problèmes d'hydrosolubilité apparaissent. C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à la mise au point d'une synthèse rapide et efficace de cryptophanes hydrosolubles et fonctionnalisables pouvant être vus comme une plateforme générale pour l'obtention d'un éventail de biosondes.

Pour terminer, nous nous sommes penchés sur la synthèse de cryptophanes originaux pouvant présenter des propriétés d'encapsulation intéressantes.

PARTIE B

**SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION
DU CRYPTOPHANE-111**

B. SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION DU CRYPTOPHANE-111

Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie A. II. 3. b. vi, le plus petit cryptophane synthétisé à ce jour (le cryptophane-111) présente de très bonnes propriétés d'encapsulation du xénon³:

- il possède, parmi les cryptophanes organosolubles déjà existants, la plus grande constante d'affinité pour le xénon, soit $10\,000\text{ M}^{-1}$ à 293 K dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane- d_2 .
- la vitesse d'entrée / sortie du xénon dans la cage (vitesse de sortie = $2,4\text{ s}^{-1}$ et temps moyen de résidence = 0,4 s à 293 K) ainsi que le temps de relaxation du xénon dans le cryptophane (12,1 s à 293 K) sont tout à fait adaptés pour des études en RMN ^{129}Xe .
- le ratio entre le volume du xénon (42 \AA^3) et le volume interne de la cavité du cryptophane-111 (81 \AA^3) est égal à 0,52 et il se rapproche du ratio optimal prédit par Rebek ($0,55 \pm 0,09$)³⁰.

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de ce cryptophane et à sa fonctionnalisation en vue de construire de nouvelles biosondes en IRM ^{129}Xe .

I. SYNTHÈSE DÉCRITE DANS LA LITTÉRATURE

Le cryptophane-111 (**11**) a été synthétisé pour la première fois par l'équipe de J-P. Dutasta et T. Brotin en 2007 (Figure 87)^{3, 93}. Il est obtenu en sept étapes linéaires à partir de l'alcool vanillique (**12**), avec un rendement global de synthèse de 1,5 %.

La fonction phénol de l'alcool vanillique **12** est d'abord protégée par un groupement allyle pour obtenir le composé **74**. Ce dernier peut être soit directement engagé dans l'étape de cyclotrimérisation soit être protégé par un groupement tetrahydropyranyle (THP) afin de faciliter la purification et de diminuer la formation de nombreux sous produits lors de la cyclotrimérisation⁹⁴. Dans le cas où **74** est engagé directement, le CTV **78** est obtenu en présence de triflate de scandium avec un rendement de 55 %. Le triflate de scandium est utilisé en quantité catalytique et permet l'obtention de CTV avec de bons rendements tout en diminuant la formation de produits secondaires⁹³. Le groupement allyle est ensuite clivé pour donner le CTV **79** qui, à son tour, va être activé sous forme de triflate (CTV **80**). Une coupure au palladium conduit au composé **81** portant trois fonctions méthoxy. Les groupements méthoxy du CTV **81**

⁹³ T. Brotin, V. Roy, J-P. Dutasta, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 6187

⁹⁴ T. Brotin, T. Devic, A. Lesage, L. Emsley, A. Collet, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*

sont ensuite déprotégés au tribromure de bore pour donner le CTV tri-phénol **10**. Enfin, le cryptophane-111 (**11**) est obtenu par couplage de deux CTV **10** en présence de chlorobromométhane.

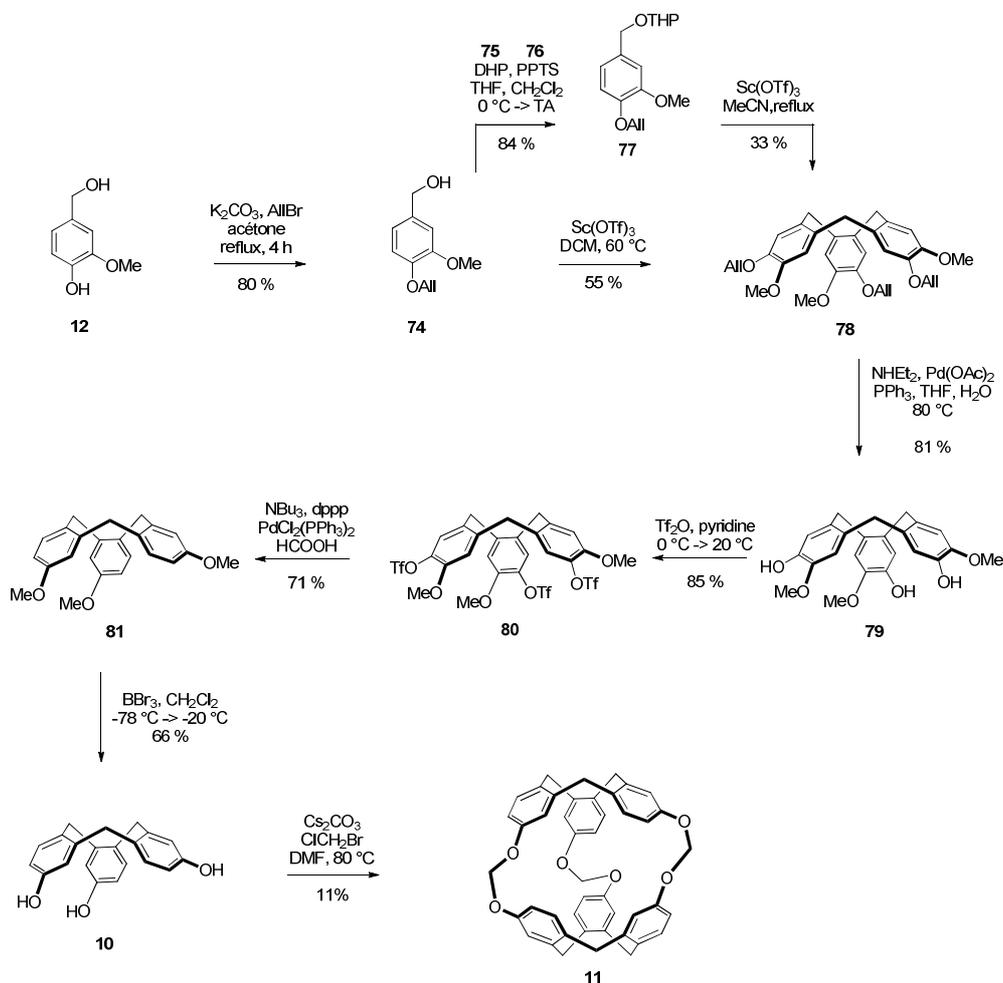


Figure 87: première synthèse du cryptophane-111

Cette stratégie de synthèse a donc permis d'obtenir pour la première fois le cryptophane-111. Cependant les étapes sont nombreuses et le rendement final faible. Elle semble difficilement adaptée à une synthèse à grande échelle. Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse est de participer au développement d'une méthode de synthèse simple et rapide pour l'obtention du cryptophane-111 à grande échelle. Le deuxième objectif sera de mettre au point les premières fonctionnalisations de ce cryptophane, permettant ainsi l'accès à de nouvelles biosondes pour l'IRM ^{129}Xe .

II. NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE DU CRYPTOPHANE-111

1. Nouvelle stratégie de synthèse

a. Approche rétro-synthétique

Le schéma rétrosynthétique proposé pour l'obtention du cryptophane-111 est présenté dans la Figure 88.

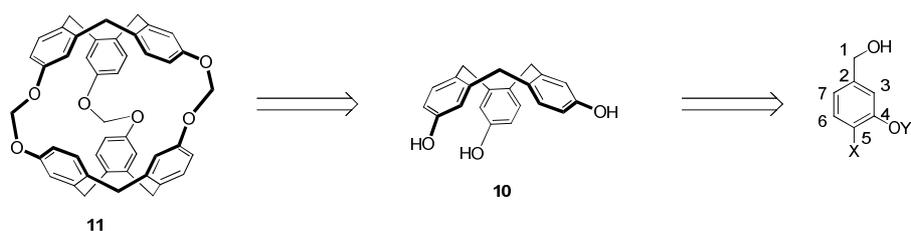


Figure 88: schéma rétrosynthétique de la synthèse du cryptophane-111

Le cryptophane **11** serait obtenu comme dans la méthode décrite précédemment par couplage de deux CTV **10**. Ce couplage devra être optimisé afin d'augmenter le rendement connu de 11 %. La molécule **10** pourrait être synthétisée par réaction de cyclotrimérisation à partir d'un alcool benzylique judicieusement substitué.

b. Choix de l'alcool benzylique de départ

L'objectif de cette nouvelle voie de synthèse étant de minimiser le nombre d'étapes sans pour autant diminuer le rendement global, l'alcool benzylique de départ devra répondre aux critères suivants:

- être commercial
- posséder un groupement donneur en position 4 afin d'orienter la cyclotrimérisation en position 7

Le CTV **10** serait idéalement obtenu en une étape à partir du 3-hydroxy alcool benzylique **82** (Figure 89).

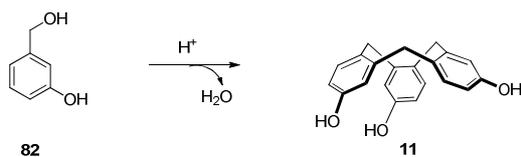


Figure 89: obtention du CTV **11** en une seule étape

Cependant, lors de cette cyclotrimérisation, des réactions d'addition électrophile peuvent avoir lieu en position 5 et conduire à de nombreux produits secondaires et donc à un faible rendement⁷³.

En plus des critères décrits précédemment, on choisira l'alcool benzylique de départ de telle façon que:

- l'alcool benzylique de départ devra posséder un groupement protecteur en position 5
- les groupements protecteurs 4 et 5 devront être idéalement éliminés en une seule et même étape.

Notre choix s'est orienté sur le produit commercial suivant: l'alcool 3-hydroxy-4-iodobenzyle **83** (Figure 90).

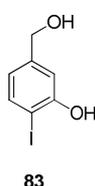


Figure 90: alcool 3-hydroxy-4-iodobenzyle

La fonction phénol pourra être protégée par un groupement benzyle. Les réactions de déiodation et de débenzylation ayant lieu en présence de palladium et de dihydrogène, ces deux groupements devraient pouvoir être éliminés lors d'une seule et même étape.

2. Schéma de synthèse

Le schéma de synthèse réalisé dans notre laboratoire est présenté dans la Figure 91.

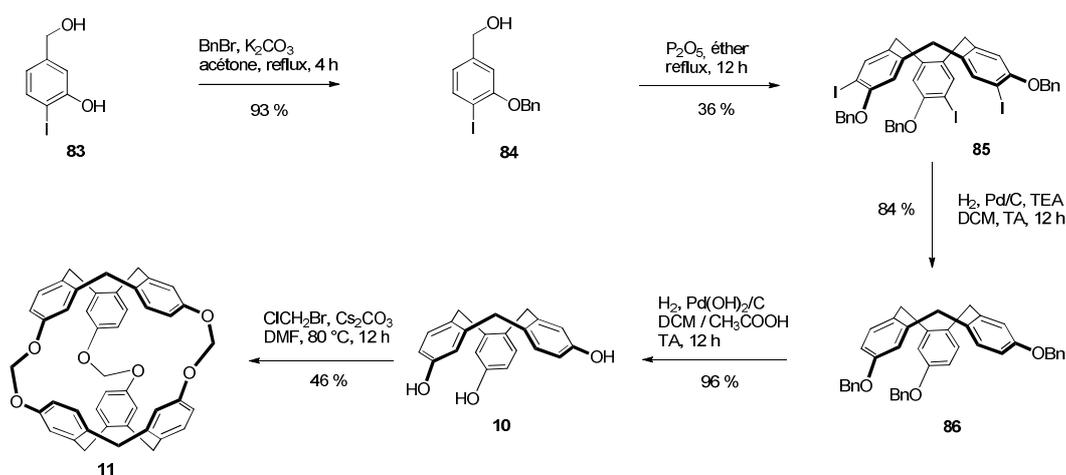


Figure 91: nouveau schéma de synthèse du cryptophane-111

Ces travaux ont fait l'objet de la thèse du Dr. Ténin Traoré et j'ai participé à ce projet en resynthétisant chaque intermédiaire et en développant une fonctionnalisation du cryptophane-111 par chimie du palladium.

La première étape de synthèse est une réaction de protection de la fonction phénol du composé **83** par un groupement benzyle pour conduire à l'alcool benzylique **84** avec un rendement de 93 %. Pour ce faire, le phénol est mis en présence de carbonate de potassium et de bromure de benzyle dans l'acétone à reflux pendant 4 heures. **84** est obtenu suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante.

La deuxième étape de synthèse est une réaction de cyclotrimérisation du composé **84** pour donner le CTV **85**. Parmi tous les acides testés (triflate de scandium, acide perchlorique, acide phosphorique et penta-oxyde de phosphore (P_2O_5)), seule la méthode utilisée par Cram⁷⁵: (P_2O_5 dans l'éther à reflux) a conduit à la formation du CTV **85**. Après optimisation du rendement en jouant sur le nombre d'équivalents de P_2O_5 , le composé **85** est isolé par recristallisation avec un rendement de 36 %.

La troisième étape est une réaction de déiodation du composé **85** pour conduire au CTV **86**. Pour ce faire, **85** est mis en présence d'une atmosphère de dihydrogène, de 10 % de palladium sur charbon et de triéthylamine, dans le dichlorométhane, à température ambiante pendant 12 heures. Cette réaction conduit à la formation du composé **86** avec un rendement de 84 %, suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante. Il est important de noter que tous les essais de déiodation et de débenzylation en une seule étape n'ont pas abouti.

La quatrième étape est, de ce fait, une réaction de débenzylation. Elle conduit au CTV **10**, précurseur-clé pour l'obtention du cryptophane-111. Plusieurs conditions ont été testées: avec différentes sources de palladium (Pd/C ou $Pd(OH)_2/C$), à différentes pressions (un ou quarante bars de dihydrogène). Le CTV **10** est finalement obtenu sous une atmosphère de dihydrogène, en présence de 20 % de $Pd(OH)_2/C$ dans un mélange d'acide acétique/dichlorométhane 0,5 : 1 à température ambiante pendant 12 heures. Il est alors isolé pur avec un rendement de 96 %. La réaction précédente s'effectuant en milieu basique, il n'aurait donc pas été possible de débenzyler et déioder en même temps.

Le cryptophane **11** est finalement obtenu dans une dernière étape par couplage de deux CTV **10** avec le chlorobromométhane. Comme nous l'avons vu précédemment, cette approche est décrite dans la littérature avec un rendement de 11 %.

Afin d'optimiser ce rendement, différentes conditions réactionnelles ont été testées en jouant sur le nombre d'équivalents de chlorobromométhane et de Cs_2CO_3 et la température. Le

cryptophane-111 a finalement été obtenu en présence de 10 équivalents de base et 500 équivalents de chlorobromométhane dans le diméthylformamide à 80 °C pendant 12 heures. **11** a alors été isolé avec un rendement de 46 % sans purification par chromatographie. Après une extraction liquide-liquide, la filtration sur lit de silice a été optimisée afin de séparer les polymères formés lors de la réaction du produit final attendu. De plus, cette réaction est reproductible à grande échelle en partant de 10 g de CTV **10**.

Cette nouvelle synthèse du cryptophane-111 mise au point dans notre laboratoire a donc permis d'obtenir ce composé en cinq étapes avec un rendement global de 12 %⁹⁵.

3. Essais de synthèse du cryptophane-222 dans les mêmes conditions de couplage

La réaction de couplage de deux unités de CTV **10**, étant mise au point pour l'obtention de **11**, nous avons tenté d'obtenir le cryptophane-222 (**87**) dans ces mêmes conditions (Figure 92). Ce cryptophane est actuellement synthétisé en 11 étapes avec 0,56 % de rendement global^{41,93}.

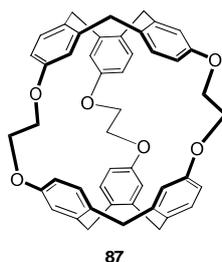


Figure 92: cryptophane-222 (**87**)

Après 12 heures de réaction à 80 °C entre le CTV **10**, le dibromoéthane (500 équivalents) et le carbonate de césium (10 équivalents), les CTV **88** et **89** ont été observés majoritairement en LC/MS. Aucune trace de cryptophane **87** n'a été détectée. (Figure 93)

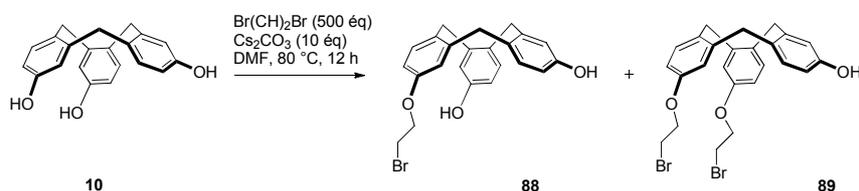


Figure 93: réaction de couplage de CTV **10** avec 500 éq de dibromoéthane

⁹⁵ T. Traoré, L. Delacour, S. Garcia-Argote, P. Berthault, J-C. Cintrat, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 960

Le dibromoéthane étant bien moins réactif que le chlorobromométhane, ce résultat n'est pas si étonnant. Pour l'obtention du cryptophane-111, de tels CTV intermédiaires n'ont jamais été observés par LC/MS.

En jouant sur le nombre d'équivalents de dibromoéthane, il est intéressant de noter la formation de nouveaux intermédiaires de synthèse (Figure 94). Lorsque le couplage de deux CTV **10** est effectué en présence de 10 équivalents de dibromoéthane, le CTV **10** ainsi que deux intermédiaires cryptophanes ouverts **90** et **91** sont alors détectés majoritairement par LC/MS. Des traces de cryptophane **87** sont également observées.

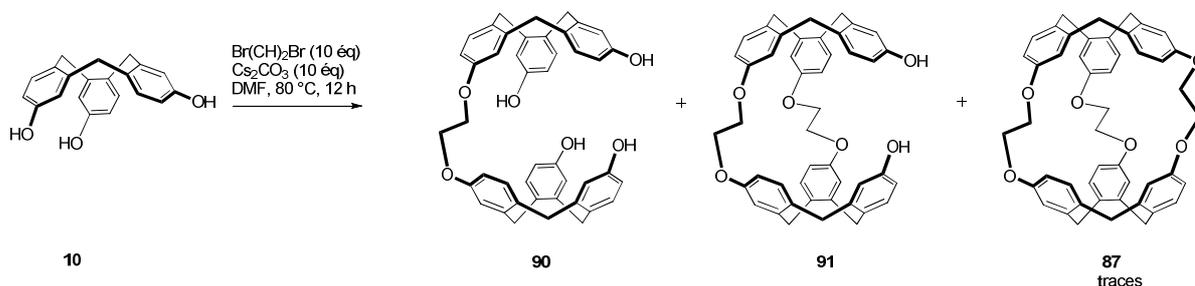


Figure 94: réaction de couplage de CTV **10** avec 10 éq de dibromoéthane, suivi par LC/MS

L'étude de ces intermédiaires ont fait en partie l'objet de la thèse de Naoko Kotera⁹⁶.

III. PREMIÈRE FONCTIONNALISATION DU CRYPTOPHANE-111

La fonctionnalisation du cryptophane-111 n'a encore jamais été réalisée. Ce dernier étant maintenant synthétisable à l'échelle de 10 g dans notre laboratoire, nous nous sommes alors concentrés sur cette étape de fonctionnalisation.

1. Synthèse de cryptophanes halogénés

Les réactions d'iodation et de bromation de fonctions phénoxy sont des réactions largement décrites dans la littérature⁹⁷. La présence de six fonctions phénoxy pour le cryptophane **11** laisse donc supposer la possibilité de réaliser de telles réactions d'halogénéation.

Les réactions d'iodation et de bromation ont été développées au cours de la thèse de Ténin Traoré et j'ai participé à ce projet en mettant au point la méthode de purification de ces molécules et en déterminant la position des halogènes sur le cycle aromatique.

⁹⁶ N. Kotera, L. Delacour, T. Traoré, N. Tassali, P. Berthault, D-A. Buisson, J-P. Dognon, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 9

⁹⁷ H. Togo, G. Nogami, M. Yokoyama, *Synlett*, **1998**, 534.

a. Synthèse du cryptophane mono-iodé **92**

Le cryptophane mono-iodé **92** a été obtenu par réaction du composé **11** en présence de diacétoxy-iodobenzène et de diiode dans le chloroforme à température ambiante (Figure 95).

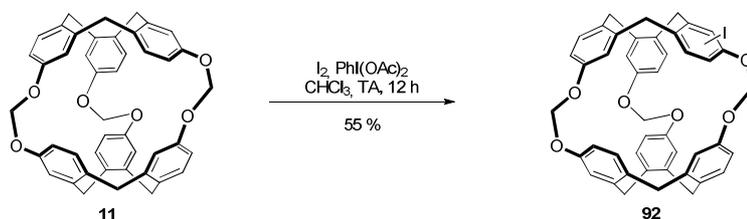


Figure 95: synthèse du cryptophane mono-iodé (**92**)

Différentes conditions ont été testées pour cette réaction: soit par des méthodes classiques avec du diiode, soit par des méthodes utilisant l'iode hypervalent (triflate de iodobenzène ou diacétoxy-iodobenzène). Le meilleur résultat a été obtenu avec le diacétoxy-iodobenzène en présence de diiode. Le nombre d'équivalents de ces deux réactifs ainsi que le temps de réaction ont également été optimisés. En effet, en faisant varier ces deux paramètres, les dérivés mono-, di-odé (**94**) et tri-iodé (**95**) seront obtenus chacun de manière majoritaire. Finalement, lorsque le cryptophane **11** est mis en présence de deux équivalents de diacétoxy-iodobenzène et 2,2 équivalents de diiode pendant 12 heures, le cryptophane **92** est observé majoritairement par LC/MS.

Le brut réactionnel est un mélange de cryptophanes **11**, **92**, **94** et **95** (Figure 96). Une purification par chromatographie sur gel de silice est donc indispensable pour isoler **92**.

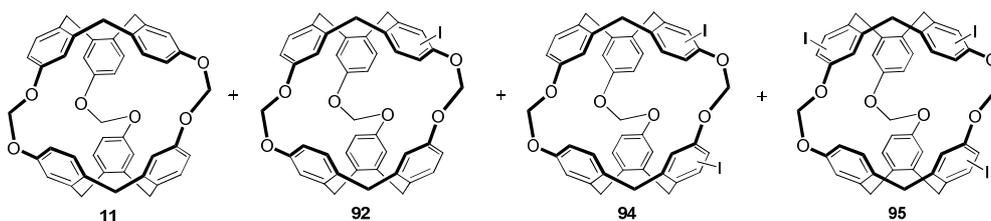


Figure 96: mélange des cryptophanes **11**, **92**, **94** et **95** obtenus dans le brut réactionnel

Pour ce faire, différents systèmes d'éluant et différents gradients ont été testés (Tableau 7). Seul le système d'éluant DCM : cyclohexane a permis d'isoler le composé **92** pur. Le rendement de cette réaction est de 55 % (rendement calculé par rapport à la quantité de produit de départ qui a réagi).

Éluants	Gradient	Rendement en 92 (%)
CHCl ₃	isocratique	non isolé
CHCl ₃ : n-hexane	7 : 3 -> 10 : 0	non isolé
CHCl ₃ : cyclohexane	8 : 2 -> 10 : 0	non isolé
CHCl ₃ : cyclohexane	6 : 4 -> 10 : 0	non isolé
DCM : cyclohexane	6 : 4 -> 10 : 0	55

Tableau 7: tests de purification du cryptophane **92**

b. Synthèse du cryptophane mono-bromé **93**

Le cryptophane mono-bromé (**93**) a été obtenu par réaction du composé **11** en présence de N-bromosuccinimide (NBS), dans le chloroforme à température ambiante (Figure 97).

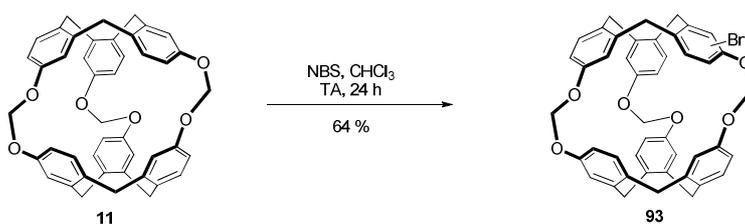


Figure 97: synthèse du cryptophane mono-bromé (**93**)

Différentes conditions ont été testées pour cette réaction: avec du dibrome ou avec du NBS. Seul le NBS a permis l'obtention du composé **93**. De plus, comme pour la réaction de iodation, le nombre d'équivalents de ces deux réactifs ainsi que le temps de la réaction ont également été optimisés. Le meilleur résultat est obtenu lorsque la réaction a lieu en utilisant 1,2 équivalents de NBS pendant 24 heures.

Le cryptophane **93** est ensuite purifié dans les conditions chromatographiques optimisées pour le cryptophane **92**. Il est ainsi obtenu avec un rendement de 64 % (le rendement est calculé par rapport à la quantité de produit de départ qui a réagi).

2. Détermination de la position des halogènes par RMN ¹H

Contrairement au cryptophane **11**, les cryptophanes **92** et **93** n'ont plus d'élément de symétrie. Les spectres RMN ¹H obtenus sont alors complexes et il est difficile de déterminer la position de l'halogène (I ou Br) sur le cycle aromatique. Ainsi, afin d'identifier cette position, les atomes

d'iode et de brome ont été remplacés par un atome de deutérium selon le schéma réactionnel présenté dans la Figure 98:

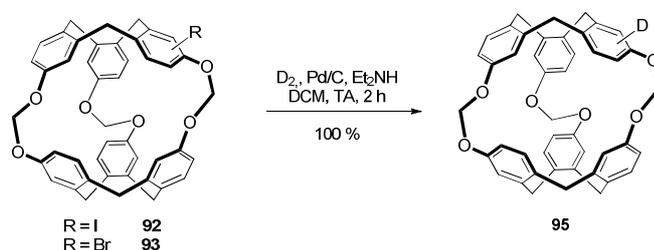
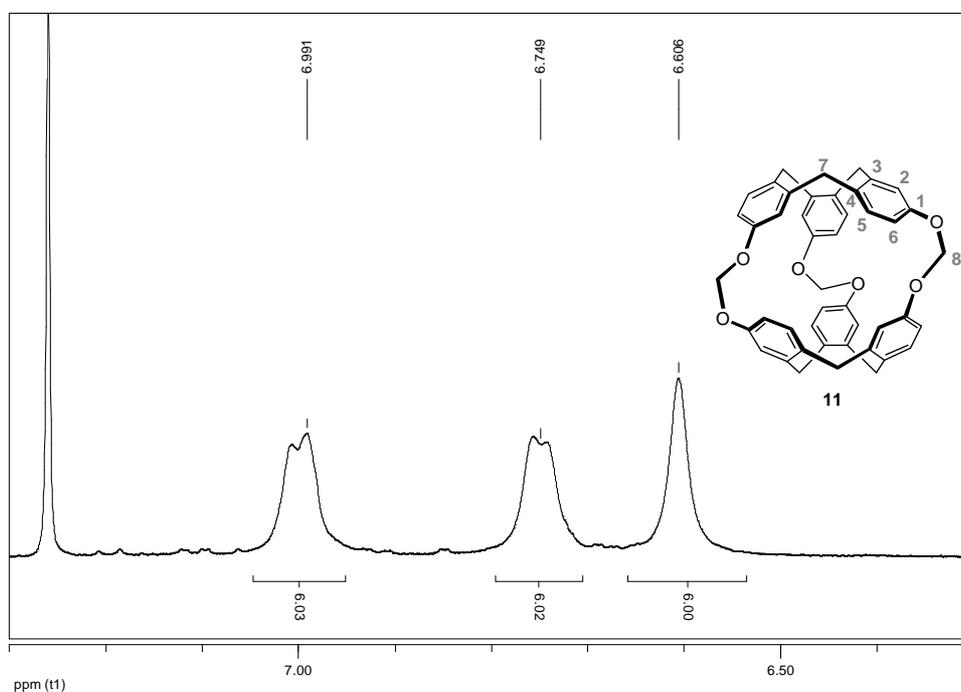


Figure 98: réaction de deutération des cryptophanes **92** et **93**

Le cryptophane deutéré (**95**) est obtenu par deutération du cryptophane **92** ou du cryptophane **93** en présence de 10 % de palladium sur charbon, de triéthylamine et de deutérium gaz à température ambiante pendant 2 heures. Le cryptophane deutéré est alors isolé pur avec un rendement quantitatif.

Les spectres RMN ^1H des cryptophanes **11** et **95** dans la zone des protons aromatiques sont présentés dans la Figure 99. Le spectre du cryptophane-111 montre trois pics larges d'intensité relative 6 / 6 / 6 alors que celui du cryptophane deutéré présente également trois pics larges mais d'intensité relative 6 / 6 / 5.



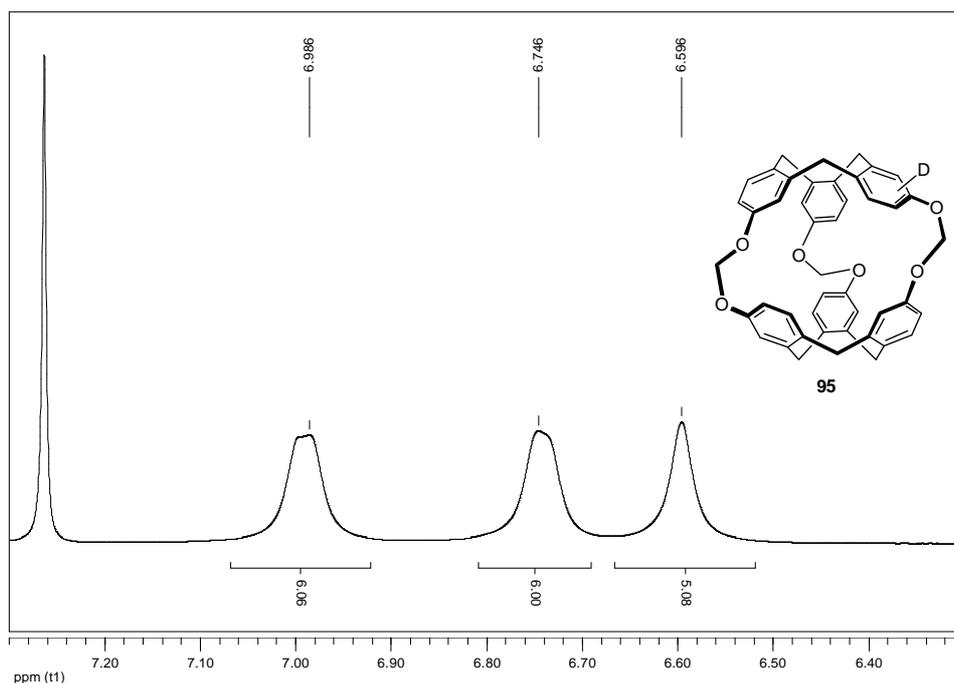


Figure 99: spectres RMN ^1H (H_{Ar}) des cryptophanes **11** (en haut) et **95** (en bas)

La corrélation COSY du cryptophane-111 (**11**) a ensuite permis d'attribuer chacun de ces singulets (Figure 100).

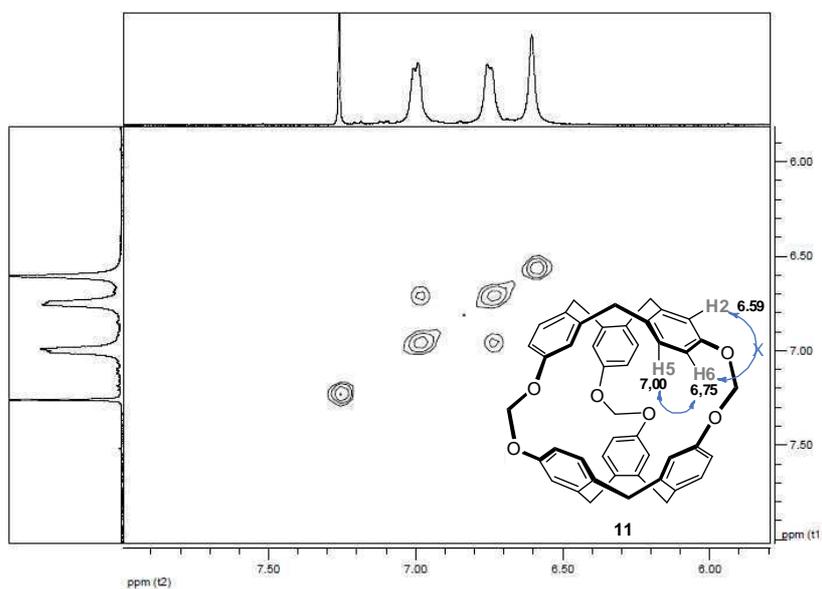


Figure 100: spectre COSY (H_{Ar}) du cryptophane **11**

La tache de corrélation indiquant le couplage entre deux protons a permis d'identifier H6 et H5 respectivement à 6,75 ppm et 7,00 ppm. Le proton H2 correspond alors au singulet à 6,60 ppm. D'autre part, sur le spectre du cryptophane deutéré **95**, ce singulet a une intensité relative de 5,

ce qui nous démontre donc que les réactions d'halogénéation ont lieu sur la position 2. Les structures exactes des cryptophanes **92** et **93** sont représentées dans la Figure 101.

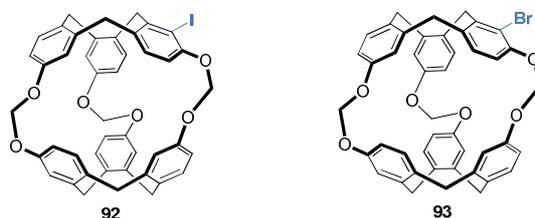


Figure 101: structures exactes des cryptophanes **92** et **93**

L'obtention de ces deux nouveaux cryptophanes **92** et **93** ouvre la voie à de nombreuses réactions (chimie des organolithiens ou chimie du palladium) pour introduire divers groupements fonctionnels. On s'intéressera dans la partie suivante à l'obtention d'un nouveau cryptophane, précurseur de biosonde à partir de **92**.

IV. SYNTHÈSE D'UN NOUVEAU CRYPTOPHANE PAR CHIMIE DU PALLADIUM

1. Synthèse du cryptophane malonate **97**

Un nouveau cryptophane (**97**) comportant une fonction ester malonique a été obtenu en une étape par réaction de Heck entre le cryptophane mono-iodé **92** et de diéthylallylmalonate **96** (Figure 102)^{98,99}.

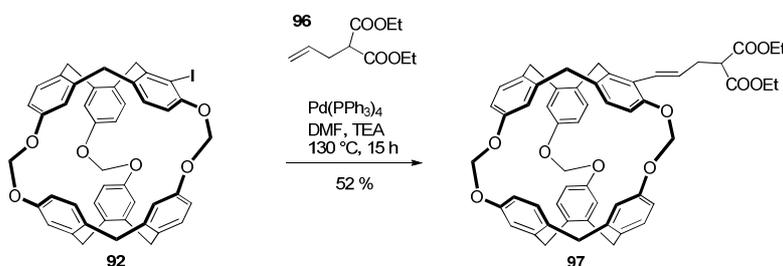


Figure 102: synthèse du cryptophane **97**

Pour ce faire, différentes conditions ont été testées en jouant sur la source de palladium (palladium acétate ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$), diallyldichlorodipalladium ($[\text{Pd}(\text{C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$), palladium tétrakis triphénylphosphine ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$)), la présence ou non de phosphine, la nature de la base (*n*-tributylamine, triéthylamine (TEA), bicarbonate de sodium (NaHCO_3) ou acétate de sodium (AcONa)), la nature du solvant ou encore la température (Tableau 8). Parmi toutes ces

⁹⁸ M. Lemhadri, A. Battace, T. Zair, H. Doucet, M.Santelli, *J. Organomet. Chem.*, **2007**, 692, 2270

⁹⁹ X. Gao, W. Yu, Y. Mei, Z. Jin, *Tetrahedron. Lett.*, **2004**, 8169

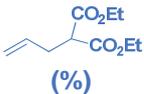
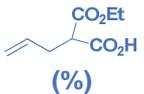
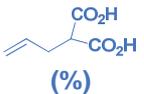
NaOH (M)	T	t(h)	 (%)	 (%)	 (%)
1	TA	15	0	100	0
1	TA	72	0	100	0
1	reflux	48	0	50	50
2	reflux	3	0	0	100

Tableau 9: tests de saponification à partir du diéthylallylmalonate **96**

Ces conditions expérimentales sont ensuite reproduites sur le cryptophane **97**. Le cryptophane **98** est alors isolé après deux extractions successives en milieu basique et acide avec un rendement non optimisé de 31 %. Ce nouveau cryptophane est soluble dans des solvants organiques polaires (acétone, acétonitrile), mais la présence de deux fonctions acide carboxylique ne suffit pas pour le rendre soluble en milieu aqueux à pH 7.

V. CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons mis au point une synthèse efficace du cryptophane-111 en cinq étapes et avec un rendement global de 12 %; la première synthèse de ce cryptophane nécessitait sept étapes pour un rendement global de 1,5 %.

Cette synthèse est aujourd'hui réalisable à grande échelle et des quantités de l'ordre de 10 g de l'intermédiaire-clé (CTV **10**) ont pu être obtenues.

Par ailleurs, la fonctionnalisation du cryptophane-111 a été réalisée pour la première fois. Nous avons ainsi pu isoler et caractériser les cryptophanes mono-bromé (**93**) et mono-iodé (**92**). Ces molécules cibles ouvrent la voie à la synthèse de nouveaux cryptophanes notamment par la chimie du palladium et du lithium.

Nous avons finalement introduit un groupement malonate à partir du cryptophane **92** par couplage au palladium. Ce nouveau cryptophane obtenu (**97**) sera le précurseur d'une biosonde à pH, présentée dans la partie suivante.

PARTIE C

BIOSONDE POUR LA MESURE DU pH EXTRACELLULAIRE PAR IRM ^{129}Xe

C. BIOSONDE POUR LA MESURE DU pH EXTRACELLULAIRE PAR IRM ^{129}Xe

I. CARTOGRAPHIE DU pH, APPLICATION AUX CELLULES CANCÉREUSES

1. Métabolisme de la production d'acide lactique, effet Warburg

Le sang approvisionne les cellules en glucose (Glc) et en oxygène via l'hémoglobine (HbO_2) (Figure 105). Le glucose est transporté dans les cellules à l'aide d'une perméase spécifique (1) où il est ensuite oxydé en pyruvate (Pyr) et libère un proton H^+ par glycolyse. L'ion H^+ est exporté à l'extérieur de la cellule par des transporteurs (2). En présence d'oxygène, le pyruvate est oxydé en CO_2 qui, une fois sorti de la cellule (3), est hydraté par l'anhydrase carbonique en HCO_3^- et H^+ . En l'absence d'oxygène, le pyruvate est réduit en lactate (Lac), qui est transporté hors de la cellule via des transporteurs monocarboxylates (4), à la suite de quoi il rentre dans le sang par diffusion passive.

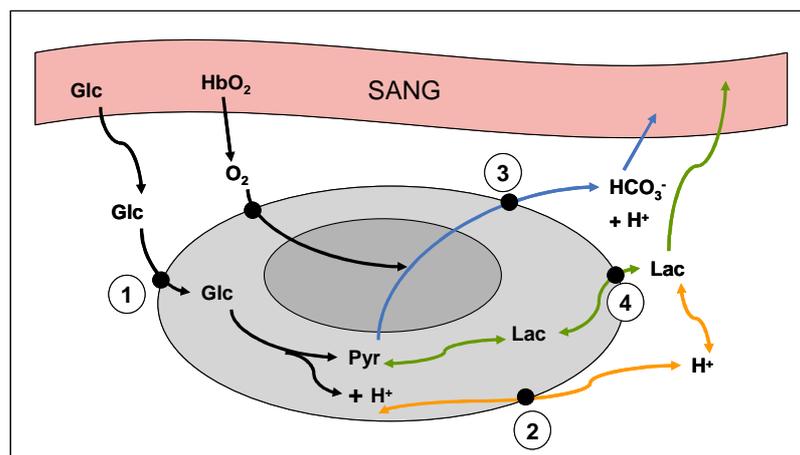


Figure 105: métabolisme de la production d'acide lactique

Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses ont un métabolisme particulier, à savoir une consommation accrue de glucose avec production d'acide lactique même en présence d'oxygène. Ce phénomène, connu sous le nom "d'effet Warburg", a été observé par Otto Warburg dans les années 1930¹⁰⁰, celui-ci l'ayant interprété en 1956 comme un défaut de la respiration mitochondriale, à l'origine même du cancer¹⁰¹. L'acide lactique acidifie le microenvironnement des cellules cancéreuses, ce qui déclenche l'apoptose des cellules normales au contact, à l'inverse des cellules cancéreuses qui supportent cette acidification.

¹⁰⁰ O. Warburg, *Constable and Company, Ltd. London, 1930*, 327

¹⁰¹ O. Warburg, *Science, 1956*, 123, 309

Le milieu extracellulaire est beaucoup plus sensible aux variations de pH que le milieu intracellulaire. La mesure du pH extracellulaire (pHe) donnera donc plus d'informations concernant l'équilibre acido-basique que celle du pH intracellulaire (pHi). En moyenne, les cellules cancéreuses ont un pHe entre 6 et 7 en comparaison aux cellules saines (7,4).

2. Techniques de mesure du pH

a. Par des techniques classiques

Différentes techniques ont été développées pour mesurer le pH dans les tissus. La technique qui a été la plus utilisée est la mesure par microélectrodes^{102, 103}. Dans les tumeurs, elle a permis de montrer que le pHe était plus acide que dans le tissu sain, mais elle a aussi montré une forte variabilité entre les valeurs de pHe en fonction du type de tumeur mais aussi de la position de la microélectrode. Cependant, c'est une technique invasive, empêchant toute adaptation à l'homme en clinique.

Des méthodes utilisant la spectroscopie par RMN ¹H, ³¹P ou ¹⁹F ont également été utilisées¹⁰⁴. Ces techniques exploitent l'échange entre les formes acides et basiques d'une molécule. Si la vitesse de transfert protonique est lente, deux pics séparés correspondant à chacune des formes acide et basique seront alors observés et le pH sera mesuré à partir du ratio des intensités des pics de ces deux formes. Lorsque l'échange entre les formes acide et basique est rapide, le déplacement chimique moyen observé est proportionnel aux concentrations relatives des deux formes et sa mesure permet de déterminer le pH. En spectroscopie du ³¹P, le pHi peut ainsi être mesuré à l'aide du déplacement chimique du phosphate inorganique, molécule endogène et intracellulaire. Des molécules exogènes qui restent extracellulaires peuvent être utilisées pour mesurer le pHe, comme le 3-APP (3-aminopropylphosphonate)^{105, 106} en ³¹P ou l'acide 3-[N-(4-fluor-2-trifluorométhylphényl)-sulphamoyl]-propionique¹⁰⁷ en ¹⁹F. En RMN du proton des molécules exogènes, dérivées de l'imidazole ont été développées pour mesurer le pHe¹⁰⁸. La première molécule testée a été l'acide (±)- 2-imidazol-1-yl-3-éthoxycarbonylpropionique^{109, 110, 111}.

¹⁰² F. Pampus, *Acta Neurochir.*, **1963**, 11, 305

¹⁰³ E. Jahde, M.F. Rajewsky, H. Baumgartl, *Cancer Res.*, **1982**, 42, 1498

¹⁰⁴ R. J. Gillies, N. Raghunand, M. L. Garcia-Martin, R. A. Gatenby, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **2004**, 23, 57

¹⁰⁵ R.J. Gillies, Z. Liu, Z. Bhujwala, *Am. J. Physiol.*, **1994**, 267, 195

¹⁰⁶ A.S. Ojugo, P.M. McSheehy, D.J. McIntyre, C. McCoy, M. Stubbs, M.O. Leach, I.R. Judson, J.R. Griffiths, *NMR Biomed.*, **1999**, 12, 495

¹⁰⁷ Y. Aoki, K. Akagi, Y. Tanaka, J. Kawai, M. Takahashi, *Invest. Radiol.*, **1996**, 31, 680

¹⁰⁸ S. Gil, P. Zaderenzo, F. Cruz, S. Cerdan, P. Ballesteros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 2, 305

¹⁰⁹ R. van Sluis, Z.M. Bhujwala, N. Raghunand, P. Ballesteros, J. Alvarez, S. Cerdan, J.P. Galons, R.J. Gillies, *Magn. Reson. Med.*, **1999**, 41, 743

¹¹⁰ Z.M. Bhujwala, D. Artemov, P. Ballesteros, S. Cerdan, R.J. Gillies, M. Solaiyappan, *NMR Biomed.*, **2002**, 15, 114

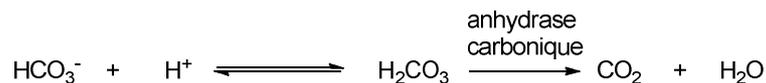
Cependant, la faible sensibilité intrinsèque de toutes ces spectroscopies (^1H , ^{31}P et du ^{19}F) constitue un obstacle majeur pour cartographier le pH avec une haute résolution. D'autre part, la variation de déplacement chimique de ces molécules endogènes ou exogènes en fonction du pH est souvent faible, rendant ainsi difficile une estimation précise du pH.

D'autres techniques par IRM ^1H ont été exploitées comme celle fondée sur le transfert de magnétisation de l'eau libre et de l'eau liée aux protéines, sensible au degré d'acidité du milieu¹¹² ou encore celle basée sur l'échange d'hydrogène entre le Gd^{3+} libre et le Gd^{3+} complexant une molécule d'eau, également sensible au pH du milieu^{113,114}. Cependant ces deux méthodes nécessitent une détermination précise de la concentration en agent de contraste dans les tissus concernés, ce qui est très difficile *in vivo*.

En conclusion, bien que toutes ces techniques décrites précédemment permettent une cartographie du pH *in vivo* sur des modèles animaux, elles restent difficilement transposables à l'homme.

b. Par IRM ^{13}C hyperpolarisé

Récemment, l'équipe de K. M. Brindle a mis au point une technique de cartographie du pH *in vivo* par RMN ^{13}C hyperpolarisé en mesurant le ratio de concentration du bicarbonate hyperpolarisé ($\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$) et du dioxyde de carbone hyperpolarisé $^{13}\text{CO}_2$ après injection par voie intraveineuse de $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ hyperpolarisé¹¹⁵. Le bicarbonate est une molécule endogène, présente dans le milieu extra cellulaire, qui sous l'action de l'anhydrase carbonique va former du CO_2 (Équation 4).



Équation 4: réaction acido-basique entre HCO_3^- et H_2CO_3 fortement déplacée vers la droite et catalysée par l'anhydrase carbonique

L'équation d'Henderson-Hasselbalch permet de mesurer le pH à partir des concentrations en HCO_3^- et CO_2 (Équation 5).

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \right) \quad \text{avec pKa} = 6,1$$

Équation 5: équation d'Henderson-Hasselbalch

¹¹¹ M-L. Garcia-Martin, G. Herigault, C. Remy, R. Farion, P. Ballesteros, J.A. Coles, S. Cerdan, A. Ziegler, *Cancer Research*, **2001**, 61, 6524

¹¹² J. Zhou, J. F. Payen, D. A. Wilson, R. Traystman, *Nature Med.*, **2003**, 9, 1085

¹¹³ D. A. Beauregard, D. Parker, K. M. Brindle, *Proc. Int. Soc. Magn. Reson. Med.*, **1998**, 653

¹¹⁴ N. Raghunand, S. Zhang, A. D. Sherry, R. J. Gillies, *Acad. Radiol.*, **2002**, 9, 481

¹¹⁵ F. A. Gallagher, M. I. Kettunen, S. E. Day, D-E. Hu, J. H. Ardenkjær-Larsen, R. Zandt, P. R. Jensen, M. Karlsson, K. Golman, M. H. Lerche, K. M. Brindle, *Nature*, **2008**, 453, 940

Bien que la concentration en bicarbonate dans le plasma humain soit importante (24 mM), la faible abondance naturelle du ^{13}C (1,1 %), combiné à la faible polarisation de son spin nucléaire ne permettrait pas d'établir une cartographie du pH avec une haute résolution. L'hyperpolarisation du ^{13}C obtenue par PDN (voir partie A. I. 3. b. i) permet de pallier ce problème avec un gain en sensibilité considérable.

Grâce à cette technique d'hyperpolarisation, cette équipe a mis au point une méthode non-invasive pour imager le pH *in vivo* chez la souris (Figure 106).

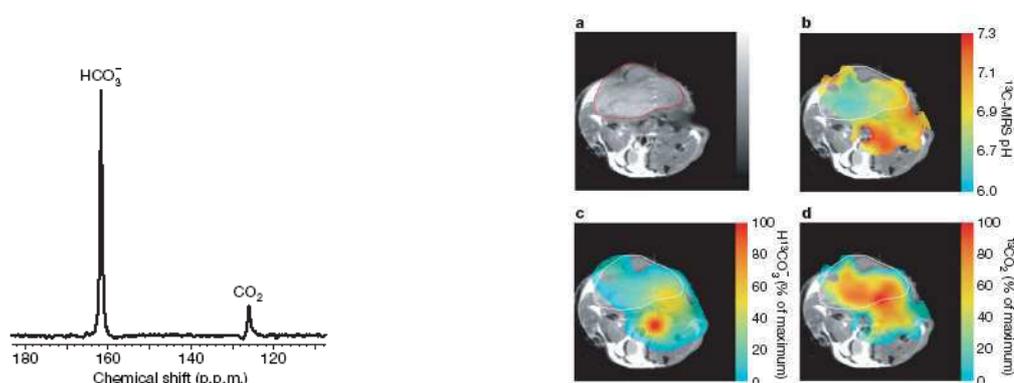


Figure 106: à gauche: spectre RMN ^{13}C d'un lymphome murin (EL4) *in vivo* montrant les fréquences de résonance de $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ et $^{13}\text{CO}_2$ respectivement à 161 et 125 ppm. À droite: (a) IRM ^1H d'une souris présentant une tumeur EL4 sous-cutanée (b) cartographie du pH obtenue après calcul du ratio $[\text{H}^{13}\text{CO}_3^-]$ (c) et $[\text{CO}_2]$ (d). Ces résultats sont obtenus dix secondes après l'injection de $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ (100 mM).

II. MESURE DU pH EXTRACELLULAIRE PAR IRM ^{129}Xe

1. Cryptophane malonate comme biosonde à pH

Contrairement aux biosondes pour l'IRM ^{13}C hyperpolarisé, celles avec le ^{129}Xe hyperpolarisé pourraient être plus sensibles puisque, une fois la biosonde injectée, il est possible de recharger la cage en permanence avec du xénon hyperpolarisé.

L'idée d'une biosonde à pH en IRM ^{129}Xe a déjà été développée par les équipes de T. Brotin et J-P. Dutasta et de P. Berthault en 2010 à partir du cryptophane **44** (Figure 73)⁸³. Cette biosonde présentant six fonctions acide carboxylique permet la mesure de pH autour de 4,7 et est donc limitée à la localisation de cellules de faible pH (cellule entrant en acidose).

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une biosonde pour la mesure de pH extracellulaire par IRM ^{129}Xe en vue de détecter les tumeurs.

La conception d'une telle biosonde nécessite de choisir judicieusement:

- la taille du cryptophane

À la vue des propriétés intéressantes d'encapsulation du xénon par le cryptophane-111 (Tableau 2, Tableau 3 et Tableau 4) nous avons décidé de travailler avec ce dernier comme précurseur de la biosonde à pH. Jusqu'à présent aucune biosonde à partir du cryptophane-111 n'a été décrite dans la littérature. Par ailleurs, dans notre laboratoire, les premiers résultats en RMN ^{129}Xe d'une biosonde au stress oxydant à partir du cryptophane-111 se sont révélés très encourageants. Ces résultats nous confortent dans notre choix du cryptophane-111.

- le groupement permettant la mesure du pH

Ce dernier doit avoir un pKa proche de 6 - 7. Nous avons donc choisi l'acide malonique **99** (Figure 107). La première fonction acide carboxylique avec un pKa proche du pH physiologique permettra la mesure du pH et la seconde (pKa ~ 3 - 4) aidera à l'hydrosolubilisation de la biosonde. Par ailleurs, ce groupement acide malonique pourra être facilement couplé sur le cryptophane **92** par chimie du palladium (Figure 102).

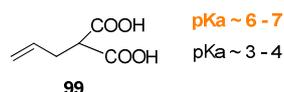


Figure 107: acide allyl-malonique **99**

Le cryptophane **98** n'étant pas suffisamment hydrosoluble (Figure 103), la biosonde à pH devra donc comporter un bras hydrosoluble.

- le bras hydrosoluble

Nous avons décidé de travailler avec un petit PEG constitué de quatre unités $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ et terminé par une fonction acide carboxylique. La fonction $-\text{COOH}$ (pKa ~ 5) permettra une meilleure solubilisation de la biosonde en milieu aqueux sans pour autant interférer avec la mesure de pH.

La biosonde envisagée est présentée dans la figure suivante:

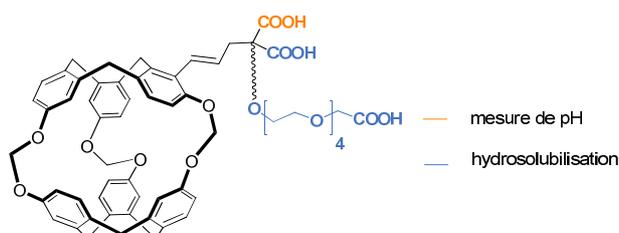


Figure 108: biosonde à pH pour l'IRM ^{129}Xe

2. Schéma de synthèse

Pour ce faire, deux voies de synthèse sont envisageables (Figure 109): la première nécessite un couplage par réaction de Heck entre le cryptophane mono-iodé **92** et un dérivé d'acide malonique hydrosoluble **100**, préalablement synthétisé. Dans la seconde voie de synthèse, la biosonde est obtenue par un couplage entre le cryptophane mono-malonate **99** et un bras hydrosoluble **101**.

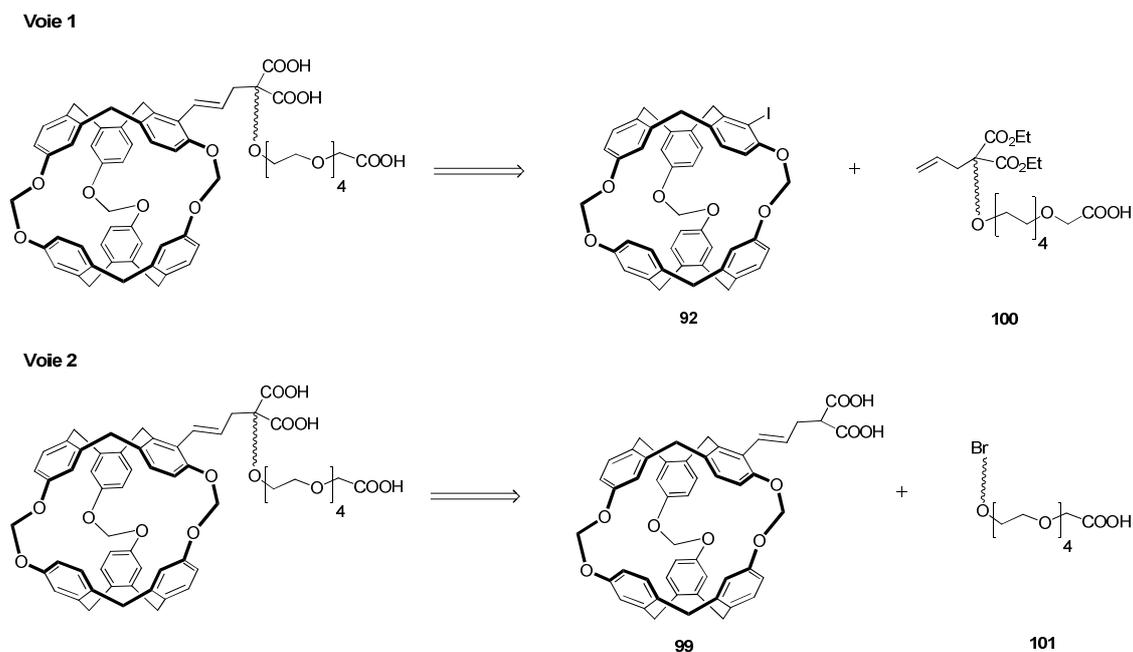


Figure 109: différentes voies de synthèse de la biosonde à pH

Par la suite, chacune de ces voies sera détaillée.

a. Synthèse de la biosonde à pH par la voie 1

i. Synthèse du dérivé d'acide malonique hydrosoluble

Le diéthylallylmalonate **96** est d'abord alkylé par le 1,3-dibromopropane pour donner le composé **102** (Figure 110). Ce dernier est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 50 %. Nous avons choisi de travailler avec le 1,3-dibromopropane plutôt que le 1,2-dibromoéthane afin de minimiser les réactions de β -élimination. Le PEG de masse molaire 200 g.mol^{-1} est ensuite alkylé avec **102** pour donner **103** avec de très faibles rendements de l'ordre de 5 %. Ce faible rendement peut s'expliquer par la formation de produits de transestérification et de décarboxylation. Le produit **104**, obtenu par alkylation de **103** avec l'éthyl

Le diéthylallylmalonate **96** est ensuite alkylé par **106** pour donner la molécule **107**, précurseur de la biosonde à pH. **107** est isolé après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 40 %. **107** est obtenu en 3 étapes avec un rendement total de 6 %.

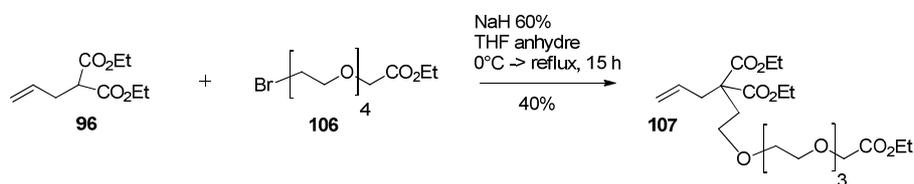


Figure 112: synthèse du dérivé d'acide malonique hydrosoluble **107**

ii. Couplage final

Le couplage final avec le cryptophane mono-iodé **92** a été testé avec les dérivés d'acide malonique hydrosolubles **103** (fonction hydroxyle du PEG libre) et **107** (fonction hydroxyle protégée) dans les conditions optimisées dans la partie B.IV (Figure 113 et Figure 114). Plusieurs essais en modifiant le nombre d'équivalents des réactifs de départ ont été réalisés mais, dans aucun cas, les produits finaux **108** et **109** n'ont été observés. Ces deux réactions ont été suivies par LC/MS et seuls les réactifs de départ **92**, **103** / **107** et le cryptophane **11** (cryptophane-111) sont visibles. Ces résultats nous laissent supposer qu'il y aurait bien une insertion oxydante du palladium entre le cycle aromatique et l'halogène mais que les complexes pi-allyliques du palladium avec **103** et **107** ne se formeraient pas, probablement par gêne stérique.

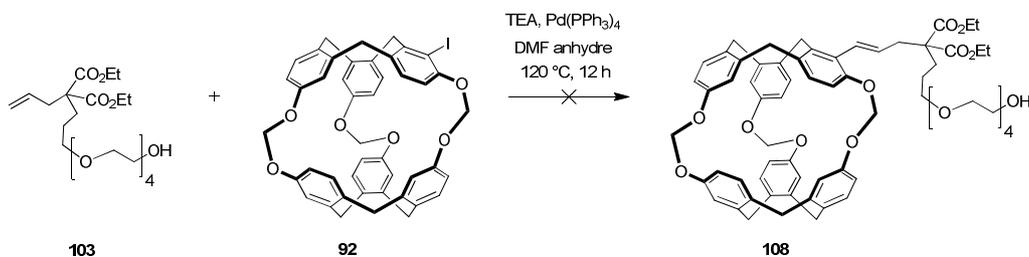


Figure 113: couplage final à partir de **103** et **92**

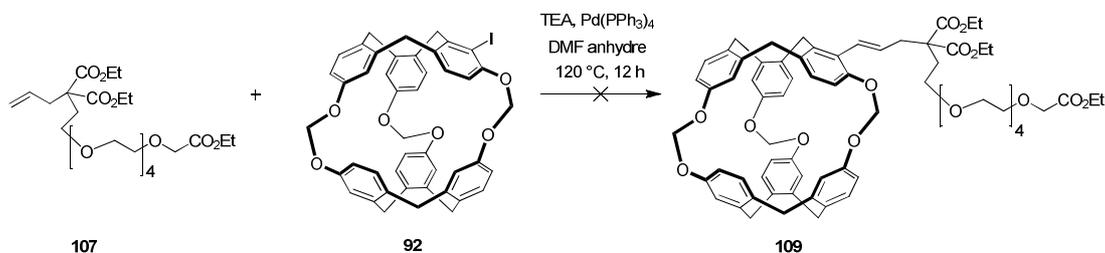


Figure 114: couplage final à partir de **107** et **92**

b. Synthèse de la biosonde à pH par la voie 2

Ces résultats nous ont conduits à tenter la voie 2 où le diéthylallylmalonate **96** est d'abord couplé au cryptophane **92** dans les conditions optimisées dans la partie B. IV pour donner **97** avec un rendement de 52 % (Figure 115). Puis, **97** est ensuite alkylé avec le PEG **106** pour donner le cryptophane **110**. Ce dernier est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 3 %. La présence majoritaire des produits de départ en fin de réaction nous montre qu'il y a probablement une gêne stérique empêchant l'alkylation du cryptophane **97**. Cette étape n'a pas été optimisée en attendant de valider la preuve de concept en RMN ^{129}Xe .

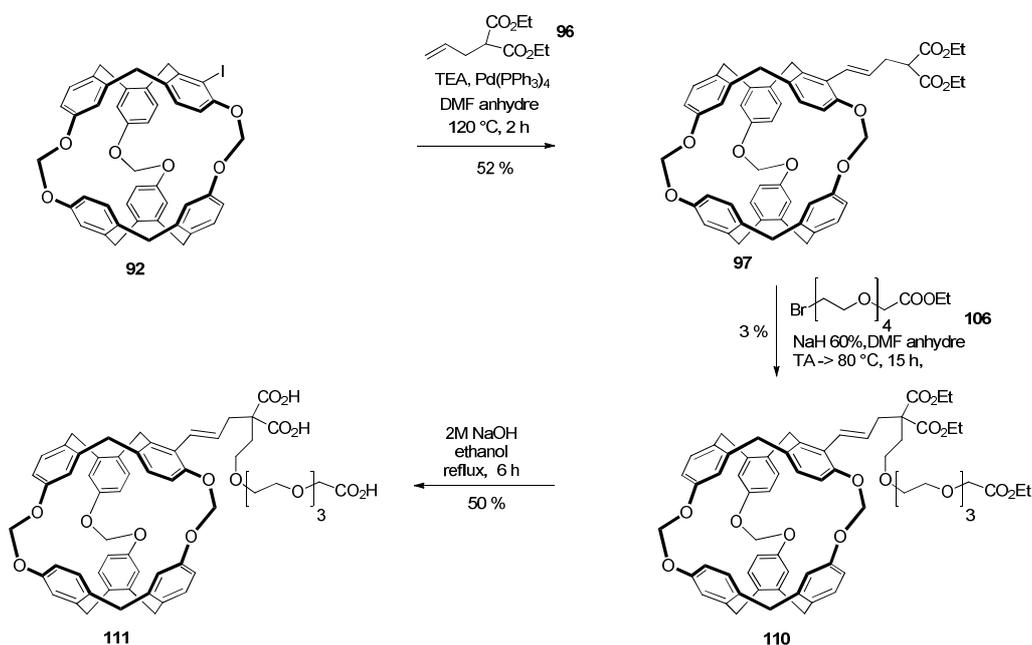


Figure 115: obtention de la biosonde par la voie 2

La dernière étape pour obtenir la biosonde **111** consiste à saponifier les trois fonctions ester de la molécule **110**. Les conditions de saponification optimisées précédemment (Tableau 9) sont reproduites sur le cryptophane **110**. La réaction est suivie par LC/MS: 6 heures sont nécessaires pour observer **111** majoritairement en LC/MS. Une purification par chromatographie en phase inverse permet d'isoler **111** pur avec un rendement de 50 %. La biosonde **111** a donc été obtenue en 3 étapes à partir du cryptophane **92** avec un rendement global de 0,78 %. Ce rendement n'a pas été optimisé.

3. Détermination des pKa et étude de l'hydrosolubilité de la biosonde à pH

a. Détermination des pKa du cryptophane **111**

Une courbe de titration du cryptophane **111** a été obtenue par mesure du pH après ajouts successifs d'une solution d'HCl diluée (50 mM) (Figure 116).

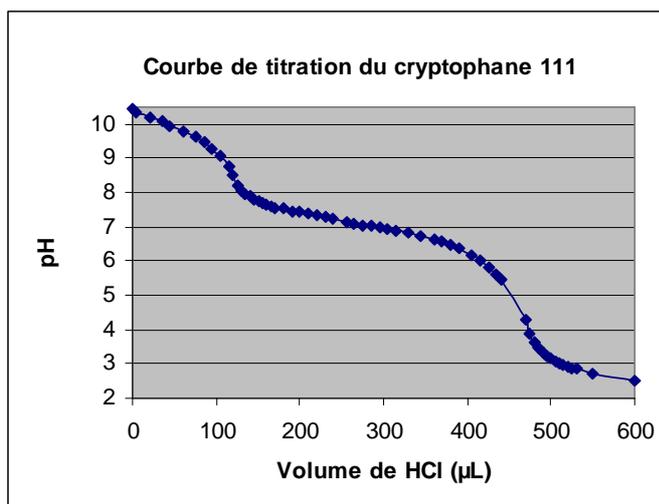


Figure 116: courbe de titration du cryptophane **111**

À partir de cette courbe de titration, nous avons déterminé un pKa de 6,8 pour la fonction -COOH d'intérêt de l'acide malonique. Ce résultat est cohérent avec la valeur de la littérature et confirme bien le potentiel de la biosonde **111** pour établir une cartographie du pH par RMN ^{129}Xe . Les deux autres pKa n'ont pas pu être déterminés. Il est probable que ces derniers soient trop proches (différence inférieure à 3 unités pH) pour pouvoir être déterminés séparément par une courbe de titration.

b. Étude de la solubilité du cryptophane **111** dans l'eau

L'hydrosolubilité du cryptophane **111** à pH physiologique a été mesurée par RMN ^1H à l'aide d'un standard interne: le DMF. Ce dernier est à une concentration de 10 μM dans le tube RMN. D'après le spectre RMN ^1H , la solubilité à pH physiologique de la biosonde **111** est de l'ordre de 10 μM . La solubilité en milieu aqueux du cryptophane **111** est donc faible mais elle reste probablement suffisante pour des applications en RMN ^{129}Xe .

4. Résultats RMN ^{129}Xe

Les expériences RMN ^{129}Xe ont été réalisées par l'équipe de P. Berthault au CEA Saclay.

a. Spectres RMN ^{129}Xe du cryptophane **111** à différents pH

Des tests RMN ^{129}Xe de la biosonde **111** dans D_2O ont été réalisés à différents pH: 3,94, 7 et 9,35 (Figure 117). La gamme de pH a été faite par ajout de NaOD. Entre pH 9,35 et 7, le cryptophane **111** est totalement déprotoné, aucune modification du déplacement chimique du xénon n'est alors observée et un pic correspondant au xénon encapsulé dans la biosonde totalement déprotonée est visible autour de 45 ppm. À pH 3,94, un pic autour de 65 ppm pour le xénon encapsulé dans la biosonde partiellement déprotonée est difficilement visible mais bien présent. La très petite intensité de ce pic peut s'expliquer par la faible hydrosolubilité de la biosonde à ce pH.

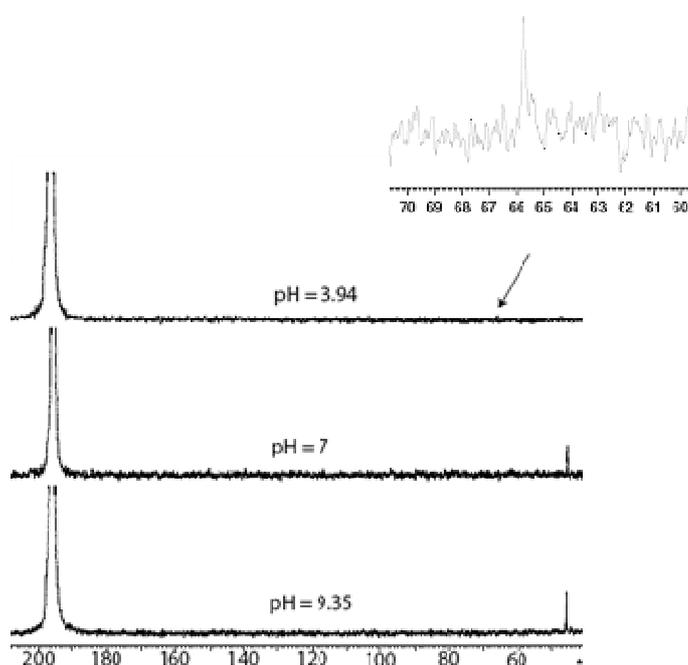


Figure 117: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé de **111** dans D_2O (0,6 mg/mL, 293 K)

Nous observons donc une différence de déplacement chimique du xénon entre pH 4 et pH 7 de l'ordre de 20 ppm. Ces premiers résultats sont très encourageants et une telle différence de déplacement chimique serait suffisante pour établir une cartographie du pH.

Afin de pallier ce problème de solubilité et de pouvoir établir une courbe de titration du cryptophane **111** (déplacement chimique du xénon en fonction du pH) il serait alors envisageable de mettre un PEG plus long.

b. Spectre RMN ^{129}Xe du cryptophane **111** en présence de LiOH

Nous nous sommes également intéressés à l'influence des contre-ions portés par les fonctions carboxylate de la molécule **111** sur l'environnement chimique du xénon encapsulé dans ce cryptophane.

Un spectre RMN ^{129}Xe du cryptophane **111** a ainsi été réalisé à pH alcalin en présence de LiOH (Figure 118).

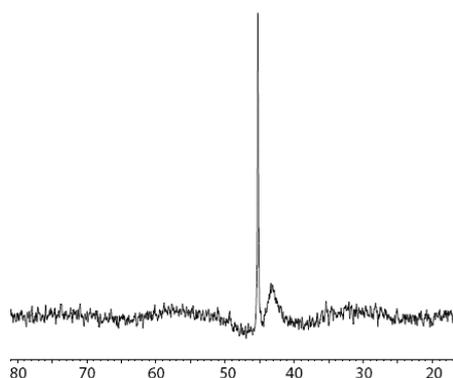


Figure 118: spectre RMN ^{129}Xe hyperpolarisé de **111** dans D_2O + LiOH (0.6 mg/mL, 293 K)

Comme sur la Figure 117 à pH = 9,35, un pic autour de 45 ppm correspondant au xénon encapsulé dans la biosonde totalement déprotonée est visible. On observe également un nouveau signal d'intensité plus faible, décalé de 3 ppm à droite du pic principal.

Une des hypothèses émises concernant la nature de ce pic serait la formation d'un complexe entre le groupement PEG de la biosonde **111** et l'ion Li^+ . En effet, le PEG présent sur la biosonde **111** possède 4 motifs éthylène glycol et pourrait posséder des propriétés de complexation de Li^+ similaires à celles de la molécule 12-couronne-4^{116, 117} (Tableau 10 et Figure 119).

Cation	Rayon ionique (Å)	Ether couronne	diamètre de la "cavité" (Å)	complexe majoritaire
Li^+	0,68	12-couronne-4	1,2 – 1,4	Li^+
Na^+	0,97	15- couronne -5	1,7 – 2,2	Na^+
K^+	1,33	18- couronne -6	2,6 – 3,2	K^+

Tableau 10: complexation des éthers couronnes avec les cations

¹¹⁶ J.-M. Lehn, "Supramolecular Chemistry : Concepts and Perspectives", ed. VCH, **1995**

¹¹⁷ C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1021

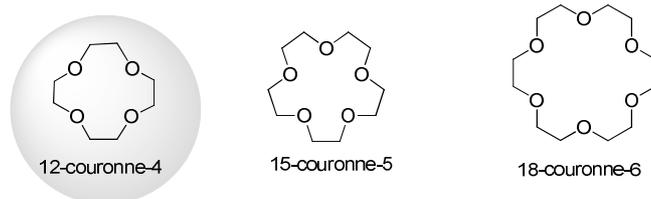


Figure 119: différents éthers couronnes

On observerait ainsi sur le spectre RMN le xénon encapsulé dans le cryptophane **111** présent sous deux formes en équilibre: complexé et non complexé à Li^+ .

III. CONCLUSION

Dans cette partie nous avons mis au point la synthèse d'une biosonde pour la mesure du pH extracellulaire. Ce nouveau cryptophane (**111**) a été obtenu en 3 étapes à partir du cryptophane mono-iodé **92** avec un rendement global non optimisé de 0,78 %.

Nous avons pu déterminer le pKa d'intérêt (6,8) de la fonction acide malonique greffée sur le cryptophane par une technique de titration et ainsi confirmer le potentiel d'une telle molécule pour la mesure de pH autour de 7.

L'hydrosolubilité de cette biosonde a également été mesurée: **111** est soluble en milieu aqueux à pH physiologique à des concentrations utilisées en RMN ^{129}Xe (de l'ordre de 10 μM).

Les premiers résultats en RMN ^{129}Xe sont très encourageants puisqu'un écart d'environ 20 ppm est visible entre pH = 4 et pH = 7. Des tests complémentaires restent à faire afin d'obtenir la courbe de titration du cryptophane **111** (déplacement chimique du xénon en fonction du pH).

Pour terminer, des analyses RMN ^{129}Xe de **111** en présence de LiOH ont montré l'apparition d'un nouveau pic qui pourrait correspondre au signal du xénon encapsulé dans le cryptophane complexant l'ion Li^+ . Dans le cas où cette hypothèse est confirmée, cette molécule pourrait donc être utilisée comme biosonde pour la détection de lithium.

PARTIE D

BIOSONDE POUR LA DÉTECTION DU CANCER DU SEIN PAR L'IRM ^{129}Xe

D. BIOSONDE POUR LA DETECTION DU CANCER DU SEIN PAR IRM ¹²⁹Xe

I. LE CANCER DU SEIN ET SES TECHNIQUES DE DÉTECTION

1. Hydroxyapatite, cancer du sein à métastases osseuses

Le squelette est la cible privilégiée des cellules métastatiques cancéreuses mammaires humaines. En effet, la majorité des patients présentant un cancer du sein à un stade avancé développent des métastases osseuses responsables d'une mortalité importante. Il a été observé que les cellules cancéreuses mammaires sont capables d'induire la formation de microcalcifications au niveau de la tumeur primaire. En effet, la sialoprotéine osseuse, phosphoprotéine de la matrice osseuse jouant un rôle important lors de la formation des cristaux d'hydroxyapatite (principal constituant des microcalcifications), est surexprimée dans les cancers mammaires humains¹¹⁸. L'hydroxyapatite est une forme naturelle de calcium apatite de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.

2. Les bis-phosphonates et leurs applications

Les bis-phosphonates font partie de l'arsenal thérapeutique contre les métastases osseuses¹¹⁹. Ce sont des analogues structuraux synthétiques du pyrophosphate dans lesquels l'atome de carbone remplace l'atome central d'oxygène (Figure 120). Ce pont P-C-P les rend résistants à l'hydrolyse¹²⁰. Les bis-phosphonates se différencient par la nature des chaînes latérales qui sont responsables de leur affinité pour l'hydroxyapatite de la matrice osseuse et leurs effets biologiques. Les principaux bis-phosphonates utilisés en thérapeutique sont l'étidronate, le clodronate, le pamidronate, l'alendronate et le zolédronate.

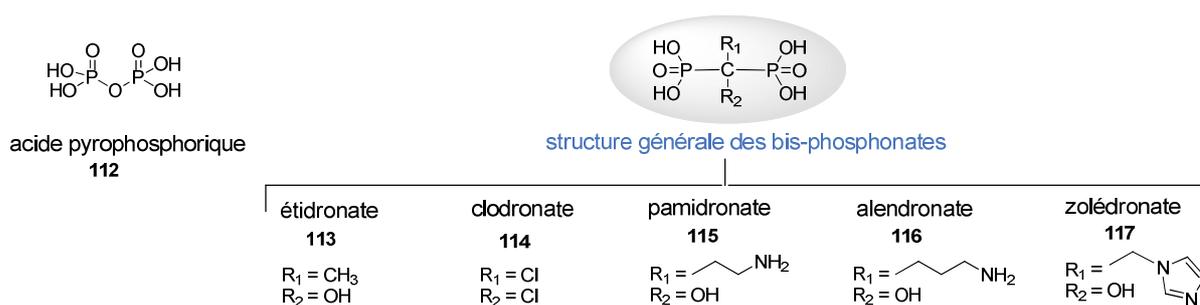


Figure 120: acide pyrophosphorique et les principaux bisphosphonates

¹¹⁸ A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 5375

¹¹⁹ A. Lipton, R. L. Theriault, G. N. Hortobagyi, J. Simeone, R. D. Knight, K. Mellars, D. J. Reitsma, M. Heffernan, J. J. Seaman, *Cancer*, **2000**, 88, 1082

¹²⁰ E. R. van Beek, C.W. Lowik, F. H. Ebetino, S. E. Papapoulos, *Bone*, **1998**, 23, 437

Les bisphosphonates inhibent la résorption osseuse par la fixation de façon sélective sur l'hydroxyapatite de la phase minérale du tissu osseux. Ils sont absorbés par les ostéoclastes (cellules responsables de la résorption osseuse), perturbent leur fonctionnement et induisent leur apoptose ¹²¹.

3. Détection du cancer du sein par mammographie

La mammographie est la méthode couramment utilisée pour la détection des cancers du sein ^{122,123} qui repose sur la technique de radiographie. Cependant elle souffre d'une sensibilité et spécificité relativement faibles: la sensibilité de la mammographie est inversement proportionnelle à la densité mammographique et à l'âge de la femme ^{124, 125, 126}. Depuis quelques années, ces limitations ont incité la communauté scientifique à s'intéresser à de nouvelles techniques de détection du cancer du sein.

4. Détection de microcalcifications à l'aide d'une sonde bimodale SPECT / NIR

L'équipe de Frangioni a synthétisé une sonde bimodale pour la détection d'hydroxyapatite des microcalcifications ¹²⁷. Elle est constituée d'un bis-phosphonate permettant l'interaction avec l'hydroxyapatite, d'un groupement comportant du ^{99m}Tc pour de l'imagerie par tomographie par émission de simples photons (ou SPECT) et d'un groupement pour de l'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge (ou NIR) (Figure 121).

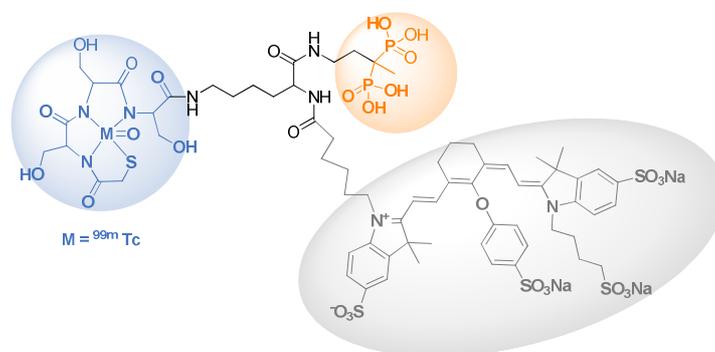


Figure 121: sonde bimodale SPECT / NIR pour la détection de microcalcifications

¹²¹ P. M. Boonekamp, L. J. van derWee-Pals, M. M. vanWijkvan Lennep, C. W. Thesing, O. L. Bijvoet, *BoneMine r.*, **1986**, 1, 27

¹²² L.W. Bassett, *Radiol. Clin. North Am.*, **1992**, 30, 93

¹²³ L.W. Bassett, *Breast J.*, **2000**, 6, 291

¹²⁴ A. Mavroforou, D. Mavrophoros, E. Michalodimitrakis, *Eur. J. Radiol.*, **2006**, 57, 428

¹²⁵ T. M. Kolb, J. Lichy, J. H. Newhouse, *Radiology*, **2002**, 225, 165

¹²⁶ Z. Huo, M. L. Giger, O. I. Olopade, D. E. Wolverton, B. L. Weber, C. E. Metz, W. Zhong, S. A. Cummings, *Radiology*, **2002**, 225, 519

¹²⁷ K. R. Bhushan, P. Misra, F. Liu, S. Mathur, R. E. Lenkinski, J. V. Frangioni, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 17648

Cette sonde bimodale permet ainsi de détecter simultanément les microcalcifications par fluorescence dans le proche infrarouge et par SPECT. Ces chercheurs ont pu démontrer *in vitro* la spécificité de cette molécule pour l'hydroxyapatite par rapport à d'autres sels de calcium (Figure 122 - A). Ils ont également observé *in vivo* la présence d'hydroxyapatite par imagerie optique dans le proche infrarouge et validé ce résultat par SPECT (Figure 122 - B, C).

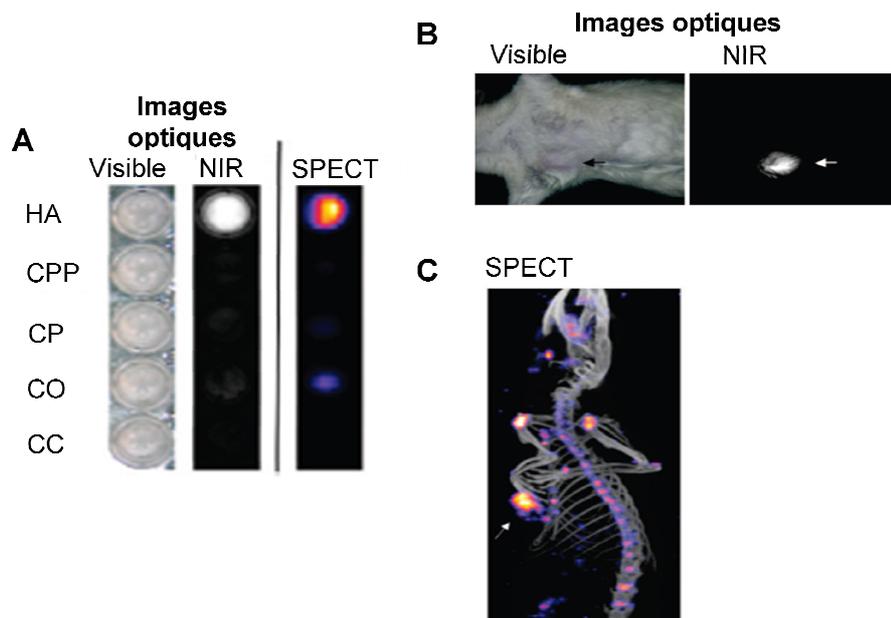


Figure 122: **A** - Images optiques *in vitro* dans le visible et dans le proche infrarouge: spécificité de la biosonde pour l'hydroxyapatite (HA) par rapport à d'autres sels de calcium (Ca-pyrophosphate (CPP), Ca-phosphate (CP), Ca-oxalate (CO) et Ca-carbonate (CC)); **B** et **C** - Images *in vivo* de microcalcifications de cancer du sein par images optiques dans le visible et dans le proche infrarouge (**B**) et par tomographie par émission de simples photons (**C**).

II. DÉTECTION DE MICROCALCIFICATIONS PAR IRM ^{129}Xe

Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'une biosonde pour la détection de microcalcifications par IRM ^{129}Xe . Cette biosonde sera composée d'un cryptophane fonctionnalisé par une molécule d'alendronate (Figure 120). Le xénon étant très sensible à son environnement, nous espérons obtenir deux déplacements chimiques du xénon suivant qu'il est encapsulé dans la biosonde libre ou dans la biosonde complexée à l'hydroxyapatite.

1. Stratégie de synthèse 1

a. Approche rétrosynthétique

La première stratégie pour la synthèse d'une telle biosonde consiste à fonctionnaliser le cryptophane mono-bromé **93** (Figure 123). Une carbonatation de cette molécule par chimie du lithium permettrait d'obtenir **118**. L'alendronate **116** serait ensuite couplé à **118** par couplage peptidique pour former la biosonde **120** de première génération. Nous espérons que **120** soit suffisamment soluble en milieu aqueux pour obtenir une preuve de concept par RMN ^{129}Xe .

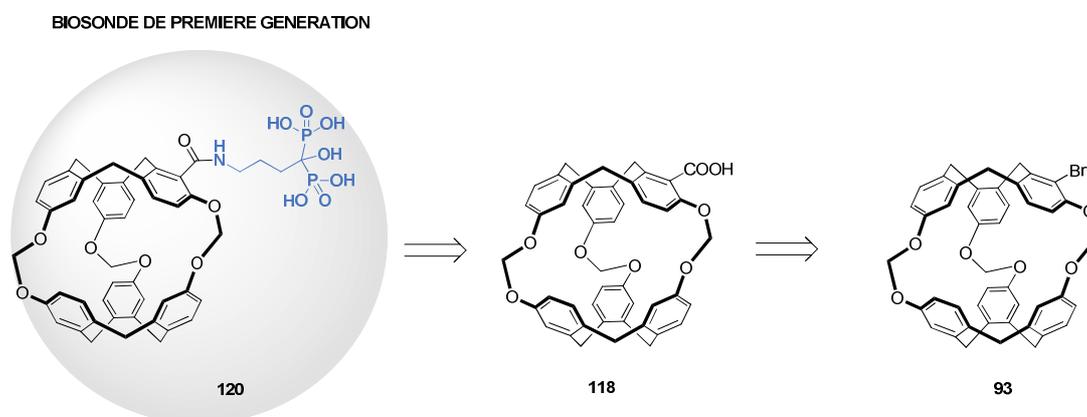


Figure 123: schéma rétrosynthétique 1 pour l'élaboration d'une biosonde de première génération

Afin d'obtenir une biosonde de seconde génération (**122**) parfaitement soluble en milieu aqueux, un groupement hydrosolubilisant pourra être ajouté par chimie du palladium ou du lithium à partir du cryptophane **121** lui-même obtenu par halogénéation de **120** (Figure 124).

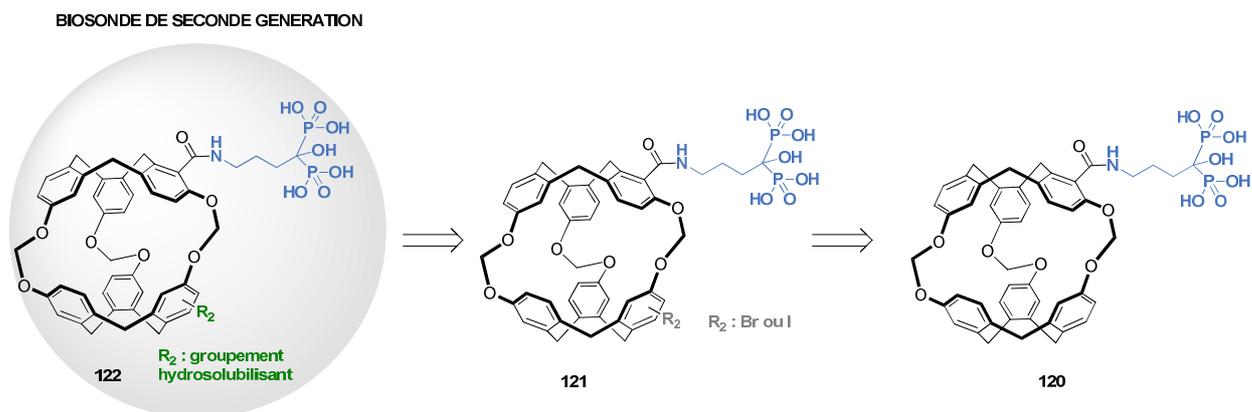


Figure 124: schéma rétrosynthétique 1 pour l'élaboration d'une biosonde de seconde génération

b. Schéma de synthèse

Le schéma de synthèse envisagé est présenté dans la Figure 125.

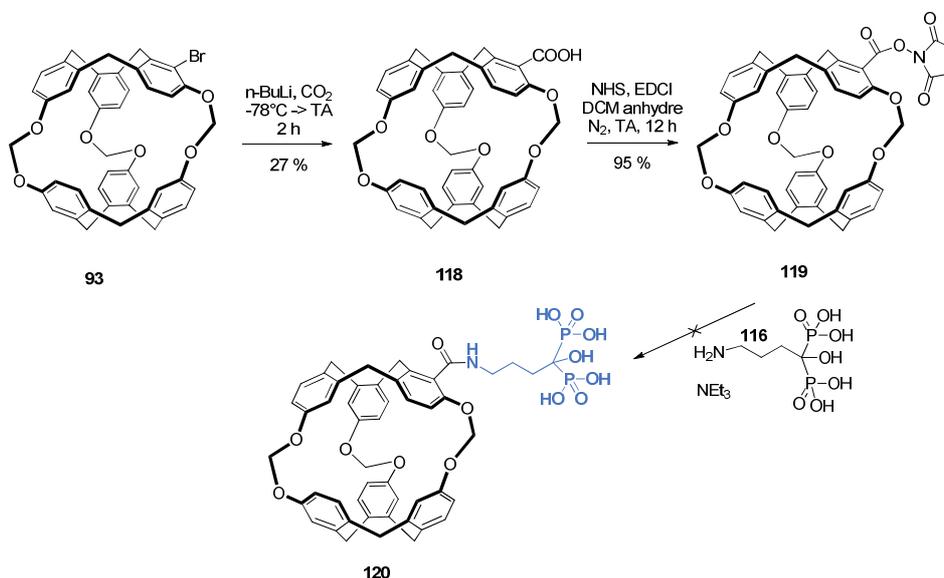


Figure 125: synthèse de **120**, biosonde de première génération

Le cryptophane **118** a été synthétisé par le Dr. T. Traoré pendant sa thèse. Il est obtenu par lithiation du précurseur **93** avec du *n*-butyllithium à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 minutes. Le lithien obtenu est ensuite piégé avec du dioxyde de carbone à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 heure puis à température ambiante 2 heures. Le cryptophane acide **118** est finalement isolé avec un rendement de 27 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

118 est ensuite activé pour former le cryptophane **119**. Pour ce faire, **118** est mis en solution avec un léger excès de NHS et d'EDCI dans du dichlorométhane anhydre pendant 12 heures, à température ambiante. **119** est finalement obtenu avec un rendement de 95 % après purification par chromatographie sur gel de silice.

Différentes conditions opératoires ont été testées pour obtenir la biosonde **120** de première génération et la réaction est suivie par LC/MS (Tableau 11). Un problème de solubilité se pose: l'alendronate est très soluble dans l'eau en présence de base et quasiment insoluble dans des solvants organiques, même très polaires. De son côté, le cryptophane ester activé **119** est partiellement soluble dans des solvants organiques comme le dichlorométhane ou le chloroforme et insoluble dans l'eau (remarque: il en est de même pour **118**). Dans ces conditions, nous avons travaillé soit dans un mélange de solvants organiques et aqueux, soit dans des solvants très polaires comme le DMF ou le DMSO.

base	solvant	temps (h)	T (°C)	produits observés en LC-MS
TEA	DMF / H ₂ O	12	TA	119 + trace de 118
TEA	DMF / H ₂ O	12	80	119 + trace de 118
NaOH	DMF / H ₂ O	12	100	118
TEA	DMF	72	60	119
TEA	DMSO	48	40	119
TEA	DMSO	72	60	119

Tableau 11: conditions opératoires testées pour obtenir le cryptophane **120**

Quelles que soit les conditions testées, aucune trace de cryptophane **120** n'a été observée. Il est possible que l'incompatibilité d'un point de vue de la solubilité entre l'alendronate **116** et le cryptophane **119** soit un obstacle pour cette réaction de couplage peptidique.

2. Stratégie de synthèse 2

a. Approche rétrosynthétique

Une seconde stratégie de synthèse a alors été développée pour pallier ce problème de solubilité (Figure 126). Nous avons donc décidé de partir du cryptophane hexa-fonctionnalisé **44**, déjà soluble en milieu aqueux. La biosonde **124** pourrait alors être obtenue par couplage peptidique entre l'alendronate **116** et le cryptophane **123**. Pour ce faire, une mono-activation d'un des acides de la molécule **44** par du NHS sera nécessaire. Jusqu'à présent, aucune biosonde n'a jamais été obtenue à partir du cryptophane **44** par cette stratégie de synthèse.

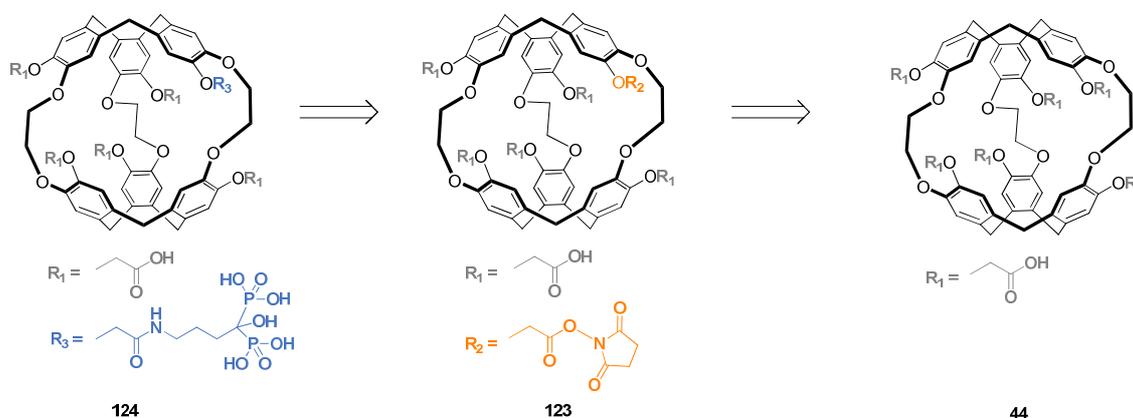


Figure 126: schéma rétrosynthétique 2 pour l'élaboration d'une biosonde à hydroxyapatite

b. Synthèse du cryptophane **44**

Le schéma de synthèse du cryptophane **44** est rappelé dans la Figure 127⁵⁰. Le groupement phénol de l'alcool vanillique **12** est d'abord protégé par le bromure d'allyle pour obtenir **13**. Puis **14** est isolé après cyclotrimérisation de **13** dans un mélange acide perchlorique / méthanol. La fonction allyle du CTV **14** est ensuite déprotégé pour donner le CTV **11** qui va être à son tour alkylé avec le monomère **13** pour obtenir la molécule **45**. Une seconde cyclotrimérisation, cette fois-ci dans l'acide formique, permet d'isoler le cryptophane-A. Finalement, après une étape de déméthylation, suivie d'une réaction d'alkylation avec le bromoacétate de méthyle puis d'une saponification, le cryptophane **44** est obtenu en 8 étapes linéaires avec un rendement global de 8,2 %.

Ce cryptophane nous a été fourni par le Dr. T. Brotin de l'ENS Lyon.

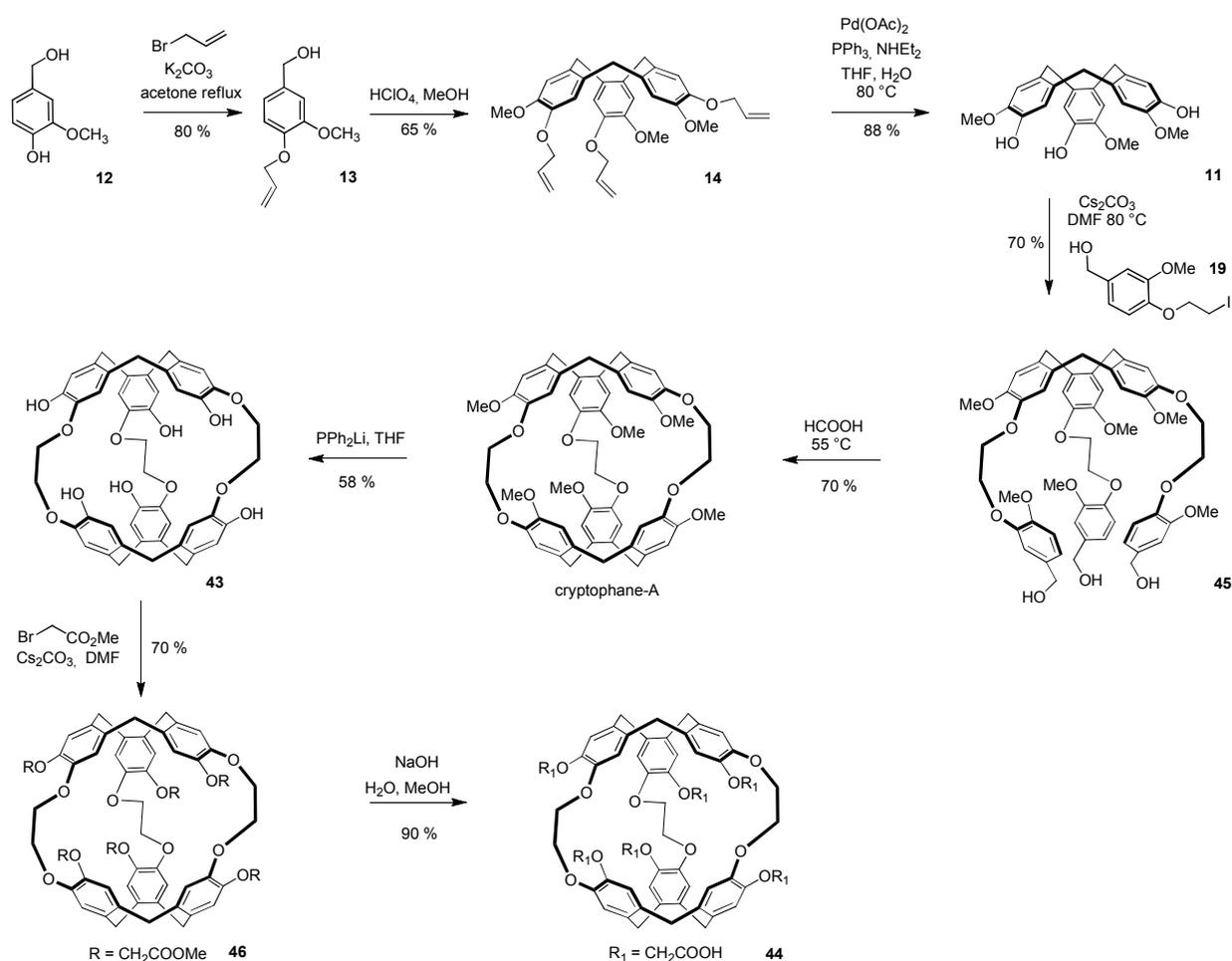


Figure 127: synthèse du cryptophane **44**

c. Couplage peptidique entre l'alendronate et le cryptophane **44**

La biosonde **124** est ensuite obtenue par couplage peptidique entre l'alendronate **116** et le cryptophane **44** (Figure 128).

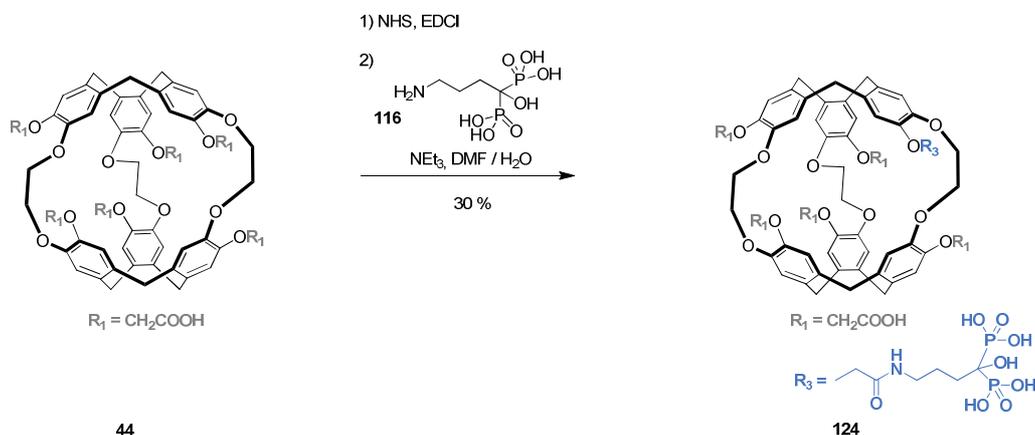


Figure 128: étape de couplage entre le cryptophane **44** et l'alendronate **116**

Une activation d'un des groupements acide carboxylique de la molécule **44** par du NHS et de l'EDCI est d'abord effectué. Les réactifs de départ sont introduits en quantité stoechiométrique et on suit la cinétique de la réaction par LC/MS (Figure 129). Au bout de 2 heures de réaction, le monoester activé **123** est obtenu majoritairement, on observe également la molécule **44** et les cryptophanes **125** et **126** où respectivement 2 et 3 fonctions acide carboxylique ont été activées par du NHS.

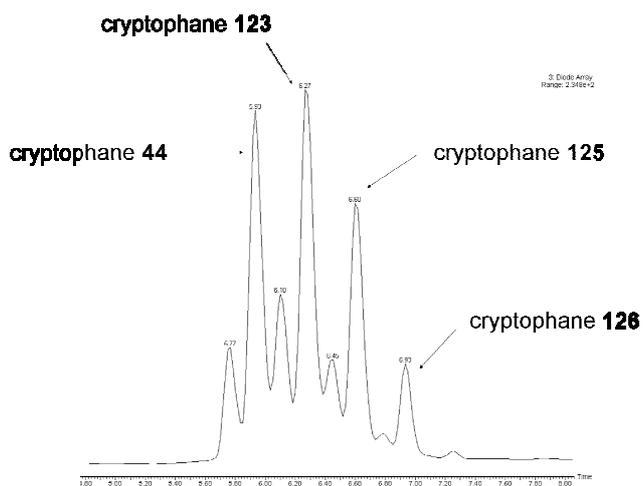


Figure 129: profil LC de l'étape de mono-activation de **44** au bout de 2 heures

L'alendronate préalablement solubilisé à pH 12 dans un mélange eau / TEA est ensuite introduit dans le milieu réactionnel et la réaction est laissée pendant 12 heures sous agitation à température ambiante. À la fin de la réaction, on observe majoritairement par LC/MS, les cryptophanes **124** (comportant une unité d'alendronate) et **44** (hydrolyse de l'ester activé) et minoritairement les cryptophanes **127** et **128** comportant respectivement 2 et 3 unités d'alendronate (Figure 130).

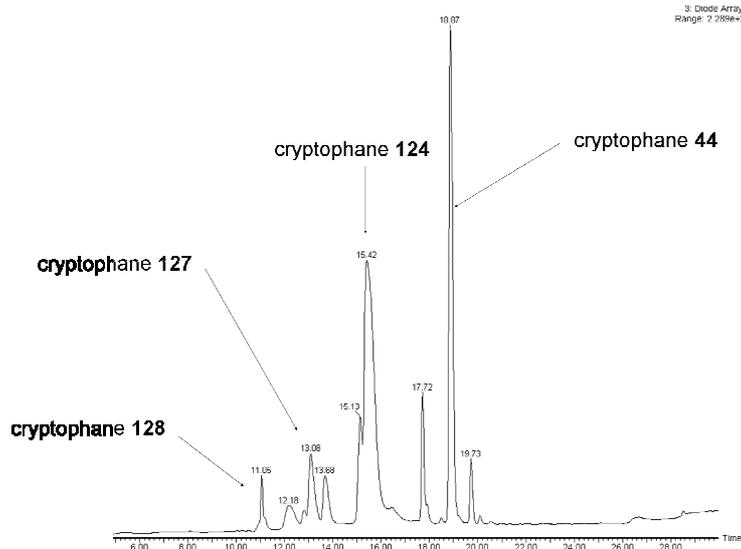


Figure 130: profil LC du brut réactionnel

La biosonde **124** est finalement isolée par chromatographie en phase inverse avec un rendement de 30 % (le rendement est calculé par rapport à la quantité de produit de départ qui a réagi).

3. Résultats RMN ^{31}P

a. RMN ^{31}P du complexe alendronate avec l'hydroxyapatite

Des tests en RMN ^{31}P de l'alendronate seul (**116**) ou en solution avec de l'hydroxyapatite (**HA**) ont d'abord été effectués. Les spectres témoins RMN ^{31}P de **116** et **HA** dans D_2O montrent deux pics à respectivement 17,9 et 0,37 ppm (à proximité du pic de référence d'acide phosphorique à 0,00 ppm) (Figure 131 (A) et (B)). Lorsqu'on rajoute un défaut d'hydroxyapatite, on observe un pic autour de 0,3 ppm (Figure 131(C)). En présence d'un excès d'hydroxyapatite, le pic correspondant à l'alendronate non complexé disparaît et seul le signal correspondant à 0,3 ppm est visible (Figure 131 (D)). Ces résultats nous montrent que le complexe alendronate / HA se forme bien. Cependant aucun signal spécifique à ce complexe n'est observé : soit il n'est pas soluble dans l'eau à pH 6, soit il possède le même déplacement chimique que l'hydroxyapatite seule.

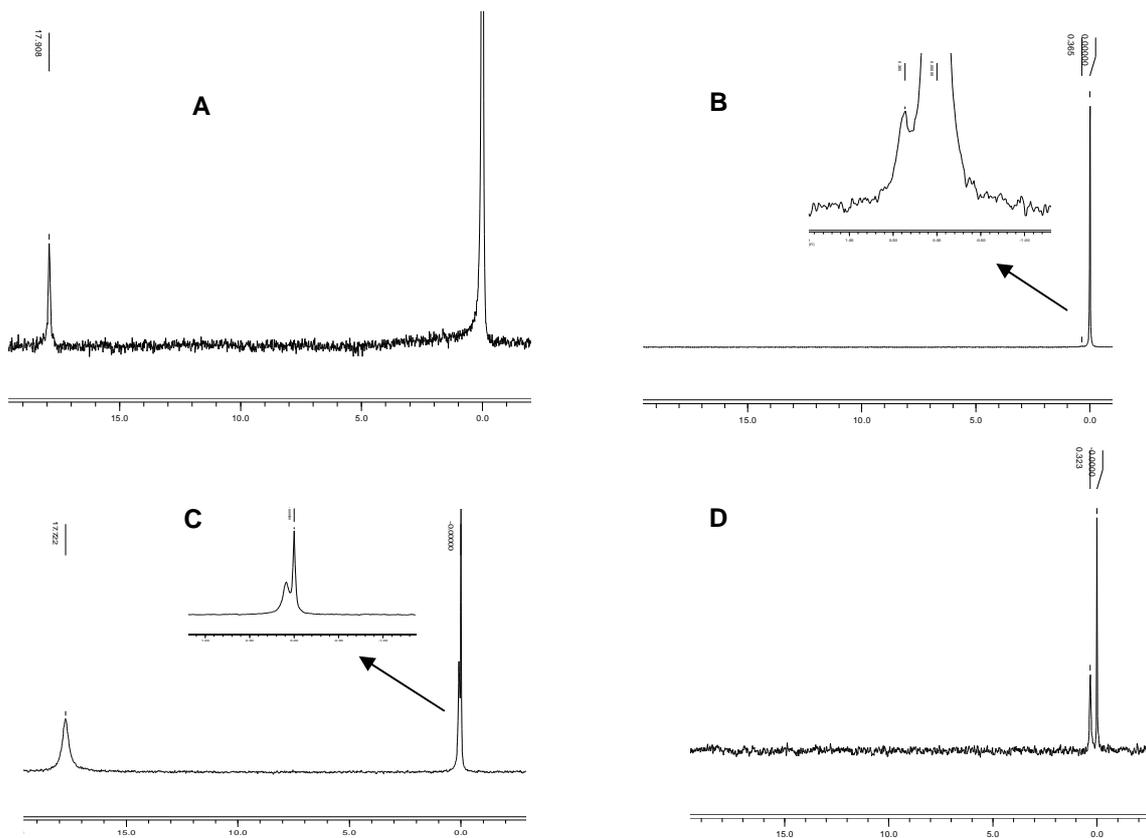


Figure 131: RMN ^{31}P dans D_2O à pH 6: (A) alendronate témoin ($4 \cdot 10^{-7}$ mol), (B) hydroxyapatite témoin (10^{-6} mol), (C) alendronate (10^{-5} mol) avec un défaut d'hydroxyapatite ($4 \cdot 10^{-6}$ mol), (D) alendronate ($4 \cdot 10^{-7}$ mol) avec un excès d'hydroxyapatite (10^{-6} mol)

b. RMN ^{31}P du complexe **124** avec l'hydroxyapatite

Nous avons alors décidé de reproduire les expériences précédentes avec la biosonde **124**. Pour cela, on se place à pH 6, de telle sorte que la majorité des fonctions acide carboxylique soit déprotonée. Le spectre RMN ^{31}P de **124** seul dans D_2O montre un pic à 18,43 ppm (Figure 132).

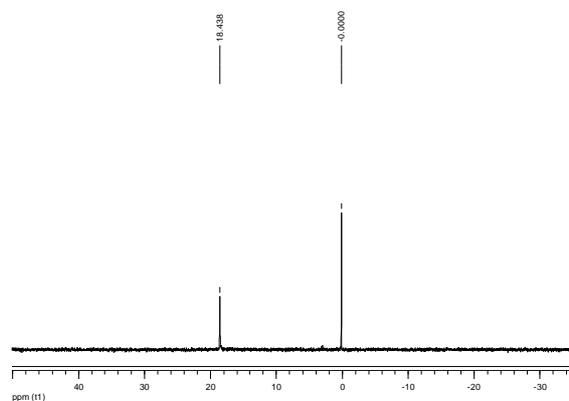


Figure 132: RMN ^{31}P de **124** ($3,6 \cdot 10^{-7}$ mol) dans D_2O à pH 6

La taille des particules d'hydroxyapatite varie entre 60 nm à 300 μm . Dès qu'on ajoute un défaut d'hydroxyapatite ($2 \cdot 10^{-7}$ mol), la solution se trouble et une suspension se forme. Le pic correspondant à **124** disparaît, ce qui montre que le complexe **124** / hydroxyapatite se forme. Cependant aucun signal correspondant à ce complexe n'apparaît.

4. Résultats RMN ^{129}Xe

Le spectre RMN ^{129}Xe du cryptophane **124** dans D_2O montre la présence d'un pic à 65 ppm correspondant au xénon encapsulé dans la biosonde (Figure 132).

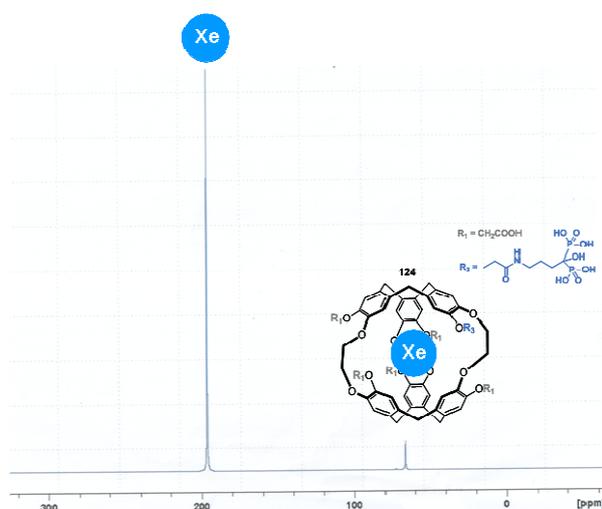


Figure 133: spectre RMN ^{129}Xe hyperpolarisé de **124** dans D_2O (1 mg / mL, 293 K, pH 7)

Un excès d'hydroxyapatite est ensuite ajouté dans le tube RMN. Le tube est alors agité et comme précédemment la solution se trouble instantanément et une suspension apparaît. Le spectre RMN ^{129}Xe de cette nouvelle solution montre la disparition immédiate du pic à 65 ppm. Comme pour les expériences en RMN ^{31}P , le complexe cryptophane **118** avec l'hydroxyapatite se forme bien mais ce dernier n'étant pas soluble dans l'eau, il s'ensuit une extinction du signal RMN.

D'autres tests ont été réalisés en utilisant des nanoparticules d'hydroxyapatite, préalablement dispersés à l'aide d'une sonde à ultrasons. Comme précédemment une disparition du signal RMN est observée.

En conclusion, à pH physiologique, la complexation de la biosonde **124** avec l'hydroxyapatite se traduit par la précipitation du complexe et donc la disparition du signal RMN ^{129}Xe . Il serait alors intéressant de décorer le cryptophane **124** par des groupements solubilisants (de type polyéthylène glycol par exemple) afin de rendre hydrosoluble le complexe et donc de le détecter par RMN ^{129}Xe .

III. AUTRES APPLICATIONS DU CRYPTOPHANE 124

1. Biosonde pour la détection d'uranium

In vivo, la toxicité d'un métal se manifeste comme le résultat d'interactions qu'il développe avec les constituants de l'organisme. Un ligand (L) spécifique du métal (M) à éliminer est donc susceptible de limiter ces interactions nocives en formant un complexe qui pourra par la suite être excrété du corps et ainsi agir comme un antidote. Au cours de ces dernières années, de nombreux scientifiques ont cherché à développer de nouveaux ligands pour éliminer l'uranium du corps humain et réduire ainsi sa fixation sur des organes cibles (le rein et les os)^{128, 129}.

a. Propriétés chimiques de l'uranium

i. Degrés d'oxydation de l'uranium

L'atome d'uranium possède la configuration électronique suivante: $5s^2 5p^6 5d^{10} 5f^3 6s^2 6p^6 6d^1 7s^2$. Les six électrons les plus externes des couches 5f, 6d et 7s constituent le système des électrons de valence de l'uranium. Les états d'oxydation de l'uranium sont nombreux allant de + III à + VI, sans oublier le degré zéro de l'uranium métallique. Parmi les degrés d'oxydation de l'uranium en solution aqueuse, U(IV) et U(VI) sont les plus importants. En effet, ce sont ces espèces que l'on retrouve en très grande quantité dans l'environnement et dans les milieux biologiques. *In vivo*, U(IV) est rapidement oxydé en U(VI). C'est donc ce seul degré d'oxydation qui focalise notre intérêt pour la détection par IRM ^{129}Xe . U(VI) est présent dans l'eau sous forme d'ions oxo-aqua, de formule $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$. L'atome d'uranium forme alors une entité linéaire $\text{O}=\text{U}=\text{O}$ appelée uranyle (UO_2^{2+}).

ii. Diagramme de spéciation de U(VI)

La spéciation de l'uranyle en milieu aqueux est complexe: U(IV) peut se trouver sous différentes formes selon le pH (Figure 134)^{130,131}. À pH acide, UO_2^{2+} est l'espèce majoritaire alors qu'à pH basique des espèces hydroxylées de type $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ ou $\text{UO}_2(\text{OH})_4^{2-}$ ou carbonatées ($\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$) vont se former. La présence de tels complexes à pH supérieur à 6 peut masquer la fluorescence et gêner ou empêcher la complexation de l'uranyle avec le ligand. C'est pour cela qu'il est préférable de se placer à des pH inférieurs à 5,5.

¹²⁸ P. W. Durbin, B. Kullgren, J. D. Xu, K. N. Raymond, *Radiat. Prot. Dosim.*, **1998**, 79, 433.

¹²⁹ M. A. Basinger, R. L. Forti, L. T. J. Burka, *Toxicol. Environ. Health*, **1983**, 64, 237.

¹³⁰ J. J. Katz, G. T. Seaborg, L. R. Morss, *The Chemistry of the Actinide Elements*, Chapman and Hall: London/New York, **1986**, 2

¹³¹ Based on the complexing constant of the Organization for Economic Cooperation and Developments Nuclear Energy Agency (O.E.C.DN-E.A) thermodynamical database.

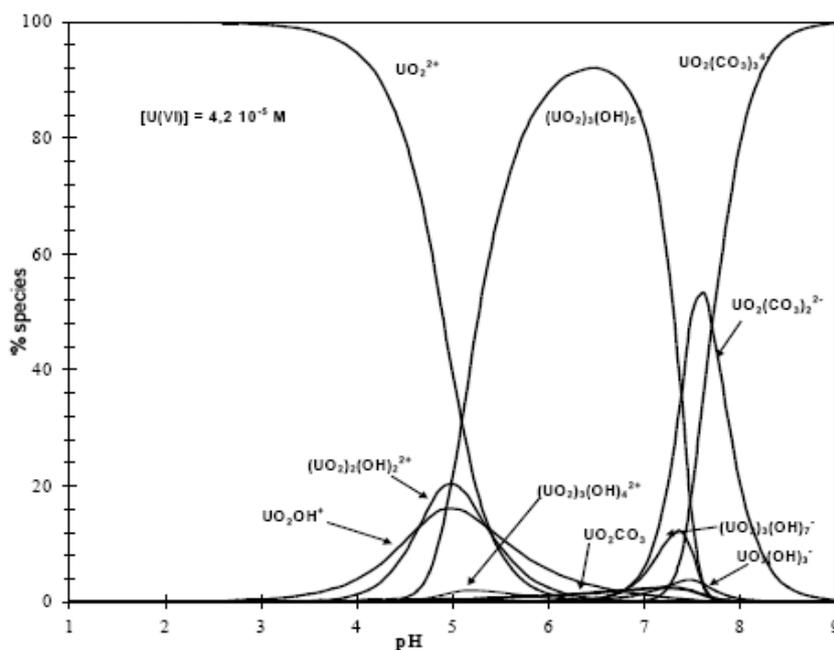


Figure 134: diagramme de spéciation de UO_2^{2+} à $4,2 \times 10^{-5}$ M

iii. Fluorescence de l'ion uranyle

De façon similaire aux lanthanides, suite à une excitation, la fluorescence des sels d'uranyle a lieu pendant une période de temps relativement longue: de quelques microsecondes à plus de 100 microsecondes en fonction des conditions expérimentales (contre moins de la nanoseconde pour les fluorophores organiques). Le spectre d'émission de fluorescence de l'ion uranyle reflète la vibration symétrique de la liaison U-O et est composé de cinq raies d'émission caractéristiques à $\lambda = 470, 488, 509, 533$ et 558 nm (Figure 135).

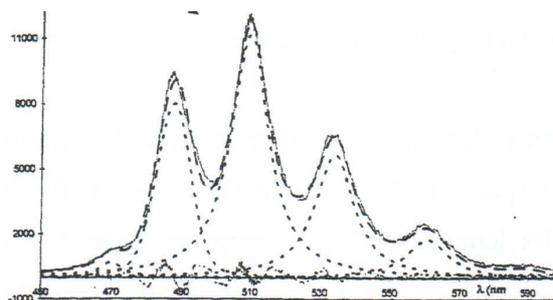


Figure 135: fluorescence de l'ion uranyle

Parmi les méthodes connues utilisant les propriétés de fluorescence de l'uranyle, la spectrophotométrie laser à résolution temporelle (SLRT) est une méthode très sensible pour la

détection de UO_2^{2+} ¹³². Elle est fondée sur une excitation laser suivie de la résolution temporelle (positionnement d'une fenêtre de mesure quelques microsecondes après l'impulsion laser) du signal de fluorescence permettant l'élimination des fluorescences parasites (organique, etc) à temps de vie courts (durée de vie < 100 ns). La limite de détection est de 10^{-12} M avec l'aide d'un agent complexant comme l'acide phosphorique.

b. Les bis-phosphonates, ligands de l'uranyle

i. Les complexes bis-phosphonates / uranyle

Le pouvoir complexant des bis-phosphonates pour l'uranyle, exacerbé par le caractère ionique qu'ils adoptent en solution (faible pKa), est bien connu de la littérature (Figure 136)¹³³. Suivant la concentration du ligand, deux types de complexes ML_n (avec $n = 1$ ou 2) peuvent probablement se former (Figure 136)¹³⁴:

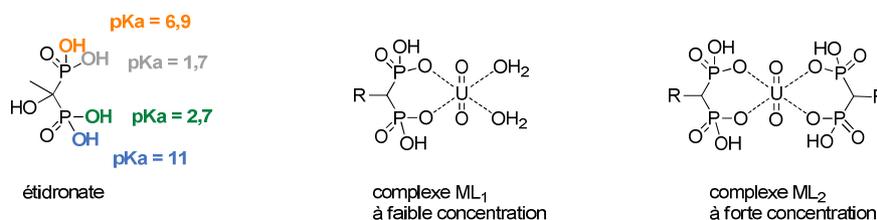


Figure 136: structure et valeurs de pKa de l'étidronate. Coordination hypothétique des bis-phosphonates avec l'ion uranyle.

ii. Les bis-phosphonates et leur influence sur la fluorescence de l'uranyle

La complexation de l'ion uranyle par certains ligands va augmenter la fluorescence de l'uranyle. C'est le cas des bis-phosphonates¹³⁴. La Figure 137 présente la fluorescence de l'uranyle par ajouts croissants de bis-phosphonate (ici A7B6)¹³⁵. On constate que la fluorescence augmente jusqu'à saturation à partir d'un équivalent de bis-phosphonate ajouté. Ce résultat permet également de conclure sur la nature du complexe: dans ce cas-là il s'agit d'un complexe 1 / 1.

¹³² C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre, *Appl. Spectrosc.*, **1998**, 52, 528

¹³³ J. E. Bollinger, D. M. Roundhill, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 6421

¹³⁴ C. Jacopin, M. Sawicki, G. Plancque, D. Doizi, F. Taran, E. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, *Inorganic Chemistry*, **2003**, 42, 5015

¹³⁵ M. Sawicki, J-M. Siaugue, C. Jacopin, C. Moulin, T. Bailly, R. Burgada, S. Meunier, P. Baret, J-L. Pierre, F. Taran, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 3689

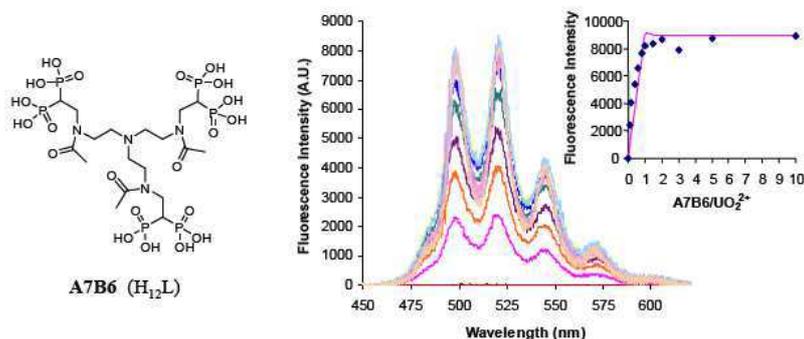


Figure 137: structure du ligand A7B6. Spectre de fluorescence d'une solution de UO_2^{2+} (4,2 mM) après ajouts croissants d'A7B6 (0,1M NaClO_4), pH = 5,5. Intensité expérimentale et théorique de la fluorescence de l'uranyle en fonction du ratio $\text{A7B6} / \text{UO}_2^{2+}$ à $\lambda_{\text{ex}} = 266 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$.

c. Résultats des tests de fluorescence

L'uranyle présentant une signature caractéristique en fluorescence, il nous a semblé intéressant d'étudier le complexe de la biosonde **124** avec UO_2^{2+} par fluorescence.

Un test rapide, décrit dans la partie expérimentale, nous a permis d'observer une disparition de la signature caractéristique de l'uranyle. Un nouveau pic d'émission, ne correspondant pas au signal de la biosonde seule apparaît vers les longueurs d'onde plus grandes et augmente jusqu'à arriver à saturation au bout de 30 minutes (Figure 138).

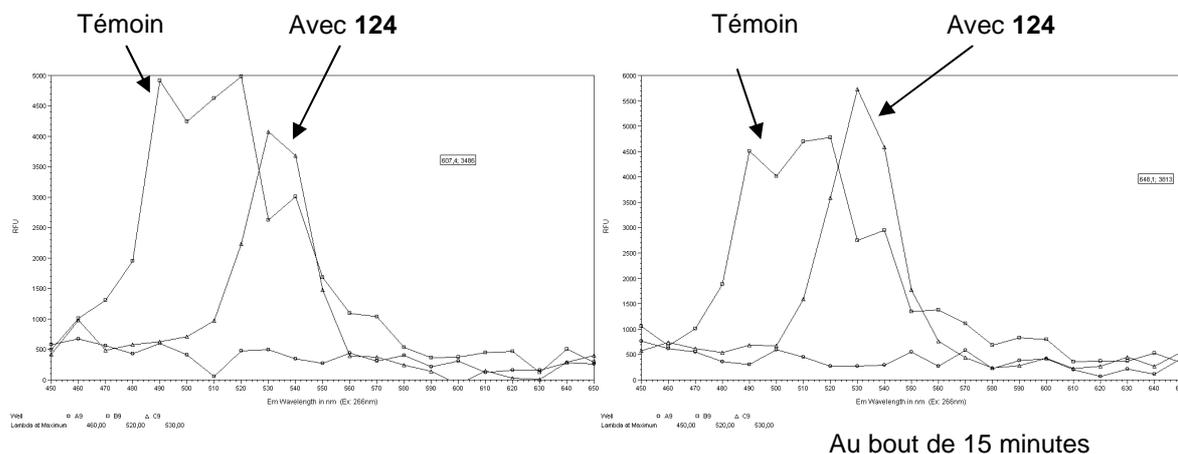


Figure 138: fluorescence d'une solution d'uranyle $[\text{UO}_2(\text{OAc})_2] = 0,1 \mu\text{M}$ en présence de 20 équivalents de cryptophane **124** (0,9 mM); $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$; $\Delta t = 50 - 250 \mu\text{sec}$

Ces résultats sont difficilement interprétables. D'autres tests consistant à ajouter des quantités croissantes de biosondes **124** ont également été effectués mais se sont avérés peu concluants.

d. Résultats RMN ^{129}Xe

Afin de simplifier l'interprétation du spectre RMN ^{129}Xe , nous avons étudié préférentiellement le complexe ML_2 . Nous avons donc travaillé avec une solution de cryptophane **124** contenant un défaut d'uranyle (0,2 équivalent) à pH ~ 5 - 6.

Le spectre RMN ^{129}Xe , réalisé par l'équipe de P. Berthault, montre un écart de déplacement chimique de 0,2 ppm entre le xénon encapsulé dans le cryptophane **124** libre et encapsulé dans **124** complexé à l'uranyle (Figure 139). On remarquera également un léger épaulement à gauche du pic correspondant au complexe. Cet épaulement pourrait correspondre au complexe ML_1 .

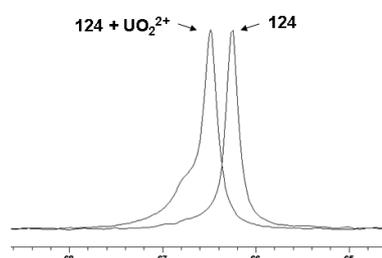


Figure 139: RMN ^{129}Xe hyperpolarisé dans D_2O de **124** avec et sans UO_2^{2+} (1 mg / mL, 293 K, pH = 5,5)

Ce faible écart de déplacement chimique pourrait s'expliquer par le trop grand éloignement entre l'intérieur du cryptophane dans lequel va entrer et sortir le xénon et la "tête" chélatante de l'alendronate.

Ces résultats obtenus par RMN ^{129}Xe montrent que la complexation de l'ion uranyle avec la biosonde **124** conduit comme espéré à une variation du déplacement chimique du xénon encapsulé. Cette variation confirme la grande sensibilité du xénon à son environnement. Malheureusement elle reste trop faible et difficilement utilisable pour de l'imagerie.

2. Biosonde pour la mesure du pH extracellulaire

Comme nous l'avons vu dans la Figure 136, un des pKa des bis-phosphonates est proche du pH physiologique. Il est donc intéressant de tester le potentiel du cryptophane **124** en tant que sonde à pH. Des tests en RMN ^{129}Xe de **124** dans D_2O ont été réalisés à différents pH: 6, 8 et 7 (Figure 140). Les études ont été réalisées à des pH supérieurs à 5 afin d'avoir les fonctions acide carboxylique déprotonées et donc de suivre uniquement la protonation / déprotonation de la tête alendronate.

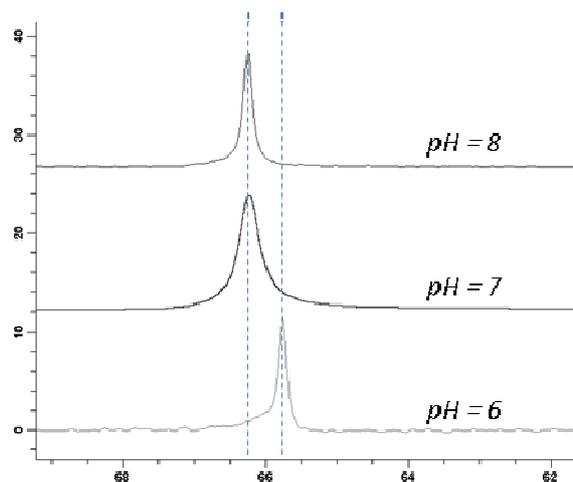


Figure 140: spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé de **124** dans D_2O (1 mg / mL, 293 K)

La gamme de pH a été faite par ajout de NaOD. Entre pH 8 et 7, comme prévu, aucune modification du déplacement chimique du xénon n'est observée. Entre pH 6 et pH 7, le spectre RMN ^{129}Xe montre un écart de déplacement chimique de 0,5 ppm entre le xénon encapsulé dans **124** comportant respectivement 7 et 8 charges négatives (Figure 141).

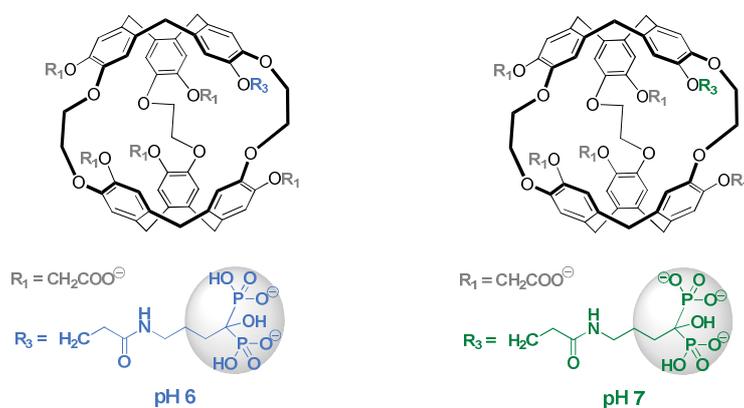


Figure 141: biosonde 124 à pH 6 et à pH 7

Ces résultats nous montrent que le xénon est suffisamment sensible pour observer le phénomène de protonation et déprotonation de la biosonde **124** autour du pH physiologique. Mais comme précédemment, cette variation reste trop faible et difficilement utilisable pour de l'imagerie. Le cryptophane **111** décrit précédemment semble bien mieux adapté pour la mesure du pH extra-cellulaire par RMN ^{129}Xe .

IV. CONCLUSION

Nous avons d'abord tenté de synthétiser une biosonde pour la détection de microcalcifications à partir du cryptophane-111 mono acide (**118**). Une trop grande différence de solubilité entre la fonction alendronate et le composé **118** n'a pas permis de réaliser le couplage peptidique entre ces deux composés et donc d'obtenir la biosonde **120** envisagée.

Nous avons ensuite mis au point une nouvelle stratégie pour la synthèse d'un cryptophane hydrosoluble et fonctionnalisé par un groupement alendronate à partir du composé **44**. Pour ce faire, **44** a d'abord été mono-activé par du NHS puis un couplage peptidique avec l'alendronate a permis l'obtention de la biosonde finale **124**.

La complexation de la biosonde **124** avec l'hydroxyapatite a été étudiée par RMN ^{129}Xe . Nous avons constaté une disparition du signal RMN, due à la précipitation du complexe. Aucun signal nouveau correspondant à **124** complexé à **HA** n'a donc été observé.

Nous nous sommes également intéressés à la complexation du cryptophane **124** avec l'uranyle par fluorescence et par RMN ^{129}Xe . Seuls les résultats RMN ^{129}Xe nous ont permis de conclure sur la formation du complexe. Cependant, la variation de déplacement chimique du xénon (0,2 ppm) n'est pas suffisante pour envisager de l'imagerie.

Enfin, nous avons étudié l'écart de déplacement chimique du xénon encapsulé dans le cryptophane **124** à différents pH. Comme précédemment cet écart (0,5 ppm) est trop faible pour faire de l'imagerie.

Afin d'augmenter la sensibilité du xénon face à ces variations d'environnement, nous pouvons envisager deux possibilités pour la suite:

- travailler avec un bis-phosphonate plus court (comme le pamidronate) permettant de rapprocher ce dernier du cœur du cryptophane.
- travailler avec une cage plus petite telle qu'un cryptophane-111 hydrosoluble.

PARTIE E

PLATEFORME GÉNÉRALE POUR LA SYNTHÈSE DE BIOSONDES

E. PLATEFORME GÉNÉRALE POUR LA SYNTHÈSE DE BIOSONDES

I. CONTEXTE

Toutes les biosondes décrites à ce jour (partie A.III.3.d) comportent de nombreux inconvénients:

- les synthèses sont longues et présentent de faibles rendements.
- la très faible hydrosolubilité du cryptophane peut favoriser les interactions de ce dernier avec la membrane cellulaire. D'autre part, le fort caractère hydrophile de l'antenne de reconnaissance contrastant avec le caractère hydrophobe de la cage peut entraîner la formation de systèmes auto-organisés de type micelles ou vésicules. Ces deux paramètres peuvent compromettre les applications *in vivo*.

Notre objectif est de mettre au point une plateforme qui serait d'une utilisation générale pour la synthèse de biosondes en IRM ^{129}Xe . Les qualités requises pour une telle plateforme sont:

- être hydrosoluble avant d'être fonctionnalisée par une antenne de reconnaissance.
- être obtenue en peu d'étapes avec de bons rendements.
- être facilement fonctionnalisable par des méthodes classiques (chimie *click*, couplage peptidique, alkylation).
- être non toxique.
- avoir de bonnes propriétés d'encapsulation du ^{129}Xe en termes de constante d'affinité, de vitesse d'échange et de relaxation.

La Figure 142 présente le concept d'une telle plateforme.

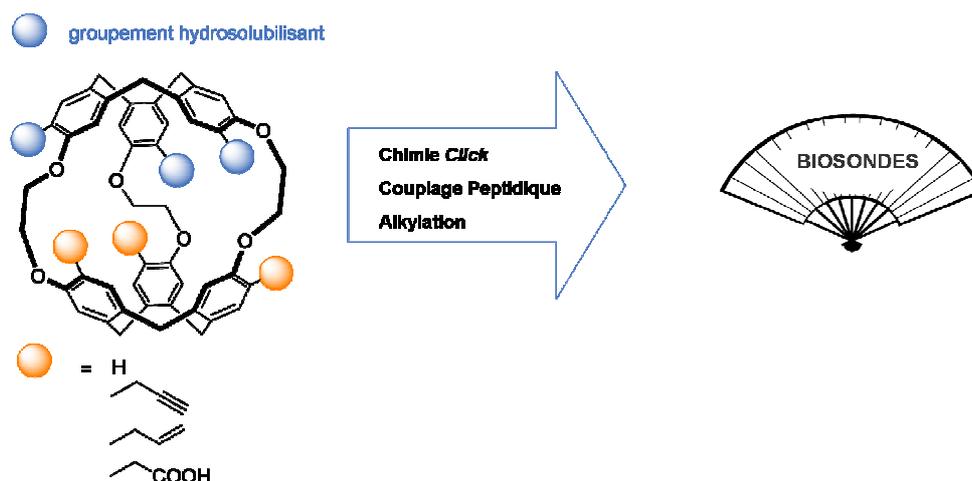


Figure 142: concept de la plateforme générale pour la synthèse de nouvelles biosondes

II. SYNTHÈSE DE LA PLATEFORME

1. Conception de la plateforme

Comme nous l'avons vu dans la partie A. II. 3. a, les biosondes comportent trois parties: un cryptophane, une antenne de reconnaissance et un bras espaceur reliant les deux premiers motifs. Deux stratégies peuvent être envisagées pour obtenir une plateforme hydrosoluble répondant au cahier des charges décrit dans le paragraphe précédent:

La première approche consiste à introduire des groupements hydrosolubilisants sur le bras espaceur. Cette méthode présente l'avantage de ne pas avoir à développer une nouvelle méthode de synthèse du cryptophane. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il se pose alors le problème du caractère hydrophobe de la molécule cage.

La seconde approche consiste à introduire les groupements solubilisants sur le cryptophane afin d'obtenir une molécule cage hydrosoluble avant fonctionnalisation. Cette méthode a l'avantage d'éviter les problèmes d'hydrophobie du cryptophane et les phénomènes d'auto-assemblages mais elle nécessite le développement d'une nouvelle stratégie de synthèse. Nous avons décidé de poursuivre nos recherches en suivant cette approche.

2. Choix du groupement solubilisant et compatibilité avec l'encapsulation du ^{129}Xe

Le groupement polyéthylène glycol (PEG) nous a semblé être un groupement hydrosoluble prometteur tant pour la synthèse que pour les applications *in vivo*:

- la présence de groupements hydrophiles et hydrophobes sur le PEG lui confère une très bonne solubilité à la fois en milieu organique et en milieu aqueux.
- il est inerte vis à vis de nombreuses réactions chimiques comme l'oxydation, la réduction, les acides et les bases.
- il est stable à haute température.
- il est biocompatible et utilisé dans de nombreuses applications pharmaceutiques et biomédicales.

Nous avons choisi de travailler avec le méthoxy-polyéthylène glycol 550 (masse molaire moyenne en nombre M_n : 550, soit environ 11 motifs éthylèneglycol). Le **PEG 550** est

suffisamment long pour permettre une très bonne solubilisation du cryptophane en milieu aqueux mais pas trop long pour éviter des étapes de purification compliquées.

De par la grande taille et la flexibilité du PEG 550, la présence de plusieurs groupements polyéthylène glycol sur le cryptophane (masse moléculaire de l'ordre de 1000 g / mol) peut venir obstruer le portail d'entrée du xénon. Avant de développer toute nouvelle stratégie de synthèse, il est donc important de vérifier par RMN ^{129}Xe que les PEG greffés sur le cryptophane ne vont pas empêcher l'encapsulation du xénon. Pour ce faire, le cryptophane **130** a été synthétisé en une étape à partir du cryptophane **43** (Figure 127 et Figure 143)⁵⁰.

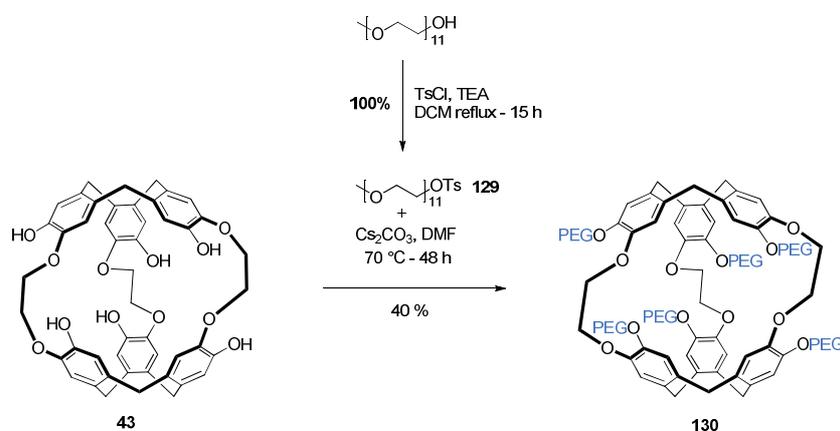


Figure 143: synthèse du cryptophane **130**

Le méthoxy-polyéthylène glycol 550 est dans un premier temps activé par le chlorure de tosylo. Le PEG tosylate **129** est obtenu de manière quantitative après filtration sur silice. En parallèle, le cryptophane **43** a été obtenu en suivant le schéma de synthèse décrit dans la Figure 127, sous les conseils de T. Brotin⁵⁰. Puis, **43** est alkylé avec **129** en présence de carbonate de césium, dans du DMF. Le composé **130** est finalement isolé avec un rendement non optimisé de 40 %, après purification par chromatographie sur gel de silice.

Le cryptophane **130** est ensuite testé en RMN ^{129}Xe afin de s'assurer qu'il encapsule bien le xénon. En un scan, un signal très net apparaît aux alentours de 80 ppm et à une fréquence différente de celles généralement obtenues avec des analogues du cryptophane-A (autour de 60 ppm) (Figure 144). Ce cryptophane, très soluble dans l'eau, présente une forte constante d'affinité de $5800 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ à 293 K, quasiment équivalente à celle du cryptophane **44** (6800 M^{-1} à 293 K dans D₂O).

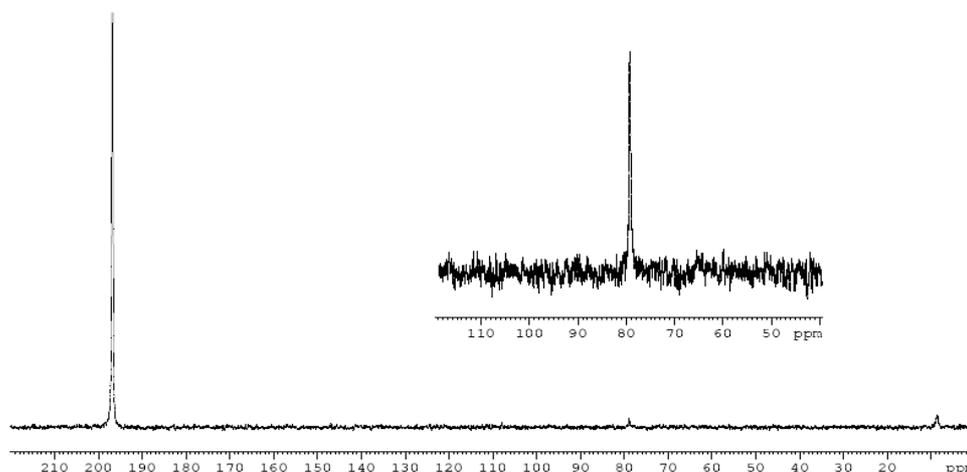


Figure 144: spectre RMN ^{129}Xe du cryptophane **130** (33 μM) dans D_2O à 293 K

Ces résultats sont très encourageants et confirment notre choix du PEG comme groupement hydrosoluble pour l'obtention de la plateforme.

3. Nouvelle stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse repose sur la construction d'un CTV porteur de **PEG 550** comme groupement hydrosoluble. Ce groupement sera introduit dès la première étape afin d'éviter la protection et déprotection de l'alcool vanillique de départ. Cette stratégie permettra également de faciliter les conditions de synthèse et de purification en apportant une meilleure solubilité en milieux organique et aqueux aux intermédiaires de synthèse (Figure 145).

La plateforme sera ensuite obtenue à partir d'alcools benzyliques portant un groupement fonctionnalisant (alcyne, alcène, acide carboxylique ou encore alcool) par une méthode bien documentée: la méthode template (Partie A. III. 3. b. ii). Les fonctions alcyne et alcène permettront le greffage d'une antenne de reconnaissance sur le cryptophane par chimie *click* (cycloaddition de Huisgen, *click* thiol-ène). Les fonctions acide et alcool serviront respectivement pour les couplages peptidiques et les réactions d'alkylations.

À notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle stratégie, introduisant un groupement hydrosoluble dès la première étape, a été développée.

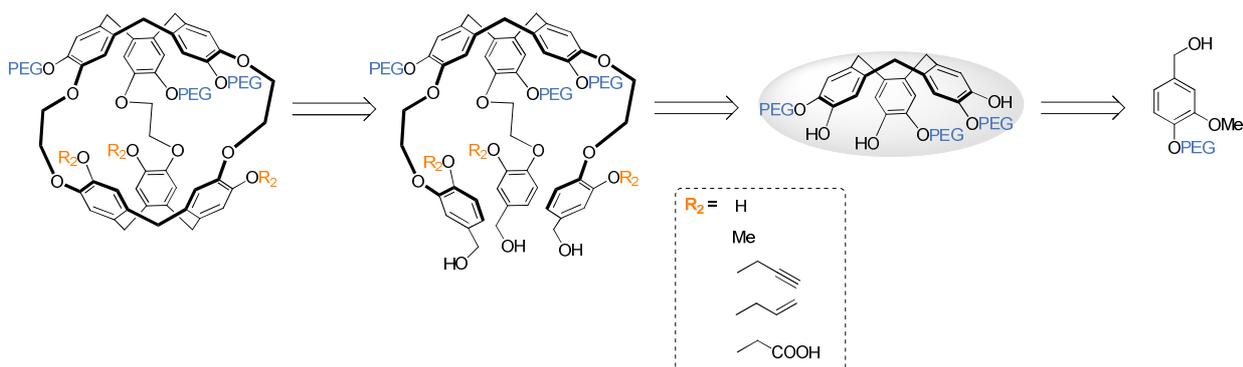


Figure 145: schéma rétrosynthétique pour l'élaboration de la plateforme

4. Synthèse de la plateforme

a. Synthèse de cryptophanes hydrosolubles précurseurs de biosondes

Le schéma réactionnel est présenté dans la figure suivante:

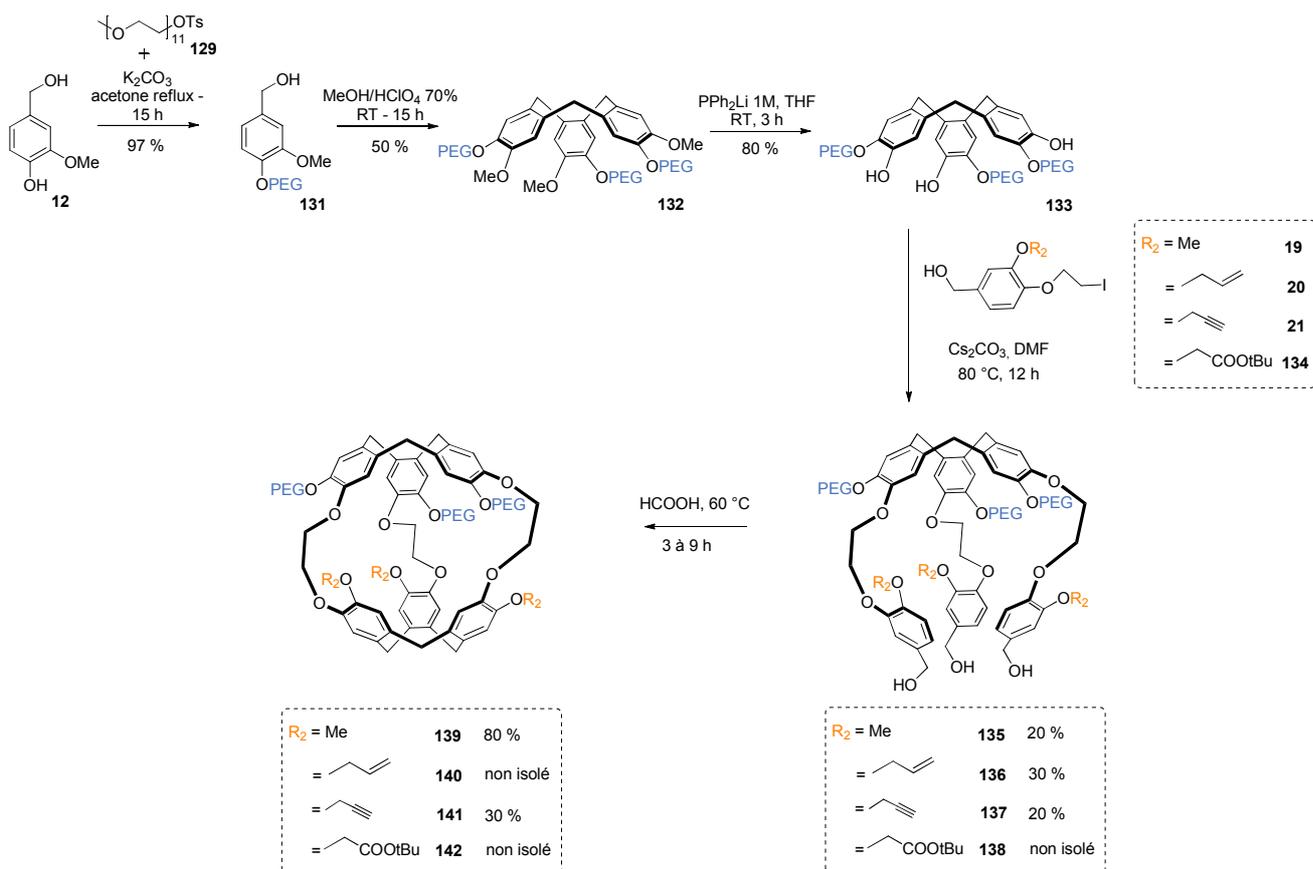


Figure 146: synthèse de cryptophanes hydrosolubles et trifonctionnalisés, précurseurs de biosondes

Afin de synthétiser en grande quantité le précurseur PEG **129**, une méthode de purification par extractions successives eau / diéthyl éther et eau / dichlorométhane a été mise au point et a permis d'obtenir **129** sur une échelle de 10 grammes, sans passer par une filtration sur silice.

L'alcool vanillique **12** est d'abord alkylé avec le composé **129** (Figure 143) en présence de carbonate de potassium dans l'acétone à reflux pendant une nuit. L'intermédiaire **131** est alors isolé avec un rendement de 97 % sans purification par chromatographie sur gel de silice. Il est actuellement synthétisable sur une échelle de 10 grammes.

La première cyclotrimérisation est effectuée dans des conditions classiques (70 % acide perchlorique / MeOH 1 : 2). On observe dans le brut réactionnel la présence d'oligomères difficilement séparables du produit **132** par chromatographie sur gel de silice. De tels oligomères ont déjà été décrits dans la littérature pour la synthèse d'autres CTV⁶². Le résidu obtenu après extraction liquide / liquide est directement engagé dans l'étape suivante sans purification. Afin de le caractériser, **132** a été purifié par chromatographie en phase inverse, ce qui a de plus permis de déterminer le rendement de cette réaction (50 %). Des tentatives d'optimisation de ce rendement ont été effectuées afin de diminuer la quantité d'oligomères. Cette réaction a été testée avec un autre acide: le triflate de scandium (Sc(OTf)₃). Ce dernier est décrit par l'équipe de J-P. Dutasta et T. Brotin, comme permettant la cyclotrimérisation avec de bons rendements tout en diminuant la formation de produits secondaires⁹³. Dans notre cas, quel que soit l'acide utilisé (HClO₄ ou Sc(OTf)₃), le pourcentage de CTV **132** par rapport aux polymères, estimé par RMN ¹H, ne change pas (Tableau 12).

Acide	Solvant	T (°C)	t (h)	rendement 132 (%) estimé par RMN ¹ H
HClO ₄	méthanol	TA	18	50
Sc(OTf) ₃	acétonitrile	60	18	50

Tableau 12: tests de cyclotrimérisation avec différents acides

La réaction de cyclotrimérisation a également été testée dans l'acide perchlorique en faisant varier la nature du solvant (méthanol, eau, sans solvant) et le temps de réaction afin d'étudier l'influence du solvant sur la cinétique de formation de **132** par rapport aux polymères. Ces réactions ont été suivies par LC/MS après 2, 4, 6 et 22 heures. Le PEG **550** présentant une distribution en poids moléculaire, le profil en spectrométrie de masse est vite compliqué et il est donc difficile d'analyser le brut réactionnel. Pour faire cette étude, un PEG à 8 motifs uniques, sans distribution de masse, a été utilisé. Les résultats sont présentés dans le Tableau 13.

Entrée	Acide	Solvant	t (h)	rendement 132 (%) estimé en LC/MS
1	HClO ₄ *	méthanol	2	0
2	HClO ₄ *	méthanol	4	5
3	HClO ₄ *	méthanol	6	40
4	HClO ₄	méthanol	22	50

5	HClO ₄ *	eau	2	54
6	HClO ₄ *	eau	4	58
7	HClO ₄ *	eau	6	58
8	HClO ₄ *	eau	22	58

9	HClO ₄	aucun	2	60
10	HClO ₄	aucun	4	50
11	HClO ₄	aucun	6	40
12	HClO ₄	aucun	22	0

Tableau 13: cinétique de cyclotrimérisation avec HClO₄ dans différents solvants à TA.
* pourcentage volumique acide perchlorique / solvant (méthanol ou eau) est égal à 1 : 2

La nature du solvant modifie non seulement la cinétique mais également la nature des impuretés formées lors de la réaction.

- Cinétique

La cinétique de la réaction est quasiment identique en utilisant l'acide perchlorique pur et en utilisant l'acide perchlorique / eau: respectivement 60 et 54 % de rendement au bout de 2 heures (entrées 5 et 9). Par contre, en acide perchlorique pur, le CTV **132** se dégrade avec le temps et au bout de 22 heures, aucune trace de produit final n'est visible en LC/MS (entrée 12). En présence de méthanol, la cinétique est beaucoup plus lente et un rendement de 50 % n'est obtenu qu'au bout de 22 heures (entrée 4).

- Nature des impuretés

Les trois essais ont été arrêtés, traités puis analysés par RMN ¹H dès que le rendement avait atteint 50 %. Lorsque le milieu réactionnel contient du méthanol ou de l'eau, on observe des spectres quasiment identiques avec environ 50 % de CTV **132** et 50 % de produits secondaires pouvant correspondre à des polymères. La nature du solvant (aqueux ou organique) ne change donc pas de manière significative le rendement de la réaction. De plus, lorsque le milieu

réactionnel contient uniquement de l'acide perchlorique, le spectre RMN ^1H montre un profil différent, ce qui laisse penser que d'autres produits secondaires se forment. La nature des impuretés dépend donc du milieu réactionnel.

Des tests de déméthylation ont ensuite été effectués avec du tribromure de bore (BBr_3) mais conduisent à une dégradation du CTV **132**. La déméthylation en présence d'une solution de PPh_2Li fraîchement synthétisée permet l'obtention du CTV **133** avec un rendement de 80 %. La solution de PPh_2Li est préparée par réaction du lithium métal avec de la chlorodiphényl phosphine (Figure 147)⁵⁰. Une chromatographie sur gel de silice permet d'éliminer les dérivés de phosphine et de séparer les oligomères déméthylés obtenus lors de l'étape précédente du produit **133**.

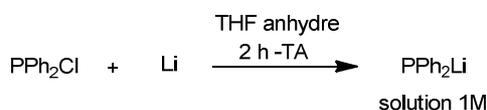


Figure 147: synthèse d'une solution de PPh_2Li

Les monomères **19**, **20**, **21** et **134** (alcools benzyliques précurseurs de la seconde unité de CTV) sont synthétisés avec de bons rendements conformément à la littérature (Figure 57 page 59).

L'alkylation du CTV **133** par les monomères fonctionnalisés **19**, **20**, **21** ou **134** conduit respectivement aux composés **135**, **136** et **137** et **138** (Figure 146). Il s'agit de l'étape limitante de cette synthèse: les rendements sont modestes et les purifications difficiles. Les produits **135**, **136** et **137** ont été isolés, après chromatographie sur phase inverse, avec des rendements respectifs de 20 %, 30 % et 20 %. Ces rendements sont en cours d'optimisation. La présence du produit **138** a été confirmée par LC/MS mais la purification étant trop difficile, ce dernier n'a pas pu être isolé.

Nous avons émis plusieurs hypothèses concernant le faible rendement de cette étape et nous travaillons actuellement sur son amélioration:

- Il est possible d'imaginer la formation de complexes entre le PEG et le cation césium Cs^+ ^{116,117}. De tels complexes pourraient gêner stériquement l'alkylation des monomères sur le CTV **133**. D'autres bases, telles que NaH , sont actuellement testées.
- la purification de cette étape pourrait également être améliorée par protection de la fonction alcool des monomères avec un groupement tetrahydropyranyle (THP). Cette stratégie, déjà décrite par l'équipe de T. Brotin⁹⁴, est à envisager, bien qu'elle rajoute une étape supplémentaire.

- la présence de monomère ayant subi une β -élimination est observé dans le brut réactionnel. Des essais réalisés avec des rapports monomères / base différents (défaut, stoechiométrie et excès de monomère) n'ont pas permis d'améliorer le rendement, quel que soit le monomère (**19**, **20**, **21** ou **134**) (Figure 148).

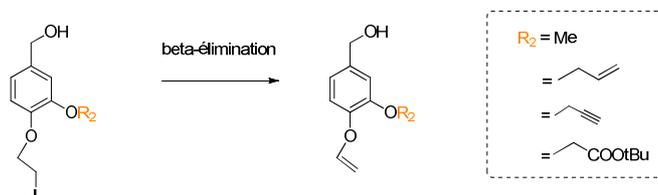


Figure 148: bêta-élimination des monomères **19**, **20**, **21** et **134**

La cyclotrimérisation du produit **135** au reflux de l'acide formique pendant 3 heures permet l'obtention du cryptophane **139** avec un bon rendement de 80 %. Ce dernier a été isolé après chromatographie sur gel de silice. La cyclotrimérisation des composés **136** et **137** au reflux de l'acide formique est plus lente. L'équipe de l'Immochoowski a étudié le rendement de la cyclotrimérisation pour l'obtention de cryptophanes analogues (Figure 59 page 60) en fonction du temps et a démontré un rendement optimal au bout de 9 heures⁸¹. Dans notre cas, après 9 heures de réaction, le produit **141** est isolé par chromatographie sur phase inverse avec un rendement de 30 %. Les cryptophanes **139** et **141** sont donc obtenus en 5 étapes linéaires avec des rendements globaux respectifs de 6,2 % et 2,3 %.

Le cryptophane **140**, même après purification par chromatographie sur phase inverse, n'a pas été isolé propre. L'optimisation de la purification et la détermination de la structure des produits secondaires sont en cours.

b. Synthèse du cryptophane **144**

Nous avons également étudié la synthèse du cryptophane **144** (Figure 149). L'intérêt de ce composé est d'offrir d'autres possibilités de fonctionnalisation à l'aide des groupements phénols.

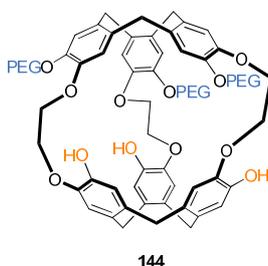


Figure 149: cryptophane **144**

Ce cryptophane peut être obtenu à partir des molécules **136** et **139**:

- À partir du composé **136** (Figure 150)

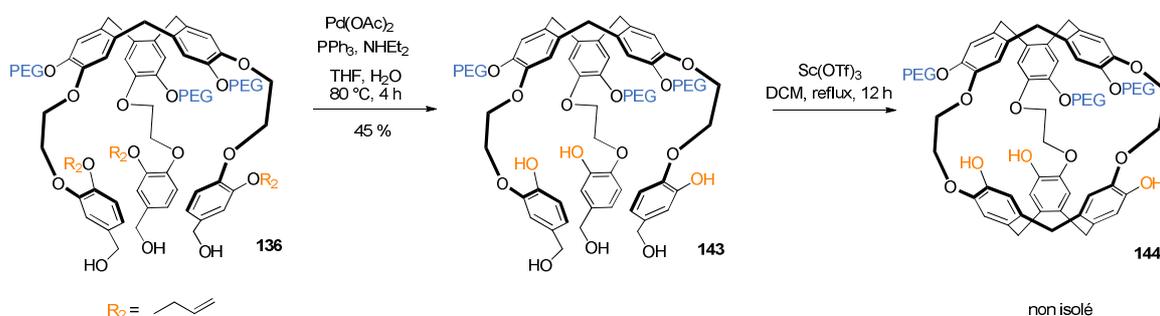


Figure 150: synthèse du cryptophane **144** à partir de **139**

La déallylation du composé **136** en présence d'acétate de palladium, de triphénylphosphine et de diéthylamine conduit à l'intermédiaire **143**. Ce dernier est purifié par chromatographie sur gel de silice et est obtenu avec un rendement de 45 %. La cyclotrimerisation finale est effectuée en présence de triflate de scandium au reflux du DCM telle que décrite par l'équipe de T. Brotin⁹³. Ces conditions expérimentales ont été reprises récemment par l'équipe d'I. Dmochowski pour la synthèse du cryptophane **33** comportant 3 fonctions phénols non protégées⁸². Dans notre cas, après purification par chromatographie en phase inverse, le produit obtenu **144** n'est pas totalement pur. Le spectre de masse confirme la présence du produit désiré et de nombreux produits secondaires.

- À partir du cryptophane **139** (Figure 151)

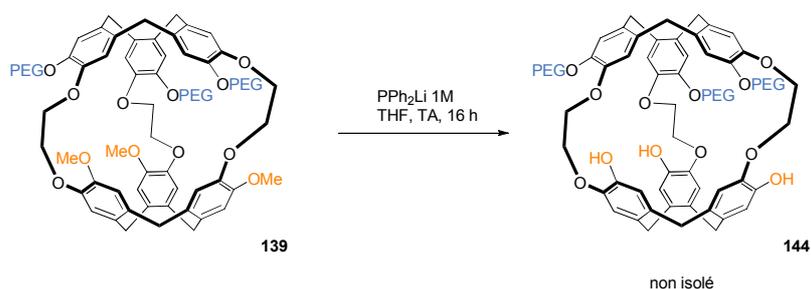


Figure 151: synthèse du cryptophane **144** à partir de **139**

Des tentatives de déméthylation du cryptophane **139** sont en cours pour obtenir le cryptophane **144**. Jusqu'à présent, nous avons travaillé avec de petites quantités de **139** et les conditions anhydres nécessaires pour le bon déroulement de cette réaction sont difficiles à mettre en œuvre. De ce fait, PPh_2Li s'hydrolyse facilement et la réaction n'avance plus. Même après ajout d'un

excès de PPh_2Li et un temps de réaction de 24 heures, le produit final propre n'a pas été isolé. L'analyse par LC/MS montre la présence du cryptophane **144** et de ces intermédiaires mono- et di-déméthylé ainsi qu'un important excès de dérivés de phosphine difficiles à éliminer par chromatographie. La déméthylation de **139** semble prendre beaucoup plus de temps que celle du CTV **132**, et ceci est probablement dû à l'encombrement stérique. Des études sont en cours en travaillant avec des quantités plus importantes de cryptophane **139**.

5. Fonctionnalisation

Afin de valider l'utilisation de la plateforme pour la synthèse de biosondes, nous avons montré qu'il est possible de la fonctionnaliser notamment par chimie *click*. Le concept de la chimie *click*, introduit par Sharpless en 2001, a pour objectif de développer une large gamme de blocs sélectifs, modulables et facilement assemblables pour un vaste champ d'applications¹³⁶. La cycloaddition 1,3-dipolaire ou cycloaddition de Huisgen catalysé par le Cu(I) entre un alcyne et un azoture, découverte simultanément par les équipes de Meldal¹³⁷ et Sharpless¹³⁸, est la réaction la plus connue. Grâce à sa simplicité et à sa fiabilité, elle est devenue un outil incontournable aussi bien pour les biologistes que pour les chimistes organiciens. Cette cycloaddition de Huisgen est effectuée à partir du cryptophane **141** et de différents composés azotures. (Figure 152)

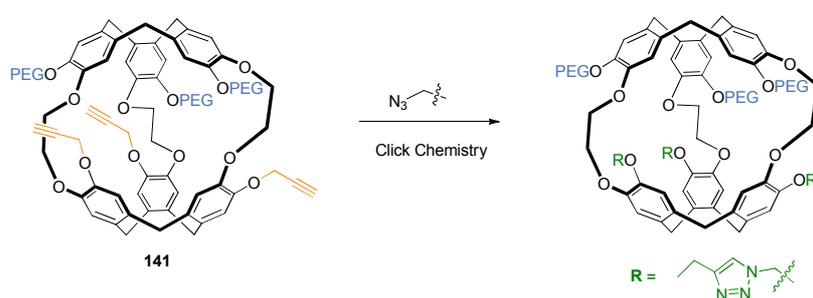


Figure 152: fonctionnalisation par chimie *click*

a. Réaction avec l'acide 3-azidopropanoïque

- synthèse de l'acide 3-azidopropanoïque (Figure 153)

Il est préparé facilement à partir de l'acide 3-bromopropanoïque et d'azoture de sodium, comme décrit dans la littérature¹³⁹.

¹³⁶ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004

¹³⁷ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057

¹³⁸ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596

¹³⁹ R. Srinivasan, L.P. Tan, H. Wu, P.Y. Yang, K.A. Kalesh, S.Q. Yao, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 1821

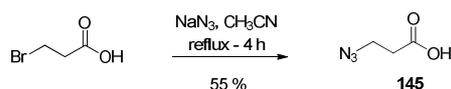


Figure 153: synthèse de l'acide 3-azidopropanoïque **145**

- couplage de la plateforme **141** avec l'acide 3-azidopropanoïque (Figure 154)

L'azoture **145** est ensuite couplé au cryptophane **141** en présence de sulfate de cuivre pentahydraté, d'ascorbate de sodium comme agent réducteur et de 2,6-lutidine dans le DMSO pendant 24 heures. Les diméthylpyridines appelées communément lutidines vont venir assister la cycloaddition de Huisgen en formant des complexes avec le cuivre. La réaction est suivie par LC/MS. Après 24 heures de réaction, on observe majoritairement le produit attendu **146** qui est purifié par chromatographie sur phase inverse (65 % de rendement). Sa structure est vérifiée par RMN ^1H et par spectrométrie de masse.

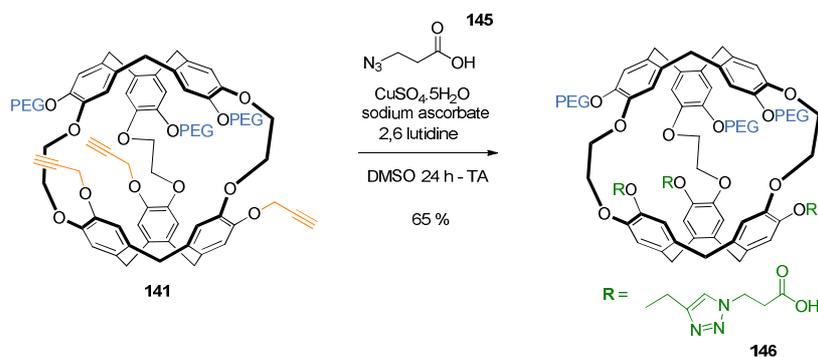


Figure 154: synthèse du cryptophane **146**

b. Réaction avec un azoture biotinylé

L'équipe d'A. Pines a déjà utilisé la molécule de biotine pour mettre au point la première biosonde **50** en RMN $^{129}\text{Xe}^2$. Le cryptophane **50** avait été obtenu en dix-sept étapes non linéaires (Figure 65 et Figure 66 pages 64 et 65). Dans notre cas, nous avons souhaité fonctionnaliser la plateforme **141** avec un azoture biotinylé afin de comparer ces deux biosondes en termes de nombre d'étapes, solubilité et propriétés d'encapsulation du xénon.

- synthèse de la biotine fonctionnalisée par un groupement azoture (Figure 155)

Elle a été synthétisée en suivant les protocoles décrits dans la littérature^{140, 141}. La biotine est dans un premier temps activée avec le dicyclocarbodiimide (DCC) et du NHS pour former l'ester activé **147**. En parallèle, la 3-azidopropanamine **148** est synthétisée à partir de la 3-

¹⁴⁰ A. J. Lampkins, E. J. O'Neil, B. D. Smith, *J. Org. Chem.*, 2008, 73, 6053

¹⁴¹ P-C. Lin, S-H. Ueng, M-C. Tseng, J-L. Ko, K-T. Huang, S-C. Yu, A. K. Adak, Y-J. Chen, C-C. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4286

bromopropanamine et de l'azoture de sodium. La molécule **149** est finalement obtenue par couplage peptidique entre **147** et **148** avec un rendement de 50 %.

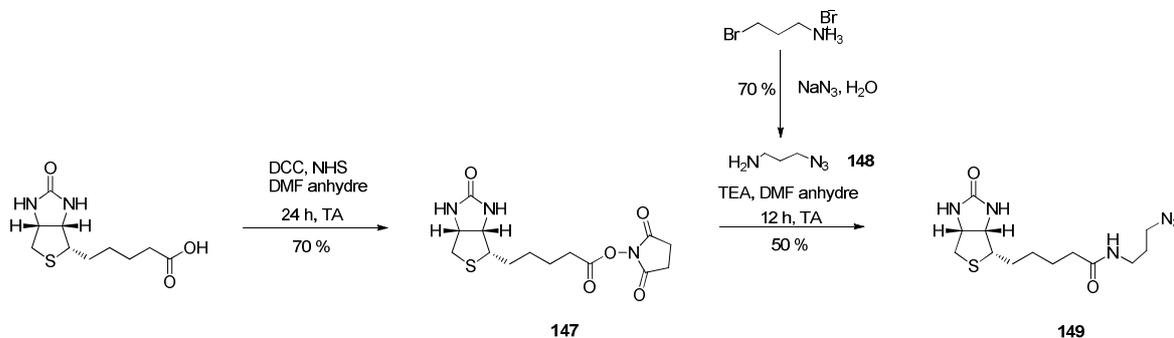


Figure 155: synthèse de la biotine **149**

La réaction de cycloaddition de Huisgen avec le composé **149** est d'abord testée sur le PEG **150** terminé par une fonction alcyne (Figure 156). Ce dernier avait été synthétisé par alkylation du méthoxy-polyéthylène glycol 550 avec le bromure de propargyle au cours d'un autre projet de ma thèse. La réaction est suivie par LC/MS: après 24 heures, on observe la disparition des deux produits de départ et la formation d'un pic unique correspondant au produit attendu. La molécule **151**, ne présentant pas beaucoup d'intérêt pour la suite, n'a pas été isolée.

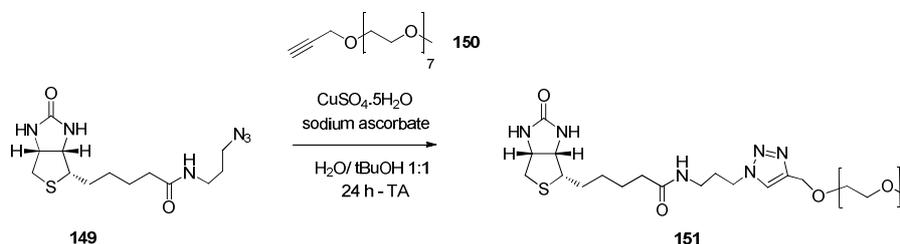


Figure 156: test de la réaction de cycloaddition de Huisgen entre les composés **149** et **150**

- couplage de la plateforme **141** avec le composé biotinylé **149** (Figure 157)

149 est ensuite couplée au cryptophane **141** en présence de sulfate de cuivre pentahydraté, d'ascorbate de sodium et de 2,6 lutidine dans un mélange eau / *tert*-butanol pendant 24 heures. La réaction est suivie par LC/MS. Au bout de 24 heures, on n'observe plus de cryptophane **141** mais la présence de trois produits majoritaires **152**, **153** et **154** avec respectivement une, deux et trois biotines greffées sur le cryptophane ainsi qu'un excès du composé **141** (Figure 158). L'ajout de cuivre, d'ascorbate de sodium et de 2,6-lutidine ainsi que l'augmentation du temps de réaction ne change rien à l'évolution du système. Le brut réactionnel a donc été purifié par chromatographie sur phase inverse. Les trois composés **152**, **153** et **154** ont été facilement isolés et identifiés par spectrométrie de masse. Cependant leurs structures n'ont pas pu être confirmées par RMN ^1H à cause de la trop faible quantité de produit obtenu.

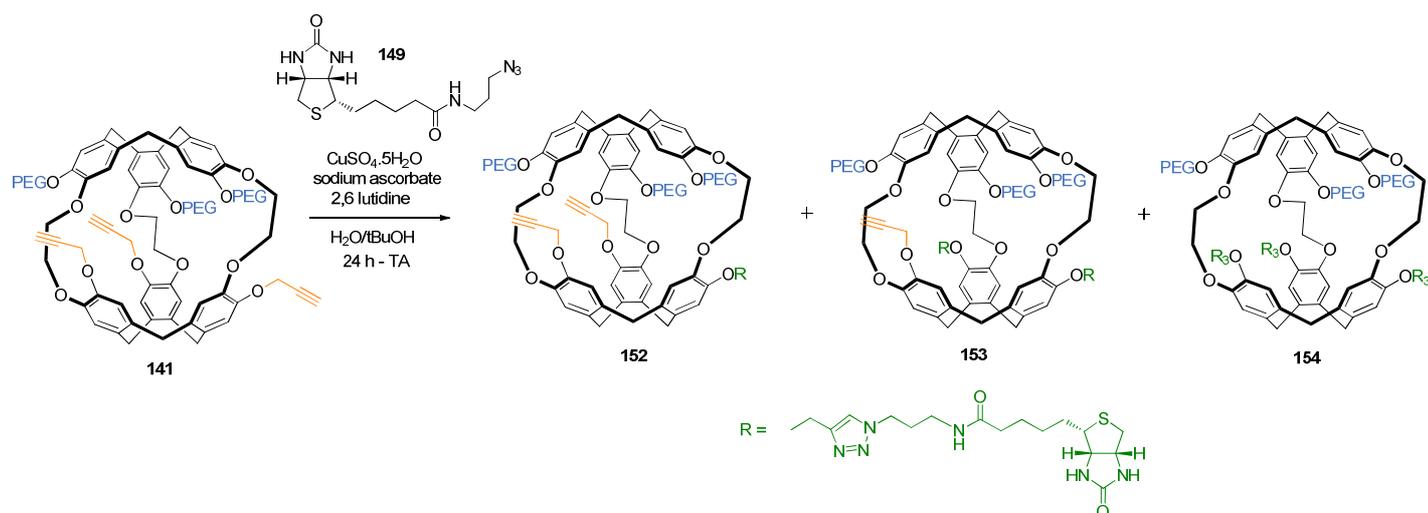


Figure 157: synthèse du cryptophane **154**

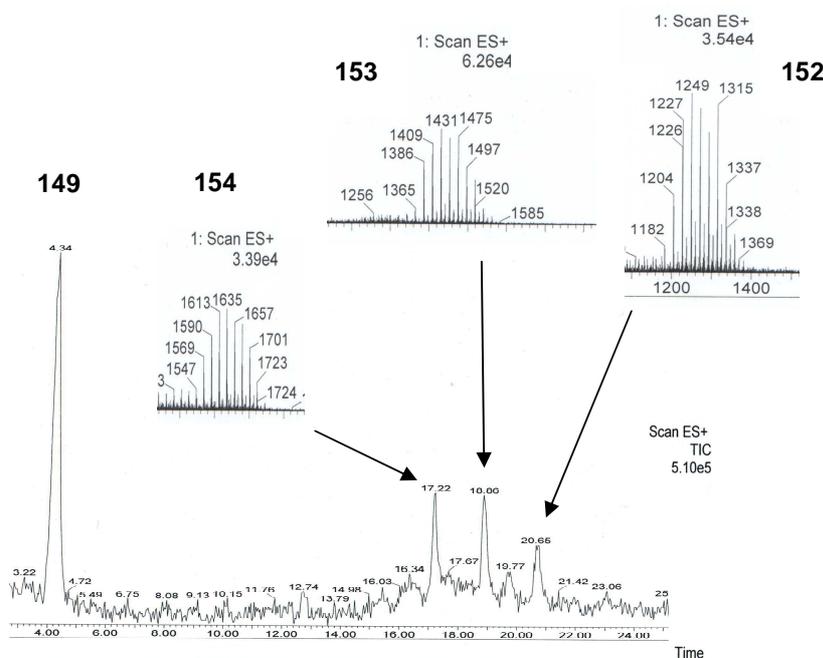


Figure 158: chromatogramme et spectres de masse du mélange de composés **152**, **153** et **154**

Ces résultats sont très encourageants puisqu'ils ouvrent la voie à la synthèse de nouveaux cryptophanes hydrosolubles et multi-fonctionnalisés. Grâce à cette stratégie de synthèse, on pourrait par exemple envisager la synthèse d'une biosonde multimodale hydrosoluble comportant trois fonctionnalisations différentes: une antenne de reconnaissance, un groupement permettant l'internalisation dans la cellule et un groupement fluorescent (Figure 159). Une telle biosonde permettrait la détection de phénomènes biologiques grâce à une double détection par IRM ^{129}Xe et par fluorescence.

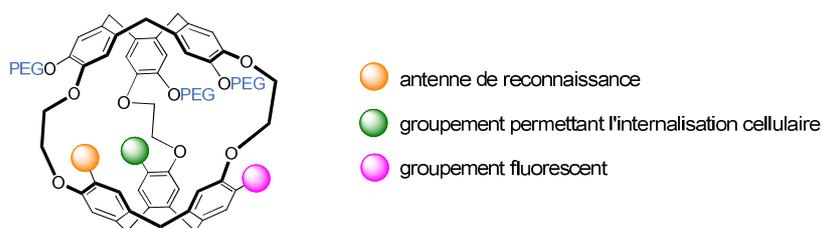


Figure 159: sonde multimodale envisagée

Par manque de temps, nous n'avons pas pu comparer la biosonde **154** avec celle décrite par l'équipe d'A. Pines. Nous pouvons tout de même conclure qu'avec notre stratégie de synthèse, **154** pourrait être obtenu en 11 étapes non-linéaires à comparer avec 17 étapes non-linéaires pour la biosonde **50** (les dérivés de biotine pouvant être commerciaux, le nombre d'étape de synthèse pour les obtenir n'est pas pris en compte dans les deux cas).

III. ÉTUDE DE LA SOLUBILITÉ EN MILIEU AQUEUX

Nous avons ensuite étudié la solubilité en milieu aqueux des cryptophanes **139** et **141**. Ces deux molécules présentent une solubilité dans l'eau supérieure à 50 mg/mL (20 mM). À notre connaissance, il s'agit de la plus grande hydrosolubilité jamais observée pour les cryptophanes.

IV. RÉSULTATS RMN ^{129}Xe

Les cryptophanes **139** et **141** ont été analysés en RMN ^{129}Xe et tous les deux encapsulent le xénon. Le déplacement chimique du xénon encapsulé dans **139** est de 76 ppm (Figure 160). Des études sont en cours afin de caractériser plus précisément l'encapsulation du xénon dans ces molécules cages.

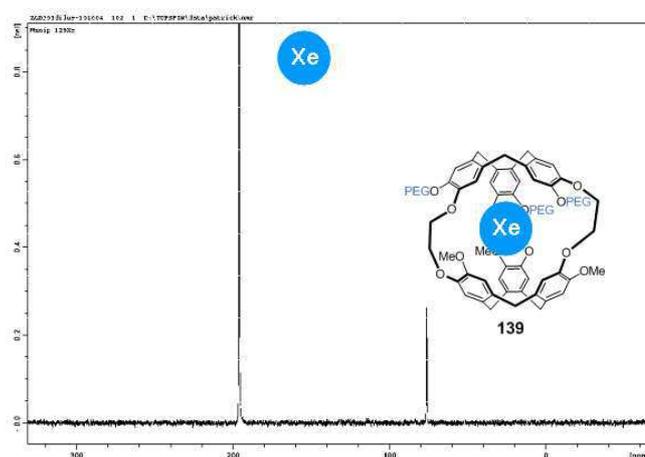


Figure 160: spectre RMN ^{129}Xe hyperpolarisé du cryptophane **139** (26,5 μM , D_2O , $T = 293\text{ K}$)

V. ÉTUDE DE TOXICITÉ

Les premières études de toxicité cellulaire, réalisées grâce au test MTT (Annexe 2), ont été effectuées par l'équipe de I. Dmochowski sur des cryptophanes comportant un groupement RGD. Ces chercheurs ont montré la non-toxicité de ces molécules cages à des concentrations utilisées en RMN ^{129}Xe (toxicité maximale de 40 % après 24 heures d'exposition des cellules à une concentration en cryptophane de 100 μM)^{55, 90}.

Afin d'évaluer la toxicité cellulaire du cryptophane **141**, F. Leteurtre au CEA Saclay a réalisé des essais d'inhibition de la croissance de cellules K562 (lignée cellulaire *erythroleukemia*). Pour ce faire, 300×10^3 cellules / mL ont étéensemencées et exposées à différentes concentrations de **141** (1 à 500 μM), aussi bien sur des temps courts (3 heures) que sur une exposition continue (24 et 48 heures). Le nombre de cellules / mL a ensuite été compté au bout de 24 heures et 48 heures afin de suivre la prolifération cellulaire (Figure 161 et Figure 162).

La Figure 161 montre l'absence de toxicité du cryptophane **141** lorsque les cellules ont été soumises à une exposition sur une durée de 3 heures, même à des concentrations de l'ordre de 500 μM . Les courbes de prolifération sont plus ou moins parallèles à la courbe témoin (vert). Les légères différences observées proviennent de la perte de cellules au cours des lavages nécessaires pour enlever **141**.

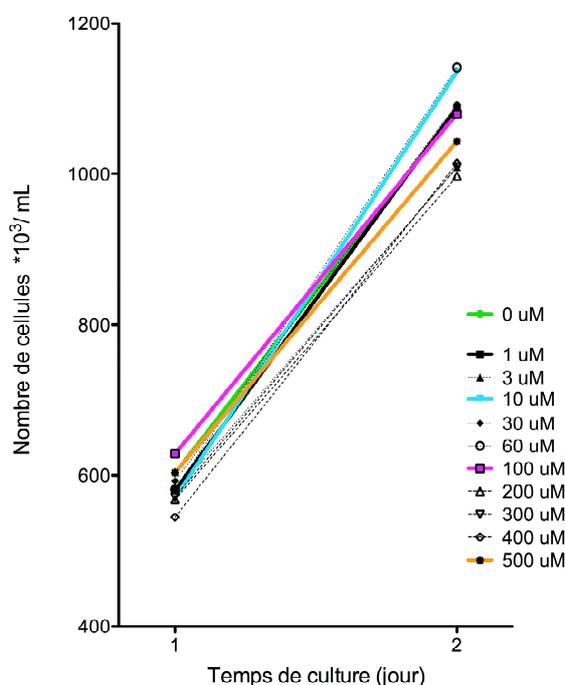
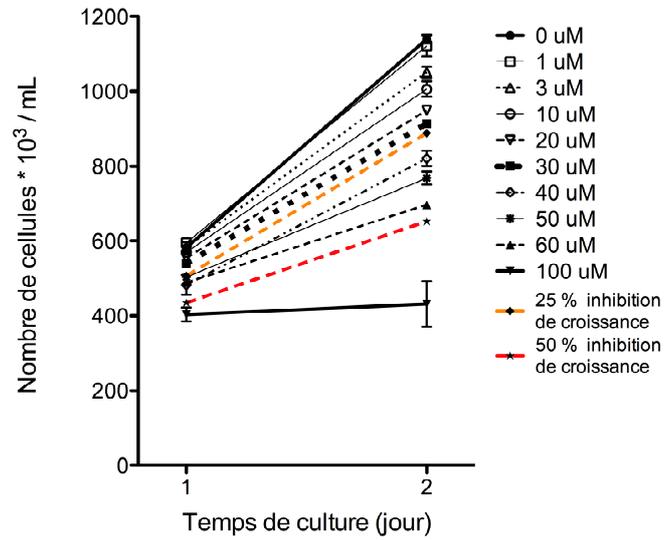


Figure 161: étude de la prolifération cellulaire après une exposition courte (3 heures) de cellules K562 avec le cryptophane **141** (1 à 500 μM)

La Figure 162 montre une diminution de la prolifération cellulaire en fonction de la concentration de **141** sous une exposition continue avec le cryptophane. Ainsi, une exposition continue des cellules à des concentrations en cryptophane de 30 μM et 60 μM entraîne une inhibition de la croissance de respectivement 25 % et 50 %.



On observe donc une toxicité du même ordre que celle mesurée par l'équipe d'I. Dmochowski pour les cryptophanes comportant un groupement RGD.

VI. CONCLUSION

Nous avons mis au point la synthèse d'une plateforme générale (cryptophane **139** et **141**) pouvant être utilisée pour l'obtention d'un éventail de biosondes. Pour ce faire une nouvelle stratégie de synthèse consistant à introduire un groupement hydrosoluble (**PEG 550**) dès la première étape a été mise au point.

Cette plateforme présente les caractéristiques suivantes:

- elle est hautement hydrosoluble grâce à la présence de groupement polyéthylène glycol (supérieure à 50 mg/mL soit 20 mM).
- elle est obtenue en 5 étapes linéaires, à partir de produits peu onéreux et avec un rendement global de 1,9 à 5,1 %, qui reste à optimiser.
- elle est facilement fonctionnalisable par chimie *click* (cryptophane **146**).
- elle est peu toxique à des concentrations utilisées en RMN ^{129}Xe (de l'ordre de 30 μM)
- elle présente de bonnes propriétés d'encapsulation du xénon.

Nous avons également démontré qu'à partir du cryptophane **141**, il est possible de greffer sélectivement une, deux ou trois antennes de reconnaissance. Ces résultats obtenus sont très encourageants et ouvrent la voie à la synthèse rapide de biosondes multimodales.

Actuellement, certaines étapes de synthèse et de purification de la plateforme sont en cours d'optimisation afin d'augmenter le rendement global et de pouvoir synthétiser ces nouveaux précurseurs de biosondes à l'échelle de plusieurs grammes.

PARTIE F

SYNTHÈSE DE CAGES ORIGINALES

F. SYNTHÈSE DE CAGES ORIGINALES

La structure des cryptophanes donne aux chercheurs la possibilité de jouer sur de nombreux paramètres afin d'obtenir de nouvelles cages. Ces dernières pourront posséder des propriétés intéressantes pour l'encapsulation du xénon mais également pour l'encapsulation d'autres molécules. Trois paramètres principaux sont à prendre en compte:

- la nature des groupements sur les cycles aromatiques
- Par exemple, les cryptophanes **43** et **44** portant respectivement 6 fonctions – OH et 6 fonctions – CH₂COOH présentent des propriétés d'encapsulation du xénon différentes suivant le pH et la nature du contre-ion à pH basique (Figure 163)⁸³.

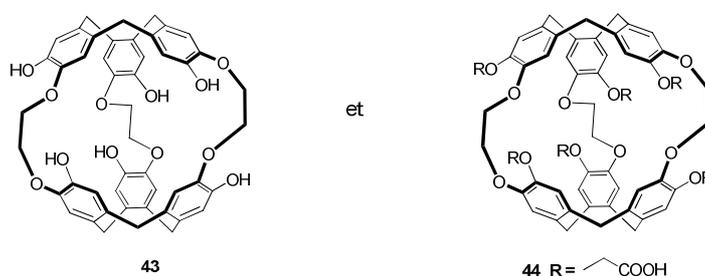


Figure 163: **43** et **44** se différenciant par la nature des groupements sur les cycles aromatiques

- la longueur des chaînes pontantes
- Les cryptophanes-111 (**11**) et -222 (**87**) ainsi que les cryptophanes de tailles intermédiaires (cryptophane-112 (**155**) et cryptophane-122 (**156**)) récemment synthétisés dans notre laboratoire, semblent présenter des propriétés d'encapsulation du xénon bien différentes (Figure 164)⁹⁶.

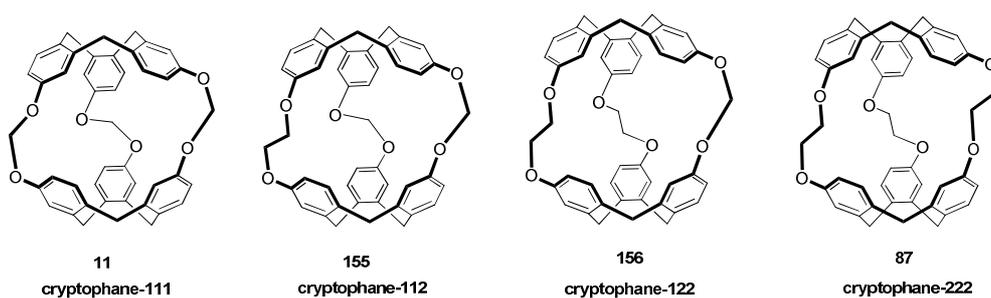


Figure 164: cryptophanes se différenciant par la longueur de chaînes pontantes

- la nature des chaînes pontantes
- C'est le cas par exemple du cryptophane **8** où chaque chaîne pontante possède deux fonctions alcynes et du cryptophane **157** où trois atomes d'oxygène ont été remplacés par trois atomes de soufre (Figure 165)^{73,75}.

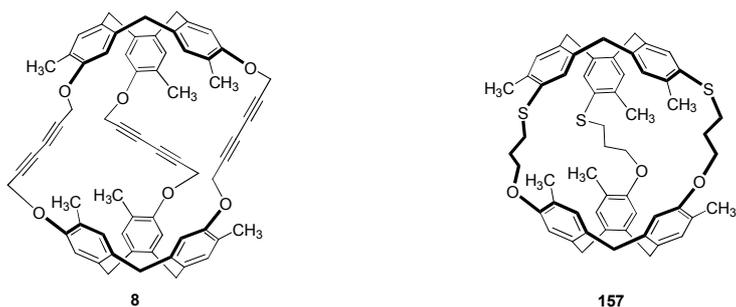


Figure 165: cryptophanes se différenciant par la nature des chaînes pontantes

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à ce troisième paramètre et donc à la conception de nouveaux cryptophanes présentant des chaînes pontantes originales.

I. LES "CLICKTOPHANES"

Nous nous sommes d'abord intéressés à la synthèse de "clicktophanes", nouvelles molécules cages présentant trois fonctions triazoles entre les deux unités CTV. Ces composés cages pourraient être obtenues par réaction de chimie *click* entre un CTV possédant 3 fonctions azotures et un CTV possédant trois fonctions alcynes (Figure 166). Ces "clicktophanes" semblent avoir une taille plus grande que les cryptophanes -111 et -222 mais le portail d'entrée pour encapsuler une espèce donnée peut être restreint par la présence des trois triazoles.

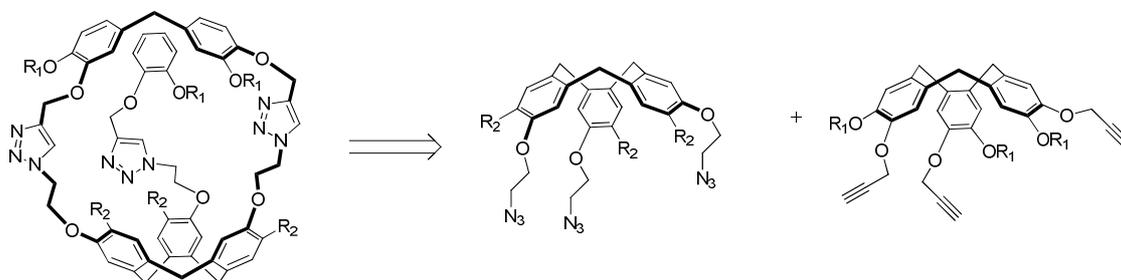


Figure 166: schéma rétrosynthétique pour l'élaboration de clicktophanes

1. "Clicktophane" en milieu organique

Le CTV **10** étant obtenu en grande quantité au laboratoire (à l'échelle de 10 grammes), nous avons dans un premier temps travaillé sur la synthèse des CTV tri-alkyne (**159**) et tri-azoture (**158**) à partir de **10**.

a. Synthèse du CTV **158**

Le CTV **158** est obtenu en deux étapes à partir du CTV **10** (Figure 167).

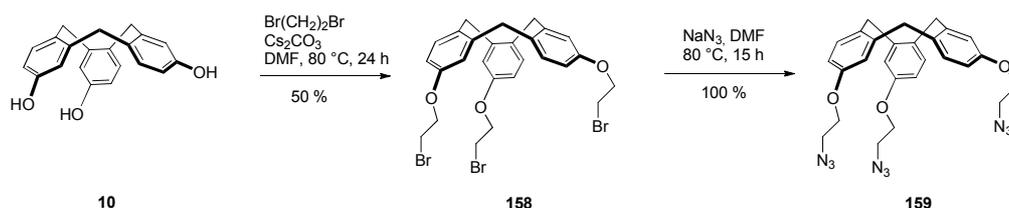


Figure 167: synthèse du CTV tri-azoture **159**

Dans un premier temps, le composé **10** est alkylé avec du dibromoéthane en présence de carbonate de césium dans du DMF à chaud. Cette réaction, bien que paraissant triviale au premier abord, s'est révélée plus ardue et de nombreuses conditions opératoires ont été testées (Tableau 14). Même en présence d'un excès de base et de dibromoéthane, la réaction se bloque et les CTV alkylés par un et deux molécules de dibromoéthane (**88** et **89** (Figure 93)) sont observés majoritairement en LC/MS (entrées 1 et 2). Le temps de la réaction (entrée 3) et la température (entrée 4) ne permettent pas de faire évoluer la réaction. L'ajout de dibromoéthane au bout de deux heures de réaction (entrée 5) ne change rien au profil. Il est possible que le dibromoéthane se dégrade facilement pour former du HBr lequel viendrait à son tour neutraliser la réaction et bloquer son avancée.

Entrée	Éq Cs ₂ CO ₃	Éq dibromoéthane	T (°C)	temps (h)	produits visibles en LC/MS
1	10	500	80	24	88 + 89 + traces de 158
2	10	50	80	24	88 + 89 + traces de 158
3	10	50	80	48	88 + 89 + traces de 158
4	10	50	100	24	88 + 89 + traces de 158
5	10	50 + 50 au bout de 2 h	80	24	88 + 89 + traces de 158
6	10	10	80	24	10 + 90 + 91
7	10 + 10 au bout d'1 h	50	80	24	158 majoritairement
8	10 + 10 au bout d'1 h	50	80	4	158 majoritairement

Tableau 14: conditions opératoires testées pour la synthèse du CTV **158**

On a donc tenté de diminuer le nombre d'équivalents de dibromoéthane (entrée 6). Dans ce cas-là, on n'observe plus les CTV attendus mais la présence de cryptophanes intermédiaires ouverts (**90** et **91** (Figure 94 page 90)). Finalement, l'ajout de base au bout d'une heure permet de faire

avancer la réaction et d'observer majoritairement le CTV **158** au bout de 24 heures (entrée 7). Ce temps de réaction a été optimisé et réduit à 4 heures (entrée 8).

Le composé **158** est finalement purifié par chromatographie sur gel de silice et isolé avec un rendement de 50 %.

Le CTV tri-azoture **159** est ensuite obtenu à partir de **158** en présence d'azoture de sodium dans du DMF à chaud. Après extraction, **159** est obtenu quantitativement sans purification.

b. Synthèse du CTV **160**

Le CTV **160** est à son tour synthétisé à partir de **10**, en présence de carbonate de césium et de bromure de propargyle (Figure 168). Une purification par chromatographie sur gel de silice permet d'obtenir le composé **160** avec un rendement non optimisé de 30 %.

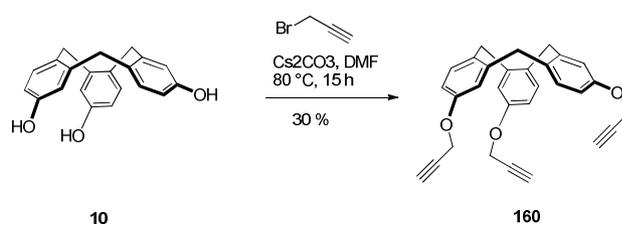


Figure 168: synthèse du **160**

c. Synthèse du "clicktophane" **161**

Les deux intermédiaires clés (**159** et **160**) étant synthétisés et caractérisés, nous nous sommes ensuite intéressés à leur couplage par chimie *click*.

i. Chimie click en présence de cuivre

La réaction de chimie *click* a d'abord été testée en présence de cuivre (Figure 169).

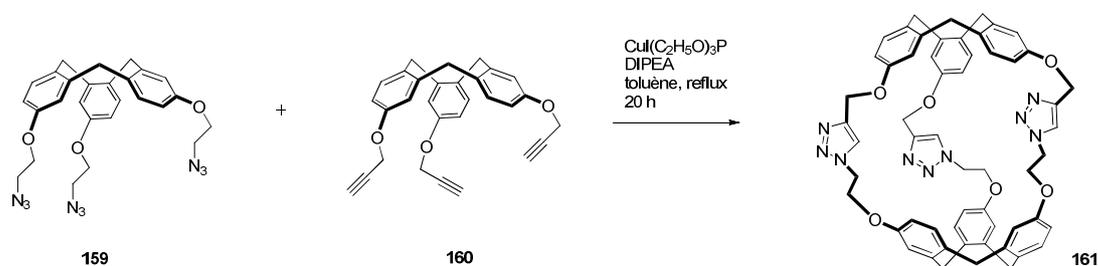


Figure 169: couplage entre **159** et **160** par chimie *click*

Pour cela, de nombreuses conditions expérimentales ont été testées (nature du cuivre, présence de ligand, présence de réducteur, solvant et température). Dans chacun des cas la réaction est suivie par LC/MS (Tableau 15).

Entrée	Cuivre	Réducteur (Na Asc)	Réactifs autres	Solvant	T (°C)	produits visibles en LC/MS
1	CuSO ₄ .5H ₂ O	oui	non	DCM / MeOH / H ₂ O	TA	159 + 160
2	CuSO ₄ .5H ₂ O	oui	non	DCM / MeOH / H ₂ O	50	159 + 160
3	CuSO ₄ .5H ₂ O	oui	acide bathocuproinedisulfonique	THF / H ₂ O	TA	159 + 160
4	CuSO ₄ .5H ₂ O	oui	acide bathocuproinedisulfonique	THF / H ₂ O	50	159 + 160
5	CuI	oui	diisopropylethylamine	DCM anhydre	TA	159 + 160
6	CuI	oui	bathophénanthroline	THF anhydre	TA	159 + 160
7	Cu(C ₂ H ₅ O) ₃ P	non	diisopropylethylamine	toluène	reflux	161

Tableau 15: conditions opératoires testées pour la synthèse du "clicktophane" **161**

Des conditions classiques ont d'abord été testées: avec du cuivre(II) (CuSO₄.5H₂O), en présence d'ascorbate de sodium (Na Asc) dans un mélange DCM / MeOH / H₂O à température ambiante, seuls les produits de départ **159** et **160** sont observés en LC/MS (entrée 1). Il se pose un problème de solubilité puisque **159** et **160** sont insolubles dans le méthanol et l'eau et légèrement solubles dans le dichlorométhane. L'augmentation de la température (entrées 1 et 3 à comparer respectivement avec les entrées 2 et 4) ou l'ajout de ligand de type acide bathocuproïne disulfonique (entrées 3) ne changent rien au profil LC/MS précédent. La réaction est ensuite testée en milieu organique, en présence de cuivre (I) dans du DCM ou du THF anhydre (entrée 5) mais à nouveau aucune trace de "clicktophane" n'est observé en LC/MS. L'ajout de ligand (bathophénanthroline) ne change à nouveau rien à la réaction (entrée 6).

Nous avons finalement testé la réaction en présence de CuI(C₂H₅O)₃P (**162**) comme catalyseur. Ce dernier a été utilisé pour la synthèse de calixarène par chimie *click*^{142,143}. Il est obtenu en une étape à partir d'iodure de cuivre et de triéthylphosphite (Figure 170).

¹⁴² J. Morales-Sanfrutos, M. Ortega-Muñoz, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7768

¹⁴³ J. Morales-Sanfrutos, M. Ortega-Muñoz, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7772

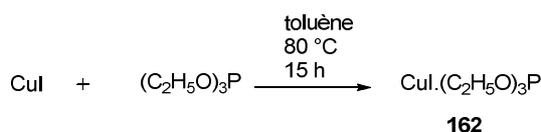


Figure 170: synthèse du catalyseur **162**

Le catalyseur $\text{CuI}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ est d'abord testé entre **150** et **163**, molécules synthétisées au cours d'un autre projet de ma thèse (Figure 171). La réaction est suivie par LC/MS: après 24 heures, on observe la disparition des deux produits de départ et la formation d'un pic unique correspondant au produit final. La molécule **164**, ne présentant pas beaucoup d'intérêt pour la suite, n'a pas été isolée.

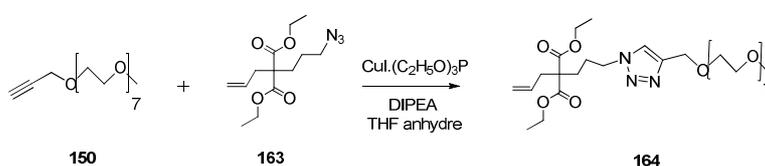


Figure 171: test de la réaction de cycloaddition de Huisgen entre les composés **150** et **163**

Au bout de 20 heures de réaction entre les CTV **159** et **160** en présence du catalyseur $\text{CuI}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ au reflux du toluène, on observe en LC/MS la disparition des réactifs de départ et l'apparition d'un pic de masse correspondant au "clicktophane" **161** (entrée 7). Le produit est un solide blanc insoluble dans de nombreux solvants (DCM, acétate d'éthyle, DMF, DMSO, acétonitrile, acétone et méthanol). Des tests RMN ^1H ont été effectués dans du DMSO deutéré à TA et à chaud mais le composé est trop peu soluble et les spectres ne nous confirment pas la structure du produit. Nous avons également tenté de solubiliser le composé **161** en protonant le triazole dans du TFA mais la RMN ^1H dans du TFA deutéré ne montre pas de solubilisation du "clicktophane". En parallèle, des études IR ont été réalisées: la bande à 2100 cm^{-1} correspondant au groupement azoture a quasiment disparu (il reste encore quelques traces de CTV **159**), ce qui nous montre bien que le produit final **161** s'est formé et qu'il ne s'agit pas d'intermédiaires "clicktophanes" ouverts.

ii. Chimie click sans cuivre

Nous avons également testé la réaction de cycloaddition de Huisgen entre les CTV **159** et **160** sans cuivre et en présence de fullerène C60. En effet ce dernier pourrait avoir un effet template en rapprochant **159** et **160**, par des interactions non covalentes de type π stacking, et favoriser ainsi la réaction de chimie *click* (Figure 172).

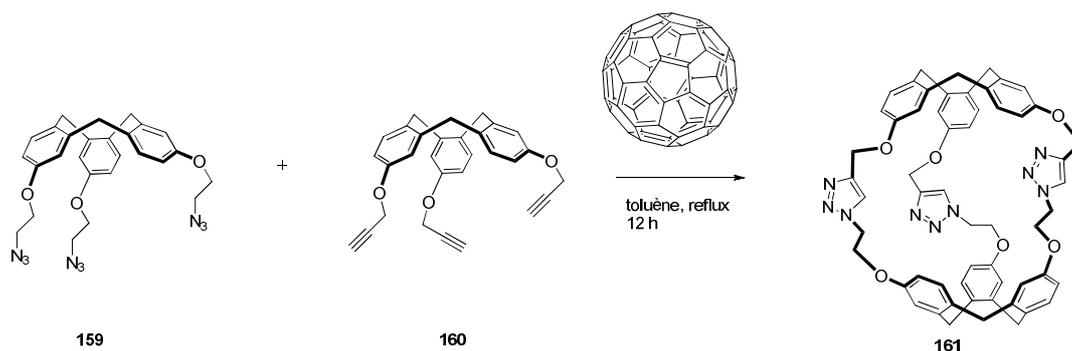


Figure 172: synthèse de **161** par chimie *click* sans cuivre

Le produit **161** se forme majoritairement en LC/MS. Les résultats IR montrent la disparition de la bande à 2100 cm^{-1} caractéristique du groupement azote. Cependant, comme précédemment, compte tenu du problème de solubilité, la structure de **161** n'a pas pu être confirmée par RMN ^1H . Une analyse MALDI a également été réalisée: la masse de **161** est observée, mais aussi des masses plus grandes pouvant correspondre à des polymères. En comparant le volume du fullerène C60 (environ 52 \AA^3) au volume de **161** (estimé à 130 \AA^3 sur ChemBio3D), il est possible d'envisager la formation du "clicktophane" encapsulant le fullerène. L'analyse MALDI ne montrant pas la masse d'un tel complexe, cette hypothèse a été écartée.

Ces résultats sont très encourageants et nous montrent qu'il est possible d'obtenir des "clicktophanes" avec et sans cuivre. Il s'agit maintenant de "décorer" les CTV de départ afin de rendre le "clicktophane" soluble en milieu organique ou en milieu aqueux et donc de pouvoir le purifier et l'analyser.

2. "Clicktophane" hydrosoluble

Ayant développé dans la partie précédente une nouvelle chimie des cryptophanes à base de PEG, nous avons décidé de synthétiser un nouveau "clicktophane" hydrosoluble à l'aide de **PEG 550** (Figure 173).

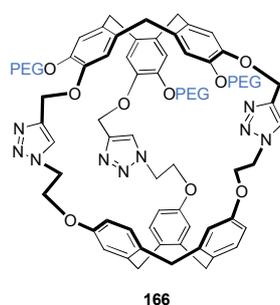


Figure 173: "clicktophane" hydrosoluble **166**

Pour ce faire, le CTV **165** est obtenu par alkylation du CTV **133** hydrosoluble avec du bromure de propargyle en présence de carbonate de césium, dans du DMF à chaud (Figure 174). Une purification par chromatographie en phase inverse permet l'obtention du composé **165** avec un rendement de 50 %.

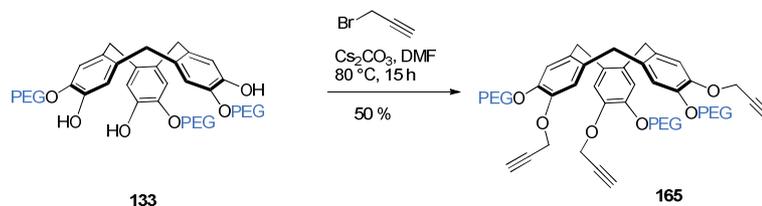


Figure 174: synthèse du CTV **165** hydrosoluble

Les deux CTV **165** et **159** sont mis au reflux du toluène en présence de catalyseur $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ pour former le "clicktophane" **166** (Figure 175).

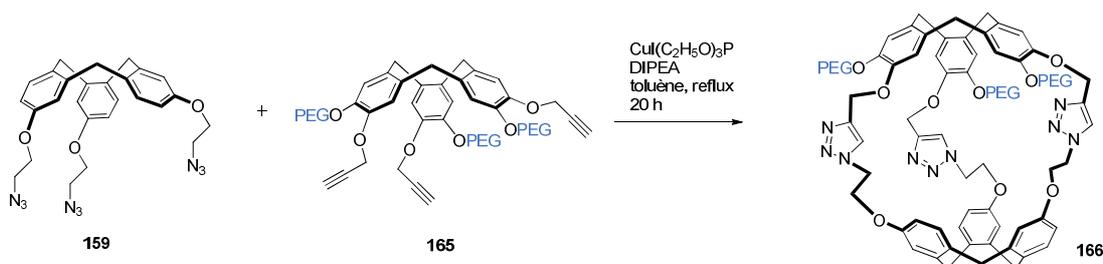


Figure 175: synthèse du "clicktophane" hydrosoluble **166**

Au bout de 20 heures de réaction, une analyse LC/MS montre la disparition des réactifs de départ et l'apparition de trois pics de masse identique pouvant correspondre aux "clicktophanes" ouverts **167** et **168** et à la molécule attendue **166** (Figure 176).

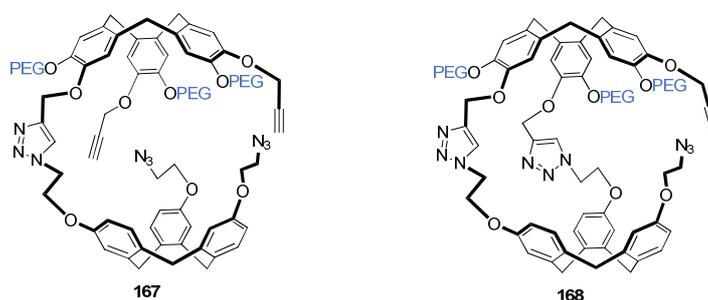


Figure 176: possibles intermédiaires formés **167** et **168**

Une purification sur phase inverse a permis d'isoler et d'identifier par spectrométrie de masse les trois composés **166**, **167** et **168**. Cependant leurs structures n'ont pas pu être confirmées par RMN ^1H à cause de la trop petite quantité de produit obtenu. Il est important de noter que la

présence de PEG permet de solubiliser parfaitement les composés finaux aussi bien dans des solvants organiques (dichlorométhane ou méthanol) que dans l'eau.

Un test pour former le "clicktophane" **166** sans cuivre, en présence de fullerène a également été réalisé. Au bout de 22 heures, le profil LC/MS montre la présence majoritaire des produits de départ et un pic minoritaire ayant la masse du produit attendu. La réaction est relancée 24 heures supplémentaires, mais aucun changement n'est visible. Il est possible que la présence de PEG sur le CTV **165** engendre une gêne stérique, ce qui empêcherait au fullerène de préorganiser les réactifs **159** et **165**.

3. Conclusion

Nous avons synthétisé deux précurseurs clés (CTV **159** et CTV **160**) pour la synthèse de nouveaux cryptophanes par chimie *click*.

Nous avons démontré par LC/MS, que la réaction de cycloaddition de Huisgen entre **159** et **160** fonctionne en présence d'un catalyseur particulier: $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$. Le premier "clicktophane" (**161**) a donc pu être identifié par LC/MS mais sa faible solubilité dans des solvants classiques n'a pas permis de valider sa structure par RMN ^1H .

Nous avons également montré que la réaction de chimie *click* peut être réalisée en l'absence de cuivre, et ceci grâce à l'effet template du fullerène. Ce résultat est d'autant plus intéressant que les réactions de chimie *click* sans cuivre sont rares.

Pour terminer, nous avons souhaité pallier le problème de solubilité du "clicktophane" (**161**). Pour ce faire nous avons synthétisé un autre précurseur clé hydrosoluble (**165**) à partir du CTV **133**.

Un second "clicktophane" (**166**), cette fois-ci soluble en milieu organique et en milieu aqueux a pu être identifié par LC/MS.

II. CRYPTOPHANES PHOSPHORYLÉS

1. Concept de ces nouveaux cryptophanes

Nous nous sommes également intéressés à la synthèse de nouveaux cryptophanes présentant un groupement phosphate entre les deux unités de CTV. Ils seront appelés cryptophanes phosphorylés. Il s'agit dans un premier temps de mettre au point une méthode de synthèse du cryptophane **169** et de vérifier sa solubilité en milieu aqueux et ses propriétés d'encapsulation du xénon. L'idée étant ensuite de concevoir de nouveaux cryptophanes phosphorylés et "décorer" les CTV par des fonctionnalisations de type antenne de reconnaissance ou groupement fluorescent pour ensuite obtenir de nouveaux cryptophanes phosphorylés hydrosolubles et multifonctionnalisés (Figure 177).

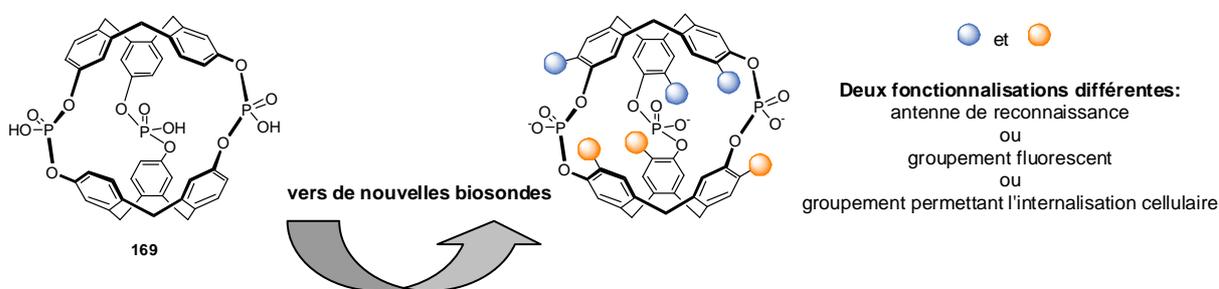


Figure 177: concept du cryptophane phosphorylé

2. Synthèse de 169 à partir du trichlorure de phosphoryle (POCl_3)

a. Synthèse de **169** en une étape

Un essai rapide a d'abord été réalisé en mélangeant le CTV **10** avec POCl_3 dans les proportions respectives 2 / 3, en présence de pyridine (Figure 178). Les analyses, obtenues après 5 heures de réaction, par LC/MS et par RMN ^{31}P ne montrent aucune trace du cryptophane **169**. Seuls le CTV de départ et des polymères sont observés.

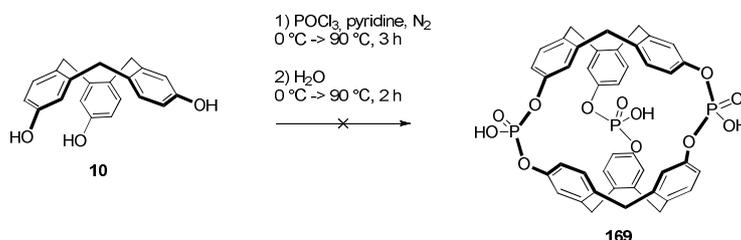


Figure 178: synthèse de **169** en présence d'un ratio CTV **10** / POCl_3 de 2 / 3

b. Synthèse de **169** en deux étapes

À la vue des résultats précédents, nous avons tenté d'obtenir **169** à partir de l'intermédiaire **170**. Dans un premier temps, **10** est mis en solution avec un léger excès de POCl_3 afin de former l'intermédiaire **170**. Puis, sans isoler **170** (car ce dernier est trop facilement hydrolysable), un second équivalent de CTV est ajouté afin de former **169** (Figure 179).

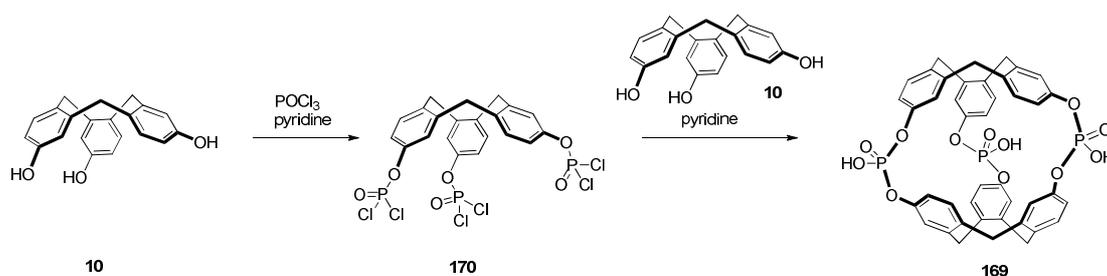


Figure 179: synthèse de **169** en deux temps

Pour cela, nous avons d'abord optimisé la première partie de la réaction, en isolant l'intermédiaire **171** (Figure 180).

i. Synthèse du composé **171**

Au cours de cette réaction, POCl_3 est d'abord ajouté à une solution de CTV **10** dans la pyridine pour former **170**. Ce dernier est ensuite hydrolysé pour obtenir le CTV **171** (Figure 180).

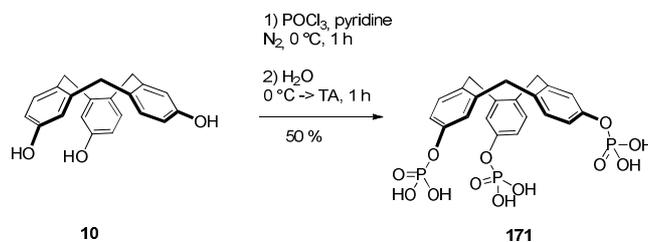


Figure 180: synthèse de l'intermédiaire **171**

En présence de 3,0 équivalents ou d'un léger excès (3,5 équivalents) de POCl_3 (Tableau 16 - entrées 1 et 2), le profil LC/MS nous a permis d'identifier le produit attendu **171** mais également beaucoup de polymères. Ce résultat est confirmé en présence d'un large excès de POCl_3 où l'on n'observe plus que des traces de **171** et majoritairement des polymères (entrée 3). Nous avons donc réalisé la réaction avec un défaut de POCl_3 : avec 1,5 et 1,8 équivalents de trichlorure de phosphoryle (entrées 4, 5 et 6), le profil LC/MS est très propre et on observe les différents intermédiaires **172** et **173** (Figure 181). Avec 2,8 équivalents de POCl_3 , le produit **171** est formé majoritairement et proprement, sans présence de polymère (entrée 7).

Entrée	Eq POCl ₃	produits visibles en LC/MS
1	3,0	171 + polymères
2	3,5	171 + polymères
3	30	polymères
4	1,5	10 + 172 + 173
5	1,8	172 + 173 + 171
6	2,0	173 + 171
7	2,8	173 + 171 majoritaire

Tableau 16: conditions opératoires testées pour l'obtention de **171**



Figure 181: intermédiaires observés au cours de la synthèse de **171**

Après une heure de réaction en présence de 2,8 équivalents de POCl₃, dans de la pyridine anhydre et sous atmosphère inerte, le CTV **171** est finalement purifié par chromatographie sur phase inverse et obtenu avec un rendement non optimisé de 50 %. Il est caractérisé par RMN ¹H et ³¹P et LC/MS.

ii. Réaction de couplage

Nous avons ensuite étudié la seconde partie de la réaction, c'est-à-dire l'ajout de CTV **10** préalablement dissout dans de la pyridine pour former le cryptophane phosphorylé **169**. De nombreuses conditions expérimentales ont été testées afin d'isoler **169**. Pour ce faire, la première partie de la réaction est réalisée dans les conditions expérimentales optimisées précédemment (2,8 équivalents POCl₃) puis la seconde partie de la réaction est suivie par LC/MS. En présence d'un excès ou d'un défaut de CTV **10**, on observe uniquement du CTV **171** et des polymères en LC/MS (Tableau 17 - entrées 1 et 2). Avec 1,0 équivalent de CTV **10** ajouté, des traces du produit attendu sont visibles (entrée 3). Nous avons également observé l'effet de la concentration en travaillant dans des solutions plus ou moins diluées et à haute dilution par ajout au pousse seringue (entrées 4, 5, 6, 7 et 8). Globalement, quelle que soit la concentration en CTV **10**, on observe majoritairement la formation de polymères.

Seulement en présence d'un équivalent de CTV **10** dissout dans 10 mL de pyridine et ajouté au pousse seringue pendant 15 minutes, le produit attendu a pu être clairement identifié en LC/MS (entrée 8). Nous avons finalement étudié l'effet de la température sur la réaction (entrées 9 et 10): en chauffant la réaction, les produits formés se dégradent, tandis qu'à 0°C, le produit final ne se forme pas.

Entrée	Eq CTV	Vpyridine (mL)	t d'injection (min)	T(°C)	produits visibles en LC/MS
1	0,5	2,0	0	TA	171 + polymères + 10
2	2,0	2,0	0	TA	171 + polymères + 10
3	1,0	2,0	0	TA	171 + polymères + traces de 169
4	1,0	20	30	TA	polymères
5	1,0	20	15	TA	polymères
6	1,0	20	60	TA	171 + polymères + 10
7	1,0	20	5	TA	171 + polymères + 10
8	1,0	10	15	TA	171 + polymères + 169
9	1,0	20	15	0	171 + polymères + 10
10	1,0	20	30	40	-

Tableau 17: conditions opératoires testées pour l'obtention de **169**, à partir de 50 mg du CTV **10** et 2,8 équivalents de POCl_3

Dans les conditions décrites précédemment (Tableau 17 - entrée 10), une purification par chromatographie sur phase inverse a permis d'éliminer un bon nombre de polymères, sans pour autant isoler le produit **169** propre. Le spectre RMN ^1H montre la présence de plusieurs produits et est difficilement interprétable. La RMN ^{31}P confirme ce résultat: deux pics majoritaires sont visibles.

L'échantillon est finalement analysé en RMN ^{129}Xe , mais aucun signal n'est visible. Il est donc probable que le cryptophane phosphorylé **169** n'encapsule pas le xénon. Pour le moment, nous n'avons pas poursuivi les tests d'optimisation de cette réaction et donc pas isolé **169** pur.

3. Conclusion

Nous avons tenté de synthétiser un nouveau cryptophane phosphorylé (**169**) à partir de trichlorure de phosphoryle.

Nous avons ainsi isolé un CTV précurseur (**171**) de cette molécule cage et caractérisé cet intermédiaire par RMN ^1H et ^{31}P ainsi que par LC/MS.

Malgré nos efforts d'optimisation de synthèse, le cryptophane final n'a pas pu être isolé. Des analyses RMN ^1H , RMN ^{31}P et LC/MS confirment sa présence mais également celle de produits secondaires de type polymères.

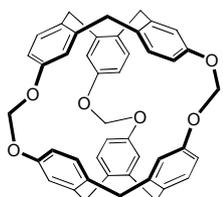
Le spectre RMN ^{129}Xe de l'échantillon non pur n'a pas montré de signal pouvant correspondre à ce nouveau complexe. Il est donc probable que la présence de groupements phosphate sur le cryptophane empêche l'entrée et la sortie du xénon dans la cage.

**CONCLUSION GÉNÉRALE
ET
PERSPECTIVES**

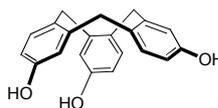
CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ces travaux de recherche était de concevoir et de synthétiser de nouveaux cryptophanes pour des applications en IRM ^{129}Xe . Au cours de cette thèse, plusieurs thématiques ont été abordées et les résultats obtenus sont les suivants:

- Une nouvelle synthèse du cryptophane-111, plus petit cryptophane présentant la meilleure constante d'affinité pour le xénon, a été mise au point. Ce composé a été obtenu en cinq étapes avec un rendement global de 12 % (la synthèse décrite dans la littérature nécessitant sept étapes pour un rendement global de 1,5 %). Cette synthèse est aujourd'hui réalisable à grande échelle et des quantités de l'ordre de 10 grammes de l'intermédiaire clé (CTV **10**) ont pu être obtenues⁹⁵.

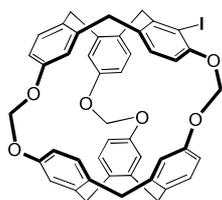


cryptophane-111

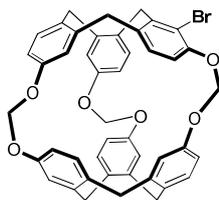


10

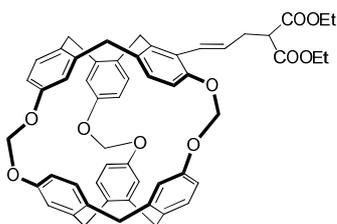
- La fonctionnalisation du cryptophane-111, jamais décrite auparavant, a été mise au point. Des réactions d'halogénéation (bromation, iodation) ont été réalisées et elles ont permis l'introduction de nouveaux groupements fonctionnels (diéthylallylmalonate, acide carboxylique) par chimie du palladium et du lithium.



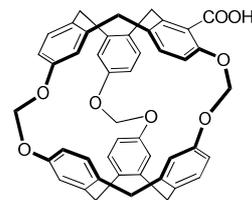
92



93

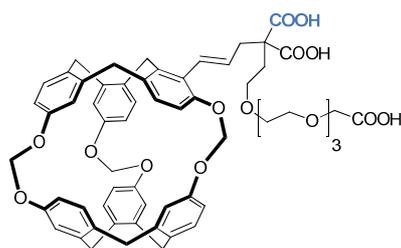


97



118

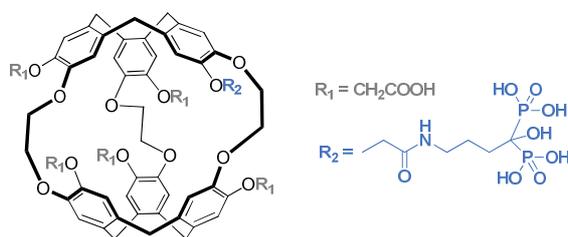
- Une biosonde **111** pour la mesure du pH extracellulaire par RMN ^{129}Xe a été synthétisée. Ce nouveau cryptophane a été obtenu en 3 étapes à partir du cryptophane mono-iodé **92** avec un rendement global de 7,8 %. La mesure du pKa d'intérêt (6,8) de la fonction acide malonique greffée sur le cryptophane a confirmé le potentiel d'une telle molécule pour la mesure de pH autour de 7. Les premiers résultats en RMN ^{129}Xe sont encourageants puisqu'un écart d'environ 20 ppm est visible entre pH = 4 et pH = 7 mais ils restent à confirmer.



111

Par ailleurs, des analyses RMN ^{129}Xe de **111** en présence de LiOH ont montré l'apparition d'un nouveau pic qui pourrait correspondre au signal du xénon encapsulé dans le cryptophane complexant l'ion Li^+ . Ces résultats restent à confirmer.

- Une biosonde (**124**) pour la détection de microcalcifications par RMN ^{129}Xe a également été conçue à partir du cryptophane hexa-carboxylate (**44**) et d'un groupement alendronate. Pour ce faire, une nouvelle stratégie de synthèse qui consiste en une mono-activation de **44** par du NHS, suivie d'un couplage peptidique avec l'alendronate, a été développée. La complexation de la biosonde **124** avec l'hydroxyapatite (principal constituant des microcalcifications) a été étudiée par RMN ^{129}Xe , mais seule une disparition du signal due à la précipitation du complexe a été observée.

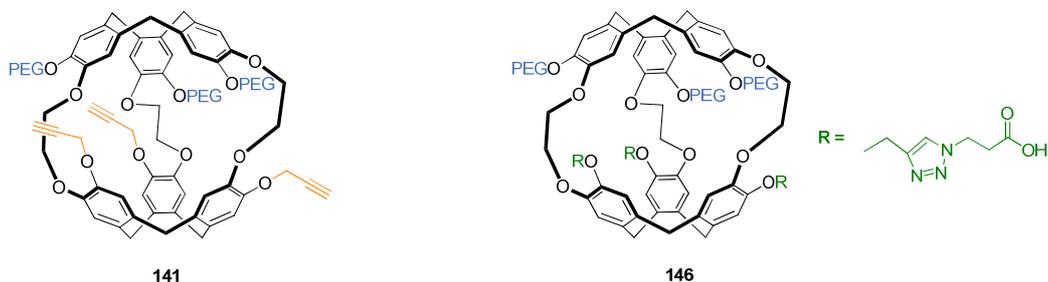


124

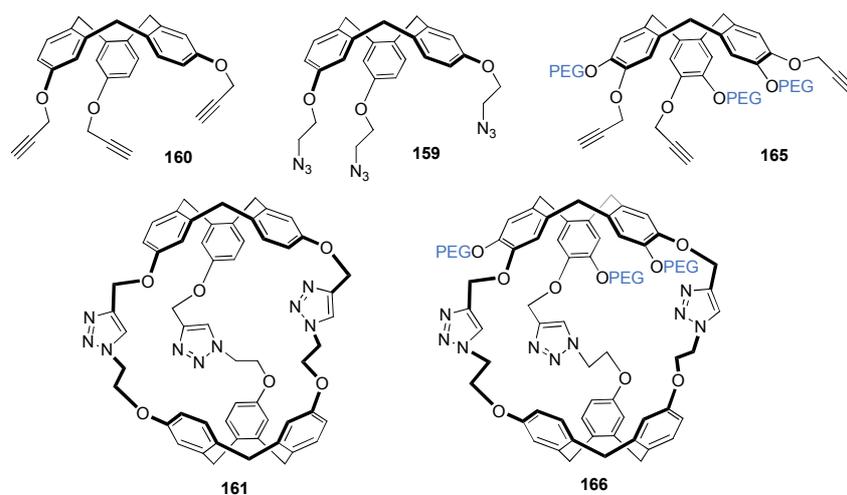
La complexation du cryptophane **124** avec l'uranyle ainsi que l'utilisation de **124** comme biosonde pour la mesure du pH ont également été étudiées par RMN ^{129}Xe . La formation du complexe **124** - uranyle ou les différentes formes de **124** selon le pH ont été observées en RMN ^{129}Xe ; mais, dans les deux cas, la variation de déplacement chimique du xénon encapsulé (0,2 à 0,5 ppm) n'est pas suffisante pour envisager une application en imagerie.

- Une plateforme générale (cryptophanes **141**) pour l'obtention d'un éventail de biosondes a été conçue. Pour ce faire, une nouvelle stratégie de synthèse consistant à introduire un groupement hydrosoluble (**PEG 550**) dès la première étape a été mise au point. Cette plateforme est ainsi obtenue en 5 étapes linéaires, à partir de produits peu onéreux et avec un rendement global de 1,9 % qui reste à optimiser. De plus, elle est facilement fonctionnalisable par chimie *click* (cryptophane **146**), hautement hydrosoluble (supérieure à 50 mg/mL soit 20 mM), non toxique à

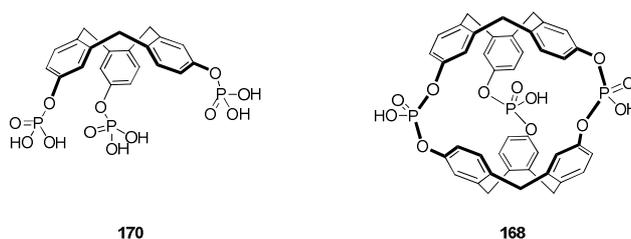
des concentrations utilisées en RMN ^{129}Xe (inférieures à 30 μM) et elle présente de bonnes propriétés d'encapsulation du xénon.



- Trois précurseurs clés (CTV **159**, CTV **160** et CTV **165**) pour la synthèse de nouveaux cryptophanes par chimie *click* ont été synthétisés. La réaction de cycloaddition de Huisgen entre **159** et **160** ou entre **159** et **165**, réalisée en présence du catalyseur $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$, a montré la formation des "clicktophane" **161** et **166** par LC/MS. D'autre part, ces molécules ont également pu être identifiées par LC/MS, après réaction sans cuivre, grâce à l'effet template du fullerène C_{60} .



- Pour terminer, plusieurs tentatives pour synthétiser un nouveau cryptophane phosphorylé (**168**) à partir du CTV **10** et de trichlorure de phosphoryle ont été réalisées. Pour cela, un CTV précurseur (**170**) a été isolé et caractérisé par RMN ^1H et ^{31}P et par LC/MS. Mais, dans aucun des cas, le produit final n'a pu être isolé propre.



PERSPECTIVES

Plusieurs perspectives sont envisagées pour la suite de ces travaux:

- Biosonde pour la mesure du pH extracellulaire: le problème actuel du cryptophane **111** est sa faible solubilité en milieu aqueux, ce qui pourrait engendrer la formation de micelles et donc fausser les analyses RMN ^{129}Xe . Une des solutions envisagées serait de mettre un PEG plus long (PEG 550 par exemple). Une courbe de titration du déplacement chimique du xénon en fonction du pH pourrait ensuite être obtenue.
- Biosonde pour la détection du lithium: des tests complémentaires en RMN ^{129}Xe pourront être réalisés afin de confirmer le potentiel du cryptophane **111** en tant que biosonde pour la détection de lithium.
- Biosonde pour la détection de l'uranyle par RMN ^{129}Xe : il serait intéressant de travailler avec un bis-phosphonate plus court (pamidronate) ou bien avec une cage plus petite (cryptophane-111) afin d'augmenter la sensibilité du xénon aux variations de son environnement. Pour cela, la synthèse d'un cryptophane-111 hydrosoluble et fonctionnalisable doit être envisagée.
- Plateforme générale: certaines étapes de synthèse et de purification de la plateforme sont actuellement en cours d'optimisation afin d'augmenter le rendement global et de pouvoir synthétiser ces nouveaux précurseurs de biosonde à grande échelle. En parallèle, de nouvelles biosondes multimodales, comportant trois fonctionnalisations différentes pourraient être synthétisées par chimie click.
- "Clicktophane": le "clicktophane" **161** présentant de gros problème de solubilité, il serait donc préférable de concentrer nos efforts sur le "clicktophane" **166** soluble en milieu organique et dans l'eau. Une caractérisation précise de ce composé devra d'abord être faite par ^1H RMN et MALDI. Puis, des études concernant la chimie *click* sans cuivre, en présence de fullerène, devront être approfondies.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ J. Gabard, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 1137
- ² M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yaoi, F. Tiani, P. G. Schultzi, *PNAS*, **2001**, 98, 10654
- ³ H. A. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332
- ⁴ *Adsp*, n°42, mars **2003**
- ⁵ *Clefs CEA*, N°56, **2007 - 2008**
- ⁶ P.C. Lauterbur, *Nature New Biol.*, **1973**, 242, 190
- ⁷ S. R. Meikle, F. J. Beekman, S. E. Rose, *Drug Discovery Today : Technologies*, **2006**, 3, 187
- ⁸ J.L. Barnhart, N. Kuhnert, D.A. Bakan, R.N. Berk, *Magn. Reson. Imag.*, **1987**, 5, 221
- ⁹ A. J. L. Villaraza, A. Bumb, M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2921
- ¹⁰ M. Bottrill, L. Kwok, N. J. Long, *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 557
- ¹¹ S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064.
- ¹² J. Wolber, F. Ellner, B. Fridlund, A. Gram, H. Jóhannesson, G. Hansson, L.H. Hansson, M.H. Lerche, S. Mansson, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, J.H. Ardenkjaer-Larsen, *Nucl. Instrum. Methods A*, **2004**, 526, 173
- ¹³ E. Terreno, D. Delli Castelli, A. Viale, S. Aime, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 3019
- ¹⁴ R. Eisenberg, *Acc. Chem. Res.*, **1991**, 24, 110; C. R. Bowers, D. P. Weitekamp, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 5541; J. Natterer, J. Bargon, *Prog. Nuc. Mag. Res.*, **1997**, 31, 29; D. Blazina. et al., *Dalton Trans.*, **2004**, 17, 2601
- ¹⁵ R. W. Adams et al., *Science*, **2009**, 323, 1708; K. D. Atkinson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 13362
- ¹⁶ K. Golman, R. Zandt, M. Lerche, R. Perhson, H. Ardenkjaer-Larsen, *Cancer Res.*, **2006**, 66, 10855
- ¹⁷ A. Viale, S. Aime, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 14, 1
- ¹⁸ K. Kawakami, *Ann. Nucl. Med.*, **1997**, 11, 67
- ¹⁹ S. Cullen, E. Gross, *Science*, **1951**, 113, 580
- ²⁰ R. Dickinson, B. Peterson, P. Banks, C. Simillis, JCS. Martin, C. Valenzuela, M. Maze, N. Franks, *Anesthesiology*, **2007**, 107, 756
- ²¹ M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer. B. Saam, C. S. Springer, Jr, A. Wishnia, *Nature*, **1994**, 370, 199
- ²² J. P. Mugler III, B. Driehuys, J. R. Brookeman, G. D. Cates, S. S. Berr, R. G. Bryant, T. M. Daniel, E. E. del Lange, J. H. Downs III, C. J. Erickson, W. Happer, D. P. Hinton, N. F. Kassel, T. Maier, C. D. Phillips, B. T. Saam, K. L. Sauer, M. E. Wagshul, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 37, 809
- ²³ A. J. Kastler, *Phys. Radium*, **1950**, 11, 225
- ²⁴ M. A. Bouchiat, T. R. Carver, C. M. Varnum, *Phys. Rev. Lett.*, **1960**, 5, 373
- ²⁵ B. M. Goodson, *Journal of Magnetic Resonance*, **2002**, 155, 157
- ²⁶ P. Berthault, G. Hubert, H. Desvaux, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2009**, 55, 35
- ²⁷ T. Pietrass, H. C. Gaede, *Adv. Mat.*, **1995**, 7, 826
- ²⁸ P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9262
- ²⁹ P. A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 3069
- ³⁰ S. Mecozzi, J. Rebek Jr., *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 1016
- ³¹ D.M. Rudkevich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 558
- ³² K. Bartik, M. Luhmer, S.J. Heyes, R. Ottinger, J. Reisse, *J. Magn. Reson. B*, **1995**, 109, 164
- ³³ J. Fukotomi, Y. Adachi, A. Kaneko, A. Kimura, H. Fujiwara, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2007**, 58, 115
- ³⁴ D. J. Cram, M. E. Tanner, C. B. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7717
- ³⁵ Y. Miyahara, K. Abe, T. Inazu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3020
- ³⁶ M. El Haouaj, M. Luhmer, Y. Ho Ko, K. Kim, K. Bartik, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2001**, 2, 804

- ³⁷ B.S. Kim, Y.H. Ko, Y. Kim, H.J. Lee, N. Selvapalam, H.C. Lee, K. Kim, *Chem Commun*, **2008**, 2756
- ³⁸ R. M. Fairchild, A. I. Joseph, K. Travis Holman, H. A. Fogarty, T. Brotin, J.-P. Dutasta, C. Boutin, G. Huber, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15505
- ³⁹ A. Nicholls, B. Sharp, B. Honig, *Proteins*, **1991**, 11, 281
- ⁴⁰ T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973
- ⁴¹ G. Huber, L. Beguin, H. Desvaux, T. Brotin, H. Fogarty, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 11363
- ⁴² H. Desvaux, G. Huber, T. Brotin, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *Chem. Phys. Chem.*, **2003**, 4, 384
- ⁴³ K. Bartik, M. Luhmer, J.-P. Dutasta, A. Collet, J. Reisse, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 784
- ⁴⁴ G. Huber, T. Brotin, L. Dubois, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6239
- ⁴⁵ M. Luhmer, B.M. Goodson, Y.-Q. Song, D.D. Laws, L. Kaiser, M.C. Cyrier, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3502
- ⁴⁶ L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science*, **2006**, 314, 446
- ⁴⁷ A. D. Sherry, M. Woods, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, 10, 391
- ⁴⁸ J. L. Mynar, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6334
- ⁴⁹ T. Meldrum, K. L. Seim, V. S. Bajaj, K. K. Palaniappan, W. Wu, M. B. Francis, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 5936
- ⁵⁰ J. Canceill, L. Lacombe, A. Collet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 219
- ⁵¹ A. Bouchet, T. Brotin, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 4507
- ⁵² A. Bouchet, T. Brotin, M. Linares, H. Ågren, D. Cavagnat, T. Buffeteau, *J. Org. Chem*, **2011**
- ⁵³ L. Garel, B. Lozach, J.-P. Dutasta, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11652
- ⁵⁴ L. Garel, J.-P. Dutasta, A. Collet, *Angew. Chem.*, **1993**, 32, 1169
- ⁵⁵ G. K. Seward, Q. Wei, I. J. Dmochowski, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2129
- ⁵⁶ P. Berthault, A. Bogaert-Buchmann, H. Desvaux, G. Huber, Y. Boulard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 16456
- ⁵⁷ O. Taratula, P. A. Hill, N. S. Khan, P. J. Carroll, I. J. Dmochowski, *Nat. Commun.*, **2010**, 1, 148
- ⁵⁸ G. M. Robinson, *J. Chem. Soc.*, **1915**, 102, 266
- ⁵⁹ A. S. Lindsey, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 1685
- ⁶⁰ H. Erdtman, F. Haglid, R. Ryhage, *Acta. Chem. Scand.*, **1964**, 18, 1249
- ⁶¹ A. Goldup, A. B. Morrison, G. W. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 3864
- ⁶² A. Collet, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5725
- ⁶³ J. D. White, B.D. Gesner, *Tetrahedron*, **1974**, 30, 2273
- ⁶⁴ A. Collet, J. Jacques, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 1265
- ⁶⁵ A. Collet, J. Gabard, J. Jacques, M. Cesario, J. Guilhem, C. Pascard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1981**, 1, 1630
- ⁶⁶ J. Canceill, A. Collet, J. Gabard, G. Gottarelli, G. P. Spada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 1299
- ⁶⁷ J. Canceill, A. Collet, G. Gottarelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 5997
- ⁶⁸ J. Canceill and A. Collet, *Nouv. J. Chim.*, **1986**, 10, 17
- ⁶⁹ B. Cookson *et al.* *J. Chem. Soc. B*, **1968**, 767
- ⁷⁰ J. F. Manville, G. E. Troughton, *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 4278
- ⁷¹ T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 88
- ⁷² K. T. Holman, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, **2004**
- ⁷³ A. Collet, J.-P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Topics in Current Chemistry*, **1993**, 165
- ⁷⁴ S. T. Mough, J. C. Goeltz, K. T. Holman, *Angew. Chem.*, **2004**, 43, 5631
- ⁷⁵ D. Cram, M. Tanner, S. Keipert, C. Knobler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 8909
- ⁷⁶ H. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332
- ⁷⁷ V. Roy, T. Brotin, J.-P. Dutasta, M.-H. Charles, T. Delair, F. Mallet, G. Huber, H. Desvaux, Y. Boulard, P. Berthault, *ChemPhysChem*, **2007**, 8, 2082
- ⁷⁸ Q. Wei, G. K. Seward, P. A. Hill, B. Patton, I. E. Dimitrov, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 13274
- ⁷⁹ A. Schlundt, W. Kilian, M. Beyermann, J. Sticht, S. Gunther, S. Hopner, K. Falk, O. Roetzschke, L. Mitschang, C. Freund, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4142

- ⁸⁰ P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9262
- ⁸¹ P. A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 3069
- ⁸² O. Taratula, P. A. Hill, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 1414
- ⁸³ P. Berthault, H. Desvaux, T. Wendlinger, M. Gyejacquot, A. Stopin, T. Brotin, J-P. Dutasta, Y. Boulard, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 12941
- ⁸⁴ T. Brotin, A. Lesage, L. Emsley, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1171
- ⁸⁵ M. M. Spence, E. J. Ruiz, S. M. Rubin, T. J. Lowery, N. Winssinger, P. G. Schultz, D. E. Wemmer, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15287
- ⁸⁶ C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 76
- ⁸⁷ T. J. Lowery, S. Garcia, L. Chavez, E. J. Ruiz, T. Wu, T. Brotin, J-P. Dutasta, D. S. King, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *ChemBioChem*, **2006**, 7, 65
- ⁸⁸ J. M. Chambers, P. A. Hill, J. A. Aaron, Z. Han, D. W. Christianson, N. N. Kuzma, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 563
- ⁸⁹ J. A. Aaron, J. M. Chambers, K. M. Jude, L. Di Costanzo, I. J. Dmochowski, D. W. Christianson *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 6942
- ⁹⁰ G. K. Seward, Y. Bai, N. S. Khan, I. J. Dmochowski, *Chem. Sci.*, **2011**
- ⁹¹ P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9262
- ⁹² T. Meldrum, L. Schröder, P. Denger, D. E. Wemmer, A. Pines, *Journal of Magnetic Resonance*, **2010**, 205, 24
- ⁹³ T. Brotin, V. Roy, J-P. Dutasta, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 6187
- ⁹⁴ T. Brotin, T. Devic, A. Lesage, L. Emsley, A. Collet, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7
- ⁹⁵ T. Traoré, L. Delacour, S. Garcia-Argote, P. Berthault, J-C. Cintrat, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2010**, 12, 960.
- ⁹⁶ N. Kotera, L. Delacour, T. Traoré, N. Tassali, P. Berthault, D-A. Buisson, J-P. Dognon, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 9
- ⁹⁷ H. Togo, G. Nogami, M. Yokoyama, *Synlett*, **1998**, 534.
- ⁹⁸ M. Lemhadri, A. Battace, T. Zair, H. Doucet, M. Santelli, *J. Organomet. Chem.*, **2007**, 692, 2270
- ⁹⁹ X. Gao, W. Yu, Y. Mei, Z. Jin, *Tetrahedron. Lett.*, **2004**, 8169
- ¹⁰⁰ O. Warburg, *Constable and Company, Ltd. London*, **1930**, 327
- ¹⁰¹ O. Warburg, *Science*, **1956**, 123, 309
- ¹⁰² F. Pampus, *Acta Neurochir.*, **1963**, 11, 305
- ¹⁰³ E. Jahde, M.F. Rajewsky, H. Baumgartl, *Cancer Res.*, **1982**, 42, 1498
- ¹⁰⁴ R. J. Gillies, N. Raghunand, M. L. Garcia-Martin, R. A. Gatenby, *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, **2004**, 23, 57
- ¹⁰⁵ R.J. Gillies, Z. Liu, Z. Bhujwala, *Am. J. Physiol.*, **1994**, 267, 195
- ¹⁰⁶ A.S. Ojugo, P.M. McSheehy, D.J. McIntyre, C. McCoy, M. Stubbs, M.O. Leach, I.R. Judson, J.R. Griffiths, *NMR Biomed.*, **1999**, 12, 495
- ¹⁰⁷ Y. Aoki, K. Akagi, Y. Tanaka, J. Kawai, M. Takahashi, *Invest. Radiol.*, **1996**, 31, 680
- ¹⁰⁸ S. Gil, P. Zaderenzo, F. Cruz, S. Cerdan, P. Ballesteros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 2, 305
- ¹⁰⁹ R. van Sluis, Z.M. Bhujwala, N. Raghunand, P. Ballesteros, J. Alvarez, S. Cerdan, J.P. Galons, R.J. Gillies, *Magn. Reson. Med.*, **1999**, 41, 743
- ¹¹⁰ Z.M. Bhujwala, D. Artemov, P. Ballesteros, S. Cerdan, R.J. Gillies, M. Solaiyappan, *NMR Biomed.*, **2002**, 15, 114
- ¹¹¹ M-L. Garcia-Martin, G. Herigault, C. Remy, R. Farion, P. Ballesteros, J.A. Coles, S. Cerdan, A. Ziegler, *Cancer Research*, **2001**, 61, 6524
- ¹¹² J. Zhou, J. F. Payen, D. A. Wilson, R. Traystman, *Nature Med.*, **2003**, 9, 1085
- ¹¹³ D. A. Beauregard, D. Parker, K. M. Brindle, *Proc. Int. Soc. Magn. Reson. Med.*, **1998**, 653
- ¹¹⁴ N. Raghunand, S. Zhang, A. D. Sherry, R. J. Gillies, *Acad. Radiol.*, **2002**, 9, 481
- ¹¹⁵ F. A. Gallagher, M. I. Kettunen, S. E. Day, D-E. Hu, J. H. Ardenkjær-Larsen, R. Zandt, P. R. Jensen, M. Karlsson, K. Golman, M. H. Lerche, K. M. Brindle, *Nature*, **2008**, 453, 940
- ¹¹⁶ J-M. Lehn, "Supramolecular Chemistry : Concepts and Perspectives", ed. VCH, **1995**
- ¹¹⁷ C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Ind. Ed. Engl*, **1988**, 27, 1021
- ¹¹⁸ A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Cancer Res.*, **2002**, 62, 5375
- ¹¹⁹ A. Lipton, R. L. Theriault, G. N. Hortobagyi, J. Simeone, R. D. Knight, K. Mellars, D. J. Reitsma, M. Heffernan, J. J. Seaman, *Cancer*, **2000**, 88, 1082

- ¹²⁰ E. R. van Beek, C.W. Lowik, F. H. Ebetino, S. E. Papapoulos, *Bone*, **1998**, 23, 437
- ¹²¹ P. M. Boonekamp, L. J. van derWee-Pals, M. M. vanWijkvan Lennep, C. W. Thesing, O. L. Bijvoet, *BoneMine r.*, **1986**, 1, 27
- ¹²² L.W. Bassett, *Radiol. Clin. North Am.*, **1992**, 30, 93
- ¹²³ L.W. Bassett, *Breast J.*, **2000**, 6, 291
- ¹²⁴ A. Mavroforou, D. Mavrophoros, E. Michalodimitrakis, *Eur. J. Radiol.*, **2006**, 57, 428
- ¹²⁵ T. M. Kolb, J. Lichy, J. H. Newhouse, *Radiology*, **2002**, 225, 165
- ¹²⁶ Z. Huo, M. L. Giger, O. I. Olopade, D. E. Wolverton, B. L. Weber, C. E. Metz, W. Zhong, S. A. Cummings, *Radiology*, **2002**, 225, 519
- ¹²⁷ K. R. Bhushan, P. Misra, F. Liu, S. Mathur, R. E. Lenkinski, J. V. Frangioni, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 17648
- ¹²⁸ P. W. Durbin, B. Kullgren, J. D. Xu, K. N. Raymond, *Radiat. Prot. Dosim.*, **1998**, 79, 433.
- ¹²⁹ M. A. Basinger, R. L. Forti, L. T. J. Burka, *Toxicol. Environ. Health*, **1983**, 64, 237.
- ¹³⁰ J. J. Katz, G. T. Seaborg, L. R. Morss, *The Chemistry of the Actinide Elements, Chapman and Hall: London/New York*, **1986**, 2
- ¹³¹ Based on the complexing constant of the Organization for Economic Cooperation and Developments Nuclear Energy Agency (O.E.C.DN-E.A) thermodynamical database
- ¹³² C. Moulin, I. Laszak, V. Moulin, C. Tondre, *Appl. Spectrosc.*, **1998**, 52, 528
- ¹³³ J. E. Bollinger, D. M. Roundhill, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 6421
- ¹³⁴ C. Jacopin, M. Sawicki, G. Plancque, D. Doizi, F. Taran, E. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, *Inorganic Chemistry*, **2003**, 42, 5015
- ¹³⁵ M. Sawicki, J-M. Siaugue, C. Jacopin, C. Moulin, T. Bailly, R. Burgada, S. Meunier, P. Baret, J-L. Pierre, F. Taran, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 3689
- ¹³⁶ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed*, **2001**, 40, 2004
- ¹³⁷ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057
- ¹³⁸ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed*, **2002**, 41, 2596
- ¹³⁹ R. Srinivasan, L.P. Tan, H. Wu, P.Y. Yang, K.A. Kalesh, S.Q. Yao, *Org Biomol Chem.*, **2009**, 7, 1821
- ¹⁴⁰ A. J. Lampkins, E. J. O'Neil, B. D. Smith, *J. Org. Chem.*, 2008, 73, 6053
- ¹⁴¹ P-C. Lin, S-H. Ueng, M-C. Tseng, J-L. Ko, K-T. Huang, S-C. Yu, A. K. Adak, Y-J. Chen, C-C. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4286
- ¹⁴² J. Morales-Sanfrutos, M. Ortega-Muñoz, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7768
- ¹⁴³ J. Morales-Sanfrutos, M. Ortega-Muñoz, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7772
- ¹⁴⁴ S. R. Meikle, F. J. Beekman, S. E. Rose, *Drug Discovery Today: Technologies*, **2006**, 3, 187

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Solvants et réactifs

Toutes les expériences nécessitant des conditions anhydres sont réalisées dans des montages secs (verrerie placée préalablement à l'étuve ou flambée sous vide) sous atmosphère d'azote séché sur carbonate de sodium et gel de silice.

Les solvants anhydres sont obtenus par distillation sous atmosphère d'azote en présence d'agents desséchants: l'hydruure de calcium pour le dichlorométhane et le sodium couplé à la benzophénone pour l'éther diéthylique et le tétrahydrofurane.

Les réactifs commerciaux sont utilisés sans purification.

Purifications et analyses

Les purifications par chromatographie sur colonne de gel de silice sont réalisées soit par gravité, soit sous pression d'azote ou d'air en utilisant de la silice MERCK (granulométrie 40-63 μm). Le mélange éluant est précisé pour chaque purification.

Les purifications par combiFlash[®] automatique sont réalisées sur un appareil RediSep (Serlabo Technologies, Teledyn ISCO) en utilisant des cartouches "pré-packées" en phase normale SiO_2 ou en phase normale C_{18} . Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice MERCK 60 F254 sur support en verre.

Les produits sont révélés soit par illumination ultraviolette à 254 nm, soit par réaction en présence de vapeurs d'iode, d'une solution aqueuse de permanganate de potassium et de carbonate de potassium ou encore d'une solution d'acide phosphomolybdique à 5 % en masse dans l'éthanol.

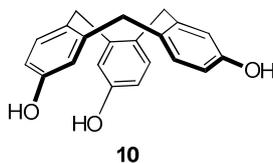
Les spectres de résonances magnétiques nucléaires (RMN) ^1H , ^{13}C , ^{31}P ainsi que les expériences complémentaires (DEPT 135, COSY, HSQC, NOESY) ont été enregistrés sur un spectromètre à ondes pulsées BRUKER DPX 400 MHz équipé d'un ordinateur Avance. Les fréquences de résonances des noyaux sont respectivement égales à 400,13 MHz pour le proton, 100,61MHz pour le carbone 13 et 121,50 MHz pour le phosphore 31.

Les déplacements chimiques δ sont exprimés en parties par million (ppm) et les constantes de couplage J en Hertz (Hz). Les références utilisées sont respectivement le proton du chloroforme ($\delta = 7,26$ ppm) ou ceux du tétraméthylsilane ($\delta = 0,00$ ppm) en RMN ^1H , le carbone 13 du chloroforme deutéré ($\delta = 77,00$ ppm) en RMN ^{13}C et le phosphore 31 de l'acide phosphorique ($\delta = 0,00$ ppm) en RMN ^{31}P . Dans la description des spectres, les multiplicités des signaux sont abrégées comme suit: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), dd (doublet de doublet), dm (doublet de multiplet), m (multiplet de nature indéterminée ou massif résultant de la superposition de différents signaux). Les autres abréviations utilisées concernent la forme ou la nature des noyaux auxquels ils correspondent: sl (singulet large).

Les spectres d'absorption infrarouge (IR) sont enregistrés sur un spectromètre PERKIN ELMER System 2000 FT-IR. Les composés, solides, sont inclus dans une pastille de KBr. Les nombres d'onde des bandes d'absorption correspondant aux différentes vibrations sont exprimés en cm^{-1} , à leurs intensités maximales.

Les spectres de masse (SM) sont obtenus par électrospray sur un spectromètre ESI TOF MARINER. Dans la description des spectres, «M» représente la masse molaire de la molécule analysée. Les spectres de masse haute résolution (HRMS) sont réalisés à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif-sur-Yvette.

10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g][9]annulene-2,7,12-triol **10**



À une solution de **86** (16,5 g, 28 mmol) dans du dichlorométhane (200 mL) à température ambiante sont ajoutés de l'acide acétique (100 mL) et de l'hydroxyde de palladium sur charbon à 20 % en masse (5,7 g). Le milieu est placé sous une atmosphère d'hydrogène pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur une couche de Célite[®] et le solvant est évaporé. Le produit souhaité **10** est obtenu avec un rendement de 95 %. Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Poudre blanche

R_f = 0,45 (dichlorométhane / acétone 30 : 10)

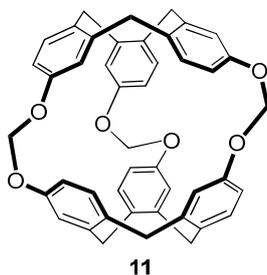
IR (KBr, cm⁻¹): 3333, 3024, 1497

RMN ¹H (400 MHz, acétone-d₆, δ en ppm): 3,52 (d, *J* = 13,2 Hz, 3H), 4,75 (d, *J* = 13,2 Hz, 3H), 6,53 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 8,4 Hz, 3H), 6,87 (d, *J* = 2,4 Hz, 3H), 7,19 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, acétone-d₆, δ en ppm): 35,7, 113,5, 116,1, 130,5, 130,9, 141,5, 155,7

HRMS-ESI (m/z) calculé pour C₂₁H₁₇O₃, 317,1172 trouvé 317,1190 ([M-H]⁻)

Composé 11: cryptophane-111



À une solution de **10** (10 g, 31 mmol) dans le N,N-diméthylformamide (DMF, 400 mL) est ajouté du carbonate de césium (Cs_2CO_3 , 102 g, 0,31 mol) et le mélange est agité pendant 1 heure à 80 °C. Du bromochlorométhane (BrCH_2Cl , 1 L, 155 mol) est ensuite ajouté puis le milieu réactionnel est chauffé à 80 °C pendant 12 heures. Le solvant est évaporé et le résidu est soniqué trois fois avec du chloroforme (2 x 300 mL) pendant 30 minutes. Les phases organiques sont rassemblées, filtrées sur un gel de silice (200 mL), lavées à l'eau puis avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 puis le solvant est évaporé. Le cryptophane-111 **11** est obtenu avec un rendement de 46 %. Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Poudre blanche

R_f = 0,4 (chloroforme)

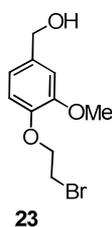
IR (KBr, cm^{-1}): 2983, 1499, 1232, 1038

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 3,42 (d, $J = 12,8$ Hz, 6H), 4,48 (d, $J = 12,8$ Hz, 6H), 5,73 (s, 6H), 6,59 (sl, 6H), 6,75 (d, $J = 6,2$ Hz, 6H), 6,98 (d, $J = 6,2$ Hz, 6H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 35,3, 86,1, 111,6, 117,5, 129,8, 132,1, 140,7, 157,7

RMN ^{129}Xe : le résultat obtenu pour ce composé est identique au résultat décrit dans la littérature.

(4-(2-bromoéthoxy)-3-méthoxyphényl)méthanol **23**

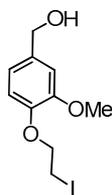


L'alcool vanillique (10 g, 74,9 mmol) est dissout dans du DMF (120 mL) puis K_2CO_3 (45 g, 0,3 mol) et 1,2-dibromoéthane (50 mL, 0,7 mol) sont ajoutés à la solution. La réaction est laissée sous agitation à 60 °C pendant 16 heures. Le lendemain, le mélange est versé dans de l'eau (800,00 mL) puis extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 400 mL). Les phases organiques sont réunies puis concentrées jusqu'à environ 500 mL et lavées successivement avec une solution de NaOH 1M (2 x 400 mL), de l'eau (500 mL) et avec une solution saturée de NaCl (2 x 500 mL). La phase organique est ensuite séchée et concentrée sous vide. Le produit **23** est obtenu avec un rendement de 52 %.

Solide

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 3,65 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 4,33 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 4,64 (s, 2H), 6,89 – 6,97 (m, 3H)

(4-(2-iodoéthoxy)-3-méthoxyphényl)méthanol **19**



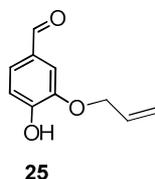
19

Le composé **23** (8,87 g, 34,1 mmol) est dissout dans de l'acétone (60 mL) puis du NaI (22 g, 0,15 mol) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation à 50 °C pendant 8 heures. L'acétone est évaporée puis le solide est dissout dans du dichlorométhane (400,00 mL) et lavé avec une solution saturée de thiosulfate de sodium (2 x 400 mL), de l'eau (400 mL) et avec une solution saturée de NaCl (400 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Le produit final **19** est obtenu quantitativement sans purification.

Solide

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,40 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 4,27 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 4,61 (s, 2H), 6,86 – 6,94 (m, 3H)

3-(allyloxy)-4-hydroxybenzaldéhyde **25**



À une suspension de NaH 60 % (3,05 g, 76,3 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL), est ajouté lentement à 0 °C une solution de 3,4-dihydroxybenzaldehyde (5 g, 36,2 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL). Après 30 min d'agitation, une solution de bromure d'allyle (3,1 mL, 36,2 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL) est ajoutée. La réaction est remontée à température ambiante et laissée sous agitation pendant 18 heures. La réaction est quenchée à l'eau et une solution de HCl 1M est ajoutée jusqu'à atteindre pH 2. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 90 : 10 → 70 : 30) permet d'obtenir le produit **25** avec un rendement de 30 %.

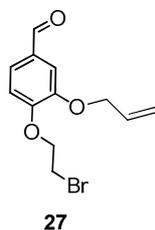
Solide

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 4,68 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 5,38 (dd, *J*₁ = 10,5 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H), 5,46 (dd, *J*₁ = 17,3 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H), 6,08 – 6,18 (m, 1H), 6,26 (s, 1H), 7,05 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 9,82 (s, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 69,89, 110,16, 114,55, 119,06, 127,45, 129,76, 131,93, 146,00, 151,78, 190,78

MS (ESI-TOF) *m/z*: 178,89 (100 %, [M+H]⁺)

3-(allyloxy)-4-(2-bromoéthoxy)benzaldéhyde **27**



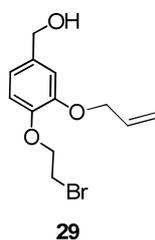
Le composé **25** (1,7 g, 9,7 mmol) est dissout dans du DMF (15 mL) puis K_2CO_3 (1,6 g, 11,7 mmol) et 1,2-dibromoéthane (3,3 mL, 39 mmol) sont ajoutés à la solution. La réaction est laissée sous agitation à 80 °C pendant 16 heures. La réaction est refroidie et de l'éther est ajouté à la solution, qui est ensuite lavée avec une solution d'HCl 1M. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 80 : 20 → 50 : 50) permet d'obtenir le produit **27** avec un rendement de 70 %.

Solide

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 3,68 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,40 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,65 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H), 5,30 (dd, $J_1 = 10,5$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 1H), 5,44 (dd, $J_1 = 17,3$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 1H), 6,07 – 6,18 (m, 1H), 6,99 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,46 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 9,85 (s, 1H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 28,26, 68,81, 69,81, 112,16, 112,99, 118,10, 126,34, 130,80, 132,50, 148,95, 153,31, 190,71

(3-(allyloxy)-4-(2-bromoéthoxy)phényl)méthanol 29



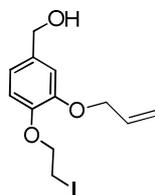
Le composé **27** (2 g, 8,5 mmol) est dissout dans du THF (19 mL). La solution est refroidie à 0 °C et NaBH₄ (0,3 g, 8,5 mmol) et du méthanol (2,3 mL) sont ajoutés. La réaction est laissée sous agitation pendant 30 minutes à 0 °C puis elle est quenchée avec une solution d'HCl 1M et extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 95 : 5) permet d'obtenir le produit **29** avec un rendement de 90 %.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,65 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,33 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,55 – 4,65 (m, 4H), 5,30 (dd, *J*₁ = 10,5 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H), 5,44 (dd, *J*₁ = 17,3 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H), 6,07 – 6,18 (m, 1H), 6,89 – 6,96 (m, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 29,09, 65,05, 69,59, 69,96, 113,59, 115,69, 117,65, 119,89, 133,17, 135,22, 147,45, 149,07

(3-(allyloxy)-4-(2-iodoéthoxy)phényl)méthanol 20



20

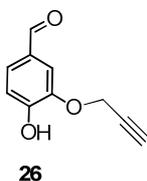
Le composé **29** (2 g, 7 mmol) est dissout dans de l'acétone (15 mL) puis du NaI (4,2 g, 28 mmol) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation à 50 °C pendant 8 heures. L'acétone est évaporée, puis le solide est dissout dans du dichlorométhane (100 mL) et lavé avec une solution saturée de thiosulfate de sodium (2 x 100 mL), de l'eau (100 mL) et une solution de NaCl saturée (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Le produit final **20** est obtenu quantitativement sans purification.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,42 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,27 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,55 – 4,65 (m, 4H), 5,30 (dd, *J*₁ = 10,5 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H), 5,44 (dd, *J*₁ = 17,3 Hz, *J*₂ = 1,2 Hz, 1H), 6,07 – 6,18 (m, 1H), 6,88 - 6,94 (m, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,40, 64,93, 69,93, 70,38, 113,50, 115,52, 117,68, 119,84, 133,17, 135,17, 147,18, 148,93

4-hydroxy-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde **26**



À une suspension de NaH 60 % (2,9 g, 72,5 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL), est ajoutée lentement à 0 °C une solution de 3,4-dihydroxybenzaldehyde (5 g, 36,2 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL). Après 30 min d'agitation, une solution de bromure de propargyle (3,2 mL, 36,2 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL) est ajoutée. La réaction est remontée à température ambiante et laissée sous agitation pendant 18 heures. La réaction est quenchée à l'eau et une solution de HCl 1M est ajoutée jusqu'à atteindre pH 2. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 90 : 10 → 50 : 50) permet d'obtenir le produit **26** avec un rendement de 54 %.

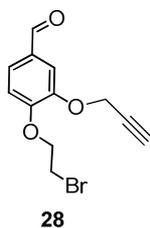
Solide

RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO, δ en ppm): 3,13 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 4,93 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 7,03 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,50 (dd, *J*₁ = 1,7 Hz, *J*₂ = 8,1 Hz, 1H), 7,59 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 9,83 (s, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, (CD₃)₂CO, δ en ppm): 56,32, 76,68, 78,25, 112,54, 115,62, 126,68, 129,62, 145,90, 152,98, 190, 00

MS(ESI-TOF) *m/z* 176,84 (100 %, [M+H]⁺)

4-(2-bromoéthoxy)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldéhyde **28**



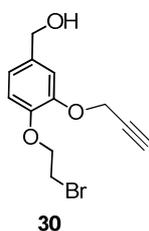
Le composé **26** (1,5 g, 9,3 mmol) est dissout dans du DMF (15 mL) puis K_2CO_3 (6,4 g, 46,3 mmol) et 1,2-dibromoéthane (7,9 mL, 92,5 mmol) sont ajoutés à la solution. La réaction est laissée sous agitation à 80 °C pendant 16 heures. La réaction est refroidie et de l'éther est ajouté à la solution, qui est ensuite lavée avec une solution d'HCl 1M. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 80 : 20 → 50 : 50) permet d'obtenir le produit **28** avec un rendement de 75 %.

Solide

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 2,54 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 3,68 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,40 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,83 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 7,03 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,50 (dd, $J_1 = 1,7$ Hz, $J_2 = 8,1$ Hz, 1H), 7,59 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 9,86 (s, 1H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 28,15, 56,99, 68,80, 76,40, 77,77, 112,99, 113,76, 126,86, 130,63, 147,61, 153,52, 190,00

(4-(2-bromoéthoxy)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)phényl)méthanol 30



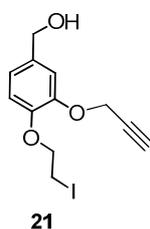
Le composé **28** (1,9 g, 6,6 mmol) est dissout dans du THF (19 mL). La solution est refroidie à 0 °C et NaBH₄ (0,3 g, 8,5 mmol) et du méthanol (2,3 mL) sont ajoutés. La réaction est laissée sous agitation pendant 30 minutes à 0 °C, puis elle est quenchée avec une solution d'HCl 1M et extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 95 : 5) permet d'obtenir le produit **30** avec un rendement de 90 %.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 2,51 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,68 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,33 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,63 (s, 2H), 4,83 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 6,91 – 6,97 (m, 2H), 7,09 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 28,94, 57,17, 64,94, 69,43, 75,78, 78,52, 114,80, 115,32, 120,99, 135,05, 147,69, 147,81

(4-(2-iodoéthoxy)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)phényl)méthanol 21



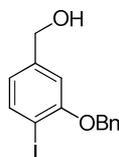
Le composé **30** (1 g, 3,5 mmol) est dissout dans de l'acétone (10 mL) puis du NaI (2,1 g, 14 mmol) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation à 50 °C pendant 8 heures. L'acétone est évaporée puis le solide est dissout dans du dichlorométhane (100 mL) et lavé avec une solution saturée de thiosulfate de sodium (2 x 100 mL), de l'eau (100 mL) et avec une solution de NaCl saturée (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Le produit final **21** est obtenu quantitativement sans purification.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 2,51 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,44 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,29 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,64 (s, 2H), 4,78 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 6,87 – 6,94 (m, 2H), 7,09 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 1,07, 57,19, 64,94, 70,27, 75,82, 78,52, 114,72, 115,22, 120,99, 134,97, 147,62

(3-(benzyloxy)-4-iodophényl)méthanol **84**



84

À une solution de 4-iodo-3-hydroxy-alcool benzylique **83** (50 g, 0,2 mol) dans l'acétone (500 mL) à température ambiante sont ajoutés du carbonate de potassium (K_2CO_3 , 55,4 g, 0,4 mol) et du bromure de benzyle (BnBr, 35,5 mL, 0,3 mol). Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 3 heures. Un suivi CCM permet de contrôler l'avancement de la réaction. Le milieu est refroidi et le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est extrait avec de l'acétate d'éthyle (2 x 200 mL), les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau puis avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée sur silice puis le solvant est évaporé. Le léger excès de BnBr est éliminé par lavage du résidu avec de l'éther. Le produit souhaité **84** est obtenu avec un rendement de 93 %. Le produit est obtenu suffisamment pur et est engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Solide blanc

R_f = 0,45 (*n*-hexane / acétate d'éthyle 10 : 20)

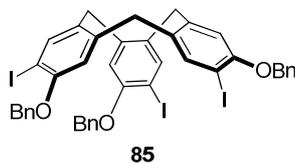
IR (KBr, cm^{-1}): 3208, 3026, 1573, 1279, 577

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 2,43 (s, 1H), 4,55 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 6,65 (dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 4$ Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 7,31 – 7,50 (m, 5H), 7,73 (d, $J = 8$ Hz, 1H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 64,4, 70,7, 85,3, 111,0, 121,0, 127,0, 127,8, 128,5, 136,3, 139,3, 142,8, 157,2

HRMS-ESI (m/z) calculé pour $C_{14}H_{12}IO_2$, 338,9877 trouvé 338,9888 ($[M-H]^+$)

2,7,12-tris(benzyloxy)-3,8,13-triiodo-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g][9]annulene **85**



À une solution de **84** (57 g, 0,2 mol) dans de l'éther anhydre (1,5 L) sous azote à température ambiante est ajouté de l'acide pentaphosphorique (P_2O_5 , 63,3 g, 0,4 mol) et le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 12 heures. Le milieu est refroidi à température ambiante et le solvant est évaporé. De l'eau (1,2 L) est ensuite ajoutée au résidu obtenu et le mélange est soniqué pendant 1 heure. Le solide est extrait avec du dichlorométhane (750 mL) puis lavé avec une solution d'ammoniaque à 28 %. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau (3 x 500 mL) puis avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée sur silice, puis le solvant est évaporé. Après une recristallisation dans un mélange dichlorométhane / éther 1 : 2, le produit désiré **85** est obtenu avec un rendement de 36 %.

Solide blanc

R_f = 0,4 (*n*-hexane / dichlorométhane 20 : 30)

IR (KBr, cm^{-1}): 3029, 1480, 1257, 1025, 733, 693

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 3,49 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H), 4,57 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H), 5,12 (s, 6H), 6,78 (s, 3H), 7,30 – 7,50 (m, 15H), 7,64 (s, 3H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 36,0, 71,2, 85,0, 114,1, 126,9, 128,0, 128,6, 133,2, 136,4, 140,3, 140,5, 156,3

HRMS-MALDI (m/z) calculé pour $C_{42}H_{33}I_3NaO_3$, 988,9461 trouvé 988,9482 ($[M+Na]^+$)

2,7,12-tris(benzyloxy)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g][9]annulene **86**



À une solution de **85** (32,1 g, 33 mmol) dans du dichlorométhane (1 L) à température ambiante sont ajoutés du palladium sur charbon à 10 % (Pd/C, 2,8 g), de la triéthylamine (Et₃N, 46,8 mL, 330 mmol). Le milieu est placé sous une atmosphère d'hydrogène pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur une couche de Célite[®] et le solvant est évaporé. La phase organique est lavée avec une solution HCl 1N (100,00 mL), de l'eau puis avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄, filtrée sur Célite[®] puis le solvant est évaporé. Le produit souhaité **86** est obtenu avec un rendement de 86 %. Le produit est suffisamment pur pour être engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire.

Poudre jaune clair

R_f = 0,3 (*n*-hexane / dichlorométhane 20 : 30)

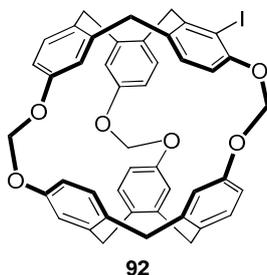
IR (KBr, cm⁻¹): 3388, 3031, 1610, 1496, 1253

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,59 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 4,72 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 5,00 (s, 6H), 6,66 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 8,4 Hz, 3H), 6,93 (d, *J* = 2,4 Hz, 3H), 7,17 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H), 7,30 – 7,50 (m, 15H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,5, 69,9, 113,0, 116,2, 127,3, 127,8, 128,5, 130,9, 131,6, 137,1, 140,9, 157,4

HRMS-ESI (*m/z*) calculé pour C₄₂H₃₆NaO₆, 611,2664 trouvé 611,2586 ([M+Na]⁺)

Composé 92



À une solution du cryptophane **11** (1,1 g, 1,6 mmol) dans le chloroforme (400 mL) à température ambiante sont ajoutés du diacétoxy-iodobenzène ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$, 0,63 g, 1,9 mmol) et du diiode (I_2 , 0,49 g, 1,9 mmol) et le mélange est agité pendant 2 heures. Une deuxième portion de diacétoxy-iodobenzène (0,52 g, 1,6 mmol) et de diiode (0,4 g, 1,6 mmol) est ajoutée puis le mélange est agité à température ambiante pendant 12 heures. Une solution saturée de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 50 mL) est ajoutée puis le milieu est extrait avec du chloroforme. Les phases organiques sont lavées à l'eau puis avec une solution saturée en NaCl (200 mL). La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 puis le solvant est évaporé. Après une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / dichlorométhane 40 : 60 \rightarrow 0 : 100), le composé souhaité **92** (0,45 g) est obtenu avec un rendement de 55 % (calculé par rapport à la quantité de produit ayant réagi).

Solide blanc

$R_f = 0,37$ (cyclohexane / dichlorométhane 30 : 70)

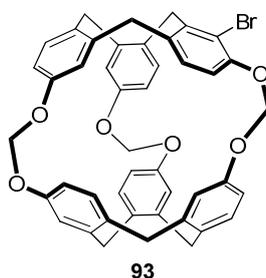
IR (KBr, cm^{-1}): 2962, 2900, 1609, 1501, 1230, 1040, 753

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 3,38 – 3,45 (m, 5H), 4,29 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H), 4,32 – 4,50 (m, 5H), 4,61 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H), 5,71 – 5,80 (m, 4H), 5,84 (s, 2H), 6,61 (sl, 11H), 6,97 (sl, 5H), 8,20 (sl, 1H)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 35,5, 35,6, 35,7, 37,0, 37,1, 86,0, 86,2, 87,9, 93,2, 111,3, 111,4, 111,8, 111,9, 112,1, 112,6, 117,5, 117,6, 117,7, 117,9, 129,5, 129,9, 130,5, 130,8, 131,1, 131,7, 132,2, 132,3, 132,5, 133,0, 133,9, 139,8, 140,5, 140,6, 141,4, 141,5, 144,1, 152,1, 152,5, 152,7, 153,0, 153,1, 153,2,

HRMS-MALDI (m/z) calculé pour $\text{C}_{45}\text{H}_{35}\text{I}\text{NaO}_6$, 821,1387 trouvé 821,1376 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Composé 93



À une solution de **11** (1,5 g, 2,2 mmol) dans du chloroforme (350 mL) est ajoutée du *N*-bromosuccinimide (NBS, 0,63 g, 3,3 mmol) et le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau puis avec une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée sur Célite® puis le solvant est évaporé. Après une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / dichlorométhane 1 : 1 → 1 : 2), le produit souhaité **93** est obtenu avec un rendement de 64 % (calculé par rapport à la quantité de produit ayant réagi).

Poudre blanche

R_f = 0,3 (cyclohexane / dichlorométhane 20 : 30)

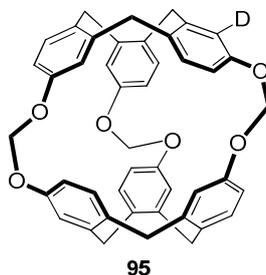
IR (KBr, cm⁻¹) : 2922, 1500, 1232, 1041, 754

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm) : 3,39 – 3,45 (m, 5H), 4,27 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 4,39 – 4,58 (m, 6H), 5,65 – 5,72 (m, 4H), 5,84 (s, 2H), 6,59 (sl, 5H), 6,75 – 6,80 (m, 6H), 7,0 (sl, 5H), 7,96 (sl, *J* = 4Hz, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm) : 33,0, 34,5, 35,5, 35,7, 36,7, 36,9, 85,6, 87,0, 87,1, 111,1, 111,2, 111,3, 111,4, 111,6, 113,5, 113,8, 116,7, 117,6, 117,9, 118,0, 129,0, 129,8, 130,1, 130,4, 130,7, 130,9, 131,4, 131,7, 132,4, 132,4, 133,6, 135,0, 139,7, 140,4, 140,6, 140,9, 141,2, 149,4, 149,7, 152,6, 152,6, 153,0,

HRMS-MALDI (m/z) calculé pour C₄₅H₃₅BrNaO₆, 773,6598 trouvé 773,6592 ([M+Na]⁺)

Composé 95



À une solution de cryptophane **92** ou **93** (5 mg, 6 μmol) dans du dichlorométhane (5 mL) à température ambiante sont ajoutés du palladium sur charbon à 10 % (5 mg) et de la triéthylamine (8,7 μL , 0,06 mmol). Le mélange est ensuite agité sous une atmosphère de deutérium pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur Célite[®] puis lavé avec une solution de HCl 1N. La phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution saturée en NaCl, séchée sur MgSO_4 puis filtrée sur Célite[®] à nouveau. Le solvant est évaporé et le cryptophane deutéré **95** souhaité est obtenu avec un rendement quantitatif.

Poudre blanche

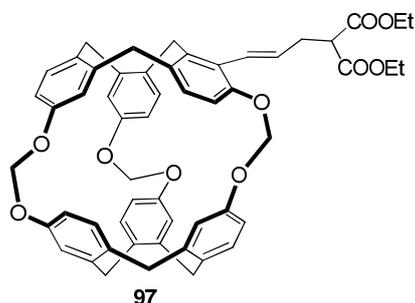
R_f = 0,29 (cyclohexane / dichlorométhane 30 : 70)

IR (KBr, cm^{-1}): 2980, 1485, 1234, 1033

RMN ¹H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 3,42 (d, $J = 13,1$ Hz, 6H), 4,49 (d, $J = 13,1$ Hz, 6H), 5,73 (s, 6H), 6,60 (sl, 5 H), 6,75 (sl, 6H), 7,00 (sl, 6H)

HRMS-ESI (m/z) calculé pour $\text{C}_{45}\text{H}_{35}\text{DNaO}_6$, 696,2575 trouvé 696,2495 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Composé 97



À une solution de cryptophane **92** (0,87 g, 1,1 mmol) dans du DMF anhydre (30 mL) sous atmosphère inerte sont ajoutés du diéthylallylmalonate (2,18 g, 10,9 mmol), du palladium tétrakis triphénylphosphine (0,06 g, 0,05 mmol) et de la triéthylamine (0,17 g, 1,6 mmol) à température ambiante. La réaction est laissée sous agitation pendant 2 heures à 120 °C. Le solvant est évaporé puis le milieu est extrait au dichlorométhane (25 mL), lavé à l'eau, séché sur MgSO₄ puis filtré sur Célite[®]. Le solvant est évaporé et une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle, 90 : 10 → 50 : 50) permet l'obtention du composé **97** avec un rendement de 52 %.

Solide blanc

R_f = 0,4 (cyclohexane / acétate d'éthyle 80 : 20)

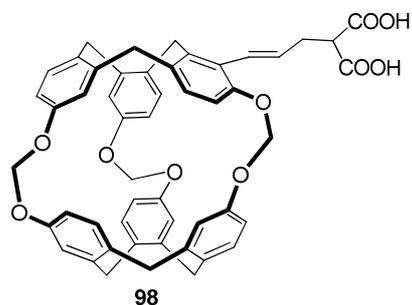
IR (KBr, cm⁻¹): 3439, 2980, 2920, 1731, 1501, 1231, 1039

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,26 – 1,35 (m, 6H), 3,00 (dd, *J*₁ = 6,9 Hz, *J*₂ = 7,6 Hz, 2H), 3,30 – 3,50 (m, 5H), 3,64 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 4,20 – 4,35 (m, 6H), 4,50 – 4,55 (m, 5H), 5,70 – 5,80 (m, 7H), 6,55 – 6,80 (m, 12H), 6,95 – 7,10 (m, 5H), 7,15 – 7,19 (m, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 14,0, 14,1, 32,7, 35,4, 35,5, 35,7, 35,8, 36,3, 36,6, 51,9, 61,4, 61,5, 86,0, 86,7, 111,0, 111,4, 111,5, 111,7, 111,9, 117,6, 117,7, 117,8, 117,9, 129,2, 129,6, 129,9, 130,0, 130,1, 130,2, 130,3, 132,1, 132,2, 132,3, 132,4, 132,8, 132,9, 139,1, 140,6, 140,7, 140,8, 140,9, 141,2, 152,5, 152,7, 152,8, 152,9, 153,0, 153,1, 168,9, 169,0

HRMS-MALDI (m/z) calculé pour C₅₅H₅₀NaO₁₀, 893,3306 trouvé 893,3296 ([M+Na]⁺)

Composé 98



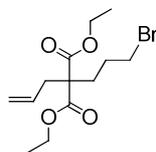
À une solution de cryptophane **97** (17 mg, 0,2 mmol) dans de l'éthanol (0,2 mL) est ajoutée une solution de NaOH 2M (0,2 mL). La réaction est laissée sous agitation pendant 2 heures au reflux de l'éthanol. L'éthanol est évaporé, la phase aqueuse est acidifiée à pH 2 par une solution d'HCl 1M, puis une extraction à l'acétate d'éthyle est effectuée. Ensuite, deux autres extractions successives respectivement à pH basique (NaHCO₃ saturée / acétate d'éthyle) et à pH acide (HCl 1M / acétate d'éthyle) permettent de purifier le composé **98**. Ce dernier est finalement isolé avec un rendement de 30 %.

Solide jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,06 (sl, 2H), 3,42 (m, 5H), 3,69 (sl, 1H), 4,32 (sl, 2H), 4,50 – 4,60 (m, 5H), 5,74 (sl, 7H), 6,61 – 6,99 (m, 18H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 815,46 (100 %, [M+H]⁺)

Diéthyl 2-allyl-2-(3-bromopropyl)malonate **102**



102

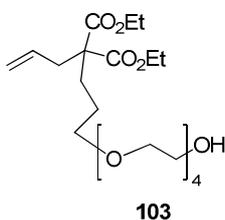
Le diéthyl 2-allylmalonate (1 g, 5 mmol) est ajouté à une suspension de NaH 60 % (0,4 g, 10 mmol) dans du DMF anhydre (0,5 mL) à 0 °C, sous atmosphère inerte. Le mélange est laissé 30 minutes à 0 °C et 30 minutes à température ambiante, puis le dibromopropane (2,2 mL, 25 mmol) est ajouté à 0 °C. Le mélange est laissé sous agitation, à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 15 heures. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 98 : 2 → 96 : 4) permet l'obtention du composé **102** avec un rendement de 64 %.

Huile incolore

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H), 1,75 – 1,85 (m, 2H), 1,95 – 2,05 (m, 2H), 2,63 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,37 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 4,17 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 5,05 – 5,15 (m, 2H), 5,60 – 6,70 (m, 1H)

MS(ESI-TOF) *m/z* 339,02 (100 %, [M+H₂O+H]⁺)

Diéthyl 2-allyl-2-(1-hydroxy-3,6,9,12-tétraoxapentadécan-15-yl)malonate 103



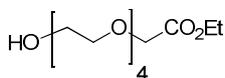
Du **PEG 200** (1,95 mg, 5 mmol) est ajouté à une suspension de NaH à 60 % (0,4 g, 10,0 mmol) dans DMF anhydre (10 mL) à 0 °C, sous atmosphère inerte. Le tout est agité à température ambiante, pendant 1 heure puis une solution de **102** (2,14 g, 6,7 mmol) dans du DMF (5 mL) à 0 °C est ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 50 : 50 → 0 : 100) permet l'obtention du composé **103** avec un rendement de 5 %.

Huile incolore

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,24 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H), 1,45 – 1,55 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 2,65 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,44 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,55 – 3,73 (m, 16H), 4,18 (q, *J* = 7,0 Hz, 4H), 5,05 – 5,15 (m, 2H), 5,60 – 5,65 (m, 1H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 435,4 (100 %, [M+H]⁺)

Éthyl 14-hydroxy-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate **105**



105

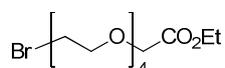
Sous une atmosphère inerte, du sodium métal (1,8 g, 78,3 mmol) est ajouté à du **PEG 200** (30 g, 154 mmol) dans un ballon de 500 mL. Le mélange est agité à 120 °C jusqu'à dissolution totale du sodium puis le bromoacétate d'éthyle (12,9 g, 77,3 mmol) est rajouté lentement. Le mélange est laissé sous agitation à 120 °C pendant 15 heures. La réaction est finalement refroidie à température ambiante puis quenchée à l'eau. Une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / THF 90 : 0 → 0 : 100) permet l'obtention du composé **106** pur avec un rendement global de 20 %.

Huile incolore

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,33 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 3,64 – 3,78 (m, 16H), 4,19 (s, 2H), 4,24 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 281,09 (100 %, [M+H]⁺)

Éthyl 14-bromo-3,6,9,12-tétraoxatétradécan-1-oate **106**



106

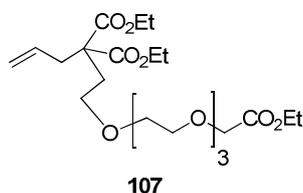
La triphénylphosphine (18,6 g, 71 mmol) est ajoutée à une solution de **105** non purifié (9,5 g, 33,8 mmol) dans du DCM anhydre (30 mL) à 0 °C. Le tout est agité à 0 °C pendant 5 minutes puis le tétrabromométhane (23,6 g, 71 mmol) est ajouté à 0 °C. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / acétate d'éthyle 80 : 20 → 0 : 100) permet l'obtention du composé **106** pur avec un rendement de 57 %.

Huile incolore

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H), 3,44 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 3,64 (m, 12H), 3,78 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H), 4,12 (s, 2H), 4,18 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 345,0 (100 %, [M+H]⁺)

Triéthyl 2,5,8,11-tétraoxaheptadec-16-ène-1,14,14-tricarboxylate **107**



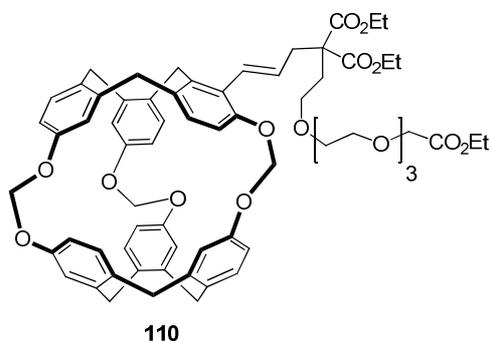
Le diéthylallylmalonate (0,59 g, 2,9 mmol) est ajouté à une suspension de NaH à 60 % (0,14 g, 3,5 mmol) dans THF anhydre (0,9 mL) à 0 °C, sous atmosphère inerte. Le tout est agité à température ambiante, pendant 1 heure, puis une solution de **106** (0,68 mg, 2 mmol) dans du THF (0,9 mL) à 0 °C est ajoutée. Le mélange est porté à reflux pendant 24 heures. Le THF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 90 : 10 → 50 : 50) permet l'obtention du composé **107** avec un rendement de 40 %.

Huile incolore

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H), 1,28 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H), 2,18 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,67 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,47 – 3,74 (m, 14H), 4,14 – 4,24 (m, 8H), 5,10 – 5,15 (m, 2H), 5,62 – 5,66 (m, 1H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 463,24 (100 %, [M+H]⁺)

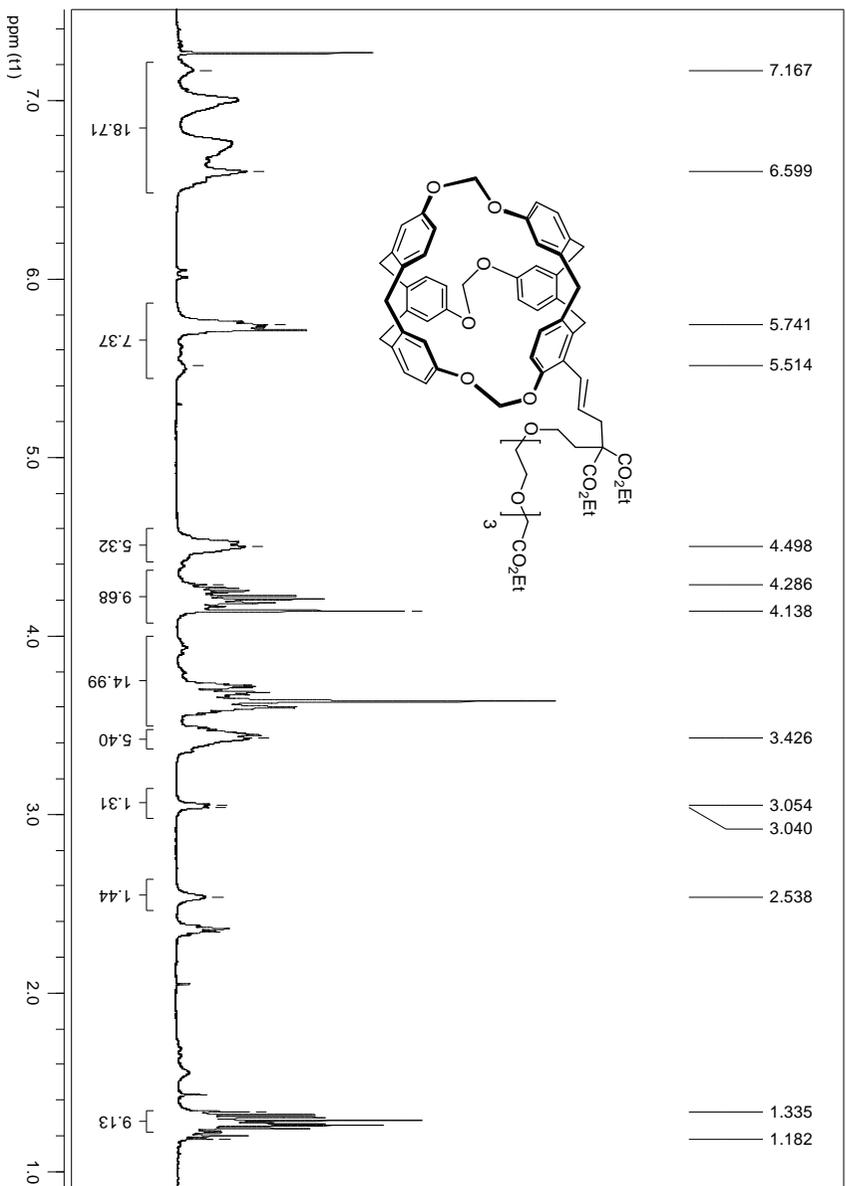
Composé 110



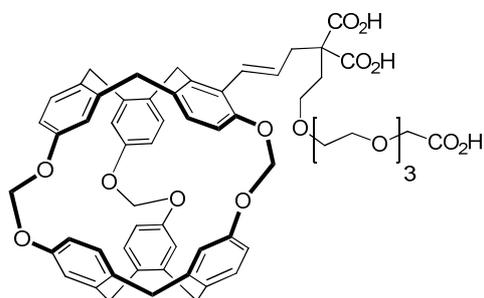
Une solution de cryptophane **97** (0,15 g, 0,2 mmol) dans du DMF anhydre (1 mL) est ajoutée à du NaH à 60 % (20 mg, 0,8 mmol) à température ambiante, sous atmosphère inerte. Le tout est agité pendant 30 minutes à température ambiante et pendant 1 heure à 80 °C. Une solution de **106** (0,3 mg, 1,8 mmol) dans du DMF (0,2 mL) est ajoutée et le mélange est laissé sous agitation à 80 °C pendant 12 heures sous atmosphère inerte. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 70 : 30 → 0 : 100) permet l'obtention du composé **110** avec un rendement de 3 %.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,18 – 1,34 (m, 9H), 2,44 (sl, 2H), 3,03 (sl, 2H), 3,44 (sl, 5H), 3,60 – 3,73 (m, 14H), 4,14 – 4,29 (m, 10H), 4,49 (sl, 5H), 5,51 – 5,74 (m, 7H), 6,60 – 7,17 (m, 18H)



Composé 111



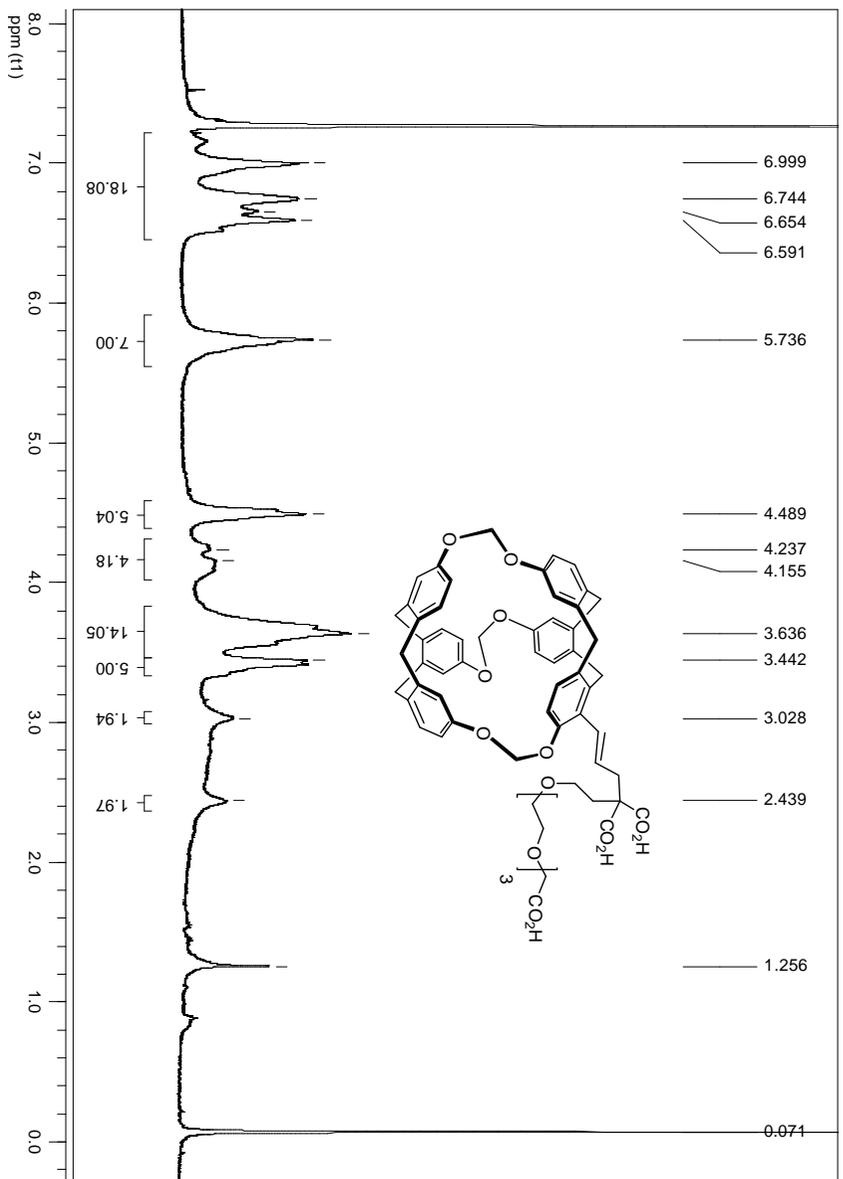
111

Une solution de NaOH 2M (0,3 mL) est ajoutée à une solution de cryptophane **110** (24 g, 21 mmol) dans de l'éthanol (0,3 mL). Le mélange est laissé sous agitation, à reflux pendant 6 heures. L'éthanol est ensuite évaporé puis une extraction au dichlorométhane suivie d'un lavage avec une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et une purification par chromatographie en phase inverse permet d'obtenir **111** avec un rendement de 50 %.

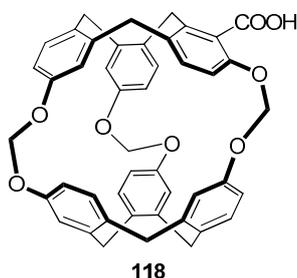
Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,44 (sl, 2H), 3,03 (sl, 2H), 3,44 (sl, 5H), 3,64 (sl, 14H), 4,16 – 4,24 (m, 4H), 4,49 (sl, 5H), 5,74 (sl, 7H), 6,59 – 7,00 (m, 18H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 1049,66 (100 %, [M+H]⁺)



Composé 118



À une solution du cryptophane **93** (0,2 g, 0,3 mmol) dans du tétrahydrofurane anhydre (35 mL) à - 78 °C est ajouté du *n*-butyllithium (*n*-BuLi, 0,4 mL, 1,1 mmol) et le mélange est agité pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite placé sous une atmosphère de CO₂ anhydre, agité pendant 1 heure à - 78 °C, puis le milieu est lentement réchauffé à température ambiante et agité pendant 2 heures. Le solvant est évaporé, puis le milieu est extrait avec du chloroforme (100 mL), lavé à l'eau, avec une solution saturée en NaCl, séché sur MgSO₄ et enfin filtré sur Célite®. Le solvant est évaporé. Après une purification par colonne chromatographique sur silice avec du chloroforme stabilisé à l'amylène puis du chloroforme stabilisé à l'éthanol, le cryptophane-acide **118** souhaité est obtenu avec un rendement de 27 %.

Solide blanc

R_f = 0,2 (chloroforme)

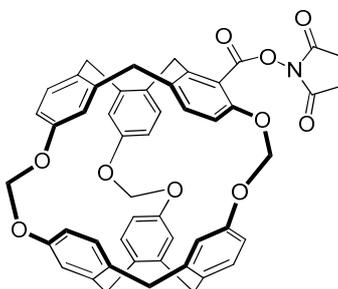
IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 2980, 1790, 1501, 1230, 1045

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,39 – 3,50 (m, 5H), 3,93 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 4,42 – 4,62 (m, 6H), 5,64 – 5,95 (m, 6H), 6,57 – 7,16 (m, 16H), 7,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 11,89 (s, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 31,5, 35,3, 35,4, 35,5, 35,7, 85,5, 85,6, 85,9, 110,7, 111,3, 111,5, 111,6, 111,7, 112,2, 117,0, 117,5, 117,7, 117,9, 118,1, 118,9, 126,1, 129,7, 129,8, 130,0, 130,6, 131,3, 131,7, 131,9, 132,1, 132,5, 133,5, 135,7, 140,1, 140,8, 140,9, 140,9, 141,4, 149,6, 153,1, 153,6, 153,7, 153,9, 170,2

HRMS-ESI (*m/z*) calculé pour C₄₆H₃₆O₈, 716,2410 trouvé 716,2419 ([M-H]⁻)

Composé 119



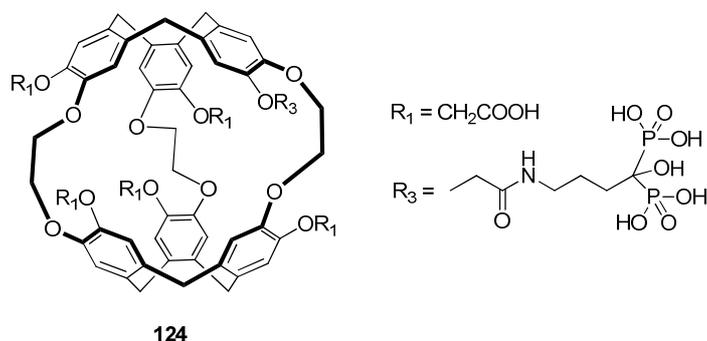
119

Le cryptophane **118** (50 mg, 0,07 mmol), l'EDCI (21 mg, 0,1 mmol) et le *N*-hydroxysuccinimide (20 mg, 0,1 mmol) sont solubilisés dans du dichlorométhane anhydre (1 mL). Après 12 heures de réaction à température ambiante sous azote, un lavage à l'eau est réalisé puis la phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99,5 : 0,5) permet d'obtenir le produit **119** avec un rendement de 70 %.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,90 – 2,95 (m, 4H), 3,40 – 3,45 (m, 5H), 4,21 (d, *J* = 14,3 Hz, 1H), 4,49 – 4,52 (m, 6H), 5,68 – 5,75 (m, 6H), 6,58 – 6,65 (m, 5H), 6,73 – 6,79 (m, 6H), 6,99 – 7,01 (m, 6H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 831,28 (100 %, [M+ H₂O+H]⁺)

Composé 124



Le cryptophane **44** (40 mg, 0,04 mmol), l'EDCI (6,6 mg, 0,04 mmol) et le *N*-hydroxysuccinimide (4 mg, 0,04 mmol) sont mis en solution dans du DMF anhydre (0,5 mL) et la réaction est laissée pendant 4 heures sous agitation à température ambiante. L'ester activé **123** est directement engagé dans la réaction de couplage peptidique sans purification.

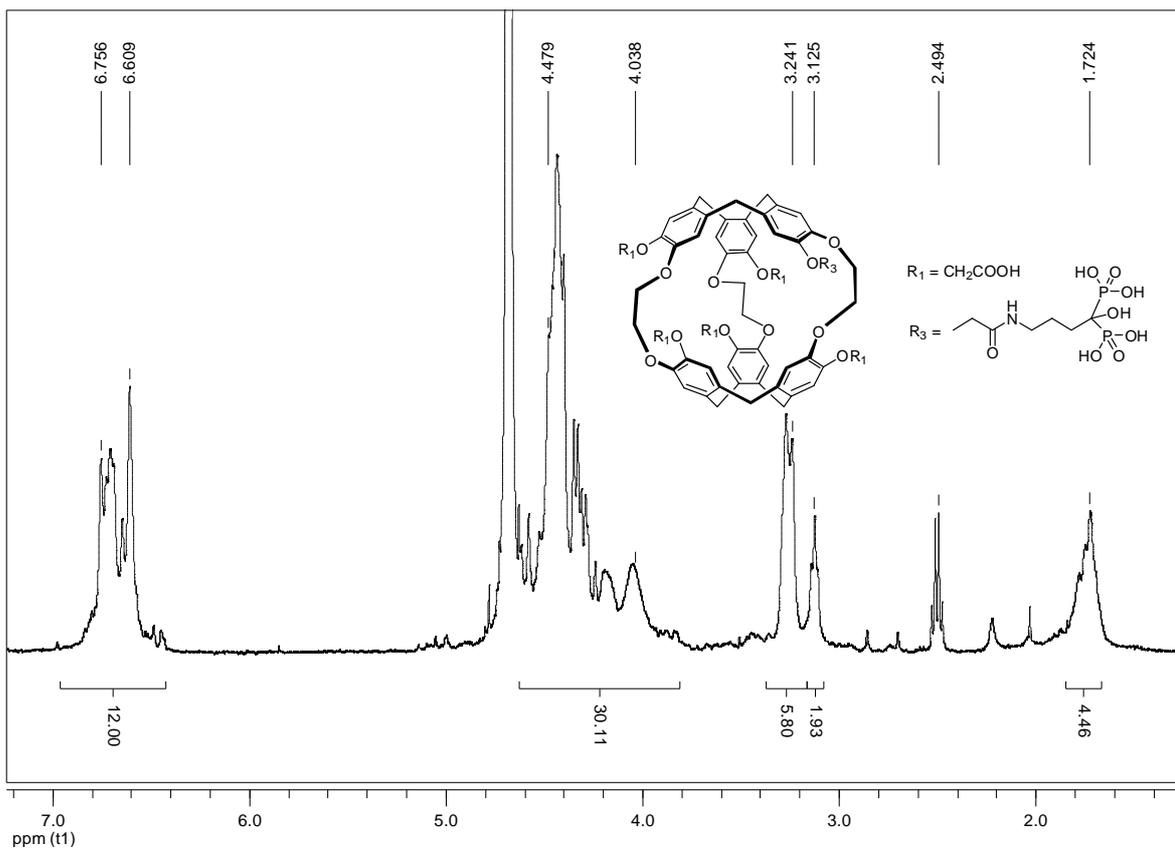
Dans un pilulier, une solution d'alendronate (0,07 g, 0,3 mmol) dans un mélange eau (0,3 mL) / TEA (0,2 mL) est préparée puis ajoutée goutte à goutte à la solution contenant le cryptophane **123**. La réaction est laissée pendant 12 heures sous agitation à température ambiante TA. Après un dépôt solide sur Célite[®], le brut réactionnel est directement purifié sur phase inverse (eau / acétonitrile 95 : 5 → 50 : 50), le composé **124** est obtenu avec un rendement de 30 % (calculé par rapport à la quantité de produit ayant réagi).

Solide blanc

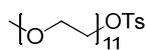
RMN ¹H (400 MHz, D₂O, δ en ppm): 1,70 – 1,78 (m, 4H), 3,12 – 3,16 (m, 2H), 3,25 – 3,29 (m, 6H), 4,08 – 4,60 (m, 30H), 6,63 – 6,77 (m, 12H)

RMN ³¹P (121,5 MHz, D₂O, δ en ppm): 18,43

MS (ESI-TOF) *m/z*: 1390,46 (100 %, [M+H]⁺)



2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetatriacontan-34-yl 4-methylbenzenesulfonate **129**



129

- Protocole expérimental sur 5 g de méthoxy-polyéthylène glycol 550

Le méthoxy-polyéthylène glycol 550 (5 g, 9,7 mmol) et le chlorure de tosyle (18,5 g, 96,8 mmol) sont dissouts dans 100 mL de DCM anhydre. La triéthylamine (9,5 mL, 70 mmol) est ensuite rajoutée goutte à goutte sous atmosphère inerte. La réaction est laissée au reflux du dichlorométhane pendant 1 nuit. Le dichlorométhane et la triéthylamine sont évaporés puis une extraction eau / dichlorométhane est effectuée. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé. Une purification par chromatographique sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 100 : 0 → 90 : 10) permet l'obtention du composé **129** de manière quantitative.

- Protocole expérimental sur 20 g de méthoxy-polyéthylène glycol 550

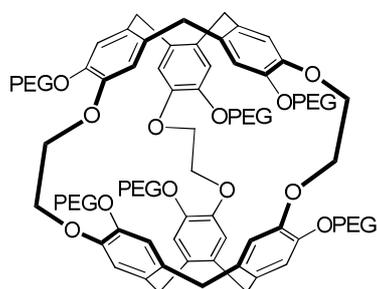
Le méthoxy-polyéthylène glycol 550 (20 g, 39 mmol) et le chlorure de tosyle (74 g, 387 mmol) sont dissouts dans 400 mL de DCM anhydre. La triéthylamine (37,8 mL, 271,1 mmol) est ensuite rajoutée goutte à goutte sous atmosphère inerte. La réaction est laissée au reflux du dichlorométhane pendant 1 nuit. Le dichlorométhane et la triéthylamine sont évaporés. Le résidu est repris dans du diéthyl éther et est lavé deux fois à l'eau. La phase aqueuse est ensuite récupérée et extraite au DCM. Pour terminer la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis le solvant est évaporé. Le composé **129** est obtenu avec un rendement de 60 %.

Huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,44 (s, 3H), 3,37 (s, 3H), 3,54 – 3,69 (m, 42H), 4,15 (t, J = 4,7 Hz, 2H), 7,33 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,78 (d, J = 8,3 Hz, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 21,55, 58,91, 68,57, 69,18, 70,45, 70,63, 71,83, 127,87, 129,74, 132,93, 144,70

Composé 130



130

Le carbonate de césium (0,08 g, 0,3 mmol) est ajouté à une solution de **43** (0,01 g, 0,01 mmol) dans du DMF anhydre (1 mL) et le mélange est chauffé à 70 °C pendant 1 heure. **129** (0,06 g, 0,09 mmol) est ensuite ajouté à la solution et le mélange est laissé pendant 1 nuit à 70 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Puis, une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 90 : 10) permet l'obtention du composé **130** avec un rendement de 40 %.

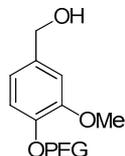
Huile jaune pâle

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): δ 3,34 (d, *J* = 13,9 Hz, 6H), 3,37 (s, 18H), 3,48 – 3,82 (m, 252H), 3,90 – 3,96 (m, 6H), 4,07 – 4,20 (m, 19H), 4,51 (d, *J* = 13,9 Hz, 6H), 6,71 (s, 6H), 6,74 (s, 6H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,18, 58,99, 68,80, 69,73, 69,96, 70,51, 70,76, 71,88, 116,88, 121,91, 132,37, 134,06, 147,07, 148,91

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 3339,8 ± 44 ([M+Na]⁺)

(4-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecaoxatetracontan-34-yloxy)-3-méthoxyphényl)méthanol 131



131

L'alcool vanillique (2,6 g, 16,8 mmol) est dissout dans 20 mL d'acétone. Le composé **129** (7,5 g, 11,2 mmol) et le carbonate de potassium (2,6 g, 19 mmol) sont ensuite rajoutés dans le milieu réactionnel, et le tout est laissé sous agitation, au reflux de l'acétone, sous atmosphère inerte, pendant 16 heures. L'acétone est évaporée puis une extraction eau / dichlorométhane est effectuée. La phase organique est récupérée et lavée deux fois avec une solution aqueuse de carbonate de potassium (pH = 11) et deux fois à l'eau. Elle est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Le composé **131** est obtenu sans purification avec un rendement de 98 %.

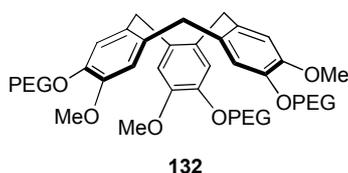
Huile jaune pâle

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,37 (s, 3H), 3,54 – 3,72 (m, 40H), 3,86 (s, 3H), 3,88 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,17 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,61 (s, 2H), 6,84 – 6,92 (m, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 55,84, 58,95, 65,08, 68,64, 69,61, 70,50, 70,77, 71,86, 110,95, 113,8, 119,28, 134,38, 147,73, 149,70

HRMS-ESI (m/z) calculé pour C₃₁ H₅₆ O₁₄ Na, 675,3597 trouvé 675,3568 ([M-H]⁻)

Composé 132



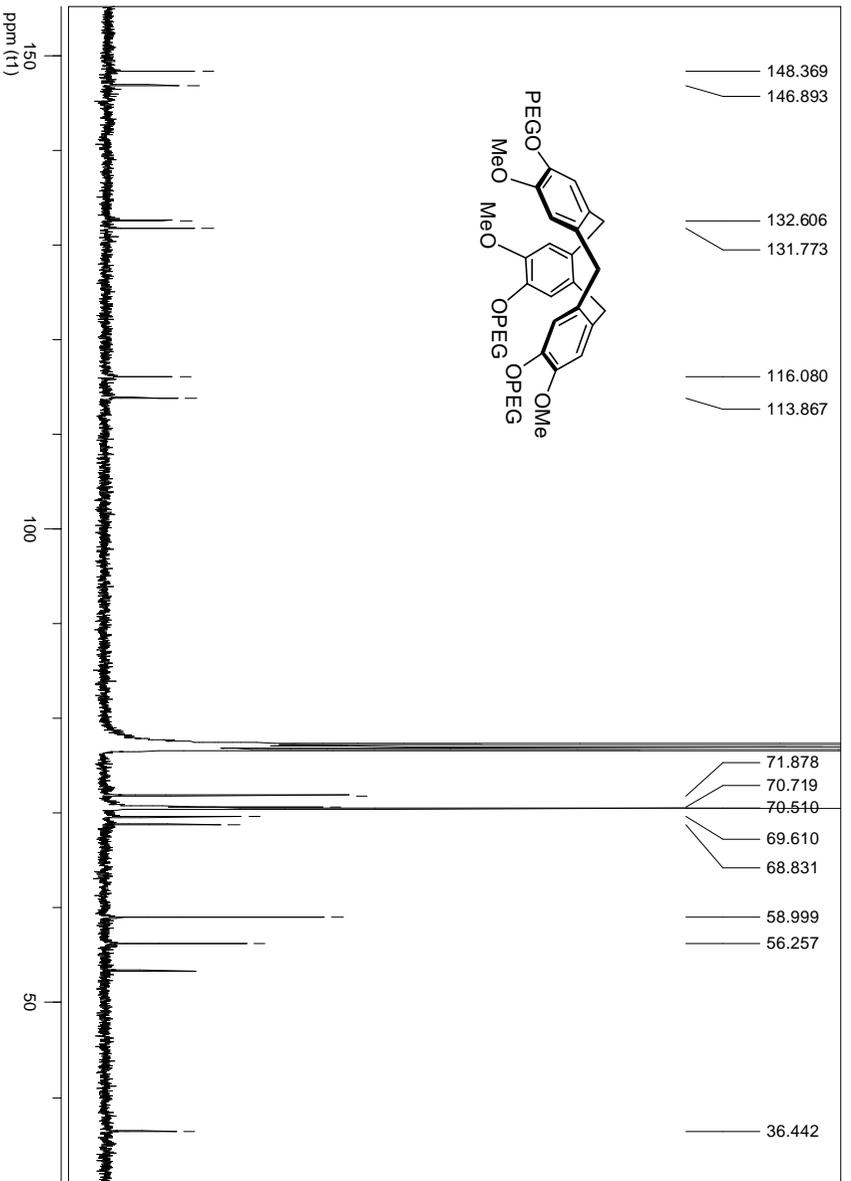
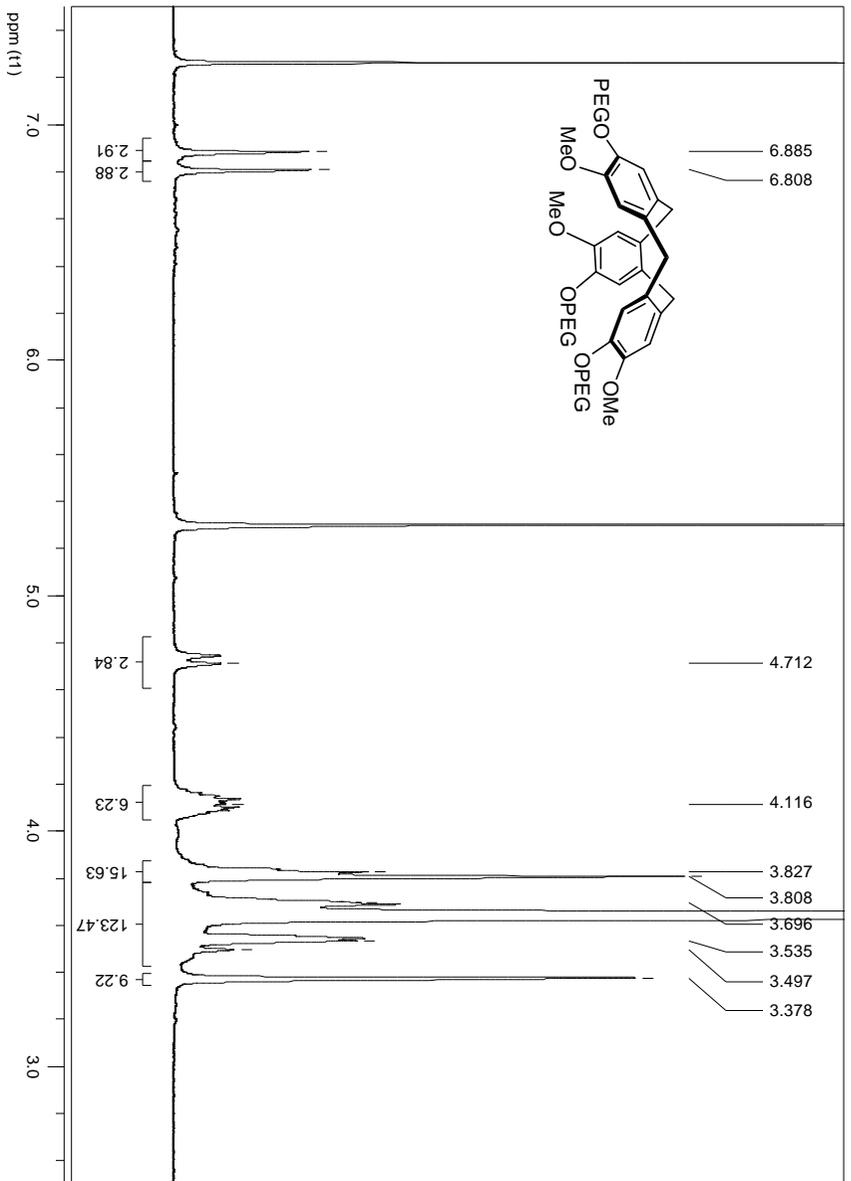
À une solution de **131** (2,7 g, 4.1 mmol) dans 27 mL de MeOH sont ajoutés lentement 13 mL d'acide perchlorique 70 % à 0 °C sous atmosphère inerte. La réaction est ensuite remontée à température ambiante et laissée sous agitation pendant 24 heures. Le mélange réactionnel est dilué dans du DCM et neutralisé par une solution de NaOH 1M à 0 °C. La phase organique récupérée est lavée avec de l'eau et avec une solution de NaCl saturé. Celle-ci est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification sur phase inverse (eau / acétonitrile 80 : 20 → 20 : 80) permet l'obtention du composé **132** avec un rendement de 50 %.

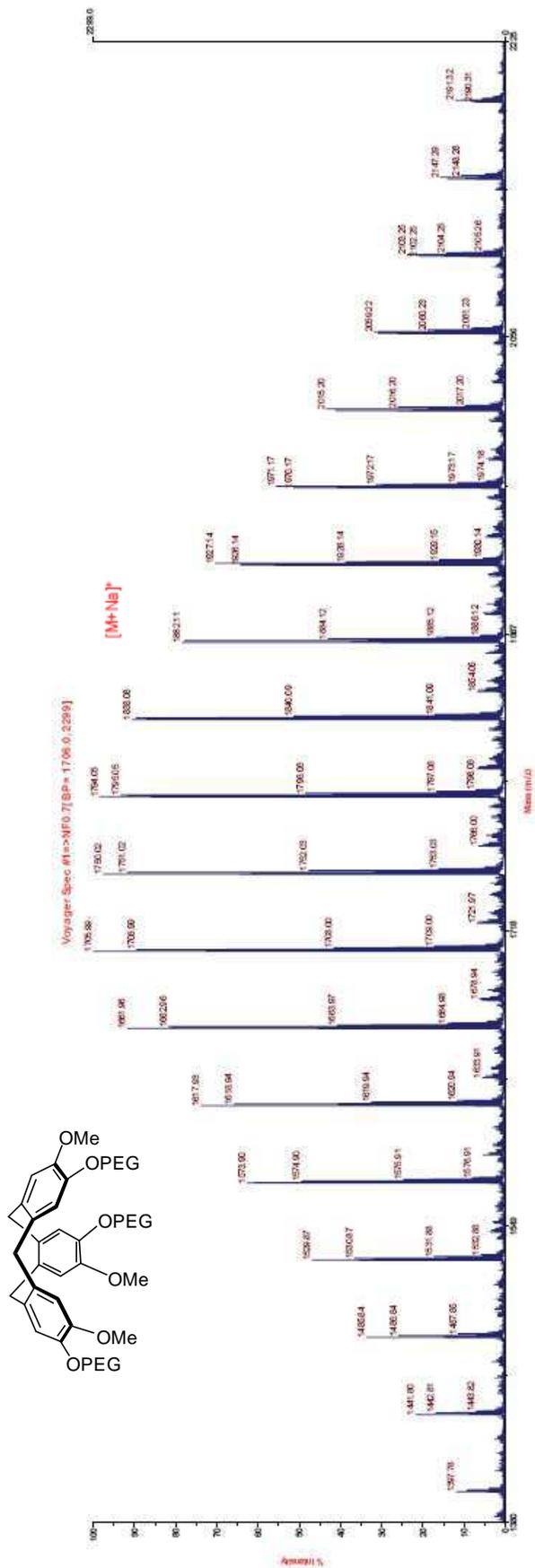
Huile transparente

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,38 (s, 9H), 3,50 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H), 3,54 – 3,70 (m, 120H), 3,81 (s, 9 H), 3,80 – 3,90 (m, 6H), 4,11 – 4,20 (m, 6H), 4,71 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H), 6,81 (s, 3H), 6,89 (s, 3H)

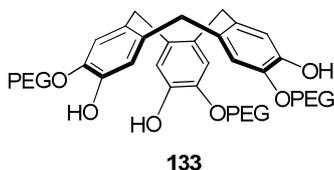
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,44, 56,26, 58,99, 68,83, 69,61, 70,51, 70,72, 71,88, 113,87, 116,08, 131,77, 132,61, 146,89, 148,37

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 1705,9 ± 44 ([M+Na]⁺)





Composé 133



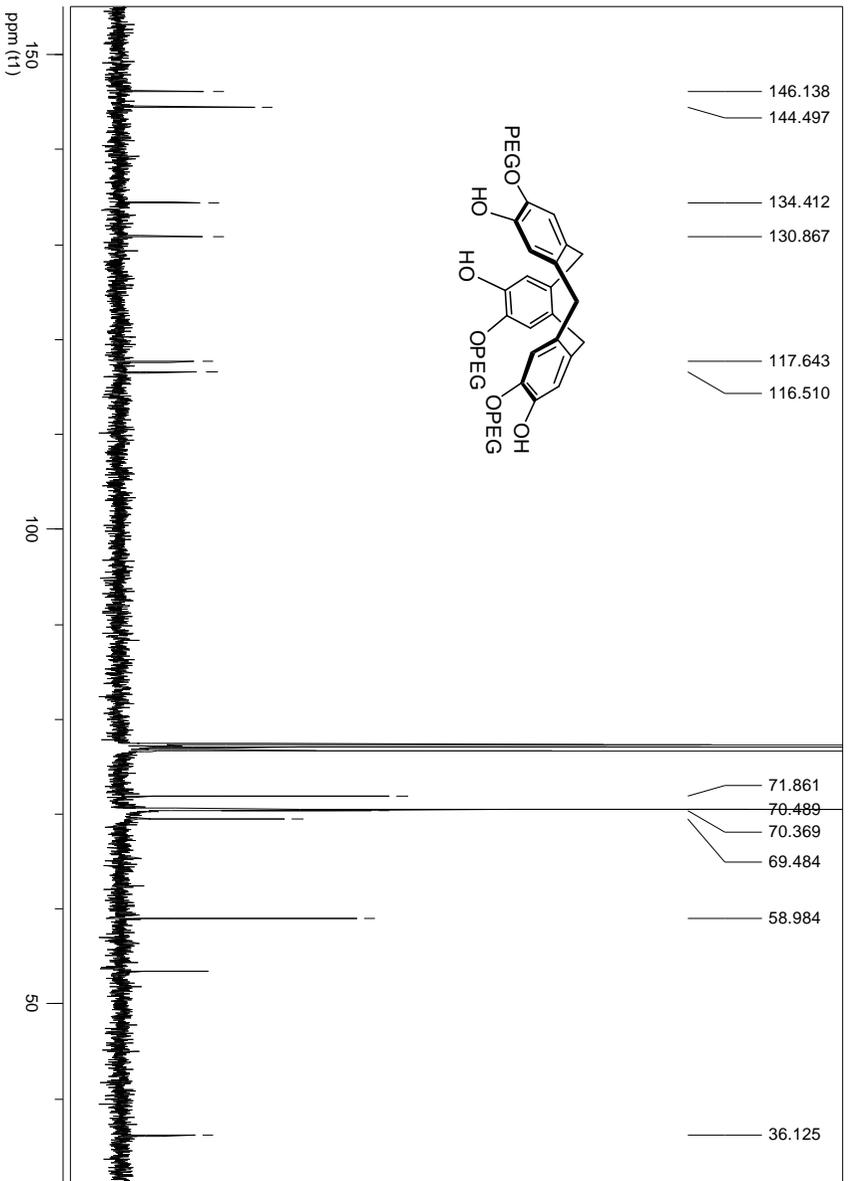
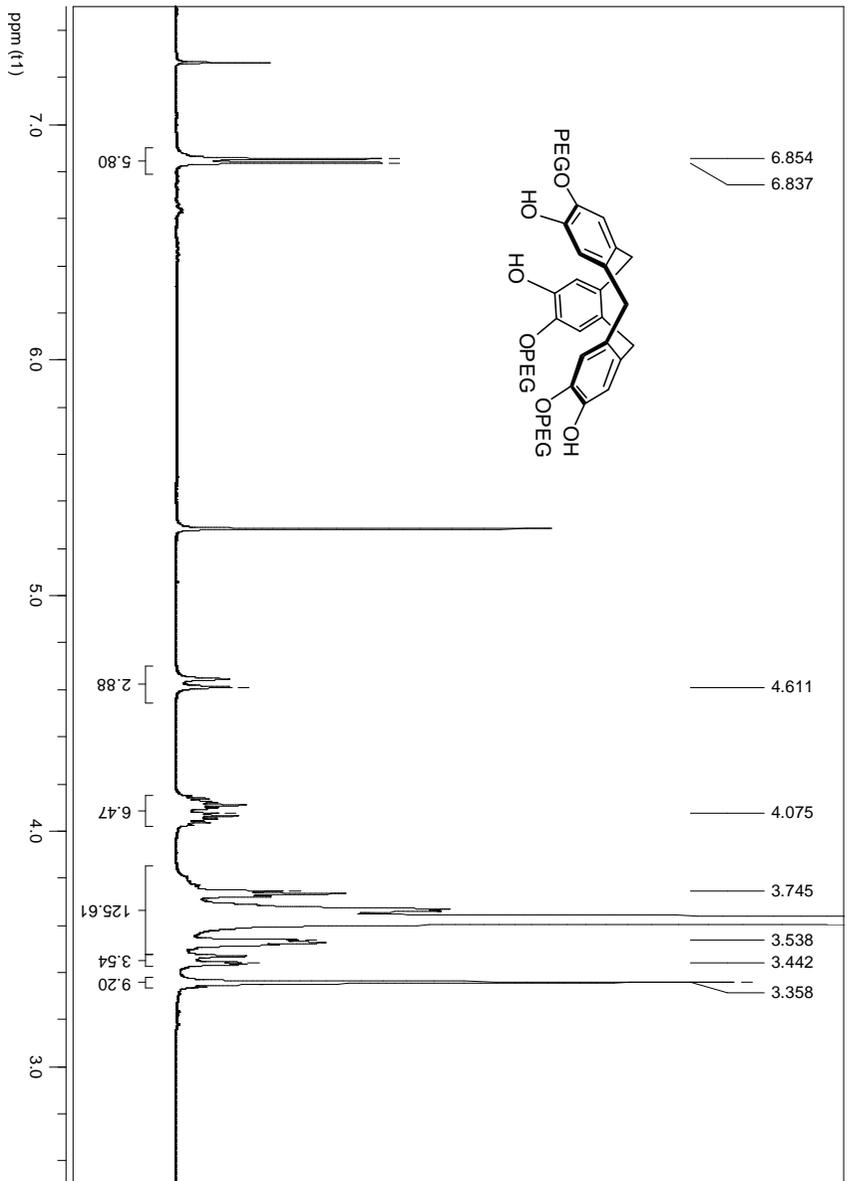
À une solution de **132** (0,2 g, 0,1 mmol) dans 1,5 mL de THF anhydre est rajouté lentement, à TA, sous atmosphère inerte, 0,7 mL d'une solution à 1M de PPh_2Li (0,68 mmol) fraîchement préparée. La réaction est laissée à température ambiante pendant 3 heures. Puis elle est quenchée à l'eau et neutralisée avec une solution d'HCl 1M. La phase organique est ensuite extraite au dichlorométhane, puis lavée par une solution de NaCl saturé. La solution organique est finalement séchée sur MgSO_4 et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 \rightarrow 90 : 10) permet l'obtention du composé **133** avec un rendement de 80 %.

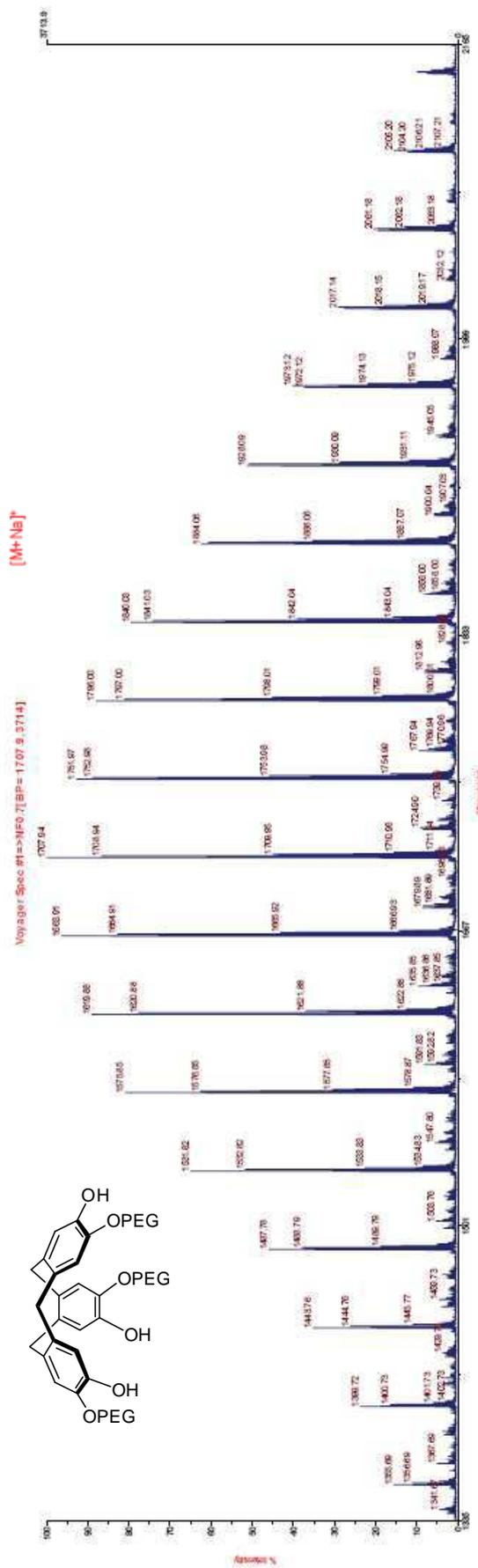
Huile transparente

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 3,36 (s, 9H), 3,44 (d, $J = 13,7$ Hz, 3H), 3,54 – 3,75 (m, 126H), 4,08 – 4,29 (m, 6H), 4,61 (d, $J = 13,7$ Hz, 3H), 6,84 (1s, 3H), 6,85 (1s, 3H)

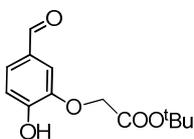
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ en ppm): 36,13, 58,98, 69,48, 70,37, 70,49, 71,86, 116,51, 117,64, 130,87, 134,41, 144,50, 146,14

MS (MALDI-TOF) m/z distribution centrée sur $1707,9 \pm 44$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)





Tert-butyl 2-(5-formyl-2-hydroxyphénoxy)acétate 134-1



134-1

À une suspension de NaH 60 % (2,9 g, 72,5 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL), est ajoutée lentement à 0 °C une solution de 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (5 g, 36 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL). Après 30 min d'agitation, une solution de bromoacétate de *tert*-butyle (5,4 mL, 36,2 mmol) dans du DMF anhydre (17 mL) est ajoutée. La réaction est remontée à température ambiante et laissée sous agitation pendant 18 heures. La réaction est quenchée à l'eau et une solution de HCl 1M est ajoutée jusqu'à atteindre pH 2. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 90 : 10 → 50 : 50) permet d'obtenir le produit **134-1** avec un rendement de 50 %.

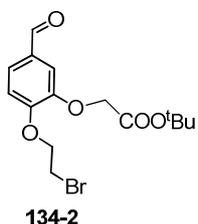
Solide jaune

RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO, δ en ppm): 1,45 (s, 9H), 4,59 (s, 2H), 7,07 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,51 (dd, *J* = 1,7 Hz, *J* = 8,2 Hz, 1H), 9,81 (s, 1H)

RMN ¹³C (100 MHz, (CD₃)₂CO, δ en ppm): 27,97, 68,96, 83,78, 115,42, 116,23, 128,80, 129,70, 146,71, 153,79, 169,27, 190,36

MS (ESI-TOF) *m/z*: 253,01 (100 %, [M+H]⁺)

Tert-butyl 2-(2-(2-bromoéthoxy)-5-formylphénoxy)acétate 134-2



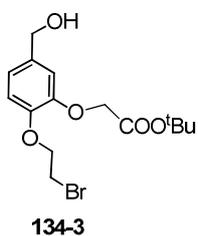
Le composé **134-1** (2 g, 7,9 mmol) est dissout dans du DMF (15 mL) puis K_2CO_3 (1,4 g, 10,1 mmol) et 1,2-dibromoéthane (2,8 mL, 32,3 mmol) sont ajoutés à la solution. La réaction est laissée sous agitation à 80 °C pendant 16 heures. La réaction est refroidie et de l'éther est ajouté à la solution, qui est ensuite lavée avec une solution d'HCl 1M. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / acétate d'éthyle 80 : 20 \rightarrow 50 : 50) permet d'obtenir le produit **134-2** avec un rendement de 70 %.

Solide jaune

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 1,47 (s, 9H), 3,69 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,41 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 4,62 (s, 2H), 6,99 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,32 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 7,47 (dd, $J = 1,7$ Hz, $J = 8,2$ Hz, 1H), 9,82 (s, 1H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 27,99, 28,24, 66,28, 68,94, 82,65, 112,22, 113,41, 126,91, 130,64, 148,27, 153,16, 167,27, 190,45

Tert-butyl 2-(2-(2-bromoéthoxy)-5-(hydroxyméthyl)phénoxy)acétate 134-3



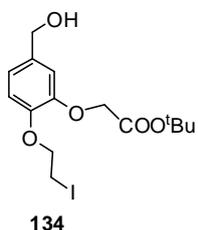
Le composé **134-2** (2 g, 5,6 mmol) est dissout dans du THF (19 mL). La solution est refroidie à 0 °C et NaBH₄ (0,25 g, 6,6 mmol) et du méthanol (2,3 mL) sont ajoutés. La réaction est laissée sous agitation pendant 30 minutes à 0 °C puis elle est quenchée avec une solution d'HCl 1M et extraite au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 95 : 5) permet d'obtenir le produit **134-3** avec un rendement de 90 %.

Huile transparente

RMN ¹H (400 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 1,48 (s, 9H), 3,66 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,36 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,59 (s, 2H), 4,60 (s, 2H), 6,88 (sl, 1H), 6,90 (sl, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 28,01, 29,10, 64,93, 66,68, 69,68, 82,27, 113,67, 116,00, 120,68, 135,19, 147,38, 148,40, 167,85

Tert-butyl 2-(5-(hydroxyméthyl)-2-(2-iodoéthoxy)phénoxy)acétate 134



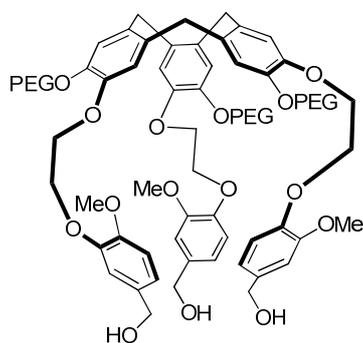
Le composé **134-3** (2 g, 4,9 mmol) est dissout dans de l'acétone (15 mL) puis du NaI (3 g, 20 mmol) est ajouté et le mélange est laissé sous agitation à 50 °C pendant 8 heures. L'acétone est évaporée puis le solide est dissout dans du dichlorométhane (100,00 mL) et lavé avec une solution saturée de thiosulfate de sodium (2 x 100 mL), de l'eau (100 mL) et avec une solution de NaCl saturée (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et concentrée à sec. Le produit final **134** est obtenu quantitativement sans purification.

Huile transparente

RMN ¹H (400 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 1,48 (s, 9H), 3,45 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,31 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,59 (s, 2H), 4,60 (s, 2H), 6,88 (sl, 1H), 6,92 (sl, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, (CDCl₃, δ en ppm): 1,28, 28,03, 64,93, 66,71, 70,53, 82,28, 113,65, 115,87, 120,68, 135,11, 147,20, 148,34, 167,85

Composé 135



135

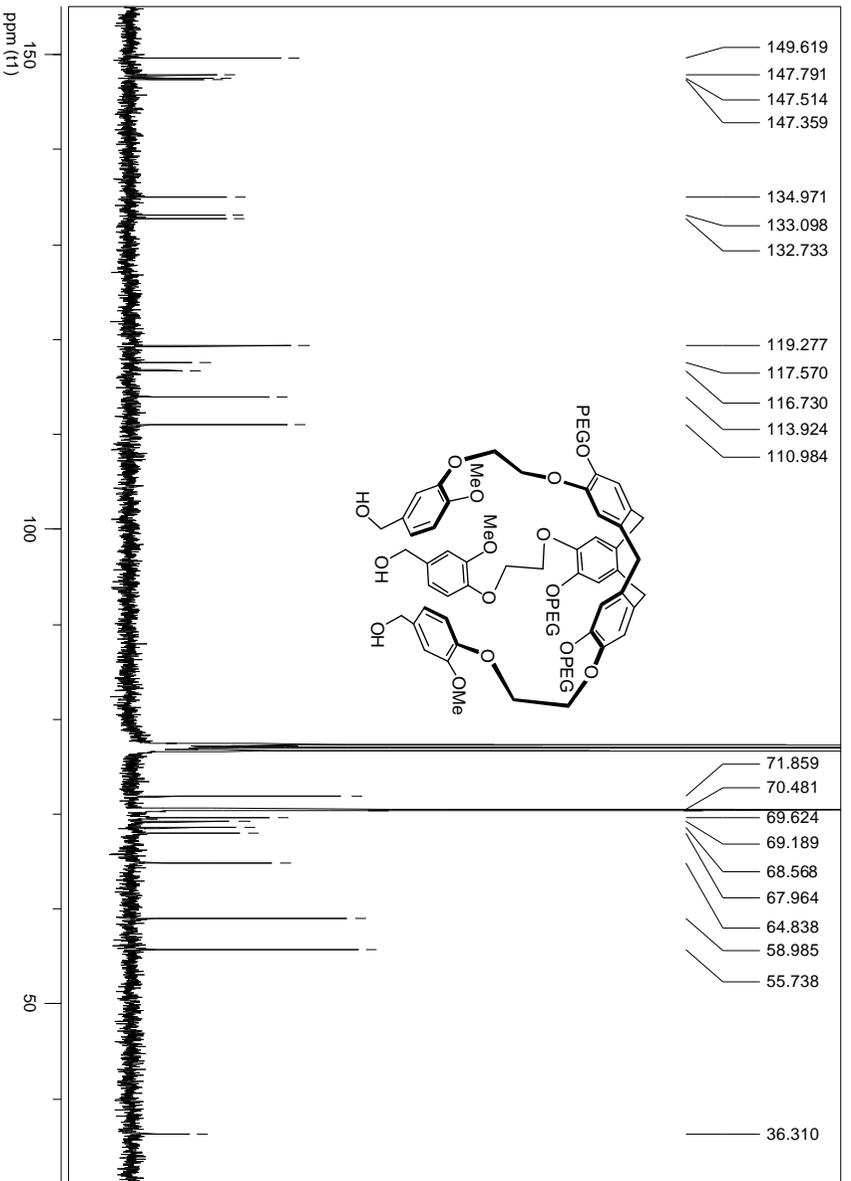
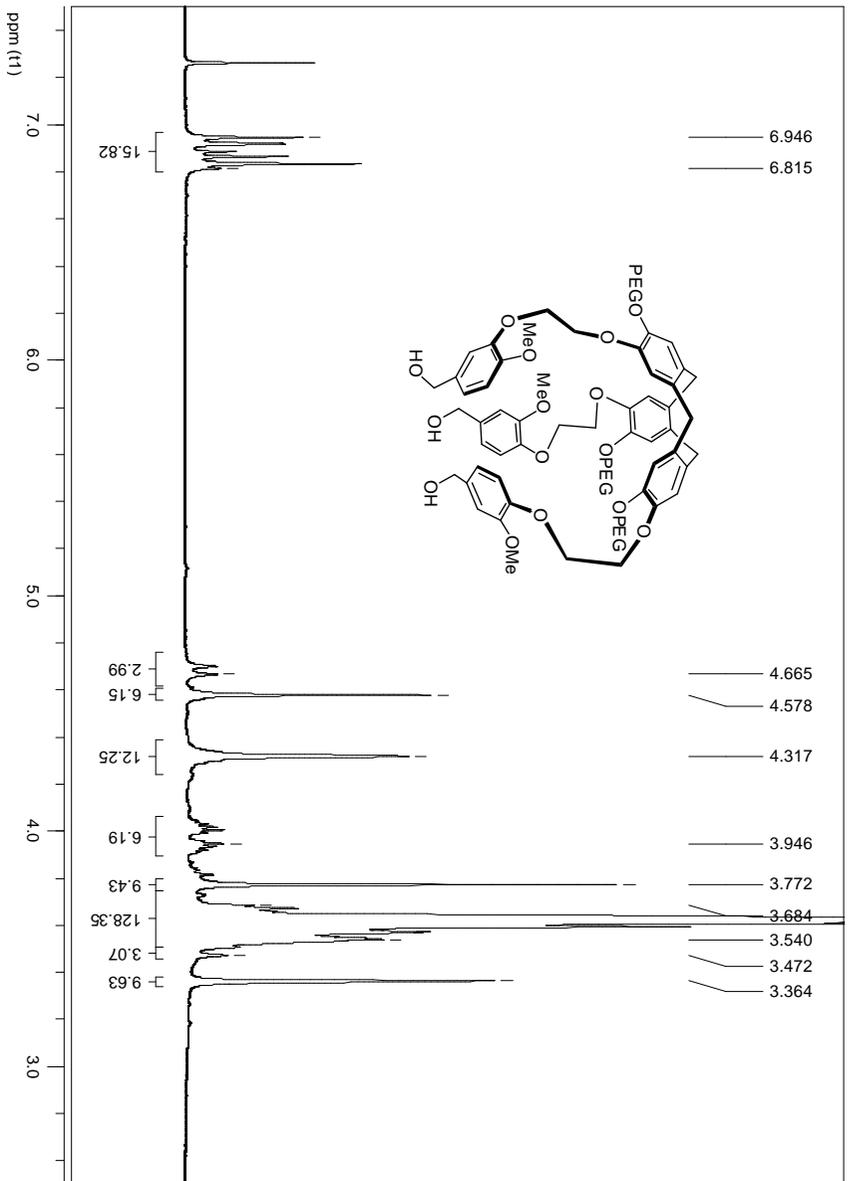
Le carbonate de césium (0,42 g, 1,3 mmol) est ajouté à une solution de **133** (0,40 g, 0,2 mmol,) dans 27 mL de DMF anhydre. Au bout d'une heure d'agitation à 70 °C, **19** (0,6 g, 1,9 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est laissé pendant 1 nuit à 70 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification sur colonne phase inverse (eau / acétonitrile 70 : 30 → 45 : 55) permet l'obtention du composé **135** avec un rendement de 20 %.

Huile jaune pâle

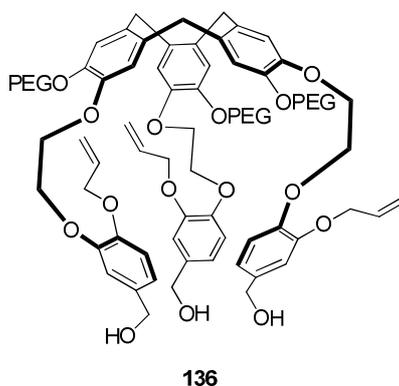
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,36 (s, 9H), 3,47 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H), 3,24 – 3,68 (m, 126H), 3,77 (s, 9H), 3,95 – 4,05 (m, 6H), 4,32 (sl, 12H), 4,58 (s, 6H), 4,67 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H), 6,82 – 6,95 (m, 15H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,31, 55,74, 58,99, 64,84, 67,96, 68,57, 69,19, 69,62, 70,48, 71,86, 110,98, 113,92, 116,73, 117,57, 119,28, 132,73, 133,10, 134,97, 147,36, 147,51, 147,79, 149,62

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 2293,2 ± 44 ([M+Na]⁺)



Composé 136



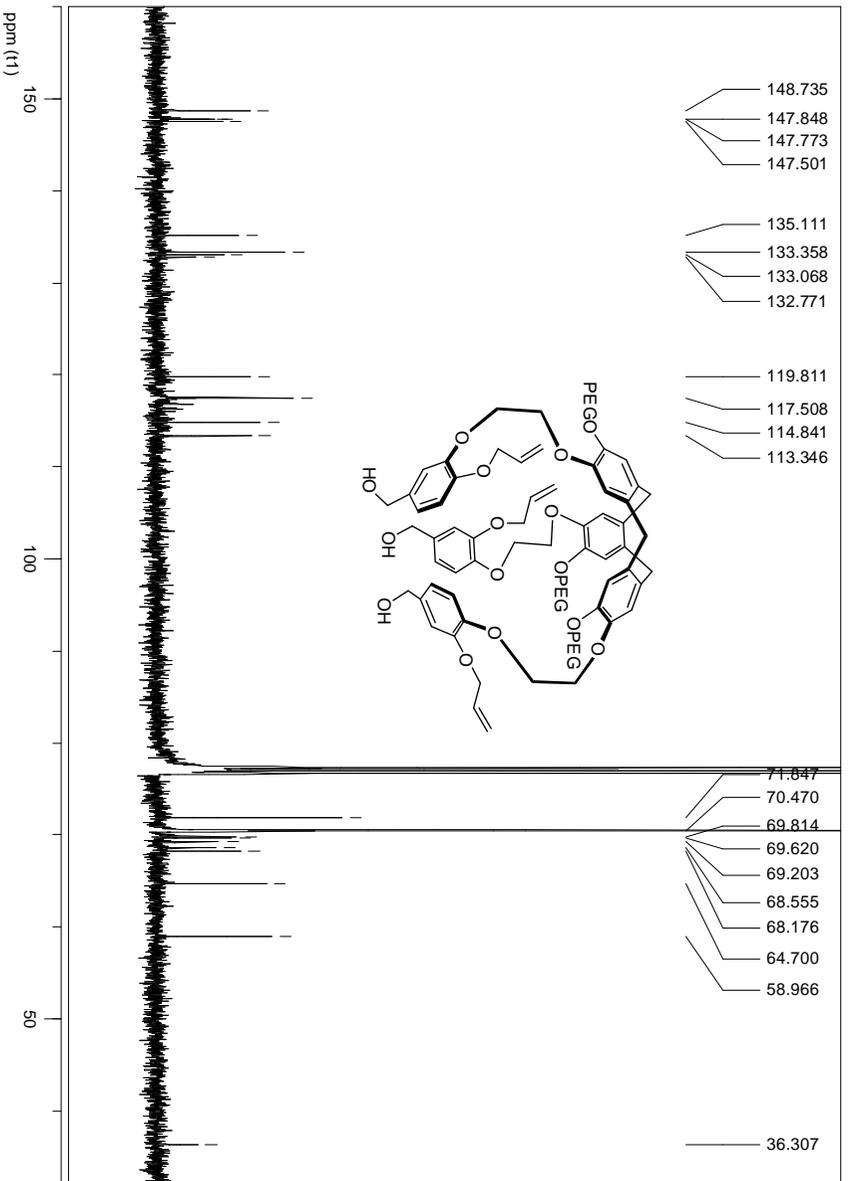
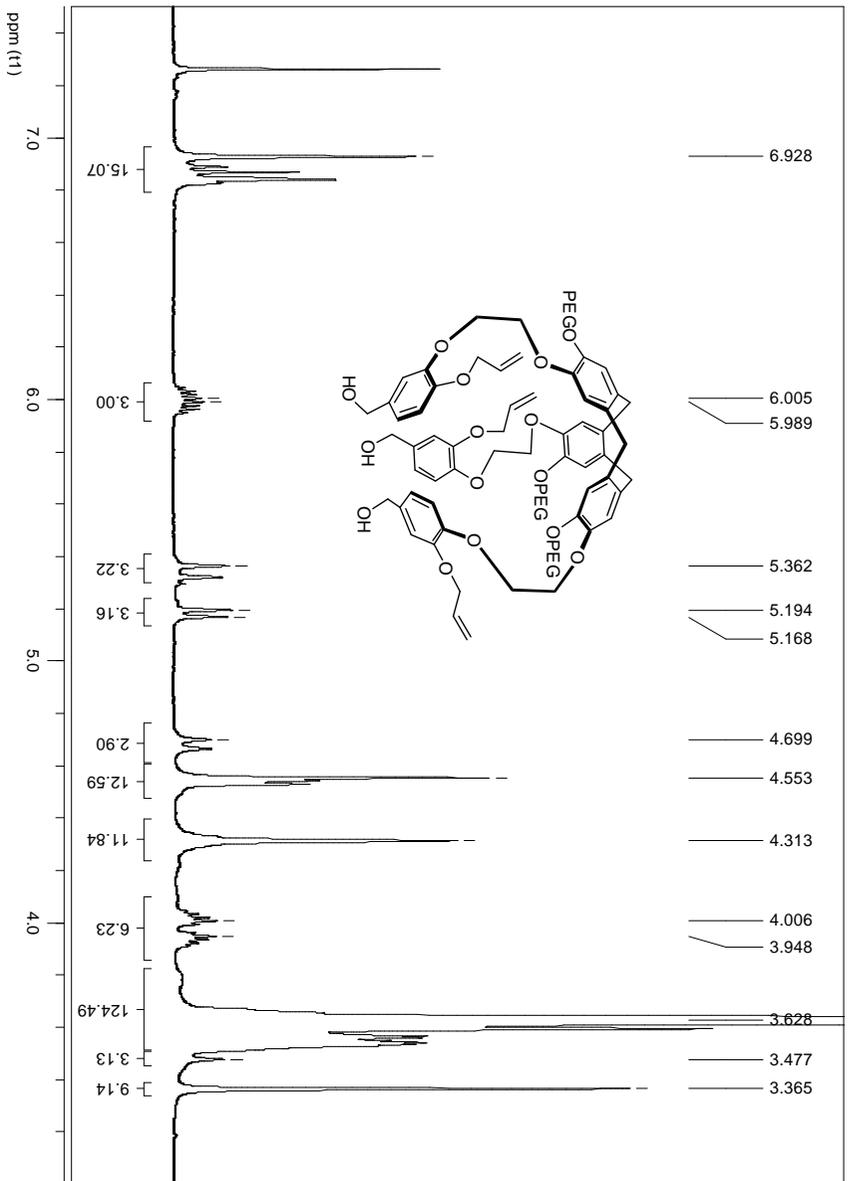
Le carbonate de césium (0,05 g, 0,15 mmol) est ajouté à une solution de **133** (0,05 g, 0,02 mmol) dans 3 mL de DMF anhydre. Au bout d'une heure d'agitation à 70 °C, **20** (0,07 g, 0,22 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est laissé pendant 1 nuit à 70 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Puis une purification sur colonne phase inverse (eau / acétonitrile 65 : 35 → 45 : 55) permet l'obtention du composé **136** avec un rendement de 35 %.

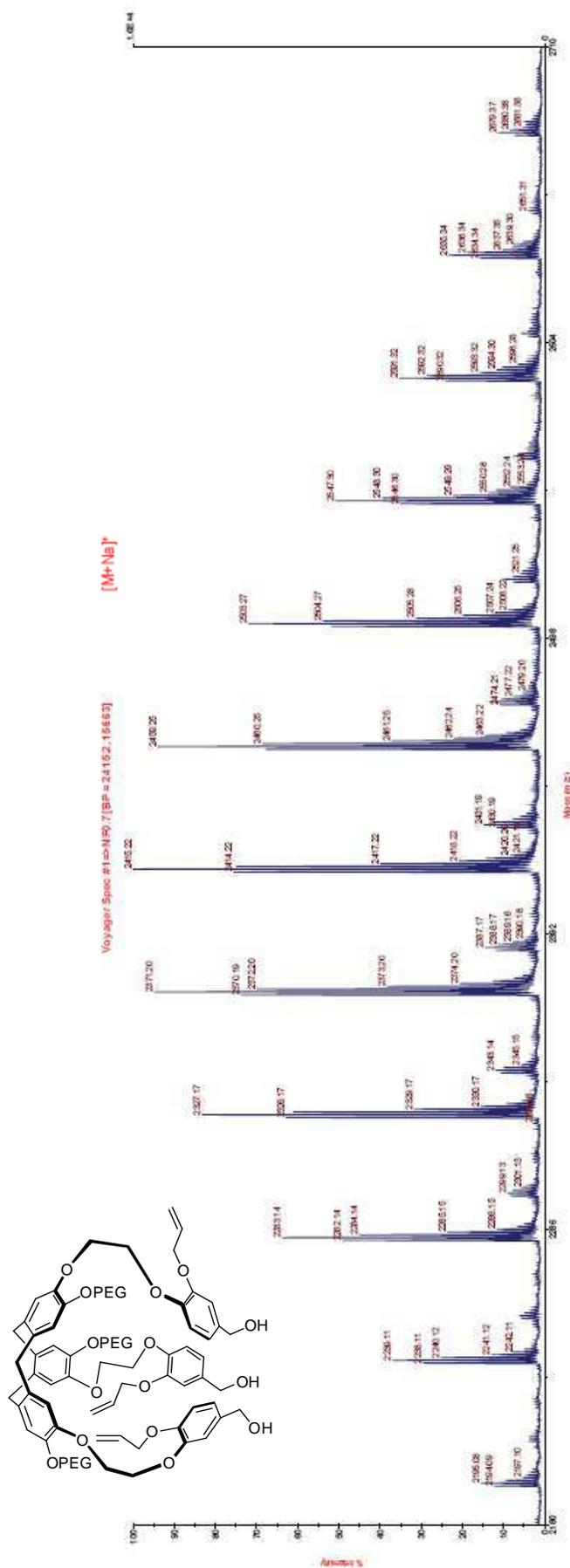
Huile jaune pâle

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,36 (s, 9H), 3,48 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 3,55 – 3,90 (m, 124H), 3,95 – 4,05 (m, 6H), 4,31 (sl, 12H), 4,53 (d, *J* = 5,3 Hz, 6H), 4,55 (s, 6H), 4,70 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 5,17 (d, *J* = 10,5 Hz, 3H), 5,36 (d, *J* = 17,3 Hz, 3H), 5,99 – 6,02 (m, 3H), 6,80 – 6,93 (m, 15H)

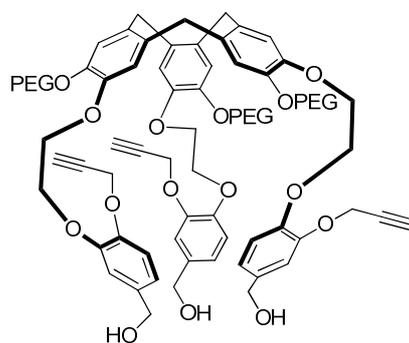
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,31, 58,97, 64,7, 68,18, 68,56, 69,20, 69,62, 69,81, 70,47, 71,85, 113,35, 114,84, 117,51, 119,81, 132,77, 133,10, 133,36, 135,11, 147,50, 147,77, 147,85, 148,74

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 2415,2 ± 44 ([M+Na]⁺)





Composé 137



137

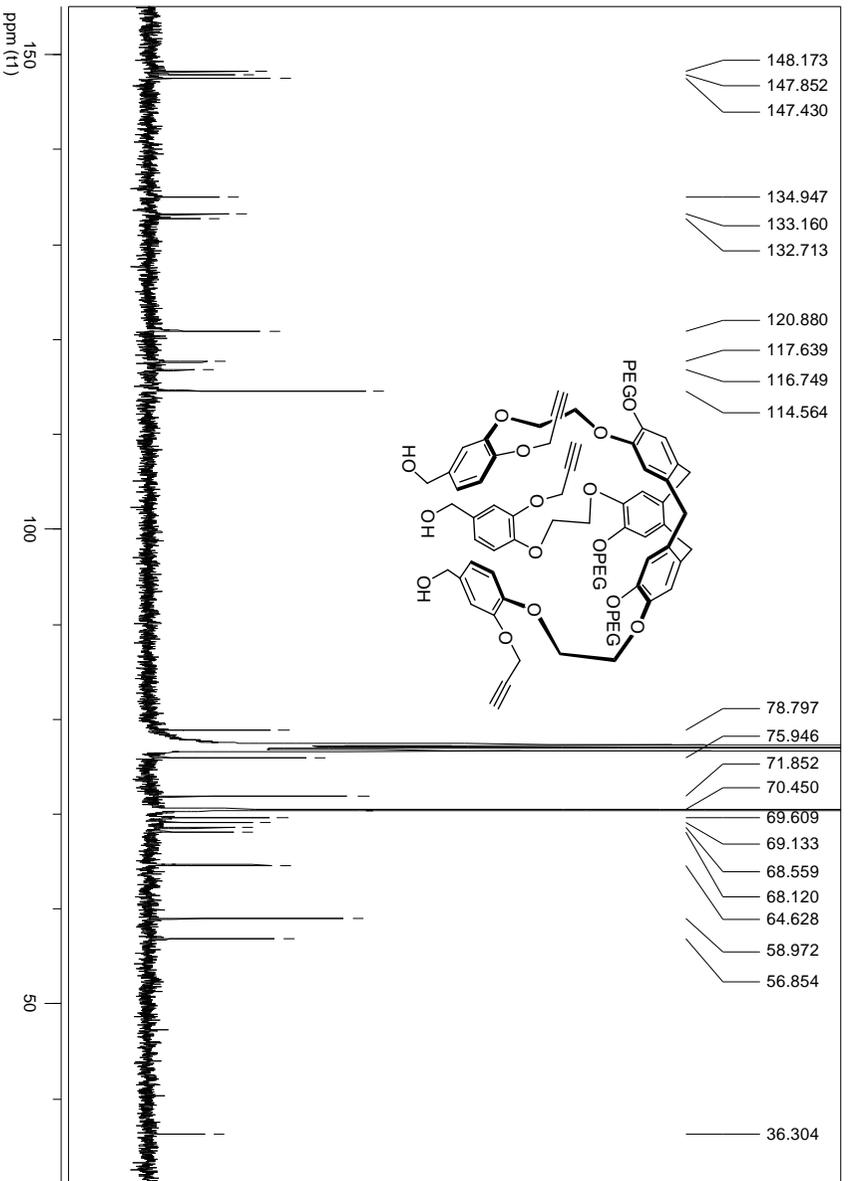
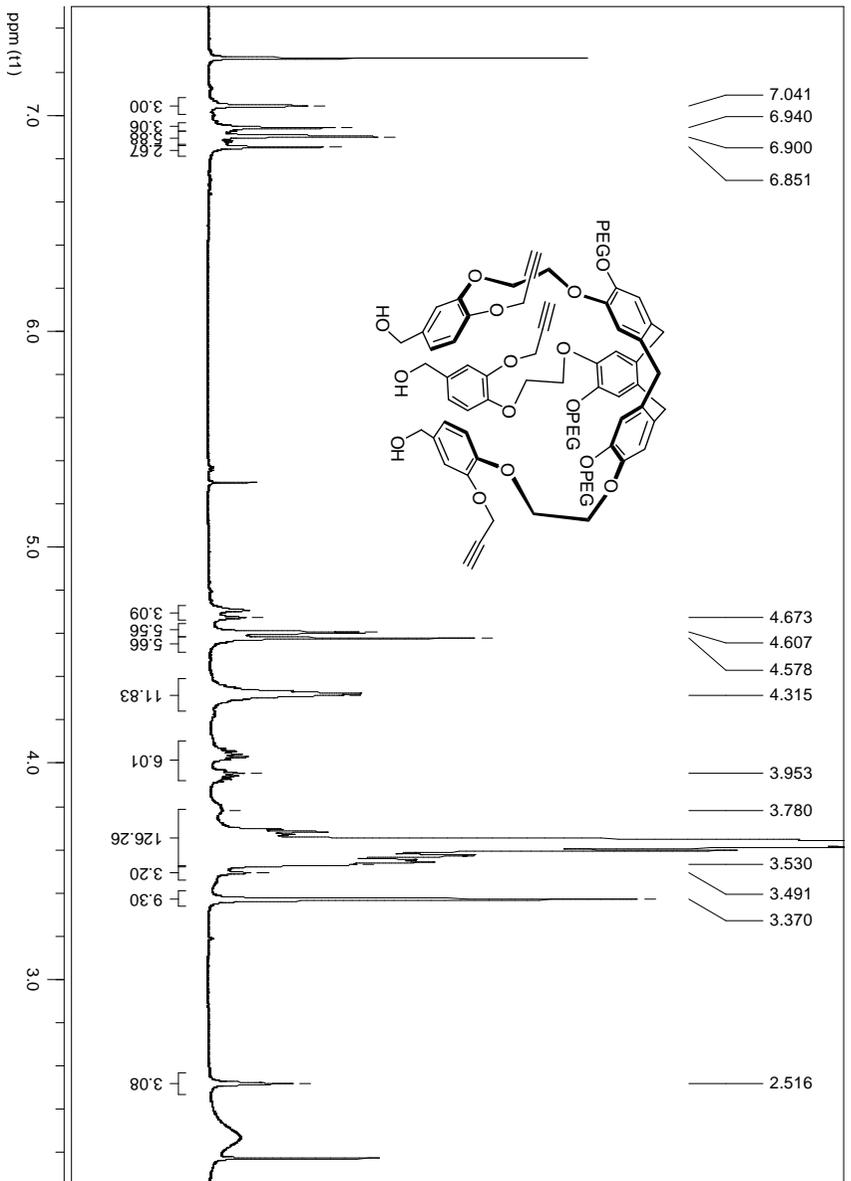
Le carbonate de césium (0,5 g, 1,6 mmol) est ajouté à une solution de **133** (0,5 g, 0,3 mmol) dans 30 mL de DMF anhydre. Au bout d'une heure d'agitation à 70 °C, **21** (0,8 g, 2,4 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est laissé pendant 1 nuit à 70 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Puis une purification sur colonne phase inverse (eau / acétonitrile 65 : 35 → 45 : 55) permet l'obtention du composé **137** avec un rendement de 20 %.

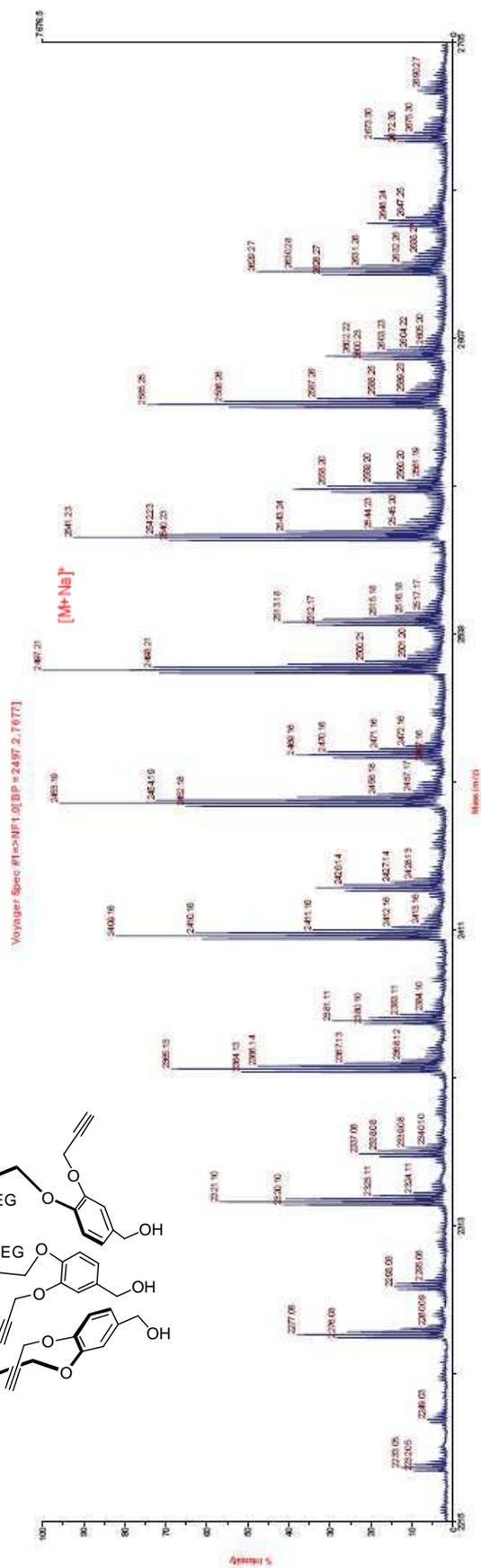
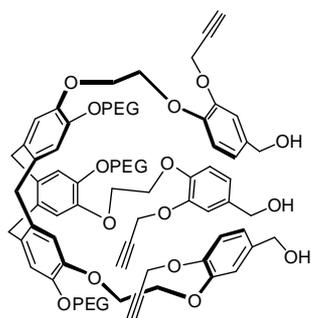
Huile jaune pâle

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,52 (t, *J* = 2,2 Hz, 3H), 3,37 (s, 9H), 3,49 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 3,53 – 3,78 (m, 126H), 3,95 – 4,05 (m, 6H), 4,31 – 4,40 (m, 12H), 4,58 (s, 6H), 4,60 (d, *J* = 2,2 Hz, 6H), 4,67 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 6,85 (sl, 3H), 6,9 (sl, 6H), 6,94 (sl, 3H), 7,04 (s, 3H)

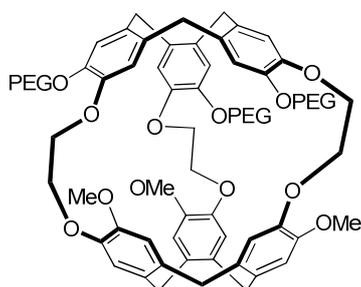
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,30, 56,85, 58,97, 64,63, 68,12, 68,56, 69,13, 69,61, 70,45, 71,85, 75,95, 78,80, 114,56, 116,75, 117,64, 120,88, 132,71, 133,16, 134,95, 147,43, 147,85, 148,17

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 2497,2 ± 44 ([M+Na]⁺)





Composé 139



139

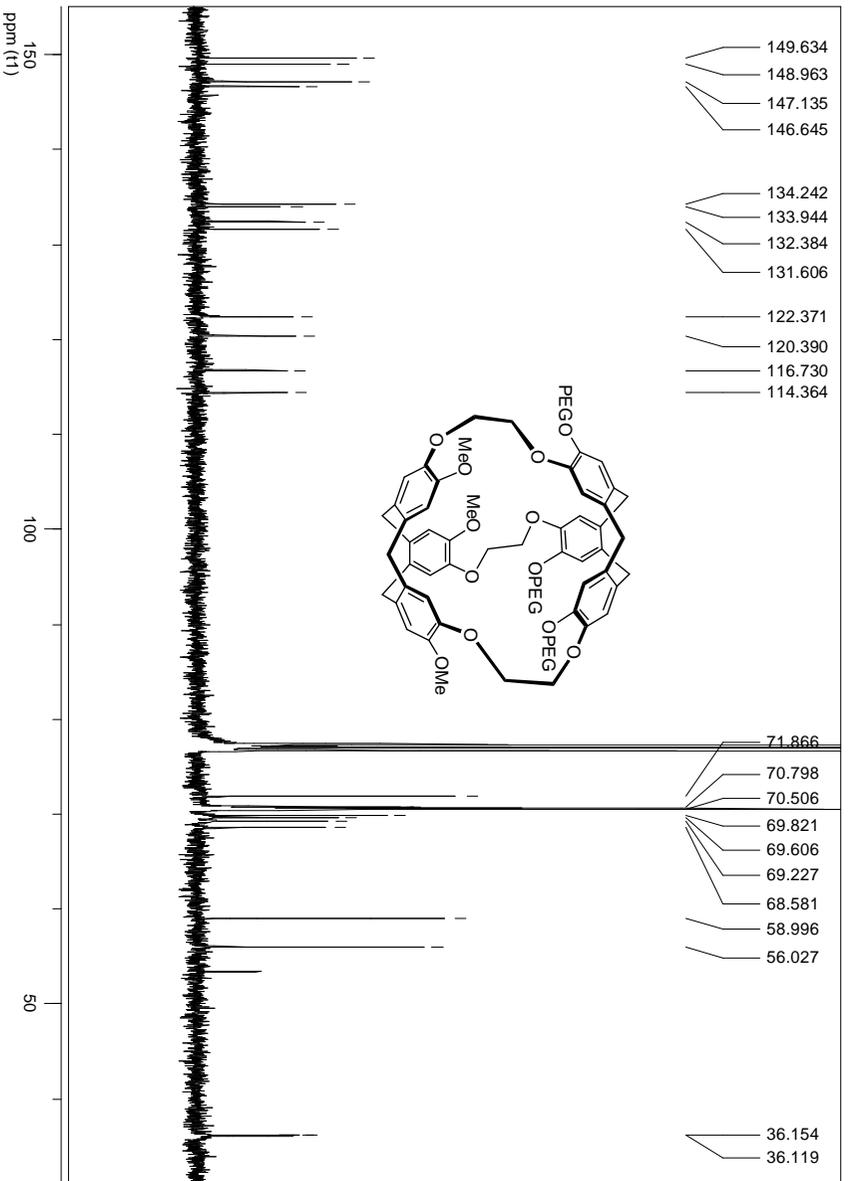
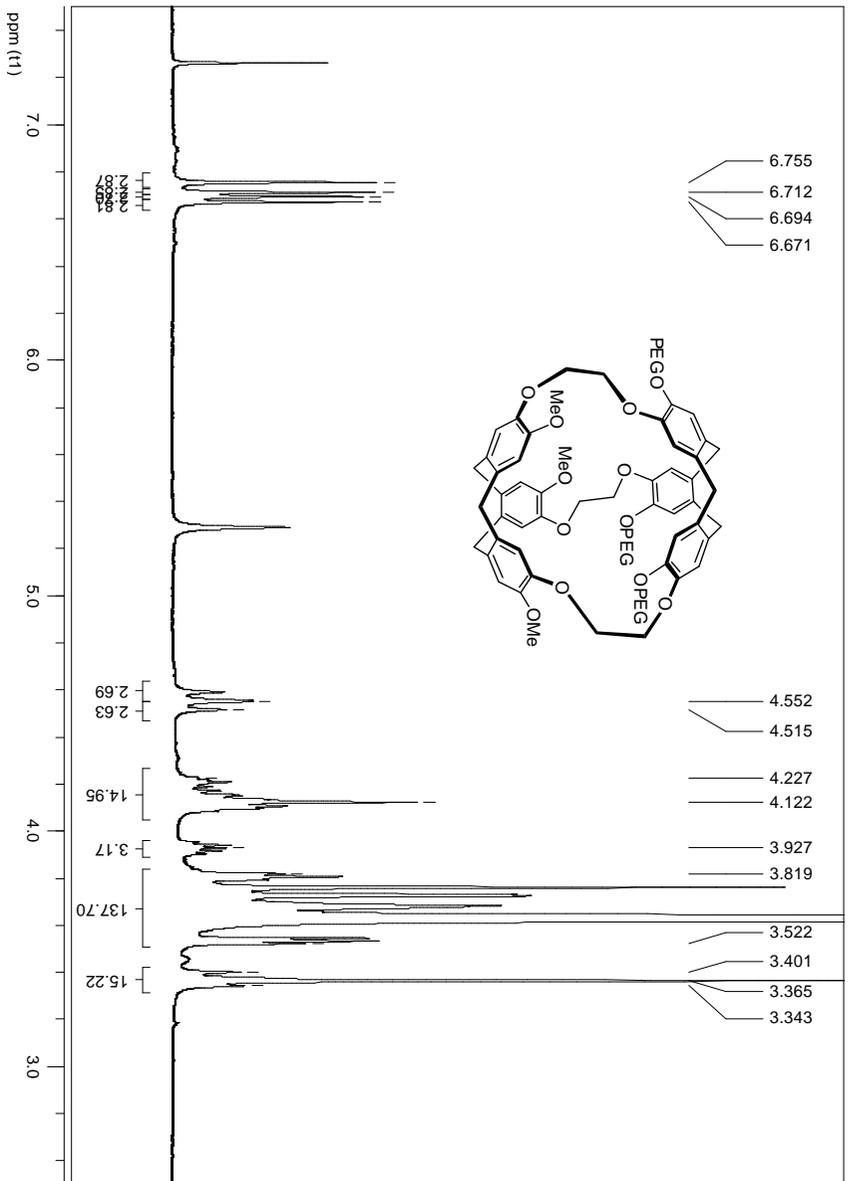
Au composé **135** (0,1 g, 0,04 mmol) dissout dans un minimum de dichlorométhane est ajouté 38 mL d'acide formique. Le mélange réactionnel est chauffé à 55 – 60 °C pendant 3 heures. L'acide formique est ensuite évaporé. Puis, une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 90 : 10) permet l'obtention du cryptophane **139** avec un rendement de 81 %.

Huile jaune pâle

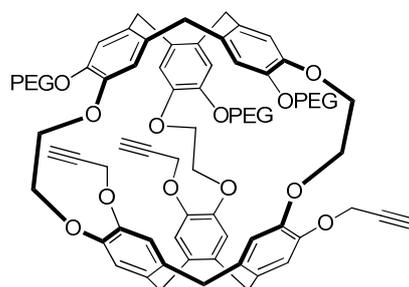
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,34 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 3,36 (s, 9H), 3,40 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 3,52 – 3,93 (m, 138H), 3,93 – 3,98 (m, 3H), 4,12 – 4,22 (m, 15H), 4,52 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 4,55 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 6,67 (s, 3H), 6,69 (s, 3H), 6,71 (s, 3H), 6,76 (s, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,12, 36,15, 56,03, 59,00, 68,58, 69,23, 69,61, 69,82, 70,51, 70,80, 71,87, 114,36, 116,73, 120,39, 122,37, 131,61, 132,38, 133,94, 134,24, 146,65, 147,14, 148,96, 149,63

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 2371,2 ± 44 ([M+Na]⁺)



Composé 141



141

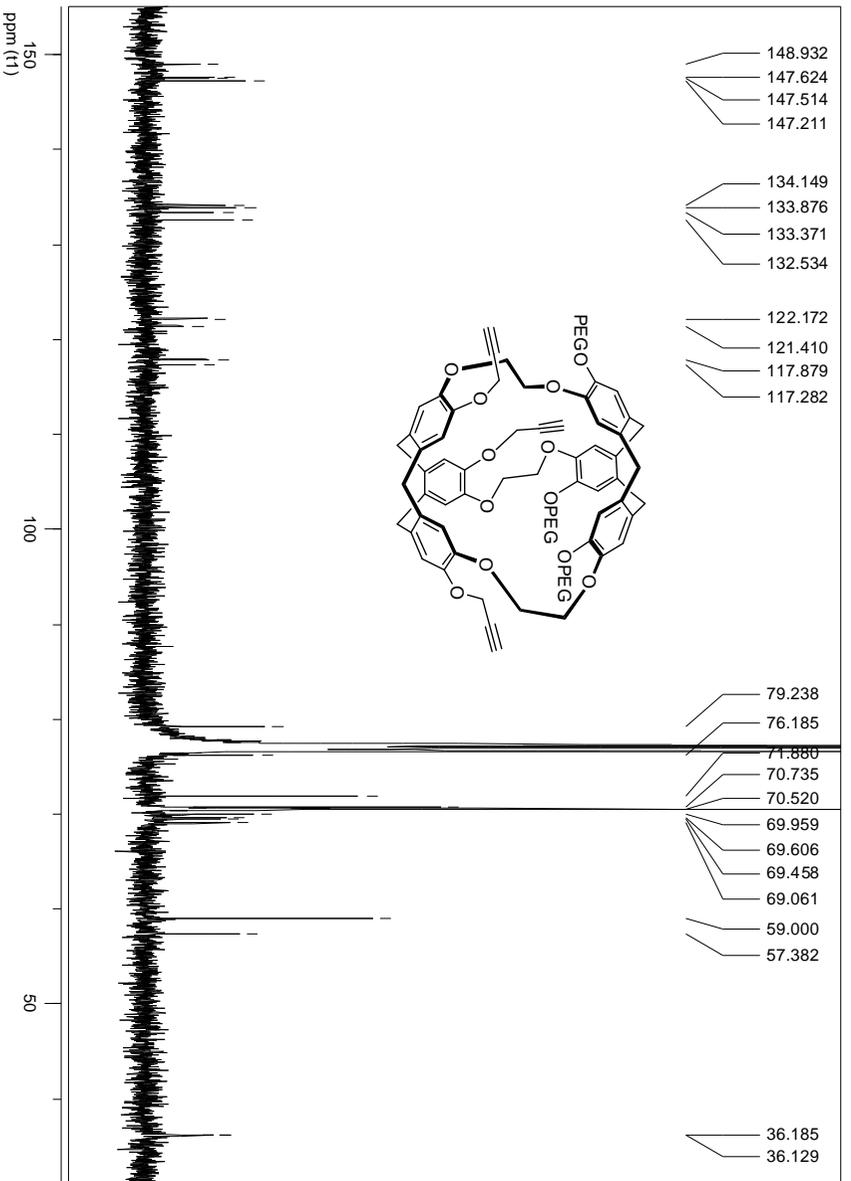
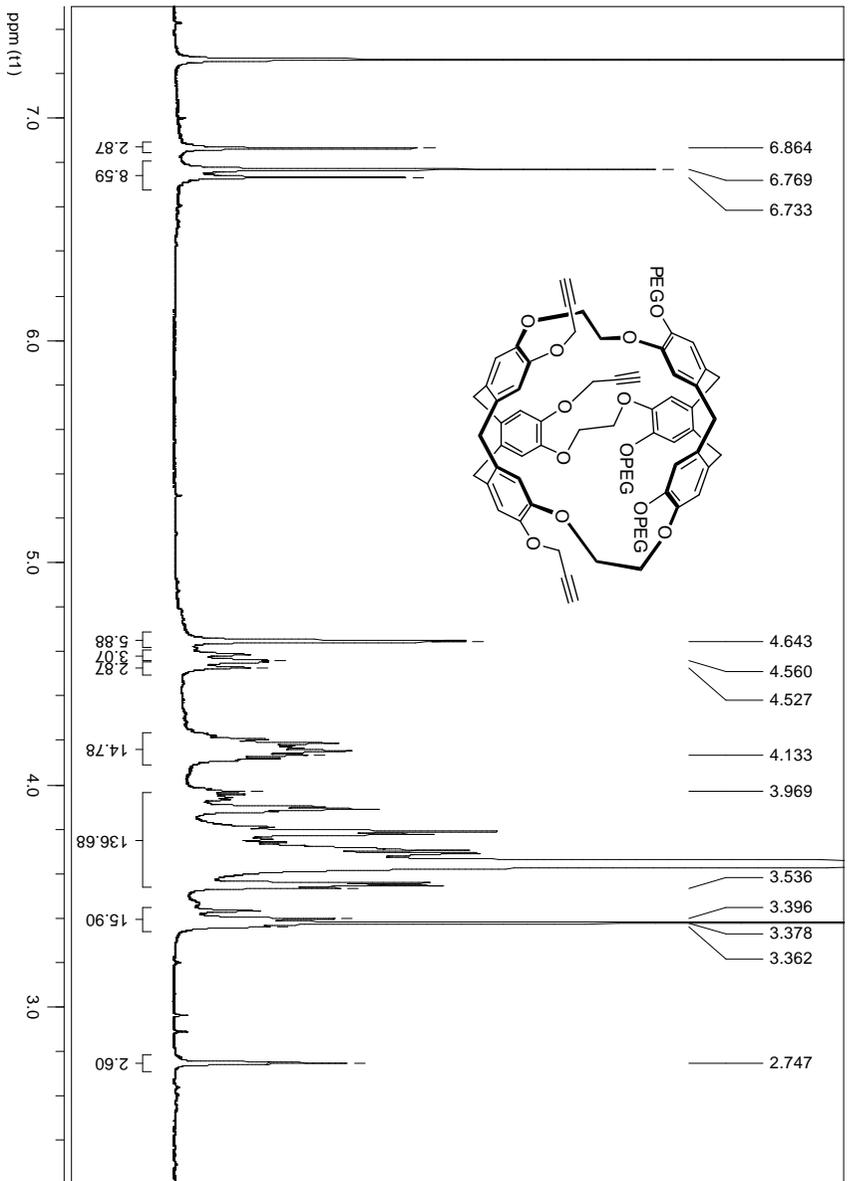
Au composé **137** (0,06 g, 0,02 mmol) dissout dans un minimum de dichlorométhane est ajouté 23 mL d'acide formique. Le mélange réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 9 heures. L'acide formique est ensuite évaporé. Puis une purification par chromatographie sur gel de silice (eau / acétonitrile 70 : 30 → 30 : 70) permet l'obtention du composé **141** avec un rendement de 32 %.

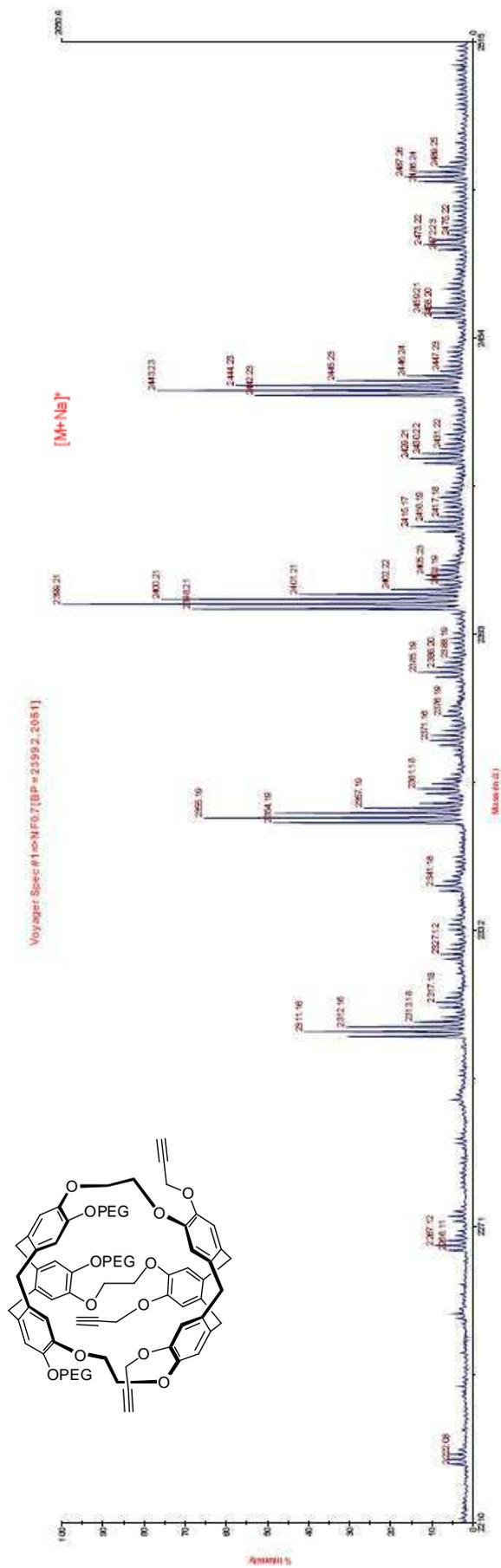
Huile jaune pâle

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,75 (t, *J* = 1,9 Hz, 3H), 3,36 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 3,38 (s, 9H), 3,40 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 3,57 – 3,97 (m, 136H), 4,13 – 4,25 (m, 15H), 4,53 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 4,56 (d, *J* = 13,3 Hz, 3H), 4,64 (d, *J* = 1,9 Hz, 6H), 6,73 (s, 3H), 6,77 (sl, 6H), 6,86 (s, 3H)

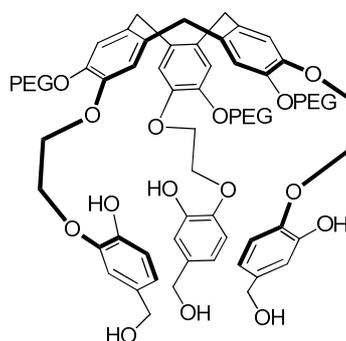
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 36,13, 36,19, 57,38, 59,00, 69,06, 69,46, 69,61, 69,96, 70,52, 70,74, 71,88, 76,19, 79,24, 117,28, 117,88, 121,41, 122,17, 132,53, 133,37, 133,88, 134,15, 147,21, 147,51, 147,62, 148,93

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 2399,21 ± 44 ([M+Na]⁺)





Composé 144



144

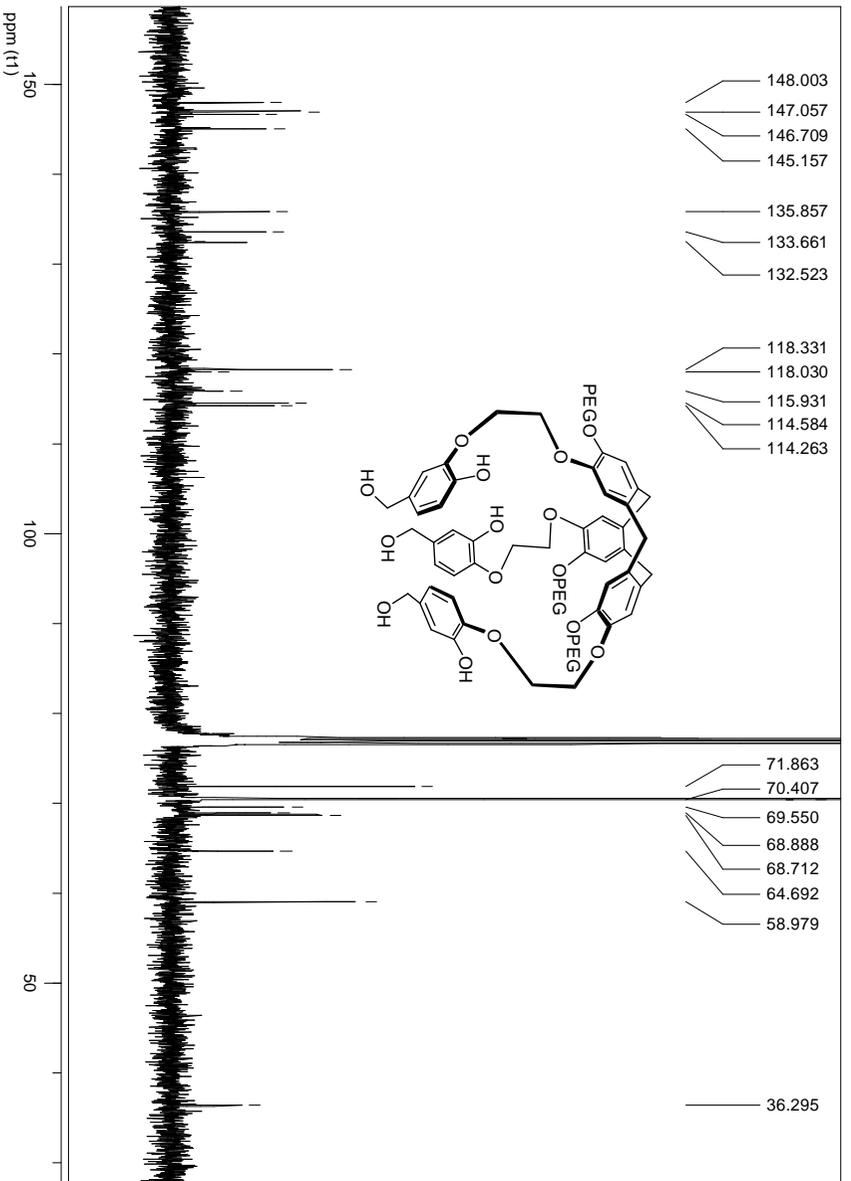
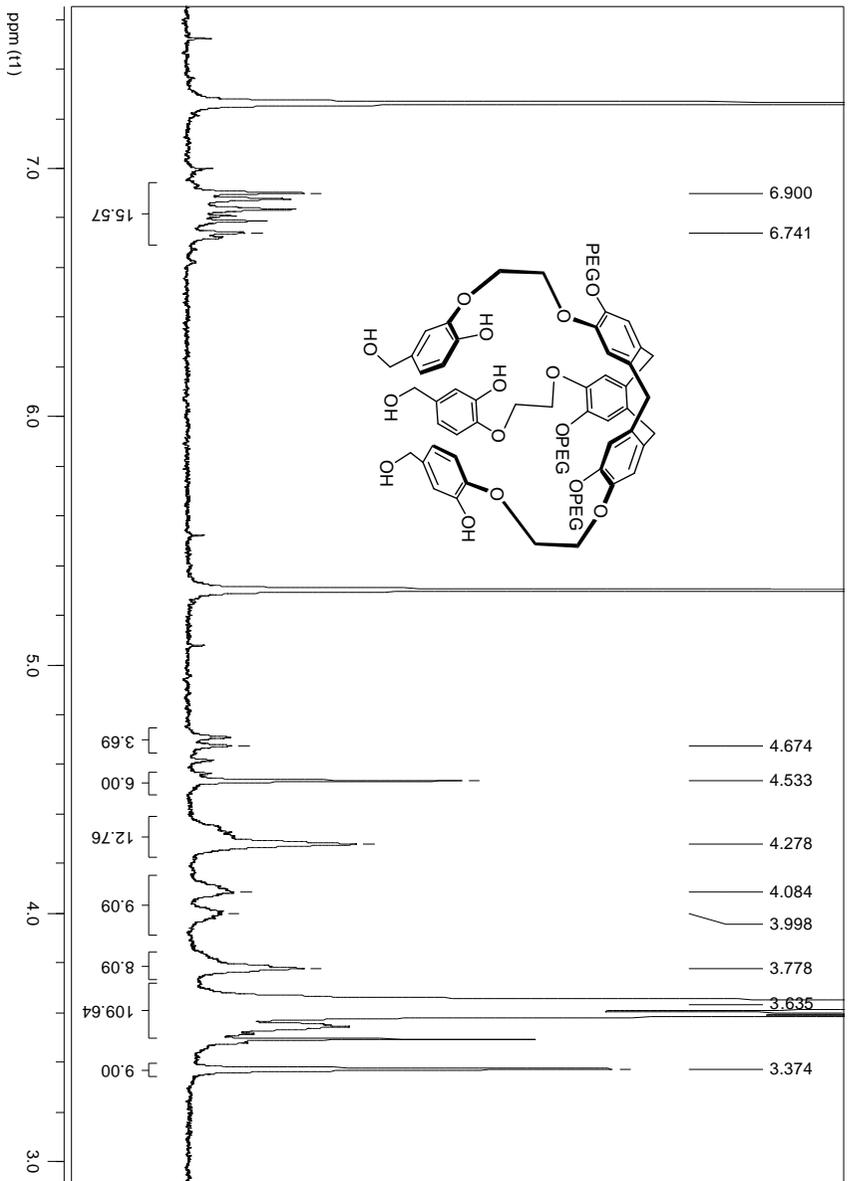
136 (25 mg, 0,01 mmol) est dissout dans un mélange de THF (0,17 mL) et d'eau (35 μ L). La triphénylphosphine (0,32 mg, 1,2 μ mol), l'acétate de palladium (0,09 mg, 0,4 μ mol) et la diéthylamine (35 μ L, 0,3 mmol) sont ensuite rajoutés à la solution. Le mélange est porté au reflux pendant 12 heures. Les solvants sont évaporés puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur $MgSO_4$ et le dichlorométhane est évaporé. Puis une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 \rightarrow 90 : 10) permet l'obtention du composé **144** avec un rendement de 45 %.

Huile jaune pâle

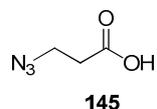
RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 3,37 (s, 9H), 3,50 – 3,70 (m, 110H), 3,78 – 3,87 (m, 8H), 3,99 – 4,08 (m, 9H), 4,20 – 4,37 (m, 12H), 4,53 (s, 6H), 4,67 (d, $J = 13,9$ Hz, 3H), 6,74 – 6,90 (m, 15H)

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ en ppm): 36,30, 58,98, 64,69, 68,71, 68,89, 69,55, 70,41, 71,86, 114,26, 114,58, 115,93, 118,03, 118,33, 132,52, 133,66, 135,86, 145,16, 146,71, 147,06, 148,00

MS (ESI-TOF) m/z : distribution centrée sur 1132 ± 22 ($[(M+2H)/2]^+$)



Acide azido-3 propanoïque 145



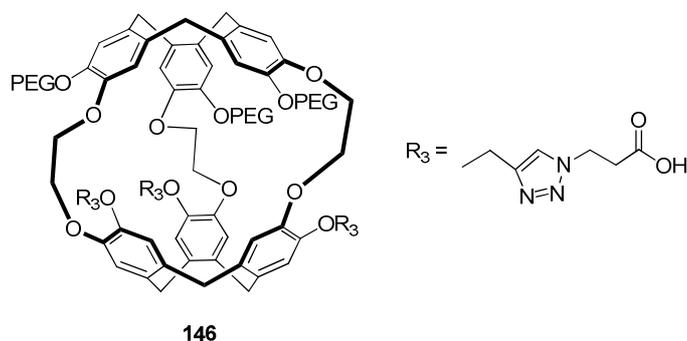
L'acide bromo-3 propionique (0,1, 0,7 mmol) est dissout dans de l'acétonitrile (1 mL) et l'azoture de sodium (0,09, 1,3 mmol) est ensuite ajouté à la solution. Le mélange est laissé sous agitation pendant 4 heures au reflux puis l'acétonitrile est évaporé et le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle (5 mL) et extrait avec HCl 0,1 M (3 x 4 mL), avec de l'eau (3 x 4 mL) et avec une solution de NaCl saturé (1 x 3 mL). La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et l'acide azido-3 propanoïque est obtenu avec un rendement de 55 %.

Huile transparente

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,65 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,59 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 34,39, 47,01, 178,04

Composé 146

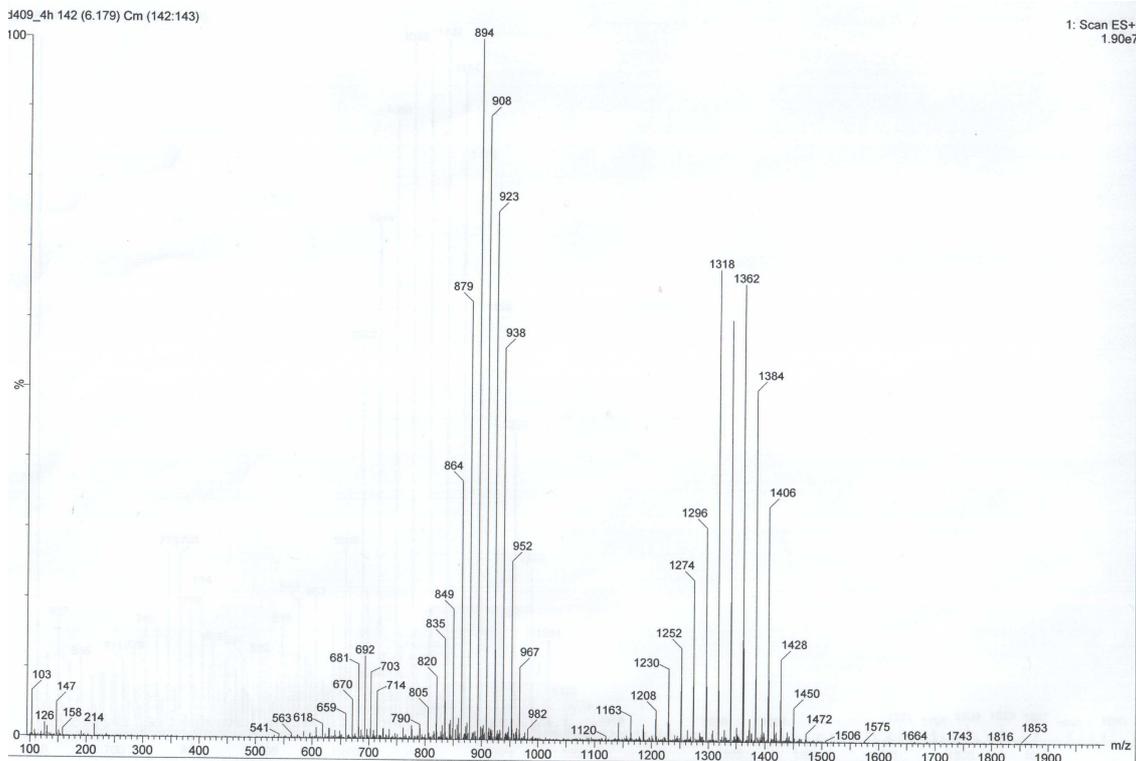
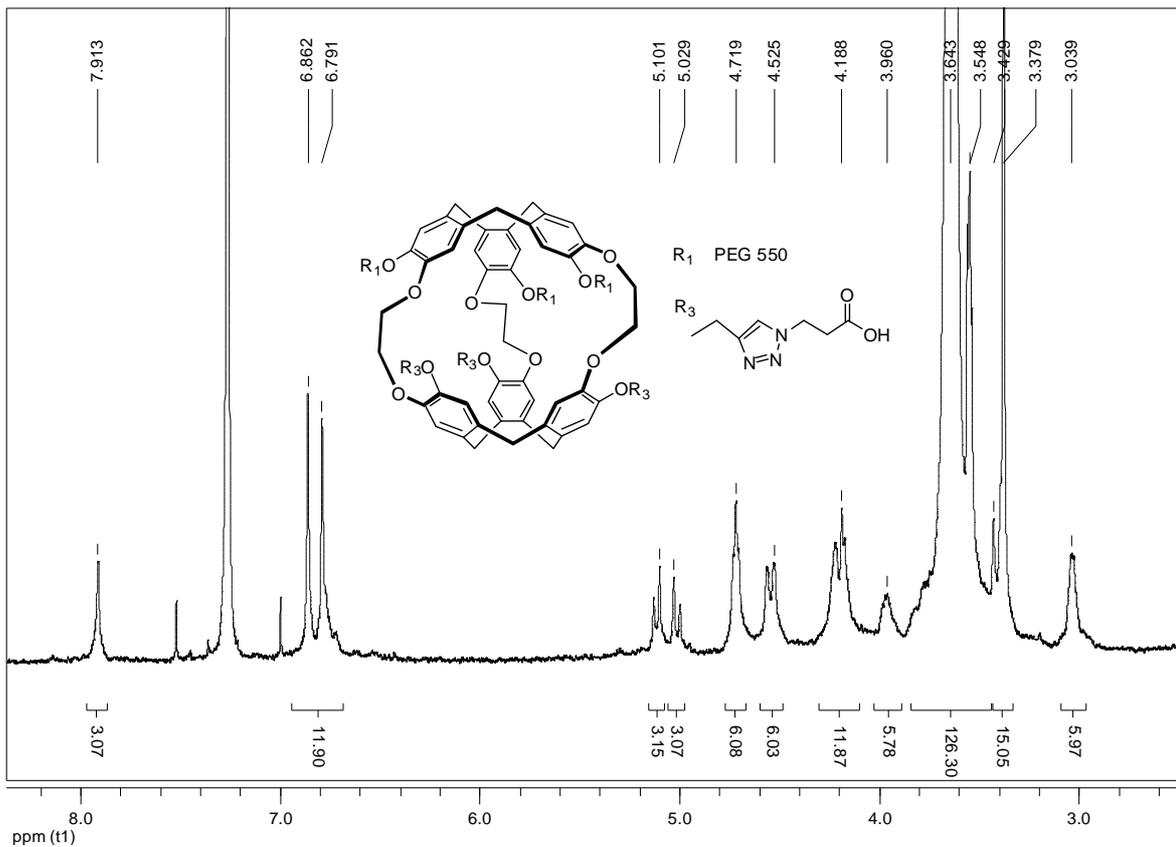


Le cryptophane **141** (5 mg, 2 μ mol) est dissout dans du DMSO anhydre (0,5 mL) à température ambiante. Le composé **145** (2 mg, 0,02 mmol) est ensuite ajouté, suivi de CuSO₄ (0,13 mg, 0,5 μ mol), de 2,6-lutidine (0,06 mg, 0,6 μ mol) et d'ascorbate de sodium (0,32 mg, 2 μ mol). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 22 heures puis le brut réactionnel est directement purifié par chromatographie en phase inverse (eau / acétonitrile 70 : 30 \rightarrow 60 : 40). Le cryptophane **146** est finalement obtenu avec un rendement de 65 %.

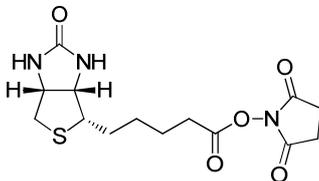
Huile jaune pâle

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,03 (sl, 6H), 3,38 (s, 15H), 3,55 – 3,64 (m, 126H), 3,96 – 3,99 (m, 6H), 4,15 – 4,25 (m, 12H), 4,50 – 4,55 (m, 6H), 4,70 – 4,72 (sl, 6H), 5,03 (d, $J = 12$ Hz, 3H), 5,10 (d, $J = 12$ Hz, 3H), 6,79 (sl, 6H), 6,86 (sl, 6H), 7,91 (s, 3H)

MS(ESI-TOF) m/z : distribution centrée sur 1362 ± 22 ($[(M+2H)/2]^+$) ou sur 894 ± 15 ($[(M+3H)/3]^+$)



2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thièno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanoate **147**



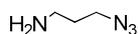
147

À une solution de D-biotine (0,2 g, 0,8 mmol) dans du DMF anhydre (8 mL) sont ajoutés du NHS (0,1 g, 0,8 mmol) et du DCC (0,2 g, 0,8 mmol). La suspension est laissée sous agitation pendant 24 heures à température ambiante puis elle est filtrée et concentrée sous vide pour obtenir le composé **147** attendu avec un rendement de 70 %.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 0,97 – 1,72 (m, 6H), 2,55 – 2,80 (m, 8H), 3,09 – 3,11 (m, 1H), 4,12 – 4,14 (m, 1H), 4,27 – 4,29 (m, 1H), 6,36 (s, 1H), 6,41 (s, 1H)

3-azidopropan-1-amine **148**



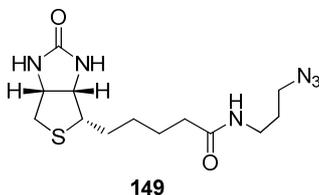
148

À une solution de 3-bromopropan-1-amine (0,5 g, 2,3 mmol) dans de l'eau (1,6 mL) est ajoutée lentement une solution de NaN₃ (0,5 g, 7,9 mmol) dans de l'eau (2,4 mL). Le mélange est agité au reflux pendant une nuit. Une fois la solution refroidie, environ 2/3 de l'eau sont évaporés et le résidu restant est dilué dans de l'éther (8 mL). Le mélange biphasique est refroidi à 0 °C et des pastilles de KOH (0,63 g) sont ajoutées lentement. Les phases organiques et aqueuses sont séparées et la phase aqueuse est extraite à l'éther (2 x 4,5 mL). Toutes les phases organiques sont finalement rassemblées, séchées sur MgSO₄ et concentrées pour obtenir le composé **148** avec un rendement de 70 %.

Huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,74 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 3,40 (m, 2H)

N-(3-azidopropyl)-5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide **149**



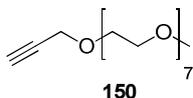
À une solution de **147** (0,1 g, 0,3 mmol) et de TEA (0,2 mL, 1,5 mmol) dans du DMF (6 mL) est ajouté **148** (0,1 g, 1 mmol) et la réaction est laissée sous agitation à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 20 heures. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat est concentré à sec. Le résidu obtenu est finalement purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 90 : 10) pour obtenir le composé **149** avec un rendement de 50 %.

Poudre blanche

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ en ppm): 1,40 – 1,77 (m, 10H), 2,21 – 2,25 (m, 2H), 2,70 – 2,90 (m, 2H), 3,18 – 3,37 (m, 3H), 4,32 – 4,40 (m, 1H), 4,50 – 4,55 (m, 1H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 326,90 (100 %, [M+H]⁺)

2,5,8,11,14,17,20,23-octaohexacos-25-yne **150**

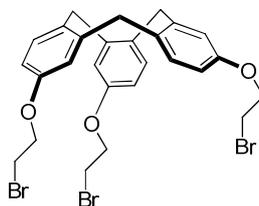


Le PEG 350 monométhyl éther (1 g, 3 mmol) est ajouté à une suspension de NaH 60 % (0,4 g, 10,4 mmol) dans du DMF anhydre (5 mL) à 0 °C et sous atmosphère inerte. Le mélange est laissé sous agitation pendant 5 minutes à 0 °C et 30 minutes à température ambiante. Le bromure de propargyle (5,1 mL, 58 mmol) est ensuite ajouté à 0 °C et le mélange est laissé sous agitation, à TA et sous atmosphère inerte pendant 12 heures. Le DMF est évaporé puis le résidu est repris dans du dichlorométhane et extrait à l'eau et avec une solution de NaCl saturé. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 100 : 0 → 90 : 10) permet l'obtention du composé **150** de manière quantitative.

Huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,42 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,66 (m, 28), 4,19 (d, *J* = 2,3 Hz, 2H)

2,7,12-tris(2-bromoéthoxy)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g][9]annulène 158



158

Le carbonate de césium (2,1 g, 6,5 mmol) est ajouté à une solution de CTV **10** (0,2 g, 0,6 mmol) dans du DMF anhydre (2,5 mL) et le mélange est laissé pendant 1 heure à 80 °C. Le dibromoéthane (5,9 g, 31,4 mmol) ainsi que 10 équivalents supplémentaires de base sont ajoutés à la solution et le mélange est laissé pendant 4 heures à 80 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / dichlorométhane 50 : 50 → 0 : 100) permet l'obtention du composé **158** avec un rendement de 50 %.

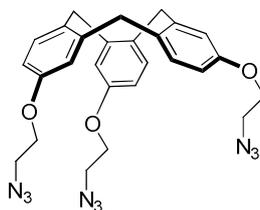
Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,58 (t, *J* = 6,3 Hz, 6H), 3,63 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 4,22 (t, *J* = 6,3 Hz, 6H), 4,74 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 6,65 (dd, *J*₁ = 8,4 Hz, *J*₂ = 2,7 Hz, 3H), 6,90 (d, *J* = 2,7 Hz, 3H), 7,29 (d, *J* = 8,4 Hz, 3H)

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 29,08, 36,45, 67,79, 112,88, 116,40, 131,09, 132,18, 141,13, 156,274

MS(ESI-TOF) *m/z*: 636,90 (100 %, [M+H]⁺)

2,7,12-tris(2-azidoéthoxy)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[*a,d,g*][9]annulène 159



159

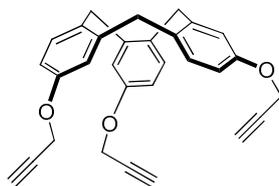
Un mélange de **158** (160 mg, 0,3 mmol) et d'azoture de sodium (200 mg, 3,1 mmol) dans du DMF (5 mL) est chauffé à 80 °C pendant 15 heures. Le DMF est évaporé et le mélange réactionnel est repris avec du DCM puis la phase organique est lavée à l'eau et séchée sur MgSO₄. Le composé **159** est alors obtenu quantitativement sans purification.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,52 – 3,55 (m, 6H), 3,63 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 4,05 – 4,15 (m, 6H), 4,74 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 6,65 (dd, *J*₁ = 8,5 Hz, *J*₂ = 2,6 Hz, 3H), 6,90 (d, *J* = 2,6 Hz, 3H), 7,29 (d, *J* = 8,5 Hz, 3H)

HRMS-ESI (*m/z*) calculé pour C₂₇H₂₇N₉O₃Na, 548,2151 trouvé 548,2135 ([M-H]⁻)

2,7,12-tris(prop-2-yn-1-yloxy)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[*a,d,g*][9]annulène 160



160

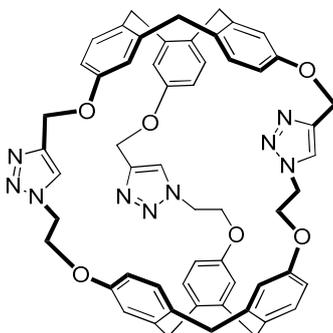
Le carbonate de césium (3 g, 9,4 mmol) est ajouté à une solution de CTV **10** (0,3 g, 0,9 mmol) dans du DMF anhydre (5 mL) et le mélange est laissé pendant 1 heure à 80 °C. Le bromure de propargyle (3 mL, 22,6 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est laissé pendant 4 heures à 80 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La phase organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (cyclohexane / dichlorométhane 50 : 50 → 0 : 100) permet l'obtention du composé **160** avec un rendement de 30 %.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,50 (t, *J* = 2,4 Hz, 3H), 3,63 (d, *J* = 13,5 Hz, 3H), 4,62 (d, *J* = 2,4 Hz, 6H), 4,75 (d, *J* = 13,5 Hz, 3H), 6,70 (dd, *J*₁ = 8,5 Hz, *J*₂ = 2,7 Hz, 3H), 6,96 (d, *J* = 2,7 Hz, 3H), 7,29 (d, *J* = 8,5 Hz, 3H)

MS (ESI-TOF) *m/z*: 433,10 (100 %, [M+H]⁺)

Composé 161



161

Avec cuivre

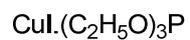
Un mélange de CTV **159** (0,04 g, 0,07 mmol) et CTV **160** (0,03 g, 0,07 mmol), diisopropyléthylamine (DIPEA, 0,09 g, 0,7 mmol) et $\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{P}$ (5 mg, 0,01 mmol) dans du toluène anhydre (10 mL) est laissé pendant 24 heures au reflux du toluène. La réaction est ensuite refroidie à température ambiante puis filtrée sur fritté. Un solide blanc est récupéré et séché sous vide.

Sans cuivre

Les CTV **159** (0,02 g, 0,04 mmol) et **160** (0,015 g, 0,04 mmol) ainsi que le fullerène (0,03 g, 0,04 mmol) sont mis en solution dans du toluène (5 mL) et le mélange est chauffé à reflux pendant 20 heures. La réaction est ensuite refroidie à température ambiante puis filtrée sur un fritté. Le fullerène reste collé sur les parois du ballon. Un solide noir est récupéré et séché sous vide.

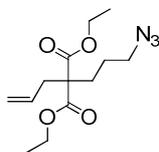
MS (ESI-TOF) m/z : 958,60 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Composé 162



L'iodure de cuivre (CuI, 3,8 g, 20 mmol) et le triéthylphosphite (3,3 g, 20 mmol) sont mis en solution dans du toluène anhydre (40 mL). Le mélange est laissé toute la nuit sous atmosphère inerte à 80 °C. Au bout de 8 heures de réaction, le ballon est refroidi à température ambiante puis le mélange est filtré sur Céelite® et le solvant est ensuite évaporé. Une fois le produit séché sous vide, il est recristallisé dans 2,5 mL d'éther.

Diéthyl 2-allyl-2-(3-azidopropyl)malonate **163**



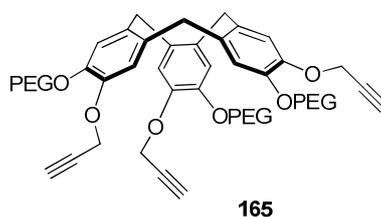
163

Un mélange de **102** (0,98 g, 4,5 mmol) et d'azoture de sodium (2,5 g, 39 mmol) dans du DMF (5 mL) est chauffé à 80 °C pendant 1 heure. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Le produit final **163** est obtenu quantitativement.

Huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H), 1,51 (m, 2H), 1,92 (m, 2H), 2,64 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,27 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 4,18 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 5,11 (m, 2H), 5,64 (m, 1H)

Composé 165

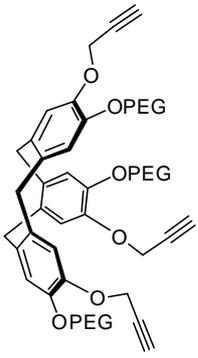
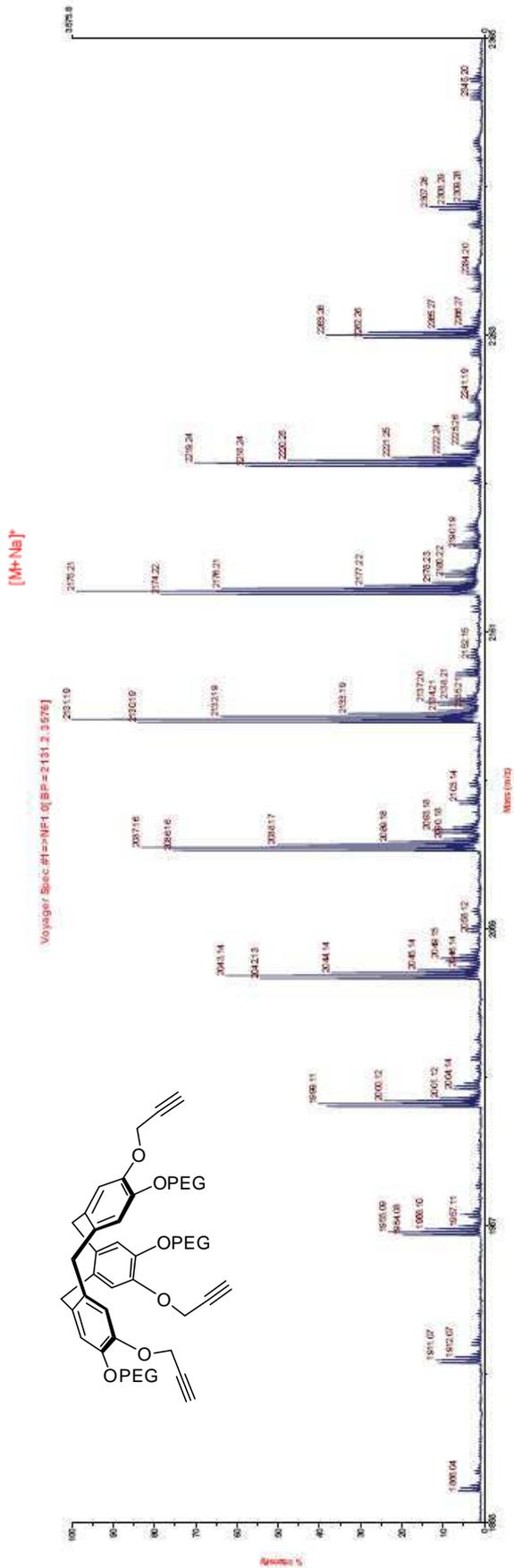


Le carbonate de césium (10 éq) est ajouté à une solution de **133** (0,02 g, 0,06 mmol) dans du DMF anhydre (1 mL) et le mélange est laissé pendant 1 heure à 80 °C. Le bromure de propargyle (0,14 mL, 1,6 mmol) est ajouté à la solution et le mélange est laissé pendant 8 heures à 80 °C. Le DMF est évaporé puis une extraction eau / dichlorométhane, suivie d'un lavage par une solution de NaCl saturé sont effectués. La solution organique est finalement séchée sur MgSO₄ et le dichlorométhane est évaporé. Une purification par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane / méthanol 99 : 1 → 90 : 10) permet l'obtention du composé **165** avec un rendement de 50 %.

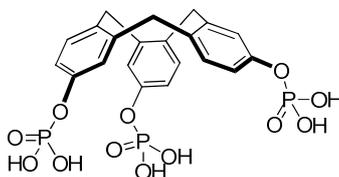
Huile jaune

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 2,71 (s, 3H), 3,38 (s, 9H), 3,64 (m, 202H), 4,13 (m, 8H), 4,69 (m, 9H), 6,93 (s, 3H), 7,02 (s, 3H)

MS (MALDI-TOF) *m/z* distribution centrée sur 2131,2 ± 44 ([M+Na]⁺)



10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g][9]annulène-2,7,12-triyl tris(dihydrogène phosphate) 171



171

Le trichlorure de phosphoryle (0,04 mL, 0,4 mmol) est ajouté lentement à une solution de CTV **10** (50 mg, 0,2 mmol) dans de la pyridine (1 mL), à 0 °C sous atmosphère inerte. La réaction est laissée sous agitation pendant 1 heure à 0 °C puis de l'eau (1 mL) est ajoutée. La réaction est laissée remonter à température ambiante et sous agitation pendant 1 heure. La pyridine est évaporée puis une purification par chromatographie en phase inverse permet l'obtention de **171** avec un rendement de 30 %.

Solide blanc

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,57 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 4,62 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H), 6,84 (d, *J* = 8,2 Hz, 3H), 7,10 (s, 3H), 7,28 (d, *J* = 8,2 Hz, 3H)

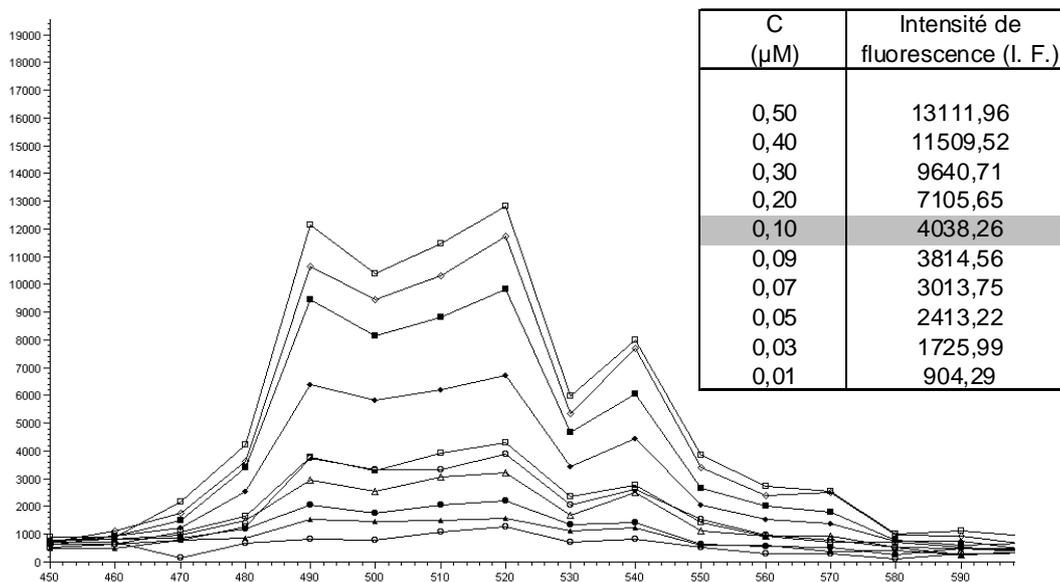
RMN ³¹P (121,5 MHz, CDCl₃, δ en ppm): 3,47

MS (ESI-TOF) *m/z*: 558,93 (100 %, [M+H]⁺)

Tests de fluorescence du complexe 124 avec UO_2^{2+}

Gamme d'étalonnage

Une gamme d'étalonnage entre 0,50 μM et 0,01 μM a d'abord été effectuée afin d'estimer la concentration en uranyle nécessaire pour les expériences. Pour ce faire, les solutions filles sont préparées à partir d'une solution mère d'acétate d'uranyle à 20 mM dans de l'eau distillée. La fluorescence est ensuite mesurée en présence d'acide phosphorique (20 μL de solution fille + 180 μL H_3PO_4 0,75 % par puit (plaque 96 puits)). La solution à 0,10 μM est tout à fait adaptée pour les tests de fluorescence avec le cryptophane **124**.



Fluorescence de solutions d'acétate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{OAc})_2$) de concentrations comprises entre 0,5 μM et 0,01 μM ; $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$; $\Delta t = 50 - 250 \mu\text{sec}$

Mesure de la fluorescence du complexe **124** avec UO_2^{2+}

À une solution d'acétate d'uranyle 1 μM (1 mL, pH = 5,5) fraîchement préparée à partir d'une solution mère à 20 mM, sont ajoutés 20 équivalents de cryptophane **124** (0,9 mM, 22 μL). La solution est agitée pendant 15 minutes puis 20 μL de cette solution, suivis de 180 μL de H_3PO_4 (0,75 %) sont introduits dans chaque puit. Le mélange est ensuite analysé par fluorescence.

Tests RMN ^{129}Xe du complexe **124** avec UO_2^{2+}

À partir d'une solution mère d'acétate d'uranyle à 20 mM, une solution fille à 100 μM (pH ~ 5) dans D_2O est préparée. Puis, 179 nmol de cryptophane **124** sont directement introduits dans un pilulier contenant 0,4 mL de la solution fille à 100 μM , soit 40 nmol d'uranyle. Le pilulier est laissé sous agitation pendant 15 minutes et l'échantillon est ensuite analysé par RMN ^{129}Xe .

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: TEP et TEMP

La médecine nucléaire consiste à administrer par voie intraveineuse une molécule marquée avec un isotope radioactif afin de suivre, par détection externe, le fonctionnement normal ou pathologique d'un organe. Les traceurs radioactifs présentent les mêmes propriétés physico-chimiques que leurs homologues non radioactifs, si ce n'est qu'ils possèdent la particularité d'émettre un rayonnement. Ils servent donc de balise pour suivre, à l'aide d'outils de détection appropriés, le cheminement d'une molécule préalablement marquée dans l'organisme.

Production des isotopes radioactifs

Les atomes radioactifs de courte durée de vie, nécessaires pour l'imagerie nucléaire, sont obtenus à l'aide d'un cyclotron. Il s'agit d'un accélérateur électromagnétique de haute fréquence mis au point en 1929 par Ernest Orlando Lawrence aux Etats-Unis. Dans son principe, le cyclotron utilise l'action combinée d'un champ électrique et d'un champ magnétique pour délivrer un faisceau de particules accélérées. Ces particules électriquement chargées sont introduites au centre d'une enceinte où règne un vide très poussé. Elles décrivent une trajectoire en spirale depuis le centre du cyclotron jusqu'au bord tandis que leur vitesse s'accroît. Elles parcourent ainsi plusieurs tours avant d'être extraites de l'accélérateur, puis projetées à très grande vitesse sur une cible située à quelques mètres. Il se produit alors des transmutations avec production d'isotopes radioactifs et désintégrations d'atomes, lesquels retrouvent un état stable en émettant un rayonnement.

Choix et production des radiopharmaceutiques

Une fois produit, l'atome radioactif est incorporé dans une molécule choisie en fonction de ses capacités à marquer un paramètre biologique donné : métabolique, physiologique ou encore médicamenteux. Pour être utilisable en médecine, l'isotope doit :

- Délivrer une dose d'irradiation la plus faible possible
- Avoir une durée de vie dans l'organisme courte mais suffisante pour permettre une observation physiologique
- Émettre un rayonnement qui présente le plus d'innocuité possible et soit décelable à l'extérieur du corps.

Le rayonnement gamma, qui, par nature, interagit peu avec la matière, est le rayonnement le plus utilisé en médecine nucléaire. On utilise donc des isotopes émetteurs de rayonnements gamma

ou des isotopes émetteurs de positons qui donnent naissance à l'émission de photons gamma (Tableau 18).

Période de radioéléments												
Composition du corps humain												
Éléments	C	O	H	N	P	S	Cl	Na	K	Ca	Fe	Mg
% (masse)	18	65	10	3	1,1	0,25	0,15	0,15	0,35	2	0,004	0,05
Radio-isotopes émetteurs de positons												
Isotopes	^{11}C	^{13}N		^{15}O				^{18}F		^{76}Br		
Période (min)	20,38	9,96		2,04				109,74		960		
Radio-isotopes émetteurs de photons gamma uniques												
Isotopes	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	^{111}In		^{123}I				^{133}Xe		^{201}Tl		
Période (h)	6,01	67,31		13,21				125,86		72,98		

Tableau 18: composition atomique du corps humain et période de radioéléments

Tomographie par émission de positons

La TEP utilise comme traceurs des isotopes artificiels de l'oxygène, du carbone ou du fluor, émetteurs de positons. Ces traceurs radioactifs peuvent être fixés sur une molécule d'eau (pour l'observation du débit sanguin), sur une molécule proche du glucose, le FGD (^{18}F -fluorodéoxyglucose) (pour la détection de cancers) ou encore sur des molécules à usage thérapeutique. Dans ce dernier cas, la TEP permet de visualiser *in vivo* le trajet et la localisation du médicament dans le corps humain, mais aussi de le quantifier dans ses sites d'action spécifiques¹⁴⁴.

Tomographie par émission de simples photons

La TEMP, quant à elle, utilise des isotopes stables de l'iode, du technétium, du thallium ou de l'indium, qui émettent des rayons gamma. A la différence de la TEP, il ne s'agit pas d'une méthode quantitative. D'autre part, les isotopes émetteurs de photons gamma ne figurent pas dans les molécules biologiques comme le carbone, l'oxygène, le sodium ou l'azote, et peuvent donc modifier l'activité de la molécule dans laquelle ils sont incorporés¹⁴⁴. La période radioactive (quelques heures) est bien plus longue que celle des émetteurs de positons. Cependant, plus simple techniquement et moins coûteuse que la TEP, la TEMP est beaucoup plus répandue en milieu hospitalier.

¹⁴⁴ S. R. Meikle, F. J. Beekman, S. E. Rose, *Drug Discovery Today : Technologies*, **2006**, 3, 187

Annexe 2: test MTT

Ce test permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaires. Il est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium), les sels de tétrazolium du substrat sont transformés en cristaux insolubles de formazan grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. Ces derniers forment un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). La quantité de sel formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Le test du MTT est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriales, assimilables à une mesure de la vitalité cellulaire

