



HAL
open science

Synthèses de cryptophanes hydrosolubles adaptés à l'encapsulation du xénon, et d'hémicryptophanes fonctionnalisés pour la complexation de lanthanides (III), en vue d'applications en imagerie médicale

Estelle Godart

► **To cite this version:**

Estelle Godart. Synthèses de cryptophanes hydrosolubles adaptés à l'encapsulation du xénon, et d'hémicryptophanes fonctionnalisés pour la complexation de lanthanides (III), en vue d'applications en imagerie médicale. Autre. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSEN041 . tel-01685014

HAL Id: tel-01685014

<https://theses.hal.science/tel-01685014>

Submitted on 16 Jan 2018

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.



Numéro National de la thèse : 2017LSEN041

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Opérée par

l'École Normale Supérieure de Lyon

École doctorale N°206 : Chimie (Chimie, Procédés, Environnement)

Discipline : Chimie

Soutenue publiquement le 21 Juillet 2017 par :

Madame Estelle GODART

**Synthèses de cryptophanes hydrosolubles adaptés à
l'encapsulation du xénon, et d'hémicryptophanes
fonctionnalisés pour la complexation de lanthanides(III), en
vue d'applications en imagerie médicale.**

Devant le jury composé de :

M. Thierry Brotin, *Directeur de Recherche à l'ENS de Lyon*

Examineur

M. François Lux, *Maître de conférences de l'Université de Lyon*

Examineur

Mme Isabelle Gosse, *Professeure à l'Université de Bordeaux*

Rapporteuse

M. Frédéric Fagès, *Professeur de l'Université d'Aix-Marseille*

Rapporteur

M. Alexandre Martinez, *Professeur de l'Université d'Aix-Marseille*

Directeur de thèse

Liste des abréviations :

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Bn : Benzyle

CEST : Chemical exchange saturation transfert

CI : Concentration d'inhibition (chapitre3)
Croisement intersystème (chapitre 4)

CRD : Carbohydrate recognition domain

CT : Computed Tomography (scanner)

CTB : Cyclotribenzylène

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DIPEA : Diisopropyléthylamine

DMAP : Diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOSY : Diffusion Ordered Spectroscopy

DOTA : 1,4,7,10- tetraazacyclododecane,1,4,7,
10-tetraacetic acid

DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène

E : Electrophile

ECD : Electronic Circular Dichroism

EP / PE : éther de pétrole / Petroleum ether

EtOAc : Acétate d'éthyle

Eq : Equivalent(s)

FNS : Fibrose Néphrogénique Systémique

Gp : Groupement protecteur

HSA : Human Serum Albumin

HPLC : High Performance Liquid
Chromatography

HOPO : Hydroxypyridinone

IAM : 2-hydroxyisophtalamide

IRM : Imagerie par Résonance nucléaire

Lec : Lectine

M : mol/L

MeOH : Méthanol

MMP : Matrice metalloprotéase

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

PA : Pseudomonas Aeruginosa

PEG : Polyéthylèneglycol

PET : Positron Emission Tomography

PyBOP : Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-
phosphonium hexafluorophosphate

QD : Quantum Dot(s)

R_f : Rapport frontal

RF : Radiofréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RT : Retention time

rt : room temperature

SBM : Solomon Bloembergen Morgan

SeAr : Substitution Electronique Aromatique

SPIO : Small Particules Iron Oxyde

TACN : Triazacyclononane

TE : Temps d'Echo

THF : Tetrahydrofurane

TFA : Acide Trifluoroacétique

THP : Tetrahydropyrane

TI : Temps d'Inversion

TLC : Thin Layer Chromatography

Tof : Turn over frequency

TR : Temps de répétition (IRM) ou Temps de
rétention (HPLC)

Tren : Tris-2-aminoéthylamine

USPIO : Ultra Small Particules Iron Oxyde

UV : Ultra Violet

Sommaire

Chapitre 1 : Chimie supramoléculaire et notion d'encapsulation	9
1.1. La chimie supramoléculaire : définitions et généralités	10
1.2. La chimie supramoléculaire au service de la pluridisciplinarité	12
1.2.1. Chimie supramoléculaire et matériaux	12
1.2.2. Chimie supramoléculaire et machines moléculaires.....	13
1.2.3. Chimie supramoléculaire et biologie.....	14
1.3. Supermolécules et encapsulation.....	15
1.3.1. La reconnaissance moléculaire	15
1.3.2. La chimie supramoléculaire au service de la catalyse	17
1.3.2.1. <i>Interactions non covalentes et catalyse</i>	17
1.3.2.2. <i>Supermolécules et catalyse</i>	18
1.4. Le cas des molécules comportant l'unité CTB.....	20
1.4.1. Description de l'unité CTB	20
1.4.1.1. <i>Présentation</i>	20
1.4.1.2. <i>Synthèse</i>	21
1.4.1.3. <i>Chiralité</i>	22
1.4.1.4. <i>Applications des CTB</i>	23
1.4.2. Les cryptophanes	24
1.4.3. Les hémicryptophanes (HC).....	26
1.4.3.1. <i>Présentation</i>	26
1.4.3.2. <i>Hémicryptophanes et reconnaissance</i>	27
1.4.3.3. <i>Hémicryptophanes et catalyse</i>	29
1.4.4. Objectifs de la thèse.....	30
Chapitre 2 : Encapsulation de Gd(III) au sein d'hémicryptophanes : vers la conception d'agent de contraste IRM	31
2.1. L'IRM du proton.....	32
2.1.1. Principe de fonctionnement	32
2.1.1.1. <i>Généralités sur l'IRM</i>	32
2.1.1.2. <i>Images IRM T_1 et T_2</i>	33
2.1.2. Utilisation d'agents de contraste en IRM	34
2.1.2.1. <i>Agents de contraste T_2</i>	34
2.1.2.2. <i>Agents de contraste T_1</i>	35
2.1.3. Différentes stratégies d'optimisation d'agents de contraste T_1	36
2.1.3.1. <i>Signal IRM contrôlé par un stimulus extérieur</i>	36
2.1.3.2. <i>Optimisation des paramètres de relaxation longitudinale (Annexe 1 pour des détails théoriques)</i>	36

2.1.3.3. <i>L'intérêt des hémicryptophanes dans la conception d'agents de contraste T₁</i>	38
2.2. Synthèse de ligands hémicryptophanes - complexation du Gd(III)	38
2.2.1. Alkylation des fonctions amine d'hémicryptophane-tren.....	38
2.2.2. Acylation des fonctions amine d'hémicryptophane-tren.....	40
2.2.2.1. <i>Synthèse des ligands</i>	40
2.2.2.2. <i>Complexation de l'hémicryptophane V au gadolinium</i>	41
2.2.3. Fonctionnalisation des bras espaceurs des hémicryptophanes.....	41
2.2.3.1. <i>Synthèse de l'hémicryptophane VII</i>	42
2.2.3.2. <i>Synthèse de l'hémicryptophane VIII</i>	46
2.2.4. Complexe hémicryptophane-gadolinium.....	52
2.2.4.1. <i>Synthèse</i>	52
2.2.4.2. <i>Premières mesures de paramètres de relaxation</i>	53
2.2.5. Perspectives.....	59
Chapitre 3 : Conception d'une biosonde de type cryptophane pour l'IRM au xénon hyperpolarisé	61
3.1. Introduction à l'IRM au Xe hyperpolarisé	62
3.1.1. L'IRM au Xe hyperpolarisé : principe général.....	62
3.1.1.1. <i>Le xénon</i>	62
3.1.1.2. <i>L'hyperpolarisation</i>	62
3.1.2. Amélioration du diagnostic en IRM du Xe.....	63
3.1.2.1. <i>Stratégie synthétique : conception de biosondes¹⁴⁴</i>	63
3.1.2.2. <i>Optimisation de la technique en RMN : l'hyperCEST</i>	64
3.2. Vers la conception d'une nouvelle sonde	66
3.2.1. Les cryptophanes en RMN et IRM du xénon.....	66
3.2.1.1. <i>Les cryptophanes : des récepteurs adaptés</i>	66
3.2.1.2. <i>Exemples de récepteurs de type cryptophane et leurs applications</i>	68
3.2.2. Vers la construction d'une sonde pour détecter l'interaction sucre / lectine en RMN du ¹²⁹ Xe.....	70
3.2.2.1. <i>Généralités sur l'interaction sucre/lectine en biologie</i>	70
3.2.2.2. <i>Développement d'une biosonde à base de cryptophane pour l'étude et la détection de lectines bactériennes en RMN du ¹²⁹Xe</i>	74
3.3. Synthèse et caractérisations	77
3.3.1. Obtention du cryptophane [2,2,2](OMe) ₃ (Opropargyl) ₃	78
3.3.1.1. <i>Racémique</i>	78
3.3.1.2. <i>Enantiopur</i>	82
3.3.2. Greffage des sucres.....	84
3.3.2.1. <i>Choix des sucres</i>	84
3.3.2.2. <i>Synthèse des carbohydrates porteurs d'une fonction azide</i>	84
3.3.2.3. <i>Obtention des sondes finales par couplage de Huisgens</i>	85

3.3.3. Bilan et perspectives.....	86
Chapitre 4 : Complexation d'ions lanthanide(III) au sein d'un hémicryptophane en vue d'applications en spectroscopie de fluorescence.....	87
4.1. La spectroscopie de fluorescence	88
4.1.1. Aspects théoriques et appareillage	88
4.1.1.1. Généralités	88
4.1.1.2. Spectres de fluorescence.....	89
4.1.1.3. Les paramètres de fluorescence.	90
4.1.2. Différentes catégories de systèmes fluorescents.....	91
4.1.2.1. Molécules organiques.....	91
4.1.2.2. Particules : <i>Quantum Dots</i>	93
4.1.2.3. Complexes de lanthanides	95
4.2. La fluorescence des lanthanides	95
4.2.1. Généralités sur les lanthanides	95
4.2.1.1. Configuration électronique et contraction des lanthanides	95
4.2.1.2. Généralités sur la chimie de coordination des lanthanides	96
4.2.2. Propriétés spectroscopiques.....	97
4.2.2.1. Notion de terme spectroscopique	97
4.2.2.2. Spectres de fluorescence des complexes de lanthanides (III) : effet d'antenne.....	98
4.2.2.3. Elaboration de complexes de Ln(III) adaptés à des applications en imagerie de fluorescence.....	100
4.3. La fluorescence circulairement polarisée	102
4.3.1. Définition et intérêt.....	102
4.3.2. Exemples d'applications.....	103
4.3.2.1. Détection d'entités biologiques	103
4.3.2.2. Matériaux luminescents.....	104
4.3.3. Description de notre sonde	105
4.4. Synthèse d'une nouvelle sonde fluorescente.....	106
4.4.1. Synthèse du ligand hémicryptophane IX.....	106
4.4.1.1. Stratégie et descriptif.....	106
4.4.1.2. Propriétés chiroptiques du ligand IX.....	109
4.4.1.3. Tentative d'application du ligand IX en reconnaissance.....	110
4.4.2. Complexation et propriétés des complexes IX@Ln(III)	112
4.4.2.1. Mise en place d'un protocole de complexation avec un métal diamagnétique, le lanthane(III).	112
4.4.2.2. Complexation à des lanthanides fluorescents : l'euprium (III) et le terbium (III)	112
4.4.2.3. Premières analyses spectroscopiques	114
4.4.3. Perspectives	116

Chapitre 5 : Partie expérimentale	121
5.1. Synthesis and characterizations	122
5.1.1. General procedures	122
5.1.2. Synthesis of hemicryptophane I	123
5.1.3. Synthesis of hemicryptophanes II and IV	126
5.1.4. Synthesis of hemicryptophanes V and VI.	129
5.1.5. Synthesis of hemicryptophane VII and complexation with Gd(III).	131
5.1.6. Synthesis of hemicryptophane VIII and complexation with Gd (III).....	137
5.1.6.1. <i>Synthon 26 used for the synthesis of both hemicryptophanes VIII et IX.....</i>	<i>137</i>
5.1.6.2. <i>End of the synthesis of hemicryptophane VIII.</i>	<i>139</i>
5.1.7. Cryptophane based bioprobe for ¹²⁹ Xe MRI.....	149
5.1.7.1. <i>Synthesis of cryptophane 41.</i>	<i>149</i>
5.1.7.2. <i>Binding cryptophane 41 to hexose by click chemistry (realized in Lyon by Yoann Pascal under the supervision of Pr S. Vidal)</i>	<i>155</i>
5.1.8. Synthesis of hemicryptophane IX and complexation with several lanthanide ions.	161
5.2. Measure related to application of the complexe VIII@Gd as MRI- contrast agent	173
5.2.1. Sample preparation	173
5.2.2. Relaxation times measurement.....	173
5.2.2.1. <i>Longitudinal relaxation time T₁.....</i>	<i>173</i>
5.2.2.2. <i>Transversal relaxation time T₂.....</i>	<i>178</i>
5.2.3. ¹ H-NMRD profile	179
5.3. Fluorescence properties of complexes IX@lanthanides.....	181

Chapitre 1 : Chimie supramoléculaire et notion d'encapsulation

1.1. La chimie supramoléculaire : définitions et généralités

L'évolution et notre compréhension de la chimie depuis plus de 200 ans est à l'image du fonctionnement des poupées russes. Les particules élémentaires s'assemblent pour former des atomes, eux-mêmes capables de se lier entre eux, donnant naissance à de petites molécules. Les premières études, motivées par le besoin de comprendre l'origine du vivant et de notre système solaire, ont porté sur des entités inorganiques. La chimie organique a pris le relais en 1828 avec la synthèse de la première molécule organique, l'urée, par Friedrich Wöhler.¹ Durant le siècle suivant cet événement pionnier, la chimie moléculaire n'a fait que se complexifier. Les chimistes sont aujourd'hui capables de créer et rompre une grande diversité de liaisons covalentes de façon sélective et contrôlée.

Mais l'observation du monde du vivant, qui met en jeu des systèmes polymoléculaires intelligents et très efficaces, comme les enzymes qui sont capables à la fois de contribuer à la transformation, au transport ou encore à la reconnaissance de molécules, le tout étant orchestré par un ensemble d'interactions non covalentes, a donné naissance à la fin du XX^{ème} siècle à un nouveau pan de la chimie. Une nouvelle poupée russe est mise en place par Jean-Marie Lehn² en 1978, la chimie *au-delà des molécules*, ou chimie dite supramoléculaire. Elle concerne l'élaboration et l'étude d'édifices de plus grande complexité que les molécules, où plusieurs entités s'organisent et s'associent grâce à des forces intermoléculaires non covalentes, et donc, plus subtiles à maîtriser. Ces forces sont listées dans le tableau 1 ci-contre.

Ces forces intermoléculaires sont de faible énergie si on les compare à des liaisons covalentes (150 kJ/mol : F-F à 1072 kJ/mol : C≡O), ce qui confère aux édifices supramoléculaires une certaine flexibilité, et leur stabilité est alors assurée par une multiplication des interactions mises en jeu ainsi que par une géométrie complémentaire entre les différentes entités concernées. La nature, encore une fois, permet d'illustrer ce concept avec l'exemple de la double hélice de l'ADN impliquée dans de nombreux processus biologiques qui est stabilisée par des interactions de type $\pi\pi$ et de multiples liaisons hydrogène (figure 1a).

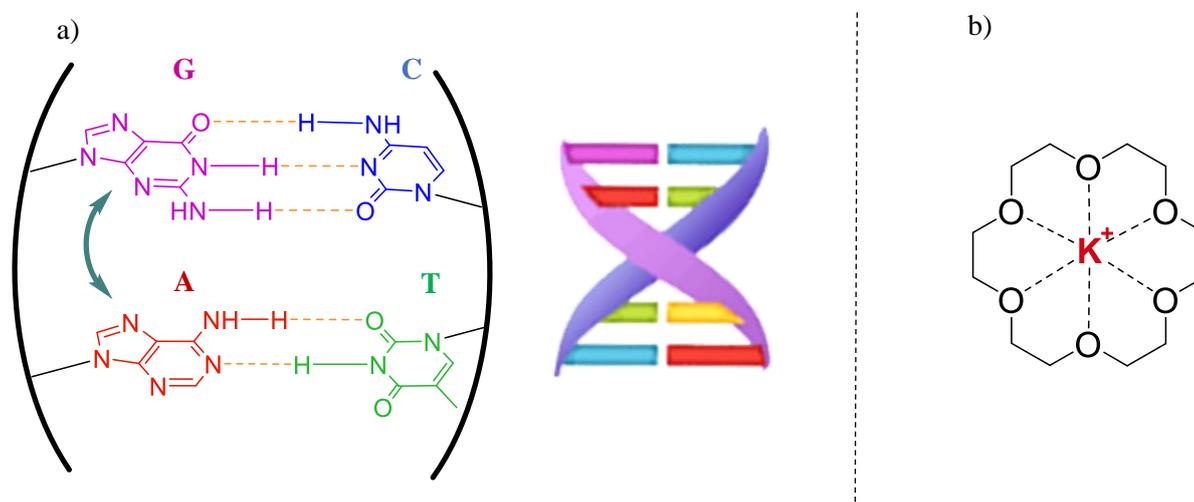


Figure 1 : a- Distinction entre un assemblage supramoléculaire: la double hélice de l'ADN, et une supermolécule : le complexe entre un éther couronne 18-[C]-6 de Pedersen³ et un cation potassium a- Mise en évidence de la multiplicité des interactions entre bases azotées dans la double hélice de l'ADN. Les liaisons hydrogène sont en pointillés orange et les interactions $\pi\pi$ en gris. b- Exemple de supermolécule présentant une directionnalité des interactions entre hôte (sites convergents) et invité (divergents).

¹ F. Wöhler, *Poggendorffs Annalen der Physik*, **1828**, 88, 253-256

² a- J.-M. Lehn, *La chimie supramoléculaire : concepts et perspectives* ; De Boeck Université, **1997**. b- J. M. Lehn, *Pure and Applied Chemistry*, **1978**, 50, 871-892.

³ C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 27, 1021-1027.

Interaction	Description /exemple	Energie (kJ/mol)	Ref
Ion-Ion	Interaction coulombienne attractive ou répulsive entre espèces chargées.	100-350	4 5
Ion-dipôle	Interaction électrostatique directionnelle où un dipôle s'oriente vers une charge de façon à développer de préférence une interaction attractive. (interaction entre éther couronne et cation figure 1b)	50-200	4 5
π-cation π-anion	Interaction entre un cation/anion et une face d'un noyau aromatique enrichi/appauvri en électron (interaction entre une charge et un système π associé à un moment quadrupolaire).	5-120	6 7 8
Liaisons hydrogène	Interaction entre un atome d'hydrogène porté par un atome électro-négatif et un autre atome électro-négatif, très influencée par la géométrie du système considéré. (ADN figure 1a)	5-120	5 9
Liaisons halogène	Interaction électrostatique entre un halogène électro-appauvri, au nuage électronique fortement polarisable (typiquement F, Br), et un atome électrodonneur (N, O, autre halogène ...)	5-180	10 11
π-π	Interaction électrostatique entre deux noyaux aromatiques qui est d'autant plus importante que chaque cycle est respectivement enrichi et appauvri en électrons. (ADN figure 1a)	1-60	5 12 13
Van der Waals	Alignement de deux dipôles induits (London), d'un dipôle permanent avec un dipôle induit (Debye), de deux dipôles permanents (Keesom).	1-50	14
X-H...π	Interaction assimilable à une liaison hydrogène entre un H lié à un atome électro-négatif (ou un carbone) et un noyau aromatique.	5-20	15

Tableau 1 : Liste des principales interactions non covalentes utiles en chimie supramoléculaire. *

Parmi les objets de la chimie supramoléculaire on distingue les supermolécules des assemblages supramoléculaires. Les supermolécules sont caractérisées par l'association d'un petit nombre d'entités où l'on discerne une molécule hôte (récepteur) d'une molécule invitée (substrat) selon l'orientation des sites d'interaction (cas de l'éther couronne, figure 1b), alors qu'un assemblage moléculaire correspond à l'association ordonnée d'un nombre plus conséquent de molécules aux sites d'interaction complémentaires sans la nécessité d'une distinction hôte/invité. C'est le cas de l'ADN déjà évoqué à la figure 1a.

*On peut ajouter à toutes ces interactions la notion d'effet solvophobe qui résulte de l'existence d'interactions dipolaires entre des molécules de solvant polaire, excluant les molécules apolaires qui ont alors tendance à s'agréger. Ce phénomène est essentiel dans le domaine de la biologie, avec comme solvant l'eau (effet hydrophobe).

⁴ P. D. Beer, P. A. Gale, D. K. Smith, *Supramolecular chemistry*, Oxford University Press, New-York, **1999**.

⁵ J. W. Steed and J. L. Atwood, *Supramolecular chemistry*, Wiley, Chichester, UK, **2009**.

⁶ J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303-1324.

⁷ O. B. Berryman, V. S. Bryantsev, D. P. Stay, D. W. Johnson and B. P. Hay, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 48-58.

⁸ D. X. Wang, M. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 892-897.

⁹ G. A. Jeffrey, *An introduction to hydrogen bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.

¹⁰ G. Cavallo, P. Metrangolo, R. Milani, T. Pilati, A. Priimagi, G. Resnati, G. Terraneo, *Chem. Rev.*, **2016**, *116* (4), 2478-2601

¹¹ A. Brown, P. D. Beer, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 8645-8658.

¹² C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 651-669.

¹³ C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5525-5534.

¹⁴ P. W. Atkins, J. De Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2010**.

¹⁵ E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1210-1250.

1.2. La chimie supramoléculaire au service de la pluridisciplinarité

La chimie supramoléculaire constitue un domaine très vaste de la chimie qui ne cesse de se diversifier depuis la deuxième partie du XX^{ème} siècle. Le fait de travailler avec des interactions de faibles énergies confère aux édifices supramoléculaires une grande flexibilité, ainsi qu'une certaine dynamique. Par ailleurs, il existe une grande variabilité de structures pouvant donner lieu à des interactions non covalentes. Tout ceci contribue à laisser libre cours à l'imagination du chimiste pour construire des édifices supramoléculaires aux applications diverses, faisant de plus en plus appel à une certaine pluridisciplinarité.

1.2.1. Chimie supramoléculaire et matériaux

Si la chimie supramoléculaire s'est d'abord illustrée dans le cadre de la recherche académique, avec les travaux de Donald Cram, Jean-Marie Lehn et Charles J. Pedersen, récompensés par un prix Nobel en 1987, cette chimie trouve aujourd'hui de plus en plus de domaines d'applications concrets, voire industriels. La chimie des matériaux, et en particulier des polymères, a considérablement évolué.¹⁶ En effet, sans la dimension supramoléculaire, les matériaux polymériques souffraient d'un manque de flexibilité, dû à la nature même de leur squelette uniquement basé sur les liaisons covalentes. L'utilisation d'interactions de plus faible énergie, d'origines variées (purement électrostatiques ou non, nécessité d'hydrogène labiles, liaisons métal-ligand ...) et directionnelles, entre unités monomériques, confère non seulement aux assemblages supramoléculaires la possibilité de contrôler la souplesse du matériau recherché, mais aussi une capacité de réponse à des stimuli externes pouvant modifier la force des interactions, et les propriétés du matériau. De nombreuses formes d'édifices supramoléculaires sont accessibles (figure 2), allant des formes classiques de la chimie des polymères¹⁷ (fibres, systèmes réticulés en 2 comme en 3 dimensions), jusqu'à des structures tridimensionnelles plus contrôlées et régulières, à partir de synthons protéiques¹⁸ (pyramides, cubes ...).

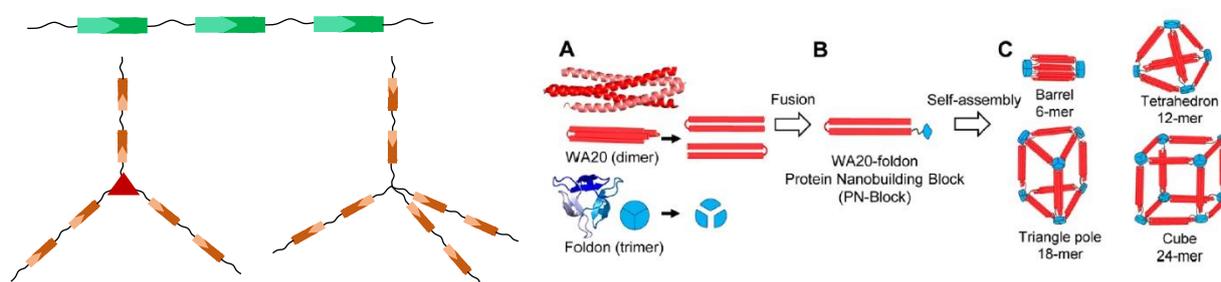


Figure 2 : Représentation schématique d'une partie du panel de structures de polymères et de structures supramoléculaires auto-assemblées rencontrées dans la littérature.

Un exemple de l'intérêt des polymères supramoléculaires concerne la fabrication de bitume, qui consiste à jouer constamment entre flexibilité, et résistance du matériau. En 2009, l'équipe de Laurent Bouteiller insère un polymère supramoléculaire de type polyacide carboxylique (sous forme de longues fibres reliées par des liaisons hydrogène) dans la composition d'un bitume. A haute température, les interactions non covalentes sont rompues et le bitume devient non pas juste flexible (comme un polymère classique le permettrait), mais liquide, le temps de sa mise en place. Et l'assemblage supramoléculaire cristallise à basse température rendant le matériau plus résistant qu'un bitume classique.¹⁹

¹⁶ L. Yang, X. Tan, Z. Wang, X. Zhang, *Chem.Rev.*, **2015**, *115*, 7196–7239.

¹⁷ Thèse de Reda Agnaou, *Polymères supramoléculaires semi-cristallins à base de Polyamides et PMMA*, **2014**, HAL Id: tel-01169073, Chapitre 1.

¹⁸ N. Kobayashi, K. Yanase, T. Sato, S. Unzai, M. H. Hecht, R. Arai, *J.Am.Chem.Soc.*, **2015**, *137*, 11285–11293.

¹⁹ B. Isare, L. Petit, E. Bugnet, R. Vincent, L. Lapalu, P. Sautet, L. Bouteiller, *Langmuir*, **2009**, *25* (15), 8400–8403.

1.2.2. Chimie supramoléculaire et machines moléculaires

Un autre champ d'application de la chimie supramoléculaire récemment remis au goût du jour avec la nobélisation de Jean-Pierre Sauvage en 2016, est la conception de machines moléculaires. Il s'agit d'un assemblage de molécules capables de produire un mouvement dirigé sous l'influence d'un stimulus extérieur (chimique, photochimique, électronique ...). Les structures, ou topologies, de types caténane (deux anneaux entrelacés) ou rotaxane (un anneau traversé par un axe) sont les principales briques de base de ces machines (figure 3a), donnant lieu respectivement à des mouvements de rotation et de translation. Ces systèmes a priori simples, permettent aujourd'hui de mimer le comportement de systèmes biologiques complexes à l'échelle moléculaire.²⁰

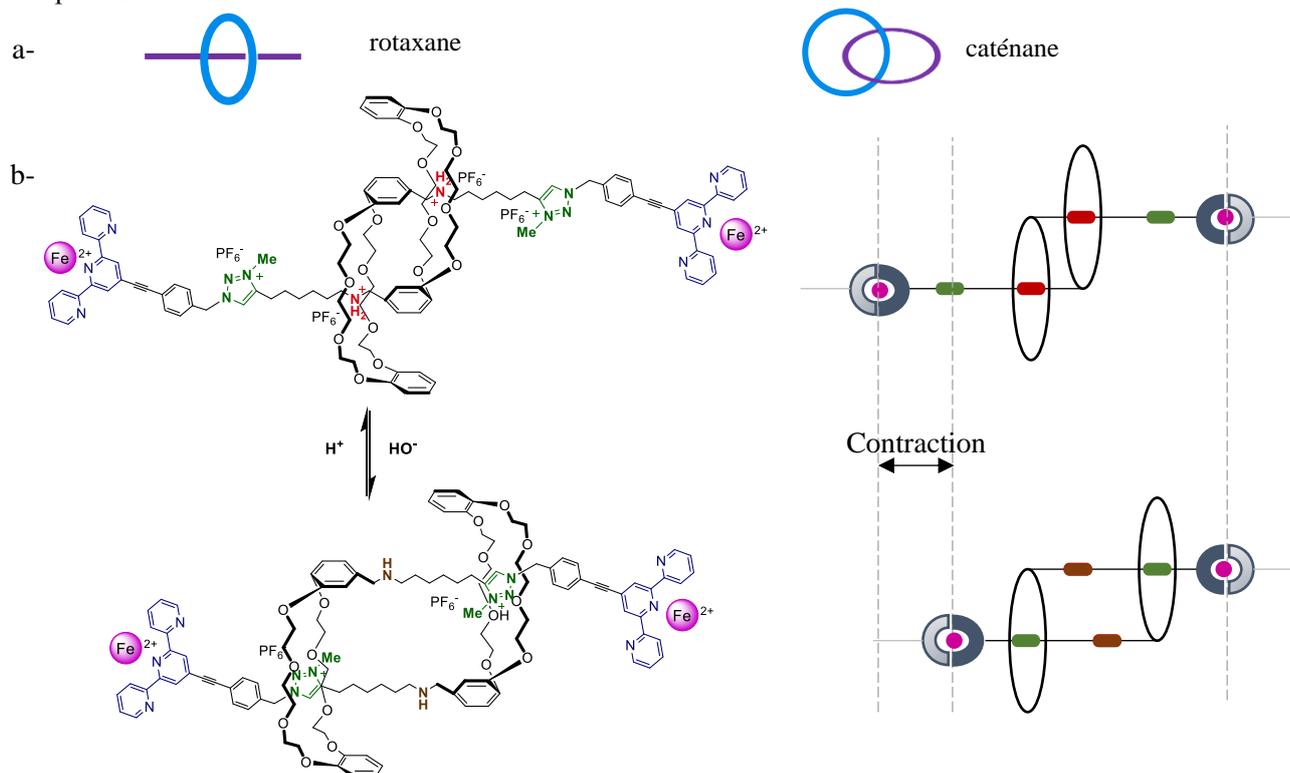


Figure 3 : a- Représentation topologique des structures rotaxane et caténane. b - Machine moléculaire destinée à mimer la contraction musculaire : structure chimique d'un monomère à gauche et schéma du fonctionnement du polymère à droite.²¹

L'exemple représenté sur la figure 3b est celui d'une fibre constituée d'une succession de rotaxanes enchevêtrés, capable de se contracter et s'étendre sur plusieurs nanomètres à l'image d'une fibre musculaire, mais le mouvement est induit et contrôlé par une variation de pH.²¹ Pour ce faire, deux unités circulaires de la famille des éthers couronne, connus pour avoir une affinité pour les cations ammonium, sont liées à une chaîne comportant deux types de fonctions azotées (sites d'accroche des macrocycles), la chaîne fixée au premier cycle traversant le second. La mise en mouvement du double rotaxane est basée sur le fait que le cation ammonium secondaire (rouge) présente une plus forte affinité pour l'éther couronne et un pH de protonation plus faible que le cation triazolium (vert). Ainsi en augmentant le pH du milieu, l'amine secondaire déprotonnée, et donc désactivée (marron), laisse place au cation triazolium, générant dans le cas présent, un mouvement de contraction à l'échelle moléculaire. Enfin, l'ajout aux extrémités des chaînes de sous-unités terpyridine, polymérisables par chimie de coordination, permet d'obtenir un mouvement de plus grande ampleur.

²⁰ a-J.-P. Collin, F. Durolo, J. Lux, J.-P. Sauvage, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 8532 b- J.-P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.*, 1998, *31*, 611.

²¹ G. Du, E. Moulin, N. Jouault, E. Buhler, N. Giuseppone, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 12504–12508

1.2.3. Chimie supramoléculaire et biologie

Nous avons déjà évoqué le fait que la biologie soit une grande source d'inspiration pour la construction d'assemblages supramoléculaires complexes et fonctionnels. En particulier les protéines, qui, certes, sont constituées d'un enchaînement de structures unitaires simples, les acides aminés, mais sont suffisamment spécifiques pour être capables –entre autres- de reconnaître et transformer chimiquement un substrat donné de façon sélective. Cette forte sélectivité des protéines envers leur substrat est due à une structure tridimensionnelle sophistiquée essentiellement permise par des interactions non covalentes entre des groupes d'acides aminés, ou encore entre une portion de chaîne protéique et un métal via des liaisons de coordination modulables (par exemple : des doigts de zinc ²²). On peut répertorier diverses formes caractéristiques au sein des protéines (les hélices α , les feuillets β , les coudes ...) issues du repliement de la chaîne unidimensionnelle d'acides aminés qui la constitue. La volonté de mimer ces comportements en version synthétique espérant, étape par étape, s'approcher de la structure des protéines naturelles correspond à la chimie des foldamères. ²³ On représente sur la figure 4 ci-dessous l'exemple de la première double hélice synthétique dont la structure, qui a été déterminée par diffraction aux rayons X, permet de mettre en évidence les nombreuses interactions non covalentes mises en jeu. ²⁴

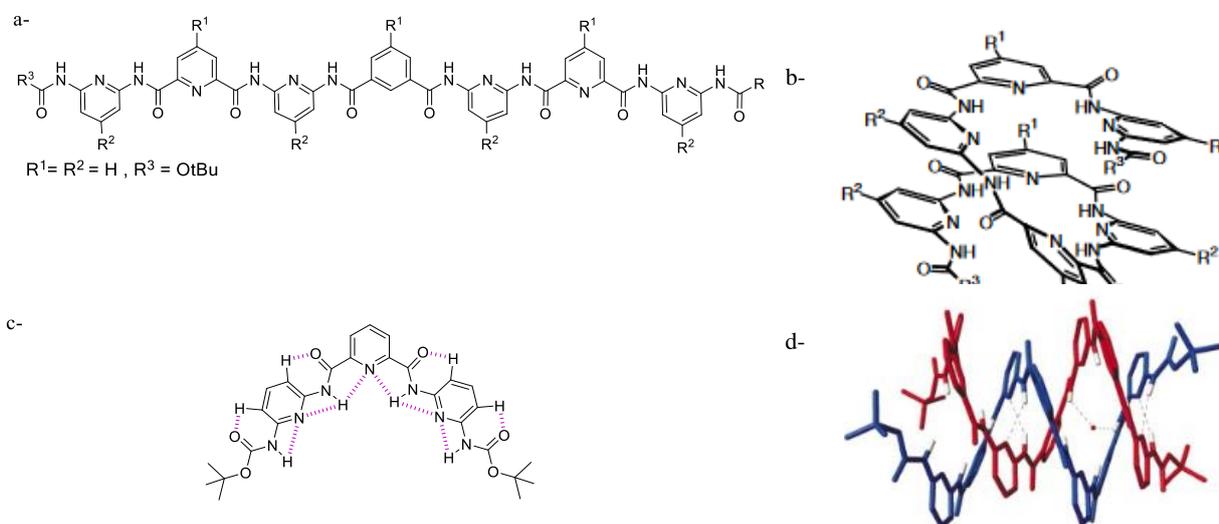


Figure 4 : a – Formule chimique générale d'un oligopyridilcarboxamide et représentation en b- de l'agencement tridimensionnel en hélice d'un heptamère. c- Mise en évidence - sur un trimère - des liaisons hydrogène intramoléculaires favorisant la courbure de l'oligopyridilcarboxamide. d- Structure aux rayons X d'une double hélice formée de deux heptamères et mise en évidence des liaisons hydrogène intermoléculaires ainsi que du π -stacking entre aromatiques stabilisant la structure. ^[22]

La chimie des foldamères tend à avoir des applications prometteuses dans le cadre de la pharmacologie, puisque ces espèces sont conçues de façon à ressembler et donc interagir avec des biomolécules. Cette chimie s'étend aussi jusqu'au domaine de la reconnaissance moléculaire. En effet, en diversifiant les squelettes polypeptidiques à l'origine du repliement des foldamères, les chercheurs accèdent aujourd'hui à une large gamme de structures 3D comprenant une cavité, ou qui s'organisent et se forment via l'encapsulation d'une petite entité chimique. ¹⁹⁻²⁵

²² J.H. Laity, B.M. Lee, P.E. Wright, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2001**, 11(1), 39-46.

²³ G. Guichard, I. Huc, *Chem. Comm.*, **2011**, 47, 5933–5941.

²⁴ V. Berl, I. Huc, R. G. Khoury, M. J. Krische, J-M. Lehn, *Nature*, **2000**, 407.

²⁵ M. Inouye, M. Waki and H. Abe, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2022.

Il serait trop ambitieux de tenter de dresser une liste exhaustive des champs d'applications de la chimie supramoléculaire. Au sein du laboratoire de l'iSm2, dans l'équipe Chirosciences, on s'intéresse tout particulièrement à deux procédés phares de la chimie supramoléculaire, à savoir, les concepts de reconnaissance moléculaire et de transformation chimique en milieu confiné. Pour développer ces deux notions, nous nous limiterons dans la suite du manuscrit à l'étude d'édifices supramoléculaires discrets de type supermolécules, et utiliserons la terminologie adaptée (récepteur-substrat ou hôte-invité).

1.3. Supermolécules et encapsulation

1.3.1. La reconnaissance moléculaire

La reconnaissance moléculaire caractérise un phénomène d'association entre deux entités chimiques. Pour être sélective, une telle association doit être favorisée par plusieurs paramètres, afin de créer une certaine symbiose entre le récepteur et son substrat. Pour ce faire, des arguments géométriques, tels que la complémentarité hôte-invité du point de vue de leur taille ou de leur forme, sont à prendre en compte. Ceci a été intuité par Emile Fischer en 1894 avec le concept d'interaction clef/serrure,²⁶ et peut être illustré dans le cadre de la chimie des éthers couronne de Pedersen (figure 5). J. Rebek²⁷ a d'ailleurs quantifié ceci en remarquant qu'une meilleure sélectivité est observée pour un rapport de 55% entre le rayon de Van der Waals du substrat et la taille de la cavité du récepteur.

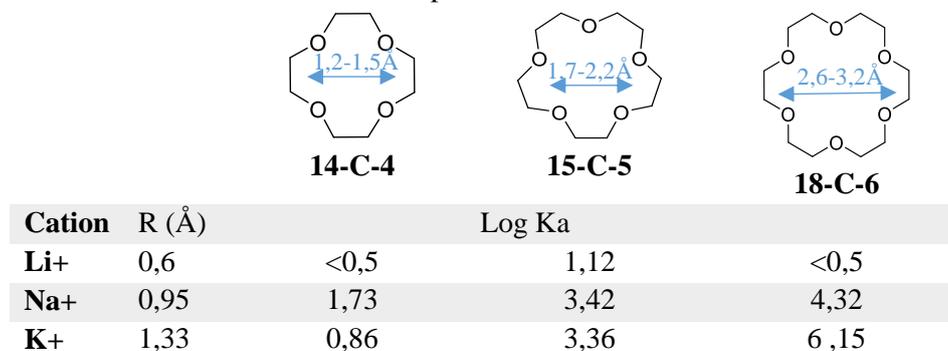


Figure 5 : Représentation de quelques éthers couronne et valeur de leur constante de complexation – en log Ka – avec différents cations alcalins (contre ion Cl⁻) dans le méthanol. En bleu : taille de la cavité et R = rayon de Van der Waals des cations considérés.^{28 29}

Ce modèle a été par la suite amélioré en ajoutant aux considérations géométriques la prise en compte de la nature des sites de coordination, ce qui correspond davantage à un critère énergétique. En effet, nous avons évoqué en début de chapitre la grande diversité d'interactions non covalentes pouvant être mises à profit pour créer des supermolécules. Ainsi, plus le récepteur et le substrat auront des paires de sites d'interactions en commun (donneur/ accepteur de liaison hydrogène, moment dipolaire face à une charge, cycles aromatiques pouvant se superposer etc), plus la supermolécule sera stable. Mais il faut noter que souvent, l'énergie globale de stabilisation du complexe récepteur-substrat est plus importante que celle de la somme de toutes les interactions mises en jeu, et considérées indépendamment les unes des autres. Cette observation est due à la pré-organisation du récepteur et correspond à un effet dit chélate.³⁰ En effet, en solution un substrat contracte des interactions avec des molécules de solvant « individuelles », et après la formation du complexe, les molécules de solvants relarguées augmentent le nombre global d'entités chimiques par rapport à l'état initial non complexé, ce qui favorise entropiquement la formation de la supermolécule.

²⁶ E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1894**, 27, 2985-2993.

²⁷ S. Mecozi; J. J. Rebek, *Chem. A Eur. J.*, **1998**, 4, 1016-1022.

²⁸ C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 7017-7036

²⁹ E. V. Anslyn, D. A. Dougherty, *Modern Physical Organic Chemistry* ; University Science Books, **2006**.

³⁰ R-E. Eastes, F. Daumarie-Vedrenne, *Le Bup*, n°**899**(2) p52-64

De plus, si la connexion entre les sites d'interactions est telle que l'hôte soit cyclique, une stabilisation supplémentaire est observée (figure 6). Elle provient du fait que l'on ne paye pas le coût énergétique que demanderait l'enroulement du récepteur acyclique autour du substrat, on parle d'effet macrocyclique.^{31 32}

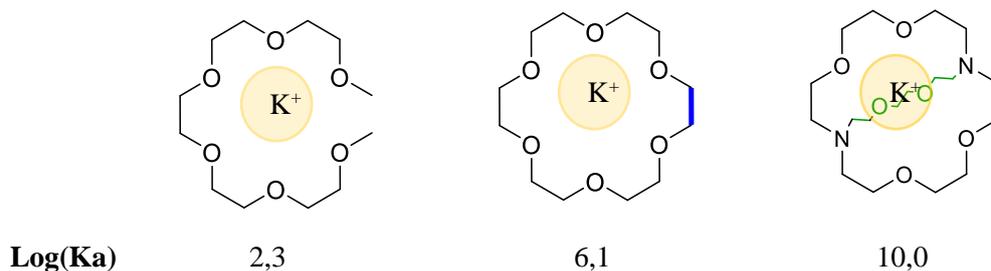


Figure 6 : Constantes d'association entre le potassium et trois récepteurs (de gauche à droite : podand, éther couronne et cryptand) mesurée dans le méthanol à 25°C, contre ion Cl⁻.

Il existe ainsi une large gamme de récepteurs synthétiques que l'on classe aujourd'hui en différentes familles - dont une partie est représentée figure 7 - mettant à profit tous ces critères de compatibilité : formes et tailles variables, nombre et nature des interactions, récepteurs cycliques voire polycycliques, cylindriques ou coniques. Et chaque famille présente des caractéristiques telles qu'elles sont spécialisées dans la reconnaissance d'un nombre limité de substrats.

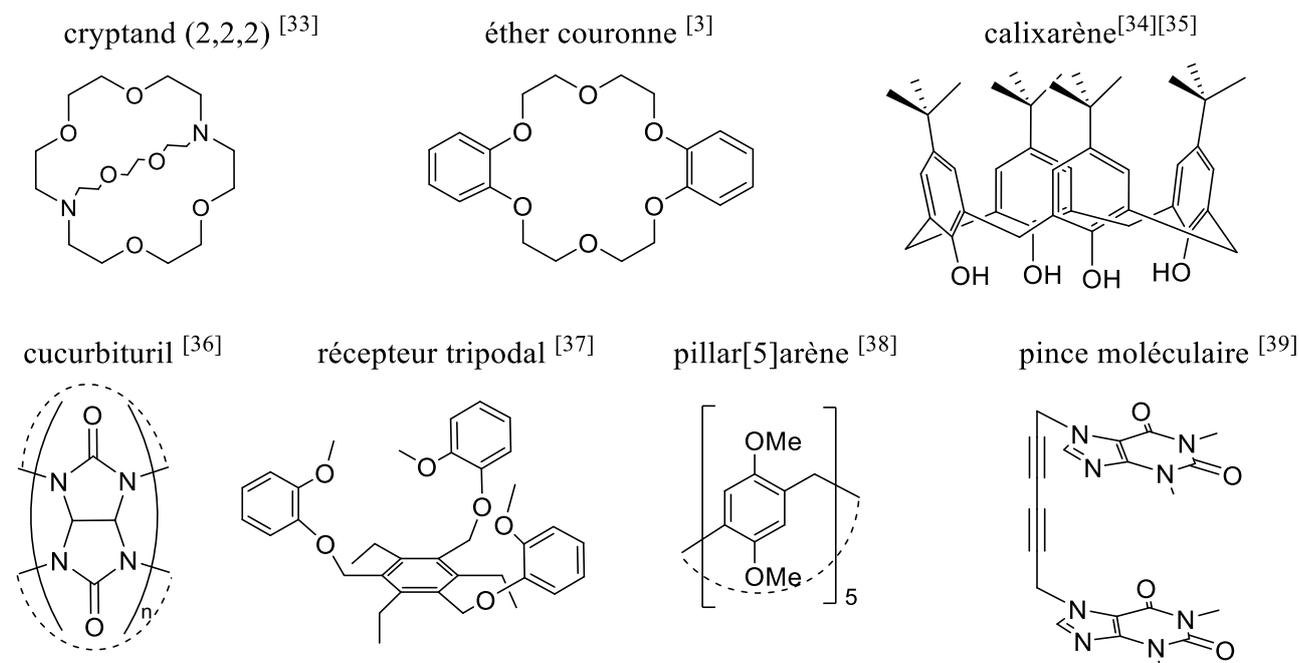


Figure 7 : Structures de quelques récepteurs moléculaires ^{33 34 35 36 37 38 39}

³¹ J. W. Steed ;J. L. Atwood, *Supramolecular chemistry*; Chichester . John Wiley, **2009**.

³² D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, 25, 1039-1057.

³³ M. Castaing, F. Morel, J-M. Lehn, *J Membr Biol.*, **1986**, 89(3), 251-267.

³⁴ C. D. Gutsche and Royal Society of Chemistry (Great Britain), *Calixarenes : an introduction*, RSC Pub., Cambridge, **2008**.

³⁵ C. K. W. Sliwa, *calixarenes and resorcinarenes: synthesis, properties and applications*, Wiley-VCH, **2009**.

³⁶ J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 4844-4870.

³⁷ B. Kuswandi, Nuriman, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Sensors*, **2006**, 6(8) 978-1017

³⁸ T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. Yamagishi, Y. Nakamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130 (15), 5022–5023

³⁹ M. Hardouin-Lerouge, P. Hudhomme, M. Salle, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 30-43.

La reconnaissance moléculaire s'étend aussi à la complexation d'entités biologiques, et donc, d'hôtes chiraux (Figure 8). La chimie de synthèse des récepteurs a donc évolué dans ce but en greffant des centres stéréogènes sur des récepteurs achiraux au départ, et/ou en utilisant des récepteurs formés de sous unités dotées d'une chiralité inhérente comme des cyclodextrines à base de sucres énantiopurs, ou les cryptophanes (chiralité planaire du cyclotribenzylène, voir 1.4.1).

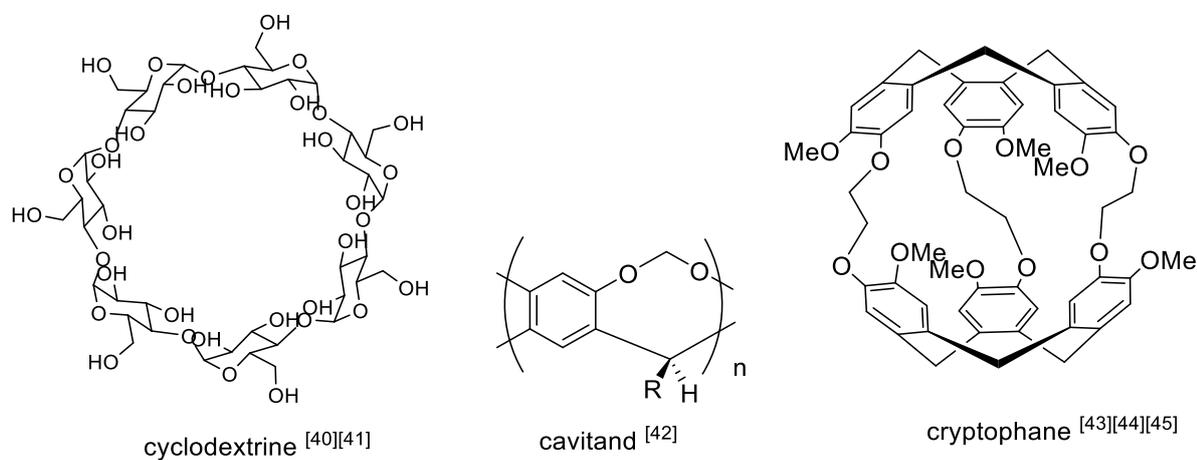


Figure 8 : Exemples de récepteurs moléculaires chiraux ^{40 41 42 43 44 45}

1.3.2. La chimie supramoléculaire au service de la catalyse

1.3.2.1. Interactions non covalentes et catalyse

La chimie supramoléculaire joue également un grand rôle dans le cadre de la catalyse. ⁴⁶ En effet, un catalyseur est une entité chimique capable de modifier la cinétique d'une transformation chimique sans être modifié, ni même intervenir dans l'équation bilan de la réaction. Au cours du mécanisme d'une réaction catalysée, plusieurs entités sont mises en présence (métal, ligand, substrat, éventuel contre ion, organocatalyseur ...). Catalyseur et substrat réagissent, formant et brisant des liaisons covalentes de façon à améliorer la cinétique de la transformation chimique du substrat en abaissant l'énergie d'activation d'étapes cinétiquement déterminantes. La chimie supramoléculaire peut apporter un plus, en créant des interactions non covalentes entre ces différents acteurs. Un exemple connu de la littérature est celui de l'effet N-H dans le cadre de l'hydrogénation de liaison C=O en présence d'un catalyseur de ruthénium (II) (figure 9).

Dans cet exemple, on observe une forte amélioration de la cinétique de la réaction en présence d'amine primaire et l'entrée 3 du tableau de la figure 9 prouve que la liaison N-H est indispensable à cette progression. ⁴⁷ Ceci a été rationalisé, et c'est l'existence d'une liaison hydrogène entre la fonction amine portée par le catalyseur et le réactif qui accélère la réaction.

⁴⁰ J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1753.

⁴¹ E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **2004**, 39, 1033-1046.

⁴² A. Collet, J. P. Dutasta, B. Lozach and J. Canceill, *Top. Curr. Chem.*, **1993**, 165, 103-129.

⁴³ T. Brotin, J. P. Dutasta, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 88-130.

⁴⁴ M. J. Hardie, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 516-527.

⁴⁵ R. Pinalli, M. Suman and E. Dalcanale, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 451-462.

⁴⁶ M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferranab, P. W. N. M. van Leeuwen, *Chem. Soc. Rev.*, 2014 **43**, 1660-1787

⁴⁷ B. Zhao, Z. Han, K. Ding, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 2-47.

Cette notion d'effet N-H, et plus généralement, l'ajout d'interactions faibles (interaction π - π par exemple⁴⁸) dans le cadre de la catalyse, a été dérivée et amplement valorisée de façon à contrôler à la fois la régiosélectivité⁴⁹ mais aussi la stéréosélectivité^{50 51} de réactions catalysées. Mais la chimie supramoléculaire s'est surtout démarquée en utilisant les propriétés de reconnaissance de récepteurs moléculaires au service de la catalyse.

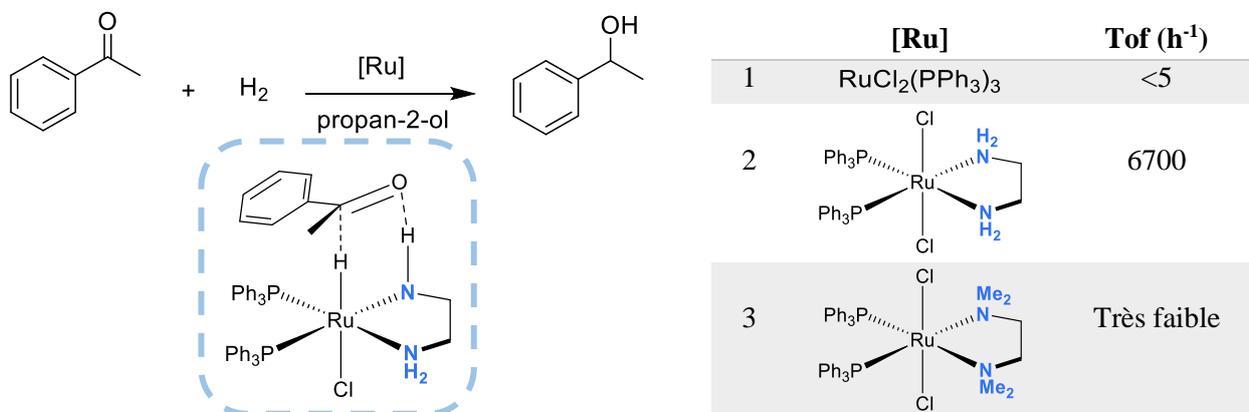


Figure 9 : Mise en évidence de l'apport d'interactions faibles en catalyse : la présence d'une liaison N-H...O entre catalyseur et substrat accélère la réaction de réduction de cétone.

1.3.2.2. Supermolécules et catalyse

Nous avons déjà montré que les supermolécules étaient dotées de propriétés de reconnaissance fortement inspirées du fonctionnement de biomolécules comme les enzymes. Cependant, le processus de reconnaissance d'un substrat par une enzyme en biologie n'est pas une fin en soi, mais le plus souvent, le signal de déclenchement d'une cascade de réactions chimiques au cœur de l'enzyme (qui joue le rôle de catalyseur) conduisant à la transformation spécifique du dit substrat. Cette observation a conduit le chimiste à utiliser les supermolécules et leurs propriétés de reconnaissance moléculaire en catalyse. On distingue deux grandes stratégies d'amélioration des propriétés catalytiques à l'aide de récepteurs moléculaires.

❖ L'hôte joue le rôle de catalyseur (figure 10).

Le phénomène d'encapsulation des réactifs peut améliorer la cinétique de leur transformation de diverses manières. D'une part, la proximité spatiale induite par l'encapsulation des réactifs au sein d'un hôte favorise leur rencontre. C'est un peu comme si en solution on augmentait fortement la concentration en chacun des réactifs, ce qui, d'après les lois cinétiques, accélère la vitesse de réaction. D'autre part, la désolvatation des réactifs reconnus par un récepteur précède leur encapsulation, ce qui a pour effet de les activer, et ainsi atténuer l'énergie d'activation de la réaction. Ensuite, les interactions non covalentes qui s'établissent entre l'hôte et les substrats en cours de transformation peuvent donner lieu à une stabilisation de l'état de transition. Pour cela, un critère essentiel concerne la flexibilité du récepteur qui doit être en mesure de s'adapter à la complexation des réactifs, mais aussi à l'évolution de leurs géométries jusqu'à l'état de transition de la réaction. L'implication d'interactions non covalentes est dans ce cas un avantage considérable. Ainsi Sanders, Rebek ou encore Fujita ont amélioré la cinétique de réactions de Diels-Alder en encapsulant diènes et diénophiles dans des récepteurs aux structures variées, respectivement des chaînes entrelacées,⁵² des récepteurs cycliques⁵³ ou des cages supramoléculaires.⁵⁴

⁴⁸ F. Doro, J. N. H. Reek, P. W. N. M. van Leeuwen, *Organometallics*, **2010**, 29, 4440–4447.

⁴⁹ a-T. Smejkal, B. Breit, *Angew. Chem.*, **2008**, 120, 317 ; b-T. Smejkal, D. Gribkov, J. Geier, M. Keller, B. Breit, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 2470.

⁵⁰ K. Mikami, T. Korenaga, M. Terada, T. Ohkuma, T. Pham, R. Noyori, *Angew. Chem.*, **1999**, 38(4), 495-497.

⁵¹ K. Mikami, K. Wakabayashi, K. Aikawa, *Org. Lett.*, **2006**, 8 (8), 1517–1519.

⁵² J. Kang, J. Rebeck Jr, *Nature*, **1997**, 385, 50 -52.

⁵³ M. Nakash, J. K. M. Sanders, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65(22), 7266–7271.

⁵⁴ M. Yoshizawa, M. Tamura, M. Fujita, *Science*, **2006**, 312, 251-254.

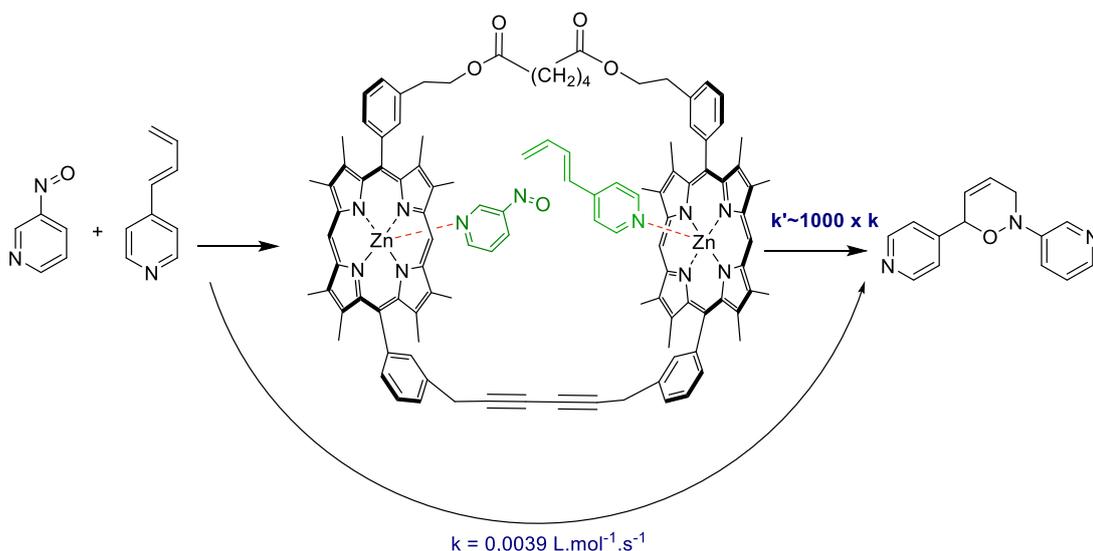


Figure 10 : Exemple de catalyseur utilisant les propriétés de reconnaissance de récepteurs moléculaires : un récepteur cyclique à base de métalloporphyrines augmente jusqu'à un facteur 1000 la vitesse d'une réaction d'hétéro Diels-Alder (les ions Zn^{2+} servant à coordonner les substrats sans jouer le rôle de métallo-catalyseur)⁵³

❖ Le site actif de la catalyse est lié à un site de reconnaissance, mais non inclus dans le récepteur.

Une autre manière d'influencer la cinétique d'une réaction consiste à mettre en place un processus de reconnaissance entre un hôte et une partie du catalyseur ce qui pourra moduler la sélectivité de la réaction considérée pour des raisons stériques. La figure 11 montre deux cyclodextrines capables de reconnaître des unités adamantane d'un ligand phosphoré.⁵⁵ Le complexe de rhodium correspondant devient alors plus sélectif et fixe plus aisément des oléfines peu encombrées pour permettre leur hydroformylation.

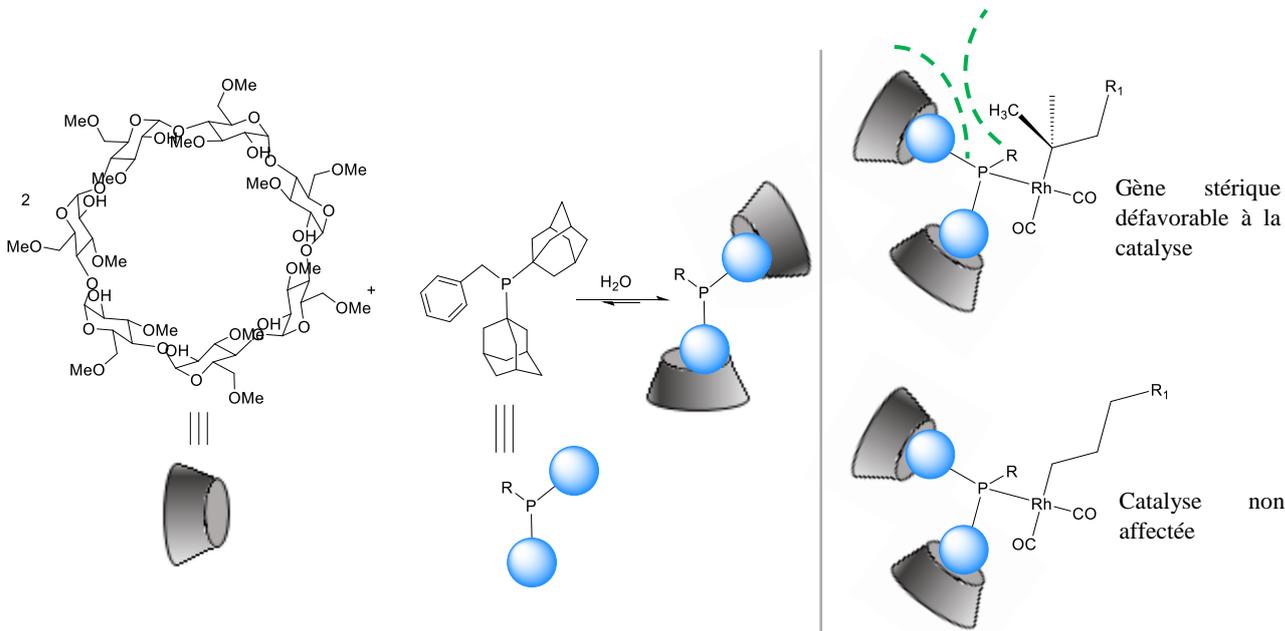


Figure 11 : Utilisation de cyclodextrines fixées sur un complexe de ruthénium pour améliorer la sélectivité du catalyseur métallique vis-à-vis de substrats structurellement proches⁵⁵

Pour aller encore plus loin, il faudrait combiner les avantages des deux catégories précédemment décrites, c'est-à-dire, faire en sorte que le site actif de la catalyse soit au coeur de la cavité du récepteur

⁵⁵ L. Leclercq, A. R. Schmitzer, *Organometallics*, **2010**, 29, 3442–3449.

moléculaire (figure 12). On peut donc bénéficier des avantages propres au processus d'encapsulation (désolvatation, rapprochement des réactifs entre eux et avec le site catalytique..), mais aussi du contrôle de la sélectivité de la réaction via l'orientation des réactifs au sein de la cavité grâce à des interactions non covalentes entre hôte et invité(s). L'enjeu réside alors dans le design d'un récepteur adapté. On représente ci-dessous l'exemple d'un cavitand, lié en périphérie à un site actif de type acide carboxylique, qui améliore la régiosélectivité d'une réaction de cyclisation intramoléculaire d'époxyalcool en orientant le réactif au sein de sa cavité.

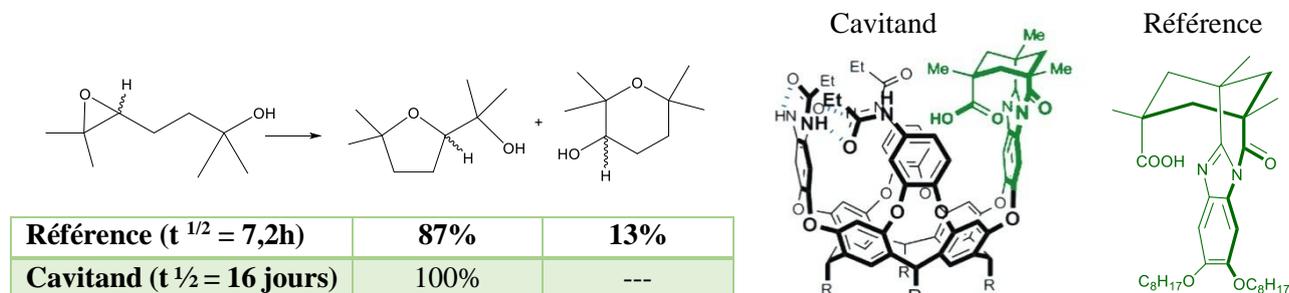


Figure 12 : Un cavitand porteur d'un site organocatalytique accélère une réaction intramoléculaire d'ouverture d'époxyde et améliore la régiosélectivité⁵⁶

Les équipes de J-P. Dutasta à Lyon, et A. Martinez à Marseille développent une catégorie de récepteurs reconnus pour leurs propriétés de reconnaissance de molécules impliquées dans des processus biologiques, mais qui, fonctionnalisés de manière adéquate, ont aussi la capacité de complexer des métaux de transition d, constituant alors de bons catalyseurs supramoléculaires. Nous allons à présent nous focaliser sur ces structures porteuses d'un groupe caractéristique : le CTB (cyclotribenzylène).

1.4. Le cas des molécules comportant l'unité CTB

1.4.1. Description de l'unité CTB

1.4.1.1. Présentation

L'unité cyclotribenzylène est un trimère de type orthocyclophane c'est-à-dire formé de cycles benzéniques reliés en positions ortho par des ponts méthylène, et pouvant être substitués sur les deux autres positions (figure 13a).

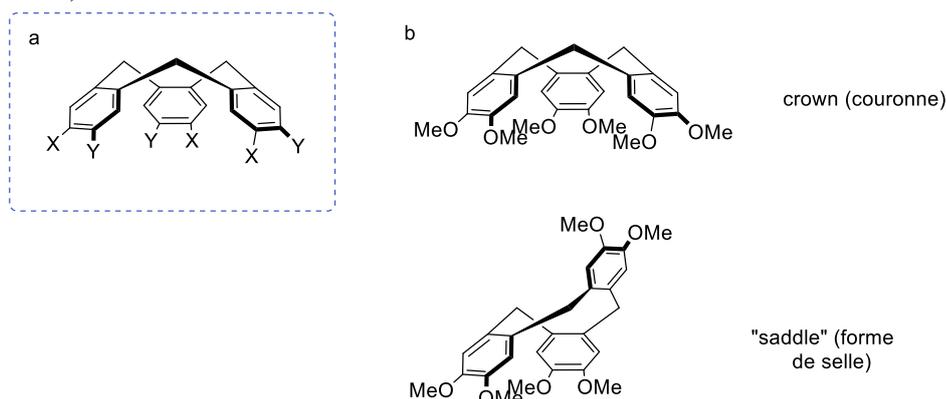


Figure 13 : a- Formule générale d'un CTB b- représentation des principales conformations du CTB

Même si les premières synthèses de CTB datent du début du XX^{ème} siècle, ce n'est que dans les années 1960^{57 58 59} que cette structure a commencé à intéresser la communauté scientifique. Ce motif présente

⁵⁶ S. R. Shenoy, F. R. P. Crisostomo, T. Iwasawa, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 5658–5659.

⁵⁷ A. Collet, J. P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Topics in Current Chemistry*, **1993**, 165, 103-129.

⁵⁸ A. S. Lindsey, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 1685-1692.

⁵⁹ A. Goldup; A. B. S. Morrison, G.W., *J. Chem. Soc.*, **1965**, 3864-3865.

généralement une symétrie C_3 ainsi qu'une forme d'hémisphère – souvent nommée couronne- pouvant constituer un bon récepteur moléculaire (section 1.4.1.4.). Il faut cependant garder à l'esprit que le CTB peut se décliner sous d'autres conformations (peu favorables) comme celle appelée « saddle » (figure 13-b) récemment isolée et caractérisée.⁶⁰ On dénombre aujourd'hui une grande diversité de structures de CTB plus ou moins sophistiquées (figure 14).

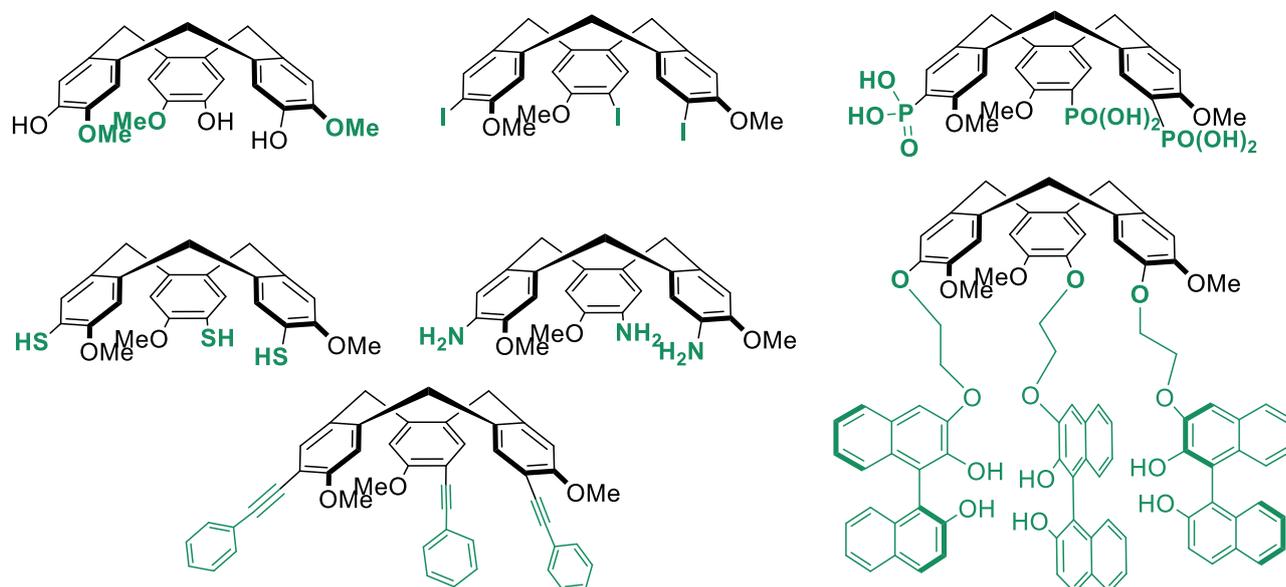


Figure 14 : Exemples de CTB fonctionnalisés par des alcools, éthers, amines,⁶¹ thiols, halogène,⁶² phosphate,⁶³ phénylacétylène,⁶⁴ ou avec l'ajout de chaînes fonctionnalisées de type binaphtol⁶⁵

1.4.1.2. Synthèse

Un macrocycle CTB s'obtient via une triple réaction d'alkylation de Friedel et Crafts (substitution électrophile aromatique - SeAr) à partir d'un alcool benzylique (historiquement de vératrole + formaldéhyde).⁶⁶ Cet alcool n'est pas choisi au hasard (figure 15) : le substituant X joue un rôle important dans l'activation de la nucléophilie de la position en para. On privilégie donc les groupements à effet mésomère donneur. Le substituant Y n'a pas d'effet électronique mais sert à protéger des substitutions secondaires sur cette position. Enfin, cette réaction est catalysée en milieu acide, de types Brønsted (HCOOH, HClO₄, voire H₂SO₄) ou Lewis, (P₂O₅, Sc(OTf)₃ dans l'acétonitrile) et peut donner lieu à la formation d'oligomères plus grands comme produits secondaires (essentiellement le tétramère).^{66 67}

⁶⁰ H. Zimmermann, P. Tolstoy, H-H. Limbach, R. Poupko, Z. Luz, *J. Phys. Chem.*, **2004**, *108*, 18772-18778.

⁶¹ M. J. Hardie, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 516-527.

⁶² a- J. Sanseverino, J. C. Chambron, E. Aubert, E. Espinosa, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 1914-1917 b- T. Traoré, L. Delacour, S. Garcia-Argote, P. Berthault, J.-C. Cintrat, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 960-962.

⁶³ L. Peyrard, S. Chierici, S. Pinet, P. Batat, G. Jonusauskas, N. Pinaud, P. Meyrande, I. Gosse, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 8489-8994.

⁶⁴ L. Peyrard, M-L. Dumartin, S. Chierici, S. Pinet, G. Jonusauskas, P. Meyrand, I. Gosse, *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 7023-7027.

⁶⁵ Thèse de Sara Lefèvre, *Synthèse de récepteurs cyclotribenzylène et hémicryptophane. Propriétés chiroptiques, reconnaissance moléculaire et fluorescence*, **2016**, université de Lyon.

⁶⁶ A. Collet, *Tetrahedron*, **1987**, *43*(24), 5725-5759.

⁶⁷ J.D. White, B.D. Gesner, *Tetrahedron*, **1974**, *30*, 2273-2277.

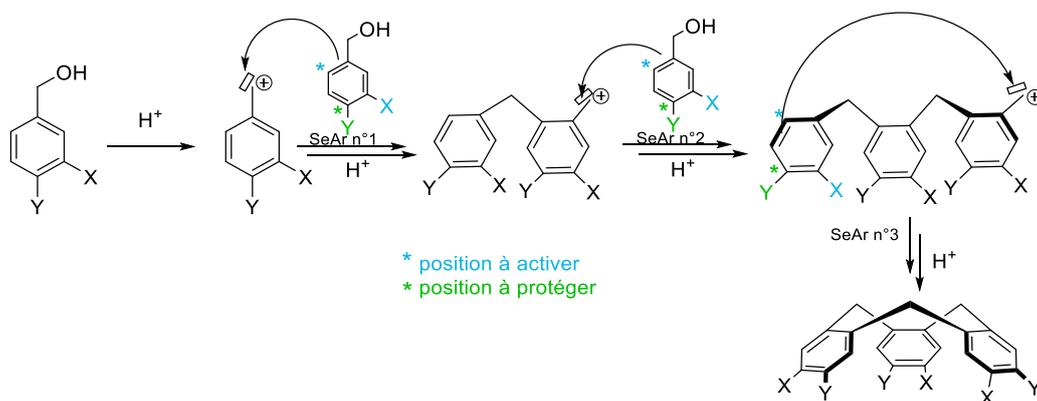


Figure 15 : Mécanisme partiel de formation d'un CTB

1.4.1.3. Chiralité

Si les substituants X et Y portés par un CTB sont différents, on obtient alors une molécule chirale. La chiralité mise en jeu est dite planaire et on distingue deux configurations, nommées M et P. (figure 16)

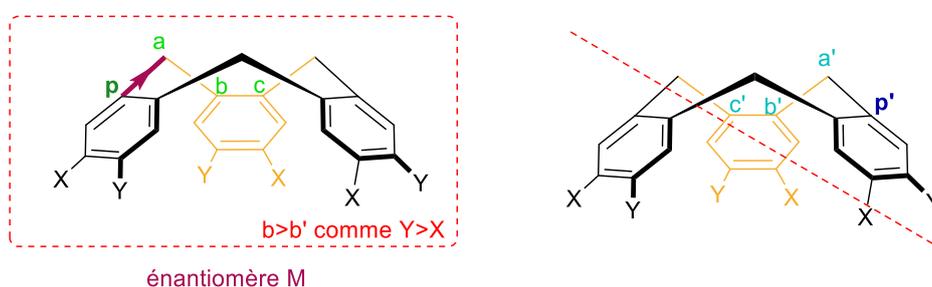


Figure 16 : Détermination de la configuration P ou M d'un CTB, Y étant un substituant prioritaire devant X au sens de Cahn Ingold et Prelog : on se fixe un plan de chiralité parmi les 3 que comporte le CTB (orange), on trouve 2 atomes pilotes (1^{er} atome hors du plan de chiralité, lié à un atome de ce plan) potentiels, **p** et **p'**. Partant de chaque atome pilote, on classe les atomes du plan de chiralité selon les règles de Cahn, Ingold et Prelog $a > b > c$ et $a' > b' > c'$. Or, b est prioritaire devant b', on sélectionne alors l'atome pilote **p**. En regardant la liaison de **p** vers le plan de chiralité les atomes a,b,c tournent dans le sens anti-horaire, ce qui correspond à une configuration **M**.⁶⁸

Les 1^{ères} mesures d'activité optique de CTB ont eu lieu en 1966.⁶⁹ Depuis, d'autres caractérisations de l'activité optique de CTB énantio-purs sont possibles. En particulier, le dichroïsme circulaire électronique permet de déterminer la configuration absolue des CTB. Cette technique expérimentale nécessite la présence de chromophores absorbant dans l'UV-visible sur la molécule à analyser.

C'est le cas du CTB possédant 3 cycles aromatiques. Le principe est le suivant : l'échantillon est irradié successivement par une lumière polarisée circulairement droite puis gauche sur une gamme de longueurs d'onde donnée. Si la molécule est chirale, elle n'absorbe pas les deux lumières de manière équivalente, et on peut alors tracer un spectre correspondant à la différence $\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$ des coefficients d'absorption en fonction de la longueur d'onde.⁶⁸ En présence d'un unique chromophore le spectre est une bande d'absorption positive pour un énantiomère et négative pour l'autre. Dans le cas de multiples chromophores, le spectre est plus complexe et montre une succession de bandes d'absorption tantôt positives, tantôt négatives. Mais les spectres de chaque énantiomère demeurent images miroir l'un de l'autre. La comparaison avec un spectre prédit théoriquement permet d'attribuer les configurations absolues, et/ou la comparaison entre spectres de molécules de structures proches dont une est de configuration connue permet généralement de conclure (si le nombre et la nature des chromophores changent peu).

⁶⁸ A. Collet, J. Crassous, J.-P. Dutasta, L. Guy, *Molécules chirales : stéréochimie et propriétés*; Les Ulis (Essonne). EDP sciences. Paris. CNRS éditions, 2006.

⁶⁹ A. Lüttringhaus K.C. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1966, 78, 603.

La synthèse de CTB aboutit à l'obtention d'un mélange racémique puisque les libres rotations au niveau des ponts méthylène permettent le passage d'un énantiomère à l'autre. La première méthode de séparation des CTB énantiopurs passait par la synthèse de diastéréoisomères et leur séparation, mais on est aujourd'hui en mesure de les séparer par HPLC sur support chiral. A l'institut des sciences moléculaires de Marseille, M. Jean et N. Vanthuyne, peuvent dédoubler le CTB où les groupes X et Y sont respectivement $-OMe$ et $-OCH_2CH_2Br$ (qui est un intermédiaire de synthèse important ⁷⁰) à l'échelle du gramme en moins d'une journée (figure 17).

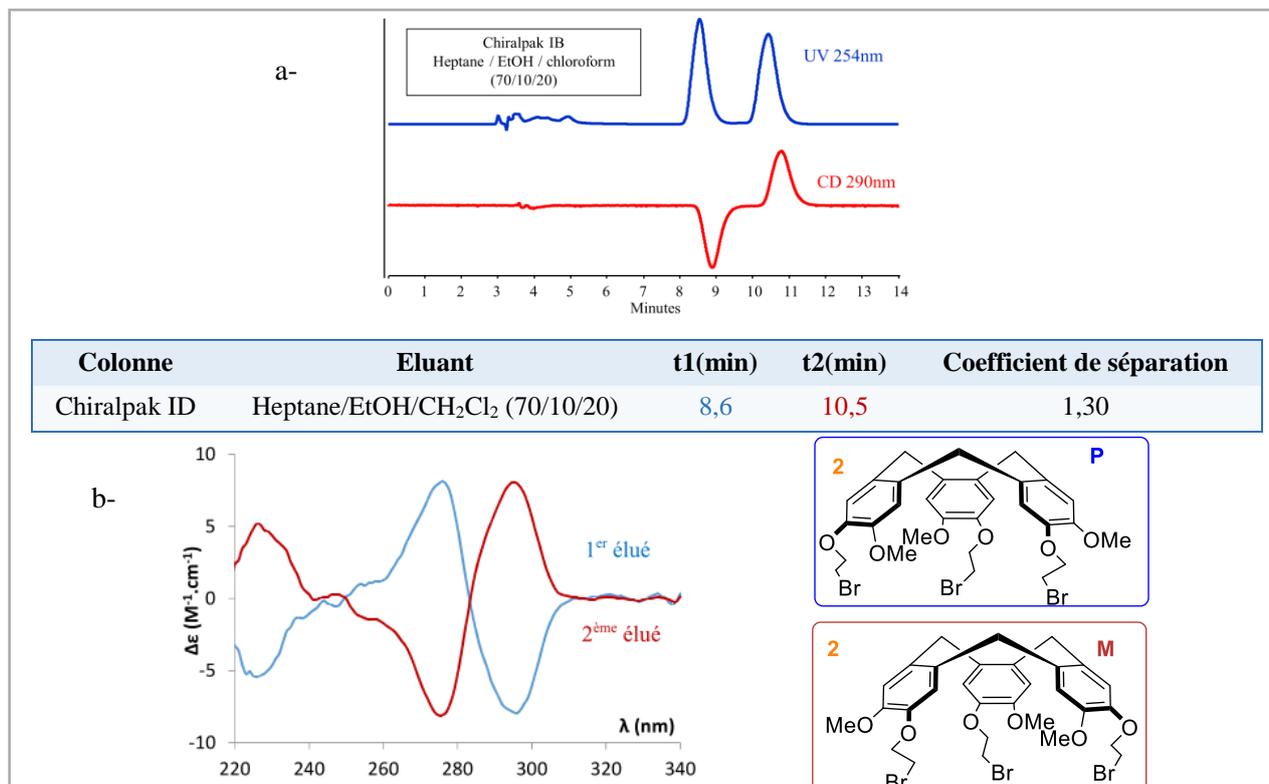


Figure 17 : a-chromatogrammes et paramètres de séparation sur HPLC chirale d'un mélange racémique de **2** ^{65,70} b- spectres ECD des deux énantiomères du CTB bromé **2** (CH₃CN, 1^{er} élué : c = 2,39.10⁻⁴ M ; 2nd élué : c = 3,56.10⁻⁴ M

1.4.1.4. Applications des CTB

Nous avons pu avoir un aperçu de la diversité de structures des CTB, en particulier via la fonctionnalisation au niveau des groupes X et Y ce qui permet de les utiliser dans plusieurs domaines, le plus courant étant la reconnaissance moléculaire. La présence de cycles benzéniques offre en effet la possibilité de former des interactions multiples π -cation ou π -anion menant à la reconnaissance de petites entités chargées comme des cations alcalins ⁷¹, des ammoniums, ⁷² voire même des cations de métaux de transition f. ⁷³

Les anions, plus difficiles à complexer car plus volumineux, ont aussi été reconnus par des CTB modifiés de façon à générer des interactions non covalentes additionnelles aux π -anion. ^{74,75} Enfin, des molécules non chargées mais riches en aromatiques comme des fullerènes sont de bons substrats pour des récepteurs CTB grâce à l'existence de nombreuses interactions π - π stabilisant le complexe. ⁷⁶

⁷⁰ S. Lefevre, D. Zhang, E. Godart, M. Jean, N. Vanthuyne, J.-C. Mulatier, J.-P. Dutasta, L. Guy, A. Martinez, *Chem. Eur. J.*, **2016**, 22, 2068-2074.

⁷¹ M. J. Hardie, R. Ahmad, C. J. Sumbly, *New Journal of Chemistry*, **2005**, 29, 1231-1240.

⁷² J. A. Hyatt, *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 1808-1811.

⁷³ H. H. Dam, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *New Journal of Chemistry*, **2007**, 31, 1620-1632.

⁷⁴ O. Reynes, F. Maillard, J.-C. Moutet, G. Royal, E. Saint-Aman, G. Stanciu, J.-P. Dutasta, I. Gosse, J.-C. Mulatier, *J. Organometallic Chem.*, **2001**, 637-639.

⁷⁵ K. Travis Holman, G. William Orr, J. L. Atwood, J. W. Steed, *Chem. Commun.*, **1998**, 2109-2110.

⁷⁶ J. W. Steed, P. C. Junk, J. L. Atwood, M. J. Barnes, C. L. Raston, R. S. Burkharter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 10346-10347.

Les autres champs d'application des CTB font davantage appel à des polymères ou des assemblages supramoléculaires de couronne CTB en chimie des matériaux (gels polymères).⁶¹ J-C. Chambron les utilise aussi dans le cadre de la chimie combinatoire dynamique.⁷⁷ Ainsi le motif CTB constitue plutôt une brique intermédiaire de synthèse vers des molécules plus complexes. Nous allons dans la suite présenter des molécules comportant deux unités CTB appelées cryptophanes.

1.4.2. Les cryptophanes

Les cryptophanes sont des molécules en forme de cage, de la famille des hémicarcérands, constituées de deux unités CTB qui se font face et reliées par trois bras espaceurs de taille variable. La synthèse des cryptophanes a été largement développée par A. Collet à partir de 1981⁷⁸ puis s'est diversifiée avec la contribution d'autres équipes dont celles de J-P. Dutasta et T. Brotin à Lyon,⁷⁹ P. Berthault⁸⁰ à Paris, I.J. Dmochowski en Pennsylvanie,⁸¹ L. Schröder⁸² à Berlin, ou encore A. Pines à Berkeley.⁸³ Pour nommer ces molécules, on disposait d'une nomenclature arbitraire uniquement à base de lettres majuscules, correspondant à l'ordre de leur découverte, mais qui s'est par la suite précisée. On nomme maintenant un cryptophane en fonction de la longueur de chaîne des bras espaceurs que l'on indique entre crochets, et de la nature des substituants des deux entités CTB qui le constituent (figure 18).

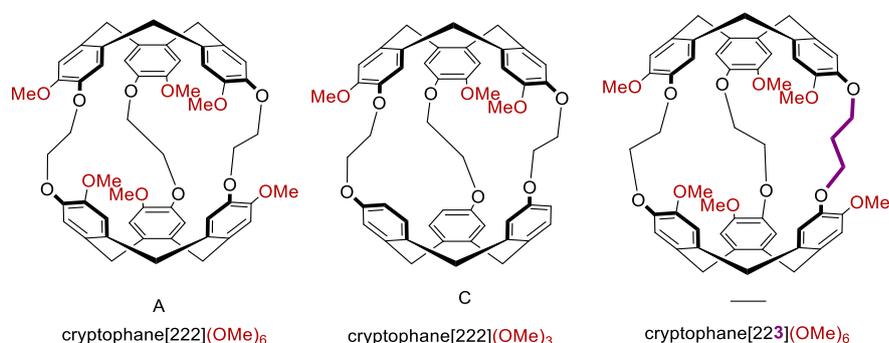
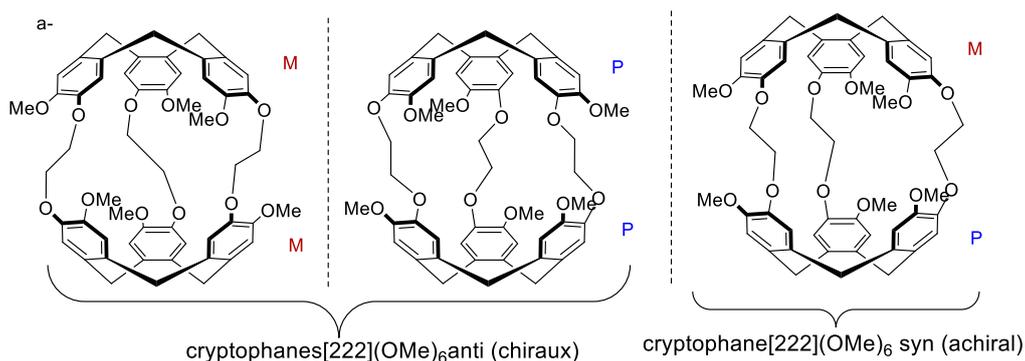


Figure 18 : Structure et nomenclature de quelques cryptophanes

Etant formé de deux CTB à présent liés l'un à l'autre, l'orientation d'un « chapeau » par rapport à l'autre a son importance, et il existe des conformations (figure 19-b) variées de cryptophane. Enfin, pouvant individuellement être de configuration P ou M, un cryptophane peut exister sous différentes configurations (figure 19-a)



⁷⁷ J. Sanseverino, J-C. Chambron, E. Aubert, E. Espinosa, *J.Org.Chem.*, **2011**, 76, 1914–1917.

⁷⁸ J. Gabard, A. Collet, *Chem. Commun.*, **1981**, 1137.

⁷⁹ T. Brotin, J-P. Dutasta, *Chem. Rev.*, **2009**, 109 (1), 88–130.

⁸⁰ T. Traoré, L. Delacour, S. Garcia-Argote, P. Berthault, J-C. Cintrat, B. Rousseau, *Org. Lett.*, **2010**, 12 (5), 960.

⁸¹ N.S. Khan, B.A. Riggle, G.K. Seward, Y. Bai, I.J. Dmochowski, *Bioconjugate Chem.*, **2015**, 26 (1), 101.

⁸² R. Tyagi, C. Witte, R. Haagand, L. Schröder, *Org. Lett.*, **2014**, 16 (17), 4436–4439.

⁸³ K. K. Palaniappan, M. B. Francis, A. Pines, D.E. Wemmer, *Isr. J. Chem.*, **2014**, 54, 104 – 112.

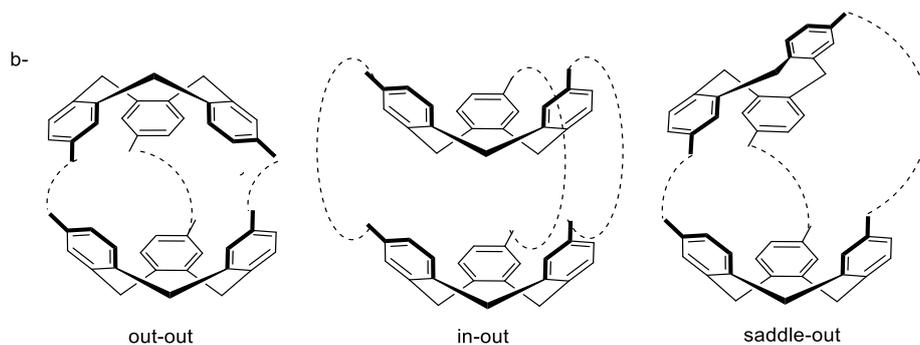


Figure 19 : Différentes configurations (a) d'un même cryptophane et (b) diverses conformations pouvant être adoptées par un cryptophane.

Les cryptophanes sont tous comme les CTB utilisés dans le cadre de la reconnaissance de petites entités chimiques cationiques, anioniques ou neutres. L'efficacité en terme de complexation de substrats est accrue puisqu'on dispose d'un nombre deux fois plus important d'interactions non covalentes (π -cation π -anion ou π - π) et surtout grâce à la structure de cage de ces récepteurs qui encapsulent plus efficacement leurs invités. La tendance actuelle consiste à rendre possible ces phénomènes de reconnaissance en milieu biologique, donc, dans un premier temps, en milieu aqueux pour le chimiste, et ce à des concentrations raisonnables pour des applications en biologie. Or, un cryptophane de type [222](OMe)₆ constitue un objet hydrophobe compte tenu du grand nombre de cycles aromatiques et de chaînes carbonées caractérisant son squelette. Différentes stratégies de fonctionnalisation de cryptophanes, en vue de les rendre hydrosolubles, ont déjà été explorées (figure 20) : utilisant par exemple l'introduction de complexes de métaux de transition aboutissant à une molécule cage globalement polychargée,⁸⁴ ou l'ajout de fonctions ou groupes organiques susceptibles d'interagir avec des molécules d'eau via l'instauration de nombreuses liaisons hydrogène.⁸²

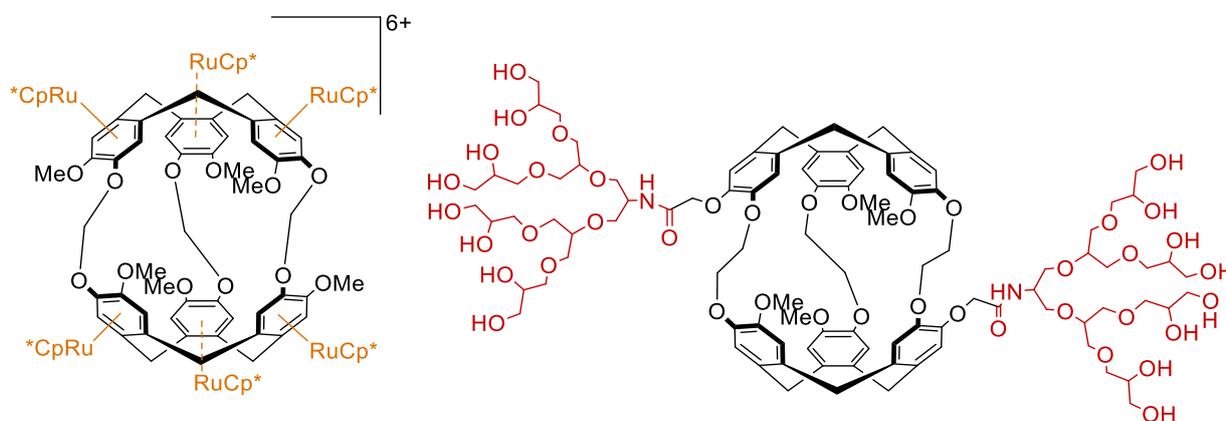


Figure 20 : Exemples de cryptophanes hydrosolubles.

Les cryptophanes, même s'ils sont plus évolués qu'un simple récepteur CTB, souffrent d'une trop grande symétrie intrinsèque à leur structure, qui tend à limiter la gamme de structures accessibles et donc la diversité de domaines d'application envisageables pour des récepteurs en forme de cage. Nous avons évoqué en début de chapitre notre volonté de combiner les propriétés de reconnaissance de récepteurs moléculaires, à l'intégration de site catalytique au cœur d'une cavité. Les équipes d'A. Martinez et de J-P. Dutasta ont développé la synthèse de récepteurs hétéroditopiques pouvant remplir ces deux fonctions : les hémicryptophanes.

⁸⁴ R.M. Fairchild, A.I. Joseph, K.T. Holman, H.A. Fogarty, T. Brotin, J-P. Dutasta, C. Boutin, G. Huber, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 15505.

1.4.3. Les hémicryptophanes (HC)

1.4.3.1. Présentation

Les hémicryptophanes sont composés d'une unité CTB reliée via trois bras espaceurs à une seconde unité de symétrie C_3 mais distincte d'un CTB. Même si le terme hémicryptophane n'apparaît qu'au milieu des années 1990,⁸⁵ leur découverte par A. Collet et J.-M. Lehn a eu lieu en 1982, date à laquelle ils reportent la synthèse du premier hémicryptophane⁸⁶ formé d'un CTB tri-méthoxy et d'un éther couronne. Il a effectivement fallu près de 15 ans avant de mettre au point des synthèses de nouveaux hémicryptophanes aux formes très variables (figure 21).

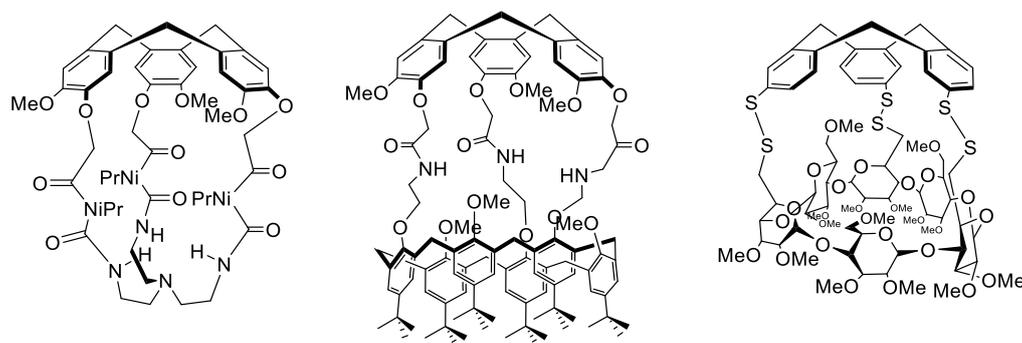
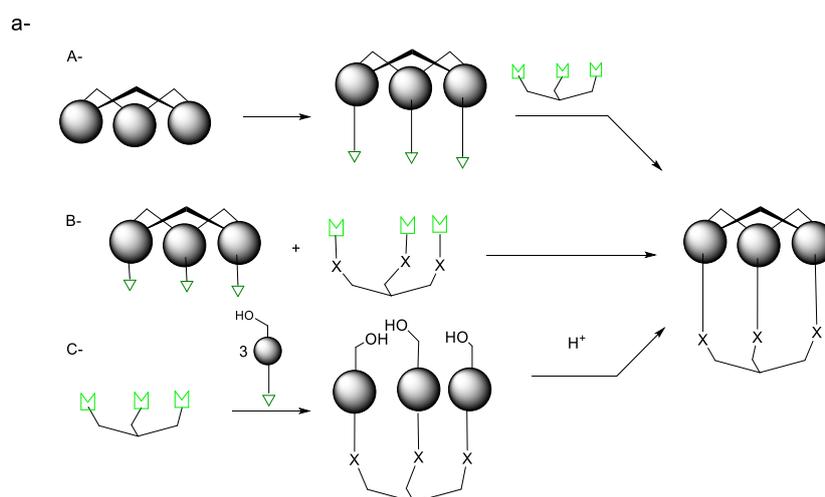


Figure 21 : Exemples d'hémicryptophanes décrits dans la littérature^{87 88 89}

Il existe principalement trois voies de synthèse de ces molécules cages, schématisées figure 22-a: la voie A consiste à partir d'un CTB, puis de le fonctionnaliser afin d'allonger les bras espaceurs avant de coupler l'intermédiaire obtenu avec la seconde unité C_3 de la molécule. Un exemple concret est présenté figure 22-b. La seconde voie est un couplage direct entre deux unités C_3 . Enfin la voie C, démarre par la construction ou l'utilisation d'un tripode commercial qui fera face au CTB, puis on le fonctionnalise et on y greffe des bras espaceurs porteurs en bout de chaîne d'un précurseur de cyclisation de CTB de type alcool benzylique. La fermeture de la cage est alors réalisée par le haut, en milieu acide dans des conditions similaires à celle de la cyclisation d'un CTB.



⁸⁵ A. Collet, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 2 (Eds.: J. L. Atwood, J.E. D. Davies, F. Macnicol, F. Vögtle and J. M. Lehn), Pergamon, Oxford, **1996**.

⁸⁶ J. Canceill, A. Collet; J. Gabard, F. Kotzyba-Hibert, J.-M. Lehn, *Helvetica Chimica Acta*, **1982**, 65, 1894-1897.

⁸⁷ D. G. Rivera, L. A. Wessjohann, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 7122-7123.

⁸⁸ S. Le Gac, I. Jabin, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 548-557.

⁸⁹ F. Bregier, J. Lavalle, J. C. Chambron, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 2666-2671.

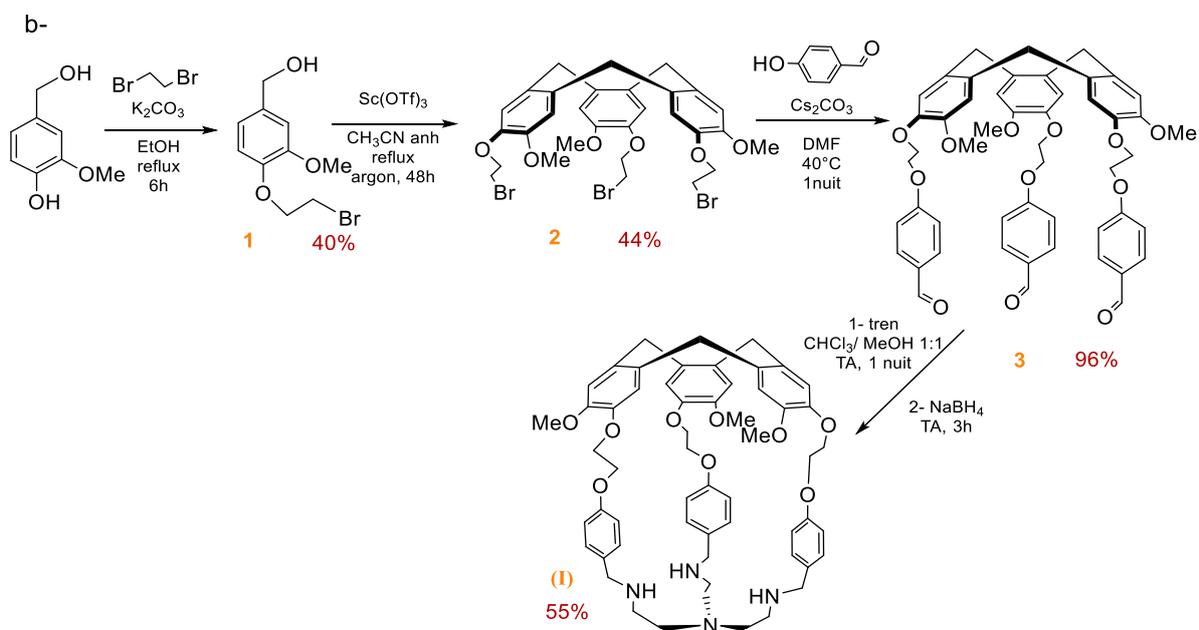


Figure 22 : a- Représentation schématique des trois voies de synthèse d'hémicryptophanes. b- Conditions opératoires pour la synthèse d'un hémicryptophane (I) de type tren par la voie A.⁹⁰ (Nous verrons des exemples de synthèse d'hémicryptophanes par la voie B dans les chapitres 2 et 4.)

1.4.3.2. Hémicryptophanes et reconnaissance.

La structure hétéroditopique des hémicryptophanes leur confère des propriétés de reconnaissance moléculaire. On sait déjà que le « chapeau » CTB en haut de la cage peut donner lieu à des interactions avec des entités chargées ou neutres. Il présente cependant une préférence pour les cations, en particulier les ammoniums primaires qui sont localement de symétrie C_3 , et donc de géométrie optimale pour interagir avec un récepteur de même symétrie. Il en est de même pour les hémicryptophanes qui constituent de ce point de vue une version améliorée des CTB. Par exemple, le tripode constituant la partie basse de la cage peut aussi présenter des propriétés de reconnaissance des ammoniums en formant avec ces invités des liaisons hydrogènes, plus stabilisantes que des interactions π -cation. De plus, l'effet d'encapsulation de B est plus marqué que pour le récepteur ouvert A ce qui mène à ses constantes de complexation élevées (figure 23).

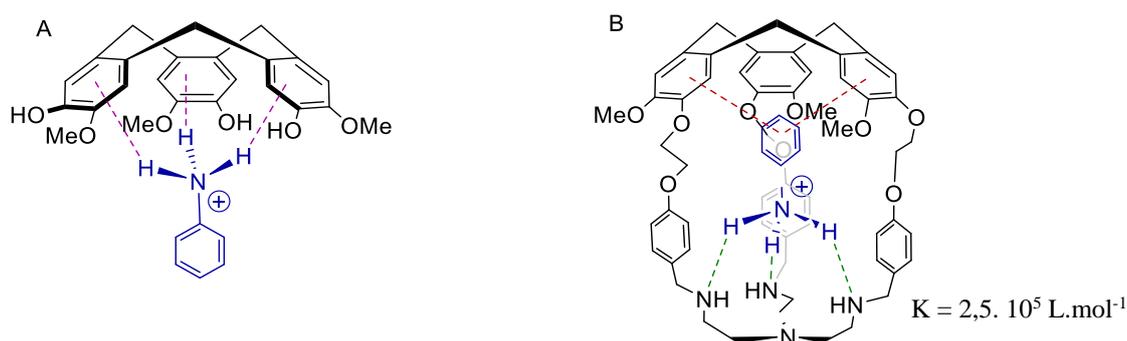


Figure 23 : Comparaison entre la complexation du cation benzylammonium primaire par un récepteur CTB et un hémicryptophane.⁹¹ L'hémicryptophane encapsule mieux l'invité et contracte des interactions de plus haute énergie : liaison hydrogène (vert) > π - π (rouge) > π -HX (violet). Constante d'affinité K déterminée par titration RMN dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95/5)

⁹⁰ B. Châtelet, E. Payet, O. Perraud, P. Dimitrov-Raychev, L-L. Chapellet, V. Dufaud, A. Martinez, J-P. Dutasta, *Org. Lett.*, **2011**, 13 (14), 3706–3709.

⁹¹ O. Perraud, S. Lefevre, V. Robert, A. Martinez, J-P. Dutasta, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 1056-1059.

D'un autre côté, si la partie inférieure de la cavité est conçue de façon à reconnaître les anions - en intégrant un cycle aromatique électro-appauvri par exemple, ou en coordinant un métal chargé positivement (interaction électrostatique) - l'hémicryptophane est alors en mesure d'encapsuler des paires d'ions⁹² et des zwitterions. Ceci a été mis à profit dans le cadre de la reconnaissance de molécules d'intérêt biologique au sein du laboratoire de Lyon ou de Melbourne, avec la complexation de zwitterions comme la taurine,⁹² la carnitine,⁹³ la choline phosphate⁹⁴ par des hémicryptophanes (figure 24).

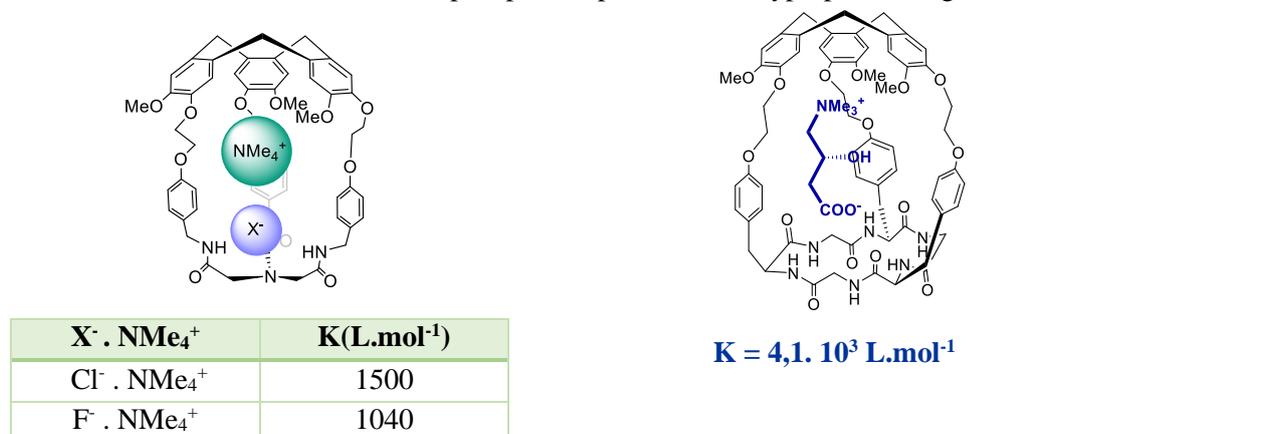


Figure 24 : Exemples de complexes d'hémicryptophanes encapsulant des paires d'ions et des zwitterions^{92 93}

La reconnaissance sélective de sucres, sous leur forme énantiopure, est favorisée par la chiralité de l'unité CTB, et donc des hémicryptophanes, mais aussi grâce à l'intégration d'autres sources de chiralité (centrale ou axiale) lors de la synthèse de ces récepteurs (figure 25). Les diastéréoisomères obtenus sont alors séparables par chromatographie classique même si souvent plusieurs colonnes sont nécessaires. Récemment, une méthode de synthèse énantiospécifique d'une série d'hémicryptophanes tren a été mise au point, à partir de CTB énantiopur,⁷⁰ obtenu par chromatographie chirale.

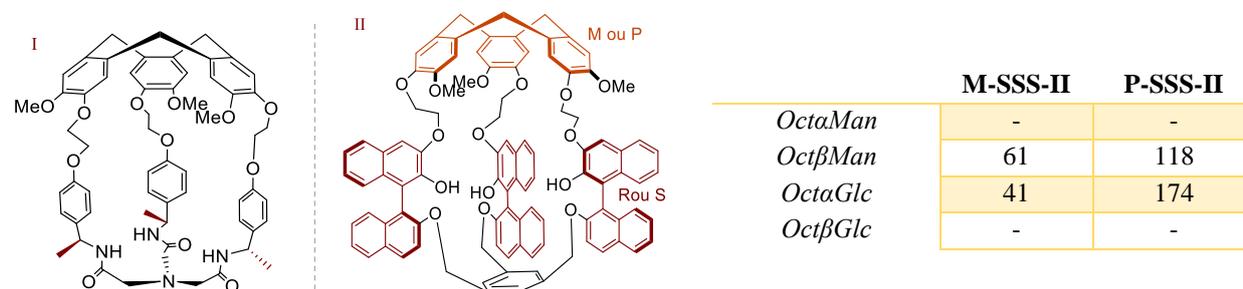


Figure 25 : Exemples de récepteurs hémicryptophanes portant deux sources de chiralité utilisés en reconnaissance sélective de sucres énantiopurs.^{65 95 96} Constantes d'association de 2 stéréoisomères de l'hémicryptophane II avec différents sucres (octylglucopyranoside et octylmannopyranoside), obtenues par titrations RMN ($CDCl_3$, 500MHz).

L'apport des hémicryptophanes ne se résume pas à des progrès dans le cadre de la reconnaissance moléculaire, mais ouvre aussi des portes vers la catalyse en milieu confiné.

⁹² O. Perraud, V. Robert, A. Martinez, and J.-P. Dutasta, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 4177.

⁹³ J. R. Cochrane, A. Schmitt, U. Wille, C. A. Hutton, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 8504 – 8506.

⁹⁴ D. Zhang, G. Gao, L. Guy, V. Robert, A. Martinez, J.-P. Dutasta, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 2679-2682.

⁷⁰ S. Lefevre, D. Zhang, E. Godart, M. Jean, N. Vanthuyne, J.-C. Mulatier, J.-P. Dutasta, L. Guy, A. Martinez, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 2068-2074.

⁶⁵ Thèse de Sara Lefèvre, *Synthèse de récepteurs cyclotribenzylène et hémicryptophane. Propriétés chiroptiques, reconnaissance moléculaire et fluorescence*, **2016**, université de Lyon.

⁹⁵ A. Schmitt, O. Perraud, E. Payet, B. Châtelet, B. Bousquet, M. Valls, D. Padula, L. Di Bari, J.-P. Dutasta, A. Martinez, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 4211.

⁹⁶ S. Lefevre, A. Heloin, D. Pitrat, J.-C. Mulatier, N. Vanthuyne, M. Jean, J.-P. Dutasta, L. Guy, A. Martinez, *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 3199–3205.

1.4.3.3. Hémicryptophanes et catalyse.

Les hémicryptophanes de type tren sont structurellement proches d'organocatalyseurs phosphorés appelés les bases de Verkade, ainsi que leurs acides conjugués les azaphosphatranes, aux multiples applications en synthèse et catalyse organique.⁹⁷ L'insertion du phosphore dans une structure de type hémicryptophane a été réalisée en 2011 dans l'équipe de J-P. Dutasta et A. Martinez,⁹⁸ la version encagée des superbases de Verkade s'est montrée efficace dans le cadre de la catalyse de réactions de Diels-Alder.⁹⁹

Cependant les hémicryptophanes sont aussi propices à des applications en catalyse organométallique (figure 26). Il est en effet possible de choisir la constitution de l'unité basse d'un hémicryptophane et de la fonctionnaliser de façon à obtenir un bon ligand pour des métaux utilisés en catalyse. On peut alors étudier l'effet de confinement du site catalytique par comparaison à des systèmes ouverts, ainsi que jouer sur la taille, l'hydrophobicité, ou la fonctionnalisation de la cavité en modulant la structure des hémicryptophanes.

Aujourd'hui, ce sont les complexes hémicryptophane@vanadium qui sont les plus prometteurs dans le domaine de la catalyse. Alors que certains complexes obtenus présentent des propriétés structurales intéressantes,¹⁰⁰ d'autres structures se sont montrées efficaces en catalyse d'oxydation de composés soufrés.^{101 102} LES complexationS du cuivre et du zinc ont aussi été réalisées. Les complexes de cuivre ont été utilisés dans le cadre de l'oxydation de cycloalcanes,¹⁰³ et ceux de zinc pour l'hydrolyse de carbonate.¹⁰⁴

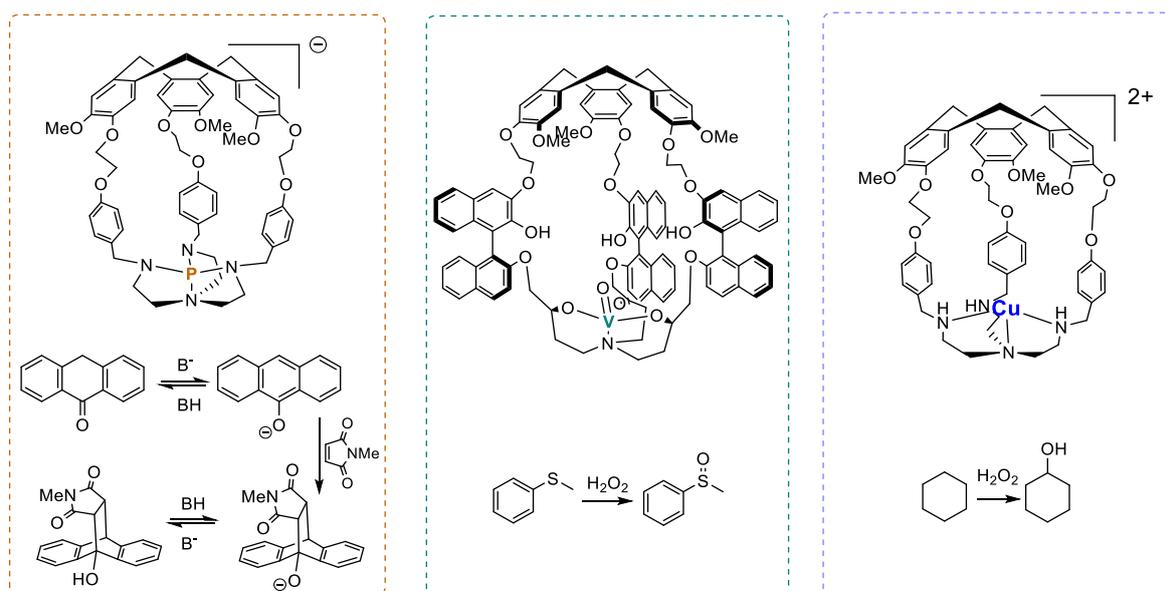


Figure 26 : Quelques catalyseurs de types hémicryptophane et leur utilisation en catalyse organique ou organométallique.

⁹⁷ J. G. Verkade, P. B. Kisang, *Aldrichimica Acta*, **2004**, 37, n°1.

⁹⁸ P. Dimitrov Raytchev, A. Martinez, H. Gornitzka, J-P Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 2157–2159.

⁹⁹ B. Châtelet, V. Dufaud, J-P. Dutasta, A. Martinez, *J. Org. Chem.*, **2014**, 79 (18), 8684–8688.

¹⁰⁰ A. Martinez, V. Robert, H. Gornitzka, J-P. Dutasta, *Chemistry*, **2010**, 16(2), 520.

¹⁰¹ A. Martinez, J-P Dutasta, *Journal of Catalysis*, **2009**, 267, 188–192.

¹⁰² D. Zhang, K Jamieson, L. Guy, G. Gao, J-P. Dutasta, A. Martinez, *Chemical Science*, **2017**, 8, 789.

¹⁰³ O. Perraud, A. B. Sorokin, J-P. Dutasta, A. Martinez, *Chem. Commun.*, **2013**, 13, 1288.

¹⁰⁴ Y. Makita, K. Sugimoto, K. Furuyoshi, K. Ikeda, S. Fujiwara, T. Shin-ike, A. Ogawa, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49 (16), 7220-7222.

1.4.4. Objectifs de la thèse

L'objectif premier de cette thèse consiste à développer un nouveau champ d'application des molécules cages de type hémicryptophane en s'appuyant sur les connaissances déjà acquises sur ces structures. On connaissait les propriétés de reconnaissance des hémicryptophanes, ainsi que leur capacité à complexer des métaux de transition d, pour une utilisation en catalyse. Il s'agit d'aller plus loin en nous intéressant aux métaux de transition f. Cette catégorie de métaux est en effet reconnue pour ses propriétés magnétiques, optiques, et est largement utilisée dans le domaine médical. Le $Gd^{(III)}$ est par exemple communément utilisé en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) pour le diagnostic de diverses pathologies. Les cations $Eu^{(III)}$, $Tb^{(III)}$, $Y^{(III)}$, $Sm^{(III)}$ sont des éléments fluorescents pouvant être au cœur de sondes biomédicales. L' $Ac^{(III)}$ a des propriétés radioactives qui peuvent être mises à profit pour la tomographie par émission de positons. Nous avons donc entamé des recherches visant à mettre au point la synthèse de sondes à base de lanthanides. Isolés, les cations $Ln^{(III)}$ sont toxiques du fait de leur tendance à former des hydroxydes insolubles, bouchant alors les canaux de circulation sanguine. Il faut donc masquer leur toxicité grâce à des ligands adaptés. C'est ici qu'entrent en jeu les hémicryptophanes.

La complexation de cations $Ln^{(III)}$ réclamant 8 à 9 sites de coordination en moyenne (contre 3 à 6 pour les métaux de transition), il a d'abord fallu définir la structure et mettre au point la synthèse d'hémicryptophanes suffisamment fonctionnalisés pour assurer la stabilité des complexes. Nous nous sommes focalisés sur deux types de sondes à base de lanthanides pour concevoir des hémicryptophanes adaptés : des sondes magnétiques et fluorescentes. Le chapitre 2 de cette thèse portera sur les sondes à base de gadolinium dans le but de former de bons agents de contraste en IRM du proton. Dans le cadre de cette méthode d'imagerie par résonance magnétique nous avons aussi travaillé sur la synthèse d'un cryptophane, déjà bien connu en tant que sonde en IRM du xénon, mais cette fois, rendu hydrosoluble par greffage de plusieurs sucres pour une meilleure biocompatibilité. Le cryptophane étudié est reconnu pour sa capacité à encapsuler un atome de xénon de manière efficace, et le complexe [cryptophane hydrosoluble-Xe] résultant pourrait constituer une bonne sonde hydrosoluble dans le cadre de l'IRM au Xe hyperpolarisé. Nous développerons plus en détail cette méthode d'imagerie dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Enfin la synthèse et l'étude de complexes hémicryptophane-lanthanide fluorescents, à base d'euporium et de terbium, feront l'objet du chapitre 4.

L'avantage des hémicryptophanes dans le cadre d'imageries à base de lanthanides, réside dans la possibilité de combiner ultérieurement les propriétés magnétiques du gadolinium, ou optiques des métaux de transition f fluorescents, aux propriétés de reconnaissance des hémicryptophanes. On pourrait ainsi mettre au point des biosondes spécifiques dont le principe de fonctionnement est schématisé figure 27. Ce travail est ainsi le début d'un projet de recherche de plus long terme. Par conséquent, l'essentiel de cette thèse traite de la synthèse de molécules cages fonctionnalisées, ainsi que leur complexation à des entités utilisées en IRM ou fluorescence (lanthanide ou xénon), et je vous présenterai les premiers résultats dans le cadre d'applications concrètes en imagerie.

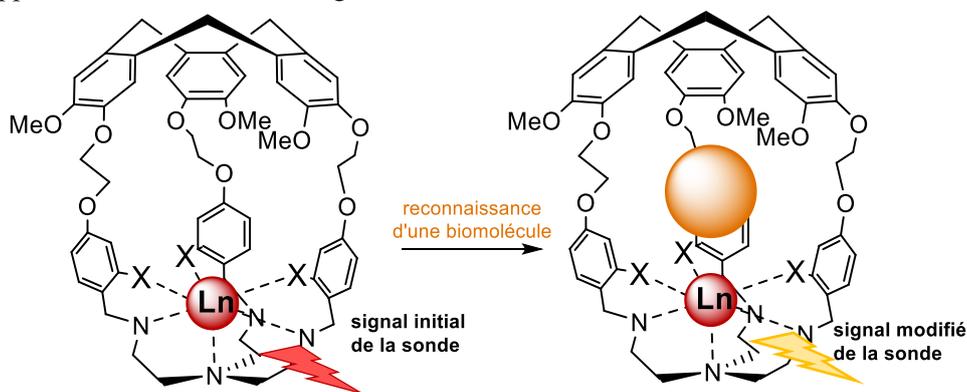


Figure 27 : Principe de fonctionnement des sondes de type hémicryptophane-lanthanide.

Chapitre 2 : Encapsulation de Gd(III) au sein d'hémicryptophanes : vers la conception d'agent de contraste IRM

2.1. L'IRM du proton.

2.1.1. Principe de fonctionnement

2.1.1.1. Généralités sur l'IRM

L'imagerie regroupe plusieurs techniques permettant d'extraire des informations à caractère médical. On classe ces méthodes en fonction de leur résolution, leur sensibilité ou leur caractère invasif. Nous nous intéresserons au cours de ce chapitre à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) du proton, qui donne des images de bonne résolution et présente l'avantage d'être non invasive (tableau 2).

Technique	Avantages	Inconvénients	Résolution	Sensibilité (seuil de détection en mole)
PET	Très sensible	Radioactivité, détection d'un seul noyau radioactif	1-2mm	10^{-15}
CT	Très rapide	Rayons X, mauvaise résolution des tissus mous	50 μ m	10^{-6}
MRI	Non invasif, très bonne résolution	Faible sensibilité	50 μ m	10^{-6} 10^{-9}
Fluorescence	Mise en œuvre facile, peu cher, non invasif	Faible profondeur de pénétration	1-2 mm	10^{-12}
Ultrasons	Rapide, indolore	Peu de contraste et de sensibilité	50 μ m	10^{-8}

Tableau 2 : Les principaux avantages et les limites de plusieurs techniques d'imagerie médicales ^{105 106}

Le fonctionnement de l'IRM est basé sur le principe général de la RMN-¹H, mais la différence entre les deux réside dans la nature des informations extraites des mesures. Alors que la RMN a pour objectif de distinguer l'ensemble des protons d'un échantillon selon leur environnement chimique, l'IRM se focalise sur les protons de l'eau uniquement, et fournit des informations sur la répartition spatiale de ces molécules au sein d'un échantillon ou d'un patient. L'IRM constitue donc une méthode de choix dans le domaine médical puisqu'elle permet de sonder l'ensemble du corps humain, composé à 70% d'eau.

Techniquement, les spins nucléaires des protons de l'eau (assimilables à des aimants), sont orientés sous l'influence d'un champ magnétique global B_0 , puis irradiés par une succession d'impulsions radiofréquence (comme en RMN), ce qui a pour conséquence de les faire basculer dans le plan transverse. Leur retour à l'équilibre, ou relaxation, génère un signal dont l'intensité sera directement liée au nombre de molécules d'eau de l'échantillon (ainsi qu'à d'autres paramètres de relaxation sur lesquels nous reviendrons en 2.1.1.2). C'est ensuite l'utilisation de gradients de champs magnétiques additionnels ¹⁰⁷ qui permet de balayer l'espace selon deux dimensions, et des logiciels de reconstruction d'images donnent aujourd'hui accès à une vision en trois dimensions du patient examiné.

Les images IRM en densité de protons ainsi obtenues permettent de distinguer différents tissus en fonction de la quantité moyenne d'eau qu'ils contiennent, mais le contraste n'est pas toujours suffisant pour pouvoir effectuer un diagnostic correct. C'est une première raison au manque de sensibilité de cette technique d'imagerie évoqué dans le tableau 2. Une manière d'y remédier consiste à nuancer l'image en fonction d'autres paramètres caractéristiques du phénomène de relaxation à l'origine du signal IRM.

¹⁰⁵Baker M., *Nature*, **2010**, 463, 977-980.

¹⁰⁶ Weissleder R., Ross B.D., Rehemtulla A., Gambhir S.S., *Molecular imaging : principles and practice*, **2010**, ISBN : 9781607950059.

¹⁰⁷ Merbach A., Helm L., Toth E., *The chemistry of contrast agents in medical MRI*, Wiley Ed., **2013**, ISBN : 9781-119-99176-2

2.1.1.2. Images IRM T_1 et T_2

Si on met de côté les gradients de champs magnétiques, la séquence d'impulsions IRM s'apparente à une succession d'échos de spin (figure 28).¹⁰⁸ Elle est basée sur une répétition d'impulsions 90° - 180° dont le principe est rappelé ci-dessous. Le vecteur \vec{M} correspondant à l'aimantation globale d'un échantillon initialement orienté selon l'axe longitudinal z, est basculé dans le plan transverse via une impulsion à 90° . Dès la fin de la radiofréquence (RF) un processus de relaxation se met en place. A cela s'ajoute un déphasage des spins qui serait responsable d'une atténuation du signal recueilli. Le rôle de l'impulsion à 180° est de rephaser les spins et recouvrer la totalité du signal d'aimantation avant l'enregistrement du signal.

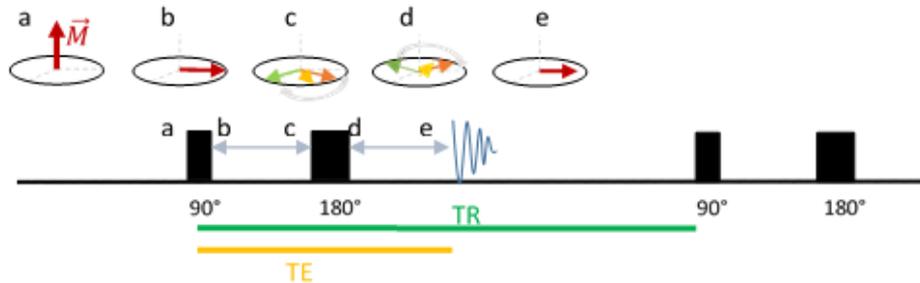


Figure 28 : Séquence d'écho de spin et représentation des spins dans le plan transverse au cours du temps.

On caractérise la relaxation longitudinale par un temps T_1 qui correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale ait retrouvé 63% de son amplitude initiale. La relaxation transversale est quant à elle associée au temps T_2 défini par le délai requis pour que le tissu revienne à 37% de son aimantation transversale. Le signal IRM noté S (eq (1)), que l'on recueille uniquement dans le plan transverse, fait intervenir les temps T_1 et T_2 , intrinsèques au tissu analysé, mais aussi deux autres paramètres. Le temps de répétition TR est celui écoulé entre deux impulsions de 90° et le temps d'écho TE correspond au temps entre l'impulsion de 90° et le recueil de l'écho de spin. En jouant sur ces paramètres (TR et TE), l'opérateur peut rendre un des deux termes exponentiels prédominant, donnant lieu à différentes images IRM.

eq (1)

$$S \propto \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \cdot e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad 109$$

Considérons¹¹⁰ un tissu A, qui relaxe moins vite qu'un autre tissu B. Si on répète rapidement l'impulsion RF à 90° (TR court) pour faire basculer de nouveau le vecteur \vec{M} , la composante transversale de ce vecteur sera plus importante pour le tissu B au début de la deuxième relaxation (TE court) et l'image obtenue montrera un contraste entre les tissus A et B : elle est dite "pondérée T_1 ". En revanche, si on choisit un TR long, les deux tissus ont le temps de relaxer entièrement avant la seconde impulsion à 90° (pas de contraste si T_2 court), on s'affranchit donc de la pondération T_1 . La différence entre les deux signaux est alors optimale seulement à partir d'un temps TE long. L'image est dite « pondérée T_2 » (figure 29). *

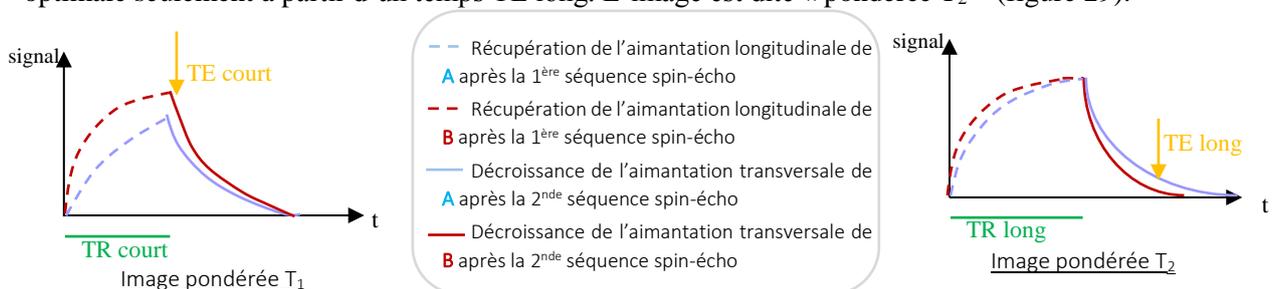


Figure 29 : Evolution du signal IRM pour deux tissus A et B tels que $T_1A > T_1B$ et $T_2A > T_2B$. Principe de pondération en T_1 et/ou T_2 d'une image IRM

¹⁰⁸ M. Décors, *Imagerie de résonance magnétique*, CNRS éditions, EDP sciences, 2012.

¹⁰⁹ W. Krause, *Contrast Agents I : Magnetic Resonance Imaging*, Springer Ed., 2002, ISBN : 3540422471.

¹¹⁰ D. Weishaupt, V. D. Köchli, B. Maincek, *How does MRI work?*, Springer Ed., 2008.

* le cas correspondant à une image en densité de proton est celui où aucune des deux pondérations T_1 et T_2 n'est responsable du contraste, en appliquant un temps TR long et TE court.

L'intensité du signal est alors retranscrite sous forme de nuance de gris (figure 30) dans chaque pixel de l'image IR. Dans la plupart des cas, le contraste est suffisant pour établir un diagnostic, mais pour certaines pathologies, ou plus généralement, lorsqu'il s'agit de distinguer les tissus mous de l'organisme, les temps de relaxation des protons sont trop proches pour les différencier. C'est alors que l'utilisation d'agents de contraste devient nécessaire. ¹¹¹

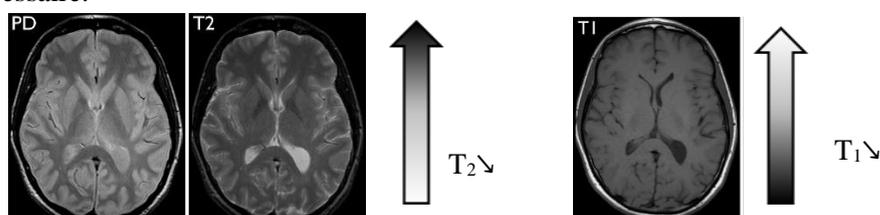


Figure 30 : IRM d'une coupe de cerveau humain obtenue selon 3 pondérations distinctes (Proton Density, T₁, T₂)

2.1.2. Utilisation d'agents de contraste en IRM

Les agents de contraste sont des entités paramagnétiques qui affectent directement les temps T₁ et T₂ selon l'équation (2) suivante, établie par les physiciens I. Solomon et N. Bloembergen :

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i,dia}} + \frac{1}{T_{i,para}} = \frac{1}{T_{i,dia}} + r_i \cdot C \quad (i = 1,2) \quad \text{eq (2)}$$

La contribution diamagnétique est toujours présente, mais cette équation, (où C correspond à la concentration en agent de contraste), montre que l'ajout d'un agent paramagnétique accroît la vitesse de relaxation des protons environnants. Pour quantifier ceci, le paramètre r_i a été mis introduit. Il s'agit de la relaxivité de l'espèce paramagnétique qui caractérise son efficacité. Plus précisément, la relaxivité est définie comme étant la contribution à l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau apportée par une millimole par litre d'ion paramagnétique. On distingue alors les agents de contrastes T₁, qui ont un impact plus fort sur la relaxation longitudinale, des agents de contraste T₂ qui influencent davantage la vitesse de relaxation transversale.

2.1.2.1. Agents de contraste T₂

Les agents de contraste T₂ commercialisés sont constitués de nanoparticules d'oxyde de Fer, Fe₃O₄, et sont qualifiés d'agents à effet négatif. En effet, la diffusion de ces espèces s'accompagne d'un hyposignal (zone de plus en plus foncée) lorsque T₂ diminue. Les nanoparticules sont fonctionnalisées en surface de façon à contrôler leur taille et éviter leur agrégation (ce qui les rendrait toxiques). On peut ainsi choisir d'enrober la particule avec de longues chaînes fonctionnalisées, générant ainsi une gêne stérique suffisante pour éviter l'agglomération. Une autre stratégie consiste à greffer des fonctions chargées en surface, provoquant ainsi une répulsion électrostatique. Les agents de contrastes obtenus ont alors des tailles variables et vont diffuser préférentiellement dans certains organes en fonction de leur diamètre (tableau 3).

Nom	Type de particules	Diamètre (nm)	r ₁ (L.mmol ⁻¹ .s ⁻¹)	r ₂ (L.mmol ⁻¹ .s ⁻¹)	Organes ciblés
<i>lumirem</i>	Oral SPIO	300	3	74	Estomac/Intestins
<i>endorem</i>	SPIO	80-150	23,9	98,3	Foie /rate
<i>combidex</i>	USPIO	20-40	10	60	Sang/ lymphes

Tableau 3 : Caractéristiques de quelques agents de contrastes T₂ commerciaux. ^{112 113}

¹¹¹ E. Terreno, D. Delli Castelli, A. Viale, S. Aime ; *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 3019-3042.

¹¹² J. Y-X. J Wang, *Quant. Imaging. Med. Surg.*, **2011**, *1*(1), 35-40.

¹¹³ J. Y-X. J Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *Eur. Radiol.*, **2001**, *11*, 2319-2331.

La majorité des agents de contraste commerciaux sont plutôt de type T_1 , et ce, pour deux raisons : d'une part, l'accélération de la relaxation longitudinale correspond cette fois à un hypersignal (surbrillance) plus facilement perceptible, et d'autre part, la diminution de T_1 , permet de diminuer le délai entre deux impulsions successives, et ainsi raccourcir le temps d'acquisition. En revanche, la relaxation transversale T_2 correspond à un déphasage de l'aimantation et son temps de retour à l'équilibre n'a pas d'influence sur la durée de l'examen. Nous nous limiterons dans la suite de cette thèse aux agents de contraste T_1 .

2.1.2.2. Agents de contraste T_1

Les agents de contraste T_1 utilisés en routine aujourd'hui sont essentiellement à base de gadolinium (III) (figure 31), et se distinguent les uns des autres par la structure du ligand. La coordinence du Gd(III) étant de 8 ou 9, les ligands commerciaux sont élaborés de façon à laisser un site de coordination disponible pour permettre la relaxation des molécules d'eau.¹¹⁴

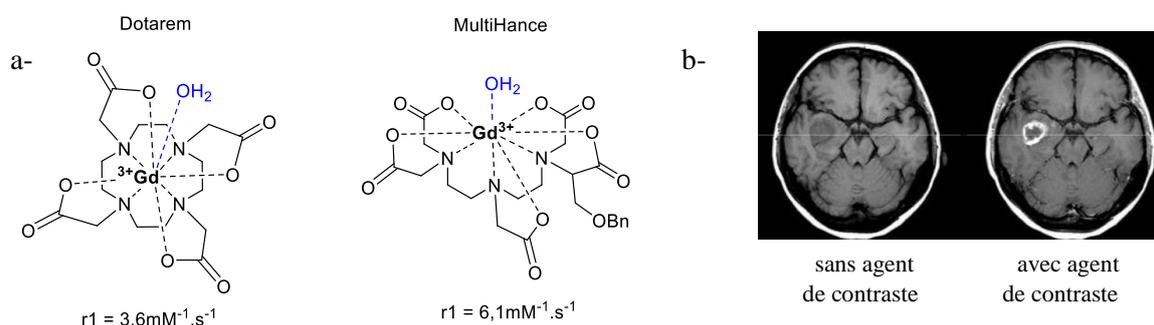


Figure 31 : a- Quelques agents de contraste T_1 utilisés en routine et relaxivités associées mesurées à 1,5 T. b- détection d'une tumeur au cerveau grâce à un agent de contraste T_1

Le choix de ce cation n'est pas anodin, puisqu'il possède au total 7 électrons célibataires, soit un spin électronique optimal de 7/2. Ainsi, l'interaction spin électronique-spin nucléaire des protons de l'eau est accrue avec ce métal, ce qui va de pair avec une bonne relaxivité, et, par conséquent, un contraste important entre les zones où les complexes de gadolinium diffusent et celles où ils sont absents. Enfin, ces agents sont très pratiques pour mettre en relief les zones fortement irriguées du corps humain, ce qui est le cas des tumeurs, métastases ou encore, les inflammations. Cependant, le gadolinium n'est pas un élément inoffensif pour les êtres vivants. A pH physiologique, le cation Gd^{3+} a tendance à former des hydroxydes qui précipitent et sont susceptibles d'obstruer des vaisseaux sanguins. Même sans ces considérations sur le pH, le Gd^{3+} reste toxique dans la mesure où il présente des caractéristiques similaires à d'autres cations endogènes (rayon, dureté, et charge proches de celles du Ca^{2+} , ou du Zn^{2+}). Il peut alors y avoir remplacement du calcium ou du zinc par le Gd au sein même des os, ou dans certaines enzymes ce qui est à l'origine de maladies telles que les fibroses néphrogéniques systémiques (FNS).¹¹⁵ C'est pour cela que l'utilisation d'agents de contraste en IRM n'est pas automatique, et que, lorsque cela s'avère nécessaire, un ligand encapsule le Gd^{3+} .¹¹⁶ Les complexes jouent le rôle de « catalyseurs »¹¹⁷ puisqu'un seul complexe peut relaxer un grand nombre de molécules d'eau. Ainsi, pour conserver l'effet sur l'optimisation du contraste, il faut maximiser l'efficacité des agents T_1 , pour pouvoir diminuer les doses injectées et améliorer la sensibilité de cette méthode d'imagerie (eq 2).

¹¹⁴ P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293.

¹¹⁵ P. Stratta, C. Canavese, S. Aim, *Current Medicinal Chemistry*, **2008**, 15, 1229-1235.

¹¹⁶ W.P. Cacheris, S.C. Quay, S.M. Rocklage, *Magn Reson Imaging.*, **1990**, 8 (4), 467-81.

¹¹⁷ P. Caravan, *Chem.Soc.Rev.*, **2006**, 35, 512-523.

2.1.3. Différentes stratégies d'optimisation d'agents de contraste T₁

2.1.3.1. Signal IRM contrôlé par un stimulus extérieur

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour améliorer le diagnostic IRM via l'utilisation d'agents de contrastes T₁ qualifiés de sensibles (responsive contrast agents¹¹⁸). Il s'agit d'observer un changement au niveau du signal IRM dû à un stimulus extérieur (variation de pH¹¹⁹, réaction redox¹²⁰, irradiation de l'échantillon¹²¹...). Si ce stimulus est lié à une activité biologique spécifique d'une pathologie, l'agent en question permettra de localiser cette activité et améliorer le diagnostic d'un patient. Citons l'exemple d'une sonde inspirée de la structure du Dotarem commercial qui a été rendue sensible à l'activité d'une enzyme, la β-galactosidase (figure 32). Le ligand encapsulant le Gd comporte un bras espaceur porteur d'un sucre (le galactose), qui en se coordonnant au métal paramagnétique, limite l'approche et la relaxation des molécules d'eau. En présence de l'enzyme, la fonction éther liant le sucre au ligand est clivée, permettant aux molécules d'eau de se coordiner au Gd, le tout menant à une diminution du T₁ de l'ordre de 30%. Ce concept a été poussé encore plus loin via l'utilisation d'agent de contraste à base de Fe(II) pour la mise en place de sonde IRM Off-On. On déclenche cette fois une apparition du contraste, et non pas juste une modification. Le ligand dipyridyltriazacyclononane a été conçu de façon à présenter un troisième bras, qui s'effondre sous l'action d'un stimulus chimique. En effet, la réduction d'un groupement nitro -NO₂ en para d'un benzène en amine provoque le passage d'une sonde diamagnétique (invisible en IRM) à un complexe paramagnétique générant un signal.¹²²

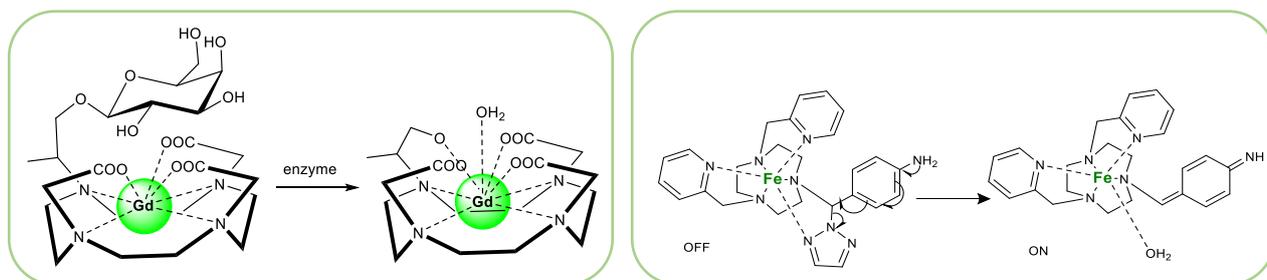


Figure 32 : Exemples d'agents de contraste IRM sensibles à des stimuli extérieurs.

Cependant, ces méthodes ne contribuent pas à améliorer concrètement les valeurs de relaxivité des agents de contraste T₁, pour ce faire, il faut considérer divers paramètres.

2.1.3.2. Optimisation des paramètres de relaxation longitudinale (Annexe 1 pour des détails théoriques)

C'est en s'appuyant sur la théorie de Solomon Bloembergen et Morgan (S.B.M.)¹²³ que l'on a accès aux paramètres intrinsèques de la relaxation des molécules d'eau par le Gadolinium. Le premier paramètre impactant sur la valeur de la relaxivité est la force du champ magnétique imposé, mais ceci concerne plutôt le progrès technologique de mise en œuvre des appareils IRM. Actuellement, les examens IRM sont réalisés à bas champ (1 à 3 T en moyenne). Pour comprendre l'influence des autres paramètres, il faut garder à l'esprit que le principal mécanisme de relaxation des protons de l'eau par un complexe de Gd se décompose en deux étapes indépendantes l'une de l'autre : d'une part, l'échange des molécules d'eau entre sphère de coordination interne et sphère externe, et d'autre part, l'étape de relaxation des protons de l'eau par couplage spin-spin. Les paramètres mis en jeu sont représentés sur la figure 33.

¹¹⁸ G-L. Davis, I. Krambergen, J. J. Davis, *Chem. Commun.*, **2013**, 49(84), 9704-9721.

¹¹⁹ J. Hall, R. Haner, S. Aime, M. Botta, S. Faulkner, D. Parker, A.S. de Sousa, *New J. Chem.*, **1998**, 22, 627.

¹²⁰ F. Touti, P. Maurin, L. Canaple, O. Beuf, J. Hasserodt, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 31-33

¹²¹ C. Tu, A.Y. Louie, *Chem Commun.*, **2007**, 13, 1331-1333.

¹²² C. Gondrand, F. Touti, E. Godart, Y. Berezhanskyy, E. Jeanneau, P. Maurin, J. Hasserodt, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2015**, 8, 1379.

¹²³ I. Solomon, *Phys. Rev.*, **1955**, 99, 559-566.

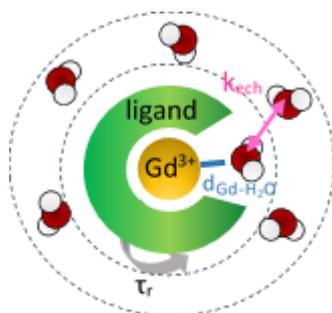


Figure 33 : Schéma d'un agent de contraste T_1 en solution, et des différents paramètres de relaxation.

- **Paramètres q , k_{ech} et T_m**

Plus le nombre de molécules d'eau de la sphère interne, q , capables de se coordonner directement au Gd est élevé, plus la relaxivité sera grande. De même, plus le mécanisme d'échange des molécules d'eau entre les différentes sphères de coordination sera rapide (k_{ech} grande ou T_m -temps de résidence des molécules d'eau- petit), plus il y aura de molécules d'eau relaxées pour un temps donné, et plus le signal paraîtra intense. L'un des enjeux actuel consiste à maximiser le nombre de molécules d'eau liées au métal. L'équipe de K.N. Raymond a déjà synthétisé des ligands à base d'hydroxypyridinone, HOPO, capables de relaxer 2 à 3 molécules d'eau en même temps, et possédant de bonnes constantes de vitesse d'échange des molécules d'eau.^{124 125} Une autre stratégie consiste à élaborer des dendrimères de Gd. Dans ce cas, même si chaque Gd(III) complexe une seule molécule d'eau, le polymère peut en relaxer un grand nombre.¹²⁶

- **Le temps de corrélation rotationnel, τ_R**

Le temps τ_R caractérise le mouvement de rotation global du complexe de Gd sur lui-même. Si ce mouvement est rapide, la vitesse du processus d'échange de molécules d'eau sera atténuée puisque les molécules d'eau ont des difficultés à atteindre les sites de coordination libres du complexe en rotation rapide. Ceci tend à diminuer le contraste. L'objectif est donc de maximiser ce temps de rotation τ_r , ce qui peut être réalisé en augmentant le poids moléculaire de l'agent de contraste.¹²⁷ Des ligands disposant de groupes pouvant être reconnus par une protéine (albumine HSA) ont été synthétisés. Le complexe de Gd obtenu augmente considérablement sa taille et son poids moléculaire optimisant ainsi le τ_R .¹²⁸

- **T_{1e} et distance Gd-proton**

Le temps de relaxation électronique, T_{1e} est un des paramètres les plus difficiles à évaluer, et dont l'influence sur la relaxivité n'est pas facilement rationalisable. La raison principale étant que la théorie S.B.M., servant de base pour comprendre les phénomènes de relaxation, a un domaine de validité restreint aux molécules dont le processus de relaxation est qualifié de monoexponentiel. Le gadolinium, avec son spin électronique de 7/2 est associé à des processus multiexponentiels bien plus complexes. Enfin la distance Gd-proton a une forte influence, dans la mesure où la relaxivité est proportionnelle à $(1/d_{(Gd-H_2O)})^6$. Cependant, c'est à posteriori que l'on peut réaliser la mesure, et il est compliqué d'anticiper l'influence de la structure du ligand sur cette distance.^{123 129 130}

¹²⁴ A.Datta, K.N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42 (7), 938-947.

¹²⁵ K.N. Raymond, V. C. Pierre, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 3-8.

¹²⁶ J. Lim, B. Turkbey, M. Bernardo, L.H. Jr. Bryant, M. Garzoni, G. M. Pavan, T. Nakajima, P. L. Choyke, E. E. Simanek, H. Kobayashi., *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23 (11), 2291-2299

¹²⁷ W. C. Floyd, P. J. Klemm, D. E. Smile, A. C. Kohlgruber, V. C. Pierre, J. L. Mynar, J. M. J. Frechèt, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 2390-2393.

¹²⁸ R.B. Lauffer et al, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45 (16), pp 3465-3474

¹²⁹ A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring, P. Caravan, *J. Phys. Chem.*, **2004**, 108, 1990.

¹³⁰ M. B. Yim, M. W. J. Makinen, *J. Magn. Res.*, **1986**, 70, 89.

2.1.3.3. L'intérêt des hémicryptophanes dans la conception d'agents de contraste T₁

L'objectif de cette partie du projet de thèse est de synthétiser des agents de contraste T₁ en complexant du gadolinium au sein d'un hémicryptophane, l'intérêt étant double :

1- On espère ainsi pouvoir optimiser plusieurs paramètres de relaxation comme **le paramètre q**, en ne sollicitant que 6 à 7 sites de coordination du Gd laissant 2 à 3 sites libres pour la relaxation de l'eau. La **stabilité thermodynamique** du complexe serait alors assurée par la structure macrotricyclique du ligand et sa forme de cage. D'autre part, les hémicryptophanes ayant un poids moléculaire déjà conséquent, de tels agents de contrastes devraient bénéficier d'un **temps de corrélation rotationnel** favorable. Enfin, si l'on envisage de complexer le métal dans la partie basse de l'hémicryptophane, l'hydrophobicité de l'unité CTB pourrait contribuer à accélérer le processus de sortie des molécules d'eau déjà relaxées et donc avoir un effet sur **le paramètre k_{ech} ou T_m**.

2- On pourrait combiner les propriétés magnétiques des complexes de Gd à celles de reconnaissances propres aux hémicryptophanes, pour aller vers la synthèse de sondes spécifiques. (voir 1.4.4)

2.2. Synthèse de ligands hémicryptophanes - complexation du Gd(III)

Sachant que le nombre de coordination du gadolinium s'élève à 9, les ligands hémicryptophanes à synthétiser devrait contenir idéalement 7 sites de coordination au maximum, afin de laisser la place pour relaxer 2 molécules d'eau (deux fois plus que les agents de contraste commerciaux actuels). Les hémicryptophanes comportant la sous unité tren sont des cibles de choix puisqu'ils disposent de 4 azotes susceptibles de former des liaisons de coordination. Il reste à fonctionnaliser la structure de la cage de façon à ajouter 3 sites supplémentaires, tout en gardant une symétrie C₃, ce qui facilite les analyses. Enfin, le gadolinium étant très oxophile, nous nous sommes intéressés à l'insertion de sites de coordination de type carboxylate, alcool ou phénol, ainsi qu'énol.

2.2.1. Alkylation des fonctions amine d'hémicryptophane-tren

L'hémicryptophane (II) ciblé est fortement inspiré de la structure des agents de contraste actuellement commercialisés, portant de multiples sites carboxylates pour complexer le Gd(III). Sachant synthétiser la cage **I** (figure 22-b, page 26), la nouveauté consiste à alkyler les amines avec des chaînes de type acétate. La complexation du gadolinium dans une telle structure serait alors favorisée par la formation de 3 cycles à 5 chaînons, qui participent à renforcer la stabilité thermodynamique de l'ensemble. La voie de synthèse de **II** est schématisée figure 34. Nous avons utilisé une version protégée du groupe acétate, à savoir, le tertbutylbromoacétate comme agent alkylant afin de s'affranchir de la réaction acidobasique entre amine secondaire et acide carboxylique, mais aussi pour rendre possible la purification du produit désiré par colonne de chromatographie. Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pu obtenir que 9 mg d'intermédiaire **4**. Nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproductibilité et de « scale-up » de cette réaction. En effet, le lancement de la réaction sur 300 mg au lieu de 50 mg mène à l'obtention d'un autre produit, de même poids moléculaire mais ayant perdu la symétrie C₃, pour lequel la structure **5** est proposée.

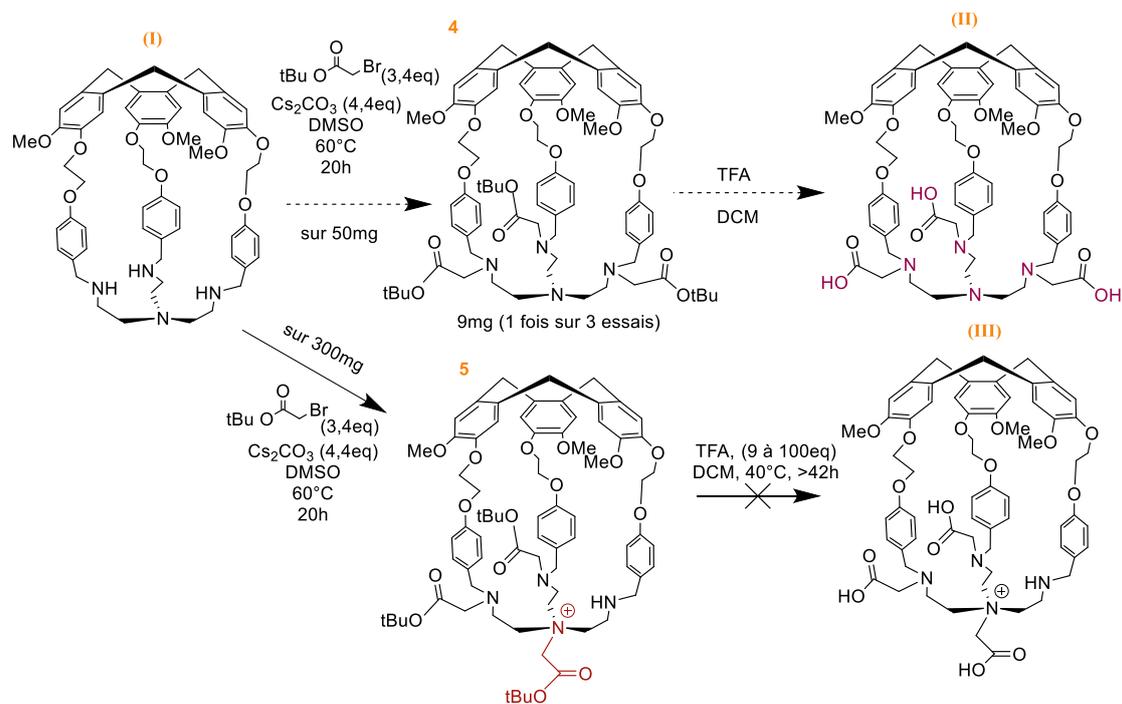


Figure 34 : Schéma de synthèse de l'hémicyptophane **II** et structure du sous-produit **5** obtenu

Nous en avons déduit qu'il existait une compétition entre amine tertiaire et secondaire du tren. De plus, les tests de déprotection des esters *tert*-butyliques à l'aide de TFA sur cet intermédiaire se sont révélés infructueux. Nous avons alors entamé la synthèse d'un nouveau ligand où l'azote tertiaire est remplacé par un carbone, dans le but d'alkyler sélectivement les amines secondaires. Il s'agit cette fois de coupler le trialdéhyde **3**, avec un analogue carboné du tren **10** par amination réductrice.

Nous disposions au laboratoire de plusieurs grammes de l'intermédiaire tosylé **8** (obtenu en deux étapes à partir du tétraalcool **6**) (figure 35). Une triple substitution nucléophile des groupements tosyloxy par des substituants azides mène à l'intermédiaire **9**, qui est réduit en triamine en présence de triphénylphosphine (réaction de Staudinger).

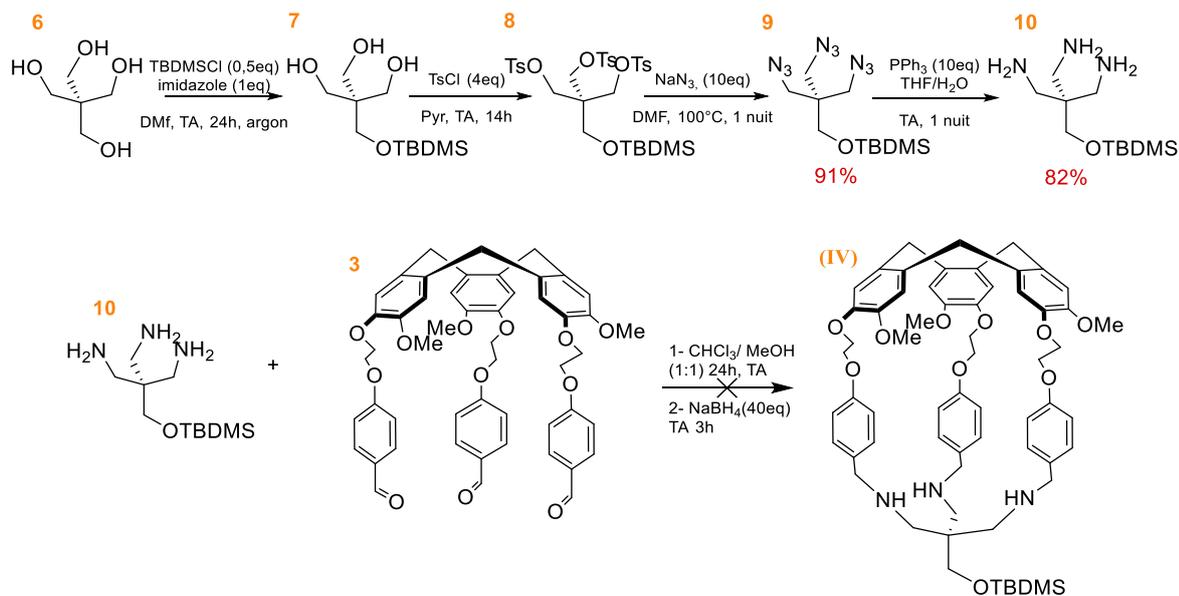


Figure 35 : Schéma de synthèse de l'hémicyptophane **(IV)**

Cependant l'étape de fermeture de la cage **IV** n'a jamais abouti. Nous ne sommes parvenus ni à isoler ni même détecter (en masse ou RMN) un quelconque produit s'apparentant à un hémicryptophane. La stratégie de fonctionnalisation d'hémicryptophanes par alkylation semblant compromise, nous nous sommes tournés vers des réactions d'acylation.

2.2.2. Acylation des fonctions amine d'hémicryptophane-tren

2.2.2.1. Synthèse des ligands

Si beaucoup d'agents de contrastes T₁ utilisent la chimie de coordination des acétates, les lanthanides sont aussi connus pour avoir une forte affinité avec des ligands comme les aminophénols¹³¹ ou acétoacétone¹³². Ces derniers servaient d'ailleurs à extraire les lanthanides de solutions aqueuses.^{133 134} Nous avons donc tenté de greffer ces fonctions (acac et phénol) sur des molécules cages, via des réactions d'acylation des amines secondaires de l'hémicryptophane **I**. Nous avons choisi le DCC et la DMAP comme agents de couplage. Dans le cas de l'hémicryptophane **V**, nous avons couplé l'acide acétoacétique **12** aux amines de l'unité tren. Cet acide, instable, n'est pas commercial, nous l'avons obtenu par déprotection de l'éther *tert*-butylique **11** correspondant à l'aide de TFA, (en prenant garde à ne jamais chauffer car cela entraîne une réaction d'aldolisation non réversible). Pour synthétiser l'hémicryptophane **VI**, nous avons utilisé l'acide 2-hydroxybenzoïque **13**, dont la nucléophilie a été préalablement activée via le couplage avec du benzotriazole. Si la triple acylation menant à l'hémicryptophane **V** est un succès, celle visant à synthétiser **VI** donne un mélange de plusieurs produits –dont le produit désiré– non isolables et où, d'après l'analyse par spectrométrie de masse, une unité d'acide hydroxybenzoïque est de trop dans les sous-produits. (figure 36)

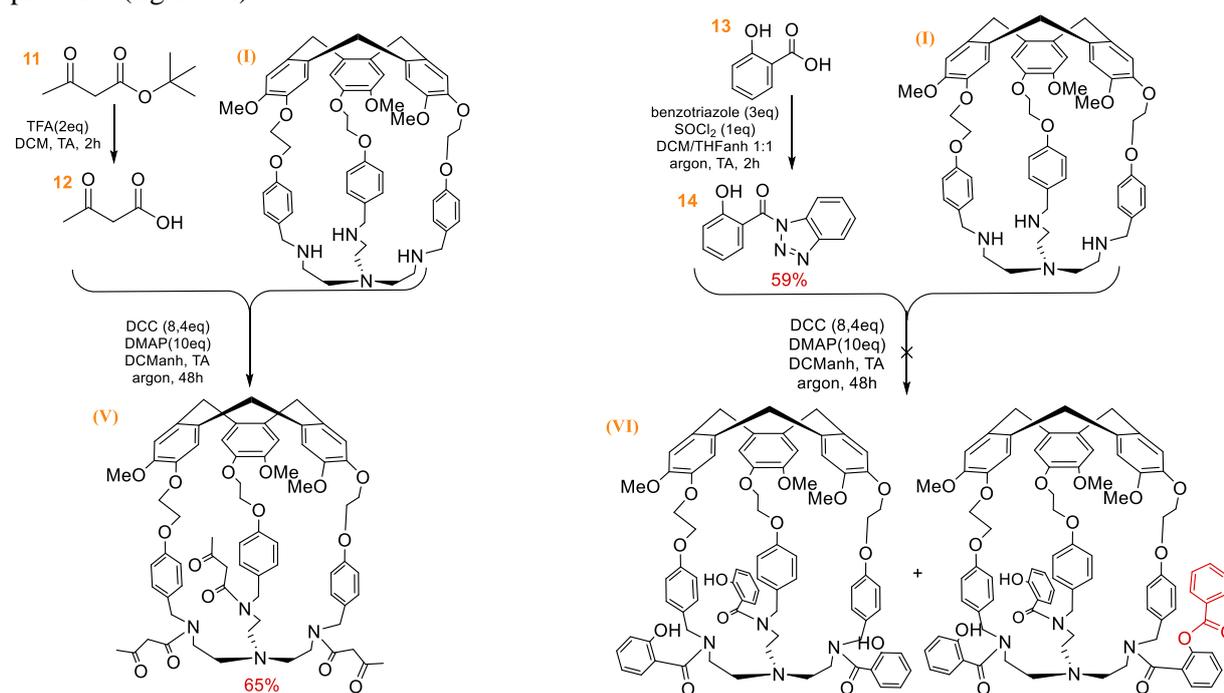


Figure 36 : Schémas de synthèse des hémicryptophanes **V** et **VI**.

¹³¹ S. Liu, L. Celmini, S. J. Rettig, R. C. Thompson, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6087-6095.

¹³² A.N. Gusey, M. Hasegawa, T. Shimizu, T. Fukawa, S. Sakurai, G. A. Nishchymenko, V. F. Shul'gin, S.B. Meshkiva, W. Linert, *Inorganica Chim. Acta*, **2013**, *406*, 279-284.

¹³³ C. E. Willans, M. A. Sinenkov, G. K. Fukin, K. Sheridan, J. M. Lynam, A. A. Trifonov, F. M. Kerton, *DaltonTrans.*, **2008**, 3592-3598.

¹³⁴ W.B. Brown, J.F. Steinbach, W.F. Wagner, *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, **1960**, *13*, 119-124.

2.2.2.2. Complexation de l'hémicryptophane **V** au gadolinium.

Etant donné que nous avons isolé le ligand hémicryptophane **V**, nous avons tenté de le complexer au Gd(III).^{135 136} Pour ce faire, nous avons utilisé le triflate de Gd(III), ainsi qu'une base, la triéthylamine, afin de privilégier la forme énolate des groupes acétoacétate, créant une interaction électrostatique favorable à la complexation du Gd. La réaction a été suivie régulièrement par spectrométrie de masse. Il s'agit d'une méthode de choix car le Gd possède un massif isotopique atypique et donc facile à détecter. Différentes conditions réactionnelles ont été tentées et sont résumées dans le tableau 4 ci-dessous.

	Temps de réaction	Quantité de base	Température	Ratio Ligand/Complexe en masse
1	3h	1,2eq	TA	100/0
2	12h	1,2eq	40°C	100/0
3	24h	17eq	40°C	100/10
4	48h	16eq	40°C	100/10

Tableau 4 : Conditions réactionnelles pour la complexation de **V** au Gd(III) et résultats obtenus.

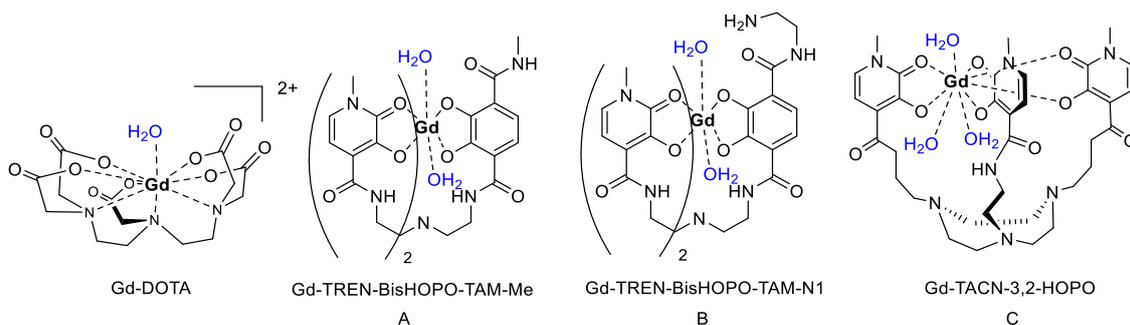
On remarque qu'un large excès de base est nécessaire ainsi qu'un léger chauffage pour permettre au gadolinium d'entrer dans la cavité de l'hémicryptophane **V**. Même si les essais 3 et 4 semblent efficaces, l'analyse par spectrométrie de masse montre un ratio ligand /complexe qui n'évolue pas au cours de la réaction. De plus, malgré plusieurs tentatives d'analyse avec des conditions d'ionisation de plus en plus douces, ce ratio est resté identique. Nous avons déduit de ces expériences que soit le complexe se forme peu, soit il est trop instable pour supporter des conditions d'ionisations douces, et sûrement trop instable aussi pour pouvoir avoir une application dans le domaine de l'IRM. L'interprétation que nous avons trouvée met en cause la rigidité des groupes acétoacétate totalement conjugués, qui ne peuvent pas se «replier» convenablement pour interagir avec le métal. Compte tenu de ces résultats, nous n'avons pas approfondi la synthèse de l'hémicryptophane **VI** qui s'avérerait tout aussi rigide - voire même plus car davantage délocalisé - et nous nous sommes orientés vers d'autres ligands cibles.

2.2.3. Fonctionnalisation des bras espaceurs des hémicryptophanes

Le groupe de K. N. Raymond en Californie travaille sur la synthèse de complexes de Gd(III) pouvant contenir 2 à 3 molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination du métal (tableau 5). Parmi les ligands qu'il met au point figurent des tripodes (comportant une unité TACN ou tren), de symétrie C_3 ou dissymétriques, pour lesquels tous les sites de coordinations sont directement contenus dans les 3 bras du tripode. Il obtient avec de tels ligands des paramètres IRM (T_1 , τ_R q, k_{ech}) satisfaisants, et parfois dépassant même les valeurs des agents commerciaux actuels, ainsi qu'une bonne affinité du métal pour le ligand. Cette affinité ligand-métal n'est pas mesurée sous forme de constante d'association faute de technique adaptée, mais en valeur de $p[Gd] = -\log[Gd]$ représentant la quantité de gadolinium libre en solution (plus la valeur de $p[Gd]$ est élevée, plus le complexe est stable). Ceci permet de comparer la stabilité de ces complexes à celle des agents de contraste commerciaux. Le magnevist (ligand DTPA : acide diéthylènediaminepentaacétique) ou le dotarem (ligand 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacide acétique) servent souvent de références.

¹³⁵ A.P. Souza, S. Alves Jr, O.L. Malta, *Optical Materials*, **2011**, 33, 402-407.

¹³⁶ F.S. Guo, J.D. Leng, J.L. Liu, Z.S. Meng, M.L. Tong, *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 405-413.



	Gd-DOTA	A ^c	B ^c	C
q	1	2	2	3 ^b
r ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	3,8 ^d	8,7	11,1	13,1 ^a
T _m (ns)	143 ^d	8	2,6	2,0 ^b
τ _r (ps)	54 ^d	110	110	150 ^b
p[Gd]	19,1	20,1	19,5	--

Tableau 5 : Paramètres de relaxation et stabilité de complexe de Gd de type HOPO comparés au ligand DOTA. Mesurés à 60MHz, 298 K^{137 138 139} a- pH = 7 ; b- pH = 6,1 ; c- pH = 7,4 ; d-310 K, pH non renseigné.

Nous nous sommes inspirés de ces travaux pour concevoir une troisième catégorie de ligand cage, où cette fois, les sites de coordination sont directement ancrés dans les « bras » de l'hémicryptophane. Nous espérons ainsi obtenir des paramètres de relaxation comparables, mais surtout gagner en termes de stabilité thermodynamique et cinétique du complexe grâce à la structure de cage des hémicryptophanes.

2.2.3.1. Synthèse de l'hémicryptophane VII.

La structure de la première cage répondant à ces critères, est obtenue en remplaçant formellement les unités phényles des trois bras, par des phénols (figure 37). Pour y parvenir concrètement, notre stratégie consiste à reprendre le schéma de synthèse de I à partir du CTB bromé **2**, et réaliser la triple substitution nucléophile avec un intermédiaire de type dihydroxybenzaldéhyde, avant de fermer la cage par amination réductrice avec l'unité tren.

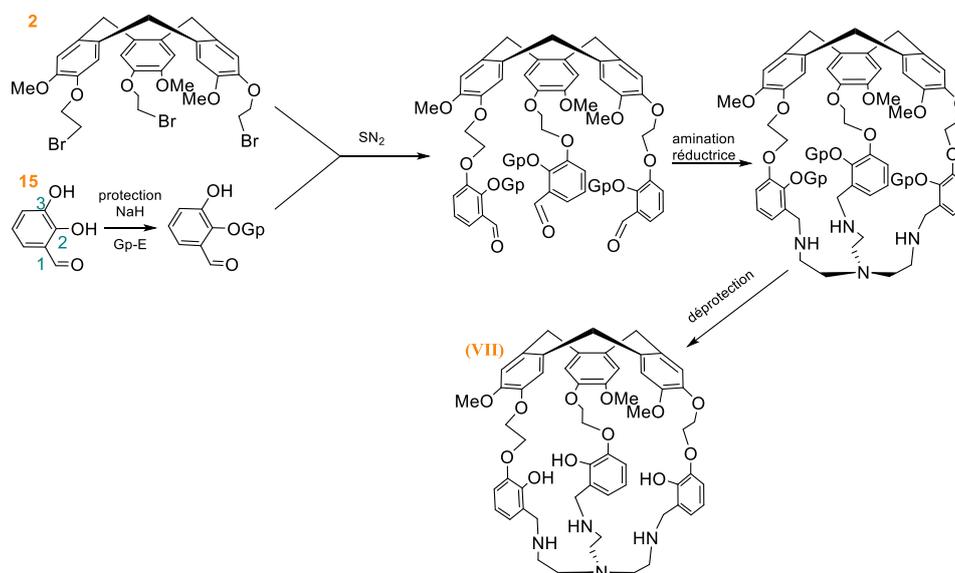


Figure 37 : Stratégie de synthèse de l'hémicryptophane VII. (Gp = groupement protecteur)

¹³⁷ S. Laurent, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Contrast Med. Mol. Imaging*, **2006**, *1*, 128–137.

¹³⁸ C.V. Pierre, M. Botta, S. Aime, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 5344-5445.

¹³⁹ E. J. Werner, S. Avedano, M. Botta, B.P. Hay, E.G. Moore, S. Aime, K.N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1879 *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1870-1871.

L'insertion d'un groupement protecteur (Gp) sur le 2,3-dihydroxybenzaldéhyde commercial **15** présente deux avantages. Cela permet dans un premier temps d'avoir une régiosélectivité contrôlée au moment de l'étape de triple substitution nucléophile, et éviter la formation d'un mélange complexe de plusieurs CTB structurellement proches. La protection de **15** est réalisée en présence de base (hydrure de sodium) et d'un équivalent du groupement protecteur lié à un électrophile Gp-E. La régiosélectivité de cette étape est contrôlée via le nombre d'équivalents de base que l'on introduit ¹⁴⁰ : un seul équivalent de base déprotone le proton le plus acide (celui dont la base conjuguée est stabilisée par mésomérie), menant dans notre cas au régioisomère désiré, protégé en position 2. L'autre régioisomère serait obtenu avec 2 équivalents (ou davantage) de base, de façon à être sûr de déprotone les deux phénols. C'est alors le phénolate en position 3, plus réactif, qui réaliserait l'attaque nucléophile sur Gp-E.

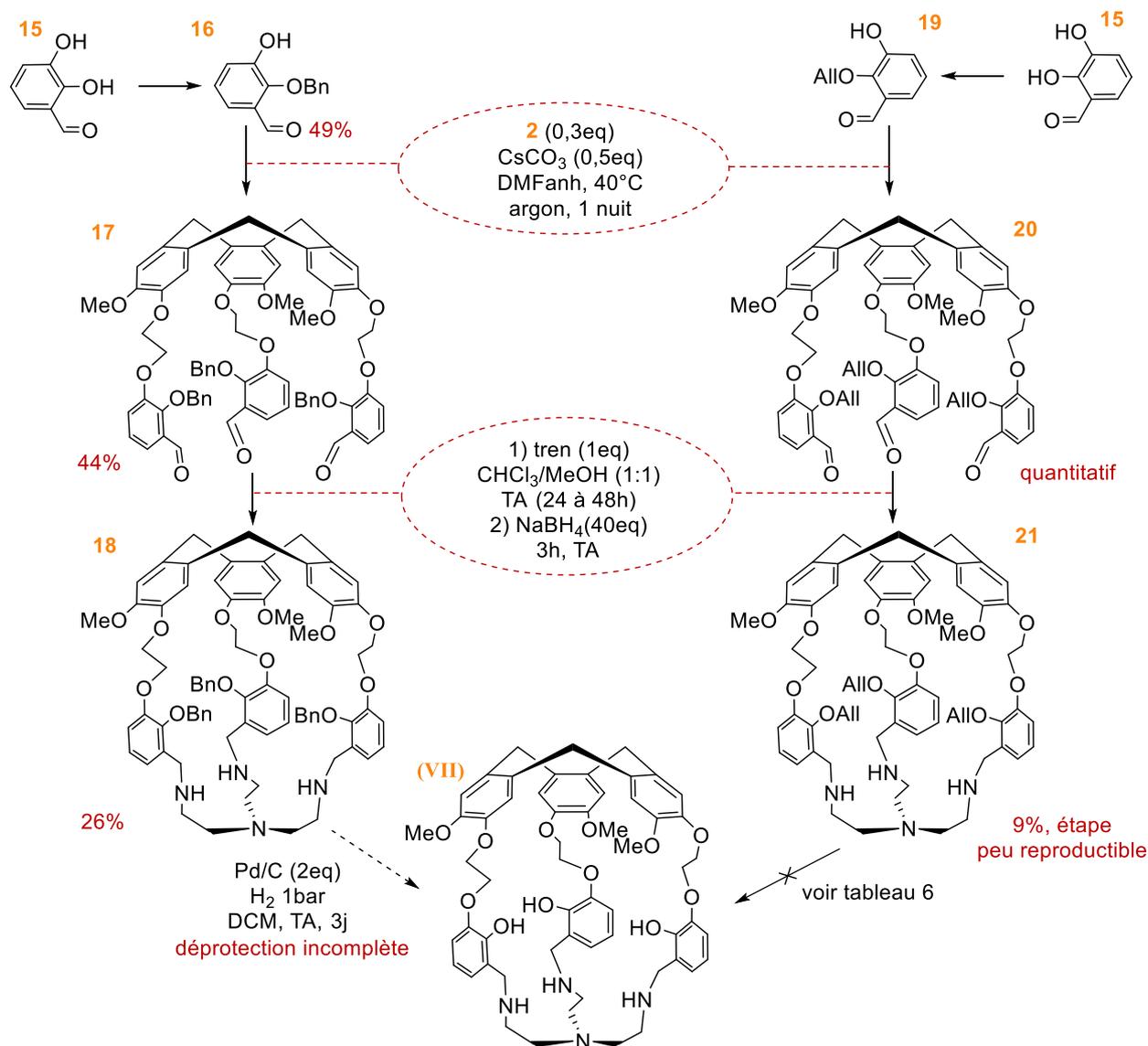


Figure 38 : Deux schémas de synthèse en vue de l'obtention de l'hémicyptophane **VII**.

Le second avantage de la présence d'un groupement protecteur concerne l'étape de fermeture de la cage par amination réductrice (figure 38). L'expérience au sein de l'équipe a montré que la purification d'hémicyptophanes est souvent fastidieuse, voire impossible par chromatographie classique si la molécule est trop polaire. C'est le cas de l'hémicyptophane **VII** pouvant former de nombreuses

¹⁴⁰ a- C. J. van Staveren, J. van Eerden, F. C. J. M. van Veggel, S. Harkema, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 4997. b- A.R. von Doorn, W. Verboom, S. Harkema, D. N. Reinhoudt, *Synthesis*, **1992**, 109.

interactions, de type liaisons hydrogène ou dipôle-dipôle, avec la silice, limitant fortement l'élution. La présence des groupements protecteurs, qui masquent quelques interactions, permet de purifier le précurseur de la cage **VII**, et l'étape de déprotection qui suit se doit alors d'être propre, c'est-à-dire, ne générer que des sous-produits que l'on peut éliminer par évaporation, filtration, voire des extractions-lavages. Notre choix s'est porté vers des groupements protecteurs benzyle et allyle ¹⁴¹ qui répondent à priori à ces critères.

Dans le cas des groupements benzyle, la synthèse de l'intermédiaire **18** ne pose pas de problèmes particuliers, même si les rendements resteraient à optimiser. La déprotection en revanche est longue et incomplète sous une atmosphère de dihydrogène, même en présence de Pd/C en quantité quasi stœchiométrique. Le suivi par spectrométrie de masse de la réaction permet de visualiser l'hydrogénation progressive des benzyles mais la réaction semble stagner au bout de 2 jours, laissant environ 50% de composé **18** même après 72h. (figure 40)

Une tentative de déprotection des benzyles en autoclave sous une pression de 10 bars en dihydrogène a pu être réalisée plus tard, et le suivi en masse montre cette fois des résultats plus encourageants puisque seul le ligand entièrement déprotégé est détecté en spectrométrie de masse au bout de 36h. Le problème suivant étant de récupérer uniquement la cage en travaillant à l'échelle de la dizaine de milligrammes. Plusieurs filtrations sur célite du brut réactionnel sont nécessaires pour éliminer les traces de métaux, mais ont également mené, dans la plupart des cas, à la perte du produit, pourtant détecté en masse avant le traitement. Nous ne sommes parvenus qu'une fois à isoler, et caractériser le ligand **VII**, en réalisant après filtration, un lavage basique avec une solution de NaOD/D₂O suivi d'une analyse en RMN du proton de la phase aqueuse en saturant le pic de solvant (figure 39).

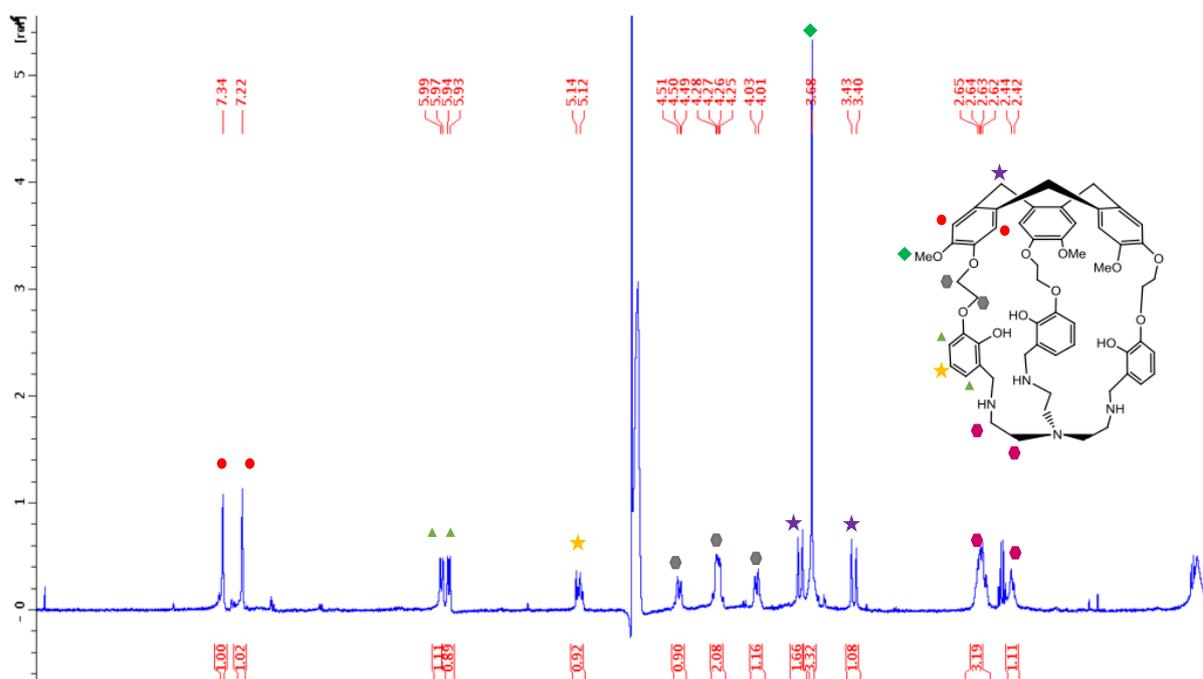


Figure 39 : Spectre RMN (500MHz, NaOD/D₂O) de l'hémicryptophane **VII** avec pré-saturation du pic correspondant aux protons de l'eau

Un essai de complexation avec du Gd³⁺ sur un mélange de composé **18** à différents niveaux de déprotection et **VII**, a été concluant. Seul le composé complètement déprotégé complexe le métal, et ce, instantanément dès l'ajout d'une base (Et₃N) donnant une coloration violette au milieu réactionnel. Le complexe est par ailleurs majoritairement détecté en spectrométrie de masse. Ces résultats de complexation

¹⁴¹ G.M. P. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, 2006, Wiley, ISBN: 9780471697541

nous ont encouragés à essayer une nouvelle voie de synthèse de **VII**, avec cette fois un groupement protecteur allyle, en espérant parvenir à isoler plus facilement le ligand désiré en fin de synthèse.

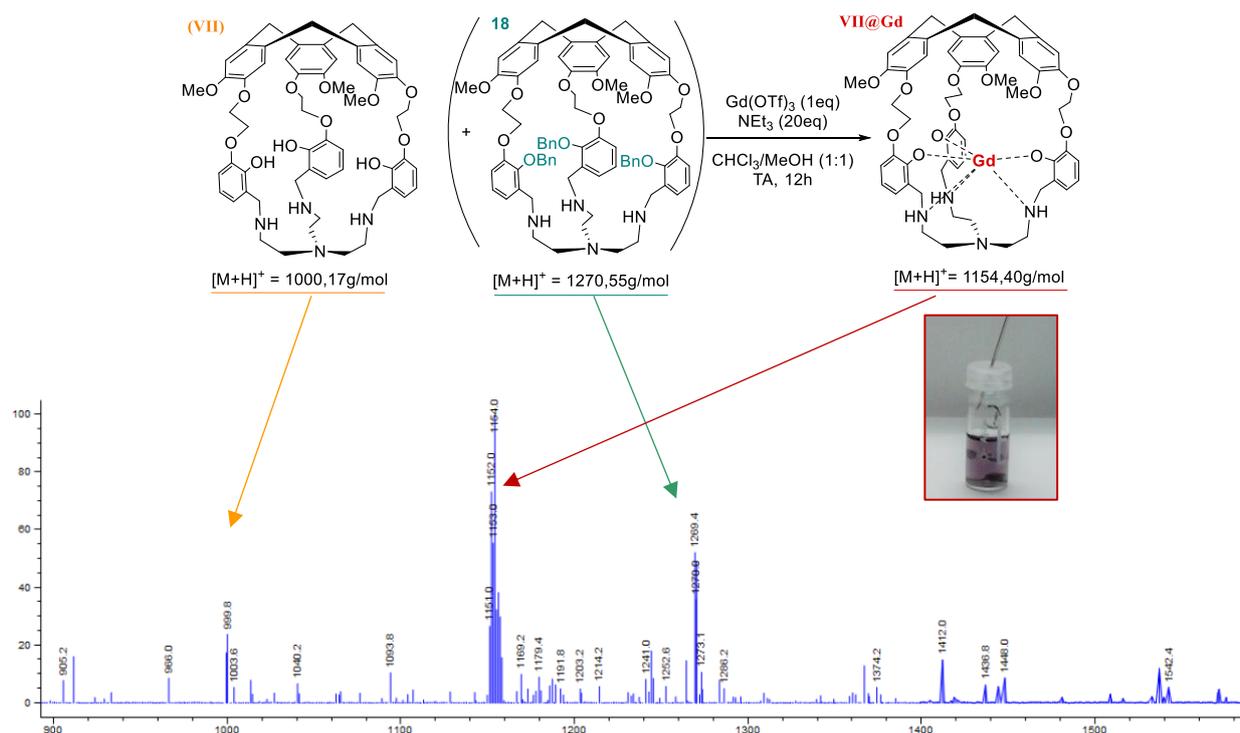


Figure 40 : Suivi par spectrométrie de masse de la complexation de l'hémicyptophane **VII** avec le Gd(III).

L'utilisation d'un groupement protecteur allyle a eu un impact sur l'étape de fermeture de la cage **21** par amination réductrice, qui s'avère cette fois peu reproductible et présente des rendements très médiocres allant de 5 à 9%. Mais la difficulté réside surtout dans l'étape de déprotection. Pour ce faire, nous avons réalisé plusieurs essais, résumés dans le tableau ci-dessous.

Catalyseur	Nb d'eq	Conditions expérimentales	Résultat
1	$\text{Pd}(\text{OAc})_2$, 0,7	21 , PPh_3 (4eq), NH_4Et_2 (45eq)	échec
2	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 0,1	21 , K_2CO_3 (10eq), 48h, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, TA, lavage acide.	échec
3	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 0,1	19 , K_2CO_3 (10eq), 48h, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, TA, lavage acide.	succès
4	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 2,7	21 , K_2CO_3 (10eq), 48h, DCM, TA, lavage acide	échec
5	Pd/C , 1	21 , APTS (5eq), $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80°C, 20h	échec

Tableau 6 : Conditions expérimentales testées pour la déprotection des groupements allyle de l'intermédiaire **21**.

La première tentative correspond aux conditions couramment utilisées dans l'équipe sur des substrats de type cryptophanes. N'ayant pas eu de résultats concluants, nous nous sommes orientés vers un autre catalyseur correspondant directement à l'entité théoriquement présente dans le cycle catalytique, le tetrakis(triphényl)phosphine palladium (0),^{142 143} sans plus de succès. Les mêmes conditions réactionnelles appliquées au précurseur **19** ont pourtant permis de déprotéger de manière efficace le groupement allyle. Il semble donc que le problème soit dû à la structure de l'hémicyptophane **VII**. Nous avons alors supposé que la sous-unité tren de l'hémicyptophane **VII** soit en mesure de complexer le palladium, rendant celui-ci inactif vis-à-vis des groupements allyle, d'où un 4^{ème} essai avec plus d'un équivalent de catalyseur. L'analyse RMN montre toujours la présence d'une fonction allyl et de phosphine malgré plusieurs lavages acides suivis de digestions dans l'éther diéthylique. Ces traitements sont sensés respectivement cliver la liaison O-allyl, et extraire la triphénylphosphine du milieu réactionnel. La déprotection n'a donc pas fonctionné, et quand bien même, la séparation du catalyseur homogène et du produit désiré semble

¹⁴² A. Martinez, C. Hemmert, C. Loup, G. Barré, B. Meunier, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 1449-1457.

¹⁴³ D.R. Vutukuri, P. Bharathi, Z. Yu, K. Rajsekaran, M.H. Tran, S. Thayumanavan ; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 1146-1149.

compliquée. Tout ceci justifie le choix d'un catalyseur hétérogène en entrée 5 sans davantage de succès.¹⁴⁴ La solution que nous avons trouvée consiste à masquer temporairement la nucléophilie des amines secondaires du tren, en les protégeant par des Boc, afin de procéder à la déprotection des groupements allyles à l'aide de Pd(PPh₃)₄. Une étape supplémentaire de suppression des Boc en présence de TFA nous a permis de détecter **VII** en spectrométrie de masse (figure 41)

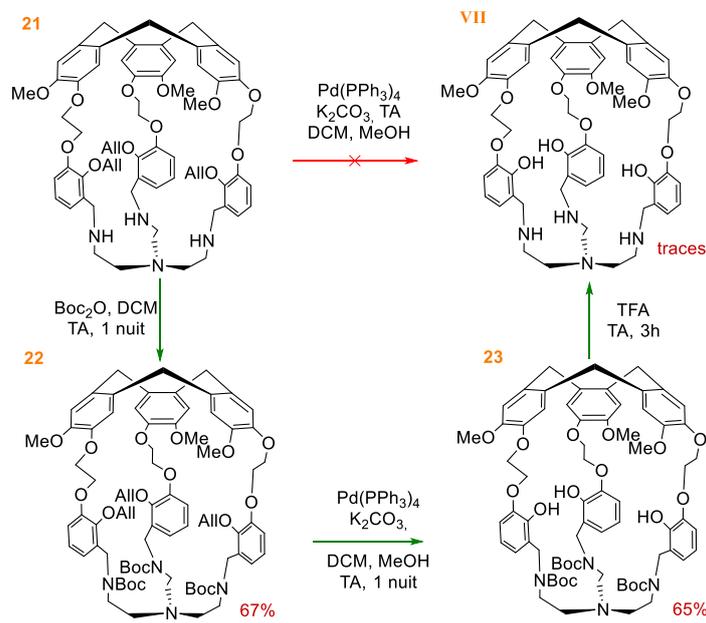


Figure 41 : Obtention de l'hémicryptophane **VII** à partir du précurseur allylé **21**.

Même si cette alternative permet de détecter **VII** et l'isoler par simple évaporation, l'ajout de 3 étapes de synthèse n'a abouti qu'à la récupération de l'hémicryptophane ciblé à l'état de traces. L'obtention de **VII** se montre donc plus complexe qu'il n'y paraît, et la voie de synthèse trouvée est – avouons-le – assez peu élégante, dans la mesure où il nous a fallu protéger des fonctions amines pour permettre la déprotection de fonctions phénol. Nous avons donc opté pour la conception d'une nouvelle cage apte à complexer du gadolinium.

2.2.3.2. Synthèse de l'hémicryptophane **VIII**

❖ Quelle structure choisir ?

La nouvelle structure imaginée utilise toujours des fonctions de type phénol comme sites de coordination avec le métal, mais les amines de l'unité tren, qui posent des problèmes de purification ainsi que lors des étapes de déprotection, seront remplacées par des amides. K. N. Raymond a travaillé sur la synthèse de ligands polydentates à base de motifs 2-hydroxyisophtalamide (IAM)¹⁴⁵ dont la structure est représentée figure 42. Ce ligand est capable de complexer des lanthanides pour des applications en fluorescence. Dans le cadre de cette technique spectroscopique, l'objectif est de saturer la sphère de coordination du lanthanide afin d'éviter tout quenching de fluorescence (généralisé par la présence de molécules de solvant dans la 1^{ère} sphère de coordination). Pour y parvenir, K. N. Raymond utilise des ligands comportant 4 ensembles IAM. La coordinence des lanthanides étant de 8 à 9, on en déduit que chaque bras apporte uniquement 2 sites de coordination (figure 42). Le motif IAM est composé de 2 amides et d'un phénol géométriquement proches, mais seule une des deux fonctions amide est réellement liée au métal. Nous avons donc intégré ce motif pour aboutir à la construction d'un ligand hémicryptophane de structure analogue. Etant de symétrie C₃, il n'y aurait a priori que 6 sites de coordination, (voire 7 si l'amine tertiaire participe), ce qui est prometteur dans le cadre d'applications en IRM, où l'objectif est de maximiser le nombre de molécules d'eau coordonnées au gadolinium.

¹⁴⁴ R. Boss, R. Scheffold ; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1976**, *15*, 558-560.

¹⁴⁵ A. P. S. Samuel, E. G. Moore, M. Melchior, J. Xu, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **2008**, *47* (17), 7535-7544.

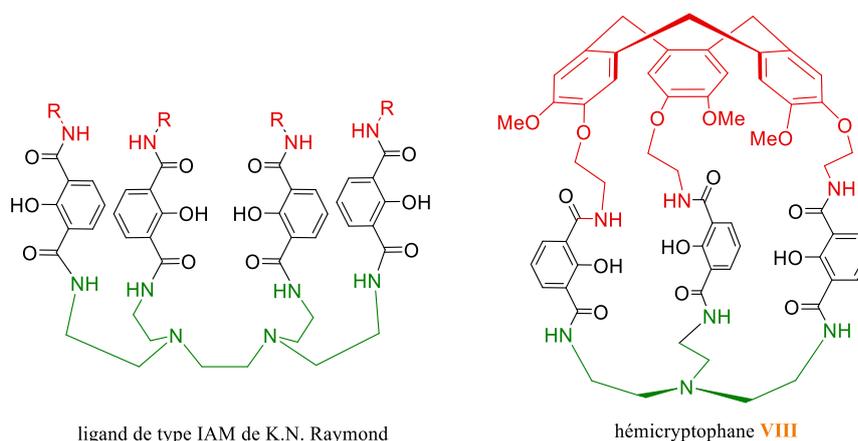


Figure 42 : Structure du ligand de K.N. Raymond à gauche, capable de complexer le Tb(III) et structure du ligand **VIII** ciblé à droite.

❖ Synthèse du précurseur de CTB sous forme amino.

La stratégie de synthèse consiste à partir de l'unité tren, puis de la fonctionnaliser avec les bras espaceur adéquats, avant de fermer la cage via la formation du « chapeau » CTB (voie B figure 22-a, chapitre 1 page 26). Il s'agit de synthétiser dans un premier temps des bras de type 2-hydroxyisophthalamide portant un précurseur de cyclisation du CTB (alcool benzylique protégé jusqu'à la cyclisation finale). Pour cela, le précurseur sera fonctionnalisé avec une fonction amine en vue d'un couplage avec un analogue d'acide 2-hydroxyisophthalamique (diacide correspondant au groupement noir figure 42).

La synthèse de ce précurseur a lieu en 4 étapes à partir de l'alcool vanilique, avec un rendement global de 33% (figure 43). Une monosubstitution du phénolate de l'alcool vanilique sur le dibromoéthane donne le produit **1**, dont l'alcool benzylique est protégé sous forme d'acétal pour mener à l'intermédiaire **24**. La substitution nucléophile du brome par un azoture, suivie d'une réduction de Staudinger, fournit le précurseur de cyclisation **26**. Le rendement est certes limité par la première étape, dont le sous-produit principal est le produit de disubstitution, mais sa mise en œuvre est assez simple (pas de chromatographie mais une recristallisation), et permet d'obtenir 25 à 30 grammes de **1** en une seule fois, à partir d'un réactif bon marché.

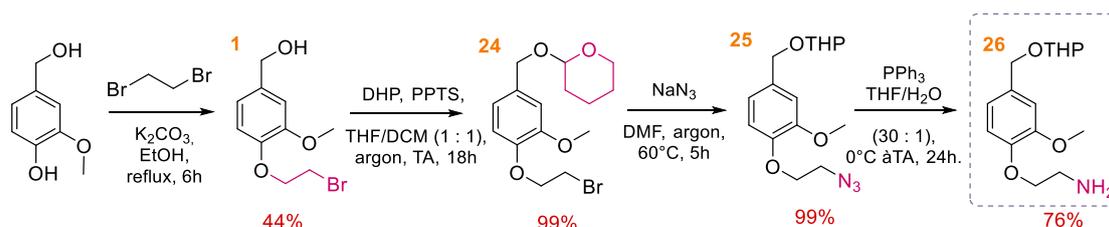


Figure 43 : Schéma de synthèse de l'intermédiaire **26**.

❖ Synthèse de l'hémicryptophane **VIII**.

Nous disposons donc de deux amines, le tren et le précurseur **26**, qu'il faudrait coupler avec l'acide 2-hydroxyisophthalamique. Cependant, cet acide existe chez peu de fournisseurs classiques, et surtout au prix moyen de 575\$ le gramme. Nous avons donc choisi l'analogue méthylé comme réactif de départ, plus accessible et dix fois moins onéreux. A partir de là, la stratégie consiste à dissymétriser le réactif de départ de façon à pouvoir faire réagir sélectivement une seule fonction acide, avec une des deux amines à notre disposition (figure 44-a).

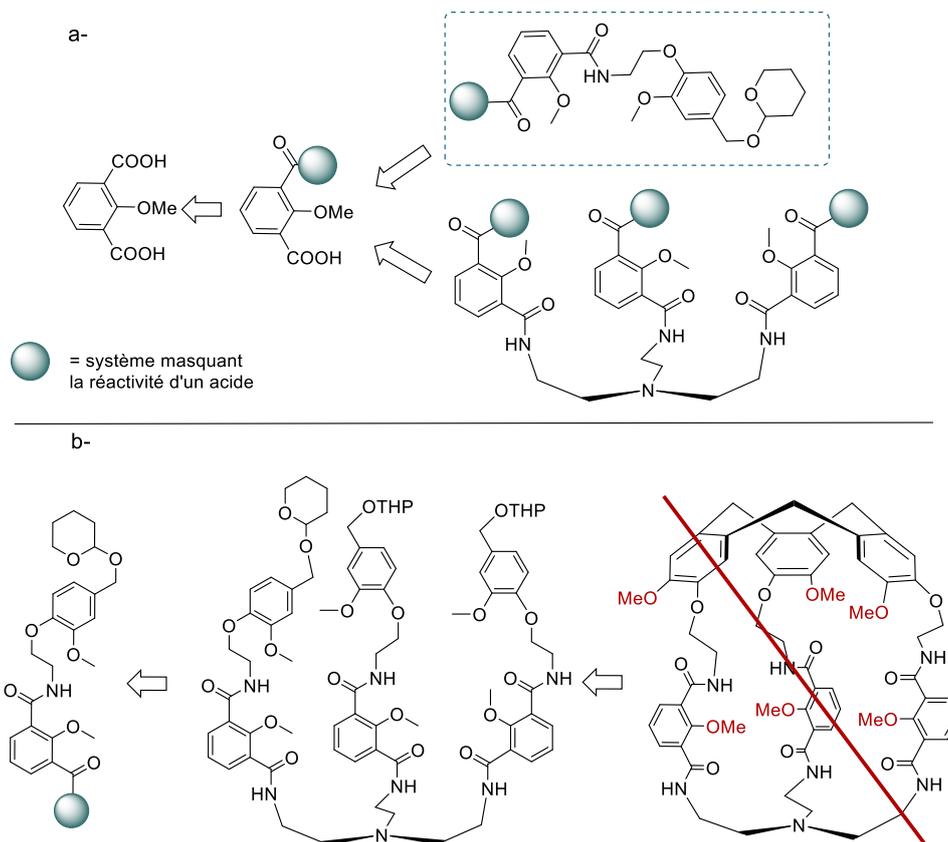


Figure 44 : Vision rétrosynthétique globale de la synthèse de l'hémicryptophane **VIII** mettant en relief la nécessité de modifier le groupement protecteur méthyle du phénol de départ.

Notre choix s'est porté vers un premier couplage avec le précurseur **26**, pour retarder tant que possible l'insertion du tren, souvent à l'origine de difficultés en termes de purification. S'en suit le second couplage avec le tren puis la cyclisation du CTB. La dernière étape consisterait alors à déprotéger les éthers de méthyle des phénols au niveau des bras espaceurs, mais il y aurait compétition avec ceux initialement présents sur le précurseur **26** (figure 44-b). Il faut donc commencer la synthèse par une modification de l'éther méthylique du produit commercial de départ. Nous avons opté pour des groupements allyles, dont la déprotection est orthogonale à celle des méthyles, et ce, même si cette étape nous avait donné du fil à retordre lors de la synthèse de l'hémicryptophane **VII** précédent. En effet, le clivage des éthers allyliques était empêché par la présence d'amines, qui cette fois sont remplacées par des amides, ne pouvant plus empoisonner le catalyseur à base de palladium.

La voie de synthèse ayant mené à l'hémicryptophane **VIII** est représentée figure 45. Elle comporte 8 étapes supplémentaires soit 12 au total avec un rendement global optimal de 4 %. En pratique, nous avons réalisé la synthèse dans sa totalité à deux reprises, et avons isolé 20 et 28 mg de cage, ainsi que 80 mg de précurseur **34** à partir de deux fois 10 g d'acide 2-méthoxyisophtalique **27**.

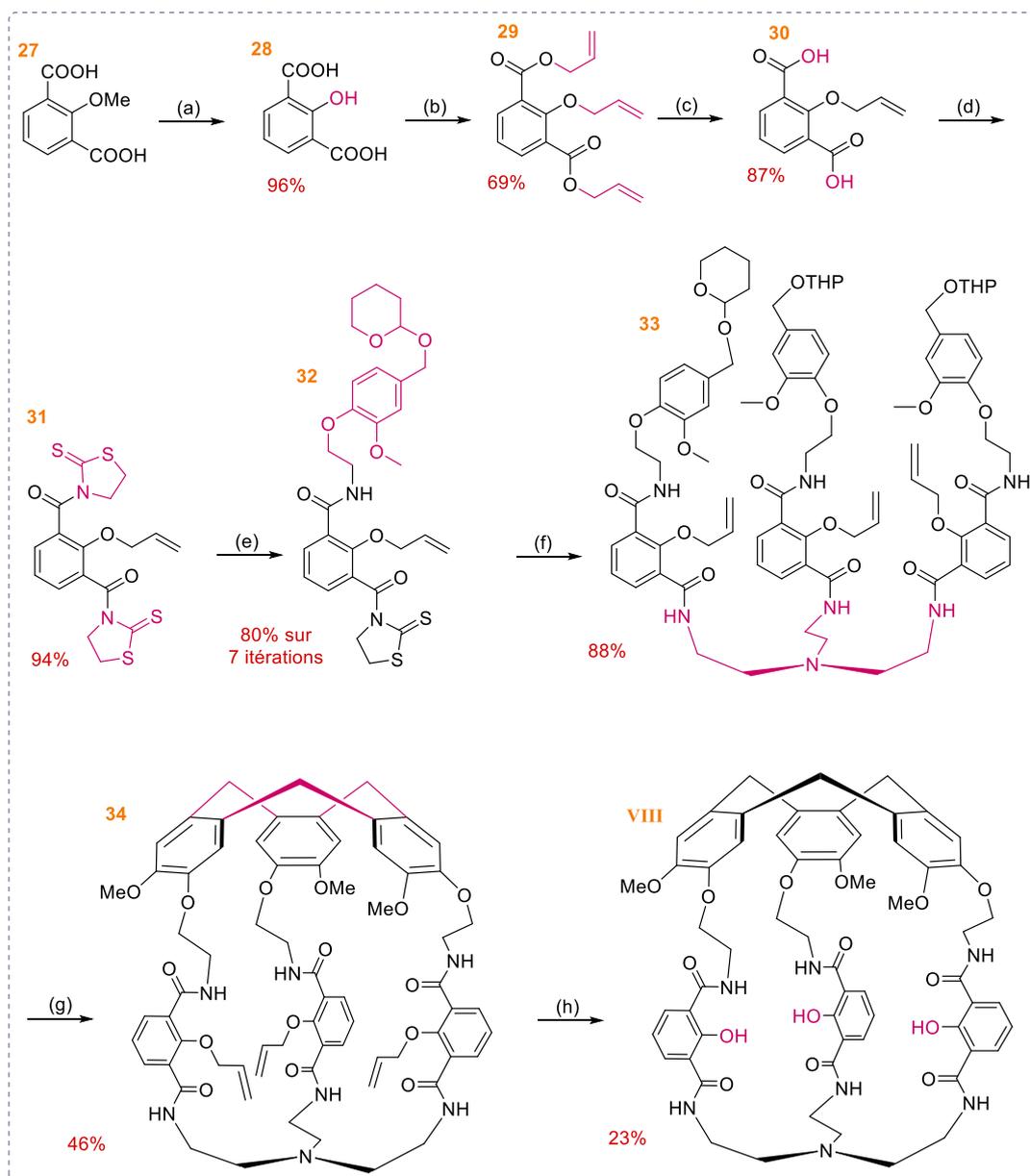


Figure 45 : Schéma de synthèse de l'hémicryptophane VIII.

(a) HBr/AcOH (1 : 1), 90°C, 45min.

(b) Bromure d'allyle (5 eq), K₂CO₃ (10 eq), argon, DMF, 75°C, 20h.

(c) NaOH (3 eq), MeOH/H₂O 1 : 1, TA, 48h.

(d) 1-C₂O₂Cl₂ (2,4 eq), DMF, argon, dioxane, TA, 8h -2- NEt₃ (2,5 eq), mercaptothiazoline (2,4 eq), THF 0°C→TA, 24h.

(e) 26 (1/8 eq), DCM, TA, ajout goutte à goutte en 8 h, et 8 h d'agitation supplémentaire.

(f) TREN (0,3 eq), DCM TA, 18h.

(g) HCOOH, CHCl₃ (traces) 30°C, 48h.

(h) Pd(PPh₃)₄ cat (0,2 eq), K₂CO₃ (10 eq), argon, DCM/MeOH 1 :1, TA, 24h.

Le phénol du réactif **27** est tout d'abord déméthylé, en chauffant dans un mélange d'acide bromhydrique et acétique, puis le nouveau groupement protecteur est inséré par substitution nucléophile sur le bromure d'allyle. Cependant, les acides carboxyliques étant plus réactifs que le phénol, on obtient le produit triplement allylé **29** qu'il faut alors saponifier. La dissymétrisation de **30** a lieu via l'insertion de mercaptothiazolines,¹⁴⁵ qui ont un rôle d'agents de couplage pour les étapes suivantes avec les amines, mais donnent des intermédiaires moins réactifs qu'avec des agents de couplages classiques comme le DCC par exemple. Il est alors possible avec des conditions opératoires adaptées, de ne faire réagir qu'un seul des deux acides « masqués ». Pour cela, on ajoute goutte à goutte en 8 h un défaut d'amine (1/8^{ème} d'équivalent) sur une solution de **31** dans le dichlorométhane à température ambiante. La réaction est quasi quantitative et la séparation de **31**, **32** et de la mercaptothiazoline générée est rapide sur gel de silice. Il faut tout de même réitérer 8 à 10 fois cette manipulation pour accumuler suffisamment de produit **32**.

Compte tenu de l'aspect fastidieux de cette étape, nous avons voulu dissymétriser en réalisant une monosaponification de l'intermédiaire **29**. Cette réaction est en effet décrite avec un diester méthylique de pyridine.¹⁴⁶ Cependant, les mêmes conditions appliquées au phénol **29** porteur d'ester allylique (ou à un équivalent avec les mêmes esters de méthyle) n'ont pas été fructueuses. Le mélange de produits mono et disaponifié n'étant pas séparable (par chromatographie ou par précipitation).

L'étape suivante de la synthèse consiste à engager **32** dans un triple couplage peptidique avec le tren. Pour cela, un léger excès de **32** est agité en présence de tren dans le dichlorométhane à température ambiante, et le résidu obtenu après évaporation est purifié sur gel de silice avec un éluant majoritairement composé de dichlorométhane et d'un lent gradient de méthanol menant au précurseur de cyclisation **33** avec un rendement de 88%. La macrocyclisation par formation du CTB est réalisée dans l'acide formique dans des conditions diluées (1g/L) pour limiter la formation de polymères, et le composé **34** est purifié parfois à 2 reprises par chromatographie. Le rendement de 46 % obtenu est un des meilleurs rendements de fermeture d'une cage de type hémicryptophane. Les éthers allyliques de la cage **34** sont alors déprotégés avec succès en présence de Pd(PPh₃)₄ de base et de MeOH en tant que nucléophile. Sa purification est discutée dans le paragraphe suivant.

❖ Caractérisations du ligand **VIII**

La purification du ligand **VIII** a été réalisée une première fois par chromatographie sur gel de silice avec un éluant à base de chloroforme et un gradient de méthanol, mais le brut réactionnel de la seconde tentative n'était pas entièrement soluble dans ce mélange. Le précipité analysé correspond au ligand **VIII** propre, et rien n'a été isolé de la colonne réalisée sur le filtrat. Une fois sous forme de solide, le ligand n'est pas soluble dans les solvants chlorés, ni l'acétate d'éthyle, mais uniquement dans le méthanol, l'acétonitrile ou l'eau en présence de base. Une analyse RMN a pu être réalisée dans D₂O rendue basique avec l'ajout d'un grain de soude (pH>10), en pré-saturant au préalable le signal de l'eau. (figure 46) et la structure du produit a été confirmée par une analyse en masse exacte.

¹⁴⁶ C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 1109

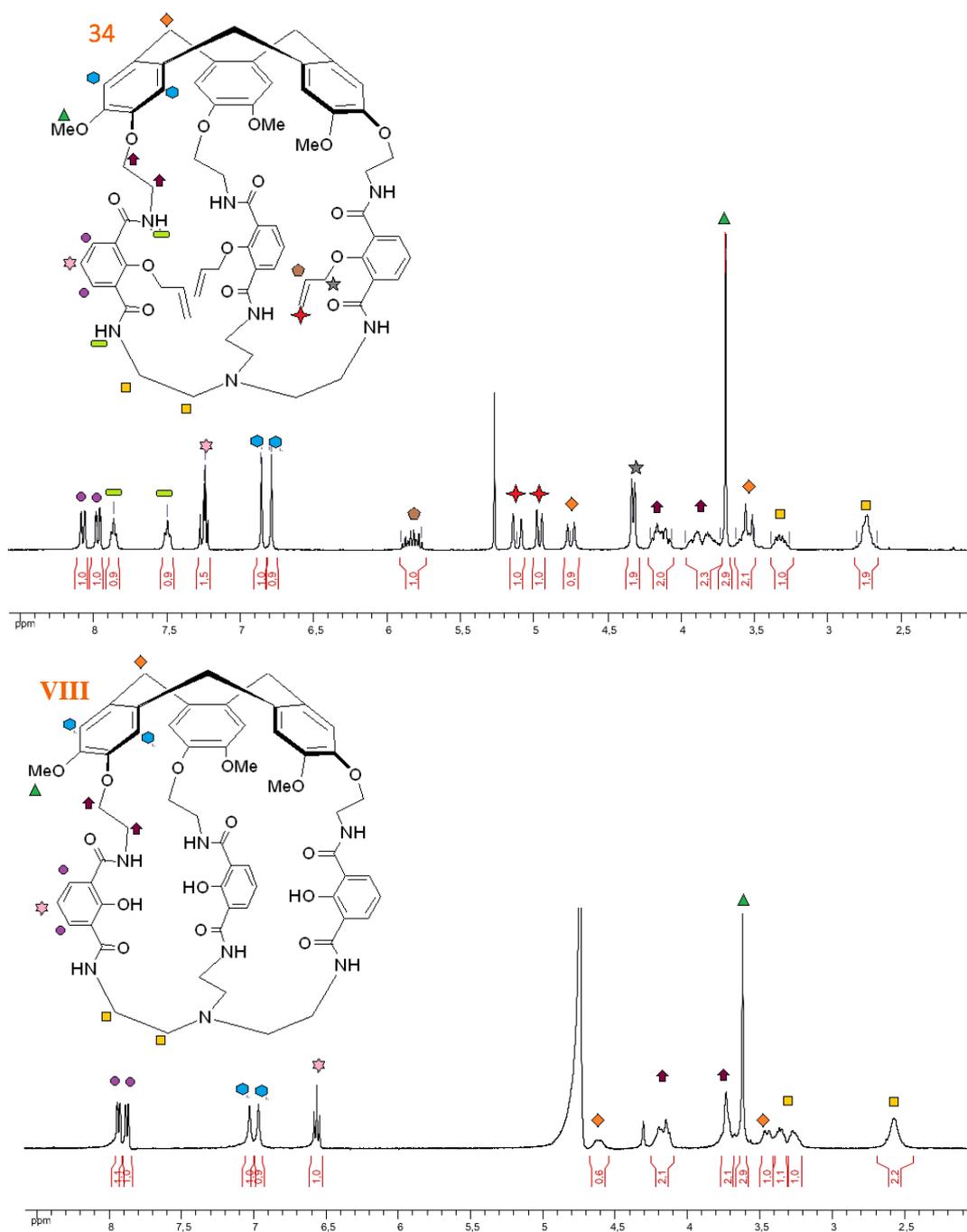


Figure 46 : Spectres RMN (400MHz) de l'intermédiaire **34** dans CDCl₃, et de **VIII** dans D₂O/NaOH

Nous souhaitons par ailleurs obtenir des informations sur les propriétés chiroptiques de ce ligand, ainsi que séparer les énantiomères en vue de tests de reconnaissance de biomolécules chirales, mais les limites de solubilité de l'hémicryptophane **VIII** ne permettent pas la résolution des deux énantiomères de cette cage par HPLC chirale. La synthèse a donc été reprise du départ pour obtenir une quantité suffisante de cage **34** protégée qui a pu être dédoublée par HPLC (figure 47) sur colonne *Chiralpak ID* avec le mélange d'éluants suivant : 60/40 EtOH+NEt₃/dichlorométhane, et caractérisée par la mesure de pouvoirs rotatoires spécifiques, ainsi que par dichroïsme circulaire électronique. Le but étant ensuite d'obtenir les versions énantiopures du ligand **VIII** après déprotection des éthers allyliques. Les spectres ECD nous permettent de proposer que le 1^{er} élué qui présente en ECD une succession de bandes dans l'ordre négatif puis positif au niveau de 240 nm est de configuration P, et donc le second élué de configuration M. Cependant une confirmation théorique est nécessaire.⁶⁵

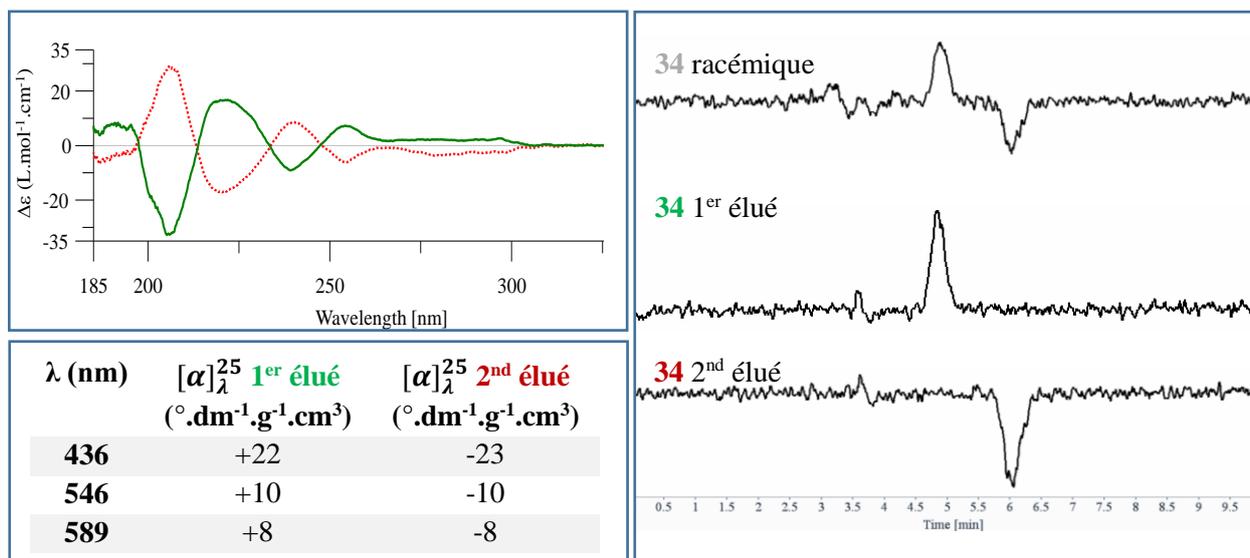


Figure 47 : A droite : Chromatogrammes obtenus avec un détecteur de dichroïsme circulaire à $\lambda = 254$ nm sur une colonne Chiralpak ID (éluant : EtOH+NEt₃/dichlorométhane (60/40).

En haut à gauche : spectres ECD des deux énantiomères de **34** - 1^{er} élué en vert (0.190 mmol.L⁻¹ dans l'acétonitrile) - 2nd élué en rouge (0.150 mmol.L⁻¹ dans l'acétonitrile).

En bas à gauche : valeurs des pouvoirs rotatoires spécifiques mesurés à différentes longueurs d'onde pour des solutions dans l'acétonitrile à 0,101 g.cm⁻³ pour le 1^{er} élué et 0,298 g.cm⁻³ pour le 2nd.

2.2.4. Complexe hémicryptophane-gadolinium

2.2.4.1. Synthèse

Pour complexer le gadolinium, il faut que le ligand **VIII** soit sous sa forme phénolate. Pour ce faire, deux jeux de conditions basiques ont été testés : en milieu aqueux en présence de soude, et en milieu organique avec la triéthylamine comme base. Dans le 1^{er} cas, nous avons observé la formation d'une suspension quasi immédiatement après l'ajout de base, mais le suivi par spectrométrie de masse ne montre pas d'évolution vers la formation d'un complexe. On suppose que l'hydroxyde de Gd(III) insoluble (pK_s = 25,7)¹⁴⁷ se forme dans ces conditions et empêche la complexation. Le passage en solvant organique en utilisant le méthanol est plus concluant. Le ligand se solubilise aisément en présence de base dans le méthanol et un trouble apparaît aussi lors de l'ajout de triflate de gadolinium. La spectrométrie de masse montre la présence du complexe dans le milieu (et d'un pic à 979g/mol non identifié mais n'ayant pas le profil isotopique du Gd – figure 48). Le traitement laisse penser que le complexe correspond au solide en suspension, on détecte cependant en masse quelques traces du ligand dont le ratio dépend des conditions d'ionisation. Ceci tend à penser que le complexe est « propre » et qu'il se brise partiellement dans la chambre d'ionisation. Une analyse RMN ne permettrait pas de conclure, le Gd³⁺ paramagnétique conduirait à un éclatement des signaux sur plusieurs dizaines de ppm, rendant l'analyse quantitative de spectre et son interprétation compliquée. Nous disposons après cette synthèse d'environ 4mg de complexe sous forme de poudre blanche.

¹⁴⁷ Thèse de S. Aury, *Etude structurale et thermodynamique de la complexation de lanthanides (III) par des acides carboxyliques polyhydroxylés*. Université de Lorraine, 2002.

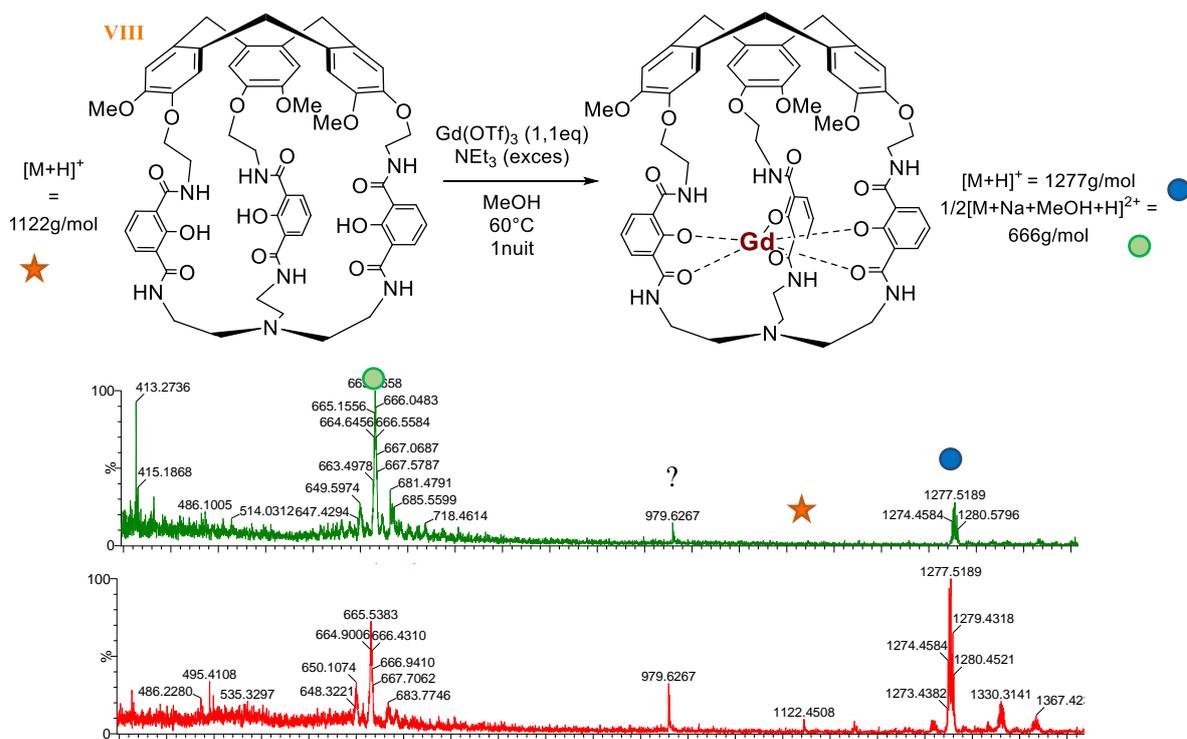


Figure 48 : Suivi par spectrométrie de masse de la complexation du Gd(III) avec **VIII**. Tension de cône de 60V (vert), 85V (rouge).

2.2.4.2. Premières mesures de paramètres de relaxation.

❖ Réalisées à Marseille avec Roseline Rosas

Il s'agit concrètement de mesurer le temps de relaxation longitudinal de l'eau en présence de complexe paramagnétique à différentes concentrations. L'expérience a été réalisée sur deux spectromètres RMN 500MHz et 300MHz. La mesure de T_1 est réalisée à l'aide d'une expérience dite d'inversion-récupération^{148 149} dont la séquence est représentée figure 49. L'aimantation \vec{M} initialement alignée avec le champ \vec{B}_0 subit une impulsion à 180° puis relaxe pendant un temps d'inversion TI variable. Une seconde impulsion à 90° permet de basculer l'aimantation résiduelle dans le plan transverse, et ainsi recueillir le signal généré pendant le mouvement de précession de \vec{M} . L'intensité du signal, à savoir, le singulet correspondant aux protons de l'eau dans notre cas, dépend du temps TI imposé en suivant une loi exponentielle (équation (3)). On réitère alors la séquence 1D d'inversion-récupération avec différents temps d'inversion TI. Il faut aussi laisser un temps D1 suffisant entre deux spectres protons, pour permettre une relaxation totale entre chaque expérience, afin de s'assurer de démarrer chaque acquisition à partir de la même norme du vecteur aimantation initial.

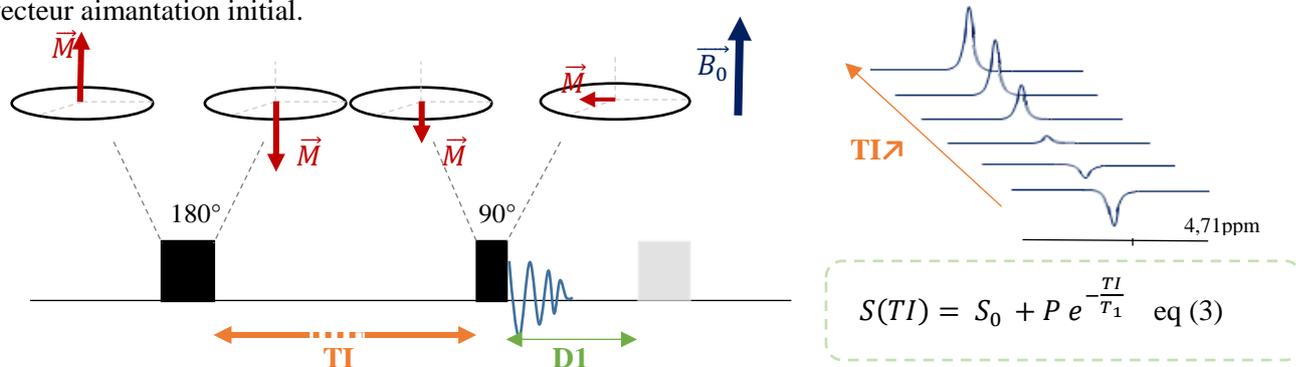


Figure 49 : Séquence RMN d'inversion récupération pour la mesure de T_1 .

¹⁴⁸ M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt, H-J. Weinmann, *Investigative Radiology*, **2005**, 40 (11), 715-724.

¹⁴⁹ R. L. Vold, J. S. Waugh, H. P. Klein, D. E. Phelps, *J. Chem. Phys.*, **1968**, 48, 3831.

Une fois les spectres RMN acquis, un logiciel de modélisation permet d'accéder simultanément aux valeurs de S_0 , P et surtout au temps T_1 de l'échantillon (voir partie expérimentale 5.3. pour plus de détails). Il est alors possible d'extraire la valeur de r_1 par régression linéaire, puis qu'il s'agit de la contribution paramagnétique à la relaxation longitudinale, ramenée à une concentration de complexe de 1mmol/L :

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i,dia}} + r_i \cdot C \quad i = 1,2 \quad \text{eq (2)}$$

Une première série de mesures a été effectuée sur un spectromètre RMN à la fréquence de 500MHz. Pour cela, on prépare cinq solutions de concentration 0,066 - 0,13 - 0,2 - 0,36 et 0,33 mM en complexe de gadolinium dans un mélange DMSO- d_6 /D $_2$ O (40/60). Nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilité malgré l'utilisation de DMSO pour les 2 plus fortes concentrations, mais avons tout de même utilisés ces solutions pour mettre au point tous les paramètres de la séquence RMN et avoir un ordre de grandeur de la valeur de r_1 à ce champ magnétique. La figure 50 ci-dessous regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Les valeurs de T_1 et $T_{1,dia}$ (cas du solvant seul), ont été extraites d'une modélisation des courbes exponentielles donnant l'intensité du signal en fonction du temps d'inversion appliqué grâce au logiciel Bruker Topspin 3.5.

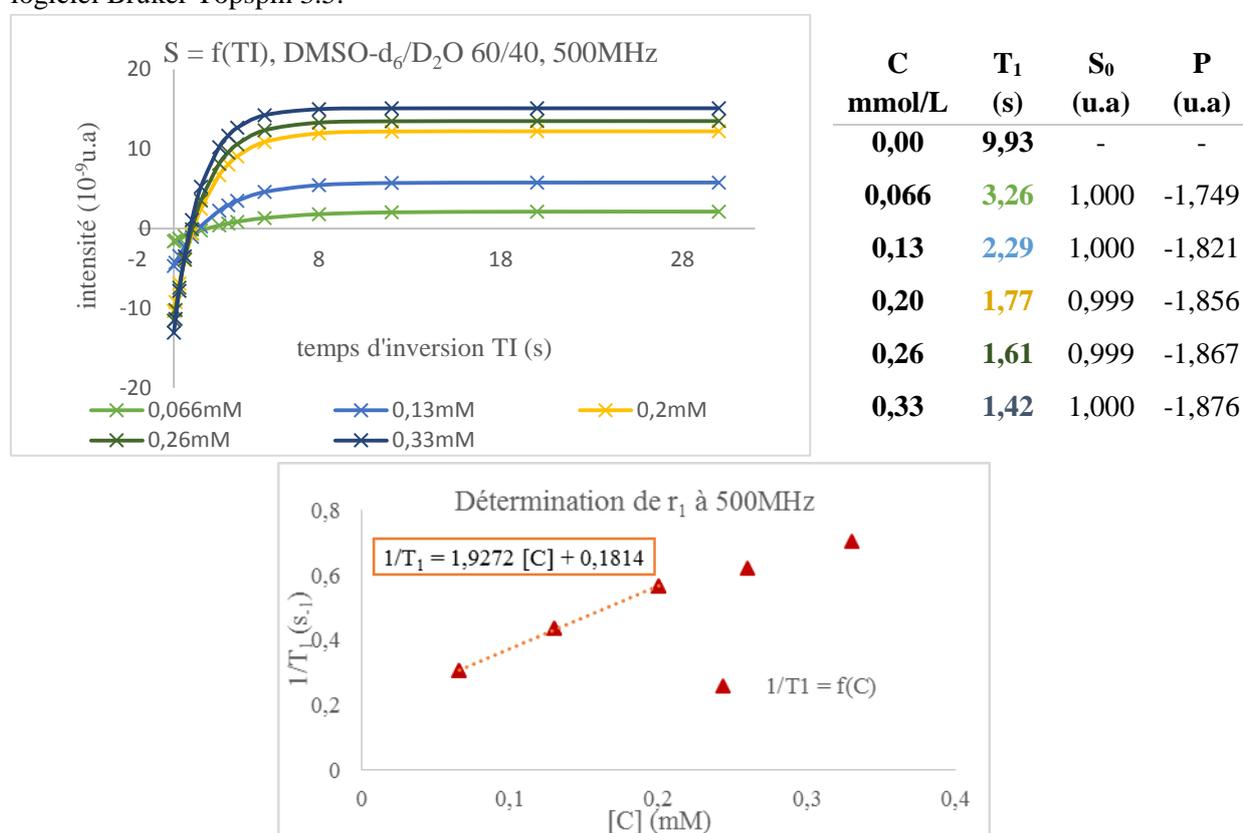


Figure 50 : Tracé des courbes donnant l'intensité du signal RMN de l'eau en fonction du temps d'inversion appliqué, et tableau résumant les paramètres extraits de la modélisation de ces courbes. Détermination de la relaxivité du complexe [hémicryptophane VIII- Gd], par régression linéaire sur les points les plus pertinents de la courbe $1/T_1 = f(C)$. Mesures réalisées à 303K et 500MHz dans DMSO- d_6 /D $_2$ O (40/60).

Les valeurs de temps de relaxation longitudinale obtenues sont comprises entre 1,4 et 3,2 s. On remarque au niveau de la régression linéaire, que les deux mesures correspondant aux concentrations 0,26 et 0,33 mM semblent moins fiables et cela est lié aux problèmes d'inhomogénéité des solutions correspondantes, trop fortement concentrées. Cependant, on obtient avec ces mesures une relaxivité longitudinale de l'ordre de $1,93 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 500MHz (11,7 T). Cette valeur est encourageante puisqu'il y est connu que la relaxivité longitudinale tend vers zéro à haut champ magnétique, et qu'on obtient malgré tout une valeur proche des relaxivités d'agents de contrastes commerciaux. En comparaison, le dotarem® est associé à une relaxivité de $3,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 1,5T (cf figure 31).

Nous avons alors adapté les mesures en passant dans un mélange DMSO-d₆/D₂O (85/15) et sur un spectromètre à 300MHz (figure 51). Des solutions de complexe, homogènes cette fois, sont préparées avec les concentrations suivantes : 0,1 – 0,2 – 0,3 – 0,4 et 0,5 mM. Les résultats sont regroupés figure 51 ci-dessous.

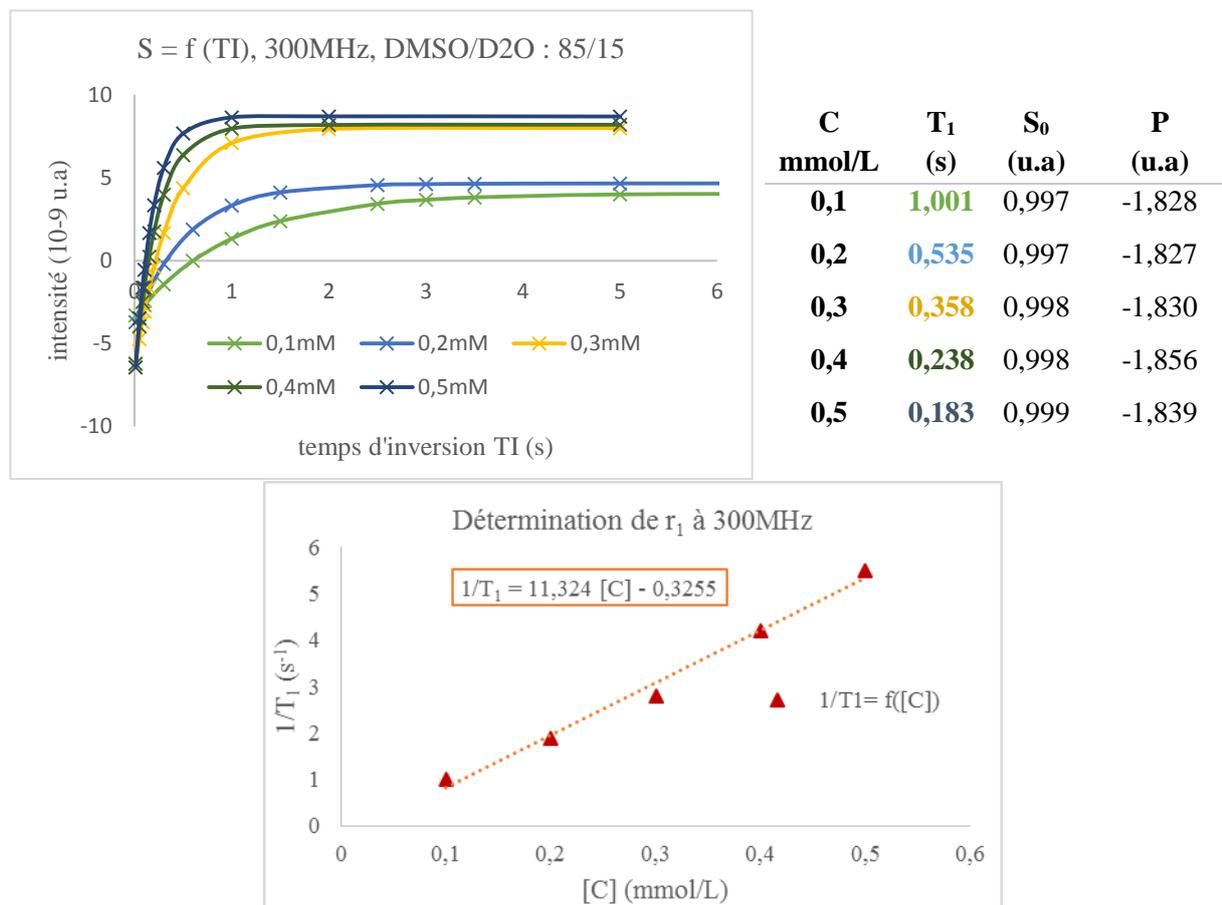


Figure 51 : Tracé des courbes donnant l'intensité du signal RMN de l'eau en fonction du temps d'inversion appliqué, et tableau résumant les paramètres extraits de la modélisation de ces courbes. Détermination de la relaxivité du complexe [hémicryptophane VIII- Gd], par régression linéaire de la courbe $1/T_1 = f([C])$. Mesures réalisées à 293K et 300MHz dans DMSO-d₆/D₂O (85/15).

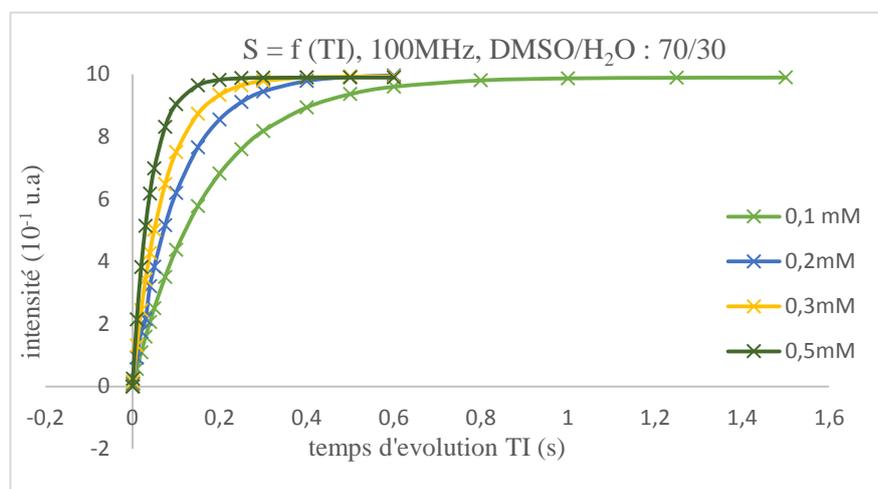
Le passage à un champ magnétique plus faible (300MHz = 7,4T) accélère fortement la relaxation puisqu'on atteint des valeurs de T₁ de l'ordre de la centaine de millisecondes, mais aussi et surtout la relaxivité qui s'élève cette fois à 11,3 mM⁻¹.s⁻¹. On dépasse à priori, en termes de propriétés magnétiques, l'efficacité des agents de contraste commerciaux, et cette valeur est comparable à celles obtenues à champ plus faible par l'équipe de K.N. Raymond pour des complexes de Gd³⁺ caractérisés par un nombre de molécules d'eau coordonnées au métal q = 2 (8,7 mM⁻¹.s⁻¹ < r_{1(1,5T)} < 13,1 mM⁻¹.s⁻¹ tableau 5).^{139, 140}

❖ Mesures réalisées à Nancy avec les Dr. Sabine Bouguet-Bonnet et Sébastien Leclerc.

Temps de relaxation et relaxivités :

La récente mise en place d'une collaboration avec les Dr. Sabine Bouguet-Bonnet et Sébastien Leclerc au CMR² à Nancy nous a permis de réaliser des expériences approfondies. Dans un premier temps nous avons pu mesurer des relaxivités longitudinales à un champ magnétique plus bas - 2,34 T (100MHz) - ce qui entre dans la gamme de champs utilisés pour des applications médicales. Les mesures ont été effectuées sur un mini imageur Brüker Biospec Avance 24/40 avec une sonde adaptée (fabriquée sur place), pour des solutions de concentrations 0,1 - 0,2 – 0,3 – 0,5 mM. Le solvant est cette fois un mélange DMSO-d₆ – eau distillée *non deutérée*. En effet, nous avons pris conscience durant cet échange avec les membres de l'équipe CMR² que la relaxivité longitudinale était à priori plus faible dans l'eau lourde que dans l'eau

légère car certains mécanismes de relaxation ne sont plus permis dans D₂O. Cela peut aussi être appréhendé en observant l'influence des paramètres γ^2_H et D_{H_2O} dans les équations théoriques de S.B.M. (annexe 1) et en notant que les rapports $\frac{\gamma^2_H}{\gamma^2_D}$ et $\frac{D_{H_2O}}{D_{D_2O}}$ s'élèvent respectivement à 170¹⁵⁰ et 0,8. Le rapport gyromagnétique γ intervient dans le mécanisme de relaxation de sphère interne alors que le coefficient de diffusion joue un rôle dans la relaxation de sphère externe. La figure 52 regroupe les résultats obtenus avec une expérience de saturation-récupération (voir annexe 2 pour plus d'explications).



C mmol/L	T ₁ (ms)	S ₀ (u.a)
0,0	883	0,996
0,1	171	0,989
0,2	103	0,999
0,3	71	0,983
0,5	41	0,989

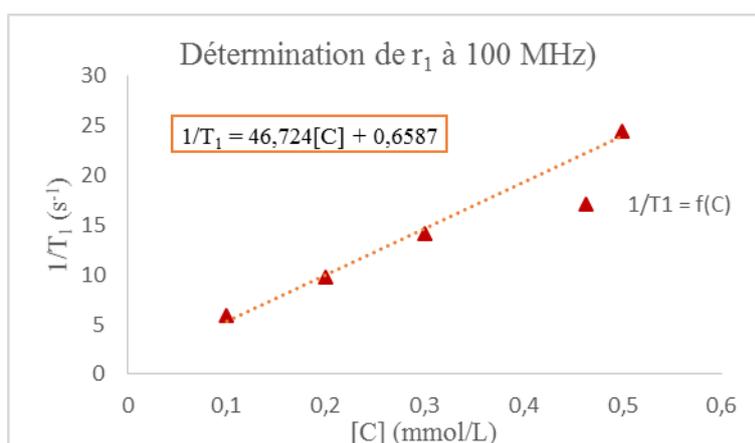


Figure 52 : Tracé des courbes donnant l'intensité du signal RMN de l'eau en fonction du temps d'évolution appliqué mesuré par saturation-récupération (annexe 2), et tableau résumant les paramètres extraits de la modélisation de ces courbes. Détermination de la relaxivité longitudinale du complexe VIII@Gd, par régression linéaire de la courbe $1/T_1 = f(C)$. Mesures réalisées à 297K et 100MHz dans DMSO-d₆/H₂O (70/30).

On obtient une relaxivité longitudinale r_1 de 46,7 mM⁻¹.s⁻¹ à 100 MHz et 24°C dans un mélange DMSO-d₆/eau : 70/30, soit plus de dix fois celle des agents de contraste commerciaux (3,6 mM⁻¹.s⁻¹ à 1,5T pour le dotarem en milieu physiologique) et plus de 3 fois les valeurs des complexes de K.N. Raymond (entre 8 et 13 mM⁻¹.s⁻¹ à 1,5T).

Ces données à 100MHz ont été complétées par des mesures de temps de relaxation transversaux T₂, en utilisant cette fois une séquence de type écho de spin « améliorée » de façon à s'affranchir des effets de la diffusion de molécules (séquence CPMG annexe 2). Le signal au cours de ces expériences décroît exponentiellement selon l'équation (4) : $S = S_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}$ (voir partie expérimentale). On obtient ainsi par

¹⁵⁰ Thèse d'Emilie Steiner, *Relaxométrie du proton pour l'étude de fluides à l'intérieur de milieux poreux*, Université Henri Poincaré-Nancy I, 2011.

simple modélisation les valeurs de T_2 à différentes concentrations, et la relaxivité correspondante (figure 53).

T_2 (s)	[C] mM/L
0,866	0
0,149	0,1
0,081	0,2
0,057	0,3
0,036	0,5

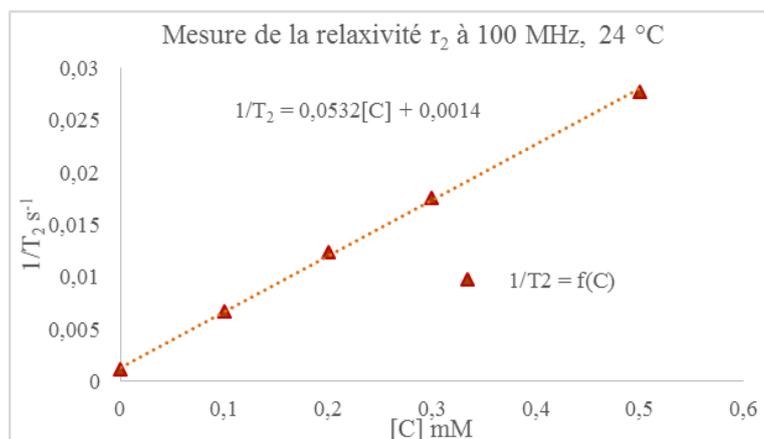
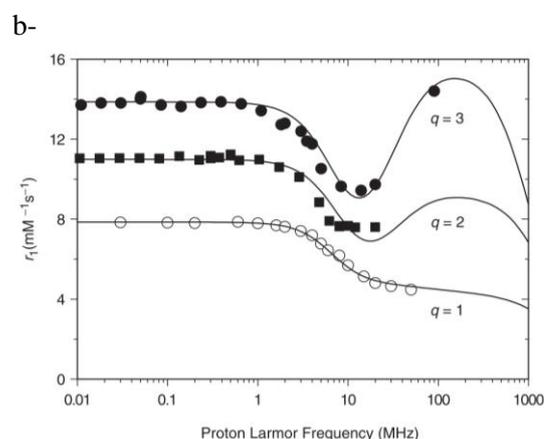
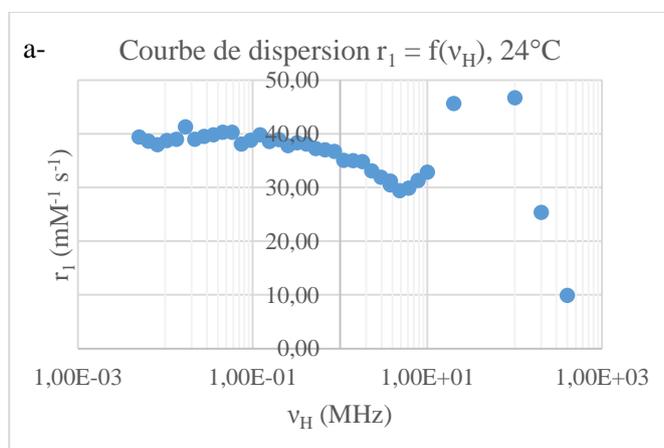


Figure 53 : Mesures des temps de relaxation transversaux de solutions de complexe à différentes concentrations et détermination de la relaxivité transversale du complexe [hémicryptophane **VIII**- Gd], par régression linéaire de la courbe $(1/T_2 - 1/T_{2\text{dia}}) = f(C)$. Mesures réalisées à 297K et 100MHz dans DMSO- d_6 /H $_2$ O (70/30).

On détermine ainsi une relaxivité transversale de $52,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans les conditions de mesure, qui correspond presque aux paramètres des particules ferromagnétiques utilisées comme agents de contraste T_2 (60 à $100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ cf tableau 3). Le gadolinium est en effet reconnu pour accélérer les 2 processus de relaxations transversaux et longitudinaux, et ces expériences le confirment.

Courbe de relaxométrie (NMRD profile) :

Une façon de rationaliser ces résultats prometteurs consiste à accéder aux paramètres de relaxivité caractéristiques des agents de contraste T_1 , en utilisant la théorie de S.B.M. détaillée dans l'annexe 1. Cette théorie met en équation l'évolution de la relaxivité en fonction de nombreux paramètres, dont le nombre de molécules d'eau (q) présentes dans la sphère de coordination du métal, des paramètres de dynamique d'échange des molécules d'eau entre différentes sphères de coordination, ou encore, le temps de corrélation rotationnel du complexe, c'est - à - dire les paramètres que nous souhaitons optimiser via le design du ligand hémicryptophane **VIII**. L'outil de choix permettant d'obtenir expérimentalement ces informations est la relaxométrie en champ cyclé (annexe 2), qui donne accès à des courbes de dispersion de relaxation magnétique nucléaire. Ces courbes représentent l'évolution de la relaxation globale (contribution dia- et paramagnétique) d'un échantillon en fonction de la fréquence de résonance du proton. En réalisant les mesures à plusieurs concentrations, on peut en déduire la courbe représentant la relaxivité r_1 (contribution uniquement paramagnétique) en fonction de la fréquence communément appelée $^1\text{H-NMRD profile}$ (figure 54). La modélisation de cette courbe donnera alors accès aux paramètres désirés.



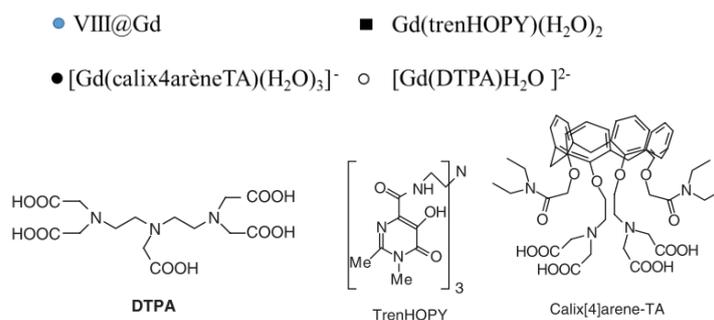


Figure 54 : a- Courbe de dispersion ¹H du complexe VIII@Gd(III) mesurée à 24°C sur un appareil *Stelar SMARtracer* et mesures complémentaires à 20 MHz ainsi qu'à 100MHz, 200MHz et 400MHz b- Courbes de dispersion ¹H de trois complexes de Gd(III) mesurées à 25°C. ¹⁵¹ ¹⁵² ¹⁵³ ¹⁵⁴

La figure 54-a ci-dessus montre la courbe obtenue, sur un relaxomètre allant de 4 kHz à 10MHz avec des points supplémentaires mesurés indépendamment, à 20MHz, 100 MHz 200 MHz et 400MHz. La forme de la courbe est celle classiquement observée pour des agents paramagnétiques. L'allure générale laisse espérer un nombre de molécules d'eau coordonnées $q > 1$ si l'on compare aux courbes obtenues (figure 54-b) pour des complexes de Gd(III) dont le paramètre q a été déterminé par d'autres méthodes, et varie entre 1 et 3. Il nous reste cependant un important travail de modélisation à mettre au point afin d'accéder aux paramètres de relaxivité paramagnétique du complexe VIII@Gd.

Acquisition d'images IRM :

Nous avons pu visualiser concrètement l'effet de ces paramètres de relaxation via l'obtention d'image IRM sur ce même imageur Brüker Biospec Avance 24/40, avec une sonde RapidBiomedical (de diamètre 5cm). Pour ce faire, la séquence RMN mise en place est un écho de spin accompagné des gradients de champs magnétiques permettant l'obtention d'images en deux dimensions (voir annexe 2) et les temps de répétition TR et d'écho TE sont choisis de manière à réaliser dans un premier temps une image pondérée en T₂ – figure 55-a. Celle-ci permet de visualiser le contraste résiduel dû à la relaxation transversale. Cette image sert de témoin, on y remarque une légère évolution du contraste du blanc vers le gris lorsque la concentration en complexe de gadolinium augmente. La figure 55-b est une image IRM pondérée en T₁ des mêmes échantillons et on remarque l'effet du métal paramagnétique (agent T₁). La tendance est inversée par rapport à l'image T₂ et le contraste est beaucoup plus marqué.

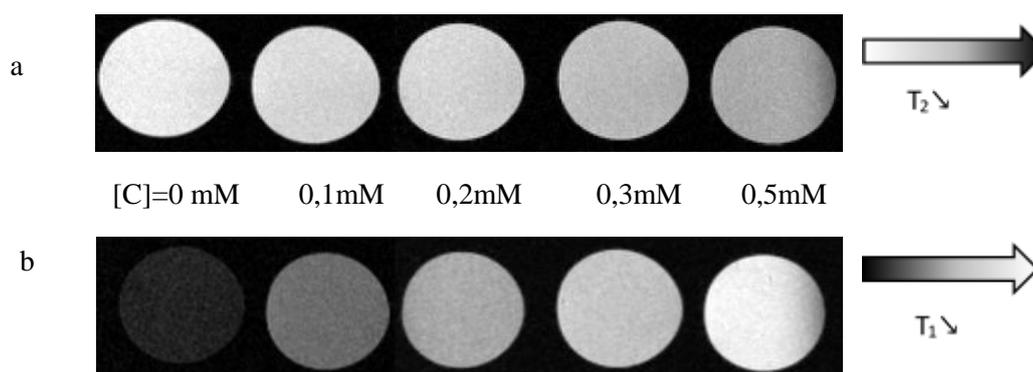


Figure 55 : Images IRM d'échantillons à différentes concentrations en complexe **VIII-Gd**. a- image T₂ avec TR = 10 s TE = 11,5 ms. b- image T₁ avec TR = 50 ms TE = 11,5 ms.

¹⁵¹ S. Aime, M. Botta, E. Terreno, *Advances in inorganic chemistry*, vol 57, ISSN : 0898-8838, Elsevier Ed, **2005**, 173-237.

¹⁵² K.N. Kellar, P.M. Henrichs, M. Spiller, S.H. Koenig, *Magnetic Resonance in Medicine*, **1997**, 37, 730-735.

¹⁵³ K.N. Raymond, V.C. Pierre, *Bioconjugates*, **2005**, 16, 3-8.

¹⁵⁴ S. Aime, A. Barge, M. Botta, A. Casnati, M. Fragai, C. Luchinat, R. Ungaro, *Angew.Chem.*, **2001**, 40 (24), 4737-4739

2.2.5. Perspectives

Malgré des travaux de synthèses fastidieux, nous avons pu élaborer le premier ligand hémicryptophane capable de complexer un lanthanide : le Gadolinium. Ce complexe hémicryptophane **VIII**-Gd(III) est un premier prototype d'agent de contraste T_1 très prometteur d'après les premières caractérisations, surtout si l'on se réfère aux valeurs de relaxivités observées à 100MHz, dans le mélange DMSO/eau ($r_1 = 46,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $r_2 = 52,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Il reste cependant à rationaliser ces observations dans un premier temps par une comparaison expérimentale en mesurant la relaxivité d'un agent de contraste connu, comme le dotarem, dans les mêmes conditions (solvant, température, champ magnétique). Dans un second temps, il faudrait confronter les résultats à la théorie de S.B.M. afin de comprendre l'origine du gain de contraste. Plus concrètement, il s'agit de modéliser la courbe de relaxométrie obtenue en fixant au préalable quelques paramètres des équations de S.B.M., et en laissant s'adapter les autres. On pourrait ainsi en extraire des valeurs de temps de corrélation rotationnelle τ_R , du nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du metal, q , ou encore de leur temps de résidence τ_M . Un premier test de modélisation (figure 56) a été réalisé et tend à montrer que 2 molécules d'eau entrent dans la sphère de coordination du Gd(III). Ce résultat reste à affiner et devra être confirmé par des mesures directes de paramètres ou par d'autres techniques de modélisation.

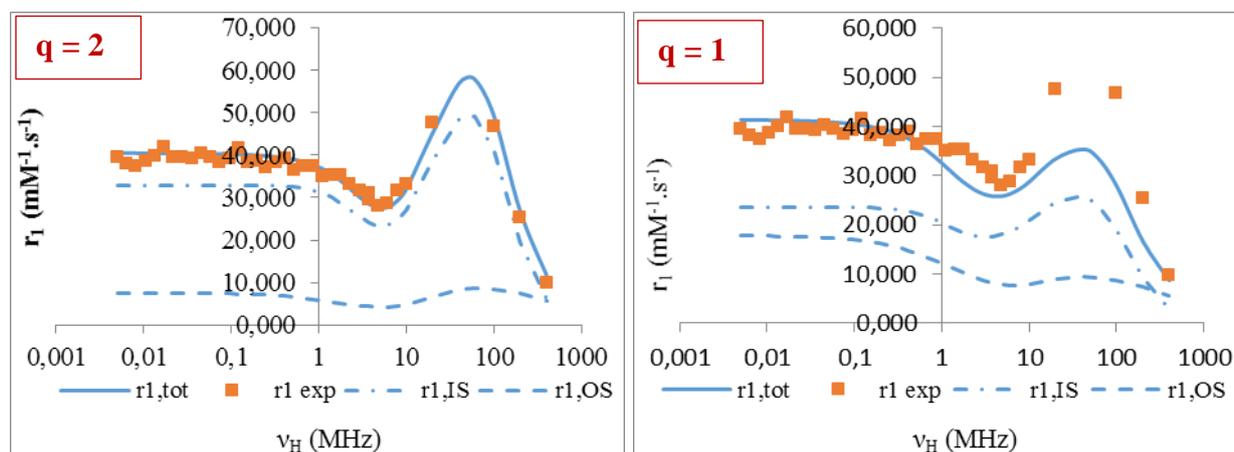


Figure 56 : 1^{ers} tests de modélisation des courbes de dispersion réalisées par Sabine Bouguet-Bonnet (CMR² Nancy) en fixant les paramètres suivants : $r_{GdH} = 3,1 \text{ \AA}$; $\tau_M = 2 \mu\text{s}$; $\tau_R = 5 \text{ ns}$; $\tau_v = 15 \text{ ps}$. (voir annexe 1).

Par ailleurs, aucune caractérisation de la stabilité du complexe n'a été effectuée à ce jour, mais c'est un paramètre important à quantifier dans le cadre d'applications biologiques. Nous disposerons bientôt d'un calorimètre adapté au sein du laboratoire pour mettre au point les mesures de grandeurs thermodynamiques.

Il faudrait aussi s'atteler à réduire et faciliter l'accès synthétique au ligand hémicryptophane **VIII**, ainsi que mettre au point des analogues hydrosolubles, afin d'en étudier les propriétés de relaxation et la stabilité cinétique en milieu physiologique.

Enfin nous ne perdons pas de vue l'objectif visant à combiner les propriétés de reconnaissance des hémicryptophanes, aux propriétés magnétiques des futurs complexes, afin de mettre au point des sondes IRM spécifiques.

Chapitre 3 : Conception d'une biosonde de type cryptophane pour l'IRM au xénon hyperpolarisé

L'IRM du proton décrite dans le chapitre précédent est une technique d'imagerie moléculaire puissante grâce, entre autres, à la grande résolution des images obtenues et aux nombreuses stratégies visant à en améliorer la sensibilité. Mais ce domaine d'imagerie, basé sur les principes de la RMN, s'étend aussi à d'autres noyaux comme l'hélium, le carbone, le xénon... Nous nous focaliserons par la suite sur le xénon, qui permet d'étendre le diagnostic à des tissus où la densité de protons est faible, ou encore, d'explorer des voies aériennes comme les poumons puisqu'il s'agit d'un gaz.

3.1. Introduction à l'IRM au Xe hyperpolarisé

3.1.1. L'IRM au Xe hyperpolarisé : principe général.

3.1.1.1. Le xénon.

Le xénon est un gaz rare qui possède 8 isotopes stables et plus d'une vingtaine d'isotopes radioactifs. L'application principale du xénon dans le domaine médical est en tant qu'anesthésiant, puisqu'il est non toxique et soluble dans la plupart des fluides biologiques. Par ailleurs, parmi les isotopes instables, le ^{133}Xe a été le premier à être utilisé dans le cadre d'imagerie médicale, pour la scintigraphie de poumons, puis la radiographie d'autres organes comme le cœur et le cerveau.¹⁵⁵ C'est au début des années 2000 que les propriétés magnétiques du xénon sont mises à profit en IRM avec la conception des premières sondes adaptées à cette technique.¹⁵⁶ Seuls deux isotopes stables possèdent un spin nucléaire non nul, le ^{129}Xe et le ^{131}Xe de spins respectifs 1/2 et 3/2. L'isotope 129 a été retenu car il fournit des signaux plus simples en RMN, et est aussi le plus abondant des deux candidats. Il présente par ailleurs le plus long temps de relaxation T_1 , ce qui est un paramètre important pour l'hyperpolarisation (paragraphe suivant). Mais le principal atout du xénon est sa forte polarisabilité qui induit directement une forte sensibilité au milieu extérieur. Ainsi la RMN du xénon s'étend sur une plage de près de 300 ppm (comparé à 15 ppm pour le proton-figure 57), et l'on peut aisément différencier le xénon gazeux, du xénon en solution dans différents solvants, différents tissus, ou encore encapsulé au sein d'une protéine ou d'un hôte synthétique.¹⁵⁷ En sélectionnant alors une fréquence de travail correspondant au xénon dans un environnement donné, on peut cartographier un échantillon ou un patient, et visualiser les zones où le xénon est plus ou moins concentré.

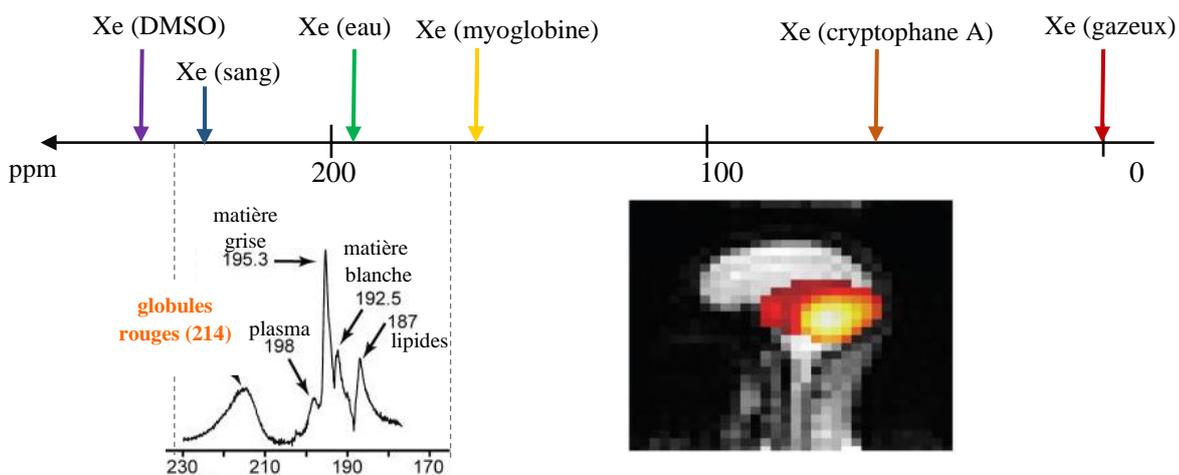


Figure 56 : Répartition de certains déplacements chimiques du xénon. Spectre RMN- ^{129}Xe du cerveau d'un sujet humain, et image IRM obtenue en sélectionnant la fréquence correspondant au ^{129}Xe dans les globules rouges.¹⁴³

3.1.1.2. L'hyperpolarisation.

Tout comme l'IRM du proton, l'inconvénient majeur de l'IRM (et de la RMN) du xénon est son manque de sensibilité. Pour pouvoir obtenir des images ou spectres d'intensité significative comme sur la figure 57, il faut injecter du xénon dit hyperpolarisé. Revenons aux bases de la RMN pour expliquer le principe de l'hyperpolarisation. En RMN, l'échantillon à analyser est placé dans un champ magnétique \vec{B}_0 dont le rôle est d'aligner l'ensemble des spins nucléaires du noyau d'intérêt. Deux états de spin d'énergies différentes se distinguent alors : les spins sont soit parallèles (état α), soit antiparallèles (état β) au champ

¹⁵⁵ S. A. Herzog, A. F. Jacobson, *J. Nucl. Med. Technol.* **1995**, 23, 258-261.

¹⁵⁶ M.M. Spence, S.M. Rubin, I.E. Dimitrov, E.J. Ruiz, D.E. Wemmer, A. Pines, S.Q. Yao, F. Tian, P.G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 10654–10657.

¹⁵⁷ P. Nikolaou, B.M. Goodson, E.Y. Chekmenev, *Chemistry – A Eur. J.*, **2015**, 21, 3156.

\vec{B}_0 . C'est la différence de population entre ces deux états qui crée une aimantation globale de l'échantillon \vec{M} , celle-ci même qui est manipulée à l'aide d'impulsions radiofréquences. L'intensité du signal RMN est intimement liée à cette différence de population. On introduit un paramètre P la polarisation qui est directement proportionnelle au signal (figure 58).

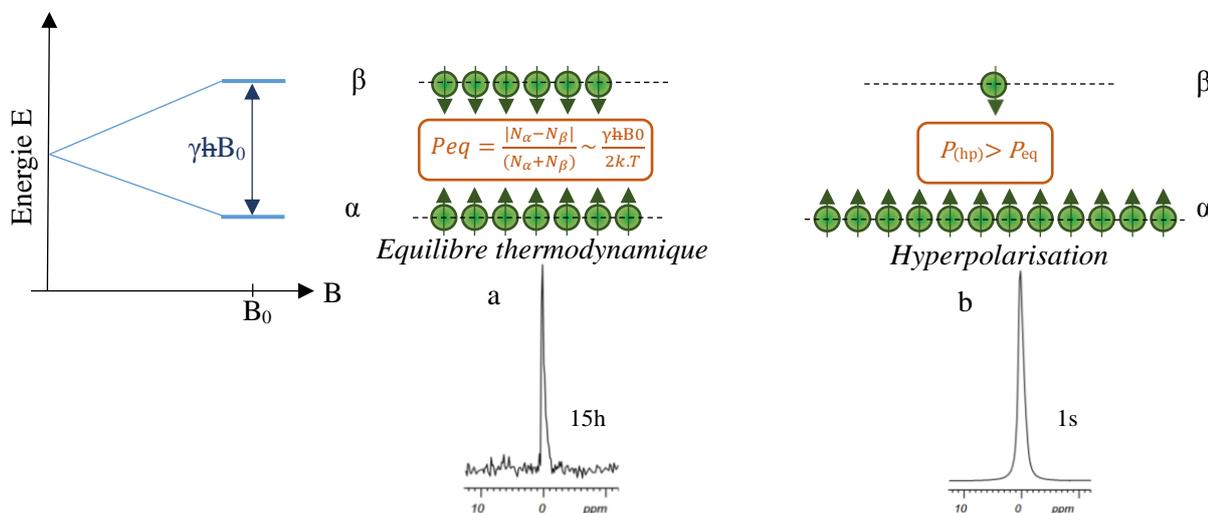


Figure 58 droite : Représentation des états de spin d'un noyau tel que $S=1/2$ dans un champ magnétique B_0 , et expression générale de la polarisation P à l'équilibre thermodynamique - gauche : effet de l'hyperpolarisation. Comparaison de deux expériences de RMN du ^{129}Xe -a- acquisition de 15 heures dans les conditions d'équilibre thermodynamique -b- acquisition d'une seconde avec du xénon hyperpolarisé.¹⁵⁸

Hyperpolariser un échantillon revient à accentuer la différence de population entre les spins α et β du noyau considéré, ce qui implique une augmentation du signal de 10^3 à 5.10^5 comparé à l'état d'équilibre thermodynamique. Il s'agit donc d'un état hors équilibre, non stable, dont la durée de vie est de l'ordre de la valeur du T_1 (temps de relaxation longitudinal) du noyau. Une fois hyperpolarisé le xénon doit être assimilé par l'organisme et l'analyse RMN rapidement effectuée, d'où l'intérêt de travailler avec des noyaux qui relaxent lentement. Plusieurs techniques ont été mises au point pour atteindre un état hyperpolarisé : le pompage optique (adapté au cas du xénon),¹⁴⁴ la polarisation nucléaire dynamique (DNP) ou la polarisation para-hydrogène (PHIP). L'influence de cette hyperpolarisation est importante à la fois sur le temps et sur la qualité d'acquisition du signal comme en témoigne la figure 58.

3.1.2. Amélioration du diagnostic en IRM du Xe

3.1.2.1. Stratégie synthétique : conception de biosondes¹⁴⁴

Le xénon est un élément de choix pour l'imagerie médicale du fait de sa biocompatibilité, de son mode d'administration facile (inhalation), et de sa bonne pénétration dans les tissus biologiques. Cependant, ce gaz diffuse de façon homogène dans l'organisme et n'est pas capable de cibler un organe, ou un processus biologique précis. Le diagnostic d'une pathologie peut alors être amélioré par la conception de biosondes adaptées, aussi appelées agents de contraste pour l'IRM de xénon. Il s'agit de récepteurs dotés d'une forte affinité pour le xénon, et fonctionnalisés de façon à posséder un site de reconnaissance d'entités biologiques cibles. La forte sensibilité du xénon à son environnement chimique est mise à profit pour différencier en RMN les fréquences des signaux dus au xénon libre, de ceux associés au xénon encapsulé attaché ou non à sa cible (figure 59). En sélectionnant la fréquence qui caractérise un récepteur fixé à une biomolécule, on peut obtenir une image IRM témoignant de la répartition de la cible biologique.

¹⁵⁸ P. Berthault, G. Huber, H. Desvaux, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2009**, 55, 35-60.

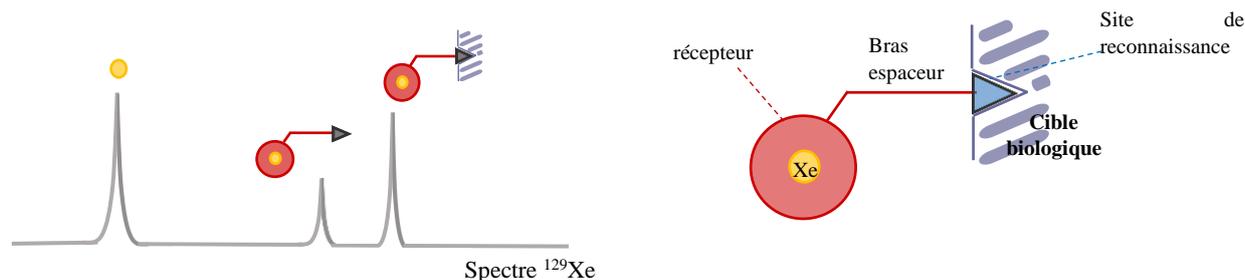


Figure 59 : Schématisation du principe de fonctionnement d'un agent de contraste en IRM du ^{129}Xe . Les 3 états du xénon (seul - encapsulé - encapsulé et attaché à une cible biologique) ont des déplacements chimiques distincts.

Pour être efficace le récepteur doit satisfaire plusieurs conditions :

(i) D'un point de vue structural, l'hôte doit avoir une forte affinité pour le xénon ce qui peut être favorisé de deux manières. D'une part, en concevant une poche à caractère hydrophobe, et d'autre part en adaptant la taille de la cavité. Pour répondre au critère publié par Rebek ²⁷, c'est-à-dire, pour que le xénon – ayant un rayon de Van der Waals de 2,2 Å- occupe 55% du volume total, une cavité de 76Å^3 est optimale (soit un diamètre de 5,3Å pour une sphère).

(ii) Les autres conditions sont liées à l'acquisition du signal RMN. Le récepteur ne doit pas trop accélérer le processus de relaxation du xénon, ce qui provoquerait une perte trop rapide de l'hyperpolarisation. Enfin, une dynamique d'échange *in-out* du gaz est nécessaire. Le temps de résidence du xénon dans la cavité du récepteur doit être suffisamment court pour permettre l'hyperpolarisation d'un maximum d'atomes à la fréquence du Xe encapsulé. Mais le processus d'échange doit être lent à l'échelle de temps de l'acquisition RMN afin de maintenir une bonne résolution des différents signaux observés.

Plusieurs types de récepteurs connus en chimie supramoléculaire ont été testés. Les systèmes auto-assemblés ont été proscrits car l'imagerie du ^{129}Xe est associée à de très faibles concentrations de travail, responsables du désassemblage de telles structures supramoléculaires. Les cyclodextrines ne répondent pas au critère d'encapsulation efficace du Xe, puisque la plus petite cavité envisageable correspond à un volume de 140Å^3 . L'échange *in-out* du gaz est alors trop rapide pour recueillir de bons signaux RMN. Le même problème de rapidité d'échange est observé avec les calixarènes. Quant aux carcérands comme les fullerènes, ils empêchent la sortie du xénon une fois encapsulé. Les deux familles les plus prometteuses sont celles des cucurbiturils avec des constantes d'affinité pour le Xe allant de l'ordre de 300 à 3000 M^{-1} , ¹⁵⁹ ¹⁶⁰ et des cryptophanes. L'affinité du gaz est meilleure avec ces cryptophanes. Cependant, les cucurbiturils offrent l'accès à une plage de déplacements chimiques bien distincte de celle des cryptophanes, ce qui peut être intéressant si l'on souhaite détecter plusieurs procédés en même temps (multiplexing). Nous nous focaliserons par la suite sur les récepteurs de type cryptophanes.

3.1.2.2. Optimisation de la technique en RMN : l'hyperCEST.

La conception d'agents de contraste à base de ^{129}Xe est un réel progrès dans la mesure où cela permet un diagnostic plus ciblé et précis. Mais la dose de sonde injectée à un patient étant de l'ordre du subnanomolaire, l'hyperpolarisation du xénon devient alors insuffisante pour détecter efficacement le signal, et d'autres stratégies doivent être mises en place pour améliorer la sensibilité de cette méthode d'imagerie. Les premières idées, déjà mises à profit dans d'autres techniques d'imagerie, consistent à augmenter la concentration locale en ^{129}Xe en élaborant par exemple des récepteurs de types

¹⁵⁹ B. S. Kim, Y. H. Ko, Y. Kim, H. J. Lee, N. Selvapalam, H. C. Lee, K. Kim, *Chem. Commun.*, **2008**, 2756.

¹⁶⁰ Y. Wang, I. J. Dmochowski, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 8982-8985.

dendrimères¹⁶¹, ou via le développement de matériaux poreux,¹⁶² de nanoparticules,¹⁶³ voire l'utilisation de capsides virales¹⁶⁴ pouvant transporter plus d'un atome de xénon.

Mais la stratégie la plus populaire à ce jour est une amélioration de la méthode d'acquisition du signal, en utilisant le principe de saturation d'un échantillon. En imagerie par résonance magnétique, la saturation correspond à un état temporaire pendant lequel un échantillon, subissant une irradiation adaptée, ne possède plus d'aimantation globale ($\vec{M} = \vec{0}$).¹⁶⁵ Dans le cas de l'imagerie du ^{129}Xe cette méthode est appelée l'hyperCEST (figure 60), (**hyper**polarized species detection through **C**hemical **E**xchange **S**aturation **T**ransfert). Cette méthode utilise la capacité du ^{129}Xe encapsulé à s'échanger avec le solvant environnant à l'échelle de temps de la RMN, pour détecter indirectement le complexe récepteur-xénon.¹⁵⁸ Pour ce faire, on acquiert dans un premier temps un spectre RMN d'un échantillon contenant le récepteur, et le xénon préalablement hyperpolarisé, en observant l'intensité du pic correspondant au ^{129}Xe dans l'eau (Xe@H₂O, **vert**). Puis l'échantillon est soumis à une impulsion à la fréquence de résonance du xénon encapsulé, ce qui a pour conséquence de saturer et donc dépolariiser les atomes de gaz contenus dans le récepteur. L'échange *in-out* du xénon est suffisamment rapide pour que plusieurs atomes soient dépolariisés par une seule molécule cage pendant la durée de l'impulsion, et c'est pour cette raison que la sensibilité se trouve accrue. Après l'expérience de saturation un nouveau spectre est acquis (Xe@H₂O **jaune**) mettant en relief la dépolariisation partielle des atomes de xénon relargués. L'effet de saturation, qui a été imposé au ^{129}Xe encapsulé, est finalement transféré au signal du ^{129}Xe libre qui est atténué. La différence entre les deux spectres avant et après saturation, fournit un signal dit hyperCEST (**bleu**), témoin de la présence de sonde dans le milieu, là où une acquisition directe du signal RMN du ^{129}Xe engagé ne donne pas de signal.

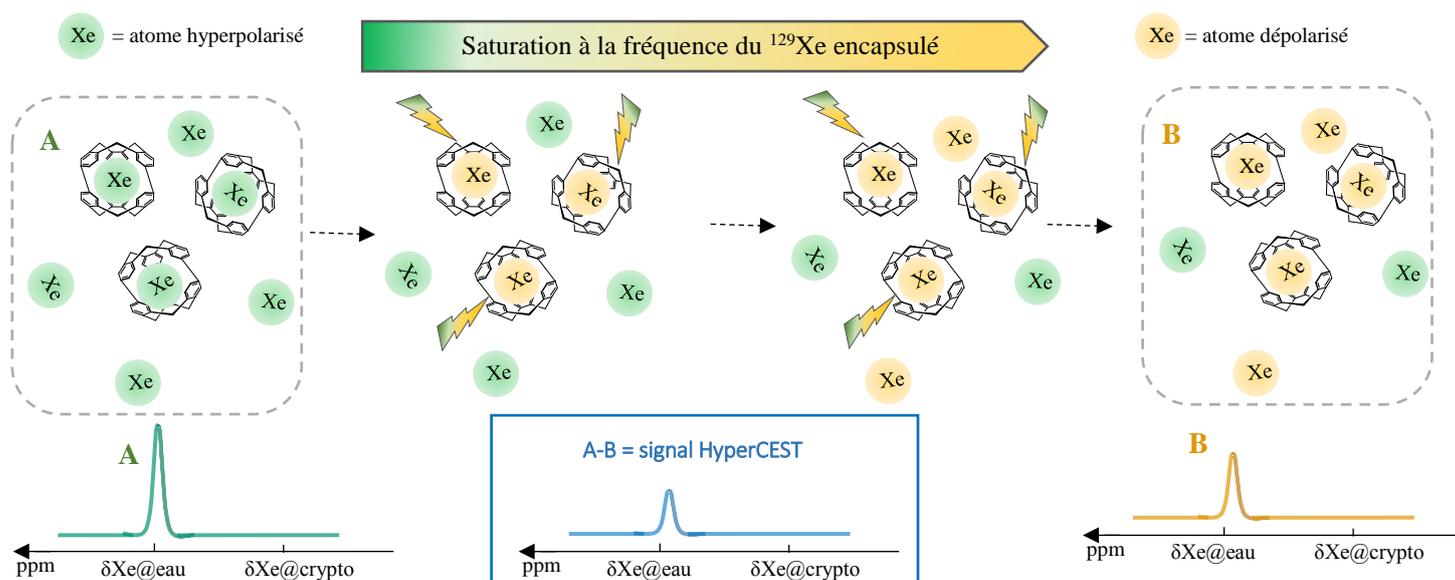


Figure 60 : Principe de l'acquisition d'un signal hyperCEST

¹⁶¹ J. Mynar, T. Lowery, D. Wemmer, A. Pines, J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128 (19), 6334-6335.

¹⁶² Siurdyban E, Brotin T, Heuzé K, Vellutini L, Buffeteau T, *Langmuir.*, **2014**, 30(49), 14859-14867.

¹⁶³ F. Lerouge, O. Melnyk, J-O. Durand, L. Raeh, P. Berthault, G. Huber, H. Desvaux, A. Constantinesco, P. Choquet, J. Detour, M. Smaïhi, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 379-386.

¹⁶⁴ T. Meldrum, K. Seim, V.S. Bajaj, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132 (17), 5936-5937.

¹⁶⁵ B.Wu, G.Warlock, M.Zaiss, C.Lin, M.Chen, Z.Zhou, L.Mu, D.Nanz, R.Tuura, G.Delso, *Physics*, **2016**, 3, 19-40.

3.2. Vers la conception d'une nouvelle sonde

3.2.1. Les cryptophanes en RMN et IRM du xénon

3.2.1.1. Les cryptophanes : des récepteurs adaptés

- ❖ Une bonne affinité et sélectivité pour le xénon

Les cryptophanes présentent une forte affinité avec le xénon grâce au caractère hydrophobe de la cavité. Cependant, d'autres petites molécules biologiques hydrophobes pourraient être encapsulées, c'est pourquoi il est nécessaire d'obtenir des constantes d'association élevées entre xénon et récepteur. Dans le cas des cryptophanes, la taille de la cavité et sa flexibilité, sont modulables avec la longueur de chaîne des bras espaceurs intégrés lors de la synthèse. On peut voir dans les données du tableau 7 que la constante d'affinité du xénon pour les cryptophanes augmente quand la longueur de chaîne diminue. La valeur de 10 000 est atteinte pour le cryptophane [111](H)₆, qui s'approche au mieux du critère stérique de Rebek avec une cavité de 81 Å³ (la valeur optimale étant de 76 Å³). Il faut également noter que la modulation des substituants sur les CTB joue sur les capacités d'encapsulation du xénon (entrées 8 à 14). Ces valeurs sont associées à des récepteurs où les deux CTB adoptent une conformation couronne de type *out-out* offrant une cavité sphérique. Souvent la présence d'un CTB sous forme saddle ou une conformation *in-out* de cryptophane ne favorise pas la complexation du xénon.¹⁶⁶ Ces conformères se rencontrent surtout à partir des longueurs de chaîne $n \geq 2$, offrant une flexibilité suffisante à l'inversion des cycles aromatiques.

	[n,n,n]	R ¹ , R ²	Taille de la cavité (Å ³)	K (L/mol) ; solvant organique ou eau	T _{1cage} (s) ^[151]
1	[3,3,3]	OMe, OMe	121	5-10 ^[167] organique	--
2	[2,3,3]	OMe, OMe	117	810 ^[151] organique	--
3	[2,2,3]	OMe, OMe	102	2800 ^[151] organique	--
4	[2,2,2]	OMe, OMe	95	3000 ^[151] organique	12,1
5	[1,1,1]	H,H	81	10 000 ^[151] organique	18,8
6	[1,1,1]	H,H (CTB hydrosoluble)	--	29000 ^[168] eau	--
7	[0,0,0]	OMe, OMe bras S-S	40 ^[169]	--	--
8	[3,3,3]	OCH ₂ COOH, OCH ₂ COOH	121	6800 ^[151] eau	--
9	[2,3,3]	OCH ₂ COOH, OCH ₂ COOH	117	2200 ^[151] eau	--
10	[2,2,3]	OCH ₂ COOH, OCH ₂ COOH	102	2200 ^[151] eau	--
11	[2,2,2]	OCH ₂ COOH, OCH ₂ COOH	95	1000 ^[151] eau	--
12	[2,2,2]	OMe, OCH ₂ COOH	--	33 000 ^[170] eau	--
13	[2,2,2]	OMe, triazole propioniacid	--	17 000 ^[154] eau	--
14	[2,2,2]	PEG ₁₁ , PEG ₁₁	--	5800 ^[171] eau	--
15	[2,2,2]	H,H	--	--	3,9
16	[2,2,2]	H, OMe	--	--	5,7
17	[2,2,2]	H, OBn	--	--	9,3
18	[2,2,2]	OCH ₂ COOD, OCH ₂ COOD	--	--	12,1
19	[2,2,2]	OCD ₂ COOD, OCD ₂ COOD	--	--	17,6

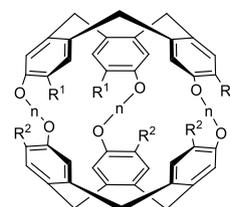


Tableau 7 : Valeurs de constantes d'association, de T₁, et taille des cavités de complexes cryptophanes-xénon

¹⁶⁶ G. Huber, T. Brotin, L. Dubois, H. Desvaux, J-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 6239-6246.

¹⁶⁷ P. Berthault, G. Huber, H. Desvaux, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2009**, 55, 35-60.

¹⁶⁸ R. M. Fairchild, A. I. Joseph, K. T. Holman, H. A. Fogarty, T. Brotin, J-P. Dutasta, C. Boutin, G. Huber, P. Berthault., *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132 (44), 15505-15507.

¹⁶⁹ M.A. Little, J. Donkin, J. Fisher, M.A. Halcrow, J. Loder, M.J. Hardie, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 51, 764-766.

¹⁷⁰ P.A. Hill, Q. Wei, T. Troxler, I.J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(8), 3069-3077.

¹⁷¹ L. Delacour, et al., *Chem Eur J*, **2013**, 16, 6089-6093.

- ❖ Des paramètres favorables pour l'hyperCEST : vitesse d'échange et temps de relaxation.

La flexibilité de la cage joue aussi sur la dynamique d'échange du xénon entre la cage et le milieu extérieur. Pour les cryptophanes, les constantes de vitesse d'échange à des températures allant de 293 à 310K, sont comprises en général entre 1 et 500Hz¹⁷² avec par exemple une valeur de 2,4Hz à 293 K pour le cryptophane [111](H)₆.¹⁷³ Ceci satisfait la condition de régime lent à l'échelle de l'acquisition RMN puisque la limite haute à ne pas franchir pour un appareil à 1,5T - champ magnétique classique pour des applications médicales - est de 21kHz. En revanche, pour des utilisations en hyperCEST mieux vaut maximiser la vitesse d'échange pour dépolariser le maximum d'atomes par saturation en un temps donné, et minimiser les doses de récepteurs à injecter. Ainsi, les cages qui satisfont les conditions d'efficacité d'encapsulation, en conservant une cinétique d'échange du xénon correcte sont surtout les cryptophanes [111], [222] et [223].

Compte tenu de l'utilisation du concept d'hyperpolarisation, il est nécessaire de s'assurer que le passage du xénon au sein du récepteur n'accélère pas trop la relaxation des spins, ce qui provoquerait une atténuation du signal recueilli. Il a été défini, en prenant en compte le temps de résidence du ¹²⁹Xe dans le récepteur, qu'un T_{1cage} de l'ordre de 10 s pour le xénon engagé permettait encore de réaliser des mesures correctes. Ce sont principalement les interactions xénon-proton qui sont responsables de l'atténuation de T_{1cage} au sein des cryptophanes. Ceci est confirmé par les données du tableau 7, puisque non seulement la substitution en R¹ et R² ralentit la relaxation du xénon, mais que la deutération de ces groupements accroît aussi grandement les temps de relaxation.

- ❖ Une gamme de déplacements chimiques variés.

Pour pouvoir utiliser les sondes en imagerie du ¹²⁹Xe, les déplacements chimiques du xénon libre et encapsulé doivent impérativement être distincts. C'est le cas pour les cryptophanes qui donnent un signal du xénon complexé autour de 60 ppm alors que le signal du xénon solubilisé dans l'eau, le sang ou au sein d'un milieu biologique de façon générale sort au-delà de 200 ppm. Mais la sensibilité du xénon permet d'aller plus loin en distinguant différents cryptophanes en fonction de la taille de leur cavité ou de la nature des substituants. Ainsi, d'après le tableau 8 ci-dessous on a un écart de 10 ppm (soit 600Hz sur un appareil à 1,5T) entre cages de différentes tailles et près de 5 ppm (300Hz à 1,5T) en changeant la nature des substituants. Ces différences de déplacements chimiques offrent la possibilité de sonder plusieurs phénomènes en même temps avec des sondes structurellement proches, et ainsi recueillir plusieurs informations grâce à une seule catégorie de récepteurs (multiplexing).

	Cryptophane[n,n,n](R¹)₃(R²)₃	δ (ppm)
1	[2,2,2](OMe) ₆	68 ^[174]
2	[2,2,3](OMe) ₆	60 ^[158]
3	[2,3,3](OMe) ₆	47 ^[158]
4	[2,2,2](OCH ₂ COOH) ₆	64 ^[150]
5	[2,2,3](OCH ₂ COOH) ₆	52 ^[150]
6	[2,3,3](OCH ₂ COOH) ₆	42 ^[150]

Tableau 8 : Mesures de déplacements chimiques du ¹²⁹Xe dans plusieurs cryptophanes à 293K dans le tetrachloroéthane deutéré. Dans ces conditions, le signal du xénon libre est à 225ppm.

¹⁷² Y. Bai, P. A. Hill, and I. J. Dmochowski, *Anal Chem.*, **2012**, 84(22), 9935–9941.

¹⁷³ H. Fogarty, P. Berthault, T. Brotin, G. Huber, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332.

¹⁷⁴ T. Brotin, J.-P. Dutasta, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 973-984.

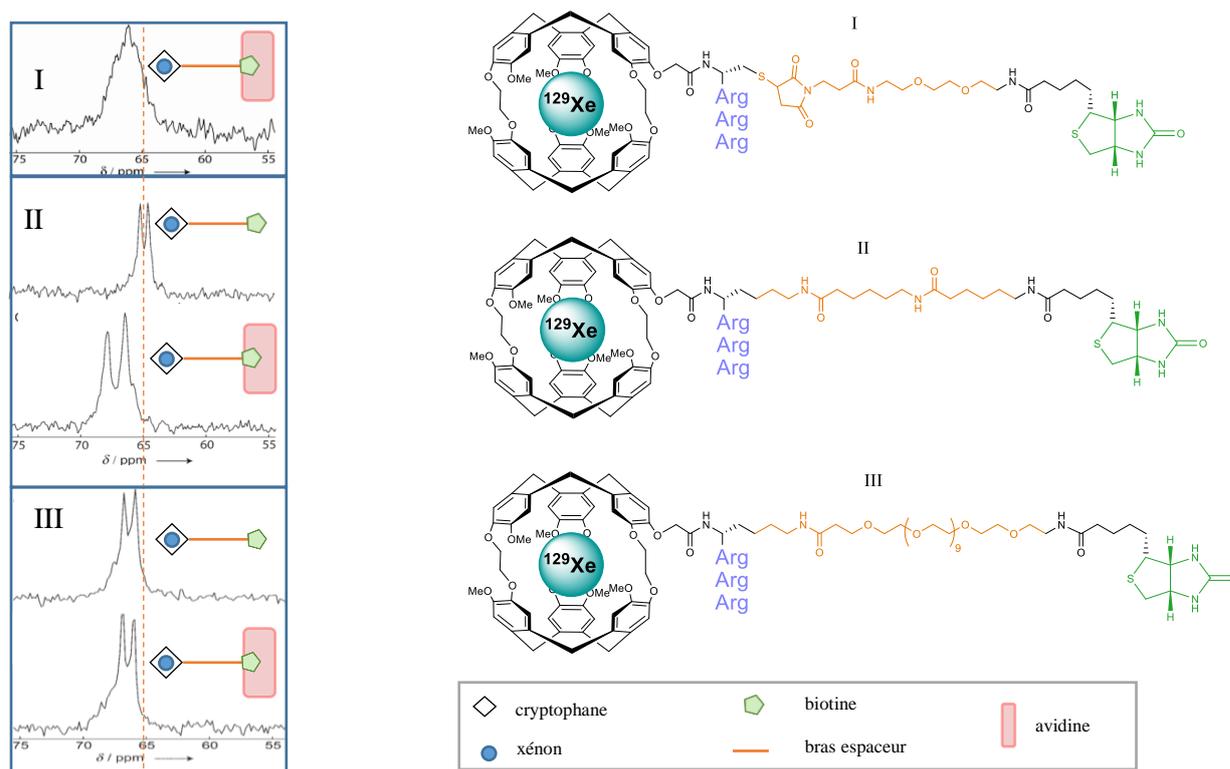
3.2.1.2. Exemples de récepteurs de type cryptophane et leurs applications.

L'objectif de la conception de récepteurs encapsulant le xénon est de remédier au manque de spécificité de l'atome de xénon et pouvoir cibler des processus à caractère biologique. Ceci est permis par la forte sensibilité du xénon à de faibles modulations de son environnement menant à la détection, par variation de déplacements chimiques, d'événements dus à l'interaction du récepteur avec une entité extérieure.

❖ Détection d'un processus de reconnaissance :

La première biosonde pour l'IRM du xénon, constituée d'un cryptophane a été développée par l'équipe de A. Pines en 2001. Il s'agit d'un cryptophane [2,2,2](OMe)₅, fonctionnalisé sur la sixième position par une chaîne peptidique portant à son extrémité une biotine (vitamine B8) et rendu hydrosoluble via l'ajout d'arginines. Cette unité biotine est en mesure s'associer fortement à une protéine tétramérique, l'avidine, et cette interaction peut être à l'origine de carence en vitamine B8. La RMN du xénon permet de détecter et distinguer 2 formes du xénon complexé : dans un cryptophane lié à une biotine, et dans un cryptophane porteur d'une biotine associée à l'avidine, avec un écart d'environ 2 ppm.¹⁷⁵ La multiplicité des pics observés est due à la présence de plusieurs sources de chiralité (CTB, carbone asymétrique des acides aminés, unité maléimide) et témoigne de la détection de plusieurs diastéréoisomères. Ici, la complexité du signal, ne permet pas de suivre le phénomène de reconnaissance de la biotine par l'avidine (cas I, figure 61). Depuis de nouvelles structures ont été mises au point dans le but de simplifier le signal (cas II, figure 61), et tester différentes distances entre le xénon encapsulé et la protéine. (cas III, figure 61).

176



¹⁷⁵ M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S.Q. Yao, F. Tian, P. G. Schultz, PNAS, **2001**, 98(19), 10654-10657.

¹⁷⁶ 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, 65-73.

Une fois les fréquences de résonance de chaque espèce identifiées, il est possible d'améliorer la qualité du signal de la biosonde fixée sur sa cible en utilisant l'hyperCEST. Il est aussi possible d'ajouter des gradients de champs magnétiques en parallèle de la séquence RMN d'acquisition, de façon à balayer l'espace, et plus précisément l'échantillon, afin d'obtenir une image IRM de la répartition de la protéine d'avidine.¹⁷⁷
178

D'autres processus de reconnaissance peuvent ainsi être visualisés en spectroscopie RMN et /ou IRM du xénon comme la complexation d'ions,¹⁷⁹ 180 la fixation d'une sonde sur des récepteurs cellulaires,¹⁸¹ la mise en évidence d'interactions complémentaires entre deux brins d'ADN ...¹⁸²

❖ Détection d'activité biologique par RMN du xénon

Dans certains cas la cible biologique, par exemple une enzyme, peut être présente dans des quantités trop faibles pour générer un signal et mieux vaut essayer de détecter l'activité de cette biomolécule. Ceci est aussi réalisable en RMN du xénon avec des récepteurs de type cryptophanes, via la détection de phénomène de clivage. Voici l'exemple de l'étude de l'activité d'une metalloprotéase de matrice cellulaire, la MMP-7 (figure 62). Cette catégorie de protéines est impliquée dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire et se trouve surexprimée en présence de cellules cancéreuses.¹⁸³ Pour déceler la présence de MMP-7 fonctionnelle, la sonde mise au point est constituée d'un cryptophane lié à une séquence peptidique pouvant être reconnue et sélectivement clivée par l'enzyme.¹⁸⁴ Lorsque le récepteur et l'enzyme sont mélangés, deux lots de signaux sont détectés en RMN du xénon correspondant à un mélange de récepteurs intacts et d'autres cryptophanes possédant une chaîne peptidique réduite. Les acides aminés en bout de chaîne étant chargés positivement, on attribue la variation de déplacement chimique à un changement de l'environnement électronique du xénon. Le décalage des signaux est inférieur au ppm et des progrès restent à faire pour avoir une meilleure résolution et pourvoir réaliser une étude plus quantitative de l'activité de l'enzyme par spectroscopie RMN. Cependant, ce nouveau modèle de sonde donne des informations non seulement sur la répartition mais aussi sur la fonctionnalité de la cible biologique et fait preuve d'une forte spécificité.



Figure 62 : à gauche : structure d'un cryptophane adapté pour la détection de clivage enzymatique. Les acides aminés de la chaîne peptidique sont représentés par leur acronyme à une lettre pour plus de clarté.

à droite : spectres RMN du ¹²⁹Xe hyperpolarisé dans D₂O, de la biosonde intacte en bleu (154µM), d'un mélange de biosonde intacte I (77 µM) et de la version clivée II (95µM)

Les exemples présentés ici ne constituent pas une liste exhaustive mais plutôt un aperçu du fonctionnement des biosondes à base de cryptophane en RMN du xénon. A l'heure actuelle, la tendance

¹⁷⁷ C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 76–77.

¹⁷⁸ L. Schröder, T.J. Lowery, C. Hilty, D.E. Wemmer, A. Pines, *Science.*, **2006**, 314 (5798), 446-449.

¹⁷⁹ N. Tassali, N. Kotera, C. Boutin, E. Léonce, Y. Boulard, B. Rousseau, E. Dubost, F. Taran, T. Brotin, J-P. Dutasta, P. Berthault, *Anal Chem.*, **2014**, 86 (3), 1783-1788.

¹⁸⁰ J. Zhang, W. Jiang, Q. Luo, X. Zhang, Q. Guo, M. Liu, X. Zhou, *Talanta*, **2014**, 122, 101-105.

¹⁸¹ C. Witte, V. Martos, H.M. Rose, S. Reinke, S. Klippel, L. Schröder, C.P. Hackenberger, *Angew Chem Int Ed*, **2015**, 54, 2806.

¹⁸² 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, 2082-2085.

¹⁸³ H. Tanimoto, L.J. Underwood, K. Shigemasa, T.H. Parmley, Y. Yan, J. Clarke, T.J. O'Brien, *Tumour Biol.*, **1999**, 20 (2), 88.

¹⁸⁴ 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, 13274-13283.

consiste à aller vers l'internalisation de ces sondes dans des systèmes biologiques, et des premiers résultats ont déjà été obtenus in cellulo.^{185 186}

3.2.2. Vers la construction d'une sonde pour détecter l'interaction sucre / lectine en RMN du ¹²⁹Xe

3.2.2.1. Généralités sur l'interaction sucre/lectine en biologie

❖ Les carbohydrates

Les sucres, ou carbohydrates $C_n(H_2O)_n$, sont des molécules essentielles en biologie et dans le fonctionnement du monde vivant, que l'on s'intéresse aux animaux, végétaux ou encore aux bactéries ou aux parasites. Ils font partie, avec les acides nucléiques, les lipides et les acides aminés, des constituants essentiels d'une cellule. Les carbohydrates suscitent l'intérêt des chercheurs depuis plus d'un siècle, et les propriétés physiques et chimiques des mono comme des polysaccharides sont aujourd'hui bien connues.¹⁸⁷ ¹⁸⁸ Cependant, la compréhension des rôles joués par les sucres au sein de systèmes biologiques vivants est moins aboutie, et fait l'objet d'un domaine d'étude plus récent, appelé glycobiologie. ¹⁸⁹ L'intérêt tardif pour la glycobiologie peut être expliqué par la grande diversité et complexité des carbohydrates. On peut par exemple comparer les polysaccharides aux protéines : 4 acides aminés différents peuvent donner lieu à la formation de 24 tetrapeptides, alors que 4 monosaccharides mènent à plus de 35 000 oligomères, qui diffèrent non seulement par l'ordre de succession des sucres, mais aussi par la position et l'orientation des liaisons glycosidiques mises en jeu. De plus, les carbohydrates peuvent se lier à des lipides, des protéines ou d'autres entités biologiques pour donner lieu à une grande diversité de glycoconjugués.¹⁹⁰

En biologie un des sucres les plus connus est le glucose, dont l'hydrolyse est une source d'énergie pour la cellule, ou pouvant former des polymères comme la cellulose qui structurent les membranes cellulaires de plantes. De façon plus générale, les sucres sont impliqués dans beaucoup de processus biologiques essentiellement initiés à la surface des cellules, comme des phénomènes de transmission de signal, de reconnaissance, ou d'adhésion, eux-mêmes à la base de cascades biologiques diverses. La biochimie des sucres concerne ainsi des processus allant du développement embryonnaire à la réponse immunitaire, en passant par la reconnaissance hôte-pathogène ou encore la régulation de l'expression des gènes.

De nombreux carbohydrates sont répartis au sein des membranes cellulaires en se fixant surtout sur les protéines et les lipides qui la constituent. On peut citer l'exemple des glycoprotéines caractérisant le groupe sanguin d'un individu découvertes par Karl Landsteiner ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine de 1930.^{191 192} Les hématies ou globules rouges sont des cellules responsables du transport du dioxygène dans les vaisseaux sanguins. Elles sont recouvertes d'un ensemble d'antigènes qui sont caractéristiques d'un individu, dont des glycoprotéines. Selon la nature des polysaccharides exposés en surface des globules rouges, on attribue à l'individu un groupe sanguin A, B, O ou AB (figure 63).

¹⁸⁵ K.K. Palaniappan, R.M. Ramirez, V.S. Bajaj, D.E. Wemmer, A. Pines, M.B. Francis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 4849.

¹⁸⁶ S. Klippel, J. Döpfert, J. Jayapaul, M. Kunth, F. Rossella, M. Schnurr, C. Witte, C. Freund, L. Schröder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 493.

¹⁸⁷ S. David, *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres*, **1995**, InterEdition (Paris), ISBN : 2 7296 0528 2.

¹⁸⁸ P. H. Seeberger, W-C. Haase, *Chem. Rev.*, 2000, 100 (12), 4349–4394.

¹⁸⁹ A. Varki, J.D. Esko, K.J. Collet, *Essential of Glycobiology* (chapitre3), Cold Spring Harbor Laboratory Press (N-Y), **2009**.

¹⁹⁰ R.G. Spiro, *Glycobiology*, 2002, 12 (4), 43R-56R.

¹⁹¹ K. Lansteiner, *Wiener klinische Wochenschrift*, **1901**, 14 (46), 1132-1134.

¹⁹² K. Landsteiner, *On individual differences in human blood*, Nobel lecture, December 11, **1930**.

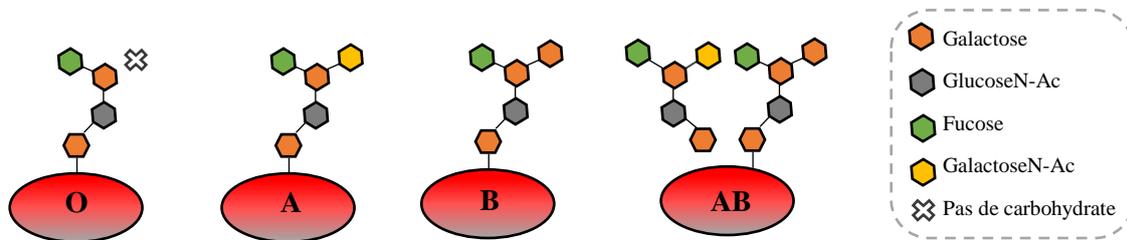


Figure 63 : Représentation schématique des glycoprotéines de surface des hématies du système ABO, qui diffèrent au niveau d'un sucre terminal qualifié d'antigène (ou par son absence)

On parle de glycosylation pour qualifier la création de liaisons entre un sucre et une autre entité biologique. La formation, la maturation ainsi que la distribution des glycoconjugués sont régulées et contrôlées par la machinerie cellulaire. Beaucoup de pathologies ont pour origine un dérèglement de ces réactions de glycosylations. Par exemple, une étude de 2011¹⁹³ a montré qu'une déficience au niveau de la glycosylation des motifs arginine (N-glycosylation) de protéines est responsable de la mise en place de symptômes associés à la sclérose en plaque (neurodégénérescence, démyélinisation donnant lieu à des inflammations). Les carbohydrates de surface cellulaire ont aussi un rôle à jouer dans le développement de certains cancers.¹⁹⁴ Il est certes avéré que la naissance de cellules cancéreuses est la conséquence d'une loterie génétique, mais des altérations qualifiées de phénotypiques peuvent favoriser leur croissance. Concrètement, des modifications de la répartition des sucres, à l'extérieur de membranes cellulaires, peuvent permettre aux cellules malignes d'échapper aux processus de reconnaissance mis en jeu par le système immunitaire, ou encore provoquer le détachement d'un amas de cellules tumorales d'un tissu, permettant ainsi leur dispersion dans les voies vasculaires (métastases).

❖ Les lectines¹⁹⁵

On perçoit donc l'importance de l'étude des carbohydrates que ce soit dans le cadre de la biochimie ou de la médecine. Pour mener cette étude, les scientifiques ont à leur disposition des outils de choix : les lectines. Ce terme vient du latin *legere* qui signifie choisir, sélectionner, et correspond de façon générale à toutes les protéines qui se lient et reconnaissent spécifiquement des carbohydrates.¹⁹⁶ Avec le temps, la définition s'est précisée et exclut les protéines possédant une activité enzymatique ainsi que celles responsables du transport des carbohydrates au sein d'un organisme. On se limite ainsi essentiellement aux phénomènes de reconnaissance en surface de cellule. Les lectines reconnaissent surtout des monosaccharides (plus rarement des oligomères), et ce, avec la même spécificité qu'une interaction antigène/anticorps.

D'un point de vue structurel, les lectines sont des protéines dotées de structures tertiaires diverses, présentant des similitudes,¹⁹⁷ mais il est délicat à cette échelle de rationaliser leur affinité pour tels ou tels sucres. En revanche, en observant la structure secondaire de ces protéines, il a été démontré que le phénomène de reconnaissance s'établit entre un sucre et un domaine restreint de la chaîne d'acides aminés, appelé CRD pour *Carbohydrate Recognition Domain*. Depuis un classement des lectines en plusieurs familles selon la nature de leur CRD se met en place (tableau 9).

¹⁹³ H Mkhikian, A. Grigorian, C. F. Li, H-L. Chen, B. Newton, R. W. Zhou, C. Beeton, S. Torossian, G.G. Tatarian, S.U. Lee, K. Lau, E. Walker, K. A. Siminovitch, K. G. Chandy, Z. Yu, J. W. Dennis, M. Demetriou, *Nature Comm.*, 2, **2011**, n° 334.

¹⁹⁴ H. Ghazarian, B. Itoni, S. B. Oppenheimer, *acta Histochemica*, **2011**, 113, 236-247.

¹⁹⁵ N. Sharon, H. Lis, *Lectins*, Ed Nathan, **1989**, ISBN : 978-94-010-6029-5.

¹⁹⁶ N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology*, **2004**, 14 (11), 53R-62R.

¹⁹⁷ R. Loris, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, 1572, 198-208R.

Nom de la lectine	Famille /origine	Substrat	Exemple de fonction biologique
Galectine 1	Type S / animale	B-galactoside	Régulation de l'adhésion cellulaire en fonction de sa concentration ¹⁹⁸
Concanavaline A	Type L /végétale	Glucose et mannose	Agglutination, interaction avec des glycoprotéines ¹⁹⁹
PA-II	Non renseigné / bactérienne	Galactose	Adhésion ²⁰⁰ et prolifération ²⁰¹ de bactéries
PA-III	Non renseigné / bactérienne	Fucose	Adhésion ¹⁸⁴ et prolifération ¹⁸⁵ de bactéries
HA1	Hémagglutinine / virale	Acide sialique	Adhésion du virus, endocytose ²⁰²

Tableau 9 : Quelques exemples de lectines et leurs caractéristiques.

Dans la plupart des cas, les lectines sont des polymères (structures quaternaires) et sont par conséquent constituées de plusieurs sites de reconnaissance, donnant lieu à des interactions multivalentes avec plusieurs récepteurs cellulaires glucidiques (appartenant à une seule ou différentes cellules). Cette propriété explique leur nom historique d'agglutinines. En effet, ce sont des observations d'agglutination voir de précipitation cellulaire qui ont mené à la découverte de la première lectine par P. Herrmann Stillmarck en 1888.²⁰³ C'est aussi la formation d'amas de globules rouges en présence de lectines qui explique l'échec de certaines transfusions sanguines. Nous avons évoqué dans le paragraphe précédent la répartition de glycoprotéines A, B, ou O en surface des hématies (figure 63). Il faut savoir que la présence (ou l'absence pour le groupe O) d'un sucre terminal jouant le rôle d'antigène sur les glycoprotéines membranaires des globules rouges, va de pair avec la présence de lectines spécifiques de tous les autres carbohydrates du système ABO dans le plasma sanguin. Ainsi, un individu du groupe O possède des lectines anti A et anti B, qui en présence d'hématies d'un donneur de type A, B ou AB, provoquent une agglutination de ces cellules menant au rejet de la transfusion par le système immunitaire. En revanche, l'individu O est donneur universel, puisque les lectines anti-A ou anti-B de n'importe quel receveur seraient sans impact sur les globules rouges de type O, non porteurs d'antigènes glucidiques.

❖ Interaction lectine/sucre et immunologie

La grande diversité de structures que l'on retrouve tant au niveau des carbohydrates que des lectines a donné naissance à un nouveau domaine en biochimie : la lectinologie qui se rapporte à toutes les fonctions biologiques et processus initiés par l'association entre un sucre et une lectine. La figure 63 montre de façon schématique un aperçu des nombreuses applications de la lectinologie.

¹⁹⁸ E. M. Rapoport, O. V. Kurmyshkina, N. V. Bovin, *Biochemistry (Moscow)*, 2008, 73 (4), 393-405.

¹⁹⁹ H. Rüdiger, H-J. Gabius, *Glycoconj. J.*, **2001**, 18, 589-613

²⁰⁰ J.S. Wentworth, F.E. Austin, N. Garber, N. Gilboa-Garber, C.A. Paterson, R.J. Doyle, *Biofouling*, **1991**, 4, 99-104.

²⁰¹ D. Tielker, S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau, K-E. Jaeger, *Microbiology*, **2005**, 151, 1313-1323.

²⁰² S. J. Gamblin, J. J. Skehel, *J Biol Chem.*, **2010**, 285(37), 28403-28409.

²⁰³ P.F. Zatta, R.D. Cummings, *Biochemical Education*, **1992**, 20 (1), 1-8.

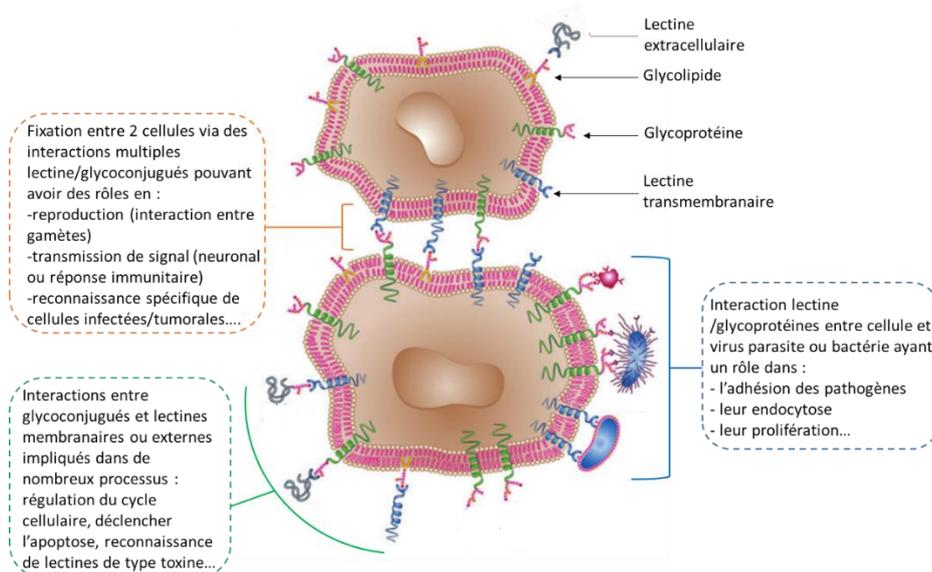


Figure 64 : Représentation schématique de l'importance des interactions lectines-sucres en biologie. ¹⁸⁰

L'interaction lectine-carbohydrate est de plus en plus utilisée dans le cadre de l'immunologie. En effet, la création d'amas cellulaires permet de repérer et étudier des réponses immunitaires associées. Beaucoup de lectines sont également reconnues pour leur effet mitogène. Celui-ci consiste en la reconnaissance entre lectine et récepteurs glucidiques de cellules lymphocytaires (globules blancs), qui permet parfois de déclencher leur prolifération. A cela s'ajoute la possibilité pour certaines lectines de reconnaître spécifiquement des cellules infectées/cancéreuses²⁰⁴. Toutes ces observations ont donné lieu à la mise en place de stratégies d'utilisation des sucres et des lectines pour la biodistribution ciblée de médicaments.

On discerne deux principales techniques de distribution de médicaments orientée grâce à l'interaction lectine/carbohydrate (figure 65 - gauche). La voie dite directe correspond au cas où la substance active est greffée à un carbohydrate spécifique de la lectine ciblée. La voie indirecte²⁰⁵ consiste à injecter une lectine préalablement liée au médicament afin de viser une catégorie particulière de glycoconjugués. Les carbohydrates peuvent eux aussi agir en tant que médicament, surtout dans le but d'empêcher l'adhésion d'un pathogène comme une bactérie ou un virus. Pour cela les lectines pathogènes sont rendues inactives via un phénomène de saturation des sites de reconnaissance (figure 65- droite).

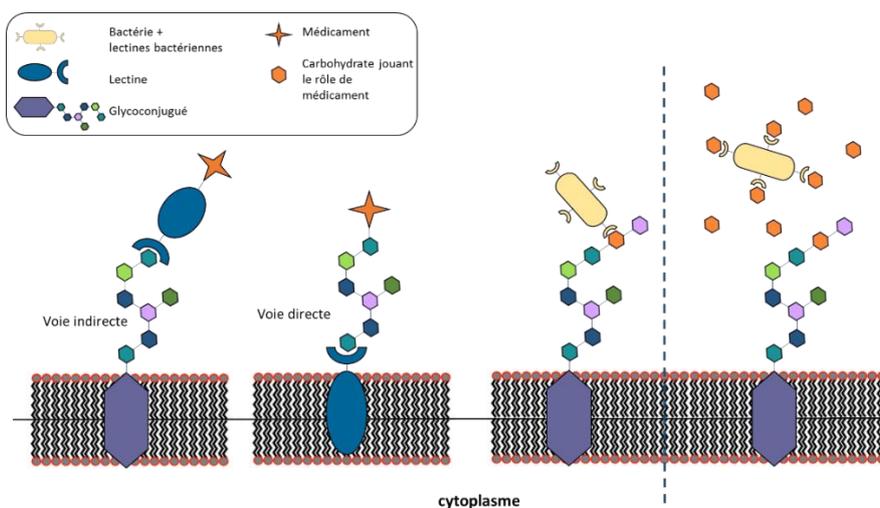


Figure 65 : Quelques stratégies d'utilisation des lectines et des carbohydrates en immunologie.

²⁰⁴ J.C. Aub, B.H. Sanford, M.N. Cote, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1965**, 54, 396–399.

²⁰⁵ C. Bies, C-M. Lehr, J. F. Woodley, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, 56, 425–435.

3.2.2.2. Développement d'une biosonde à base de cryptophane pour l'étude et la détection de lectines bactériennes en RMN du ^{129}Xe .

❖ Contexte biologique : les lectines de la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa* (PA).

La bactérie *Pseudomonas Aeruginosa* est une bactérie naturellement présente dans les sols et l'eau (elle fait partie des pathogènes recherchés lors d'une analyse classique d'échantillon d'eau) et pouvant se transmettre aussi bien par l'air que par des particules ce qui en fait une bactérie ubiquitaire. On en détecte de nombreuses souches dans les systèmes hospitaliers et ambulatoires. Même si cette bactérie est inoffensive pour tout individu sain, elle est en revanche à l'origine de nombreux symptômes chez les patients déjà atteints d'infection diverses, de maladies respiratoires, les immunodéprimés ... Elle est de plus qualifiée de superbactérie, très résistante, et capable de se diversifier en souches qui s'adaptent aux médicaments et antibiotiques. Tout ceci la place au 3^{ème} rang dans le classement des infections nosocomiales.

Le mécanisme d'infection de la bactérie PA est connu et met en jeu de nombreux processus biologiques aussi complexes qu'impressionnants au regard de non-spécialistes. Nous retiendrons de manière simplifiée qu'une fois fixée sur la cellule hôte, les bactéries PA sont en mesure d'utiliser les ressources cellulaires pour développer des colonies capables de s'organiser et de se défendre efficacement contre le système immunitaire ainsi que la plupart des médicaments. Une stratégie consiste donc à empêcher l'étape d'adhésion des bactéries aux membranes cellulaires, et plus concrètement, à inactiver les lectines bactériennes PA-IL (ou Lec A)²⁰⁶ et PA-IIL (ou Lec B)²⁰⁷ identifiées comme responsables de ce processus. Pour y parvenir, il s'agit de mettre au point la synthèse d'agents qui fonctionneront comme illustré sur la figure 65 - droite, en remplaçant les oligosaccharides « naturels » reconnus par PA-IL et PA-IIL par des agents synthétiques de structure proche.

Des études ont montré que la lectine PA-IL était exclusivement sélective aux dérivés à base de D-galactose avec une constante d'affinité pour ce sucre de $3,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, alors que PA IIL montre une excellente affinité pour le L-fucose ($K = 1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$). Un aperçu des interactions non covalentes mises en jeu dans ces phénomènes de reconnaissance est illustré figure 66.

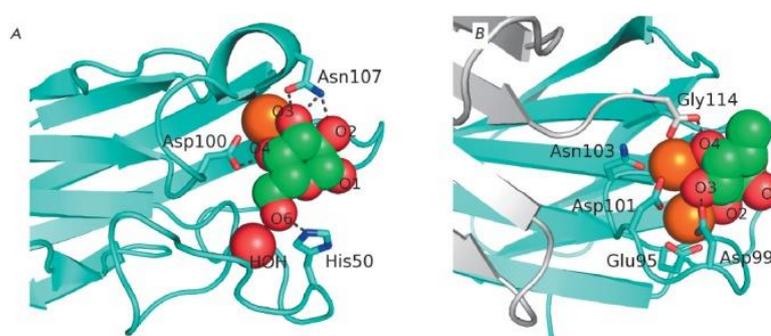


Figure 66 : Représentation tri- dimensionnelle des interactions entre D-Galactose et PA-IL (A) d'une part et L-Fucose et PA-IIL(B) d'autre part.²⁰⁸

²⁰⁶ N. Gilboa-Garber, *FEBS Lett.*, **1972**, 20, 242–244.

²⁰⁷ N. Gilboa-Garber, *Methods Enzymol.*, **1982**, 83, 378–385.

²⁰⁸ A.V. Grishin, M.S. Krivozubov, A.S. Karyagina, A.L. Gintsburg, *Acta Naturae.*, **2015**, 7 (2), 29–41.

PA-IL			PA-III		
Saccharide	Concentration d'inhibition CI (mM)	Potentiel d'inhibition relatif au L- fucose	Saccharide	Concentration d'inhibition CI (mM)	Potentiel d'inhibition relatif au D- galactose
L-Fucose	0,025	1	L-Fucose	>200	< 2,5.10 ⁻³
L-Fucosylamine	0,050	0,5	Phényl-β-D-galactoside	0,075	6,7
L-Galactose	0,050	0,5	L-Galactose	>100	< 5.10 ⁻³
D-Galactose	300	8,3.10 ⁻⁵	D-Galactose	0,5	1
D-Mannose	5	5.10 ⁻³	D-Mannose	>100	< 5.10 ⁻³
D-Fructose	10	2,5.10 ⁻³	D-Glucose	>300	< 1,7.10 ⁻³

Tableau 10 : Mesures de concentrations minimales de carbohydrate nécessaires pour observer l'inhibition du phénomène d'agglutination d'hématies (CI). Toutes les lectines ont une certaine affinité pour les carbohydrates de surface des globules rouges provoquant l'agglutination de ces cellules. L'ajout de carbohydrate susceptible d'interagir avec les lectines inhibe l'hémagglutination à partir d'un certain seuil de concentration, valeur qui traduit l'affinité de la lectine étudiée pour un sucre. Plus la CI est faible plus l'affinité de la lectine pour le sucre est élevée. Le potentiel d'inhibition est un rapport de deux CI. Ce paramètre permet de comparer plus simplement les sucres par rapport à un carbohydrate de référence. ^{209 194 195}

L'interaction lectine sucre est réversible. Le but est donc de mettre au point l'interaction la plus forte possible entre les lectines PA-IL, PA-III et les (oligo)saccharides synthétiques, afin de rendre l'adhésion de la bactérie impossible. Il existe des méthodes pour quantifier la force l'interaction carbohydrate-lectine. Par exemple, les mesures des constantes d'affinités entre PA-IL et le D-galactose ou entre PA-III et le L-fucose ont été respectivement obtenues via des expériences de dialyse²¹⁰ et des mesures de calorimétrie²¹¹, alors que les mesures d'affinité des lectines PA pour différents saccharides du tableau 10 mettent en œuvre des méthodes biochimiques de détermination du pouvoir d'inhibition d'un processus biologique connu.

De nombreux saccharides ont déjà été synthétisés et étudiés en tant qu'inhibiteurs potentiels des lectines de la bactérie PA (monocarbohydrates modifiés¹⁹⁴, oligomères²¹², dendrimères²¹³, cluster de carbohydrates supportés sur des matériaux²¹⁴...)

Notre objectif serait de combiner les connaissances acquises pour la conception de biosondes en imagerie du xénon, à celles concernant le développement de carbohydrates inhibiteurs de l'adhésion des lectines de PA, afin d'élaborer une nouvelle méthode de détection et de suivi de l'interaction sucre-lectine in vitro, et peut être un jour in cellulo et in vivo.

❖ Structure de la biosonde

1- Choix du cryptophane

Nous avons choisi un modèle de biosonde basée sur un cryptophane [2,2,2]R₃(OMe)₃ (figure 67). La taille de la cavité est adaptée à la complexation du xénon et cette cage trisubstituée devrait avoir des paramètres de cinétique d'échange du ¹²⁹Xe proche du cryptophane A et donc favorable à des mesures de type hyperCEST en RMN du xénon. D'un point de vue synthétique de nombreuses variantes du cryptophane [2,2,2] sont déjà décrites dans la littérature ce qui permet de choisir une voie de synthèse adaptée à la cible souhaitée.

²⁰⁹ A. Imberty, M. Wimmerov, E.P. Mitchell, N. Gilboa-Garber, *Microbes and Infection*, **2004**, 6, 221–228.

²¹⁰ N. Garber, U. Guempel, A. Belz, N. Gilboa-Garber, R.J. Doyle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1116, 331–333.

²¹¹ N. Garber, U. Guempel, N. Gilboa-Garber, R.J. Doyle, *Microbiol. Lett.*, **1987**, 48, 331–334.

²¹² E. M. V. Johansson, S. A. Crusz, E. Kolomiets, L. Buts, R. U. Kadam, M. Cacciarini, K. M. Bartels, S. P. Diggle, M. Camara, P. Williams, R. Loris, C. Nativi, F. Rosenau, K. E. Jaeger, T. Darbre, J. L. Reymond, *Chem. Biol.*, 2008, 15, 1249-1257.

²¹³ K. Marotte, C. Préville, C. Sabin, M. Moumé-Pymbock, A. Imberty, R. Roy, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2953-2961.

²¹⁴ B. Gerland, A. Goudot, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, Y. Chevolut, F. Morvan, *J. Org. Chem.*, 2012, 77 (17), 7620–7626.

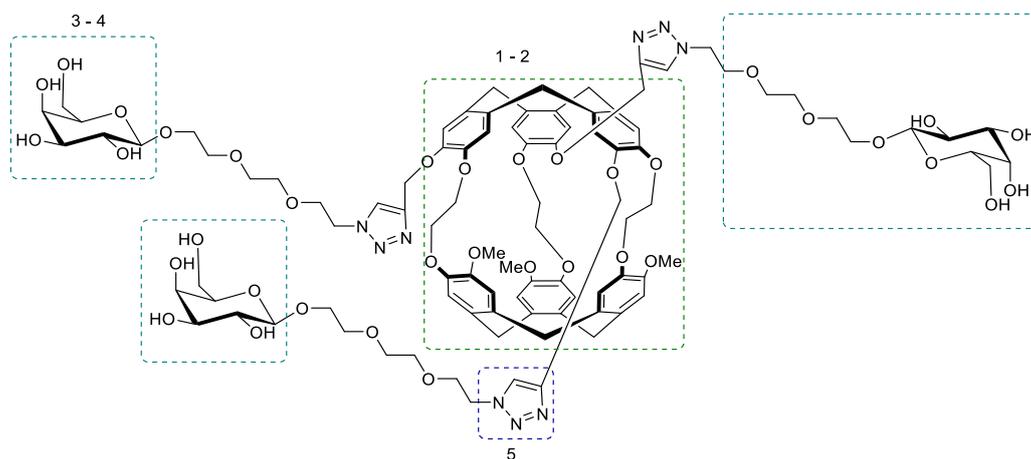


Figure 67 : Structure d'un récepteur cryptophane pour la détection de lectines par RMN du Xe.

2- Séparation des énantiomères

Nous avons évoqué dans la partie 3.2.1.2 (figure 61) l'importance de minimiser le nombre de diastéréoisomères de la future biosonde pour une meilleure clarté du signal RMN. La synthèse des cages a été mise au point dans des proportions racémiques, mais on a aussi pu prouver qu'elle était réalisable de façon énantiosélective, à partir de CTB énantio pur, sans passer par une stratégie utilisant des esters de Mosher²¹⁵ qui a le désavantage de rajouter des étapes de synthèse. De plus, les énantiomères MP et PM d'un intermédiaire clef ont pu être séparés par HPLC chirale.

3- Motifs de substitution

Le choix des sucres en bout de chaîne de type PEG pour substituer une unité CTB n'est pas anodin. Certes ce sont les substrats des lectines PA-IL et PA-III ciblés, mais ce sont aussi des entités capables de rendre la biosonde hydrosoluble. Par ailleurs, l'utilisation de bras espaceurs PEG₁₁ avait montré une constante d'affinité de 5800 M⁻¹ pour le xénon ¹⁵⁵ (contre 3000 pour le cryptophane A), ce qui est encourageant. Enfin, la longueur des chaînes PEG est modulable et peut être un facteur d'optimisation de l'efficacité de la biosonde.

4- Multivalence

Nous avons envisagé de greffer 3 unités carbohydrates pour permettre une meilleure interaction avec les lectines cibles qui contiennent plusieurs sites de reconnaissance de sucres. La comparaison entre interactions mono- et multivalentes dans le cadre de la lectinologie a déjà été étudiée²¹⁶ de façon générale et dans le cadre d'études spécifiques de lectines. Les études sur la lectine A semblent montrer un effet important de l'augmentation de la valence pour une meilleure inhibition. ($K_{diss} \sim 4 \mu M$ pour un monosaccharide²¹⁷ optimisé via l'ajout d'un substituant aromatique hydrophobe, contre K_{diss} de l'ordre de 100 nM pour des inhibiteurs tétravalents²¹⁸ à hexavalents²¹⁹). Des CTB sur lesquels ont été greffés des galactoses ont été étudiés et montrent qu'un cluster trivalent a une affinité 5 fois plus élevée qu'un CTB hexavalent pour la lectine A, même si tous les sites d'interaction ne sont pas sollicités (figure 68).

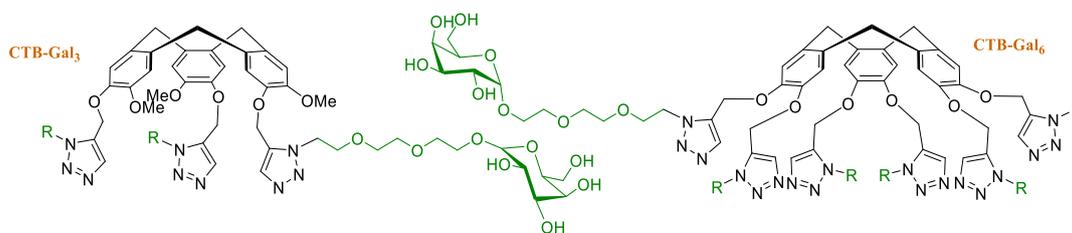
²¹⁵ O. Taratula, M.P. Kim, Y. Bai, J.P. Philbin, B.A. Riggle, D.N. Haase, I.J. Dmochowski, *J. Org. Lett.* **2012**, *14*, 3580.

²¹⁶ S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 525-561.

²¹⁷ R.U. Kadam, D. Garg, J. Schwartz, R. Visini, M. Sattler, A. Stocker, T. Darbre, J.L. Reymond, *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 1925.

²¹⁸ S. Cecioni, R. Lalor, B. Blanchard, J-P. Praly, A. Imberty, A. Matthews, S. Vidal, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 13232.

²¹⁹ S. Cecioni, S. Faure, U. Darbost, I. Bonnamour, H. Parrot-Lopez, O. Roy, C. Taillefumier, M. Wimmerová, J-P. Praly, A. Imberty, S. Vidal, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 2146.



	Valence théorique	Stœchiométrie mesurée	K _{diss} (μM)
CTB-Gal ₃	3	2	2,3
CTB-Gal ₆	6	5	0,447

Figure 68 : Valeurs de constantes de dissociation (mesurées par ITC) entre des CTB tri- ou hexa- galactosidés et la lectine A²²⁰ et stœchiométrie des interactions mises en jeu.

Les cryptophanes offrent la possibilité de compléter les études sur l'influence de la valence puisque la synthèse de cages mono, tri puis éventuellement hexafonctionnalisées est réalisable (les cas intermédiaires étant plus délicats à obtenir d'un point de vue synthétique.)

5- Sites d'accroche des sucres

Enfin en collaboration avec l'équipe de glycochimie de Lyon, les sucres ont été associés au cryptophane via une triple réaction de Huygens (click –chemistry). Il s'agit pour cela d'avoir deux intermédiaires de synthèse, azide et propargyl. Plusieurs exemples de sucres porteurs de fonctions azide et impliqués dans la formation d'hétérocycles tétrazole sont décrits dans la littérature.^{202 203 221} Ceci permet d'envisager le cryptophane[2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃ comme un intermédiaire clef, permettant à terme de tester l'efficacité de nombreux sucres en tant qu'inhibiteurs de lectines.

3.3. Synthèse et caractérisations.

Voici figure 69 un schéma résumant les étapes clés menant à l'obtention de nos biosondes.

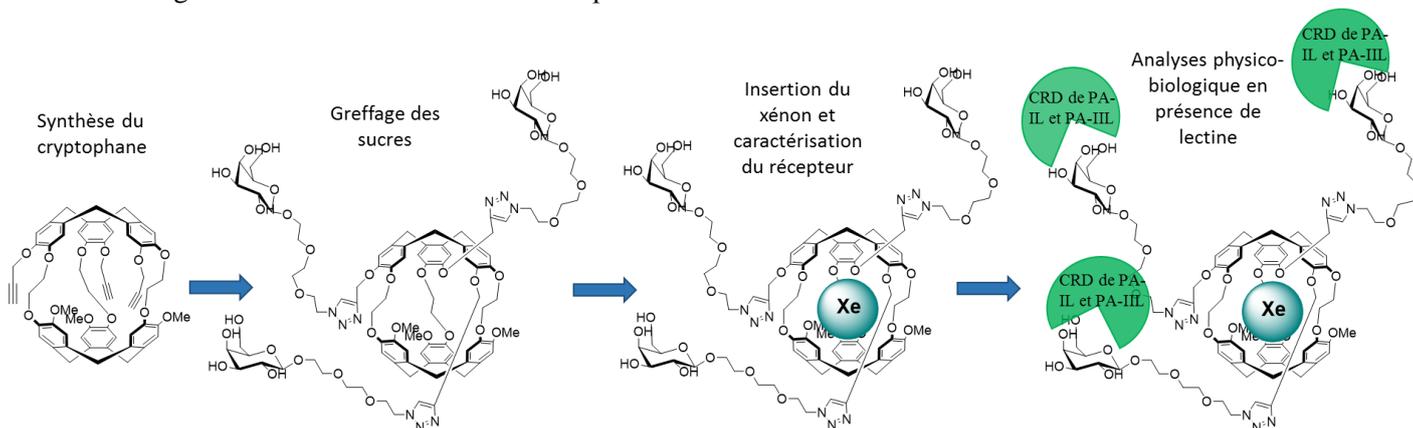


Figure 68 : Etape de création d'une biosonde pour l'imagerie par résonance magnétique du ¹²⁹Xe.

²²⁰ N. Galanos, Y. Chen, Z P. Michael, E Gillon, J-P. Dutasta, A. Star, A. Imberty, A. Martinez, S. Vidal, *ChemistrySelect*, **2016**, *1*, 5863-5868.

²²¹ B. Gerland, A. Goudot, C. Ligeour, G. Pourceau, A. Meyer, S. Vidal, T. Gehin, O. Vidal, E. Souteyrand, J-J. Vasseur, Y. Chevelot, F. Morvan, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, *25*, 379.

3.3.1. Obtention du cryptophane [2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃

3.3.1.1. Racémique.

❖ Différentes stratégies synthétiques

La synthèse de cryptophanes peut se faire principalement de 3 façons (figure 70-A). La voie directe consiste à former 3 bras espaceurs fonctionnalisés à leurs extrémités par des précurseurs de cyclisation des CTB (alcool benzyliques), et de synthétiser en même temps les deux « chapeaux ». Cette stratégie mène souvent à des rendements faibles (~1 à 5%) mais est parfois la seule qui se montre efficace. La voie [1+1] consiste à lier ensemble deux CTB préalablement formés. La 3^{ème} voie consiste à former un CTB, le fonctionnaliser en fonction des bras espaceurs désirés en terminant par une unité dérivée de l'alcool vanilique pour fermer le cryptophane via la formation du second « chapeau ». Nous avons opté pour cette dernière méthode de synthèse et là encore deux possibilités s'offrent à nous (figure 70-B) : on peut commencer par la synthèse d'un CTB(OCH₂CH₂Br)₃(OMe)₃ (CTB **2**) ou d'un CTB(OCH₂CH₂Br)₃(Opropargyl)₃. Etant donné qu'une synthèse partant du CTB **2** était déjà décrite dans la littérature,²²² nous avons choisi de reproduire cette voie de synthèse.

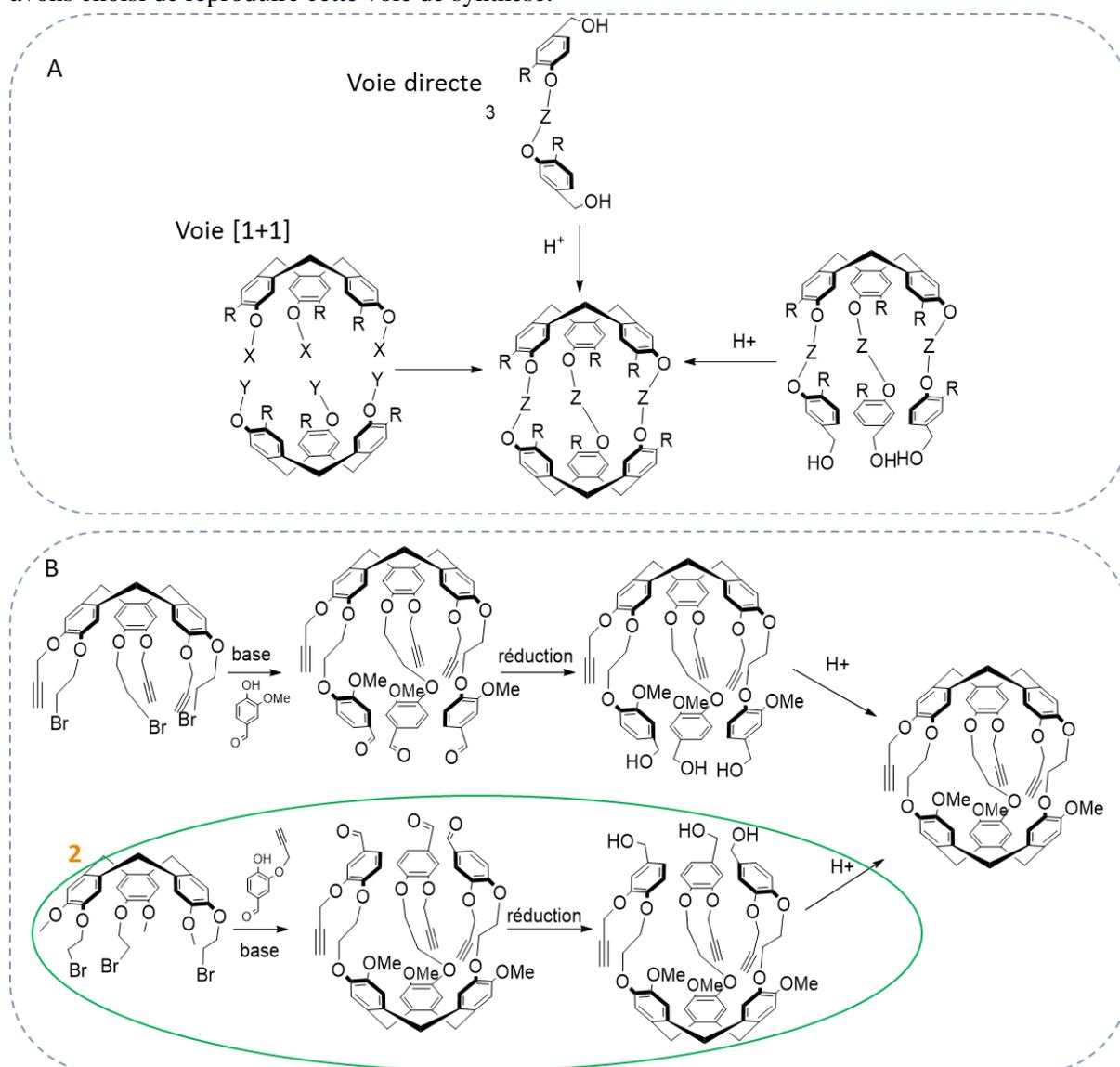


Figure 70 : A – Les différentes voies d'accès aux cryptophanes. B – Stratégies de synthèse du cryptophane[2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃.

²²² O. Taratula, P. A. Hill, Y. Bai, N.S. Khan, I.J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2011**, 13 (6), 1414-1417.

❖ Mise au point de la synthèse du cryptophane[2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃

La publication de I.J. Dmoshowski qui nous a servi de référence pour cette synthèse passe par l'alkylation du CTB **2** par 3 équivalents de 4-hydroxy-3-propargyloxybenzaldéhyde **38** dans le DMSO, pour ensuite réduire les fonctions aldéhyde, afin d'obtenir le triple alcool benzylique nécessaire à la formation du second CTB.

Nous avons dans un premier temps tenté de réduire cette voie de synthèse en greffant directement l'alcool benzylique **36** correctement substitué (figure 71). De plus, nous avons utilisé les conditions de l'équipe qui travaille dans le DMF à 40°C (au lieu du DMSO plus fastidieux encore à éliminer). Ces conditions réactionnelles donnent lieu à la formation d'un minimum de 5 produits non séparables même après plusieurs colonnes de chromatographie, alors qu'en principe cette réaction d'alkylation ne demande qu'un traitement de type extractions/lavages.

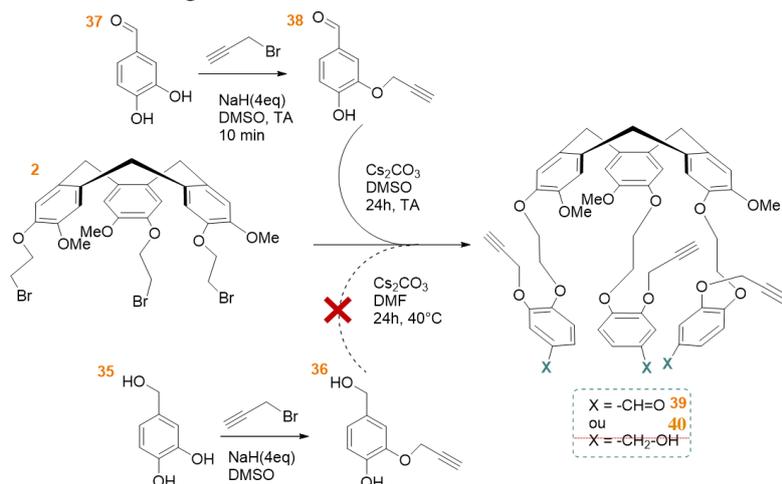


Figure 71 : schéma représentatif des réactions d'alkylation du CTB **2** pour l'obtention des intermédiaires **39** et **40**

Nous nous sommes donc reportés sur la synthèse utilisant le 4-hydroxy-3-propargyloxybenzaldéhyde **38**. La première étape consiste à alkyler une unique fois le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (figure 72). Ici, la position sur laquelle on alkylye n'a pas d'impact sur la suite de la synthèse. En effet, que l'on parte du régioisomère α ou β (figure 73), la réduction de l'aldéhyde en alcool benzylique suivie de la triple réaction de Friedel et Crafts, mènent à la formation du cryptophane désiré. Il est cependant indispensable d'être régiosélectif à 100% car les deux régioisomères α et β ne sont pas séparables par chromatographie sur silice, et qu'un précurseur de cyclisation issu d'un mélange de ces régioisomères perdrait sa symétrie C_3 .

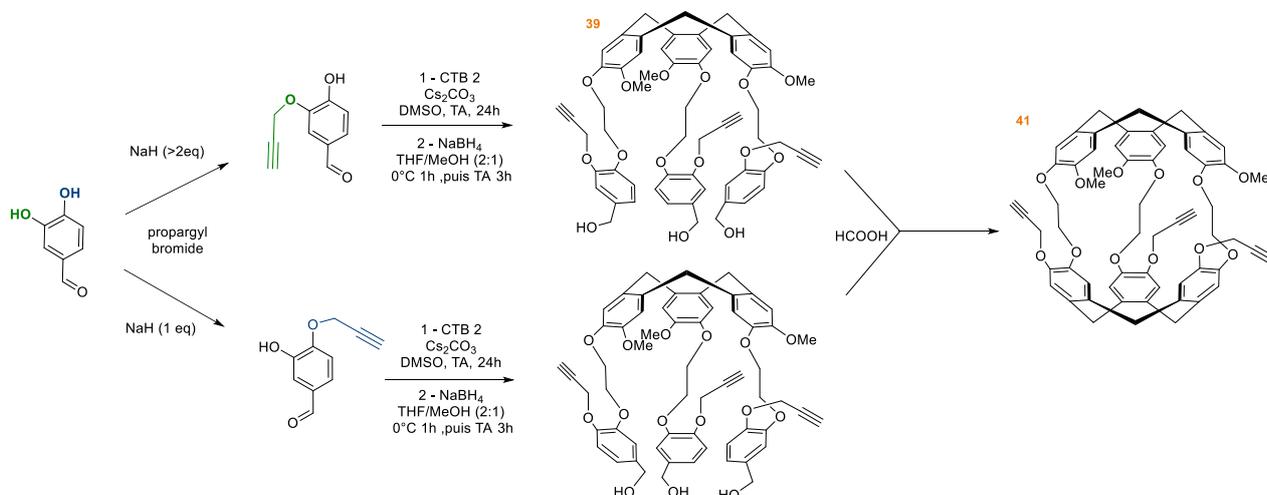
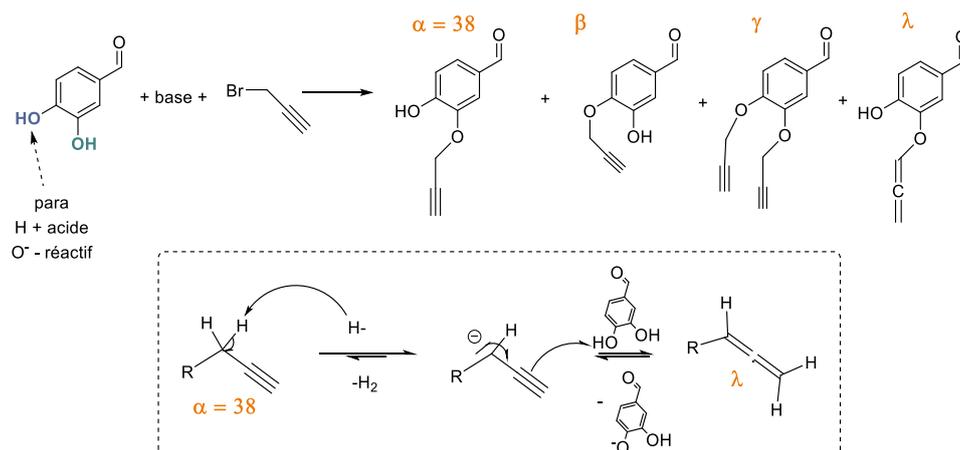


Figure 72 : Deux régioisomères mères du propargyloxy-hydroxybenzaldéhyde menant au même cryptophane.

La régiosélectivité de l'alkylation $37 \rightarrow 38$ peut se contrôler en utilisant les différences de basicité et de réactivités des deux fonctions phénols du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **37**. La fonction phénol en **para** de l'aldéhyde est plus acide et moins réactive que la fonction phénol en **méta**. Ainsi l'utilisation d'un équivalent d'hydrure de sodium oriente l'alkylation en para, alors que le régioisomère en méta est obtenu en utilisant un excès de base. (voir chapitre 2 page 43) Dans les deux cas, il est préférable de se contenter d'un équivalent ou d'un léger défaut de bromure de propargyle pour éviter d'alkyler doublement.

Nous avons suivi la stratégie de I.J. Dmochowski qui alkyle la position méta.²²³ Ce dernier utilise 2eq de NaH dans le DMSO anhydre pour former le phénolate, et ajoute ensuite goutte à goutte le bromure de propargyle avant de laisser réagir 24h, le tout sous atmosphère inerte. Le tableau 11 et la figure 73 ci-dessous résument les conditions opératoires et résultats obtenus lors de la mise en œuvre de cette réaction d'alkylation au laboratoire.



	Base et nombre d'éq	Temps de réaction	Conditions	Rendement global après traitement/ colonne	Répartition des produits (%)			
					α	β	γ	λ
1	NaH 2 eq	18h	DMSO, Ajout en 5min, NaH 60%, pas de conditions anhydres	8%	3	97		
2	NaH 2,2 eq	18h	DMSO, Ajout en 5min, NaH 60%, pas de conditions anhydres	36%	8		92	
3	NaH 1 eq	18h	DMSO, Ajout en 5min, NaH 60%, pas de conditions anhydres	<10%			100	
4	NaH 3 eq	18h	DMSO, Ajout en 30min, NaH 60%, pas de conditions anhydres	nc	45			55
5	NaH 3,7 eq	18h	DMSO anhydre, Ajout en 30min, NaH 60% lavé au pentane	59%	24			76
6	tBuOK 2,2 eq	12h	THF anhydre, Ajout en 30min,	22%	73	27		
7	NaH 3 eq	50min	DMSO anhydre, Ajout en 30min, NaH 60% lavé au pentane	nc	54	19		27
8	NaH 4,3 eq	5-10min	DMSO anhydre, Ajout en 30min, NaH 60% lavé au pentane	60%	70			30

Tableau 11 : Récapitulatif des différentes conditions réactionnelles d'alkylation tentées (1 eq de bromure de propargyle dans tous les cas) et les résultats obtenus. nc = non calculé

²²³ 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*, 13274-13283.

Les premières expériences (entrées 1-4) n'ont pas été réalisées sous atmosphère inerte, ni en solvant anhydre. Le premier essai donne des résultats incohérents avec la littérature et la théorie, puisqu'il mène essentiellement au régioisomère non attendu. De plus en comparant à l'entrée 2 où la seule différence est l'emploi d'un léger excès de base, les résultats obtenus ne semblent pas reproductibles. Quel que soit le nombre d'équivalents de base, l'ajout de bromure de propargyl initialement trop rapide (environ 5 minutes de goutte à goutte – entrées 1-3), semble responsable de la synthèse du produit de dialkylation γ . Le passage à un ajout plus lent d'une solution davantage diluée a permis de s'affranchir de la production de produit γ dialkylé. L'utilisation d'un large excès d'hydrure de sodium va de pair avec l'apparition de l'allène λ (entrées 4 et 5) et la disparition complète du mauvais régioisomère β . Nous avons tenté de changer la nature de la base (entrée 6) sans succès puisqu'on obtient un mélange inséparable de α et β , avec un rendement modeste. Nous nous sommes donc concentrés sur la méthode mettant en jeu l'excès d'hydrure de sodium, puisque dans ce cas l'allène et le produit désiré sont séparables par chromatographie. Il a fallu ajuster le nombre d'équivalents de base à employer pour empêcher la formation de mauvais régioisomère, ainsi que les temps de réactions pour obtenir le meilleur ratio α/λ (entrées 7 et 8). La répétition de l'expérience au cours de la thèse a révélé que l'utilisation de conditions anhydres était obsolète dans le cas où l'on travaille avec 4eq de NaH pour un temps total de réaction de l'ordre de 40 min à partir de l'ajout de bromure de propargyle. On obtient donc le produit désiré avec un rendement de 42%.

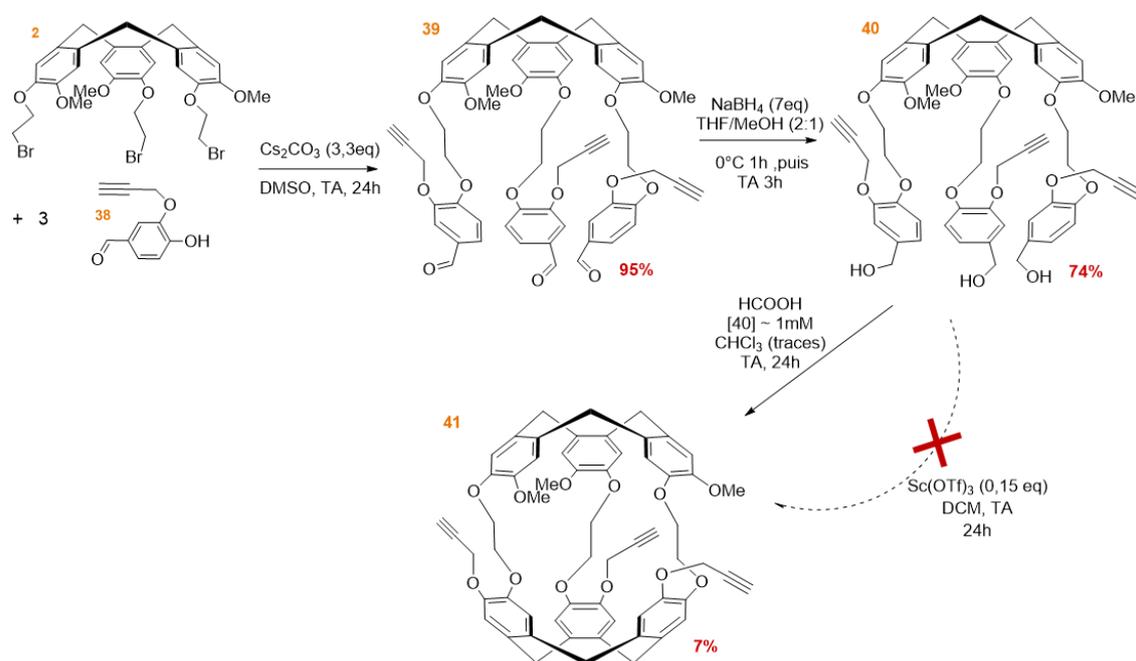


Figure 74 : Suite de la synthèse du cryptophane[2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃.

La suite de la synthèse n'a pas nécessité de revoir toutes les conditions réactionnelles (figure 74). On réalise la triple substitution nucléophile de **38** sur le CTB **2** en présence de carbonate de césium dans le DMSO anhydre, puis les aldéhydes sont réduits avec le borohydrure de sodium pour donner le précurseur de cyclisation **40**. Après plusieurs échecs de cyclisation dans le dichlorométhane, ou l'acétonitrile en milieu acide de Lewis avec le triflate de scandium (protocole inspiré de la référence ²⁰⁶), nous avons utilisé l'acide formique comme acide et solvant de la macrocyclisation pour obtenir le cryptophane[2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃ avec un rendement de 7% en moyenne.

Cette synthèse s'est donc révélée plus fastidieuse que ce qui est décrit dans la littérature, et a dû être réalisée plusieurs fois afin d'accumuler suffisamment de produit pour poursuivre jusqu'à l'obtention de la biosonde. Une fois mise au point en version racémique il a fallu s'intéresser à la démarche à suivre pour obtenir la version énantiopure de ce cryptophane.

3.3.1.2. Enantiopur

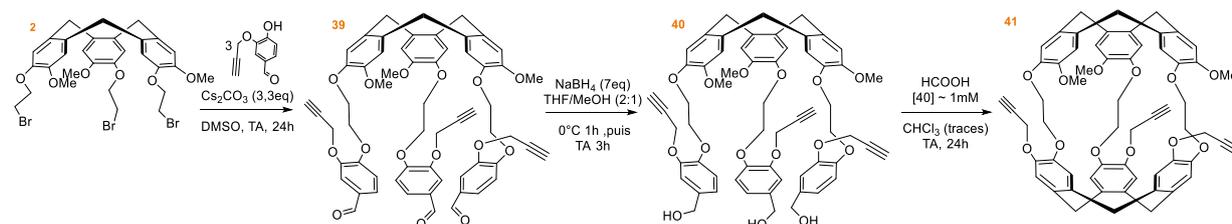
❖ Par synthèse énantiosélective

Nous avons déjà pu montrer au sein de l'équipe qu'il est possible de synthétiser des hémicryptophanes de manière énantiosélective à partir de CTB **2** énantipur. Il s'agit ici de montrer que l'on peut appliquer ceci aux cryptophanes. En effet, le barrière d'énantiomérisation des CTB étant de 112 à 116 kJ/mol, ils sont susceptibles de racémiser thermiquement. En pratique, il faut une synthèse qui ne présente pas ou peu d'étapes nécessitant de chauffer, et dans ce dernier cas, il faut s'assurer que l'on peut baisser la température sans trop affecter l'étape réactionnelle en question. Il faut de plus réaliser toutes les manipulations d'évaporation sans chauffer afin de ne pas provoquer de racémisation lors des traitements. L'effet de la température sur la vitesse de racémisation du CTB **2** peut se quantifier en mesurant l'évolution de l'excès énantiomérique au cours du temps. Le tableau 12 regroupe les données thermodynamiques et cinétiques déjà accumulées au sein de l'équipe, et la dernière entrée concerne les mesures réalisées dans le DMSO qui est le solvant utilisé pour la synthèse de l'intermédiaire **39**.

Solvant	Température (°C)	$k_{\text{énantiomérisation}} (\text{s}^{-1})$	$\Delta_r G^\ddagger (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$t_{1/2}$
EtOH	78	$1,24 \cdot 10^{-4}$	112,7	46,4 min
CHCl ₃	61	$1,85 \cdot 10^{-5}$	112,5	5,2 h
DMF	60	$4,02 \cdot 10^{-6}$	16,3	24h
DMSO	60	$7,46 \cdot 10^{-6}$	114,6	13 h

Tableau 12 : Études de la barrière d'inversion du CTB Br **2** dans différents solvants faites par polarimétrie.

La première étape de la synthèse énantipure du cryptophane **41** semble donc réalisable puisque la réaction a lieu à température ambiante et dure au plus 24h. Nous avons donc travaillé dans les mêmes conditions à partir du CTB **2** énantipur (tableau 13). Les résultats obtenus le long de cette synthèse sont résumés dans le tableau 13. La cyclisation du second chapeau CTB(Opropargyl)₃ est orientée par la présence du CTB(OMe)₃ déjà présent de façon à favoriser la formation du cryptophane anti. Les substituants propargyloxy étant prioritaires au sens de Cahn Ingold et Prelog cela correspond dans notre cas à la configuration *PM* (respectivement pour le CTB(OMe)₃ et le CTB(Opropargyl)₃).



	CTB 2		CTB 39		CTB 40	41
Configuration (+/-)	M(+)	P(-)	M(+)	P(-)	P	PM
Excès énantiomérique	0,98	0,98	0,92	0,94	0,89	0,75
énantiomère majoritaire	99/1	99/1	96/4	97/3	94,5/5,5	87,5/12,5
énantiomère minoritaire						

Tableau 13 : suivi par chromatographie chirale de la synthèse énantiosélective du cryptophane **41**.

❖ Par dédoublement du racémique par HPLC Chirale

On a pu montrer qu'il est possible d'obtenir le cryptophane propargyl quasi énantipur en seulement 3 étapes à partir du CTB **2**, sans passer par un dédoublement utilisant des esters de Möscher. Cependant les

rendements faibles mis en jeu dans cette synthèse, en particulier lors de la dernière étape, nous ont amenés à privilégier une voie d'accès plus efficace : dédoubler uniquement en fin de synthèse par chromatographie chirale. Ceci a été réalisé au sein de l'équipe par Marion Jean et Nicolas Vanthuyne. La figure 75 représente les chromatogrammes d'un échantillon de racémique et de chaque énantiomère une fois élués ainsi que les conditions opératoires utilisées.

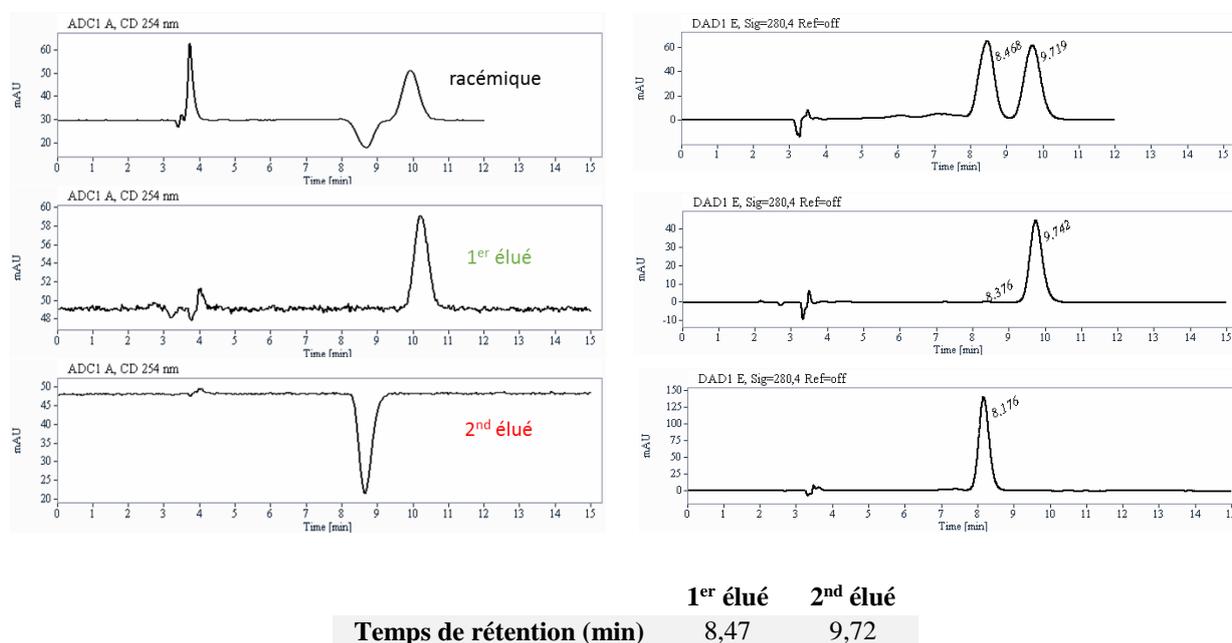


Figure 75 : Chromatogrammes détectés par dichroïsme circulaire à 254nm (gauche) et par UV (droite), avant et après séparation par HPLC chirale analytique du cryptophane **41** (Chiralpak IE (250 x 4,6 mm), EtOH / CHCl₃ (70/30), 1mL / min). Conditions de séparation préparative : Colonne Chiralpak IE (250 x 10 mm), EtOH / CHCl₃ (70/30), 55mg de racémique sont solubilisés dans l'éluant puis la séparation nécessite 35 injections de 200 µL toutes les 5min pour récupérer 24 mg (ee>99,5%) du premier élué et 14 mg du 2nd élué (ee>98,5%).

Chaque énantiomère a ensuite été caractérisé par dichroïsme circulaire et via des mesures de pouvoir rotatoire spécifiques (figure 76).

λ (nm)	$[\alpha_D^{25}]$ 1 ^{er} élué (°.dm ⁻¹ .g ⁻¹ .cm ³) acétonitrile, c = 0.145 M	$[\alpha_D^{25}]$ 2 nd élué (°.dm ⁻¹ .g ⁻¹ .cm ³) acétonitrile, c = 0.075 M
589	- 159	+ 159
578	- 166	+ 165
546	- 192	+ 191
436	- 368	+ 371
365	- 715	+ 720

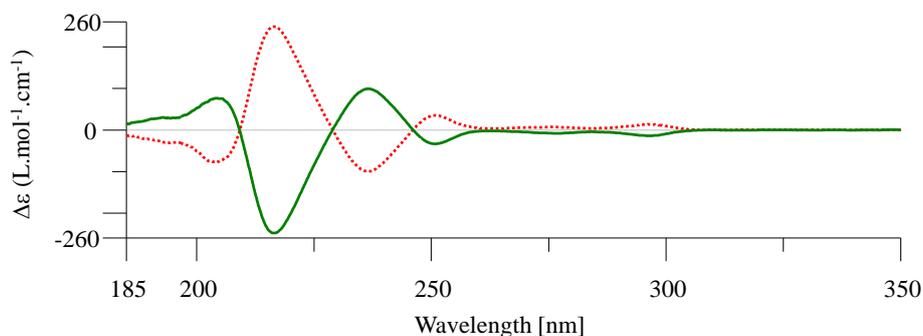


Figure 76 : Caractéristiques chiroptiques des deux énantiomères du cryptophane **41**. Spectre ECD de solutions dans l'acétonitrile à 0.124 mmol.L⁻¹. 1^{er} élué (vert) – 2nd élué (rouge)

3.3.2. Greffage des sucres

3.3.2.1. Choix des sucres

Une fois le cryptophane servant de structure de base de la sonde synthétisé, l'objectif suivant est de greffer les carbohydrates qui constituent les substrats des lectines de la bactérie PA. Toutes les étapes de synthèses associées ont été réalisées au sein de l'équipe de glycochimie de Lyon par Y. Pascal sous la direction du Professeur S. Vidal.

Les premières études porteront sur la lectine PA-IL, pour laquelle on dispose de davantage de données dans la littérature. Cette lectine étant exclusivement spécifique des dérivés galactosidés, notre choix s'est donc porté sur l'ajout de 3 unités galactose. En parallèle une expérience témoin sera menée via l'élaboration d'un cryptophane porteur de 3 unités glucose. En effet, ce carbohydrate ne présente aucune affinité pour les lectines de la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa* (figure 77) et servira de référence lors des mesures en RMN du xénon.

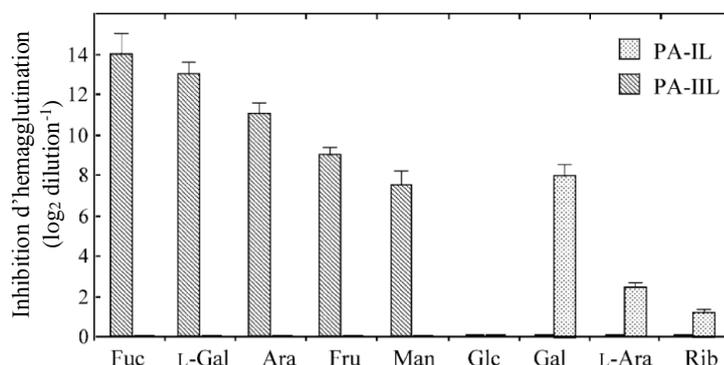


Figure 77 : graphique représentatif des résultats obtenus pour des expériences d'inhibition d'hémagglutination (annexe 3) de lectine PA-IL (gris clair) et PA-III (gris foncé). L'unité choisie (\log_2 dilution⁻¹) est telle que la valeur tend vers zéro en l'absence d'affinité d'un sucre pour une lectine, (incapacité à contrer le processus d'agglutination). D-arabinose (Ara), L-arabinose (L-Ara), D-fructose (Fru), L-fucose (Fuc), D-galactose (Gal), L-galactose (L-Gal), D-glucose (Glc), D-mannose (Man) and D-ribose (Rib).²⁰⁹

3.3.2.2. Synthèse des carbohydrates porteurs d'une fonction azide

La réaction consistant à lier de façon covalente un glucide à une autre molécule est appelée glycosylation.²²⁴ Cette réaction est très courante dans les organismes biologiques et est contrôlée (du point de vue de la régio- et de la stéréosélectivité) par des enzymes. En synthèse organique, c'est la position anomérique d'un carbohydrate que l'on fonctionnalise le plus aisément, et on définit la stéréosélectivité de la réaction de glycosylation sur cette position en fonction de l'orientation relative des substituants en position 1 et 2 du sucre : réaction de glycosylation 1,2-cis ou 1,2-trans. (figure 78).

Nous nous limiterons dans la suite à la glycosylation 1,2-trans qui d'après la littérature est la plus avantageuse en terme de rendement et de sélectivité. Dans ce cas, l'utilisation d'un groupement protecteur de type acétate en position 2, servant d'assistant anchimérique (figure 78-b), permet d'orienter l'attaque de l'accepteur de glycoside, et l'efficacité de la réaction peut être améliorée en utilisant un bon groupement partant en position anomérique. Par ailleurs, les études menées au sein de l'équipe du Pr. Vidal ont montré que le contrôle de la stéréochimie de la réaction de glycosylation dépend fortement de la nature de l'accepteur de glycoside utilisé.

²²⁴ A. V. Demchenko, *Synlett*, **2003**, 9, 1225– 1240.

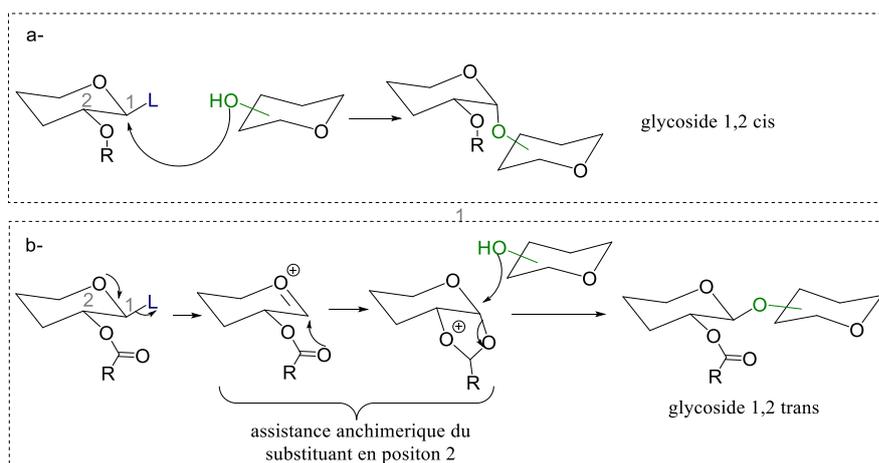


Figure 78 : a – Représentation schématique d’une glycosylation 1,2 cis par mécanisme SN₂ b- Principe de la glycosylation 1,2-trans orientée par assistance anchimérique. (L =bon groupe partant)

Il s’agit dans notre cas de fonctionnaliser la position anomérique d’un carbohydate avec une chaîne de type PEG comprenant un azide en position terminale. Cet intermédiaire a été obtenu en 2 étapes (figure 79). La première étape est la glycosylation du carbone anomérique du sucre pentaacétylé par le chlorure de triéthylèneglycol. La stéréochimie de cette réaction est décrite comme étant difficile à contrôler du fait de l’utilisation d’un alcool primaire peu encombré.²²⁵ Cependant, des conditions opératoires mettant en jeu le couple tétrachlorure d’étain/ trifluoroacétate d’argent comme activateur du sucre pentaacétylé permettent d’obtenir l’intermédiaire chloré énantiopur avec un rendement de 82% à l’échelle de 20g.²²⁶ Les impuretés métalliques sont alors éliminées par simple filtration sur silice avant de procéder à la substitution nucléophile de l’anion azoture sur le chlorure en présence d’iodure de tétrabutylammonium comme catalyseur.²²⁷

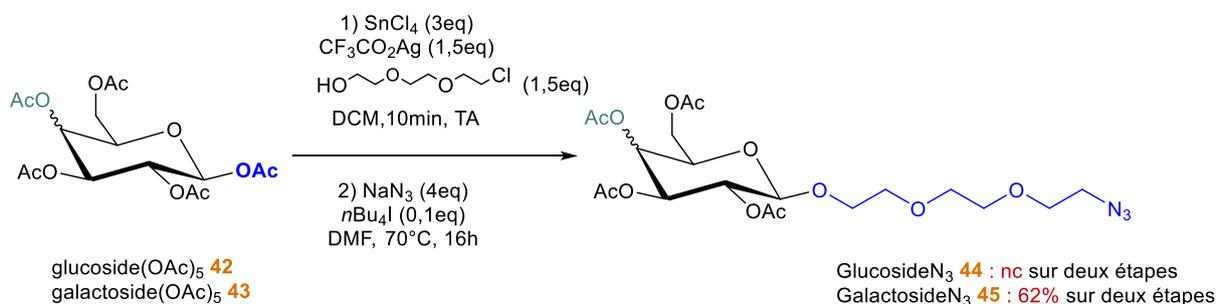


Figure 79 : Synthèse de galactoside et glucoside fonctionnalisés par une chaîne PEG-azide sur la position anomérique.

3.3.2.3. Obtention des sondes finales par couplage de Huisgens

Les carbohydates ainsi obtenus peuvent être couplés au cryptophane[2,2,2](OMe)₃(Opropargyl)₃ 41 selon une réaction de cycloaddition de Huisgens qui a lieu entre l’azide du sucre et le propargyl du cryptophane, et mène à la formation d’un triazole. Ce type de couplage a été optimisé au sein de l’équipe du professeur S. Vidal sur des plateformes calixarènes. Les conditions retenues pour cette étape impliquent l’utilisation du couple catalytique Meldal (CuI + DIPEA) dans le DMF à 110°C sous irradiation micro-ondes pendant 15 minutes.²²⁷

²²⁵ H. Vermeer, C. van Dick, J. Kamerling, J. Vliegthart ; *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 193-203.

²²⁶ J. L. Xue, S. Cecioni, L. He, S. Vidal, J-P. Praly, *Carbohydrate Research*, **2009**, 334, 1646-1653.

²²⁷ These de S. Cecioni, *Approche multivalente des interactions saccharides/lectines : synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire*, ICBMS Lyon I, **2010**, HAL Id: tel-00732336.

Dans le cas du couplage sur le cryptophane **41**, (figure 80), les meilleurs rendements sont obtenus à température ambiante et sans irradiation micro-ondes ce qui va de pair avec une cinétique plus lente et nécessite entre 5 et 7 jours de réaction pour obtenir les intermédiaires **46** et **48** avec des rendements respectifs de 55% et 54%. La dernière étape de déprotection des groupements acétate menant aux deux sondes désirées **47** et **49** est une saponification. Deux bases ont été testées : le méthanolate de sodium dans un mélange biphasique méthanol/DCM permet d'isoler la sonde *cryptophane-glucose*₃ **47** avec un rendement de 54%, alors que l'utilisation de triéthylamine comme base mène à la sonde *cryptophane-galactose*₃ **49** avec un rendement de 82%.

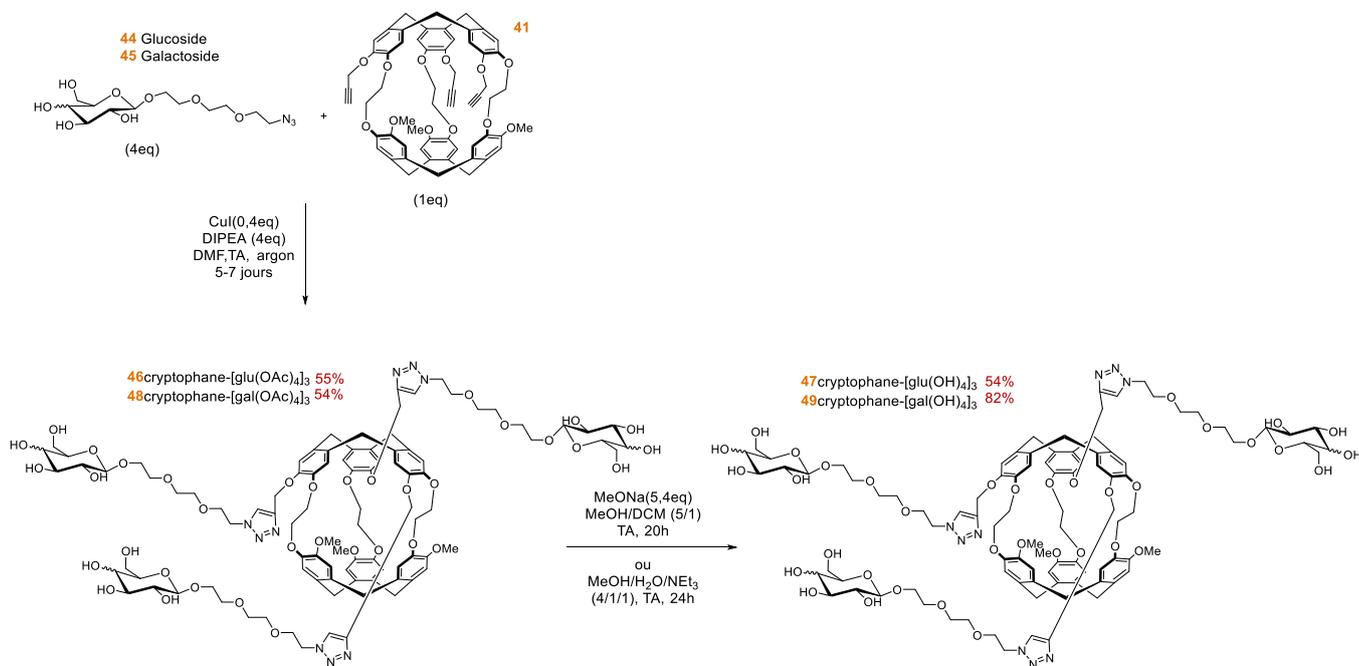


Figure 80 : Synthèse des sondes cryptophane couplés à 3 carbohydrates (**47** et **49**).

3.3.3. Bilan et perspectives

Ce projet a conduit à la synthèse d'une plateforme de type cryptophane fonctionnalisée par des groupements propargyle et adaptée à la complexation du xénon. Dans un second temps, la collaboration avec l'équipe du Pr.S. Vidal a permis de mettre au point une méthode de greffage de carbohydrate, afin de constituer des sondes spécifiques aux lectines de la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa*.

Les sondes obtenues constituent une nouvelle catégorie de cryptophanes hydrosolubles et donc possiblement adaptés à des applications en milieu biologique.

De plus les versions énantiopures des sondes ont été isolées ce qui permettra à priori de simplifier, et améliorer l'interprétation du signal en RMN du ¹²⁹Xe

Cependant les expériences de spectroscopies sont en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit et la mise en évidence de l'interaction sucre/lectine par RMN du xénon n'est pas encore concrète à ce jour. Nous poursuivons donc ces travaux en collaboration avec P. Berthault, au CEA de Saclay. En fonction des résultats obtenus en RMN du xénon, nous pourrions alors envisager de diversifier les sondes en fonction de la nature des carbohydrates greffés, et de passer progressivement des analyses de RMN in vitro à des analyses d'imagerie in cellulo.

Chapitre 4 : Complexation d'ions lanthanide(III) au sein d'un hémicryptophane en vue d'applications en spectroscopie de fluorescence

Nous avons montré dans le chapitre 2 que l'élaboration d'hémicryptophanes fonctionnalisés pouvait mener à la complexation du Gadolinium(III), dans le but de concevoir un nouveau type d'agent de contraste IRM. Nous nous sommes aussi intéressés au cours de cette thèse à l'encapsulation d'autres lanthanides au sein de molécules cages, afin d'en exploiter cette fois-ci les propriétés de fluorescence. La spectroscopie de fluorescence est un outil d'imagerie largement employé dans le cadre d'analyses biologiques et de diagnostic médical. C'est à l'origine l'existence de composés biologiques dotés de fluorescence « naturelle » qui a contribué à l'essor de la microscopie de fluorescence, permettant ainsi de détecter entre autres des bases azotées, certains acides aminés (tryptophane...), des cofacteurs (NADH, ATP...) ou encore, des biomolécules de la famille des porphyrines (hémoglobine) ou de structure proche (chlorophylle). Cette méthode s'est par la suite développée via l'utilisation de sondes fluorescentes exogènes autorisant alors l'observation spécifique d'entités non radiatives, et élargissant ainsi le panel d'applications de la microscopie optique. C'est dans le contexte que s'inscrit ce dernier chapitre au cours duquel nous rappellerons les principes généraux de la fluorescence, avant de nous focaliser sur le cas des lanthanides, et l'intérêt de ligands de type hémicryptophane dans la conception de sondes fluorescentes.

4.1. La spectroscopie de fluorescence

4.1.1. Aspects théoriques et appareillage

4.1.1.1. Généralités ²²⁸

La luminescence est le phénomène d'émission de photons à partir d'un atome ou d'une molécule dans un état électronique excité. L'atome peut avoir été placé dans un état excité via un transfert d'énergie thermique, chimique (ou une réaction enzymatique), électrique ou lumineuse correspondant respectivement à la thermo- chimio- (bio-) électro, ou photoluminescence. Dans cette dernière catégorie figure la fluorescence qu'il faut distinguer des phénomènes de phosphorescence.

Considérons une espèce qui absorbe un photon afin de passer de l'état électronique fondamental singulet S_0 à un état excité d'énergie supérieure. Le diagramme figure 81, appelé diagramme de Jablonski permet de représenter l'ensemble des « chemins » accessibles menant au retour à l'état fondamental.

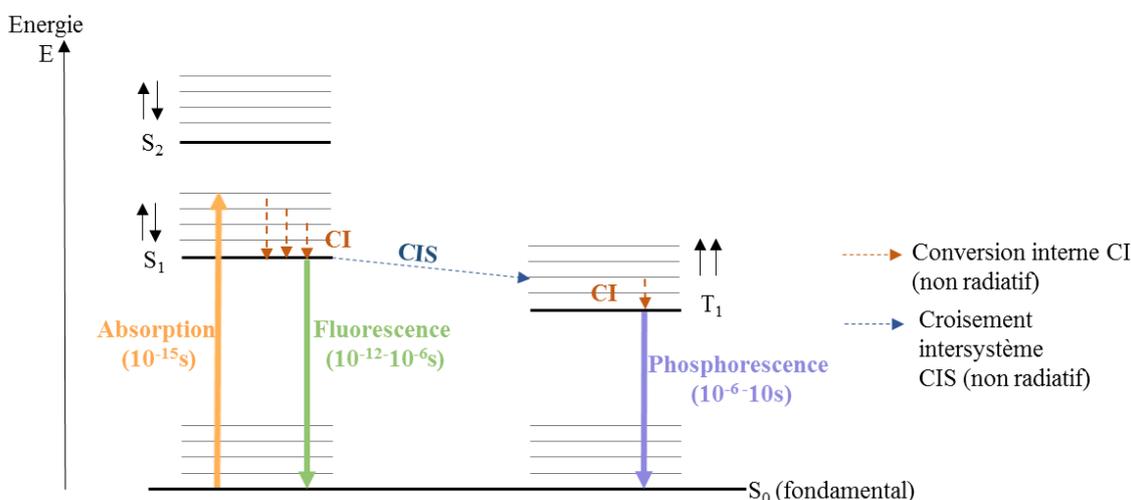


Figure 81 : Diagramme de Jablonski (S = état singulet, T = état triplet).

Souvent le photon atteint un des états vibrationnels de l'état singulet S_1 et le mécanisme de désexcitation commence par des processus non radiatifs (collisions entre molécules ou avec le solvant) pour gagner l'état vibrationnel de plus basse énergie (conversion interne CI). A partir de là deux possibilités donnant lieu à deux catégories de photoluminescence sont envisageables :

- soit la molécule émet directement un photon correspondant à l'énergie du transfert de l'état S_1 vers un des états vibrationnels de l'état fondamental S_0 . C'est le phénomène de fluorescence qui se caractérise par une courte durée de vie de l'état excité de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-6} s.

- soit la désexcitation de la molécule passe par l'inversion de spin d'un des électrons célibataires, passant alors par un état triplet T_1 , d'énergie proche mais plus faible que S_1 . On parle de conversion intersystème (CIS) pour désigner cette transition non radiative d'un état singulet vers un état triplet. Enfin, l'émission d'un photon correspondant à l'énergie du transfert de l'état T_1 vers un des états vibrationnels de l'état fondamental S_0 est à l'origine du phénomène de phosphorescence. Ce processus est plus lent (10^{-6} à 10 s) car les changements de spins sont en théorie interdits par les règles de transitions, mais favorisés dans certains cas (présence d'atomes lourds).

²²⁸ B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, 2004, De Boeck, ISBN : 2804145972.

4.1.1.2. Spectres de fluorescence

Le phénomène de fluorescence est observé expérimentalement à l'aide d'un spectrophotomètre dont le principe de fonctionnement est schématisé sur la figure 82 ci-dessous.

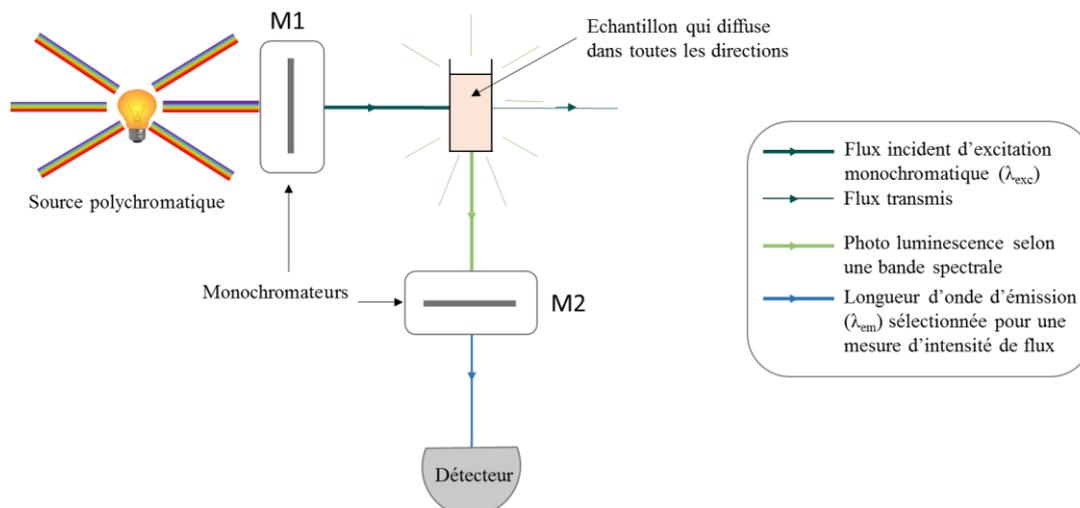


Figure 82 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrofluorimètre.

Une source polychromatique associée à un monochromateur M1 permet d'irradier l'échantillon avec un faisceau de longueur d'onde λ_{exc} . Si l'échantillon est photoluminescent, il émet alors de la lumière sans direction privilégiée. L'excitation d'un échantillon à une longueur d'onde fixe donne lieu à l'émission de photons sur bande spectrale dont la largeur dépend de l'espèce fluorescente. Un second monochromateur M2 est placé à 90° du faisceau incident, afin que la mesure ne soit pas affectée par un flux résiduel transmis. Il sélectionne alors une longueur d'onde d'émission λ_{em} pour en mesurer l'intensité.

On caractérise une molécule fluorescente par deux spectres dits d'excitation et d'émission de fluorescence, qui sont quasiment des images miroirs l'un de l'autre :

- Le spectre d'émission est obtenu en fixant la longueur d'onde d'excitation de l'échantillon (monochromateur M1 fixe), et en enregistrant l'intensité de fluorescence à différentes longueurs d'ondes (balayage au niveau du monochromateur M2). La longueur d'onde d'excitation correspond au maximum d'absorption de la molécule étudiée de façon à recueillir le signal le plus intense possible. Ce spectre s'apparente à une succession de bandes de largeur et d'intensités de fluorescence variables.
- Le spectre d'excitation est quant à lui obtenu en mesurant l'intensité de fluorescence émise pour une longueur d'onde λ_{em} fixe et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation. Il correspond généralement au spectre d'absorption de la molécule d'intérêt. En effet, si on étudie une seule espèce fluorescente, l'enveloppe du spectre est toujours identique quelle que soit la longueur d'onde d'excitation (figure 83-B), et donc l'aire sous la courbe d'émission (qui correspond au signal ré-émis par les photons précédemment absorbés à λ_{exc}), est toujours proportionnelle à l'intensité en un point donné de cette courbe (d'où λ_{em} fixé).

Le nombre et l'attribution des bandes d'émission se justifient en représentant les états électroniques par des courbes de Morse. En passant d'un état fondamental à un état excité, une espèce fluorescente change de géométrie, ce qui se traduit par un décalage selon l'axe des abscisses entre les puits des courbes d'énergies potentielles correspondantes. Les transitions verticales obéissant au principe de Franck-Condon donnent lieu à des bandes intenses, mais plusieurs transitions entre états vibrationnels de l'état excité et du fondamental sont accessibles, ce qui génère d'autres bandes moins intenses. La variation de géométrie entre l'état fondamental et excité, (qui change la forme des potentiels de Morse), ainsi que les effets de solvation sont à l'origine de la largeur des bandes spectrales.

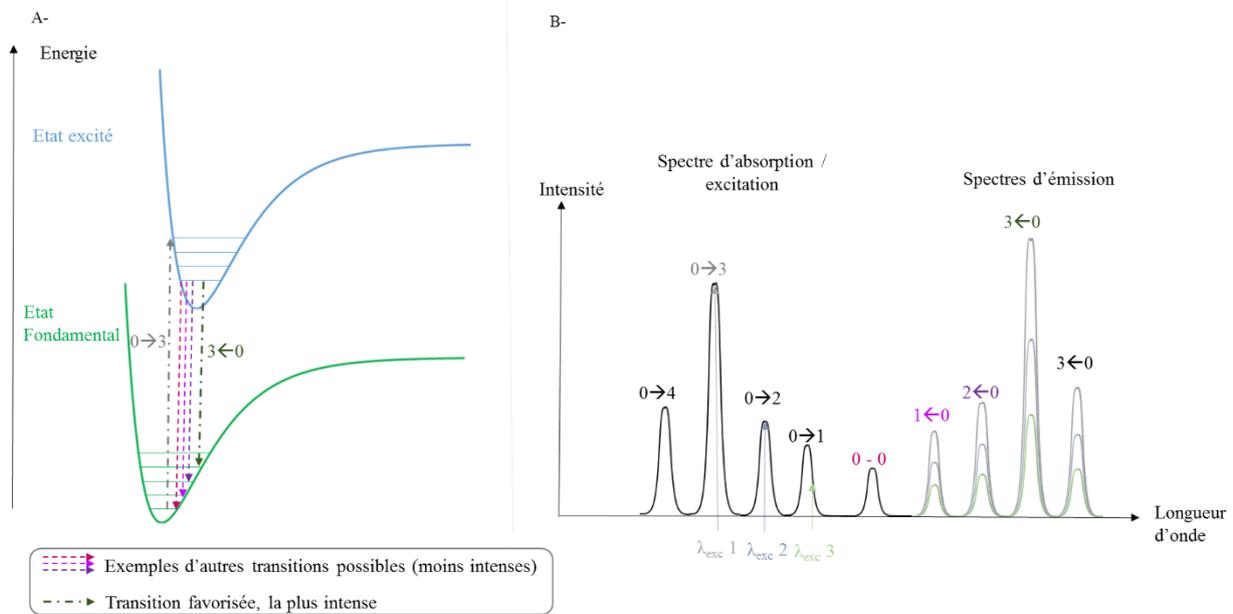


Figure 83 : A- Représentation des transitions verticales entre état fondamental et excités satisfaisant le principe de Franck-Condon B- Allure générale des spectres d'excitation et d'émission d'une espèce fluorescente. Mise en évidence de l'effet de miroir et de l'influence de la longueur d'onde d'excitation choisie sur l'acquisition d'un spectre d'émission de fluorescence.

4.1.1.3. Les paramètres de fluorescence.

❖ Pour caractériser les transitions :

En absorption, l'intensité des bandes figurant sur un spectre est appelée l'absorbance A (sans unité), et correspond au logarithme du rapport entre les intensités lumineuses incidente et transmise.

$$A = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) \quad (3)$$

Si on connaît la concentration de l'échantillon analysé, on peut mesurer à une longueur d'onde fixée le coefficient d'absorption molaire ε , qui s'exprime en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$, et est proportionnel à l'absorbance :

$$\varepsilon = A / \ell \cdot C \quad (4)$$

avec ℓ la largeur de la cuve utilisée en cm, et C la concentration en espèce « active » en mol/L.

❖ Pour décrire la forme du spectre de fluorescence :

La forme et l'allure des spectres de fluorescence sont caractéristiques d'une espèce donnée. On peut les décrire en comptabilisant le nombre de bandes, ou encore en mesurant leur largeur et leur position (longueur d'onde en nm). On relève en particulier les longueurs d'onde correspondant aux maxima d'excitation et d'émission. Compte tenu des désexcitations non radiatives qui font suite au processus d'absorption (règle de Kasha), la transition correspondant au maximum d'émission de l'espèce fluorescente sera toujours moins énergétique que le maximum d'absorption (excitation), et donc à une longueur d'onde décalée vers l'infrarouge. Le décalage entre ces deux bandes spectrales porte le nom de déplacement de Stokes, exprimé en nm, et caractérise une espèce fluorescente.

❖ Pour évaluer l'efficacité d'un fluorochrome :

On caractérise un fluorophore par son rendement quantique de fluorescence Φ qui traduit l'efficacité de l'émission de fluorescence comparée aux autres voies de désexcitations. Il n'a pas d'unité et correspond au rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

$$\Phi = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} \quad (5)$$

Le rendement quantique de fluorescence est caractéristique d'une molécule dans un solvant donné à un pH fixé, il est aussi dépendant de la température.

L'analyse quantitative de spectres d'émission de fluorescence passe aussi par la mesure de l'intensité de fluorescence I_F . Cette dernière correspond au nombre de photons émis par unité de temps dans des conditions d'excitation données. Elle s'exprime en einstein par seconde (1 einstein = $6,10^{23}$ photons) et correspond au produit du rendement quantique de fluorescence par l'intensité lumineuse absorbée :

$$I_F = \Phi \times I_A = \Phi \times (I_0 - I_t) \sim 2,3 I_0 \cdot \Phi \cdot \varepsilon \cdot \ell \cdot C \text{ (dans le cas de solutions diluées)} \quad (6)$$

L'intensité de fluorescence dépend de nombreux paramètres (température, solvant, pH, concentration de l'échantillon en fluorophore, λ_{exc} , nature de la source lumineuse, appareil utilisé...). Ces deux grandeurs I_F et Φ peuvent être atténuées par différents phénomènes tels que des collisions menant à la dissipation d'énergie non radiative, ou encore le photoblanchiment et la formation de complexes non radiatifs.

❖ Temps de vie de fluorescence :

Une alternative à la mesure d'intensité de fluorescence est celle du temps de vie de fluorescence (ou durée de vie de l'état excité) τ d'un fluorophore. Il s'agit du temps nécessaire pour que la population de photons n dans l'état excité soit réduite de 63%. En effet, on peut dans le cas général, décrire l'évolution de la population en photons $n(t)$ par l'équation :

$$\frac{dn(t)}{dt} = -kn(t) \quad (7)$$

où k est la constante de vitesse globale de désactivation de l'état excité (prenant en compte les processus radiatifs comme non radiatifs). La résolution de cette équation différentielle donne la population $n(t)$, donc l'intensité $I(t)$ de la fluorescence qui est telle que :

$$I(t) \propto -\frac{dn(t)}{dt} \Rightarrow I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \text{ avec } \tau = 1/k \quad (9)$$

L'intérêt de ce temps τ est double : sa valeur est d'une part indépendante des conditions de mesure (appareil, source, longueur d'onde d'excitation, concentration de l'échantillon) et mène à une comparaison plus aisée de différents fluorophores. D'autre part, le temps de vie de fluorescence est très dépendant de l'environnement externe du fluorophore (température, polarité, présence de quenchers) ce qui est mis à profit pour cartographier des tissus biologiques dans le cadre de l'imagerie médicale (fluorescence en temps résolu).²²⁹

4.1.2. Différentes catégories de systèmes fluorescents.²³⁰

4.1.2.1. Molécules organiques

La première synthèse de molécule organique fluorescente a été mise au point par J.Herschel en 1845. Il s'agit du sulfate de quinine (figure 82) qui émet une lumière bleue lorsqu'il est irradié dans l'ultra-violet.²³¹ Depuis de nombreuses familles de molécules fluorescentes ont été étudiées. Les principales applications des fluorophores organiques sont en tant que biosonde,²³² pour l'imagerie de fluorescence. Cette technique d'imagerie médicale présente l'avantage d'être peu coûteuse, très sensible, rapide à mettre en œuvre et est non invasive. Dans ce cadre, un des enjeux est de s'affranchir de la fluorescence des molécules biologiques déjà présentes in vivo, et il est nécessaire de se placer dans la fenêtre de transparence biologique (800-1200 nm).

²²⁹ W. Becker, *Journal of Microscopy*, **2012**, 247, 119-136.

²³⁰ T.Terai, T. Nagano, *Pflugers Arch : Eur. J. Physiol.*, **2013**, 465 (3), 347-359.

²³¹ J.F.W.Herschel, *Phil Trans Roy Soc London*, **1845**, 135, 143-145.

²³² Y. Suzuki, K.Yokoyama, *Biosensors*, **2015**, 5 (2), 337-363.

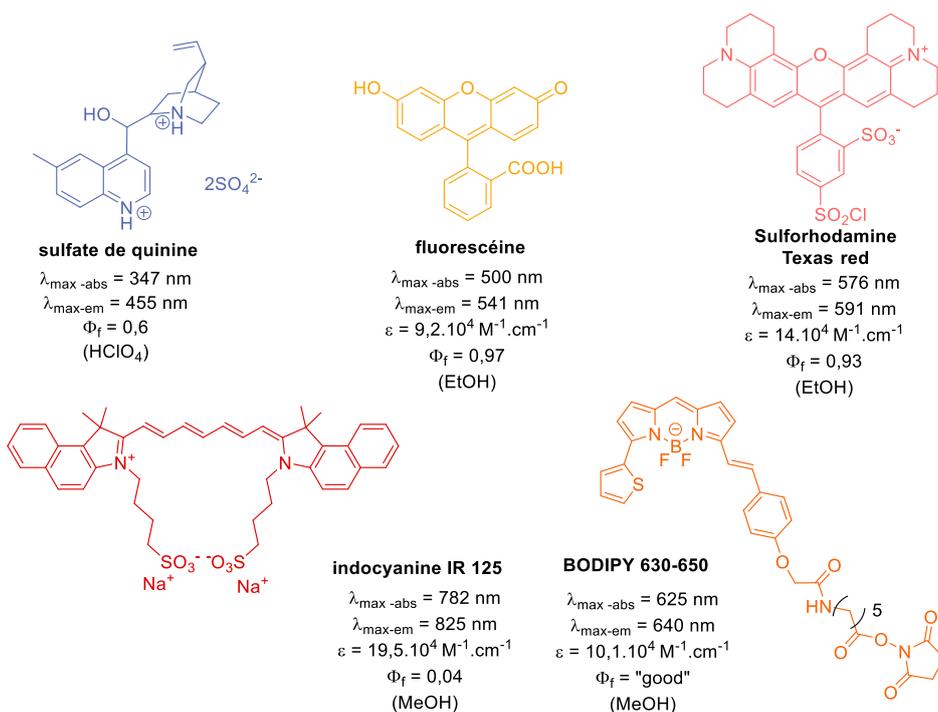


Figure 84 : Quelques familles de fluorophores et leurs propriétés spectroscopiques.

Cela passe par une compréhension du lien entre structure de la molécule et propriétés spectroscopiques. Le design de nouveaux fluorophores organiques est à l'heure actuelle toujours en plein essor (figure 84). On peut retenir que l'ajout de cycles, l'extension de systèmes conjugués ainsi que l'ajout d'hétéroatomes influencent fortement les propriétés spectroscopiques, comme l'illustre l'évolution de la famille de fluorophores Alexa Fluor (figure 85).

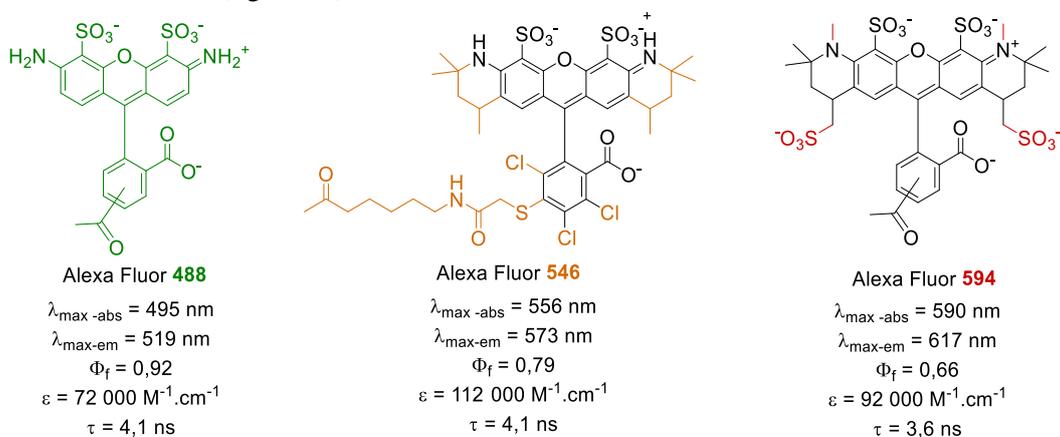


Figure 85 : Représentation (non exhaustive) de systèmes fluorescents de la gamme Alexa Fluor dont les propriétés d'émission évoluent vers des longueurs d'ondes plus élevées.

La tendance actuelle consiste à optimiser les propriétés spectroscopiques (rendement de fluorescence, longueur d'onde d'émission, maximiser le déplacement de Stokes etc), mais aussi à créer des sondes de plus en plus élaborées et spécifiques d'une pathologie. Ceci devient réalisable grâce au design des molécules dont l'activité spectroscopique est dépendante d'un stimulus (chimique, physique, biologique), au lieu de simplement détecter un phénomène d'accumulation de composé fluorescent. On citera par exemple les sondes sensibles au pH²³³, aux dérivés réactifs de l'oxygène (DROs)²³⁴, à un rayonnement UV²³⁵ (figure 86)...

²³³ H. Lee, W. Akers, K. Bhushan, S. Bloch, G. Sudlow, R. Tang, S. Achilefu, *Bioconjug. Chem.*, **2011**, 22 (4), 777–784.

²³⁴ M.C.Y. Chang, A. Pralle, E.Y. Isacoff, C.J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15392–15393.

²³⁵ J. Fölling, V. Belov, R. Kunetsky, R. Medda, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, M. Bossi, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 6266–6262.

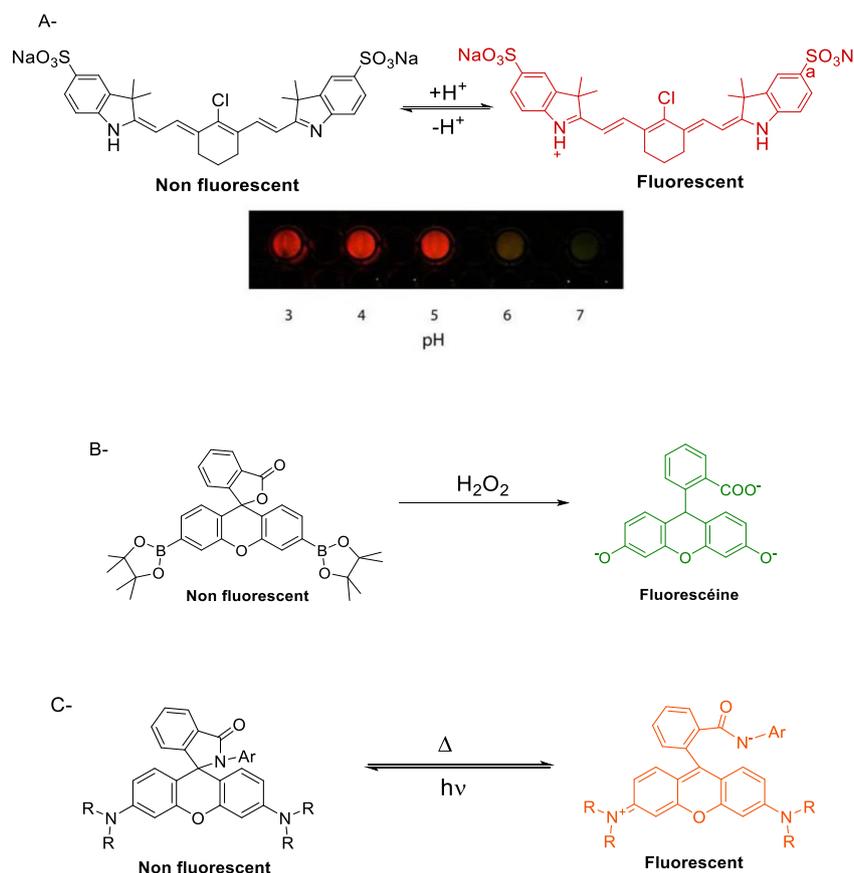


Figure 86 : Exemples de fluorophores organiques dont les propriétés spectroscopiques sont contrôlables A- par variation de pH (détection de cellules cancéreuses), B- par oxidation (détection de processus biologiques générant H_2O_2), C- par irradiation UV ou chauffage.

4.1.2.2. Particules : Quantum Dots

Les quantum dots (QD) sont des nanocristaux semi-conducteurs,²³⁶ découverts au début des années 1980, qui sont constitués d'éléments de la classification périodique choisis parmi les groupes II-VI (Cd-Te, Cd-Se), III-V (In-P) ou encore IV -VI (Pb-S, Pb-Se). Les matériaux semiconducteurs se distinguent par l'existence de bandes continues de niveaux d'énergie séparées par un gap. A l'échelle du nanomètre, ces bandes deviennent discrètes (figure 87). Sous l'effet d'une irradiation, un électron d'une bande de valence peut être promu dans une bande de conduction donnant naissance à un exciton (couple électron – trou) confiné dans une « boîte » en 3 dimensions. Un exciton est caractérisé par la distance moyenne entre le trou chargé positivement et l'électron, appelée rayon de Bohr, qui détermine ses propriétés optiques et électroniques. L'électron peut ensuite regagner la bande de valence, annihilant ainsi l'exciton, et ce phénomène s'accompagne de l'émission d'onde électromagnétique assimilable à de la fluorescence. Les spectres d'émission des QD se présentent sous la forme de bandes fines, aux déplacements de Stokes comparables à ceux des fluorophores organiques (<50nm). De plus, les coefficients d'extinction molaire sont généralement plus élevés (10^5 - 10^6 $M^{-1}cm^{-1}$) que ceux des fluorophores organiques, et les rendements quantiques de fluorescence moyens voire élevés même dans le proche infrarouge

²³⁶ S. B. Rivzi, S. Ghaderi, M. Keshtgar, A. M. Seifalian, *Nano Review*, **2010**, *1*, 5161.

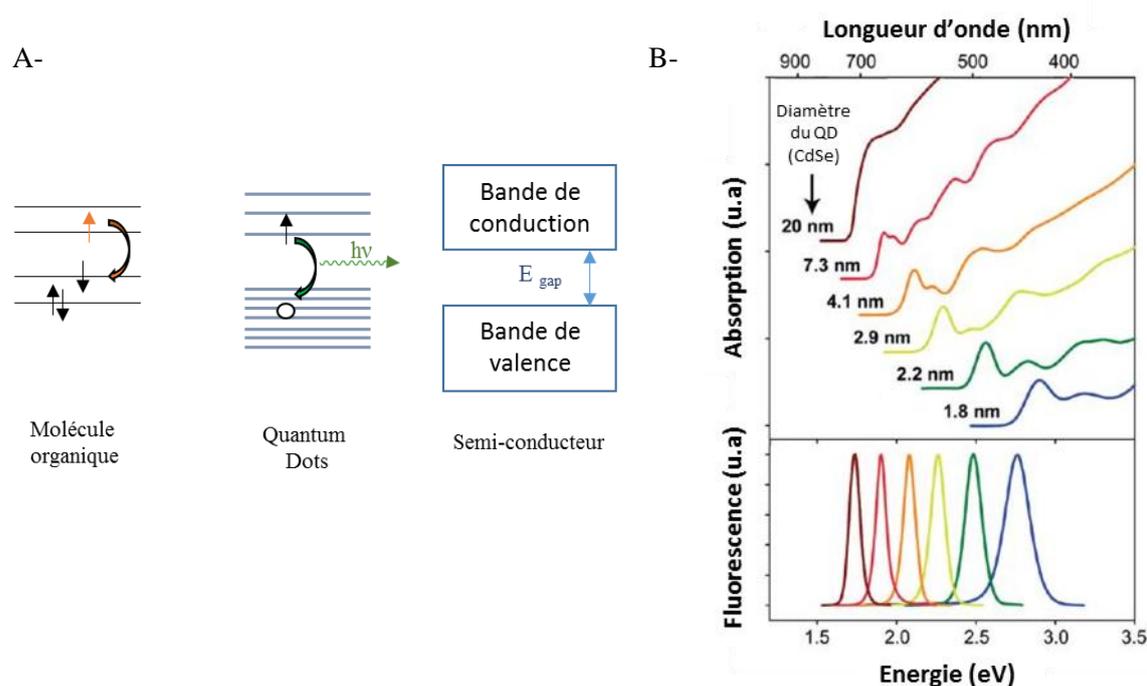


Figure 87 : A- Comparaison schématique des niveaux d'énergies des fluorophores organiques, des quantum dots et d'un matériau semi conducteur. B- Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de QD Cd-Se, mettant en évidence l'influence de la taille de la nanoparticule sur les propriétés spectroscopiques ²³⁷

La principale particularité des QD réside dans le fait que la taille des nanoparticules détermine le rayon de Bohr des excitons créés, et influe fortement sur les propriétés de fluorescence (tableau 14). Concrètement, en augmentant la taille du QD on décale la fluorescence vers les plus grandes longueurs d'onde. Par ailleurs, le noyau semi-conducteur est le plus souvent entouré d'une couche protectrice de sulfure de zinc (ZnS), ainsi que de molécules organiques de nature amphiphyles dont le rôle est de stabiliser la particule et d'accroître leur solubilité en milieu biologique. Il s'agit aussi d'un moyen de contrôle des propriétés spectroscopiques puisque la nature et l'épaisseur de ces différentes enveloppes changent la longueur d'onde d'émission, et la dispersité des solutions colloïdales de QD joue sur la finesse des bandes d'émission. Les temps de vie de fluorescence associés aux quantum dots varient entre 5 et 100 ns et sont suffisamment longs pour s'affranchir de l'autofluorescence des systèmes biologiques (qui dure quelques ns) en instaurant un délai d'attente avant l'acquisition du signal d'intérêt. Cependant, la multidépendance des paramètres spectroscopiques devient un inconvénient dans le cadre de la mesure de temps de vie de fluorescence dont l'évolution n'est plus mono mais multi-exponentielle. Ces outils ne sont donc pas adaptés à la spectroscopie de fluorescence en temps résolu.

Composition	λ_{\max} absorption	λ_{\max} emission	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Φ_f
Cd-S	350-470	370-500	9,5.10 ⁵ (MeOH) ^a	≤ 0,6 ^e
Cd-Se	450-640	470-660	7,0.10 ⁵ (MeOH) ^b	0,65-0,85 ^e
Cd-Te	500-700	520-750	6,0.10 ⁵ (MeOH) ^c	0,3-0,75 ^e
In-P	550-650	620-720	--	0,1-0,6 ^e
Pb-S	800-3000	>900	--	0,7 (hexane)
Pb-Se	900-4000	>1000	1,23.10 ⁵ (CHCl ₃) ^d	0,81 (hexane)

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des propriétés spectroscopiques de plusieurs quantum dots. Les longueurs d'ondes sont données sous forme d'intervalles car elles dépendent de la taille de la nanoparticule considérée ^a pour $\lambda_{em} = 450$ nm, ^b pour $\lambda_{em} = 630$ nm, ^c pour $\lambda_{em} = 700$ nm, ^d λ_{em} non renseigné, ^e solvant non précisé. ²³⁸

²³⁷ A.M. Smith, S. Nie, *Acc. Chem. Res.*, **2010**, 43 (2), 190–200.

²³⁸ U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavalière-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nature Methods*, **2008**, 5 (9), 763-775.

4.1.2.3. Complexes de lanthanides

La 3^{ème} grande catégorie de systèmes fluorescents utilise les propriétés spectroscopiques des métaux de transition f, en particulier des ions lanthanides, Ln(III). Ces ions sont d'abord connus dans le domaine des matériaux en tant qu'agents dopants pour leurs propriétés fluorescentes (phosphores au sein de tubes cathodiques d'écran de télévision), mais aussi pour leur capacité à amplifier les signaux optiques (fibres optique dopée à l'erbium). Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons plutôt sur l'utilisation des propriétés de fluorescence des ions Ln(III) complexés par un ligand organique dont les rôles sont multiples. Le ligand masque non seulement la toxicité du métal en vue d'application comme biosonde, mais il sert aussi d'antenne ce qui confère aux complexes des paramètres de fluorescences atypiques (comme par exemple de longs temps de vie de fluorescence, et de bons rendements quantiques). Tout ceci sera davantage détaillé dans la partie suivante (4.2).

4.2. La fluorescence des lanthanides

4.2.1. Généralités sur les lanthanides

4.2.1.1. Configuration électronique et contraction des lanthanides

Les lanthanides sont les éléments de transition f de numéros atomiques compris entre 57 (lanthane) et 71 (lutécium). Leur configuration électronique est de type $[Xe]4f^n5d^16s^2$, sauf pour le lanthane, le cérium et le gadolinium qui adoptent une configuration $[Xe]4f^{n+1}6s^2$ pour répondre au principe de plus basse énergie. Ainsi, les ions trivalents des lanthanides perdent 2 électrons *s* ainsi qu'un électron *d* (ou *f*) pour balayer les configurations $[Xe]4f^n$ ($1 < n < 14$). Tous les lanthanides (III) à l'exception du lanthane ($4f^0$) et du lutécium ($4f^{14}$) sont paramagnétiques (en particulier le gadolinium déjà rencontré au chapitre 2), mais aussi luminescents. Ils présentent par ailleurs un caractère d'acide dur (théorie de Pearson) ainsi qu'acide de Brønsted leur donnant tendance à former des hydroxydes $Ln(OH)_3$ à pH neutre.

Si, de façon générale, l'ensemble des lanthanides ont des propriétés physico-chimiques similaires, on remarque tout de même une évolution régulière de ces propriétés au sein de la période correspondante de la classification périodique. Ceci a pour origine un phénomène communément appelé la « contraction des lanthanides ». En effet, en passant de *Z* à *Z*+1, un électron supplémentaire est ajouté dans une orbitale *f* (qui n'est pas une orbitale externe) mais celui-ci ne compense qu'en partie le gain de charge nucléaire (constante d'écran inférieure à 1), et l'attraction du noyau correspondant augmente. Le rayon ionique des Ln(III) décroît donc progressivement du lanthane au lutécium (figure 88). Ceci va de paire avec des constantes de stabilité croissantes des complexes de Ln(III) lorsque *Z* augmente, ou encore un pH de précipitation des hydroxydes de plus en plus acide.

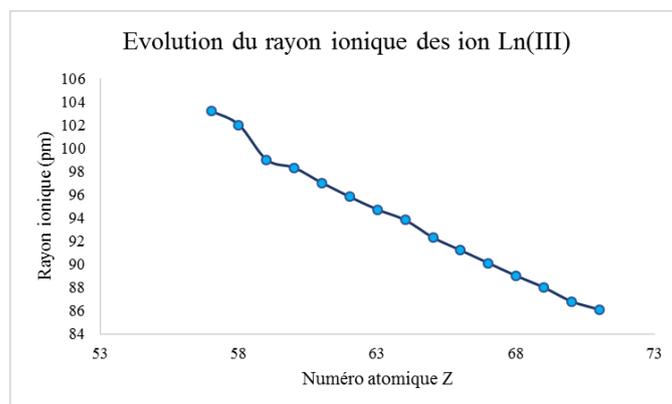


Figure 88 : Graphique illustrant le phénomène de contraction des lanthanides ²³⁹

²³⁹ N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the elements*, 2nd edition, 1997, Elsevier, Oxford.

4.2.1.2. Généralités sur la chimie de coordination des lanthanides

Les orbitales f ne sont pas les orbitales externes des lanthanides, elles sont masquées par les orbitales 5d et 6s plus diffuses. Il n'est donc pas possible d'envisager la formation de liaison covalente métal-ligand mettant en jeu ces orbitales f. C'est pourquoi les interactions de nature électrostatiques sont favorisées dans le cadre de la complexation de lanthanides, avec de préférence des sites de coordination de type bases dures au sens de Pearson. Tout ceci justifie le caractère fortement oxophile de ces métaux.

Etant plus volumineux que les métaux de transition d, les lanthanides peuvent atteindre des nombres de coordination plus élevés, et variables, car dictés par des critères électrostatiques et/ou stériques. Les lanthanides peuvent ainsi accepter des nombres de coordination allant de 6 à 12 (pour les plus fréquents)²⁴⁴ avec une grande majorité de complexes répertoriés ayant 8 ou 9 sites de coordination. Une conséquence structurelle de l'enfouissement des orbitales f est la non directionnalité des liaisons de coordination métal-ligand qui donne lieu à des géométries des complexes de Ln(III) surtout guidées par la structure du ligand.

La forte influence du ligand sur la géométrie des complexes de lanthanides a mené au développement de ligands (chiraux ou achiraux) capables de conférer aux complexes correspondants une certaine hélicité, et par extension, une stéréochimie autour du métal de transition f. On leur attribue la configuration Δ ou Λ en fonction de l'orientation de l'hélice observée. La figure 89 représente certains modèles de complexes de lanthanides chiraux déjà développés.

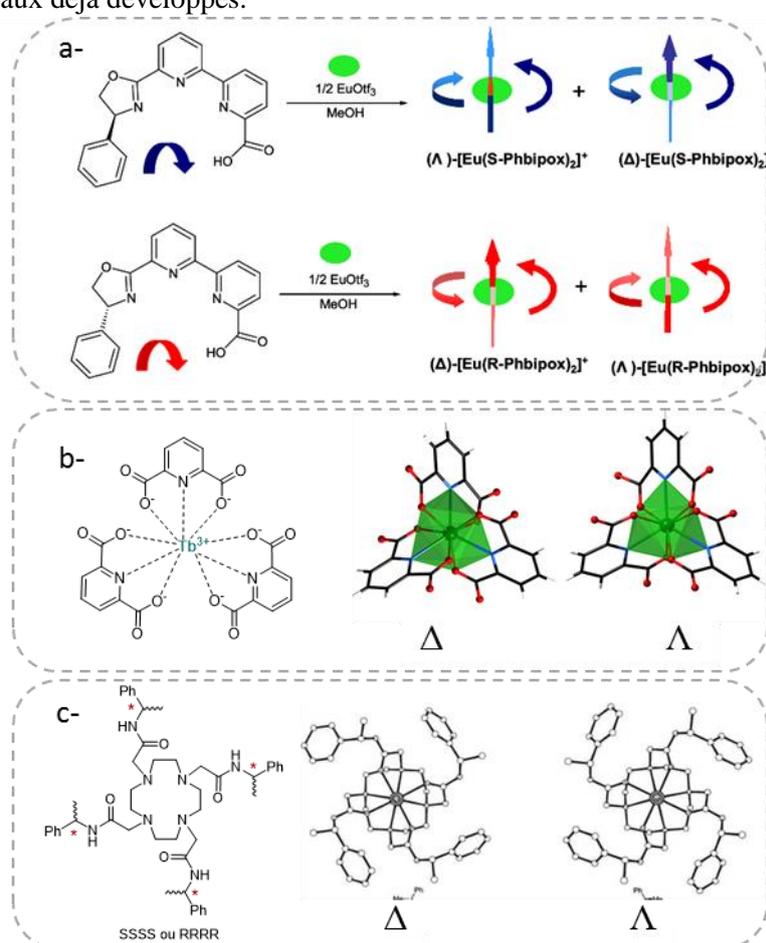


Figure 89 : a-Complexe d'euprium(III) chiral de type EuL_2 avec le ligand $\text{L} = \text{Phbipox}$ tétravalent²⁴⁰ b- Complexe de terbium(III) chiral de type TbL_3 avec le ligand $\text{L} = \text{acide dipicolinique}$ ²⁴¹ c- Complexe d'euprium(III) chiral avec un ligand macrocyclique chiral inspiré du DOTA.²⁴²

²⁴⁰ G. Bozoklu, C. Marchal, C. Gateau, J. Pécaut, D. Imbert, and M. Mazzanti, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 6159–6163.

²⁴¹ P.A. Brayshaw, J-C. G. Bunzli, P. Froidevaux, J.M. Harrowfield, Y. Kim, A.N. Sobole, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 2068-2076.

²⁴² R. S. Dickins, J. A. K. Howard, C. L. Maupin, J. M. Moloney, D. Parker, J. P. Riehl, G. Siligardi, J. A. Gareth Williams, *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5* (3), 1095- 1105.

4.2.2. Propriétés spectroscopiques²⁴³

4.2.2.1. Notion de terme spectroscopique

Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur les propriétés spectroscopiques des ions des lanthanides au degré d'oxydation III. Ces propriétés sont intrinsèquement liées à la répartition des électrons au sein des orbitales f. En effet, les sous couches f incomplètes peuvent donner lieu à différentes répartitions des électrons au sein des spin-orbitales, chacune ayant une énergie qui lui est propre. On définit alors des termes spectraux (tableau 15) pour désigner chaque répartition envisageable, que l'on note $^{2S+1}L_J$ avec :

- S, la multiplicité de spin totale, à avoir la somme, $\sum ms$, des nombres quantiques magnétiques de spin de chaque électron de la configuration considérée, sachant que $ms = +1/2$ pour un spin *up*, et $-1/2$ pour un spin *down*.

- L, le nombre quantique orbital total qui s'exprime comme la somme, $\sum ml$, des nombres quantiques magnétiques, des électrons de la configuration considérée, sachant que $-l < ml < +l$.

- J, le moment angulaire total des électrons qui prend ses valeurs entre $|S-L|$ et $S+L$ par pas de 1.

Le tableau 15 regroupe l'ensemble des termes spectraux associés aux configurations des ions Ln(III) dans leur état fondamental.

Ion	n (4f ⁿ)	Nombre quantique magnétique ml des orbitales							L	S	J	Terme spectral
		3	2	1	0	-1	-2	-3				
J = L-S												
La ³⁺	0								0	0	0	¹ S ₀
Ce ³⁺	1	↑							3	1/2	5/2	² F _{5/2}
Pr ³⁺	2	↑	↑						5	1	4	³ H ₄
Nd ³⁺	3	↑	↑	↑					6	3/2	9/2	⁴ I _{9/2}
Pm ³⁺	4	↑	↑	↑	↑				6	2	4	⁵ I ₄
Sm ³⁺	5	↑	↑	↑	↑	↑			5	5/2	5/2	⁶ H _{5/2}
Eu ³⁺	6	↑	↑	↑	↑	↑	↑		3	3	0	⁷ F ₀
J = L+S												
Gd ³⁺	7	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	0	7/2	7/2	⁸ S _{7/2}
Tb ³⁺	8	↑↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	3	3	6	⁷ F ₆
Dy ³⁺	9	↑↓	↑↓	↑	↑	↑	↑	↑	5	5/2	15/2	⁶ H _{15/2}
Ho ³⁺	10	↑↓	↑↓	↑↓	↑	↑	↑	↑	6	2	8	⁵ I ₈
Er ³⁺	11	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑	↑	↑	6	3/2	15/2	⁴ I _{15/2}
Tm ³⁺	12	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑	↑	5	1	6	³ H ₆
Yb ³⁺	13	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑	3	1/2	7/2	² F _{7/2}
Lu ³⁺	14	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	0	0	0	¹ S ₀

Tableau 15 : Configurations électroniques et termes spectraux des ions trivalents des lanthanides dans leur état fondamental.

Les transitions électroniques entre spin-orbitales f, correspondent donc à un changement de terme spectral, et sont associées à des phénomènes d'absorption de photons (ou d'émission, selon la position relative des états considérés). Ce sont ces transitions qui sont à l'origine des propriétés de fluorescence des lanthanides et de leurs complexes. *

²⁴³ C. Huang, Z. Bian, Rare Earth Coordination Chemistry : Fundamentals and Applications, chapitre 1, 2010, Wiley (Asia), ISBN : 978-0-470-82485-6.

*Les lanthanides se distinguent des métaux de transition *d* par le fait que les orbitales 4f ne participent pas à la formation de liaisons métal-ligand, et ce, parce qu'elles sont masquées par les orbitales externes 5d et 6s. Par conséquent, la nature et la géométrie du ligand influent peu sur les niveaux énergétiques associés aux termes spectraux des ions Ln(III), et l'on peut se contenter d'étudier les termes spectroscopiques des ions libres et transférer les résultats aux complexes de lanthanides.

4.2.2.2. Spectres de fluorescence des complexes de lanthanides (III) : effet d'antenne

❖ Origine des spectres de fluorescence des lanthanides :

Il existe des règles de sélection pouvant favoriser ou interdire certaines transitions, et celles-ci interdisent en théorie les transitions f-f. Ce sont des considérations de couplage spin-orbite et/ou de mélanges de fonctions d'ondes de différentes parités qui permettent de rationaliser l'observation expérimentale de ces transitions dans les spectres d'absorption, et d'émission de fluorescence des lanthanides (III). Un des intérêts des éléments de transition f en fluorescence est la finesse des bandes d'émission qui leur est caractéristique et qui est due à la non-intervention des orbitales f, internes, dans la formation de liaisons avec les ligands environnants. Les spectres des complexes conservent cette propriété des spectres des ions libres.

Les Ln(III) peuvent être répartis en 4 groupes selon les caractéristiques de leur spectre d'émission :

- pour le Sm(III), l'Eu(III), le Tb(III) et le Dy(III), les émissions sont principalement dues à des transitions entre l'état excité de plus basse énergie et le fondamental, elles correspondent à des longueurs d'onde dans le visible, les bandes observées sont intenses, et les temps de vie de fluorescence longs (μs à ms).
- les niveaux d'énergies des ions Pr(III), Nd(III), Ho(III), Er(III), Tm(III) et Yb(III), sont proches les uns des autres et cela donne lieu à des transitions moins intenses dans l'infrarouge.
- Le La(III) et le Lu(III) ont des configurations électroniques stables (orbitales f respectivement vides et pleines) qui ne donnent pas lieu à des transitions f-f.
- Le Gd(III) a une configuration électronique stable (orbitales à moitié remplies) qui ne favorise pas les transitions f-f et pour celle qui peut avoir lieu elle correspond à un rayonnement UV.

Nous nous limiterons dans la suite aux 4 lanthanides émettant dans le visible ainsi qu'aux 2 lanthanides les plus utilisés en émission infra-rouge, pour lesquels voici une représentation simplifiée de leur diagramme énergétique (figure 90) :

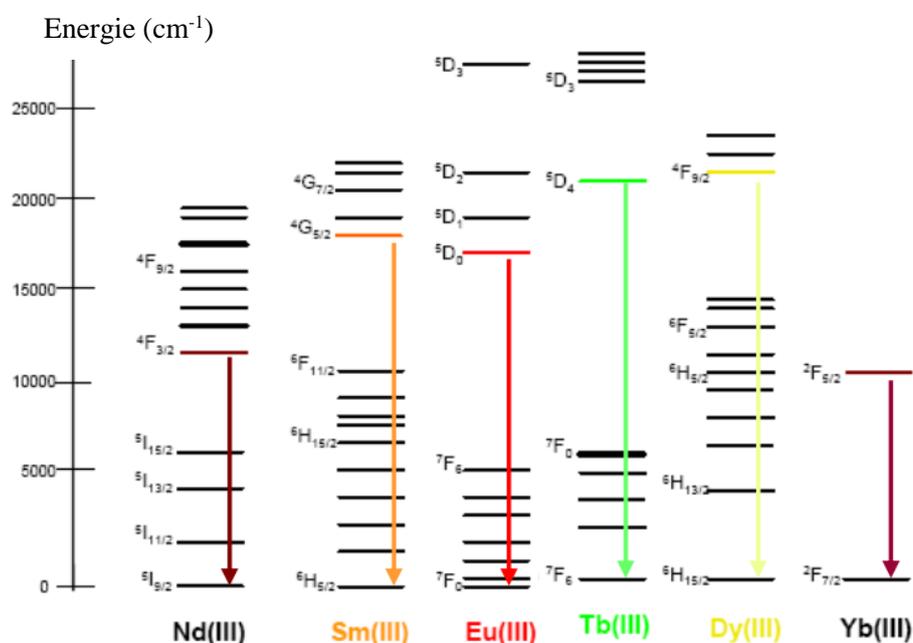


Figure 90 : Diagramme partiel d'énergies pour les ions Ln(III) principalement utilisés au sein de complexes fluorescents : principaux niveaux luminescents (en couleur) et transition vers leurs niveaux fondamentaux.²⁴⁴

²⁴⁴ Thèse d'Aline Nonat : *Complexes de lanthanides(III) pour le développement de nouvelles sondes magnétiques et luminescentes*, 2007, université de Grenoble.

❖ Les rôles du ligand :

Cependant, si on ne prend que les ions en considération, les coefficients d'extinction molaires des transitions f-f sont de l'ordre de $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, alors que les spectres d'émission de complexes de lanthanides peuvent atteindre des valeurs de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (tableau 16). C'est donc le ligand qui joue un rôle particulier, qualifié d'antenne ou de sensibilisateur. Le principal mécanisme proposé dans les années 1990, et retenu pour expliquer cet effet, est illustré dans le diagramme de la figure 91 ci-dessous.

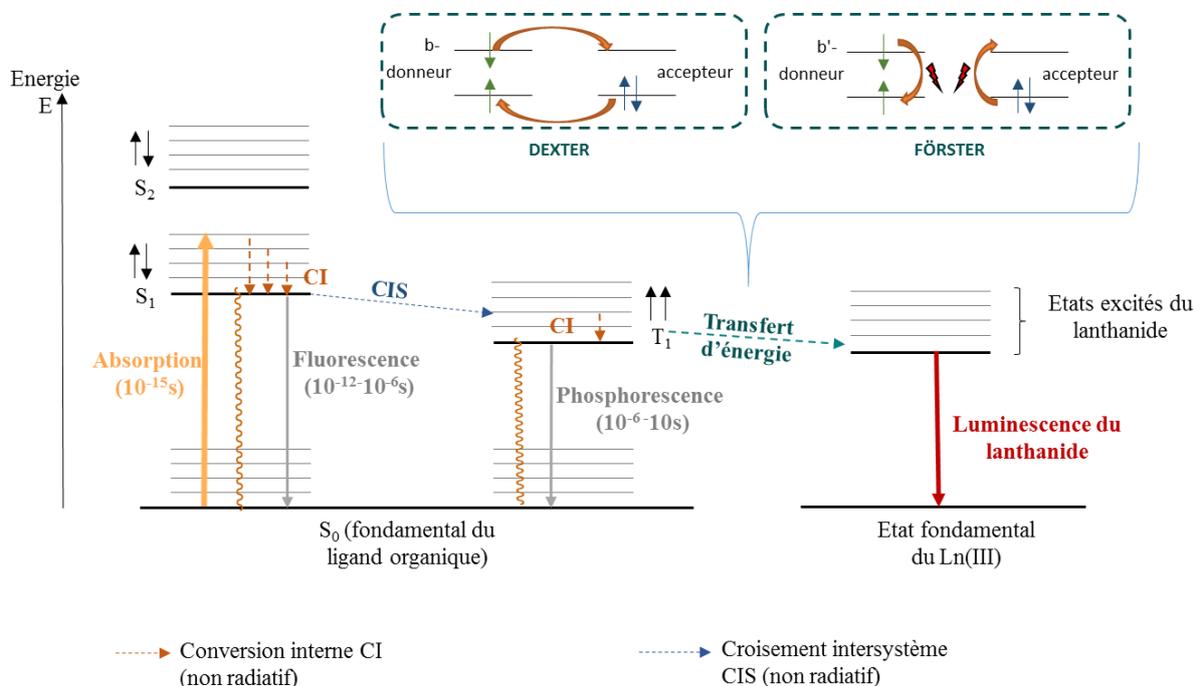


Figure 91 : Représentation dans un diagramme de Jablonski du mécanisme de sensibilisation du lanthanide par le ligand, impliquant son état triplet.

Le ligand organique possédant des coefficients d'extinction molaire élevés est responsable de l'absorption de l'énergie lumineuse, ce qui lui permet de passer de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 . S'en suit un phénomène de croisement intersystème (favorisé par la présence du lanthanide à proximité) qui permet de transférer l'énergie à l'état triplet du ligand, et si l'énergie de celui-ci correspond à un état excité de l'ion lanthanide un transfert se produit, plaçant les électrons de l'ion Ln(III) dans un état excité. L'émission a alors lieu depuis le niveau d'énergie principal du métal avec la longueur d'onde qui lui est caractéristique. Le fait que l'absorption soit propre au ligand d'une part et que l'émission de fluorescence soit due au métal a un effet notable sur les déplacements de Stokes, qui sont très élevés pour les complexes de lanthanides, ce qui permet de supprimer d'éventuelles interférences dues à la source d'excitation.

Le transfert ayant lieu entre le ligand et le métal est un processus complexe pour lequel on distingue deux principaux mécanismes. Celui de Dexter implique un transfert d'électrons entre les deux acteurs. Il nécessite donc un bon recouvrement entre les orbitales concernées du ligand, et les orbitales du métal, ce qui est peu probable pour les éléments de transition f. Le mécanisme Förster ou FRET (« Fluorescent Resonant Energy Transfer »), est un transfert dipôle/dipôle résonant entre deux molécules différentes. Pour que ce transfert soit efficace, il est nécessaire que le spectre d'émission du ligand organique donneur se superpose au spectre d'absorption du lanthanide jouant le rôle d'accepteur. Ce transfert est dépendant de la proximité des molécules, et peut intervenir sur des distances allant jusqu'à 10 nm.

Outre ce rôle d'antenne, le ligand permet de masquer la toxicité des lanthanides en formant des complexes stables, évitant donc le relargage d'ions au degré d'oxydation +III susceptibles de former des hydroxydes insolubles, toxiques et non luminescents. Enfin, il protège l'ion Ln(III) des inhibiteurs, tels que les oscillateurs O-H des molécules d'eau par exemple, dont l'effet est de favoriser les désexcitations non radiatives. Ainsi, le ligand organique peut limiter les phénomènes d'extinction de fluorescence en particulier en milieu aqueux et biologique.

4.2.2.3. Elaboration de complexes de Ln(III) adaptés à des applications en imagerie de fluorescence.

Nous avons mis en évidence quelques intérêts des complexes de lanthanide(III) en spectroscopie de fluorescence. D'une part, la finesse des bandes d'émission assure une bonne résolution, et d'autre part, les forts déplacements de Stokes permettent de séparer clairement les signaux émis de ceux dus à l'excitation de l'échantillon. De plus, il existe toute une gamme de métaux de transitions f émettant chacun à une longueur d'onde préférentielle (visible ou proche infrarouge) ce qui offre la possibilité de distinguer aisément chaque sonde.

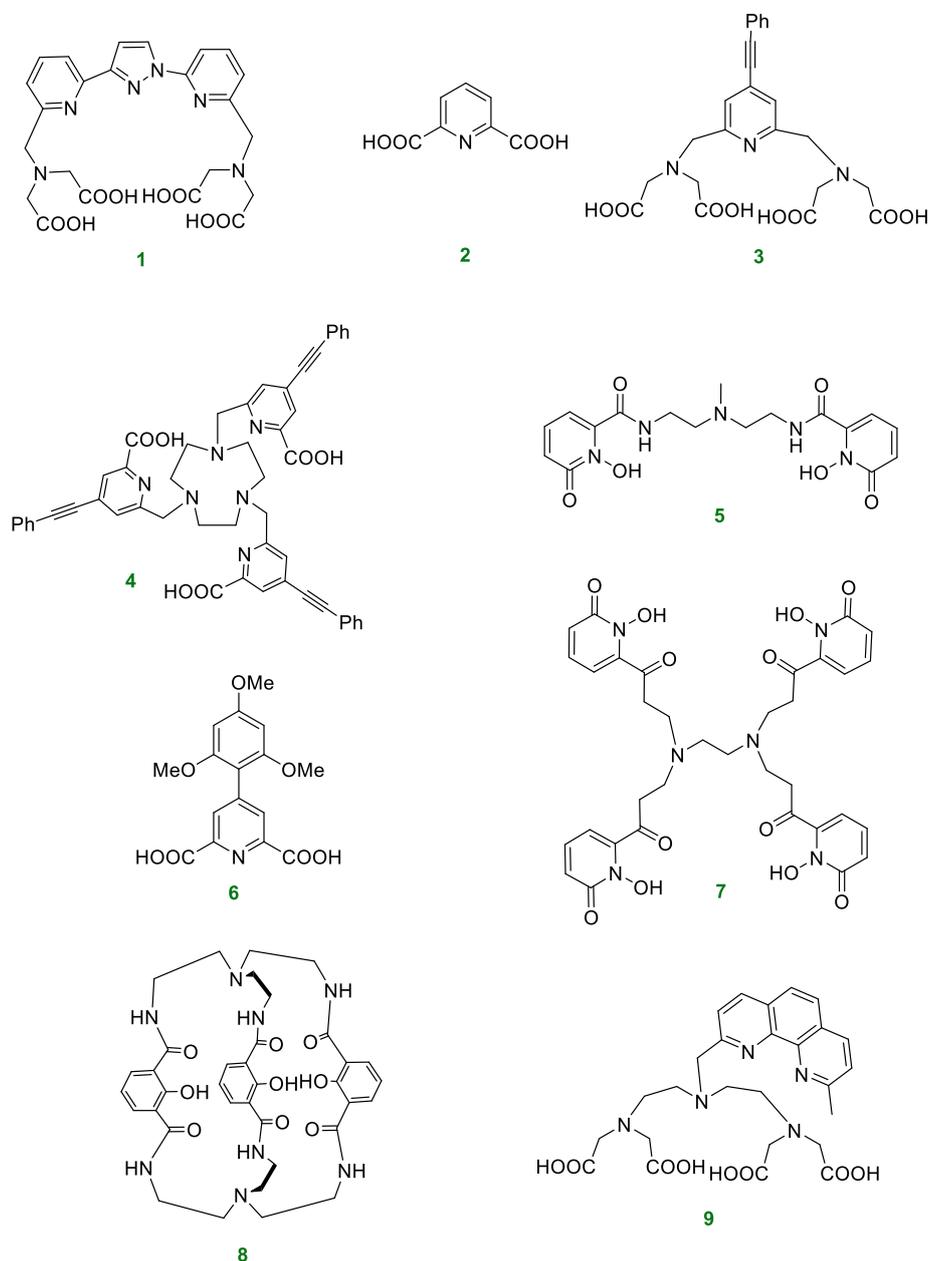


Figure 92 : Exemples de ligands utilisés comme sensibilisateurs dans le cadre de la fluorescence des lanthanides. Cette liste est non exhaustive. La majorité des ligands antenne utilisés en fluorescence sont une association de sites de coordination oxygénés et/ou azotés, de type dipicolinate (2,6), et polyaminocarboxylate (1, 3, 4, 9).^{245 246} Nous avons également représenté des ligands IAM (8)²⁴⁷ et HOPO (5,7)²⁴⁸ développés par l'équipe de K.N. Raymond.

²⁴⁵ S. Quici, M. Cavazzini, G. Marzanni, G. Accorsi, N. Armaroli, B. Ventura, F. Barigelletti, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 529-537.

²⁴⁶ M. Latva, H. Takalo, V-M. Mukkala, C. Matachescu ; J.C. Rodriguez-Ubis, J. Kankare, *J. of Luminescence*, **1997**, *75*,149-169

²⁴⁷ S. Petoud, S. M. Cohen, J-C. G. Bünzli, K.N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13324-13325.

²⁴⁸ E.G. Moore, C.J. Jocher, J. Xu, E. J. Werner, K.N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 5468-5470.

Complexe	Solvant	λ_{exc} (nm) ou λ_{em}	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Φ	τ (μs)	ref
<i>Tb(III).1</i>	H ₂ O	330	9800	42%	1910	246
<i>Tb(III).2₃</i>	H ₂ O	275	12800	21%	2250	246
<i>Eu(III).3</i>	H ₂ O	292	29950	27%	385	246
<i>Eu(III).4</i>	H ₂ O	315	48400	22%	850	246
<i>Eu(III).5</i>	H ₂ O	332	18750	17%	728	249
<i>Tb(III).6₃</i>	H ₂ O	320	18850	48%	1260	246
<i>Eu(III).7</i>	H ₂ O	341	18200	3,6%	480	259
<i>Eu(III).8₂</i>	H ₂ O	354	28482	61%	-	248
<i>Tb(III).8₂</i>	H ₂ O	361	23496	6%	-	248
<i>Sm(III).8₂</i>	H ₂ O	347	30028	1%	-	248
<i>Dy(III).8₂</i>	H ₂ O	347	30028	3%	-	248
<i>Eu(III).9</i>	H ₂ O	616	-	24%	1250	245
<i>Tb(III).9</i>	H ₂ O	544	-	45%*	2.3*	245
<i>Sm(III).9</i>	H ₂ O	598	-	2.5%	13	245
<i>Dy(III).9</i>	H ₂ O	478	-	0.5%	1.2	245
<i>Yb(III).9</i>	D ₂ O	980	-	1%	10	245
<i>Nd(III).9</i>	D ₂ O	1064	-	0.2%	0.4	245

Tableau 16 : Propriétés spectroscopiques d'un panel (non exhaustif) de complexes de lanthanide (III). *solution dégazée

En terme d'efficacité de fluorescence (rendement quantique ou coefficient d'absorption molaire) les meilleurs complexes de lanthanide égalent voire dépassent les fluorophores purement organiques. Le tableau 16 ci-dessus associé à la figure 92, recense les propriétés spectroscopiques de quelques complexes de lanthanides. Ces propriétés sont relativement dépendantes du métal, l'euporium et le terbium étant les plus utilisés et les plus efficaces en fluorescence. Cependant, ils nécessitent une excitation dans l'UV ou le proche UV ce qui devient limitant²⁴⁹ dans le cadre de l'application biologique de ces sondes. La tendance consiste donc à développer des complexes émettant de plus en plus vers l'IR et dans ce cas, le rendement quantique est le facteur à optimiser.

Enfin, à l'instar des sondes organiques, des complexes de lanthanides dont le signal de fluorescence est modulé par des processus externes ont été mises au point : on peut ainsi suivre des variations de pH²⁵⁰, détecter des oxydants comme l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène,²⁵¹ ou encore des biomolécules de type phosphates²⁵²

²⁴⁹ D. Parker, P.K. Senanayake, J.A.G. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.*, **1998**, 2129.

²⁵⁰ D. Parker, J.A.G. Williams, *Chem. Comm.*, **1998**, 245.

²⁵¹ O.S. Wolfheis, A. Durkop, M. Wu, Z.H. Lin, *Angew. Chem.Int. Ed.*, **2002**, 41, 4495.

²⁵² F.J. Hou, Y.H. Miao, C.Q. Jiang, *Spectrochim. Acta Part A*, **2005**, 61, 2891.

❖ Spectroscopie de fluorescence en temps résolu

Une des propriétés remarquables des complexes de Ln(III) est leur long temps de vie de fluorescence, τ , de l'ordre de la micro- voire de la milliseconde. En effet, le mécanisme d'émission mettant en jeu à la fois un croisement intersystème (changement de spin), et un transfert d'énergie entre ligand et métal, le processus global est plus long que celui mis en jeu pour la fluorescence classique de composés organiques. Ceci permet de s'affranchir de la lumière émise par des fluorophores naturels de nature organique (en particulier lors d'analyse ou d'imagerie en milieu biologique - on parle d'autofluorescence). Les lanthanides sont en effet adaptés à une technique de mesure appelée fluorescence en temps résolu²⁵³ dont le principe est illustré figure 93 ci-dessous.

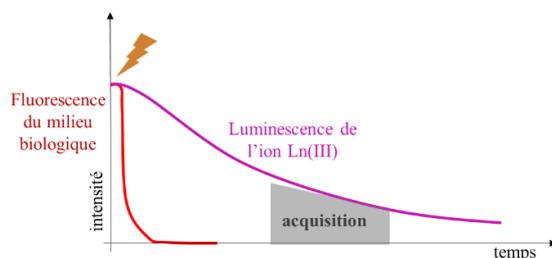


Figure 93 : Schéma représentatif du principe de fonctionnement de la fluorescence en temps résolu.

Cette méthode consiste à ne recueillir le signal qu'après un certain délai suivant l'excitation de l'échantillon. On augmente ainsi le ratio signal/ bruit en ne prenant pas en compte l'émission des fluorophores biologiques dont le temps de vie est beaucoup plus court que les complexes de Ln(III).

4.3. La fluorescence circulairement polarisée

4.3.1. Définition et intérêt

La grande majorité des sondes et objets fluorescents décrits dans la littérature ont été mis à profit dans de nombreux domaines, dont le plus courant est la détection d'entités biologiques ou de processus caractéristiques du monde du vivant. Hors ce dernier est « naturellement » chiral. C'est pourquoi les scientifiques s'intéressent au biomimétisme ou au développement de médicaments chiraux pour mieux appréhender et interagir avec ce monde vivant. La suite logique a été de constater que pour sonder et comprendre comment les molécules chirales ont un impact au sein des systèmes biologiques, il est nécessaire de développer des outils ayant les mêmes propriétés.²⁵⁴ Parmi les méthodes d'analyses chiroptiques, les plus utilisées sont les mesures d'activité optique (pouvoirs rotatoires), le dichroïsme circulaire, ou encore la spectroscopie de rayons X, qui permettent d'identifier des stéréoisomères, et de les caractériser. Par ailleurs, dans ce milieu, il est préférable de confronter les résultats obtenus par plusieurs méthodes d'analyses afin d'en déduire des informations avérées (là où les conclusions issues d'une seule analyse peuvent être ambiguës)

La Luminescence Circulairement Polarisée (CPL) s'ajoute à toutes ces méthodes spectroscopiques au cœur de l'étude des entités chirales. Il s'agit en CPL de mesurer la différence entre les intensités d'émissions de lumière polarisée circulairement gauche (I_L) et de lumière polarisée circulairement droite (I_R) d'un échantillon. Le paramètre caractéristique de cette spectroscopie et le facteur de dissymétrie de fluorescence, noté g_{lum} (ou g_{em}) tel que :

$$g_{lum} = 2 \frac{I_L - I_R}{I_L + I_R} \quad (9)$$

Le facteur g_{lum} prend donc ses valeurs entre -2 et +2 et vaut 0 en cas d'absence de polarisation circulaire de la lumière émise. Les fluorophores organiques ont en moyenne un facteur de dissymétrie de l'ordre de 10^{-2} , là où les complexes de lanthanides ont des valeurs moyennes entre 0,1 et 1 avec un maximum de

²⁵³ L. Galhaut, L.W. Miller, *Cytometrie A.*, **2010**, 77 (12), 1113-1125.

²⁵⁴ G. Müller, *Dalton Trans.*, **2009**, 44, 9692-9707.

+1,38 atteint avec un complexe d'euporium (figure 94).²⁵⁵ La chiralité du ligand semble contrôler celle du métal. Nous nous focaliserons ensuite uniquement sur les complexes de lanthanide.

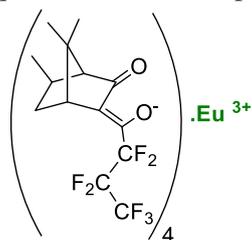


Figure 94 : Structure du complexe chiral d'euporium le plus actif en CPL à ce jour.

Par comparaison au dichroïsme circulaire (CD, qui donne des informations sur la structure globale de l'état fondamental d'une espèce chirale), le spectre de CPL est lié à la chiralité de l'état excité d'un fluorophore. L'information structurale fournie est qualifiée de « locale », car plus sélective, puisqu'elle est caractéristique du chromophore de la molécule analysée (même si celle-ci contient plusieurs sources de chiralité). La CPL devient également plus intéressante que le CD dans le cadre de l'étude de complexes de Ln(III) car mieux adaptée aux transitions f-f. En effet, ces transitions f-f mises en jeu sont difficilement détectables en absorption (car interdites en théorie), mais intenses en émission grâce à l'utilisation d'une antenne (ligand organique). Si l'on compare à la fluorescence classique, la CPL peut améliorer la résolution puisque des bandes successives sont susceptibles d'avoir différents signes en fonction de la polarisation majoritairement émise, et être donc distinguées même si elles sont séparées de seulement quelques nanomètres.

4.3.2. Exemples d'applications

4.3.2.1. Détection d'entités biologiques

Certains complexes de lanthanides existent sous forme racémique et ne sont pas séparables du fait de l'existence d'un équilibre trop rapide entre les formes Δ et Λ . Leur signal en CPL est donc nul. Cette propriété a pourtant été mise à profit pour détecter des molécules chirales. On peut citer l'exemple de l'équipe de G. Müller²⁵⁶ qui utilise un complexe labile de terbium avec trois unités d'acide chélidamique (achirales) comme sonde pour la détection des acides aminés chiraux (figure 95-A). Le réseau de liaisons hydrogènes pouvant se former entre le complexe luminescent et le substrat biologique chirale énantiopur perturbe l'équilibre en favorisant une forme (Δ ou Λ) par rapport à l'autre, et génère ainsi un signal en CPL caractéristique du phénomène de détection. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Pfeiffer.²⁵⁷

Ils vont même plus loin en étudiant l'influence du rapport L/D entre deux énantiomères d'un acide aminé (la sérine) interagissant avec un complexe de terbium(III)(dpa)₃. Il remarque ainsi que le facteur de dissymétrie évolue linéairement avec le pourcentage de D-sérine (dans un mélange D+L sérine), faisant de la CPL une technique de choix pour la reconnaissance spécifique et quantitative de mélange d'énantiomères.²⁵⁸ (figure 95-C)

D'autres sondes à base de ligand chiraux, donc plus compliquées à obtenir d'un point de vue synthétique, ont aussi été développées en particuliers par l'équipe de D. Parker (figure 95-B). Le complexe chiral énantiopur génère à l'origine un spectre en CPL, et c'est la modification de ce spectre en terme de forme et d'intensité des bandes (voire une inversion de signes) qui témoigne de l'interaction avec une biomolécule. Le groupe de D. Parker a ainsi développé une sonde dont seul un des deux énantiomère est spécifique de l'albumine de serum humain (HSA).²⁵⁹

²⁵⁵ Complexe d'euporium avec G lum max 1, 38

²⁵⁶ A. Moussa, C. Pham, S. Bommireddy, G. Müller, *Chirality*, **2009**, 21 (5), 497-506.

²⁵⁷ P. Pfeiffer, K. Quehl, *Chemische Berichte.*, 1932, **65** (4), 560-565.

²⁵⁸ M. N. Kosareff, J. L. Lunkley, N. G. Nguyen, G. Müller, résultats non publiés, voir ref 258.

²⁵⁹ C. P. Montgomery, E. J. New, D. Parker, R. D. Peacock, *Chem. Commun.*, **2008**, 4261-4263

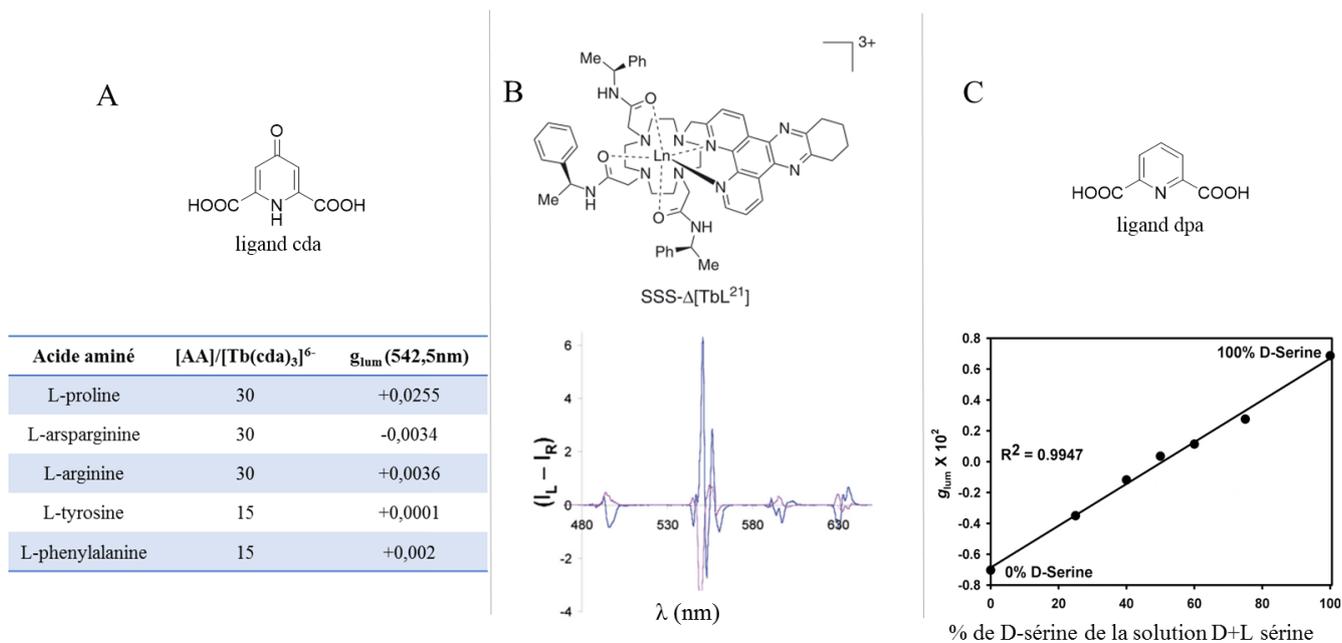


Figure 95 : A- Valeurs de facteurs de dissymétrie de luminescence g_{lum} d'un mélange racémique de complexe de $Tb(cda)_3^{6-}$ (0,04 M dans D_2O) interagissant avec des acides aminés énantiopurs de configuration L ([AA]= 0,6 ou 1,2 M) ; T = 295 K, λ_{exc} = 318-323nm, pH = 12,2.

B- Spectre CPL d'un complexe macrocyclique de Terbium avant (bleu) et après (violet) addition de protéine HSA.

C- Graphique représentatif de l'évolution du facteur de dissymétrie de luminescence (mesuré à 543 nm) d'un complexe de $Tb(dpa)_3^{3-}$ (0,01 M dans l'eau) en fonction du pourcentage de D-sérine en solution.

4.3.2.2. Matériaux luminescents

Les composés capables d'émettre de la lumière circulairement polarisée sont également développés dans le cadre de la chimie des matériaux pour des applications allant du stockage /transport d'information à l'optimisation d'écran lumineux. Par exemple, la tendance actuelle en informatique consiste à remplacer les composants électroniques par des équivalents optiques. Les matériaux actifs en CPL commencent à émerger dans ce domaine car ils sont susceptibles d'enregistrer une information binaire (c'est-à-dire de manière simplifiée : 0 → lumière polarisée circulairement gauche vs 1 → lumière polarisée circulairement droite).

Les complexes de lanthanides fluorescents sont également au cœur du développement d'OLED (organic light emitting diode).²⁶⁰ Les LED deviennent la source de lumière artificielle la plus en vogue en ce 21^{ème} siècle. La mise au point de matériaux organiques pouvant émettre de la lumière a permis de faciliter la conception et d'optimiser les propriétés des précédents matériaux semi-conducteurs. Et aujourd'hui les recherches se poursuivent en étudiant les propriétés des matériaux pouvant émettre une lumière polarisée linéairement, et depuis peu circulairement,²⁶¹ dans le but de mettre au point des écrans et sources toujours plus performants.

²⁶⁰ K. Binnemans, Chemical Reviews, 2009, 109, (9), 4283-4374. (OLED p 4350).

²⁶¹ F. Zinna, M. Pasini, F. Galeotti, C. Botta, L. Di Bari, U. Giovanella, Adv. Funct. Mater., 2017, 27(1), 1-8.

4.3.3. Description de notre sonde

L'objectif de ce dernier projet de thèse est de développer les applications des hémicryptophanes en particulier dans le domaine de la fluorescence. Des fluorophores organiques de type CTB²⁶² ou même hémicryptophanes^{263 264} existent déjà. Ici, il s'agit d'utiliser les propriétés de complexation des hémicryptophanes pour élaborer un complexe fluorescent hémicryptophane-lanthanide(III).

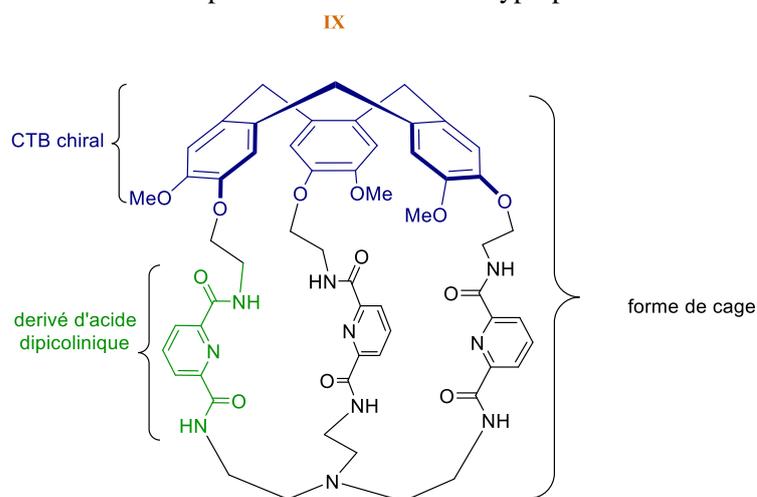


Figure 96 : Structure de l'hémicryptophane **IX** en vue d'applications des complexes de Ln(III) en fluorescence

La structure du ligand choisi est représentée figure 96. Les trois bras de l'hémicryptophane **IX** sont fonctionnalisés avec des dérivés d'acide dipicolinique, ce groupement étant déjà connu en spectroscopie de fluorescence des lanthanides comme un bon sensibilisateur. Ces fonctions à base de « pyridine diamide » constituent aussi l'unité complexante, et seront donc au plus proche du métal de transition f. On favorisera ainsi a priori le transfert d'énergie de type Förster entre le ligand et le métal impliqué dans le mécanisme de fluorescence.

Chaque bras comporte 3 sites de coordination, soit 9 au total, ce qui devrait saturer la sphère de coordination de l'ion trivalent, et ainsi limiter, voire empêcher, le quenching de fluorescence par l'eau ou d'autres quenchers. La forme de cage des hémicryptophanes renforce ce rôle de protection du ligand, ainsi que la stabilité du complexe formé. Ce dernier critère est important en vue d'applications en milieu biologique du fait du caractère toxique des lanthanides.

Par ailleurs, la chiralité de l'unité CTB combinée à la symétrie globale de la molécule sont susceptibles de conférer une certaine hélicité aux ligands hémicryptophanes et à leurs complexes.^{265 266} Il a même été montré que la chiralité de l'unité CTB pouvait se transférer très efficacement, en particulier via la formation d'une triple hélice, à la partie sud de la cage. La figure 97 montre un hémicryptophane fonctionnalisé de manière à former des complexes octaédriques avec des métaux de transition d, tels que le fer(III) ou le gallium(III). Le ligand seul montre l'existence d'une hélicité générée, et liée à la configuration du CTB. De plus, une fois complexé à un métal, seul le couple d'énantiomères PΔ-MΛ est isolé à l'état solide (les stéréoisomères MΔ et PΛ ne sont pas détectés), prouvant ainsi le transfert de chiralité.²⁶⁷

²⁶² Rappel ref 63 : L. Peyrard, S. Chierici, S. Pinet, P. Batat, G. Jonusauskas, N. Pinaud, P. Meyrande, I. Gosse, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 8489-8994

²⁶³ Rappel ref 65 : Thèse de Sara Lefèvre, *Synthèse de récepteurs cyclotribenzylène et hémicryptophane. Propriétés chiroptiques, reconnaissance moléculaire et fluorescence*, **2016**, université de Lyon.

²⁶⁴ D. Zhang, G. Gao, L. Guy, V. Robert, J-P. Dutasta, A. Martinez, *Chem. Commun.*, **2015**, 51 (13), 2679-2682.

²⁶⁵ Thèse d'Olivier Perraud, *Les hémicryptophanes : de la reconnaissance moléculaire à la catalyse supramoléculaire*, **2012**, université de Lyon.

²⁶⁶ A. Martinez, V. Robert, H. Gornitzka, J-P. Dutasta, *Eur. J. Chem.*, **2010**, 16 (2), 520-527.

²⁶⁷ Isabelle Gosse, K. Robeyns, C. Bougault, A. Martinez, B. Tinant, J-P. Dutasta, *Inorg. Chem.*, **2016**, 55 (3), 1011-1013.

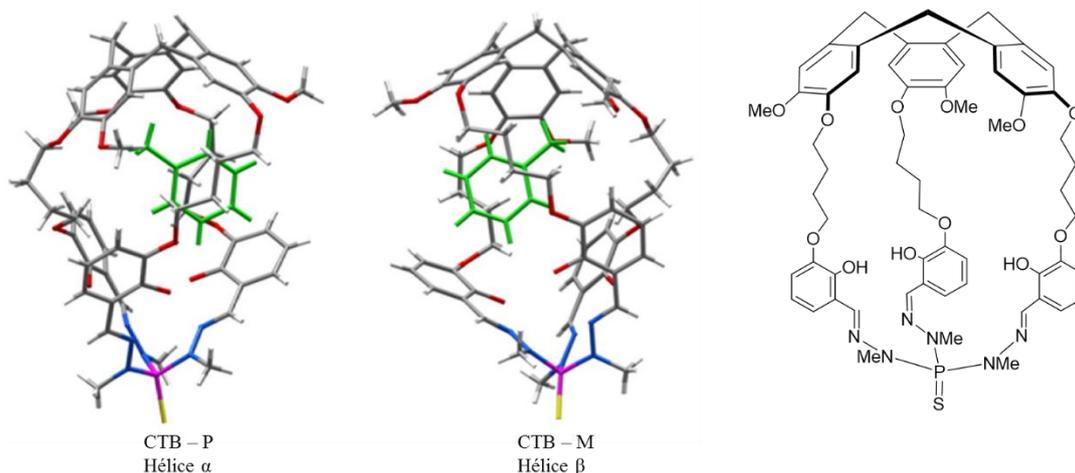


Figure 97 : Exemple d'hémicryptophane montrant l'influence de la stéréochimie de l'unité CTB sur l'hélicité de la molécule.²⁶⁷

Dans la littérature on trouve des ligands chiraux, utilisés en CPL, dotés d'une chiralité centrale voire axiale (tableau 17). Les ligands hémicryptophanes constitueront une nouvelle catégorie faisant appel à une chiralité planaire du CTB. Si cette chiralité du CTB induit une hélicité qui est ensuite transférée au niveau du complexe de Ln(III), celui-ci peut adopter une configuration de type Λ ou Δ , et les énantiomères correspondants devraient constituer de bonnes sondes fluorescentes dans le cadre de la CPL. Nous travaillerons dans un premiers temps avec les 2 ions lanthanides les plus efficaces en fluorescence, à savoir l'euprium(III) et le terbium(III).

Enfin, les hémicryptophanes étant également connus pour leurs propriétés de complexation de petites molécules biologiques, nous espérons les combiner aux propriétés de fluorescences des complexes de lanthanides obtenus pour élaborer des sondes fluorescentes spécifiques, dont le signal en CPL est modulé par la présence ou non d'un invité au sein de la cavité.

4.4. Synthèse d'une nouvelle sonde fluorescente

4.4.1. Synthèse du ligand hémicryptophane IX.

4.4.1.1. Stratégie et descriptif

La stratégie de synthèse consiste à partir de l'unité tren, puis de la fonctionnaliser avec les bras espaceurs adéquats, avant de fermer la cage via la formation du « chapeau » CTB (voie B figure 22-a, chapitre 1). Pour cela, nous avons choisi de partir de l'acide dipicolinique commercial et bon marché pour en différencier chaque fonction acide carboxylique, afin de coupler d'une part le précurseur aminé de CTB **26**, et d'autre part l'unité tren, avant de fermer la cage en formant l'unité CTB (figure 98).

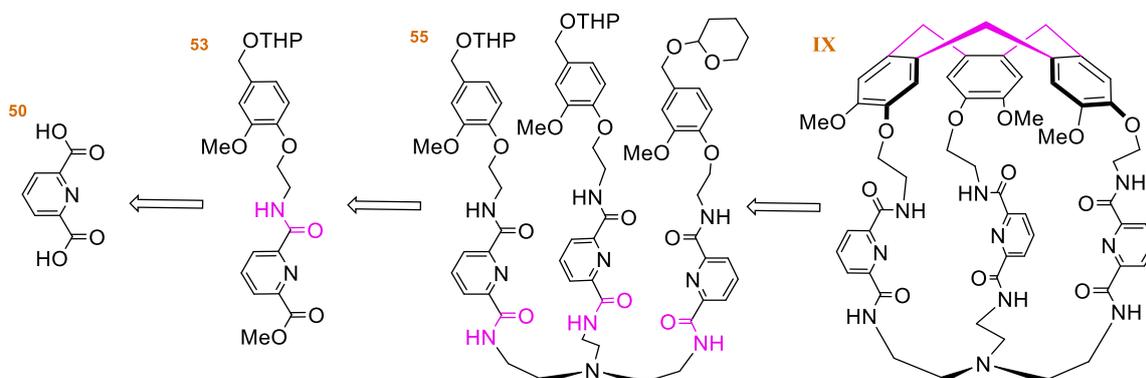


Figure 98 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de l'hémicryptophane IX.

Une méthode simple à mettre en œuvre de disymétrisation de l'acide dipicolique a été décrite par C. Schmuck en 2005.²⁶⁸ Elle consiste à former le diester le méthyle **51** en chauffant à reflux une solution méthanolique d'acide dipconilique en présence d'acide sulfurique (figure 99). Cette étape quantitative et ne nécessitant qu'une filtration pour isoler le produit d'intérêt est suivie d'une monosaponification, à l'aide d'un équivalent d'hydroxyde de potassium. Le sel de potassium du monocarboxylate obtenu est isolé par précipitation dans l'acétate d'éthyle. Enfin, le monoacide **52** est formé par acidification du carboxylate (lavage avec HCl(aq) à pH~1).

L'étape suivante est le couplage peptidique entre l'acide **52** et l'amine **26** dont la synthèse en 4 étapes est représentée figure 43 page 47). Ce couplage est réalisé à l'aide d'un agent phosphoré, le PyBOP, en quantité stoechiométrique en présence de base aminée la N-méthylmorpholine dans le DMF à température ambiante. Des lavages ainsi qu'une purification par colonne de chromatographie ont été mis au point pour obtenir l'intermédiaire **53** avec un bon rendement de 94%. Après saponification de l'ester méthylique restant le second couplage peptidique peut avoir lieu. Les mêmes conditions expérimentales utilisant le PyBOP et la NMM ont été testées, mais nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproductibilité. De plus, le choix du fournisseur de PyBOP commercial semble avoir son importance pour cette étape (celui de Aldrich donnant accès au produit **55** mais pas celui acheté chez Alfa Aesar). La purification par chromatographie du brut réactionnel s'est de plus révélée fastidieuse nécessitant souvent plus d'une colonne, et faisant chuter les rendements.

Nous nous sommes donc orientés vers d'autres conditions réactionnelles mettant en jeu le couple DCC/HOBt comme agent de couplage en présence d'amine secondaire comme base, la DIPEA, pour obtenir le précurseur **55** avec un rendement de 43% pour le triple couplage peptidique. La déprotection des groupements protecteurs THP et la macrocyclisation formant le chapeau CTB sont réalisées en milieu acide de Brønsted (dans l'acide formique), en ayant au préalable solubilisé le réactif dans un minimum de chloroforme. L'hémicryptophane **IX** est obtenu après purification avec un rendement de 22% sur cette dernière étape puis sa structure est confirmée entre autres par RMN du proton (figure 100).

Le rendement global de synthèse est de 2 % sur 10 étapes. Un des prochains objectifs sera d'améliorer les deux dernières étapes de synthèse afin de faciliter l'accès à cette molécule cage aux propriétés intéressantes.

²⁶⁸ C. Schmuck, U. Machon, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 1109.

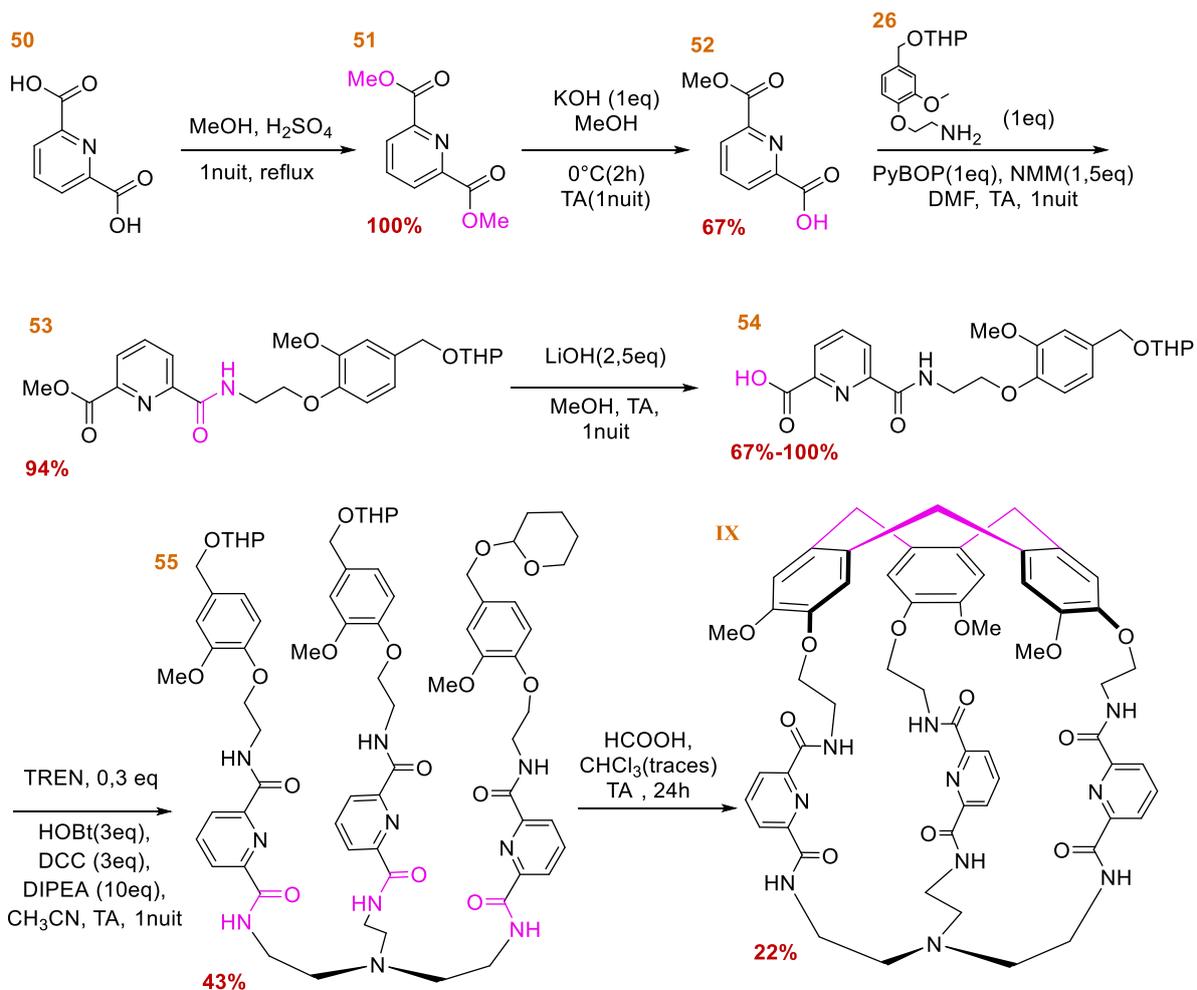


Figure 99 : Synthèse de l'hémicryptophane **IX**.

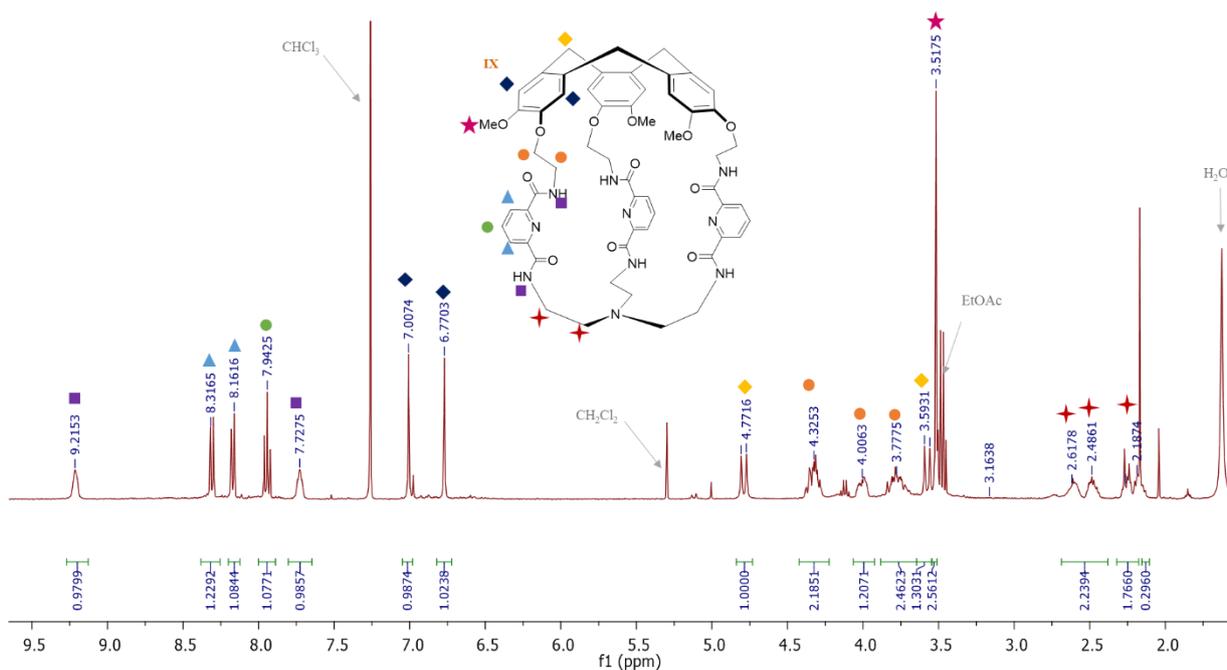


Figure 100 : Spectre RMN dans CDCl_3 du proton de l'hémicryptophane **IX**.

4.4.1.2. Propriétés chiroptiques du ligand IX

Le ligand ainsi synthétisé est chiral du fait de la présence de l'unité CTB, nous nous sommes intéressés à l'ensemble de ces caractérisations chiroptiques. Il a fallu pour cela dédoubler les deux énantiomères du mélange racémique obtenu en fin de synthèse, ce qui a été réalisé à l'échelle de 50 mg de racémique par HPLC chirale. Les pouvoirs rotatoires à différentes longueurs d'ondes de chaque énantiomère ont été mesurés (le 1^{er} élué est lévogyre, le 2nd dextrogyre), ainsi que les spectres d'absorption et de dichroïsme circulaire électronique (figure 101).

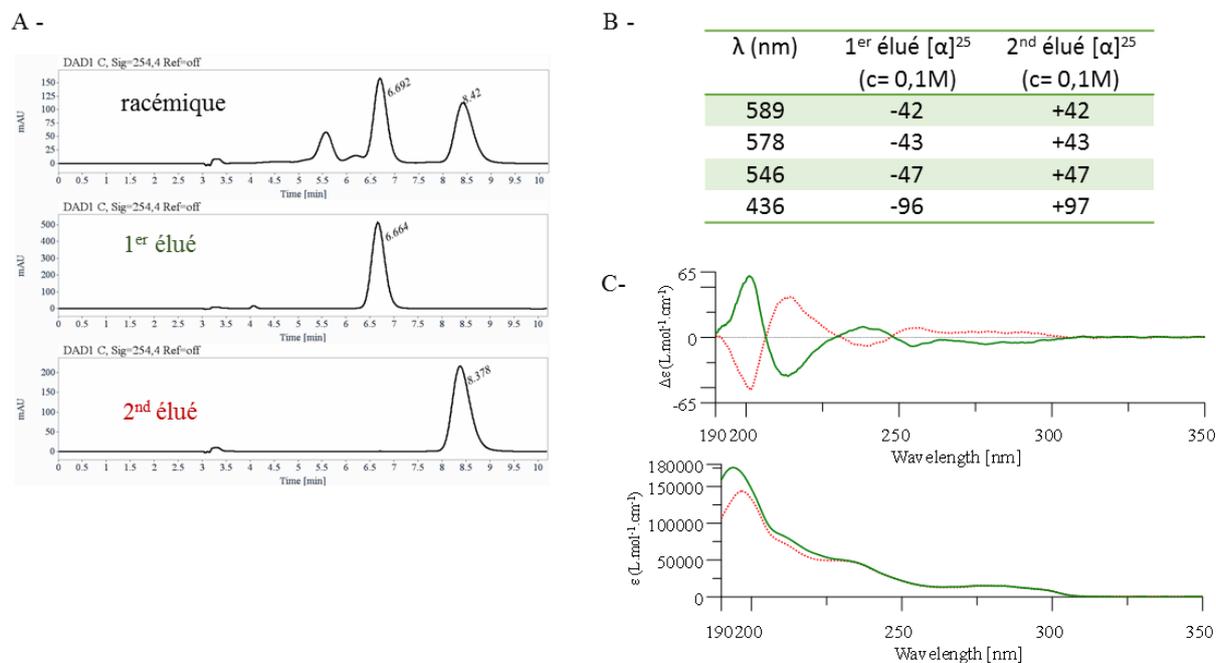


Figure 101 : A- Chromatogrammes (déttection UV) du mélange racémique de l'hémicryptophane IX et de chaque énantiomère après separation sur une colonne Chirapack IE (eluant : EtOH/CHCl₃, 1/1). B- Pouvoirs rotatoires spécifiques mesurés à différentes longueurs d'ondes dans l'acétonitrile. C- Spectres de dichroïsme circulaire électronique et spectre d'absorption des deux énantiomères dans l'acétonitrile. (c= 0,092 M, 1^{er} élué : vert, 2nd élué : rouge)

Nous pouvons à priori déduire de ces mesures la configuration de chaque énantiomère de l'hémicryptophane IX en observant la zone du spectre ECD autour de 240 nm. Le second élué qui présente une succession de bandes dans l'ordre négatif puis positif au niveau de 240-250 nm serait de configuration P, et par conséquent le 1^{er} élué de configuration M.

Cependant, des analyses approfondies en ECD dans différents solvants (figure 102) nous encouragent à reconsidérer cette méthode d'attribution des configurations des hémicryptophanes. En effet, les spectres obtenus dans le chloroforme, le dichlorométhane, ou encore le méthanol diffèrent de celui acquis quand l'acétonitrile, et de fortes modifications apparaissent en particulier dans la zone autour de 240-260nm. L'attribution rigoureuse de ces configurations nécessite donc la combinaison de plusieurs méthodes dont la plus puissante serait une structure obtenue par diffraction aux rayons X.

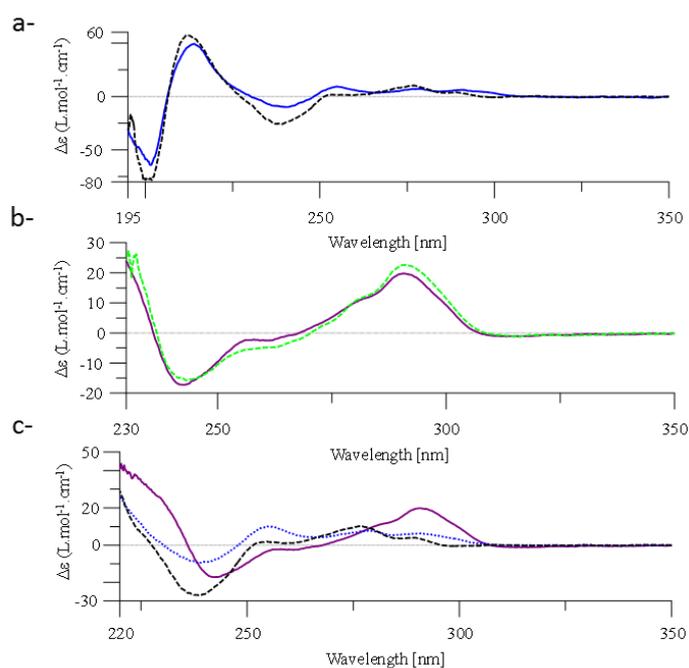


Figure 105 : Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de l'énantiomère de **IX** élué en 2nd dans différents solvants : a- **acétonitrile** & **méthanol** (0.133 mmol.L⁻¹), b- **dichlorométhane** & **chloroforme** (0.310 mmol.L⁻¹), c- **dichlorométhane**, **acétonitrile** & **méthanol** (0.310 mmol.L⁻¹)

4.4.1.3. Tentative d'application du ligand **IX** en reconnaissance

Afin de valoriser la synthèse du ligand seul, des mesures de constante d'affinité entre l'hémicryptophane **IX** et un substrat de type octylhexose ont été réalisées. Les hémicryptophanes sont en effet reconnus pour complexer les sucres et d'autres biomolécules dans des solvants organiques (voir chapitre 1- partie 1.4.3.2.). L'efficacité de ces phénomènes de reconnaissance est classiquement suivie via des expériences de titration en RMN du proton. Pour cela, une solution de concentration 1mM en molécule hôte – l'hémicryptophane **IX** – est préparée dans le chloroforme deutéré. Et on réalise des ajouts successifs d'une 2nde solution dix fois plus concentrée en invité– le β-octylglucopyrannose dans notre cas. Entre chaque ajout, un spectre proton est recueilli sur un spectromètre à 500MHz. En cas de complexation, on visualise clairement un décalage des pics associés aux protons de l'hémicryptophane lorsque la quantité de sucre augmente. La modélisation de la courbe représentant la variation de déplacement chimique en fonction du nombre d'équivalents de sucre ajoutés permet d'évaluer la constante de formation du complexe supramoléculaire hémicryptophane-sucre.

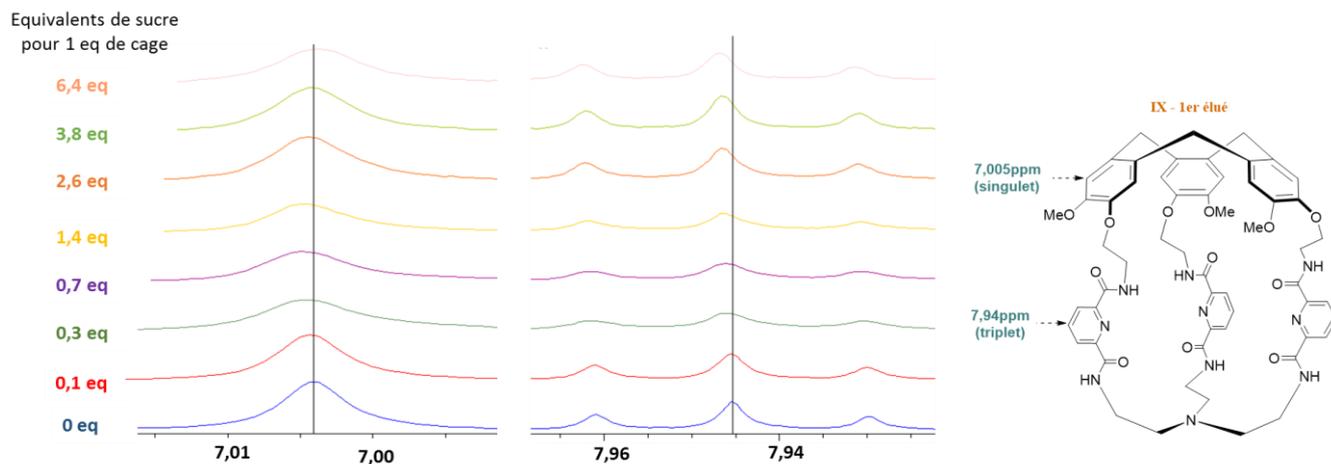


Figure 103 : Courbes de titration RMN de **IX** par le β-octylglucopyrannose non exploitables pour une analyse quantitative.

Les courbes de titration mettant en jeu l'hémicryptophane **IX** et le β -octylglucopyranose (figure 103) ne montrent pas de variation de déplacement chimique significatif ($\Delta\delta \sim 10^{-4}$ ppm), et l'erreur expérimentale sur de telles mesures ne permet pas d'évaluer la constante d'affinité du complexe. Ces observations suggèrent même une très faible constante d'affinité de l'hémicryptophane **IX** pour ce sucre.

Cette hypothèse a par la suite été complétée via la mesure de coefficients de diffusion, par expérience de DOSY ²⁶⁹ (dans le chloroforme deutéré, à température ambiante), de 3 solutions : de sucre seul, d'hémicryptophane seul, et d'un mélange hémicryptophane-sucre 1 : 1, toutes à 1 mM en chaque constituant. On considère pour cela que le coefficient de diffusion observé pour un mélange d'hôte et d'invité D_{obs} est une moyenne pondérée des deux coefficients du complexe formé $D_{complexe}$ et de l'invité libre D_{sucre} .

$$D_{obs} = \rho \cdot D_{complexe} + (1 - \rho) \cdot D_{sucre} \quad (10)$$

Avec ρ la fraction de sucre encapsulé.

$$\text{Soit : } \rho = \frac{D_{obs} - D_{sucre}}{D_{complexe} - D_{sucre}} = \frac{D_{obs} - D_{sucre}}{D_{cage} - D_{sucre}} \quad (11)$$

en faisant l'approximation $D_{complexe} \sim D_{cage}$

La fraction ρ de sucre encapsulé dans l'hémicryptophane **IX** peut aussi s'exprimer en fonction des concentrations de chaque espèce :

$$\rho = \frac{[complexe]}{[sucre] + [complexe]} \quad (12)$$

et l'expression de la constante d'affinité étant :

$$K_a = \frac{[complexe]}{[sucre] \cdot [cage]} \quad (13)$$

On obtient à partir des équations (12) et (13) :

$$K_a = \frac{\rho}{(1 - \rho) \cdot [cage]} \quad (14)$$

Les mesures effectuées donnent les valeurs suivantes des coefficients de diffusion : $D_{obs} = 1,29 \cdot 10^{-9}$ m²/s ; $D_{sucre} = 1,40 \cdot 10^{-9}$ m²/s et $D_{cage} = 9,34 \cdot 10^{-10}$ m²/s ce qui correspond à une **constante d'affinité $K_a = 308 \text{ M}^{-1}$** entre l'hémicryptophane **IX** et le β -octylglucopyranose. Cette valeur est faible comparée aux constantes d'affinité déjà obtenues entre certains hémicryptophanes et des sucres qui atteignent plutôt des valeurs proches de 1000, mais n'explique néanmoins pas l'absence de variation de déplacement chimique lors des expériences de titration. Cette cage ne paraît a priori pas adaptée à la complexation d'hexoses mais des mesures avec d'autres sucres (mannose, fucose...) sont à réaliser pour réellement confirmer ces résultats.

Nous disposons tout de même de chaque énantiomère d'un ligand chiral conçu pour complexer des lanthanides en vue d'applications en spectroscopie de fluorescence, nous nous sommes consacrés en parallèle à l'encapsulation de métaux de transition f au sein de cette molécule cage.

²⁶⁹ R. Wimmer, F. L. Achmann, K. L. Larsen, S. B. Petersen, *Carbohydrate Research*, **2002**, 337, 841–849.

4.4.2. Complexation et propriétés des complexes IX@Ln(III)

4.4.2.1. Mise en place d'un protocole de complexation avec un métal diamagnétique, le lanthane(III).

Nous avons choisi dans un premier temps de mettre au point le protocole de complexation des métaux de transition f au sein de l'hémicryptophane **IX** en utilisant le lanthane(III). Cet ion ne possède pas de propriétés spectroscopiques intéressantes car sa sous couche f est vide, mais il est diamagnétique ce qui permet de suivre plus aisément la réaction de complexation par spectroscopie RMN du proton. (Les éléments trop paramagnétiques ayant tendance à élargir et éclater les signaux en RMN rendant leur interprétation plus compliquée).

Le premier test effectué mettait en présence 1 équivalent de ligand **IX** pour 1 équivalent de perchlorate de lanthane hexahydraté ainsi qu'un équivalent de base (carbonate de potassium) dans le méthanol. Nous nous sommes heurté à des problèmes de solubilité dans ce solvant, et si l'ajout de dichlorométhane a permis d'obtenir une solution homogène, la réaction de complexation n'a pas eu lieu que ce soit à température ambiante en 24 h, ou en chauffant une nuit supplémentaire à 50°C.

Nous avons donc privilégié un solvant qui permet de solubiliser à la fois le ligand et le sel de lanthane(III) à savoir l'acétonitrile. En chauffant un mélange 1 : 1 hémicryptophane/métal à 55°C, on observe au bout de 3h la formation de complexe que l'on peut suivre par RMN-1H via le décalage de déplacement chimique au niveau des protons aromatiques (figure 104). Il a cependant fallu ajouter un léger excès de Ln(III) et chauffer une nuit supplémentaire pour arriver à complétion de la réaction de complexation.

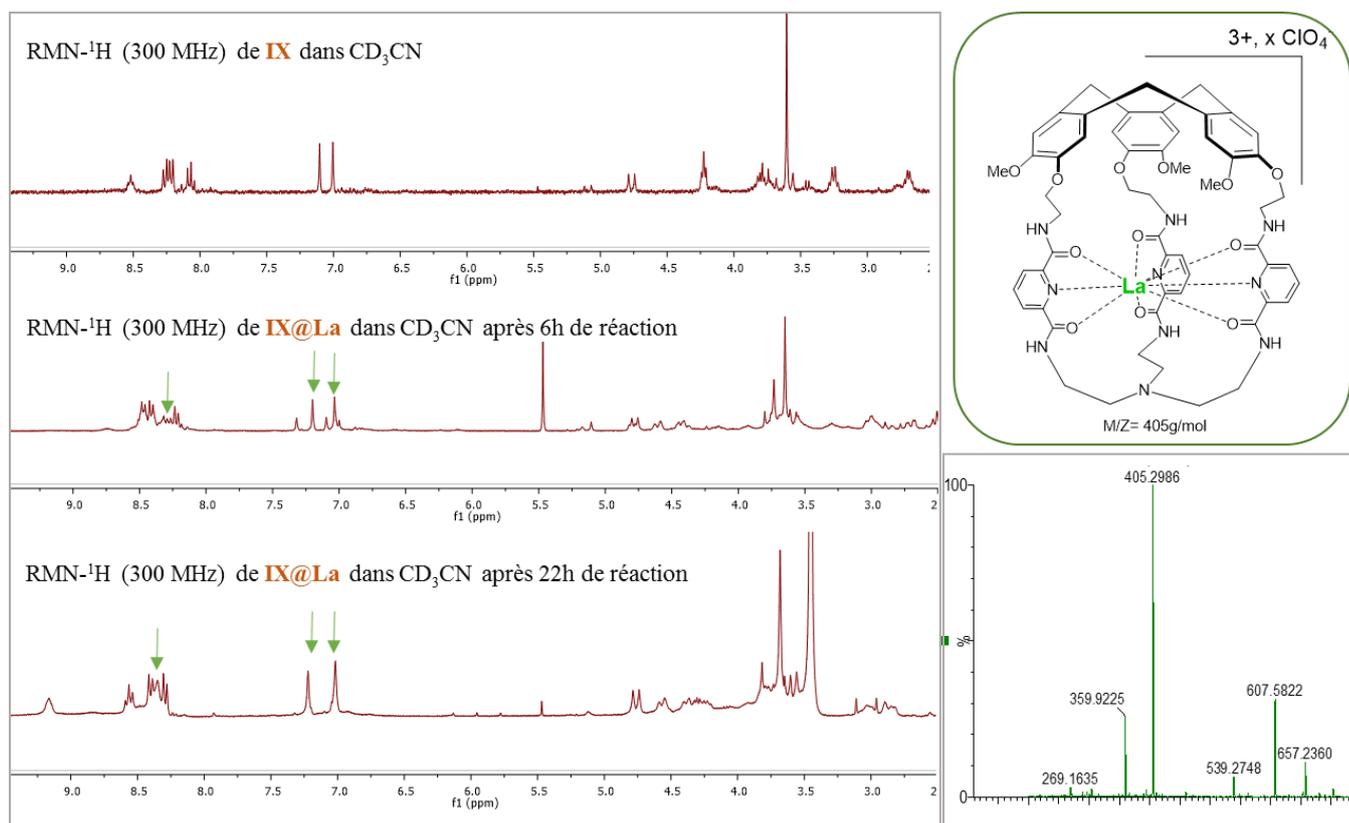


Figure 104 : Suivi de la réaction de complexation de **IX** avec le Ln(III) par spectroscopie RMN (gauche) et spectrométrie de masse (droite).

4.4.2.2. Complexation à des lanthanides fluorescents : l'euprium (III) et le terbium (III)

La suite logique a consisté à utiliser ces conditions réactionnelles (acétonitrile, sel de perchlorate, 55°C) pour la complexation de lanthanides luminescents. Nous avons choisi l'Euprium et le Terbium. Dans les deux cas, la réaction de complexation a été suivie par spectrométrie de masse (figure 105).

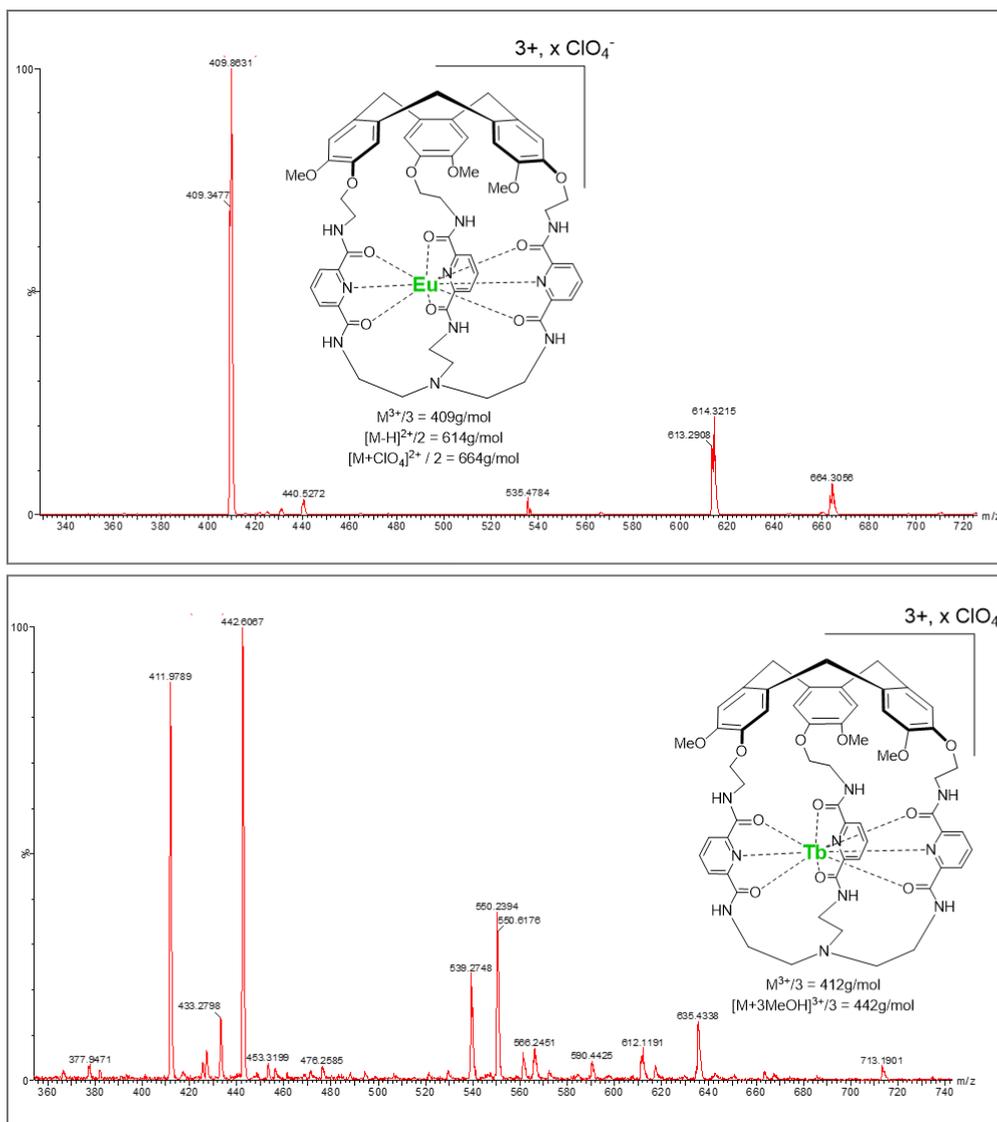


Figure 105 : Spectres de masse des complexes d'euprium et de terbium de l'hémicryptophane **IX**.

Chacun des deux complexes a cristallisé par évaporation lente du solvant, mais les cristaux, de trop petite taille, du complexe d'Eu(III) n'étaient pas adaptés à une analyse par diffraction aux rayons X. Ils ont cependant permis d'avoir un spectre RMN très bien défini du complexe (figure 106), mettant en évidence les décalages dus au paramagnétisme de ce métal, qui touchent plus fortement les protons aromatiques des pyridines (plus proches).

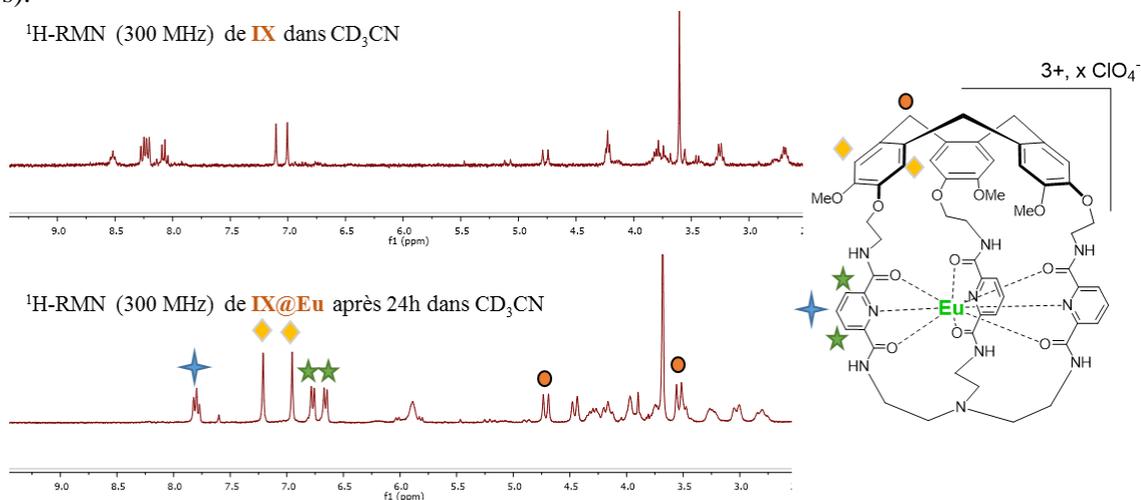


Figure 106 : Comparaison entre le RMN du proton du ligand **IX** seul et de son complexe l'Europium.

Le complexe de Terbium(III) cristallise plus facilement et donne des cristaux d'environ 2-3 mm sous forme d'aiguilles fines. Mais plusieurs analyses menées par des spécialistes de cristallographie à Marseille et à Toulouse ne montrent pas de diffraction sous rayonnement X, et n'ont donc pas permis d'aboutir à une structure tridimensionnelle. Nous envisageons alors d'utiliser l'influence des propriétés magnétiques des lanthanides encapsulés pour obtenir cette structure par RMN en collaboration avec l'équipe de L. Di Bari à Pise (Italie).

4.4.2.3. Premières analyses spectroscopiques

Avant toute analyse quantitative, nous avons pu observer à l'œil nu la fluorescence de chaque complexe sous lampe UV. Le complexe d'Europium émet une très faible lumière rouge et celui de Terbium fluoresce plus efficacement dans le vert (figure 107).

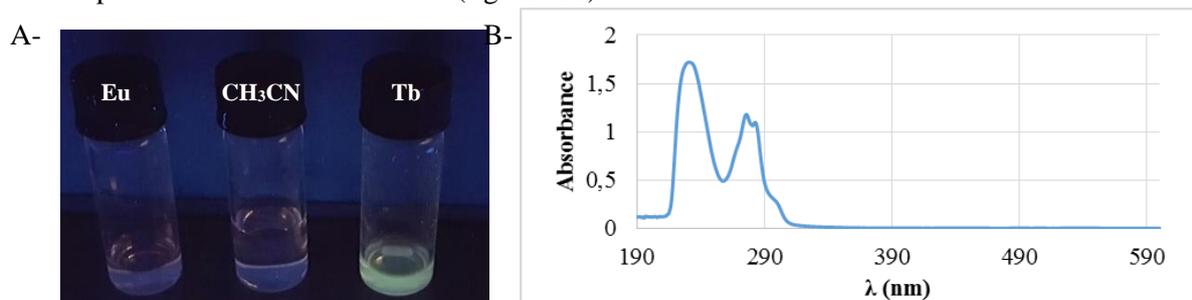


Figure 107 : A- Photographie de solutions de complexe **IX@Eu(III)** (gauche), et **IX@Tb(III)** avec une solution témoin ne contenant que du solvant au centre, irradiées par un rayonnement ultraviolet à 265nm. B- Spectre d'absorption UV-visible d'une solution de complexe de terbium dans l'acétonitrile (C~0,08 mM)

Afin de comprendre ce comportement du terbium nous avons pu réaliser de manière qualitative un spectre d'absorption UV-visible de ce complexe et il se trouve qu'à la longueur d'onde émise par la lampe UV, nous nous situons dans un creux en terme d'absorption de ce complexe. L'idéal serait de compléter ces données par des spectres d'émission et excitation de fluorescence afin de mesurer les paramètres de chacun des complexes, et pouvoir davantage interpréter les observations expérimentales. Nous disposerons prochainement d'un fluorimètre au sein de l'équipe pour compléter ces mesures.

Une récente collaboration avec L'équipe du Pr. Di Bari en Italie a permis de tester les propriétés des complexes en CPL. Avec cette technique c'est le complexe de terbium qui ne fournit presque pas de signal, alors que le complexe d'Europium présente un spectre et des paramètres de CPL intéressants (figure 108).

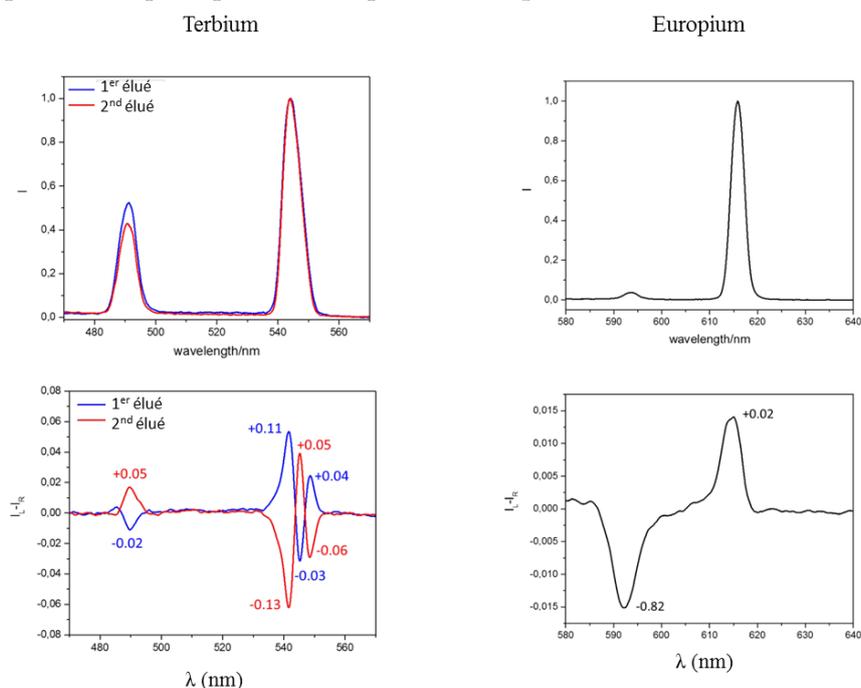
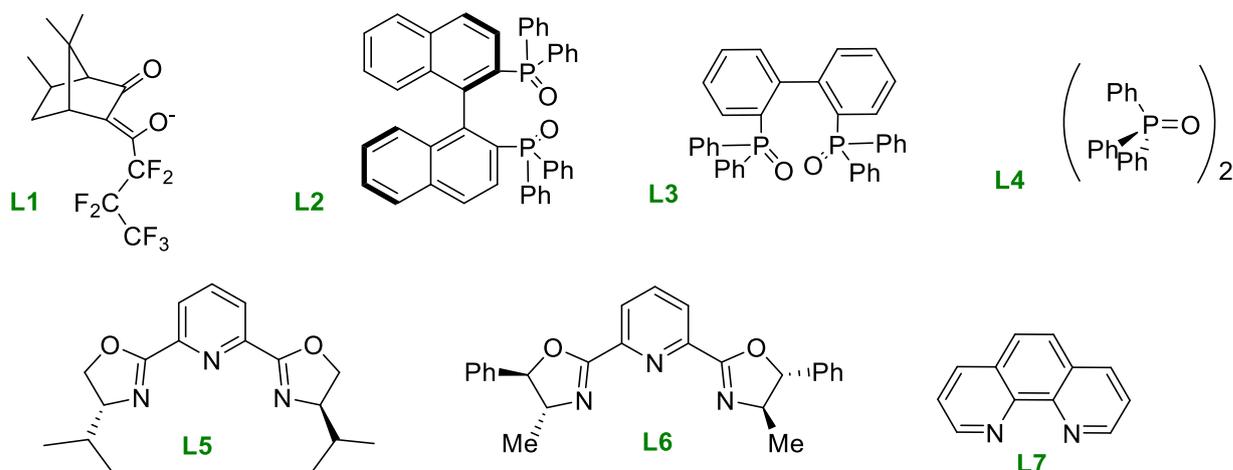


Figure 108 : Spectres normalisés de fluorescence totale (haut) et de CPL (bas) des complexes **IX@Tb** et **IX@Eu** (solvant = éthanol, $\lambda_{exc} = 365nm$)

Les bandes spectrales observées sont fines dans les deux cas et ne montre pas de dégénérescence ce qui est en accord avec la présence d'une seule espèce active en CPL.

Dans le cas du Tb(III) on observe 2 bandes très émissives vers 490 et 540 nm, toutes deux visibles en CPL. Le complexe d'Eu(III) présente principalement une bande d'émission vers 615nm, et une très légère émission de fluorescence globale vers 590 nm. C'est cependant cette dernière bande qui est la plus active en CPL avec un facteur de dissymétrie important.

En effet, on obtient des valeurs (en norme) de facteurs g_{lum} optimaux de 0,13 à 541 nm ($^5D_4 \rightarrow ^7F_5$) pour le complexe de Terbium et de 0,82 à 592 nm ($^5D_0 \rightarrow ^7F_1$) pour celui d'Europium, ce qui correspond à la gamme correspondant aux fluorophores chiraux à base de lanthanides (0,1-1). Le complexe d'Europium présente même une des plus grandes valeurs de g_{lum} répertoriées (tableau 17), et mérite d'être davantage analysé pour ses propriétés spectroscopiques.



	Complexe	g_{lum} (595 nm)
1	Eu(L1) ₄	1,38
2	Eu(L1) ₃ (R-L2)	0,44
3	Eu(L1) ₃ (S-L2)	0,34
4	Eu(L1) ₃ (L3)	0,24
5	Eu(L1) ₃ (L4)	0,47
6	Eu(L1) ₃ (R-L5)	-1,0
7	Eu(L1) ₃ (S-L5)	-0,8
8	Eu(L1) ₃ (S,S-L6)	-1,0
9	Eu(L1) ₃ (L7)	-0,46

Tableau 17 : Valeurs de facteur de dissymétrie à 595 nm de quelques complexes d'europium actifs en CPL, (en gras les valeurs plus élevées que notre complexe **IX@europium**).²⁷⁰

²⁷⁰ F. Zinna, L. Di Bari, *Chirality*, **2015**, 27, 1-13.

4.4.3. Perspectives

Ce projet a abouti au design et à la synthèse d'un nouvel hémicryptophane fonctionnalisé de façon à constituer un bon ligand dans le cadre de la complexation de lanthanides. Les propriétés de reconnaissance de la molécule cage seule ont été testées en milieu organique sur un unique hexose. La non-concordance entre les observations lors des titrations, et mesures par expérience de DOSY nous invitent à réitérer les mesures et les diversifier, afin de vraiment pouvoir discuter de ces capacités ou non de reconnaissance. N'ayant pas assez de matière nous nous sommes focalisés sur l'obtention de complexes fluorescents à base de terbium et d'euporium dont les propriétés spectroscopiques sont à développer. Le complexe de terbium fluoresce de manière intense dans le vert, et le complexe d'euporium présente des paramètres prometteurs dans le cadre de la CPL.

Tous ces « débuts de résultats » sont à approfondir et pour ce faire, un premier objectif serait de faciliter et améliorer la voie de synthèse permettant l'accès au ligand **IX**. Une fois en possession de quantité suffisante de ligands les tests d'affinités du ligand **IX** avec différents invités devront être poursuivis.

Dans le cadre de la spectroscopie de fluorescence, il s'agira de compléter les résultats récemment obtenus par une caractérisation complète des complexes (spectres d'émission et d'excitation de fluorescence, mesure de coefficients d'absorption molaire, de rendement quantique de fluorescence, etc). Nous envisageons également, en collaboration avec le Pr. Di Bari (Italie) de synthétiser des complexes avec d'autres lanthanides, ce qui est d'une part nécessaire pour obtenir une structure par RMN de telles entités, et aussi pour explorer leurs propriétés spectroscopiques.

De plus, il serait très intéressant d'exploiter les connaissances déjà publiées sur la fonctionnalisation des ligands antenne de type dipicolinate, pour envisager l'élaboration de différentes cages de type hémicryptophane comportant cette unité et en comparer leur propriétés spectroscopiques afin de concevoir les meilleures sondes possibles.

L'objectif ultime serait la combinaison des propriétés de reconnaissance et de fluorescence, accompagnée du passage à une utilisation des sondes obtenues en milieu aqueux, puis biologique.

Conclusion générale et **perspectives**

Le domaine de l'imagerie médicale se développe depuis plusieurs décennies avec la diversification des analyses accessibles (RX, TEP, IRM ultrasons, fluorescence...), et grâce à la création ainsi qu'aux progrès des techniques et appareillages mis en jeu. Les chimistes contribuent à l'amélioration de toutes ces méthodes d'imagerie via l'élaboration de sondes de plus en plus sophistiquées, spécifiques, et compatibles avec notre système biologique. Une des façons de satisfaire les critères de biocompatibilité est de mimer les systèmes vivants. La chimie supramoléculaire, qui permet la construction d'édifices complexes et dynamiques, en utilisant des interactions non covalentes, tend à s'approcher des systèmes biologiques.

L'objectif de cette thèse était de mettre à profit les connaissances acquises sur la synthèse de molécules cages chirales – les hémicryptophanes et les cryptophanes – ainsi que leurs propriétés en matière de complexation de métaux de transition d, et d'encapsulation d'entités chimiques, biologiques, afin d'étendre leurs applications à la complexation de métaux de transitions f, grandement utilisées dans le cadre de l'imagerie médicale. Nous nous sommes ainsi focalisés sur la complexation de lanthanides au sein d'hémicryptophanes, avec en particulier l'Europium et le Terbium pour leurs caractéristiques en fluorescence, et le Gadolinium pour son utilisation au sein d'agents de contrastes IRM. En parallèle, nous avons développé une nouvelle sonde à base de cryptophane adaptée à une utilisation en RMN et IRM du xénon 129.

En RMN du xénon, beaucoup de travaux de recherches sur les cryptophanes ont déjà été effectués, mais plusieurs points restent à améliorer dont l'accès à des sondes biocompatibles, et la simplification du signal recueilli pour une meilleure interprétation des spectres obtenus, (ce qui passe par l'utilisation du minimum de stéréoisomères d'une sonde donnée afin de démultiplier les signaux).

Les connaissances déjà publiées sur l'affinité du xénon pour les cryptophanes nous ont permis de choisir au mieux la structure de la molécule cage à synthétiser, et de davantage nous focaliser sur la fonction biologique de la future sonde. Nous avons ainsi imaginé et synthétisé une sonde composée d'un cryptophane fonctionnalisé de manière à y greffer trois carbohydrates, dont les intérêts sont multiples :

(1) les nombreuses interactions non covalentes pouvant avoir lieu entre les fonctions OH des sucres et l'eau (liaisons hydrogènes, interactions dipolaires) rendent la sonde hydrosoluble, et contribuent à accroître sa biocompatibilité.

(2) les sucres sont les substrats spécifiques de protéines particulières - les lectines - ce qui peut être mis à profit dans le cadre de la détection de certains pathogènes. Nous avons ciblé, en collaboration avec l'équipe du Pr. S. Vidal à Lyon, la bactérie *Pseudomonas Aeruginosa* IL dont les lectines sont spécifiques du galactose.

Pour y parvenir nous avons dans un premier temps repris la synthèse d'une plateforme cryptophane comprenant 3 unités propargyles (41), et testé deux voies d'accès à chaque énantiomère de cette molécule cage chirale. Une synthèse énantiosélective à partir de CTB-bromé énantiopur n'étant pas suffisamment efficace, nous avons choisi de profiter des connaissances de l'équipe (en particulier N. Vanthyne et M. Jean) en matière de HPLC sur support chiral, pour obtenir des cryptophanes énantiopurs. Puis, l'intégration de 3 carbohydrates a été mise au point à Lyon fournissant deux sondes potentielles : une sonde témoin portant 3 glucoses, et une sonde spécifique de la lectine PA-IL portant 3 galactoses. La suite logique sera de vérifier les propriétés de ces sondes en RMN du xénon et de les caractériser entièrement (déplacement chimiques caractéristiques en présence ou non de protéine, influence de la molécule cage sur les paramètres de relaxation du xénon, affinité du xénon pour ce cryptophane, et sa dynamique d'échange avec le milieu extérieur). Toutes ces mesures qui concrétiseront le projet, sont en cours de réalisation en collaboration avec P. Berthault au CEA de Saclay.

L'IRM du proton, qui est plus connue et davantage utilisée dans le milieu médical a aussi suscité notre intérêt. Dans ce domaine d'imagerie l'objectif principal est de pallier au manque de sensibilité inhérent à l'IRM, essentiellement via la mise au point d'agents de contraste. Nous nous sommes focalisés sur les agents de contraste dits T_1 à base de Gadolinium(III). Les propriétés magnétiques de ce métal, accélèrent la relaxation des protons des molécules d'eau environnantes générant localement un hypersignal sur l'image IRM. Beaucoup de travaux scientifiques visant à optimiser de tels agents paramagnétiques sont en cours

actuellement, et ce domaine de recherche est très compétitif. De nombreux paramètres peuvent mener à l'amélioration des propriétés d'un agent de contraste T_1 , et nous avons fait le choix de nous focaliser principalement sur la maximisation du nombre de molécules d'eau appartenant à la première sphère de coordination du métal, ainsi que le temps de corrélation rotationnel des complexes élaborés. Nous avons ainsi mis au point, après plusieurs échecs, la synthèse d'un nouveau ligand hémicryptophane (**VIII**) fonctionnalisé de façon à pouvoir complexer le Gd(III), tout en conservant au moins 2 places libres pour relaxer les molécules d'eau. Il s'agit du premier complexe hémicryptophane-lanthanide synthétisé à ce jour. Les premières mesures de paramètres de relaxation longitudinale (T_1 , r_1) sont très encourageantes : nous atteignons des relaxivités de l'ordre de $40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans un mélange DMSO/eau (70/30) à 100MHz. Cette valeur dépasse celles mesurées dans l'eau pure des complexes de Gd(III) commerciaux (3 à $6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), et de ceux décrits dans la littérature (11 - $13 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les complexes de K.N. Raymond). Pour rationaliser ces résultats, des mesures de relaxométrie ont été réalisées au CRM² à Nancy, et nécessitent encore un travail de modélisation avant de pouvoir réellement conclure. Les perspectives sur ce projet sont nombreuses : il s'agira dans un premier de réaliser des mesures de relaxivités de complexes de Gadolinium reconnus en IRM dans les mêmes conditions de mesures que celles utilisées pour le complexe à base d'hémicryptophane. Nous soupçonnons que le solvant, le DMSO, soit en partie responsable des différences observées au niveau des valeurs de relaxivités. Si, après ce test, les hémicryptophane se révèlent être des ligands de choix dans ce domaine d'imagerie, le principal travail consistera à rendre le complexe synthétisé hydrosoluble. Cependant sa synthèse étant fastidieuse, il faudra peut-être la repenser voir changer de cible synthétique tout en conservant la structure de cage hémicryptophane. Nous pourrions alors nous inspirer des travaux de la littérature et par exemple envisager d'introduire des motifs HOPO de K.N. Raymond au sein des 3 bras d'un hémicryptophane.

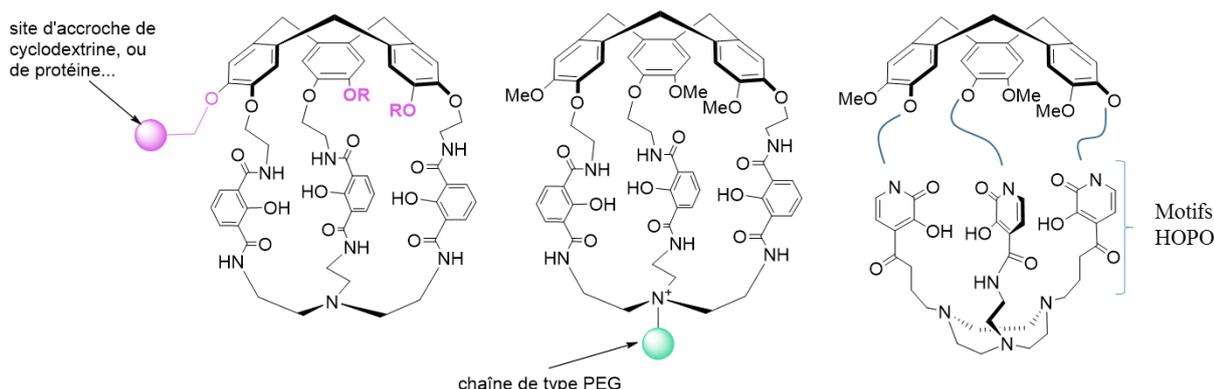


Figure 117 : Différentes stratégies d'hydrosolubilisation d'hémicryptophanes capables de complexer le Gd(III)

Enfin l'objectif ultime serait d'être en mesure de complexer non seulement le Gd(III) mais aussi une autre entité chimique, et idéalement biologique, de manière spécifique pour voir les effets d'un phénomène de reconnaissance sur le signal IRM (figure 27 page 30, chapitre 1).

Enfin les lanthanides ne sont pas uniquement connus pour leurs propriétés magnétiques mais aussi pour leurs propriétés spectroscopiques. Comparés aux autres systèmes fluorescents (fluorophores organiques matériaux, quantum dots), les complexes de lanthanides fluorescents se distinguent par leur long temps de vie de fluorescence, assimilées parfois à de la phosphorescence, et des déplacements de Stokes importants, tout en ayant des rendements de fluorescence plus que satisfaisants. L'amélioration des propriétés spectroscopiques de telles entités passe par la conception et l'étude de la structure des ligands, indispensables car jouant le rôle d'antenne. Nous souhaitons, dans ce dernier projet, tester l'efficacité des hémicryptophanes dans ce contexte. De plus, les propriétés chiroptiques des hémicryptophanes énantiopurs peuvent être mises à profit dans le cadre d'une technique de fluorescence particulière : la CPL.

Nous avons donc synthétisé une nouvelle molécule cage adaptée à la complexation de lanthanides, mais aussi à des applications en fluorescence. Pour ce faire, un chromophore de type « pyridine – orthodiamide » a été inséré dans chaque bras d'un hémicryptophane (**IX**). Et deux lanthanides fluorescents : l'euprium et

le terbium y ont été complexés. Les complexes obtenus ont été caractérisés, et des mesures en CPL on pu être réalisées. Nous obtenons un complexe de terbium(III) aux bandes intenses en CPL mais présentant de modestes facteurs de dissymétrie g_{lum} , et un complexe d'europium dont la bande la moins intense en CPL est associée à un facteur de dissymétrie $g_{lum} = 0,82$, c'est-à-dire un des plus importants observés avec des objets chiraux fluorescents.

Ces premiers résultats nous invitent à poursuivre et nous tentons actuellement, en collaboration avec le professeur Di Bari, de résoudre la structure des complexes par RMN (à défaut d'avoir des cristaux diffractant suffisamment sous RX) afin de rationaliser cet effet sur la lumière circulairement polarisée. Nous espérons aussi caractériser entièrement chaque complexe en termes de propriétés spectroscopiques. De plus nous envisageons de poursuivre les travaux en synthétisant des ligands antennes de plus en plus élaborés et conjugués, et donc à priori, des fluorophores de plus en plus sophistiqués dans le but d'optimiser les propriétés en fluorescence classique. Nous pensons également à la possibilité d'ajouter des centres de chiralité sur le ligand afin de voir les effets en CPL (figure 118).

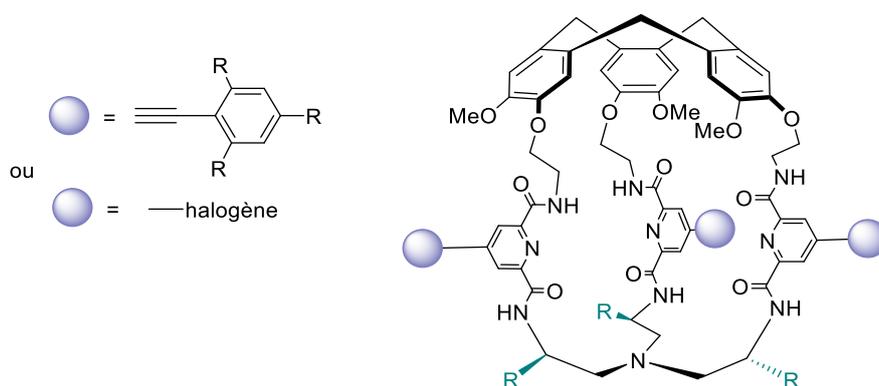


Figure 118 : vision schématique des modifications à apporter à la structure du ligand **IX** pour en améliorer les propriétés spectroscopiques.

Une nouvelle fois, l'objectif final sera de combiner les propriétés de fluorescence des meilleurs candidats aux capacités de reconnaissance des hémicryptophanes, afin de mettre au point des nouvelles sondes spécifiques en imagerie de fluorescence.

Ces trois projets ouvrent la voie vers un nouveau domaine d'application des molécules cages. Si l'utilisation des cryptophanes en RMN, puis en imagerie du xénon, se développe depuis environ 15 ans, l'utilisation des hémicryptophanes dans le cadre de l'imagerie médicale est une idée plus novatrice. Les applications concrètes de complexes hémicryptophane@lanthanide en IRM et imagerie de fluorescence demandent de mêler à la fois, la chimie de synthèse et des méthodes de caractérisations spécifiques, tout en gardant en mémoire le contexte biologique dans lequel les sondes auront un réel intérêt. Le travail de recherche effectué pendant cette thèse a mené à la synthèse de 2 nouveaux hémicryptophanes comportant au sein même des bras espaceurs, plusieurs fonctions chimiques (phénol / amides – pyridine / amides) ayant permis la complexation de divers lanthanides. Les prémices d'analyses et caractérisations de ces espèces en spectroscopie de fluorescence et en IRM ont été réalisées et sont très prometteuses. Il s'agira essentiellement pour la suite de compléter ces analyses afin de regrouper les données nécessaires à la comparaison de nos complexes aux agents de contraste T_1 et aux fluorophores déjà décrits dans la littérature, pour enfin nous tourner vers des applications biologiques spécifiques.

Chapitre 5 : Partie expérimentale

5.1. Synthesis and characterizations

5.1.1. General procedures

Anhydrous solvents : DMF and DMSO were purchased from commercial suppliers. Dichloromethane and THF were dried thanks to a solvent purification system (MB-SPS-800) under an argon flush. Other anhydrous solvents were dried over molecular sieves.

Column chromatography were performed with silica Macherey-Nagel Si 60 (40-63 μm) and **TLC** were performed on silica layer Alugram Xtra SiL G/UV, SiO₂ 60 – 0,2mm from Macherey-Nagel.

NMR spectra (¹H, ¹³C) were recorded on a Brüker Avance III (300MHz and/or 400MHz). Data are listed in parts per million and are reported relative to the tetramethylsilane. Residual solvent peaks were used as internal standard.

Near infrared/visible absorption measurements were recorded on a Brüker ALPHA spectrometer, with a Platinum-ATR module.

Fusion temperature were measured thanks to a Büchi Melting Point B-545.

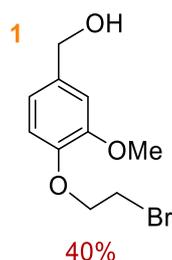
Classical analyses by **mass spectroscopy** were recorded on a Waters spectrometer with a 3100 waters mass-detector and a 2998 waters UV-detector.

High resolution mass spectra were recorded by the Mass Spectrometry specialists from the Spectropôle (Aix Marseille Université (saint jerôme) 13013 Marseille).

All chiroptic characterizations and chiral separations were conducted by Marion Jean and Nicolas Vanthuynne who are responsible of the Chiral HPLC platform from Aix Marseille Université (saint jerôme) 13013 Marseille :

- Analytical and preparative **chiral HPLC separations** were followed with an UV detector at 254 nm and circular dichroism at 254 nm.
- **Optical rotations** and inversion barriers were measured on a 241 Perkin-Elmer polarimeter with a sodium lamp (589 nm), a mercury lamp (578, 546, 436 and 365 nm) and a double-jacketed 10 cm cell at 25°C.
- **ECD and UV spectra** were measured on a JASCO J-815 spectrometer equipped with a JASCO Peltier cell holder PTC-423 to maintain the temperature at $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$. A CD quartz cell of 1 mm of optical pathlength was used. The CD spectrometer was purged with nitrogen before recording each spectrum, which was baseline subtracted. The baseline was always measured for the same solvent and in the same cell as the samples. The spectra are presented without smoothing and further data processing.

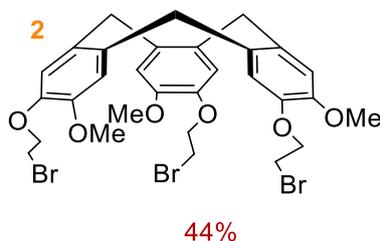
5.1.2. Synthesis of hemicryptophane I



45 g (0,293 mol – 1eq) of vanilic alcohol and 45 g (0,326 mol – 1,1 eq) of potassium carbonate are weighted in a 2 L round bottom flask and then solubilized in 500 mL of absolute ethanol. The mixture is stirred, and 100 mL (1,191 mol – 3,9 eq) of 1,2-dibromoethane are added before heating to reflux during 6h. The ethanol is removed by evaporation and the crude is mixed with 600 mL of a 1/1 solution of EtOAc/H₂O during 1 h. A dimeric specie resulting from disubstitution on dibromoethane precipitates and is then removed by filtration. The two phases are separated and the aqueous one is extracted twice with 100 mL of EtOAc. The combined organic phases are then washed 3 times with a 10% NaOH solution, dried over Na₂SO₄. After evaporation, the brown solide is solubilized in 300 mL of diisopropyl ether. The solution demixed and a few mL of a dense and brown oil are removed. Then the solution is concentrated by evaporation of about 1/3rd of the solvent, and the product crystallizes slowly at room temperature first, then at 4°C. 30,6 g (40%) of a white powder are isolated.

RMN-¹H (CDCl₃-300 MHz) : 6,96 (s, 1H) ; 6,89 (m, 2H) ; 4,63 (s, 2H) ; 4,33 (t, *J* = 6,65 Hz, 2H) ; 3,88 (s, 3H) ; 3,66 (t, *J* = 6,65 Hz, 2H)

Other characterizations are reported in reference ²⁷¹



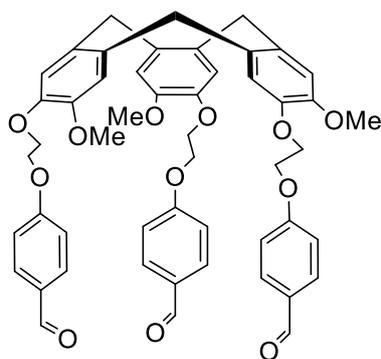
In a dried three necked flask are inserted 10 g (13,7 mol – 1 eq) of **1** and 800 mg (1,63 mmol – 0,11 eq) of scandium triflate. Both are solubilized under argon atmosphere in 200 mL of anhydrous acetonitrile, and the mixture is refluxed 48h. After evaporation of the solvent the brown residue is solubilized in 150 mL of DCM, washed with water and the organic phase is dried over MgSO₄. After evaporation the crude product is purified by chromatography (eluant : DCM) and recrystallized in a DCM / Et₂O mixture. 4,09 g (44%) of a white powder are isolated.

RMN-¹H (CDCl₃-300 MHz) : 6,94 (s, 3H) ; 6,86 (s, 3H) ; 4,76 (d, *J* = 13,8 Hz, 3H) ; 4,31 (t, *J* = 6,55 Hz, 6H) ; 3,87 (s, 9H) ; 3,60 (m, *J* = 6,55 Hz, 6H- *J'* = 13,8 Hz, 3H).

Other characterizations are reported in reference ²⁷²

²⁷¹ P. Dimitrov-Raytchev, O. Perraud, C. Aronica, A. Martinez, J-P. Dutasta, *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 2099-2102.

²⁷² N.S. Khan, J.M. Perez-Aguilar, T. Kaufmann, P.A. Hill, O. Taratula, O.S. Lee, P.J. Carroll, J.G. Saven, I.J. Dmochowski, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 1418-1424.



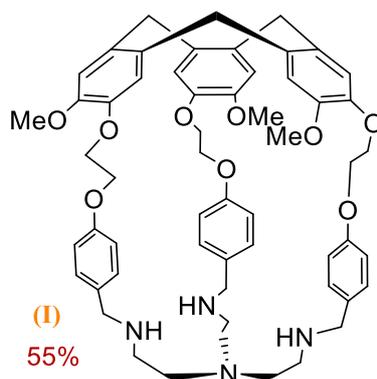
3 96%

In a dried three necked flask under argon conditions, are successively added 986 mg (1,35 mmol – 1 eq) of **2**, 558 mg (4,98 mmol – 3,7 eq) of 4-hydrobenzaldehyde, 631 mg (1,94 mmol – 1,4 eq) of Cs_2CO_3 and 20 mL of anhydrous DMF. The mixture is heated at 40°C 1 night. And the crude solution is diluted in 120 mL of EtOAc, then washed 3 times with a 10% solution of NaOH and one with brine. The organic phase is dried over MgSO_4 , filtered and the solvent evaporated. 1,13 g (96%) of a white powder are isolated.

RMN- ^1H (CDCl_3 -300 MHz) : 6,95 (s, 3H) ; 6,86 (s, 3H) ; 4,76 (d, $J = 13,8$ Hz, 3H) ; 4,31 (t, $J = 6,55$ Hz, 6H) ; 3,87 (s, 9H) ; 3,55-3,62 (t+d, 6H+3H, $J = 6,55$ Hz et $J = 13,8$ Hz).

Other characterizations are reported in reference ²⁷³

²⁷³ B. Châtelet, E. Payet, O. Perraud, P. Dimitrov-Raytchev, L-L. Chapellet, V. Dufaud, A. Martinez, J-P. Dutasta, *Org. Lett.*, **2011**, *13* (14), 3706-3709.

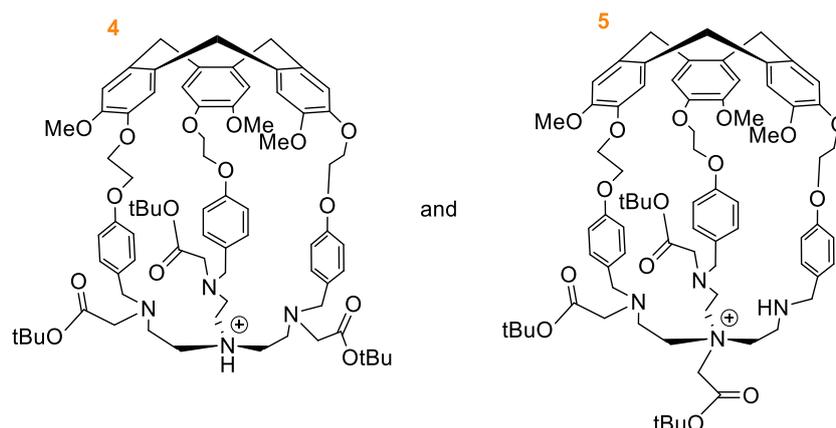


A solution of tris(2-aminoethyl)amine (182 mg - 1,24 mmol -1.2 eq) in a mixture of chloroform and methanol (200 mL, 1/1) was added dropwise to a solution of **3** (894 mg - 1,02 mmol, 1 eq) in a mixture of chloroform and methanol (400 mL, 1/1) for 8h. The reaction mixture was stirred for 24h. Sodium borohydride (1,7 g - 44 mmol - 43 eq) was then added to the reaction mixture cooled to 0°C, which was then allowed to warm up to room temperature and stirred for 3 h. The solvents were removed under vacuum. The residue was dissolved in chloroform (150 mL) and 10% aqueous NaOH (100 mL). The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with chloroform (2×100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and the organic solvent was removed under vacuum. The crude compound was recovered and polymeric species were then precipitated in dichloromethane and diethylether and the filtrate was evaporated. A further purification by chromatography can be necessary (eluant : 90/10/2 ; DCM/MeOH/Et₃N). 533 mg (55%) of pure hemicryptophane **I** are isolated as a yellowish powder.

RMN-¹H (CDCl₃-300 MHz) : 7,06 (s, 3H) ; 6,86 (s, 3H) ; 6,84 (d, *J* = 9,9 Hz, 6H) ; 6,47 (d, *J* = 8,2 Hz, 6H) ; 4,78 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H) ; 4,51 (m, 3H) ; 4,38 (m, 3H) ; 4,21 (m, 6H) ; 3,68 (s, 9H) ; 3,57 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H) ; 3,42 (d, *J* = 13,1 Hz, 3H) ; 3,47 (d, *J* = 13,1 Hz, 3H) ; 2,4 (m, 12H).

Other characterizations are reported in reference ³

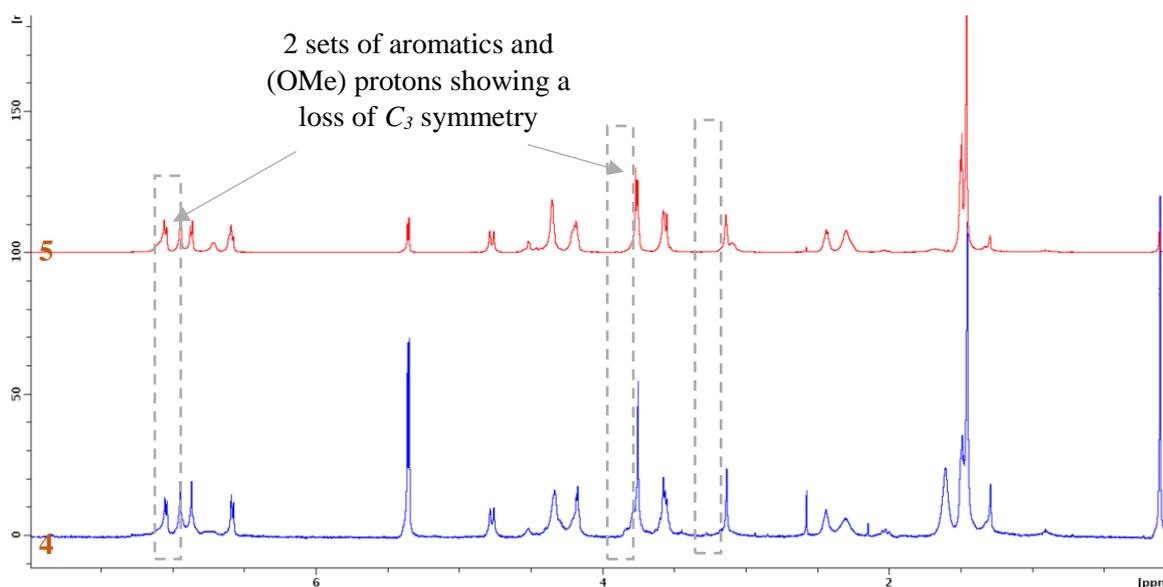
5.1.3. Synthesis of hemicryptophanes **II** and **IV**.



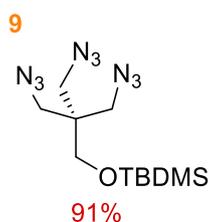
In a dried flask, under argon, 50 mg (0,052 mmol – 1 eq) of hemicryptophane **I** and 75,2 mg (0,231 mmol – 4,4 eq) of Cs₂CO₃ are solubilized in 4,5 mL of anhydrous DMSO. Then 25 μ L (0,171 mmol – 3,3 eq) of tertbutylacetate bromide are added. The mixture is heated at 40°C one night, before adding one more equivalent (8 μ L) of tertbutylacetate bromide and the reaction is stirred 6h. The crude mixture is dissolved in 100 mL of DCM and washed with 50 mL of water and 50 mL of 10 % solution of K₂CO₃, the organic phase is dried over MgSO₄ filtered and evaporated to give a yellowish oil. A purification by preparative chromatography (eluant 90/10 ; DCM/MeOH) gives 9 mg (13%) of the expected product **4**.

RMN-¹H (CD₂Cl₂-500 MHz) : 7,04 (d, 3H) 6,94 (s, 3H) ; 6,87 (s, 3H) ; 6,58 (d, 3H) ; 4,77 (d, 3H) 4,33 (m, 6H) ; 4,17 (m, 6H) ; 3,76 (s, 9H + d, 3H), 3,56 (m, 6H) ; 3,13 (m, 6H) ; 2,30-2,44 (m 12H) ; 1,45 – 1,47 (broad signal – 27H). (blue NMR spectra)

In a dried flask, under argon, 295 mg (0,31mmol – 1eq) of hemicryptophane **I** and 422 mg (1,295 mmol – 4,2 eq) of Cs₂CO₃ are solubilized in 7 mL of anhydrous DMSO. Then 145 μ L (1,01 mmol – 3,5 eq) of tertbutylacetate bromide are added. The mixture is heated at 40°C and the reaction followed by mass spectroscopy. After 8h, one more equivalent (45 μ L) of tertbutylacetate bromide is added and the reaction continued 13h. The crude mixture is dissolved in 200 mL of DCM and washed with 120 mL of water and 120 mL of 10 % solution of K₂CO₃, the organic phase is dried over MgSO₄ filtered and evaporated to give about 400 mg of a yellowish oil. After 2 purifications by chromatography, (eluant : DCM/ MeOH 95/5 → 90/10) 24 mg of a non C₃ symmetric cage which seems to correspond to **5** are isolated. (red NMR spectra).

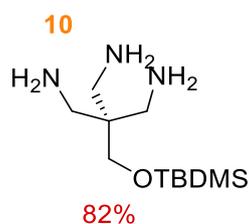


S1 : Comparison between ¹H-NMR (500MHz) spectra of **4** (blue) and **5** (red)



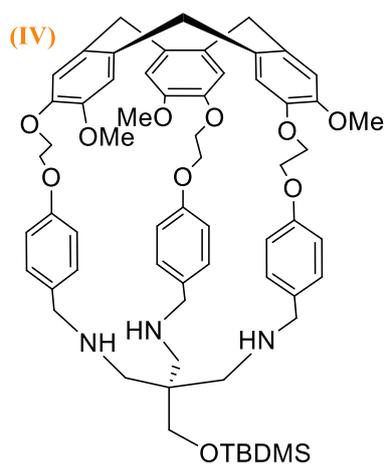
1,01 mg (1,41 mmol – 1 eq) of **8** are solubilized in 35 mL of DMF, and 922 mg (14,2 mmol – 10 eq) of NaN_3 are added at room temperature. Then the mixture is *slowly* heated to 100°C and stirred during one night. After partial evaporation of the solvent the crude is dissolved in 100 mL of DCM and washed 3 times with 100 mL of water. The organic phase is dried over Na_2SO_4 filtered and evaporated. 418 mg of **9** are isolated (91%) as a colorless oil.

RMN- ^1H (CDCl_3 - 300 MHz) : 3,44 (s, 2H) ; 2,69 (s, 6H) ; 0,91 (s, 9H) ; 0,08 (s, 6H).



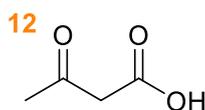
184 mg (0,47 mmol – 1 eq) of **9** are solubilized in 15 mL of THF and cooled to 0°C . 1,47 g (5,61 mmol – 12 eq) of PPh_3 are added by portion followed by 4 mL of water. The mixture is allowed to warm to room temperature and stirred one night before evaporation of the solvent. The resulting residue is solubilized in 30 mL of Et_2O , and extracted three times with acidified water (pH = 3). Combined aqueous phases are then switched to pH > 10 by adding a 10% NaOH solution and extracted three times with DCM. These last combined organic phases are dried over Na_2SO_4 and 96 mg (82%) of a white powder are isolated after evaporation.

RMN- ^1H (CDCl_3 - 300 MHz) : 3,46 (s, 2H) ; 2,66 (s, 6H) ; 0,88 (s, 9H) ; 0,05 (s, 6H).



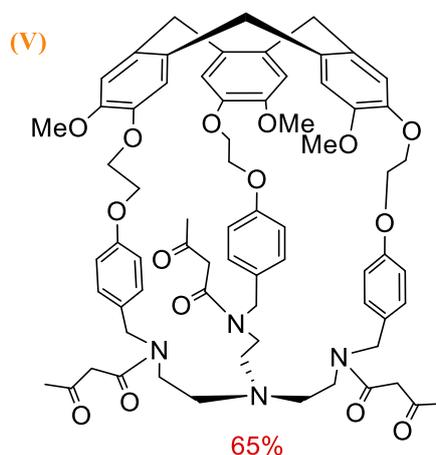
324 mg (0,38 mmol - 1eq) of CTB **3** are dissolved in 270 mL of a mixture 1 : 1 of MeOH/CHCl₃ and a solution of 100 mg (0,4 mmol – 1,05 eq) in 80 mL of the same solvents is added dropwise at room temperature. The solution is stirred one night and then cooled to 0°C. 620 mg (16 mmol – 42 eq) of sodium borohydride are added and the mixture is warmed at room temperature during 3h. After evaporation the crude product is solubilized in 100 mL of DCM and washed with 100 mL of 10% NaOH. The aqueous phase is extracted twice with DCM and combined organic phases are dried over Na₂SO₄ and evaporated. Despite several purifications by chromatography (silica, eluant : 95/5, DCM/ MeOH) and preparative TLC (alumina : eluant 98/2, DCM/MeOH) we don't manage to isolate a product corresponding to the hemicryptophane **IV**.

5.1.4. Synthesis of hemicryptophanes V and VI.



In a dried flask 800 mg (3,3 mmol – 1 eq) of tertbutylacetoacetate are dissolved in 1 mL of anhydrous DCM. Then a solution of TFA (1 mL – 13,3 mmol -4 eq) in 1 mL of DCM is added dropwise and the mixture is stirred 1h30 at room temperature. After evaporation of the solvent (at 20°C to avoid a secondary reaction of aldolisation), a yellow oil corresponding to the desired product **12** (89%) is isolated and kept at -20°C because of its instability.

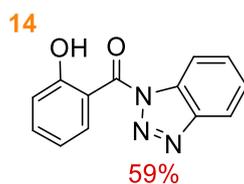
RMN-¹H (CDCl₃ – 300 MHz) : 3,66 (s, 2H) ; 2,38 (s, 3H). (and 10,93 (s, broad) TFA traces)



In a dried flask, under argon atmosphere, are successively added : 43,7 mg (0,046 mmol – 1 eq) of hemicryptophane **I**, 75 mg (0,37 mmol – 8 eq) of DCC, 56 mg (0,46 mmol – 10 eq) of DMAP, 0,5 mL of DCM, and finally 29 mg (0,276 mmol – 6 eq) of acetoacetic acid **12**. The solution is stirred 48h at room temperature. A white solid formed during the reaction is filtered and the liquid is diluted in 15 mL of DCM before being washed twice with 15 mL of 1M HCl solution, then twice with 10% NaOH solution. The organic phase is dried over Na₂SO₄ filtered and evaporated and the crude residu is purified by chromatography (eluant : DCM/AcOEt/ MeOH/Et₃N, 5/5/1/0,8). 36 mg (65%) of hemicryptophane **V** are isolated as a white powder.

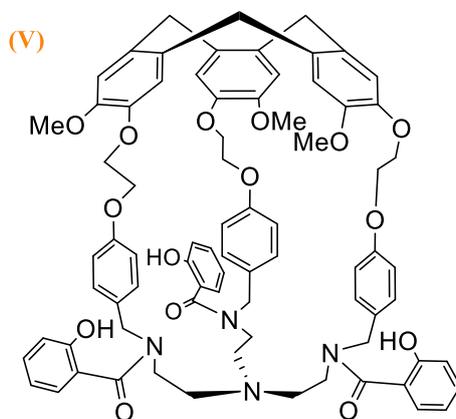
RMN-¹H (CHCl₃ – 500 MHz – 60°C) : 6,96 (s, 3H) ; 6,86 (s, 6H) ; 6,68 (m broad, 6H) ; 4,76 (d,3H, *J* = 13,5 Hz) ; 4,24 - 4,34 (d broad, 18H) ; 3,79 (s, 9H) ; 3,55 (d, 3H + s, 6H) ; 2,95 – 3,10 (m broad, 6H) ; 2 – 2,3 (m broad, 15H)

Standard mass spectroscopy (ESI) : 1204,3 g/mol [M+H]⁺

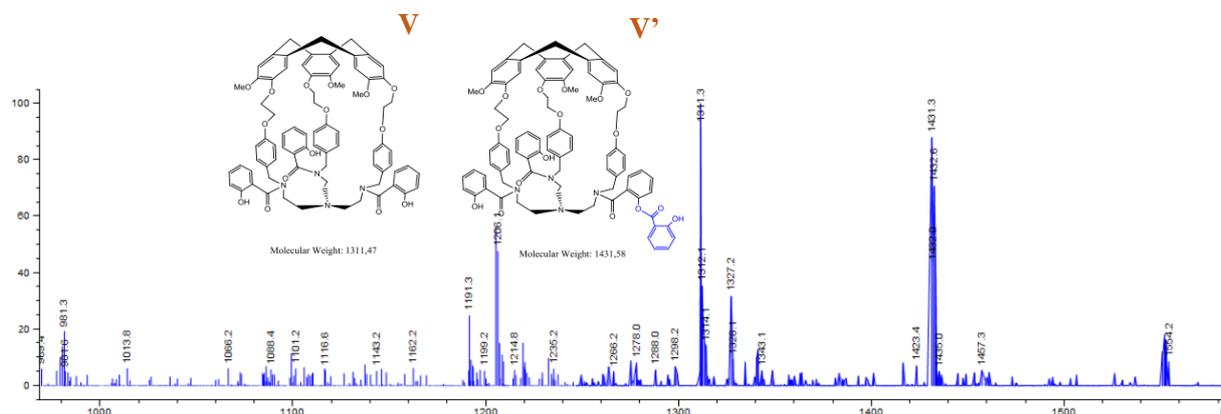


707 mg (5,93 mmol – 2,95 eq) of benzotriazole are weighted in a dried flask. Then, under argon, 5 mL of anhydrous DCM and 5 mL of distilled THF are added. After solubilisation of benzotriazole, 155 μ L (2,13 mmol – 1,06 eq) of thionyle chloride are added and the mixture is stirred 40 min at room temperature. Finally, 278 mg (2,013 mmol – 1 eq) of salicylic acid are added and the crude is stirred 2h before solvent evaporation. The residu is warmed to reflux 20min in Et₂O (8 mL) and an insoluble white powder is removed by filtration. The product is obtained after evaporation of the liquid phase (300 mg, 59%).

RMN-¹H (CDCl₃ – 300 MHz) : 8,64 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz) ; 8,36 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz) ; 8,22 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz) ; 7,75 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz) ; 7,62 (m, 2H) ; 7,16 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz) ; 7,09 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz).

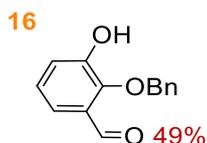


In a flask under argon are successively added 13,4 mg (0,014 mmol – 1 eq) of hemicryptophane **I**, 11,4 mg (0,048 mmol – 3,4 eq) of **14**, 0,5 mL of distilled THF, 1mL of anhydrous DCM, and 10 μ L (0,072 mmol – 5 eq) of Et₃N. The mixture is stirred at room temperature 5h and the reaction followed by mass spectroscopy. ([M(**V**) + H]⁺ = 1312 g/mol, side product [M(**V'**) + H]⁺ = 1432 g/mol)



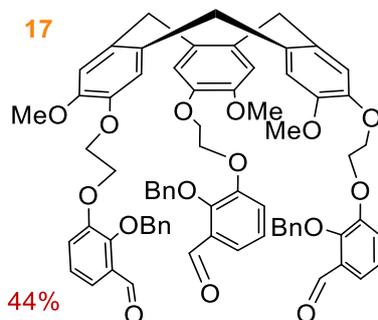
S2 : Mass spectra of crude : the hemicryptophane **V** is formed but also a product containing 4 salicylic acid units whose structure must correspond to **V'**

5.1.5. Synthesis of hemicryptophane VII and complexation with Gd(III).



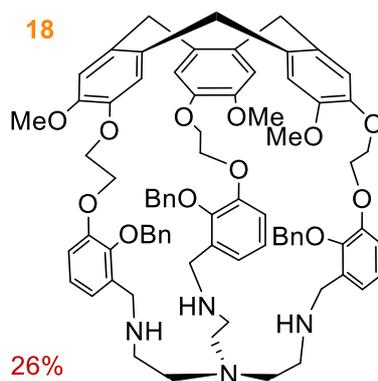
In a flask are solubilized 5 g (36,2 mmol – 1 eq) of 2,3-dihydroxybenzaldehyde in 150 mL of DMSO. Then 1,45 g (36,2 mmol – 1 eq) of NaH (60 % in oil) and added by portion. The mixture is stirred 1h at room temperature. Then 4,3 mL of benzyl bromide are added to the solution which is stirred one night at room temperature. The reaction is stopped by adding 300 mL of distilled water, this phase is extracted 3 times with 200 mL of CHCl₃. Combined organic phases are washed twice with water, dried over Na₂SO₄ and evaporated to lead to 6,6 g of a brown oil. A further purification by chromatography (eluant : CHCl₃) gives pure **16** as a yellow solid (4,024 g – 49%).

RMN-¹H (CD₂Cl₂- 300 MHz) : 10,19 (s, 1H) ; 7,42 (s, 5H) ; 7,37 (dd, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J*' = 2,6 Hz) ; 7,19 (m, 2H) ; 5,82 (s, 1H, broad) ; 5,10 (s, 2H).

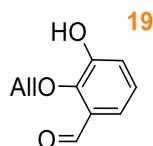


1g (1,37 mmol – 1 eq) of CTB **2**, 1,05 g (4,6 mmol – 3,4 eq) of **16** and 638 mg (1,96 mmol – 1,4 eq) of Cs₂CO₃ are solubilized in 20 mL of DMF. The solution is heated at 40°C during 48h. The crude is then dissolved in 120 mL of EtOAc, washed with 3 x 60 mL of 10% NaOH and 60 mL of water, dried over Na₂SO₄ and evaporated. 1,356 mg (83%) of a brown solid are isolated.

RMN-¹H (CDCl₃ – 300 MHz) : 10,25 (s, 3H); 7,41 (dd, 3H, *J* = 8,0 Hz, *J*' = 1,2 Hz); 7,32 (m, 6H) ; 7,22 (m, 12H) ; 7,11 (t, 3H, *J* = 7,7 Hz) ; 6,92 (s, 3H) ; 6,78 (s, 3H) ; 5,20 (d, 6H, *J* = 5,3 Hz) ; 4,75 (d, 3H, *J* = 13,3 Hz); 4,43 (m, 12H) ; 3,62 (s, 9H) ; 3,53 (d, 3H, *J* = 13,5 Hz).

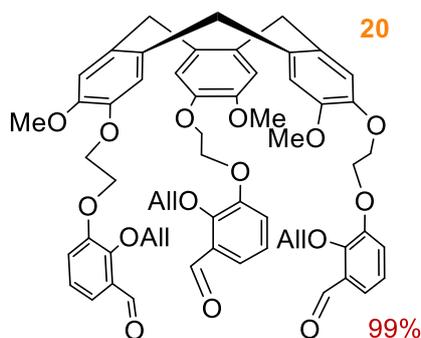


700 mg (0,6 mmol - 1 eq) of **17** are dissolved in 300 mL of CHCl₃/ MeOH (1/1) and 114 mg (0,78 mmol - 1,3 eq) of tren solubilized in 200 mL of the same mixture of solvent is added dropwise in 3h. The solution is stirred 48h at room temperature before cooling to 0°C and 2 g (84 eq) of NaBH₄ are then added. The mixture is warmed up to room temperature and stirred 3h. After evaporation of the solvents, the residu is dissolved in 150 mL of CHCl₃, washed with 100 mL of 10% NaOH solution, and the aqueous phase is extracted twice with 100 mL of CHCl₃. Combined organic phases are dried over Na₂SO₄, filtered, evaporated and the crude is purified by chromatography (eluant : DCM/MeOH/ Et₃N, 96/5/5 then 92/8/3) to give **18** as a yellowish powder (201 mg – 26%).



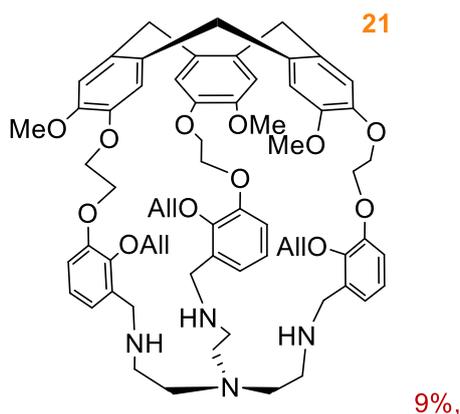
In a flask 5,509 g (39 mmol – 1,1 eq) of 2,3-dihydroxybenzalehyde are solubilized in 50 mL of DMSO. Then 1,45 g (36,2 mmol – 1eq) of NaH (60 % in oil) are added by portion. The mixture is stirred 1h at room temperature. Then 3 mL (35 mmol - 1eq) of allyl bromide are added to the solution which is stirred one night at room temperature. The reaction is stopped by adding 300 mL of distilled water, this phase is extracted 3 times with 200 mL of CHCl₃. Combined organic phases are washed twice with water, dried over Na₂SO₄ and evaporated. A further purification by chromatography (eluant : CHCl₃) gives pure **19** as a yellow solid (2,87 g – 44%).

RMN-¹H (CDCl₃- 300 MHz) : 10,12 (s, 1H) ; 7,48 (s, 5H) ; 7,35 (dd, 1H, *J* = 7,6 Hz, *J'* = 2,5 Hz) ; 7,13 (m, 2H) ; 5,49-5,63 (m, 1H) ; 4,84 (d, 1H, *J* = 16,4 Hz) ; 4,70 (d, 1H, *J* = 9,8 Hz) ; 3,61 (m, 2H).



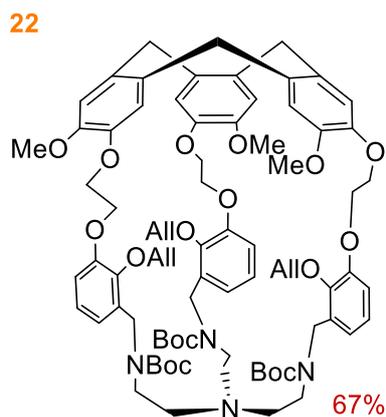
In a dried flask under argon atmosphere, 500 mg (0,685 mmol – 1 eq) of CTB **2**, 452 mg (2,54 mmol – 3,7 eq) of **19** and 314 mg (0,97 mmol – 1,4 eq) are dissolved in 10 mL of anhydrous DMF. The mixture is stirred and heated to 40°C 1 night before evaporation of the solvent. The residu is dissolved in 60 mL of EtOAc and washed by 3 x 60 mL of 10% NaOH solution, and 3 x 60 mL of water. The organic phase is dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to give 709 mg of a brown oil (99%).

RMN (CDCl₃-300 MHz) : 10,43 (s, 3H) ; 7,45 (dd, 3H, $J = 7,6$ Hz, $J' = 1,8$ Hz) ; 7,18 (dd, 3H, $J = 7,6$ Hz, $J' = 1,8$ Hz) ; 7,09 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz) ; 6,93 (s, 3H) ; 6,83 (s, 3H) ; 5,99-6,01 (m, 3H) ; 5,25 (d, 3H, $J = 17,4$ Hz) ; 5,18 (d, 3H, $J = 10,1$ Hz) ; 4,72 (d, 3H, $J = 13,7$, Hz) ; 4,66 (t, 6H, $J = 6,1$ Hz) ; 4,38 (s, 9H) ; 4,24 (m, 6H) ; 3,55 (m, 9H, large).



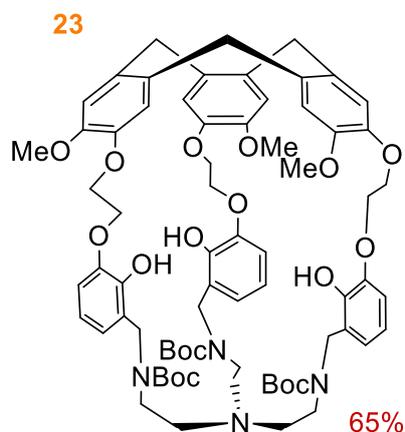
712 mg (0,5 mmol - 1 eq) of **20** are dissolved in 250 mL of CHCl₃/ MeOH (1/1) and 89 mg (0,6 mmol- 1,2 eq) of tren solubilized in 150 mL of the same mixture of solvents are added dropwise in 3h. The solution is stirred 48h at room temperature before cooling to 0°C and 850 g (21 mmol - 42 eq) of NaBH₄ are then added. The mixture is warmed up to room temperature and stirred 4h. After evaporation of the solvents the residu is dissolved in 150 mL of CHCl₃, washed with 100 mL of 10% NaOH solution, and the aqueous phase is extracted twice with 100 mL of CHCl₃. Combined organic phases are dried over Na₂SO₄, filtered, evaporated and the crude is purified by chromatography (eluant : DCM/MeOH/Et₃N, 98/2/2) to give **21** as a white powder (60 mg – 9 %).

RMN ¹H (CDCl₃ – 300 MHz) : 6,75-6,94 (m, 15H) ; 5,50-5,67 (m, 3H) ; 4,84 (d, 3H, $J = 17,4$ Hz) ; 4,76 (d, 3H, $J = 13,8$ Hz) ; 4,74 (d, 3H, $J = 10,1$ Hz) ; 4,18-4,42 (m, 18H) ; 3,71 (s+d, 12H) ; 3,55 (m, 6H) ; 2,45-2,62 (m, 12H).



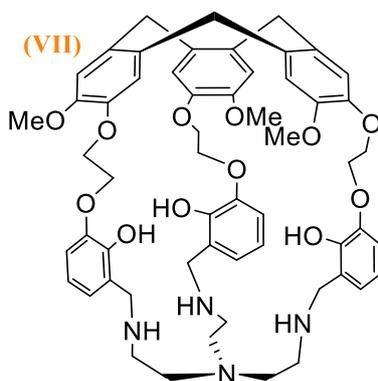
149 mg (0,133 mmol – 1eq) of **21** and 111 mg (0,451 mmol – 3,4 eq) of di-*t*-butyldicarbonate are dissolved in 7 mL of DCM and the solution is stirred at room temperature one night. The crude solution is diluted in 20 mL of DCM, washed with a 10% NaOH solution and the aqueous phase is extracted twice with DCM. Combined organic phases are dried over Na₂SO₄ filtered and evaporated, the residu is purified by chromatography (eluant : DCM/ EtOAc ; 7/3) to give 126 mg (67%) of **22**.

RMN ¹H (CDCl₃ – 300 MHz) : 6,72-6,99 (m, 15H) ; 5,51-5,72 (m, 3H) ; 4,84 (large d, 3H, *J* = 17 Hz) ; 4,76 (d, 3H, *J* = 13,7 Hz) ; 4,74 (large d, 3H, *J* = 10 Hz) ; 4,16-4,42 (m, 18H) ; 3,73 (s+d, 12H) ; 3,56 (m, 6H) ; 2,42-2,65 (m, 12H), 1.40-1,50 (broad signal, 27H).



153 mg (0,108 mmol – 1eq) of **22** are dissolved in 6 mL of DCM. Then 99 mg (0,086 mmol - 0,8 eq) of Pd(PPh₃), 4,119 mg (0,894 mmol – 8 eq) of K₂CO₃, and 6 mL of MeOH are added and the solution is stirred 1 night at room temperature. The reaction is monitored by mass spectroscopy. The solvents are evaporated and the residu dissolved in 20 mL of DCM then washed with a saturated solution of NaHCO₃ (pH ~9). The aqueous phase is then extracted 3 times with DCM. Combined organic phases are dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated. The residu is purified by chromatography (eluant : DCM/ EtOAC ; 1/1) to give 92 mg (65%) of a brown oil corresponding to **23**.

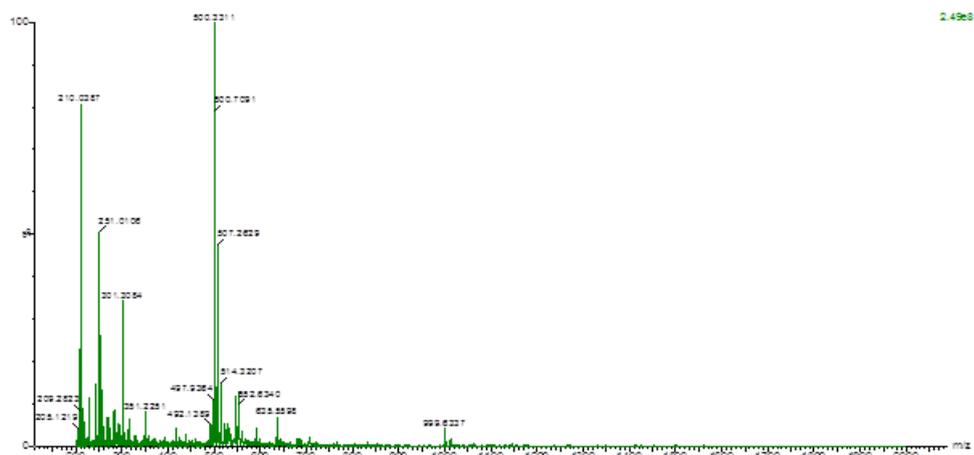
RMN ¹H (CDCl₃ – 300 MHz) : 6,73-7,01 (m, 15H) ; 4,76 (d, 3H, *J* = 13,8 Hz) ; 4,13-4,40 (m, 18H) ; 3,73 (m, 12H) ; 3,58 (m, 6H) ; 2,43-2,69 (m, 12H), 1.40-1,50 (broad signal, 27H).

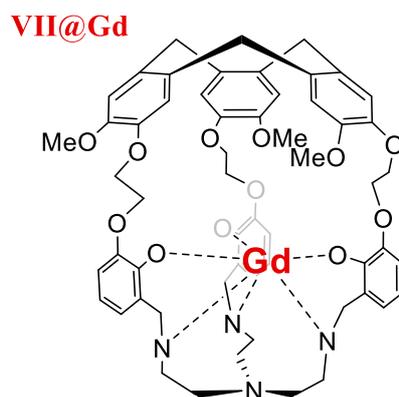


By catalytic hydrogenation of **18** under 1 atm of H_2 : 63 mg (60 μmol - 1,5 eq) of Pd/C (10%) and 49,2 mg (39 μmol - 1 eq) of **18** are dissolved in 2 mL of DCM at room temperature. Regularly $H_2(g)$ is bubbled in the solution and the reaction is followed by mass spectroscopy. When the pic corresponding to the hemicryptophane **VII** (999 g/mol) is the major one (3 days later) and there is no more evolution on the mixture analysis the crude solution is filtered on celite to remove palladium particles, the DCM is evaporated and D_2O with NaOD is directly added to the flask to extract the ligand **VII** and analyse it by NMR with presaturation of the pic of the solvent.

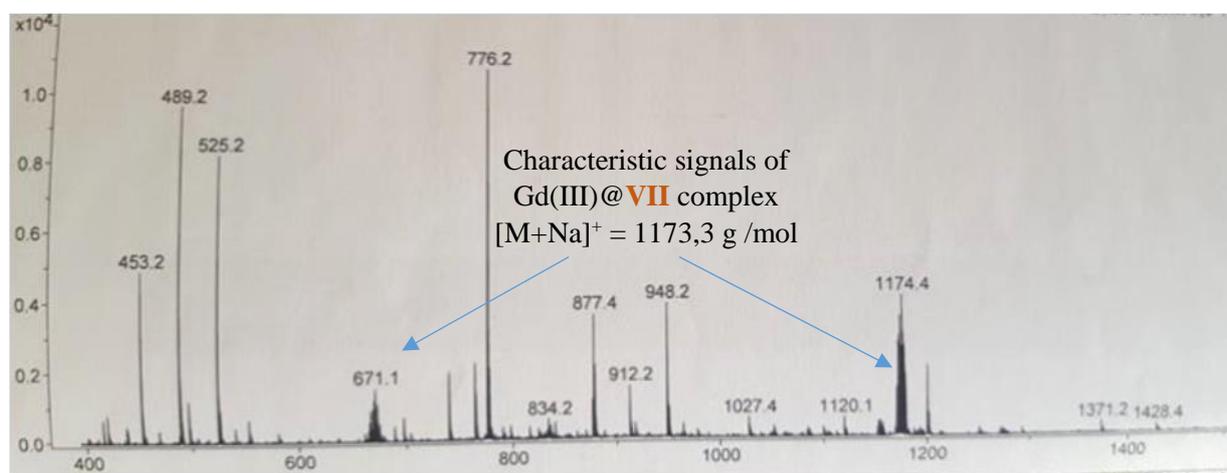
RMN 1H (D_2O / NaOD, 500 MHz) with presaturation of water protons at 4,7 ppm : 7,34 (s, 3H) ; 7,22 (s, 3H) ; 5,98 (d, 3H, $J = 7,8$ Hz) ; 5,93 (d, 3H, $J = 7,4$ Hz) ; 5,13 (m, 3H) ; 4,50 (m, 3H) ; 4,26 (m, 6H) ; 4,02 (m, 3H) ; 3,77 (d, 3H, $J = 13,4$ Hz) ; 3,68 (s, 9H) ; 3,42 (d, 3H, $J = 13,4$ Hz) ; 2,63 (m, 9H) ; 2,43 (m, 3H)

By catalytic hydrogenation of **18** under 10 bar of H_2 : In the insert of a reactor adapted to high pressure is injected a solution of 40 mg (31 μmol - 1 eq) of hemicryptophane **18** and 4 mg (3,7 μmol - 0,12 eq) of Pd/C. Then a 10 bar H_2 atmosphere is applied during 36h, before the filtration of palladium over celite. The mass spectroscopy of the liquid phase shows a total deprotection but we can't isolate the product.





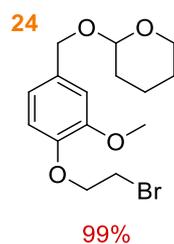
13 mg (13 μmol – 1 eq) of hemicryptophane **VII** and 8,3 mg (14 μmol – 1,1 eq) of $\text{Gd}(\text{OTf})_3$ are solubilized in 1 mL of a 1/1 mixture of DCM/MeOH, Then 18 μL (128 μmol – 10 eq) of Et_3N are added and the solution is stirred at room temperature. The reaction is monitored by mass spectroscopy, in 45 min the complex is formed.



S4 : Mass spectra of the crude solution containing the complex VII@Gd

5.1.6. Synthesis of hemicryptophane VIII and complexation with Gd (III).

5.1.6.1. Synthon **26** used for the synthesis of both hemicryptophanes VIII et IX.



7,74 g (29,6 mmol – 1 eq) of **1** are solubilized under argon in anhydrous THF and 5,4 mL (59,3 mmol – 2 eq) of dihydropyran are added. Then a solution of 744 mg (2,96 mmol – 0,1 eq) of PPTS in 10 mL of anhydrous DCM is added dropwise. The mixture is stirred 3h at room temperature. After evaporation of the solvents, the crude is dissolved in 150 mL of DCM and washed twice with water (100 mL). The organic phase is dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to give 10,21 g (99%) of **24** as a transparent oil.

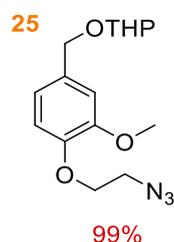
RMN - ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 6,91 (s, 1H) ; 6,86 (s, 2H) ; 4,70 (d, 1H, *J* = 11,9 Hz) ; 4,67 (t, 1H, *J* = 3,8 Hz) ; 4,41 (d, 1H *J* = 11,9 Hz) ; 4,29 (t, 1H, *J* = 6,9 Hz) ; 3,87-3,94 (m, 1H) ; 3,85 (s, 3H) ; 3,61 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz) 3,49 -3,56 (m, 1H) 1,48 – 1,89 (m, 6H).

RMN - ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 149,82 ; 146,88 ; 132,40 ; 120,54 ; 114,71 ; 112,21 ; 97,67 ; 69,34 ; 8,38 ; 55,99 ; 30,62 ; 28,94 ; 25,45 ; 19,43.

ESI-HRMS *m/z* calcd for [M+NH₄]⁺ : 362,0961, found : 362,0963.

R_f (DCM) : 0,86.

IR : 3053 ; 2943 ; 1664 ; 1593 ; 1511 ; 1264.



In a 100 mL round bottom flask, 7g (20 mmol -1 eq) of **24** are dissolved in 60 mL under argon. Then 4,3 g (66 mmol - 3,2 eq) of NaN₃ are additionned by portions at room temperature. The mixture was *slowly* heated at 60 °C during 5h. After DMF evaporation the crude product is dissolved in 400 mL of dichloromethane and washed twice with water (200 mL), then with brine (150 mL) before drying over anhydrous Na₂SO₄. After filtration and evaporation, 6,2 g (99 %) of an transparent oil are isolated.

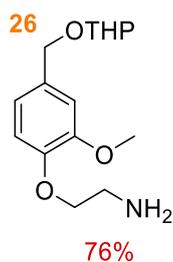
RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 6,91 (s, 1H) ; 6,85 (s, 2H) ; 4,69 (d, 1H, *J* = 11,9 Hz) ; 4,65 (t, 1H, *J* = 3,8 Hz) ; 4,41 (d, 1H *J* = 11,9Hz) ; 4,14 (t, 1H, *J* = 6,9 Hz) ; 3,85-3,94 (m, 1H) ; 3,84 (s, 3H) ; 3,59 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz) 3,48 -3,54 (m, 1H) 1,47 – 1,88 (m, 6H).

RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 150,01 ; 147,35 ; 132,38 ; 120,58 ; 114,46 ; 112,24 ; 97,76 ; 68,82 ; 68,44 ; 62,42 ; 50,09 ; 50,37 ; 30,74 ; 25,58 ; 19,62.

ESI-HRMS *m/z* calcd for [M+NH₄]⁺ : 325,1870 ; found : 325,1871.

R_f (DCM) : 0,70.

IR : 3053 ; 2942 ; 2873 ; 2107 ; 1549 ; 1513 ; 1201.



In a 250 mL round bottom flask, 6,420 g (20 mmol – 1 eq) of azide **25** are dissolved in 60 mL of THF and 13 g (49 mmol – 2,4 eq) of PPh₃ are added by portions at 0°C. The mixture is then allowed to warm to room temperature and 2 mL of distilled water are added. After 24 h stirring at room temperature, solvents are evaporated and the crude mixture is dissolved in 150 mL of dichloromethane and washed twice with water (100 mL) before drying over anhydrous Na₂SO₄. After filtration and evaporation, the orange oil is purified by chromatography (eluant : CHCl₃/ MeOH, 96/4 to 90/10) and 4,162 g (76%) of an orange oil that slowly crystallize are obtained.

RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 6,87 (s, 1H) ; 6,88 (s, 2H) ; 4,67 (d, 1H, *J* = 11,5 Hz) ; 4,64 (t, 1H, *J* = 3,5 Hz) ; 4,39 (d, 1H, *J* = 11,5 Hz) ; 4,00 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz) ; 3,84-3,92 (m, 1H) ; 3,82 (s, 3H) ; 3,46-3,52 (m, 1H) ; 3,07 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz) ; 2,47 (broad s, 2H) ; 1,46 - 1,86 (m, 6H)

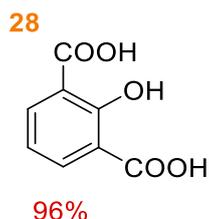
RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 149,62 ; 147,80 ; 131,67 ; 120,79 ; 113,72 ; 111,96 ; 97,77 ; 71,06 ; 68,93 ; 62,50 ; 56,02 ; 41,41 ; 30,79 ; 25,63 ; 19,63.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MNa⁺) : 304,1519 ; found : 304,1518.

R_f (DCM) : 0,16.

IR : 3365 (N-H) ; 3053 ; 2940 ; 2862 ; 1592 ; 1513 ; 1264.

5.1.6.2. End of the synthesis of hemicryptophane **VIII**.



2 g (10,2 mmol) of 2-methoxyisophtalic acid are dissolved in a mixture of 75 mL of bromhydric acid and 75 mL of acetic acid. The resulting solution is heated à 90°C during 45 minutes. Solvents are then evaporated and the white solid is washed 3 times with cold water. 1,310 g (96%) of a white solid are isolated.

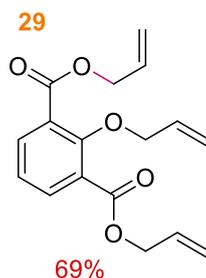
RMN ^1H (CD_3OD - 300MHz) : 8,12 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz) ; 7,01 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3OD - 400MHz) : 171,2 ; 163,3 ; 137,9 ; 119,8 ; 117,9.

Tfus : 242°C.

ESI-HRMS m/z calcd for (MNa^+) : 205,1123 ; found : 205,1123.

IR : 2430-3030 (large) ; 1691 ; 1605 ; 1432 ; 1242 ; 1175 ; 744 ; 686.



2,54 g (13,7 mmol-1eq) of 2-hydroxyphthalic acid **28**, 18,9 g (137 mmol - 10 eq) of K_2CO_3 and 6 mL (68,7 mmol - 5eq) of allyl bromide are heated to 75°C in 90 mL of DMF during 18h. The solution is then cooled to room temperature, and after evaporation of the solvent, the mixture is dissolved in DCM (150 mL) and washed 3 times with NaOH 4M solution (150mL) and 3 times with distilled water (150 mL). The organic phase is dried over anhydrous Na_2SO_4 and after evaporation, the residu is purified by chromatography (eluant : PE/ Et_2O : 9/1). 3,53g (69%) of a transparent oil are isolated.

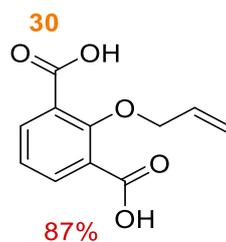
RMN ^1H (CD_3OD - 300MHz) : 7,94 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz) ; 7,30 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 6,00-6,15 ; 5,44 (d, 2H, $J = 17,3$ Hz) ; 5,33 (d, 1H, $J = 17,3$ Hz) ; 5,30 (d, 2H, $J = 10,5$ Hz) ; 5,21 (d, 1H, $J = 10,5$ Hz) ; 4,83 (d, 4H, $J = 5,2$ Hz) ; 4,55 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 - 400MHz) : 165,5 ; 158,2 ; 137,5 ; 135,0 ; 133,7 ; 132,0 ; 127,2 ; 123,7 ; 119,0 ; 118,1 ; 66,5 ; 66,1.

ESI-HRMS m/z calcd for (MH^+) : 303,3387 found : 303,3289.

Rf (PE/ Et_2O : 9/1) = 0,28.

IR : 3086 ; 2950 ; 1723 ; 1446 ; 1244 ; 1197 ; 983 ; 928, 767.



2,64 g (9,4 mmol - 1eq) of **29** are dissolved in a 1 : 1 mixture of water and methanol and 1,13 g (28,2 mmol - 3eq) of NaOH are added. After stirring during 48h, methanol is evaporated and 15 mL of water are added. This phase is first washed with DCM. Then the aqueous phase is acidified to pH ~ 1-2 with 37% HCl solution, and is extracted 3 times with DCM. Combined organic phases are dried over anhydrous Na₂SO₄ filtered and evaporated, 2,09 g (87%) of a white solid are obtained.

RMN ¹H (CD₃OD - 300MHz) : 7,86 (d, 2H, *J* = 7,7 Hz) ; 7,20 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz) ; 5,97-6,11 (m, 1H) ; 5,27 (d, 1H, *J* = 17,2 Hz) ; 5,14 (d, 1H, *J* = 10,4 Hz) ; 4,52 (d, 2H, *J* = 5,9 Hz).

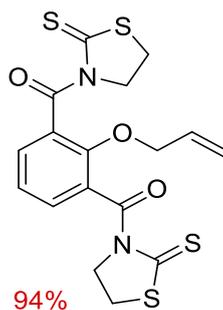
RMN ¹³C (CD₃OD - 400MHz) : 169,4 ; 159,2 ; 135,9 ; 135,4 ; 129,3 ; 125,1 ; 118,9 ; 78,4.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MNa⁺) : 245.0420, found : 245.0420.

R_f (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,09.

IR : 2500 – 3000 (large) ; 1672 ; 1580 ; 1466 ; 1295 ; 1248 ; 919 ; 681.

31



1,74 g (7,84 mmol – 1 eq) of **30**, are inserted under argon in a dry 250 mL three-necked flask and dissolved in 25 mL of dry dioxane and one drop of DMF. Then 1,6 mL (18,8 mmol – 2,4 eq) of oxalyl chloride are added dropwise at room temperature and the mixture is heated at 60°C during 17h to form the acyl chloride. Dioxane is evaporated and replaced by 20 mL of dry THF. Still under argon, a solution of 2,24 g (18,8 mmol – 2,4 eq) of mercaptothiazoline and 2,64 mL (19,6 mmol – 2,5 eq) of freshly distilled Et₃N in 60 mL of dry THF is added dropwise at 0°C to the first solution, and is then allowed to warm to room temperature for 15h. THF is evaporated and the crude mixture is dissolved in DCM and washed with a 1M HCl solution and then with 1M solution of NaOH before drying over anhydrous Na₂SO₄. The residue is purified by chromatography (eluant : 98/2 DCM/EtOAc) and 3,13 g (94%) of a yellow solid are isolated.

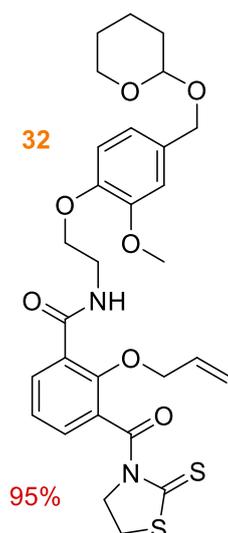
RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 7,43 (d, 2H, *J* = 7,7 Hz) ; 7,24 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz) ; 5,91-6,04 (m, 1H) ; 5,39 (d, 1H, *J* = 17,2 Hz) ; 5,22 (d, 1H, *J* = 9,9 Hz) ; 4,53 (t, 4H, *J* = 7,1 Hz) ; 4,47 (d, 2H, *J* = 5,5 Hz) ; 3,35 (t, 4H, *J* = 7,1 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 200,9 ; 167,4 ; 153,4 ; 133,2 ; 132,3 ; 129,3 ; 124,0 ; 118,0 ; 76,5 ; 55,9 ; 29,4.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MH⁺) : 425.0117, found : 425.0120.

R_f (DCM) : 0,2.

IR : 2939 ; 2887 ; 1670 ; 1587 ; 1460 ; 1441 ; 1274 ; 1218 ; 1146 ; 1082 ; 998 ; 756 ; 672.



3,13 g (7,3 mmol -7 eq) of **31** are dissolved in 100 mL of DCM and a solution of 293 mg (1,04 mmol – 1 eq) of **26** in 100 mL of DCM is added dropwise in 10h at room temperature. The solvent is evaporated and the resulting oil was purified by chromatography (eluant : pure DCM then DCM/ MeOH 97/3). 2,6 g (6,14 mmol) of reactant are isolated for further amidation, and 580 mg (95%) of the product of monoamidation.

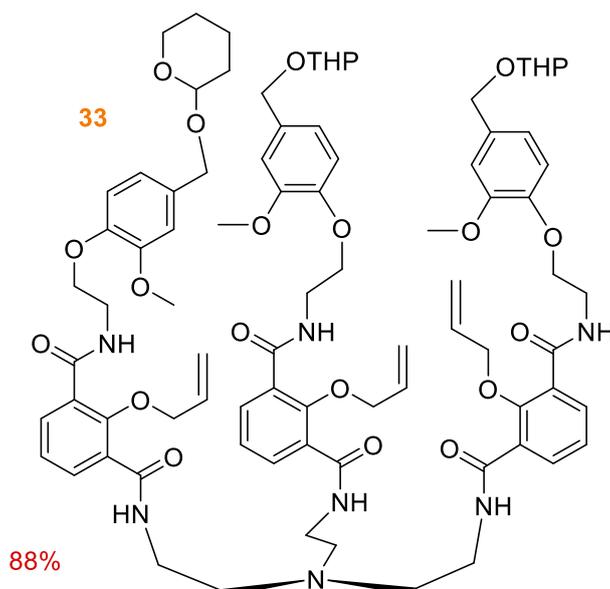
RMN ^1H (CDCl_3 - 400MHz) : 8,12 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 7,98 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz) ; 7,44 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 7,24 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 6,87 (d, 2H) ; 5,91-6,02 (m, 1H) ; 5,30 (d, 1H, $J = 17,2$ Hz) ; 5,11 (d, 1H, $J = 10,3$ Hz) ; 4,69 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz) ; 4,65 (t, 1H, $J = 4,1$ Hz) ; 4,60 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz) ; 4,51 (d, 2H, $J = 5,7$ Hz) ; 4,41 (d, 1H, $J = 11,6$ Hz) ; 4,15 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz) ; 3,87-3,93 (m, 1H) ; 3,80 (t, 2H) ; 3,81 (s, 3H) ; 3,49-3,55 (m, 1H) ; 3,37 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz) ; 1,48-1,88 (m, 6H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 - 400MHz) : 201,5 ; 167,7 ; 165,2 ; 154,3 ; 150,1 ; 147,7 ; 134,6 ; 132,8 ; 132,7 ; 132,3 ; 130,1 ; 127,8 ; 125,0 ; 120,8 ; 118,7 ; 114,9 ; 112,1 ; 97,9 ; 77,1 ; 68,9 ; 68,7 ; 62,5 ; 56,0 ; 55,9 ; 39,7 ; 30,8 ; 29,2 ; 25,7 ; 19,7.

ESI-HRMS m/z calcd for (MH^+) : 586.1880 ; found : 586.1877.

Rf (DCM/EtOAc ; 9/1) : 0,23.

IR : 3385 ; 2941 ; 2868 ; 1658 ; 1511 ; 1264 ; 1230 ; 1154 ; 1036 ; 732.



1,15 g (1,96 mmol – 3,3 eq) of **32** and 88,7 mg (0,594 mmol - 1 eq) of tren are dissolved in 100 mL of dichloromethane and stirred at room temperature during 15h. After evaporation, the crude product is purified by chromatography (eluant DCM / MeOH from 99 /1 to 95/5) and 810 mg (88% of a transparent oil are isolated.

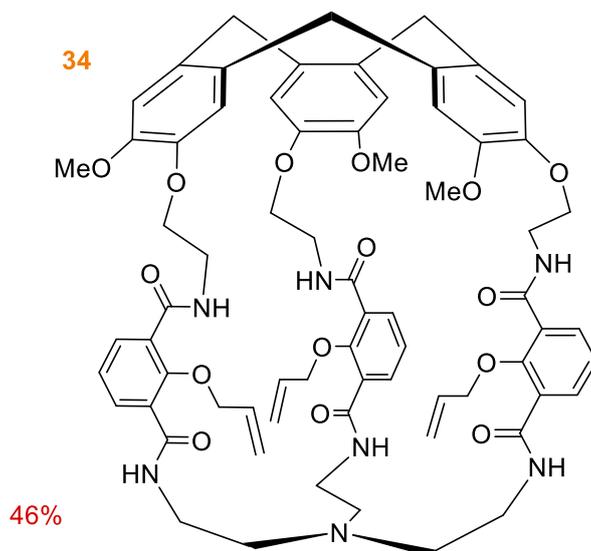
RMN ^1H (CDCl_3 - 300MHz) : 7,98 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 7,87 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz) ; 7,71 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 7,65 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz) ; 7,13 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz) ; 6,87 (m, 3H) ; 5,92-6,05 (m, 1H) ; 5,28 (d, 1H, $J = 17$ Hz) ; 5,17 (d, 1H, $J = 10,1$ Hz) ; 4,68 (d, 1H, $J = 11,7$ Hz) ; 4,64 (t, 1H, $J = 3,6$ Hz) ; 4,38-4,43 (m, 3H) ; 4,15 (t, 2H, $J = 5,7$ Hz) ; 3,79-3,93 (m, 3H) ; 3,77 (s, 3H) ; 3,44 -3,55 (m, 3H) ; 2,76 (t, 2H, $J = 5,7$ Hz) ; 1,47-1,89 (m, 6H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 - 400MHz) : 165,82 ; 165,55 ; 154,44 ; 149,93 ; 147,61 ; 134,27 ; 134,02 ; 132,43 ; 132,36 ; 128,69 ; 128,57 ; 125,18 ; 120,79 ; 119,82 ; 114,69 ; 112,12 ; 97,98 ; 77,64 ; 68,93 ; 68,51 ; 62,57 ; 55,94 ; 53,92 ; 39,80 ; 38,32 ; 30,84 ; 25,68 ; 19,73.

ESI-HRMS m/z calcd for $((\text{M}+\text{H}+\text{NH}_4)^{2+})$: 783.3887 ; found : 783.3882.

Rf (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,52.

IR : 3425 ; 2943 ; 2852 ; 1654 ; 1515 ; 1266, 1034, 736.



190 mg (0,123 mmol) of **33** are stirred at 30°C in 200 mL of formic acid and 4 mL of chloroform during 48h. After evaporation of the solvents, the crude mixture is dissolved in dichloromethane and washed twice with NaOH (4M) before being purified by chromatography (eluant : DCM/MeOH from 98/2 to 93/7). 70 mg (46%) of a white solid are obtained.

RMN ^1H (CDCl_3 - 300MHz) : 8,08 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz) ; 7,97 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz) ; 7,87 (t, 1H, $J = 5,3$ Hz) ; 7,50 (t, 1H, $J = 4,8$ Hz) ; 7,25 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz) ; 6,86 (s, 1H) ; 6,79 (s, 1H) ; 5,76-5,90 (m, 1H) ; 5,12 (d, 1H, $J = 16,9$ Hz) ; 4,96 (d, 1H, $J = 10,2$ Hz) ; 4,75 (d, 1H, $J = 13,5$ Hz) ; 4,33 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz) ; 4,06-4,22 (m, 2H) ; 3,73-3,97 (m, 2H) ; 3,70 (s, 3H) ; 3,50-3,62 (m, 2H) ; 3,26-3,39 (m, 1H) ; 2,66-2,81 (m, 2H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 - 300MHz) : 165,30 ; 165,17 ; 154,28 ; 148,86 ; 147,15 ; 134,84 ; 134,59 ; 133,52 ; 132,21 ; 131,98 ; 128,39 ; 128,24 ; 125,47 ; 120,06 ; 116,84 ; 114,04 ; 77,71 ; 68,85 ; 56,24 ; 52, 98 ; 40,07 ; 37,35 ; 36,62.

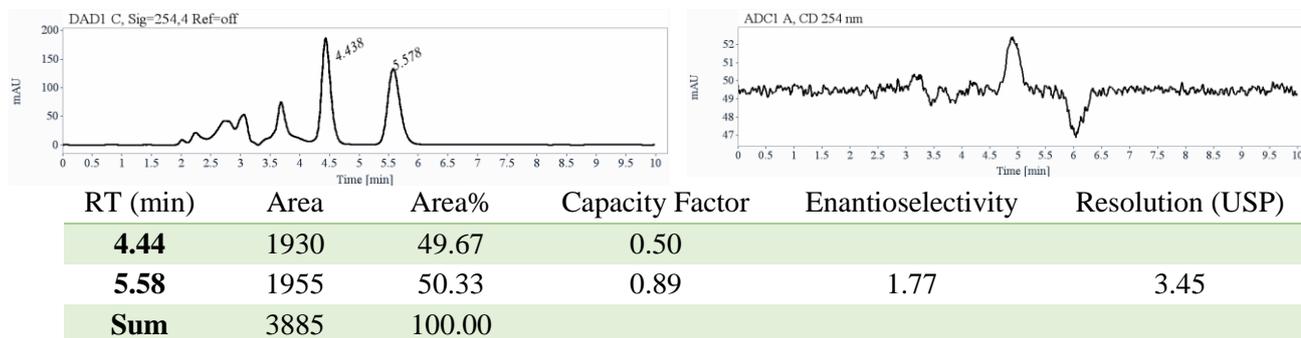
ESI-HRMS m/z calcd for (MH^+) : 1242.5394 ; found : 1242.5392.

R_f (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,47

IR : 3380 ; 3027 ; 2943 ; 1650 ; 1524 ; 1265 ; 738.

Analytical chiral HPLC separation for compound 34

The sample is dissolved in chloroform, injected on the chiral column Chiralpak ID with EtOH+Et₃N / dichloromethane (40/60) as mobile phase, and detected with an UV detector at 254 nm and dichroism circular at 254 nm. The flow-rate is 1 mL/min.



S5 : Analytical chiral HPLC analysis : chromatograms of the racemic mixture of 34.

Semi-preparative separation for compound 34:

Sample preparation: About 90 mg of compound 34 are dissolved in 6 mL of a mixture dichloromethane / ethanol (70/30).

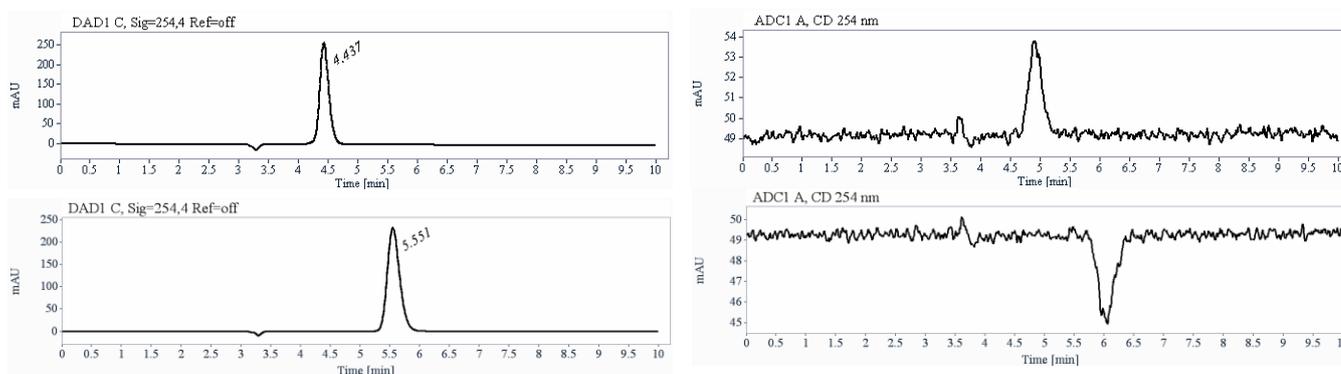
Chromatographic conditions: Chiralpak ID (250 x 10 mm), EtOH+triethylamine / dichloromethane (40/60) as mobile phase, flow-rate = 5 mL/min, UV detection at 254 nm.

Injections (stacked): 60 times 100 μ L, every 4 minutes.

Collection: the 1st eluted enantiomer is collected between 4.2 and 4.6 min, the 2nd between 5.5 and 6 min.

First fraction: 40 mg of the first eluted with ee > 99.5%. **Second fraction:** 40 mg of the second eluted with ee > 99.5%

Chromatograms of the collected fractions:



S6 : Chiral HPLC preparative separation : chromatograms of the collected fractions.

Optical rotations

λ (nm)	for the first eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (acetonitrile, c = 0.101)	for the second eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (acetonitrile, c = 0.298)
589	+ 8	- 8
578	+ 8	- 8
546	+ 10	- 10
436	+ 22	- 23
365	+ 61	- 56

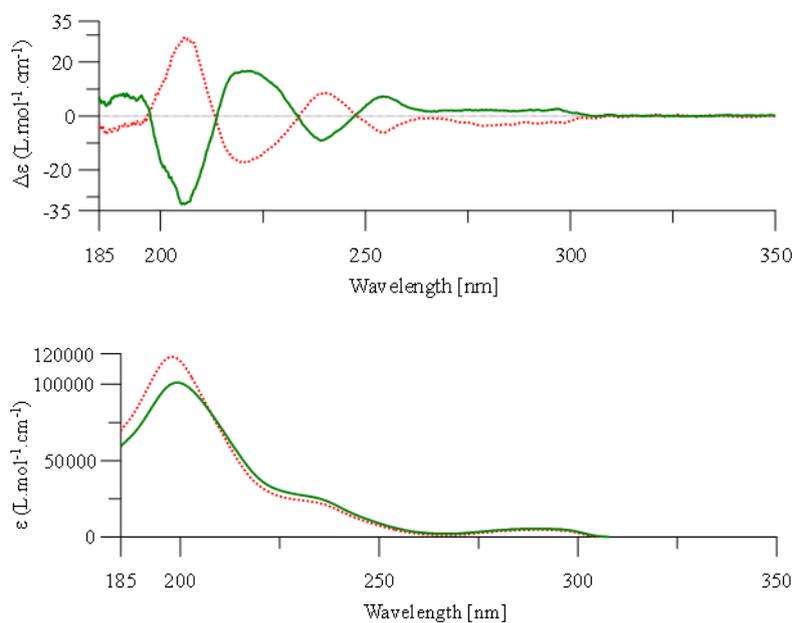
S7 : Optical activity measurement for the both enantiomers of 34.

UV spectra and Electronic Circular Dichroism

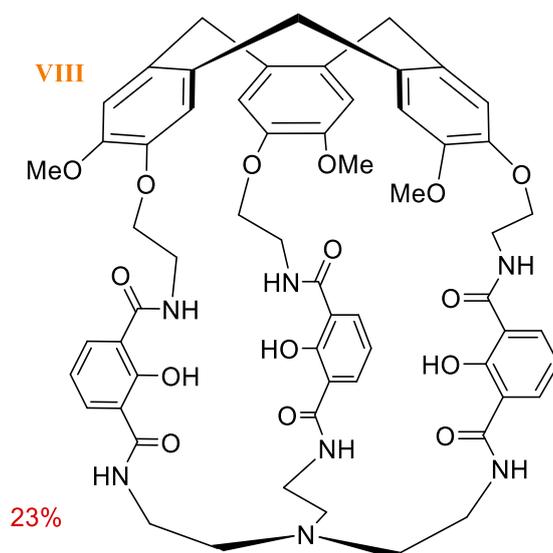
First eluted enantiomer : green solid line, concentration = 0.190 mmol.L⁻¹ in acetonitrile.

Second eluted enantiomer : red dotted line, concentration = 0.150 mmol.L⁻¹ in acetonitrile.

Acquisition parameters : 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.



S8 : Electronic circular dichroism and absorption spectra of both enantiomers of **34**.



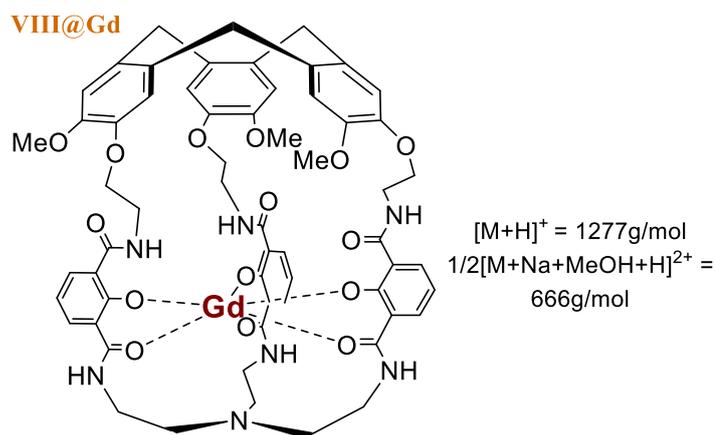
190 mg (0,153 mmol – 1eq) of **34**, 35 mg (15,3 μmol – 0,10 eq) of $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ and 211 mg (1,53 mmol – 10 eq) of K_2CO_3 are stirred under argon at room temperature in 5 mL of DCM/MeOH. After 36h, the crude mixture is washed with a saturated solution of NaHCO_3 . The organic phase is dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. A purification by chromatography (eluant : DCM/MeOH 95/5) gives 39 mg (23 %) of an orange solid. (Sometimes the product precipitates after evaporation of the organic phase and there is no need to purify by chromatography. A simple recrystallization in a DCM/ Et_2O (~10/90) allows to obtain the pure product.)

RMN ^1H ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOH}$ - 400MHz) : 7,96 (dd, 1H, $J = 7,7 \text{ Hz}$ $J' = 2 \text{ Hz}$) ; 7,60 (dd, 1H, $J = 7,7 \text{ Hz}$, $J' = 2 \text{ Hz}$) ; 7,05 (s, 1H) ; 6,99 (s, 1H) ; 6,59 (t, 1H, $J = 7,7 \text{ Hz}$) ; 4,64 (s large, 1H) ; 4,19 (m, 2H) ; 3,74 (m, 2H) ; 3,64 (s, 3H) ; 3,51 (d, 1H, $J = 12,6 \text{ Hz}$) ; 3,26 (m, 2H) ; 2,59 (m, 2H).

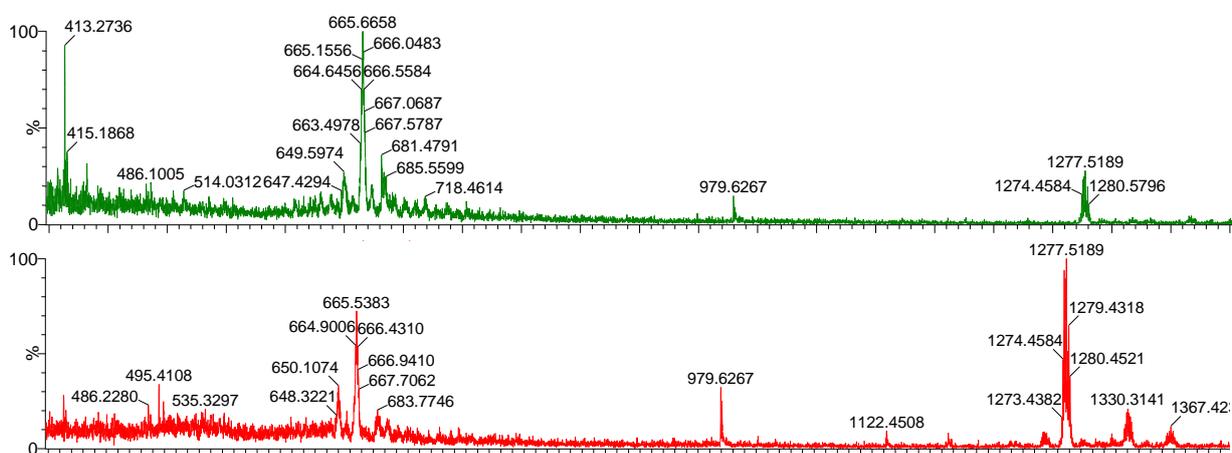
ESI-HRMS m/z calcd for (MH^+) : 1122,4455 found : 1122,4459.

Rf (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,32.

IR : 3116 – 3988 (large) ; 2919 ; 2839 ; 1597 ; 1523 ; 1256 ; 750.



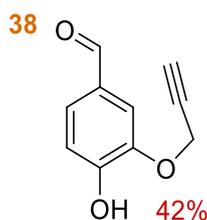
6 mg (5,3 μmol – 1eq) of the hemicryptophane **VIII** are solubilized in a mixture of 1 mL MeOH and Et₃N (1 drop – excess) the solution becomes orange. Then 3 mg (5 μmol – 0,95 eq) of Gd(OTf)₃ are added and the mixture is heated at 60°C overnight. The crude mixture contains a white solid which is filtered and analysed by mass spectroscopy, it corresponds to the complex and we still see some traces of ligand **VIII** (M+H = 1122) (depending on the voltage applied during the ionisation process).



S9 : Mass spectra of the solid (60V in green – 85V in red)

5.1.7. Cryptophane based bioprobe for ^{129}Xe MRI

5.1.7.1. Synthesis of cryptophane **41**.



To 1,5 g (62,5 mmol - 4,3 eq) of NaH previously washed with pentane under argon, is added anhydrous DMSO (50 mL). After 10 minutes of stirring, 2 g (14,5 mmol - 1 eq) of 3,4-dihydroxybenzaldehyde are added and the mixture is stirred at room temperature. After 30 minutes, 1,6 mL (14,5 mmol - 1 eq) of a solution of propargyl bromide (80% in toluene) is then added dropwise in 20 to 30 min and the mixture is stirred 5 minutes more before quenching it by addition of a 200 mL solution of acidified water (pH = 1). This aqueous solution is extracted twice with DCM and combined organic phases are washed with acidified water (pH = 1) until there is no more DMSO, dried over MgSO_4 . After evaporation the orange brown solid is purified by chromatography (eluant : DCM/PE ; 9/1) to give 1,08 g (6,15 mmol - 42%) of a yellow powder.

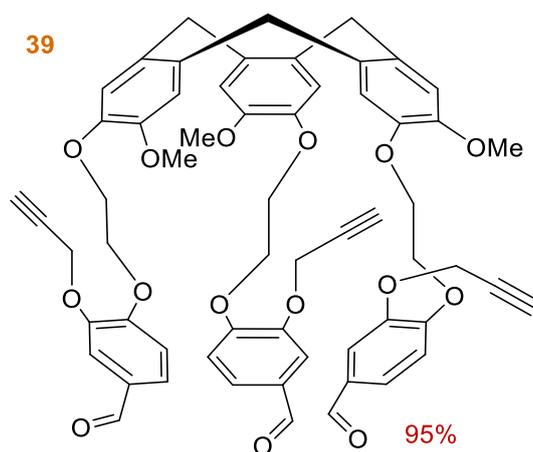
RMN- ^1H (CDCl_3 - 400MHz) : 9,82 (s, 1H) ; 7,51(d, 1H, $J = 1,8$ Hz) ; 7,46 (dd, 1H, $J = 8,1$ Hz $J' = 1,8$ Hz) ; 7,05 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz) ; 6,20 (s, 1H) ; 4,82 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz) ; 2,57 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz).

RMN- ^{13}C (CDCl_3 - 300MHz) : 190,91 ; 152,91 ; 146,30 ; 129,83 ; 128,09 ; 115,29 ; 111,28 ; 77,34 ; 77,01 ; 57,12

Rf (PE/ Et_2O ; 1/1) : 0,47.

ESI-HRMS m/z calcd for (MH^+) : 177,0533 found : 177,0535.

IR : 2830-3860 (large) 3253 ; 2925 ; 2850 ; 2121 ; 1668 ; 1591 ; 1509 ; 1436 ; 1297 ; 1162 ; 1115 ; 1015 ; 673.



600 mg (3,41 mmol – 3,4 eq) of **38** are dissolved in 15 mL of anhydrous DMSO under argon. A solution of 730 mg (1,00 mmol – 1 eq) of CTB **2** in 15 mL of DMSO is added dropwise during 20min. The resulting mixture is heated at 40°C during 20h before quenching with HCl solution (pH = 1). The acidic aqueous solution is extracted twice with DCM and the combined organic phases are then washed 4 to 6 times with pH 1 HCl solution. The organic phase is dried over anhydrous MgSO₄ before evaporation and 916 mg (95 %) of a yellow powder are isolated.

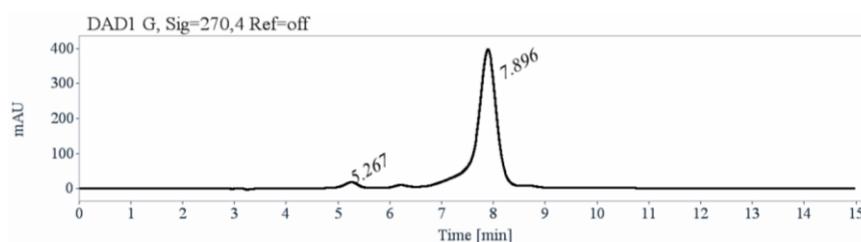
RMN ¹H (CDCl₃ - 400MHz) : 9,86 (s, 1H) ; 7,55 (d, 1H, *J* = 1,9Hz) ; 7,49 (dd, 1H, *J* = 8,3 Hz, *J'* = 1,9 Hz) ; 7,05 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz) ; 6,98 (s, 1H) ; 6,85 (s, 1H) ; 4,76 (d, 1H, *J* = 13,8 Hz) ; 4,74 (d, 2H, *J* = 2, 3 Hz) ; 4,35- 4,43 (m, 4H) ; 3,75 (s, 3H) ; 3,56 (d, 1H, *J* = 13,8 Hz) ; 2,51 (t, 1H *J* = 2,3 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 190,61 ; 154,20 ; 148,60 ; 147,48 ; 146,65 ; 133,29 ; 131,92 ; 130,19 ; 126,97 ; 116,93 ; 113,98 ; 113,46 ; 112,69 ; 78,04 ; 76,44 ; 68,67 ; 67,75 ; 56,17 ; 36,25.

Rf (DCM/MeOH ; 96/4) : 0,72.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (M+Na⁺) : 1037,3360 found : 1037, 3384. ²⁷⁴

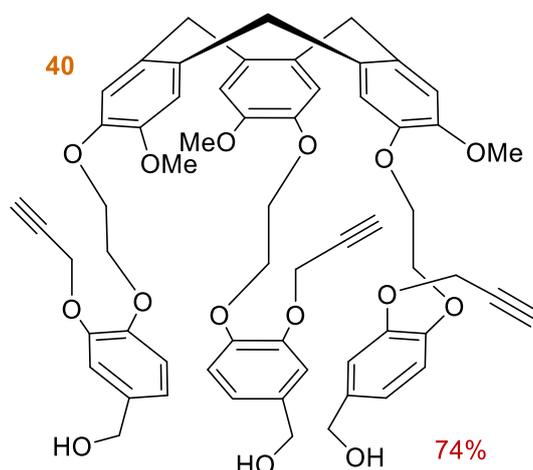
Enantioselective synthesis : The same protocole is applied using enantiopure CTB **2** (levogyre – P configuration – ee = 98%). All the evaporation steps were conducted at room temperature to avoid racemisation. The (-)-P- CTB **39** is obtained with an enantiomeric excess of 94%.



T [min]	Area	Area%	Capacity Factor	Enantioselectivity	Resolution (USP)
5,27	334	3,03	0,79		
7,90	10663	96,97	1,68	2,14	4,79
Sum	10997	100.00			

S10 : HPLC Chromatogram of (-)-P-**39** obtained on a column Chiralpak IA with heptane/isopropanol/DCM (50/10/40) as mobile phase, with a flow of 1 mL/min

²⁷⁴ O. Taratula, P.A. Hill, Y. Bai, N.S. Khan, I.J. Dmochowski, *Org. Lett.*, **2011**, 13 (6), 1414-1417.



108 mg (0,106 mmol – 1 eq) of aldehyde **39** are diluted in a THF/MeOH (2/1) mixture and 28,1 mg (0,742 mmol - 7 eq) of NaBH₄ are added at -20°C, the reaction mixture is stirred 2h at -20°C and 1 night at room temperature. The reaction is quenched by adding an acidic aqueous solution (pH = 1), and the crude mixture is extracted twice with DCM and combined organic phases are dried over MgSO₄. After evaporation, the resulting white oil is purified by chromatography (eluant : DCM/ MeOH ; 95/5) to give 80 mg (74%) of a white solid.

RMN ¹H (CDCl₃ - 400MHz) : 7,00 (s ,3H) ; 6,95 (s, 3H) ; 6,86 (large s, 6H) ; 6,79 (s, 3H) ; 4,70 (m, 3H) ; 4,57 (m, 9H) ; 4,31 (m, 12H) ; 3,67 (s, 9H) ; 3,50 (d, 3H, *J* = 13,8 Hz) , 2,42 (t, 3H, *J* = 2,2 Hz)

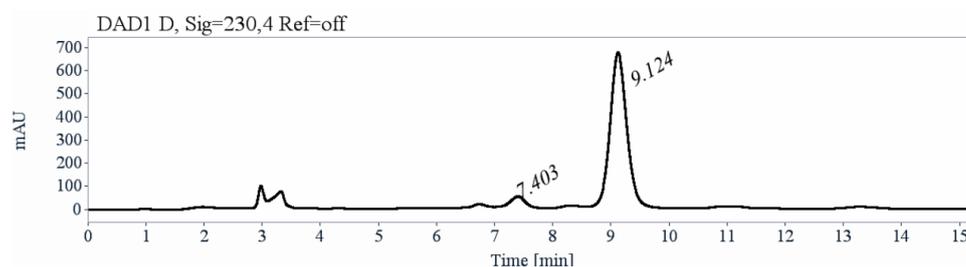
RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) ⁴: 148.5, 148.3, 147.4, 146.8, 134.8, 133.2, 132.1, 121.1, 116.8, 114.9, 114.6, 114.0, 78.8, 75.7, 68.3, 67.9, 64.2, 57.1, 56.2, 36.3.

R_f (DCM/MeOH ; 96/4) : 0,27.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (M+Na⁺) ⁴: 1043,3830 found : 1043, 3751.

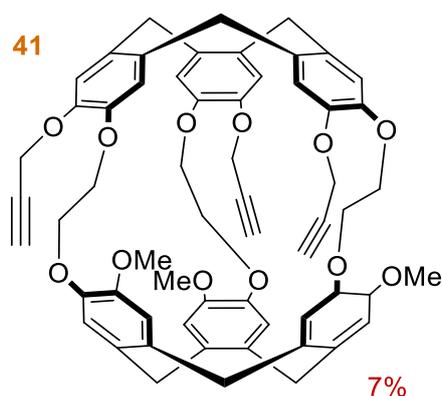
IR : 3276-3502 ; 2837 ; 2878 ; 2111 ; 1507 ; 1260 ; 1134 ; 1015

Enantioselective synthesis : The same protocole is applied using enantiopure CTB **39** (levogyre – P configuration – ee = 94%). All the evaporation steps were conducted at room temperature to avoid racemisation. The (-)-P- CTB **40** is obtained with an enantiomeric excess of 89%.



T [min]	Area	Area%	Capacity Factor	Enantioselectivity	Resolution (USP)
7,40	783	5,61	1,51		
9,12	13159	94,39	2,09	1,39	3,59
Sum	13941	100.00			

S11 : HPLC Chromatogram of (-)-P-**40** obtained on a column Chiralpak IA with heptane/isopropanol/DCM (50/10/40) as mobile phase, with a flow of 1 mL/min



550 mg (0,539 mmol – 1 eq) of 40 are solubilized in the minimum of CHCl_3 and then diluted in 600 mL of formica cid. The solution is vigorously stirred at room temperature during 24 h before removing formic acid by distillation under low pressure. The residu is then solubilized in 50 mL of CHCl_3 and washed with 50 mL of 10% NaOH solution. The aqueous phase is extracted twice with 50 mL of CHCl_3 and combined organic phases are dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. The orange oil is purified by choratography (eluant : DCM/Acetone ; 9/1) to give 37 mg (7%) of a white solid.

RMN ^1H (CDCl_3 - 400MHz) : 6,90 (s, 3H) ; 6,79 (s, 3H) ; 6,76 (s, 3H) ; 6,70 (s, 3H) ; 4,52-4,71 (m, 12H) ; 4,16 (d, 6H, $J = 2,2$ Hz) ; 4,15 (m, 6H) ; 3,82 (s, 9H) ; 3,42 (d, 3H, $J = 13,8$ Hz) ; 3,41 (d, 3H, $J = 13,8$ Hz) ; 2,69 (t, 3H, $J = 2,2$ Hz)

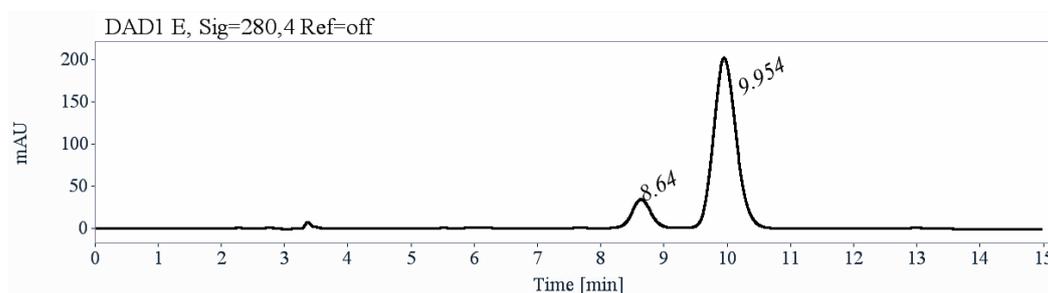
RMN ^{13}C (CDCl_3 - 300MHz) : 149,81 ; 148,02 ; 147,61 ; 146,72 ; 134,22 ; 133,47 ; 131,64 ; 121,98 ; 120,80 ; 117,57 ; 114,16 ; 79,07 ; 76,28 ; 69,64 ; 69,47 ; 57,53 ; 56,34 ; 36,34 ; 36,30 ; 31,03.

Rf (DCM/Acetone ; 9/1) : 0,80.

ESI-HRMS m/z calcd for $(\text{M}+\text{NH}_4^+)$: 984,3954 found : 984,3958.

IR : 3276 ; 2937 ; 2872 ; 2117 ; 1507 ; 1268 ; 728 ; 540.

Enantioselective synthesis : The same protocole is applied using enantiopure CTB **40** (levogyre – P configuration - ee = 88%). All the evaporation steps were conducted at room temperature to avoid racemisation. The cryptophane **41** (anti configuration P-M) is obtained with an enantiomeric excess of 75%.

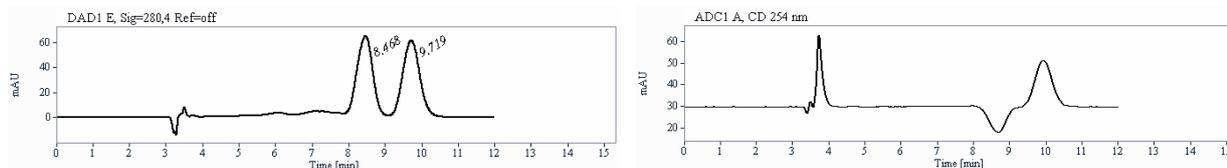


T [min]	Area	Area%	Capacity Factor	Enantioselectivity	Resolution (USP)
8.64	726	12.60	1.93		
9.95	5040	87.40	2.37	1.23	2.17
Sum	5766	100.00			

S12 : HPLC Chromatogram of anti-cryptophane **41** obtained on a column Chiralpak IE with CHCl_3 / EtOH (70/30) as mobile phase, with a flow of 1 mL/min.

Analytical chiral HPLC separation for compound **41**

The sample is dissolved in chloroform, injected on the chiral column Chiralpak IE with a 70/30 mixture of EtOH / CHCl₃, and detected with an UV detector at 254 nm and circular dichroism at 254 nm. The flow-rate is 1 mL/min.



T [min]	Area	Area%	Capacity Factor	Enantioselectivity	Resolution (USP)
8.47	1854	48.76	1.87		
9.72	1949	51.24	2.29	1.23	1.52
Sum	3803	100.00			

S12 : Analytical chiral HPLC analysis : chromatograms of the racemic mixture of **41**.

Semi-preparative separation for compound **41** :

Sample preparation : About 55 mg of compound **41** are dissolved in 7 mL of the mixture of chloroform/Ethanol.

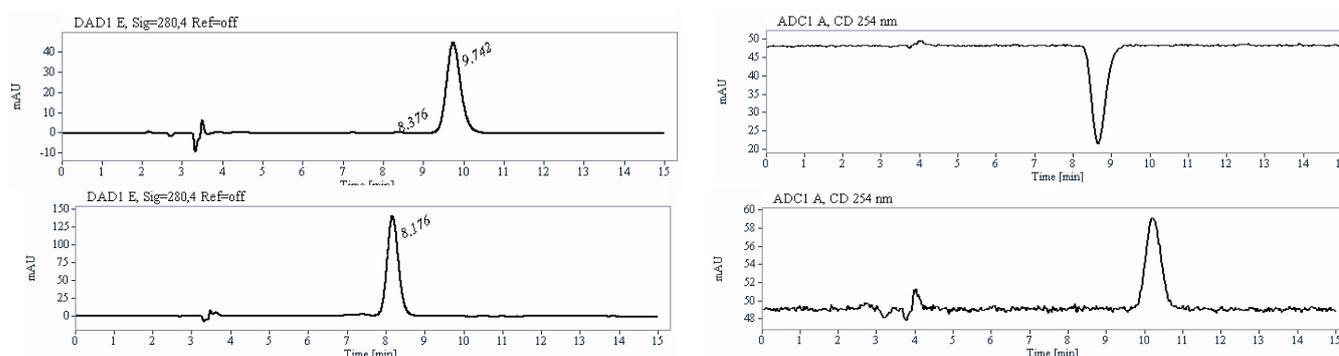
Chromatographic conditions : Chiralpak IE (250 x 10 mm), EtOH / chloroform (70/30) as mobile phase, flow-rate = 5 mL/min, UV detection at 254 nm.

Injections (stacked) : 35 times 200 μL, every 5 minutes.

First fraction : 24 mg of the first eluted with ee > 99.5%

Second fraction : 14 mg of the second eluted with ee > 98.5%

Chromatograms of the collected fractions (right : UV detection , left : circular dichroism detection)



S13 : Chiral HPLC preparative separation : chromatograms of the collected fractions.

Optical rotations

λ (nm)	for the first eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (acetonitrile, c = 0.145)	for the second eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (acetonitrile, c = 0.075)
589	- 159	+ 159
578	- 166	+ 165
546	- 192	+ 191
436	- 368	+ 371
365	- 715	+ 720

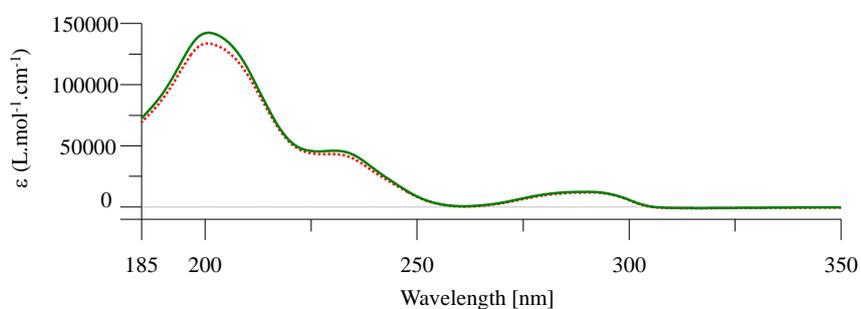
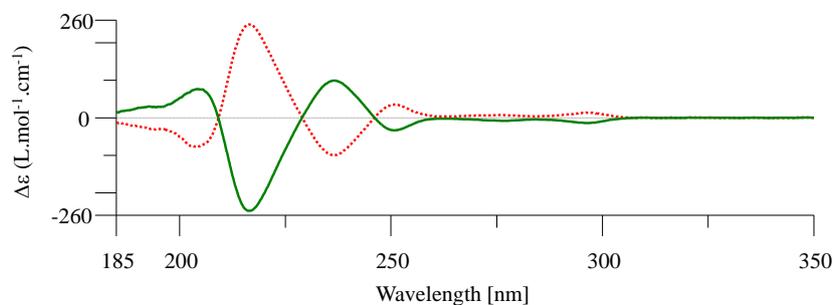
S14 : Optical activity measurement for the both enantiomers of **41**.

UV Spectra and Electronic Circular Dichroism

First eluted enantiomer : green solid line, concentration = 0.124 mmol.L⁻¹ in acetonitrile.

Second eluted enantiomer : red dotted line, concentration = 0.124 mmol.L⁻¹ in acetonitrile.

Acquisition parameters: 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.



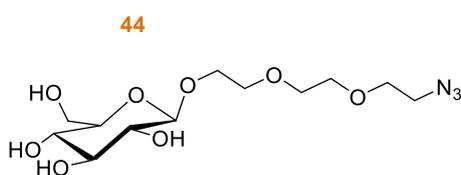
S15 : Electronic circular dichroism and absorption spectra of both enantiomers of **41**

5.1.7.2. Binding cryptophane **41** to hexose by click chemistry (realized in Lyon by Yoann Pascal under the supervision of Pr S. Vidal)

General Methods:

Solvents were purchased dry. All reactions were performed under an argon atmosphere. NMR spectra were recorded at 293 K, unless otherwise stated, using a 300 MHz or a 400 MHz Bruker spectrometer. Shifts are referenced relative to deuterated solvent residual peaks. Assignments were deduced from 2D experiments (HSQC and HMBC). High resolution (HR-ESI-QTOF) mass spectra were recorded using a Bruker MicrOTOF-Q II XL spectrometer. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on aluminum sheets coated with silica gel 60 F254 (Merck). TLC plates were inspected by UV light ($\lambda = 254$ nm) and developed by treatment with a mixture of 10% H₂SO₄ in EtOH/H₂O (90:10 v/v) followed by heating. Silica gel column chromatography was performed with silica gel Si 60 (40–63 μ m) or C18 silica gel column chromatography (Reveleris 4g C18 Silica Flash Chromatography).

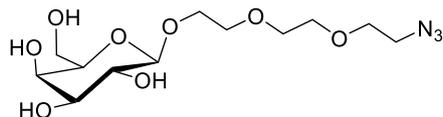
Synthesis :



The original publication concerning this synthesis containing all the information about the protocol and characterizations is : A.K. Sankin, L.K. Mahal, *Synlett*, **2006**, 3, 455-459.

But S. Vidal's group uses the same conditions as **45** with 1,2,3,4,6-pentaO-acetyl- β -D-glucopyranose as starting material. Neither the synthesis nor the characterizations have been published.

45



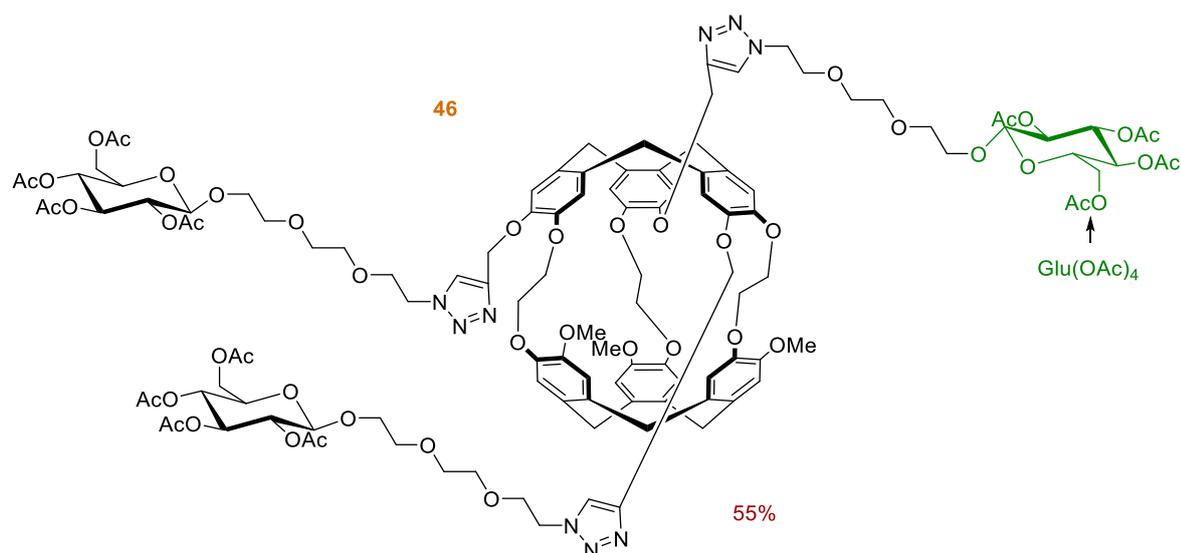
SnCl_4 (pure 8,7 mL - 76.9 mmol - 3 eq) is added dropwise (within 90 min via syringe pump) at rt to a stirred solution of 1,2,3,4,6-pentaO-acetyl- β -D-galactopyranose **43** (10 g, 25.6 mmol, 1 eq.), silver trifluoroacetate (8,49 g - 38,4 mmol - 1,5 eq) and 2-[2-(2chloroethoxy)ethoxy]ethanol (5,6 mL - 38,4 mmol - 1.5 eq.) in freshly distilled DCM (400 mL). The mixture is protected from light. Disappearance of the starting material is observed (TLC monitoring) 10 min after all SnCl_4 was added. The mixture is transferred in saturated aqueous NaHCO_3 and the pH is checked to be above 8. The solution is vigorously stirred for 15 min. The biphasic solution is extracted with DCM. The organic layers are combined, washed successively with saturated aqueous NaHCO_3 (2 \times 250 mL), water (2 \times 250 mL) and brine (250 mL) and dried over Na_2SO_4 . After evaporation, contaminants such as metallic salts are removed by filtration on a plug of silica gel ($\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$, 8:2). To the resulting oil is added sodium azide (6,3 g - 96,4 mmol - 4 eq) and $n\text{Bu}_4\text{NI}$ (0,712 g - 1.9 mmol - 0,1 eq) and DMF (100 mL). The mixture is stirred at 70 $^\circ\text{C}$ under argon for 16h. The mixture is cooled to rt, transferred into brine (1L) and extracted with EtOAc (3 \times 250 mL). The organic layer is washed with NaHCO_3 (2 \times 200 mL), water (2 \times 200 mL), brine (200 mL) and dried over Na_2SO_4 . After concentration, the residue is purified by chromatography ($\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$, 8:2) to afford the corresponding azido-functionalized β -galactoside **45** as a colorless gum (8,02 g- 62% over 2 steps).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) : 1.96, 2.02, 2.04, 2.13 (4s, 4 \times 3H, CH_3CO), 3.38 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz, CH_2N_3), 3.60-3.81 (m, 9H, OCH_2), 3.88-4.01 (m, 2H, OCH_2), 4.07-4.19 (m, 1H), 4.56 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 5.00 (dd, 1H, $J = 3.4$ Hz, $J = 10.5$ Hz,), 5.18 (dd, 1H, $J = 7.9$ Hz, $J = 10.5$ Hz), 5.37 (dd, 1H, $J < 1$ Hz, $J = 3.4$ Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) : 20.3, 20.4, 20.4, 20.5 (4s, 4 \times CH_3CO), 50.4 (CH_2N_3), 61.0, 66.8, 68.5, 68.8, 69.8, 70.1 (3s, 3 \times CH_2O), 70.4, 70.4, 70.5 (2s, 2 \times CH_2O), 70.6, 101.1, 169.2, 169.9, 170.0, 170.1 (4s, 4 \times CH_3CO).

Rf (PE/EtOAc , 1:1) = 0.34. *

* protocol and characterizations taken from the ref 227 (Ph-D manuscript from S. Cecioni, *Approche multivalente des interactions saccharides/lectines : synthèse de glycoclusters et analyse de la reconnaissance biomoléculaire*, ICBMS Lyon I, 2010, HAL Id: tel-00732336.)



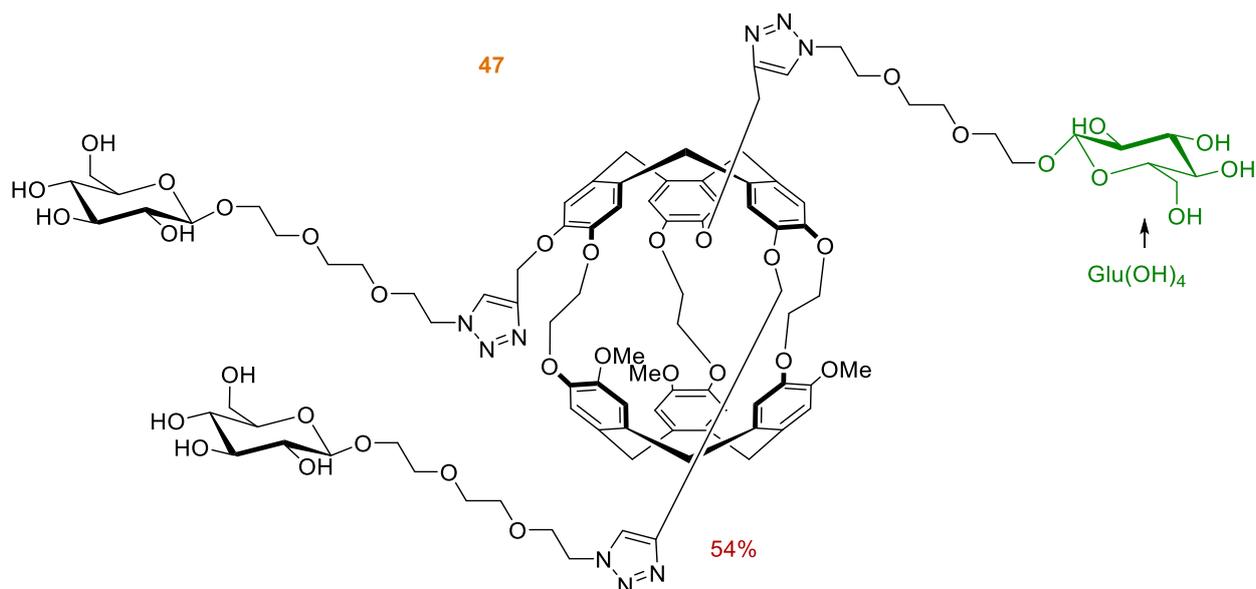
Cryptophane **41** (40 mg - 0,041 mmol - 1 eq), 1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside **44** (84 mg - 0.165 mmol - 4 eq) and CuI (3.1 mg - 0,0165 mmol - 0.4 eq) are suspended in dry DMF (5 mL) and placed under inert atmosphere (Ar). DIPEA (29 μ L - 0,165 mmol - 4 eq) is added and the white suspension is stirred at r.t. for 6 days. After solvent evaporation, the crude residue is purified by flash silica gel column chromatography (pure EtOAc then 19:1 EtOAc/MeOH) to afford the desired product **42** (56 mg, 55%) as a transparent oil.

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): 8.17 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-triazole), 7.12 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.92 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.83; 6.81 (2s, 2H, H_{Ar}), 5.28-5.16 (m, 3H, OCH_2 -triazole + H_3), 5.01 (td, J = 1.0; 9.8 Hz 1H, H_4), 4.92 (m, 1H, H_2), 4.72-4.54 (m, 5H, H_1 + NCH_2 + ArCH_2Ar), 4.34 (s, 4H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{OAr}$), 4.30-4.20 (m, 1H, H_6), 4.10 (m, 1H, H_6'), 3.98 (t, J = 5.0 Hz, 2H, NCH_2CH_2), 3.90-3.55 (m, 12H, $4 \times \text{OCH}_2$ + OCH_3 + H_5), 3.50-3.32 (m, 2H, ArCH_2Ar), 2.02-1.96 (m, 9H, $3 \times \text{COCH}_3$), 1.94 (s, 3H, COCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): 170.8; 170.4; 170.0; 169.8 (4s, 4C, $4 \times \text{COCH}_3$), 150.4; 149.3; 148.1; 147.4 (4s, 4C, $\text{C}_{\text{Ar-O}}$), 134.6; 134.5; 134.4; 133.9; 132.8 (5s, 5C, $\text{C}_{\text{Ar-CH}_2} + \text{C}^{\text{iv}}$ -triazole), 125.0 (CH-triazole), 121.7, 120.7, 118.9, 116.4 (4s, 4C, CH_{Ar}), 101.4 (C_1), 73.5 (C_3), 72.3 (C_5), 72.1 (C_2), 71.2; 71.1; 70.8; 70.2; 69.91; 69.86; 69.6 (7s, 8C, OCH_2), 69.5 (H_4), 64.5 (OCH_2 -triazole), 62.1 (C_6), 57.2 (OCH_3), 50.8 (NCH_2), 36.3; 36.2 (2s, 2C, ArCH_2Ar), 20.73; 20.69; 20.57 (3s, 4C, $4 \times \text{COCH}_3$).

ESI-HRMS m/z : calcd. for $\text{C}_{120}\text{H}_{149}\text{N}_9\text{O}_{48}$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 1241.9742$, found 1241.9714.

R_f (19/1 ; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) = 0.4

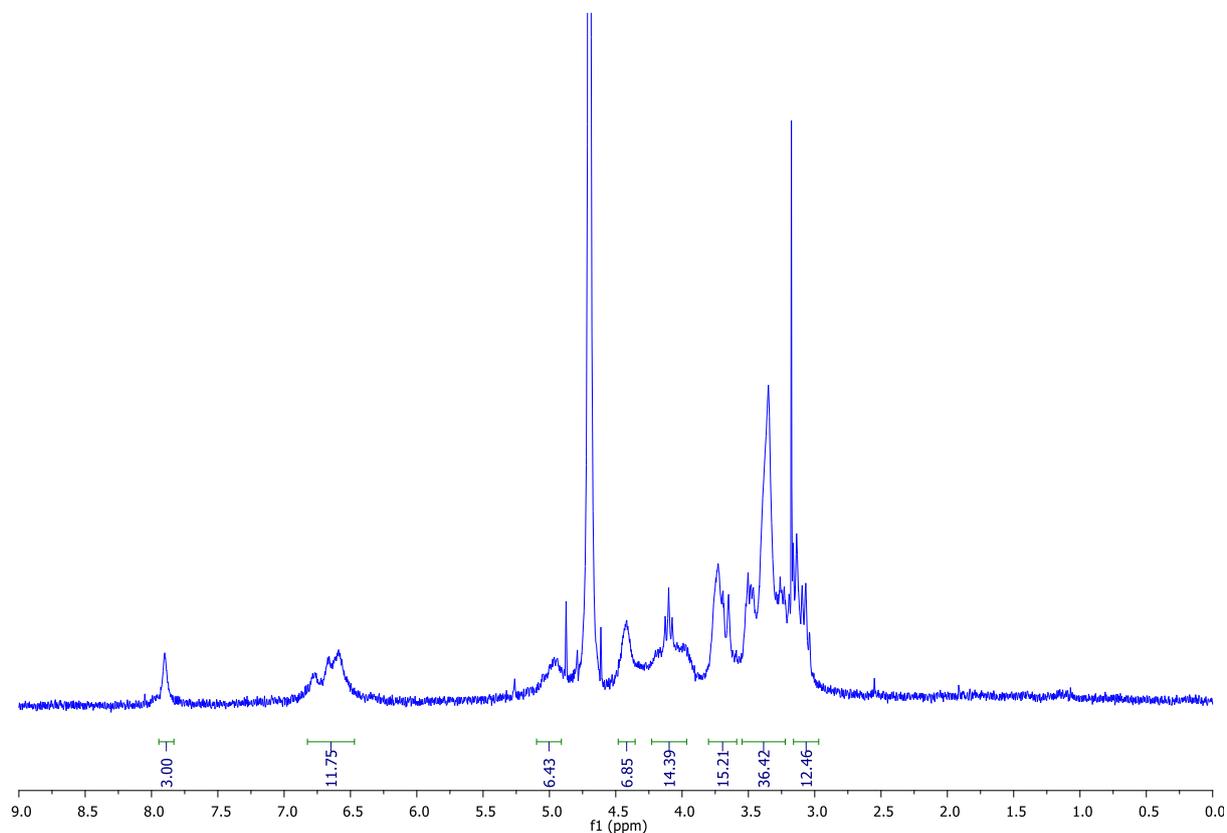


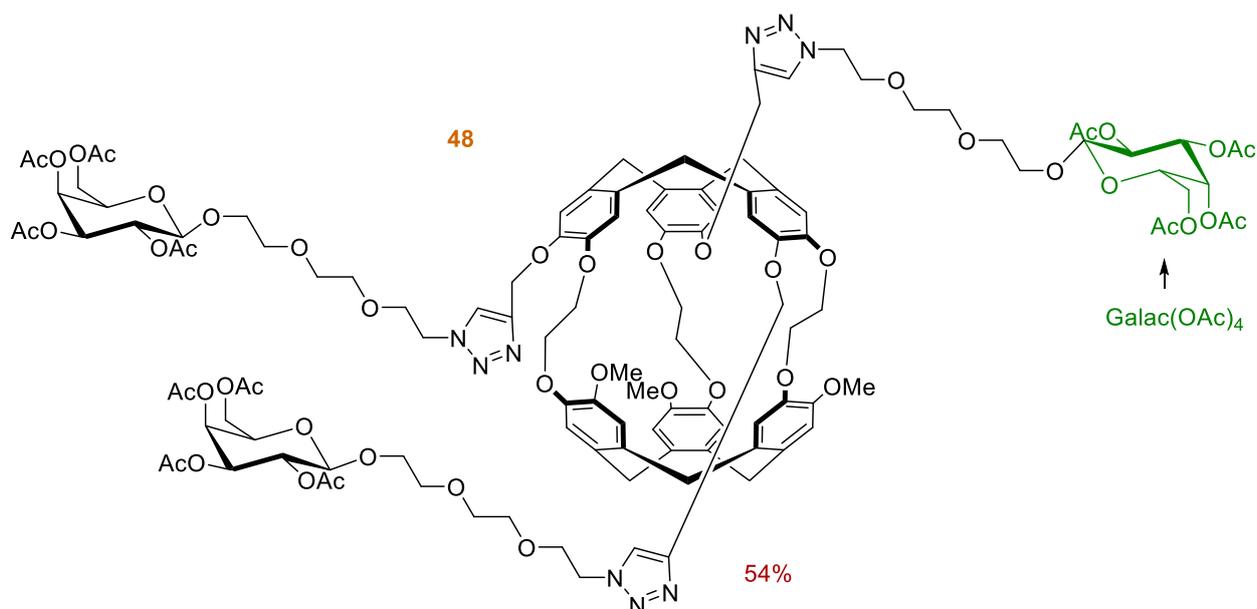
Cryptophane **42** (56 mg - 0,022 mmol – 1 eq) and MeONa (7 mg - 0,123 mmol - 5,4 eq.) are dissolved in dry MeOH/CH₂Cl₂ (5:1, 6 mL) under inert atmosphere (Ar) and stirred at r.t. for 20 h. The solvent are evaporated and the crude residue is purified by 4 g C18 silica gel column chromatography (Gradient: H₂O/MeOH, 5 CV 100% H₂O, 20 CV 0 to 100% MeOH then 5 CV 100% MeOH) to afford the desired product **43** (24 mg, 54%) as a transparent oil.

ESI-HRMS m/z : calcd. for C₉₆H₁₂₅N₉O₃₆ : [M+2H]²⁺ = 989.9108, found 989.9099.

R_f = 0 (99:1 CH₂Cl₂-MeOH)

¹H NMR (300 MHz, D₂O saturated in CD₂Cl₂) :





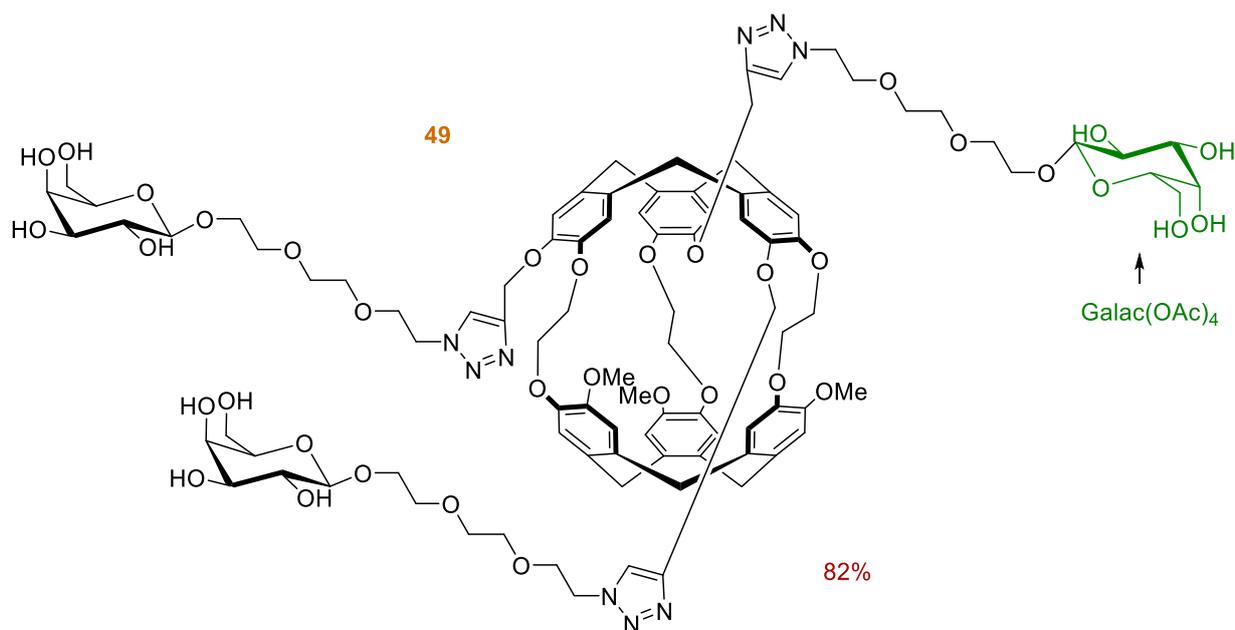
Cryptophane **41** (40 mg - 0,041 mmol – 1 eq), 1-azido-3,6-dioxaoct-8-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranoside **45** (84 mg - 0,165 mmol - 4 eq) and CuI (3.1 mg - 0.0165 mmol, - 0,4 eq) are suspended in dry DMF (5 mL) and placed under inert atmosphere (Ar). DIPEA (29 μ L - 0.165 mmol - 4 eq) is added and the white suspension is stirred at r.t. for 5 days before being heated at 70°C for 48 h. Solvent is evaporated and the crude residue is purified by flash silica gel column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH 99:1 then 96:4) to afford the desired product **44** (55 mg, 54%) as a transparent oil.

¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): 8.22 (s, 1H, H-triazole), 7.12; 6.92; 6.84; 6.81 (4s, 4H, H_{Ar}), 5.36 (bs, 1H, H₄), 5.24 (s, 2H, OCH₂-triazole), 5.15-5.05 (m, 2H, H₂ + H₃), 4.74-4.54 (m, 5H, NCH₂ + H₁ + ArCH₂Ar), 4.33 (s, 4H, ArOCH₂CH₂OAr), 4.14-4.08 (m, 3H, H₅ + H₆), 3.99 (t, *J* = 5 Hz, 2H, NCH₂CH₂), 3.95-3.85 (m, 1H, Gal-OCH₂), 3.75-3.70 (m, 1H, Gal-OCH₂), 3.70-3.58 (m, 9H, 3×OCH₂ + OCH₃), 3.46-3.34 (4s, 2H, ArCH₂Ar), 2.11; 2.02; 2.00; 1.99; 1.92 (5s, 12H, 4×COCH₃)

¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): 170.8; 170.6; 170.3; 169.9 (4s, 4C, 4×COCH₃), 150.4; 149.2; 148.1; 147.4 (4s, 4C, C_{Ar}-O), 134.55; 134.52; 134.4; 134.0, 132.8 (5s, 5C, C_{Ar}CH₂+C^{iv}-triazole), 125.3 (CH-triazole), 121.5; 120.7; 119.0; 116.6; (4s, 4C, CH_{Ar}), 101.9 (C₁) 71.7 (C₃), 71.4 (C₅), 71.3; 71.1; 70.8; 70.2; 69.83; 69.80; 69.6, (7s, 8C, OCH₂) 69.7 (C₂), 68.3 (C₄), 64.5 (OCH₂-triazole), 62.1 (C₆), 57.2 (OCH₃), 51.0 (NCH₂), 36.3; 36.2 (2s, 2C, ArCH₂Ar), 20.8; 20.7; 20.6 (3s, 4C, 4×COCH₃).

ESI-HRMS *m/z* : calcd. for C₁₂₀H₁₄₇N₉Na₃O₄₈ : [M+3Na]³⁺ = 850.3005, found 850.3013.

R_f(99/1 ; CH₂Cl₂/MeOH) = 0,4.

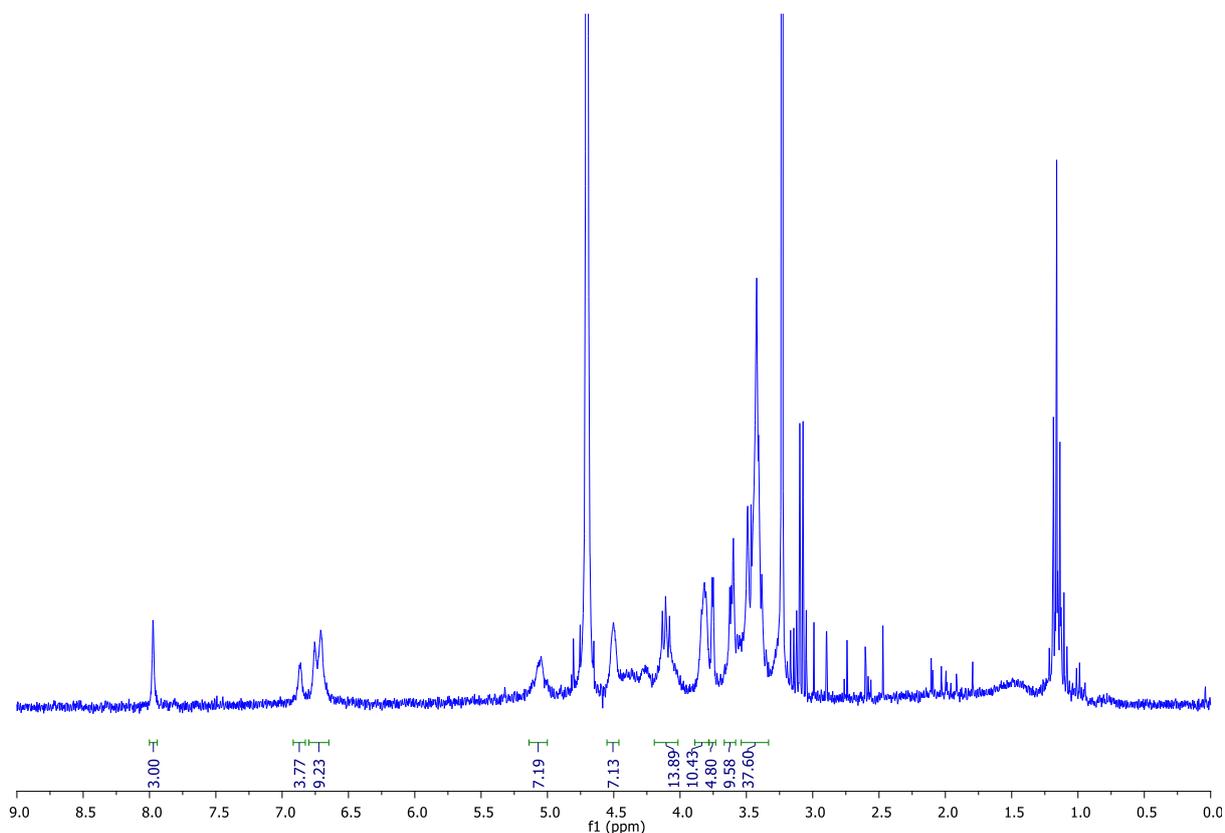


Cryptophane **44** (55 mg - 0.022 mmol – 1 eq) is dissolved in a mixture of MeOH/H₂O/triethylamine (4:1:1, 6 mL) under inert atmosphere (Ar) and stirred at r.t. for 24 h. The solvent are evaporated and the crude residue is purified 4 g C18 silica gel column chromatography (Gradient: H₂O/MeOH, 5 CV 100% H₂O, 10 CV 100% MeOH then 4 CV 100% MeOH) to afford the desired product **45** (36 mg, 82%) as a slightly yellow oil.

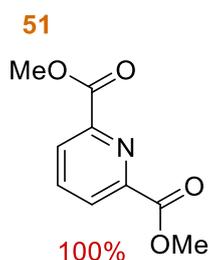
R_f (99/1 ; CH₂Cl₂/MeOH) = 0.

ESI-HRMS *m/z* : calcd. for C₉₆H₁₂₅N₉O₃₆ : [M+2H]²⁺ = 989.9108, found 989.9086.

¹H NMR (300 MHz, D₂O saturated in CD₂Cl₂) :



5.1.8. Synthesis of hemicryptophane IX and complexation with several lanthanide ions.



1 g (6 mmol – 1 eq) of commercial dipicolinic acid is dissolved in 6 mL of MeOH and 0,2 mL (3,5 mmol – 0,5 eq) of H₂SO₄ are added. The mixture is warmed to reflux during 48h. The excess of acid is neutralised by adding a saturated solution of NaHCO₃, until the pH increases to 7-8. After evaporation of the MeOH, the aqueous solution is extracted twice with DCM, and the combined organic phases are washed twice with water, then brine and dried over anhydrous MgSO₄ before evaporation. 1,193g (100%) of a white powder are obtained.

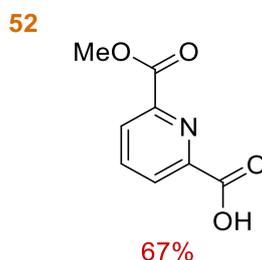
RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 8,29 (d, 2H, *J* = 7,8 Hz) ; 7,99 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz) ; 4,03 (s, 6H).

RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 165,26 ; 148,48 ; 138,52 ; 128,16 ; 53,34.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MH⁺) : 196,0604, found : 196,0604.

Tfus = 122,5 °C.

IR : 3062 ; 2966 ; 2929 ; 2853 ; 1738 ; 1665 ; 1570 ; 1437 ; 1241.



7,0 g (35,9 mmol) of **46** are dissolved at room temperature in 120 mL of MeOH and cooled to 0°C. 2,01 g (35,9 mmol - 1eq) of KOH are added by portions. The crude mixture is stirred 2h at 0°C and then 24h at room temperature. After evaporation of MeOH, 50 mL of EtOAc are added, the white solid is filtered and dissolved in water acidified to pH=1 with HCl. This aqueous solution is extracted 3 times with DCM. Organic phases are dried over MgSO₄ and evaporated. 4,378 g (24,1 mmol, 67%) of a white solid are obtained.

RMN ¹H (CD₃OD - 300MHz) : 8.22 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.1 Hz) ; 8.16 (dd, 1H, *J* = 7.7, 1.1 Hz) ; 8.04 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz) ; 4,00 (s, 3H).

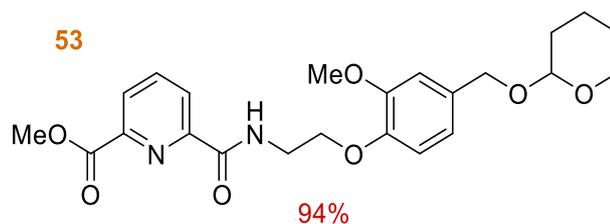
RMN ¹³C (CDCl₃ - 400MHz) : 164,3 ; 163,8 ; 146,9 ; 146,6 ; 139,7 ; 128,9 ; 127,1 ; 53,3.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MH⁺) :182,0448, found : 182,0449.

Rf (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,03.

Tfus = 151°C.

IR : 2600-3100 (large) ; 1722 ; 1693 ; 1580 ; 1449 ; 1250.



1,5g (5,34 mmol - 1 eq) of amine **26**, 966 mg (5,34 mmol - 1 eq) of acide **47** and 377 mg (3,74 mmol - 0,73 eq) of N-methylmorpholine were dissolved in 15 mL DMF. A solution of 2,78 g (5,34 mmol - 1 eq) of PyBOP and 377 mg (3,74 mmol - 0,73 eq) of N-methylmorpholine in 20 mL of DMF is added dropwise at rt in 20 min and the mixture is stirred overnight at rt. After partial evaporation of DMF, the crude mixture is dissolved in 150 mL of DCM and washed with water. The organic phase is dried over MgSO₄ and evaporated. A purification by chromatography (eluant : EtOAc/PP, 7/3) leads to 2,176 g (94%) of product **48** as a pale yellow oil.

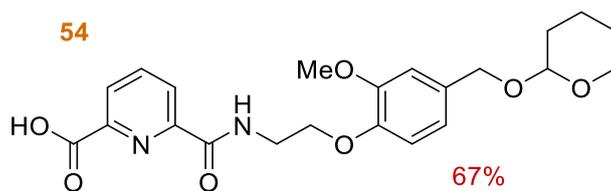
RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 8,65 (t, 1H, *J* = 5,5Hz) ; 8,31 (dd, 1H, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 1Hz) ; 8,16 (dd, 1H, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 1Hz) ; 7,94 (t, 1H, *J* = 7,8Hz) ; 6,82-6,90 (m, 3H) ; 4,65(d, 1H, *J* = 11,8Hz) ; 4,62 (t, 1H, *J* = 3,7Hz) ; 4,38 (d, 1H, *J* = 11,8Hz) ; 4,16(t, 2H, *J* = 5,1Hz) ; 3,95 (s, 3H) ; 3,82-3,89 (m, 3H) ; 3,84 (s, 3H) ; 3,49-3,54 (m, 1H) ; 1,42-1,84 (m, 6H).

RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 165,15 ; 164,04 ; 158,59 ; 150,32 ; 147,68 ; 146,75 ; 138,60 ; 132,24 ; 125,59 ; 120,84 ; 114,92 ; 112,32 ; 97,77 ; 68,83 ; 68,78 ; 62,45 ; 56,16 ; 52,97 ; 39,25 ; 30,75 ; 25,60 ; 19,61.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MH⁺) :445,1969, found : 445,1968.

R_f (EtOAc/PE ; 70/30) : 0,27.

IR : 3380 ; 3062 ; 2966 ; 2929 ; 2853 ; 1738 ; 1655 ; 1570 ; 1437 ; 1241.



2,9 g (6,73 mmol - 1 eq) of **48** are dissolved in 80 mL of MeOH at rt, and 707mg (16,8 mmol - 2,5 eq) of LiOH are added portionwise. The mixture is stirred 30 min at rt. Then, the solvent is evaporated and the resulting oil is dissolved in DCM, washed 3 times with water. The organic phase is dried over MgSO₄ and evaporated. 1,89 g (4,54 mmol - 67%) of a transparent oil are obtained.

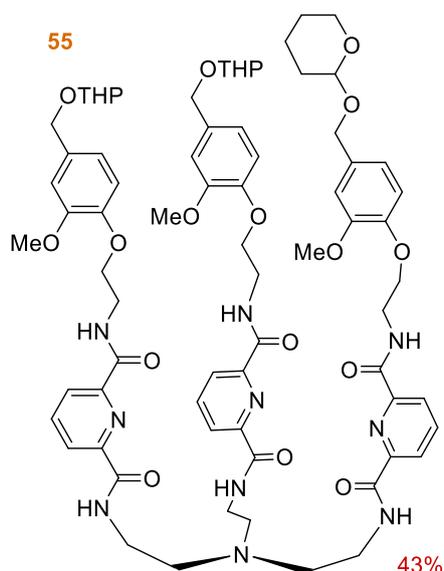
RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 9,07 (t, 1H, *J* = 5,5Hz) ; 8,41 (dd, 1H, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 1Hz) ; 8,33 (dd, 1H, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 1Hz) ; 8,01 (t, 1H, *J* = 7,8Hz) ; 6,82-6,91 (m, 3H) ; 4,67 (d, 1H, *J* = 11,8Hz) ; 4,64 (t, 1H, *J* = 3,7Hz) ; 3,40 (d, 1H, *J* = 11,8Hz) ; 4,15 (t, 2H, *J* = 5,1Hz) ; 3,86-3,91 (m, 3H) ; 3,85 (s, 3H) ; 3,49-3,54 (m, 1H) ; 1,46-1,85 (m, 6H).

RMN ¹³C (CDCl₃- 300MHz) : 164,51 ; 163,38 ; 149,51 ; 149,26 ; 147,56 ; 145,67 ; 139,65 ; 132,21 ; 126,79 ; 126,46 ; 121,22 ; 113,80 ; 112,45 ; 97,92 ; 68,81 ; 68,66 ; 62,52 ; 56,36 ; 39,19 ; 30,74 ; 25,58 ; 19,62.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MH⁺) : 431,1813, found : 431,1809.

R_f (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,13.

IR : 3450 ; 3303 ; 2940 ; 2872 ; 1748 ; 1674 ; 1571 ; 1536 ; 1455 ; 1261.



With PyBOP as coupling agent :

1,46g (3,51 mmol- 3,3 eq) of carboxylic acid **49**, 154 mg (1,06 mmol - 1eq) of TREN and 93 mg (0,91 mmol- 0,85 eq) of N-methylmorpholine were dissolved in 15 mL DMF. A solution of 1,66 g (3,19 mmol -3 eq) of PyBOP and 93 mg (0,91 mmol - 0,85 eq) of N-methylmorpholine in 15 mL of DMF is added dropwise at rt in 20 min and the mixture is stirred overnight at rt. After partial evaporation of DMF, the crude mixture is dissolved in 150mL of DCM and washed with water. The organic phase is dried over MgSO₄ and evaporated. Two successive purifications by chromatography (eluant : EtOAc/THF, 6/4) leads to the obtention of 127 mg of product as a transparent oil. (12%)

With HOBt & DCC as coupling agents :

850 mg (3,87 mmol – 3,3 eq) of carboxylic acid **49** are solubilized in 25 mL of CH₃CN, then 538 mg (3,52 mmol – 3 eq) of HOBt and 725 mg (3,52 mmol – 3 eq) of DCC are inserted. Then 166 mg (1,17 mmol – 1eq) of tren and 1,513 g (11,73 mmol - 10 eq) of DIPEA added and the mixture is stirred 1 night at room temperature. The white solid is filtered and the crude solution evaporated. The residue is dissolved in 30 mL DCM and washed twice with water acidified to pH 3-4 with a 1M HCl solution. The organic phase is dried over MgSO₄, filtered and evaporated before purification with two chromatography columns (first : eluant = DCM/ THF / MeOH ; 60/40/3 and second DCM/MeOH 97/3 to 94/6). 690 mg (43%) of a transparent oil are isolated.

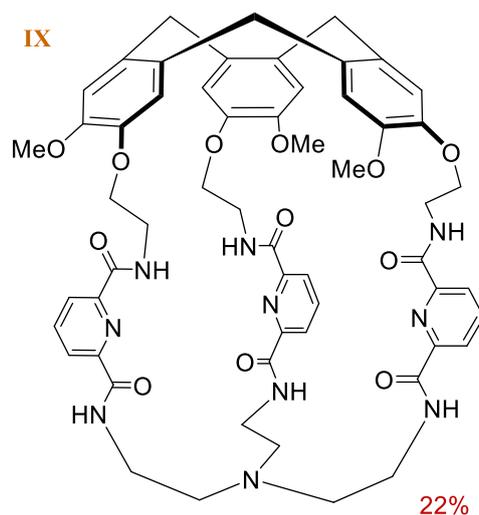
RMN ¹H (CDCl₃ - 300MHz) : 9,57 (t, 3H, *J* = 5,5 Hz) ; 9,30 (t, 3H, *J* = 5,8 Hz) ; 8,22 (dd, 3H, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 1 Hz) ; 8,11 (dd, 3H, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 1 Hz) ; 7,87 (t, 3H, *J* = 7,8 Hz) ; 6,75-6,81 (m, 9H) ; 4,60 (d, 3H, *J* = 11,6 Hz) ; 4,57 (t, 3H, *J* = 3 Hz) ; 4,33 (d, 3H, *J* = 11,6 Hz) ; 4,28 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz) ; 3,98 (m, 6H) ; 3,82-3,84 (m, 6H) ; 3,77 (s, 9H) ; 3,42-3,49 (m, 3H) ; 2,48 (m, 3H) ; 2,36 (m, 3H) ; 2,19 (m, 3H) ; 1,4-1,8 (m, 18H).

RMN ¹³C (CDCl₃ - 300MHz) : 165,2 ; 164,0 ; 149,1 ; 148,8 ; 148,0 ; 147,5 ; 139,0 ; 131,6 ; 125,2 ; 124,7 ; 121,0 ; 112,7 ; 111,8 ; 97,8 ; 68,8 ; 62,5 ; 55,8 ; 39,2 ; 34,1 ; 32,2 ; 30,73 ; 27,9 ; 25,5 ; 19,6.

ESI-HRMS *m/z* calcd for (MH⁺) : 1383,6507, found : 1383,6541.

R_f (EtOAc/THF ; 60/40) : 0,12.

IR : 3252 ; 2930 ; 2861 ; 1667 ; 1589 ; 1511 ; 1439 ; 1267 ; 1160.



690 mg (499 μmol – 1eq) of **50** are solubilized in the minimum of CHCl_3 and 700 mL of formic acid are then added. The solution is stirred at room temperature 24h before evaporation of the solvents. The residue is solubilized in 25 mL of DCM and washed with 4M NaOH solution. The aqueous phase is extracted twice with DCM and combined organic phases are dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. A purification by chromatography (eluant : DCM / MeOH ; 98/2 to 96/4) gives 121 mg (22%) of a pale yellow powder.

^1H RMN (CDCl_3 - 300MHz) : 9,21 (t, 3H, $J = 5,6$ Hz) ; 8,31 (dd, 3H, $J = 7,8$ Hz, $J' = 1$ Hz) ; 8,14 (dd, 3H, $J = 7,8$ Hz, $J' = 1$ Hz) ; 7,87 (t, 3H, $J = 7,8$ Hz) ; 7,94 (t, 3H, $J = 5,6$ Hz) ; 7,01 (s, 3H) ; 6,77 (s, 3H) ; 4,79 (d, 3H, $J = 13,8$ Hz) ; 4,29-4,37 (m, 6H) ; 3,95-4,03 (m, 3H) ; 3,72-3,82 (m, 6H) ; 3,56 (d, 3H, $J = 13,8$ Hz) ; 3,52 (m, 3H) ; 2,57-2,61 (m, 3H) ; 2,47-2,50 (m, 3H) ; 2,19-2,24 (m, 3H)

^{13}C RMN (CDCl_3 - 300MHz) : 163,84 ; 163,20 ; 148,87 ; 148,72 ; 148,60 ; 146,97 ; 139,27 ; 133,82 ; 132,21 ; 125,66 ; 125,09 ; 124,03 ; 117,45 ; 113,46 ; 84,16 ; 70,14 ; 56,37 ; 55,98 ; 39,19 ; 38,43 ; 36,68.

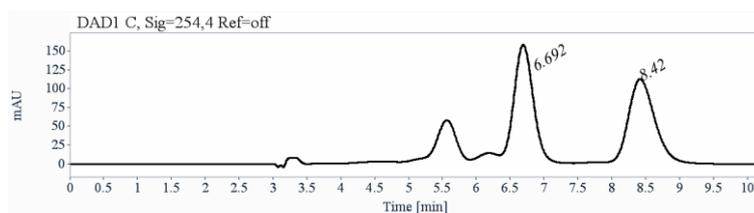
ESI-HRMS m/z calcd for (MH^+) : 1077,4465, found : 1077,4471.

R_f (DCM/MeOH ; 92/8) : 0,55.

IR : 3305 ; 2925 ; 1655 ; 1608 ; 1509 ; 1260.

Analytical chiral HPLC separation for compound IX

- The sample is dissolved in chloroform, injected on the chiral column Chiralpak IE with EtOH/CHCl₃ (50/50) as mobile phase, and detected with an UV detector at 254 nm. The flow-rate is 1 mL/min.



RT [min]	Area	Area%	Capacity Factor	Enantioselectivity	Resolution (USP)
6.69	3114	51.36	1.27		
8.42	2949	48.64	1.85	1.46	2.83
Sum	6063	100.00			

S16 : Analytical chiral HPLC analysis : chromatograms of the racemic mixture of **IX**.

Semi-preparative separation for compound IX :

Sample preparation: About 15 mg of compound **IX** are dissolved in 5 mL of chloroform.

Chromatographic conditions: Chiralpak IE (250 x 10 mm), EtOH / chloroform (30/70) as mobile phase, flow-rate = 5 mL/min, UV detection at 254 nm.

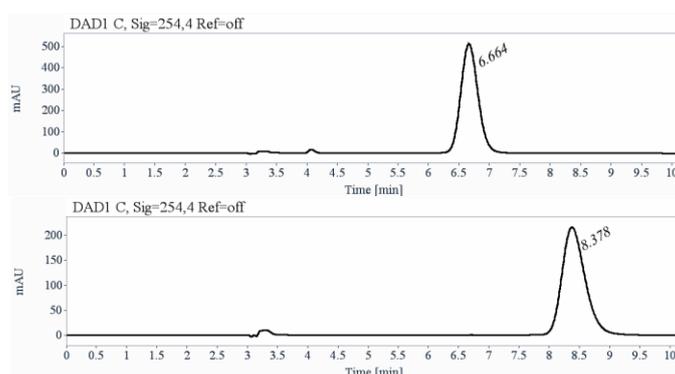
Injections (stacked): 20 times 250 µL, every 6.5 minutes.

Collection: the first eluted enantiomer is collected between 4 and 4.6 minutes, the second one between 4.8 and 6 minutes.

First fraction: 7 mg of the first eluted with ee > 99.5%

Second fraction: 5 mg of the second eluted with ee > 99.5%

Chromatograms of the collected fractions:



S17 : Chiral HPLC preparative separation : chromatograms of the collected fractions.

Optical rotations

λ (nm)	for the first eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (CHCl ₃ , c = 0.215)	for the second eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (CHCl ₃ , c = 0.195)
589	- 42	+ 43
578	- 44	+ 45
546	- 53	+ 53
436	- 117	+ 120

λ (nm)	for the first eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (acetonitrile, c = 0.1)	for the second eluted enantiomer $[\alpha]_{\lambda}^{25}$ (acetonitrile, c = 0.076)
589	- 42	+ 42
578	- 43	+ 43
546	- 47	+ 47
436	- 96	+ 97

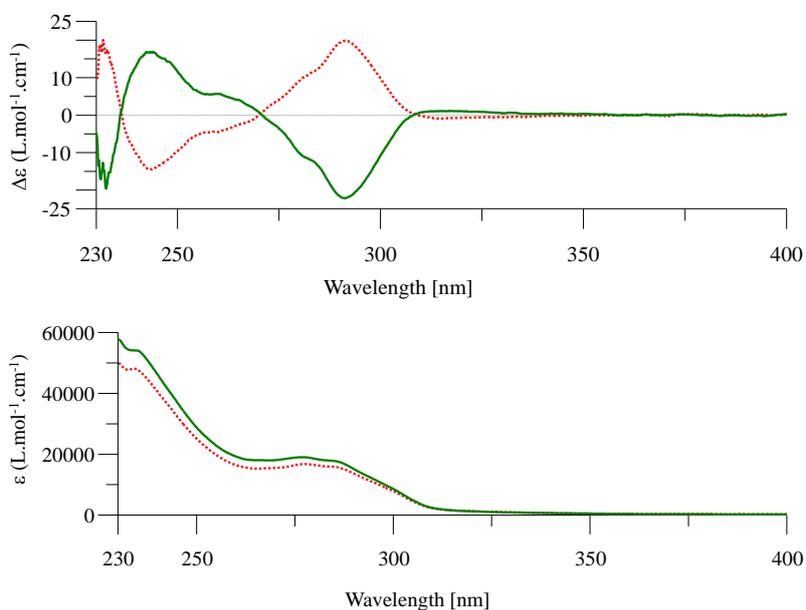
S18 : Optical activity measurement for the both enantiomers of **IX**.

Electronic Circular Dichroism

First eluted enantiomer : green solid line, concentration = 0.333 mmol.L⁻¹ in **chloroform**.

Second eluted enantiomer : red dotted line, concentration = 0.357 mmol.L⁻¹ in **chloroform**.

Acquisition parameters: 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.

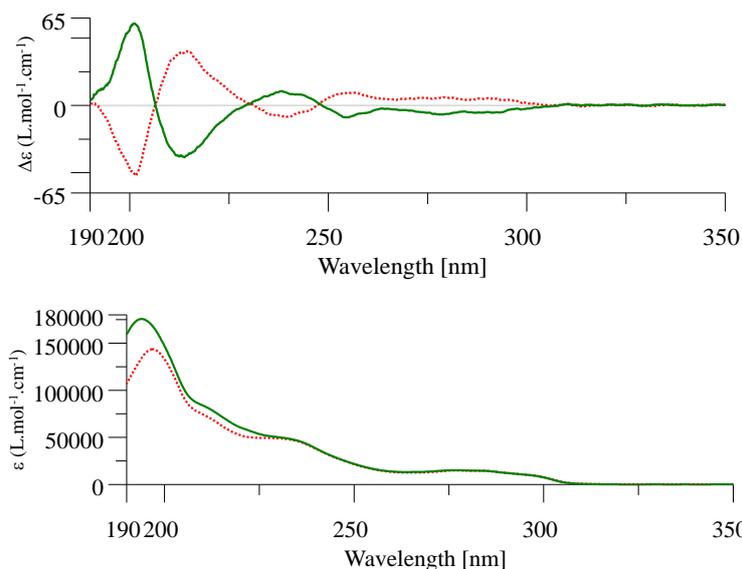


S19 : Electronic circular dichroism and absorption spectra of both enantiomers of **IX** in CHCl_3

First eluted enantiomer : green solid line, concentration = 0.092 mmol.L⁻¹ in **acetonitrile**.

Second eluted enantiomer : red dotted line, concentration = 0.092 mmol.L⁻¹ in **acetonitrile**.

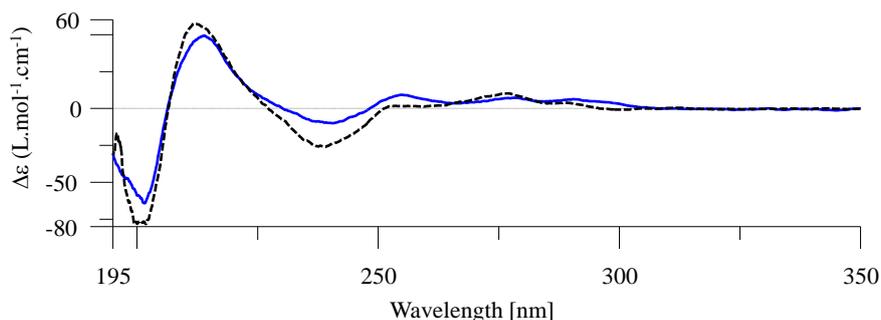
Acquisition parameters: 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.



S20 : Electronic circular dichroism and absorption spectra of both enantiomers of **IX** in acetonitrile.

Comparison of ECD spectra in acetonitrile and in methanol for the second eluted enantiomer

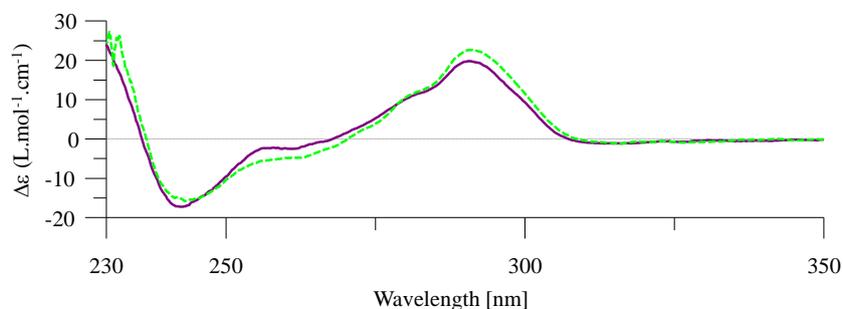
Acquisition parameters: 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.



S21 : Superposition of electronic circular dichroism spectra of the 2nd enantiomers of **IX** in **acetonitrile**: blue solid line, concentration = 0.133 mmol.L⁻¹ and in **methanol**: black dashed line, concentration = 0.133 mmol.L⁻¹.

Comparison of ECD spectra in dichloromethane and in chloroform for the second eluted enantiomer

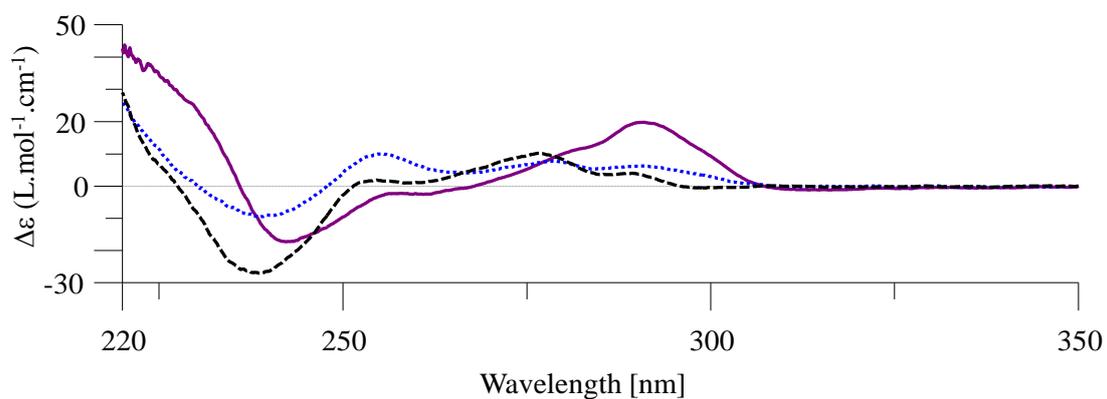
Acquisition parameters: 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.



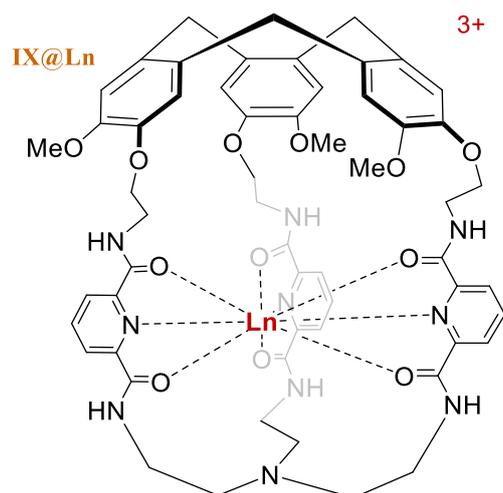
S22 : Superposition of electronic circular dichroism spectra of the 2nd enantiomers of **IX** in **dichloromethane**: purple solid line, concentration = 0.310 mmol.L⁻¹, and in **chloroform**: green dashed line, concentration = 0.310 mmol.L⁻¹.

Comparison of ECD spectra in DCM, acetonitrile and methanol for the second eluted enantiomer

Acquisition parameters: 0.1 nm as intervals, scanning speed 50 nm/min, band width 1 nm, and 1 accumulation per sample.



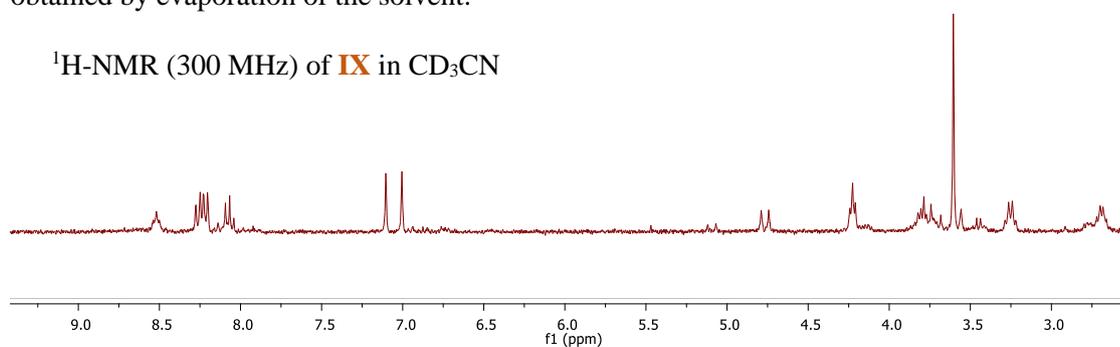
S23 : superposition of electronic circular dichroism spectra of the 2nd enantiomers of **IX** in **dichloromethane**: purple solid line, concentration = 0.310 mmol.L⁻¹, in **acetonitrile**: blue dotted line, concentration = 0.310 mmol.L⁻¹, and in **methanol**: black dashed line, concentration = 0.310 mmol.L⁻¹.



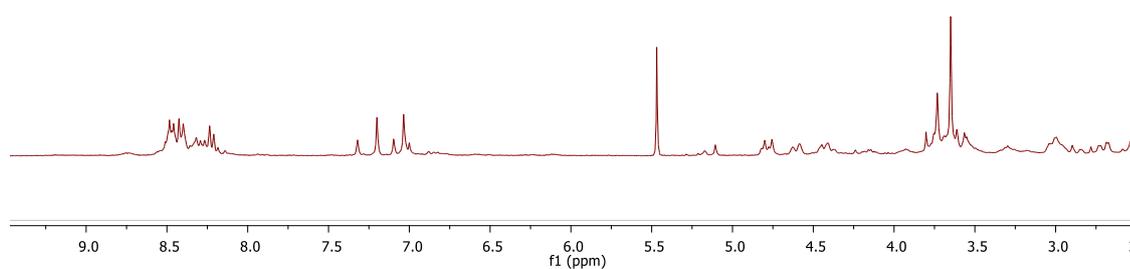
- Complexation of hemicryptophane **IX** with La (III) :

15 mg (0,0139 mmol – 1 eq) of hemicryptophane **IX** are solubilized in 1 mL of CH₃CN and ~7,6 mg of La(ClO₄)₃ are added. The solution is stirred and heated at 50°C and followed by NMR. The complex is obtained by evaporation of the solvent.

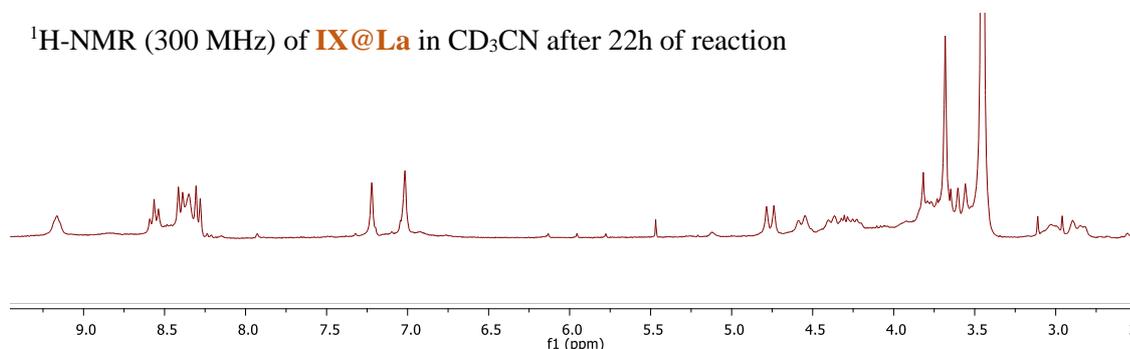
¹H-NMR (300 MHz) of **IX** in CD₃CN



¹H-NMR (300 MHz) in CD₃CN after 6h of reaction



¹H-NMR (300 MHz) of **IX@La** in CD₃CN after 22h of reaction

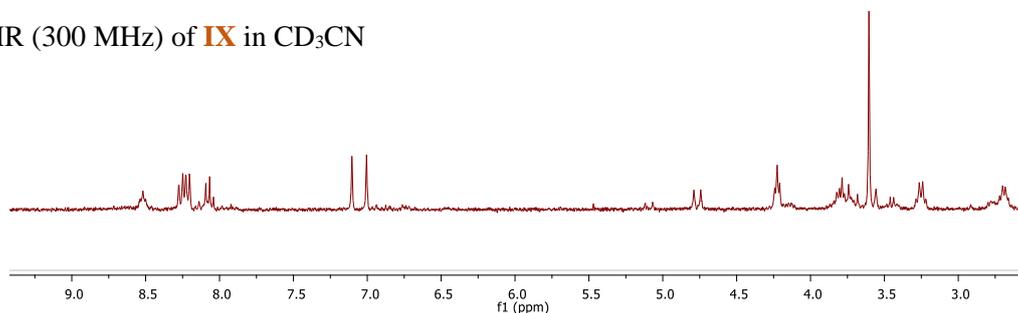


- ESI-HRMS m/z calcd for [M]³⁺/3 : 405,1146, found : 405,1147.

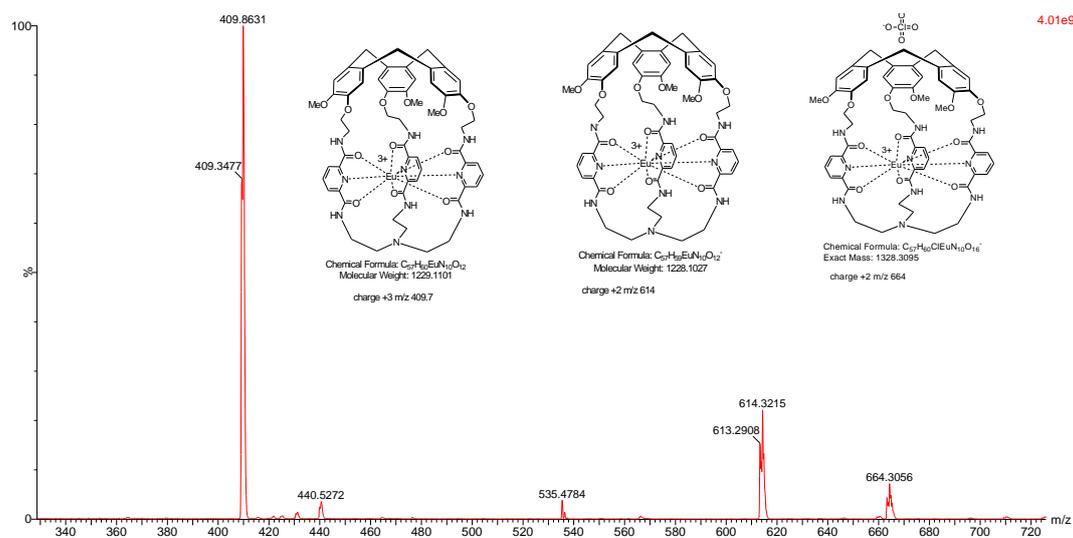
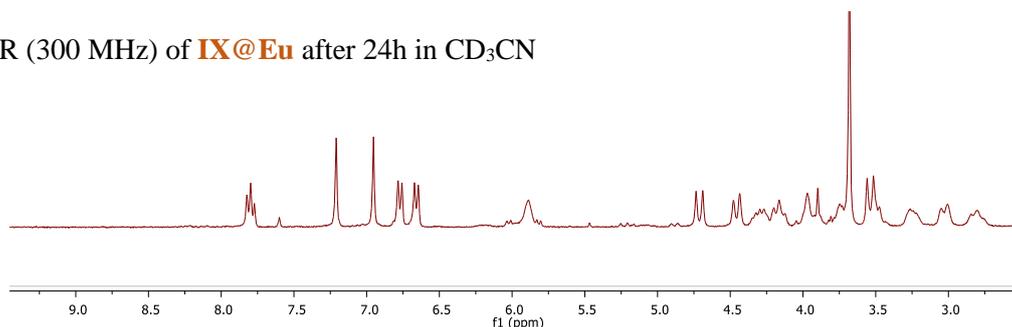
- Complexation of hemicryptophane **IX** with Eu (III) :

3,5 mg (3,25 μmol – 1 eq) of hemicryptophane **IX** are solubilized in 0,35 mL of CH_3CN and 3 μL (3,25 μmol – 1 eq) of a $\text{Eu}(\text{ClO}_4)_3$ solution at 50% in water are added. The solution is stirred and heated at 50°C during 24h and the complex is obtained by evaporation of the solvent.

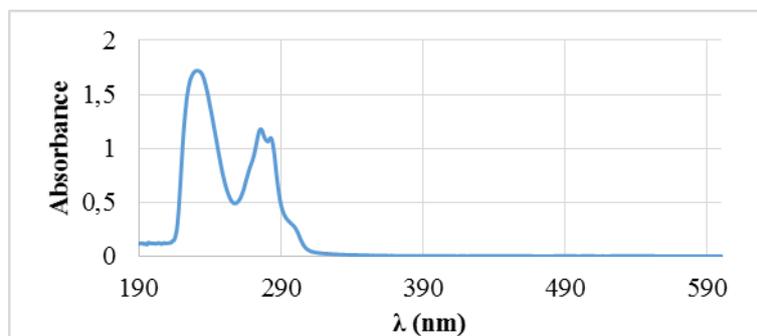
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) of **IX** in CD_3CN



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) of **IX@Eu** after 24h in CD_3CN



S24: Mass spectrometry of the complex **IX@Eu**

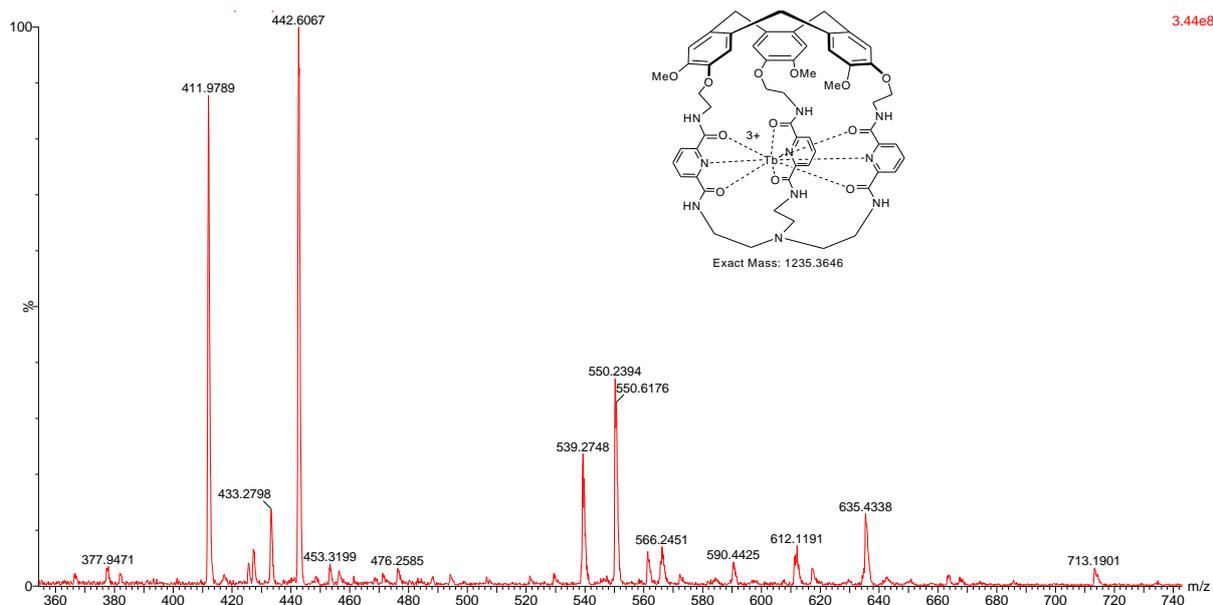


S25 : UV spectra of **IX@Eu**, C ~ 0,08mg/mL

- Complexation of hemicryptophane **IX** with Tb (III) :

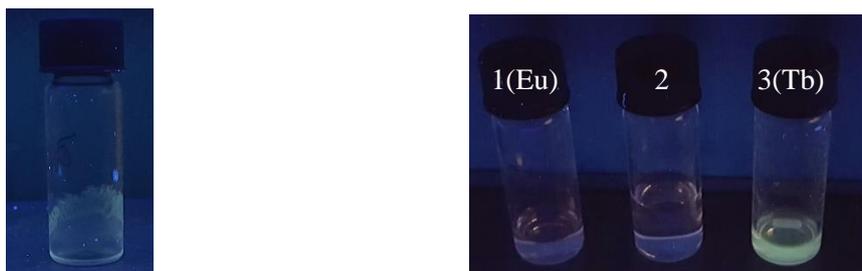
4 mg (3,7 μmol – 1 eq) of hemicryptophane **IX** are solubilized in 0,5 mL of CH_3CN and 3,4 μL (3,7 μmol – 1 eq) of a $\text{Tb}(\text{ClO}_4)_3$ solution at 50% in water are added. The solution is stirred and heated at 50°C during 24h and the complex crystallizes by slow evaporation of the solvent. Unfortunately, the crystals can't be analysed by X Ray cristallography since they don't lead to proper diffraction process.

The reaction is just followed by mass spectroscopy : $M^{3+}/3 = 412$, $[\text{M}+3 \text{MeOH}]^{3+} / 3 = 442$.



S26: Mass spectra of the **IX@Tb** complex solution

The fluorescence (green color) of this complex is visible under radiation at 265nm.



S27: Left - Photo showing the green fluorescence of Tb(III) (at 265nm) complex at the solid state. Right - comparative fluorescence at 265 nm of 3 solutions : IX@Eu complex in CH_3CN (1), CH_3CN (2), IX@Tb complex in CH_3CN (3).

5.2. Measure related to application of the complexe VIII@Gd as MRI- contrast agent

5.2.1. Sample preparation

1st samples for the measure at 500MHz :

4,68 mg (3,66 μmol) of complex VIII@Gd(III) are dissolved in 870 μL of a 80/20 mixture of D_2O /DMSO- d_6 . But the dissolution is not complete, so 250 μL of DMSO- d_6 were added. The resulting concentration is $C_0 = 3,27 \text{ mM}$ in a 62/38 of D_2O /DMSO- d_6 mixture.

This solution S_0 is diluted to give 500 μL of each solution : S_1 (0,066 mM) ; S_2 (0,13 mM), S_3 (0,2 mM), S_4 (0,26 mM), and S_5 (0,33 mM). One supplementary sample only contains the solvent mixture.

2nd samples for the measure at 300MHz :

5,54 mg (4,34 μmol) of complex VIII@Gd(III) are dissolved in 870 μL of a 85/15 mixture of DMSO- d_6 / D_2O . The resulting concentration is $C'_0 = 5,0 \text{ mM}$.

This solution S'_0 is diluted to give 500 μL of each solution: S'_1 (0,1 mM) ; S'_2 (0,2 mM), S'_3 (0,3 mM), S'_4 (0,4 mM), and S'_5 (0,5 mM). One supplementary sample only contains the solvent mixture.

3rd samples for the measure at 20MHz, 100MHz, 200MHz, 400MHz, and the relaxometry:

2,75 mg (2,15 μmol) of complex VIII@Gd(III) are dissolved in 4300 μL of a 70/30 mixture of DMSO- d_6 / H_2O . The resulting concentration is $C''_0 = 0,5 \text{ mM}$.

This solution S''_0 is diluted to give 2000 μL of each solution: S''_1 (0,1 mM) ; S''_2 (0,2 mM), S''_3 (0,3 mM). One supplementary sample only contains the solvent mixture.

5.2.2. Relaxation times measurement

5.2.2.1. Longitudinal relaxation time T_1

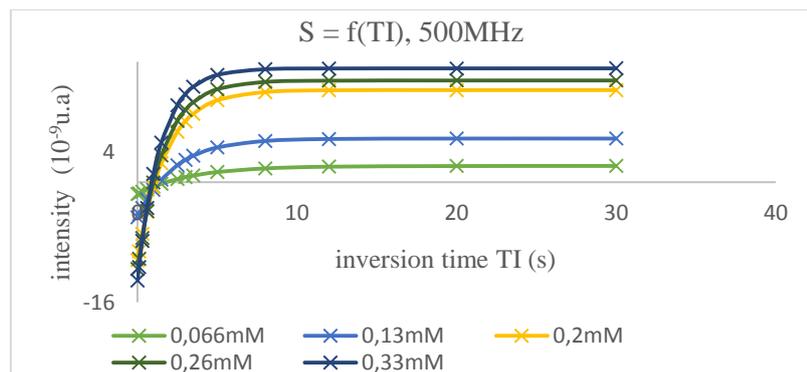
500MHz : Parameters

Spectrometer	Brüker Avance III 500
Probe	BBFO
Temperature	303 K

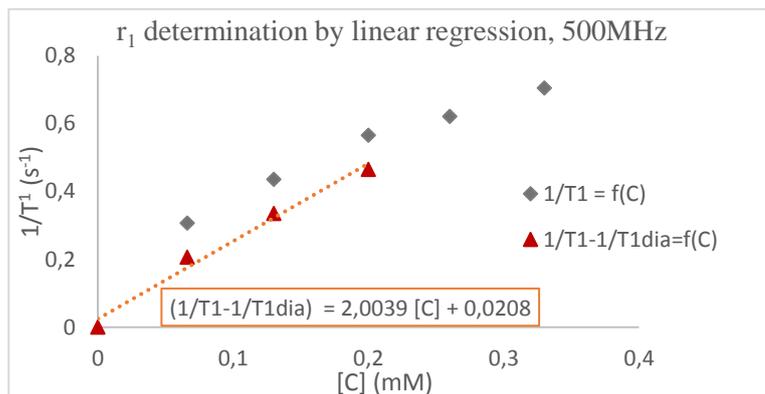
Inversion-Recovery sequence (see annexe 2) with two different lists of inversion times :

	D1	TI - list
Solvent	15s	500ms – 1s -1.5s - 3s - 6s - 10s - 12s - 15s - 30s - 45s - 60s - 80s - 120s
Solutions $S_1 \rightarrow S_5$	5s	10ms -100ms -300ms – 600ms – 1s – 1,5s – 2,5s – 3s – 3,5s – 5s – 8s – 12s – 20s – 30s.

500MHz : Results in 62/38 ; D₂O /DMSO-d₆ mixture.



C mmol/L	T ₁ (s)	S ₀ (u.a)	P (u.a)
0,00	9,93	-	-
0,066	3,26	1,000	-1,749
0,13	2,29	1,000	-1,821
0,20	1,77	0,999	-1,856
0,26	1,61	0,999	-1,867
0,33	1,42	1,000	-1,876



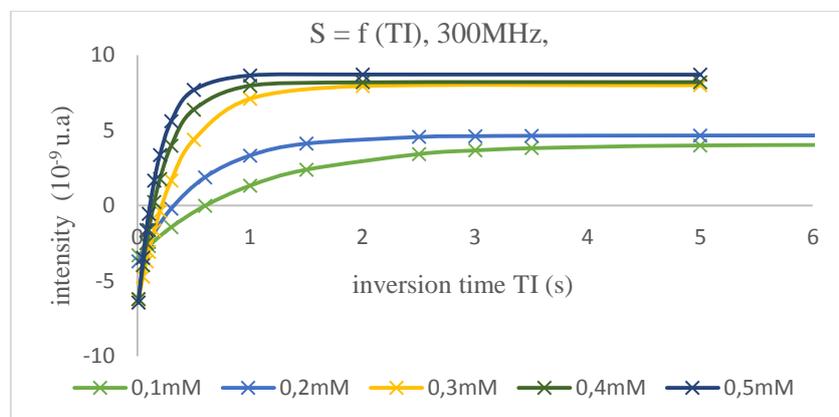
300MHz : Parameters

Spectrometer	Brüker Avance III 300
Probe	BBFO
Temperature	293K

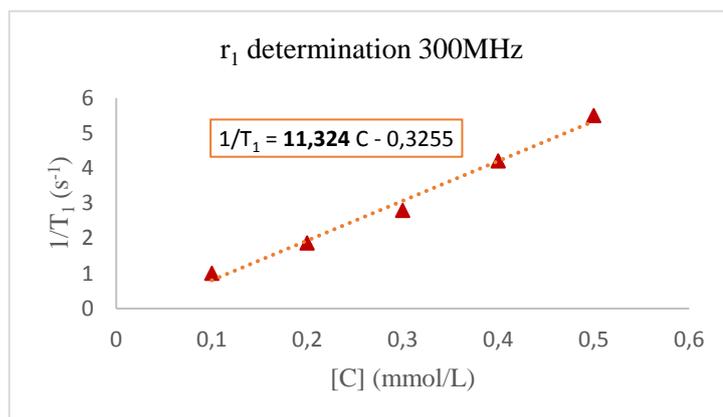
Inversion-Recovery sequence (see annexe 2) with three different lists of inversion times :

	D1	TI - list
Solutions S' ₁ et S' ₂	5s	10ms -100ms -300ms - 600ms - 1s - 1,5s - 2,5s - 3s - 3,5s - 5s - 8s - 12s - 20s - 30s.
Solutions S' ₃ → S' ₅	3s	10ms - 50ms - 80ms - 100ms - 150ms - 200ms - 300ms - 500ms - 1s - 2s - 5s.

300MHz : Results in 15/85 of D₂O /DMSO-d₆ mixture



C mmol/L	T ₁ (s)	S ₀ (u.a)	P (u.a)
0,1	1,001	0,997	-1,828
0,2	0,535	0,997	-1,827
0,3	0,358	0,998	-1,830
0,4	0,238	0,998	-1,856
0,5	0,183	0,999	-1,839



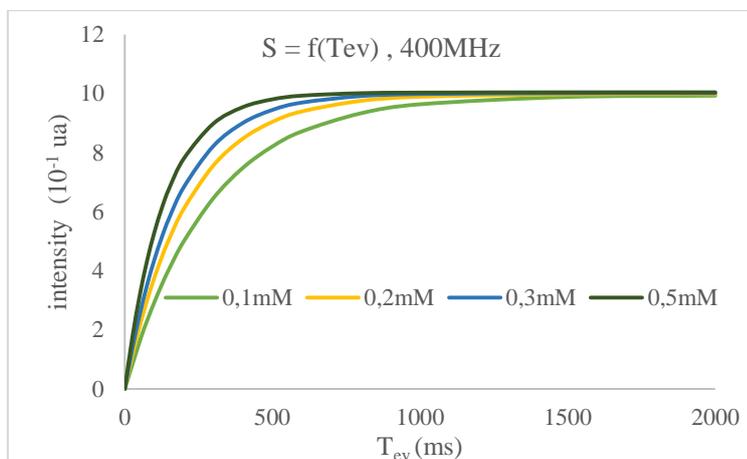
400MHz : Parameters

Spectrometer	Bruker Avance III 400
Probe	BBFO
Temperature	297 K

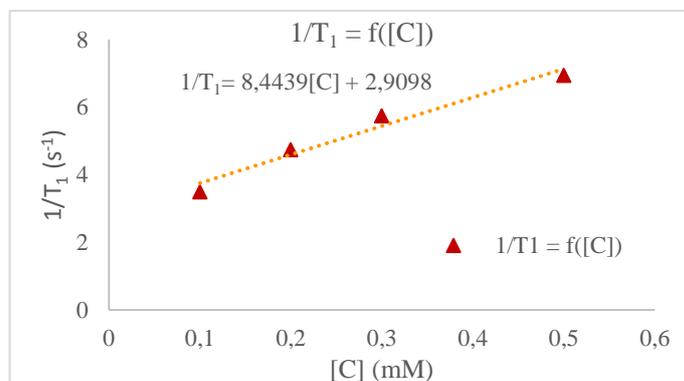
Saturation-Recovery sequence (see annexe 2) with two different lists of inversion times :

Solutions S'' ₀ → S'' ₃	D1	Tev - list
	1s	10μs – 25 ms – 50ms - 75ms - 100ms - 125ms – 150ms – 200ms – 300ms – 400ms – 500ms – 600ms – 800ms - 1s – 1,5s – 2s.

400MHz : Results in 30/70 ; H₂O /DMSO-d₆ mixture



C mmol/L	T ₁ (ms)	S ₀ (u.a)
0,1	286	0,993
0,2	211	0,998
0,3	174	1,001
0,5	144	1,004



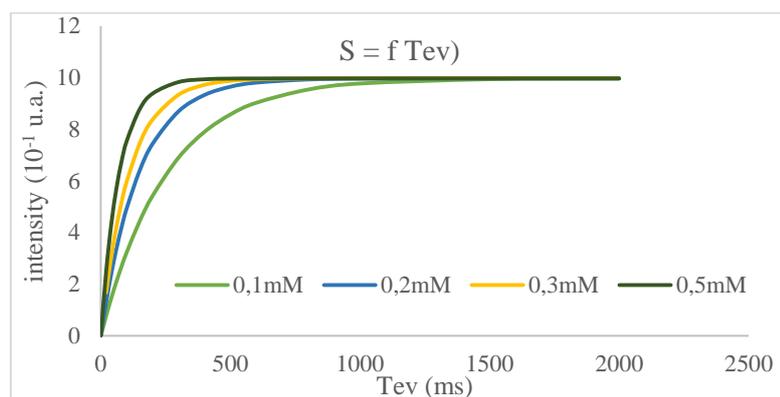
200MHz : Parameters

Spectrometer	Bruker Avance III 200
Probe	QNP
Temperature	297 K

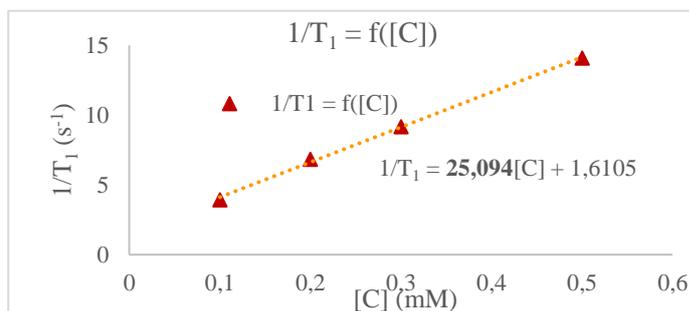
Saturation-Recovery sequence (see annexe 2) :

	D1	Tev - list
Solutions $S''_0 \rightarrow S''_3$	1s	100 μ s – 20 ms – 40ms – 60ms – 80ms – 100ms – 150ms – 200ms – 300ms – 400ms – 500ms – 600ms – 800ms – 1s – 1,5s – 2s.

200MHz : Results in 30/70 ; H₂O /DMSO-d₆ mixture



C mmol/L	T ₁ (ms)	S ₀ (u.a)
0,1	254	0,997
0,2	146	0,997
0,3	109	0,998
0,5	71	0,997



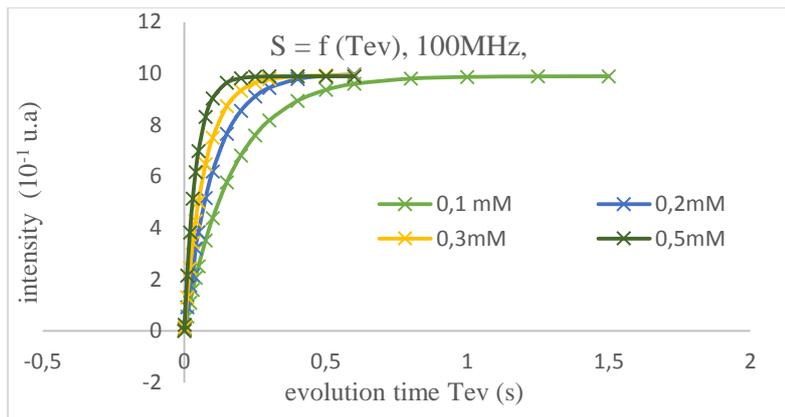
100MHz : Parameters

Spectrometer	Bruker Biospec Avance 24/40
Probe	Home made
Temperature	297 K

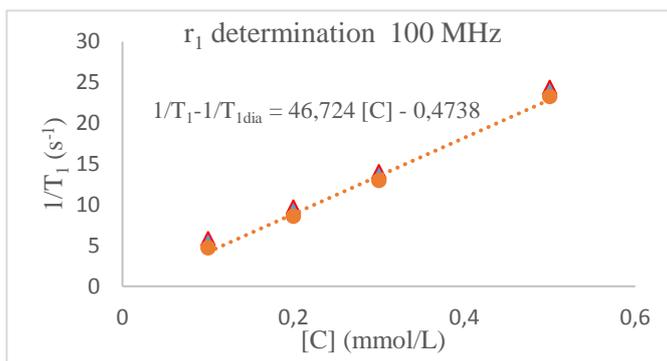
Saturation-Recovery sequence (see annexe 2) with three different lists of inversion times :

	D1	Tev - list
Solvent	1s	1ms – 100ms – 250ms – 500ms – 750ms – 1s – 1,5s- 2s – 2,5s- 3s- 4s- 5s- 7,5s- 10s- 12,5s- 15s.
Solution S''_1	1s	10 μ s – 1ms – 10ms – 20ms – 30ms – 40ms – 50ms – 75ms- 100ms – 150ms – 200ms – 250ms – 300ms – 400ms – 500ms – 600ms – 800ms- 1s – 1,25s – 1,5s – 1,75s – 2s- 2,25s – 2,5s – 2,75s – 3s – 4s – 5s – 6s – 7s – 8s – 9s.
Solutions $S''_0, S''_2, S''_3,$	1s	10 μ s – 1ms – 10ms – 20ms – 30ms – 40ms – 50ms – 75ms- 100ms – 150ms – 200ms – 250ms – 300ms – 400ms – 500ms – 600ms.

100MHz : Results in 30/70 ; H₂O /DMSO-d₆ mixture



C mmol/L	T ₁ (ms)	S ₀ (u.a)
0,0	883	0,996
0,1	171	0,989
0,2	103	0,999
0,3	71	0,983
0,5	41	0,989



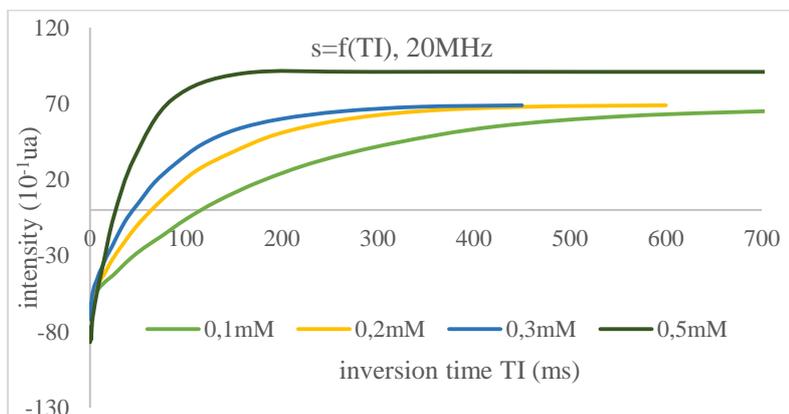
20 MHz : Parameters

Spectrometer	Bruker Minispec mq20
Temperature	297 K

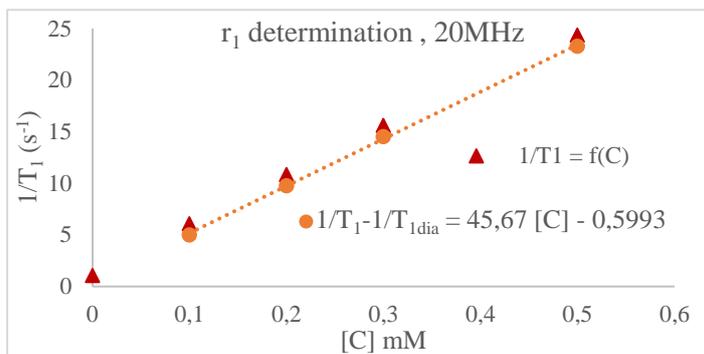
Inversion-Recovery sequence (see annexe 2) with two different lists of inversion times :

	D1	TI - list
Solvent	5s	175 μs – 275 μs – 470 μs – 860 μs – 1-ms – 3,2ms – 6,2ms – 12ms – 24ms – 49ms – 97ms – 192ms – 760ms – 1,5s – 3s.
Solutions S ["] ₀ → S ["] ₃	1s	168μs -201 μs – 246 μs – 305 μs – 384μs -490 μs – 630 μs – 818 μs – 1,1ms – 1,4ms – 1,8ms – 2,4ms – 3,2ms – 4,3ms – 5,7 ms – 7,6ms – 10ms – 13ms – 18ms – 24ms – 32ms – 42ms – 56ms – 75ms – 100ms – 133ms – 178ms – 237ms – 316ms – 422ms – 562ms – 750ms

20MHz : Results in 30/70 ; H₂O /DMSO-d₆ mixture



C mmol/L	T ₁ (ms)
0	920
0,1	164
0,2	92
0,3	65
0,5	41

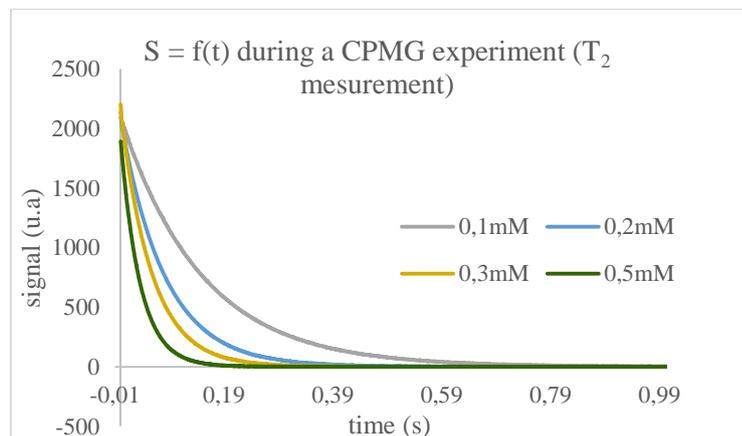


5.2.2.2. Transversal relaxation time T₂

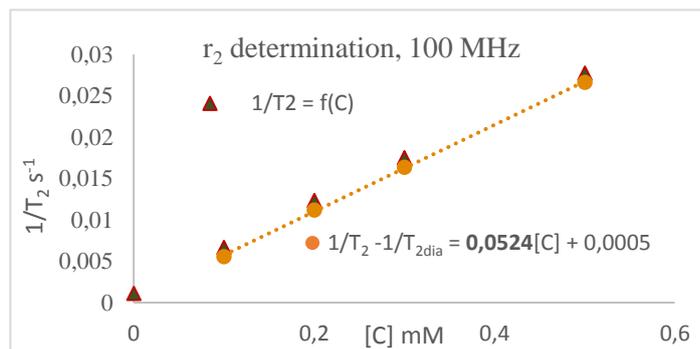
100MHz : parameters

Spectrometer	Brüker Biospec Avance 24/40
Probe	Home made
Temperature	297 K

CPMG Sequence with



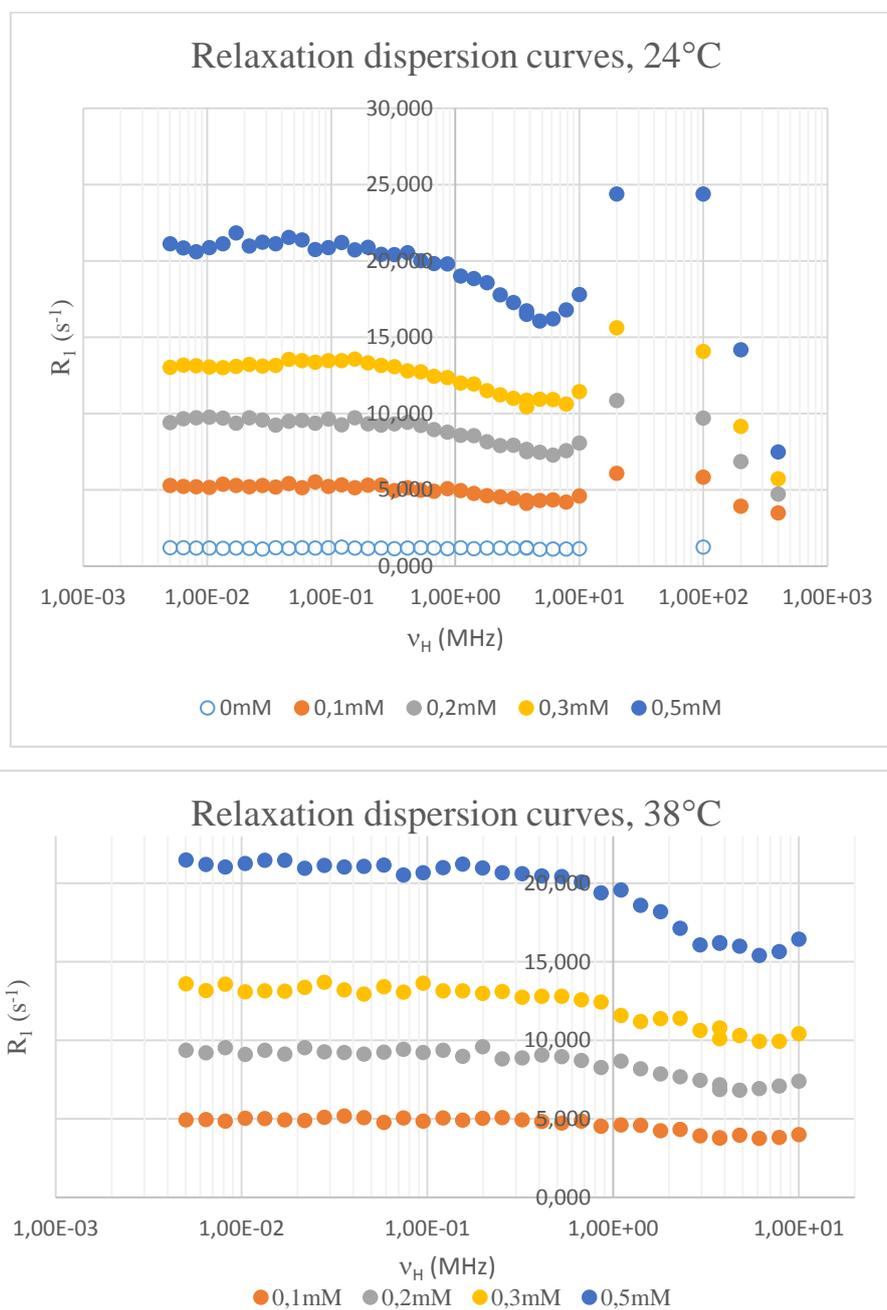
T ₂	[C]	1/T ₂ - 1/(T _{2dia})
0,866	0	0
0,149	0,1	0,00555
0,081	0,2	0,0111
0,057	0,3	0,0163
0,036	0,5	0,0266



5.2.3. ¹H-NMRD profile

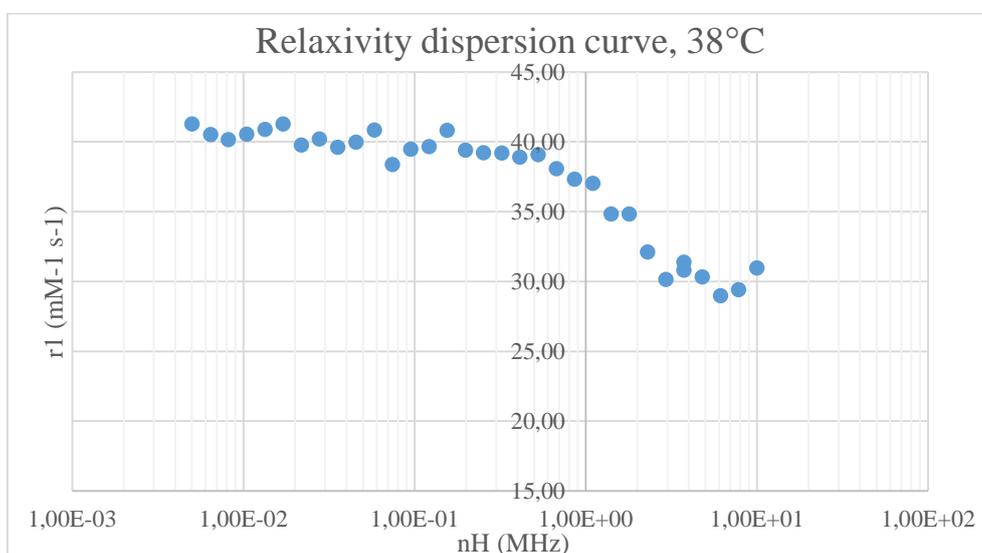
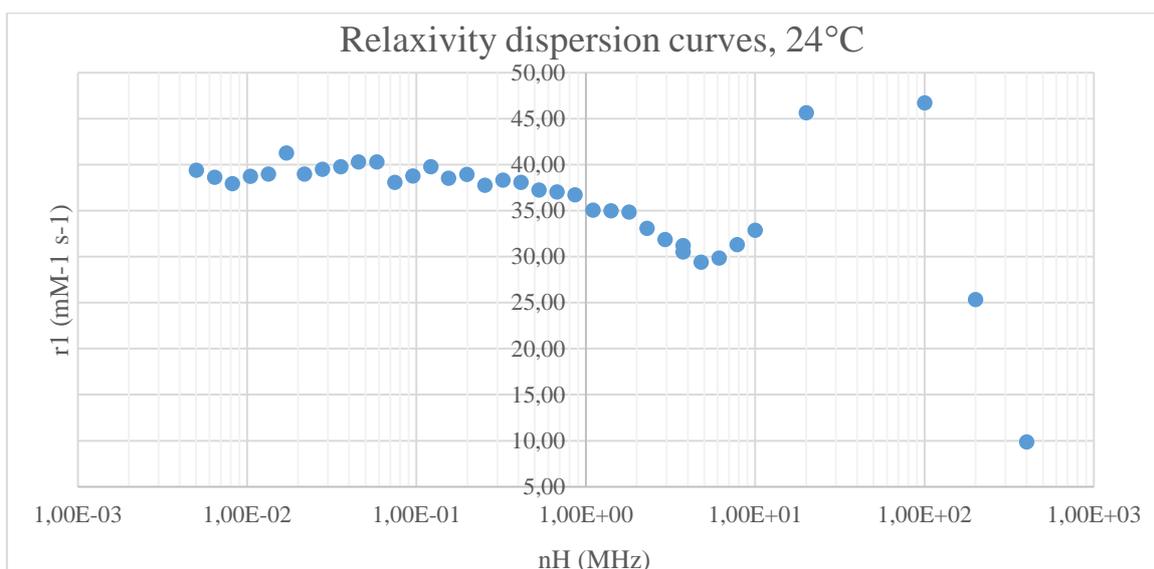
This part consists in the measurement of the global relaxivity at variable strength of the magnetic field applied during the nuclear spin relaxation for several solutions containing the paramagnetic complex. The relaxometer used is a Stellar SMARtracer and the sequence is described in annex 2. Two sets of experiments were conducted : at 24°C and 38°C.

Here are the dispersion curves representing the evolution of the global relaxation R_1 between 4kHz and 400MHz



S28: Relaxation dispersion curves measured at 24°C and 38 °C.

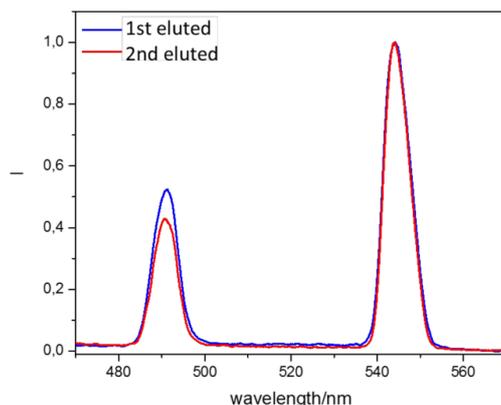
We can deduce the dispersion curve for the relaxivity r_1 (the paramagnetic contribution of R_1 normalized to a 1mM concentration of Gadolinium complex). This curve can provide (by appropriate fitting) important informations about the structural and dynamic parameters of the contrast agent, such as the numbers of coordinated water molecules, the residence time of water molecules in the first coordination sphere, the rotational correlation time ... This work is still in progress.



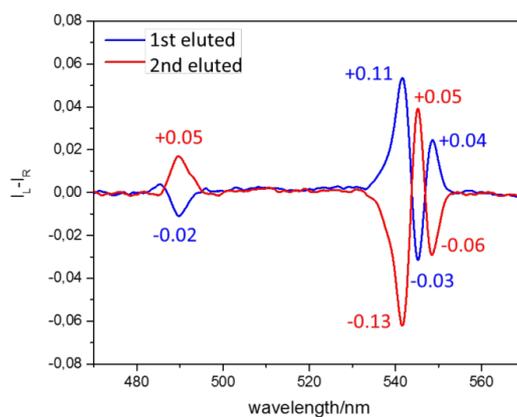
S29: Relaxivity dispersion curves measured at 24°C and 38°C.

5.3. Fluorescence properties of complexes IX@lanthanides.

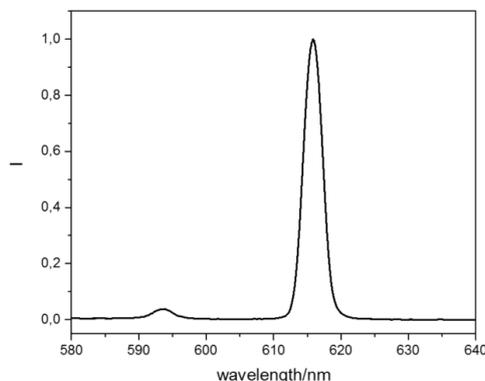
The complexes are synthesized by dissolving 1.1 equivalent of the Ln(III) salt ($TbCl_3 \cdot 6 H_2O$ or $EuCl_3$) and 1 equivalent of the chiral ligand IX in ethanol (200 μ L/mg of ligand). The mixture is heated at 50°C for 30 min and is then allowed to cool at room temperature. The circularly polarized luminescence (CPL) spectra are recorded (under a 365 nm lamp) for the obtained EtOH solutions.



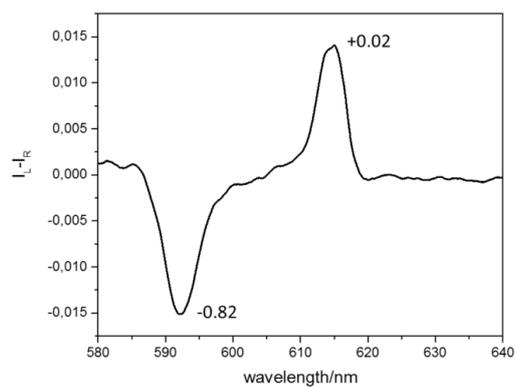
S30: Total luminescence spectra of the Tb complexes with the two enantiomers of hemicryptophane IX.



S31: Normalized CPL spectra of IX@Tb(III) complexes, showing the values of the luminescence dissymmetry factors (g_{lum}) for each band.



S32: Total luminescence spectra of the Eu complexes with the second eluted enantiomer of hemicryptophane IX.



S33: Normalized CPL spectra of **IX@Eu(III)** complexes with the 2nd eluted enantiomer, showing the values of the luminescence dissymmetry factors (g_{lum}) for each band.

Annexe 1 : Théorie de Solomon – Bloembergen – Morgan²⁷⁵ et théorie de Freed²⁷⁶

On exprime l'efficacité d'un agent de contraste en terme de relaxivité, notée r_i , en $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$.²⁷⁷ Cette grandeur représente donc l'accélération de la vitesse de relaxation des protons de l'eau due à une millimole d'agent de contraste. Cette modification des temps de relaxation des protons de l'eau a lieu à différentes échelles. D'abord au contact direct des protons de l'eau avec le métal paramagnétique, on parle alors de relaxivité de sphère interne r_i^{IS} , puis la relaxation peut se transmettre au niveau des sphères de solvation suivantes que l'on sépare en deux contributions : de seconde sphère r_i^{SS} et de sphère externe r_i^{OS} . La variation de relaxivité d'un échantillon en fonction du champ magnétique appliqué a été étudiée d'un point de vue théorique et la confrontation avec des mesures expérimentales permet d'extraire des informations sur les processus de relaxations mis en jeu. Nous nous limiterons à la description des mécanismes de sphère interne et externe, qui suffisent parfois pour mener une étude comparative entre la théorie et l'expérience.²⁷⁸

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} + (r_i^{SS}) \quad i = 1, 2$$

Relaxivité de sphère interne :

$$r_1^{IS} = \frac{[CA]}{55,6} \cdot \frac{q}{T_{1M} + \tau_M}$$

[CA] = concentration en agent de contraste (mol/L)

q = nombre de molécules d'eau coordonnées au métal

τ_M = temps de vie de résidence des molécules d'eau liées. (s)

T_{1M} = temps de relaxation (s) longitudinal des protons des molécules d'eau directement coordonnées au gadolinium qui s'exprime comme suit :

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_H^2 g^2 S(S+1) \beta^2}{r_H^6} \left[\frac{3\tau_{C1}}{1 + \omega_H^2 \tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{C2}^2} \right]$$

γ_H = rapport gyromagnétique du noyau 1H (42,576 MHz.T⁻¹)

g = le facteur électronique g, (il vaut 2 dans le cas du Gd(III))

S = spin électronique du métal (7/2 pour le Gd(III))

β = le magnéton de Bohr ($9,274\ 009 \times 10^{-24}$ J.T⁻¹)

r_H = distance entre le métal et le proton qui lui est coordonné (3,1 Å)²⁷⁹

ω_H = fréquence de Larmor du proton (Hz)

ω_S = fréquence de Larmor de l'électron (Hz)

²⁷⁵ I. Solomon, *Phys. Rev.*, **1955**, 99, 559-565 – N. Bloembergen, L. O. Morgan, *J. Chem. Phys.*, **1961**, 34, 842-850.

²⁷⁶ L. P. Hwang, J. H. Freed, *J. Chem. Phys.*, **1975**, 63, 4017-4025. – J. H. Freed, *J. Chem. Phys.*, **1978**, 68, 4034-4037.

²⁷⁷ P. Caravan, C. T. Farrar, L. Frullano, R. Uppal, *Contrast Media Mol Imaging.*, **2009**, 4(2), 89-100.

²⁷⁸ J. A. Peters, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2016**, 11, 160-168.

²⁷⁹ P. Caravan, A.V. Astashkin, A. M. Raitsimring, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42(13), 3972-3974.

Le temps de corrélation global τ_{ci} des mécanismes de relaxation longitudinale ($i = 1$) ou transversale ($i = 2$) est la somme de 3 contributions dont la première est due à un mouvement global de rotation du système (caractérisé par le temps τ_R). A cela s'ajoutent un processus de relaxation électronique des électrons non appariés du métal (caractérisé par T_{ie}), et un processus d'échange des protons des molécules dont le temps caractéristique est celui de résidence des molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination du métal τ_M .

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{T_{ie}} \quad i = 1,2$$

τ_R = Temps de corrélation (ou de réorientation) rotationnel. (s)

$$\left(\frac{1}{T_{1e}}\right) = \frac{1}{25} \Delta^2 \tau_v \{4S(S+1) - 3\} \left(\frac{1}{1+\omega_s^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1+4\omega_s^2 \tau_v^2}\right) \quad (s^{-1})$$

$$\left(\frac{1}{T_{2e}}\right) = \Delta^2 \tau_v \left(\frac{5,26}{1+0,372\omega_s^2 \tau_v^2} + \frac{7,18}{1+1,24\omega_s^2 \tau_v^2}\right) \quad (s^{-1})$$

τ_v = temps de corrélation caractéristique de la distorsion du polyèdre de coordination du métal (s)

Δ^2 = variation quadratique du zero field splitting (s^{-2})

Relaxivité de sphère externe :

$$r_1^{OS} = \left(\frac{32\pi}{405}\right) \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \gamma_H^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \frac{N_a}{aD} [7J(\omega_S) + 3J(\omega_H)]$$

N_a = nombre d'Avogadro ($6.0221409 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

a = distance entre le Gd(III) et la plus proche molécule d'eau qui diffuse à proximité du complexe. (Å)

D = coefficient de diffusion translationnel des molécules d'eau de la sphère externe. ($m^2 \cdot s^{-1}$)

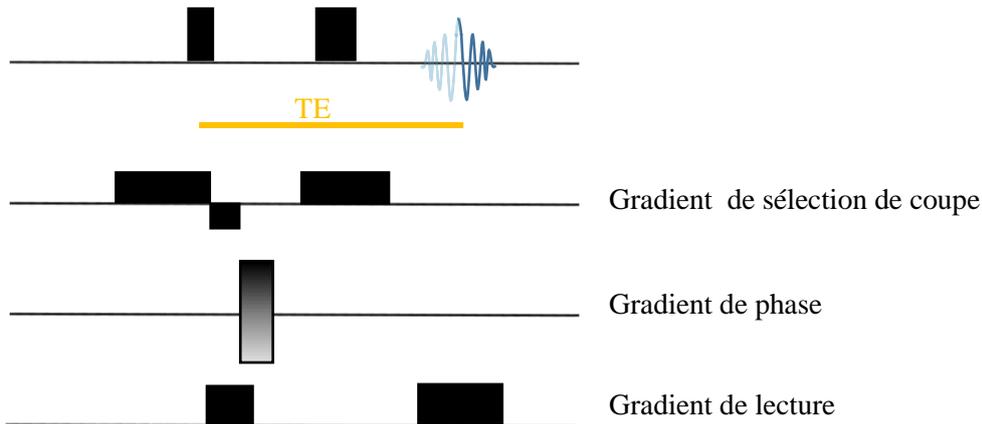
$$J(\omega) = Re \left[\frac{1+1/4 \cdot \left(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{T_{je}}\right)^{1/2}}{1 + \left(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{T_{je}}\right)^{1/2} + \frac{4}{9} \left(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{T_{je}}\right) + \frac{1}{9} \left(i\omega\tau_d + \frac{\tau_d}{T_{je}}\right)^{3/2}} \right] \text{ avec } j = 1,2 \text{ et } \tau_d = \frac{a^2}{D}$$

Annexe 2 : Les séquences RMN et IRM

En présence d'un champ magnétique statique B_0 , les spins sont orientés parallèlement à ce champ. Suite à une impulsion radiofréquence, les spins sont portés hors équilibre, et leur retour à l'équilibre est gouverné par deux constantes de temps qui se manifestent par une évolution exponentielle :

- T_1 le temps de relaxation longitudinale qui concerne la composante « verticale » de l'aimantation (ou selon l'orientation de B_0),
- T_2 le temps de relaxation transversale qui concerne la composante de l'aimantation dans le plan orthogonal à B_0 .

Utilisée pour l'acquisition d'image IRM : La séquence d'imagerie écho de spin

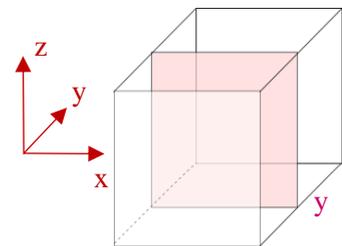


La séquence d'écho de spin pour l'imagerie est composée d'une part d'impulsions radiofréquences qui permettent de générer le signal, et d'autre part de 3 gradients de champs magnétiques selon 3 directions orthogonales chacun ayant un rôle particulier. Soit un échantillon cubique contenant de l'eau dans un repère arbitraire (O ; x, y, z).

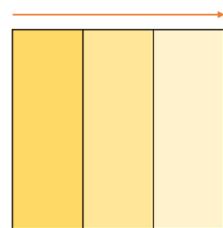
Le gradient de sélection de coupe \vec{G}_{SC} est appliqué dans une direction orthogonale au plan d'intérêt (O;x,z) de l'échantillon (selon y dans le cas du schéma ci-contre). En présence de gradient, la fréquence de résonance des protons est dépendante de la position considérée dans l'échantillon :

$$\nu_y = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + \vec{G}_{SC,y} \cdot \vec{y}).$$

Si simultanément, les impulsions à 90° et 180° correspondent à la radiofréquence ν_{yi} , seuls les protons du plan correspondant (rose (O,x,z)) au niveau de la position y_i seront détectés. La largeur de la coupe étant inversement proportionnelle à la durée des impulsions, on privilégie dans ce contexte l'utilisation d'impulsions longues (dite sélectives) pour générer une image en 2D.



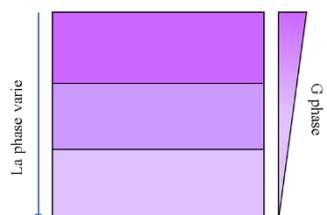
La vitesse de précession varie



G lecture

Le gradient de lecture G_{lect} est appliqué selon l'axe (Ox) horizontal et a pour effet de modifier la vitesse de précession des protons selon cette direction. Il en résulte des colonnes de protons possédant chacune vitesse de précession donnée. G_{lect} étant appliqué pendant le recueil du signal, l'information qui différencie chaque colonne y est incluse.

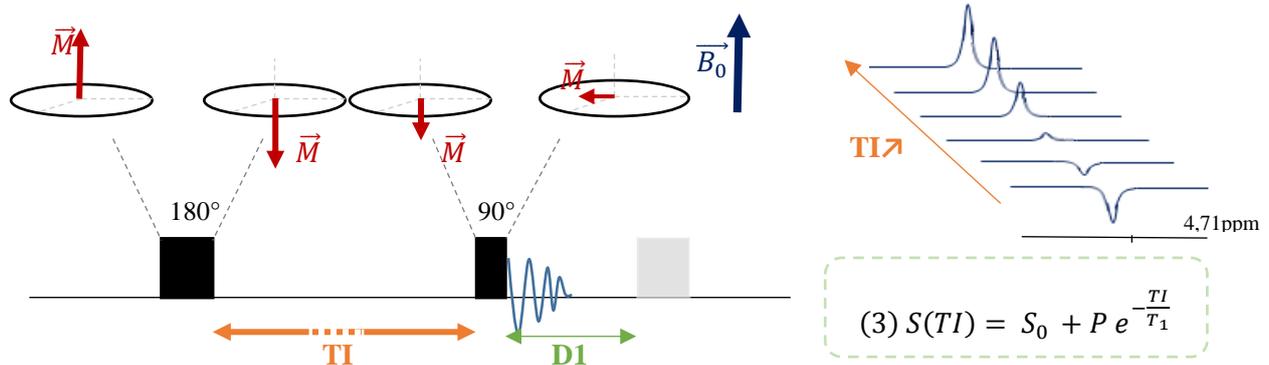
Le gradient de phase G_{phase} est appliqué entre les 2 impulsions, selon l'axe (Oz) vertical et a pour effet de modifier la fréquence de précession des protons selon cette direction pendant son application. Il en résulte un déphasage des spins qui persiste jusqu'à l'acquisition du signal. Pour coder l'ensemble de l'image, il faut multiplier les acquisitions avec des décalages de phase différents, incrémentés régulièrement. Chaque ligne de protons possède alors une phase qui lui est propre.



Ainsi, les gradients de lecture (selon x) et de phase (selon z) ont pour rôle de coder spatialement une coupe de l'échantillon dans ces deux directions, soit dans notre exemple dans le plan (O,x,z) en attribuant à chaque pixel de la coupe sélectionnée un jeu de données qui lui est propre. L'image IRM est ensuite obtenue en mesurant le signal contenu dans chaque pixel, et en lui attribuant une nuance de gris. L'intensité du signal d'un pixel est proportionnelle à la quantité d'eau dans le pixel modulée par l'effet de la relaxation (d'où le phénomène de contraste).

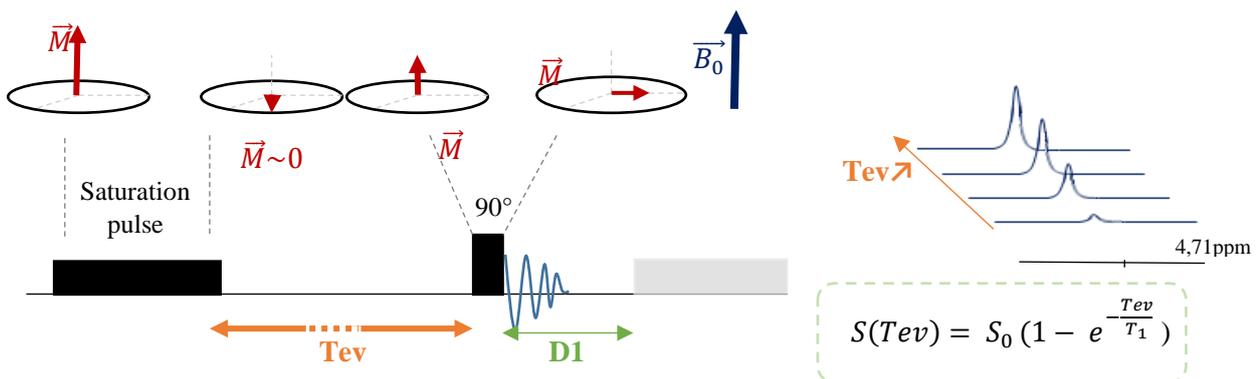
Les séquences utilisées en RMN pour des mesures de T_1 :

Inversion récupération :



L'aimantation \vec{M} initialement alignée avec le champ \vec{B}_0 subit une impulsion à 180° puis relaxe pendant un temps d'inversion TI variable. Une seconde impulsion à 90° permet de basculer l'aimantation résiduelle dans le plan transverse, et ainsi recueillir le signal généré pendant le mouvement de précession de \vec{M} . L'intensité du signal, à savoir, le singulet correspondant aux protons de l'eau dans notre cas, dépend du temps TI imposé en suivant une loi exponentielle (équation (3)). On réitère alors la séquence 1D d'inversion-récupération avec différents temps d'inversion TI. Il faut aussi laisser un temps D1 suffisant entre deux acquisitions successives, pour permettre une relaxation totale entre chaque expérience, (retour à l'équilibre complet) afin de s'assurer de démarrer chaque acquisition à partir de la même norme du vecteur aimantation initial.

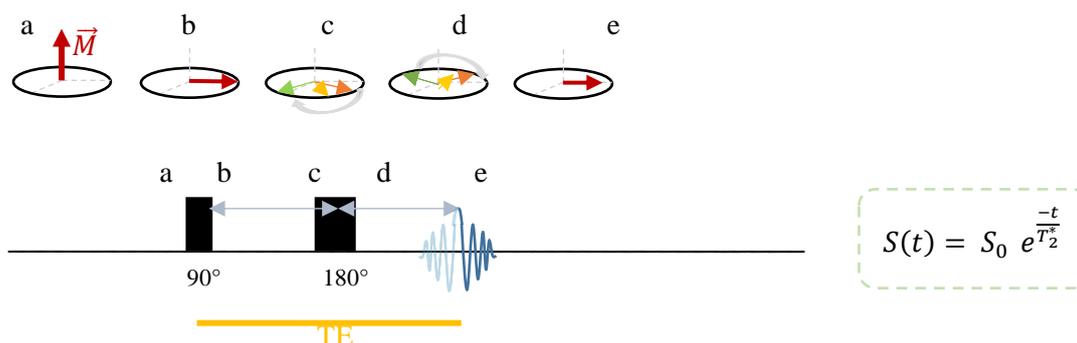
Saturation récupération :



Cette séquence permet également d'accéder au temps de relaxation longitudinal T_1 d'un échantillon. On y remplace le impulsion d'inversion par une impulsion de saturation permettant d'annuler totalement le signal, et on observe alors sa récupération en fonction du délai séparant les deux impulsions, noté Tev, temps d'évolution. L'intensité du signal évolue toujours selon une loi exponentielle. L'intérêt de cette séquence est de pouvoir raccourcir le D1 -et donc les temps d'acquisition. Il est en effet inutile de récupérer la totalité de l'aimantation à la fin d'une acquisition puisque la suivante commencera par l'annuler.

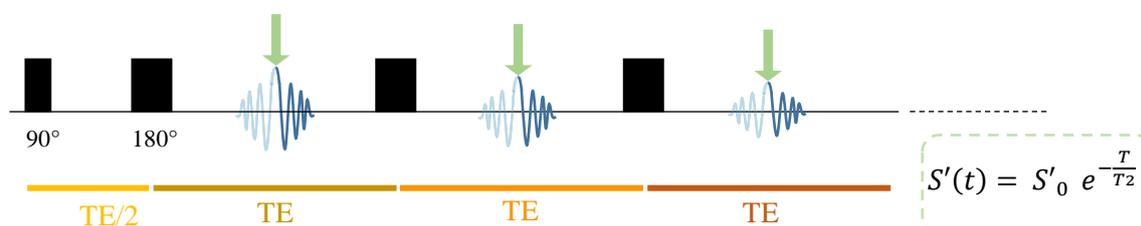
Les séquences utilisées en RMN pour des mesures de T_2 :

L'écho de spin :



Le vecteur \vec{M} correspondant à l'aimantation globale d'un échantillon initialement orienté selon l'axe longitudinal z, est basculé dans le plan transverse via une impulsion à 90° . Dès la fin de la radiofréquence (RF) un processus de relaxation se met en place, pendant $\frac{1}{2}$ temps d'écho $TE/2$. A cela s'ajoute un déphasage des spins (dû à des inhomogénéités de champ magnétique et à la diffusion des molécules), qui serait responsable d'une atténuation du signal recueilli. Le rôle de l'impulsion à 180° suivie du même temps d'attente $TE/2$, est de pallier aux inhomogénéités de champs en rephasant les spins et ainsi recouvrer la quasi-totalité de l'aimantation avant l'enregistrement du signal. Le signal obtenu est une exponentielle décroissante caractérisée par un temps de relaxation transversale T_2^* , encore affecté par les phénomènes de diffusion.

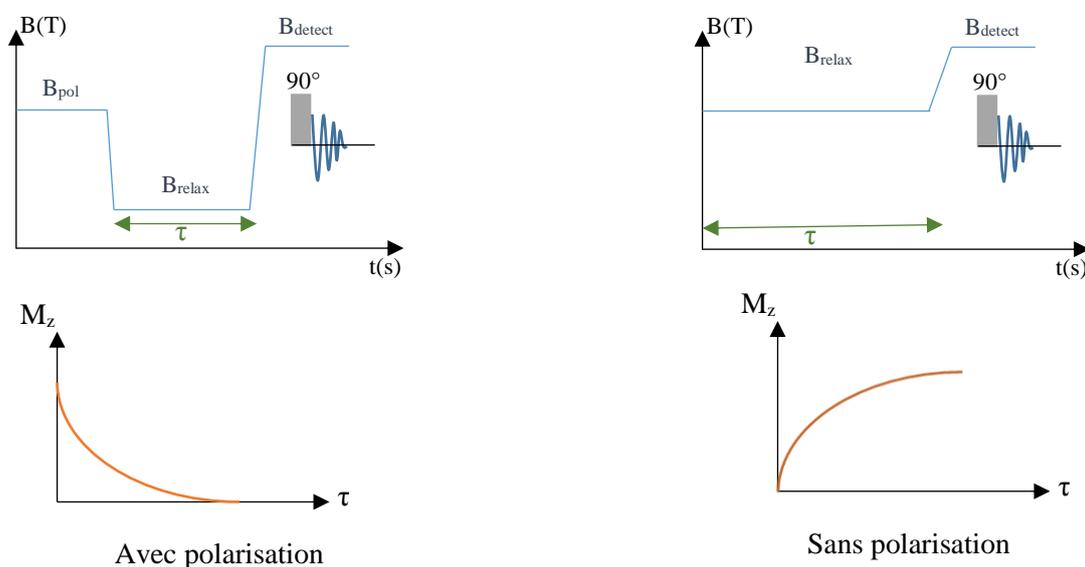
La séquence d'écho CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) :



Cette séquence CPMG débute par un écho de spin classique et se poursuit avec une succession d'impulsions à 180° donnant lieu à autant de signaux sous forme d'écho. Le fait de cumuler ces impulsions à 180° permet à terme de diminuer le temps d'écho TE , et donc de s'affranchir des phénomènes de diffusion des molécules dans l'échantillon. On relève l'intensité maximale de chaque écho (flèches vertes) qui décroît de manière exponentielle, avec pour temps caractéristique le « vrai » temps de relaxation transversale T_2 .

Utilisée pour les mesures de temps de relaxation à champ variable : relaxométrie en champ cyclé.

A faible champ magnétique, la RMN classique avec des séquences d'inversion (ou saturation)-récupération n'est pas adaptée aux mesures de temps de relaxation T_1 car le signal à détecter est trop faible. On utilise alors un relaxomètre qui permet une commutation rapide de la valeur du champ magnétique B_0 . Le signal est détecté à une valeur unique du champ magnétique B_{detect} grâce à une impulsion à 90° en fin de séquence.



La mesure du T_1 est en fait réalisée de deux manières différentes :

A très bas champ (figure de gauche), un premier champ magnétique B_{pol} intense a pour but de polariser les spins avant de les placer dans le B_{relax} pendant un temps τ variable pendant lequel les spins vont relaxer. L'aimantation évolue alors de la valeur $M_0^{B_{\text{pol}}}$ à $M_0^{B_{\text{relax}}}$ selon l'équation :

$$M_z(\tau) = M_0^{B_{\text{relax}}} + (M_0^{B_{\text{pol}}} - M_0^{B_{\text{relax}}}) \exp\left(\frac{-\tau}{T_1^{B_{\text{relax}}}}\right)$$

Ainsi en répétant l'expérience avec différentes valeurs de τ on accède au temps de relaxation longitudinal des protons de l'eau au champ B_{relax} appliqué. On fait alors varier B_{relax} pour obtenir la courbe de dispersion $R_{1, \text{tot}} = \frac{1}{T_1^{B_{\text{relax}}}} = f(B_{\text{relax}})$. Lorsque B_{relax} devient suffisamment élevé on peut se passer de l'étape de polarisation de l'échantillon et on mesure alors une croissance de l'aimantation selon l'équation :

$$M_z(\tau) = M_0^{B_{\text{relax}}} \left\{ 1 - \exp\left(\frac{-\tau}{T_1^{B_{\text{relax}}}}\right) \right\}$$

La relaxation $R_{1, \text{tot}}$ mesurée contient à la fois la contribution diamagnétique et paramagnétique. On répète alors les mesures pour des échantillons de différentes concentrations pour accéder à la courbe de dispersion de la relaxivité $r_{1, \text{para}}$ en utilisant cette relation : $\frac{1}{T_{1, \text{tot}}} = \frac{1}{T_{1, \text{dia}}} + r_{1, \text{para}} [Gd]$.

Synthèses de cryptophanes hydrosolubles adaptés à l'encapsulation du xénon, et d'hémicryptophanes fonctionnalisés pour la complexation de lanthanides (III), en vue d'applications en imagerie médicale.

Résumé

Ce manuscrit détaille l'ensemble des travaux de recherches effectués au cours de mes trois années de thèse. Après un chapitre général portant sur les principes de la chimie supramoléculaire, et quelques unes de ces applications, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation des propriétés de molécules cages (cryptophanes et hémicryptophanes) pour aller vers la conception de sondes en imagerie médicale. Nous évoquons successivement le cheminement vers la synthèse d'un hémicryptophane apte à complexer le Gadolinium(III), pour une utilisation en tant qu'agent de contraste en IRM du proton, puis à l'élaboration de cryptophanes hydrosolubles adaptés à la RMN et l'IRM du ^{129}Xe . Cette thèse s'achève sur la synthèse d'un nouvel hémicryptophane fonctionnalisé pour former des complexes avec le Terbium(III) et l'Europium(III) dont les propriétés de fluorescence sont prometteuses.

Mots clefs : chimie supramoléculaire, hémicryptophane, cryptophane, IRM, fluorescence, sondes.

Synthesis of hydrosoluble cryptophanes, designed to encapsulate xenon, and of hemicryptophanes functionalized to complex lanthanide (III) ions, with the intention to apply them in medical imaging.

Abstract

This book details all the research work that has been done during three years of Ph-D. After a chapter dedicated to the general principles of supramolecular chemistry, and some of its applications, we focalise on the use of cage-shapes molecules (cryptophanes and hemicryptophanes) in order to build probes for biological imaging. We successively mention the way toward the synthesis of a hemicryptophane able to complex Gadolinium(III), to use it it as a proton-MRI contrast agent, then toward the elaboration of hydrosoluble cryptophanes adapted to ^{129}Xe NMR and MRI. This PhD manuscript ends with the synthesis of a new hemicryptophane fonctionnalisé to form complexes with Terbium(III) and Europium(III), whose fluorescence properties are promising.

Key words : supramolecular chemistry, hemicryptophane, cryptophane, MRI, fluorescence, probes.

Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (iSm2), UMR 7313, CHIROSCIENCES:

ADRESSE : 52 Avenue Escadrille Normandie Niemen, 13013 Marseille, cases 452, 462.