



HAL
open science

Nouveaux marqueurs à base de lanthanides pour l'imagerie moléculaire et l'analyse biomédicale

Maria Moula Karimdjy

► **To cite this version:**

Maria Moula Karimdjy. Nouveaux marqueurs à base de lanthanides pour l'imagerie moléculaire et l'analyse biomédicale. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV046 . tel-01685707

HAL Id: tel-01685707

<https://theses.hal.science/tel-01685707v1>

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Maria MOULA KARIMDJY

Thèse dirigée par **Marinella MAZZANTI** et

Co-encadrée par **Christelle GATEAU**

préparée au sein du **Laboratoire de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination, Service de Chimie Inorganique et Biologique, INAC, CEA Grenoble**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Nouveaux marqueurs à base de lanthanides pour l'imagerie moléculaire et l'analyse biomédicale

Thèse soutenue publiquement le **29 septembre 2015**,
devant le jury composé de :

Dr Eva TOTH

CNRS Orléans, Rapporteur

Dr Loïc CHARBONNIERE

Université de Strasbourg, Rapporteur

Dr Laurent LAMARQUE

Cis-bio, Examineur

Pr Guy ROYAL

Université Grenoble Alpes, Président

Dr Marinella MAZZANTI

EPFL, Directrice de thèse

Dr Christelle GATEAU

CEA Grenoble, Co-encadrante de thèse



Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier les membres du jury, Loïc Charbonnière, Eva Toth, Laurent Lamarque et Guy Royal d'avoir évalué mon travail et de tous leurs conseils durant la soutenance de thèse.

Merci à Thierry Douki et Pascale Maldivi de m'avoir accueilli au sein du SCIB et du RICC. Merci également au Labex Arcane d'avoir financé cette thèse.

La première personne que je voulais remercier est Christelle Gateau, pour ta disponibilité et pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse autant aux niveaux scientifique que personnel. Merci pour toutes les réunions du lundi matin 8h, ton aide et ton soutien pour la rédaction de la thèse, les aventures de la fête de la science et j'en passe !

Je remercie Marinella Mazzanti, d'avoir dirigé cette thèse et de m'avoir fait découvrir la chimie des lanthanides. Merci de m'avoir proposé un sujet qui m'a permis de maîtriser de nombreuses techniques et merci pour toutes tes idées scientifiques .

Merci à Daniel Imbert et Pascal Fries pour respectivement les mesures de luminescence et les interprétations théoriques des résultats de relaxivité et pour la relecture du manuscrit.

Je souhaite remercier Isabelle Texier et Peter Reiss d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Vos conseils donnés chaque année m'ont permis de choisir dans quelle direction avancer.

Merci à Peter Reiss, pour la collaboration sur le projet des sondes bimodales quantum dots/IRM.

Merci à Didier Gasparutto et Christine Saint Pierre pour la collaboration sur le projet oligonucléotides. Les réactions ne se sont pas toujours déroulées en notre faveur mais cela ne nous a pas empêché de passer du bon temps ensemble ! Christine, garde ta bonne humeur et ton rire communicatif 😊

Je remercie Lothar Helm pour m'avoir accueilli dans son laboratoire quelques jours à l'EPFL pour les mesures de RMN de l'¹⁷O. Un grand merci également à Shima Karimi de m'avoir aidé pour les mesures.

Merci à Victor Mougel pour avoir effectué les mesures BET à l'ETH et à Hana Lahrech pour les mesures IRM à Clinatéc.

Je tiens également à remercier Colette Lebrun et Pierre Alain Bayle, respectivement pour l'ensemble des spectres de masse et l'aide pour les spectromètres RMN et également pour leur gentillesse et leur disponibilité au quotidien. Vous faites partie des personnes du laboratoire que j'ai vraiment pris plaisir à côtoyer !

Merci également à Zohra Termache pour l'efficacité dont elle fait preuve pour régler tous les soucis administratifs.

Remerciements

Merci à Jennifer et Christophe, d'une part pour tous les bons moments passés ensemble mais aussi pour tous vos conseils scientifiques, pour la rédaction et la préparation de la soutenance de thèse. Bon courage à vous pour la suite.

Merci Marie, ma jumelle de thèse, ma co-bureau, co-paillasse, etc.. Merci pour les chansons dans le labo, l'aide pour les papiers administratifs et pour ton soutien surtout pendant ces derniers six mois. Merci à mes cobureaux, Bastien, Fanny et Céline ; à l'équipe Julie, Lucile (bon courage à vous deux) Valentin, Sebastiano, Jennifer, Oliver et Clément ; et tous les autres personnes du RICC notamment Yves, Matthieu, Nathalie, Stéphane, Alexandra, Faustine, Sylvain. Avec vous tous, on a presque envie d'aller travailler au labo tous les jours !

Je remercie aussi tous les bons moments passés avec les étudiants du LEMOH que ce soit au labo ou en soirée : Lucia, pour le travail qu'on a effectué ensemble en toute casualité ; Louis, Christophe, Dorian, Clément et Maria.

Merci aussi à mes amies de Grenoble : Anissa, Anne Charlotte, Mehtab, Morgane, pour tous les bons moments passés ensemble ; et mes amis d'école Florentina, Manue, Sophie, Marie, Noémie, Pierrick, Eloi, Théo et Romain pour les week-ends anniversaire/ski/bouffe !

Vous êtes devenus ma famille pendant ces trois ans, alors merci Nicolas et Matthieu de m'avoir supporté tous les jours ! Ces trois années ont été riches en péripéties et en déménagements ☺ Merci pour vos blagues de tous les jours et pour toutes les soirées organisées chez nous (max de personnes possibles) qui sont connues dans tout le CEA !

Merci à mes parents, ma sœur, ma tante pour tout leur soutien et leur réconfort depuis toujours. Sans vous je ne serai jamais arrivée jusque là.

Je garde le meilleur pour la fin, merci Florent pour cette année de bonheur malgré tous les moments difficiles à passer. A toi de jouer maintenant !

Sommaire

Introduction générale.....	11
Introduction.....	13
1. Les lanthanides	15
a) Propriétés fondamentales.....	15
b) Propriétés spectroscopiques et magnétiques.....	16
2. IRM et complexes de gadolinium	18
a) Principe de l'IRM.....	18
b) Agents de contraste.....	19
c) Relaxivité des complexes de gadolinium.....	24
d) Paramètres influençant le mécanisme de sphère interne.....	29
e) Systèmes macromoléculaires, nanoobjets.....	35
f) Agents ciblés, sondes intelligentes.....	37
3. Imagerie optique	41
a) Principe.....	41
b) Les complexes de lanthanides luminescents.....	42
c) Les quantum dots.....	47
4. Objectif du travail	51
5. Références	54
Synthèse et étude des complexes.....	59
1. Conception des ligands	61
a) Couplage des espaceurs sur les complexes de lanthanides.....	61
b) Complexes cibles.....	64
2. Synthèse du dérivé du DOTA	66
3. Synthèse des dérivés de l'ebpatcn	69
4. Etude des complexes	73
a) Caractérisation.....	73
b) Relaxivité.....	76
c) Luminescence.....	81
5. Conclusion	84
6. Références	85

Greffage de complexes de lanthanides sur les quantum dots..... 87

1. Introduction	89
a) Sondes bimodales IRM/Optique	89
b) Transferts d'énergie	96
c) Travaux antécédents conduits au laboratoire.....	98
d) Choix des complexes et des quantum dots.....	99
2. Synthèse et caractérisation d'architectures nanométriques multimodales basées sur les quantum dots	100
a) Greffage des complexes de gadolinium sur les quantum dots	100
b) Caractérisation des quantum dots	101
3. Etude de la relaxivité	105
4. Etude de la luminescence des complexes de lanthanides greffés	108
5. Conclusion	116
6. Références	117

Greffage de complexes de lanthanides sur les oligonucléotides 119

1. ADN	121
a) Généralités	121
b) Sondes ADN-complexes de lanthanides.....	123
c) Objectifs et travaux antérieurs.....	127
2. Dérivés de la dpaa	128
a) GddpaarU	128
b) GddpaarUdT	129
3. Dérivés de l'ebpatcn	131
a) Synthèse	131
b) Relaxivité	132
4. Conclusion	135
5. Références	135

Incorporation de complexes de lanthanides dans les billes de silice	137
1. Introduction	139
a) Fonctionnalisation de nanoparticules de silice par des complexes de Gd(III)	140
b) Incorporation non covalente de complexes de Gd(III) dans des nanoobjets.....	143
c) Travaux antécédents conduits au laboratoire.....	145
d) Objectifs.....	147
e) Choix des complexes	148
2. Synthèse et caractérisation de billes de silice	150
a) Méthode de synthèse.....	150
b) Caractérisation des nanoparticules.....	154
c) Choix d'étude des nanoparticules de 25 et 55 nm.....	158
3. Relaxivité	160
a) Dans l'eau	160
b) En milieu biologique : Sérum, BSA, Anions	166
4. Optimisation des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$@Si25NPs et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$@Si55NPs	172
a) Stabilité cinétique.....	172
b) Greffage des chaînes PEG.....	174
c) Images IRM <i>in vitro</i>	177
5. Nanoparticules bimodales	179
a) Avantages des sondes bimodales IRM/optique	179
b) Synthèse	179
c) Luminescence	180
d) Relaxivité	181
6. Conclusion	183
7. Références	184
Conclusions et perspectives	187

Experimental part	191
1. Synthesis	193
a) General information	193
b) Synthons	195
c) DOTA derivative.....	200
d) ebpatcn derivative.....	203
e) N ₃ dpaaoEt	213
f) GddpaadU.....	215
g) Gdebpatcn6mer.....	217
h) Gebpatcn18mer.....	218
i) Synthesis of hydroxyquinoline complexes	219
2. Characterization and measurements	220
a) Scanning electron microscopy (SEM)	220
b) Dynamic light scattering (DLS).....	220
c) UV-visible absorption spectroscopy.....	221
d) Luminescence measurement	221
e) Relaxometric measurements	223
3. Grafting of lanthanide complexes on quantum dots	227
a) Quantum dots synthesis.....	227
b) Synthesis of penicillamine-capped QDs (QD-pen).....	228
c) Synthesis of Ln complexes grafted-QD.....	228
4. Silica nanoparticles	229
a) General information	229
b) Nanoparticle synthesis	229
c) Nanoparticles characterization	231
d) NMR measurement	233
e) Transmetallation	234
f) MRI measurement.....	235
5. References	235

Abréviations

ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
APTES : aminopropyltriéthoxysilane
ARN : acide ribonucléique
BHE : barrière hémato encéphalique
BMS : bulk magnetic susceptibility
Bn : benzyl
Boc: tert-butyloxycarbonyl
BSA : albumine de sérum bovin
Cbz : carboxybenzyle
CEST : chemical exchange saturation transfer
CPMG : carr-purcell-meiboom-gill
DCM : dichlorométhane
DIEA : N,N-diisopropylethylamine
DLS : dynamic light scattering ou diffusion dynamique de la lumière
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DOTA : 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétate
DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique
DTTA : acide diéthylène triamine tetra acétique
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
ES-MS : electrospray mass spectrometry
FRET : Förster resonance energy transfer
HPLC : high performance liquid chromatography ou chromatographie liquide à haute performance
ICP-MS : inductively coupled plasma mass spectrometry
IRM : imagerie par résonance magnétique
MALDI-ToF : matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
MEB : microscopie électronique à balayage
NHS : N-hydroxysuccinimide
NIR : near infrared
NMR : nuclear magnetic resonance
NMRD : nuclear magnetic relaxation dispersion
PBS : phosphate buffered saline
PEG : polyéthylène glycol
QD : quantum dots
QD-pen : quantum dots-penicillamine
QY : quatum yield ou rendement quantique
RF : radiofrequency ou radiofréquence
RMN : résonance magnétique nucléaire
SEM : scanning electron microscopy

Abréviations

^tBu : tert butyl

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

TEA : triéthylamine

TEOS : tetraethyl orthosilicate

TFA : acide trifluoro acétique

TLC : thin layer chromatography

TMAOH : hydroxide de tétraméthylammonium

TTHA : acide triethylene tetraminehexaacetic acid

UV : ultraviolet

Introduction générale

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'une des techniques les plus couramment utilisées en imagerie clinique grâce à de nombreux avantages. Cette technique n'est pas invasive et permet d'obtenir des images en trois dimensions avec une résolution de l'ordre du millimètre. L'IRM est non seulement la technique d'imagerie donnant les informations anatomiques les plus riches mais elle permet également d'obtenir des informations sur l'organisation spatiale des vaisseaux sanguins (angiographie IRM), sur l'architecture fine du tissu neuronal et ses changements à l'échelle microscopique (IRM de diffusion), ou la distribution du sang dans le cerveau (IRM fonctionnelle). L'IRM est basée sur le temps de relaxation des protons de l'eau présents dans les tissus biologiques, soumis à un champ magnétique. En dépit de ces avantages, la faible sensibilité de l'IRM nécessite dans la plupart des examens, l'injection d'un agent de contraste dans 30 à 40% des examens cliniques. Ces composés paramagnétiques permettent d'accélérer la vitesse de relaxation des protons de l'eau et ainsi augmenter le contraste des images.

L'imagerie optique est une technique largement utilisée pour imager en temps réel et de façon non invasive le cheminement d'une molécule luminescente dans les tissus. Elle présente une excellente sensibilité, mais ne possède pas la résolution spatiale de l'IRM. Coupler un agent de contraste avec une sonde luminescente permet d'obtenir un composé bimodal alliant la haute résolution spatiale de l'IRM à la très bonne sensibilité de l'imagerie optique. Les propriétés optiques et magnétiques des ions lanthanides en font d'excellents candidats pour ces deux types d'imagerie. En effet, la luminescence des ions lanthanides est particulièrement adaptée grâce à ses fines bandes d'émission allant du visible jusqu'au proche infrarouge. De plus, les propriétés magnétiques du gadolinium (sept électrons non appariés et un long temps de relaxation électronique) sont notamment exploitées pour l'IRM. L'efficacité d'un agent de contraste est définie par sa relaxivité. La relaxivité est donnée par l'inverse du temps de relaxation des protons de l'eau normalisé par la concentration en espèce paramagnétique.

La tendance actuelle est d'obtenir des informations au niveau moléculaire en augmentant la précision des images, on parle alors d'imagerie moléculaire. L'imagerie moléculaire consiste à visualiser et ainsi mieux comprendre les processus moléculaires fondamentaux à l'intérieur d'un organisme sans le perturber en utilisant des sondes connues comme biomarqueurs pour imager une cible ou un processus particulier. Ainsi elle permet un diagnostic plus précoce et plus précis de certaines maladies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et neurologiques et contribue à améliorer le traitement de ces maladies grâce à une meilleure compréhension et une optimisation des essais précliniques et cliniques.

Pour obtenir des informations à l'échelle moléculaire à l'aide de l'IRM, il est nécessaire de concevoir des agents de contraste ciblés ayant une sensibilité élevée. Les agents de contraste commerciaux (Dotarem, Magnevist ...) permettent d'obtenir de très bonnes images d'angiographie ou d'organes. Cependant, ils sont peu efficaces et leur relaxivité (environ $4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) très inférieure à la valeur prédite par la théorie ($100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) ne permet pas d'observer des événements biologiques au niveau moléculaire. Plusieurs approches sont explorées dans la littérature pour la conception d'agents de contraste optimisés. La première approche consiste à rassembler un grand nombre de complexes

dans des nanoobjets pour augmenter la sensibilité à un point donné. Le greffage des complexes de gadolinium peut aussi conduire à une augmentation importante de la relaxivité aux champs cliniques à condition qu'un certain nombre de paramètres clés gouvernant la relaxivité soient optimisés.

Depuis plusieurs années, notre groupe s'intéresse à la relation entre l'architecture des ligands et la variation des paramètres gouvernant la relaxivité. Les complexes de lanthanides étudiés comme agents de contraste et sondes bimodales IRM/imagerie optique sont basés sur des tripodes à pivot azote central ou triazacyclononane contenant des unités picolinate ou hydroxyquinoline. L'objectif de cette thèse est d'incorporer ces complexes de lanthanides choisis pour leurs propriétés améliorées dans des nanoobjets : quantum dots, oligonucléotides et nanoparticules de silice. L'incorporation des complexes dans ces nanoobjets devrait conduire à des systèmes possédant des relaxivités accrues et/ou capables de répondre à un événement biologique.

Introduction

1. Les lanthanides	15
a) Propriétés fondamentales.....	15
b) Propriétés spectroscopiques et magnétiques.....	16
2. IRM et complexes de gadolinium	18
a) Principe de l'IRM	18
b) Agents de contraste	19
c) Relaxivité des complexes de gadolinium.....	24
d) Paramètres influençant le mécanisme de sphère interne	29
e) Systèmes macromoléculaires, nanoobjets.....	35
f) Agents ciblés, sondes intelligentes.....	37
3. Imagerie optique	41
a) Principe.....	41
b) Les complexes de lanthanides luminescents	42
c) Les quantum dots	47
4. Objectif du travail	51
5. Références	54

Introduction

1. Les lanthanides

a) Propriétés fondamentales

Les lanthanides sont les 15 éléments du tableau périodique allant du lanthane au lutétium de numéros atomiques respectifs 57 et 71. Ils appartiennent à la première période du bloc f et se caractérisent par une configuration électronique de type $[\text{Xe}]5d^06s^24f^{n+1}$, n allant de 0 à 5 ou $[\text{Xe}]5d^16s^24f^n$, n allant de 7 à 14 sauf le lanthane qui présente une configuration de type $[\text{Xe}]5d^16s^24f^0$. La perte d'un électron 4f et de deux électrons 6s conduit à l'ion lanthanide trivalent (Ln^{3+}) qui est le degré d'oxydation le plus stable de la série. Quelques éléments de la série ont la possibilité d'être stabilisés au degré d'oxydation +II (samarium, europium, ytterbium) ou au degré d'oxydation +IV (cérium, praséodyme, terbium).

Figure I-1 : Classification périodique des éléments chimiques. Le tableau périodique est coloré par groupes et périodes. Les lanthanides (éléments 57 à 71) et les actinides (éléments 89 à 103) sont présentés en bas du tableau principal. Les groupes sont étiquetés de 1 à 18 (I A à VIII A) et les périodes de 1 à 7. Les éléments sont classés par numéro atomique croissant.

Figure I-1 : Classification périodique des éléments chimiques

La très forte proximité des propriétés physiques et chimiques de l'yttrium et du scandium fait que ces deux éléments sont souvent regroupés avec les lanthanides. L'ensemble de ces 17 éléments constitue ainsi la famille des « terres rares ».

La particularité des lanthanides réside dans le fait qu'ils présentent des propriétés chimiques relativement proches. Le rayon de l'ion évolue lentement du début à la fin de la période. L'effet d'écran est légèrement moins efficace tout au long de la série que celle de la charge du noyau dû au nombre d'électrons de la sous couche f. Il en résulte une faible augmentation de la charge nucléaire

et donc une diminution lente du rayon atomique, liée à la contraction progressive des orbitales 5s et 5p. Ce phénomène est appelé « contraction des lanthanides ».¹

Les orbitales de valence ont une faible extension radiale et sont enfouies dans le nuage électronique. De ce fait ils sont très peu sensibles à leur environnement chimique et ne peuvent pas former de liaisons covalentes. L'interaction métal-ligand dans les complexes de Ln(III) est décrite par un modèle purement ionique. Les lanthanides sont des acides très durs selon la classification de Pearson² (théorie HSAB des acides et bases durs et mous) et interagissent de préférence avec des ligands durs contenant notamment des atomes d'oxygènes donateurs (eau, carboxylate, phosphonate...). Les lanthanides sont des acides forts au sens de Lewis, ce qui conduit à l'activation des protons présents des molécules d'eau coordonnées aux cations métalliques, donnant lieu à la formation d'espèces Ln(OH)₃ insolubles à partir d'un pH de 6.5.³ Une autre conséquence de l'enfouissement des orbitales f dans le nuage électronique est le faible effet du champ cristallin comparé au couplage spin-orbite : 500 cm⁻¹ contre 5000 à 30000 cm⁻¹ pour les métaux de transition. Ainsi, contrairement aux métaux de transition, les niveaux d'énergie des complexes de Ln(III) sont très proches de ceux de l'ion libre. Il en est de même pour leurs propriétés spectroscopiques et magnétiques. Cette faible influence du champ cristallin explique également la grande diversité des complexes de lanthanides que ce soit en terme de nombre de coordination ou de géométrie des complexes, puisqu'elle ne sera pas imposée par la direction des orbitales. Les ligands s'organisent donc autour du centre métallique de façon à minimiser l'énergie électrostatique et les interactions stériques répulsives. Le nombre de coordination le plus souvent observé est de 8 ou 9 mais il peut varier de 6 à 12.⁴ On observe souvent une décroissance du nombre de coordination sur la série (10 pour La³⁺, 8 pour Lu³⁺) qui est associée à la contraction des lanthanides.

b) Propriétés spectroscopiques et magnétiques

Tous les ions lanthanides sont luminescents exceptés le lanthane et le lutétium de configurations respectives 4f⁰ et 4f¹⁴. Les transitions f-f sont théoriquement interdites par les règles de sélection électronique dipolaire (règle de Laporte et règle de spin). En pratique, le couplage des états électroniques avec les états vibrationnels et les mélanges de fonctions d'onde de différents nombres quantiques J ou de différentes parités atténuent cette interdiction. Les ions lanthanides ont de ce fait un faible coefficient d'extinction molaire (entre 1 et 10 M⁻¹cm⁻¹), ce qui rend difficile leur excitation directe. L'excitation à basse énergie des ions lanthanides se fait le plus souvent grâce à un chromophore qui va transmettre l'énergie via un processus appelé l'effet d'antenne. Le champ cristallin ayant une faible influence sur les orbitales 4f, le ligand organique ne modifie pas la longueur d'onde d'émission spécifique de chaque ion. De plus, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont quasi monochromatiques. La différence d'énergie entre le niveau excité et le niveau fondamental de l'ion Ln(III) conditionne l'efficacité du phénomène de luminescence. Plus l'écart d'énergie est grand et moins les processus de désexcitations non radiatifs sont probables.

2. IRM et complexes de gadolinium

L'IRM est une technique d'imagerie qui permet d'obtenir une image tridimensionnelle de la répartition de l'eau dans le corps d'un patient. L'IRM est basée sur le principe de résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenue dans l'organisme, c'est-à-dire sur la réponse des noyaux lorsqu'ils sont soumis à une onde électromagnétique. Suite à la découverte du concept de résonance magnétique nucléaire par Felix Bloch et Edward Mills Purcell en 1946, le développement de l'IRM se fait en même temps que les avancées dans le domaine de la RMN mais aussi de celles du traitement informatique des données. Les progrès accomplis au cours des années 1970 conduiront à la première image d'un corps humain entier en 1977.

a) Principe de l'IRM

Les patients sont soumis à un champ magnétique statique. Des champs de 0.5 à 3 T sont couramment utilisés en milieu hospitalier, mais la tendance actuelle va vers l'utilisation de champs plus élevés (7 T) pouvant aller jusqu'à 11.7 T pour des études précliniques et cliniques sur l'homme. Un gradient linéaire est appliqué et permet l'encodage de la position de l'information spatiale de chaque noyau dans l'appareil d'imagerie. Ensuite, une impulsion radiofréquence est appliquée et la décroissance temporelle d'induction libre des spins nucléaires est mesurée.

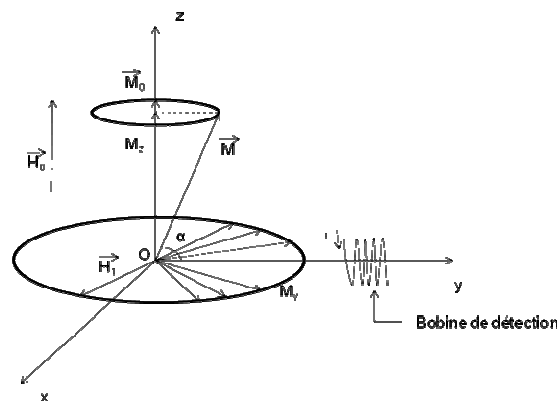


Figure I-3 : Changement d'aimantation du proton \vec{M} dans un champ constant \vec{H}_0 sous l'effet d'un champ magnétique d'excitation \vec{H}_1

Le retour à l'équilibre de la composante M_z selon l'axe du champ magnétique suit une loi mono exponentielle avec une constante de temps T_1 , appelée temps de relaxation longitudinale. De même, l'évolution de l'aimantation M_{xy} est caractérisée par une constante de temps T_2 , appelée temps de relaxation transversale.

L'intensité mesurée pour un élément de volume (voxel ou pixel 3D) dépend d'une part de la concentration des protons à l'endroit considéré et d'autre part des temps de relaxation des protons. En effet, ce comportement de relaxation varie en fonction de l'environnement macromoléculaire des protons de l'eau. Ainsi il est possible de distinguer différents tissus et leurs altérations (notamment les tumeurs) grâce aux différences de densité et de relaxation de l'eau.

Tissus	T ₁ sain (ms)	T ₁ tumoral (ms)
Foie	140-170	300-450
Pancréas	180-200	275-400
Rein	300-340	400-450
Prostate	250-325	350-400

Tableau I-1 : temps de relaxation dans différents tissus sains et malades⁷

L'IRM est une technique d'imagerie qui possède une excellente résolution spatiale mais qui n'est pas assez sensible dans la plupart des cas. Il est souvent nécessaire de procéder à de longues acquisitions pour augmenter le rapport signal sur bruit. Une autre possibilité consiste à injecter un agent de contraste paramagnétique qui va améliorer le contraste des zones à analyser en augmentant les vitesses de relaxation longitudinale et transversale des protons à proximité. Ceci permet à la fois de réduire le temps d'acquisition et d'augmenter le contraste entre les tissus sains et malades. L'efficacité d'un agent de contraste, autrement dit sa capacité à augmenter les vitesses de relaxation des protons des molécules d'eau environnantes est appelée relaxivité.

b) Agents de contraste

De nombreux agents de contraste ont été développés au cours des vingt-cinq dernières années. Ces agents de contraste peuvent être classés en deux catégories suivant leur mode d'action : les agents de type T₁ et les agents de type T₂. Les agents sont de type T₁ ou T₂ suivant qu'ils affectent respectivement la vitesse de relaxation longitudinale 1/T₁ ou transversale 1/T₂. Les effets sur les images des deux catégories sont opposés : l'intensité du signal augmente quand 1/T₁ augmente et diminue quand 1/T₂ augmente. On parle respectivement d'agents de contraste positifs ou négatifs. De plus, des séquences impulsionnelles pondérées T₁ ou T₂ sont utilisées afin de mettre en avant les changements de T₁ ou T₂. Il existe également des agents CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) qui consiste en l'utilisation d'une structure contenant des protons échangeables avec ceux de l'eau induisant un contraste négatif.

Les agents de contraste les plus utilisés pour des examens cliniques sont de type T₁ puisqu'ils permettent à la fois d'améliorer le contraste mais aussi de réduire la durée de l'examen. En effet, l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale permet un retour à l'équilibre plus rapide. Dans le cas des agents de type T₂, la relaxation transversale est provoquée par un déphasage de l'aimantation et son temps de retour à l'équilibre n'a pas d'influence sur la durée de l'examen.

Les agents de contraste commerciaux de type T₁ peuvent être classés selon leur biodistribution. Les deux grandes catégories sont les agents extracellulaires et les agents intravasculaires.⁶ Les agents extracellulaires sont des complexes de petite taille qui diffusent du sang vers le liquide interstitiel. Ils sont la plupart du temps utilisés pour la détection de tumeurs cérébrales. Dans le cas d'un sujet sain, la barrière hématoencéphalique (BHE) est imperméable aux agents de contraste. En revanche, la présence d'une lésion la rend perméable à de tels agents qui vont ainsi s'accumuler dans la zone malade hypervascularisée. Les agents extracellulaires sont éliminés par les reins en 90 min environ. Parmi ces agents, ceux présentant une lipophilie élevée sont particulièrement intéressants puisqu'ils permettent une accumulation dans les hépatocytes (cellules du foie) et donc de détecter certaines pathologies hépatiques et pancréatiques (tumeurs, insuffisance pancréatique exocrine). Ils sont

qualifiés d'agents hépatobiliaires.⁸ Les agents intravasculaires sont des complexes plus gros ou se liant aux macromolécules présentes dans la circulation sanguine, ce qui limite leur diffusion dans le liquide interstitiel et augmente le temps de résidence dans le sang. Ils permettent d'avoir accès à une imagerie des vaisseaux sanguins constituant une alternative à l'angiographie par rayons X mais aussi servir à la détection de tumeurs qui sont souvent anormalement hyper vascularisées.

-Agents de type T₂

Les agents de type T₂ sont dits superparamagnétiques. Le superparamagnétisme est une forme de magnétisme qui apparaît lorsque des matériaux ferromagnétiques sont dispersés sous forme de petites particules. Quand de telles espèces sont soumises à un champ magnétique externe, elles sont aimantées de la même manière qu'un matériau paramagnétique mais leur susceptibilité magnétique est bien plus grande. La coopération entre les moments de spin individuels est cruciale pour la formation d'un super spin qui crée une forte inhomogénéité du champ magnétique dans son environnement et réduit considérablement le temps de relaxation T₂ des protons de l'eau à proximité. Ce phénomène est observé notamment en présence de particules d'oxydes de fer Fe₃O₄. Trois types de particules sont distingués suivant leur taille :

- les USPIO (Ultra small Super Paramagnetic of Iron Oxides) dont le diamètre est inférieur à 50 nm
- les SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxides) de taille comprise entre 50 et 200 nm
- les grosses particules de diamètre supérieur à 200 nm.

Deux méthodes de stabilisation des particules sont utilisées. La première est une stabilisation stérique par de longues chaînes greffées à la surface des particules (dextran, chaînes PEG, albumine). La seconde est une stabilisation électrostatique par des charges présentes à la surface. Les fonctions carboxylates présentes dans les molécules comme le citrate, l'aspartate ou l'acétate sont les plus utilisées. L'enrobage nécessaire pour éviter l'agrégation des particules détermine la taille des particules, sa biodistribution et sa pharmacocinétique. Les principaux agents de contraste commerciaux de type T₂ sont présentés dans le tableau I-2.

Nom	Laboratoire	Type de particule	Enrobage	diamètre (nm)	r ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r ₂ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Biodistribution
Sinerem	Guerbet	USPIO	Dextran	20-40	19.5	87.6	Intravasculaire
Supravist	Schering	USPIO	Carboxy-dextran	17-46	10.7	38	Intravasculaire
Clariscan	Amersham Health	USPIO	Carbo-hydrate	20	20*	35*	Intravasculaire
Endorem	Guerbet	SPIO	Dextran	80-150	9.9	158	Hépatobiliaire
Resovist	Schering	SPIO	Carboxy-dextran	62	9.7	189	Hépatobiliaire Intravasculaire
Abdoscan	GE Healthcare	Grosse particule	Styrene	3500			Tube digestif
Lumirem	Guerbet	Grosse particule	Silicone	170-360			Tube digestif

Tableau I-2 : Propriétés des agents de contraste superparamagnétiques commerciaux (relaxivité à 60 MHz, * relaxivité mesurée à 20 MHz)⁷

- Agents CEST

Un autre type d'agents de contraste qui a émergé plus récemment sont les agents CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer). Contrairement à ce qui vient d'être présenté, ces composés n'agissent pas directement sur le temps de relaxation de l'eau. Ce sont des molécules qui contiennent des protons labiles, susceptibles de s'échanger avec les protons de l'eau. La vitesse d'échange de ces protons avec l'eau doit être inférieure à leur différence de fréquence de résonance. Le principe consiste à saturer sélectivement un signal donné de protons labiles appartenant à la structure-même de l'agent de contraste ou aux molécules d'eau qui lui sont transitoirement liées, à l'aide d'une impulsion radiofréquence bien choisie. L'image résulte alors de l'altération du signal des protons échangés et engendre un contraste négatif.

Malheureusement, cet effet n'est pas assez intense pour établir l'efficacité d'un agent CEST. En effet, le champ de saturation peut affecter le signal de l'eau libre même en l'absence d'agent de contraste. *In vivo* cette irradiation peut saturer un signal très large correspondant aux protons endogènes contenus dans les différents tissus et membranes.

Un moyen de contourner ce problème est l'utilisation d'agents PARACEST (CEST paramagnétique) qui contiennent dans leur structure un agent CEST (avec des protons échangeables) et un ion lanthanide paramagnétique qui permet de déplacer le signal des protons échangeables. Ainsi le signal des protons échangeables est suffisamment éloigné de celui des protons de l'eau et permet une irradiation sélective. Ces propriétés permettent de nouvelles applications comme la détection de plusieurs agents dans la même image ou la quantification des paramètres biologiques et physicochimiques qui caractérisent l'environnement dans lequel ils sont distribués.

- Agents T_1

La classe d'agents de contraste la plus utilisée en IRM fait intervenir un mécanisme de relaxation longitudinale. Si on introduit des molécules contenant des électrons célibataires dans l'environnement des protons de l'eau, la relaxation sera plus efficace à cause du moment magnétique de l'électron qui est 658 fois plus grand que celui du proton. Avec ses sept électrons célibataires, le gadolinium est un élément de choix pour accélérer la vitesse de relaxation des protons de l'eau. Cependant l'ion aqua Gd(III) est toxique aux doses requises pour l'IRM. Cette toxicité provient essentiellement de la similitude de son rayon ionique avec celui du Ca(II),⁹ qui conduit à une compétition avec le calcium présent dans l'organisme. D'autres métaux endogènes peuvent, dans une moindre mesure, donner lieu à des réactions de transmétallation comme le Zn(II) et le Cu(II). De plus, l'ion aqua Gd(III) libre peut interagir avec les protéines du sérum ou avec les anions endogènes pour se déposer sous forme de sels insolubles sur les os, le foie et la rate.

La complexation du Gd(III) par un chélate organique bien conçu est indispensable pour éviter toute toxicité et pour garantir l'excrétion rapide de l'agent de contraste de l'organisme. Le complexe formé doit posséder plusieurs propriétés indispensables. Celui-ci doit avoir une forte solubilité dans l'eau à pH physiologique car des solutions de 0.1 à 1 M sont injectées. Les complexes formés doivent être stables cinétiquement et thermodynamiquement pour éviter les réactions de transmétallation dans l'organisme. Enfin le ligand ne doit pas saturer la sphère de coordination du Gd(III) mais laisser au moins un site vacant pour qu'une molécule d'eau puisse se coordonner, s'échanger avec les molécules d'eau du solvant et assurer ainsi le transfert de l'information paramagnétique.

Les ligands DOTA et DTPA forment des complexes dont les stabilités cinétique et thermodynamique sont suffisantes pour leur utilisation *in vivo*. Le complexe GdDTPA est le premier agent de contraste à avoir été approuvé pour son utilisation clinique chez l'homme. Il est commercialisé depuis 1988 sous le nom de Magnevist®. Depuis au moins six autres complexes de Gd(III) avec des ligands polyaminocarboxylates ont été commercialisés. Ils sont classés selon deux familles : ils sont basés soit sur un squelette linéaire (DTPA) ou cyclique (DOTA). Leurs structures et leurs propriétés sont présentées dans la figure I-4.

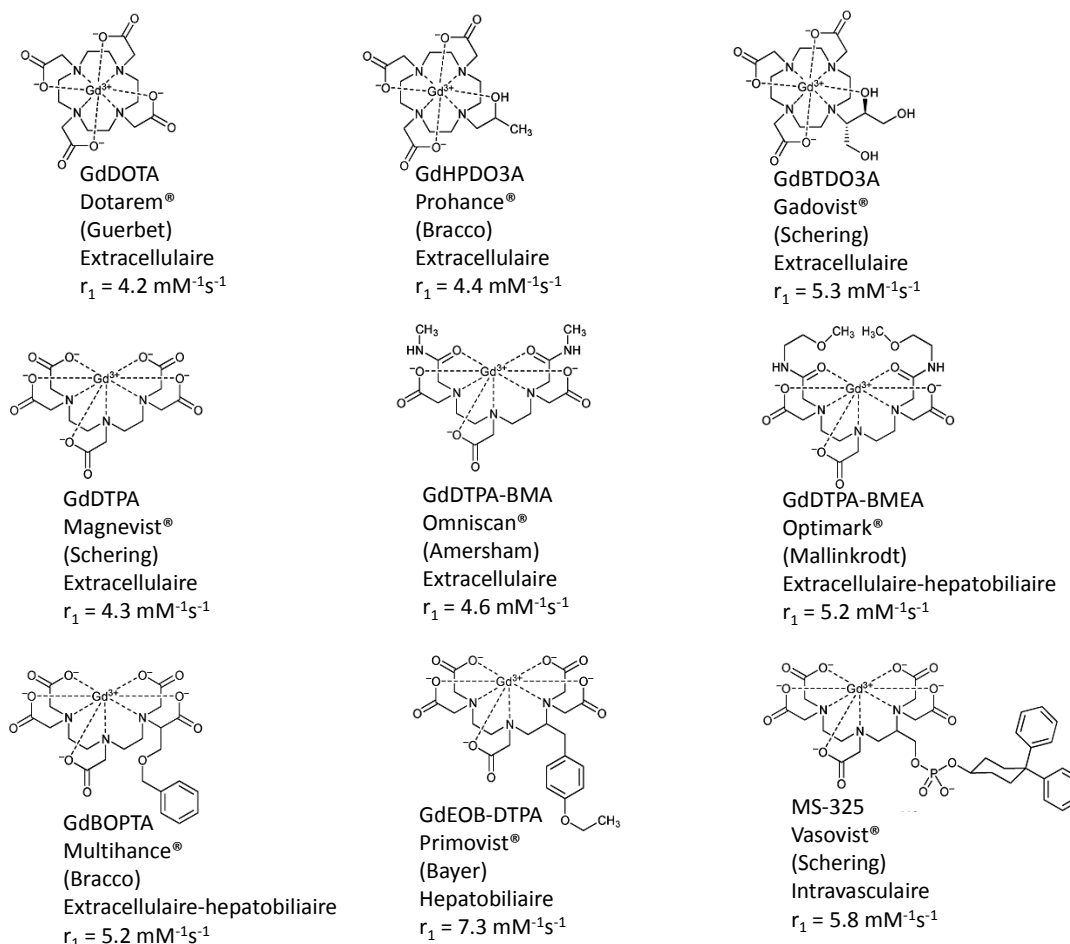


Figure I-4 : Les agents de contraste de type T_1 utilisés cliniquement et leur relaxivité à 20 MHz et 25°C ⁷

La plupart de ces composés sont qualifiés « d'agents de contraste de première génération ». Après injection ils diffusent rapidement vers le milieu extracellulaire. Les complexes de GdDOTA et GdDTPA, les plus utilisés lors d'examens cliniques ne possèdent pas de pharmacodynamique particulière. Les complexes GdBOPTA et GdEOB-DTPA sont des dérivés du GdDTPA pour lesquels un bras acétate ou le squelette polyamine a été fonctionnalisé avec un groupement plus lipophile, entraînant une accumulation dans les hépatocytes. Concernant le MS-325, l'introduction d'un groupement dibenzocyclohexane sur le DTPA via un lien phosphate permet un temps de vie plus long dans le sang, d'une part à cause de sa taille qui l'empêche de diffuser dans le milieu interstitiel, d'autre part du fait de sa forte affinité avec l'albumine sérique.¹⁰ Cette interaction non covalente

entre le complexe et la protéine permet d'augmenter la relaxivité du complexe jusqu'à $42 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz en ralentissant son temps de corrélation rotationnelle. Ces propriétés particulièrement en font un agent de contraste dédié à l'angiographie par IRM qui se montre bien plus efficace que les petits complexes.

Le gadolinium n'est pas le seul métal utilisé comme base pour les agents de contraste. L'ion manganèse (II), par la présence de ses cinq électrons non appariés, et donc un spin de 5/2, permet également d'accélérer la vitesse de relaxation longitudinale des protons environnants. Un agent de contraste à base de manganèse (II), le $[\text{Mn}(\text{DPDP})]^{2-}$ a également été approuvé cliniquement et a été commercialisé en Europe par GE Healthcare sous le nom de Teslascan® (figure I-5). La structure du ligand fait qu'il est de type extracellulaire et hépatobiliaire. Le complexe n'a pas de molécule d'eau dans sa sphère interne mais les molécules d'eau de seconde sphère lui permettent d'atteindre une relaxivité de $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans l'eau à 25°C .¹¹ C'est le seul agent qui relargue des ions métalliques pour former des adduits avec des macromolécules endogènes induisant l'accélération de la vitesse de relaxation et permettant la visualisation des hépatocytes. Cet agent de contraste présente une toxicité amoindrie par rapport aux complexes de gadolinium, mais son efficacité en terme de relaxivité est moins importante et il ne peut être un agent que de type hépatobiliaire.

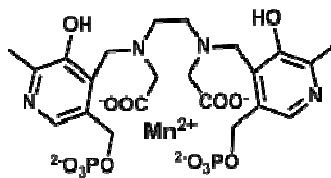


Figure I-5 : Agent de contraste extracellulaire $[\text{Mn}(\text{DPDP})]^{2-}$, Teslascan®¹¹

D'autres ions métalliques peuvent être utilisés comme alternative au gadolinium. Des recherches sur les complexes d'euporium(II) ont montré qu'ils pouvaient accélérer la vitesse de relaxation des protons de l'eau. En effet, l'Eu(II) contient le même nombre d'électrons non appariés mais a une vitesse d'échange plus élevée de l'ordre de 10^8 s^{-1} grâce à sa densité de charge plus faible. Le groupe d'Allen a développé des ligands à base de cryptates qui permettent d'avoir deux molécules d'eau dans la sphère interne du métal (figure I-6). Tous ces paramètres confèrent au complexe décrit dans la figure I-6 une relaxivité de $7.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 300 MHz et 19°C , plus élevée qu'à bas champ ($4.39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 37°C).¹² La présence du groupement biphenyl permet au complexe d'interagir avec la BSA et de ce fait une augmentation de la relaxivité de 171% est observée à 60 MHz.¹³ Cependant le complexe a une faible stabilité en solution aqueuse : l'ion Eu(II) peut facilement s'oxyder en ion Eu(III), qui ne possède pas ces propriétés relaxométriques.

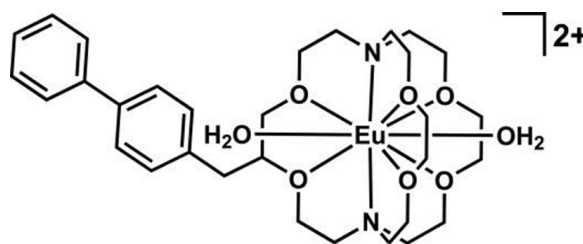


Figure I-6 : Agent de contraste à base d'Eu(II)

c) Relaxivité des complexes de gadolinium

Actuellement la dose maximale d'agent de contraste injectée au patient est limitée par la stabilité du complexe dans les conditions physiologiques, elle est de 0.1 mmol/kg. A cette concentration, une relaxivité inférieure ou égale à $5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ne produit pas un contraste suffisant pour l'imagerie moléculaire, qui consiste à observer les processus biologiques à l'échelle moléculaire ou de la cellule. Ainsi de nombreux efforts sont effectués pour accéder à des agents de contraste à hautes relaxivités.

Nous avons vu précédemment que le gadolinium était l'élément de choix en tant qu'agent de contraste pour l'IRM grâce à ses sept électrons non appariés, son long temps de relaxation électronique, un nombre de coordination élevé qui lui permet d'accommoder neuf molécules d'eau d'hydratation et un seul degré d'oxydation stable, empêchant ainsi toute métabolisation *in vivo* par des processus d'oxydoréduction. Cependant la présence d'un ligand organique chélatant le gadolinium est nécessaire afin d'éviter toute toxicité.

Le design du ligand est primordial car c'est lui qui va déterminer les propriétés du complexe par son architecture et sa composition chimique. L'un des enjeux majeurs est de pouvoir accéder à des complexes solubles dans l'eau dont la stabilité cinétique et thermodynamique est suffisante pour éviter le relargage de l'ion aqua Gd(III) *in vivo*. De plus, l'architecture des complexes influence de nombreux paramètres gouvernant la relaxivité. Afin de les mettre en évidence, le mécanisme de relaxivité des complexes de Gd(III) doit être détaillé.

La théorie de la relaxation d'un spin au voisinage d'une espèce paramagnétique est décrite par la théorie de Bloembergen et Solomon.^{14, 15} Un complexe de Gd(III) induit une augmentation des vitesses de relaxation longitudinale $1/T_1$ et transversale $1/T_2$ du spin. La vitesse de relaxation observée $(1/T_i)_{obs}$ est la somme des vitesses de relaxation diamagnétique et paramagnétique :

$$\text{Equation I-1 : } \left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + \left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} \quad i = 1, 2$$

L'équation I-1 est couramment utilisée pour une description générale mais elle est valide uniquement pour des solutions diluées. La composante diamagnétique correspond à la vitesse de relaxation du solvant en l'absence du composé paramagnétique. Le terme paramagnétique traduit l'augmentation de la vitesse de relaxation causée par le composé paramagnétique, qui est proportionnelle à sa concentration:

$$\text{Equation I-2 : } \left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + r_i[\text{Gd}] ; \left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} = r_i[\text{Gd}] ; i = 1, 2$$

où r_i est la relaxivité de l'espèce paramagnétique et correspond à son efficacité. La relaxivité est l'augmentation de la vitesse de relaxation des spins des atomes du solvant résultant de l'ajout d'un millimole par litre de l'espèce paramagnétique donnée. La relaxivité est gouvernée par de nombreux paramètres qui seront décrits par la suite. Ici nous considérons uniquement la relaxation des protons de l'eau qui est le fondement de l'imagerie par résonance magnétique. Dans la suite du manuscrit, le terme relaxivité est utilisé pour désigner la relaxivité longitudinale des protons de l'eau.

La contribution principale à la relaxation des protons de l'eau provient d'une interaction dipolaire entre le spin nucléaire et le spin électronique du gadolinium. Cette interaction diminue rapidement

avec la distance entre le centre paramagnétique et le proton. En tenant compte de cette distance, on distingue trois catégories de molécules d'eau et trois mécanismes de relaxivité qui leur sont associées (figure I-7).

- Le mécanisme de sphère interne (ou inner sphere IS) qui concerne l'eau en première sphère de coordination, directement liée au centre métallique. Ces molécules d'eau s'échangent avec les molécules libres du solvant, permettant de propager l'augmentation de la vitesse de relaxation au sein de la solution.

- Le mécanisme de sphère externe (ou outer sphere OS) qui concerne les molécules d'eau à proximité du centre métallique. L'interaction entre ces molécules d'eau et le centre paramagnétique est gouvernée uniquement par des phénomènes de diffusion translationnelle.

- Le mécanisme de seconde sphère (ou second sphere SS) qui concerne les molécules d'eau en seconde sphère de coordination. Ces molécules sont le plus souvent liées au complexe par liaisons hydrogène via le ligand. Leur temps de résidence à la surface du complexe est supérieur au temps de diffusion translationnelle de l'eau libre.

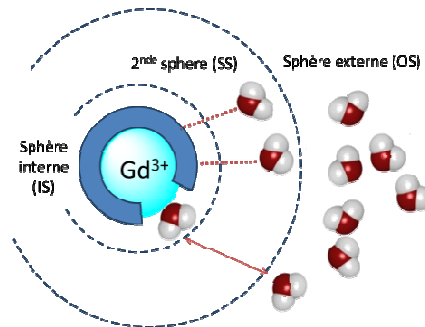


Figure I-7 : Représentation schématique d'un complexe de gadolinium en solution avec les différentes catégories de molécules d'eau

L'augmentation paramagnétique de la relaxation (PRE pour paramagnetic relaxation enhancement) est alors la somme de trois contributions, il en est de même pour la relaxivité :

$$\text{Equation I-3} : \left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} = \left(\frac{1}{T_i}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_i}\right)^{OS} + \left(\frac{1}{T_i}\right)^{SS} \quad i = 1, 2$$

$$\text{Equation I-4} : r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} + r_i^{SS} \quad i = 1, 2$$

Les agents de contraste à base de gadolinium étant principalement des agents de type T_1 , nous nous limiterons pour la suite à la description de la relaxivité longitudinale r_1 .

- *Mécanisme de sphère interne*

La contribution de la sphère interne à la relaxation globale résulte de l'échange des molécules d'eau coordonnées au gadolinium avec celles du solvant. Pour prendre en compte que la population du solvant est bien plus importante que le nombre de molécules d'eau coordonnées, le mécanisme

décrit par la théorie de Solomon, Bloembergen, Morgan (SBM) repose sur les approximations suivantes :¹⁶

- Le spin électronique est assimilé à un dipôle ponctuel au centre de cet ion
- Le complexe est assimilé à une sphère et sa rotation est isotrope
- Le facteur de Landé g est isotrope
- Les fonctions de corrélation associées à la dynamique de rotation des molécules d'eau coordonnées accompagnant le complexe et à l'échange de ces molécules ont des décroissances monoexponentielles de temps de corrélation τ_R et τ_m
- Seule la levée de dégénérescence transitoire des niveaux électroniques du multiplet fondamental de spin S due aux distorsions/vibrations du ligand est prise en compte

En tenant compte de ces approximations, l'augmentation paramagnétique de sphère interne de relaxation longitudinale est donnée par :

$$\text{Equation I-5 : } \frac{1}{T_1^S} = \frac{qP_m}{T_{1m} + \tau_m} = \frac{c}{55.5} \frac{q}{T_{1m} + \tau_m}$$

Avec :

- q le nombre de molécules d'eau liées par le centre métallique
- P_m la fraction molaire des molécules de solvant en première sphère de coordination
- T_{1m} le temps de relaxation longitudinale d'une molécule d'eau si elle était coordonnée de façon permanente au gadolinium
- τ_m le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la première sphère de coordination
- c la concentration molaire en espèce paramagnétique^{17, 18}

A priori la relaxation des protons de l'eau liée est gouvernée par une interaction dipôle-dipôle et une interaction scalaire ou de contact, toutes deux dépendantes du champ magnétique. Le Gd(III) formant des liaisons de nature ionique avec l'oxygène de l'eau partiellement chargé négativement, les protons se retrouvent éloignés du centre paramagnétique et l'interaction de contact est négligeable.⁷ Le temps de relaxation de protons de l'eau liée peut donc dans une bonne approximation, être considéré comme dépendant uniquement de l'interaction dipolaire. La variation de T_{1m} en fonction du champ magnétique est donnée par les équations de Solomon-Bloembergen modifiées :

$$\text{Equation I-6 : } \frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2}{r_{GdH}^6} S(S+1) \left[\frac{3\tau_{c1}}{1 + \omega_I^2 \tau_{c1}^2} + \frac{7\tau_{c2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2} \right]$$

Avec :

- γ_I le rapport gyromagnétique du proton
- g le facteur de Landé pour l'électron libre
- μ_B le magnéton de Bohr
- r_{GdH} la distance entre le spin nucléaire I du proton et le spin électronique S
- S le nombre quantique de spin électronique
- τ_{ci} (i=1,2) le temps de corrélation relatif à la dynamique du couplage S-I
- ω_I et ω_S les fréquences de Larmor pour le proton et l'électron ($\omega_S = 658\omega_I$)

Les termes τ_{c1} et τ_{c2} sont définis de la manière suivante :

$$\text{Equation I-7 : } \frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m} \quad i = 1, 2$$

Avec :

- T_{1e} et T_{2e} respectivement les temps de relaxation électronique longitudinale et transversale du Gd(III)
- τ_R le temps de corrélation rotationnelle du complexe
- τ_m le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la première sphère de coordination

On peut noter que les deux termes entre crochets de l'équation I-6 sont responsables d'une baisse importante de la relaxivité à haut champ ($\omega^2\tau_{ci}^2 > 1$).

Comme les temps de relaxation nucléaire, les temps de relaxation électronique varient en fonction du champ magnétique. Pour les complexes de Gd(III), le temps de relaxation électronique est lié à la modulation temporelle de la levée de dégénérescence des niveaux électroniques du spin du Gd(III) (Zero Field Splitting ou ZFS). Une description précise fait intervenir deux contributions : d'une part la fluctuation moyenne du ZFS (ZFS statique) causée par la rotation brownienne du champ moyen du ligand accompagnant celle du complexe dans le référentiel moléculaire et d'autre part celle liée aux vibrations du champ du ligand (ZFS transitoire ou transient).¹⁹ Une description simplifiée, en prenant compte uniquement la partie vibratoire du ZFS est donnée par la théorie de Bloembergen et Morgan¹⁵ dans les équations suivantes.

$$\text{Equation I-8 : } \left(\frac{1}{T_{1e}}\right)^{ZFS} = 2C \left(\frac{1}{1+\omega_s^2\tau_v^2} + \frac{4}{1+4\omega_s^2\tau_v^2} \right)$$

$$\text{Equation I-9 : } \left(\frac{1}{T_{2e}}\right)^{ZFS} = C \left(\frac{5}{1+\omega_s^2\tau_v^2} + \frac{2}{1+4\omega_s^2\tau_v^2} + 3 \right)$$

$$\text{Equation I-10 : } C = \frac{1}{50} \Delta^2 \tau_v [4S(S+1) - 3]$$

Avec :

- τ_v le temps de corrélation associé à la modulation vibrationnelle à la levée de dégénérescence
- Δ^2 le carré de l'amplitude de l'éclatement à champ magnétique nul

Δ^2 et τ_v sont reliés au temps de relaxation électronique à champ nul τ_{s0} par les équations suivantes :

$$\text{Equation I-11 : } C = \frac{1}{10\tau_{s0}} \text{ où } \frac{1}{\tau_{s0}} = \frac{1}{5} \Delta^2 \tau_v [4S(S+1) - 3] = 12\Delta^2 \tau_v \text{ pour } S = 7/2$$

L'ensemble de ces équations constitue la théorie SBM de la relaxivité de sphère interne. Cette théorie met en évidence les paramètres importants qui influent sur la relaxivité de sphère interne :

- le nombre d'hydratation du complexe q
- la distance spin nucléaire-spin électronique r_{GdH} pour une molécule d'eau coordonnée
- le temps de corrélation rotationnelle τ_R
- la vitesse d'échange $k_{ex}=1/\tau_m$ des molécules d'eau coordonnées avec le solvant
- les temps de relaxation électronique T_{1e} et T_{2e}

Ces paramètres sont fortement influencés par l'architecture du ligand, comme ce sera décrit dans la partie suivante (Paramètres influençant la relaxivité de sphère interne). De plus, cette description

met en évidence l'influence du champ magnétique (ω_I , ω_S) sur la relaxation électronique et de manière plus générale sur la relaxivité de sphère interne. La variation de la relaxivité en fonction du champ est donc primordiale pour l'étude d'un agent de contraste. La mesure des temps de relaxation en fonction du champ magnétique est appelé relaxométrie. Un profil relaxométrique ou NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) correspond au tracé de la relaxivité mesurée en fonction du champ. L'allure du profil NMRD permet d'accéder à une interprétation qualitative des mécanismes de relaxation. A bas champ (<3-4 MHz) c'est le temps de relaxation électronique qui domine les fluctuations de l'interaction dipôle-dipôle et détermine la relaxivité. A des champs plus élevés, c'est le temps de corrélation rotationnelle τ_R qui est dominant et génère un extrémum autour de 30 MHz. La valeur de cet extrémum est fortement influencée par le temps de résidence des molécules d'eau en première sphère de coordination (figure I-8).

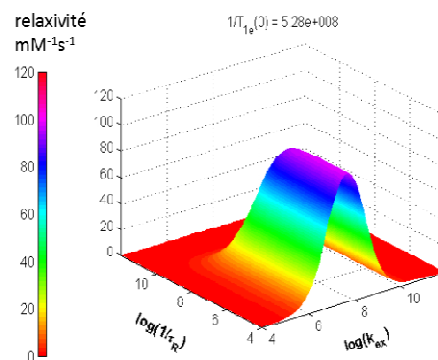


Figure I-8 : Relation entre la diffusion rotationnelle et l'échange d'eau pour un complexe de Gd(III) à 20 MHz à q fixé²⁰

- *Mécanisme de sphère externe*

La contribution de sphère externe provient de l'interaction dipolaire entre le spin nucléaire et le spin électronique lorsque les molécules de solvant diffusent à proximité du complexe. Le mécanisme est caractérisé par la distance minimale d'approche a_{GDH} entre la molécule d'eau et l'ion paramagnétique ; et par le coefficient de diffusion D d'une molécule d'eau par rapport au complexe. Cette contribution est décrite par le modèle d'Ayant-Belorisky-Hwag-Freed (ABHF)²¹⁻²⁵ :

$$\text{Equation I-12} : \frac{1}{T_1^{OS}} = \frac{8\pi}{5} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \left[j\left(\frac{1}{T_{1e}} + i\omega_I\right) + \frac{7}{3} \left(\frac{1}{T_{2e}} + i\omega_S\right) \right]$$

Avec :

- γ_I et γ_S les rapports gyromagnétiques du proton et électron
- \hbar la constante de Planck
- S le nombre quantique de spin électronique
- T_{ie} (i=1,2) les temps de relaxation électronique longitudinal et transversal du Gd(III)
- ω_I et ω_S les fréquences de Larmor pour le proton et l'électron

Le temps caractéristique est un temps de corrélation diffusionnelle τ_D tel que $\tau_D = a_{GDH}^2/D$. La densité spectrale $j(\sigma)$ est la transformée de Fourier des fonctions de corrélation temporelle τ_D et τ_v (associées à T_{ie}). Une expression simple existe pour ces densités spectrales dans le cadre du modèle de Gd(III) et

de protons assimilés à des sphères dures où les interactions électrostatiques et spécifiques ne sont pas prises en compte :

$$\text{Equation I-13 : } j(\sigma) = \frac{10^{-6} N_A c}{D a_{GdH}} Re \left[\frac{4+x}{3(9+9x+4x^2+x^3)} \right] \text{ avec } x = \sqrt{\sigma \tau_D}$$

Avec :

- N_A le nombre d'avogadro
- c la concentration en espèce paramagnétique
- D le coefficient de diffusion relatif d'une molécule d'eau par rapport au complexe
- a_{GdH} la distance minimale d'approche entre un proton d'une molécule d'eau diffusant librement et l'ion paramagnétique

Cette contribution représente environ 40% de la relaxivité globale d'un complexe de gadolinium monohydraté aux champs de l'imagerie clinique.²⁶

- *Mécanisme de seconde sphère*

Les molécules d'eau de seconde sphère sont en interaction avec le ligand majoritairement par des liaisons hydrogène et ne peuvent être assimilées à des sphères dures et traitées par un modèle purement diffusionnel. Une approche similaire à la modélisation de phénomène « inner sphere » a été développée.^{26, 27}

En première approximation, la contribution de seconde sphère est calculée comme celle de sphère interne en ajustant la vitesse d'échange τ'_m et la distance r'_{GdH} . Il faut noter que l'orientation des molécules n'est pas la même en seconde sphère qu'en sphère interne, les protons sont plus proches du cation métallique comparés aux oxygènes. Un moyen d'augmenter la contribution de la seconde sphère est de remplacer un des bras acétate du DTPA²⁸ ou du DOTA²⁹ par un bras phosphonate connu pour former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau environnantes.

d) Paramètres influençant le mécanisme de sphère interne

Pour les agents de contraste commerciaux actuellement utilisés, les sphères externe et interne ont la même contribution sur la relaxivité globale des protons aux champs de l'imagerie clinique. La contribution de la sphère interne peut être considérablement augmentée en changeant l'architecture du ligand, mais la contribution de sphère externe peut être difficilement modifiée. Par conséquent, pour les nouveaux agents de contraste avec une meilleure efficacité (et donc une meilleure relaxivité), le terme de sphère interne devient plus important et représente la majeure contribution à la vitesse de relaxation des protons.

De nombreux paramètres influencent la relaxivité de sphère interne et leur contribution est fortement influencée par le champ magnétique. Il est difficile d'obtenir une détermination précise de ces paramètres par l'étude du seul profil NMRD, il est donc nécessaire de déterminer un maximum de paramètres de façon indépendante. Dans cette partie, les méthodes classiques de détermination de chaque paramètre comme le nombre de molécules d'eau coordonnées (q), la vitesse d'échange ($k_{ex}=1/\tau_m$), le temps de corrélation rotationnelle (τ_R) et le temps de relaxation électronique (T_{1e}) ainsi que l'ajustement de ces paramètres par l'architecture du ligand vont être présentées (figure I-9).

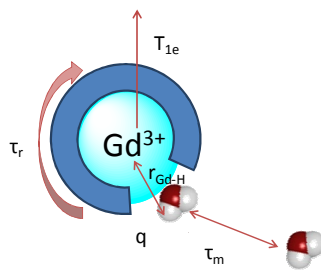


Figure I-9 : Paramètres influençant la relaxivité de sphère interne

- *Nombre de molécules d'eau coordonnées q*

La relaxivité de sphère interne est directement proportionnelle au nombre de molécules d'eau coordonnées en première sphère (équation I-5). En modifiant la denticité du ligand utilisé pour complexer l'ion gadolinium, il semble facile d'augmenter la relaxivité quel que soit le champ magnétique. Cependant l'augmentation du nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination a également des inconvénients. La denticité réduite du ligand va entraîner une stabilité cinétique et thermodynamique plus faible du complexe, ce qui augmentera sa toxicité en milieu biologique. De plus, le complexe sera plus sensible à la coordination des anions endogènes (carbonate, phosphate...) qui pourront remplacer une ou plusieurs molécules d'eau dans la sphère de coordination et de ce fait faire chuter la relaxivité.

La recherche d'une amélioration franche de la relaxivité a conduit à la conception d'architectures susceptibles d'apporter une stabilité suffisante à ces complexes avec un nombre de molécules d'eau supérieur à un. Parmi les ligands développés pour obtenir des complexes bis-aqua, les ligands AAZTA³⁰ et DTTA^{31, 32} (figure I-10) se distinguent parmi les autres par la stabilité des complexes de gadolinium correspondants, proche de celle de la DTPA et de leur résistance à la liaison des anions dans la sphère de coordination. En effet, le complexe de GdAAZTA a une relaxivité de $7.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C et le complexe dinucléaire Gd_2DTTA_2 a une relaxivité de $12.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 37°C.

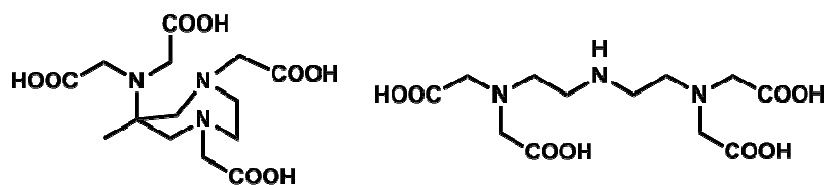


Figure I-10 : Les ligands H_4AAZTA ³⁰ et H_4DTTA ^{31, 32} conduisant à des complexes de Gd(III)

Pour déterminer le nombre de molécules d'eau dans la sphère interne, la méthode la plus fréquemment utilisée est la mesure des temps de vie de luminescence des complexes de Tb(III) et Eu(III) dans l'eau lourde D_2O et légère H_2O .³³ Il est également possible de déterminer le paramètre q par la spectroscopie par résonance double électronique et nucléaire (ENDOR) de ^{17}O ³⁴ ou par l'étude du déplacement induit par le complexe de Dy(III) sur la résonance du noyau ^{17}O de la molécule d'eau.³⁵

- *La distance gadolinium-proton r_{GdH} pour une molécule d'eau coordonnée*

La relaxivité de sphère interne diminue rapidement avec la distance Gd-proton (en $1/r^6$, équation I-6). Une faible variation de cette distance a une influence importante sur la relaxivité : une augmentation de 0.1 Å conduit à une diminution de la relaxivité de 20%. Un tel calcul de la distance Gd-H par spectroscopie ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) montre que celle-ci est identique dans le cas de l'ion Gd(III) aqua et du complexe GdHPDO3A, elle est égale à 3.1 Å.³⁶ Ce résultat est en accord avec les données cristallographiques obtenues précédemment.⁶ Ainsi le paramètre r_{GdH} peut être considéré comme indépendant de l'architecture du ligand et peut être fixé à 3.1 ± 0.1 Å dans une bonne approximation.

- *Le temps de relaxation électronique*

La contribution du temps de relaxation électronique n'intervient qu'à champ faible, en dessous de 0.5 T. Seules les valeurs de τ_{50} à champ nul sont tabulées et comparées puisque le temps de relaxation électronique dépend du champ magnétique. Pour avoir des hautes valeurs de relaxivité, il faut que les temps de relaxation électronique soient les plus longs possibles (équations 8 à 11). Il est très difficile de contrôler ce paramètre par l'architecture du ligand, cependant il a été montré au laboratoire qu'une très haute symétrie axiale comme dans le cas du complexe Gdtpatcn (figure I-11) conduisait à des longs temps de relaxation électronique.^{37, 38}

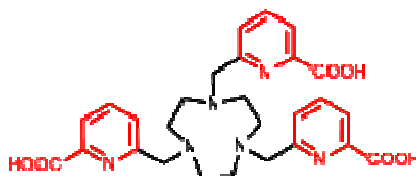


Figure I-11 : Le ligand H₃tpatcn

- *La vitesse d'échange des molécules d'eau $k_{ex}=1/\tau_m$*

La vitesse d'échange des molécules d'eau est définie comme l'inverse de leur temps de résidence dans la première sphère de coordination. Ce paramètre a une importance particulière dans le mécanisme de relaxivité : il conditionne la propagation de l'augmentation de la vitesse de relaxation par l'échange chimique entre les molécules d'eau de sphère interne et celles du solvant.

Cet échange peut être décrit par trois types de mécanismes (figure I-12).³⁹

- un mécanisme de type dissociatif D, au cours duquel une molécule d'eau quitte d'abord la première sphère de coordination du solvant (en passant par un complexe intermédiaire de coordination réduite) avant d'être remplacée par une autre molécule d'eau.

- un mécanisme de type associatif A, où une molécule d'eau supplémentaire vient se coordonner avant le départ d'une autre molécule d'eau déjà présente sur le cation métallique.

- un mécanisme intermédiaire I, dans lequel aucun intermédiaire cinétique ne peut être identifié. On distinguera deux variantes I_a et I_d selon que l'étape cinétiquement déterminante soit l'association ou la dissociation.

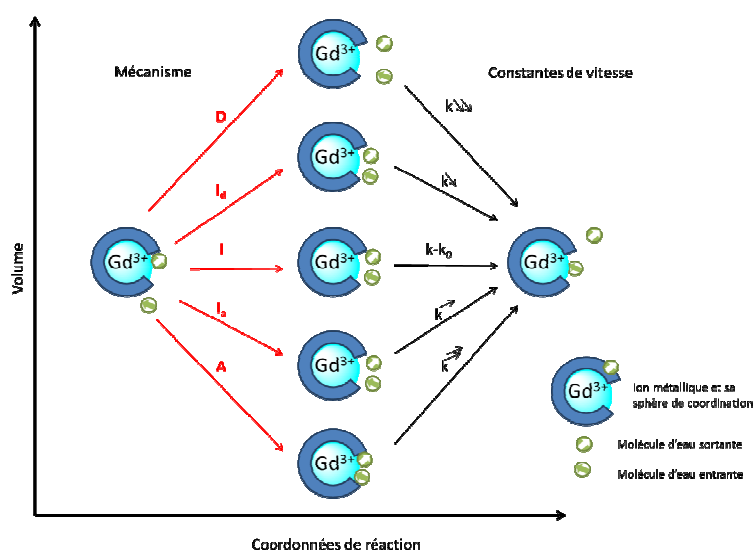


Figure I-12 : Représentation schématique des différents mécanismes d'échange d'une molécule d'eau

En reprenant les équations 5 à 7, on peut noter que la vitesse d'échange peut intervenir de deux manières différentes sur la relaxivité :

- si $\tau_m \gg T_{1M}$ le temps de résidence devient prépondérant par rapport au temps de relaxation longitudinal ; la vitesse d'échange est le facteur limitant de la relaxivité

- si $\tau_m \ll T_{1M}$, le temps de résidence est court et seul T_{1M} limite la relaxivité. On peut remarquer que T_{1M} , donné dans les équations I- 6 et I-7 dépend à priori de τ_m . Mais cette dépendance est formelle ; la valeur de T_{1M} sera majoritairement dépendante des autres paramètres (rotation τ_R , temps de relaxation électronique T_{1e} ; équation I-6 et I-7).

Ainsi dans le cas de complexe macromoléculaire ($PM > 5000$ Da), la vitesse d'échange est souvent le paramètre limitant. En effet, le terme $1/\tau_R$ devient négligeable du fait de sa taille et le terme $1/\tau_m$ devient prépondérant.

La vitesse d'échange est affectée par l'encombrement stérique autour de la sphère de coordination et la charge du complexe. En effet, une charge globale négative du complexe favorise le départ de la molécule d'eau par un mécanisme dissociatif, ce qui accélère l'échange. Pour accélérer l'échange, augmenter l'encombrement stérique autour de la sphère interne, en ajoutant un méthylène dans le macrocyclique ou sur le bras acétate a été une stratégie très utilisée. Aussi, le remplacement d'un groupement carboxylate sur le bras acétate par une fonction amide neutre et moins coordonnante⁴⁰ résulte en la diminution de la vitesse d'échange.⁴¹ Le remplacement d'un bras acétate par un bras phosphonate plus encombrant conduit également à l'augmentation de la vitesse d'échange.⁴²

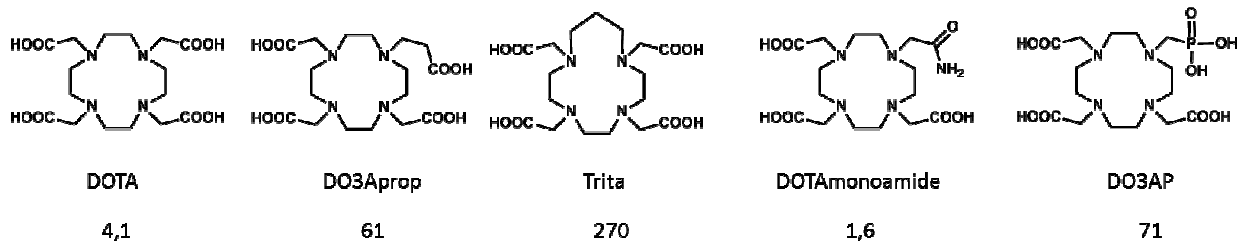


Figure I-13 : Ligands utilisés dans la littérature et la vitesse d'échange des complexes de Gd(III) associés à 25 °C ($\times 10^6 \text{ s}^{-1}$)⁷

Classiquement cette vitesse est déterminée par la mesure du temps de relaxation transversal (T_2) de l'oxygène ^{17}O d'un solvant marqué en présence et en absence d'agent paramagnétique à différentes températures. Cette méthode est détaillée dans le chapitre II.

- *Le temps de corrélation rotationnelle τ_R*

Aux champs cliniques de l'IRM entre 0.5 et 3 T (20 et 130 MHz), la relaxivité des petits complexes de gadolinium est limitée par leur vitesse de rotation élevée en solution. Cette vitesse peut être ralentie en augmentant le poids moléculaire des complexes. Pour cela plusieurs stratégies peuvent être considérées : la modification de la structure du ligand pour atteindre une masse plus importante par exemple en greffant des complexes sur des systèmes macromoléculaire ou sur des nanoobjets; ou la liaison de type non covalente à un substrat macromoléculaire tel que l'albumine, la protéine la plus abondante dans le sang dans le but de faire de l'angiographie.¹⁰ A ces valeurs de champ, le temps de corrélation rotationnelle optimal est supérieur à environ 1 ns.

L'équation de Debye-Stokes permet d'estimer le temps de corrélation rotationnelle τ_R :

$$\text{Equation I-14 : } \tau_R = \frac{4\pi\eta r_{eff}^3}{3k_B T}$$

Avec :

- η la microviscosité de la solution
- r_{eff} le rayon effectif du soluté étudié correspondant à un modèle moléculaire compacte, fonction du poids moléculaire du ligand
- k_B la constante de Boltzmann

Ainsi le temps de corrélation rotationnelle est proportionnel au volume de la sphère formée par le complexe et à son poids moléculaire. Mais la valeur du rayon ne peut pas être connue de manière précise et la microviscosité locale peut être différente de la viscosité de la solution. En pratique, le temps de corrélation rotationnelle est déterminé par la modélisation du profil NMRD. L'effet de la rotation sur la relaxivité est dépendant du champ magnétique. Aux fréquences de Larmor entre 10 et 100 MHz, des temps de corrélation longs donnent une augmentation caractéristique sur le profil NMRD. Cependant, à très hauts champs (supérieur à 400 MHz) la dépendance du temps de corrélation rotationnelle est inversée, puisque la relaxivité devient proportionnelle à τ_R^{-1} .⁴³

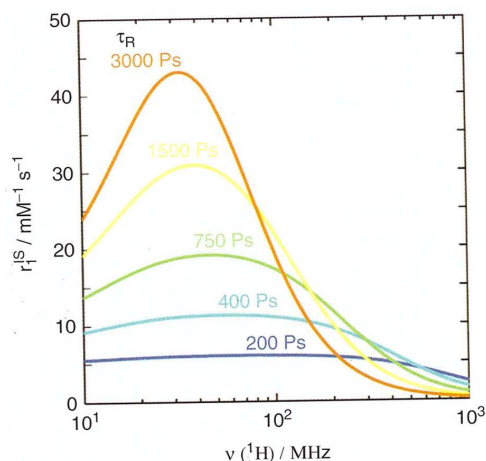


Figure I-14 : Dépendance de la relaxivité en fonction du champ et du τ_R ($q=1$, $k_{ex} = 10 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $\tau_v=20 \text{ ps}$, $\Delta^2=0.1 \times 10^{20} \text{ s}^{-2}$)⁷

Le temps de corrélation rotationnelle augmente avec le poids moléculaire des complexes mais pas de façon linéaire comme décrit dans l'équation de Debye-Stockes et est difficilement prédictible. La raison de ceci est la flexibilité interne des complexes. En effet, le temps de corrélation rotationnelle correspond au mouvement de rotation de l'ensemble métal-molécule d'eau et représente donc un temps de corrélation effective et non pas du système global. Si les molécules ne sont pas assez rigides, le mouvement de rotation qui détermine la relaxivité du complexe peut être beaucoup plus rapide que la rotation du système qui a un poids moléculaire élevé. Ce phénomène est dû à la flexibilité de l'espaceur entre le complexe de Gd(III) et la macromolécule ou du système entier. La flexibilité de l'espaceur a une contribution plus importante à l'accélération de la rotation effective et a pour conséquence de diminuer la relaxivité. Ceci a été observé pour les dendrimères, qui sont des macromolécules polymériques caractérisées par une faible polydispersité, des tailles et formes bien définies, une faible toxicité et une fonctionnalisation facile due au grand nombre de groupements réactifs. Dans la famille des dendrimères, le plus connu est le PAMAM, un polyamidoamine qui forme une nanoparticule sphérique soluble dans l'eau qui contient des amines primaires à sa surface.⁴⁴ Le nombre de groupements réactifs augmente avec la génération de dendrimères, qui est donné par le nombre de couches de monomère. Il y a 8 amines libres sur le dendrimère de génération un (G1), 16 sur G2, 32 sur G3, etc... (figure I-15).

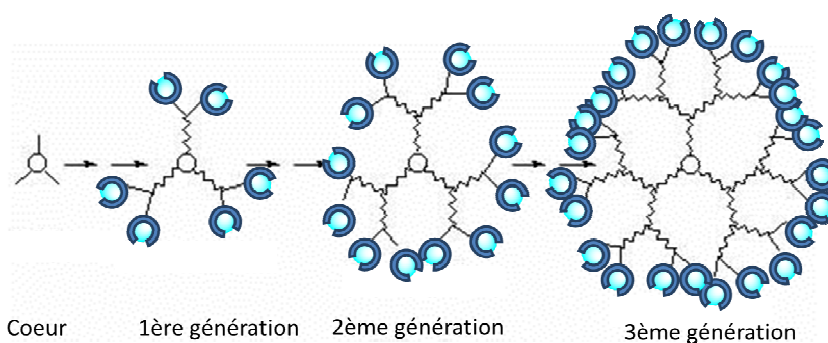


Figure I-15 : Structure générale des dendrimères fonctionnalisés avec des complexes de gadolinium

Dans certains cas, la flexibilité du dendrimère ne conduit pas à la relaxivité attendue (en plus de la vitesse d'échange du complexe utilisé qui limite la relaxivité).⁴⁵

e) Systèmes macromoléculaires, nanoobjets

Plusieurs nanoobjets contenant une dizaine à une centaine de milliers de complexes de gadolinium ont été décrits dans la littérature ces dernières années. Ces systèmes sont conçus pour à la fois rassembler un grand nombre de complexes sur un site ciblé et optimiser le temps de corrélation rotationnelle des complexes de gadolinium incorporés.⁴⁶ Parmi ces systèmes, on retrouve par exemple les dendrimères, les micelles, les liposomes, les nanoparticules solide-lipide, les nanotubes de carbone, les particules inorganiques, les zéolites ou encore les particules de silice qui sont de nature chimique (figure I-16). On peut également retrouver des systèmes de nature biologique tels les protéines et les capsides virales. Parmi la vaste panoplie des systèmes décrits dans la littérature, ceux présentant les meilleures propriétés relaxométriques seront détaillés par la suite.

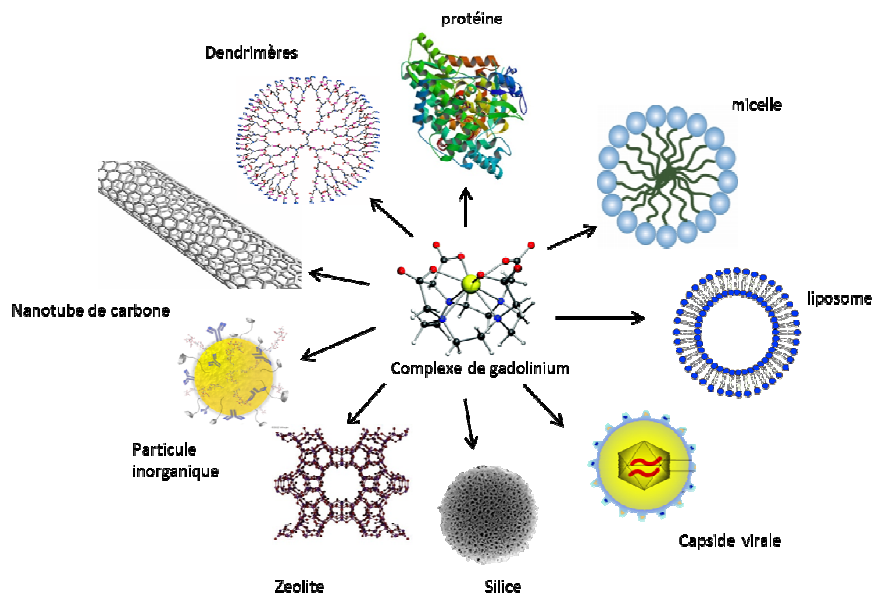


Figure I-16: Incorporation de complexes de Gd(III) dans des systèmes macromoléculaires ou nanoobjets

Les nanoémulsions, telles que les micelles et les liposomes, sont les plateformes nanométriques les plus étudiées pour l'IRM. Elles forment des agrégats supramoléculaires obtenus par l'assemblage spontané en solution aqueuse de molécules amphiphiles. Plus précisément, les micelles sont caractérisées par une architecture du type cœur (ou se situent les complexes de gadolinium)-coquille avec des tailles comprises entre 5 et 50 nm. Elles sont formées lorsque la concentration du substrat amphiphile est supérieure à la concentration micellaire critique. D'un autre côté, les liposomes sont des vésicules dont le diamètre peut aller de 50 à 1000 nm. Elles consistent en une bicouche phospholipidique entourant un cœur aqueux. L'utilisation répandue des micelles et liposomes vient de leurs propriétés de structure contrôlable et de la modulation de leurs propriétés pharmacocinétiques en changeant la taille, la charge de la surface ou bien la composition de la membrane.^{47, 48} Cependant, malgré la haute relaxivité par particule observée pour ces systèmes

grâce au grand nombre de complexes inclus grâce à la présence d'une chaîne lipophile sur le complexe, la relaxivité par gadolinium reste modeste (de 10 à 30 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C), en dessous des attentes théoriques.⁴⁸ Les facteurs limitants sont l'utilisation de complexes neutres de gadolinium (DTPA bisamide ou DOTA monoamide) ayant une vitesse d'échange lente et/ou une grande flexibilité interne, qui réduit les avantages associés au temps de corrélation rotationnelle élevé. Un moyen de palier à ces inconvénients est d'utiliser un dérivé du DOTA avec deux chaînes hydrophobes sur deux bras adjacents GdDOTA(GAC₁₂)₂ (figure I-17).⁴⁹ Ces deux chaînes vont servir de points d'ancrage dans le liposome et servent à bloquer le chélate dans la bicouche, pour atteindre une relaxivité de 40 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par gadolinium à 20 MHz et 25°C.

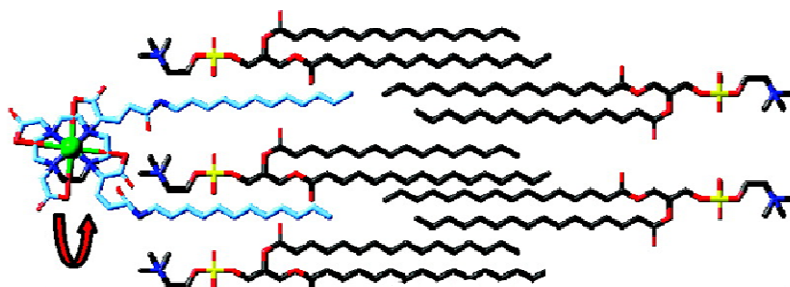


Figure I-17 : Représentation de l'incorporation de GdDOTA(GAC₁₂)₂ dans une bicouche lipidique

D'autres types de particules inorganiques tels que les nanodiamants, les oxydes d'or ou de titane ont été étudiés en tant que transporteurs de complexes de gadolinium. Les nanodiamants ont une taille de 5 à 20 nm et sont bien dispersées en solution aqueuse. L'introduction sur la surface d'un dérivé du GdDOTA conduit à une relaxivité de 58 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 37°C.⁵⁰ Des nanocristaux composés de titane⁵¹ ou d'or⁵² sont également de bons candidats car leur forme, taille et composition sont facilement ajustables. Les nanoparticules d'or obtenues par réduction d'un sel d'or en présence d'un dérivé de GdDTTA contenant deux molécules d'eau de sphère interne a permis d'accéder à une relaxivité de 60 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 30 MHz et 25°C.⁵² La modélisation du profil NMRD indique une rotation lente du système avec une absence de rotation interne expliquée par la rigidité des chélates sur la surface des nanoparticules. Le greffage sur les particules inorganiques de type quantum dots sera détaillé plus précisément dans le chapitre III.

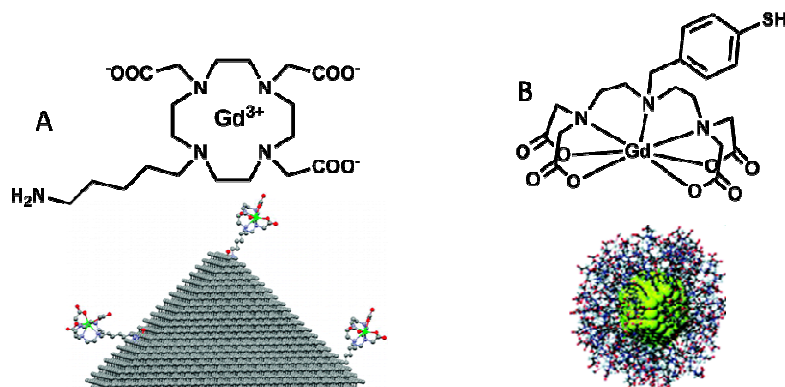


Figure I-18 : Fonctionnalisation de complexes de Gd(III) par des nanodiamants (A)⁵⁰ et des particules d'or (B)⁵²

Les zéolites sont des structures cristallines hydratées avec des micropores caractérisées par une matrice composée de silicate dans laquelle quelques tétraèdres de SiO_4 neutre sont remplacés par des tétraèdres anioniques AlO_4^- .⁵³ Le greffage de complexes de lanthanides dérivés du DOTA sur la surface des zéolites en utilisant le 3-aminopropyl triéthoxysilane (APTES) connu pour réagir avec les fonctions SiOH (figure I-19), donne des systèmes ayant une relaxivité de $30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C .⁵⁴ Ce système est typique des chélates qui ont un mouvement de rotation lent mais aussi une faible vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées au gadolinium avec celles du solvant. Le greffage d'un complexe de DTPA sur de la boehmite (qui est un minéral composé d'hydroxyde et oxyde d'aluminium) donne une relaxivité similaire de $35 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C .⁵⁵ L'incorporation de complexes de gadolinium dans les billes de silice sera détaillée dans le chapitre V.

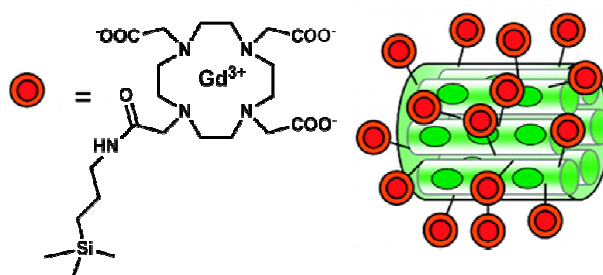


Figure I-19 : Fonctionnalisation de complexes de Gd(III) avec des zéolites⁵³

f) Agents ciblés, sondes intelligentes

- *Agents ciblés*

Des efforts particuliers sont réalisés depuis plusieurs années pour aller vers des agents de contraste spécifiques d'une maladie ou d'un marqueur moléculaire. La fonctionnalisation d'un agent de contraste avec des molécules susceptibles de reconnaître une biomolécule cible donne un agent ciblé. Cependant cette technique est limitée par la faible sensibilité de l'IRM par rapport à la concentration des récepteurs spécifiques. Leur visualisation n'est possible que si leur concentration dans les tissus est assez élevée et/ou si l'efficacité de l'agent utilisé est suffisante. Il existe des agents de contraste ciblant des protéines (albumine, fibrine, collagène...), des sucres, des vitamines, des enzymes (anhydrase carbonique, alanine aminopeptidase...), des récepteurs d'hormones (œstrogène et progestérone), des récepteurs transmembranaires (intégrines...), l'ARN messager, l'ADN...⁷ La littérature est vaste sur le sujet, seulement quelques exemples les plus représentatifs vont être présentés. L'exemple du MS-325 commercialisé sous le nom de Vasovist® a été vu précédemment pour le ciblage de la protéine albumine,¹⁰ protéine abondamment présente dans le sang dans le but de faire de l'angiographie.

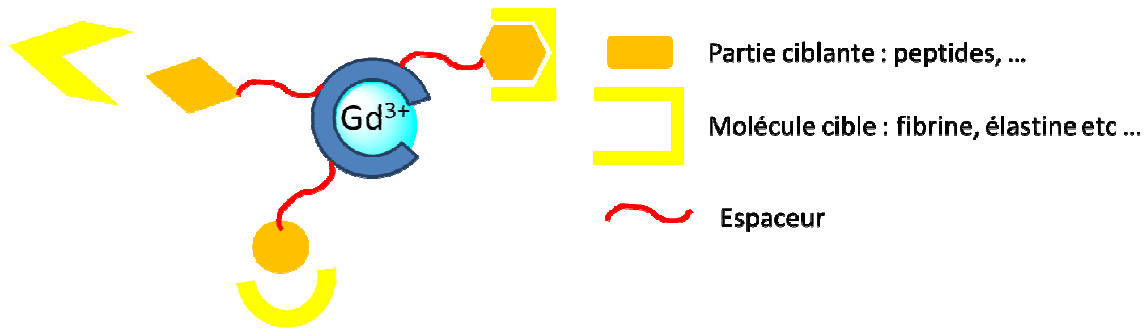


Figure I-20 : Complexe de Gd(III) fonctionnalisé pour faire un agent ciblé

Des protéines telles que la fibrine ou l'élastine et des sucres comme l'acide sialique ont fait l'objet de ciblage par des complexes de Gd(III).

La fibrine est le principal composant des caillots présents dans les vaisseaux sanguins lors de thrombose. Deux différents peptides connus pour cibler la fibrine d'une manière sélective ont été fonctionnalisés par des complexes de Gd(III), notamment avec le DOTA pour faire l'imagerie de la fibrine. Ces agents de contraste sont au stade des essais cliniques.⁵⁶

L'élastine est une protéine de la matrice extracellulaire qui est abondante sur la paroi des vaisseaux sanguins et surexprimée dans le cas de développement des plaques athérosclérotiques, cause dominante de la majorité des affections cardio-vasculaires. Un complexe dérivé de la DTPA et portant un groupement ciblant l'élastine induit une augmentation de la relaxivité de 4.5 à 13.7 mM⁻¹s⁻¹ à 60 MHz lorsque l'agent de contraste est en présence de sa cible.⁵⁷

La reconnaissance de nombreux récepteurs cellulaires est effectuée *via* des sucres, notamment l'acide sialique. Celui-ci joue un rôle important dans la reconnaissance cellulaire et est surexprimé à la surface des cellules tumorales. La fonctionnalisation d'un dérivé du DOTA avec l'acide phénylboronique permet de lier l'agent de contraste de manière covalente mais réversible aux diols de l'acide sialique.⁵⁸ Cette interaction est spécifique de l'acide sialique par rapport aux autres sucres présents dans l'organisme et permet la détection spécifique des cellules tumorales.

Un peptide capable à la fois de chélater le gadolinium et de cibler l'ADN a été mis au point par le groupe de Caravan.⁵⁹ Dans cet exemple, la valeur de la relaxivité du complexe en présence d'ADN est doublée, due à un ralentissement de la rotation corrélée à la rigidité du système. D'autres exemples d'interactions entre des complexes de Gd(III) et l'ADN seront détaillés dans le chapitre IV.

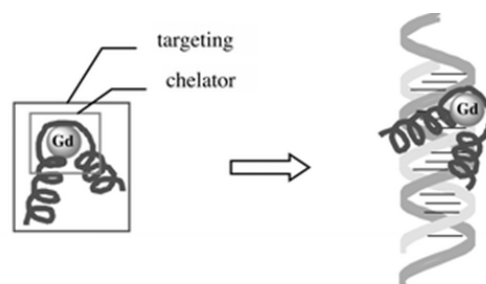


Figure I-21 : Système décrit par Caravan *et al* pour le ciblage de l'ADN⁵⁹

- *Agents intelligents ou bioactivables*

Le développement de l'imagerie moléculaire a donné naissance à une nouvelle catégorie d'agents de contraste dont le signal est influencé par leur environnement. La plupart des agents intelligents se basent sur la modification du nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination ou du temps de corrélation rotationnelle (par le changement de la taille du complexe). Plusieurs stimuli comme le pH, la température, l'environnement oxydant ou la présence de cations métalliques ou d'enzymes ont été exploités.⁷ Cette approche a connu un large essor ces dernières années.^{60, 61}

Les changements de pH dans l'organisme sont associés à de nombreuses maladies telles que les infections, maladies rénales ou des cancers. Le pH extracellulaire de tumeurs peut être 0.5 à 0.6 unités de pH plus bas que les tissus sains. Un agent de contraste intelligent peut permettre de déterminer le pH *in vivo* et ainsi détecter ces maladies au plus tôt. L'approche la plus simple est le design d'un ligand dont la protonation ou déprotonation des unités coordonnantes mène à un changement de denticité du ligand. En retour cela conduit à un changement du nombre de molécules d'eau coordonnées au centre métallique. Cette stratégie a été exploitée avec un dérivé du DOTA avec des substituants sulfonamides (figure I-22-A) dont les constantes de protonation varient.⁶² Une alternative pour détecter le pH extracellulaire est le design d'un ligand dont la vitesse de rotation varie en fonction du pH grâce à la création d'un système rigide à pH élevé par la formation de liaisons hydrogène. Cela a pu être réalisé en utilisant un ligand dérivé du DOTA fonctionnalisé avec l'acide squarique. Trente GdDOTA sont liés à une chaîne peptidique qui forme un système rigide à haut pH (figure I-22-B).⁶³ La relaxivité des complexes de Gd(III) correspondants augmente avec la rigidité du système et donc avec le pH.

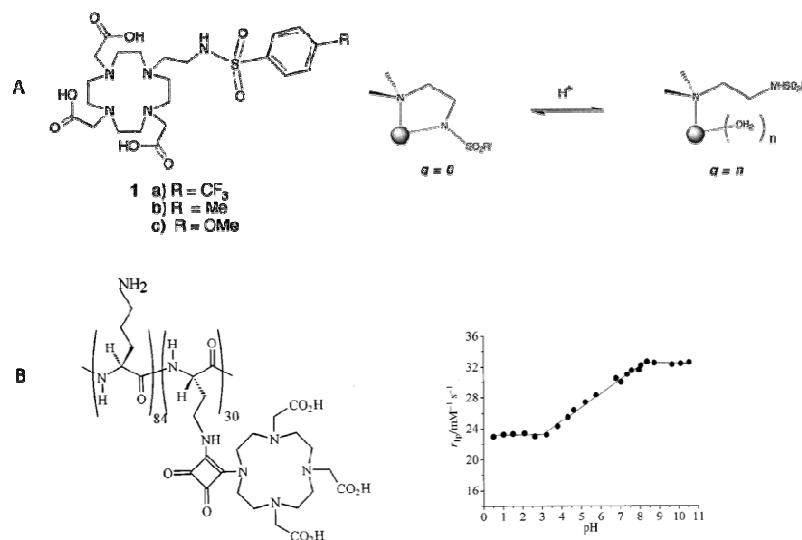


Figure I-22 : Sondes dépendantes du pH (A⁶² B⁶³)

Des agents de contraste sensibles aux cations métalliques reposant sur le changement du nombre de molécules d'eau dans leur sphère de coordination ont également été développés. En absence de métaux, la sphère de coordination du Gd(III) est saturée. En présence d'ions métalliques dans le milieu, une ou plusieurs unités coordonnantes vont se lier au cation cible, libérant ainsi un site de coordination autour de l'ion Gd(III) pour l'accès d'une molécule d'eau (figure I-23).

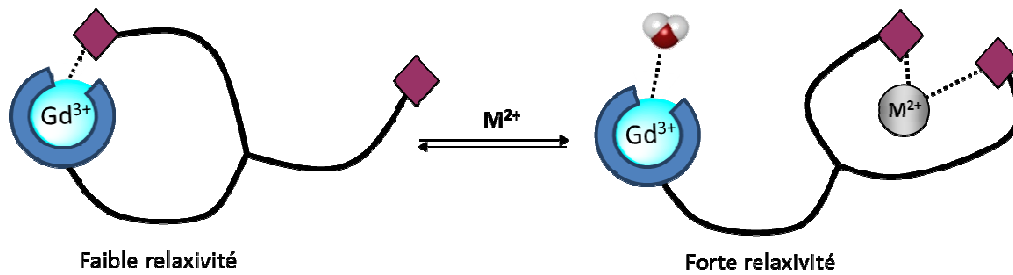


Figure I-23 : Schéma d'une sonde intelligente sensible aux cations métalliques

Des dérivés du DOTA ont été fonctionnalisés pour obtenir des sondes de ce type pour détecter la présence de calcium,⁶⁴ de zinc⁶⁵ ou de cuivre.⁶⁶

La détection d'activité enzymatique par IRM est un domaine de recherche très attractif puisque la présence de réactions enzymatiques dans les tissus peut fournir la signature de certaines maladies. Le ciblage des enzymes donne l'avantage d'une sensibilité et sélectivité améliorée par rapport aux autres biomarqueurs. En effet, la faible sensibilité de l'IRM peut être surmontée car une faible concentration d'enzyme peut transformer une grande concentration d'agents de contraste dans sa forme active de manière catalytique. De plus, la spécificité de ces réactions enzymatiques est très élevée, ce qui signifie que les effets observés peuvent être attribués à l'enzyme ciblée sans ambiguïté. Un exemple pertinent de changement du nombre de molécule d'eau en présence d'une enzyme est celui d'un dérivé de l'HPDO3A fonctionnalisé par un β -galactose.⁶⁷ Du fait de la présence du sucre, ce complexe ne contient pas de molécule d'eau dans sa sphère interne mais la coupure de l'unité galactose par la β -galactosidase permet de récupérer le complexe de GdHPDO3A avec une molécule d'eau dans la sphère interne induisant une augmentation significative de la relaxivité. Le clivage enzymatique peut conduire à une augmentation du temps de corrélation rotationnelle. Ceci a été montré avec un complexe dérivé de la DTPA contenant une séquence peptidique spécifique qui est clivé par la TAFI (Thrombin-activatable fibrinolysis Inhibitor).⁶⁸ Avant clivage, la relaxivité du complexe de $9.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz, 37°C reste inchangée en présence d'albumine. Elle atteint $26.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ après clivage grâce à une plus forte interaction avec l'albumine.

Toutes ces sondes sont des candidats potentiels pour l'imagerie moléculaire mais plusieurs obstacles s'opposent à leur utilisation *in vivo*. Tout d'abord les stabilités cinétique et thermodynamique des complexes doivent être suffisantes pour éviter le relargage de l'ion Gd(III) dans l'organisme. De plus, la variation du T_1 *in vivo* peut être due soit au stimuli recherché ou bien à la variation de concentration locale en agent de contraste. Il faut donc trouver un moyen de déterminer la concentration en agents de contraste *in vivo*. Des méthodes comme la RMN du ^{19}F ⁶⁹ ou l'utilisation de sondes bimodales IRM/imagerie nucléaire⁷⁰ sont envisagées pour détecter les stimuli recherchés et déterminer la concentration en agent de contraste.

3. Imagerie optique

L'imagerie optique est devenue un outil incontournable pour imager en temps réel et de façon non invasive le cheminement d'une molécule luminescente dans les cellules. Le matériel biologique présente des propriétés de fluorescence intrinsèque dues aux acides aminés aromatiques ou aux bases de l'ADN. Toutefois, il est plus aisé de faire appel à des marqueurs exogènes (étrangers au milieu étudié), appelés fluorochromes pour imager les tissus. Ces marqueurs peuvent être des chromophores organiques (fluorescéine, rhodamine...), des complexes de lanthanides ou encore des nanoparticules luminescentes comme les quantum dots.

a) Principe

- *Fluorescence et phosphorescence*

Lorsqu'une substance, initialement dans son état électronique singulet fondamental (S_0) absorbe un photon grâce à une source lumineuse, elle passe à un état électronique d'énergie supérieure, appelé état excité. Cet état est instable et sa désexcitation vers l'état S_0 peut se faire soit par des processus vibrationnels (10^{-12} à 10^{-14} s), soit par émission d'un photon. L'émission d'un photon associée à la relaxation d'un état électroniquement excité est appelé luminescence. L'énergie du photon correspond à la différence d'énergie entre l'état excité et le niveau accepteur de l'état fondamental. Les différents mécanismes de retour à l'équilibre $S_1 \rightarrow S_0$ sont illustrés par le diagramme de Jablonski (figure I-24).

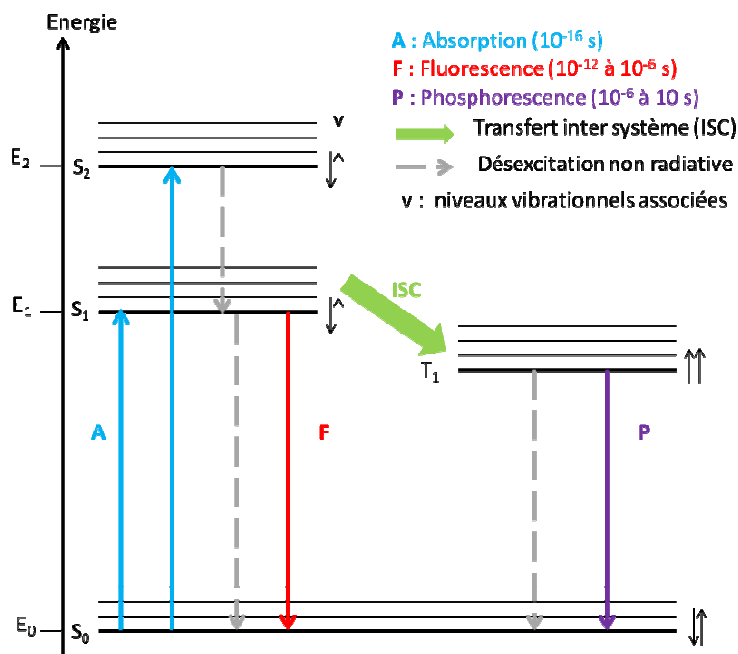


Figure I-24 : Diagramme de Jablonski (S : état singulet ; T : état triplet)

Après absorption d'un photon, l'état excité est relaxé de l'état singulet S_1 jusqu'au niveau fondamental. Les processus non radiatifs mis en jeu peuvent impliquer soit des collisions avec les

molécules de solvant, soit des échanges vibrationnels avec les molécules environnantes. Ensuite, deux types de mécanisme de luminescence peuvent avoir lieu. Ils sont principalement différenciés par leur temps caractéristiques :

- La fluorescence résulte de l'émission d'un photon en association avec le transfert de spin de l'état singulet S_1 vers un niveau vibrationnel excité de l'état fondamental (S_0^*). La durée de vie de cet état excité est comprise entre 10^{-12} et 10^{-6} s.

- La phosphorescence implique un changement de spin de l'un des électrons célibataires. Cette conversion, plus lente (10^{-8} s) est appelée croisement inter système. Elle est en théorie interdite mais favorisée par la présence d'atomes lourds comme les lanthanides. Ensuite le transfert $T_1 \rightarrow S_0$ implique des états de multiplicité différente et est également interdit. La durée de vie de l'émission est donc relativement longue, de 10^{-6} s à 10 s.

- *Rendement quantique*

L'efficacité d'un processus luminescent est donnée par son rendement quantique. Il est défini comme le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Il est fortement influencé par le niveau des états énergétiques des niveaux excités et est d'autant plus élevé que les désexcitations non radiatives sont minimisées.

Quel que soit le type de marquage, les molécules ayant un fort rendement quantique, c'est-à-dire dont les propriétés d'émission ne sont pas affectées par des phénomènes de désexcitations, seront privilégiés.

b) Les complexes de lanthanides luminescents

Nous avons vu précédemment que les ions lanthanides possèdent non seulement des bandes d'émission et d'absorption fines mais surtout ils sont luminescents et leurs temps de vie de luminescence sont significativement plus longs que ceux des chromophores organiques (de l'ordre de la milliseconde pour l'euprimum et le terbium contre quelques nanosecondes). Ainsi leur utilisation permet de s'affranchir de la luminescence intrinsèque du milieu biologique en utilisant la méthode de luminescence en temps résolu (figure I-25).

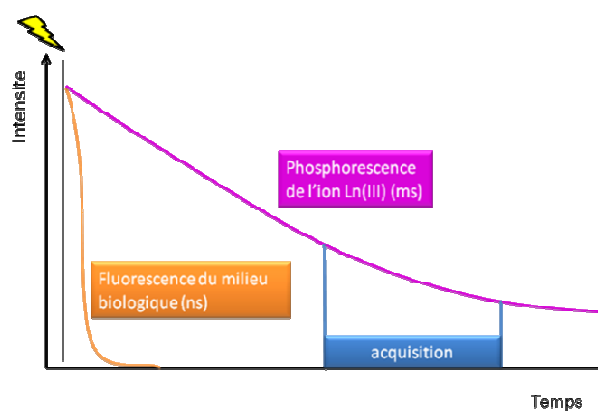


Figure I-25 : Principe de la luminescence en temps résolu

Le lanthanide est d'abord excité avec une source lumineuse ou un laser pulsé. La mesure n'est effectuée qu'après un bref délai, ce qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus dont la durée de vie est sensiblement plus courte que celle du lanthanide. De cette manière le rapport signal/bruit est amélioré.

Pendant les coefficients d'extinction molaires des ions Ln(III) sont faibles et ils ne peuvent être excités que par des sources lasers dont la puissance entrainerait la destruction du matériel biologique. Ainsi, ceux-ci peuvent être incorporés dans des systèmes dont la fonction d'absorption est distincte du lanthanide qui joue le rôle d'émetteur. De plus la séparation des fonctions d'absorption et d'émission présente l'avantage de conduire à un déplacement de Stokes important.

Plusieurs mécanismes de sensibilisation des ions lanthanides permettent de les exciter au moyen de sources lumineuses classiques. On peut citer le transfert par les bandes de transfert de charge (ligand-métal LMCT ou métal-ligand MLCT) largement utilisé pour exciter les métaux de transition ou bien la sensibilisation par les métaux d qui implique le transfert d-f depuis un métal de transition. La voie de sensibilisation la plus utilisée est la chélation des ions lanthanides par des chromophores organiques qui vont jouer le rôle d'antenne (figure I-26).

- *L'effet d'antenne*

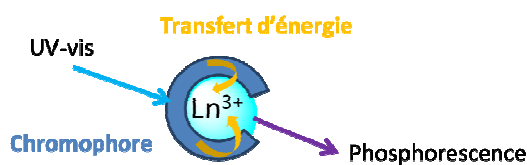


Figure I-26 : Principe de l'effet d'antenne

Le processus le plus souvent impliqué met en jeu l'état triplet du ligand. Il se déroule en quatre étapes illustrées à la figure I-27. Le chromophore organique absorbe l'énergie lumineuse et peuple ses états singulets $^1\pi\pi^*$. Le ligand est adapté si d'une part un croisement inter système permet le peuplement de son état excité triplet $^3\pi\pi^*$ et d'autre part, un transfert d'énergie efficace a lieu de cet état triplet vers les états excités du lanthanide. Les états excités du lanthanide relaxent ensuite par un processus radiatif, conduisant à l'émission de lumière qui est spécifique pour chaque lanthanide. Ce mécanisme est communément admis pour tous les lanthanides sauf pour l'ytterbium. Le croisement inter système est efficace si le niveau d'énergie de l'état triplet du ligand est en adéquation avec l'état excité du métal. Dans le cas d'une différence d'énergie trop faible, un transfert en retour (ou back transfert) vers l'état triplet a lieu et le ligand réémet les photons par phosphorescence ou par des désexcitations non radiatives.

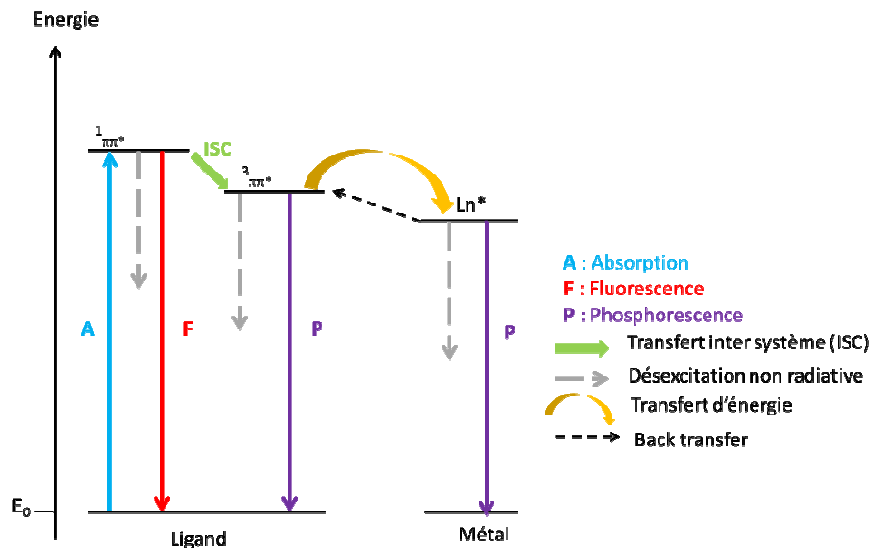


Figure I-27 : Mécanisme de sensibilisation des lanthanides par le ligand *via* son état triplet

- *Cas de l'ion ytterbium*

L'ion ytterbium ne possède qu'un état excité ($^5F_{5/2}$, $E = 10\,300\text{ cm}^{-1}$) et son mécanisme de transfert d'énergie depuis le chromophore est plus controversé. Deux alternatives ont été proposées. La première suggère un transfert par l'intermédiaire de l'état triplet du ligand comme dans les cas des autres lanthanides en dépit d'une différence d'énergie importante entre les états $^3\pi\pi^*$ et Ln^* . L'énergie en excès est transformée en énergie vibrationnelle et en chaleur.⁷¹ La deuxième explication met en jeu un transfert d'électron associé à un mécanisme d'oxydoréduction impliquant le degré d'oxydation Yb(II) (figure I-28). Ce mécanisme est envisageable que si les deux étapes de transfert d'électron sont thermodynamiquement possibles.

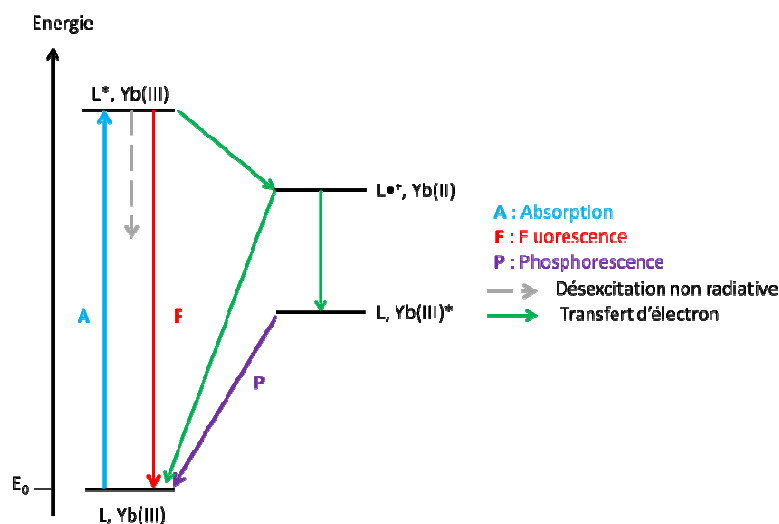


Figure I-28 : Mécanisme de sensibilisation de l'Yb(III) via le transfert d'électron

Ce mécanisme a été mis évidence en observant la luminescence de l'Yb(III) en présence de parvalbumine après excitation des unités tryptophanes de la protéine.⁷² La réduction de l'Yb(III) par le tryptophane dans son état excité singulet L* produit un radical cationique L^{•+} et l'Yb(II). Le radical cation, oxydant très puissant va oxyder à nouveau l'Yb(II) pour donner le ligand dans son état fondamental et le métal trivalent, soit dans son état fondamental Ln, soit dans son état excité Ln*. La fraction de Ln* obtenue est à l'origine de la luminescence observée.

- *Les mécanismes de transfert*

Le transfert d'énergie de l'état triplet du ligand vers les états excités du métal est un phénomène très complexe qui implique plusieurs mécanismes. Deux mécanismes limites ont été proposés et sont représentés dans la figure I-29: celui de Dexter (à gauche) et celui de Förster (à droite).

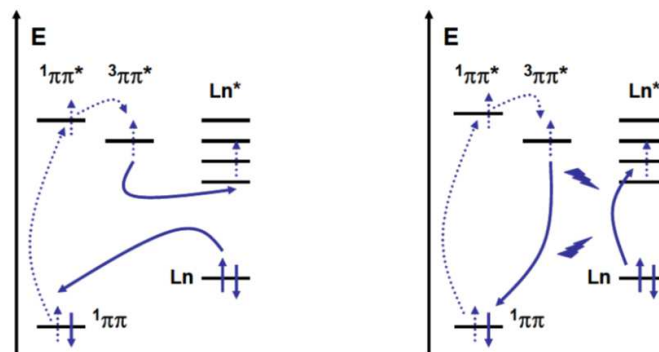


Figure I-29 : Représentation schématique des mécanismes de Dexter (gauche) et Förster (droite)

- Le mécanisme de Dexter ou mécanisme d'échange⁷³ repose sur un échange électronique entre le ligand et le métal. Ce transfert nécessite un contact entre les orbitales moléculaires du donneur et de l'accepteur. Son efficacité dépend exponentiellement de la distance entre le donneur et l'accepteur.

-Le mécanisme de Förster⁷⁴ ou mécanisme dipôle-dipôle s'appuie sur le couplage entre le moment dipolaire associé à l'état triplet et celui des orbitales 4f. Dans le cas d'un mécanisme purement dipolaire, l'efficacité du transfert peut être estimée à partir de l'équation simplifiée suivante :

$$\text{Equation I-15 : } \eta_{et} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6}$$

Avec

- R la distance donneur-accepteur
- R₀ la distance de Förster , correspondant à une efficacité de transfert moyenne de 50%.

Cette efficacité dépend de plusieurs paramètres comme le rendement quantique du donneur en absence d'accepteur, l'indice de réfraction du milieu étudié et l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

Les deux mécanismes impliquent l'intégrale de recouvrement spectrale. Leur dépendance spécifique envers la distance donneur-accepteur R (e^{-R} pour Dexter et R^{-6} pour Förster) limite souvent le mécanisme de Dexter à des distances courtes où le recouvrement orbitalaire est significatif, alors que le mécanisme de Förster peut être efficace sur de plus longues distances.

- *Conception de chélates de Ln(III) luminescents*

A la lumière de ces mécanismes, plusieurs points doivent être pris en compte lors de la conception du ligand pour sensibiliser les lanthanides :

- Les désexcitations non radiatives vibrationnelles liées aux oscillateurs X-H du solvant ou aux vibrations des liaisons du ligand devront être minimisées en évitant la présence d'oscillateurs moléculaires de type O-H ou N-H dans la sphère de coordination du lanthanide. En effet, les modes vibrationnels peuvent interagir avec les niveaux électroniques de l'ion, conduisant à une atténuation (« quenching ») de la luminescence. Lorsque les molécules de solvants protiques (eau ou méthanol) sont coordonnées au centre métallique, la durée de vie de luminescence et le rendement quantique se trouvent fortement affectés. L'efficacité du processus est fortement influencée par la nature du vibreur. Ainsi la désactivation par les vibreurs O-H est supérieure à celle provoquée par les oscillateurs O-D et cette différence peut servir à déterminer le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal. Afin d'éviter ces vibrations, les complexes dont la sphère de coordination est saturée sont privilégiés. De plus, pour un vibreur donné, la désactivation est d'autant plus faible que la différence d'énergie entre l'état émissif du lanthanide et son état fondamental est grande. Par exemple, l'extinction de luminescence est plus importante pour l'ion Eu(III) ($\Delta E(^5D_0-^7F_6) = 12300 \text{ cm}^{-1}$) que pour l'ion Tb(III) ($\Delta E(^5D_4-^7F_6) = 14200 \text{ cm}^{-1}$).

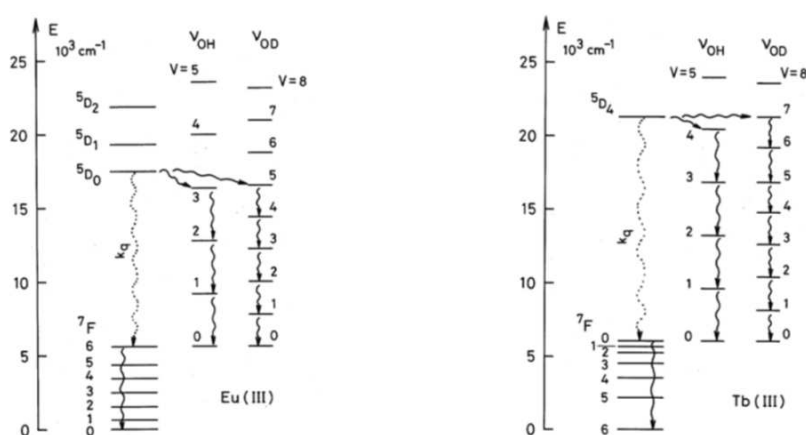


Figure I-30 : Désexcitation vibrationnelle des complexes d'Eu(III) et Tb(III) dans l'eau légère et l'eau lourde

- Le niveau énergétique de l'état triplet du ligand doit être correctement positionné par rapport aux états excités de l'ion étudié. Une étude détaillée sur une série de complexes de Tb(III) et Eu(III) montre que le transfert est irréversible à partir d'une différence d'énergie entre les deux états supérieurs de 1850 cm^{-1} .⁷⁵ Pour les complexes d'Eu(III), la relation entre la position énergétique de

l'état triplet du ligand et l'efficacité du transfert semble moins bien comprise. Cette même étude a révélé un transfert efficace pour un état triplet du ligand positionné à $22\,000\text{ cm}^{-1}$. Dans le cas d'une différence énergétique plus faible, un processus de transfert en retour de type vibrationnel a lieu. Son temps de vie dépend de la température selon une équation de type Arrhenius. En ce qui concerne les lanthanides émettant dans le proche infrarouge, les ligands ayant un état triplet qui se situent à un niveau d'énergie plus bas (aux alentours de $17\,000\text{ cm}^{-1}$) seront le plus adaptés pour leur sensibilisation.

Ainsi le rendement quantique d'un complexe est fortement influencé par les propriétés de son ligand. Celui-ci doit être bien adapté pour limiter les processus de désactivation non radiatifs et ces niveaux d'énergie doivent être en bonne adéquation avec ceux du métal utilisé pour conduire à un transfert efficace.

c) Les quantum dots

- *Définitions et propriétés*

Les nanocristaux semi-conducteurs colloïdaux (ou quantum dots, QD) sont des nanoparticules semi-conductrices de taille inférieure au rayon de Bohr du matériau considéré. Elles sont composées d'un cœur inorganique de quelques centaines ou dizaine de milliers d'atomes entourés par une fine couche de molécules organiques appelés ligands. La réduction de taille en plus d'augmenter considérablement le rapport surface/volume, permet aux niveaux électroniques de ces semi-conducteurs d'être discrétisés, induisant un confinement quantique exploitable pour des propriétés opto-électroniques.

- Confinement quantique

De part leur taille, les nanocristaux se situent comme un intermédiaire entre la molécule et l'état massif. En effet, la présence d'une bande de valence et d'une bande de conduction fait qu'ils se rapprochent de l'état massif mais la présence de niveaux d'énergie discrets leur donne aussi une caractéristique à des molécules au niveau énergétique.

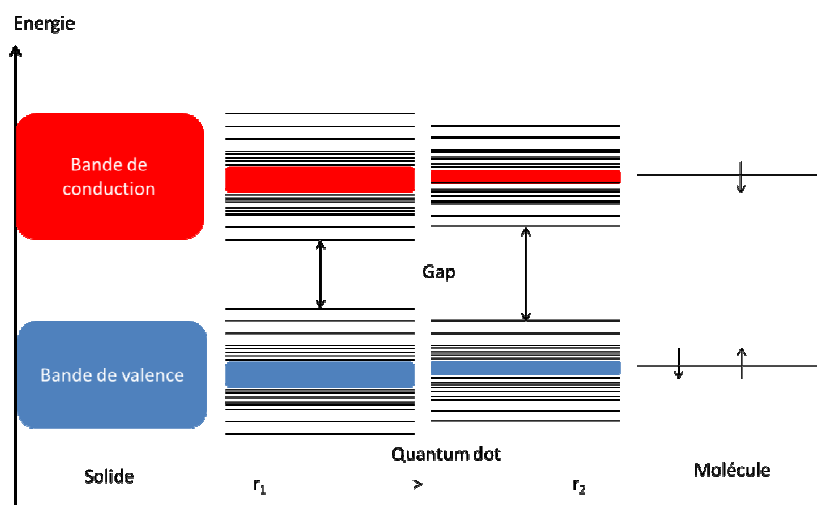


Figure I-31 : Niveaux d'énergie dans différents systèmes et pour des tailles réduites de QD

Le nombre d'atomes contenus dans un nanocristal est fini ce qui induit une discrétisation des niveaux d'énergies. Dans un nanocristal, les charges de ces niveaux d'énergie sont confinés dans des puits de potentiel en trois dimensions, on parle alors de confinement quantique.⁷⁶⁻⁷⁸ Cet effet de discrétisation et d'élargissement des niveaux d'énergie et de confinement quantique a été mis en évidence dans les travaux de Brus qui définissent les bases du calcul pour le confinement quantique. Ces formules décrivent l'évolution du gap électronique en fonction de la taille des nanocristaux et du rayon de Bohr, distance moyenne entre l'électron et la lacune dans un solide donné. En première approximation et pour des particules sphériques, cela donne :

$$\text{Equation I-16 : } E_g = E_g^{\text{massif}} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2r_B^2} \left(\frac{1}{m_e^* m_e} + \frac{1}{m_h^* m_e} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_r \epsilon_0 r_B}$$

Avec :

- E_g le gap électronique d'un nanocristal de rayon r
- E_g^{massif} le gap du matériau massif
- \hbar la constante de Planck réduite ; $\hbar = 1.0546 \times 10^{-34}$ J.s
- r_B le rayon de Bohr
- m_e^* et m_h^* les masses effectives de l'électron et du trou
- m_e la masse de l'électron ; $m_e = 9.1 \times 10^{-31}$ kg
- ϵ_r la permittivité diélectrique du matériau
- ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide ; $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ F/m

Le rayon de Bohr est exprimé par l'équation suivante :⁷⁹

$$\text{Equation I-17 : } r_B = \frac{4\pi\epsilon_r \epsilon_0 \hbar^2}{e^2} \left(\frac{1}{m_e^* m_e} + \frac{1}{m_h^* m_e} \right)$$

Il est donc possible, à condition d'avoir les paramètres m_e^* , m_h^* et ϵ_r du matériau, de calculer la valeur du gap en fonction de la taille des nanocristaux, si ceux-ci sont sphériques.

- Synthèse et structure cristalline

Il existe deux principales voies chimiques permettant d'accéder à des quantum dots de taille inférieure à 10 nm et avec une dispersion en taille étroite. La première est la synthèse en voie aqueuse à des températures relativement basses (100-150°C), la seconde est la synthèse en milieu organique à des températures plus hautes, supérieures à 200°C. Cette dernière peut se faire soit en solvant coordonnant, où le solvant joue le rôle de complexant sur le précurseur ou en solvant non coordonnant. Ces méthodes de synthèse ne seront pas détaillées ici.

Selon leurs éléments constitutifs, les quantum dots peuvent cristalliser dans différentes structures, majoritairement les structures cubique, wurtzite ou zinc blende. Il est également possible de trouver le type rocksalt (type NaCl) mais cette structure n'a été observée que sur des systèmes IV-VI. Même si la stabilité de ces structures est thermodynamique, la nature des ligands utilisés lors de la synthèse peut provoquer un changement de la structure cristalline des quantum dots : ces ligands influent directement sur la réactivité des faces du fait de l'encombrement stérique généré par leur taille.⁸⁰ Un traitement thermique après la synthèse peut aussi être à l'origine d'un changement de phase favorisant un arrangement différent des atomes.

- Propriétés optiques

Les deux principales caractéristiques optiques des quantum dots sont leurs propriétés d'absorption et de photoluminescence.

Les nanocristaux peuvent absorber des photons d'énergie supérieure à la valeur du gap. L'observation du pic excitonique sur le spectre d'absorption d'une solution de nanocristaux correspond à la transition optique du premier état excité. La position en longueur d'onde de ce pic est directement reliée à la valeur du gap tandis que sa largeur est liée à la dispersion en taille des quantum dots. Dans le cas où les nanocristaux possèdent une dispersion en taille importante, un épaulement peut être observé sur le pic excitonique. Sur les spectres bien résolus, significatifs d'une faible dispersion en taille, on peut également observer des phénomènes d'absorption dans les faibles longueurs d'onde qui sont attribuables à des états excités de plus hautes énergies.

L'énergie du photon émis correspond quasiment à la valeur du gap du matériau, c'est pour cette raison que l'on peut contrôler la couleur de l'émission des quantum dots en ajustant le gap. Cependant la présence de défauts de surface ou d'une mauvaise passivation peut inhiber cette émission par le biais de recombinaisons non radiatives.

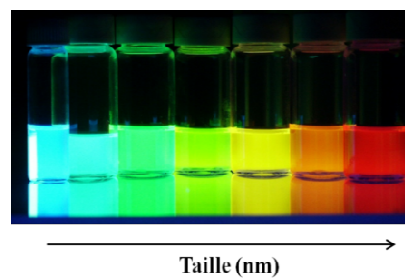


Figure I-32 : Nanocristaux colloïdaux de CdSe/ZnS pour différentes tailles de cœur⁸¹

Le photon émis est de plus faible énergie que le photon absorbé, qui est expliqué par la relaxation d'une partie de l'énergie de ce photon en phonons (vibrations du réseau). Ce décalage vers les longueurs d'onde infrarouge (redshift) est observé dans la majorité des quantum dots.

Pour rappel, le rendement de conversion des photons émis sur les photons absorbés s'appelle rendement quantique. Il est intrinsèquement lié à la qualité des nanocristaux synthétisés (défauts de surface, dispersion en taille, hétérogénéité de la stoechiométrie), mais également à l'état de surface (présence d'une coquille, nature des ligands). Le temps de vie d'émission des nanocristaux est relativement court, de l'ordre de la nanoseconde qui peut aller jusqu'à une centaine de nanosecondes.

- Systèmes cœur/coquille

La qualité de surface des nanocristaux, prépondérante dans le matériau en raison du fort rapport surface/volume, constitue la principale limite pour les propriétés optiques. La surface des nanocristaux peut être améliorée soit par passivation à l'aide de ligands, soit par croissance d'une coquille protectrice. Cette dernière technique est bien connue et consiste à faire croître un deuxième matériau semi-conducteur sur les nanocristaux.

Plusieurs paramètres entrent en jeu dans la composition de ce système cœur/coquille. Tout d'abord les structures cristallines du cœur et de la coquille doivent être similaires, pour éviter que le matériau de coquille germe de manière indépendante. Les paramètres de maille doivent être le plus proche possible afin d'éviter une contrainte trop forte à l'interface. Enfin, selon l'utilisation souhaitée, il faut étudier de près la structure de bande du matériau de coquille. Il existe deux types d'alignements, celui de type I permet le confinement des électrons et des trous dans le cœur (idéale pour la photoluminescence) alors que celui de type II permettra la séparation des charges dans le cœur et dans la coquille (pour des applications de type électrique).

En prenant en compte ces caractéristiques, il est possible d'obtenir des quantum dots dont la photoluminescence atteint 85% de rendement quantique. Il faut également noter que les coquilles peuvent agir comme protection contre l'oxydation et passiver des quantum dots sensibles à une exposition à l'air.

Les applications des quantum dots sont nombreuses. On peut citer par exemple le traçage des objets de valeur, ou leur utilisation comme composants de nouveaux matériaux pour des cellules photovoltaïques. Nous allons nous intéresser ici plus particulièrement à leur utilisation pour des applications biologiques.

- *Les quantum dots en biologie*

- Solubilité en phase aqueuse

La solubilité des quantum dots est un critère fondamental pour l'application de ces nanocristaux en biologie. Les quantum dots synthétisés en solvant organique sont stabilisés par des ligands hydrophobes et par conséquent ne sont pas solubles dans l'eau. Une étape de transfert de phase des nanocristaux est nécessaire pour leur solubilisation en phase aqueuse. Plusieurs stratégies de transfert de phase peuvent être employées pour solubiliser les nanocristaux en phase aqueuse. La première est l'échange de ligands à la surface des nanocristaux. L'objectif est de remplacer les ligands hydrophobes à la surface par des ligands bifonctionnels, présentant une fonction d'ancrage sur les quantum dots et un groupement hydrophile pour assurer la solubilisation. Les fonctions d'ancrage utilisées sont majoritairement des thiols qui ont une très forte affinité avec le zinc sur les couches de ZnS des différents nanocristaux. Parmi les ligands thiolés utilisés pour le transfert de phase, on peut citer la cystéine,⁸² la pénicillamine⁸³ ou l'acide lipoïque.⁸⁴ La seconde stratégie employée pour solubiliser les particules dans l'eau est l'utilisation d'une couche de silice fonctionnalisée avec des groupements polaires qui va isoler le quantum dot.⁸⁵ Et enfin la troisième stratégie permet de préserver les ligands hydrophobes autour du quantum dots en utilisant des copolymères à bloc amphiphiles⁸⁶ ou des micelles phospholipidiques.⁸⁷ La partie hydrophobe de ces systèmes va s'entrecroiser avec les ligands autour du quantum dot alors que la partie hydrophile permet la dispersion en phase aqueuse.

Chaque stratégie a ses avantages et ses inconvénients. Les deux stratégies d'encapsulation (silice, micelles, polymère) permettent d'avoir une stabilité des nanocristaux sur une large gamme de pH, contrairement aux ligands dont l'utilisation est limitée aux pH basiques. L'encapsulation entraîne une augmentation du diamètre hydrodynamique des particules, qui peuvent être un obstacle pour l'imagerie *in vivo*.⁸⁸ En effet, la clairance des particules de plus grosses tailles est beaucoup plus longue, entraînant un risque de toxicité supplémentaire. Dans le cas d'échange de ligands, une

diminution plus ou moins importante de la fluorescence est observée en fonction de la nature du ligand.

- Bioconjugaison

Depuis le succès du transfert des quantum dots en phase aqueuse, ces nanoparticules ont largement été utilisées en tant que marqueurs fluorescents en biologie.⁸⁹ Un grand nombre de molécules fonctionnelles comme les protéines, les oligonucléotides, les peptides, des petites molécules etc.. ont été greffés à la surface des quantum dots. Pour cela, plusieurs stratégies sont exploitées : l'échange de ligand qui contient un groupement thiol et la biomolécule, l'utilisation d'agents de couplage entre la biomolécule et le ligand hydrophile à la surface ou encore la fonctionnalisation de la couche de silice ou des polymères.

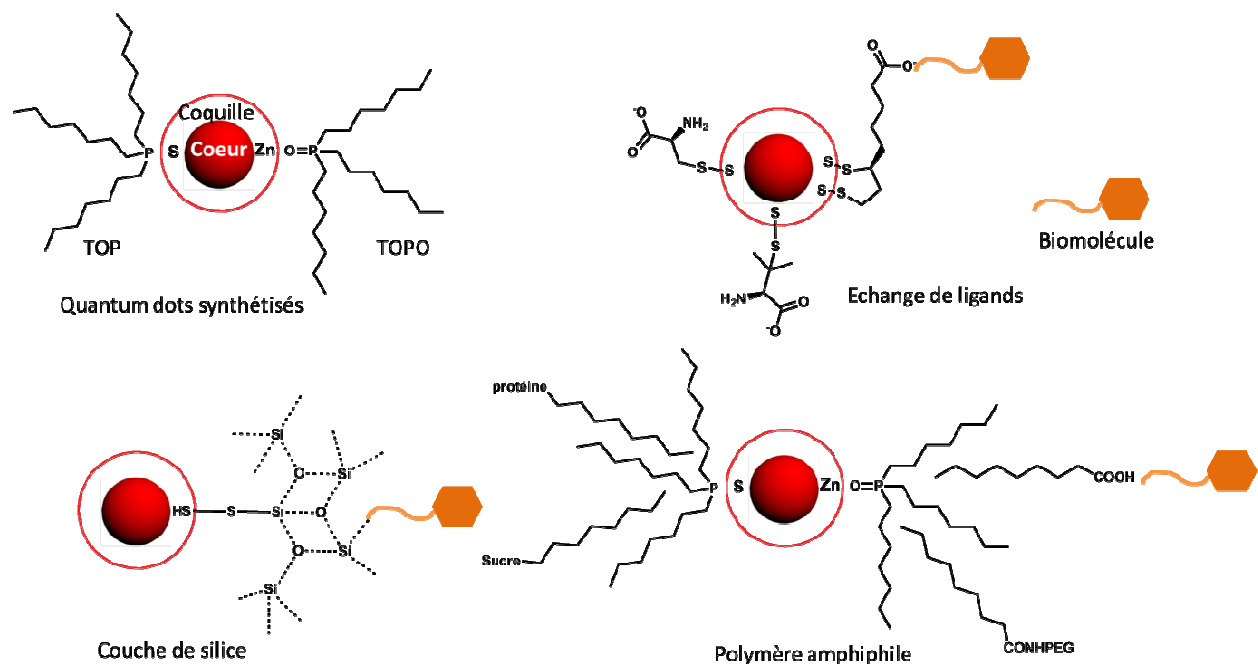


Figure I-33 : Schéma de la solubilisation des QD dans l'eau et leur bioconjugaison

4. Objectif du travail

Visualiser des événements biologiques à l'échelle moléculaire, tel est le défi de l'imagerie moléculaire. Parmi les outils utilisés, l'IRM est un outil de choix. Contrairement aux techniques d'imagerie nucléaire, elle ne met pas en jeu de radiations ionisantes et permet d'accéder à de hautes résolutions spatiales. Le défaut majeur de cette technique est sa faible sensibilité. L'imagerie moléculaire s'appuie également sur des méthodes optiques, qui consistent à injecter une molécule dotée d'un marqueur luminescent et à suivre son devenir dans les cellules. Celles qui ont intégré cette molécule émettent une lumière (souvent dans le visible ou dans l'infrarouge) qui peut être repérée par une caméra de détection. L'imagerie optique est une technique complémentaire à l'IRM car elle présente une faible résolution mais une très bonne sensibilité. Les complexes de lanthanides sont particulièrement adaptés pour l'imagerie moléculaire car ils permettent une détection, soit par

résonance magnétique (complexes de gadolinium), soit par luminescence (complexes de terbium et d'euporium). Les composés de lanthanides présentent des propriétés intéressantes comme sondes optiques dues à leur long temps de vie qui permet de s'affranchir de la fluorescence des molécules biologiques. De plus, les composés de lanthanides présentent une forte résistance à la photo-décomposition et une bonne discrimination spectrale.

Des agents de contraste à base de Gd(III) sont quant à eux utilisés avec succès depuis la fin des années 80. Si l'efficacité des agents commerciaux est satisfaisante, elle n'en reste pas moins inférieure aux valeurs prédites par la théorie. Pour associer l'imagerie moléculaire à l'IRM, il est nécessaire de développer de nouveaux marqueurs qui augmentent considérablement l'efficacité des agents de contraste et donc améliorent la sensibilité de cette technique. Aux champs classiques des imageurs, les paramètres à optimiser pour améliorer la relaxivité des complexes sont le nombre de molécules d'eau de sphère interne, la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère et le temps de corrélation rotationnelle du complexe. De nombreuses études sur ces paramètres ont été menées et ont mis en lumière leur influence sur la relaxivité. Les développements se sont donc orientés vers des complexes ayant une vitesse d'échange optimisée, afin de pouvoir ensuite ajuster les autres paramètres. L'accès à des temps de corrélation rotationnelle plus long a dirigé les recherches vers des complexes plus gros, soit par association non covalente avec des macromolécules, soit par le greffage sur différents supports et le développement d'agents multimériques. L'accès à de tels marqueurs nécessite de fixer sur les complexes des macromolécules ou nanoobjets biocompatibles via un espaceur adéquat. Un autre moyen pour aller vers l'imagerie moléculaire est d'associer la haute résolution de l'IRM avec la très bonne sensibilité de l'imagerie optique en associant dans une même entité un élément paramagnétique et un élément luminescent.

Ce travail de thèse est dédié à l'optimisation des propriétés relaxométriques d'agents de contraste pour l'IRM en les incorporant dans des systèmes macromoléculaires ou dans des nanoobjets. Depuis plusieurs années, notre groupe travaille sur la conception de complexes de lanthanides avec des propriétés relaxométriques et de luminescence optimisées. Deux séries de ligands ont été étudiées auparavant au laboratoire. La première est une série de complexes présentant des unités chélatantes picolines. L'architecture du ligand a été modulée pour comprendre les effets sur la relaxivité et accéder à des systèmes aux propriétés optimisées. De plus l'unité picolinate est un bon sensibilisateur pour la luminescence de l'Eu(III) et du Tb(III) dans le visible et de bons rendements quantiques ont été obtenus.^{38, 90, 91} La deuxième série de complexes utilise les unités 8-hydroxyquinoléines comme unités chélatantes. L'introduction de ces unités sur un squelette tripodal donne des complexes de lanthanides très stables, même en milieu biologique. Ce noyau aromatique permet également la sensibilisation de l'Yb(III), du Nd(III) et de l'Er(III) dans le proche infrarouge.⁹²⁻⁹⁴

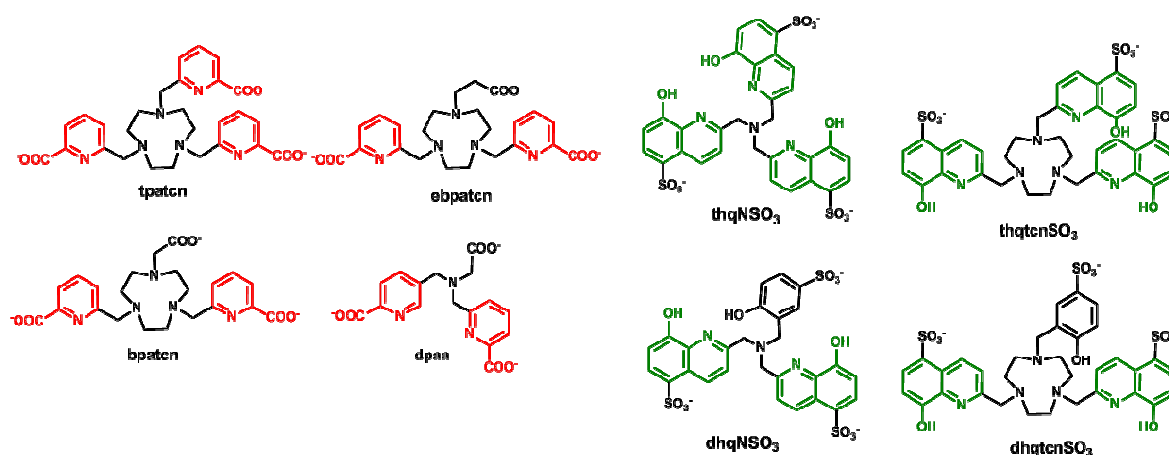


Figure I-34 : Ligands précédemment développés au laboratoire

L'objectif de ce travail de thèse est d'exploiter les ligands ayant les propriétés optimales pour les incorporer dans des systèmes macromoléculaires ou des nanoobjets afin de concevoir des agents de contraste à haute relaxivité conduisant à améliorer la sensibilité de l'IRM dans le but de l'imagerie moléculaire. L'augmentation attendue résulte de deux effets : d'une part l'association d'un grand nombre de complexes dans une seule entité et d'autre part l'amplification des effets d'augmentation de la relaxivité lors de l'incorporation. Dans le cadre de cette thèse, trois approches sont utilisées pour concevoir des agents de contraste pour l'IRM possédant une très haute relaxivité : conception de sondes bimodales IRM/Optique, conception de sondes ADN et incorporation non covalente de complexes de Gd(III) dans un système nanométrique. Pour concevoir de telles sondes, la première étape est la synthèse de complexes optimisés connus au laboratoire et comportant une fonction réactive : amine, azoture, thiol afin de pouvoir être couplés à des systèmes macromoléculaires ou des nanoobjets (chapitre II).

Des études préliminaires réalisées en collaboration avec l'équipe de Peter Reiss (LEMOH/SPrAM/INAC) montrent que l'association des complexes $[Gd(bpatcn)(H_2O)]^{95}$ et $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]^{96}$ à des objets de taille nanométrique tels que des quantum dots permet d'obtenir des sondes adaptées pour l'IRM et l'imagerie optique. Dans ce travail de thèse, l'objectif est de développer une sonde bimodale aux propriétés relaxométriques optimisées en greffant des complexes de Gd(III) sur des quantum dots (chapitre III). La variation des espaces entre les complexes de Gd(III) et les quantum dots pourra amplifier les effets obtenus.

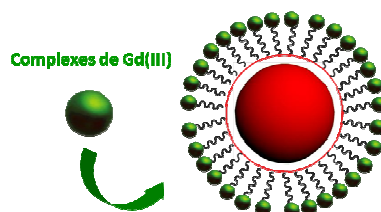


Figure I-35 : Principe d'accroche des complexes de Gd(III) sur les quantum dots

Dans la cadre d'une collaboration avec le Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques (Didier Gasparutto, LAN/SCIB/INAC), il a été montré que la réaction d'Huisgen entre un ligand contenant une fonction azoture et un nucléoside modèle, la désoxy-uridine contenant une fonction alcyne permettait de coupler le complexe $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$ sur un nucléoside. L'objectif de ce travail de thèse est de détecter les coupures et/ou interactions de l'ADN par variation de relaxivité en y greffant des complexes de Gd(III) aux propriétés optimisées (chapitre IV).

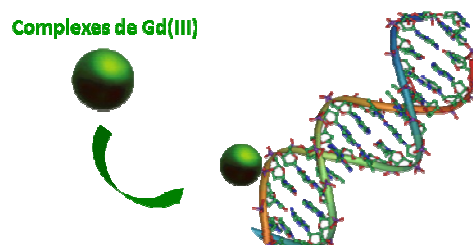


Figure I-36 : Greffage de complexes de Gd(III) sur des oligonucléotides

Enfin, l'incorporation non covalente du complexe $[Gd(ebpatcn)(H_2O)]$ dans des billes de silice⁹⁷ a montré une très forte augmentation de la relaxivité, jusqu'à $84 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz. La compréhension de ce mécanisme régissant cette haute relaxivité est un objectif essentiel pour obtenir un système possédant une très haute relaxivité. De plus, ces composés doivent avoir une stabilité élevée, notamment en milieu biologique (chapitre V).

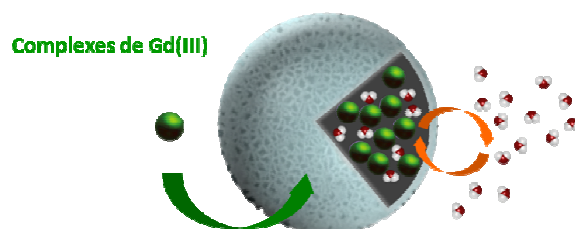


Figure I-37 : Incorporation non covalente des complexes de Gd(III) dans des billes de silice

5. Références

1. S. Cotton, *Lanthanide and Actinide Chemistry*, Wiley, 2006.
2. R. G. Pearson, *Journal of the American Chemical Society*, 1963, **85**, 3533-3539.
3. L. L. P. George K. Schweitzer, *The Aqueous Chemistry of the Elements*, USA, 2009.
4. R. D. Shannon and C. T. Prewitt, *Acta Crystallographica Section B*, 1969, **25**, 925-946.
5. K. König, *Journal of Microscopy*, 2000, **200**, 83-104.
6. P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1999, **99**, 2293-2352.

7. A. Merbach, L. Helm and E. Toth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Wiley, 2013.
8. E. Toth, L. Helm and A. Merbach, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Winchester, 2001.
9. L. H. Ahrens, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1952, **2**, 155-169.
10. P. Caravan, N. J. Cloutier, M. T. Greenfield, S. A. McDermid, S. U. Dunham, J. W. M. Bulte, J. C. Amedio, R. J. Looby, R. M. Supkowski, W. D. Horrocks, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 3152-3162.
11. S. M. Rocklage, W. P. Cacheris, S. C. Quay, F. E. Hahn and K. N. Raymond, *Inorganic Chemistry*, 1989, **28**, 477-485.
12. J. Garcia, J. Neelavalli, E. M. Haacke and M. J. Allen, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 12858-12860.
13. J. Garcia and M. J. Allen, *Inorganica Chimica Acta*, 2012, **393**, 324-327.
14. I. Solomon and N. Bloembergen, *Journal of Chemical Physics*, 1956, **25**, 261-266.
15. N. Bloembergen and L. O. Morgan, *Journal of Chemical Physics*, 1961, **34**, 842-850.
16. A. R. Dweck, *Relaxation in paramagnetic systems. Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry*, Oxford, 1973.
17. T. J. Swift and R. E. Connick, *The Journal of Chemical Physics*, 1962, **37**, 307-320.
18. Z. Luz and S. Meiboom, *The Journal of Chemical Physics*, 1963, **39**, 366-370.
19. P. H. Fries, C. Gateau and M. Mazzanti, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 15801-15814.
20. T. Storr, *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, 2014.
21. Y. Ayant, E. Belorizky, J. Aluzon and J. Gallice, *Journal of Physics, France*, 1975, **36**, 991-1004.
22. L. P. Hwang and J. H. Freed, *Journal of Chemical Physics*, 1975, **63**, 4017-4025.
23. J. H. Freed, *Journal of Chemical Physics*, 1978, **68**, 4034-4037.
24. J. P. Albrand, M. C. Taieb, P. H. Fries and E. Belorizky, *Journal of Chemical Physics*, 1983, **78**, 5809-5815.
25. C. F. Polnaszek and R. G. Bryant, *The Journal of Chemical Physics*, 1984, **81**, 4038-4045.
26. M. Botta, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2000, **2000**, 399-407.
27. S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Piccinini, M. Sisti and E. Terreno, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1997, **2**, 470-479.
28. J. Kotek, P. Lebdušková, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, C. F. G. C. Geraldes, T. Maschmeyer, I. Lukeš and J. A. Peters, *Chemistry – a European Journal*, 2003, **9**, 5899-5915.
29. P. Lebduskova, P. Hermann, L. Helm, E. Toth, J. Kotek, K. Binnemans, J. Rudovsky, I. Lukes and A. E. Merbach, *Dalton Transactions*, 2007, 493-501.
30. S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano and M. Sisti, *Inorganic Chemistry*, 2004, **43**, 7588-7590.
31. J. Costa, É. Tóth, L. Helm and A. E. Merbach, *Inorganic Chemistry*, 2005, **44**, 4747-4755.
32. J. B. Livramento, A. Sour, A. Borel, A. E. Merbach and É. Tóth, *Chemistry – A European Journal*, 2006, **12**, 989-1003.
33. A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams and M. Woods, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1999, 493-503.
34. A. M. Raitsimring, A. V. Astashkin, D. Baute, D. Goldfarb, O. G. Poluektov, M. P. Lowe, S. G. Zech and P. Caravan, *ChemPhysChem*, 2006, **7**, 1590-1597.
35. M. C. Alpoim, A. M. Urbano, C. F. G. C. Geraldes and J. A. Peters, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1992, 463-467.
36. A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring and P. Caravan, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2004, **108**, 1990-2001.
37. C. Gateau, M. Mazzanti, J. Pecaut, F. A. Dunand and L. Helm, *Dalton Transactions*, 2003, 2428-2433.

38. A. Nonat, C. Gateau, P. H. Fries and M. Mazzanti, *Chemistry-a European Journal*, 2006, **12**, 7133-7150.
39. L. Helm and A. E. Merbach, *Coordination Chemistry Reviews*, 1999, **187**, 151-181.
40. W. P. Cacheris, S. C. Quay and S. M. Rocklage, *Magnetic Resonance Imaging*, 1990, **8**, 467-481.
41. D. Pubanz, G. Gonzalez, D. H. Powell and A. E. Merbach, *Inorganic Chemistry*, 1995, **34**, 4447-4453.
42. S. Aime, A. S. Batsanov, M. Botta, R. S. Dickins, S. Faulkner, C. E. Foster, A. Harrison, J. A. K. Howard, J. M. Moloney, T. J. Norman, D. Parker, L. Royle and J. A. Gareth Williams, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1997, 3623-3636.
43. L. Helm, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2006, **49**, 45-64.
44. W.-Y. Huang and J. J. Davis, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 6087-6103.
45. J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, K. I. Hardcastle, I. Lukeš and S. Aime, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **17**, 975-987.
46. S. Aime, D. D. Castelli, S. G. Crich, E. Gianolio and E. Terreno, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 822-831.
47. W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, G. A. F. van Tilborg, D. P. Cormode, Z. A. Fayad and K. Nicolay, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 904-914.
48. A. Accardo, D. Tesauro, L. Aloj, C. Pedone and G. Morelli, *Coordination Chemistry Review.*, 2009, **253**, 2193-2213.
49. F. Kielar, L. Tei, E. Terreno and M. Botta, *Journal of American Chemical Society*, 2010, **132**, 7836-+.
50. L. M. Manus, D. J. Mastarone, E. A. Waters, X. Q. Zhang, E. A. Schultz-Sikma, K. W. MacRenaris, D. Ho and T. J. Meade, *Nano Letters*, 2010, **10**, 484-489.
51. P. J. Endres, T. Paunesku, S. Vogt, T. J. Meade and G. E. Woloschak, *Journal of American Chemical Society*, 2007, **129**, 15760-15761.
52. L. Moriggi, C. Cannizzo, E. Dumas, C. R. Mayer, A. Ulianov and L. Helm, *Journal of American Chemical Society*, 2009, **131**, 10828-10829.
53. J. A. Peters and K. Djanashvili, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 1961-1974.
54. M. Tsotsalas, M. Busby, E. Gianolio, S. Aime and L. De Cola, *Chem. Mat.*, 2008, **20**, 5888-5893.
55. E. Delgado-Pinar, M. T. Albelda, J. C. Frias, O. Barreiro, E. Tejera, V. Kubicek, L. J. Jimenez-Borreguero, F. Sanchez-Madrid, E. Toth, J. Alarcon and E. Garcia-Espana, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 6451-6457.
56. K. Overoye-Chan, S. Koerner, R. J. Looby, A. F. Kolodziej, S. G. Zech, Q. Deng, J. M. Chasse, T. J. McMurry and P. Caravan, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 6025-6039.
57. M. R. Makowski, A. J. Wiethoff, U. Blume, F. Cuello, A. Warley, C. H. P. Jansen, E. Nagel, R. Razavi, D. C. Onthank, R. R. Cesati, M. S. Marber, T. Schaeffter, A. Smith, S. P. Robinson and R. M. Botnar, *Nat Med*, 2011, **17**, 383-388.
58. S. Geninatti Crich, D. Alberti, I. Szabo, S. Aime and K. Djanashvili, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 1161-1164.
59. P. Caravan, J. M. Greenwood, J. T. Welch and S. J. Franklin, *Chemical Communications*, 2003, 2574-2575.
60. C. S. Bonnet and É. Tóth, *American Journal of Neuroradiology*, 2010, **31**, 401-409.
61. C. Shen and E. J. New, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, **17**, 158-166.
62. M. P. Lowe, D. Parker, O. Reany, S. Aime, M. Botta, G. Castellano, E. Gianolio and R. Pagliarin, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, **123**, 7601-7609.
63. S. Aime, S. Geninatti Crich, M. Botta, G. Giovenzana, G. Palmisano and M. Sisti, *Chemical Communications*, 1999, 1577-1578.
64. G. Angelovski, P. Fouskova, I. Mamedov, S. Canals, E. Toth and N. K. Logothetis, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 1729-1734.

65. J. L. Major, G. Parigi, C. Luchinat and T. J. Meade, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**, 13881-13886.
66. E. L. Que, E. J. New and C. J. Chang, *Chemical Science (Royal Society of Chemistry : 2010)*, 2012, **3**, 1829-1834.
67. R. A. Moats, S. E. Fraser and T. J. Meade, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1997, **36**, 726-728.
68. A. L. Nivorozhkin, A. F. Kolodziej, P. Caravan, M. T. Greenfield, R. B. Lauffer and T. J. McMurry, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**, 2903-2906.
69. E. Gianolio, R. Napolitano, F. Fedeli, F. Arena and S. Aime, *Chemical Communications*, 2009, 6044-6046.
70. E. Gianolio, L. Maciocco, D. Imperio, G. B. Giovenzana, F. Simonelli, K. Abbas, G. Bisi and S. Aime, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 1539-1541.
71. G. A. Crosby and M. Kasha, *Spectrochimica Acta*, 1958, **10**, 377-382.
72. W. D. Horrocks, J. P. Bolender, W. D. Smith and R. M. Supkowski, *Journal of the American Chemical Society*, 1997, **119**, 5972-5973.
73. D. L. Dexter, *The Journal of Chemical Physics*, 1953, **21**, 836-850.
74. T. Forster, *Discussions of the Faraday Society*, 1959, **27**, 7-17.
75. M. Latva, H. Takalo, V.-M. Mikkala, C. Matachescu, J. C. Rodríguez-Ubis and J. Kankare, *Journal of Luminescence*, 1997, **75**, 149-169.
76. R. Rossetti and L. Brus, *The Journal of Physical Chemistry*, 1982, **86**, 4470-4472.
77. R. Rossetti, S. Nakahara and L. E. Brus, *The Journal of Chemical Physics*, 1983, **79**, 1086-1088.
78. L. E. Brus, *The Journal of Chemical Physics*, 1984, **80**, 4403-4409.
79. L. Brus, *The Journal of Physical Chemistry*, 1986, **90**, 2555-2560.
80. S. L. Cumberland, K. M. Hanif, A. Javier, G. A. Khitrov, G. F. Strouse, S. M. Woessner and C. S. Yun, *Chemistry of Materials*, 2002, **14**, 1576-1584.
81. B. Dubertret, <https://blog.espci.fr/qdots/>.
82. W. Liu, H. S. Choi, J. P. Zimmer, E. Tanaka, J. V. Frangioni and M. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 14530-14531.
83. S. Tamang, G. Beaune, I. Texier and P. Reiss, *ACS Nano*, 2011, **5**, 9392-9402.
84. K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty and H. Mattoussi, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 13987-13996.
85. D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, **105**, 8861-8871.
86. T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile and W. J. Parak, *Nano Letters*, 2004, **4**, 703-707.
87. B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou and A. Libchaber, *Science*, 2002, **298**, 1759-1762.
88. H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. Itty Ipe, M. G. Bawendi and J. V. Frangioni, *Nature Biotechnology*, 2007, **25**, 1165-1170.
89. I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman and H. Mattoussi, *Nature Materials*, 2005, **4**, 435-446.
90. A. Nonat, P. H. Fries, J. Pecaut and M. Mazzanti, *Chemistry-a European Journal*, 2007, **13**, 8489-8506.
91. A. Nonat, M. Giraud, C. Gateau, P. H. Fries, L. Helm and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2009, 8033-8046.
92. G. Talleg, P. H. Fries, D. Imbert and M. Mazzanti, *Inorganic Chemistry*, 2011, **50**, 7943-7945.
93. G. Talleg, D. Imbert, P. H. Fries and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2010, **39**, 9490-9492.
94. A. Nonat, D. Imbert, J. Pecaut, M. Giraud and M. Mazzanti, *Inorganic Chemistry*, 2009, **48**, 4207-4218.
95. G. J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Poillot, M. Giardiello, C. Tisseyre, E. L. Barbier, P. H. Fries, M. de Waard, P. Reiss and M. Mazzanti, *ACS Nano*, 2011, **5**, 8193-8201.

96. G. J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Gateau, P. Reiss, P. Fries and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2013, **42**, 8197-8200.
97. N. Wartenberg, P. Fries, O. Raccurt, A. Guillermo, D. Imbert and M. Mazzanti, *Chemistry-a European Journal*, 2013, **19**, 6980-6983.

Synthèse et étude des complexes

1. Conception des ligands	61
a) Couplage des espaceurs sur les complexes de lanthanides	61
b) Complexes cibles	64
2. Synthèse du dérivé du DOTA	66
3. Synthèse des dérivés de l'ebpatcn	69
4. Etude des complexes	73
a) Caractérisation	73
b) Relaxivité	76
c) Luminescence	81
5. Conclusion	84
6. Références	85

Synthèse et étude des complexes

1. Conception des ligands

a) Couplage des espaceurs sur les complexes de lanthanides

Comme il a été vu en introduction, les paramètres gouvernant la relaxivité peuvent être optimisés en greffant les agents de contraste sur des nanoobjets ou des systèmes macromoléculaires dans le but d'augmenter le temps de corrélation rotationnelle et/ou de rassembler plusieurs complexes sur un même objet. Pour ce faire, il est nécessaire de modifier l'architecture du ligand entourant le gadolinium afin d'introduire une fonction réactive. Les complexes GdDOTA et GdDTPA étant les plus utilisés en tant qu'agents de contraste pour l'IRM, la fonctionnalisation des ligands correspondants a largement été décrite dans la littérature. Nous nous sommes intéressés ici aux stratégies employées pour la fonctionnalisation du DOTA, qui peuvent également être appliquées au DTPA. Les différentes stratégies consistent à la modification d'un bras acétate par un amide (figure II-1-a) ou une chaîne alkyle (figure II-1-b) et à la fonctionnalisation du macrocycle (figure II-1 c) ou du carbone en α des bras acétates (figure II-1 d).

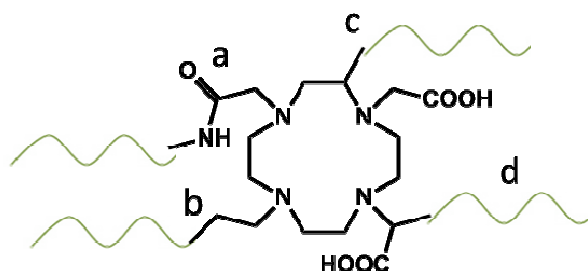


Figure II-1 : Stratégies de fonctionnalisation du DOTA

Un des premiers moyens employés est de remplacer un des bras acétate du DOTA par un bras acétamide (figure II-1-a). Le DOTANHS ester (DOTA dont un des bras acétate est activé par la N-hydrosuccinimide) étant commercial, la réaction d'une amine primaire sur l'acide activé permet de coupler n'importe quel composé sur le DOTA par la formation d'un lien amide. Dans la littérature cette voie de fonctionnalisation est largement employée pour différentes applications telles que le greffage sur des peptides¹⁻³, des nanoparticules,⁴ la conjugaison avec l'albumine⁵ ou des dendrimères,⁶ ou encore pour le ciblage des tumeurs.⁷ Cependant remplacer un bras acétate par un bras acétamide conduit à une diminution de la stabilité du complexe et de la vitesse d'échange des molécules d'eau d'un facteur 3 à 4⁸ ce qui est limitant pour induire une augmentation significative de la relaxivité par accroissement de taille.

Le motif DO3A (DOTA moins un bras acétate) peut être une alternative pour greffer des complexes de gadolinium sur la surface de nanoparticules et pour la synthèse de conjugués bifonctionnels. L'espaceur entre la fonction réactive et le complexe de gadolinium est souvent une chaîne alkyle sans

groupement coordonnant, couplée sur l'amine secondaire du DO3A (figure II-1-b). Plusieurs exemples de ce type de ligands sont décrits dans la littérature pour des applications telles que la fonctionnalisation sur des peptides⁹ ou des nanoparticules^{10,11} pour des composés bifonctionnels.¹² Les complexes obtenus possèdent alors deux molécules d'eau dans la sphère interne du gadolinium. Ces composés possèdent une plus haute relaxivité mais leur utilisation est limitée par une plus faible stabilité.

La fonctionnalisation du DOTA sur le macrocycle (figure II-1-c) est plus difficile à mettre en œuvre car l'étape de fonctionnalisation se fait avant la formation du macrocycle et nécessite plusieurs étapes de protection et déprotection. Quelques exemples sont donnés avec cette stratégie dans la littérature notamment la fonctionnalisation du DOTA avec de longues chaînes alkyles qui vont s'auto assembler pour former des micelles.¹³

La substitution en α de l'acide carboxylique d'un des bras acétates (figure II-1-d) permet de conserver la stabilité et les propriétés relaxométriques des complexes de GdDOTA. En effet, le nombre de coordination et la géométrie de la sphère de coordination des complexes restent identiques, les substituants se trouvant à l'extérieur de cette sphère. Seule la charge globale du complexe peut changer, ce qui peut avoir un effet sur la vitesse d'échange des complexes : les charges négatives favorisent une vitesse d'échange plus rapide.¹⁴ De cette manière, de nombreuses fonctions réactives sont introduites : amine, thiols, acide carboxylique... L'acide glutarique est l'un des substituants les plus souvent employés par cette méthode. Il est notamment utilisé pour greffer les complexes de gadolinium sur un cœur silsesquioxane.¹⁵

Au cours de ma thèse, nous avons choisi d'utiliser un dérivé du DOTA portant un bras propionate fonctionnalisé en α de l'acide carboxylique afin de greffer le complexe sur des nanoobjets ou des systèmes macromoléculaires. En effet, ce complexe possède une vitesse d'échange des molécules d'eau plus favorable par rapport au GdDOTA en vue du changement d'échelle. Le groupe du Pr. Merbach a montré que la vitesse d'échange des molécules d'eau des complexes avec des ligands dérivés du DOTA et de la DTPA était accélérée par l'augmentation de l'encombrement stérique autour du gadolinium, notamment par l'ajout d'un méthylène sur un bras acétate.^{16,17}

L'objectif ici est de fonctionnaliser des agents de contraste pour les greffer à des nanoobjets ou des macromolécules *via* un espaceur adéquat. Il est nécessaire d'introduire une fonction réactive sur le ligand afin de pouvoir coupler l'espaceur désiré. Plusieurs réactions de couplage présentées en figure II-2 peuvent être envisagées pour lier l'espaceur désiré sur le bras propionate du complexe de gadolinium :

- Le couplage peptidique entre une amine et un acide activé est une chimie qui est largement utilisée pour coupler des biomolécules (A)
- La cycloaddition d'Huisgen, une réaction entre un alcyne et un azoture catalysée par le cuivre (I) pour former un lien triazole (B)
- La chimie des thiols, largement utilisée pour réaliser différents couplages. En effet, les thiols peuvent réagir avec des alcènes, des chlorures d'acyle ou des maléimides pour former des liaisons stables (C)

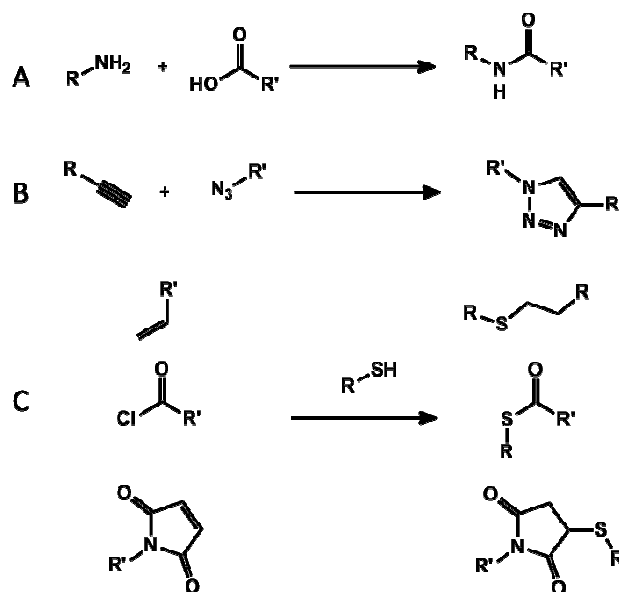


Figure II-2 : Différentes réactions de couplage

Nous avons choisi d'introduire une fonction amine primaire sur le bras propionate du complexe de gadolinium qui nous permettra via un lien amide d'introduire les espaceurs désirés. Cette liaison est très stable dans l'eau et nécessite des conditions drastiques pour être rompue (chauffage, acide ou base forte). En plus d'une fonction de greffage permettant le couplage sur des oligonucléotides ou des quantum dots, les espaceurs devront comporter une fonction acide carboxylique qui sera préalablement activée pour former la liaison amide avec l'amine primaire présente sur le complexe de lanthanide.

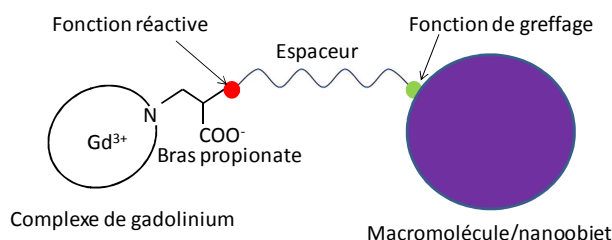


Figure II-3 : Fonctionnalisation de complexes de Gd(III) pour greffer sur une macromolécule ou nanobjet

Il a été vu en introduction que la chimie des thiols est largement utilisée pour solubiliser les quantum dots en phase aqueuse et effectuer leur bioconjugaison. Nous avons choisi d'utiliser ce type de chimie pour greffer les complexes de lanthanides aux quantum dots (chapitre III). La réaction d'Huisgen a largement été utilisée par le laboratoire LAN (Lésions des Acides Nucléiques, CEA Grenoble) pour coupler des oligonucléotides à des sondes fluorescentes ou TEMPO. Nous avons tiré profit de leur expertise de cette chimie pour greffer des complexes de gadolinium sur des oligonucléotides *via* un lien triazole (chapitre IV).

b) Complexes cibles

-Dérivé du DOTA

Pour notre étude nous avons choisi le DO3ApropNH₂ (figure II-4) comme modèle par rapport à ce qui est décrit dans la littérature :

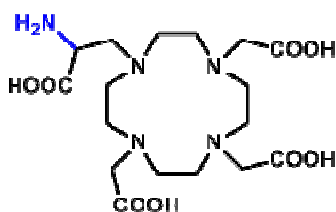


Figure II-4 : le ligand H₄DO3ApropNH₂

Il s'agit d'un dérivé du DOTA sur lequel un bras acétate a été remplacé par un bras propionate, permettant une vitesse d'échange des molécules d'eau plus importante que celle du GdDOTA ($k_{ex} = 40$ contre $4.6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C).¹⁸ Ce bras propionate porte une fonction amine en α de l'acide carboxylique qui permet l'introduction d'un espaceur adéquat pour le greffage sur un nanoobjet. L'introduction directe de cette fonction amine sur le bras permet de limiter la flexibilité par rapport à l'ajout d'un équivalent de la lysine et d'exalter les effets de l'augmentation de la taille sur la relaxivité.

La synthèse directe de ce composé par réaction de la N-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-sérine- β -lactone sur le DO3A^tBu a été décrite dans un brevet.¹⁹ Deux autres voies de synthèse multi-étapes de ce ligand sont décrites dans la littérature. Ces deux voies, décrites par les groupes de Toth/Geraldes¹⁸ et de Caravan²⁰ adoptent la même stratégie de synthèse: tout d'abord la monosubstitution du cyclène par un bras propionate convenablement protégé et préalablement activé sous forme d'un alcène ou de mésylate puis l'introduction des bras acétates grâce à un bromoacétate d'alkyle. Cet ordre des étapes de synthèse est préféré car il a été montré dans la littérature que l'introduction d'un bras propionate sur le DO3A^tBu (ou autre ester) donne un rendement de synthèse médiocre.²¹ Le groupe de Caravan obtient le DO3ApropNH₂ sous sa forme protégé (figure II-4) avec un rendement de 15% qui sera ensuite utilisé pour effectuer un couplage avec un peptide. Le groupe de Toth/Geraldes obtient le ligand DO3ApropNH₂ (figure II-4) avec un rendement de 36%. Cependant le produit obtenu est relativement instable du fait de la présence du proton labile en α et de sa basicité. De plus, le groupement amine primaire du complexe de lanthanide correspondant, qui lui est stable, a une faible réactivité, ce qui rend la conjugaison avec les espaceurs peu efficace. L'alternative est donc de déprotéger sélectivement l'amine primaire afin d'effectuer l'étape de couplage avant la déprotection des fonctions acide carboxylique. Ceci peut être réalisé en utilisant le composé protégé par des groupements éthyles de la figure II-5-B. Les trois voies de synthèse ont été testées au laboratoire et seront détaillées par la suite.

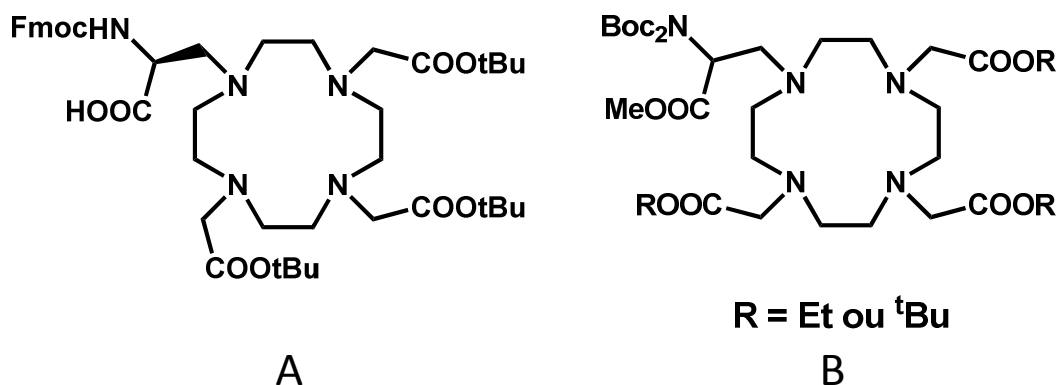


Figure II-5 : Intermédiaire du DO3ApropNH₂ synthétisés par le groupe de Caravan (A)²⁰ et de Geraldes(B)¹⁸

-Dérivé de l'ebpatcn

Le complexe [Gd(ebpatcn)(H₂O)] (figure II-6) a été étudié au laboratoire au cours de la thèse d'Aline Nonat.²² Celui-ci présente des propriétés relaxométriques améliorées, notamment par une vitesse d'échange des molécules d'eau qui est de $8.6 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ à 25°C proche de la valeur optimale prédite par la théorie comparée aux agents de contraste commerciaux, qui est de 3.3 et $4.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C²³ respectivement pour le GdDTPA et le GdDOTA. Il possède un temps de corrélation rotationnelle de 126 ps et une relaxivité de $3.8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à 45 MHz et 25°C. La stabilité du complexe de gadolinium pGd, est de 13.1 (quantité de gadolinium libre en présence de 10^{-5} M de ligand et 10^{-6} M de métal à pH 7.4 ; pGd(DOTA)= 24.7)²⁴ est raisonnable et suffisante pour des études *in vitro* ou sur le petit animal. De plus, les unités picolinate peuvent sensibiliser les ions europium et terbium émettant dans le visible. C'est principalement pour sa vitesse d'échange améliorée et sa capacité à sensibiliser par effet d'antenne les lanthanides émettant dans le visible que ce complexe a été choisi pour cette étude. Comme pour le dérivé du DOTA, une fonction amine est introduite sur le bras propionate du complexe pour coupler les espaceurs adéquats et effectuer le greffage du complexe sur des nanoobjets. La synthèse de ce composé a été réalisée en s'inspirant de celle du DO3ApropNH₂.

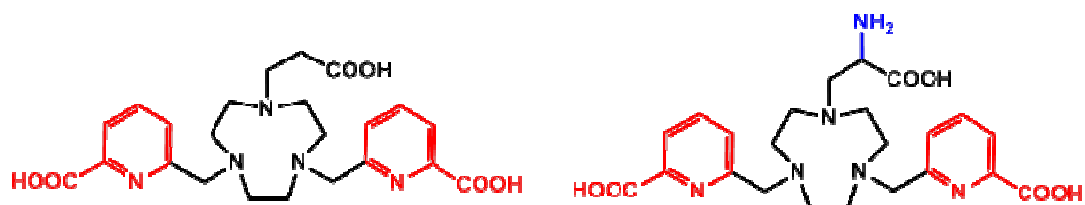


Figure II-6: Les ligands H₃ebpatcn et H₃ebpatcnNH₂

-Choix des espaceurs

Pour réaliser le couplage entre les complexes et les espaceurs sélectionnés, un lien amide a été choisi. Les espaceurs choisis devront porter une fonction acide carboxylique qui sera préalablement

activée pour effectuer la réaction de couplage avec l'amine libre située sur le bras propionate des ligands. Les espaceurs choisis sont présentés dans la figure II-7.

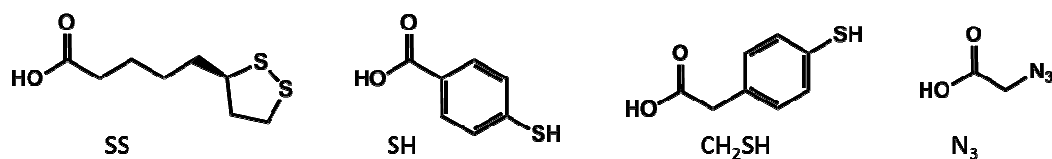


Figure II-7: Espaceurs utilisés pour greffer les complexes de gadolinium sur les quantum dots et sur les oligonucléotides

Les trois premiers espaceurs comportent des fonctions thiols pour promouvoir le greffage de complexes de lanthanides sur les quantum dots. Une étude préalablement effectuée au laboratoire montrant l'influence de différents espaceurs entre un complexe de gadolinium et un quantum dot, a orienté notre choix pour les deux premiers espaceurs.²⁵ L'acide lipoïque (SS) est avantageux grâce à la longueur de la chaîne qui permet d'introduire un plus grand nombre de complexes de lanthanides sur les quantum dots. Le deuxième espaceur choisi (SH) court et rigide, permet d'exalter l'effet du changement d'échelle sur la relaxivité du complexe de gadolinium. Le troisième (CH₂SH) permet d'avoir un "mix" des propriétés des deux premiers : la rigidité par le groupement phényle et une longueur légèrement plus importante par l'ajout d'un groupement méthylène.

Pour greffer les complexes de lanthanides sur des oligonucléotides, nous avons choisi la fonction azoture. En effet, le laboratoire du LAN possède un savoir-faire de la chimie click (Huisgen) entre les sondes fluorescentes ou TEMPO fonctionnalisées avec une fonction azoture et des oligonucléotides comportant un groupement alcyne. Cette expertise sur la fonctionnalisation des oligonucléotides nous permettra de coupler les complexes de lanthanides par la réaction d'Huisgen *via* un lien triazole.

2. Synthèse du dérivé du DOTA

Différentes voies de synthèse issues de la littérature sont explorées pour effectuer la synthèse du DO3ApropNH₂. Les premières voies de synthèse testées sont des méthodes directes, donc plus rapides. La première méthode consiste à introduire le bras propionate en faisant réagir la N-(tert-butoxycarbonyl)-L-sérine-β-lactone sur le DO3A^tBu tous deux commerciaux selon un protocole décrit dans un brevet.¹⁹ Cette réaction conduit à un mélange de produits duquel le produit souhaité n'a pu être isolé en quantité suffisante. L'alkylation directe du DO3A^tBu en utilisant différents électrophiles comme l'alcène, le mésylate ou le brome ne conduisent pas au produit désiré (figure II-8). Dans le cas de l'alcène, aucune réaction n'est observée quel que soient les conditions. L'utilisation du mésylate ou du dérivé bromé comme groupement partant conduisent à la formation de l'alcène stable correspondant à cause de la présence du proton labile en α et aucune trace du produit désiré n'est observée.

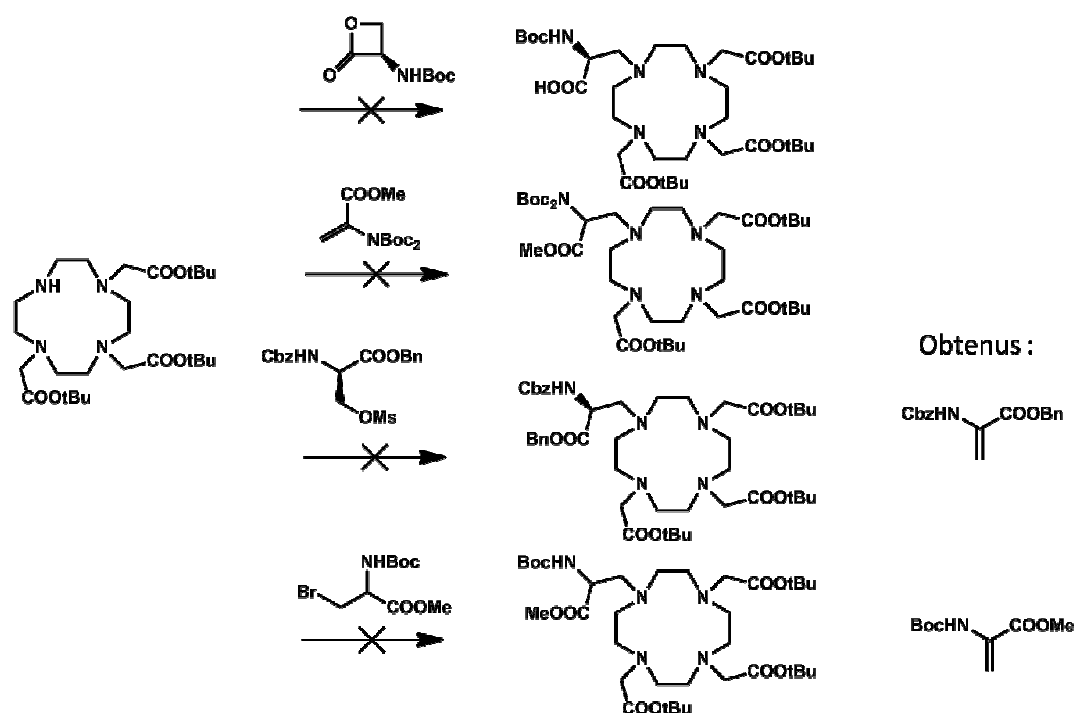


Figure II-8 : Alkylation du DO3A^tBu

La méthode de synthèse du DO3ApropNH₂ (figure II-9) décrite par les groupes de Toth et Gerald¹⁸ est une méthode indirecte à partir du cyclène qui a été reproduite au laboratoire. Elle consiste à faire réagir le Boc₂-Δ-AlaOMe avec un excès de cyclène pour favoriser la monosubstitution²⁶ en présence de carbonate de potassium en tant que base. L'intermédiaire monosubstitué est obtenu avec un rendement de 73% après élimination des composés bis et tris substitué et l'excès de cyclène. Il réagit ensuite avec le bromoacétate de *tert*-butyle ou d'éthyle, pour obtenir le composé sous sa forme protégée. Cependant, la purification des produits protégés sur gel de silice comme décrit conduit à la dégradation des deux produits. La coupure du bras propionate est observée et l'alcène de départ est récupéré après la purification.

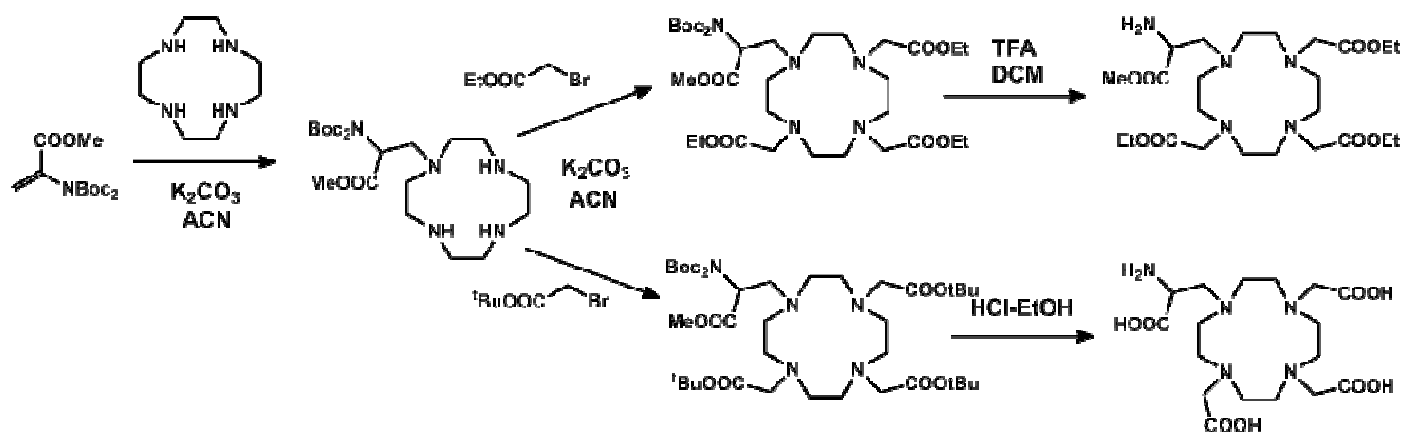


Figure II-9 : Voie de synthèse du DO3ApropNH₂ décrite par Toth et Gerald¹⁸

L'alternative a été de reproduire la synthèse décrite par le groupe de Caravan (figure II-10).²⁰ Tout d'abord la sérine Cbz-Ser-OBn commerciale est activée sous forme d'un mésylate **4** qui sert de nucléofuge lors de la réaction de monosubstitution sur le cyclène selon le protocole expérimental décrit dans la littérature.²⁷ Ce produit est obtenu avec un rendement brut quantitatif et est mis en jeu rapidement dans l'étape suivante du fait de l'instabilité relative du groupement mésylate. Celui-ci réagit ensuite avec un excès de cyclène (2 équivalents) pour favoriser la monosubstitution, en présence de carbonate de potassium. Le produit monosubstitué **11** est obtenu avec un rendement brut de 77%. Ce produit est contaminé par des traces de produits di- et tri- substitué observés par spectrométrie de masse. L'excès de cyclène est retiré par de nombreux lavages à l'eau. L'alkylation des trois autres fonctions amines secondaires du macrocycle est réalisée par traitement à l'aide de bromoacétate de *tert*-butyle en présence de carbonate de potassium. C'est également une réaction dont le mécanisme mis en jeu est une substitution nucléophile. Le produit sous forme protégé **12** est ainsi obtenu en trois étapes avec un rendement global de 30% après purification par HPLC préparative, comparable à celui de la littérature (28%).

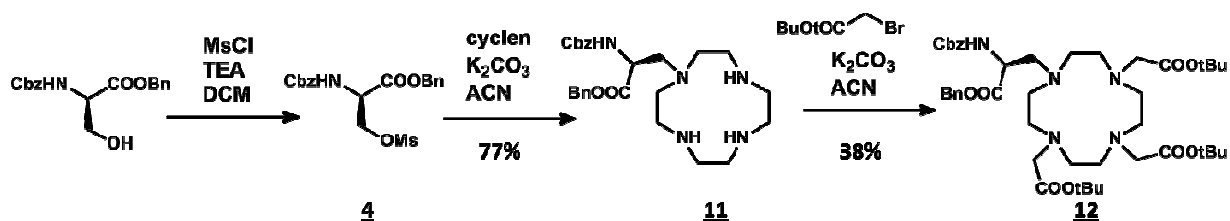


Figure II-10 : Synthèse du DO3ApropNH₂ protégé décrite par Caravan²⁰

Des essais de déprotection totale en condition acide (HCl 6M à reflux) ont été réalisés sur le composé **12**. La complexation est ensuite réalisée avec 1.1 équivalent de chlorure de gadolinium directement sur le produit brut du fait de son instabilité. Ce complexe n'absorbant pas dans la gamme UV, sa purification par HPLC n'a pu être réalisée avec la détection UV. La purification du complexe sur Sephadex ne permet pas d'éliminer l'excès de gadolinium introduit. Ceci est vérifié par le test du xylénol orange. Le complexe brut obtenu est tout de même mis en jeu dans une réaction de couplage en utilisant un acide activé par la N-hydroxysuccinimide. Cependant, aucune réaction de couplage n'est observée et la purification du milieu par HPLC avec un détecteur à diffusion de lumière ne nous a pas permis de récupérer le complexe de départ.

Une autre stratégie est employée pour obtenir le dérivé du DOTA (figure II-11). Les groupements protecteurs benzyle et carboxybenzyle présents sur le composé **12** sont déprotégés sélectivement par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon. Le palladium se lie à la molécule de dihydrogène et au composé à liaison multiple pour lui transférer un à un des atomes d'hydrogène. La molécule obtenue est ensuite mise en réaction avec l'acide 4-mercaptobenzoïque préalablement activé par un N-hydroxysuccinimide **6**, en présence de diisopropyléthylamine qui va permettre la formation d'une liaison amide entre les deux entités.

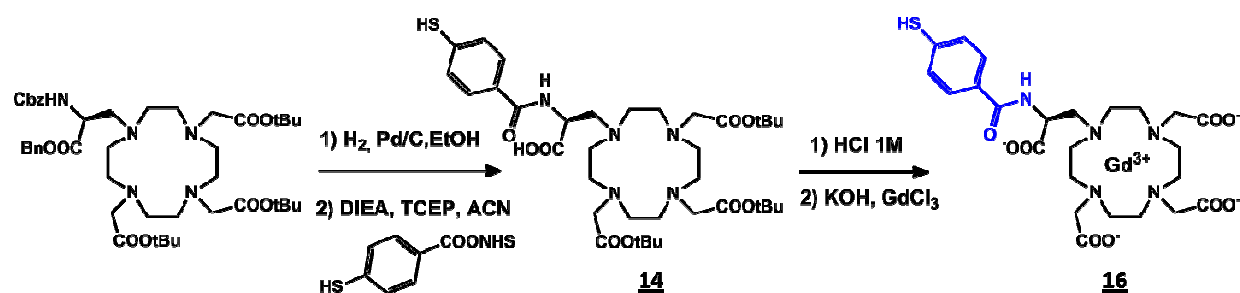


Figure II-11 : Synthèse du complexe [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]⁻

L'intermédiaire obtenu **14** est ensuite totalement déprotégé en milieu acide pour donner le ligand désiré. Du fait de son instabilité, l'étape de complexation par addition de 1.1 équivalent de chlorure de gadolinium est réalisée puis le complexe **16** est purifié par HPLC préparative. Le rendement global de ces quatre étapes est de 7% et le produit souhaité est obtenu en quantité suffisante pour la caractérisation et les études de relaxivité. Cette voie de synthèse pourra être optimisée en protégeant la fonction thiol ou en introduisant l'espaceur dès le début de la synthèse.

En conclusion, le complexe de gadolinium dérivé du DOTA, contenant un bras propionate et un espaceur mercaptobenzoïque [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]⁻ est obtenu avec un rendement de 3% (non optimisé). La caractérisation de celui-ci et ses propriétés relaxométriques sont détaillées dans le paragraphe 4 de ce chapitre. Ce dérivé du DOTA sert de modèle pour des applications *in vivo* et pour la comparaison avec les composés de la littérature. L'espaceur mercaptobenzoïque est choisi pour sa rigidité, une étude réalisée au laboratoire montre que cet espaceur est efficace pour exalter la relaxivité par le greffage de complexe de gadolinium sur des quantum dots.²⁵

3. Synthèse des dérivés de l'ebpatcn

Afin d'accéder au composé ebpatcnNH₂, nous nous sommes dans un premier temps inspirés de la synthèse mise au point au laboratoire de l'ebpatcn, à savoir l'alkylation en utilisant la même sérine activée par un mésylate décrite précédemment, sur la fonction amine secondaire libre du triazacyclononane disubstitué par deux unités picolinate protégées par des groupements esters éthyliques (figure II-12). Cependant, l'encombrement stérique autour de la fonction amine et la labilité du proton en α du bras propionate conduisent à la formation de l'alcène stable correspondant (Cbz- Δ -AlaOBn) et aucune réaction n'est observée sur le cycle.

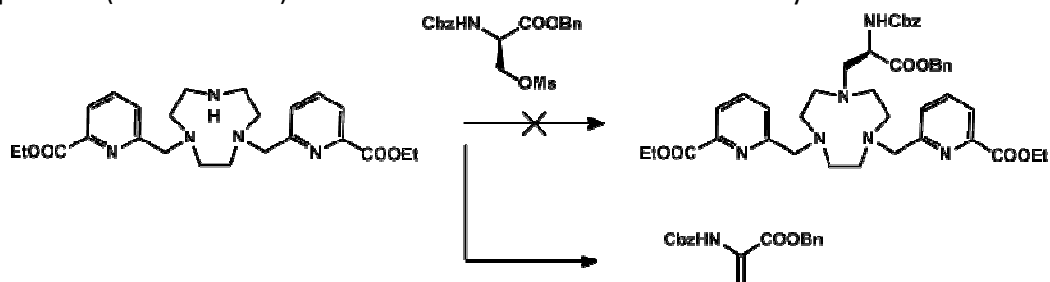


Figure II-12 : Alkylation du triazacyclononane disubstitué

L'alternative est de s'inspirer de la stratégie de synthèse mise en œuvre pour accéder au DO3ApropNH₂ en la transposant au triazacyclononane (figure II-13). Différentes conditions de réaction sont testées (différents ratios de triazacyclononane et de base). Le meilleur rendement est obtenu en utilisant trois équivalents de triazacyclononane mis en réaction avec la sérine sous forme protégée Cbz-Ser-OBn préalablement activée par un groupement mésylate **4** en présence de 4.5 équivalents de carbonate de potassium en tant que base. L'excès de triazacyclononane est éliminé grâce à des lavages à l'eau. L'utilisation d'un excès de triazacyclononane permet d'obtenir le produit monosubstitué **17** de façon majoritaire par rapport au disubstitué avec un rendement brut de l'ordre de 73%.

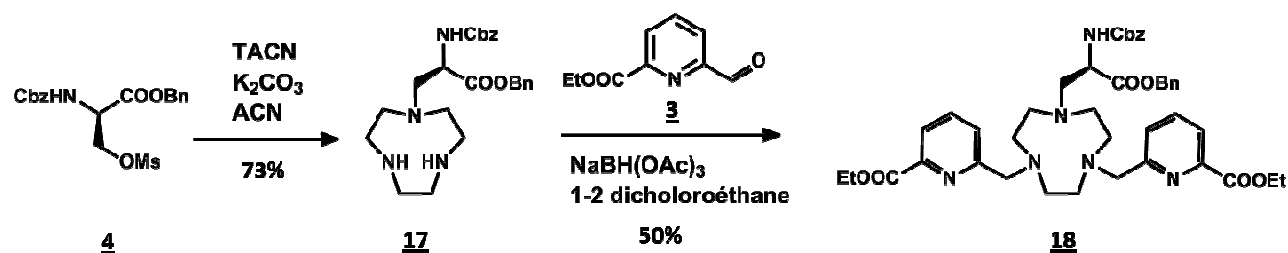


Figure II-13 : Synthèse de l'ebpatcnNH₂ sous forme protégé

Ensuite, les bras picolinate sont introduits par une réaction d'amination réductrice entre les fonctions amines secondaires libres du triazacyclononane et l'aldéhyde **3** en présence d'un agent réducteur, le triacétoxyborohydrure de sodium. Le mécanisme de l'amination réductrice peut se décomposer en deux étapes : d'abord la condensation entre l'amine et l'aldéhyde pour former une imine ou un iminium (dans le cas d'une amine secondaire), puis la réduction de l'imine ou l'iminium par l'hydrure de bore. Le choix du réducteur est crucial dans le cas où plusieurs aminations réductrices impliquant des amines secondaires doivent être effectuées, ce qui est le cas ici. En effet, la formation du second iminium ne peut se faire que si le premier a été réduit. La réduction de l'aldéhyde peut alors entrer en compétition avec la réduction de l'imine. Le triacétoxyborohydrure de sodium est donc idéal pour sa sélectivité en faveur de l'iminium.

Le produit **18**, forme protégé de l'ebpatcnNH₂, est ainsi obtenu en trois étapes avec un rendement de 35% après purification.

Le produit **18** est déprotégé en milieu acide (HCl) pour conduire au ligand désiré. Plusieurs conditions de réaction ont été testées (concentration en acide et température) et chacune conduit à la coupure plus ou moins importante du bras propionate. Les conditions pour laquelle cette coupure est minimisée sont l'utilisation de l'acide chlorhydrique 1M à reflux (figure II-14). Cette réaction est suivie par HPLC analytique. On observe la formation de deux sous-produits, isolés après l'étape de complexation. Le premier, isolé avec un rendement de 30% résulte de la déprotection incomplète de l'ebpatcnNH₂ sur lequel il reste le groupement carboxybenzyle. Ce composé peut être recyclé pour donner le produit désiré avec 30% de rendement. Le second isolé avec un rendement de 20% résulte de la coupure du bras propionate conduisant au produit disubstitué du triazacyclononane. La réaction de déprotection est arrêtée lorsque l'intensité du pic correspondant au produit disubstitué en HPLC analytique est égale à celle du produit désiré.

Comme le ligand DO3ApropNH₂, le ligand ebpatcnNH₂ déprotégé n'est pas très stable et la complexation avec les sels de lanthanides est réalisée directement sur le produit brut après avoir ajusté le pH à 6.5 par addition d'hydroxyde de potassium. Après l'ajout d'1.1 équivalent de chlorure de lanthanide, le pH est maintenu à 7 par ajouts d'hydroxyde de potassium jusqu'à ce que la réaction soit complète. Les complexes de lanthanides obtenus **19** sont purifiés par HPLC préparative. La déprotection comme celle effectuée sur le dérivé protégé du DOTA (H₂/Pd) a conduit à la coupure du bras propionate et donc à la dégradation du produit.

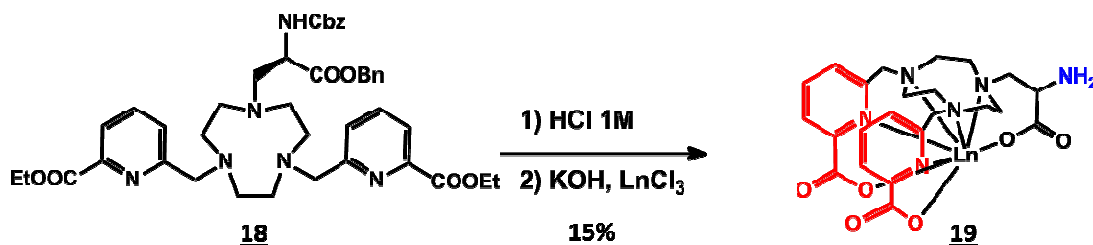


Figure II-14 : Déprotection de l'ebpatcnNH₂ et complexation de Ln = Eu, Gd, Tb, Yb

De cette manière, les complexes [Ln(ebpatcnNH₂)(H₂O)] (Ln=Eu, Gd, Tb, Yb) sont obtenus avec un rendement entre 15 et 20% à partir du produit protégé. La caractérisation des complexes [Ln(ebpatcnNH₂)(H₂O)] et l'étude de ses propriétés sont présentées dans la partie suivante de ce chapitre.

Une fois ces complexes obtenus, ceux-ci sont couplés avec les différents espaceurs choisis pour pouvoir être greffés sur les quantum dots ou les oligonucléotides. Pour effectuer ce couplage peptidique, il est nécessaire d'activer la fonction acide carboxylique des espaceurs. L'activation de tous les espaceurs est réalisée par traitement à l'aide de la N-hydroxysuccinimide (NHS) et en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC). L'activation des acides lipoïque, azidoacétique et 4-mercaptobenzoïque est réalisée avec des rendements respectivement de 99%, de 48%²⁸ et de 40%.²⁹ Il faut noter que dans le cas de l'acide 2-(4-mercaptophényl)acétique, la protection de la fonction thiol selon le schéma décrit dans la figure II-15 est nécessaire pour accéder au produit activé **9** avec un rendement de 38% comparable à celui de la littérature.³⁰

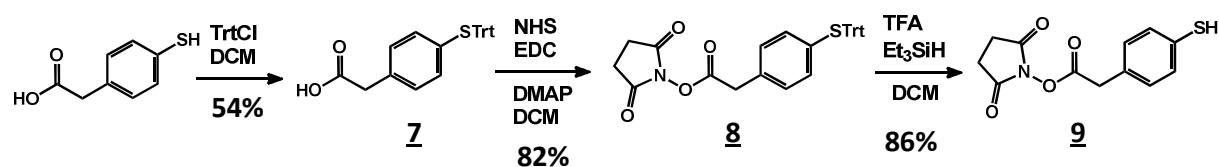


Figure II-15: Schéma réactionnel de l'activation de l'acide mercaptophényl acétique

Une fois les espaceurs activés, la réaction de couplage pour former le lien amide peut être effectuée sur les complexes de lanthanides. Cette réaction est d'abord mise au point sur les complexes de gadolinium, puis les mêmes conditions sont utilisées pour coupler les espaceurs sur les autres complexes de lanthanides. Pour les espaceurs lipoïque, mercaptobenzoïque et azidoacétique, la

réaction de couplage est réalisée dans l'acétonitrile en présence de diisopropyléthylamine. Le couplage du dernier espaceur CH_2SH a été réalisé dans la diméthylformamide dégazée en présence de diisopropyléthylamine et de l'agent réducteur tris(2-carboxyéthyl)phosphine. L'agent réducteur sert à minimiser la formation de dimère qui dans ce cas, empêche la formation du produit désiré, probablement dû à l'encombrement stérique.

Le rendement de la réaction de couplage avec l'acide lipoïque activé est de 25% pour le complexe de gadolinium et d'environ 15% pour les autres complexes (Eu, Tb, Yb) car le lot de produit protégé utilisé était moins pur. Le rendement de cette réaction n'est pas optimal car celle-ci est stoppée lorsque nous voyons l'apparition de sous-produits de réaction par HPLC analytique alors qu'il reste encore du complexe de lanthanide de départ ($\approx 60\%$).

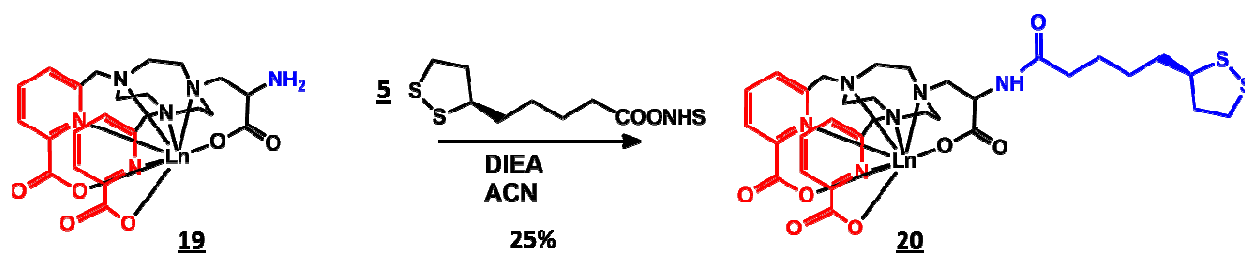


Figure II-16 : Couplage de l'acide lipoïque activé sur les complexes de $[\text{Ln}(\text{ebpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})]$ Ln = Eu, Gd, Tb, Yb

De la même manière, les produits finaux $[\text{Ln}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$ et $[\text{Ln}(\text{ebpatcnCH}_2\text{SH})(\text{H}_2\text{O})]$ sont obtenus avec un faible rendement, de seulement 5% pour les trois complexes de lanthanides. De nombreux sous-produits sont formés au cours de la réaction, mais les produits **21** et **22** ont pu être isolés en quantité suffisante.

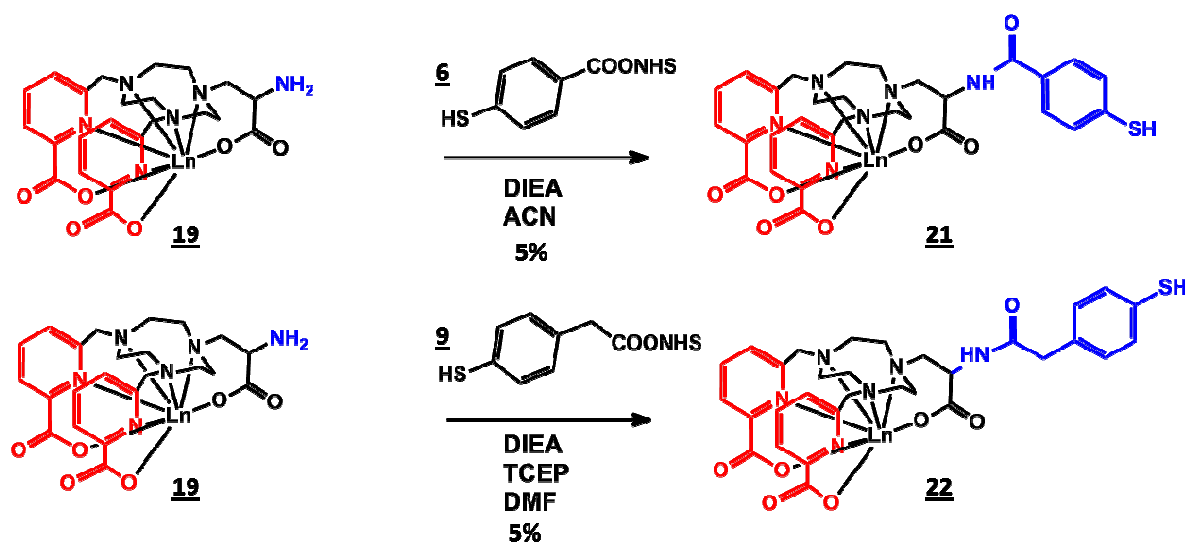


Figure II-17 : Couplage des espaceurs mercaptophényles sur $[\text{Ln}(\text{ebpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})]$ Ln = Eu, Gd, Tb

Le dernier espaceur **10**, comportant un bras azoture pour le greffage sur des oligonucléotides est couplé sur les complexes de lanthanides (figure II-18). Le complexe de gadolinium est obtenu avec un rendement de 36% alors que le rendement de la réaction avec le complexe d'euporium est seulement de 15%, car comme pour l'espaceur lipophile, le lot de produit protégé sur lequel est effectué la déprotection était moins pur. Les deux complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ sont isolés en quantités suffisantes pour la caractérisation et le greffage sur l'ADN.

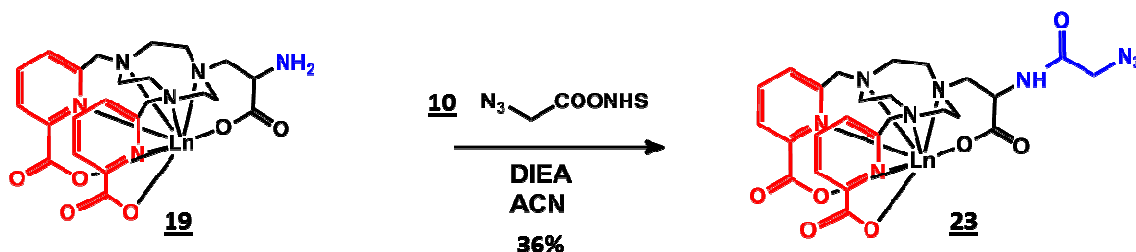


Figure II-18 : Couplage de l'espaceur azoture sur $[\text{Ln}(\text{ebpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})]$ Ln= Eu, Gd

En conclusion de cette partie, la synthèse de l'ensemble des complexes de lanthanides avec les différents espaceurs nous a permis d'accéder aux composés désirés purs en quantité suffisante pour leur caractérisation (spectrométrie de masse et RMN pour les complexes d'euporium) et pour le greffage sur les quantum dots avec les complexes contenant les espaceurs thiols et sur les oligonucléotides avec les complexes portant le bras azoture. Les résultats des greffages de complexes de lanthanides sur les quantum dots sont détaillés dans le chapitre 3 et ceux du greffage sur les oligonucléotides dans le chapitre IV.

Une alternative est envisagée pour améliorer les rendements de cette synthèse en introduisant l'espaceur dès le début de la synthèse sur la sérine de départ comme il a récemment été montré (2014) dans la littérature par les groupes de Toth et Gerald.³¹ Ceci nous permettra peut-être de s'affranchir de la coupure du bras propionate lors de la déprotection et d'avoir des rendements plus élevés. Nous envisageons d'utiliser cette stratégie de synthèse pour synthétiser à nouveau les complexes. Dans le cas des espaceurs portant des groupements thiols, il faudra inclure une étape de protection, qui pourrait être gênant lors des différentes étapes. De cette manière, l'accès au ligand nous permettra de changer facilement de métal si nécessaire.

4. Etude des complexes

a) Caractérisation

Tous les complexes obtenus sont caractérisés par spectrométrie de masse (figure II-20) et par RMN pour les complexes d'euporium (figure II-19). Leur pureté est vérifiée par HPLC analytique.

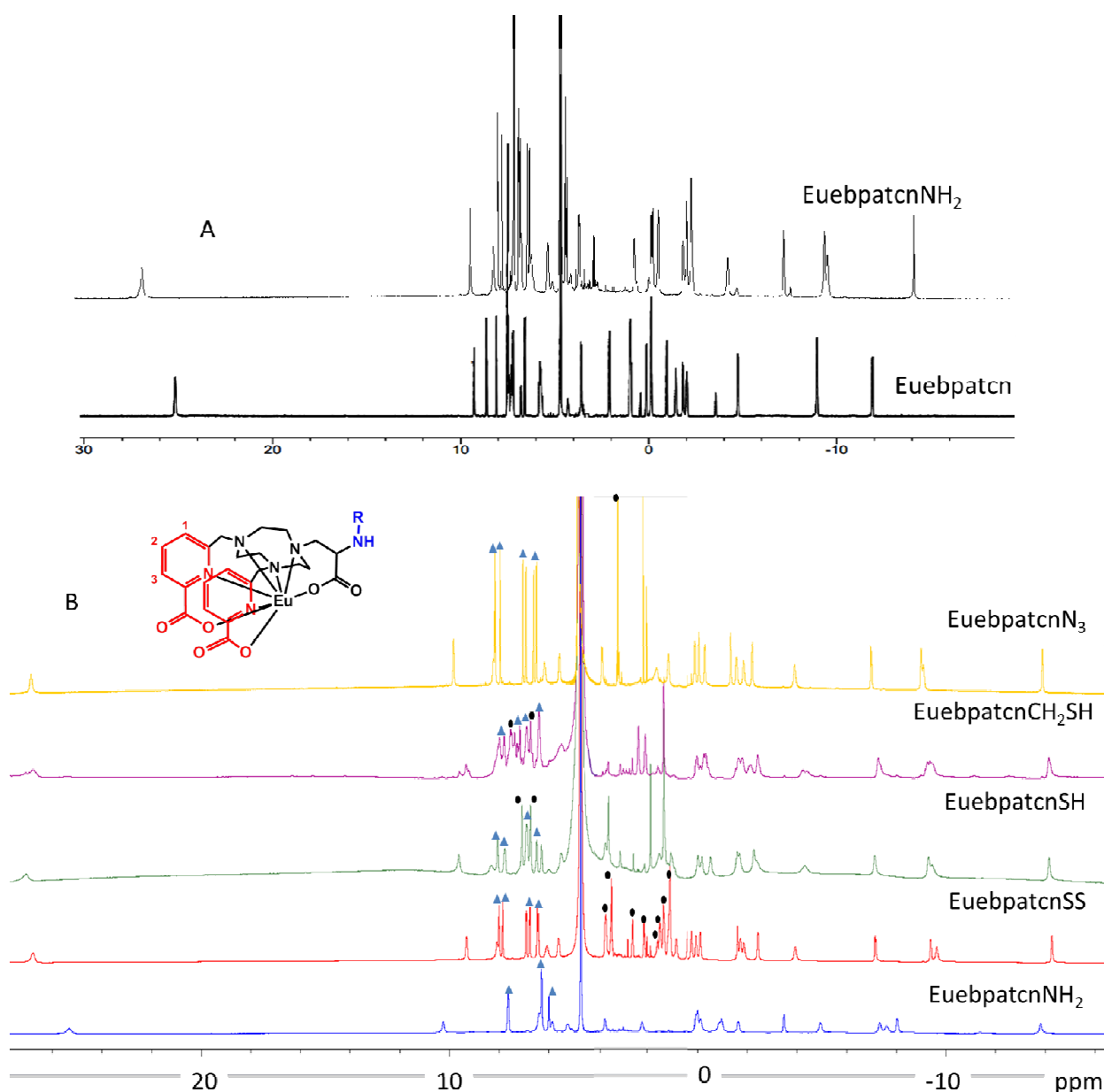


Figure II-19 : Spectre RMN ^1H des complexes d'euporium (D_2O , $\text{pD}=7.4$) à 400 MHz, 70 (A) et 25°C (B)

A 70°C, le spectre RMN ^1H du complexe $[\text{Eu}(\text{eubpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})]$ (D_2O , $\text{pD}=7.4$) possède similairement au spectre du complexe $[\text{Eu}(\text{eubpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ réalisé dans les mêmes conditions (figure II-19A), un ensemble de 25 signaux fins en accord avec la présence d'une espèce rigide de symétrie C_1 en solution. Les spectres RMN des complexes d'euporium avec les différents espaceurs ont également été étudiés à 25°C. L'attribution partielle des signaux a pu être réalisée par comparaison à ceux du spectre du complexe $[\text{Eu}(\text{eubpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ complétés par des expériences 2D. On retrouve les signaux caractéristiques des protons aromatiques de l'unité picolinate (représentés avec des triangles bleus sur la figure II-19-B), des triplets à 7.9 et 8.1 ppm intégrant pour un proton correspondant aux protons H_2 , et quatre doublets à 6.4, 6.5, 6.8 et 6.9 ppm intégrant pour un proton respectivement attribués aux protons H_3 pour les deux premiers et H_1 pour les deux suivants. Les protons

correspondants aux espaceurs peuvent être attribués sur les spectres toujours en comparant avec les signaux de $[\text{Eu}(\text{ebpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ complétés par des expériences 2D et sont représentés par des points noirs sur les spectres. Par exemple, le signal à 3.19 ppm intégrant pour deux protons dans le spectre de $[\text{Eu}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ correspondent aux protons de l'espaceur. De même pour le complexe $[\text{Eu}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$, on observe entre 1 et 4 ppm un ensemble de 8 multiplets intégrant au total pour 13 protons correspondant aux protons de l'espaceur lipoïque. En ce qui concerne les deux autres espaceurs, on retrouve des doublets à 6.82 et 7.16 ppm intégrant pour deux protons pour l'espaceur mercaptobenzoïque du complexe $[\text{Eu}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$ avec une constante de couplage à 7.2 Hz et des multiplets à 6.9 et 7.5 ppm pour le complexe $[\text{Eu}(\text{ebpatcnCH}_2\text{SH})(\text{H}_2\text{O})]$ correspondant aux protons aromatiques de l'espaceur.

Tous les complexes obtenus sont caractérisés par spectrométrie de masse par ionisation electrospray. La figure II-20 montre différents exemples de spectres de masse obtenus avec les massifs isotopiques théoriques et expérimentaux pour chaque métal :

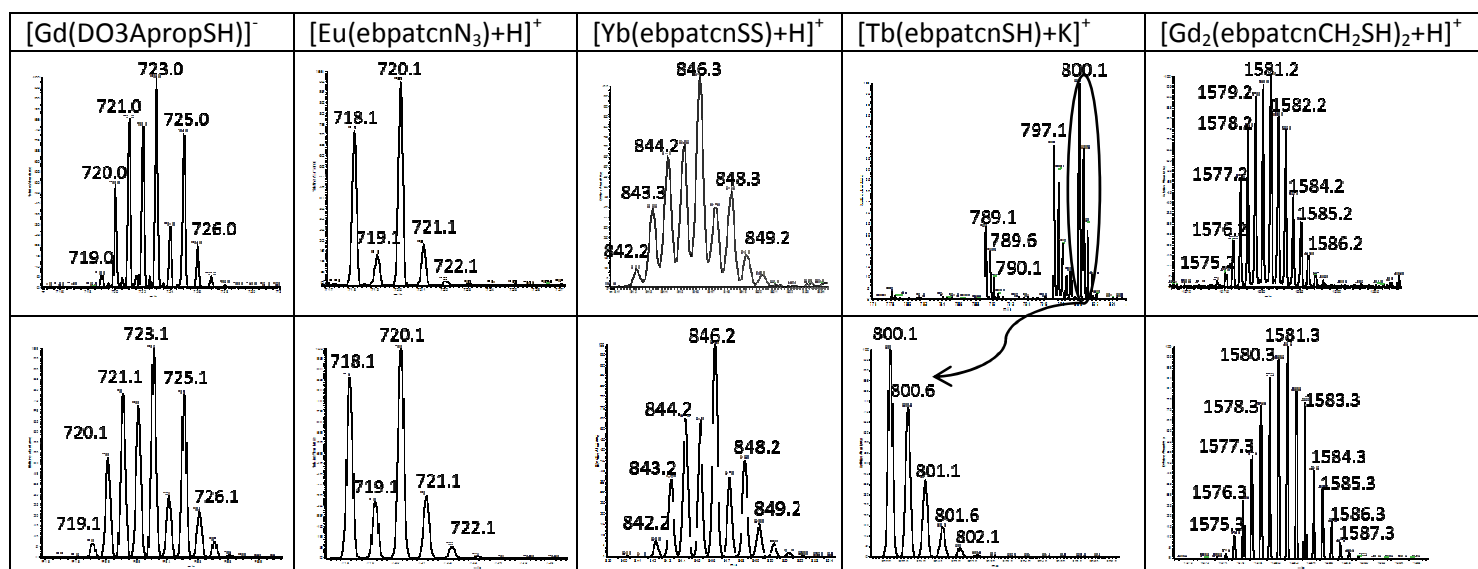


Figure II-20 : Massifs isotopiques expérimentaux (haut) et théoriques (bas) de différents complexes de lanthanides

Pour chaque complexe, les massifs isotopiques des différents adduits obtenus sont identiques à ceux du massif théorique. Pour les complexes possédant des fonctions thiols, les spectres de masse (et de RMN pour les complexes d'euprium) ne permettent pas de déterminer s'ils se trouvent sous forme de dimère où les deux complexes sont liés entre eux par des ponts disulfures. Les analyses de masse haute résolution sont en cours pour chaque composé au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Les parties suivantes présentent les propriétés de relaxivité des complexes de gadolinium et de luminescence des complexes d'euprium, terbium et ytterbium, et ceci pour chaque espaceur.

b) Relaxivité

Les temps de relaxation longitudinale T_1 des protons de l'eau en présence des complexes de gadolinium sont mesurés entre 0.01 et 400 MHz. La concentration des complexes de gadolinium est vérifiée par la méthode de susceptibilité magnétique (voir partie expérimentale) et la relaxivité est calculée en faisant le rapport de la vitesse de relaxation paramagnétique sur la concentration du complexe. Les profils NMRD des complexes $[Gd(ebpatcnNH_2)(H_2O)]$, $[Gd(ebpatcnN_3)(H_2O)]$, $[Gd(ebpatcnSS)(H_2O)]$ et $[Gd(ebpatcnCH_2SH)(H_2O)]$ sont donnés dans la figure II-21.

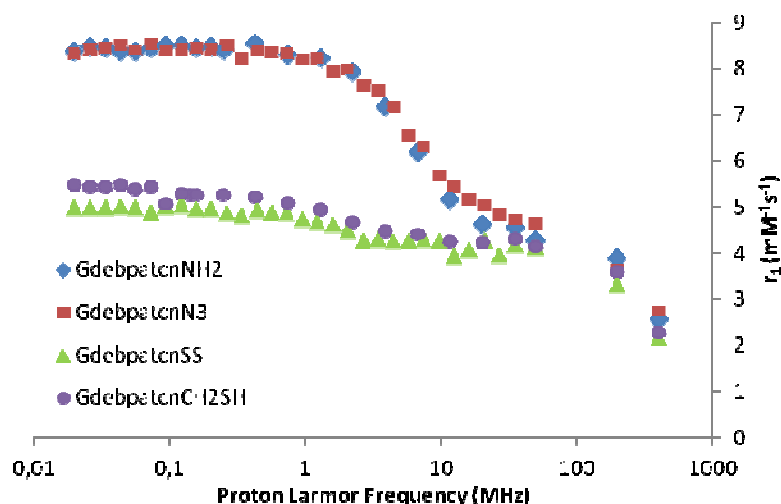


Figure II-21 : Profils NMRD des complexes $[Gd(ebpatcnNH_2)(H_2O)]$ ◆, $[Gd(ebpatcnN_3)(H_2O)]$ ■, $[Gd(ebpatcnSS)(H_2O)]$ ▲ et $[Gd(ebpatcnCH_2SH)(H_2O)]$ ● dans l'eau à 25°C, pH=7.4 et c=2.1 mM

	50 MHz	200 MHz	400 MHz
$Gd(ebpatcnNH_2)$	4,28±0,09	3,89±0,09	2,56±0,08
$Gd(ebpatcnN_3)$	4,64±0,09	3,65±0,08	2,73±0,08
$Gd(ebpatcnSS)$	4,13±0,09	3,32±0,09	2,18±0,08
$Gd(ebpatcnCH_2SH)$	4,13±0,09	3,60±0,09	2,26±0,08

Tableau II-1 : Valeurs de relaxivité en $mM^{-1}s^{-1}$ à différents champs à 25°C, pH=7.4 et c=2.1 mM

Ces profils sont caractéristiques des complexes de gadolinium mono hydratés avec des valeurs de relaxivité aux alentours de $4 \text{ mM}^{-1}s^{-1}$ à 50 MHz et 25°C et qui diminuent à hauts champs. Par comparaison celle du complexe $[Gd(ebpatcn)(H_2O)]$ est de $3.77 \text{ mM}^{-1}s^{-1}$ à 45 MHz et 25°C. Les valeurs de relaxivité (tableau II-1) suggèrent que les groupements amine ou amide ne sont pas impliqués dans la sphère de coordination du métal. Ceci est confirmé par les mesures des temps de vie des quatre complexes d'euporium et terbium contenant les chromophores picolines qui indiquent un nombre de molécules d'eau q proche de 1 pour l'euporium et le terbium (table II-3, partie luminescence (cf partie c), luminescence). La principale caractéristique de ces profils est que la

relaxivité est limitée par la rotation des complexes, particulièrement à hauts champs. Par conséquent, les valeurs de relaxivité à partir de 20 MHz des quatre complexes portant les fonctions amine, azoture, lipoïque et CH₂mercaptophényle sont pratiquement les mêmes, puisque leur poids moléculaire et donc leur temps de corrélation rotationnelle, est similaire (entre 700 et 800 g.mol⁻¹). On peut remarquer que l'allure des profils est différente à bas champs pour ces quatre complexes : on observe des valeurs de relaxivité plus élevées en dessous de 5 MHz pour les complexes [Gd(ebpatcnNH₂)(H₂O)] et [Gd(ebpatcnN₃)(H₂O)]. Ceci pourrait refléter une relaxation électronique plus lente pour ces complexes comparée aux deux autres qui possèdent une dissymétrie plus importante du fait de la taille de l'espaceur. Ceci n'a pas d'influence à haut champ à cause de la dispersion du terme de relaxation électronique.

En revanche, les complexes portant l'espaceur mercaptobenzoïque ont quant à eux un comportement différent avec des valeurs de relaxivité en dessous de 2 mM⁻¹s⁻¹ et un profil d'allure différent décrit dans la figure II-22.

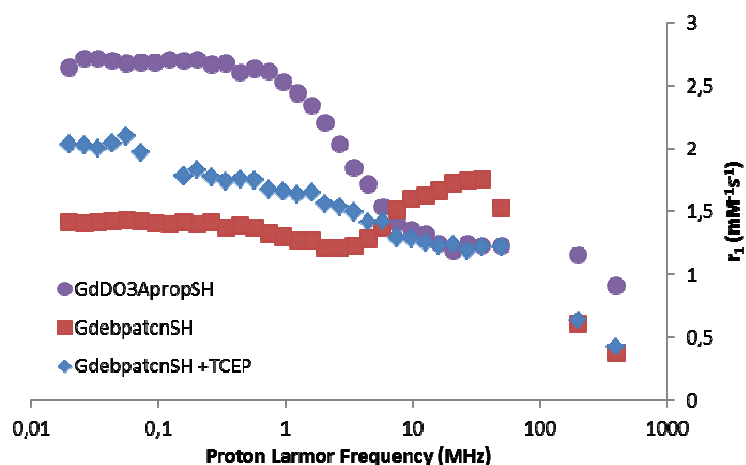


Figure II-22 : Profils NMRD des complexes de gadolinium portant des fonctions thiols dans l'eau, à pH=7.4 et c=2.1 mM (avec TCEP, c=1 mM)

	50 MHz	200 MHz	400 MHz
GdDO3ApropSH	1,22±0,07	1,15±0,07	0,90±0,06
GdebpatcnSH	1,52±0,07	0,61±0,06	0,38±0,06
GdebpatcnSH + TCEP	1,22±0,07	0,63±0,06	0,42±0,06

Tableau II-2 : Relaxivité en mM⁻¹s⁻¹ des complexes de Gd(III) à 25°C, pH=7.4 et c=2.1 mM (avec TCEP, c=1 mM)

On peut noter que les deux complexes portant l'espaceur mercaptobenzoïque, le [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]⁻ et [Gd(ebpatcnSH)(H₂O)] ont une relaxivité qui est plus de deux fois plus faible que les autres complexes. Le profil de ce dernier présente une légère augmentation aux alentours de 20 MHz suggérant une rotation lente du complexe et qui pourrait être la signature de la formation de dimère lié par des ponts disulfures. Ceci est confirmé par la mesure du profil de

relaxivité en présence d'un équivalent d'agent réducteur (TCEP, tris(2-carboxyéthyl)phosphine) où nous observons la disparition de ce maximum local. Les valeurs faibles de relaxivité pour un complexe similaire au $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ont été obtenues dans la littérature et ont été attribuées à l'absence de molécule d'eau dans la sphère interne du gadolinium.³²

La première question à se poser pour expliquer ces valeurs anormales de relaxivité est la présence de la molécule d'eau dans la sphère interne du métal. Les mesures des temps de vie des complexes d'euporium et terbium donnent respectivement un q proche de 1 et de 0.7 pour les complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$. Ceci peut suggérer la présence d'un équilibre entre deux conformations dans lesquelles l'espaceur, qui est très rigide et très proche de la sphère de coordination viendrait prendre partiellement la place de la molécule d'eau. Une étude plus poussée est réalisée pour le complexe $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ en collaboration avec le Pr. Lothar Helm à l'EPFL afin de vérifier la présence d'une molécule d'eau dans la sphère interne de coordination du métal et de déterminer la vitesse d'échange du composé. La méthode employée repose sur la relaxivité transverse de ^{17}O de l'eau en fonction de la température. En suivant les protocoles standards,^{33, 34} la vitesse de relaxation transverse réduite expérimentale $1/T_{2r}$ est calculée à partir des valeurs de $1/T_2$ et $1/T_{2a}$ des vitesses de relaxation transversales de ^{17}O respectivement d'une solution paramagnétique du complexe de gadolinium et d'une solution acide de référence (a) sans complexe. La vitesse de relaxation transversale $1/T_{2r}$ est donnée par l'équation suivante :

$$\text{Equation II-1} : \frac{1}{T_{2r}} = \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2a}} \right) / 1.8 \times 10^{-5} q$$

En dopant la solution de complexe avec 3.2% d'eau enrichie en ^{17}O , le temps de relaxation transversal est mesuré et la valeur de q a été déterminée grâce au déplacement chimique de ^{17}O , celle-ci est proche de 1. Le complexe $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ contient donc une molécule d'eau dans la sphère interne du métal. La vitesse d'échange de la molécule d'eau dans ce composé peut alors être calculée en mesurant le temps de relaxation transversale de ^{17}O en fonction de la température. Les équations suivantes montrent la relation entre la vitesse d'échange et le temps de relaxation transversal de ^{17}O .

Le lien du temps de relaxation transversal de ^{17}O avec le temps de résidence de l'eau τ_m est donné par l'équation 2 due à Swift et Connick :³⁵

$$\text{Equation II-2} : \frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + (\Delta\omega_m)^2}{(\tau_m^{-1} T_{2m}^{-1})^2 + (\Delta\omega_m)^2}$$

Dans cette équation, la différence de déplacement chimique $\Delta\omega_m$ entre l'eau liée et l'eau du milieu environnant varie avec la température selon la loi de Curie :

$$\text{Equation II-3} : \Delta\omega_m = \frac{g_s \mu_B S(S+1) B_0}{3k_B T} \frac{A}{\hbar}$$

où A/\hbar ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) est la constante de couplage scalaire $\text{Gd}-^{17}\text{O}$ et $1/T_{2m}$ la vitesse de relaxation transverse de ^{17}O de l'eau liée en échange avec le milieu définie par l'équation :

$$\text{Equation II-4} : \frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \left(\frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1e}} \right)$$

Avec $1/T_{1e}$ représentant la vitesse de relaxation longitudinale du spin électronique du gadolinium.

La dépendance en température de la vitesse d'échange de l'eau k_{ex} suit la loi d'Arrhenius :

$$\text{Equation II-5 : } k_{ex} \equiv \frac{1}{\tau_m} = k_{ex}^{298} \frac{T}{298.15} \exp \left[\frac{\Delta H^+}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right]$$

où k_{ex}^{298} est la vitesse d'échange à 298.15 K et ΔH^+ est l'enthalpie d'activation du processus d'échange.

A des valeurs de champs $B_0 > 4.7$ T, il est à noter que les effets de la relaxation du spin électronique S sur $1/T_{2m}$ sont simplement pris en compte par la vitesse de relaxation électronique $1/T_{1e}$ donnée par l'équation de McLachlan :

$$\text{Equation II-6 : } \frac{1}{T_{1e}} = \frac{12}{5} \Delta_T^2 \tau_v \left(\frac{1}{1+(\omega_s \tau_v)^2} + \frac{4}{1+4(\omega_s \tau_v)^2} \right)$$

Où Δ_T et τ_v définissent la taille et la fluctuation du temps de corrélation de l'Hamiltonien du "zero-field splitting" transitoire (ZFS) qui résulte des distorsions du complexe sous l'effet des « impacts » avec les molécules d'eau environnantes. Il est communément admis que τ_v a une dépendance exponentielle simple vis-à-vis de l'énergie d'activation E_v qui est souvent fixée à $1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour la plupart des complexes de Gd^{3+} . Il est intéressant de noter que $E_v = 1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ conduit à une variation de τ_v en fonction de la température qui peut être presque réduite à une simple équation :

$$\text{Equation II-7 : } \tau_v = \tau_v^{298} \sqrt{\frac{298.15}{T}}$$

et correspond à la variation avec la température de la fréquence du "bombardement" du complexe par les molécules d'eau, telle qu'elle est donnée par l'inverse de leur vitesse de Maxwell moyenne.³⁶ Nous supposons donc que τ_v suit la loi de Maxwell de l'équation 7 de façon à réduire le nombre de paramètres à modéliser. Enfin, il est nécessaire de souligner que l'Hamiltonien du zero-field splitting statique (ZFS), qui gouverne à la fois la relaxation transversale et longitudinale de S à bas champ, a une influence décroissante sur la relaxivité longitudinale à mesure que le champ augmente.³⁷ Cette simplification justifie la précision de l'équation 6 pour calculer $1/T_{1e}$.

A partir de la théorie exposée ci-dessus, la dépendance en température de τ_m des molécules d'eau coordonnées au gadolinium est déduite de la modélisation des vitesses de relaxations transverses réduites $1/T_{2r}$. L'ensemble des paramètres utilisés pour la modélisation sont donnés dans le tableau II-3.

Paramètre	[Gd(DO3ApropSH)(H ₂ O)] ⁻	[Gd(ebpatcnSS)(H ₂ O)]	[Gd(ebpatcnCH ₂ SH)(H ₂ O)]
$\Delta H^\#$ [kJ.mol ⁻¹]	69.0	82.7	53.2
$\Delta S^\#$ [kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	112	141	72
k_{ex}^{298} [10 ⁶ s ⁻¹]	3.7	0.5	20
E_v [kJ/mol]	1	3	3
t_v^{298} [ps]	31.8	1.01	1.01
Δ^2 [10 ²⁰ s ⁻²]	10.2	1.47	0.12
A/\hbar [10 ⁶ rad/s]	-3.5	-3.5	-3.5
Gd-O [Å]	2.5	2.5	2.5

Tableau II-3: Paramètres utilisés pour la modélisation de la courbe $1/T_{2r} = f(T)$ des complexe [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]⁻, [Gd(ebpatcnSS)(H₂O)] et [Gd(ebpatcnCH₂SH)(H₂O)]

La vitesse d'échange des molécules d'eau du complexe [Gd(ebpatcnSS)(H₂O)] est très faible comparée à celle de [Gd(ebpatcn)(H₂O)] et aux agents de contraste commerciaux. Elle est équivalente à celle du complexe GdDTPA-BMA (0.45x10⁶ s⁻¹), qui possède une des valeurs de vitesse d'échange les plus faibles de la littérature.²³ Cependant, cette faible valeur de vitesse d'échange n'est pas limitante dans le cas de petits complexes, elle ne semble pas affecter les valeurs de relaxivité.

La vitesse d'échange des molécules d'eau de [Gd(ebpatcnCH₂SH)(H₂O)] est inférieure à celle du complexe non fonctionnalisé [Gd(ebpatcn)(H₂O)] (86x10⁶ s⁻¹ à 25 °C). Celle-ci reste quand même une vitesse d'échange rapide comparée aux agents de contraste commerciaux (≈4x10⁶ s⁻¹ à 25°C). La présence de l'espaceur, en interaction avec son environnement semble atténuer légèrement l'encombrement stérique autour de l'ion métallique, diminuant alors la vitesse d'échange des molécules d'eau.

La vitesse d'échange du complexe [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]⁻ a une valeur de 3.7x10⁶ s⁻¹ similaire à celle du [Gd(DOTA)(H₂O)]⁻ (4.2x10⁶ s⁻¹). Cette vitesse d'échange faible n'est pas attendue. En effet, les groupes de Toth et Geraldès ont reporté que la vitesse d'échange du complexe [Gd(DO3ApropNH₂)(H₂O)]⁻ est de 40x10⁶ s⁻¹¹⁸ soit un ordre de grandeur plus élevée que celle du GdDOTA grâce à la présence du bras propionate qui engendre un encombrement stérique autour de la sphère de coordination.

L'entropie d'activation pour ces trois complexes a été calculée à partir de l'équation d'Eyring :

$$\text{Equation II-8 : } k_{ex} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right)$$

Avec :

- k_{ex} la vitesse d'échange à la température T
- k_B la constante de Boltzmann
- h la constante de Planck
- T la température en Kelvin
- ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger respectivement l'entropie et l'enthalpie d'activation
- R la constante des gaz parfaits

Les valeurs positives de l'entropie pour les trois complexes (tableau II-3) suggèrent un mécanisme dissociatif pour l'échange des molécules d'eau. Le mécanisme est identique pour les composés [Gd(ebpatcn)(H₂O)] et [Gd(DO3Aprop)(H₂O)]⁻, qui ont respectivement une entropie d'activation de 15 et 35 kJ.mol⁻¹.K⁻¹.¹⁸ L'accélération de la vitesse d'échange du complexe [Gd(DO3Aprop)(H₂O)]⁻ est attribuée à l'encombrement stérique autour de la sphère de coordination due à la formation d'un cycle à six membre avec le bras propionate. Dans le mécanisme d'échange dissociatif, la compression stérique autour la sphère de coordination facilite le départ de la molécule d'eau, qui est l'étape déterminante, et donc accélère l'échange.

L'espaceur se situant en dehors de la sphère de coordination, il ne devrait pas influencer sur les propriétés de vitesse d'échange. Dans le cas du complexe [Gd(ebpatcnSH)(H₂O)], comme il est très court et très rigide, il pourrait modifier la contrainte stérique autour de la sphère de coordination et venir modifier les mécanismes de vitesse d'échange. La mesure de la vitesse d'échange est en cours lors de la rédaction de ce manuscrit.

Pour comprendre cette diminution de la relaxivité en présence de l'espaceur mercaptobenzoïque la dépendance de la relaxivité en fonction du pH est étudiée (figure II-23).

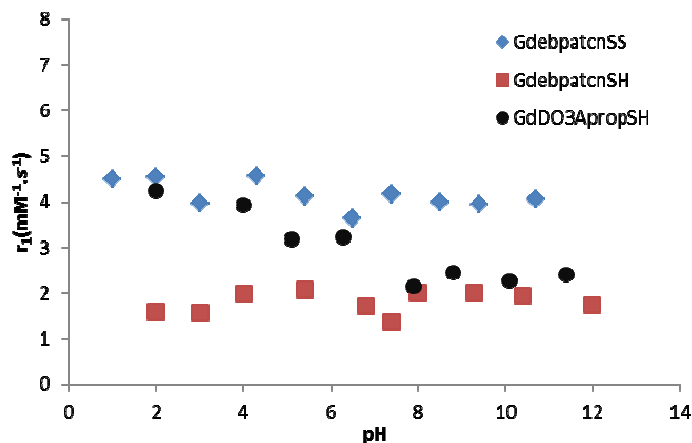


Figure II-23 : Relaxivité en fonction du pH des complexes $[\text{Gd}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{Gd}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$ et $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ à 50 MHz et 25°C

La relaxivité reste constante en fonction du pH pour les complexes dérivés de l'ebpatcn ce qui signifie que la baisse de la relaxivité n'est pas due à un effet de protonation/déprotonation de l'amide en présence du cycle aromatique. Une légère augmentation de la relaxivité en milieu acide pour le complexe $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ pourrait être attribué à la décomplexation d'un ou plusieurs bras carboxylates qui se protonnent en milieu acide. Ceci a déjà été observé dans la littérature sur des complexes de GdDOTA.³⁸

L'origine de ces faibles valeurs de relaxivité et de vitesse d'échange n'est pas comprise pour le moment. Des études supplémentaires doivent être menées sur ces complexes notamment sur sa structure pour comprendre les relations structure-relaxivité qu'il peut y avoir sur ce complexe. Les mesures de luminescence, présentées dans la partie suivante, peuvent également nous donner des indications sur la structure du complexe.

c) Luminescence

Au vu de leur faible coefficient d'absorption molaire, la luminescence des ions lanthanides est difficilement observable après excitation par une source lumineuse classique. Nous avons vu en introduction que le peuplement d'un état excité de l'ion est facilité par la présence d'un ligand organique agissant comme un collecteur d'énergie (effet d'antenne). Plusieurs ligands contenant des motifs picolinate ont été étudiés dans le laboratoire et montrent une sensibilisation efficace de la luminescence de l'euporium et terbium en excitant à 273 nm.^{39,40} Malgré la présence d'une molécule d'eau dans la sphère interne du métal, l'émission des deux ions lanthanides n'est pas totalement "quenchée" : le complexe de terbium $[\text{Tb}(\text{bpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ présente un rendement quantique de 43% dans l'eau.

En théorie, nous avons vu que les espaceurs ne sont pas impliqués dans la sphère de coordination du complexe et ne devraient pas modifier les propriétés optiques des complexes. Les spectres

d'excitation mesurés aux longueurs d'onde d'émission de l'euprium et du terbium ne montrent pas de changements significatifs. Ils présentent tous une bande d'absorption entre 260 et 290 nm avec un maximum à 273 nm caractéristique du transfert par effet d'antenne du picolinate. Un exemple de spectre d'excitation est présenté dans la figure II-24. La présence de groupements aromatiques ou de l'azoture sur les espaceurs ne modifie pas les propriétés d'absorption.

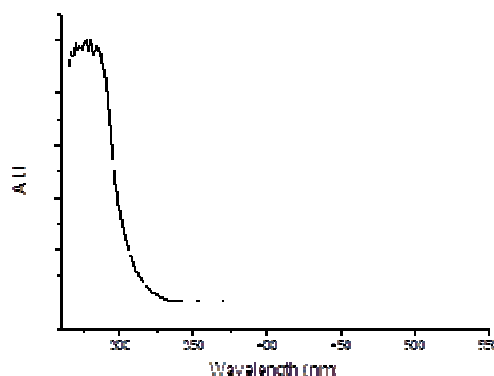


Figure II-24 : Spectre d'excitation du complexe $[Tb(ebpatcnNH_2)(H_2O)]$ ($\lambda_{an}=545$ nm)

Les spectres d'émission des complexes après excitation sur le ligand picolinate à 273 nm sont présentés dans la figure II-25.

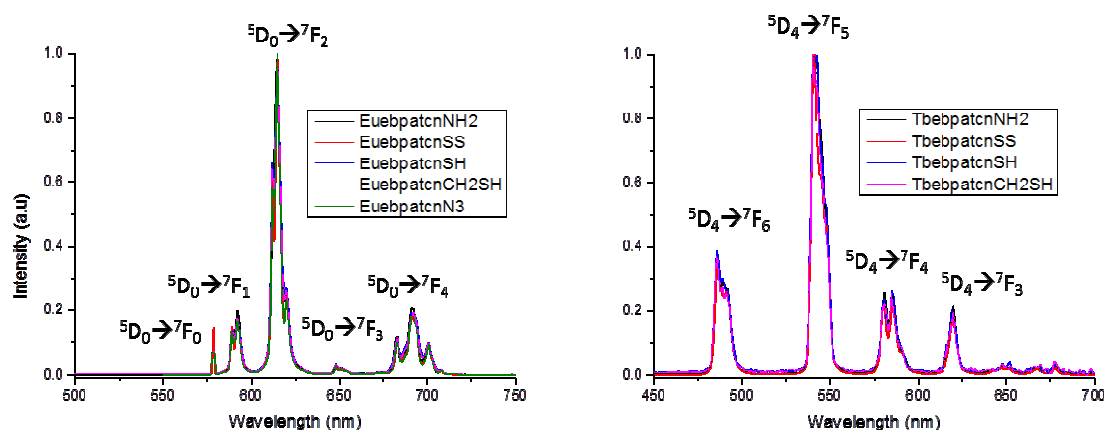


Figure II-25 : Spectres d'émission des complexes d'euprium et terbium ($\lambda_{exc}=273$ nm)

Afin de comparer l'influence des différents espaceurs, les spectres d'émission des complexes d'euprium et de terbium sont normalisés. Quel que soit l'espaceur présent sur les complexes, les spectres d'émission du terbium et de l'euprium se recouvrent parfaitement. Les spectres d'émission normalisés de l'euprium donnent plus d'informations sur la géométrie des complexes comme nous l'avons vu en introduction, ce métal est plus affecté par le champ du ligand. Sur la figure II-25, nous pouvons remarquer que les maxima de chaque transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_n$ avec n allant de 0 à 4 et l'éclatement entre les niveaux sont équivalents pour chaque complexe. De plus, l'intégration relative de chaque pic d'émission est la même quel que soit l'espaceur. Ces données indiquent que la

configuration autour de l'ion europium est identique pour tous les complexes et que la sphère de coordination reste inchangée en présence des différents espaceurs.

Afin d'étudier l'influence plus précise des différents espaceurs sur l'efficacité de la luminescence des complexes, le rendement quantique, les temps de vie de luminescence dans l'eau H₂O et D₂O et le nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination sont déterminés. Tous les résultats sont regroupés dans le tableau II-4.

	EuebpatcnNH₂	EuebpatcnSS	EuebpatcnSH	EuebpatcnCH₂SH	EuebpatcnN₃
τ (H ₂ O) (ms)	0,53±0,01	0,49±0,02	0,47±0,02	0,48±0,01	0,56±0,01
τ (D ₂ O) (ms)	1,45±0,02	1,17±0,02	1,13±0,02	1,05±0,02	1,45±0,02
q	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1
ϕ (H ₂ O) (%)	8,0±0,5	9,8±0,5	0,74±0,01	9,4±0,5	8,6±0,5
ϕ (D ₂ O) (%)	20±1	22±1	2,7±0,1	23±1	24±1

	TbebpatcnNH₂	TbebpatcnSS	TbebpatcnSH	TbebpatcnCH₂SH
τ (H ₂ O) (ms)	1,55±0,02	0,92±0,02	1,16±0,02	0,89±0,01
τ (D ₂ O) (ms)	2,57±0,02	1,21±0,02	1,52±0,02	1,17±0,02
q	1,0±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1
ϕ (H ₂ O) (%)	25±1	19±1	13±1	19±1
ϕ (D ₂ O) (%)	45±2	40±2	25±1	38±2

Tableau II-4 : Propriétés de luminescence des complexes d'Eu(III) et de Tb(III) dans l'eau légère et l'eau lourde

Le nombre de molécules d'eau est calculé en utilisant les équations suivantes issues de la littérature :⁴¹

$q = 1.2 (k_{H_2O} - k_{D_2O} - 0.25)$ pour les complexes d'europium

$q = 5 (k_{H_2O} - k_{D_2O} - 0.06)$ pour les complexes de terbium

D'une manière générale, des rendements quantiques attendus sont observés dans l'eau : d'environ 20% pour les complexes de terbium et d'environ 9% pour les complexes d'europium, montrant que les espaceurs n'ont pas d'influence sur les propriétés de luminescence des complexes. Ceci n'est pas le cas pour les complexes d'europium et terbium portant l'espaceur mercaptobenzoïque, qui ont des rendements quantiques plus faibles que ceux des autres complexes. Les rendements quantiques des complexes sont meilleurs pour le terbium que pour l'europium en accord avec une bonne adéquation des niveaux énergétiques du picolinate avec le premier niveau accepteur du terbium.

L'augmentation du rendement quantique dans l'eau deutérée est significative de la suppression des désexcitations non radiatives : plus le complexe est sujet aux désexcitations non radiatives et plus l'augmentation par rapport au rendement quantique de l'eau légère est importante. De manière générale, les complexes d'euporium sont plus sensibles que les complexes de terbium, comme il a été vu en introduction. Le rendement quantique des deux complexes d'ytterbium $[\text{Yb}(\text{ebpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})]$ et $[\text{Yb}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$ n'a pas pu être calculé à cause de la faible émission de l'ytterbium. En effet, le picolinate n'est pas un bon sensibilisateur des lanthanides émettant dans l'infrarouge. De plus, l'ion Yb(III) est très sensible à la présence d'une molécule d'eau dans la sphère de coordination. L'étude des propriétés optiques des complexes d'ytterbium est nécessaire pour pouvoir effectuer la comparaison une fois que le complexe $[\text{Yb}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$ sera greffé sur les quantum dots.

Les résultats montrent que les espaceurs n'ont globalement pas d'influence sur les propriétés de luminescence des complexes d'euporium et de terbium : les rendements quantiques sont similaires à ceux obtenus pour des complexes mono hydratés contenant les mêmes chromophores. De plus les temps de vie des complexes sont du même ordre de grandeur, ce qui confirme ce fait. Les mesures de temps de vie dans l'eau H_2O et D_2O confirment la présence d'une molécule d'eau dans la sphère interne du métal quel que soit l'espaceur. Les temps de vie des complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})]$ ($\text{Ln}=\text{Eu}, \text{Tb}$) et $[\text{Eu}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ sont légèrement supérieurs par rapport aux autres complexes. Ceci pourrait suggérer une rigidité plus importante au sein de ces trois complexes et une influence moindre des vibrations du ligand.

On peut noter que les rendements quantiques obtenus pour les complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$ sont beaucoup plus faibles, que ce soit dans l'eau lourde ou dans l'eau légère. Cependant cette diminution n'est pas accompagnée d'une décroissance de temps de vie de l'émission. Ces propriétés de luminescence ajoutées aux propriétés relaxométriques du complexe de gadolinium font de ce complexe une énigme à part entière. Une des voies pour tenter de comprendre ceci serait d'étudier précisément la structure de ce complexe en solution ou bien obtenir la structure à l'état solide.

5. Conclusion

Les complexes de lanthanides dérivés de l'ebpatcn avec différents espaceurs sont synthétisés en quantité suffisante pour être caractérisés et greffés sur des quantum dots ou des oligonucléotides. Même si cette synthèse n'est pas optimisée, notamment les deux dernières étapes, elle nous permet à partir du même intermédiaire d'introduire différents espaceurs. Une nouvelle voie de synthèse est envisagée pour optimiser les rendements de synthèse, en ajoutant l'espaceur sur la sérine de départ.

Globalement, les espaceurs n'ont pas d'influence sur les propriétés relaxométriques et photophysiques, sauf en ce qui concerne les complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$ ($\text{Ln}=\text{Eu}, \text{Gd}, \text{Tb}$) et $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]$. En effet, on observe des faibles valeurs de relaxivité pour les complexes de gadolinium et une diminution des rendements quantiques pour les deux complexes luminescents. Un moyen de tenter de comprendre ces phénomènes serait de d'évaluer leur structure en solution afin de déterminer l'effet de cet espaceur rigide sur la sphère de coordination.

6. Références

1. A. Vaidya, Y. Sun, T. Ke, E.-K. Jeong and Z.-R. Lu, *Magnetic Resonance in Medicine*, 2006, **56**, 761-767.
2. F. Ye, T. Ke, E.-K. Jeong, X. Wang, Y. Sun, M. Johnson and Z.-R. Lu, *Molecular Pharmaceutics*, 2006, **3**, 507-515.
3. L. M. De León-Rodríguez, Z. Kovacs, G. R. Dieckmann and A. D. Sherry, *Chemistry – A European Journal*, 2004, **10**, 1149-1155.
4. I. Rehor, V. Kubicek, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukes, J. Szakova, L. Vander Elst, R. N. Muller and J. A. Peters, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 1494-1500.
5. D. Thonon, V. Jacques and J. F. Desreux, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2007, **2**, 24-34.
6. R. Xu, Y. Wang, X. Wang, E.-K. Jeong, D. L. Parker and Z.-R. Lu, *Experimental Biology and Medicine*, 2007, **232**, 1081-1089.
7. S. Aime, M. Botta, E. Garino, S. Geninatti Crich, G. Giovenzana, R. Pagliarin, G. Palmisano and M. Sisti, *Chemistry – A European Journal*, 2000, **6**, 2609-2617.
8. É. Tóth, D. Pubanz, S. Vauthey, L. Helm and A. E. Merbach, *Chemistry – A European Journal*, 1996, **2**, 1607-1615.
9. L. S. Karfeld, S. R. Bull, N. E. Davis, T. J. Meade and A. E. Barron, *Bioconjugate Chemistry*, 2007, **18**, 1697-1700.
10. L. M. Manus, D. J. Mastarone, E. A. Waters, X.-Q. Zhang, E. A. Schultz-Sikma, K. W. MacRenaris, D. Ho and T. J. Meade, *Nano Letters*, 2010, **10**, 484-489.
11. E. Delgado-Pinar, J. C. Frias, L. J. Jimenez-Borreguero, M. T. Albelda, J. Alarcon and E. Garcia-Espana, *Chemical Communications*, 2007, 3392-3394.
12. R. C. Strauch, D. J. Mastarone, P. A. Sukerkar, Y. Song, J. J. Ipsaro and T. J. Meade, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**, 16346-16349.
13. C. Vanasschen, N. Bouslimani, D. Thonon and J. F. Desreux, *Inorganic Chemistry*, 2011, **50**, 8946-8958.
14. J. P. André, H. R. Maecke, É. Tóth and A. A. Merbach, *JBIC*, 1999, **4**, 341-347.
15. J. Henig, É. Tóth, J. Engelmann, S. Gottschalk and H. A. Mayer, *Inorganic Chemistry*, 2010, **49**, 6124-6138.
16. S. Laus, R. Ruloff, E. Toth and A. E. Merbach, *Chemistry-a European Journal*, 2003, **9**, 3555-3566.
17. Z. Jaszberenyi, A. Sour, E. Toth, M. Benmelouka and A. E. Merbach, *Dalton Transactions*, 2005, 2713-2719.
18. M. F. Ferreira, A. F. Martins, J. A. Martins, P. M. Ferreira, E. Toth and C. Geraldes, *Chemical Communications*, 2009, 6475-6477.
19. Brevet n° WO2010/114308 A1.
20. E. Boros, M. Polasek, Z. Zhang and P. Caravan, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 19858-19868.
21. A. Mishra, J. Pfeuffer, R. Mishra, J. Engelmann, A. K. Mishra, K. Ugurbil and N. K. Logothetis, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **17**, 773-780.
22. A. Nonat, M. Giraud, C. Gateau, P. H. Fries, L. Helm and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2009, 8033-8046.
23. P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1999, **99**, 2293-2352.
24. W. P. Cacheris, S. K. Nickle and A. D. Sherry, *Inorganic Chemistry*, 1987, **26**, 958-960.
25. G. J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Gateau, P. Reiss, P. Fries and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2013, **42**, 8197-8200.

26. P. L. Anelli, M. Murru, F. Uggeri and M. Virtuani, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1991, 1317-1318.
27. D. Shetty, J. M. Jeong, C. H. Ju, Y. J. Kim, J. Y. Lee, Y. S. Lee, D. S. Lee, J. K. Chung and M. C. Lee, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 7338-7347.
28. H. Wang, J. Zhuang and S. Thayumanavan, *ACS Macro Letters*, 2013, **2**, 948-951.
29. A. Shibata, T. Uzawa, Y. Nakashima, M. Ito, Y. Nakano, S. Shuto, Y. Ito and H. Abe, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 14172-14178.
30. J. Bartels, P. Lu, K. Maurer, A. V. Walker and K. D. Moeller, *Langmuir*, 2011, **27**, 11199-11205.
31. M. F. Ferreira, G. Pereira, A. F. Martins, C. I. O. Martins, M. I. M. Prata, S. Petoud, E. Toth, P. M. T. Ferreira, J. A. Martins and C. F. G. C. Geraldes, *Dalton Transactions*, 2014, **43**, 3162-3173.
32. E. Boros, S. Karimi, N. Kenton, L. Helm and P. Caravan, *Inorganic Chemistry*, 2014, **53**, 6985-6994.
33. D. H. Powell, O. M. N. Dhubhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer and A. E. Merbach, *Journal of the American Chemical Society*, 1996, **118**, 9333-9346.
34. T. E. Merbach A.E, Wiley, New York, 2001.
35. T. J. Swift and R. E. Connick, *J. Chem. Phys.*, 1962, **37**, 307-320.
36. P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1992.
37. C. S. Bonnet, P. H. Fries, S. Crouzy and P. Delangle, *The Journal of Physical Chemistry*, 2010, **114**, 8770-8781.
38. X. Zhang, C. A. Chang, H. G. Brittain, J. M. Garrison, J. Telsner and M. F. Tweedle, *Inorganic Chemistry*, 1992, **31**, 5597-5600.
39. A. Nonat, C. Gateau, P. H. Fries and M. Mazzanti, *Chemistry-a European Journal*, 2006, **12**, 7133-7150.
40. G. Nocton, A. Nonat, C. Gateau and M. Mazzanti, *Helvetica Chimica Acta*, 2009, **92**, 2257-2273.
41. A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams and M. Woods, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1999, 493-503.

Greffage de complexes de lanthanides sur les quantum dots

1. Introduction	89
a) Sondes bimodales IRM/Optique	89
b) Transferts d'énergie	96
c) Travaux antécédents conduits au laboratoire.....	98
d) Choix des complexes et des quantum dots.....	99
2. Synthèse et caractérisation d'architectures nanométriques multimodales basées sur les quantum dots	100
a) Greffage des complexes de gadolinium sur les quantum dots	100
b) Caractérisation des quantum dots	101
3. Etude de la relaxivité	105
4. Etude de la luminescence des complexes de lanthanides greffés	108
5. Conclusion	116
6. Références	117

Greffage de complexes de lanthanides sur les quantum dots

1. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude du greffage de complexes de lanthanides sur les quantum dots (QD). D'une part le greffage des complexes de gadolinium permet d'obtenir une sonde bimodale IRM/optique avec des propriétés de relaxivité améliorées. D'autre part le greffage de complexes de lanthanides luminescents sur les QD (Eu(III), Tb(III), Yb(III)) permet d'étudier les transferts d'énergie qu'il peut y avoir entre les deux entités luminescentes. Les parties suivantes présentent des exemples montrant l'intérêt des sondes bimodales et des composés capables de tels transferts d'énergie.

a) Sondes bimodales IRM/Optique

Les diagnostics cliniques et les recherches biomédicales disposent d'un panel de techniques d'imagerie telles que l'imagerie optique (la microscopie confocale ou la microscopie deux photons), l'imagerie magnétique (IRM), l'imagerie nucléaire (la tomographie par émission de positons PET, ou d'émission monophotonique SPECT), l'échographie, les rayons X et le scanner. Chacune de ces modalités possède ses avantages et inconvénients. Elles possèdent des sensibilités et des résolutions spatio-temporelles qui leur sont propres. Elles confèrent donc des informations complémentaires. Par exemple, l'IRM a une excellente résolution mais une faible sensibilité et l'utilisation d'un agent de contraste à une concentration de l'ordre du millimolaire est nécessaire pour avoir une détection efficace. Les traceurs radioactifs et les sondes pour l'imagerie optique sont beaucoup plus sensibles et peuvent être détectés à de plus faibles concentrations (picomolaire et nanomolaire pour des agents PET et optique respectivement) mais ont une faible résolution.

Pour combiner les avantages de l'IRM avec ceux d'autres techniques d'imagerie, les agents multimodaux ont rencontré un intérêt croissant ces dernières années. De tels agents peuvent être obtenus en intégrant dans une seule entité chimique un agent de contraste pour l'IRM et un marqueur correspondant à une autre technique assurant ainsi la colocalisation des informations acquises par les deux techniques et par conséquent une meilleure précision pour l'imagerie moléculaire.¹ L'IRM et l'imagerie optique combinent une haute résolution et une bonne pénétration dans les tissus des agents de contraste en préservant la très bonne sensibilité de l'imagerie optique. Plusieurs systèmes sont exploités dans la littérature pour coupler un agent de contraste pour l'IRM avec une sonde pour l'imagerie optique (figure III-1). Dans les exemples qui suivent, nous nous focaliserons uniquement sur l'association de complexes de gadolinium avec des sondes optiques qui peuvent être des fluorophores organiques ou inorganiques.

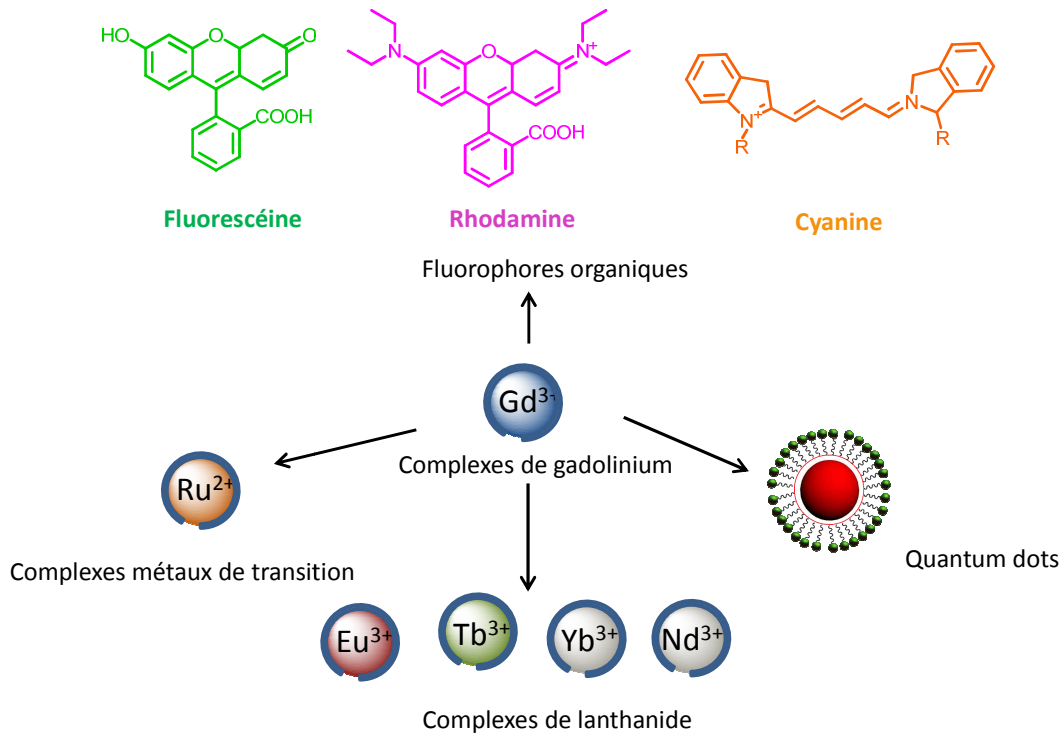


Figure III-1 : Architectures utilisés dans la conception de sondes bimodales IRM/Optique

- Fluorophores organiques

La majorité des sondes bimodales IRM/optique décrites dans la littérature associent des complexes de GdDOTA ou de GdDTPA à des fluorophores organiques. Le premier exemple d'agent de contraste bimodal associe le GdDOTA à la rhodamine (figure III-2) pour suivre des lignées cellulaires au niveau embryonnaire.²

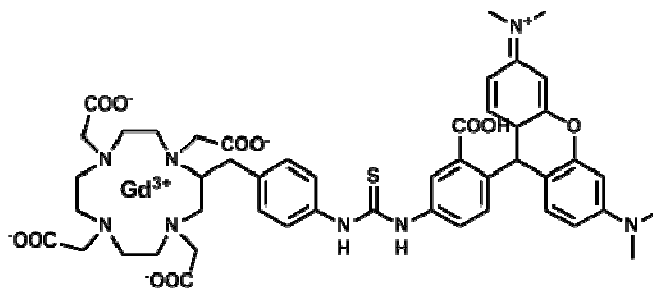


Figure III-2 : Gd(Rhoda-DOTA)²

La fluorescéine fait partie des fluorophores les plus utilisés pour la conception de sondes bimodales IRM/optique. Elle a notamment été incorporée dans des liposomes en présence de GdDTPA.³ Cette incorporation permet de ralentir le temps de corrélation rotationnelle des complexes paramagnétiques et d'atteindre une relaxivité par gadolinium de $18 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C.

Certains fluorophores jouent également le rôle d'agents ciblant. C'est le cas de la curcumine qui permet le ciblage des plaques β -amyloïdes présentes dans les cas de maladie d'Alzheimer. Celle-ci est couplée au complexe GdDTPA (figure III-3) pour obtenir une sonde bimodale dont la relaxivité augmente de 10% en présence de 2 équivalents d'agrégats β -amyloïdes.⁴ De plus, lors de son interaction avec les plaques β -amyloïdes, une augmentation de 43% de la fluorescence de la curcumine est observée.

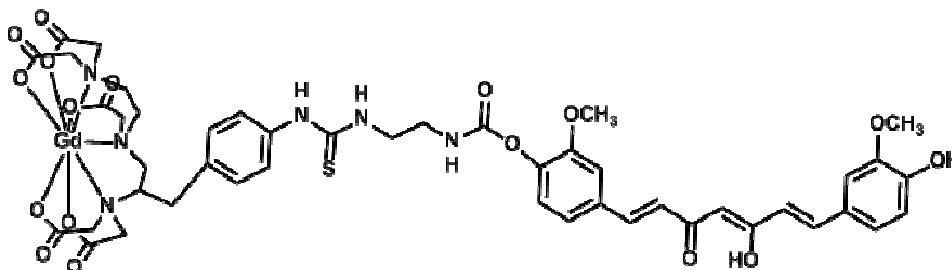


Figure III-3 : Dérivé du GdDTPA couplé avec la curcumine pour le ciblage des plaques β -amyloïdes⁴

- Métaux de transition

Le design d'agents bimodaux ne se limite pas à l'utilisation de chromophores organiques, les fluorophores inorganiques peuvent également servir de sondes pour l'imagerie optique. La structure chimique de tels agents contient deux sites de chélation, un capable d'accepter un ion Gd(III) et l'autre un ion métallique luminescent. Parmi les exemples de la littérature, on distingue dans un premier temps les complexes bimétalliques tels que celui de l'association d'un complexe de rhénium avec un complexe de gadolinium (figure III-4).⁵ Le remplacement d'un bras acétate du GdDOTA par une pyridine permet la coordination du rhénium dans le complexe $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})$. Le complexe obtenu (figure III-4) émet autour de 600 nm et possède une relaxivité de $8.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 500 MHz due à la présence de deux molécules d'eau coordonnées dans la sphère interne du gadolinium.

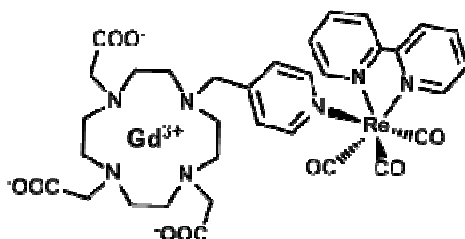


Figure III-4 : Complexe bimétallique Gd/Re

On distingue également les métallostars qui permettent de rassembler plusieurs unités paramagnétiques autour d'un métal.⁶ Par exemple, l'assemblage de trois complexes GdDTPA fonctionnalisés par une phénantroline autour d'un ion ruthénium conduit à une sonde bimodal possédant une émission centrée autour de 610 nm et une relaxivité par métallostar de $36 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz, soit 9 fois supérieure à celle des agents de contraste commerciaux.⁷

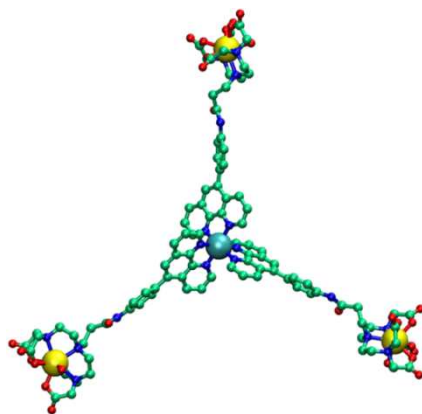


Figure III-5 : Modèle moléculaire du métallostar Gd_3Ru_7

- Complexes de lanthanides

Les complexes de lanthanides sont particulièrement adaptés pour la conception de sondes bimodales grâce aux propriétés magnétiques du gadolinium et aux propriétés optiques de l'euprimum et du terbium émettant dans le visible et du néodyme et ytterbium émettant dans le proche infrarouge. Cependant, le design d'une seule et même architecture moléculaire adaptée aux deux modalités est difficile à réaliser. En effet, comme il a été vu en introduction, une molécule d'eau au minimum est nécessaire dans la sphère de coordination du gadolinium pour avoir un contraste efficace. Mais la présence de ces molécules d'eau autour des ions lanthanides luminescents entraîne une diminution (ou "quenching") de la luminescence. Certains ligands basés sur la pyridine-DTPA,^{8,9} pyridine-DOTA^{10,11} ou sur des hydroxyquinoléines¹² (figure III-6) ont pu satisfaire à la fois les exigences de l'IRM et de l'imagerie optique.

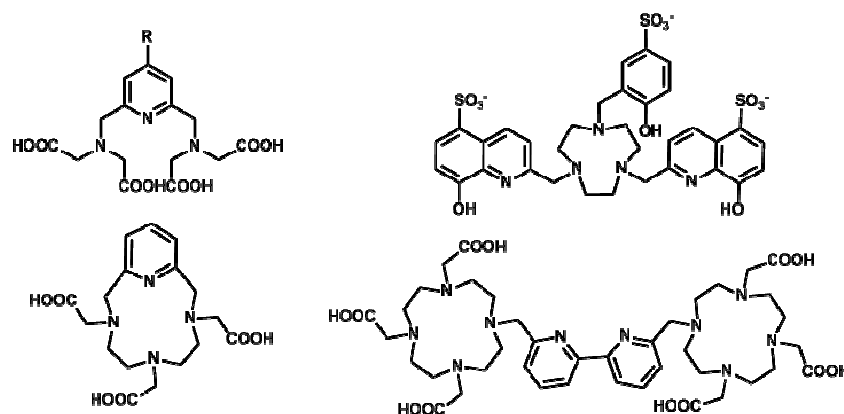


Figure III-6 : Ligands bimodaux

Un moyen pour contourner ces exigences est de concevoir des architectures possédant des sites de coordination distincts pouvant accueillir différents lanthanides. Un exemple est l'introduction d'un second site de coordination sur un complexe de Gd(III) pour accueillir et sensibiliser un lanthanide luminescent (figure III-7).¹³

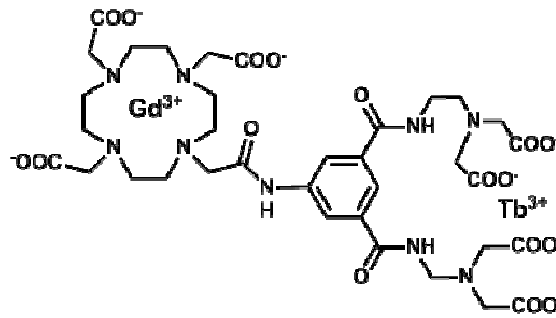


Figure III-7 : Sonde bimodale Gd/Tb

Des complexes de lanthanides peuvent également être encapsulés dans des nanoobjets tels que des liposomes afin d'obtenir une sonde bimodale avec des propriétés relaxométriques améliorées par le ralentissement du temps de corrélation rotationnelle, comme il a été vu en introduction. Ce type de nanoobjet sert de support pour réunir un agent de contraste et un agent luminescent au sein d'une même entité. Par ailleurs ils permettent aussi de concentrer un grand nombre d'entités paramagnétiques et luminescentes à un point donné.

Un tel exemple est décrit par le groupe de Toth et Petoud dans lequel le liposome est formé par une unité basée sur la pyridine-DTPA fonctionnalisée par une chaîne alkyle (figure III-8).¹⁴ La pyridine-DTPA est utilisée comme unité chélatrice du gadolinium et du néodyme, dont la sensibilisation est assurée par effet d'antenne et excitation de l'antracène. Une apolipoprotéine est également incorporée pour conférer des propriétés de ciblage envers des cellules cancéreuses. En plus de leurs propriétés bimodale et de ciblage, ce système possède une relaxivité pouvant atteindre $44 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C, grâce à la présence de deux molécules d'eau dans la sphère interne.

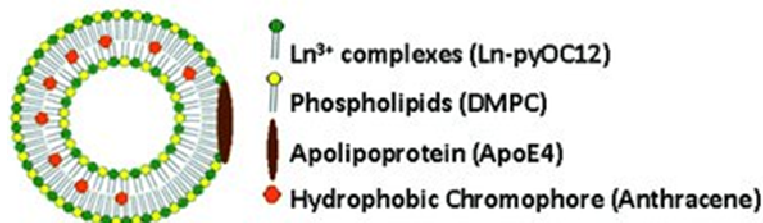


Figure III-8 : Sonde bimodale basée sur un liposome¹⁴

Dans l'exemple présenté ci-dessus la luminescence provient du complexe de lanthanide, et le nanoobjet ne sert que de support. Une autre stratégie consiste à exploiter les propriétés optiques du nanoobjet, en utilisant notamment des quantum dots.

- Quantum dots

Comme il a été mentionné en introduction (chapitre I-3b), les quantum dots (QD) sont des nanocristaux semi-conducteurs, largement utilisés en tant que biomatériaux car ils possèdent des propriétés optiques uniques inaccessibles avec des molécules organiques fluorescentes. Ils sont caractérisés par une large gamme de longueur d'onde d'absorption, un pic d'émission fin et symétrique, une très forte brillance et stabilité chimique.¹⁵ En comparaison avec les fluorophores organiques, les QD ont des rendements quantiques similaires mais des coefficients d'extinction molaire qui sont 10 à 50 fois supérieurs et des taux de photoblanchiment beaucoup plus réduits. L'effet global est que les QD sont 10 à 20 fois plus fluorescents et ont une meilleure photostabilité.¹⁶

Les excitons des QD confinés dans les trois dimensions, se placent dans des niveaux d'énergie discrets, similairement aux petites molécules. En rassemblant de plus en plus d'atomes ensemble, les niveaux d'énergie discrets des orbitales atomiques fusionnent en bandes d'énergie comme dans les matériaux semi-conducteurs. En jouant sur le confinement quantique (venant des très petites dimensions du QD dont le diamètre est inférieur au rayon de Bohr), les bandes d'absorption et d'émission du QD peuvent être modulés en changeant leur diamètre ou bien leur composition. Cette modulation d'énergie permet de faire varier l'absorption et l'émission de l'ultraviolet jusqu'au proche infrarouge. Pour un QD ayant la même composition chimique, plus le diamètre augmente plus l'absorption et l'émission sont déplacées vers le rouge.¹⁷

Les QD sont composés d'un cœur de taille nanométrique, où ont lieu les effets de confinement. Celui-ci peut être recouvert d'une coquille d'autres matériaux semi-conducteurs qui a pour rôle de modifier les propriétés d'absorption et d'émission du cœur et/ou de le protéger des défauts qui peuvent se former sur sa surface. Le tout est recouvert d'une couche de molécules organiques qui passivent les états de surface des nanocristaux tout en permettant leur stabilisation sous forme colloïdale. Les ligands jouent le rôle d'interface avec l'environnement et conditionnent l'affinité du cristal avec les différents milieux (hydrophobie, hydrophilie...). Ils peuvent également porter une fonction chimique qui permet de greffer des molécules sur ces nanocristaux comme des protéines ou des agents ciblant.

Une stratégie pour exploiter les propriétés optiques des quantum dots au sein d'un agent de contraste bimodal est de greffer des complexes de gadolinium à leur surface. En effet, le greffage de complexes de gadolinium sur des nanocristaux luminescents a deux principaux avantages en plus de l'aspect bimodal : le premier est de rassembler un grand nombre de complexes autour d'un nanoobjet, ce qui donne une relaxivité par particule très élevée. Le second est le ralentissement du temps de corrélation rotationnelle qui induit une augmentation de la relaxivité par gadolinium. Tous ces avantages font de ces systèmes des candidats prometteurs pour l'imagerie moléculaire.

La plupart des exemples reportés dans la littérature consistent à exploiter les propriétés optiques des quantum dots à base de cadmium, cuivre et indium sur lesquels des complexes de gadolinium sont greffés. La plupart de ces systèmes décrits sont basés sur des quantum dots contenant du cadmium. Par exemple le groupe de Prizen a exploité la spécificité de la réaction entre la biotine et la streptavidine pour greffer des complexes de gadolinium sur la surface de nanocristaux.¹⁸ Des quantum dots de type CdSe sont donc fonctionnalisés avec dix unités streptavidine tandis que huit

unités GdDTPA peuvent être couplées à une biotine (figure III-9). Ce système, contenant donc 80 complexes de Gd(III) par quantum dot atteint une relaxivité par particule de 3000 à 4500 mM⁻¹s⁻¹.

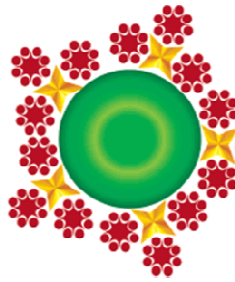


Figure III-9 : Représentation schématique d'un QD (vert) fonctionnalisé avec la streptavidine (jaune) couplée à huit unités GdDTPA (rouge)

Un autre exemple représenté en figure III-10 consiste à utiliser de la silice pour enrober des quantum dots de type CuInS₂/ZnS. Des complexes de GdDTPA sont greffés sur cette architecture afin d'obtenir un agent bimodal possédant une émission du nanocristal de 600 à 700 nm (selon le ratio Cu/In utilisé) et une relaxivité de 8.5 mM⁻¹s⁻¹ à 128 MHz et 25°C.¹⁹ L'inclusion de particules d'oxyde de fer à l'intérieur de la silice et le greffage des récepteurs RGD sur la surface de ces objets (Fe₃O₄/CuInS₂@SiO₂(Gd-DTPA)-RGD) permet de visualiser les intégrines α₃β₄ avec une triple modalité : luminescence et agents T₁/T₂.²⁰

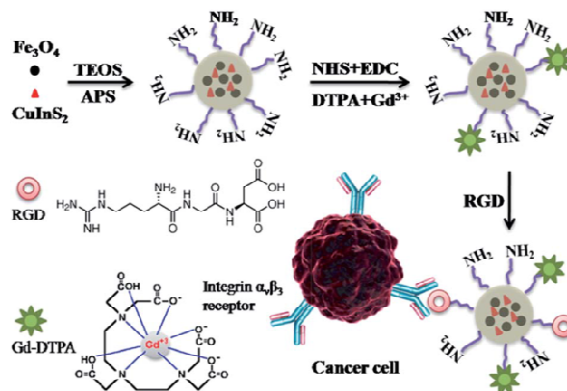


Figure III-10 : Représentation schématique des nanoparticules Fe₃O₄/CuInS₂@SiO₂(Gd-DTPA)-RGD²⁰

Les quantum dots de type InP/ZnS ont également été utilisés dans le cadre de la conception de telles sondes bimodales IRM/optique. Ceux-ci sont encapsulés dans des micelles liées de façon covalente à du GdDOTA. Ce système permet à nouveau une augmentation du signal *in vitro* IRM et une colocalisation du signal optique sur les images des cellules. Ainsi des tumeurs présentes dans les souris peuvent être visualisées de façon efficace et ciblée.²¹

b) Transferts d'énergie

En transposant les systèmes précédents, le remplacement du gadolinium par un autre lanthanide luminescent permet d'étudier les mécanismes de transfert d'énergie entre deux entités luminescentes. En effet, les processus de transferts d'énergie permettent de développer de nouveaux systèmes pour la quantification d'éléments biologiques ou pour le développement de dispositifs optoélectroniques. L'intérêt est d'augmenter le rendement quantique des systèmes pour éviter la perte d'énergie, notamment dans le proche infrarouge. Ceci permet de développer des systèmes efficaces pour les applications biologiques. Les processus de transfert se produisent entre les niveaux d'énergie d'un donneur et d'un accepteur se traduisant par une variation de la luminescence. Nous avons vu en introduction les mécanismes de transferts d'énergie dans le cadre d'interactions dipôle-dipôle (Förster) et d'échange (Dexter) (Chapitre I-3a). Dans les exemples qui suivent, les transferts d'énergie entre des complexes de lanthanides et des quantum dots sont présentés.

- Complexes de lanthanides

Les complexes hétérométalliques à base de lanthanides autre que le gadolinium sont étudiés afin d'analyser les transferts d'énergie possibles entre deux lanthanides luminescents. Un des premiers exemples mettant en évidence un tel transfert d'énergie entre deux lanthanides est décrit par le groupe de Bünzli. Ils mettent en évidence le transfert d'énergie de type dipôle-dipôle entre les états excités du terbium vers ceux de l'europium dans un complexe binucléaire.²² Plus récemment, d'autres articles décrivent de tels transferts d'énergie : l'excitation directe de deux complexes de TbDOTA portant un groupement benzyle et liés entre eux par un DTPA complexé à l'ytterbium permet d'observer l'émission dans le proche infrarouge de ce dernier (figure III-11).²³ D'autres exemples mettant en jeu des complexes Eu(III)/Tb(III)²⁴ ou Yb(III)/Nd(III)²⁵ sont également reportés.

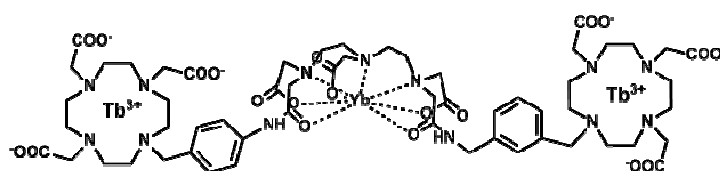


Figure III-11 : Complexe présentant un transfert d'énergie entre le terbium et l'ytterbium²³

Cependant cette stratégie représente un vrai challenge en terme de design moléculaire au vu des comportements de coordination similaires dans toute la série des lanthanides. C'est notamment pour cette raison que les transferts d'énergie au sein de complexes homométalliques sont principalement étudiés. Deux exemples mettant en jeu des complexes d'euporium peuvent être soulignés. Le premier est celui d'un complexe dinucléaire neutre dans lequel se produit un transfert d'énergie réversible entre les deux ions europium. Ce processus est démontré par des expériences de comptages de photons uniques corrélés en temps où l'excitation se fait sur le ligand par des impulsions de lumière dans la gamme des ultraviolets.²⁶ Cependant l'excitation n'est pas sélective d'un des deux europiums, il est donc difficile de décrire avec précision les mécanismes mis en jeu lors

d'un tel transfert d'énergie. Un autre exemple plus récent montre les transferts d'énergie dans un complexe d'euporium trinuécléaire (figure III-12-B).²⁷ Dans ce cas, l'excitation sélective par un laser et la spectroscopie d'émission à haute résolution ont permis d'observer les fines bandes de transition. Celles du donneur et de l'accepteur ne se recouvrent pas et les résultats ont permis de conclure que les processus de transferts à longue distance sont limités à des communications entre des sites de mêmes niveaux d'énergie et que les transferts intramoléculaires ne se font pas au-delà d'une distance de quelques centaines de picomètres.

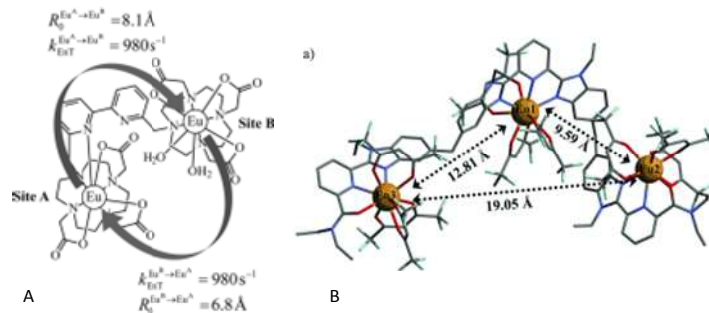


Figure III-12 : Complexes d'euporium pour l'étude des transferts d'énergie (A)²⁶ (B)²⁷

- Quantum dots

Les quantum dots peuvent également être fonctionnalisés avec des complexes de lanthanides luminescents. L'avantage de cette approche est l'amplification des effets de transferts en greffant de nombreux complexes. La principale application de ce système est le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) qui est un processus de transfert d'énergie entre un fluorophore donneur excité et un fluorophore accepteur dans son état fondamental séparés de quelques nanomètres. Dans le cas de FRET entre complexes de lanthanides et QD, les complexes de lanthanides (euporium et terbium) jouent le rôle de donneur et les quantum dots sont utilisés en tant que accepteur.²⁸ L'efficacité de ce système a été prouvée sur des complexes de lanthanides fonctionnalisés par une streptavidine ; et sur différents quantum dots de type CdSe/ZnS fonctionnalisés par des biotines (figure III-13).^{29, 30} Un large rayon de Förster de 11 nm (qui est la distance donneur-accepteur quand le FRET est efficace à 50%) a été obtenu grâce à un grand recouvrement des spectres d'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur.³¹

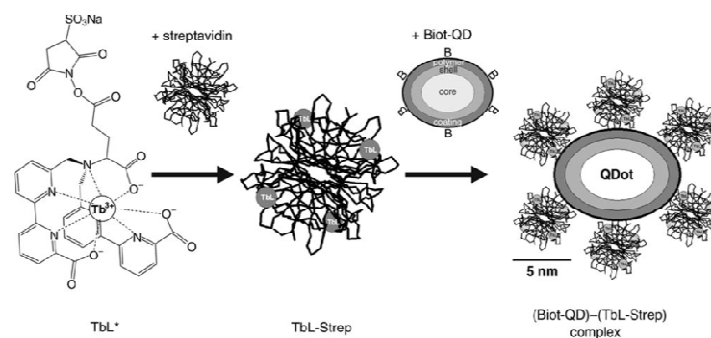


Figure III-13 : Quantum dots fonctionnalisés avec des complexes de terbium via un lien biotine/streptavidine

Tous ces systèmes montrent les potentialités de telles sondes bimodales avec des propriétés optiques et relaxométriques améliorées. Cependant la plupart des exemples utilisent des quantum dots à base de cadmium qui est un métal toxique ou des quantum dots de type $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ qui n'ont pas pu être transférés dans l'eau par échange de ligands. Au laboratoire, en collaboration avec l'équipe de Peter Reiss du SPAM, des sondes bimodales basées sur des quantum dots de type InP/ZnS fonctionnalisés avec des complexes de gadolinium pour l'IRM ou d'euprium/terbium pour l'étude des transferts d'énergie ont été développées. Les quantum dots de type InP sont des candidats pertinents pour l'application comme sondes bimodales. En effet, ils sont moins toxiques comparés à ceux basés sur le cadmium.³² Le matériau InP est intéressant du fait de son rayon de Bohr de 11.3 nm et un gap direct de 1.27 eV, ce qui a pour conséquence une émission du nanocristal modulable dans les gammes de longueurs d'onde du bleu jusqu'au proche infrarouge.³³ La synthèse de ce type de quantum dots³⁴ ainsi que le transfert de phase pour solubiliser les nanocristaux dans l'eau,³⁵ ont été optimisés par l'équipe de Peter Reiss.

c) Travaux antécédents conduits au laboratoire

Au laboratoire, différents complexes de gadolinium ont été greffés sur des nanocristaux de type InP/ZnS émettant à 620 nm pour étudier l'influence des paramètres gouvernant la relaxivité. Le premier complexe greffé est le $[\text{Gd}(\text{bpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ fonctionnalisé par une lysine dont l'amine primaire libre de la chaîne latérale a été couplée avec l'acide lipoïque pour donner Gd.1 (figure III-14).³⁶ La relaxivité de ce complexe varie de 4.5 à 13 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C lorsqu'il est greffé sur les nanocristaux. De plus, les propriétés optiques du quantum dot ne présentent pas de changements significatifs en présence des 80 chélates greffés. Le greffage des complexes d'euprium et terbium sur ces quantum dots (Eu.1 et Tb.1) permet d'avoir un système luminescent avec deux types d'émission : l'excitation à 320 nm dans la bande d'absorption du QD donne uniquement l'émission à 620 nm du nanocristal, tandis que l'excitation à 275 nm dans les bandes d'absorption du picolinate et du QD sans délai permet d'avoir les émissions du lanthanide et du nanocristal simultanément. L'application d'un délai permet de s'affranchir de l'émission du nanocristal du fait de son temps de vie plus court.

Une deuxième étude effectuée au laboratoire a consisté à étudier l'influence de différents espaceurs sur la relaxivité du complexe $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ greffés sur le même type de quantum dots (figure III-14).³⁷ Ce complexe est choisi en raison de la présence de trois molécules d'eau dans la sphère interne, ce qui permet de mieux voir les effets de changement de taille sur la relaxivité. De plus, la synthèse du ligand portant une fonction chimique est facile d'accès. Le bras acétate de ce complexe a été fonctionnalisé avec une chaîne alkyle à deux carbones se terminant par une amine primaire sur laquelle les espaceurs suivants sont couplés : les acides lipoïque, mercaptopropionique et mercaptobenzoïque pour conduire respectivement aux complexes Gd.2, Gd.3 et Gd.4. Le tableau III-1 regroupe les résultats obtenus avec ces différents espaceurs.

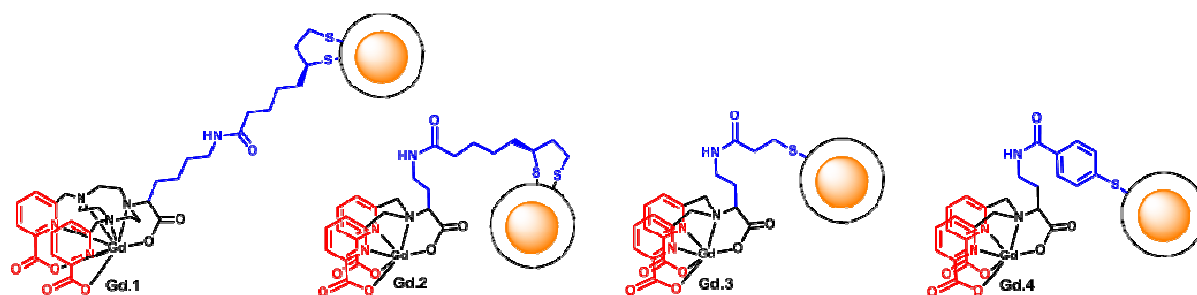


Figure III-14 : Complexes de $[Gd(bpatcn)(H_2O)]$ (Gd.1) et $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$ (Gd.2, Gd.3, Gd.4) greffés sur des quantum dots InP/ZnS

	r_1	r_1 par Gd	Nombre de complexes per QD	r_1 par QD
Gd.1	4.5	13	80	900
Gd.2	11.8	20.9	115	2406
Gd.3	9.4	8.9	66	585
Gd.4	12.2	31.5	80	2523

Tableau III-1 : relaxivité en $mM^{-1}s^{-1}$ à 35 MHz et 25°C pour des complexes de gadolinium en solution et greffés sur les QD

Une augmentation significative de la relaxivité par gadolinium est obtenue avec l'espaceur mercaptobenzoïque (Gd.4) le plus rigide qui permet de limiter la rotation interne du complexe. Cependant cet espaceur ne permet pas de lier un grand nombre de complexes à la surface des nanocristaux contrairement à l'espaceur lipoïque (Gd.2). Ce dernier espaceur, plus long, permet de lier un plus grand nombre de complexe à la surface des nanocristaux. Malgré une relaxivité par Gd(III) plus faible, l'espaceur lipoïque permet d'accéder à une relaxivité par quantum dot équivalente au système Gd.4. L'augmentation de la relaxivité est plus prononcée pour ce complexe que pour Gd.1 dû à la présence de deux molécules d'eau supplémentaires dans la sphère interne du métal et d'un espaceur plus court entre le complexe et le QD.

L'objectif de notre étude est d'optimiser les paramètres gouvernant la relaxivité grâce aux informations obtenues lors de ces deux études. L'utilisation d'un complexe ayant une très bonne vitesse d'échange nous permettra d'exalter l'influence de la taille sur la relaxivité. Le greffage des complexes d'euprium et de terbium nous permettra de quantifier les transferts d'énergie se produisant entre les chélates de lanthanides et les quantum dots.

d) Choix des complexes et des quantum dots

Au cours de ma thèse, nous avons choisi d'exploiter les potentialités du complexe $[Ln(ebpatcnNH_2)(H_2O)]$ qui comme nous l'avons vu précédemment présente des propriétés relaxométriques adaptées notamment une vitesse d'échange optimale pour le changement d'échelle. Ce ligand est également choisi pour sa stabilité pour des études *in vitro* et sa capacité à

sensibiliser les ions Eu et Tb émettant dans le visible. Pour rappel, l'étude qui vient d'être présentée nous a permis de choisir les différents espaceurs que nous avons couplés au complexe $[Ln(ebpatcnNH_2)(H_2O)]$ qui sont :

-l'espaceur lipophile, qui permet de greffer un grand nombre de complexes grâce à sa longueur de chaîne ($[Ln(ebpatcnSS)(H_2O)]$)

-l'espaceur mercaptobenzoïque qui donne une haute relaxivité par Gd(III) grâce à sa rigidité ($[Ln(ebpatcnSH)(H_2O)]$)

-l'espaceur méthylènercaptobenzoïque qui combine rigidité et éloignement stérique ($[Ln(ebpatcnCH_2SH)(H_2O)]$)

Le complexe $[Gd(DO3ApropSH)(H_2O)]$ a également été testé comme modèle pour être comparé à des systèmes connus de la littérature.

Les nanocristaux utilisés dans cette étude sont des quantum dots de type InPZnS/ZnSe/ZnS avec des diamètres entre 4.5 à 5.5 nm émettant autour de 525 nm. La couche supplémentaire de ZnSe permet d'avoir un rendement quantique plus élevé, entre 30 et 50 % dans l'hexane. En effet, la discordance des réseaux cristallins entre InP-ZnS et ZnSe est relativement faible en comparaison à ZnS et permet ainsi une meilleure passivation des états de surface. De plus, le gap du semi-conducteur ZnSe se situe entre celui de l'InP et du ZnS, ce qui permet d'avoir un meilleur alignement des bandes. La synthèse de ces nanocristaux est basée sur des procédures développées par l'équipe de Peter Reiss.^{34, 38} Les particules sont ensuite transférées en phase aqueuse par échange de ligands. Les ligands octyl hydrophobes passivant la surface des nanocristaux en solvant organique sont remplacés par de la pénicillamine suivant une procédure développée par l'équipe de Peter Reiss.³⁵ Le diamètre hydrodynamique des particules en phase aqueuse est de 5.5- 6.5 nm et leur potentiel ζ est de -40 mV, ce qui leur confère une bonne stabilité colloïdale. Leur rendement quantique diminue lors du transfert de phase à une valeur de 8 à 15% en phase aqueuse.

2. Synthèse et caractérisation d'architectures nanométriques multimodales basées sur les quantum dots

a) Greffage des complexes de gadolinium sur les quantum dots

L'optimisation du greffage des complexes de lanthanides sur les quantum dots a été effectuée lors des précédentes études au laboratoire. En pratique, un équivalent de quantum dots de type InPZnS/ZnSe/ZnS fonctionnalisés avec de la pénicillamine est mis en présence de 200 équivalents de complexes de lanthanides en solution aqueuse à pH 7.4 et de 9000 équivalents de TCEP, réducteur de ponts disulfures. Le pH du mélange est ajusté à 9 par ajout d'hydroxyde de tétraméthyle ammonium (TMAOH) en tant que base. Après une nuit d'agitation à 20°C, les quantum dots résultants sont purifiés par colonne sur gel sephadex pour éliminer l'excès de complexes non liés. Les quatre complexes de gadolinium qui ont été greffés sont présentés dans la figure III-15.

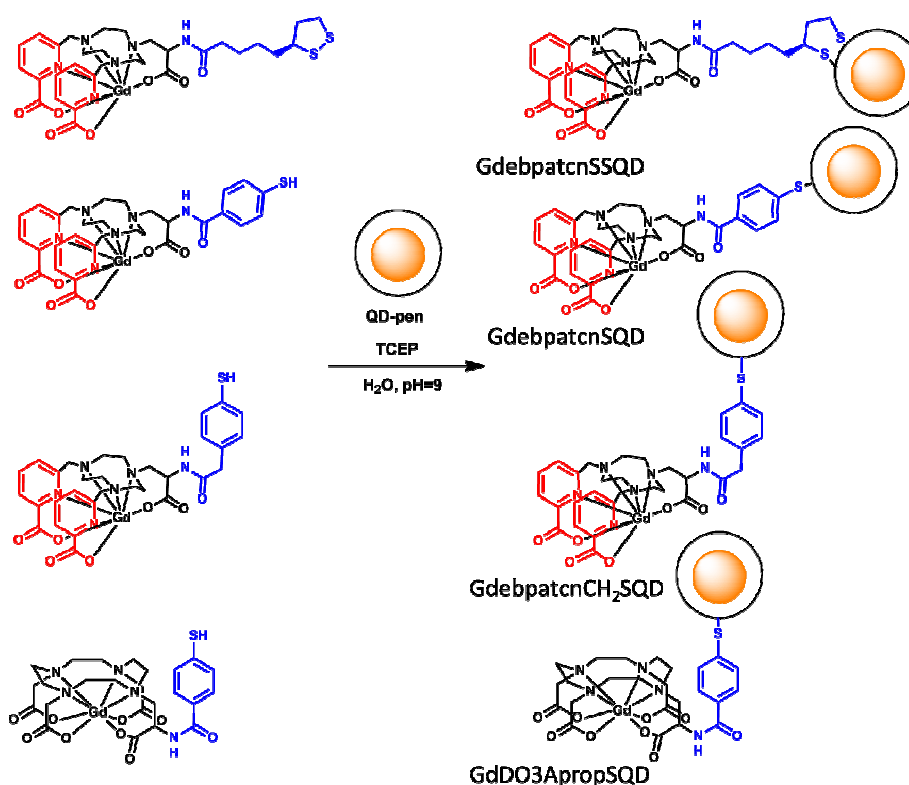


Figure III-15 : Complexes de gadolinium greffés à la surface des nanocristaux de type InP

Les complexes d'euprium, terbium et ytterbium dérivés de l'ebpatcn portant l'acide lipoïque en tant qu'espaceur ($[\text{Ln}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$) sont également greffés sur les quantum dots. La caractérisation des hybrides est décrite dans la partie 4 de ce chapitre.

b) Caractérisation des quantum dots

- Efficacité du greffage

L'efficacité du greffage des complexes de lanthanides sur les quantum dots est vérifié par DLS. Pour chaque greffage, une augmentation du diamètre hydrodynamique de 3 à 4 nm des nanocristaux est observée (figure III-16). Ceci montre un greffage efficace des complexes à la surface des quantum dots.

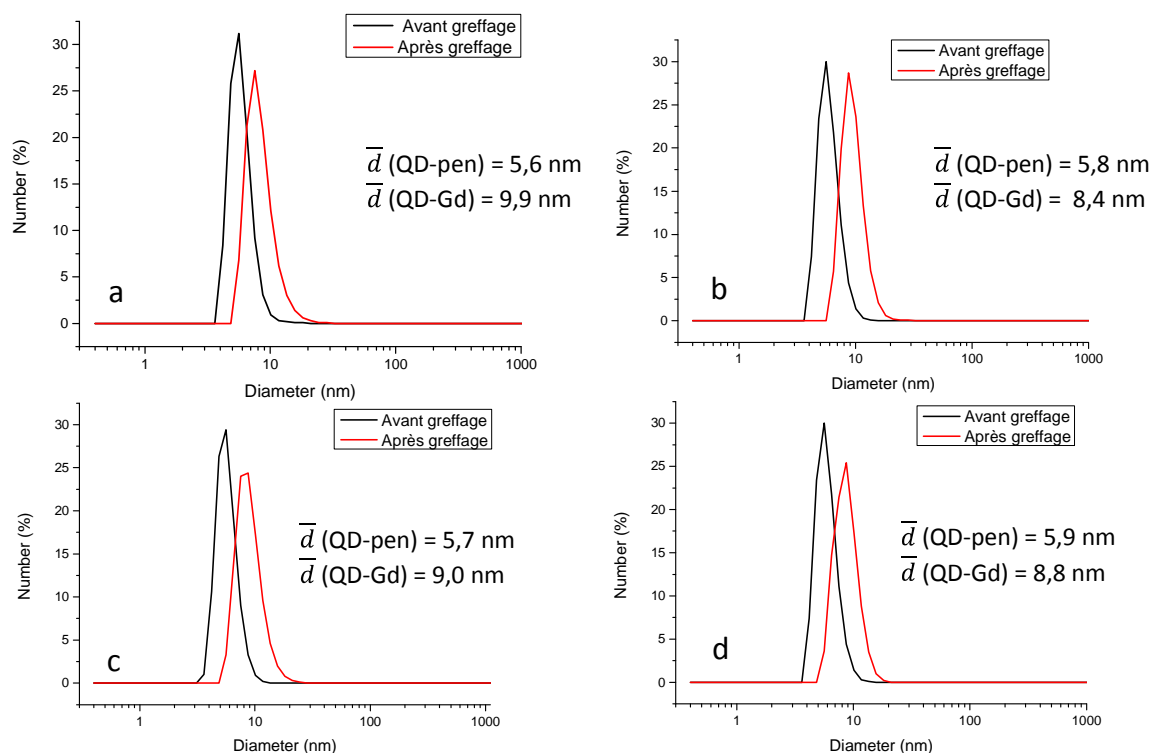


Figure III-16 : Spectres DLS de QD avant et après greffage des complexes a) $[\text{Gd}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$ b) $[\text{Gd}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$, c) $[\text{Gd}(\text{ebpatcnCH}_2\text{SH})(\text{H}_2\text{O})]$, d) $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]$

Les valeurs du potentiel ζ des particules après greffage des complexes de gadolinium sont comprises entre -40 et -30 mV, et donc ne présentent pas de changement significatif en présence des complexes. Les charges négatives à la surface proviennent de la présence de la pénicillamine dont la fonction acide carboxylique est déprotonée à pH 7.4. Les répulsions électrostatiques entre les nanocristaux permettent d'avoir une bonne stabilité colloïdale.

- Propriétés optiques des quantum dots

Les quantum dots sont également caractérisés par leur spectre d'absorption UV-visible et leur photoluminescence :

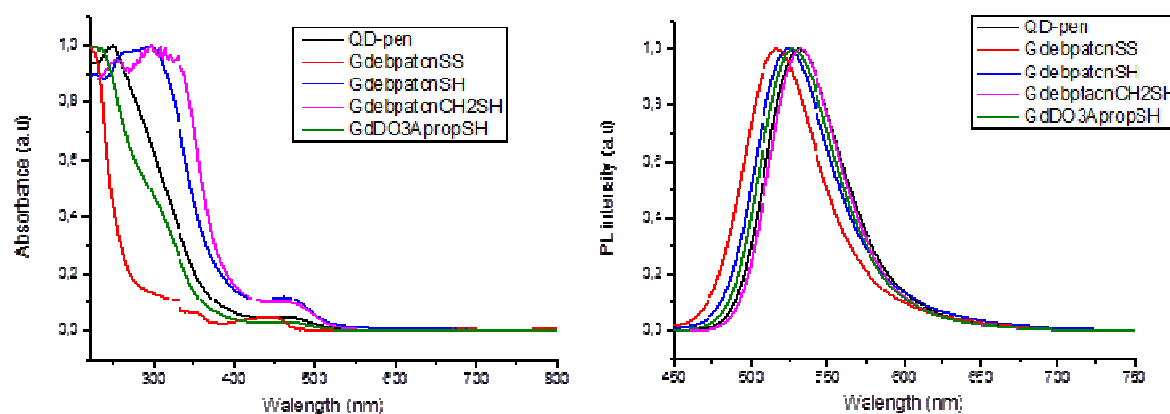


Figure III-17 : Spectres d'absorption (gauche) et de photoluminescence (droite, $\lambda_{exc} = 400$ nm) des quantum dots InPZnS fonctionnalisés par différents complexes de gadolinium

Les spectres d'absorption montrent la présence d'une bande située aux alentours de 450 nm correspondant à l'exciton du semi-conducteur. L'absorbance à 450 nm nous permet de calculer la concentration des quantum dots en connaissant leur coefficient d'absorption molaire ($\epsilon_{450} = 415970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'intensité des pics excitoniques n'est pas la même car les spectres d'absorption ne sont pas mesurés à la même concentration en QD. Pour comprendre les spectres d'absorption et de photoluminescence, il faut savoir que les greffages de complexes de gadolinium n'ont pas été effectués sur les mêmes lots de nanocristaux. Selon leurs conditions de synthèse, les gaps peuvent légèrement changer, entraînant ainsi des variations sur les spectres comme des légers décalages en longueur d'onde. La forte augmentation de l'absorption entre 300 et 400 nm est due à l'absorption de photons entre la bande de conduction et la bande de valence des nanocristaux semi-conducteurs. Ici encore on peut observer un décalage lors de l'apparition de cette bande, dépendante du gap des QD de départ et donc de leurs conditions de synthèse. La bande d'absorption du ligand ebpatcn se situe autour de 275 nm, en dessous de celle correspondant au gap des nanocristaux.

Les spectres de photoluminescence montrent que l'émission des nanocristaux est centrée autour de 520 nm. Le léger décalage observé du maximum d'émission est due aux légères différences de gap entre les QD ne provenant pas de la même synthèse.

La mesure de l'absorbance à 400 nm et de la photoluminescence de la solution de quantum dots à différentes concentrations nous permet de calculer le rendement quantique en utilisant des standards comme la fluorescéine ou la rhodamine (voir partie expérimentale). Le calcul des rendements quantiques est décrit en partie expérimentale et leurs valeurs sont données dans le tableau III-2.

	QD-pen	QD-Gd
GdebpatcnSSQD	8±2	7±2
GdebpatcnSQD	7±2	6±2
GdebpatcnCH ₂ SQD	8±2	6±2
GdDO3ApropSQD	7±2	6±2

Tableau III-2 : Rendements quantiques en % des QD dans l'eau mQ avant et après greffage des complexes de Gd(III)

On observe une légère diminution du rendement quantique après greffage mais globalement, la présence des complexes de gadolinium n'affecte pas de façon significative les propriétés optiques des quantum dots InPZnS/ZnSe/ZnS. La caractérisation et les propriétés optiques des quantum dots en présence de complexes de lanthanides luminescents sont étudiés plus en détail dans la partie 4 de ce chapitre.

- Nombre de complexes par particule

Le nombre de complexes par particule peut être déterminé à partir des concentrations en quantum dots et en gadolinium pour un même échantillon. La concentration en gadolinium est déterminée par la méthode de susceptibilité paramagnétique. Cependant cette méthode est fiable à condition que la concentration en gadolinium soit suffisante (> à 0.5 mM). Ces mesures ont été réalisées sur des solutions de quantum dots greffés avec des complexes de gadolinium préalablement concentrées en prenant soin de ne pas avoir de précipitation. Un spectre d'absorption est réalisé sur le même échantillon, afin d'obtenir la concentration en quantum dots. Le rapport de ces deux concentrations nous donne le nombre de complexes par particule.

Celui-ci est de 110, 30, 80 et 50 (tableau III-3) respectivement pour les complexes de [Gd(ebpatcnSS)(H₂O)], [Gd(ebpatcnSH)(H₂O)], [Gd(ebpatcnCH₂SH)(H₂O)] et [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]. De façon analogue aux études réalisées au laboratoire, l'espaceur lipoïque, plus long, permet de lier plus de complexes à la surface des nanocristaux car les interactions stériques entre les complexes et le nanoobjet sont plus faibles. L'espaceur phényle, plus court, conduit au nombre de complexes par particule le plus petit mais l'ajout d'un groupement méthylène entre l'aromatique et la liaison amide permet de greffer plus de complexes sur le nanocristal en réduisant les interactions stériques. Comme les complexes d'euporium et terbium possèdent la même géométrie que les complexes de gadolinium, le nombre de complexes greffés est supposé identique.

Pour conclure, le greffage de complexes de lanthanides sur des nanocristaux de type InPZnS/ZnSe/ZnS est efficace. Le nombre de complexes greffés varie en fonction de l'espaceur entre les complexes et le nanocristal. Les propriétés optiques des quantum dots ne présentent pas de changement significatif en présence des complexes de gadolinium. Dans la partie suivante, la relaxivité des complexes de gadolinium accrochés aux quantum dots est présentée.

3. Etude de la relaxivité

Les temps de relaxation longitudinale T_1 des protons de l'eau en présence des quantum dots fonctionnalisés avec des complexes de gadolinium sont mesurés entre 0.01 et 400 MHz. La concentration en gadolinium est calculée en mesurant le déplacement chimique des protons de l'eau lié à la susceptibilité paramagnétique. Ainsi la relaxivité est calculée en faisant le rapport de la vitesse de relaxation paramagnétique sur la concentration en gadolinium. Les profils NMRD des complexes greffés sur les nanocristaux qui représentent les variations de la relaxivité en fonction du champ sont représentés sur la figure III-18.

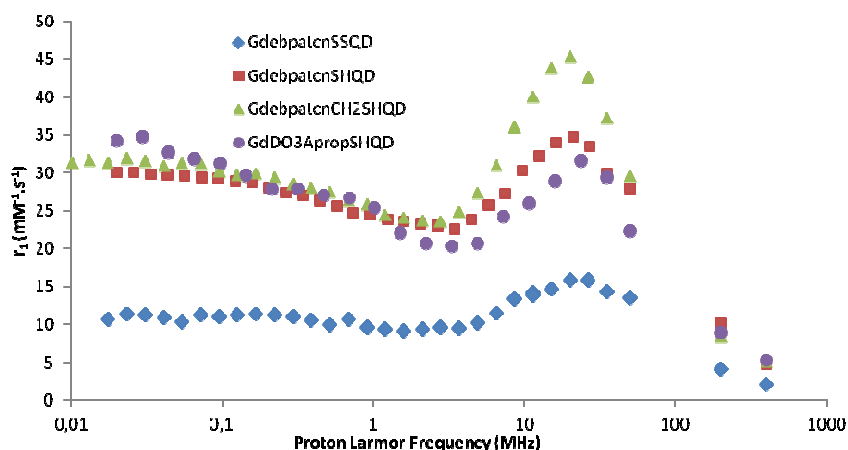


Figure III-18 : Profils NMRD des complexes de gadolinium greffés sur des quantum dots à 25°C, pH=7.4 et c=0.3-0.5 mM

Les profils de relaxivité des complexes greffés présentent tous la même allure. Cependant ils sont différents de ceux observés pour les complexes seuls en solution (cf page 74). En effet, ces profils présentent une augmentation importante à champs moyens avec un maximum à 20 MHz et une chute drastique à haut champ. En plus de confirmer le greffage des complexes de gadolinium à la surface des nanocristaux, ces profils sont caractéristiques des systèmes tournant lentement, c'est-à-dire ceux dont le temps de corrélation rotationnelle est long du fait de l'augmentation considérable du poids moléculaire du système. Comme le prédit la théorie de la relaxivité, une rotation très lente n'est pas favorable à hauts champ, conduisant à une diminution importante de la relaxivité (entre 2 et 5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 400 MHz et 25°C). Il faut noter que la légère augmentation de la relaxivité à bas champ pour les complexes de Gd(III) portant un espaceur phényle peut être attribuée à des effets de relaxation électronique.

Le tableau III-3 récapitule les valeurs de relaxivité obtenues pour chaque complexe à 35 MHz et 25°C. La relaxivité par particule est calculée en multipliant le nombre de complexes greffés par la relaxivité par gadolinium.

	r_1	r_1 par Gd	Nombre de complexes par QD	r_1 par QD
GdebpatcnSSQD	4.18±0.09	14±1	~ 110	~ 1500
GdebpatcnSQD	1.76±0.07	30±2	~ 30	~ 900
GdebpatcnCH ₂ SQD	4.31±0.09	37±2	~ 80	~ 3000
GdDO3ApropSQD	1.23±0.07	29±2	~ 50	~ 1450
Gd.1	4.5	13	~80	~ 900

Tableau III-3 : relaxivité en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz, à 25°C pH=7.4 et c=0.3-0.5 mM pour des complexes de gadolinium en solution et greffés sur les QD

L'augmentation de la relaxivité diffère en fonction des complexes, elle dépend de l'espaceur utilisé. Une augmentation de la relaxivité d'un facteur 4 est observée autour de 20 MHz dans le cas de l'espaceur lipoïque : la relaxivité passe de 4.18 à 16 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C. Cet espaceur, plus long permet d'attacher plus de complexes à la surface des quantum dots, ce qui conduit à une relaxivité par particule considérable, qui reste élevée à hauts champs (450 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C). De plus le groupement dithiol confère une meilleure stabilité à la liaison entre le complexe et le nanocristal. Cependant l'augmentation à bas champ n'est pas optimale car la flexibilité de cet espaceur induit des degrés de liberté de mouvement importants résultant en une rotation quasi-indépendante du complexe envers la nanoparticule. Le temps de corrélation rotationnelle n'est donc pas optimisé pour ce système et l'augmentation de la relaxivité est beaucoup moins importante qu'avec les espaceurs phényles, beaucoup plus rigides. De plus, la vitesse d'échange de ce composé, mesurée à $0.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C, est faible pour conduire à une relaxivité très élevée lors du changement d'échelle.

Le remplacement de la chaîne flexible par un groupement aromatique permet d'avoir un connecteur plus rigide entre le complexe et le nanoobjet, ce qui conduit à une rotation plus lente du système global et une augmentation de la relaxivité. L'introduction de ce type d'espaceur sur le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ génère l'augmentation la plus importante : elle est 20 fois supérieure à celle du complexe en solution. Les mêmes effets sont observés sur le complexe dérivé du DOTA portant le même espaceur. En effet, ils possèdent les mêmes propriétés : ce sont tous deux des complexes monohydratés dont le poids moléculaire est similaire avec une vitesse d'échange améliorée grâce à la présence d'un bras propionate.

L'effet le plus considérable est obtenu pour le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcnCH}_2\text{SH})(\text{H}_2\text{O})]$ greffé aux quantum dots, qui présente les valeurs de relaxivité les plus élevées, de 45 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C. Cette valeur élevée peut être attribuée à la vitesse d'échange rapide des molécules d'eau de sphère interne du complexe ($20 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C). L'ajout d'un groupement méthylène sur l'espaceur phényle permet de greffer plus de complexes par particule et conduit à une relaxivité par particule la plus élevée pouvant aller jusqu'à 3600 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C et qui reste importante à hauts champs (400 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 400 MHz et 25°C). Cet espaceur est un excellent compromis entre la rigidité, conduisant à une augmentation de la relaxivité par gadolinium et l'éloignement qui permet de greffer plus de complexes à la surface des quantum dots en réduisant les interactions stériques.

Dans ce type de système, il est attendu que le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcnSH})(\text{H}_2\text{O})]$ conduise à une augmentation de la relaxivité plus importante que le complexe portant un groupement méthylène supplémentaire, conduisant à un espaceur plus flexible. Cependant la faible relaxivité du complexe en solution pourrait être une explication à cette différence d'augmentation de la relaxivité lors du greffage sur les nanocristaux. Les mêmes effets apparaissent sur le complexe $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]$. Ces effets peuvent également être attribués à la vitesse d'échange des complexes. En effet, celle du complexe $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ est de $3.7 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C . Cette vitesse d'échange est équivalente à celle du DOTA et peut être limitante lors du changement d'échelle. Ceci peut aussi expliquer la raison pour laquelle le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcnCH}_2\text{SH})(\text{H}_2\text{O})]$ a une relaxivité par Gd(III) supérieure à celle du complexe $[\text{Gd}(\text{DO3ApropSH})(\text{H}_2\text{O})]^-$ lors du greffage sur les quantum dots. Pour mieux comprendre cet effet, il faudra d'abord déterminer l'origine du comportement étrange de ces complexes en solution.

L'augmentation de la relaxivité obtenue pour le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$ greffé sur les QD est quasiment identique à celle du complexe Gd.1 présenté dans la partie travaux préliminaires.³⁶ En effet le raccourcissement de l'espaceur flexible ne permet pas d'optimiser le temps de corrélation rotationnelle pour ce système. La flexibilité induite par l'espaceur lipoïque fait que la rotation du complexe est encore quasi indépendante de celle du nanocristal, et limite l'augmentation de la relaxivité. L'ajout du méthylène sur le bras acétate n'améliore pas la relaxivité.

En ce qui concerne les espaceurs aromatiques, le temps de corrélation rotationnelle est suffisamment ralenti grâce à la rigidité des espaceurs. Ceci nous permet d'obtenir de très bonnes valeurs de relaxivité, du même ordre que celles obtenues pour le complexe trisaquo portant l'espaceur phényle (Gd.4) à 35 MHz.³⁷

Parmi les systèmes décrits dans la littérature, le nôtre possède des valeurs de relaxivité par particule équivalente au système de Prizen, dans lequel 240 complexes de $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ sont couplés sur des quantum dots de type CdSe grâce à l'affinité entre la biotine et la streptavidine, qui se place parmi les plus hautes reportées dans la littérature pour des sondes bimodales ($\sim 3000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par particule).¹⁸ En ce qui concerne la relaxivité par gadolinium, notre système possède une des valeurs les plus hautes de la littérature pour des sondes bimodales mettant en jeu un complexe monoaquo. Une valeur similaire a pu être atteinte avec un complexe bishydraté encapsulé dans des liposomes.¹⁴

En conclusion de cette partie, la structure de l'espaceur entre le complexe et le quantum dot a un effet considérable sur la relaxivité globale du système. L'utilisation d'un espaceur flexible et long entraîne une rotation du complexe quasiment indépendante de celle du nanoobjet ayant pour conséquence un effet modéré de la taille sur la relaxivité. L'utilisation d'espaceurs plus rigides comme le mercaptobenzoïque ou le méthylènercaptobenzoïque induisent une contribution significative sur le changement de taille ainsi que la valeur de la vitesse d'échange. De plus la présence du groupement méthylène permet d'apporter l'éloignement nécessaire pour réduire les interactions stériques et lier un nombre important de complexes à la surface des quantum dots. Ce système conduit à une relaxivité par gadolinium et également par particule parmi les plus élevées de la littérature pour des agents bimodaux IRM/Optique.

4. Etude de la luminescence des complexes de lanthanides greffés

Trois complexes de lanthanides luminescents dans le domaine du visible et de l'infrarouge [Ln(ebpatcnSS)(H₂O)], Ln=Eu, Tb, Yb sont greffés sur les nanocristaux de type InPZnS/ZnSe/ZnS. Les complexes portant l'espaceur lipophile sont choisis pour cette étude car ils permettent de greffer un plus grand nombre de complexes sur les nanocristaux, comme il est observé sur les complexes de gadolinium. Un autre avantage est que, contrairement aux autres espaceurs, celui-ci n'a pas de chromophore susceptible d'interférer avec ceux du picolinate ou du quantum dot. Le greffage de ces trois complexes de lanthanides est effectué sur le même lot de quantum dots et selon le même protocole afin de comparer les effets sur les propriétés spectroscopiques entre les différents complexes de lanthanides et assumer un nombre de complexes greffés équivalents.

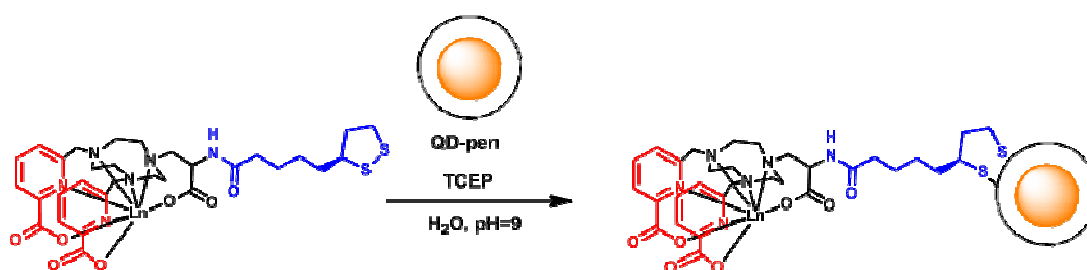


Figure III-19 : Greffage de complexes de lanthanides sur les quantum dots Ln = Eu, Tb, Yb

Ces complexes sont greffés selon la même procédure que les complexes de gadolinium : 1 équivalent de QD est mis en présence de 200 équivalents de complexes et 900 équivalents de TCEP. Le pH du mélange est ajusté à 9 par addition d'une solution d'hydroxyde de tétraméthyl ammonium puis est agité une nuit à 20°C. Les particules ainsi obtenues sont purifiées sur sephadex et sont dispersées dans du tampon PBS1X filtré (0.22 μ). Les nanocristaux ont été caractérisés par DLS. L'augmentation du diamètre hydrodynamique de 3 à 4 nm confirme le greffage efficace des complexes de lanthanides à la surface des quantum dots (figure III-20).

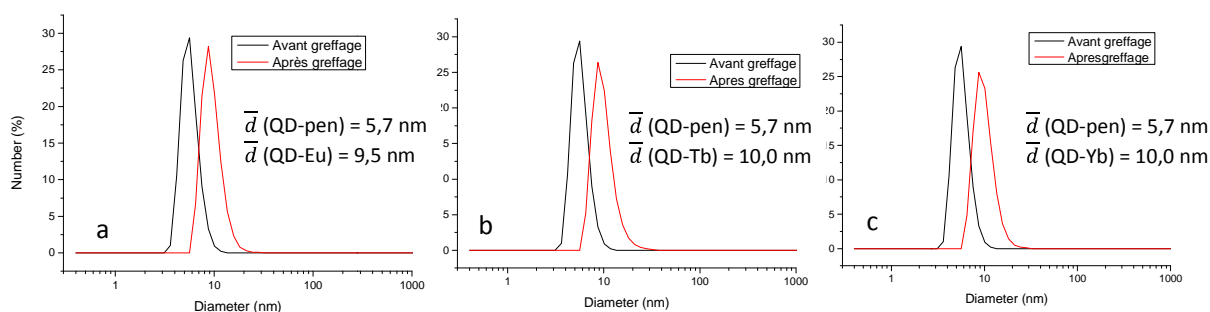


Figure III-20 : Spectres DLS de QD avant et après greffage des complexes [Ln(ebpatcnSS)(H₂O)] avec a) Ln= Eu b) Ln=Tb et c) Ln=Yb

Le potentiel ζ des nanocristaux ne présente pas de changement significatif après le greffage des complexes de lanthanides. Les valeurs sont comprises entre -40 et -30 mV, ce qui permet d'avoir une bonne stabilité colloïdale. Les quantum dots sont également caractérisés avec les techniques d'absorption UV-visible et de photoluminescence. Les spectres sont présentés dans la figure III-21.

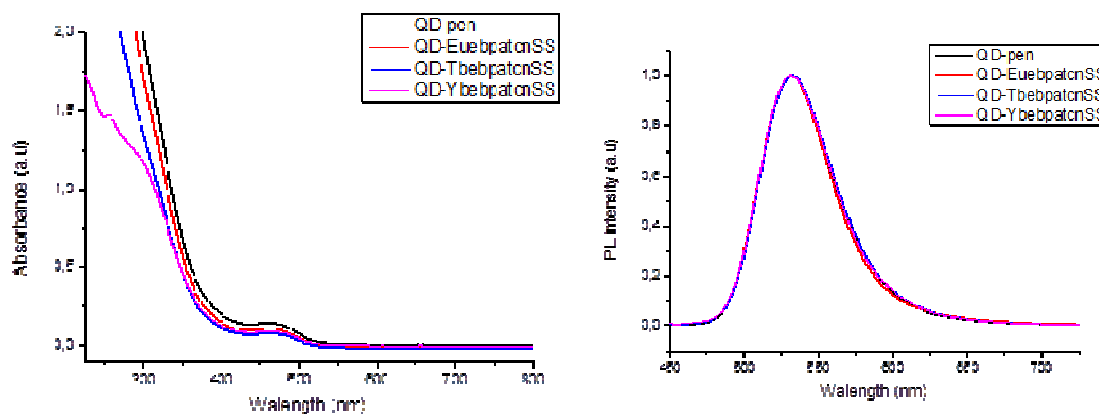


Figure III-21 : Spectres d'absorption (gauche) et de photoluminescence (droite, $\lambda_{exc} = 400$ nm) des quantum dots InPZnS fonctionnalisés par différents complexes de lanthanides

Nous avons utilisé le même lot d'échantillon de quantum dots pour les trois greffages. D'un complexe à l'autre, nous n'observons pas de changements significatifs dans les propriétés d'absorption et d'émission. On retrouve le pic d'exciton aux alentours de 450 nm, ce qui nous permet de calculer la concentration en quantum dots ($\epsilon_{450} = 415970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et une bande d'absorption importante autour de 300 nm correspondant au gap entre les bandes de conduction et de valence. Les spectres de photoluminescence normalisés ne montrent pas de changement en présence de complexes de lanthanides, l'émission est toujours centrée à 525 nm. Par contre, on peut remarquer des différences dans l'intensité des émissions selon l'ion lanthanide étudié. Ces différences sont corrélées avec la variation de rendement quantique.

Nous remarquons des différences dans le rendement quantique des quantum dots selon le complexe de lanthanide greffé. Les quantum dots fonctionnalisés avec la pénicillamine utilisés ici ont un rendement quantique de 15%. Celui-ci est mesuré avec une excitation à 370 nm. Le greffage des complexes de lanthanides conduit à la diminution du rendement quantique du quantum dot. Le rendement quantique global du système (émission du QD et du lanthanide) est mesuré avec une excitation à 273 nm (tableau III-4). Ceux du quantum dot fonctionnalisés avec de la pénicillamine et des complexes d'ytterbium ne change pas aux deux longueurs d'onde différentes car on observe uniquement l'émission du quantum dot. En ce qui concerne les deux autres systèmes (QD-Eu et QD-Tb), une superposition des émissions du quantum dot et du complexe de lanthanide entraîne une légère augmentation du rendement quantique par rapport à celui du quantum dot. Cette légère augmentation du rendement quantique est due à la contribution de l'émission du lanthanide. Elle est faible car l'excitation dans les bandes d'absorption du picolinate est en majeure partie absorbée par le quantum dot.

RQ	QD	QD-Eu	QD-Tb	QD-Yb
370 nm (QD)	15±2	1±1	10±1	5±1
273 nm (QD+Ln)	15±2	2±1	11±1	5±1

Tableau III-4 : Rendements quantiques des quantum dots en tampon PBS1X fonctionnalisés avec les complexes de lanthanides et du système global

Pour mieux comprendre cette diminution de rendement quantique du quantum dot après le greffage des complexes de lanthanides, les spectres d'excitation et d'émission sont réalisés pour chaque complexe greffé.

- Complexe de terbium

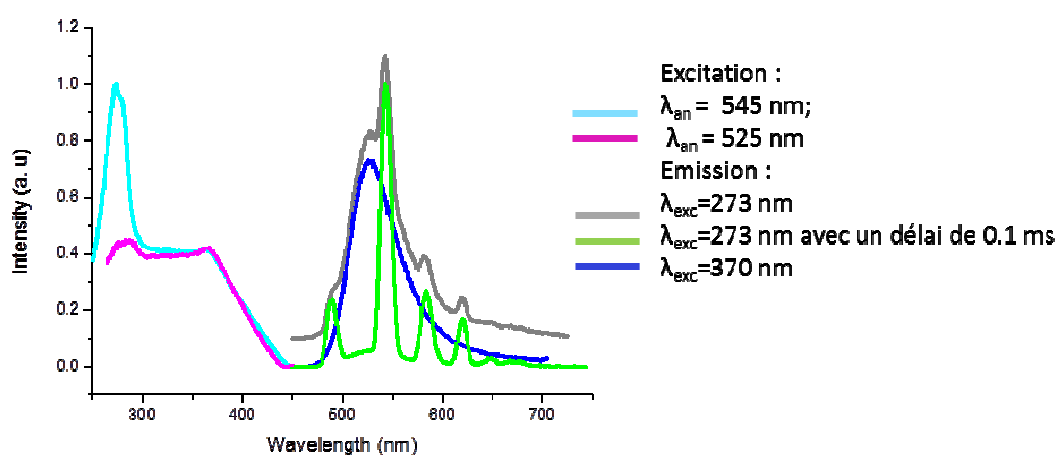


Figure III-22 : Spectres d'excitation et d'émission des QD fonctionnalisés avec des complexes de terbium

Dans la figure III-22, le spectre d'excitation mesuré à 545 nm met en évidence un pic à 275 nm correspondant à l'absorption du ligand picolinate et une bande large entre 250 et 400 nm correspondant à la gamme d'absorption du quantum dot. En effet, à cette longueur d'onde d'analyse, les émissions du terbium et du quantum dot sont superposés. Lorsqu'on mesure le spectre d'excitation à 525 nm (émission uniquement du nanocristal), on observe uniquement la bande d'absorption du quantum dot.

L'émission de l'une ou l'autre entité luminescente peut être sélectionnée en fonction des conditions d'acquisition. L'excitation à 370 nm sur la bande d'absorption du quantum dot donne l'émission du nanocristal centré à 525 nm. L'excitation à 273 nm sur la bande d'absorption du picolinate mais aussi du QD donne l'émission simultanée du lanthanide et du nanocristal. Le temps de vie de luminescence du terbium étant beaucoup plus long que celui du quantum dot, l'application d'un délai de 0.1 ms

permet d'observer l'émission du terbium excité via le picolinate à 273 nm par effet d'antenne. On peut noter que les émissions du quantum dot et du terbium sont superposées (figure III-22).

Malgré l'utilisation d'un espaceur plus court, il ne semble pas y avoir de transfert d'énergie entre le quantum dot de type InP/ZnSe/ZnS et le terbium comme cela a déjà été observé dans le cas des complexes de bpatcn (Eu.1 et Tb.1 dans les travaux préliminaires) greffés sur les nanocristaux de type InP.³⁶

- Complexe d'euporium

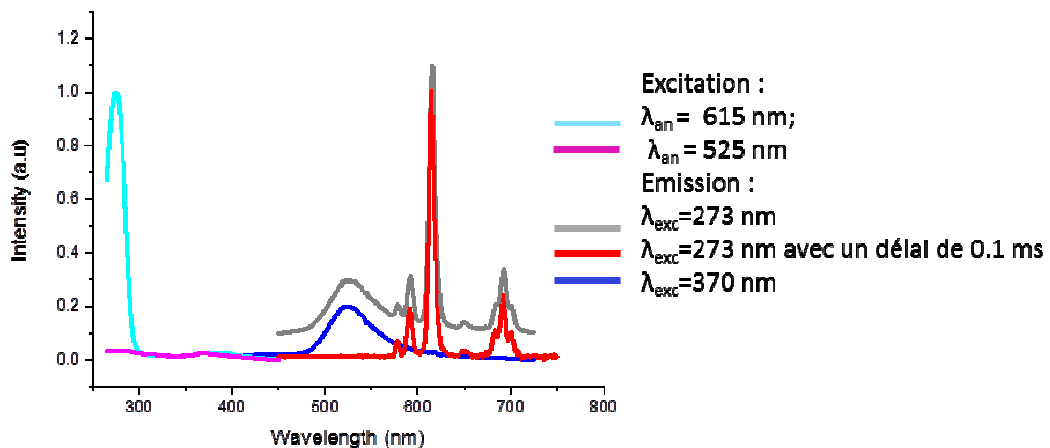


Figure III-23 : Spectres d'excitation et d'émission des QD fonctionnalisés avec des complexes d'euporium

Dans le cas de l'euporium (figure III-23), on retrouve la bande d'absorption du picolinate sur le spectre d'excitation mesuré à 615 nm correspondant au maximum d'émission de l'euporium. Une faible bande de 270 à 400 nm correspondant à l'absorption du quantum dot est également observée. Le spectre d'excitation à 525 nm montre une bande d'absorption caractéristique du quantum dot très faible, comparée à celle observée dans le cas des complexes de terbium.

En ce qui concerne les spectres d'émission, l'excitation dans la bande d'absorption du quantum dot à 370 nm donne son émission à 525 nm tandis que l'excitation à 273 nm dans les bandes d'absorption du picolinate et du quantum dot donne la double émission du quantum dot et du lanthanide. Ici encore, l'application d'un délai de 0.1 ms permet d'observer uniquement l'émission du lanthanide dû à son long temps de vie (figure III-23).

Cependant quelques différences sur les spectres d'excitation et d'émission du quantum dot par rapport au greffage de complexes de terbium sont observées :

- les bandes d'absorption et d'émission du QD sont beaucoup plus faibles
- le rapport entre les intensités d'émission du QD et du lanthanide est plus faible que dans le cas du terbium, ce qui est cohérent avec la valeur de rendement quantique du QD mesuré après le greffage des complexes d'euporium
- la présence de la bande d'absorption du QD dans le spectre d'excitation mesuré à 615 nm, ou le quantum dot n'émet pratiquement pas

- la possible présence de l'émission de l'euporium (très faible) à 615 et 700 nm correspondant aux raies d'émission les plus intenses lorsque le quantum dot est excité (figure III-24).

Ces deux derniers points peuvent suggérer la présence d'un transfert d'énergie entre le QD et le complexe d'euporium.

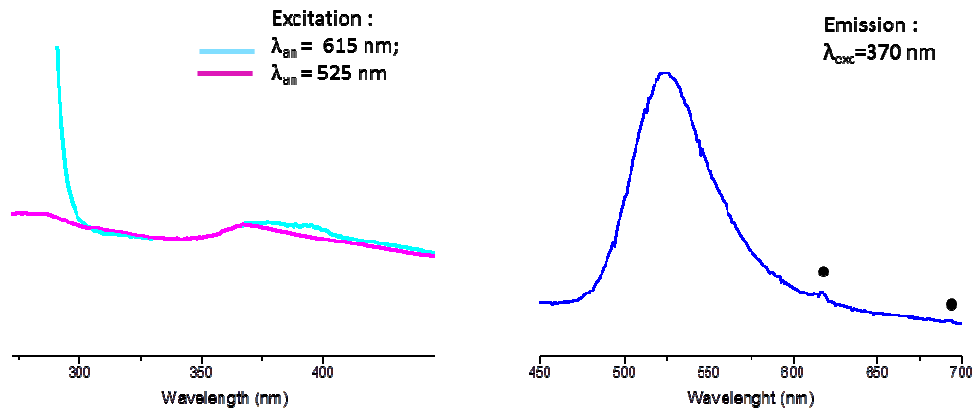


Figure III-24 : Spectres d'excitation et d'émission des QD fonctionnalisés avec des complexes d'euporium (zoom de la figure III-23)

- Complexe d'ytterbium

L'ytterbium émet dans le proche infrarouge et conduit à des propriétés optiques différentes pour ce système. Tout d'abord l'émission du QD et celle de l'ytterbium ne se recouvrent pas, on peut donc observer les deux entités séparément. Comme dans le cas des deux autres lanthanides, l'excitation à 370 nm dans la bande d'absorption du QD donne l'émission de celui-ci à 525 nm (en bleu). Mais ici, l'excitation à 370 nm permet aussi d'observer l'émission caractéristique des complexes d'ytterbium centrée à 980 nm (figure III-25).

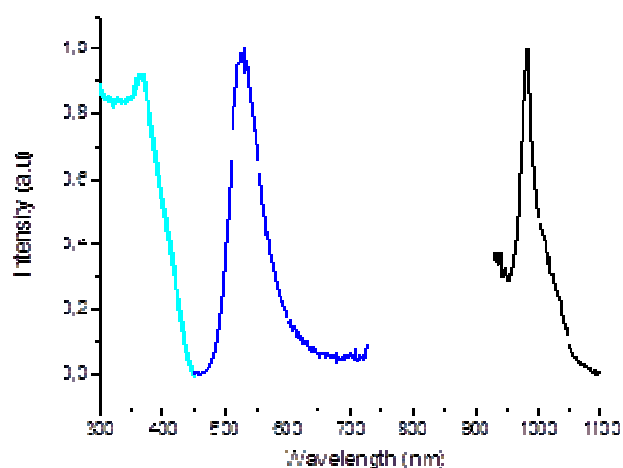


Figure III-25 : Spectres d'excitation ($\lambda_{an} = 525$ en cyan) et d'émission ($\lambda_{exc} = 370 \text{ nm}$ en bleu et noir) des quantum dots fonctionnalisés avec des complexes $[\text{Yb}(\text{ebpatcnSS})(\text{H}_2\text{O})]$

Par contre l'excitation à 275 nm sur la bande d'absorption du picolinate ne permet pas d'observer l'émission du complexe d'ytterbium. En effet, le chromophore picolinate n'est pas un bon sensibilisateur de l'ytterbium et la présence de la molécule d'eau entraîne des désexcitations non radiatives, défavorable à l'émission de l'ytterbium.

Ici aussi, comme dans le cas du greffage des complexes d'euporium, ces résultats suggèrent la présence d'un transfert d'énergie entre le QD et l'ytterbium puisque l'excitation dans la bande d'absorption du QD à 370 nm permet d'observer une faible émission de l'ytterbium à 980 nm.

- Temps de vie

Les différents temps de vie du quantum dot ont été mesurés par Daniel Imbert et sont résumés dans le tableau III-5. Un exemple de décroissance de la luminescence est donné dans la figure III-26.

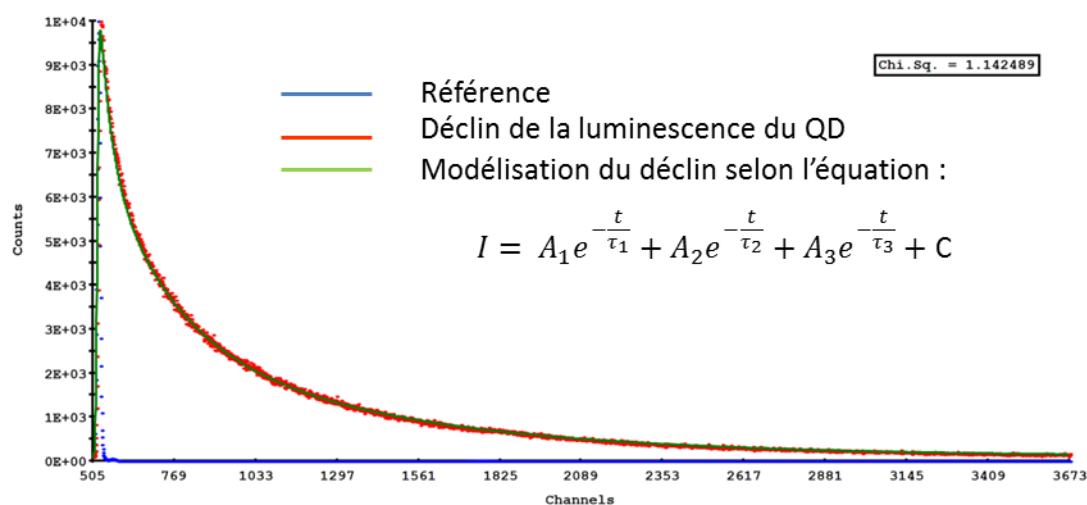


Figure III-26 : Décroissance de la luminescence des quantum dots InPZnS/ZnSe/ZnS-pen en PBS1X

Dans la figure III-26, la courbe rouge représente la décroissance de la luminescence en fonction du temps du quantum dot fonctionnalisé avec la pénicillamine. La modélisation de cette courbe, qui est représentée par la courbe verte, est une exponentielle à trois termes. Trois temps de vie (τ_i) peuvent être présentés pour ces quantum dots, ils sont résumés dans le tableau III-5. La courbe bleue correspond à la référence (ou prompt), qui permet d'apporter une correction à la réponse électronique de la nanoled.

Temps de vie	QD-pen	QD-Eu	QD-Tb	QD-Yb
N°1	3.9(1)	0.9(1)	3.3(1)	3.2(1)
N°2	22.9(1)	5.6(1)	18.9(1)	16.4(1)
N°3	83.6(1)	55.6(1)	71.8(1)	61.8(1)

Tableau III-5 : Temps de vie en ns des quantum dots InPZnS/ZnSe/ZnS en tampon PBS1X

Les quantum dots possèdent différents temps de vie de part la présence des différents semi-conducteurs présents dans le nanocrystal. Ici, on peut observer trois temps de vie différents pouvant correspondre au cœur et aux deux coquilles. Les temps de vie sont très courts, de l'ordre de la nanoseconde, ce qui est courant pour ce type de nanocristaux. Nous pouvons remarquer le lien entre le rendement quantique des quantum dots et les différents temps de vie, nous observons une diminution du temps de vie en présence de complexes de lanthanides, qui est du même ordre que celle de la diminution du rendement quantique. La baisse est très faible pour les nanocristaux fonctionnalisés avec les complexes de terbium, plus prononcée pour les complexes d'ytterbium et enfin très importante pour les complexes d'euporium.

Il est montré dans la littérature que l'efficacité du transfert d'énergie dans le cadre de l'interaction dipôle-dipôle peut être calculée par l'équation suivante :²²

$$\text{Equation III-1} : \eta = 1 - \frac{\tau}{\tau_0} = \left[1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6 \right]^{-1}$$

Avec :

- τ le temps de vie du donneur en présence de l'accepteur
- τ_0 le temps de vie du donneur en l'absence d'accepteur
- R la distance donneur-accepteur
- R_0 la distance pour laquelle le transfert est efficace à 50%

Dans notre cas, la diminution des temps de vie du quantum dot associée aux faibles valeurs de rendements quantiques en présence de complexes d'euporium et d'ytterbium suggèrent aussi un transfert d'énergie du QD, qui joue le rôle du donneur vers les deux lanthanides qui seraient les accepteurs. Cependant, l'efficacité du transfert ne peut pas être calculée par l'équation précédente car le type de mécanisme est mis en jeu nous est encore inconnu.

Les temps de vie des complexes de lanthanides sont donnés dans le tableau III-6.

EuebpatcnSS	QD-Eu	TbebpatcnSS	QD-Tb
0,49(1)	0,48(1)	0,92(1)	0,66(1)

Tableau III-6 : Temps de vie en ms des complexes d'euporium et terbium avant et après greffage sur les QD

Ceux-ci sont nettement plus longs, de l'ordre de la milliseconde ce qui permet d'observer sélectivement l'émission du complexe de lanthanide lorsqu'ils sont greffés sur les quantum dots en appliquant un délai de 0.1 ms. Nous pouvons noter que le temps de vie du complexe d'euporium ne varie pas lorsqu'il est greffé sur le nanocrystal. Par contre nous observons une diminution du temps de vie du complexe de terbium après greffage.

- Discussion

Très peu de changement dans les rendements quantiques et les temps de vie sont observés dans le cas de la fonctionnalisation des nanocristaux avec le complexe de terbium. En effet, dans ce cas, le transfert d'énergie du quantum dot vers le niveau 5D_4 du terbium ne semble pas lieu car son niveau d'énergie d'état excité est plus faible que celui de l'état excité du terbium (20500 cm^{-1}). La diminution du temps de vie du complexe de terbium lorsqu'il est greffé sur les nanocristaux peut s'expliquer par un "back transfert" vers les niveaux d'états excités du quantum dot.

Pour les complexes d'euprium et ytterbium, une diminution de rendement quantique des quantum dots et de leur temps de vie est observée. L'émission des quantum dots est beaucoup plus faible, suggérant que ce sont eux qui transfèrent l'énergie aux lanthanides. Tous ces résultats nous permettent de penser qu'un transfert d'énergie est possible entre le quantum dot et les complexes d'euprium et d'ytterbium, ce qui n'est pas le cas pour le complexe de terbium. En effet, l'émission des quantum dots se situant à 525 nm , ils ont des niveaux d'énergie suffisamment élevés pour peupler les niveaux 5D_0 (17500 cm^{-1}) de l'euprium et $^2F_{5/2}$ (10300 cm^{-1}) de l'ytterbium. Ce phénomène est plus marqué pour l'euprium que pour l'ytterbium car le niveau d'énergie de l'état excité du quantum dot (19000 cm^{-1}) est plus proche du niveau d'énergie de l'euprium (figure III-27). Il est également possible que des désexcitations non radiatives entrent en compétition avec le peuplement du niveau 5D_0 de l'euprium.

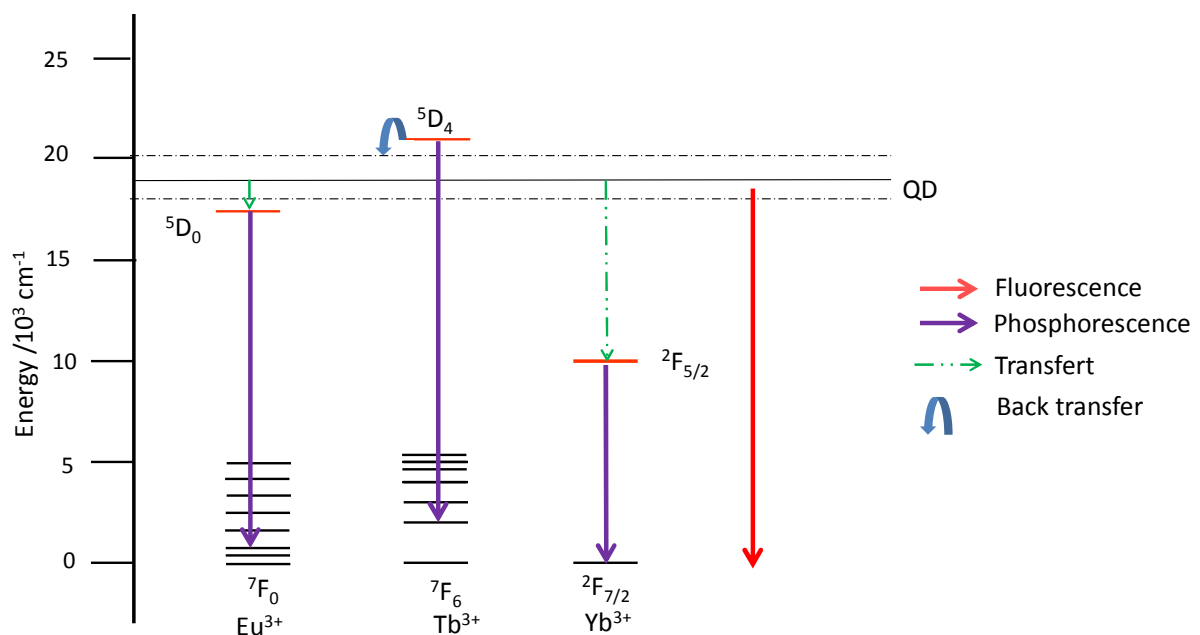


Figure III-27 : Niveaux d'énergie des ions Eu^{3+} , Tb^{3+} et Yb^{3+} et du quantum dot InPZnS/ZnSe/ZnS

En conclusion, trois complexes de lanthanides luminescents ont été greffés sur des quantum dots de type InPZnS/ZnSe/ZnS émettant à 525 nm . Le greffage des complexes de terbium n'entraîne pas de changements significatifs des propriétés optiques du quantum dots : son rendement quantique et son temps de vie sont légèrement plus faibles, un transfert d'énergie entre les deux entités

luminescentes n'est pas mis en évidence. Cependant, une diminution significative du temps de vie de l'émission du terbium caractéristique d'un "back transfert" est observée. Tous les processus d'absorption, de luminescence et de transfert d'énergie sur les quantum dots de type InP/ZnSe/ZnS greffés avec des complexes d'euporium et terbium sont regroupés dans la figure III-28. Les niveaux d'énergie des états excités du quantum dot se situant au-dessus des états excités de l'euporium, nous observons un transfert d'énergie du quantum dot vers le niveau d'énergie 5D_0 de l'euporium. Ceci se traduit par une diminution du rendement quantique et des temps de vie du nanocristal. Le même effet est observé de façon moins marqué pour le greffage de complexe d'ytterbium car le niveau d'énergie de son état excité est beaucoup plus éloigné. De plus, l'observation de l'émission de ces deux lanthanides en excitant le quantum dot confirme le transfert d'énergie. Le mécanisme de ce transfert n'est pas connu pour le moment.

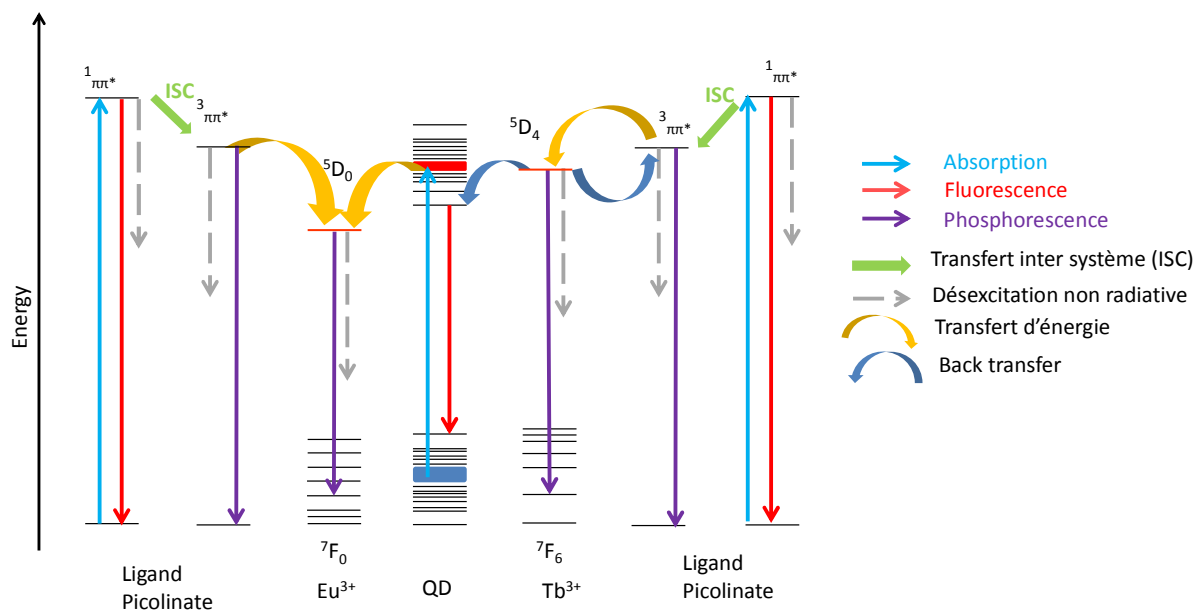


Figure III-28 : Mécanisme de luminescence des quantum dots greffés avec des complexes de lanthanides

5. Conclusion

Pour conclure, un greffage efficace de complexes de lanthanides a été réalisé sur des quantum dots de type InPZnS/ZnSe/ZnS émettant à 525 nm. L'incorporation de complexes de gadolinium possédant une vitesse d'échange optimisée a permis d'exalter l'effet de la taille sur l'augmentation de la relaxivité par gadolinium allant jusqu'à $45 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz. Comme attendu, l'étude de différents espaceurs permet de conclure qu'un espaceur très rigide conduit à un effet optimal sur la relaxivité ; alors qu'un espaceur plus long permet de greffer un plus grand complexe à la surface du nanocristal. Un compromis entre la rigidité et la flexibilité est obtenu avec l'espaceur méthylène mercaptophényle qui permet d'obtenir à la fois des relaxivités par gadolinium et par particule les

plus élevées. Ce système est très prometteur pour de futures applications comme sondes bimodales en imagerie *in vivo*.

Le greffage des complexes de lanthanides luminescents dans le visible et le proche infrarouge sur les quantum dots nous permet d'étudier les différents transferts d'énergie qu'il peut y avoir entre deux. Lorsque le niveau d'énergie de l'état excité de l'ion Ln^{3+} est plus bas que celui du quantum dot, l'excitation du quantum dot peut peupler le niveau d'énergie d'état excité du lanthanide et celui-ci réémet cette énergie sous forme de lumière, synonyme de transfert d'énergie. Par contre, lorsque le niveau de l'état excité du lanthanide est plus haut que celui du quantum dot, il peut y avoir une possibilité de "back transfert". Ce transfert peut être modulé en ajustant l'émission du quantum dot utilisé : une émission déplacée vers le rouge permettra de n'avoir aucun transfert d'énergie alors que déplacée vers le bleu, elle peut être également servir d'antenne pour les complexes de terbium.

6. Références

1. L. Frullano and T. Meade, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2007, **12**, 939-949.
2. M. M. Hüber, A. B. Staubli, K. Kustedjo, M. H. B. Gray, J. Shih, S. E. Fraser, R. E. Jacobs and T. J. Meade, *Bioconjugate Chemistry*, 1998, **9**, 242-249.
3. E. Vucic, H. M. H. F. Sanders, F. Arena, E. Terreno, S. Aime, K. Nicolay, E. Leupold, M. Dathe, N. A. J. M. Sommerdijk, Z. A. Fayad and W. J. M. Mulder, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 406-407.
4. S. M. Vithanaratchi and M. J. Allen, *Chemical Communications*, 2013, **49**, 4148-4150.
5. T. Koullourou, L. S. Natrajan, H. Bhavsar, Pope, J. Feng, J. Narvainen, R. Shaw, E. Scales, R. Kauppinen, A. M. Kenwright and S. Faulkner, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 2178-2179.
6. J. B. Livramento, E. Toth, A. Sour, A. Borel, A. E. Merbach and R. Ruloff, *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, **44**, 1480-1484.
7. G. Dehaen, S. V. Eliseeva, P. Verwilt, S. Laurent, L. Vander Elst, R. N. Muller, W. De Borggraeve, K. Binnemans and T. N. Parac-Vogt, *Inorganic Chemistry*, 2012, **51**, 8775-8783.
8. L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Villette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud and E. Toth, *Chemical Communications*, 2008, 6591-6593.
9. C. S. Bonnet, F. Buron, F. Caillé, C. M. Shade, B. Drahoš, L. Pellegatti, J. Zhang, S. Villette, L. Helm, C. Pichon, F. Suzenet, S. Petoud and É. Tóth, *Chemistry – A European Journal*, 2012, **18**, 1419-1431.
10. F. A. Rojas-Quijano, E. T. Benyó, G. Tircsó, F. K. Kálmán, Z. Baranyai, S. Aime, A. D. Sherry and Z. Kovács, *Chemistry – A European Journal*, 2009, **15**, 13188-13200.
11. M. Regueiro-Figueroa, A. Nonat, G. A. Rolla, D. Esteban-Gómez, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, L. J. Charbonnière, M. Botta and C. Platas-Iglesias, *Chemistry – A European Journal*, 2013, **19**, 11696-11706.
12. G. Tallec, P. H. Fries, D. Imbert and M. Mazzanti, *Inorganic Chemistry*, 2011, **50**, 7943-7945.
13. I. Mamedov, T. N. Parac-Vogt, N. K. Logothetis and G. Angelovski, *Dalton Transactions*, 2010, **39**, 5721-5727.
14. S. Lacerda, C. S. Bonnet, A. Pallier, S. Villette, F. Foucher, F. Westall, F. Buron, F. Suzenet, C. Pichon, S. Petoud and É. Tóth, *Small*, 2013, **9**, 2662-2666.
15. C. Burda, X. Chen, R. Narayanan and M. A. El-Sayed, *Chemical Reviews*, 2005, **105**, 1025-1102.

16. X. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons and S. Nie, *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, **16**, 63-72.
17. J. Yao, M. Yang and Y. Duan, *Chemical Reviews*, 2014, **114**, 6130-6178.
18. L. Prinzen, R.-J. J. H. M. Miserus, A. Dirksen, T. M. Hackeng, N. Deckers, N. J. Bitsch, Megens, K. Douma, J. W. Heemskerk, M. E. Kooi, P. M. Frederik, D. W. Slaaf, M. A. M. J. van Zandvoort and C. P. M. Reutelingsperger, *Nano Letters*, 2007, **7**, 93-100.
19. B. Lin, X. Yao, Y. Zhu, J. Shen, X. Yang and C. Li, *RSC Advances*, 2014, **4**, 20641-20648.
20. J. Shen, Y. Li, Y. Zhu, X. Yang, X. Yao, J. Li, G. Huang and C. Li, *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, **3**, 2873-2882.
21. R. Hu, Y. Wang, X. Liu, G. Lin, C. H. Tan, W.-C. Law, I. Roy and K.-T. Yong, *RSC Advances*, 2013, **3**, 8495-8503.
22. C. Piguet, J. C. G. Buenzli, G. Bernardinelli, G. Hopfgartner and A. F. Williams, *Journal of the American Chemical Society*, 1993, **115**, 8197-8206.
23. S. Faulkner and S. J. A. Pope, *Journal of the American Chemical Society*, 2003, **125**, 10526-10527.
24. M. S. Tremblay and D. Sames, *Chemical Communications*, 2006, 4116-4118.
25. M. P. Placidi, A. J. L. Villaraza, L. S. Natrajan, D. Sykes, A. M. Kenwright and S. Faulkner, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 9916-9917.
26. A. Nonat, M. Regueiro-Figueroa, D. Esteban-Gómez, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, C. Platas-Iglesias and L. J. Charbonnière, *Chemistry – A European Journal*, 2012, **18**, 8163-8173.
27. A. Zaïm, S. V. Eliseeva, L. Guénée, H. Nozary, S. Petoud and C. Piguet, *Chemistry – A European Journal*, 2014, **20**, 12172-12182.
28. L. J. Charbonnière and N. Hildebrandt, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2008, 3241-3251.
29. N. Hildebrandt, L. J. Charbonnière, M. Beck, R. F. Ziessel and H.-G. Löhmannsröben, *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, **44**, 7612-7615.
30. L. J. Charbonnière, N. Hildebrandt, R. F. Ziessel and H.-G. Löhmannsröben, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 12800-12809.
31. D. Geißler, L. J. Charbonnière, R. F. Ziessel, N. G. Butlin, H.-G. Löhmannsröben and N. Hildebrandt, *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**, 1396-1401.
32. V. Brunetti, H. Chibli, R. Fiammengo, A. Galeone, M. A. Malvindi, G. Vecchio, R. Cingolani, J. L. Nadeau and P. P. Pompa, *Nanoscale*, 2013, **5**, 307-317.
33. S. Xu, J. Ziegler and T. Nann, *Journal of Materials Chemistry*, 2008, **18**, 2653-2656.
34. L. Li and P. Reiss, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 11588-11589.
35. S. Tamang, G. Beaune, I. Texier and P. Reiss, *Acs Nano*, 2011, **5**, 9392-9402.
36. G. J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Poillot, M. Giardiello, C. Tisseyre, E. L. Barbier, P. H. Fries, M. de Waard, P. Reiss and M. Mazzanti, *Acs Nano*, 2011, **5**, 8193-8201.
37. G. J. Stasiuk, S. Tamang, D. Imbert, C. Gateau, P. Reiss, P. Fries and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2013, **42**, 8197-8200.
38. J. Lim, W. K. Bae, D. Lee, M. K. Nam, J. Jung, C. Lee, K. Char and S. Lee, *Chemistry of Materials*, 2011, **23**, 4459-4463.

Greffage de complexes de lanthanides sur les oligonucléotides

1. ADN	121
a) Généralités	121
b) Sondes ADN-complexes de lanthanides.....	123
c) Objectifs et travaux antérieurs.....	127
2. Dérivés de la dpaa	128
a) GddpaarU	128
b) GddpaarUdT	129
3. Dérivés de l'ebpatcn	131
a) Synthèse	131
b) Relaxivité	132
4. Conclusion	135
5. Références	135

Greffage de complexes de lanthanides sur les oligonucléotides

1. ADN

a) Généralités

L'information génétique codée de tous les êtres vivants est dans un langage universel au sein de l'acide désoxyribonucléique ou ADN. L'ADN est un polynucléotide, macromolécule découverte grâce aux travaux de Griffith puis Avery et ses collaborateurs¹ et dont la structure en double hélice a été élucidée par Watson et Crick en 1953,² leur valant le prix Nobel en 1962.

L'ADN est une macromolécule biologique dont les unités de bases sont les nucléotides. Ils résultent de la combinaison d'un groupement phosphate, d'un pentose (le 2-désoxy-D-ribose) et d'une base azotée à noyau purique (adénine, guanine) ou pyrimidique (thymine, cytosine) désignée par les lettres A, G, T et C (figure IV-1). On appelle un nucléoside une base substituée par un sucre. La phosphorylation de l'hydroxyle en position 5' du sucre donne un nucléotide. Chaque brin d'ADN est formé par des nucléotides liés entre eux par une liaison phosphodiester entre l'extrémité 5' et 3' des sucres portés par deux nucléotides adjacents. Chaque brin d'ADN est chargé négativement.

De part leur structure, les bases azotées ont la propriété de former des liaisons hydrogène entre elles de façon spécifique. L'adénine se lie à la thymine par deux liaisons hydrogène, l'association guanine-cytosine en fait intervenir trois. Cet appariement exclusif entre bases azotées conduit à l'association de deux brins d'ADN liés par des liaisons hydrogène. L'assemblage de deux brins conduit à la formation d'un édifice chimique dont la structure est une double hélice d'un diamètre constant de 2 nm. L'hélice formée comporte deux zones d'enroulement distincts : un petit et un grand sillon (figure IV-1). L'orientation d'un brin est de 5'phosphate vers 3'OH pour l'un des brins et de 3'OH vers 5'phosphate pour l'autre ; on dit qu'ils sont antiparallèles.

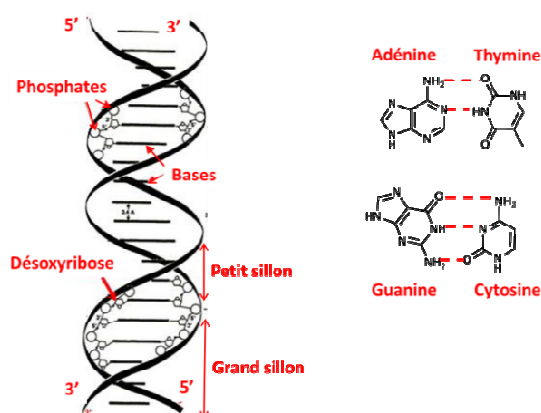


Figure IV-1 : Structure de la molécule d'ADN et association des bases azotées complémentaires

La structure en double hélice de l'ADN, appelée conformation B, est une des structures polymorphes de l'ADN existant dans le vivant. On en dénombre 21, chacune désignée par une lettre de l'alphabet. Les différents polymorphes de l'ADN sont caractérisés par leur structure, leur sens d'enroulement et le pas d'enchaînement des bases. Trois des 21 conformations sont majoritaires dans le vivant : la conformation B, la conformation A (hélice droite) et la conformation Z (enroulement gauche en zigzag). On peut également retrouver des structures tertiaires du type triplex ou quadruplex. Une structure de type triplex est composée d'une molécule d'ADN bicaténaire autour duquel un troisième brin s'apparie par l'intermédiaire du grand sillon *via* des liaisons hydrogène. La présence de palindromes, des répétitions inversées ou en miroir des bases, peut produire des structures cruciformes ou en épingle à cheveux, par appariement intra-brin.

La succession de bases guanine permet la formation de liaisons hydrogène entre 4 bases : cet appariement forme un quartet plan de guanine. Ces quartets sont stabilisés par la présence d'un cation, souvent le sodium, encapsulé au centre du quartet de guanine. Ces quartets s'empilent parallèlement pour former un G-quadruplex d'ADN (figure IV-2).

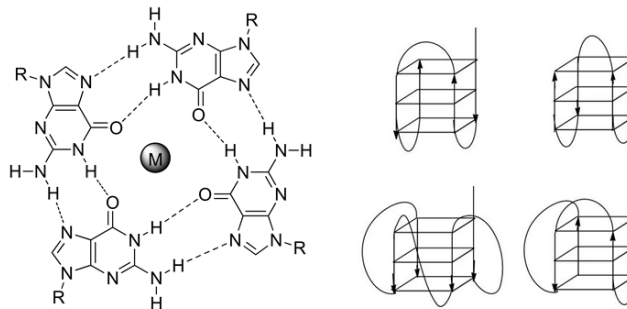


Figure IV-2 : Liaisons hydrogène dans un G-quartet et structure intramoléculaire des G quadruplex

Dans la cellule eucaryote, l'ADN est contenu dans le noyau. Il est associé à des protéines, les histones, autour desquelles il s'enroule formant une substance visqueuse appelée chromatine. Chaque segment d'ADN enroulé sur ses histones forme un nucléosome. L'assemblage ADN-histone s'enroule à nouveau sur lui-même pour former une structure plus compacte appelée chromosome. Le nombre de chromosomes par cellule est caractéristique d'une espèce. Par exemple, les cellules humaines contiennent 2x23 chromosomes diploïdes chacune.

Malgré cet énorme degré de compaction, l'ADN doit être rapidement accessible afin de permettre son interaction avec la machinerie cellulaire et assurer le transfert de l'information génétique selon le processus : réplication, transcription et traduction. Une seule perturbation au cours de ces trois étapes peut entraîner de graves conséquences : maladies génétiques, congénitales ou encore des cancers.

L'ADN possède une réactivité non négligeable vis-à-vis d'agents endogènes et exogènes. Différents processus comme l'hydrolyse, l'oxydation, l'alkylation, des réactions photochimiques, les radiations ionisantes peuvent endommager la molécule d'ADN. Les lésions qui en résultent ont des conséquences directes sur la réplication et la transcription. Heureusement les cellules disposent de divers moyens pour prévenir la formation des dommages et pour réparer l'ADN en cas de lésions.

Chez les mammifères, on distingue six voies de réparation de l'ADN possédant un mécanisme qui lui est propre : la réparation par réversion directe, par excision de base, par excision de nucléotides, par recombinaison homologe, par suture des extrémités et enfin la réparation des mésappariements.

Comprendre comment interagit l'ADN avec les protéines ou divers agents exogènes au niveau moléculaire est essentiel pour permettre le développement de nouveaux candidats médicaments ainsi que de nouveaux outils de diagnostic performants. Ces outils de diagnostic peuvent permettre une détection plus tôt de certaines maladies comme les tumeurs. Dans le cadre de ce chapitre, nous nous intéressons à ces outils mettant en jeu sur des complexes de lanthanides d'abord à travers des exemples issus de la littérature.

b) Sondes ADN-complexes de lanthanides

Comme il a été vu dans l'introduction, lier un complexe de gadolinium à une macromolécule permet de ralentir le temps de corrélation rotationnelle et donc d'optimiser la relaxivité. L'étude des interactions de l'ADN avec des éléments endogènes et exogènes permet d'étudier les niveaux d'expression des gènes, l'identification des virus et bactéries pathogènes ou encore des troubles génétiques. Des sondes ADN sont alors conçues pour pouvoir détecter ces interactions notamment grâce à l'IRM ou l'imagerie optique. Deux exemples très récents utilisent les complexes de lanthanides pour quantifier l'ADN.^{3,4} L'incorporation de ces complexes sur la macromolécule d'ADN, permet également d'optimiser la relaxivité. Dans cette partie deux catégories d'interaction avec l'ADN mettant en jeu des complexes de gadolinium dans la littérature vont être présentées : tout d'abord l'interaction non covalente et le greffage covalent des complexes sur des séquences d'ADN. Toutes deux ont le même objectif, la conception de sondes ADN pour comprendre les interactions avec le milieu endogène ou exogène.

- *Interaction non covalente*

Différentes interactions sont mises en œuvre pour la conception de sondes ADN de façon non covalente. Elles peuvent mettre en jeu des liaisons hydrogène, électrostatiques, de coordination ou de π -stacking. Elles déterminent la voie de reconnaissance de l'ADN, par le grand sillon, le petit sillon ou par un phénomène d'intercalation entre les paires de bases de l'ADN.

Peu de complexes de gadolinium sont conçus dans le but d'interagir avec l'ADN de façon non covalente. Le premier exemple décrit par le groupe de Caravan consiste en l'interaction non covalente d'un peptide de type HTH (helix-turn-helix) complexé par un ion Gd(III) avec l'ADN (figure IV-3).⁵ Les études de relaxivité montrent une augmentation de 21.2 à 42.4 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz en présence d'un équivalent d'ADN.

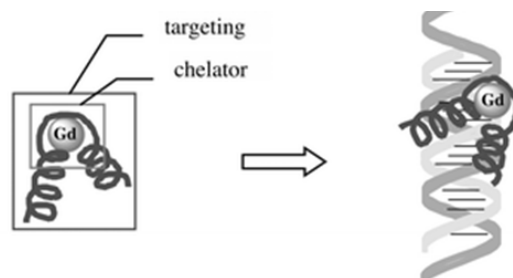


Figure IV-3 : Représentation de l'interaction du peptide HTH complexé avec du Gd(III) avec l'ADN⁵

Le second exemple est un agent qui s'intercale dans l'ADN grâce à un noyau aromatique, le thiazole orange, fonctionnalisé par le complexe GdDTPA *via* un espaceur aminohexanoate (figure IV-4-A).⁶ Après ajout d'ADN la relaxivité augmente de 4.23 à 6.5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 37°C. L'augmentation de la relaxivité est faible dans ce cas à cause de la flexibilité de l'espaceur qui engendre une rotation du complexe quasiment indépendante de celle de l'adduit ADN-thiazole orange. Enfin le dernier exemple décrit par le groupe de Pope, montre l'utilisation de deux complexes dérivés du DOTA liés entre eux par un noyau anthraquinone connu pour être un intercalant de l'ADN (figure IV-4-B).⁷ Ce travail montre une augmentation de la relaxivité de 5.4 à 11.7 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 30 MHz et 37°C en présence d'ADN, significatif d'un système tournant lentement.

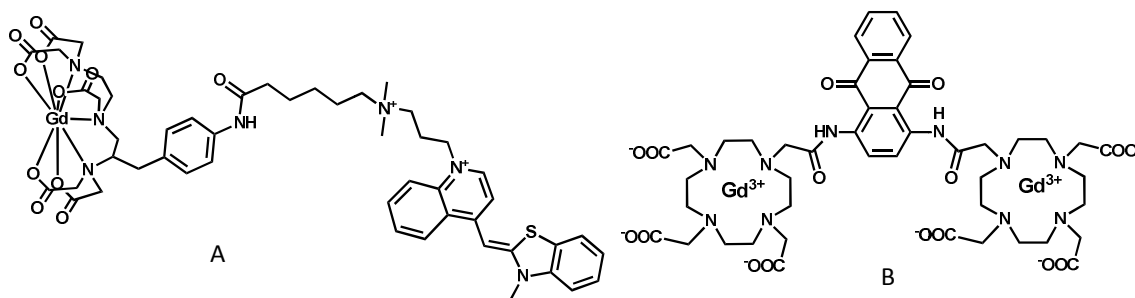


Figure IV-4 : Complexes de Gd(III) fonctionnalisés avec des intercalants de l'ADN(A⁶B⁷)

- *Greffage sur l'ADN*

La seconde stratégie pour la conception de sondes ADN est de greffer de manière covalente les complexes de gadolinium sur l'ADN. La majorité des exemples de la littérature concerne les aptamères. Les aptamères sont des courtes séquences d'ADN ou d'ARN capables de se lier spécifiquement à une cible avec une haute affinité. Ils sont obtenus par un processus de screening appelé "systematic evolution of ligands by exponential enrichment" (SELEX) d'une librairie de d'ADN ou ARN allant jusqu'à 10^5 séquences et des cibles allant des petites molécules aux protéines.⁸⁻¹⁰ La fonctionnalisation des aptamères avec des complexes de gadolinium permet d'optimiser à la fois les propriétés pharmacocinétiques des agents de contraste (en ciblant spécifiquement une protéine ou des cellules) et leurs propriétés relaxométriques (par effet de taille ou par effet de structure).

Par exemple, la fonctionnalisation du complexe GdDTPA avec un oligonucléotide de 6 unités (figure IV-5) permet de cibler le 5S rARN par complémentarité de séquence dans le but de cibler les séquences ARN surexprimées dans les cellules cancéreuses.¹¹ Dans cet exemple, une augmentation de la relaxivité du complexe GdDTPA lié à l'oligonucléotide de 4.3 à 8.8 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 270 MHz et 27°C est observée. Lors de la liaison de l'aptamère à sa cible, une augmentation supplémentaire de 16% de la relaxivité est observée due à l'augmentation de la taille du système.

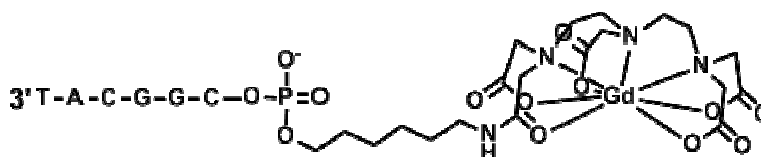


Figure IV-5 : Fonctionnalisation d'un complexe GdDTPA par un oligonucléotide¹¹

Un autre exemple montre une diminution de la relaxivité en présence de la molécule cible qui est ici l'adénosine. Il s'agit d'un dérivé du DOTA fonctionnalisé avec un oligonucléotide dont la séquence est complémentaire à celle d'une partie d'un aptamère lié à une streptavidine (figure IV-6).¹² En absence d'adénosine, les deux brins sont hybridés, conduisant à un système rigide avec un haut poids moléculaire. En présence d'adénosine, l'aptamère se désapparie du brin contenant le complexe de Gd pour se lier à l'adénosine. La diminution du poids moléculaire et de la rigidité du système conduit à une baisse de la relaxivité de 12.2 à 9.2 mM⁻¹s⁻¹ à 60 MHz en présence de 100 équivalents d'adénosine.

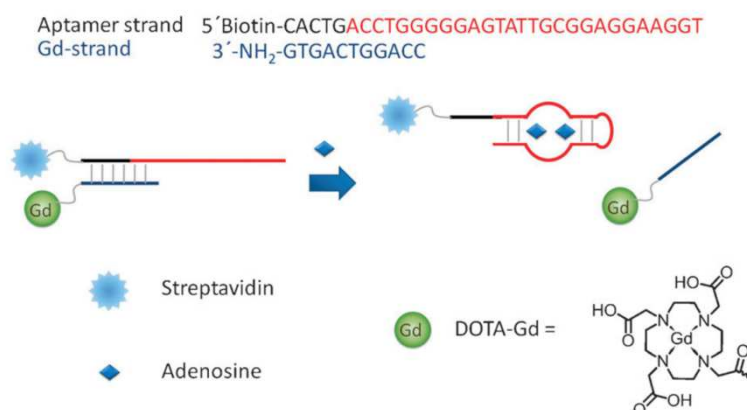


Figure IV-6 : Design d'un agent de contraste basé sur un aptamère ciblant l'adénosine¹²

Un aptamère de 15 unités ciblant la thrombine est conjugué au complexe GdDTPA *via* un lien amide. Une amélioration de la relaxivité de 35 et 20% est observée en présence de thrombine comparée à une protéine contrôle à 400 et 60 MHz.¹³ Des études de transmétallation montrent que la conjugaison à l'aptamère ne modifie pas les stabilités cinétique et thermodynamique par rapport au GdDTPA.

Des structures polycaténaires d'ADN peuvent être aussi utilisées en tant que structure rigide sur laquelle un complexe de gadolinium est greffé. Ceci permet d'allonger le temps de corrélation rotationnelle afin d'optimiser la relaxivité, en augmentant le poids moléculaire et la rigidité du système. La formation de G-quadruplex en présence de complexe de GdDOTA conduit à une augmentation de 6.4 à 11.7 mM⁻¹s⁻¹ à 170 MHz et 20°C (figure IV-7).¹⁴

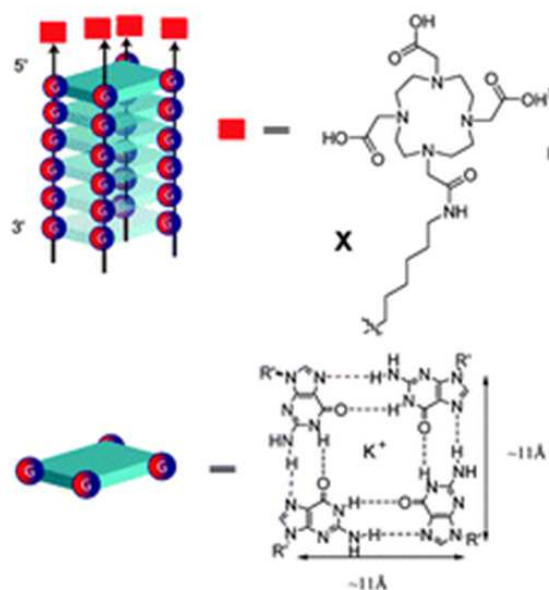


Figure IV-7 : Représentation schématique d'un G-quadruplex fonctionnalisé avec des complexes de Gd(III)

D'autres exemples associent des complexes de Gd(III) et des oligonucléotides avec des nanoparticules d'or. L'utilisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des complexes dérivés de GdDOTA et d'oligonucléotides est reportée par le groupe de Maede. Cinq complexes de GdDOTA sont couplés à un oligonucléotide de 24 unités, fonctionnalisé pour promouvoir le greffage sur les particules d'or.¹⁵ Alors que le complexe couplé à l'ADN possède une relaxivité de $8.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 37°C , la fonctionnalisation des particules d'or avec ce système permet d'augmenter la relaxivité jusqu'à $20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 37°C . En changeant la forme de la particule (de sphérique à étoilée, figure IV-8), une augmentation de la relaxivité est observée jusqu'à $55 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 37°C , attribuée à un effet de seconde sphère plus important que pour les particules sphériques.

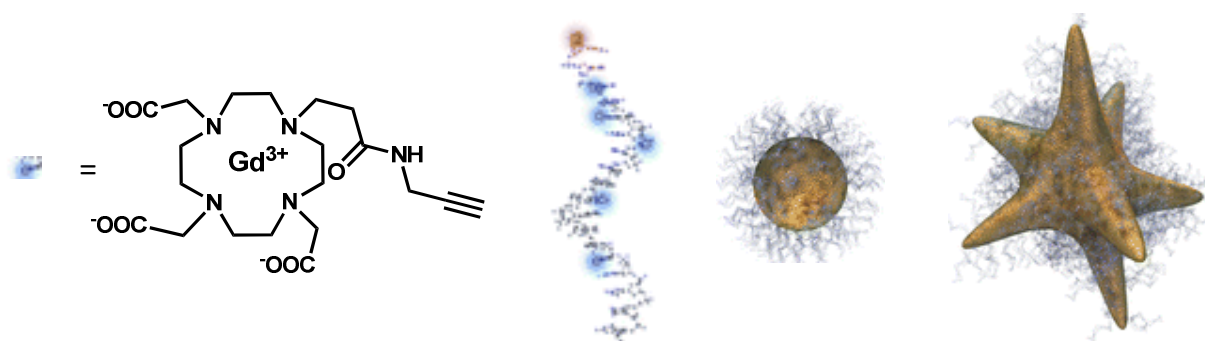


Figure IV-8 : Systèmes basés sur des complexes de Gd(III) fonctionnalisés avec des oligonucléotides sur des particules d'or

c) Objectifs et travaux antérieurs

Les exemples précédents soulignent l'intérêt de l'utilisation de complexes de Gd(III) dont la relaxivité change en présence d'ADN pour la conception de sondes ADN. Notre but ici est de développer un outil méthodologique en utilisant un complexe de gadolinium développé au laboratoire dans l'optique de détecter des changements de taille ou de structure et/ou d'éventuelles interactions de l'ADN. Ce projet, en collaboration avec Didier Gasparutto et Christine Saint-Pierre du laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (INAC/SCIB/LAN, CEA-Grenoble), consiste à greffer des complexes de gadolinium sur des oligonucléotides et étudier la variation de la relaxivité en fonction du poids moléculaire et de la structure du système. La taille de l'oligonucléotide et la structure plus ou moins rigide pourrait permettre d'étudier l'influence de ces paramètres sur la relaxivité et notamment l'allongement du temps de corrélation rotationnelle.

Le couplage *via* la réaction d'Huisgen est une chimie très utilisée au laboratoire LAN pour greffer des marqueurs tels que des sondes fluorescentes¹⁶ ou encore TEMPO¹⁷ sur des oligonucléotides. Nous nous sommes appuyés sur cette expertise pour fonctionnaliser les oligonucléotides contenant une fonction alcyne avec des complexes de lanthanides contenant une fonction azoture. Des travaux préliminaires avec le complexe $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$ et un nucléoside modèle ont été effectués au laboratoire pour valider la chimie de couplage et obtenir une première preuve de principe. Le complexe $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$ est choisi pour sa relaxivité élevée conférée par la présence de trois molécules d'eau dans la sphère interne ($r_1 = 9.62 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C) et pour sa vitesse d'échange relativement élevée pour ne pas être limitante dans le cas d'un gros complexe ($k_{ex} = 10 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25 °C). De plus, la synthèse d'analogue de ce complexe possédant une fonction réactive sur le bras acétate est facile à réaliser en remplaçant la glycine par un autre acide aminé, ce qui permet à la fois une versatilité dans les fonctions de couplage et de conserver la sphère de coordination afin de préserver les propriétés du complexe (figure IV-9). La relaxivité du complexe fonctionnalisé avec un nucléoside est augmentée par rapport au complexe seul et atteint une valeur de $16 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C. La position de greffage du complexe sur le nucléoside n'a pas d'influence sur cette augmentation de relaxivité. Pour valider cette étude préliminaire, la synthèse du composé GddpaarU est reproduite et les mesures de relaxivité sont menées à différents champs.

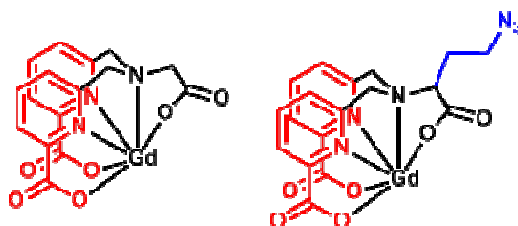


Figure IV-9 : Les complexes $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$ et $[Gd(dpaaN_3)(H_2O)_3]$

2. Dérivés de la dpaa

a) GddpaarU

- *Synthèse*

La réaction d'Huisgen entre le nucléoside modèle uridine (rU) comportant une fonction alcyne en position 2' et le ligand $N_3dpaaOEt$ dont les fonctions acide carboxylique sont protégées avec des esters permet la formation du cycle triazole. Cette réaction, effectuée dans le DMSO est catalysée par le Cu(I), qui est retiré à la fin de la réaction par des lavages à l'aide d'une solution d'EDTA. Le produit est obtenu avec un rendement de 63%. Il est ensuite déprotégé par saponification en présence d'hydroxyde de potassium dans un mélange eau/éthanol. Le ligand est obtenu après précipitation du sel de potassium avec un rendement de 84%. Un équivalent de $GdCl_3$ est ensuite ajouté dans une solution de formiate d'ammonium contenant le ligand. Le complexe résultant est purifié par HPLC semi-préparative puis lyophilisé. La caractérisation de ce complexe est effectuée par spectrométrie de masse (MALDI ToF-MS).

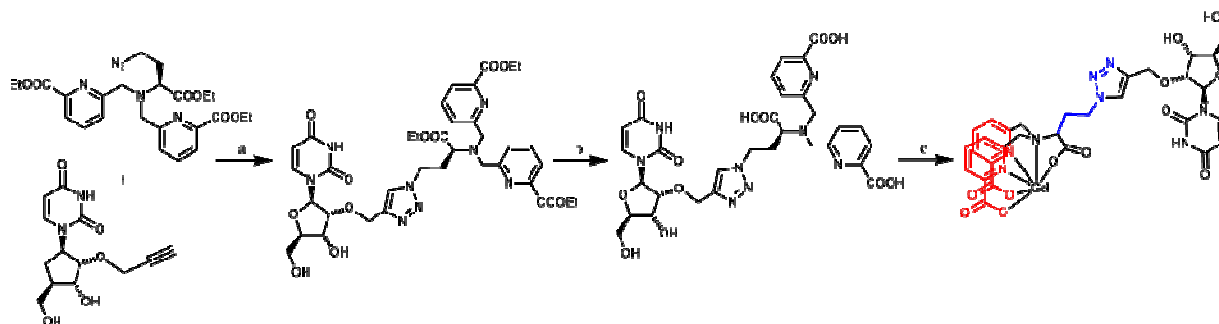


Figure IV-10 : Synthèse de GddpaarU (a) : CuI, DMSO ; (b) KOH, H₂O/EtOH ; (c) GdCl₃, NH₄COOH 25mM

- *Relaxivité*

Les mesures de relaxivité précédemment effectuées sur ce composé modèle sont confirmées puis d'autres valeurs à différents champs magnétiques sont obtenues. La concentration en gadolinium est déterminée par différence de susceptibilité paramagnétique et par ICP-MS, celle en oligonucléotides par mesure d'absorbance (voir détails en partie expérimentale). Ces trois techniques donnent des valeurs de 0.05 mM d'écart, ce qui représente une erreur de 5% sur la relaxivité. Les valeurs de relaxivité sont données dans la figure IV-11.

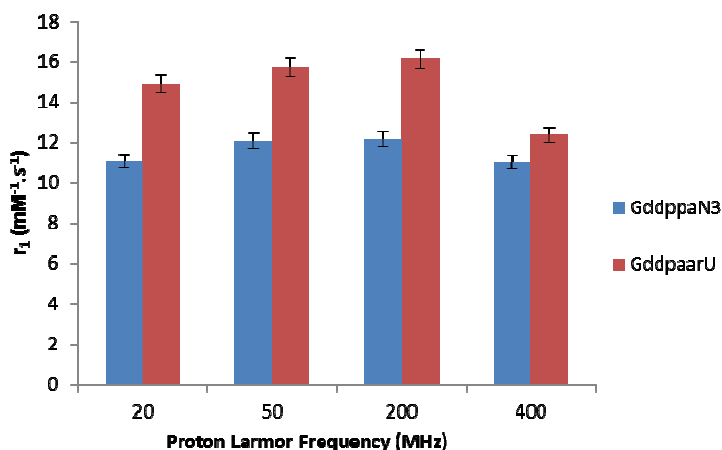


Figure IV-11 : Relaxivité à différents champs des complexes $[\text{Gd}(\text{dpaaN}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]$ et $[\text{Gd}(\text{dpaarU})(\text{H}_2\text{O})_3]$ ($c=1.3 \text{ mM}$, 25°C , $\text{pH}=7.4$)

La relaxivité des complexes de Gddpaa greffés avec un nucléoside est 50% plus élevée que le complexe non greffé, que ce soit à bas champ ou à haut champ. Le maximum de la relaxivité se situe à 200 MHz, montrant que le poids moléculaire du complexe est particulièrement adapté pour des champs plus élevés. En effet, il a été vu dans l'introduction que des valeurs intermédiaires de temps de corrélation rotationnelle favorisaient la relaxivité aux champs élevés.

b) GddpaarUdT

- *Synthèse*

Cette étude modèle est transposée à des oligonucléotides de taille plus importante. Pour ce faire, la stratégie sur support (sur billes de silice) est utilisée en vue de greffer des complexes de gadolinium sur des oligonucléotides plus longs. Ce support est couramment utilisé pour la synthèse de brins d'ADN modifiés car il permet de retirer plus facilement les réactifs par différents lavages. La synthèse du composé dimère GddpaarUdT est ainsi effectuée sur support. Le dimère rUpropdT sur billes de silice, le ligand protégé N₃dpaaOEt et l'iodure de cuivre sont incubées dans DMSO en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) pendant 24h à 35°C. Le milieu réactionnel est ensuite lavé à l'aide d'une solution d'EDTA pour retirer le cuivre présent puis la saponification du ligand et la libération du dimère du support solide sont effectuées simultanément par traitement à la soude dans un mélange eau/éthanol. Le composé obtenu est purifié par HPLC puis lyophilisé. Un excès d'une solution de chlorure de gadolinium à 50 mM dans l'eau est ajouté et le complexe obtenu est purifié par HPLC semi préparative. La caractérisation de ce complexe est effectuée par spectrométrie de masse MALDI ToF.

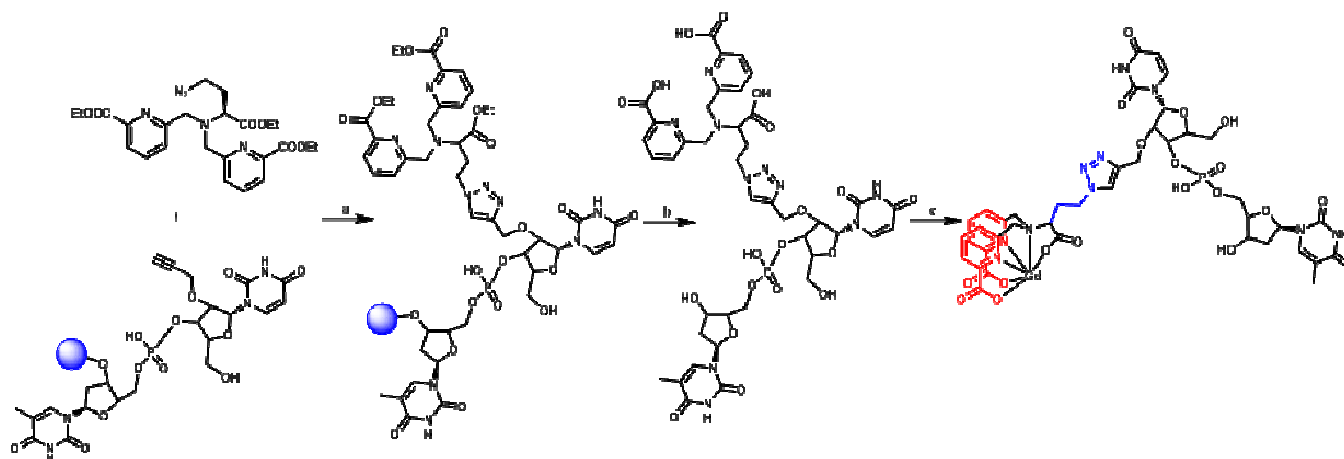


Figure IV-12 : Synthèse du $[\text{Gd}(\text{dpaarUdT})(\text{H}_2\text{O})_3]$ sur support solide (a) : CuI , DIEA, DMSO ; (b) NaOH , $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$; (c) GdCl_3 , NH_4COOH 25mM

- *Relaxivité*

De la même manière que précédemment, les mesures de relaxivité sont effectuées sur le complexe de Gddppa greffé sur ce dimère. En augmentant le poids moléculaire du système, on devrait s'attendre à obtenir des valeurs de relaxivité plus élevées, notamment à bas champ. Cependant les valeurs obtenues sont beaucoup plus faibles, non seulement par rapport au monomère mais aussi par rapport au complexe non greffé. L'étude des mesures de concentration en gadolinium est approfondie et l'analyse par ICP-MS donne des valeurs beaucoup plus faibles que celles mesurées par susceptibilité paramagnétique et absorbance UV.

Nous supposons que le cuivre reste piégé dans le support solide après la réaction. Le traitement basique conduit alors à la libération du cuivre qui est piégé par le ligand dpaa. Nous avons essayé de déplacer le cuivre par différents traitements chimiques : acide, base, chélateur, ajout jusqu'à 100 équivalents de chlorure de gadolinium, en vain. Plusieurs alternatives peuvent être envisagées pour éviter l'utilisation de cuivre en tant que catalyseur dans la réaction d'Huisgen. La première est l'utilisation d'une cyclooctyne, dont la réactivité est plus élevée que celle de l'alcyne grâce à son cycle tendu. La seconde voie est d'utiliser un complexe plus stable vis-à-vis du gadolinium. En effet, la présence de trois molécules d'eau dans la sphère interne du métal rend le complexe Gddpaa peu stable. Nous avons choisi d'utiliser le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcn}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]$, qui est plus stable que les complexes dérivés de la dpaa. De plus, il possède une vitesse d'échange améliorée, qui ne sera pas un facteur limitant de l'augmentation de la relaxivité induite lors de la liaison à l'oligonucléotide. De plus, ce ligand sensibilise efficacement l'euporium pour une émission dans le visible, ce qui permettra d'étudier en parallèle les propriétés de luminescence des systèmes obtenus.

3. Dérivés de l'ebpatcn

Cette partie décrit la fonctionnalisation de différents oligonucléotides par les complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ ($\text{Ln}=\text{Eu}, \text{Gd}$) dont la synthèse, la caractérisation et les propriétés relaxométriques et de luminescence ont été détaillés dans le chapitre II.

a) Synthèse

Le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ est greffé par réaction d'Huisgen sur des oligonucléotides comportant 6 et 18 nucléotides fonctionnalisés en 5' par un groupement alcyne. Le mode opératoire est le même : un équivalent d'oligonucléotide est mis en présence 3 équivalents de complexes de lanthanides et de 5 équivalents de iodure du cuivre en présence de 5 équivalents de diisopropyléthylamine dans l'eau à 35°C pendant une nuit. Les complexes obtenus sont purifiés par HPLC semi préparative et caractérisés par spectrométrie de masse. Leur pureté est vérifiée par HPLC analytique. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par absorbance (voir détails en partie expérimentale) et le rendement des différentes réactions peut être alors calculé. Le rendement de la réaction entre les complexes de lanthanides et le 6-mère est de 18% et celui avec le 18-mère est de 48%.

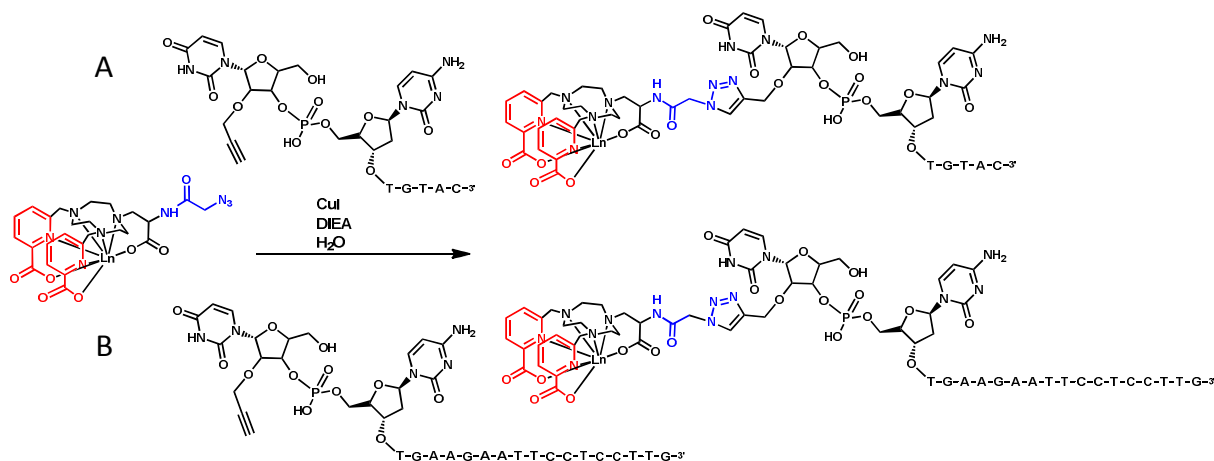


Figure IV-13 : Complexes de $[\text{Ln}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ greffés sur un 6-mère (A) et 18-mère (B) fonctionnalisés

Le rendement de la réaction avec le 6-mère est plus faible que dans le cas du 18-mère car on observe la formation d'un adduit entre l'oligonucléotide et un atome d'iode déterminé par spectrométrie de masse : MALDI ToF-MS + ES-MS. La formation d'un adduit avec un atome d'iode lors de la réaction d'Huisgen vient d'être récemment décrite dans la littérature.¹⁸

Cette stratégie, à savoir de greffer directement un complexe plus stable sur les oligonucléotides nous permet de nous affranchir de la présence du cuivre et s'est révélée efficace.

b) Relaxivité

La concentration en gadolinium est mesurée par susceptibilité magnétique et par absorbance UV. Les temps de relaxation longitudinale T_1 des protons de l'eau en présence des complexes de gadolinium greffés sur des oligonucléotides sont mesurés entre 0.01 et 400 MHz. Les profils NMRD sont donnés dans la figure IV-14.

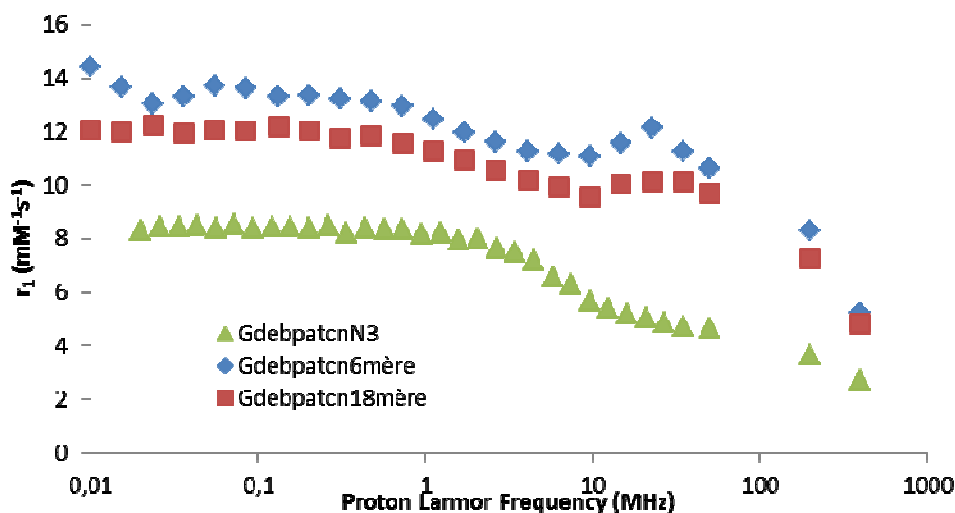


Figure IV-14 : Profils NMRD des complexes $[Gd(ebpatcnN_3)(H_2O)]$ $[Gd(ebpatcn6mère)(H_2O)]$ et $[Gd(ebpatcn18mère)(H_2O)]$ à 25°C, pH=7.4 c=0.6-0.8 mM

Les profils de relaxivité des complexes greffés sur les oligonucléotides présentent une allure différente de celui du complexe seul. Tout d'abord, une augmentation importante de la relaxivité est observée. Le poids moléculaire du système beaucoup plus important conduit à un ralentissement de la rotation des complexes fonctionnalisés et une augmentation significative de la relaxivité.

La relaxivité des complexes greffés sur les oligonucléotides est très peu dépendante du champ, le rapport des relaxivités à 0.01 MHz et 15 MHz vaut 1.3 pour les deux composés d'ADN fonctionnalisés avec des complexes de gadolinium. Ceci est probablement dû à un effet de temps de relaxation électronique. En effet, le groupe de Merbach a montré que dans l'hypothèse d'un temps de relaxation électronique infini, le rapport des relaxivités à champ nul et à champ moyen vaut une valeur constante égale à $10/3$.¹⁹ Ainsi, un affaiblissement de la relaxivité à bas champ par rapport à cette valeur de référence est caractéristique d'une relaxation électronique rapide. Celle-ci est d'autant plus rapide que la relaxivité à bas champ est faible. La valeur du rapport des relaxivités à 0.01 MHz et 15 MHz est en accord avec une relaxation électronique très rapide. La présence du brin d'ADN peut être à l'origine d'une rupture de la symétrie du complexe, entraînant ces effets sur la relaxation électronique.

L'effet de l'appariement simple brin à double brin sur la relaxivité est étudiée sur le composé $[Gd(ebpatcn18mère)(H_2O)]$. La structure en double hélice étant beaucoup plus rigide que le simple brin, la variation de la relaxivité nous permet d'observer quelle est l'effet de la rigidification du système. La réaction d'hybridation est effectuée sur les composés $[Gd(ebpatcn18mère)(H_2O)]$ et le

brin d'ADN 18-mère non couplé en présence de 1.5 équivalents du brin d'ADN complémentaire en milieu salin pour compenser les charges négatives des groupements phosphates (voir partie expérimentale). Le milieu réactionnel est chauffé à 90°C pendant 3 min puis refroidi lentement jusqu'à température ambiante. L'hybridation du 18-mère non couplé permet de vérifier la présence du double brin obtenu. Le brin complémentaire, les deux brins d'ADN 18-mère (non fonctionnalisés et fonctionnalisés avec le complexe de gadolinium) et les duplexes obtenus sont déposés sur un gel de polyacrylamide (figure IV-15). Un témoin de 60 bases est également déposé. Les différences de migration des composés confirment la présence de l'hybride contenant le complexe de Gd(III).

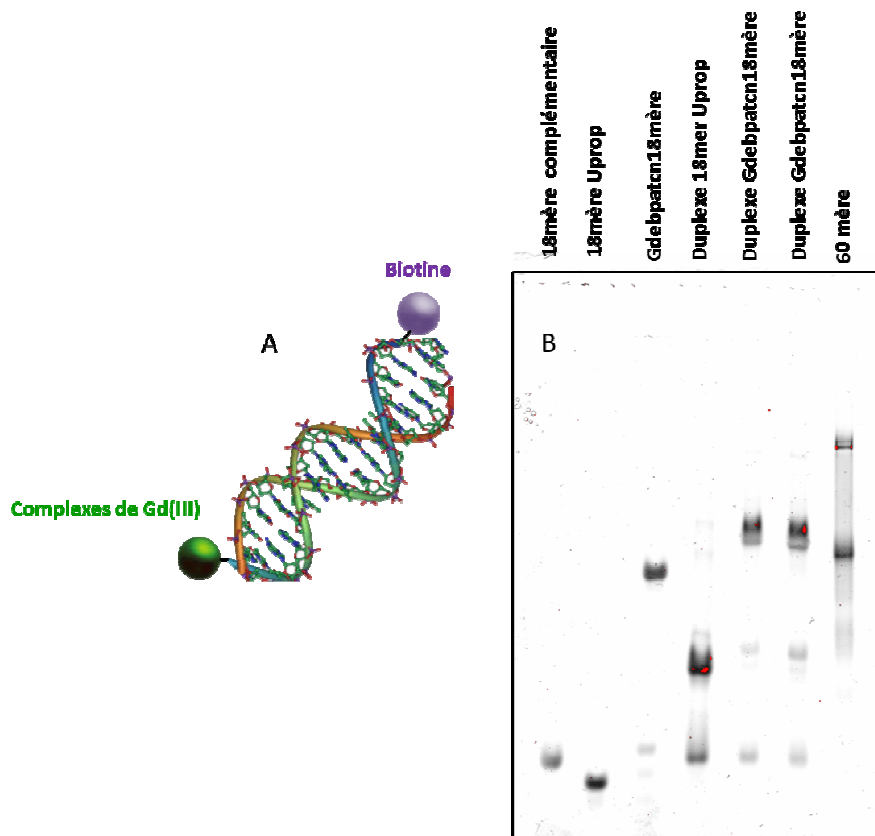


Figure IV-15 : Schéma du double brin d'ADN (A) et électrophorèse sur gel de polyacrylamide des divers fragments d'ADN fonctionnalisés (B)

Les mesures de relaxivité sont effectuées sur ce composé et le profil NMRD est donné en figure IV-16.

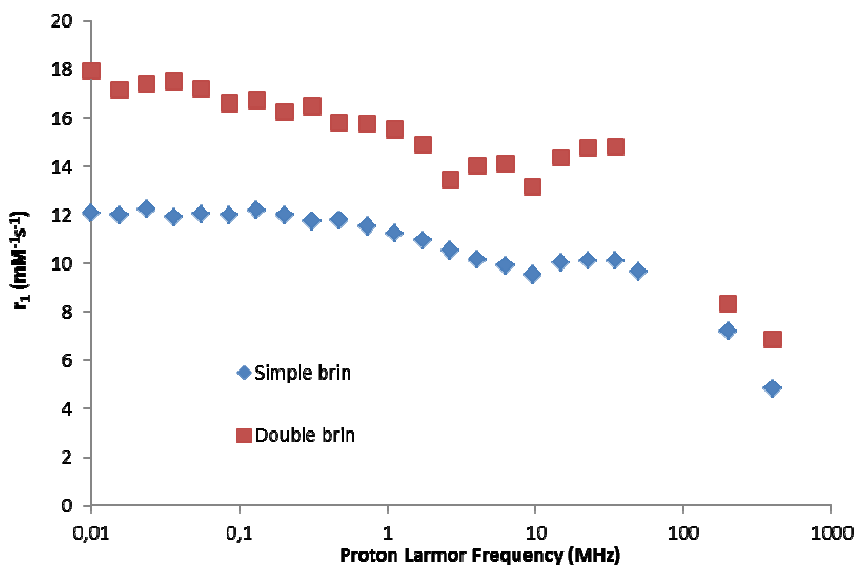


Figure IV-16 : Profils NMRD des complexes [Gd(ebpatcn18mère)(H₂O)] simple brin et double brin à 25 °C à 25°C, pH=7.4 c=0.6-0.8 mM

Les deux profils de relaxivité présentent la même allure : à bas et à moyens champs, la relaxivité ne varie pas en fonction du champ de l'ordre de $17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 25 °C pour le brin hybridé. L'appariement simple brin à double brin conduit à une augmentation de 50% de la relaxivité. Ceci peut être attribué à la rigidification du système. Ces valeurs de relaxivité sont légèrement plus élevées que les systèmes similaires décrits dans la littérature pour des complexes monoquo.

L'allure de ce profil ne ressemble pas à celui des autres systèmes macromoléculaires tournant lentement. En effet, une augmentation de la relaxivité plus importante aux champs moyens, caractéristique d'un ralentissement du temps de corrélation rotationnelle était attendue. La position du complexe sur le double brin d'ADN, qui a la forme d'un bâtonnet, ainsi que des effets de temps de relaxation électronique, pourraient expliquer l'allure du profil NMRD. Pour mieux le comprendre, la synthèse des composés contenant l'ion Eu(III) est en cours. Les propriétés de luminescence nous permettront de vérifier le nombre de molécules d'eau dans la sphère interne, et ainsi de préciser la géométrie autour de la sphère de coordination.

Le brin d'ADN complémentaire utilisé pour réaliser l'hybridation de l'ADN comporte un résidu biotine à son extrémité 5'. La spécificité de la réaction entre la biotine et la streptavidine va être utilisée pour former un système macromoléculaire comportant 3 ou 4 complexes de Gd(III). Ceci permettra d'augmenter la relaxivité par objet mais aussi certainement de ralentir la rotation du système et d'augmenter la relaxivité par Gd(III).

4. Conclusion

Les résultats préliminaires obtenus par greffage d'un complexe $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ sur un nucléoside modèle rU (de 12 à 16 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz) par la réaction d'Huisgen nous ont conduit à poursuivre les mesures sur ce système. Les valeurs de relaxivité obtenues sont maximales à 200 MHz montrant que le poids moléculaire de ce système est adapté pour des champs intermédiaires. Le greffage du ligand $\text{N}_3\text{dpaaOEt}$ sur un dimère sur support ne nous permet pas d'obtenir le composé désiré $[\text{Gd}(\text{dpaarUdT})(\text{H}_2\text{O})]$. En effet, le cuivre utilisé en tant que catalyseur de la réaction d'Huisgen reste fortement piégé par le ligand dpaa.

L'utilisation d'un complexe plus stable permet de contourner ce problème. Le greffage des complexes $[\text{Ln}(\text{ebpatcnN}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ sur des oligonucléotides de 6 et 18 unités nucléosidiques permet un greffage efficace par la réaction d'Huisgen en utilisant le cuivre comme catalyseur et une augmentation de la relaxivité de 4.8 à 10 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le 18-mère et 12 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le 6-mère à 20 MHz et 25°C. L'hybridation du brin d'ADN avec son complémentaire permet une amélioration de la relaxivité de 50%. Un fragment d'ADN complémentaire comportant une biotine à son extrémité est hybridé dans la perspective de coupler plusieurs brins d'ADN sur une streptavidine et ainsi avoir un système macromoléculaire contenant plusieurs complexes de gadolinium. La synthèse des composés 6-mère et 18-mère avec un ion $\text{Eu}(\text{III})$ est actuellement en cours et devrait permettre une meilleure caractérisation et d'étudier les propriétés de luminescence de ces systèmes.

5. Références

1. O. T. Avery, C. M. MacLeod and M. McCarty, *The Journal of Experimental Medicine*, 1944, **79**, 137-158.
2. J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, 1953, **171**, 737-738.
3. G. Han, S. Zhang, Z. Xing and X. Zhang, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 1466-1471.
4. K. Brückner, K. Schwarz, S. Beck and M. W. Linscheid, *Analytical Chemistry*, 2014, **86**, 585-591.
5. P. Caravan, J. M. Greenwood, J. T. Welch and S. J. Franklin, *Chemical Communications*, 2003, 2574-2575.
6. E. Garanger, S. A. Hilderbrand, J. T. Blois, D. E. Sosnovik, R. Weissleder and L. Josephson, *Chemical Communications*, 2009, 4444-4446.
7. J. E. Jones, A. J. Amoroso, I. M. Dorin, G. Parigi, B. D. Ward, N. J. Burma and S. J. A. Pope, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 3374-3376.
8. D. L. Robertson and G. F. Joyce, *Nature*, 1990, **344**, 467-468.
9. A. D. Ellington and J. W. Szostak, *Nature*, 1990, **346**, 818-822.
10. C. Tuerk and L. Gold, *Science*, 1990, **249**, 505-510.
11. J. V. Hines, G. M. Ammar, J. Buss and P. Schmalbrock, *Bioconjugate Chemistry*, 1999, **10**, 155-158.
12. W. Xu and Y. Lu, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 4998-5000.
13. E. Bernard, M. Beking, K. Rajamanickam, E. Tsai and M. DeRosa, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2012, **17**, 1159-1175.
14. J. Cai, E. M. Shapiro and A. D. Hamilton, *Bioconjugate Chemistry*, 2009, **20**, 205-208.

15. Y. Song, X. Xu, K. W. MacRenaris, X.-Q. Zhang, C. A. Mirkin and T. J. Meade, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 9143-9147.
16. G. Gines, C. Saint-Pierre and D. Gasparutto, *Analytica Chimica Acta*, 2014, **812**, 168-175.
17. G. Sicoli, G. Mathis, S. Aci-Sèche, C. Saint-Pierre, Y. Boulard, D. Gasparutto and S. Gambarelli, *Nucleic Acids Research*, 2009, **37**, 3165-3176.
18. R. Slimi, S. Kalhor-Monfared, B. Plancq and C. Girard, *Tetrahedron Letters*, 2015, **56**, 4339-4344.
19. E. Toth, L. Helm and A. Merbach, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Winchester, 2001.

Incorporation de complexes de lanthanides dans les billes de silice

1. Introduction	139
a) Fonctionnalisation de nanoparticules de silice par des complexes de Gd(III)	140
b) Incorporation non covalente de complexes de Gd(III) dans des nanoobjets.....	143
c) Travaux antécédents conduits au laboratoire.....	145
d) Objectifs.....	147
e) Choix des complexes	148
2. Synthèse et caractérisation de billes de silice	150
a) Méthode de synthèse.....	150
b) Caractérisation des nanoparticules.....	154
c) Choix d'étude des nanoparticules de 25 et 55 nm.....	158
3. Relaxivité	160
a) Dans l'eau	160
b) En milieu biologique : Sérum, BSA, Anions	166
4. Optimisation des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$@Si25NPs et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$@Si55NPs	172
a) Stabilité cinétique.....	172
b) Greffage des chaînes PEG.....	174
c) Images IRM <i>in vitro</i>	177
5. Nanoparticules bimodales	179
a) Avantages des sondes bimodales IRM/optique	179
b) Synthèse	179
c) Luminescence	180
d) Relaxivité	181
6. Conclusion	183
7. Références	184

Incorporation de complexes de lanthanides dans les billes de silice

1. Introduction

Le développement des agents de contraste pour l'IRM a suscité un grand intérêt ces dernières années, notamment pour pallier le manque de sensibilité de cette technique en termes de contraste par rapport à d'autres techniques d'imagerie telle que l'imagerie optique. Les agents de contraste utilisés en clinique tels que le Dotarem® ou Magnevist® doivent être injectés à une dose de 10^{-4} mol kg⁻¹ pour générer une augmentation suffisante de contraste lors de l'examen d'IRM et ainsi mieux différencier les tissus, par exemple de manière à faire de l'angiographie.¹ Cependant, dans le cas des agents de contraste actuellement disponibles, cette concentration est souvent insuffisante pour des applications telles que l'imagerie moléculaire,² permettant d'observer des processus moléculaires et cellulaire *in vivo*. En effet, une solution prometteuse pour faire de l'imagerie moléculaire consisterait à cibler les récepteurs présents à la surface des cellules, qui sont exprimés à des concentrations variant de 10^{-10} à 10^{-7} mol kg⁻¹.

Pour résoudre ce problème de sensibilité, des stratégies d'optimisation sont mises en œuvre pour augmenter la relaxivité des complexes de gadolinium. Une des stratégies consiste à inclure dans une nanoparticule un grand nombre de complexes de gadolinium pour cumuler leurs pouvoirs de contraste. De plus, les nanoparticules permettent un meilleur suivi thérapeutique car elles circulent plus longtemps dans le corps que les complexes de gadolinium avant d'être excrétés.³

A côté de cela, une des propriétés intéressantes des nanoparticules est leur utilisation potentielle en théranostique qui a connu un grand essor pendant ces dernières années. La théranostique est la combinaison de l'imagerie et de la thérapie. En pratique, la nanoparticule est utilisée comme réservoir contenant à la fois un complexe de gadolinium et un médicament. La surface de la nanoparticule peut également être fonctionnalisée par des groupes moléculaires qui la rendent biocompatible et/ou lui permettent de cibler des récepteurs biologiques qui peuvent être visualisés grâce à une augmentation locale de la concentration en complexes de gadolinium.⁴ Les propriétés physicochimiques et la fonctionnalisation de la surface des nanoparticules sont les paramètres clés de leur comportement en milieu biologique et de leur utilisation en tant qu'agents thérapeutiques.

Les nanoparticules sont des entités dont l'une des dimensions est inférieure à 100 nm. Il existe une grande variété de nanoparticules utilisées pour des applications différentes. Quelques exemples de nanoobjets fonctionnalisés avec des complexes de gadolinium ont été présentés en introduction (page 33). Nous allons nous focaliser ici sur les nanoparticules de silice qui ont suscité ces dernières années un large intérêt dans les domaines de l'imagerie moléculaire et la théranostique.^{5,6} En effet leur structure bien définie peut être aisément modifiée (taille, morphologie, porosité) et leur surface est facilement fonctionnalisable. Les nanoparticules de silice ont des diamètres inférieurs à 100 nm, sont biocompatibles⁷ et très stables, ce qui leur confère toutes les caractéristiques requises pour des

applications *in vivo*. De plus, par rapport à tous les types de particules présentées, elles ont les relaxivités les plus élevées par gadolinium et par particule (voir les exemples dans le paragraphe suivant). Enfin, elles permettent de faire des nanoparticules multimodales, en incorporant à la fois un agent luminescent et un agent de contraste en plus d'ajouter des propriétés de ciblage.

a) Fonctionnalisation de nanoparticules de silice par des complexes de Gd(III)

La principale stratégie utilisée jusqu'à présent pour fonctionnaliser les particules de silice avec des complexes de gadolinium est le greffage covalent sur la surface ou sur les parois des pores à l'intérieur de la nanoparticule. Pour cela, il suffit d'introduire sur les complexes un groupement silane qui permettra de créer un lien covalent entre le complexe et la particule par réaction de condensation. Une autre approche pour greffer des molécules sur les nanoparticules de silice est l'utilisation du (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES). En effet, l'APTES confère une terminaison amine libre sur la particule qui permet d'y greffer n'importe quelle fonction contenant un acide carboxylique activé (figure V-1).

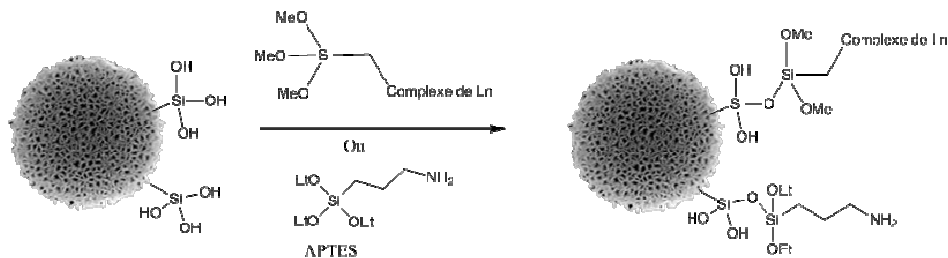


Figure V-1 : Principaux moyens de fonctionnalisation des nanoparticules de silice

De nombreux systèmes contenant des complexes de gadolinium greffés sur des nanoparticules de silice sont décrits dans la littérature notamment pour des particules de tailles ou de porosités différentes. Quelques exemples sont donnés ci-dessous.

L'équipe de Delville a fonctionnalisé des nanoparticules de silice ou d'alumine de 20 nm de diamètre avec un complexe de GdDTPA. Ils ont observés une augmentation du signal IRM de 275%.⁸ Ils ont également montré que le greffage d'un complexe de GdDTPA sur des particules de silice de 67 nm entraîne une augmentation plus importante de la relaxivité transversale que de la relaxivité longitudinale.⁹

Une des valeurs de relaxivité par particule les plus hautes décrites de la littérature est obtenue en greffant des complexes comportant des groupements phosphonates à la surface et à l'intérieur des pores de microparticules de silice mésoporeuses (figure V-2). Celle-ci est de $3.3 \times 10^7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ par particule à 60 MHz et 25°C.¹⁰ Le complexe de gadolinium utilisé avec des groupements phosphonates possède deux molécules d'eau dans la sphère interne du complexe et une relaxivité de seconde sphère optimisée.

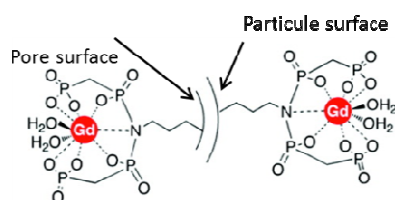


Figure V-2 : Fonctionnalisation de particules de silice avec des complexes de Gd(III) portant des groupements phosphonates

Parmi les particules de silice mésoporeuses, on distingue celles de type SBA-15 ou MCM-41 qui ont une forme de bâtonnets et contiennent des pores de section hexagonale interconnectés entre eux par des micropores irréguliers. La différence entre les deux matériaux se situe au niveau de l'aire de surface plus élevée et de la taille des pores plus petite pour le MCM-41.¹¹ La taille des pores peut être variée en changeant les paramètres de la synthèse comme la longueur de la chaîne du tensioactif ou la quantité de tensioactif utilisée.¹²

Par exemple, le groupe de Botta a greffé un complexe dérivé du DOTAmoamide (figure V-3) sur des particules de type SBA-15 (600-700 nm avec une taille de pore de 80 Å) et de type MCM-41 (20-50 nm avec une taille de pore de 35 Å) en fonctionnalisant préalablement la surface des particules avec des groupements amines.¹³ Ils ont montré que les complexes se situent à l'intérieur des pores et sur la surface des nanoparticules dans le cas des SBA-15 alors que pour les MCM-41 les complexes sont principalement situés sur la surface extérieure. La relaxivité par Gd(III) de ces systèmes à 20 MHz et 37°C est de 6 mM⁻¹s⁻¹ dans le premier cas et de 27 mM⁻¹s⁻¹ dans le second cas. Pour MCM-41, une valeur similaire aux différents systèmes décrits dans la littérature est observée, ce qui est principalement due à un ralentissement de la vitesse de rotation de l'unité paramagnétique venant de l'augmentation du poids moléculaire, donc de la taille de l'entité. En revanche, la faible relaxivité des nanoparticules de type SBA-15 est expliquée par le fait que les complexes greffés à l'intérieur des pores sont silencieux du point de vue paramagnétique. Ceci est dû à une mauvaise diffusion de l'eau faisant que seulement les complexes greffés à l'extérieur contribuent à la relaxivité.

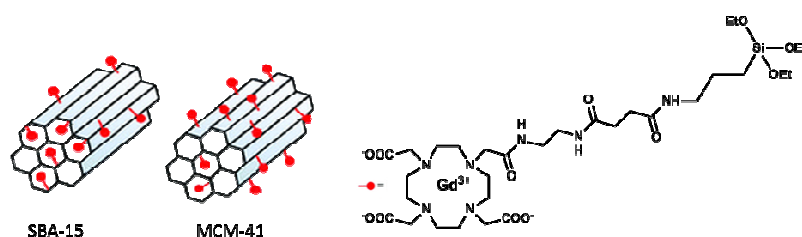


Figure V-3 : Distribution des complexes de gadolinium à la surface des nanoparticules¹³

Ils ont ensuite étudié le greffage du complexe anionique GdDOTAGA sur des MCM-41 fonctionnalisés par des groupements NH₂. Celles-ci ont été obtenues en faisant réagir la surface des particules avec l'APTES (figure V-4).¹⁴ Ensuite, l'acétylation des groupements amines (protonés à pH neutre) présents à la surface conduit à une augmentation de la relaxivité par Gd(III) 20 à 38 mM⁻¹s⁻¹ à 20 MHz

et 37°C. L'absence de groupements positifs à la surface atténue les interactions électrostatiques pour le complexe anionique conduisant à une vitesse d'échange plus élevée, ce qui explique l'augmentation de la relaxivité.

Dans la suite de leurs études ils ont synthétisé le même type de particule MCM-41 avec le complexe anionique DOTATGA qui est greffé uniquement sur la surface extérieure.¹⁵ La relaxivité par Gd(III) des nanoparticules greffées et fonctionnalisées avec des groupements amines protonés (NP3) est de 54 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 37°C. L'acétylation des amines exposées à la surface conduit à la formation d'amides neutres (NP4). Ceci entraîne une augmentation de la relaxivité (79 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 37°C) grâce à l'optimisation de la vitesse d'échange des molécules d'eau due à une interaction plus faible avec la surface. Toute cette étude montre un moyen d'atteindre une très haute relaxivité par Gd(III) de 79 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ en utilisant le greffage de complexes de gadolinium sur des nanoparticules de silice.

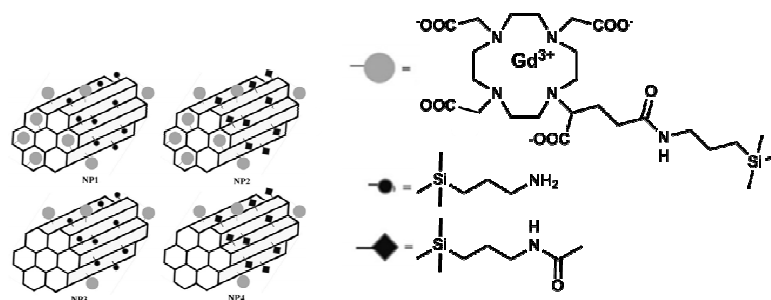


Figure V-4: Vue schématique des MCM-41 fonctionnalisés avec GdDOTAGA^{14, 15}

Le groupe de Davis a également étudié l'influence de la position des complexes dérivés du DOTAmoamide sur des nanoparticules de silice de 66 nm de diamètre.¹⁶ La localisation des groupements amines peut être contrôlée en incorporant l'APTES soit par co-condensation (avec un temps de réaction court ou un temps de réaction long) dans ce cas les complexes sont situés à l'intérieur des pores, soit par greffage postérieur, conduisant à des complexes localisés sur la surface extérieure des particules (figure V-5).

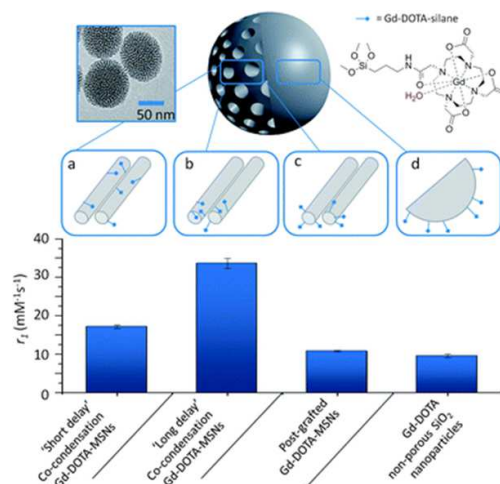


Figure V-5 : Influence de la position des complexes sur la relaxivité¹⁶

Les particules fonctionnalisées à l'intérieur par des complexes de Gd(III) ont une relaxivité par Gd(III) qui est plus élevée que pour celles fonctionnalisées à l'extérieur ($33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à l'intérieur contre $10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à l'extérieur à 300 MHz et 25°C). Ceci peut être expliqué par la combinaison de deux effets : la mobilité réduite des molécules d'eau dans la particule et le degré de liberté des centres paramagnétiques dans la paroi interne. Ces deux effets augmentent les temps de diffusion (τ_D) et de corrélation rotationnelle (τ_R) et altèrent le temps de résidence des molécules d'eau (τ_m). La localisation à l'intérieur des pores a aussi été étudiée. Dans le cas d'une co-condensation avec un long temps de réaction, la probabilité de trouver des complexes à l'extrémité des pores est plus importante. Ceci leur permet d'avoir un temps de corrélation rotationnelle plus long et une meilleure accessibilité des molécules d'eau aux centres paramagnétiques, ce qui explique une relaxivité plus élevée. Le greffage de chaînes PEG5000 sur ce type de particule entraîne une légère baisse de la relaxivité, de 33 à $26 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 300 MHz et 25°C . Dans une autre étude, les mêmes chercheurs ont étudié plus en détail le greffage de chaînes PEG et l'influence de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur des particules de 76 nm de diamètre.¹⁷ La BSA est greffée *via* l'APTES et les chaînes PEG silanisées par condensation sur la surface. Une diminution de la relaxivité de 78% a été observée en présence de BSA, qui bloquerait les pores de la particule et de ce fait limiterait la diffusion des molécules d'eau vers les centres paramagnétiques. La relaxivité des particules mères peut être récupérée en ajoutant des chaînes PEG5000 entre la surface et la BSA, cependant une chaîne de plus petite taille ne permet pas de retrouver la relaxivité initiale (figure V-6).

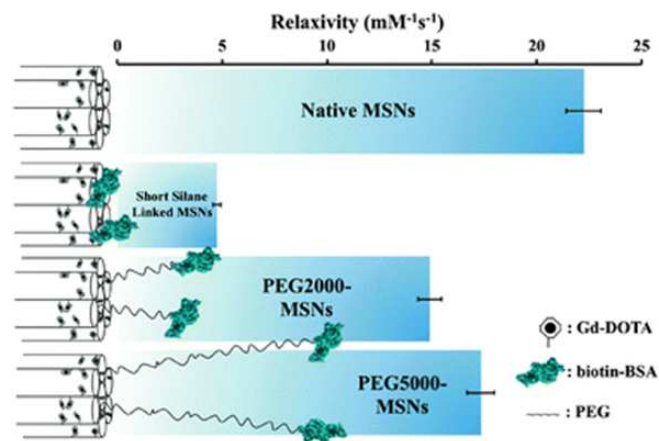


Figure V-6 : Effet du greffage direct de la BSA et des chaînes PEG sur la relaxivité¹⁷

Tous ces exemples montrent que l'effet sur la relaxivité dépend énormément de plusieurs paramètres comme le type de complexes et de particules, leur diamètre et la taille de leurs pores, la localisation des complexes et la fonctionnalisation de la surface.

b) Incorporation non covalente de complexes de Gd(III) dans des nanoobjets

En plus du greffage covalent, les nanoparticules de silice permettent également l'incorporation non covalente des complexes de gadolinium à l'intérieur de la particule qui reste perméable à l'eau grâce à ses pores. Le mécanisme conduisant à une relaxivité très élevée reste incertain, mais l'encapsulation de complexes de Gd(III) représente une nouvelle approche pour obtenir des relaxivités élevées. Les molécules d'eau peuvent encore circuler entre l'intérieur et l'extérieur du

nanoobjet, mais le confinement dans les pores restreint le mouvement des complexes et des molécules d'eau. Cette restriction dynamique se traduit par une augmentation de la viscosité locale. Alors les molécules d'eau de la sphère interne, voire externe sont ralenties, créant une augmentation de la relaxivité.¹⁸ De plus, la synthèse de ce type de particules est plus simple, car elle ne nécessite pas de modification chimique des complexes. De très nombreux exemples, décrits dans la littérature, montrent l'incorporation non covalente des citrates et nitrates de gadolinium.¹⁹ Nous nous concentrerons sur la bibliographie suivante portant sur l'incorporation non covalente des chélates de gadolinium dans des nanoobjets tels que les protéines, les hydrogels et le silicium.

L'incorporation non covalente d'un complexe de HPDO3A dans l'apoferritine qui est une protéine sphérique de 12 nm de diamètre extérieur avec une cavité centrale contenant 4500 atomes de fer, est un exemple élégant de l'augmentation de la relaxivité d'un complexe de gadolinium à l'intérieur d'un nanoobjet.²⁰ Environ 10 chélates sont encapsulés dans la protéine grâce à un changement de pH. En effet, l'apoferritine se dissocie à pH 2 pour se reformer à pH 7, ce qui permet de piéger à l'intérieur de la protéine les composants d'une solution (figure V-7). Les molécules non piégées sont séparées par dialyse. L'accès des molécules d'eau dans la cavité interne se fait par des canaux entre les sous unités de la protéine, mais ceux-ci sont trop petits pour laisser passer les complexes de gadolinium. Ce système possède une relaxivité par gadolinium de $80 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C et une relaxivité supérieure à $50 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à bas champ (en dessous de 20 MHz), 25°C et pH 7. Les interactions entre les complexes de gadolinium, la protéine et les molécules d'eau, qui sont libres d'aller à l'intérieur ou l'extérieur de la cavité, mènent à cette relaxivité significativement élevée.

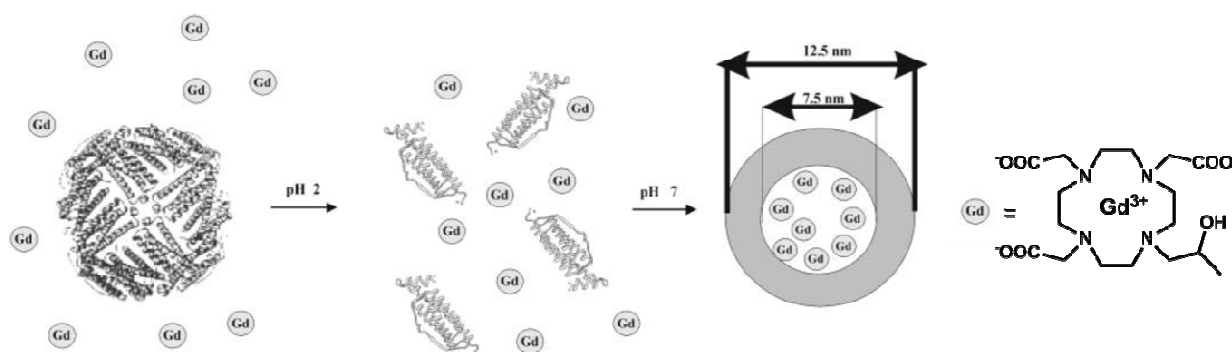


Figure V-7 : Incorporation de complexes GdHPDO3A dans l'apoferritine²⁰

L'incorporation non covalente de complexes de GdDOTA dans des hydrogels sphériques de 235 à 284 nm composés de chitosan et d'acide hyaluronique donne des relaxivités par Gd(III) longitudinale de $72 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et transversale de $178 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 60 MHz et 37°C .²¹ Le mouvement de rotation du complexe est restreint au sein de la particule et une relaxivité élevée autour de 25-30 MHz suggère une très forte contribution de la seconde sphère et de la sphère externe. Par contre, elle diminue légèrement avec la température, ce qui indique une vitesse d'échange assez lente. Ceci confirme que le mouvement du chélate est restreint et que l'accès des molécules d'eau dans la matrice n'est pas limitant. En changeant les complexes incorporés, le degré d'ionisation et la nature de la matrice, une relaxivité par Gd(III) de $100 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 30 MHz a pu être atteinte avec l'incorporation de complexe de $[\text{Gd}(\text{DOTP})(\text{H}_2\text{O})]^{5-}$ (figure V-8) dans une matrice de chitosan et d'acide hyaluronique.²²

Un exemple d'incorporation de complexes de GdDTPA dans des nanoparticules de silicium (1 μm de diamètre et 400 nm d'épaisseur) montre l'influence de la taille des pores sur la relaxivité.²³ Celle-ci est de $24 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par Gd(III) et quasi-nulle respectivement pour des tailles de pores de 5-10 nm, 30-40 nm et supérieure à 50 nm à 60 MHz et 25°C. Cette différence de relaxivité montre que la diffusion des complexes mais aussi des molécules d'eau affecte les paramètres tels que le temps de corrélation rotationnelle, qui est un effet de sphère interne et le temps de diffusion des molécules d'eau qui est un effet de sphère externe. Pour montrer qu'il y a bien un effet de sphère externe, le complexe de GdTTHA, ne présentant pas de molécules d'eau de sphère interne (figure V-8) est également incorporé dans les particules. Ce système montre une relaxivité deux fois et quatre fois plus importante respectivement pour les pores de 30-40 nm et pour les pores de 5-10 nm, que le complexe en solution. L'influence de la quantité de complexe dans la synthèse des particules a également été étudiée. Plus la concentration de départ de GdDTPA est importante, plus le nombre de complexe incorporés est élevé mais plus la relaxivité diminue. Comme la relaxivité est normalisée pour la concentration en gadolinium, elle devrait rester constante. Ce qui n'est pas le cas ici car seule une partie des complexes de gadolinium contribue à la relaxivité : ceux qui sont situés à l'intérieur des pores de la particule.

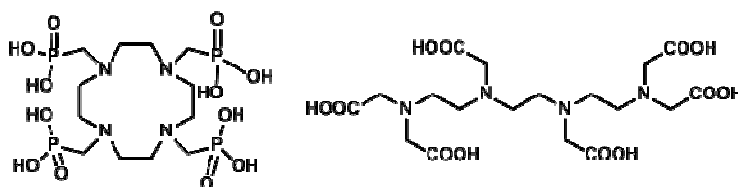


Figure V-8 : Les ligands H_8DOTP et H_6TTHA

Les exemples présentant l'encapsulation des complexes de Gd(III) montrent bien qu'il n'y a pas de relargage de gadolinium libre ; soit en étudiant la particule contenant le complexe d'europium correspondant ou bien en montrant que la relaxivité de l'ion Gd(III) aqua dans le système étudié était différente de celle qu'ils avaient obtenue.

L'incorporation non covalente des complexes de gadolinium donne des relaxivités bien plus élevées que le greffage en surface extérieure des nanoobjets. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas les mêmes dans les deux cas. Même si l'effet sur la diminution de la vitesse de rotation est présent dans tous les cas, l'incorporation non covalente mène à la modification de la diffusion des molécules d'eau autour des chélates de gadolinium et à l'augmentation de la viscosité locale qui a un effet marqué sur la relaxivité de sphère externe.¹⁸

c) Travaux antécédents conduits au laboratoire

Les effets cités précédemment d'augmentation de la relaxivité lors de l'incorporation non covalente dans des nanoobjets nous ont conduit à étudier l'incorporation des complexes développés au laboratoire. L'encapsulation de chélates de lanthanides dans des nanoparticules de silice présente un intérêt particulier pour le développement des marqueurs multicolores ou pour des tests biologiques, autant pour l'imagerie optique que pour l'IRM. Les billes de silice sont choisies pour leur

bonne biocompatibilité et leur facilité de fonctionnalisation. Elles représentent une plateforme très versatile.

Le premier travail réalisé au laboratoire est l'incorporation non covalente de complexes de $[\text{Ln}(\text{tpatcn})]$ ($\text{Ln}=\text{Eu}$, Tb , et Nd) et $[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ (figure V-9) dans des nanoparticules de silice. Elles sont synthétisées par un système quaternaire dont la taille peut varier entre 10 et 100 nm selon les conditions de synthèse.²⁴ En synthétisant des particules dopées avec des complexes d'euprimum et terbium d'un côté et de néodyme et ytterbium de l'autre, il est montré que les complexes de $[\text{Ln}(\text{tpatcn})]$ sont plutôt localisés sur les bords de la nanoparticule et que les complexes $[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ se situent au cœur de la particule à cause de leur caractère plus hydrophobe, augmentant ainsi leur pourcentage d'encapsulation. Les complexes $[\text{Nd}(\text{tpatcn})]$ et $[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ encapsulés dans les nanoparticules de silice peuvent donner un système appliqué à des marquages anti-contrefaçon grâce à l'émission des deux lanthanides. En effet, lorsque le système est excité à 272 nm, les émissions du néodyme et de l'ytterbium sont observées alors qu'avec une excitation à 375 nm seulement l'émission de l'ytterbium est observée. De plus, le rallongement des temps de vie des complexes encapsulés suggère que la silice fournit une protection des complexes de leur environnement et prévient ainsi des processus de désactivation.

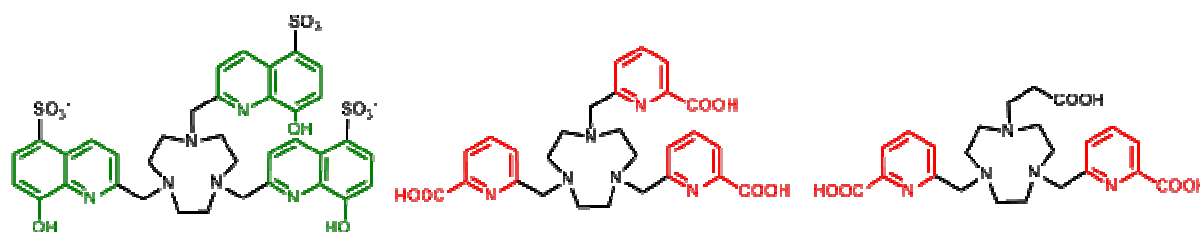


Figure V-9: Les ligands thqtcnSO_3^{3-} , H_3tpatcn et $\text{H}_3\text{ebpatcn}$

L'efficacité d'encapsulation des complexes basés sur l'unité picolinate dans des nanoparticules de silice est étudiée en utilisant des complexes d'euprimum 152 radioactif chélaté avec les ligands ebpatcn et tpatcn .²⁵ Les mesures de l'activité gamma durant la totalité de la synthèse montrent que l'incorporation de l' ebpatcn est de 40% dans des particules de 50 nm et de 15% dans celles de 15 nm ; celle de la tpatcn est de 5 et 1.5% dans ces mêmes types de particules. De plus, les complexes d' ebpatcn ne sont pas relargués à l'extérieur des nanoparticules contrairement à ceux de la tpatcn . Ceci peut être attribué au caractère plus hydrophile de l' ebpatcn .

Ce sont pour ces raisons et pour sa vitesse d'échange élevée ($86 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C) que le complexe $[\text{Gd}(\text{ebpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ est choisi pour l'étude des propriétés relaxométriques lors de l'encapsulation dans des nanoparticules de silice de 25 et 50 nm préparées par une procédure de microémulsion inverse.²⁶ Les particules obtenues sont sphériques et ont une taille homogène. La distribution des complexes se fait de manière aléatoire dans la matrice de silice grâce aux interactions électrostatiques et hydrogène. Les molécules d'eau peuvent aller librement entre l'intérieur et l'extérieur des nanoparticules, mais leur diffusion est restreinte par les parois des pores. Ces propriétés dynamiques des complexes et des molécules d'eau sont responsables des relaxivités longitudinale et transversale très élevées, respectivement de $84 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et $227 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 500 MHz et 25°C pour les particules de 25 nm (figure V-10). Le mécanisme conduisant à cette augmentation significative de la relaxivité reste non élucidé.

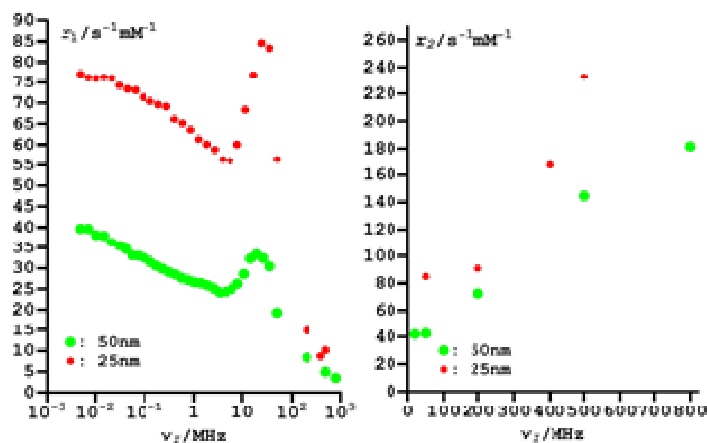


Figure V-10 : Relaxivités longitudinale (gauche) et transversale (droite) des nanoparticules de 25 et 50 nm dopées avec $[\text{Gd}(\text{ebpatchn})(\text{H}_2\text{O})]^{26}$

La relaxivité par gadolinium des particules de 25 nm est nettement plus élevée que pour celles de 50 nm ($33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C) qui contiennent environ 1000 complexes de gadolinium, ce qui donne une relaxivité par particule de $3.3 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C . A 20 MHz, la relaxivité transversale est légèrement supérieure à la longitudinale et le rapport entre ces deux croît avec le champ magnétique. Ici encore la relaxivité très élevée suggère un mécanisme différent en comparaison avec les complexes de gadolinium qui sont greffés à la surface des nanoparticules. Cet accroissement viendrait de la mobilité des molécules d'eau des sphères interne et externe associées aux propriétés de perméabilité de la matrice de silice. L'incorporation non covalente permet une rotation lente du complexe entraînant des mouvements de corrélation rotationnelle de la sphère interne et translationnelle de la sphère externe optimisés. Les valeurs de r_2 élevées à hauts champs peuvent être attribuées aux effets combinés des inhomogénéités de champs créées par les nanoparticules paramagnétiques et à l'échange des molécules d'eau entre ces nanoparticules et le solvant.

d) Objectifs

En tenant compte de ces résultats, l'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes régissant les hautes relaxivités longitudinale et transversale obtenues lors de l'incorporation non covalente de complexes de gadolinium dans les billes de silice. Comprendre ces mécanismes permet de concevoir des sondes adaptées à l'imagerie moléculaire, d'une part en augmentant le contraste par accumulation d'un grand nombre de complexes en un point donné et d'autre part en optimisant les paramètres gouvernant la relaxivité. Pour atteindre cet objectif deux séries de complexes de gadolinium basés sur le DOTA et l'hydroxyquinoléine sont incorporés dans les billes de silice de 25 et 55 nm. Les nanoparticules adéquates sont étudiées plus en détail en évaluant leur comportement en milieu biologique. Des études préliminaires sur la fonctionnalisation de surface seront menées ainsi que l'évaluation des nanoparticules en imagerie *in vitro*.

e) Choix des complexes

Pour commencer notre étude, trois agents de contraste dérivés du DOTA sont choisis afin d'étudier le taux d'incorporation des complexes ne contenant pas de groupements hydrophobes et dans l'optique d'applications *in vivo* vu la biocompatibilité connue de ces agents. Les différents complexes choisis sont présentés ci-dessous (figure V-11).

- le $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ ou Dotarem® qui est l'agent de contraste commercial le plus utilisé en clinique du fait de sa stabilité cinétique et thermodynamique ($\log K_{\text{GdL}} = 24.7$).²⁷ Sa relaxivité est de $4.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 25°C ²⁸ et de $4.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C .

- le $[\text{Gd}(\text{Trita})(\text{H}_2\text{O})]^-$ qui a une vitesse d'échange largement plus grande et favorable que celle du $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ due à la présence d'un carbone supplémentaire dans le macrocycle ($k_{\text{ex}}=270 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ contre $4.1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C).²⁹ Sa stabilité est assez élevée pour des applications *in vivo* ($\log K_{\text{GdL}}=19.2$) et sa relaxivité est de $3.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C .

- le $[\text{Gd}(\text{HPDO3A})(\text{H}_2\text{O})]$ ou Prohance® sous son nom commercial, qui a comme différence d'être un complexe neutre contrairement aux deux premiers. Il a une très bonne stabilité ($\log K_{\text{GdL}}=23.8$) et sa relaxivité est de $3.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et 40°C ²⁸ et de $4.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C .

Ces complexes ont tous une molécule d'eau dans leur sphère interne et sont adaptés pour des applications *in vivo* du fait de leur stabilité cinétique et thermodynamique.

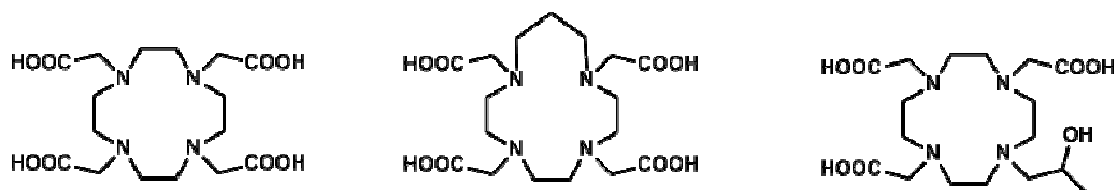


Figure V-11 : Les ligands H_4DOTA , H_4Trita et $\text{H}_4\text{HPDO3A}$

D'autres types de complexes basés sur l'unité chélatrice hydroxyquinoléine sont également étudiés. L'unité hydroxyquinoléine présente l'avantage de sensibiliser les lanthanides émettant dans l'infrarouge³⁰ et de former des complexes stables avec les lanthanides.^{31, 32} Ceci leur donne des propriétés potentielles pour le développement de sondes bimodales. De plus ces dérivés devraient être biocompatibles : des dérivés d'hydroxyquinoléine étudiés pour l'inhibition d'HIV-1 intégrase n'ont pas montré de cytotoxicité notable.³³ Les différents complexes basés sur l'unité hydroxyquinoléine ont été développés au cours de la thèse de Gaylord Tallec³⁴ au laboratoire et il est montré que les complexes de néodyme et ytterbium s'incorporaient de manière efficace dans les billes de silice. Les trois complexes considérés dans l'incorporation des billes de silice sont les suivants (figure V-12):

- $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$: La stabilité de ce complexe (pGd, quantité de gadolinium libre en présence de 10^{-5} M de ligand et 10^{-6} M de métal à pH 7.4) est de 19.8. Même si ce complexe ne contient pas de molécule d'eau dans sa sphère interne, il a néanmoins une relaxivité de $5.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et de $3.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C dans l'eau à pH 7.4. Cette relaxivité exceptionnellement élevée pour

un complexe sans molécule d'eau dans sa sphère interne est due à la contribution de la seconde sphère et de la sphère externe. Le temps de corrélation rotationnelle de ce complexe a été mesuré à 293 ps. Le complexe d'ytterbium correspondant présente de bonnes propriétés de luminescence³⁵ ce qui fait des complexes de ce ligand un candidat potentiel pour un agent de contraste bimodal.

- $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$: La stabilité de ce complexe (pGd, quantité de gadolinium libre en présence de 10^{-5} M de ligand et 10^{-6} M de métal à pH 7.4) est également de 19.8. Ce complexe possède une molécule d'eau dans sa sphère interne et a une relaxivité de $9.14 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et de $5.84 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C . Cette relaxivité inhabituellement haute pour un complexe monoquo est due à sa vitesse d'échange élevée ($k_{\text{ex}}=10\text{-}50 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C) et à un temps de corrélation rotationnelle relativement long de 260 ps.³¹ De plus, la présence d'anions dans le milieu environnant a peu d'effet sur la relaxivité de ce complexe. L'interaction non covalente de ce complexe avec la BSA conduit à une augmentation de relaxivité jusqu'à $27.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 30 MHz et 25°C ce qui correspond à l'allongement du temps de corrélation rotationnelle provoqué par l'association du complexe avec cette protéine. La relaxivité est quasi identique en présence de sérum. Dans ce milieu, le complexe forme toujours un adduit avec le BSA. Les anions, principalement carbonate n'ont pas d'influence sur la relaxivité. Ce ligand peut également servir de sensibilisateur des ions ytterbium et néodyme pour des émissions dans le proche infrarouge.

- $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$: la stabilité thermodynamique de ce complexe basé sur une structure à azote central est très élevée (pGd= 18.9, quantité de gadolinium libre en présence de 10^{-5} M de ligand et 10^{-6} M de métal à pH 7.4) pour un complexe qui contient trois molécules d'eau dans la sphère interne. Le nombre de molécules d'eau coordonnées est calculé par la mesure du temps de vie d'émission du complexe d'euporium obtenu par excitation directe. Sa relaxivité est de $12.22 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz et de $10.65 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C , conformément aux valeurs attendues pour un complexe tris-aquo. Il a une vitesse d'échange de $4.02 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ à 25°C et un temps de corrélation rotationnelle d'environ 140 ps. Ce complexe interagit de façon très sensible à la coordination des anions. En effet, si les anions citrate n'ont pas d'effet à cause de leur taille, les anions carbonate et phosphate interagissent fortement avec les complexes de Gd(III) avec une chute d'environ 50% de la relaxivité due au remplacement de deux des trois molécules d'eau de coordination. En présence de BSA, le complexe présente une augmentation de la relaxivité jusqu'à $31.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C , mais celle-ci est probablement limitée par la vitesse d'échange du complexe, assez lente. Quant à la relaxivité dans le sérum, elle est légèrement plus faible que dans la BSA, ce qui est due à l'interaction du complexe avec les anions.

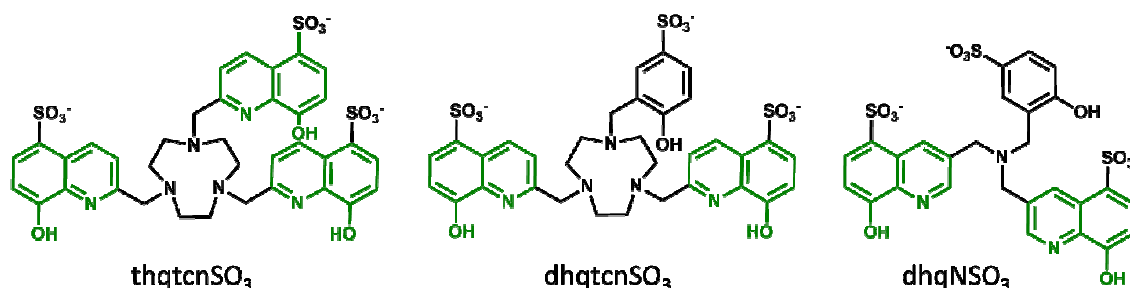


Figure V-12 : les ligands thqtcnSO_3^{3-} , dhqtcnSO_3^{3-} et dhqNSO_3^{3-}

Les constantes de stabilités de ces complexes pour des conditions données sont situés aux alentours de 19 ce qui représente une très bonne stabilité thermodynamique, comparable aux agents de contraste commerciaux (pGd(DTPA)= 19.1; quantité de gadolinium libre en présence de 10^{-5} M de ligand et 10^{-6} M de métal à pH 7.4).²⁸ De plus ces ligands sont sélectifs vis-à-vis du zinc, qui se trouve sous forme libre en milieu biologique à une concentration suffisante pour envisager une transmétallation. Les constantes de stabilités thermodynamiques sont plus basses avec le zinc (pZn≈15 pour les trois complexes). Ces complexes sont particulièrement adaptés pour l'incorporation dans des nanoparticules de silice pour l'imagerie *in vivo* et le développement de sondes bimodales.

	Log K _{GdL}	pGd	τ _R (ps)	k _{ex} (x10 ⁶ s ⁻¹)	r ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹)
[Gd(DOTA)(H ₂ O)] ⁻	24.7			4.1	4.3*
[Gd(Trita)(H ₂ O)] ⁻	19.2			270	3.9*
[Gd(HPDO3A)(H ₂ O)]	23.8				4.4*
[Gd(thqtcnSO ₃)] ³⁻		19.8	293		5.1
[Gd(dhqtcnSO ₃)(H ₂ O)] ³⁻		19.8	260	10-50	9.1
[Gd(dhqNSO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻		18.9	140	4.02	12.2

*relaxivité à 50 MHz et 25°C

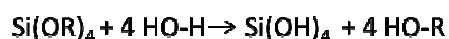
Tableau V-1: Propriétés des complexes de Gd(III) (relaxivité à 20 MHz et 25°C)

2. Synthèse et caractérisation de billes de silice

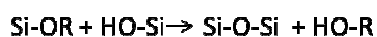
a) Méthode de synthèse

La plupart des nanoparticules de silice poreuses sont synthétisées par voie sol-gel. Cette approche repose sur une succession de réactions d'hydrolyse-condensation des précurseurs qui dans le cas de silice, sont des alcoxyxilanes de formule générale Si(OR)₄. Ceux-ci entraînent la formation d'espèces de plus en plus condensées et conduisent à des particules de silice colloïdales. Elles sont susceptibles de former des sols (solutions colloïdales) puis des gels, d'où le nom de procédé sol-gel.

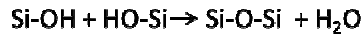
L'hydrolyse du précurseur Si(OR)₄ par addition d'eau amorce le processus de formation des nanoparticules par voie sol-gel. Elle conduit à la formation de groupements silanols, Si-OH selon la réaction suivante :



La condensation est la création des ponts Si-O-Si formés par la réaction des groupements hydroxyles résultant de la réaction d'hydrolyse. Ce processus commence avant que l'hydrolyse soit achevée et donc ces deux réactions peuvent être en concurrence. La première est l'alcoxolation, où la réaction se produit entre un groupement alcoxy et un groupement silanol pour libérer une molécule d'alcool :



La deuxième est l'oxolation dans laquelle la réaction se produit entre deux groupements silanols, le groupe partant est cette fois-ci une molécule d'eau :



Pour l'hydrolyse comme pour la condensation, le mécanisme de ces réactions est une substitution nucléophile qui peut être accélérée lors d'un ajout de catalyseur acide ou basique. Ces réactions donnent naissance à un sol colloïdal, c'est-à-dire une dispersion de matière solide dans un solvant liquide. La viscosité augmente pendant cette étape et le liquide finit par se figer : c'est la gélification. Solide et transparent, le gel obtenu est constitué d'un réseau polymérique poreux de silice et emprisonnant le solvant. L'obtention d'un matériau à partir du gel est effectuée en éliminant le solvant par séchage. Une étape de séchage à très haute température permet l'élimination des pores et la fusion du gel en verre de silice.

Stöber *et al* sont les premiers à utiliser ce procédé pour la synthèse de particules de silice,³⁶ d'où le nom de méthode Stöber souvent employé pour décrire la synthèse des nanoparticules de silice. En présence d'eau et d'ammoniaque, l'hydrolyse et la condensation de tétraéthoxysilane (TEOS) mis en solution dans l'éthanol conduit à la formation de particules de silice. Les différentes investigations menées sur la synthèse des billes de silice par la méthode de Stöber s'accordent sur le fait que le diamètre et la taille des pores dépendent des paramètres suivants : les concentrations en TEOS, eau et ammoniaque, la température, la nature de l'alcool et de la source de silice, ainsi que la force ionique de la solution aqueuse.³⁷ L'utilisation de milieux organisés comme les microémulsions confère un meilleur contrôle de la synthèse des particules.

Dans notre cas, les nanoparticules de silice sont synthétisées par la voie de microémulsion inverse. Les microémulsions sont des dispersions de type liquide-liquide contenant des systèmes instables huile dans l'eau ou eau dans l'huile. L'ajout de tensioactifs permet alors de stabiliser ces systèmes. En choisissant le bon rapport eau/huile/tensioactif, des micelles inverses peuvent être formées (des nanogouttelettes d'eau dans un solvant organique stabilisées par un tensioactif). La synthèse des nanoparticules de silice par voie micellaire inverse consiste à ajouter le réactif, ici le TEOS, dans une microémulsion. Celui-ci est hydrolysé à l'interface des micelles grâce à la présence d'ammoniaque qui agit comme catalyseur et devient alors plus hydrophile. Les molécules hydrolysées pénètrent dans la phase aqueuse à l'intérieur des micelles où ont lieu les réactions de condensation de manière confinée. Ainsi les éléments présents dans la phase aqueuse pourront être piégés à l'intérieur de la matrice de silice.

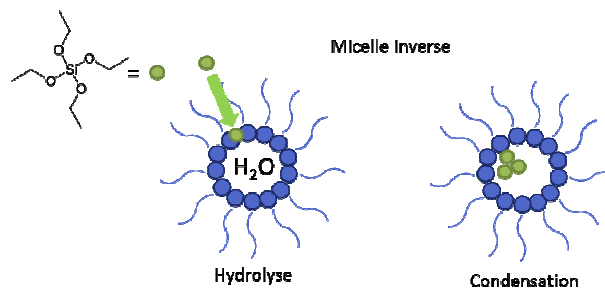


Figure V-13: Hydrolyse et condensation du TEOS dans les micelles inverses

De nombreux paramètres influencent la taille et la morphologie des nanoparticules de silice. Dans cette étude nous allons nous concentrer sur l'utilisation d'Igepal CO-520 comme tensioactif pour élaborer des particules selon le système ternaire (eau/cyclohexane/Igepal CO-520) et de Triton X-100 et Hexan-1-ol pour l'élaboration de particules selon le système quaternaire (eau/cyclohexane/Triton X-100 /Hexan-1-ol). La synthèse de ces particules est issue de la littérature³⁸ et sa mise au point (quantités d'eau, tensioactifs, cyclohexane, ammoniacque et TEOS) a été réalisée par Nicolas Wartenberg au cours de sa thèse.³⁹

La synthèse se déroule de la manière suivante : les tensioactifs et le cyclohexane sont mélangés jusqu'à ce que la solution soit homogène. L'eau contenant les complexes de lanthanides et l'ammoniacque sont ensuite ajoutées et le mélange est laissé sous agitation pendant 30 min avant d'ajouter le TEOS. Après 24h d'agitation, les micelles sont déstabilisées dans l'acétone puis les particules de silice sont récupérées par centrifugation. Les particules ainsi synthétisées sont lavées trois fois avec de l'éthanol et trois fois avec de l'eau par centrifugation et redispersion successives pour éliminer les tensioactifs. Les nanoparticules obtenues sont ensuite dispersées dans 200 μL d'eau contenant 0.1% de xantham gum pour éviter leur agrégation. Le pH de la suspension est ajusté à 7.4-7.6 à l'aide d'une solution d'HCl (1 M).

- *Système ternaire*

Ce système utilise une microémulsion basée sur un équilibre ternaire eau/cyclohexane/Igepal CO-520. Ce dernier est un tensioactif non ionique (figure V-14) utilisé pour la synthèse de nanoparticules de petites tailles, de 15 à 55 nm de diamètre. Le tensioactif utilisé fait que la structure des micelles formées est lamellaire.³⁸ Cette géométrie favorise les échanges entre gouttelettes d'eau, ce qui augmente la vitesse de nucléation et induit des tailles de particules relativement faible.

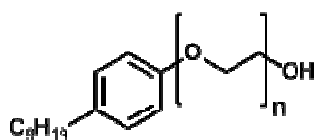


Figure V-14 : Structure du tensioactif non ionique Igepal CO-520

Les complexes de $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^{+}$, $[\text{Gd}(\text{Trita})(\text{H}_2\text{O})]^{+}$, $[\text{Gd}(\text{HPDO3A})(\text{H}_2\text{O})]^{+}$ sont incorporés dans les nanoparticules synthétisées par le système ternaire avec différents ratios. Différents volumes d'une solution aqueuse de 10 mM de complexe sont ajoutés dans la synthèse au même moment de rajouter l'eau. Des dopages de 160, 240, 320, 480 μL soit 1.6, 2.4, 3.2, et 4.8 μmol sont effectués pour chaque complexe.

La première caractéristique que l'on peut noter est la très faible incorporation des dérivés du DOTA. En effet, le dosage effectué par la méthode de la susceptibilité magnétique indique que des concentrations très faibles sont obtenues lors de la synthèse d'un lot de nanoparticules quel que soit le complexe et la quantité utilisée ($[\text{GdL}] < 0.1 \text{ mM}$). Le manque de sensibilité de cette méthode de susceptibilité empêche de mesurer ces concentrations avec précision. En effet, une concentration minimum de 0.5 mM doit être obtenue pour avoir une bonne précision. Des temps de relaxation d'environ 500 ms ont pu être mesurés pour les trois complexes avec les différents dopages. Faute de

connaître la concentration des complexes dans les nanoparticules, la relaxivité n'a pas pu être calculée. La technique plus sensible d'ICP-MS permettrait de la déterminer. Cependant dans le cadre de ce travail, nous n'avons pas pu effectuer cette mesure.

On constate que les complexes dérivés du DOTA s'incorporent beaucoup moins bien que les complexes comportant des groupements hydrophobes précédemment étudiés au laboratoire (picolinate et hydroxyquinoléine). Grâce à cette première étude, on peut souligner la nécessité de la présence de groupements hydrophobes sur le ligand pour avoir une bonne incorporation des complexes dans les nanoparticules. La conception du ligand est donc essentielle, car il faut que le complexe soit bien soluble dans l'eau et qu'il comporte également des groupements hydrophobes, pour permettre une incorporation efficace.

Les complexes d'hydroxyquinoléine sont choisis pour cette étude car ils possèdent toutes les propriétés requises pour une incorporation efficace dans les billes de silice. Le noyau hydroxyquinoléine apporte la partie hydrophobe et leur fonctionnalisation par des groupements sulfonates permet une bonne solubilité dans l'eau.

L'étude du dopage des nanoparticules de silice synthétisées par le système ternaire est réalisée pour les complexes $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$, $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$. De meilleures incorporations en comparaison avec les dérivés du DOTA sont obtenues pour un dopage minimal de 1.6 μmol . L'incorporation est identique pour les trois complexes, avec des concentrations obtenues supérieures à 0.4 mM pour ce système.

- *Système quaternaire*

Ce système utilise une microémulsion basée sur un équilibre quaternaire eau/cyclohexane/tritonX-100/hexanol. Le triton X-100 (figure V-15) est un tensioactif non ionique de la famille des polyoxyéthylène alkylphénol éthers. L'hexanol sert de co-tensioactif permettant d'abaisser la tension interfaciale et la concentration micellaire critique. Leur présence sert également à augmenter le nombre de micelles et à une meilleure pénétration des additifs dans les chaînes aliphatiques des tensioactifs.⁴⁰ Par conséquent, la présence de l'hexanol dans le mélange favorise l'obtention de l'état d'équilibre entre l'affinité hydrophobe du triton-X100 pour le cyclohexane et le caractère hydrophile de sa partie polaire destinée à la solubilisation de la phase aqueuse dans le mélange. Toutes ces caractéristiques permettent de générer un système micellaire inverse efficace pour réaliser les réactions d'hydrolyse-condensation du TEOS qui va conduire à la formation de nanoparticules de silice de taille comprise entre 50 et 80 nm.

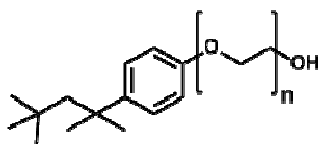


Figure V-15 : Structure du tensioactif non ionique Triton X-100

Ces particules sont également dopées avec le chargement maximal (0.48 μmol d'une solution aqueuse de 10 mM en complexe de $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]$, $[\text{Gd}(\text{Trita})(\text{H}_2\text{O})]$ ou $[\text{Gd}(\text{HPDO3A})(\text{H}_2\text{O})]$)

correspondant à la quantité maximale d'eau qu'il est possible d'ajouter, Dans ce cas encore, l'incorporation de ces complexes est très peu efficace, avec des concentrations obtenues inférieures à 0.1 mM pour un lot de particules.

Dans le cas du système quaternaire la présence de groupements hydrophobes est également nécessaire pour garantir une bonne incorporation du complexe. Le dopage des nanoparticules de silice synthétisées par le système quaternaire par les complexes d'hydroxyquinoléine $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$, $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ est étudié. Pour ce système encore, on observe une très bonne incorporation de ces complexes avec des concentrations supérieures à 2 mM avec un dopage de 1.6 μmol en complexes de gadolinium.

Nous allons donc par la suite nous concentrer sur l'étude des nanoparticules de silice dopées aux complexes d'hydroxyquinoléine, dont le taux d'incorporation est plus efficace pour les systèmes ternaire et quaternaire.

b) Caractérisation des nanoparticules

Chaque lot de nanoparticules obtenu (c'est-à-dire pour chaque système et pour chaque complexe) est caractérisé par microscopie électronique à balayage (MEB) et par diffusion dynamique de la lumière (DLS) afin de déterminer la taille et le diamètre hydrodynamique des nanoparticules. Le nombre de complexes par particule est évalué en connaissant le diamètre des particules, la masse sèche et la concentration en complexe de gadolinium dans un volume donné. Le détail des calculs est donné dans la partie expérimentale.

Les nanoparticules de silice obtenues par le système ternaire sont notées avec un chiffre devant correspondant au diamètre et de la lettre T pour ternaire. De même pour les nanoparticules synthétisées par le système quaternaire, elles sont notées avec un chiffre correspondant à leur diamètre puis de la lettre Q pour quaternaire.

- *Analyse par MEB*

Différents chargements sont réalisés pour le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ en ajoutant différents volumes de 160 μL à 480 μL d'une solution à 10 mM. Les différentes nanoparticules sont caractérisées par MEB pour mesurer leur diamètre et le nombre de complexes par particule est calculé (voir partie expérimentale, VI-4). Les résultats sont regroupés dans le tableau V-2.

Nom	Chargement	Diamètre	Complexes par particule	Complexes par nm ³
25T	1,6 µmol	25 nm	55	6.7x10 ⁻³
40T	2,4 µmol	40 nm	220	6.2x10 ⁻³
50T	3,2 µmol	50 nm	300	4.6x10 ⁻³
55T	4,8 µmol	55 nm	380	4.2x10 ⁻³
55Q	1,6 µmol	55 nm	3880	6.4x10 ⁻²
60Q	2,4 µmol	60 nm	7360	6.5x10 ⁻²
65Q	3,2 µmol	65 nm	10050	6.7x10 ⁻²
80Q	4,8 µmol	80 nm	11220	6.3x10 ⁻²

Tableau V-2 : Différents chargements par $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ des nanoparticules synthétisées par les systèmes ternaire et quaternaire

Les images MEB montrent que pour chaque système les particules obtenues sont sphériques et homogène en taille. L'erreur sur la taille est de ± 5 nm. Pour les deux systèmes, plus le chargement est important, plus les particules obtenues ont une taille élevée et plus le nombre de complexes par particule augmente. Cette augmentation est linéaire pour les particules synthétisées par le système quaternaire puisque le nombre de complexes par unité de volume reste constant. Ce n'est pas le cas sur les particules synthétisées par le système ternaire : l'augmentation du nombre de complexes par particule n'est pas proportionnelle au volume de la particule.

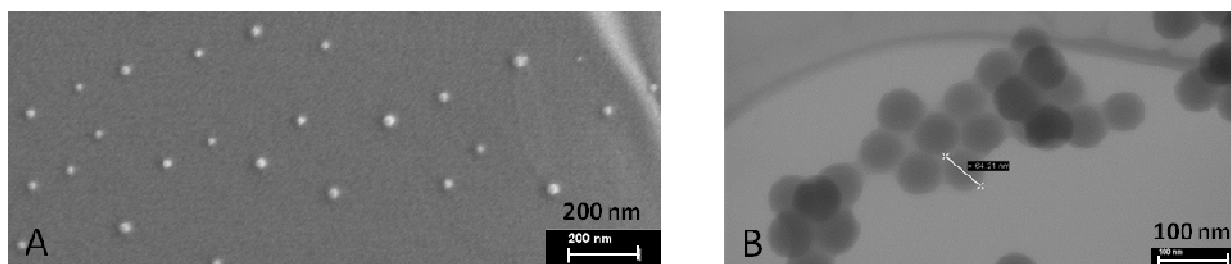


Figure V-16 : Images MEB des particules $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @40T (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @65Q (B)

Pour le système ternaire, des particules allant de 25 à 55 nm avec peu de complexes incorporés sont obtenues. Le nombre de complexes par particule est inférieur à celui de l'ebpatcn, étudié précédemment au laboratoire. Pour un dopage équivalent, il est de 55 complexes par particule contre environ 140 pour l'ebpatcn.²⁶

Pour le système quaternaire, les particules obtenues sont plus grosses (de 55 à 80 nm) avec beaucoup plus de complexes incorporés. Le nombre de complexes par particule est d'ailleurs supérieur pour notre système avec 3880 complexes par particule contre 3000 pour l'ébpatcn pour le même chargement.²⁶ Ce résultat n'est pas étonnant étant donné qu'il est montré que les complexes dérivés de l'hydroxyquinoléine avaient une meilleure incorporation que ceux dérivés des picolines dans le cas du système quaternaire.²⁴

Les particules non dopées ont été étudiées au cours de la thèse de Nicolas Wartenberg.³⁹ Les nanoparticules non dopées ont une taille de 15 et 50 nm selon qu'elles soient synthétisées respectivement par le système ternaire ou quaternaire. L'incorporation des complexes induit une augmentation de la taille des nanoparticules.

En ce qui concerne les complexes $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ seule la morphologie des nanoparticules chargées avec 1.6 μmol de complexe est étudiée. Pour le système ternaire, les nanoparticules contiennent 65 et 70 complexes par particule respectivement et ont un diamètre de 25 nm, identique à celui obtenu pour le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$, (figure V-17). De même pour le système quaternaire, des particules de 55 nm sont obtenues contenant 3640 complexes par particule pour $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et 3750 pour $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$.

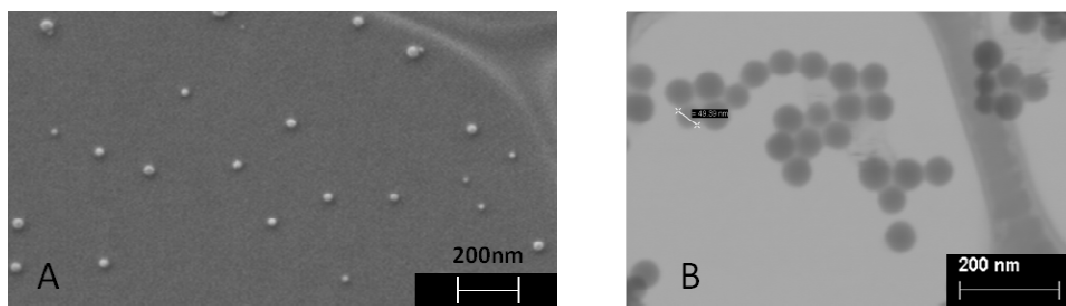


Figure V-17 : Images MEB des particules $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}@25\text{T}$ (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@55\text{Q}$ (B)

Ces résultats montrent que le diamètre et le nombre de complexes par particule n'est pas dépendant des complexes utilisés pour cette étude. En effet, ceux-ci contiennent les mêmes types de groupements hydrophobes (hydroxyquinoléine) et hydrophiles (sulfonates) et doivent donc s'incorporer de la même manière dans la matrice de silice.

- *Etude de surface spécifique*

La mesure de surface spécifique sur les systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@25\text{T}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@55\text{Q}$ est effectuée par adsorption d'azote à l'ETH Zurich par Victor Mougel. Celle-ci est mesurée en présence et en l'absence des complexes. Pour effectuer cette mesure, quatre lots de chaque type de nanoparticules sont synthétisés puis lyophilisés. Avant d'effectuer la mesure, les particules sont dégazées sous vide durant une nuit.

La surface spécifique est déterminée par la théorie BET. Elle est une extension de la théorie de Langmuir, qui permet de décrire des phénomènes de physisorption. La théorie de Langmuir se limite à une adsorption de gaz monomoléculaire sur une surface donnée et suppose que la vitesse

d'absorption est égale à la vitesse de désorption. Portant le nom de ses auteurs (Brunauer, Emmett et Teller), la théorie BET est une extension de la théorie de Langmuir appliquée à une adsorption multicouche. Elle permet de prévoir le nombre de molécules nécessaires à la formation d'une monocouche sans que celle-ci soit effectivement remplie, ce qui est le cas où des multicouches commencent à se former avant que la monocouche ne soit complète.

La surface spécifique théorique est calculée en supposant que les nanoparticules soient non poreuses à partir de l'équation V-2 décrite dans la littérature.⁴¹

$$\text{Equation V-2 : } S = \frac{6}{d \times \rho}$$

Avec d le diamètre de la nanoparticule et ρ la densité volumique de la nanoparticule, prise égale à celle de la silice pure (1.95 g cm^{-3}).⁴² Les résultats des mesures et du calcul sont décrits dans le tableau V-3.

	15T	[Gd(dhqNSO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻ @25T	50Q	[Gd(dhqNSO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻ @55Q
Exp	289	205	149	93
Théorie	205	123	61	55

Tableau V-3 : Surface spécifique expérimentale et théorique en m²/g des nanoparticules non dopées et dopées avec [Gd(dhqNSO₃)(H₂O)₃]³⁻

Les résultats des mesures expérimentales de surface spécifique montrent une diminution avant et après dopage des deux types de particules. Cette diminution peut provenir d'une part de l'augmentation du diamètre et d'autre part de la présence des complexes de Gd(III) dans les pores de la particule qui n'interagissent pas avec l'azote.

La différence de surface spécifique entre les nanoparticules synthétisées par les systèmes ternaire et quaternaire montre qu'il y a plus d'espace disponible au niveau des pores dans les particules de 25 nm que celle de 55 nm. Ceci peut être corrélé au nombre de complexes par particule. En effet, la présence de nombreux complexes dans la particule de 55 nm rend plus difficile l'adsorption de gaz sur les pores. La taille des pores n'a pas pu être mesurée sur ces systèmes car il s'agit d'un réseau de silice amorphe dans laquelle la structure des pores n'est pas bien organisée. Les différences de valeurs de surface spécifique entre la théorie et l'expérimental permettent de confirmer la présence de pores dans les nanoparticules.

La géométrie des pores fait que la diffusion de l'eau autour des complexes de Gd(III) est très différente de celle des complexes en solution. La présence de nombreux complexes dans les nanoparticules de 55 nm pourrait rendre la diffusion des molécules d'eau plus difficile que dans celle de 25 nm. La mesure de surface spécifique est en accord avec cette interprétation.

En conclusion, les billes de silice obtenues sont sphériques, uniformes en taille et sont amorphes. Les complexes de Gd(III) sont encapsulés à l'intérieur des nanoparticules de manière non covalente. La diffusion des molécules d'eau se fait à travers des pores dont la taille n'a pas pu être déterminée de manière précise. La partie suivante montre la variation de la relaxivité en fonction des tailles des différentes particules. Ceci va nous permettre de sélectionner celles qui sont le plus adaptées pour l'optimisation de ce système.

c) Choix d'étude des nanoparticules de 25 et 55 nm

Afin de choisir le chargement optimum, les études de relaxivité sont menées sur le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ incorporés dans les nanoparticules de silice synthétisées avec les deux systèmes avec différents chargements. La relaxivité est mesurée à 50, 200 et 400 MHz à 25 °C (figure V-18).

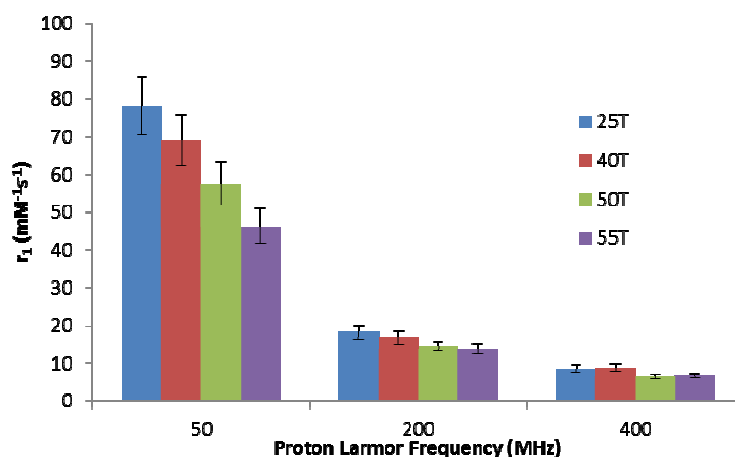


Figure V-18 : Relaxivité des nanoparticules contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ synthétisées *via* le système ternaire à 25 °C

Tout d'abord, la relaxivité obtenue pour le système ternaire est très élevée à bas champ, de $80 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C pour les particules de 25 nm, soit 6 fois plus élevée que pour le complexe en solution. A bas champ, la relaxivité diminue lorsqu'on augmente le chargement en complexes. La valeur du nombre de complexes par particule par unité de volume diminue lorsque le chargement augmente (tableau V-2). Cet effet est encore légèrement présent à 200 MHz mais disparaît à 400 MHz.

Pour le système ternaire, nous avons choisi pour la suite d'étudier les nanoparticules qui présentent une augmentation de la relaxivité la plus importante, à savoir celles de 25 nm contenant 55 complexes par particule.

En ce qui concerne le système quaternaire, l'évolution de la relaxivité en fonction de la taille des particules est différente (figure V-19).

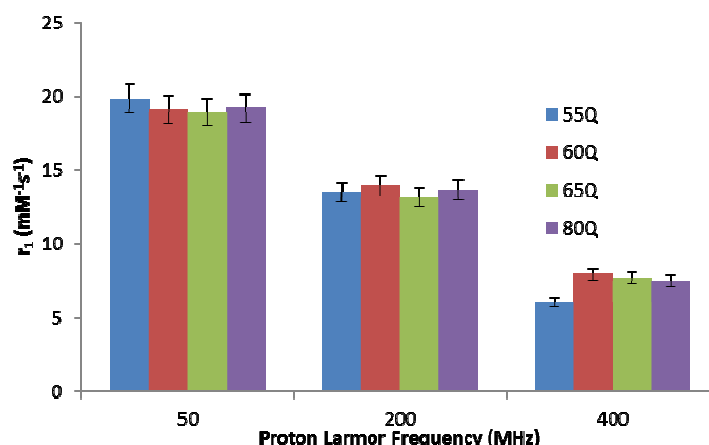


Figure V-19 : Relaxivité des nanoparticules contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ synthétisées *via* le système quaternaire à 25 °C

L'augmentation de la relaxivité de 20 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et à 25°C est beaucoup moins importante pour ce système que pour le système ternaire. De plus cette relaxivité ne varie pas en fonction de la taille des particules, ce qui peut être expliqué par le fait que le ratio nombre de complexes par particule sur le volume n'évolue pas (table V-2).

Aux vues de ces résultats nous avons choisi de nous concentrer sur les particules de 55 nm contenant 3880 complexes dans la particule, obtenue avec un chargement de 1.6 μmol pendant la synthèse, qui est la plus économique en complexe.

- *Nanoparticules de 55 nm*

Des billes de silice de 55 nm peuvent être obtenues avec les systèmes ternaire et quaternaire avec des chargements en complexes différents. Ces deux types de particules n'ont pas du tout le même comportement. En effet, il y a moins de complexes dans les particules synthétisées par le système ternaire (380 contre 3880) et la relaxivité par gadolinium y est beaucoup plus élevée (47 contre 20 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C, tableau V-4). La diffusion des molécules d'eau dans les pores semble être différente dans les deux cas. Le fait d'avoir moins de complexes dans la nanoparticule permettrait aux molécules d'eau de diffuser plus rapidement, menant à des relaxivités plus élevées. A haut champ, les valeurs de relaxivité sont identiques pour les deux types de nanoparticules. La chute de la relaxivité, qui est plus significative pour $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@55\text{T}$, peut également indiquer une différence dans le temps de corrélation rotationnelle.

	Complexes par particule	r_1 (50 MHz)	r_1 (200 MHz)
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@55\text{T}$	380	47±4	14±2
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@55\text{Q}$	3880	20±2	13±1

Tableau V-4 : $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ dans des nanoparticules de 55 nm

En conclusion de cette partie, nous avons étudié les nanoparticules de silice synthétisées par microémulsion inverse qui donne des particules de 25 nm par un système ternaire et de 55 nm par un système quaternaire lorsqu'elles sont dopées avec 1.6 μmol de complexes dérivés d'hydroxyquinoléine. Dans les parties suivantes, la relaxivité des différents systèmes va être étudiée plus précisément d'abord dans l'eau puis en milieu biologique. Pour ces mesures, les particules sont dispersées dans le milieu contenant 0.1% de xanthan gum qui est connu pour améliorer la stabilité des nanoparticules et éviter une agrégation rapide.⁴³ *Dans la suite de ce chapitre, ces particules seront appelées Si25NPs et Si55NPs.*

3. Relaxivité

a) Dans l'eau

- *Relaxivité longitudinale*

L'étude de la relaxivité longitudinale de chaque complexe incorporé dans les nanoparticules de silice est étudiée séparément et pour chaque système. Les paramètres gouvernant la relaxivité sont différents sur les trois complexes (cf partie 1-f), nous allons tenter de voir quels sont les effets de ces paramètres sur la relaxivité des nanoparticules.

- Incorporation du complexe $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$

Ce complexe n'ayant pas de molécule d'eau dans sa sphère interne, l'incorporation de ce complexe dans les nanoparticules donne une indication sur les effets de seconde sphère et de sphère externe dans les billes de silice. La relaxivité passe de 3.14 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le complexe en solution à 4.5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les particules de 55 nm et à 6 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les particules de 25 nm à 200 MHz et 25°C (table V-5). Ces données indiquent que l'encapsulation influe sur les effets de seconde sphère et de sphère externe. Les données de relaxivité indiquent que cette contribution est de 50% dans le cas des particules de 55 nm et qu'elle augmenterait d'un facteur 2 dans le cas des particules de 25 nm. Cependant, étant donné la faible augmentation de la relaxivité, on peut en déduire que les contributions de seconde sphère et de sphère externe sont marginales par rapport à la contribution de sphère interne. Nous allons alors étudier plus en détail la relaxivité des billes de silice dopées avec les deux autres complexes, le $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ monoquo et le $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ trisaquo pour observer les effets de sphère interne.

$[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$	$[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}@Si25NPs$	$[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}@Si55NPs$
3.14	6	4.5

Tableau V-5 : Relaxivité en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25 °C du complexe $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ en solution et dans les NPs

- Incorporation du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$

Comme il a été présenté précédemment, ce complexe a la caractéristique d'avoir une molécule d'eau dans sa sphère interne, une vitesse d'échange favorable à la relaxivité de $10\text{-}50 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ et un long temps de corrélation rotationnelle de 260 ps. La relaxivité de ce complexe incorporé dans des nanoparticules de 25 et 55 nm est donnée dans la figure V-20.

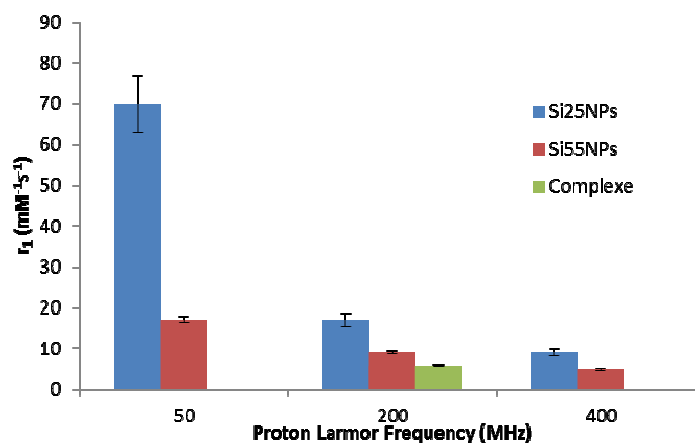


Figure V-20 : Relaxivité des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs, $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si55NPs et de $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ à différents champs et à 25°C

Tout d'abord, l'augmentation de la relaxivité est bien plus importante pour ce complexe encapsulé dans les nanoparticules comparée au précédent qui ne possède pas de molécule d'eau (17 contre 6 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et 25°C). Ceci confirme la contribution très importante de la sphère interne. Cette contribution implique une vitesse d'échange suffisamment élevée de la molécule d'eau de sphère interne et un allongement probable du temps de corrélation rotationnelle dû à l'incorporation du complexe dans la nanoparticule.

Ensuite les particules de 25 nm ont une relaxivité bien plus élevée que celle de 55 nm quel que soit le champ. Les mesures de surface spécifique ont montré qu'il y a plus d'espace disponible dans les particules de 25 nm. Les molécules d'eau sont alors capables d'y diffuser de manière plus efficace à l'intérieur des particules. Le diamètre de la particule, le nombre de complexes par particule, le temps de résidence de l'eau dans la nanoparticule et probablement la taille des pores impliquent cette variation de diffusion de l'eau et des complexes, menant à des relaxivités différentes. Ceci est valable quel que soit le complexe incorporé dans ce type de nanoparticules.

	r_1 par Gd	Complexe par particule	r_1 par NPs
$[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs	70±5	~65	~4550
$[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si55NPs	17±2	~3640	~61880

Tableau V-6 : Relaxivité à 50 MHz et 25°C des nanoparticules dopées avec $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$

La relaxivité par gadolinium des billes de 25 nm est très élevée, dans ce cas elle est de $70 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C . Ce système donne une relaxivité par particule de $4550 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C . Bien que la relaxivité par gadolinium des billes de 55 nm soit inférieure ($17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C), le fait d'avoir un grand nombre de complexes incorporés conduit à une relaxivité par particule de $61880 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C . La relaxivité est doublée à 200 MHz pour le système $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si55NPs et triplée pour $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs par rapport au complexe en solution. Une chute de la relaxivité est observée à haut champ, qui est caractéristique d'un système ayant un temps de corrélation rotationnelle long. Ceci est étudié plus précisément dans la partie suivante avec le profil NMRD du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ incorporé dans les billes de silice.

- Incorporation du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Pour ce complexe, ce sont les effets des trois molécules d'eau et de la vitesse d'échange plus lente qui sont principalement étudiés. Les temps de relaxation longitudinale T_1 des protons de l'eau en présence des nanoparticules sont mesurés entre 0.01 et 400 MHz. Les profils NMRD de ce complexe incorporé dans les particules de 25 et 55 nm à 25°C et 37°C sont présentés dans la figure V-21.

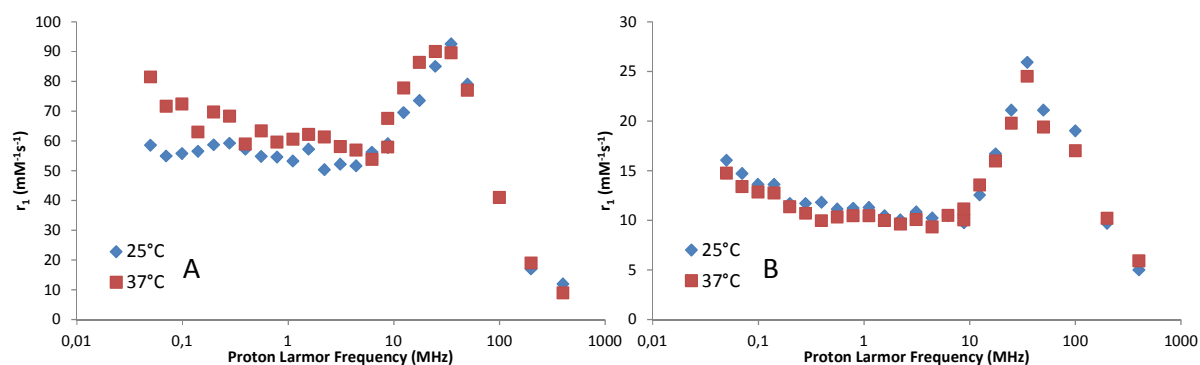


Figure V-21 : Profils NMRD des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs (A, c=0.5 mM) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs (B, c=2 mM) à 25°C et 37°C , pH =7.4

Ces profils nous permettent d'avoir plusieurs informations. Tout d'abord comme dans le cas précédent, la relaxivité des billes de 25 nm dopées au $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ ont une relaxivité beaucoup plus élevée que celles de 55 nm. Ceci peut être expliqué par leur différence de morphologie et la diffusion de l'eau. Pour les particules de 25 nm, la relaxivité obtenue est très élevée, de $90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C , similaire à celle obtenue pour l'ebpatcn ($84 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C).²⁶ Pour les particules de 55 nm, le maximum de la relaxivité est également obtenu à 35 MHz avec une valeur de $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 25°C . Cette valeur de relaxivité est légèrement supérieure à celle obtenue avec l'incorporation du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, probablement dû à la présence de deux molécules d'eau supplémentaires dans la sphère interne du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$.

Dans les deux cas, la forme des profils NMRD obtenus qui présentent un maximum à 35 MHz et une chute pour des fréquences supérieures à 50 MHz, n'est pas sans rappeler celle des systèmes qui présentent une rotation lente des complexes. Comme dans les systèmes présentés précédemment,

l'incorporation du complexe entraînant une restriction de son mouvement de rotation grâce à des interactions électrostatiques et aux liaisons hydrogène et la diffusion des molécules d'eau à travers les pores de la matrice de silice mènent à des relaxivités élevées. La relaxivité reste élevée à 50 MHz pour les deux systèmes, de $79 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $21 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivement pour les particules de 25 nm et 55 nm. A 200 MHz et 25°C, elle reste quasiment le double pour le système $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs par rapport au complexe en solution mais il n'y a pas d'augmentation observée pour les particules de 55 nm. La relaxivité par particule a été calculée à différents champs et est donnée dans le tableau V-7.

	35 MHz	200 MHz
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs	~5000	~1080
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs	~97000	~5440

Tableau V-7 : Relaxivité par particule des nanoparticules dopées avec $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Le nombre de complexes par particule déterminé dans la partie précédente nous permet de calculer la relaxivité par particule. Elle est d'environ $5000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les billes de 25 nm et monte jusqu'à $97000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les particules de 55 nm à 35 MHz et 25°C. Elle reste élevée à 200 MHz, respectivement de 1080 et $5440 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les billes de 25 et 55 nm à 25°C. L'incorporation de nombreux complexes dans la matrice de silice permet d'avoir une relaxivité par particule très élevée.

On peut également noter que la relaxivité varie très peu avec la température. Dans des nanoobjets tels que les liposomes, il a été montré une augmentation de la relaxivité avec la température,⁴⁴ ce qui n'est pas le cas dans nos systèmes. Cela est peut être dû à une vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées limitante, comme cela a été observé dans le cas des hydrogels.²¹

Les mesures de relaxivité quasi-similaire entre les complexes mono et trisaquo nous ont amené à nous demander si le nombre de molécule d'eau de ce complexe était toujours le même dans la nanoparticule. En effet, des groupements OH présents à la surface des pores des nanoparticules pourraient venir déplacer les molécules d'eau coordonnées au métal. Pour ces raisons nous avons mesuré le nombre d'hydratation du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ dans les nanoparticules de 25 nm. Pour effectuer cette mesure, les complexes analogues $[\text{Eu}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ sont encapsulés dans les billes de 25 nm. Le nombre d'hydratation est déduit des temps de vie différents de la luminescence de l'ion Eu(III) après excitation directe selon que les billes sont en suspension dans l'eau deutérée ou légère. Les équations phénoménologiques suivantes décrites dans la littérature donnent le nombre d'hydratation q :⁴⁵

$$\text{Equation V-2-a : } q = 1.05 \times \Delta k_{obs}$$

$$\text{Equation V-2-b : } \Delta k_{obs} = k_{obs}(\text{H}_2\text{O}) - k_{obs}(\text{D}_2\text{O})$$

$$\text{Equation V-2-c : } k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}}$$

Ces mesures sont réalisées par Daniel Imbert et les résultats sont regroupés dans le tableau V-8.

	τ_{obs}	q
$[\text{Eu}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si25NPs}$	H_2O 0.30(1)	3.0(5)
	D_2O 2.14(8)	

Tableau V-8 : Temps de vie de $[\text{Eu}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si25NPs}$ mesurés à 25°C avec $\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$

Ces mesures confirment que le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ possède toujours trois molécules d'eau dans sa sphère interne après incorporation dans les nanoparticules.

On suppose alors que la vitesse d'échange des complexes est le facteur limitant dans l'augmentation de la relaxivité. En effet, la comparaison des valeurs de relaxivité des différents complexes incorporés dans les billes de silice montre que ces valeurs sont légèrement plus importantes pour le complexe trisaquo $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ que pour les deux complexes monoaquo $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{ebpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$.

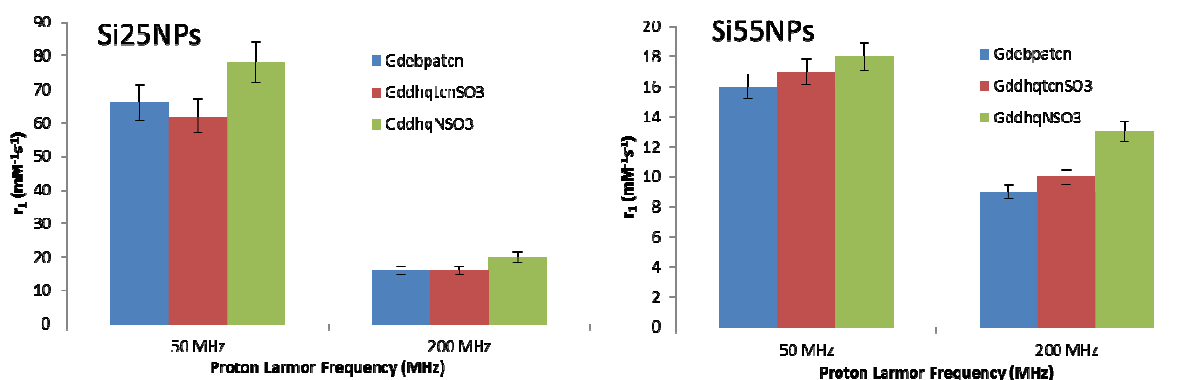


Figure V-22 : Comparaison de relaxivités à 25°C de complexes incorporés dans les nanoparticules de 25 (gauche, $c=0.5 \text{ mM}$) et 55 nm (droite, $c=2 \text{ mM}$)

Si on suppose que l'augmentation significative de la relaxivité est due à un mécanisme de sphère interne, alors la présence de deux molécules d'eau supplémentaires dans la sphère de coordination du métal devrait entraîner une augmentation plus importante que dans le cas des complexes monohydratés. Or ce n'est pas ce qui est observé ici. Un autre paramètre déterminant la relaxivité de sphère interne est la vitesse d'échange des molécules d'eau d'hydratation. Comme la vitesse d'échange du complexe trisaquo est nettement inférieure à celles des deux autres complexes monohydratés (4 contre 10-50 et $86 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), elle peut limiter la relaxivité du complexe trisaquo, l'empêchant d'atteindre des valeurs encore plus élevées, notamment à champs moyens. Un moyen de confirmer l'impact de ce paramètre serait d'incorporer un complexe bisquo avec une très bonne vitesse d'échange. L'encapsulation du complexe $[\text{Gd}(\text{hqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, étudié au cours de la thèse de Gaylord Tallec, dont la vitesse d'échange devrait être améliorée du fait de deux molécules d'eau dans la sphère interne est envisagée.

- *Relaxivité transversale*

Dans plusieurs exemples, l'incorporation de complexes de gadolinium dans des nanoobjets s'accompagne également d'une large augmentation de la relaxivité transversale. Les mécanismes qui la régissent sont différents de celle de la relaxivité longitudinale, en particulier à haut champ. Le temps de relaxation transversale est défini comme la constante de temps qui régit la décroissance de l'aimantation transversale des protons de l'eau provenant des interactions rapidement fluctuantes de ces protons avec les spins nucléaires et électroniques voisins considérés indépendamment les uns des autres. La mesure du temps de relaxation transversale permet de distinguer les différentes interactions moléculaires dans les tissus ou dans la substance d'intérêt. Cependant, la décroissance observée de l'aimantation transversale est beaucoup plus rapide que s'il n'y avait que des interactions indépendantes. La rapidité de cette décroissance résulte probablement des inhomogénéités de champ magnétique qui sont induites par la susceptibilité volumique des nanoparticules qui est créée par les ions lanthanides (III) paramagnétiques qu'elles contiennent et qui diffère fortement de la susceptibilité volumique de l'eau. Le temps de relaxation transversale observé est noté T_2^* et est donné par l'équation V-3.⁴⁶

$$\text{Equation V-3 : } \frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2i}}$$

avec T_{2i} représentant la contribution des inhomogénéités du champ magnétique à l'échelle de la taille des nanoparticules.

Les nanoparticules d'oxydes de fer sont connues pour réduire le temps de relaxation transversal des protons de l'eau. En effet, leurs moments super-paramagnétiques peuvent aussi induire des fortes inhomogénéités de champ magnétique par les ions Fe^{2+} avec leurs quatre électrons non appariés et les ions Fe^{3+} avec leur cinq électrons non appariés dans la couche 3d. Ces ions peuvent être couplés par échange ferro ou ferrimagnétique de manière à créer un fort moment super-paramagnétique.

La relaxivité transversale est mesurée pour les systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}25\text{NPs}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}55\text{NPs}$ à différents champs et 25°C (figure V-23).

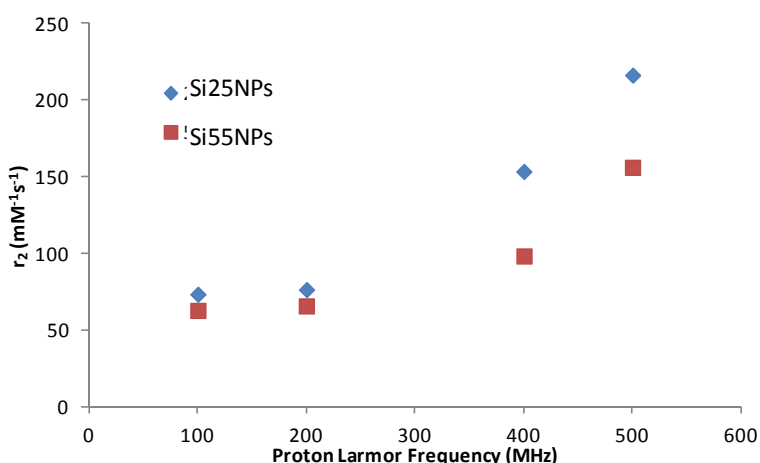


Figure V-23 : Relaxivité transversale de $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}25\text{NPs}$ ($c=0.5$ mM) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}55\text{NPs}$ ($c=2$ mM) à 25°C, pH = 7.4

Dans notre cas également, une augmentation de la relaxivité transversale est observée en incorporant les complexes de gadolinium dans les nanoparticules de silice. Celle-ci augmente avec le champ, d'abord de façon lente jusqu'à 200 MHz puis de manière plus importante à hauts champs. Comme prédit par toutes les théories, r_2 est supérieur à r_1 quel que soit le champ. Cette relaxivité transversale qui est deux fois plus élevée que la relaxivité longitudinale ne peut pas être interprétée uniquement avec les théories standards. En effet, les effets observés peuvent être attribués aux inhomogénéités du champ magnétique créées par les nanoparticules paramagnétiques et l'échange des molécules d'eau entre les particules et le solvant.⁴⁷ Cette propriété des nanoparticules donne l'avantage de pouvoir faire des images pondérées T_1 à bas champ avec un $r_1 \approx r_2$ et des images pondérées T_2 à haut champ, avec une forte relaxivité transversale plus de 10 fois supérieure à la relaxivité longitudinale à 400 MHz.

Les mécanismes d'augmentation de la relaxivité lors de l'incorporation des complexes de gadolinium sont difficiles à appréhender. En effet, en plus des paramètres présentés en introduction régissant la relaxivité d'un complexe en solution, d'autres paramètres vont entrer en jeu dans le cadre des nanoparticules. La vitesse de diffusion de l'eau entre l'intérieur et l'extérieur de la nanoparticule, la vitesse de rotation de la nanoparticule et du complexe incorporé dans la nanoparticule, sont également des paramètres à prendre en compte. Dans ce cas, la modélisation du profil de relaxivité pour déterminer les paramètres mis en jeu par la théorie SBM devient très difficile : ces paramètres sont difficiles à mesurer de manière indépendante.

En conclusion de cette partie, l'incorporation de complexes dérivés de l'hydroxyquinoléine dans les particules de silice de 25 nm donne une relaxivité par gadolinium à bas champ très élevée, jusqu'à $90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C, une des plus hautes valeurs reportées dans la littérature. L'avantage des billes de silice de 55 nm dopées aux complexes est leur relaxivité par particule qui peut atteindre $97000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C. Les deux types de nanoparticules montrent une relaxivité transversale très importante qui permet d'avoir des systèmes adaptés à l'imagerie T_1 à bas champ et T_2 à haut champ. Le mécanisme d'augmentation de la relaxivité n'est pas connu et peut être difficilement modélisé par la théorie SBM. Le comportement de ces systèmes en milieu biologique est étudié dans la partie suivante.

b) En milieu biologique : Sérum, BSA, Anions

- Dans le sérum

Le sérum est constitué par la partie du sang débarrassé de ses facteurs de coagulation tels que la fibrine. Ce liquide majoritairement constitué d'eau contient de nombreux sels inorganiques (Na^+ , Cl^- , K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , etc.), des anions organiques et des protéines plasmatiques dont 60% d'albumine. La mesure de la relaxivité dans le sérum permet d'avoir une première approximation de leur comportement en milieu biologique.

La relaxivité des particules de 25 et 55 nm synthétisées par les systèmes ternaire et quaternaire respectivement et contenant les complexes $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ est étudiée dans le sérum. Pour calculer celle-ci, la contribution diamagnétique du sérum de 0.8 s^{-1} est mesurée et prise en compte en plus de celle de la nanoparticule. Les valeurs mesurées à 50, 200 et 400 MHz pour les deux tailles de particules sont regroupées dans les graphes de la figure V-24.

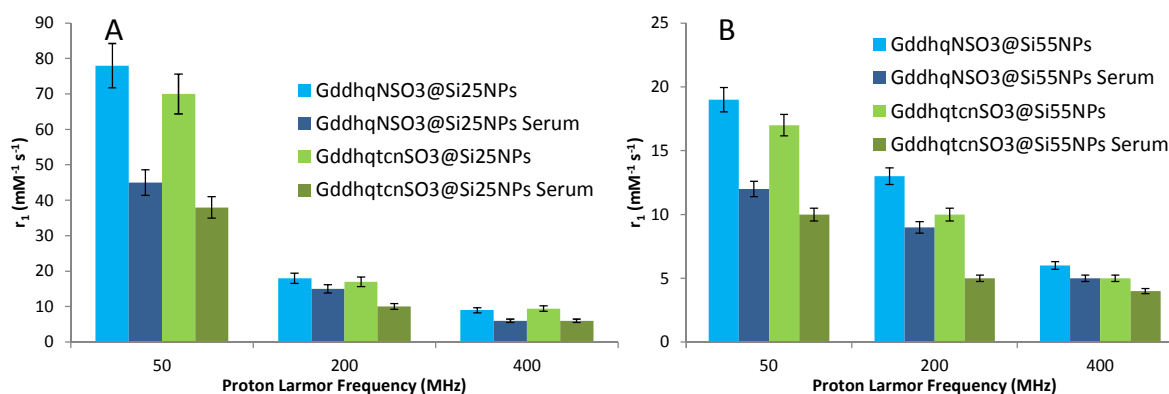


Figure V-24 : Relaxivité dans l'eau et le sérum à 25°C et pH=7.4 de $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs, $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs (A, $c = 0.5 \text{ mM}$), $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs et $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si55NPs (B, $c = 2 \text{ mM}$)

Quel que soit la taille des particules et le complexe étudié, une diminution importante de la relaxivité est observée. Celle-ci est particulièrement marquée à 50 MHz où la diminution est de 40% pour les billes de 25 nm et de 33% pour celles de 55 nm. Notons que le même effet est observé sur les deux complexes mono et trisquo et que la diminution de la relaxivité est moins flagrante à haut champ, notamment sur les particules de 55nm.

Malgré cette diminution, la relaxivité des particules de 25 nm reste supérieure à celle du complexe en solution en présence de sérum. Cependant, celle des billes de 55 nm est plus faible. Le tableau V-9 présente les différentes valeurs de relaxivité des deux complexes à 50 MHz dans le sérum.

	Complexe	Si25NPs	Si55NPs
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$	24.09 ± 0.08	45 ± 4	12 ± 1
$[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$	27.26 ± 0.08	38 ± 4	10 ± 1

Tableau V-9 : Relaxivité en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz de différents systèmes dans le sérum

Pour mieux comprendre ce phénomène de diminution de la relaxivité, celle-ci est étudiée en présence des composants du sérum pris séparément : d'une part en présence de BSA et d'une autre part en présence d'anions.

- En présence de BSA

L'albumine sérique sert de transporteur à beaucoup de ligands exogènes ou endogènes, comme les acides gras, les ions métalliques ou les produits pharmaceutiques.⁴⁸ Cette protéine dont la masse avoisine les 66 kDa, est composée de trois domaines qui sont structurellement identiques pour former une structure en forme de cœur. Cette protéine est la protéine sanguine la plus abondante : elle représente 60% du total des protéines sériques et sa concentration est de 4.5% m/v, soit environ 0.68 mM. Pour les études menées, la BSA (Bovine Serum Albumine) est utilisée. Elle s'avère

suffisamment proche de la HSA (Human Serum Albumine) par sa structure, l'enchaînement des acides aminés et l'emplacement des sites de liaisons pour servir de modèle.

La relaxivité des nanoparticules de 25 et 55 nm dopées avec les mêmes complexes de gadolinium en présence de BSA (0.68 mM) à 50 et 200 MHz est donnée dans la figure V-25.

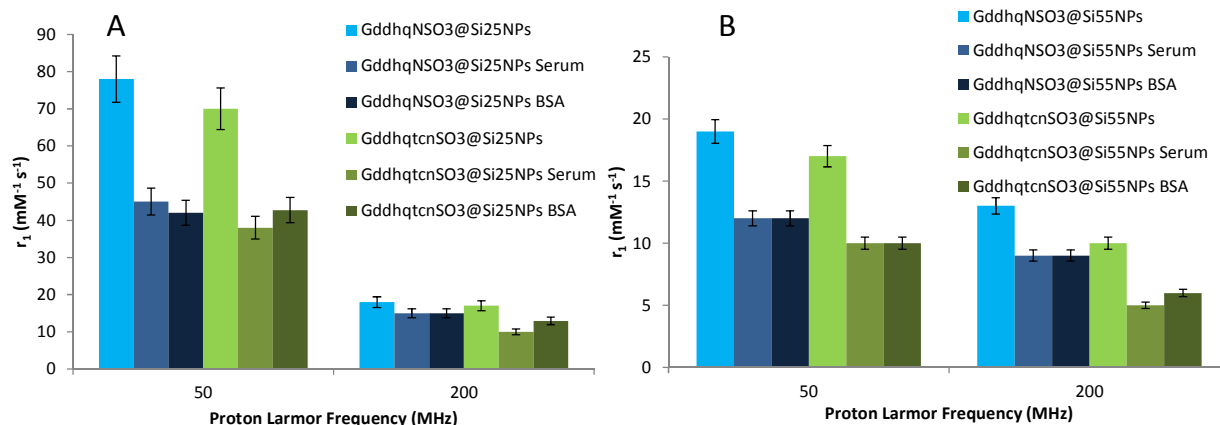


Figure V-25 : Relaxivité dans l'eau, le sérum et la BSA (0.68mM) à 25°C et pH=7.4 de $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs, $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs, (A, c=0.5 mM) $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs et $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si55NPs (B, c=2 mM)

L'évolution de la relaxivité est la même que dans le sérum : une diminution de la relaxivité est observée, importante à bas champ, mais plus raisonnable à haut champ. Cette diminution est de 40% à 50 MHz et passe entre 20 et 25% à 200 MHz pour les billes de 25 nm. L'évolution à 400 MHz est semblable à celle à 200 MHz avec des valeurs de relaxivité plus faibles, de l'ordre de 7 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les Si25NPs et de 5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les Si55NPs.

Ici encore, les valeurs de relaxivité restent supérieures à celle du complexe en solution en présence de BSA pour les billes de 25 nm mais pas pour celles de 55 nm. Les différentes valeurs de relaxivité en présence de BSA à 50 MHz sont regroupées dans le tableau V-10.

	Complexe	Si25NPs	Si55NPs
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$	22.15±0.08	42±4	12±1
$[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$	27.45±0.08	43±4	10±1

Tableau V-10 : Relaxivité en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz de différents systèmes dans la BSA (0.68mM)

La variation de la relaxivité des nanoparticules est identique quels que soient les complexes encapsulés, ce qui peut laisser supposer que la BSA a une interaction uniquement avec les nanoparticules. Pour vérifier ce fait, le diamètre hydrodynamique des nanoparticules est mesuré par DLS (figure V-26).

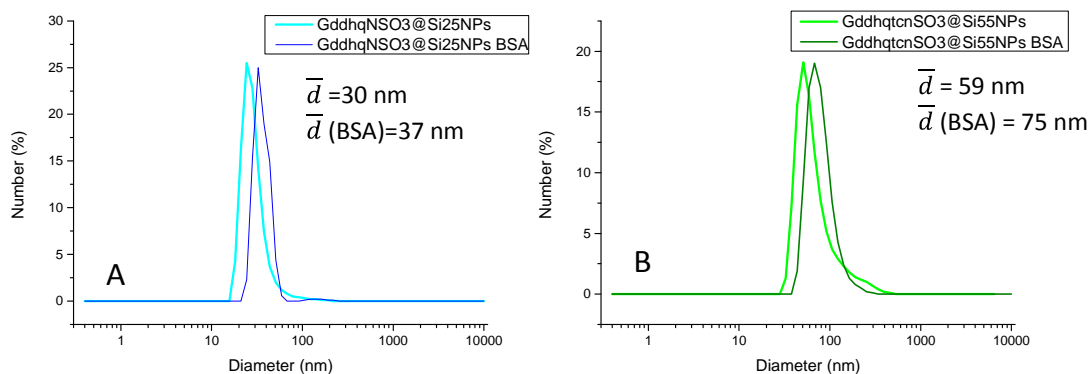


Figure V-26 : Diamètre hydrodynamique des systèmes $[Gd(L_3)]^{3-}@Si25NPs$ (A) et $[Gd(L_1)]^{3-}@Si55NPs$ (B) avec et sans BSA

Une augmentation du diamètre hydrodynamique d'environ 10 nm des deux types de particules est observée en présence de BSA. Etant donné que la BSA possède un diamètre de 3-4 nm en solution⁴⁹ cette augmentation est cohérente avec le fait que la BSA s'accroche à la surface des nanoparticules. Celle-ci doit alors bloquer une partie des pores des billes de silice, modifiant ainsi l'échange des molécules d'eau de l'extérieur vers l'intérieur de la particule et vice-versa. Cette modification de la diffusion des molécules d'eau est probablement à l'origine de la baisse de la relaxivité en présence de BSA. Les résultats obtenus sont les mêmes pour les deux complexes et pour les deux tailles de nanoparticules.

- En présence d'anions

Il a été vu que le sérum est en partie composé d'un mélange d'anions de type carbonate, phosphate, citrate, etc... Pour pouvoir comparer l'évolution sur la relaxivité nous nous sommes placés à 200 équivalents d'anions pour chaque étude, ce qui a été fait précédemment sur le complexe en solution.

Pour reproduire au mieux ce qui se passe dans le sérum, la relaxivité des complexes $[Gd(dhqtcnSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ et $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ incorporés dans les particules de 25 et 55 nm est mesurée dans un mélange d'anions (carbonate, phosphate et citrate avec un total de 200 équivalents soit 66,7 équivalents de chaque anion) Les résultats sont décrits dans la figure V-27.

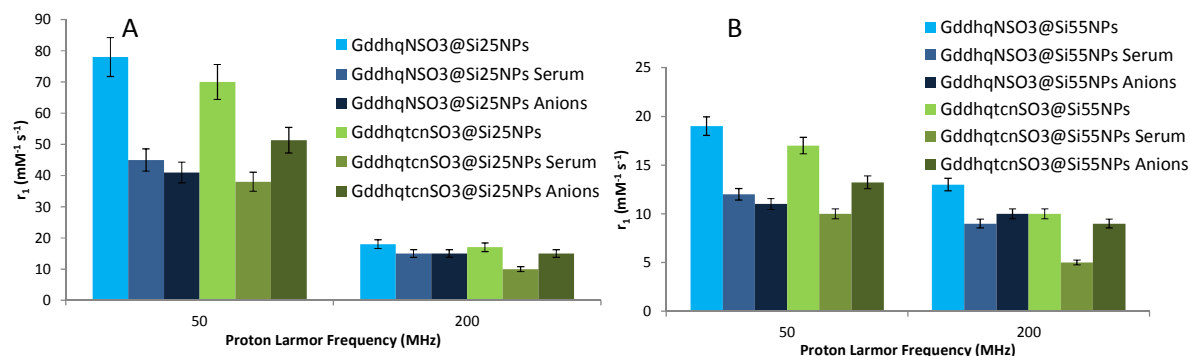


Figure V-27 : Relaxivité dans l'eau, le sérum et dans les anions (200 eq) à 25°C et pH= 7.4 de $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}@Si25NPs$, $[Gd(dhqtcnSO_3)(H_2O)_3]^{3-}@Si25NPs$ (A, c=0.5 mM), $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}@Si55NPs$ et $[Gd(dhqtcnSO_3)(H_2O)_3]^{3-}@Si55NPs$ (B, c=2mM)

Ici encore, une diminution de la relaxivité est observée en présence d'anions, quel que soit le complexe incorporé et la taille de particule. La baisse de la relaxivité est beaucoup plus importante à 50 MHz. A 200 MHz, cette diminution est modérée et la relaxivité reste élevée en présence d'anions ($15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs et $10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs à 25°C au lieu de 17 et $13 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les mêmes particules dans l'eau). Des mesures de DLS sont réalisées pour mieux comprendre le mécanisme responsable de cette baisse et les spectres obtenus sont montrés dans la figure V-28.

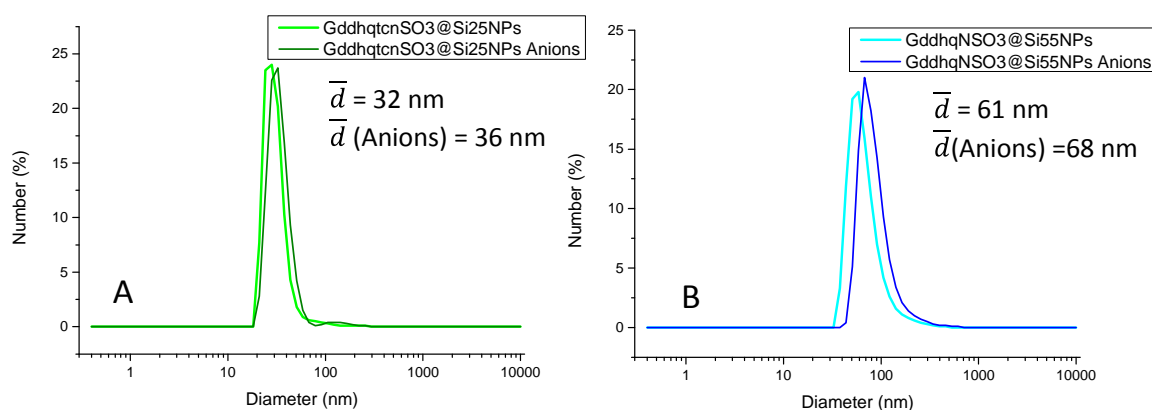


Figure V-28 : Diamètre hydrodynamique des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si25NPs (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs (B) avec et sans anions

Le diamètre hydrodynamique des particules en présence d'anions est légèrement supérieur à celui des particules dispersées dans l'eau de quelques nanomètres seulement. On peut supposer que certains anions restent accrochés à la surface des particules en modifiant leur diamètre hydrodynamique. Les molécules d'eau peuvent alors avoir des interactions avec ces anions (de type charge-dipôle et liaison hydrogène par exemple) et également avoir des difficultés à entrer dans les pores de la particule. Ici encore, la modification de la diffusion de l'eau pourrait être la raison de la diminution de la relaxivité.

Pour le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ incorporé dans les billes de 25 et 55 nm, on remarque une baisse importante de la relaxivité du même ordre de grandeur que pour les deux tailles des particules dans le sérum. L'évolution à bas champ n'est pas la même pour le complexe monoquo : les anions ont moins d'effets sur les particules contenant ce complexe. Ceci peut-être dû au fait que le complexe trisaquo est beaucoup plus sensible aux anions. En effet, la relaxivité du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ en solution est diminuée de moitié à 200 MHz en présence de 200 équivalents de carbonate. Ceci est dû au déplacement de deux de ses molécules d'eau. On peut supposer dans le cas des nanoparticules que les plus petits anions peuvent pénétrer à l'intérieur des pores et déplacer les molécules d'eau des complexes présents, surtout en surface. Pour mieux analyser ce phénomène, des mesures de relaxivité sont réalisées avec chaque anion. Les systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs sont mis en présence de 200 équivalents de sel de chlorure de potassium, de carbonate et de citrate. Les données pour les deux tailles de particules contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ sont regroupées dans la figure V-29.

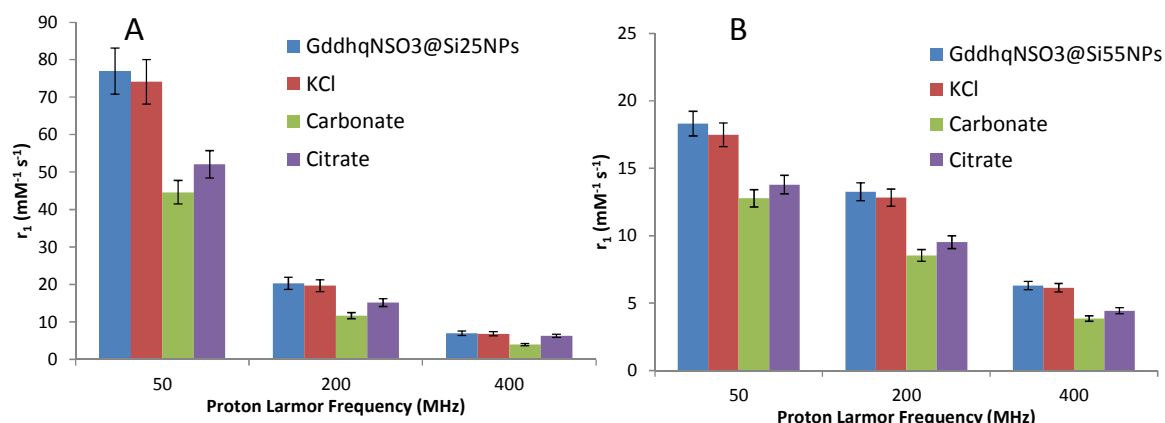


Figure V-29 : Relaxivité dans l'eau, KCl, carbonate et citrate à 25°C et pH=7.4 des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs (A, c=0.5 mM) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs (B, c=2 mM)

Les sels ont un effet important sur la dispersion des nanoparticules : la dispersion est moins efficace en solution aqueuse en présence de sels et les particules s'agrègent plus vite. Les sels non coordonnants tels que le chlorure de potassium n'ont pas d'effet sur la relaxivité. En effet, à cause de sa petite taille, sa diffusion doit se faire de la même manière que celle de l'eau, ce qui n'entraîne pas de modification de la relaxivité.

Quant aux anions carbonates et citrates, ceux-ci entraînent une baisse de la relaxivité pour les deux tailles de particules. Cette baisse est légèrement plus prononcée pour le carbonate que pour le citrate. A cause de sa taille plus grande, le citrate doit seulement s'accrocher à la surface et bloquer partiellement la diffusion de l'eau à travers les pores de la particule. Le carbonate pourrait entrer à l'intérieur des pores et déplacer les molécules d'eau des complexes présents jusqu'à l'intérieur de la particule. La mesure de la taille des pores nous permettra de mieux comprendre les phénomènes dans la nanoparticule en présence d'anions.

Une étude plus approfondie est effectuée pour les anions carbonate. Le tableau V-11 regroupe les valeurs de relaxivité à 200 MHz du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ et de celui-ci incorporé dans des particules de 25 nm en présence différentes quantités d'anions carbonates.

	$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$	$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs
H ₂ O	10.65±0.06	18±2
Carbonate (1 eq)	9.53±0.06	-
Carbonate (20 eq)	7.63±0.06	-
Carbonate (50 eq)	7.02±0.06	17±2
Carbonate (200 eq)	5.62±0.06	12±1

Tableau V-11 : Relaxivité à 200 MHz et 25°C, pH=7.4, c=0.5 mM de $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs en présence de carbonate

Comme il a été présenté précédemment, la relaxivité des nanoparticules en présence de 200 équivalents de carbonate diminue de 33% à 200 MHz et de manière plus importante à bas champ. En diminuant le nombre d'équivalents de carbonate ajoutés, on se rend compte qu'en présence de 50 équivalents, la relaxivité ne change pas en comparaison à $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}25\text{NPs}$ dispersées dans l'eau. Cela était prévisible du fait qu'en présence de 200 équivalents de mélange d'anions (soit 66.7 équivalents de carbonate), la relaxivité varie peu à 200 MHz. La relaxivité du complexe en solution diminue de 35% en présence de 50 équivalents, ce qui montre qu'à haut champ, la particule constitue une barrière contre les anions.

En conclusion de cette partie, l'incorporation de complexes d'hydroxyquinoléine monoquo et trisaquo dans les nanoparticules de silice de 25 et 55 nm permet d'obtenir des systèmes possédant une relaxivité accrue qui peut atteindre $90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par Gd(III) et jusqu'à $97000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par particule. Ces valeurs sont équivalentes à celles décrites dans la littérature pour des systèmes dans lesquels les complexes de Gd(III) sont incorporés de façon covalente ou non covalente, comme ceux présentés en introduction de ce chapitre. Une baisse de la relaxivité est observée en milieu biologique à cause des éléments endogènes qui s'accrochent à la surface des particules et modifient la diffusion des molécules d'eau. Malgré cela, la relaxivité des nanoparticules dopées reste très élevée, et plus haute que dans la plupart des systèmes où les complexes de Gd(III) sont greffés de manière covalente sur la surface des nanoparticules de silice.

4. Optimisation des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}25\text{NPs}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}55\text{NPs}$

Pour l'optimisation de ces systèmes, nous avons effectué les études sur le complexe trisaquo $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ car il présente les meilleurs résultats en terme de relaxivité. La morphologie et le comportement des nanoparticules ne dépendant pas du complexe étudié, certains résultats pourront être corrélés pour les autres complexes. La première étape est d'évaluer la stabilité cinétique du complexe et de la nanoparticule. Ensuite, les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des chaînes PEG afin d'améliorer la dispersion des nanoparticules et limiter l'effet des éléments biologiques pour effectuer une étude IRM sur ces systèmes.

a) Inertie cinétique

Les constantes cinétique et thermodynamique jouent un rôle clé dans le design d'un agent de contraste car elles conditionnent sa stabilité et le relargage du Gd(III) *in vivo*. Les études portant sur ces constantes sont d'autant plus importantes après la découverte de l'apparition de fibrose systémique néphrogénique chez les patients souffrant d'une déficience rénale après l'injection d'agents de contraste à base de Gd(III). Il est important d'analyser l'inertie cinétique et thermodynamique des systèmes étudiés.

Les constantes thermodynamiques des complexes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ et $[\text{Zn}(\text{dhqNSO}_3)]^{3-}$ ont été étudiées précédemment au laboratoire en utilisant une méthode de titration compétitive avec la DTPA par spectrophotométrie UV-visible. La valeur du pGd est donnée par l'équation V-3.

$$\text{Equation V-3: } pGd = -\log[Gd_{aq}]_{libre}$$

Avec une concentration de $[Gd]_{tot} = 10^{-6}$ M et $[L]_{tot} = 10^{-5}$ M à pH 7.4. La valeur mesurée est de 18.9, ce qui est très élevée pour un complexe trisaquo et comparable à celle de la DTPA (de 19.1).²⁸ Celle du zinc est de 15, ce qui montre une sélectivité plus importante envers le gadolinium.

L'inertie cinétique du complexe est mesurée par une méthode décrite dans la littérature⁵⁰ qui consiste à mesurer la transmétallation d'un complexe. De façon pratique, un complexe de gadolinium est mis en compétition avec un équivalent de chlorure de zinc dans un tampon phosphate, et l'évolution de la vitesse de relaxation $R_1=1/T_1$ en fonction du temps est alors mesurée. Pour $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ les temps de relaxation ont été mesurés à 50 MHz et 25°C. La même expérience est réalisée sur le complexe $[Gd(HPDO_3A)(H_2O)]$ pour avoir une comparaison avec un agent de contraste commercial. L'évolution du ratio de la vitesse de relaxation sur la vitesse de relaxation en l'absence de zinc en fonction du temps est donnée dans la figure V-30.

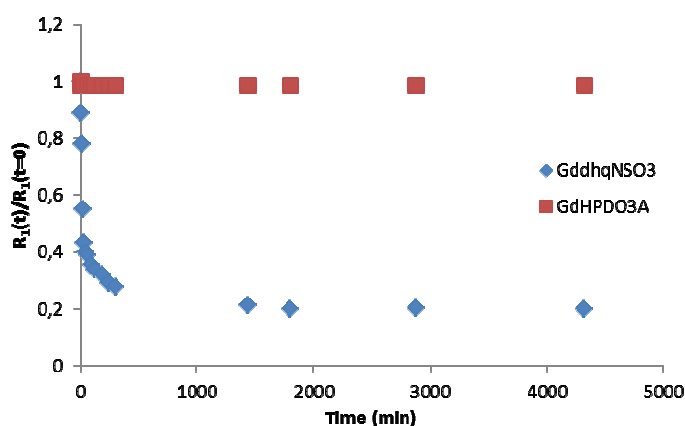


Figure V-30 : Evolution de la vitesse de relaxation en fonction du temps de $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ et $[Gd(HPDO_3A)(H_2O)]$ en présence d'un équivalent de $ZnCl_2$ dans un tampon phosphate (pH=7)

L'échange du gadolinium par le zinc au sein des complexes dans le tampon phosphate conduit à la formation d'un précipité de $GdPO_4$ entraînant ainsi la diminution de la vitesse de relaxation. Cette étude montre que le complexe $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ n'est pas résistant à la transmétallation comparé à l'agent de contraste commercial, qui lui est cinétiquement inerte. L'estimation de l'inertie cinétique peut être donnée par le temps nécessaire pour atteindre 80% de la vitesse de relaxation initiale. Ce temps est de 10 min pour le complexe $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$. Cette valeur est faible comparée aux complexes acycliques utilisées en clinique tels que la DTPA-BMA (124 min) et la DTPA (383 min).⁵¹

La même expérience a été réalisée avec le même complexe incorporé cette fois-ci dans les particules de 25 et 55 nm. L'évolution de la vitesse de relaxation en fonction du temps est mesurée en présence et en absence de chlorure de zinc à 50 MHz et 25°C et est montré dans la figure V-31.

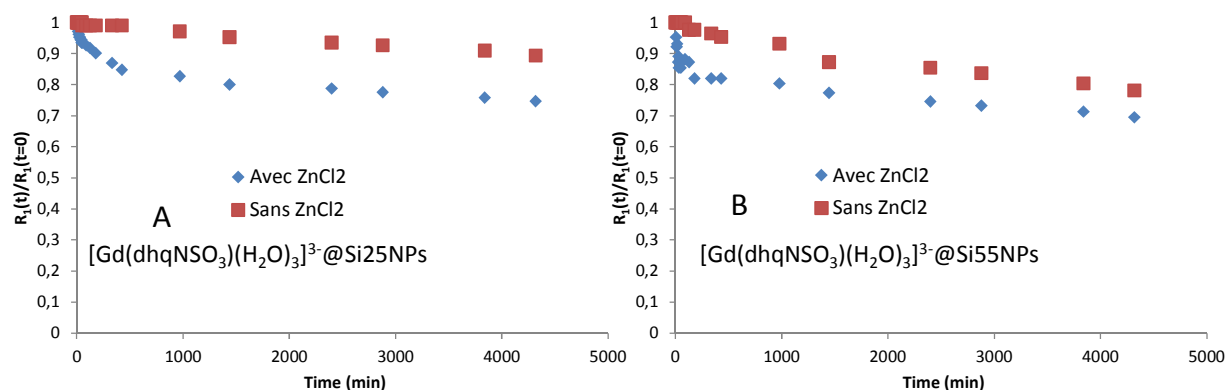


Figure V-31 : Evolution de la vitesse de relaxation en fonction du temps de $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25NPs (A, $c = 0.5 \text{ mM}$) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55NPs (B, $c = 2 \text{ mM}$) en présence et en l'absence d'un équivalent de ZnCl_2

Dans le cas des nanoparticules l'inertie cinétique est de 1000 min soit 100 fois plus long que le complexe en solution et que celle du DTPA. Ceci montre que l'incorporation de complexes de gadolinium dans les nanoparticules est un moyen efficace de prévenir la transmétallation. Sur la courbe, une décroissance linéaire de la vitesse de relaxation des nanoparticules au cours du temps est observée. Cette décroissance est observée même en absence de zinc. Ceci est dû à l'agrégation des nanoparticules avec le temps qui est d'autant plus rapide que les particules sont grosses. La diffusion de l'eau est beaucoup moins efficace dans des particules agrégées.

En conclusion, l'incorporation des complexes de gadolinium dans les billes de silice est un moyen efficace pour bloquer les cations métalliques et prévenir la transmétallation.

b) Greffage des chaînes PEG

Dans la littérature, les chaînes PEG sont largement utilisées pour augmenter la stabilité colloïdale et la biocompatibilité des nanoparticules les rendant ainsi utilisable en imagerie moléculaire et en théranostique.⁵² En effet, elles ont la propriété de prolonger le temps de demi-vie de circulation et d'accumuler les nanoparticules dans les tumeurs. Grâce à leur hydrophilie, la flexibilité de leur chaîne, la neutralité de leur charge et l'absence de groupements réactifs, l'absorption des nanoparticules pegylées dans les macrophages et leur accumulation dans le foie sont réduites.⁵³ La longueur de la chaîne PEG et leur terminaison influent sur le potentiel ζ et leur biodistribution, la terminaison OCH_3 étant la plus adaptée.⁵⁴ La fonctionnalisation des nanoparticules de silice avec les chaînes PEG se fait soit en utilisant des agents tels que l'APTES pour faire réagir des chaînes PEG contenant un acide activé ou alors en utilisant des chaînes PEG fonctionnalisées avec un groupement silane, comme il a été vu précédemment.

Dans notre cas, l'objectif est d'évaluer l'influence des chaînes PEG sur la dispersion des nanoparticules. Ceci permettra non seulement de diminuer la viscosité de la dispersion des particules pour des études *in vivo*, et de voir si les effets des éléments biologiques sur la relaxivité peuvent être diminués. Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser la méthode de fonctionnalisation basée sur des chaînes PEG se terminant par un groupement silane, ce qui permet d'éviter l'étape

supplémentaire de fonctionnalisation avec l'APTES. Pour une première preuve de principe, des chaînes contenant environ 21 à 24 unités éthylène glycol de masse d'environ 1000 gmol^{-1} sont greffées sur la surface des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}25\text{NPs}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}55\text{NPs}$. Les particules obtenues sont caractérisées par MEB et par DLS (figure V-32).

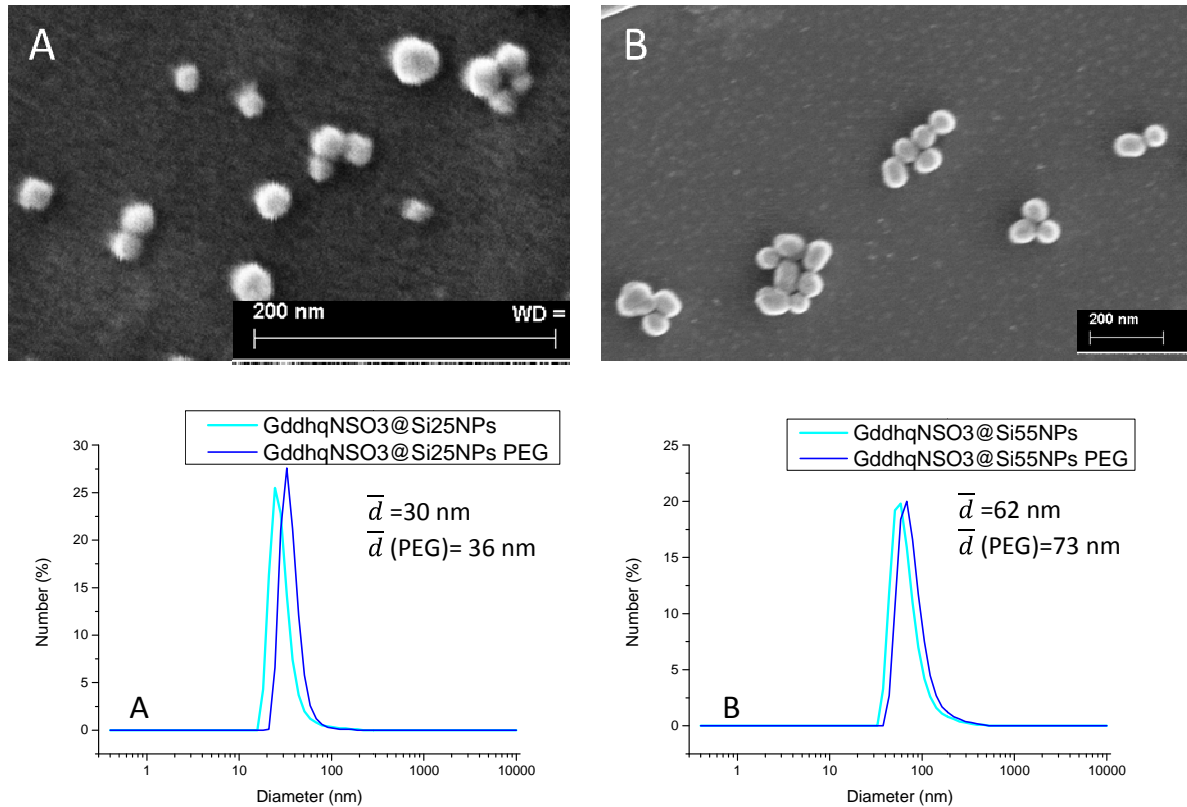


Figure V-32 : Images MEB et DLS des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}25\text{PEGNPs}$ (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}@\text{Si}55\text{PEGNPs}$ (B)

L'augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules fonctionnalisées avec des chaînes PEG montre que le greffage des chaînes a été efficace. La fonctionnalisation ne modifie pas la morphologie comme le montrent les images MEB. A première vue, la viscosité de la solution reste inchangée, la dispersion et l'agrégation des nanoparticules se font de la même manière que pour les particules non fonctionnalisées.

Une fois les particules fonctionnalisées caractérisées, leur relaxivité dans l'eau et en milieu biologique est évaluée à 25°C (figure V-32).

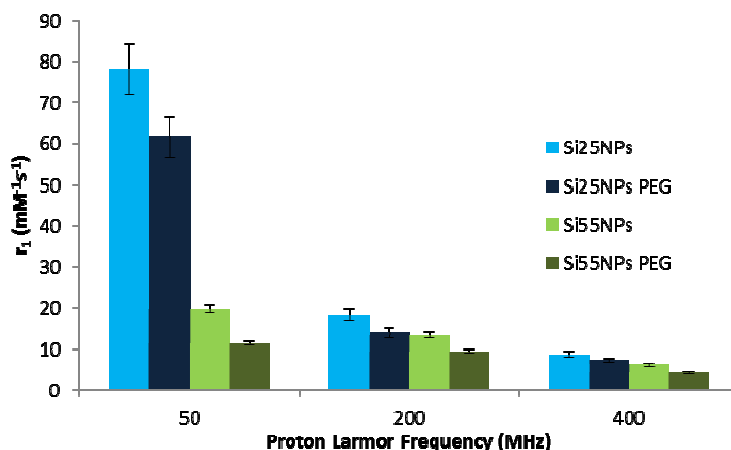


Figure V-33 : Relaxivité dans l'eau des particules de 25 ($c=0.5$ mM) et 55 nm ($c=2$ mM) fonctionnalisées avec les chaînes PEG contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Pour les deux tailles de particules, une diminution de 20 à 30% de la relaxivité est observée à 50 MHz dans l'eau en présence de chaînes PEG à la surface. Ceci serait dû à la modification de la mobilité des molécules d'eau entre l'intérieur et l'extérieur des particules à cause des interactions de type hydrogène ou de gêne stérique entre les chaînes PEG. La baisse de la relaxivité des particules fonctionnalisées est beaucoup moins importante que celle des particules qui ne le sont pas dans le sérum, où elle est de 40% à 50 MHz. La diminution de la relaxivité est moins marquée à haut champ, de la même manière que pour les particules non fonctionnalisées en présence de BSA ou d'anions.

La relaxivité en milieu biologique est également évaluée pour les particules fonctionnalisées (figure V-34).

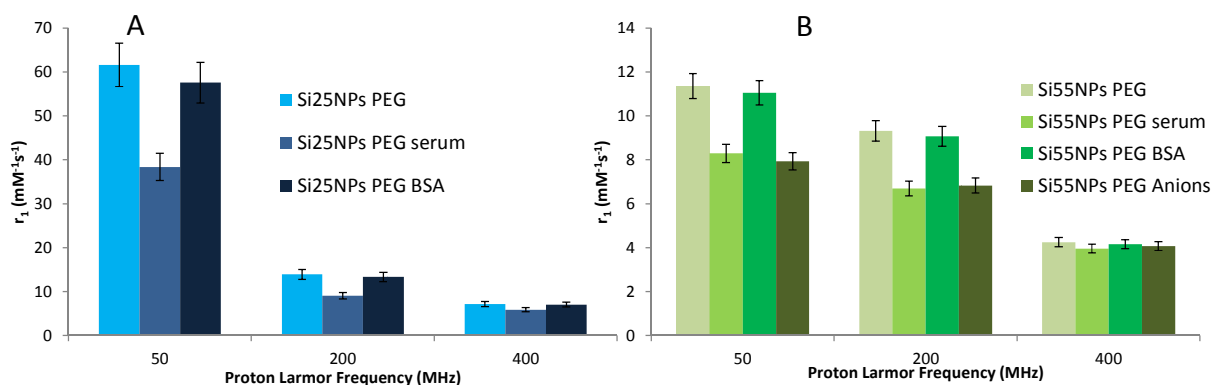


Figure V-34 : Relaxivité en milieu biologique des particules de 25 (A, $c=0.5$ mM) et 55 nm (B $c=2$ mM) fonctionnalisées avec les chaînes PEG contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Tout d'abord, la relaxivité diminue dans le sérum à bas champ pour les deux tailles de particules. Afin de déterminer si cette diminution est due à la BSA et/ou aux anions, la relaxivité est mesurée séparément dans ces deux milieux. Il n'y a pas de variation observée en présence de BSA, même à bas champ. Les chaînes PEG d'environ 1000 g/mol représentent une bonne barrière pour éviter l'interaction de la BSA à la surface des nanoparticules. De plus, dans le cas des nanoparticules de 25

nm en présence de BSA, la relaxivité est plus élevée pour les particules fonctionnalisées que pour celles qui ne le sont pas (57 contre 42 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25PEGNPs à 50 MHz). Cependant elle demeure dans le même ordre de grandeur pour $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si55PEGNPs (12 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz).

	Si25NPs	Si55NPs
Mères	42±4	12±1
PEG	57±4	11±1

Tableau V-12 : Relaxivité en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 50 MHz et 25°C en présence de BSA des particules contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ avec ou sans fonctionnalisation par des chaînes PEG

En ce qui concerne les anions, la dispersion des nanoparticules dans le mélange d'anions (200 équivalents d'anions soit 66.7 équivalents de carbonate, phosphate ou citrate) diminue et que les particules s'agrègent très rapidement. C'est pour cette raison que la relaxivité de $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @Si25PEGNPs dans les anions n'a pas pu être calculée, la concentration en gadolinium étant trop faible pour être mesurée par susceptibilité paramagnétique. Le même phénomène pour les particules de 55 nm fonctionnalisées est observé, mais la concentration en gadolinium étant plus importante, la relaxivité a pu être calculée. Ici on remarque que la diminution en présence d'anions est du même ordre de grandeur que celle dans le sérum. Les anions peuvent donc passer à travers les chaînes PEG pour atteindre la surface des particules et voir même entrer dans les pores, modifiant la mobilité de l'eau. A haut champ (400 MHz) plus aucune variation n'est observée en présence de sérum, BSA et anions.

Pour conclure, la relaxivité des particules fonctionnalisées avec les chaînes PEG reste élevée à bas champ malgré une diminution observée par rapport aux particules non fonctionnalisées. Les chaînes PEG sont efficaces pour bloquer la BSA et éviter son interaction à la surface des particules. En revanche, les anions peuvent passer à travers les chaînes entraînant une diminution de la relaxivité à bas champ. En revanche, aucune variation n'est observée à haut champ. La nanoparticule fonctionnalisée constitue alors une barrière contre les éléments biologiques à haut champ. Le greffage de chaînes PEG plus longues (de 2000 à 5000 g/mol) pourrait permettre d'améliorer la stabilité de la suspension de nanoparticules.

c) Images IRM *in vitro*

Nous avons pu réaliser des études *in vitro* sur nos nanoparticules à Clinatéc en collaboration avec Hana Lahrech. Les études *in vitro* sont réalisées sur les particules de 25 et 55 nm contenant $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ fonctionnalisées ou non avec les chaînes PEG. Pour réaliser ces mesures, les nanoparticules fraîchement préparées sont dispersées dans du sérum physiologique (une solution aqueuse de 0.9% NaCl). Différentes dilutions sont effectuées à partir de la solution mère. En premier lieu, des images pondérées T_2 sont effectuées avec un IRM de 4.7 T (figure V-35).

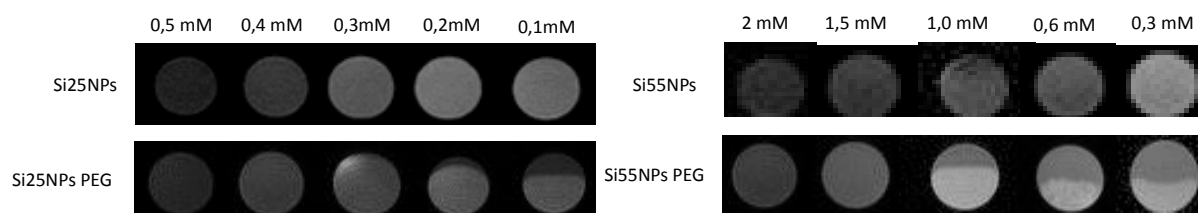


Figure V-35 : Images pondérées T_2 des particules de 25 et 55 nm contenant $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ fonctionnalisées ou non avec des chaînes PEG

Pour des images pondérées T_2 , on observe une diminution du signal en présence de composés qui ont une relaxivité transversale élevée. Les images obtenues ont un contraste négatif qui s'atténue avec la concentration. On remarque la sédimentation des particules fonctionnalisées avec les chaînes PEG, qui est plus importante lorsque la suspension est diluée. Ceci pourrait être expliqué par la formation d'un sol colloïdal. Un fort signal r_2 est observé pour les nanoparticules, ce qui était attendu en raison d'une forte relaxivité transversale.

A 4.7 T, soit 200 MHz, le plus intéressant est d'effectuer des images pondérées T_2 . En effet, comme le rapport r_2/r_1 est très important à haut champ ($r_2/r_1 = 5$), il n'est pas possible de s'affranchir de l'effet T_2 lors d'images pondérées T_1 . Pour vérifier ce fait, des images pondérées T_1 sont également effectuées à 4.7 T (figure V-36).

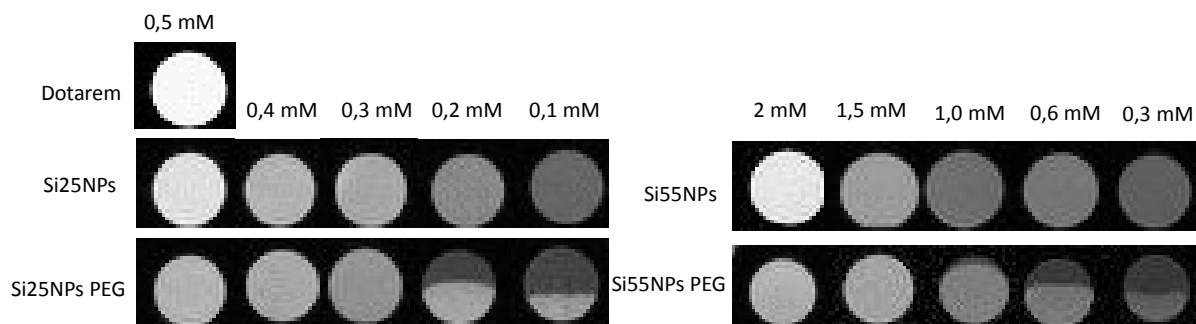


Figure V-36 : Images pondérées T_1 des particules de 25 et 55 nm contenant $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}$ fonctionnalisées ou non avec des chaînes PEG

Premièrement, le contraste diminue avec la concentration, ce qui était attendu : le contraste est d'autant plus fort que la concentration d'entités paramagnétiques est élevée. Ici encore, on remarque la sédimentation des nanoparticules fonctionnalisées avec les chaînes PEG. L'importance du ratio r_2/r_1 lors des images IRM est confirmée par le fait que le GdDOTA possède un signal plus important à la même concentration que nos particules.

Ici, l'aimant de 4.7 T disponible à Grenoble pour effectuer des images *in vitro* sur nos nanoparticules n'est pas le plus adéquat. En effet, un champ plus bas où r_1 serait équivalent à r_2 permettrait de faire des images pondérées T_1 . Un IRM avec un aimant dont le champ est plus élevé nous aurait permis de faire des images pondérées T_2 avec un très bon signal puisque la relaxivité transversale de nos nanoparticules augmente avec le champ.

Pour conclure, différentes investigations sont menées pour rendre ce système plus adaptés à l'imagerie *in vivo*. Tout d'abord l'inertie cinétique des nanoparticules a été évaluée ce qui a permis de démontrer que celles-ci sont stables vis-à-vis de la transmétallation avec le zinc. Ensuite des chaînes PEG sont greffées sur les nanoparticules. La viscosité du milieu reste inchangée mais elles permettent d'éloigner les grosses protéines comme la BSA de la surface des particules. Rallonger la longueur des chaînes PEG pourrait permettre d'améliorer la stabilité de la suspension. Enfin des mesures *in vitro* dans un IRM 4.7 T ont confirmé l'importance du ratio r_2/r_1 pour effectuer des images IRM. Après avoir souligné les paramètres optimisés pour la formation de sondes efficaces, la suite de notre projet réside dans la synthèse et l'étude de nanoparticules bimodales.

5. Nanoparticules bimodales

a) Avantages des sondes bimodales IRM/optique

Les avantages des sondes bimodales sont détaillés dans le chapitre III. Celles-ci permettent d'allier la résolution de l'IRM avec la sensibilité de l'imagerie optique. Dans le cadre des nanoparticules de silice uniquement des greffages covalents de complexes de lanthanides ont été publiés jusqu'à maintenant. Par exemple, le groupe de Deville a utilisé des complexes de lanthanides greffés à la surface de nanoparticules de silice pour faire des sondes bimodales. La présence de complexes de gadolinium et d'euprotium DTPA à la surface des nanoparticules permet une augmentation modérée de la relaxivité longitudinale, mais une augmentation plus importante de la relaxivité transversale, comme il a été vu dans le cas de nos nanoparticules.⁹ L'ajout de groupements pyridines à la surface des nanoparticules permet une meilleure émission grâce à l'effet d'antenne.⁵⁵ Les tests sur des cellules permettent d'observer une augmentation du signal IRM avec un suivi par fluorescence.

Pour notre étude, nous avons choisi d'incorporer de façon non covalente les complexes de gadolinium avec des complexes d'ytterbium pour faire des sondes bimodales. L'avantage de l'incorporation non covalente est qu'elle ne nécessite aucune modification chimique du complexe. L'ytterbium est choisi pour sa bande d'émission dans l'infrarouge permettant à la fois une plus grande pénétration dans les tissus biologiques et également pour son temps de vie relativement long qui permet de s'affranchir de l'autofluorescence de ces tissus grâce à la luminescence en temps résolu.

b) Synthèse

Pour cette étude, le système quaternaire est choisi pour incorporer différents ratios de complexes de gadolinium et ytterbium afin de réaliser des sondes bimodales. En effet, le taux d'incorporation des complexes y est plus important. Deux systèmes ont été évalués : $[Gd(dhqNSO_3)(H_2O)_3]^{3-}/[Yb(thqtcnSO_3)]^{3-}$ et $[Gd(dhqtcnSO_3)(H_2O)]^{3-}/[Yb(dhqtcnSO_3)(H_2O)]^{3-}$. En effet pour le premier système, il n'est pas possible d'utiliser le même ligand dans chacun des complexes si

on veut observer la luminescence de l'ytterbium, celle-ci étant "quenchée" lorsqu'il y a plus de deux molécules d'eau dans la sphère interne du métal.

Différents ratios de complexes d'ytterbium sont incorporés : 5 et 10% de complexes de gadolinium sont remplacés par les complexes d'ytterbium dans la synthèse de nanoparticules. Le nombre de complexes par particule ne change pas de manière significative pour les deux systèmes (de l'ordre de 3800 complexes par particule) et les images MEB montrent que la taille de particule n'a pas changé (figure V-37).

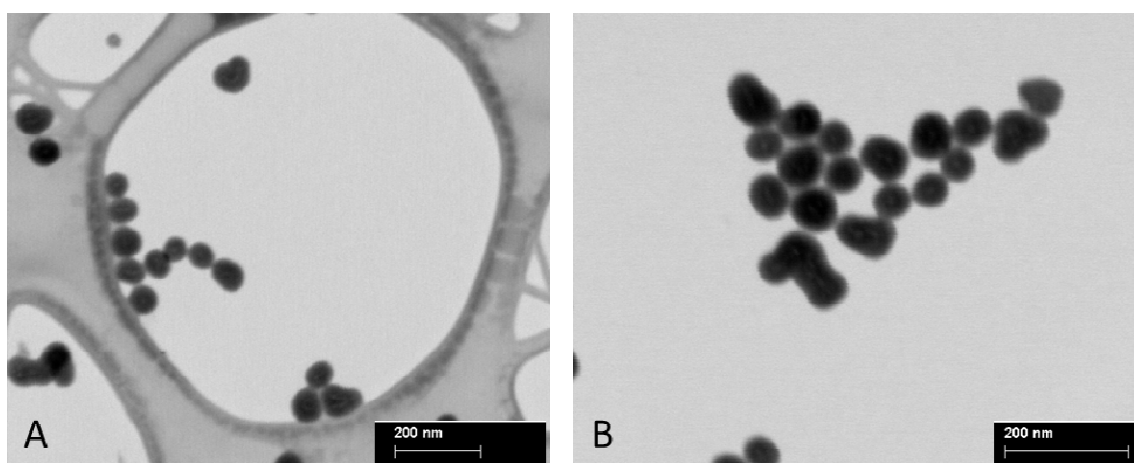


Figure V-37 : Images MEB des systèmes $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}/[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}@Si55NPs$ (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}/[\text{Yb}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}@Si55NPs$ (B) dopés à 10 % d'ytterbium

Une fois ces particules caractérisées, leurs propriétés de luminescence et de relaxivité sont étudiées et présentées dans les parties suivantes.

c) Luminescence

La 8-hydroxyquinoléine a tout d'abord été utilisée pour sensibiliser l'erbium et démontrer les propriétés de luminescence du complexe.⁵⁶ Depuis elle est souvent utilisée en tant qu'antenne sensibilisatrice de lanthanides émettant dans le proche infrarouge. En effet, son état triplet se situe à basse énergie (autour de 17100 cm^{-1}) et il est donc bien adapté à la sensibilisation des lanthanides émettant dans le proche infrarouge. La longueur d'onde d'excitation, située entre 340 et 450 nm a l'avantage de peu endommager les tissus biologiques. Pour les deux ligands thqtcnSO₃ et dhqtcnSO₃, les complexes d'ytterbium émettent entre 930 et 1080 nm avec une bande étroite présentant un maximum à 977 nm correspondant à la transition ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$.

Les propriétés des nanoparticules dopées uniquement avec le complexe $[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ ont été étudiées et publiées.²⁴ L'émission des ions ytterbium se caractérise par une bande entre 895 et 1120 nm avec un maximum à 978 nm correspondant à la transition ${}^2F_{5/2} \rightarrow {}^2F_{7/2}$. Les temps de vie des particules sont deux fois plus longs que ceux des complexes isolés (4.01 μs contre 2.05 μs) suggérant que la matrice de silice agit comme une protection autour des complexes et empêche de ce fait les phénomènes de désexcitations non radiatives. Pour nos systèmes, le signal de l'émission à 978 nm est observé faiblement pour les particules dopées à 5%, même pour le complexe qui contient une

molécule d'eau dans sa sphère interne. Ce signal est observé de manière plus importante pour celles dopées avec 10% de complexes d'ytterbium pour chacun des deux systèmes (figure V-38).

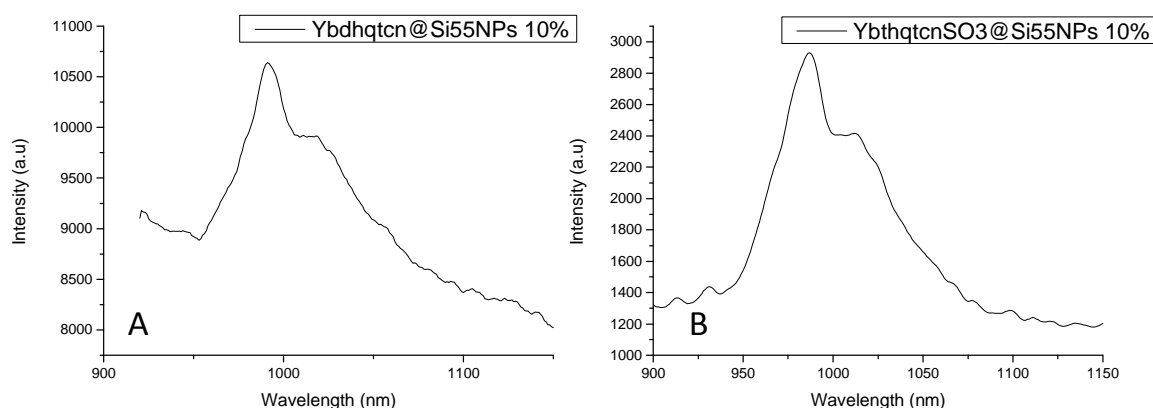


Figure V-38 : Emission de l'ytterbium pour les systèmes et $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ / $[\text{Yb}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ @Si55NPs (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ / $[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ @Si55NPs (B) dopés à 10% d'ytterbium ($\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$)

Même avec une très faible quantité incorporée et la présence d'une molécule d'eau dans la sphère interne du complexe, l'émission de l'ytterbium a pu être observée. La sensibilité de la technique de luminescence et le choix du ligand pour sensibiliser les lanthanides émettant dans l'infrarouge font de cet objet un système efficace pour des applications bimodales

d) Relaxivité

La concentration en espèces paramagnétiques est mesurée par susceptibilité paramagnétique en considérant que les complexes de gadolinium et d'ytterbium s'incorporent de la même manière. Une concentration globale en lanthanide est mesurée par susceptibilité paramagnétique et celles des complexes de gadolinium et d'ytterbium sont déduites du pourcentage de complexes incorporés.

La relaxivité de ces deux systèmes est mesurée dans l'eau à différents champs et à 25 °C et les résultats sont décrits dans la figure V-39.

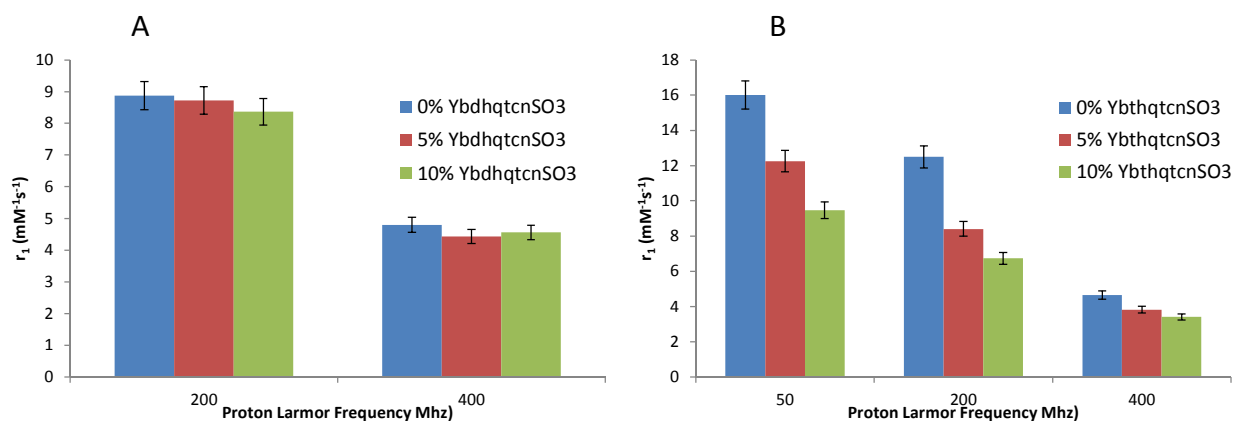


Figure V-39 : Relaxivité dans l'eau à 25°C, pH = 7.4, c = 2 mM des systèmes et $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-} / [\text{Yb}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-} @\text{Si55NPs}$ (A) et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} / [\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-} @\text{Si55NPs}$ (B)

Premièrement, la relaxivité ne varie pas en fonction de la quantité de complexes d'ytterbium incorporés dans le système $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-} / [\text{Yb}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-} @\text{Si55NPs}$. L'augmentation de la relaxivité reste la même pour une faible quantité de complexes de gadolinium substitués.

Ceci n'est pas le cas pour le système $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} / [\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-} @\text{Si55NPs}$. Plus on ajoute de complexes d'ytterbium et plus la relaxivité diminue quel que soit le champ. N'ayant pas d'explication directe de ce phénomène, les mêmes pourcentages du complexe $[\text{Y}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ ont été incorporés avec le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ dans les particules de 55 nm. La même baisse de relaxivité a été observée, on peut donc en déduire que ceci n'est pas dû au paramagnétisme de l'ytterbium. La même mesure est effectuée sur le mélange des deux complexes en solution. La diminution de la relaxivité n'est pas observée, ce qui confirme l'hypothèse d'incorporation différente.

Un autre test est de changer le ligand et de remplacer $[\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ par $[\text{Yb}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ pour voir l'influence du changement de ligand. Ici encore une diminution de la relaxivité est observée pour 10 % de complexes d'ytterbium ajoutés. Celle-ci est moins importante que pour le système $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} / [\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-} @\text{Si55NPs}$ ($7.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} / [\text{Yb}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} @\text{Si55NPs}$ contre $6.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} / [\text{Yb}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-} @\text{Si55NPs}$ à 200 MHz et 25°C). Cette baisse de relaxivité pourrait en partie être expliquée par la différence d'incorporation des deux complexes lorsqu'ils sont en compétition. En effet, par leur différence de structure (triazacyclononane et pivot azote central), l'hydrophobie de ces ligands n'est pas la même, de sorte que le taux d'incorporation simultané des complexes $[\text{Ln}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ pourrait être plus important que celui de $[\text{Ln}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$. Le calcul de la concentration des ions lanthanides serait faussé et par conséquent celui de la relaxivité aussi. Un des moyens pour évaluer précisément le taux d'incorporation est la technique d'ICP-MS, qui n'a pas pu être utilisée dans le cadre de cette thèse. De plus la diminution de la relaxivité du système $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} / [\text{Yb}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} @\text{Si55NPs}$ n'est également pas expliquée ($7.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ contre $13 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-} @\text{Si55NPs}$ à 200 MHz et 25°C), l'effet de la présence d'autres complexes sur le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ n'est déterminé, mais cela pourrait

probablement avoir un lien avec les trois molécules d'eau dans la sphère interne du gadolinium. Ceci sera l'objet de travaux ultérieurs au sein du laboratoire.

L'incorporation de complexes d'ytterbium avec des complexes de gadolinium dans des nanoparticules de silice permet d'avoir un système bimodal présentant une bonne relaxivité par gadolinium et l'émission de l'ytterbium dans le proche infrarouge. Pour être sûr du taux d'incorporation des complexes, il vaut mieux utiliser le même ligand. Ici le choix du ligand dhqtcnSO_3 est tout à fait adéquat : grâce à sa molécule d'eau dans la sphère interne il permet d'avoir une relaxivité deux fois plus élevée que le complexe en solution. De plus, l'hydroxyquinoléine étant un bon sensibilisateur des lanthanides émettant dans l'infrarouge, l'émission de l'ytterbium a pu être observée, même avec un très faible pourcentage de complexes incorporés.

6. Conclusion

Les nanoparticules de silice présentent de nombreux avantages pour l'imagerie *in vivo* du fait de leur biocompatibilité et de la facilité de synthèse. D'autre part, l'incorporation non covalente des complexes de gadolinium à l'intérieur de ces nanoobjets mène à des systèmes qui ont une relaxivité très élevée. L'association des deux permet de créer un objet adapté pour faire de l'imagerie moléculaire en IRM. L'incorporation des complexes de GdDOTA et des dérivés du GdDOTA qui sont inertes cinétiquement et thermodynamiquement n'est pas efficace. Les complexes d'hydroxyquinoléine sont choisis pour être incorporés dans les nanoparticules grâce à leur stabilité thermodynamique et leurs propriétés relaxométriques. La présence de groupements hydrophobes permet une bonne incorporation de ces complexes dans des billes de silice de 25 et 55 nm. La relaxivité obtenue atteint des valeurs de $90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par gadolinium pour des particules de 25 nm et à $97000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par particule pour les billes de 55 nm à 35 MHz. Cependant, une diminution de la relaxivité est observée, plus marquée à bas champ lorsque les particules sont dispersées en milieu biologique (sérum, BSA, anions). En effet, les protéines et les anions composant le milieu biologique s'accrochent à la surface de la particule voire rentrent dans les pores selon leur taille, ce qui modifie la mobilité des molécules d'eau au sein de la particule entraînant ainsi une baisse de la relaxivité. L'introduction de chaînes PEG à la surface des nanoparticules permet d'annuler les effets des protéines. Leur introduction entraîne une diminution de la relaxivité, probablement encore due à la modification de la diffusion des molécules d'eau pour entrer et sortir de la nanoparticule. Les chaînes PEG permettent de bloquer la BSA loin de la surface, mais pas les anions. De plus, la viscosité du milieu ne semble pas être améliorée et on remarque une sédimentation des particules fonctionnalisées en sérum physiologique lors de prises d'images fantômes en IRM. Celles-ci montrent également que nos systèmes agissent en tant qu'agent T_2 avec une relaxivité transversale très élevée par rapport à la relaxivité longitudinale, ce qui entraîne une baisse du signal lors d'images pondérées T_1 . Outre la relaxivité très élevée, la nanoparticule permet également de protéger les complexes de la transmétallation, notamment par le zinc(II). L'association des complexes d'ytterbium et de gadolinium au sein des nanoparticules permet d'obtenir des sondes bimodales. La synthèse facile et versatile des nanoparticules de silice dopées aux complexes de gadolinium et l'obtention de relaxivité très élevée en font un très bon candidat pour faire de l'imagerie moléculaire, bien que des études de toxicité et de stabilité de la nanoparticule et du complexe incorporé doivent être menées plus en détail.

7. Références

1. A. Merbarch, L. Helm and E. Toth, *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*, Wiley, 2013.
2. R. Weissleder and U. Mahmood, *Radiology*, 2001, **219**, 316-319.
3. N. Hyon Bin and H. Taeghwan, *Journal of Materials Chemistry*, 2009, **19**, 6267-6273.
4. Y. J. Liu and N. Zhang, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5363-5375.
5. J. E. Lee, N. Lee, T. Kim, J. Kim and T. Hyeon, *Accounts of Chemical Research*, 2011, **44**, 893-902.
6. J. L. Vivero-Escoto, R. C. Huxford-Phillips and W. B. Lin, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2673-2685.
7. G. T. Chen, Z. G. Teng, X. D. Su, Y. Liu and G. M. Lu, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2015, **11**, 722-729.
8. P. Voisin, E. J. Ribot, S. Miraux, A.-K. Bouzier-Sore, J.-F. Lahitte, V. Bouchaud, S. Mornet, E. Thiaudiere, J.-M. Franconi, L. Raison, C. Labrugere and M.-H. Delville, *Bioconjugate Chemistry*, 2007, **18**, 1053-1063.
9. S. L. C. Pinho, H. Faneca, C. Geraldés, M. H. Delville, L. D. Carlos and J. Rocha, *Biomaterials*, 2012, **33**, 925-935.
10. A. K. Duncan, P. J. Klemm, K. N. Raymond and C. C. Landry, *Journal of American Chemical Society*, 2012, **134**, 8046-8049.
11. M. Vallet-Regi, F. Balas and D. Arcos, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, **46**, 7548-7558.
12. H. Skar, Y. Liang, E. S. Erichsen, R. Anwander and J. G. Seland, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2013, **175**, 125-133.
13. F. Carniato, L. Tei, W. Dastru, L. Marchese and M. Botta, *Chemical Communications*, 2009, 1246-1248.
14. F. Carniato, L. Tei, M. Cossi, L. Marchese and M. Botta, *Chemistry-A European Journal*, 2010, **16**, 10727-10734.
15. F. Carniato, L. Tei, A. Arrais, L. Marchese and M. Botta, *Chemistry-A European Journal*, 2013, **19**, 1421-1428.
16. J. J. Davis, W.-Y. Huang and G.-L. Davies, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 22848-22850.
17. W.-Y. Huang, G.-L. Davies and J. J. Davis, *Chemical Communications*, 2013, **49**, 60-62.
18. P. H. Fries and E. Belorizky, *The Journal of Chemical Physics*, 2010, **133**, 024504.
19. J. A. Peters and K. Djanashvili, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 1961-1974.
20. S. Aime, L. Frullano and S. Geninatti Crich, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 1017-1019.
21. T. Courant, V. G. Roullin, C. Cadiou, M. Callewaert, M. C. Andry, C. Portefaix, C. Hoeffel, M. C. de Goltstein, M. Port, S. Laurent, L. V. Elst, R. Muller, M. Molinari and F. Chuburu, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 9119-9122.
22. M. Callewaert, V. G. Roullin, C. Cadiou, E. Millart, L. Van Gulik, M. C. Andry, C. Portefaix, C. Hoeffel, S. Laurent, L. V. Elst, R. Muller, M. Molinari and F. Chuburu, *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**, 6397-6405.
23. R. Sethi, J. S. Ananta, C. Karmonik, M. Zhong, S. H. Fung, X. Liu, K. Li, M. Ferrari, L. J. Wilson and P. Decuzzi, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2012, **7**, 501-508.
24. J. Samuel, G. Tallec, P. Chérns, W. L. Ling, O. Raccurt, O. Poncelet, D. Imbert and M. Mazzanti, *Chemical Communications*, 2010, **46**, 2647-2649.
25. N. Wartenberg, O. Raccurt, E. Bourgeat-Lami, D. Imbert and M. Mazzanti, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2013, 1493-1498.
26. N. Wartenberg, P. Fries, O. Raccurt, A. Guillermo, D. Imbert and M. Mazzanti, *Chemistry-A European Journal*, 2013, **19**, 6980-6983.
27. W. P. Cacheris, S. K. Nickle and A. D. Sherry, *Inorganic Chemistry*, 1987, **26**, 958-960.

28. P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1999, **99**, 2293-2352.
29. R. Ruloff, E. Toth, R. Scopelliti, R. Tripier, H. Handel and A. E. Merbach, *Chemical Communications*, 2002, 2630-2631.
30. S. Comby, D. Imbert, C. Vandevyver and J.-C. G. Bünzli, *Chemistry – A European Journal*, 2007, **13**, 936-944.
31. G. Tallec, P. H. Fries, D. Imbert and M. Mazzanti, *Inorganic Chemistry*, 2011, **50**, 7943-7945.
32. G. Tallec, D. Imbert, P. H. Fries and M. Mazzanti, *Dalton Transactions*, 2010, **39**, 9490-9492.
33. E. Serrao, B. Debnath, H. Otake, Y. Kuang, F. Christ, Z. Debyser and N. Neamati, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, **56**, 2311-2322.
34. G. Tallec, Université de Grenoble, 2011.
35. A. Nonat, D. Imbert, J. Pécaut, M. Giraud and M. Mazzanti, *Inorganic Chemistry*, 2009, **48**, 4207-4218.
36. W. Stober, A. Fink and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, **26**, 62-&.
37. S. H. Wu, C. Y. Mou and H. P. Lin, *Chemical Society Reviews*, 2013, **42**, 3862-3875.
38. R. P. Bagwe, C. Yang, L. R. Hilliard and W. Tan, *Langmuir*, 2004, **20**, 8336-8342.
39. N. Wartenberg, Université de Lyon 1, 2012.
40. C. Kumar and D. Balasubramanian, *Journal of Colloid Interface Science*, 1979, **69**, 271-279.
41. J. R. a. K. S. Françoise Rouquerol, *Adsorption by Powders and Porous Solids* 1999.
42. S. V. Eliseeva, B. Song, C. D. B. Vandevyver, A.-S. Chauvin, J. B. Wacker and J.-C. G. Bunzli, *New Journal of Chemistry*, 2010, **34**, 2915-2921.
43. K. J. Balkus and J. Shi, *Langmuir*, 1996, **12**, 6277-6281.
44. S. Hak, H. M. H. F. Sanders, P. Agrawal, S. Langereis, H. Grüll, H. M. Keizer, F. Arena, E. Terreno, G. J. Strijkers and K. Nicolay, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, **72**, 397-404.
45. W. D. Horrocks and D. R. Sudnick, *Journal of American Chemical Society*, 1979, **101**, 334-340.
46. G. B. Chavhan, P. S. Babyn, B. Thomas, M. M. Shroff and E. M. Haacke, *RadioGraphics*, 2009, **29**, 1433-1449.
47. C. Platas-Iglesias, L. Vander Elst, W. Z. Zhou, R. N. Muller, C. Geraldes, T. Maschmeyer and J. A. Peters, *Chemistry-A European Journal*, 2002, **8**, 5121-5131.
48. D. C. Carter and J. X. Ho, in *Advances in Protein Chemistry*, eds. J. T. E. F. M. R. C.B. Anfinsen and S. E. David, Academic Press, 1994, vol. Volume 45, pp. 153-203.
49. I. Axelsson, *Journal of Chromatography A*, 1978, **152**, 21-32.
50. S. Laurent, L. Vander Elst, C. Henoumont and R. N. Muller, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2010, **5**, 305-308.
51. E. M. Gale, N. Kenton and P. Caravan, *Chemical Communications*, 2013, **49**, 8060-8062.
52. J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare and S. S. Gambhir, *Nanomedicine*, 2011, **6**, 715-728.
53. X. P. Duan and Y. P. Li, *Small*, 2013, **9**, 1521-1532.
54. A.-C. Faure, S. Dufort, V. Josserand, P. Perriat, J.-L. Coll, S. Roux and O. Tillement, *Small*, 2009, **5**, 2565-2575.
55. S. L. C. Pinho, H. Faneca, C. F. G. C. Geraldes, J. Rocha, L. D. Carlos and M.-H. Delville, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, **2012**, 2828-2837.
56. W. P. Gillin and R. J. Curry, *Applied Physics Letters*, 1999, **74**, 798-799.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a consisté à l'incorporation de complexes de Gd(III) dans des systèmes macromoléculaires et des nanoobjets. L'objectif de ce travail était d'obtenir des systèmes rassemblant un grand nombre de complexes de Gd(III) dont les paramètres gouvernant la relaxivité sont optimisés afin d'exalter la relaxivité par le changement d'échelle dans le but de l'imagerie moléculaire.

Pour atteindre cet objectif, la fonctionnalisation des dérivés de l'ebpatcn et du DOTA a été effectué dans un premier temps afin de les greffer sur des systèmes macromoléculaires ou des nanoobjets. Les deux ligands utilisés possèdent un bras propionate qui permet d'encombrer la sphère de coordination du Gd(II) et par conséquent d'augmenter la vitesse d'échange des molécules d'eau. Ces dérivés fonctionnalisés avec une amine primaire ont été obtenus avec des rendements globaux faibles. Ceux-ci pourraient être améliorés en changeant la voie de synthèse. En effet au cours de ma thèse, plusieurs espaceurs ont été étudiés (lipoïque, mercaptobenzoïque, mercaptométhylène phényle, azoture). La voie de synthèse la plus judicieuse a donc été de synthétiser des complexes avec une fonction réactive (amine) puis d'ajouter lors de la dernière étape l'espaceur désiré grâce à une réaction de couplage peptidique, ce qui permet une plus grande versatilité au niveau de l'espaceur utilisé. Les différents complexes obtenus ont été caractérisés et leurs propriétés relaxométriques et de luminescence ne présentent pas de changements significatifs en présence des espaceurs lipoïque, mercaptométhylène phényle pour le greffage sur les quantum dots et azoture pour le greffage sur les oligonucléotides. Par contre, une diminution de la relaxivité du complexe de gadolinium et des rendements quantiques des complexes d'euprium et terbium a été observée en présence de l'espaceur mercaptobenzoïque. Ces diminutions ne sont pas expliquées pour le moment et pourront être investiguées par l'étude des conformations des complexes en solution. Une autre voie de synthèse de ces composés a récemment été décrite dans la littérature et pourra être envisagée pour améliorer les rendements de synthèse. Elle consiste à coupler l'espaceur sur le bras propionate dès le début de synthèse qui sera ensuite substitué sur le triazacyclononane ou le cyclène permettant ainsi d'avoir une versatilité au niveau des métaux utilisés.

Les complexes de gadolinium fonctionnalisés avec des fonctions thiols ont été greffés sur des quantum dots dans le but d'obtenir une sonde bimodale IRM/Optique. Les complexes ont été greffés de manière efficace sur des quantum dots de type InPZnS/ZnSe/ZnS émettant à 525 nm. Une augmentation significative de la relaxivité est observée à 20 MHz qui est propre à chaque espaceur utilisé : elle est de 16, 35 et 45 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par gadolinium respectivement pour des complexes d'ebpatcn fonctionnalisés avec l'acide lipoïque, l'acide mercaptobenzoïque et l'acide mercaptophényle acétique. L'augmentation dépend de la rigidité de l'espaceur : plus il est rigide (mercatobenzoïque) plus la relaxivité par gadolinium est affectée. La longueur de l'espaceur joue un rôle sur le nombre de complexes greffés : plus il est long (lipoïque) plus le nombre de complexes greffés sur la surface sera élevé par la diminution de gêne stérique avec la surface du nanoobjet. Ceci permet d'avoir une relaxivité par particule élevée. L'espaceur mercaptométhylène phényle représente un compromis entre les deux : le groupement phényle donne la rigidité à l'espaceur et le groupement méthylène permet d'éloigner suffisamment le complexe de la surface du quantum dots pour y greffer un plus grand nombre de complexe (80). Le greffage du complexe dérivé du DOTA portant l'espaceur

mercaptophényle a les mêmes propriétés relaxométriques que son analogue avec dérivé du Gdcbpatcn.

Ce système a permis d'obtenir une sonde bimodale avec des propriétés de relaxivité améliorées d'une part par Gd(III) grâce au changement d'échelle et d'autre part par particule en greffant un nombre élevé de complexes par quantum dot. Une des valeurs les plus hautes de la littérature a pu être atteinte pour des systèmes bimodaux comportant des complexes de Gd(III) avec une molécule d'eau dans la sphère de coordination.

Des complexes de lanthanides luminescents ont également été greffés sur les quantum dots dans le but d'étudier les transferts d'énergie entre les deux entités. Ces transferts sont dépendants des niveaux d'énergie des états excités des ions Ln(III) et du quantum dots. Des transferts ont été observés lorsque le niveau d'énergie d'état excité du quantum dot est supérieur à celui de l'ion Ln(III). L'excitation du quantum dot permet d'observer la luminescence de l'Yb(III) et dans une moindre mesure, celle de l'Eu(III). Le transfert d'énergie est caractérisé par une diminution de rendement quantique et des temps de vie du quantum dot. Ces propriétés de luminescence mais aussi relaxométriques permettent de potentielles applications de ces systèmes *in vitro* pour l'IRM et l'imagerie optique.

Les complexes d'ebpatcn ont également été fonctionnalisés par un azoture dans le but d'être greffés sur des oligonucléotides. L'objectif dans cette étude est d'obtenir un outil méthodologique permettant de détecter des changements de taille et de structure de l'ADN par relaxivité. Le complexe de Gd(III) a été greffé sur des simples brins d'ADN comportant 6 ou 18 nucléotides. Une augmentation de la relaxivité est observée grâce à l'augmentation du poids moléculaire, qui est légèrement plus importante pour le 6-mère que le 18-mère. L'effet de la structure a aussi été étudié en formant le double brin d'ADN sur le 18-mère. Une augmentation de la relaxivité a été observée en passant du simple au double brin grâce à la rigidité de la structure. Le brin d'ADN complémentaire utilisé pour former le duplexe d'ADN comporte une fonction biotine à son extrémité. La sélectivité et l'affinité de la biotine pour la streptavidine vont être utilisées dans ce système pour former un objet de taille et de rigidité encore plus importante, ce qui va permettre d'augmenter encore la relaxivité par Gd(III). Quatre unités biotines pourront être couplées à la streptavidine, ce qui permettra aussi d'augmenter la relaxivité par objet. Ces sondes ADN ont pour but d'être utilisée *in vitro* dans l'optique de détecter d'éventuelles lésions de l'ADN et ou interactions avec des éléments endogènes ou exogènes.

Dans la littérature, l'incorporation non covalente de complexes de Gd(III) dans des nanoobjets perméable à l'eau mènent à de très haute relaxivité par Gd(III). Pour comprendre les mécanismes régissant cette haute relaxivité, différents complexes possédant chacun leurs propres propriétés relaxométriques ont été incorporés dans les billes de silice. L'incorporation non efficace des dérivés du DOTA a montré la nécessité de la présence de groupements hydrophobes sur le complexe.

L'incorporation non covalente des complexes d'hydroxyquinoléine dans les billes de silice de 25 et 55 nm a été effectuée de manière efficace. Une très importante augmentation de la relaxivité par gadolinium jusqu'à $90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25 °C a été obtenue pour les particules de 25 nm, due aux interactions des complexes avec la matrice de silice. Les particules de 55 nm ont permis d'encapsuler

un grand nombre de complexes, ce qui conduit à une très haute relaxivité par particule de 97000 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 35 MHz et 25°C.

L'incorporation du complexe $[\text{Gd}(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$, n'ayant pas de molécule d'eau dans sa sphère interne, montre que les effets de sphère externe et de seconde sphère ne sont pas prédominants dans l'augmentation de la relaxivité. L'incorporation des complexes $[\text{Gd}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ montre une augmentation très importante de la relaxivité dans les billes de 25 nm, quasiment équivalente pour les deux complexes. Comme l'effet de sphère interne est celui qui prédomine, les valeurs de relaxivité auraient dûes être plus élevées dans le cas du complexe trisaquo que pour le monoaquo. Ces complexes diffèrent d'une part par le nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination mais aussi par leur vitesse d'échange, plus faible pour le complexe trisaquo. Cette dernière expliquerait l'augmentation quasi similaire de la relaxivité lors de l'incorporation des deux complexes. L'incorporation d'un complexe bisquo avec une vitesse d'échange élevée nous permettrait de confirmer ce résultat. La détermination des paramètres gouvernant la relaxivité est très difficile pour ce système. En effet, en plus des paramètres régissant la relaxivité d'un complexe en solution il faut déterminer la vitesse d'échange de l'eau entrant dans la nanoparticule et la dynamique de rotation du complexe à l'intérieur de la particule, qui ne sont pas faciles à appréhender.

Afin d'évaluer leur comportement pour des tests *in vivo*, la relaxivité des nanoparticules dopées a été évaluée en milieu biologique. Les protéines et les anions endogènes présents dans le sérum s'accrochent à la surface des nanoparticules, modifiant la diffusion des molécules d'eau dans les nanoparticules et dans le solvant. Ceci conduit à une diminution de la relaxivité à bas champ. A haut champ, la diminution est beaucoup moins importante notamment pour les anions. La nanoparticule constitue une barrière contre les anions à haut champ notamment pour le complexe trisaquo $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$, particulièrement sensible aux anions endogènes en solution. La nanoparticule permet aussi de résister à la transmetallation en présence de Zn(II), ce qui n'est pas le cas du complexe en solution. Des études préliminaires montrent que le greffage de chaînes PEG permettent d'éloigner de la surface des nanoparticules les protéines contenues dans le sérum. Cependant, la présence de chaînes PEG ne permet pas d'améliorer la dispersion des nanoparticules, et rend la solution très visqueuse et donc difficilement employable pour de l'imagerie *in vivo*. Un moyen de pallier à ce problème serait de greffer des chaînes PEG plus longues. Les études effectuées *in vitro* montre que ces particules peuvent être utilisées en tant qu'agents T_1 à bas champ et agents T_2 à haut champ. En effet, la relaxivité transversale augmente considérablement avec le champ, alors que l'inverse se produit avec la relaxivité longitudinale. Ceci conduit à des systèmes dont le ratio r_2/r_1 est très élevé à haut champ et r_2 quasiment équivalent à r_1 à bas champ.

Finalement, même si la viscosité des particules pourrait rendre une utilisation *in vivo* difficile, l'utilisation des billes de silice sur le petit animal a été testée. Des injections intracardiaques des nanoparticules de 25 et 55 nm dopées avec le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ ont été réalisés chez la souris. Aucun décès n'a été constaté durant les trois premières heures suivant l'injection révélant l'absence de toxicité aiguë.

Les systèmes obtenus dans le cadre de cette thèse possèdent tous des propriétés relaxométriques améliorées, permettant le développement de sondes pour l'imagerie moléculaire *in vitro*. Pour aller vers les applications *in vivo*, il est nécessaire de développer des sondes ne présentant pas de toxicité.

Pour cela, l'utilisation des complexes dérivés du DOTA, le complexe le plus stable pour les agents de contraste est une perspective à approfondir. De plus la toxicité des deux types de nanoparticules (quantum dots et billes de silice) est à étudier plus en détail.

Experimental part

1. Synthesis	193
a) General information	193
b) Synthons	195
c) DOTA derivative.....	200
d) ebpatcn derivative.....	203
e) N ₃ dpaaoEt	213
f) GddpaadU.....	215
g) Gdebpatcn6mer.....	217
h) Gebpatcn18mer.....	218
i) Synthesis of hydroxyquinoline complexes	219
2. Characterization and measurements	220
a) Scanning electron microscopy (SEM)	220
b) Dynamic light scattering (DLS).....	220
c) UV-visible absorption spectroscopy.....	221
d) Luminescence measurement	221
e) Relaxometric measurements	223
3. Grafting of lanthanide complexes on quantum dots	227
a) Quantum dots synthesis.....	227
b) Synthesis of penicillamine-capped QDs (QD-pen).....	228
c) Synthesis of Ln complexes grafted-QD.....	228
4. Silica nanoparticles	229
a) General information	229
b) Nanoparticle synthesis	229
c) Nanoparticles characterization	231
d) NMR measurement	233
e) Transmetallation	234
f) MRI measurement.....	235
5. References	235

Experimental part

1. Synthesis

a) General information

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Chematech, Fluka, Acros, Carlo Erba and Alfa Aesar and used without further purification. Dichloromethane was distilled on calcium hydride and triethylamine on potassium hydroxide. The lanthanide salts were purchased from Aldrich and were titrated by colorimetry with the xylenol orange as indicator. 6-Chloromethylpyridine-2-carboxylic acid ethyl ester and N-tert-butyloxycarbonate)L-homoserine ethyl ester were synthesized according to published procedures.^{1,2} All water solutions were prepared from ultrapure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore MilliQ reverse-osmosis cartridge system (resistivity 18 MΩ cm). Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 or aluminium oxide 60 F254 neutral (Merck). Preparative TLC was performed using Merck 0.5 mm coated silica gel Kieselgel 60 F254 plates. Flash chromatography was performed on silica gel 60 (40-63 μm, Merck) or silica gel 60 RP18 F₂₅₄ or aluminium oxide F₂₅₄ activated III (63-200 μm, Merck).

The analytical high performance liquid chromatography (HPLC) on organic compounds and lanthanide complexes was carried out on an Hypersil Gold column (250x4.6 mm, particle size 5 μ) at 1 mL/min with an excitation wavelength at 270 nm. The solvents used were

- A : CH₃CN/H₂O/TFA : 90/10/0.01

- B : H₂O/TFA : 99.925/0.075

- C : CH₃CN

- D : H₂O

The preparative HPLC on organic compounds and lanthanide complexes was carried out on a Hypersil Gold column (250x21.6 mm, particle size 5 μ) at 15 mL/min with an excitation wavelength at 270 nm. The same solvents as analytical HPLC are used.

Different methods were used to purify the compounds for analytical and preparative HPLC:

Method 1:

Time (min)	C	D
0	0	100
5	0	100
20	100	0
25	0	100
30	0	100

Method 2:

Time	A	B
0	5	95
5	5	95
10	60	40
15	100	0
20	5	95

Method 3:

Time	C	D
0	0	100
15	25	75
20	100	0
30	0	100

The analytical HPLC on modified oligonucleotides was carried out on an Kromasil 100 column (250x4.6 mm, particle size 5 μ C18) at 1 mL/min with an excitation wavelength at 260 nm. The solvents used were ammonium formate (25 mM in water) and acetonitrile. The method used was from 0 to 18% of acetonitrile in ammonium formate (25 mM) in 50 min at 50 °C.

The semipreparative HPLC on modified oligonucleotides was carried out on a Hypersil column (250x7.8 mm, particle size 5 μ C18) at 2.5 mL/min with an excitation wavelength at 260 nm. The same solvents as analytical HPLC are used. The method to purify the modified oligonucleotides was from 0 to 18% of acetonitrile in ammonium formate (25 mM) in 50 min.

Characterization:

The ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded on Bruker Avance DMX 200 and Bruker Avance DMX 400 spectrometers. The chemical shifts are given in ppm by using the solvent as an internal reference. The following abbreviations are used for describing the multiplicity of the signal s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet), dd (doublet of doublets), td (triplet of doublet), m (multiplet).

Mass spectra of organic compounds were recorded on a LXQ type THERMO SCIENTIFIC spectrometer, equipped with an electrospray ionization source and a linear-trap detector. Solutions were injected in the spectrometer at 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ flow rate. Ionization voltage and capillary temperature were about 2 kV and 250 °C, respectively. The source settings were the same (sheath gas, auxiliary gas, capillary voltage, and tube lens).

The mass spectra of modified oligonucleotides were obtained in the negative mode on a time-of-flight Microflex mass spectrometer (Bruker, Wissembourg), equipped with a 337-nm nitrogen laser and pulsed delay source extraction. The matrix was prepared by dissolving 3-hydroxypicolinic acid in 10 mM ammonium citrate buffer. A solution of purified DNA sample (10 pmol; 1 μL) was added to matrix (1 μL) and spotted on a polished stainless target plate using the dried droplet method. Spectra were calibrated using reference oligonucleotides of known masses.

Purified oligonucleotides (fractions with a purity of more than 95% from RP-HPLC at 260 nm) were dosed by measuring the absorbance at 260 nm *via* a Nanodrop ND-1000. The apparatus gives a mass concentration considering that the molecular weight of a DNA base is about 300 g/mol. As the picolinate moiety also absorbs at 260 nm, a correction on the concentration of the modified nucleotides is done:

$$\text{Equation V-1 : } C_{real} = \frac{C_m \times n \times 300}{MW}$$

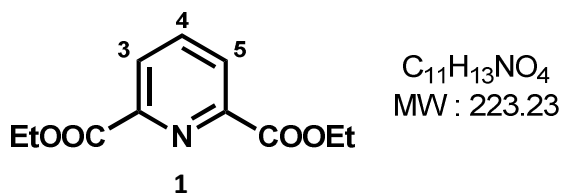
With C_m the measured concentration, n the number of base on the oligonucleotides and MW the molecular weight of the modified oligonucleotides.

b) Synthons

- *Aldehyde picolinate*

The two next reactions were adapted according to the procedure described by Fornasier et al¹

Compound 1:

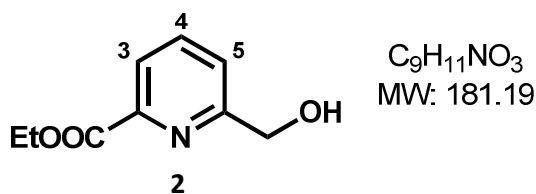


To a suspension of 2,6 pyridine dicarboxylic acid (25.0 g, 0.150 mol, 1.0 eq) in ethanol (500 mL), concentrated sulfuric acid (70 mL, 1.302 mol, 8.7 eq) was added slowly. The mixture was refluxed overnight. The reaction medium was concentrated to the third of the initial volume and discharged in a cold saturated solution of NaHCO₃ (250 mL). After checking that the pH is about 7, this one was extracted with chloroform (5x250 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduce pressure to obtain the compound **1** as a white solid (30.5 g, 91%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ = 8.28 (d, J=7.8 Hz, 2H, H₃,H₅), 7.99 (t, J=7.8Hz, 1H, H₄), 4.49 (q, J=7.2 Hz, 4H, 2x COOCH₂CH₃), 1.45 (t, J=7.2 Hz, 6H, 2x COOCH₂CH₃)

ES-MS (m/z) : 224.3 [**1**+H]⁺; 246.2 [**1**+Na]⁺; 262.2 [**1**+K]⁺

Compound 2:

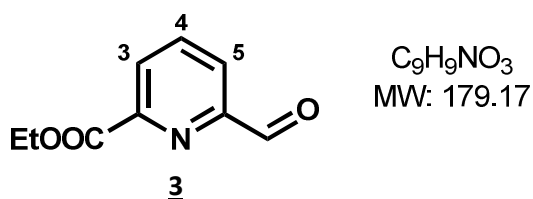


To a solution of the diester **1** (29.5 g, 0.132 mol, 1.0 eq) in dry ethanol (300 mL), sodium borohydride (3.9 g, 0.106 mol, 0.8 eq) was added slowly and the reaction was stirred overnight at reflux. The volume of the solution was concentrated half and cold water (150 mL) was added to the reaction medium. The aqueous phase was extracted with chloroform (5x100 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduce pressure to obtain a yellow oil which was recrystallized in ethanol (15 mL) to give the compound **2** as a white solid (10.2 g, 43%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ = 8.02 (d, J=7.8Hz, 1H, H₃), 7.83 (t, J=7.8 Hz, 1H, H₄), 7.49 (d, J=7.8 Hz, 1H, H₅), 4.85 (s, 2H, CH₂OH), 4.46 (q, J=7.2 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 1.43 (t, J=7.2 Hz, 3H, COOCH₂CH₃)

ES-MS (m/z): 182.1 [**2**+H]⁺; 204.0 [**2**+Na]⁺; 220.0 [**2**+K]⁺

Compound 3:



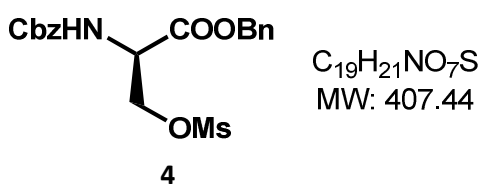
To a solution of alcohol 2 (5.06 g, 27.93 mmol, 1.0 eq) in 1,4-dioxane (140 mL), SeO₂ (1.52 g, 13.68 mmol, 0.49 eq) was added. The reaction was stirred overnight at reflux. After filtration through celite and evaporation under reduced pressure, the crude product was purified over silica gel (200 g, gradient CH₂Cl₂/EtOH from 100/0 to 90/10, v/v) to give the compound **3** (4.49 g, 92%) as a yellow solid.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 10.19 (s, 1H, CHO), 8.34 (dd, J=1.4 Hz, 7.6 Hz, 1H, H₃), 8.18 (dd, J=1.4 Hz, 7.6 Hz, 1H, H₅), 8.08 (t, J=7.6 Hz, 1H, H₄), 4.53 (q, J=7.2 Hz, 2H, COOCH₂CH₃) 1.50 (t, J= 7.2 Hz, 3H, COOCH₂CH₃)

ES-MS (m/z) : 179.9 [**3**+H]⁺ ; 201.9 [**3**+Na]⁺

- *Mesylate activated serine*

Compound 4:



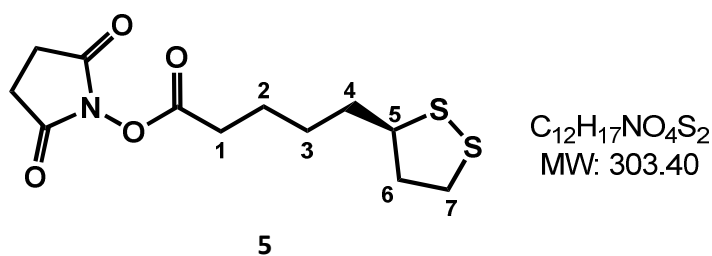
Adpated from the procedure described by Shetty et al³

To a solution of Cbz-Ser-OBn (1.00 g, 3.04 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane (25 mL), Et₃N (0.47 mL, 3.34 mmol, 1.1 eq) was added. The reaction mixture was cooled at 0°C and the mesyl chloride (0.26 ml, 3.34 mmol, 1.1 eq) was added dropwise. The reaction was stirred for 30 min at 0°C and monitored by TLC (SiO₂, Cyclohexane/EtOAc, 70/30, v/v). Then the reaction was quenched by addition of H₂O (20 mL). After decantation and separation, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3x25 mL). The organic layers were gathered and washed with saturated aqueous NaCl solution (25 mL), dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure to give the crude compound **4** (1.32 g, quant.) used without further purification.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 7.40-7.32 (m, 10H, 5H_{Bn} and 5H_{Cbz}), 5.67 (d broad, J=7.4 Hz, 1H, NH), 5.22 (s, 2H, CH₂Bn), 5.13 (s, 2H, CH₂Cbz), 4.71-4.67 (m, 1H, CHCH₂), 4.57 and 4.54 (ABX, J_{AB}=17.4 Hz, J_{AX}=J_{BX}=1.4 Hz, 2H, CHCH₂), 2.83 (s, 3H, CH₃)

- *Linkers*

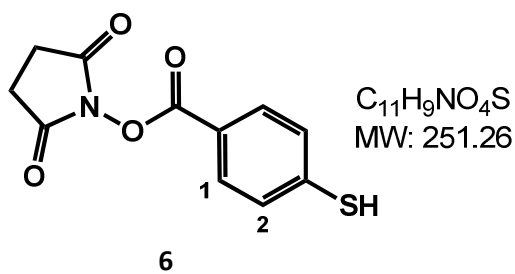
Compound 5:



To a solution of lipoic acid (1.00 g, 4.85 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (70 mL), N-hydroxysuccinimide (0.781 g, 6.78 mmol, 1.4 eq) and 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.22 g, 6.31 mmol, 1.3 eq) were added. The reaction was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduce pressure and the residue was taken in dichloromethane (150 mL). The organic phase was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (100 mL) and with brine (100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduce pressure to obtain the compound **5** as a yellowish solid (1.46 g, 99%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ = 3.57 (td, J=3.2, 7.2 Hz, 1H, H₅), 3.21-3.08 (m, 2H, H₁), 2.83 (s broad, 4H, NHS), 2.62 (t, J=7.2 Hz, 2H, H₇), 2.46 and 1.92 (ABXY₂, J_{AB}=6.4 Hz, J_{AX}=2.8 Hz, J_{BX}=3.4 Hz, J_{AY2}= J_{BY2}= 3.4 Hz, 1H, H₆), 1.82-1.75 (m, 2H, H₃), 1.74-1.68 (m, 2H, H₂), 1.57 (m, 2H, H₄)

Compound 6:

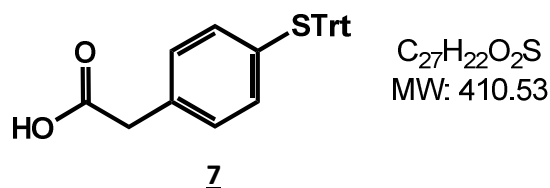


According to the procedure described by Shibata et al⁴

To a solution of 4-mercaptobenzoic acid (0.310 g, 2.01 mmol, 1 eq) in anhydrous DMF (20 mL), N-hydroxysuccinimide (0.324 g, 2.81 mmol, 1.4 eq) and 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (0.694 g, 3.62 mmol, 1.8 eq) were added. The reaction was stirred at room temperature during 3 days. The mixture was diluted in ethyl acetate (30 mL) and the organic phase was washed with water (2x20 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to obtain a crude product which was purified on silica gel (30 g, gradient cyclohexane/ethyl acetate from 50/50 to 0/100, v/v). The compound **6** was obtained as a light yellow solid (0.210 g, 40%).

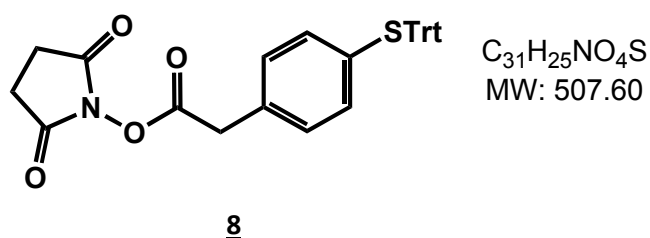
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 8.05 (d, J=8.4 Hz, 2H, H₁), 7.57 (d, J=8.4 Hz, 2H, H₂), 2.90 (s, 4H, NHS)

The three next reactions were adapted from the procedure described by Bartels et al⁵

Compound 7:

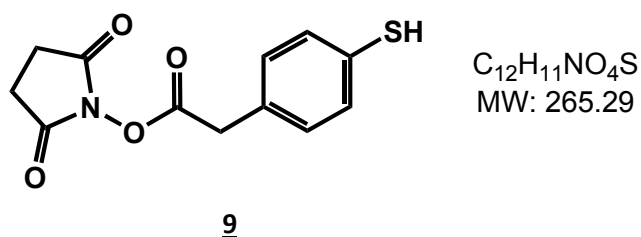
To a solution of trityl chloride (0.516 g, 1.85 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane (37 mL) with 4 Å molecular sieves, 2-(4-mercaptophenyl)acetic acid (0.311 g, 1.85 mmol, 1.0 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed leaving a yellow solid. This solid was washed with a mixture of dichloromethane and hexane (100 mL), and the washing was repeated till most of the yellow color has disappeared. The product was purified on silica gel (60 g, dichloromethane/acetone, 4/1, v/v), to provide the desired compound 7 as a pale yellow solid (0.410 g, 54%).

1H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 7.41-7.37 (m, 5 H, 3H_{Trt} and 2H_{Ph}), 7.27-7.19 (m, 10 H, 8H_{Trt} and 2H_{Ph}), 6.91 (s, 4H, 4H_{Trt}), 3.50 (s, 2H, CH₂)

Compound 8:

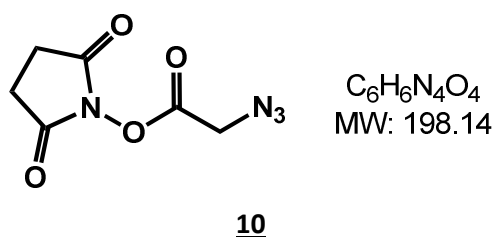
Compound 7 (0.398 g, 0.97 mmol, 1.00 eq), N-hydroxysuccinimide (0.118 g, 1.02 mmol, 1.05 eq), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (0.186 g, 0.97 mmol, 1.00 eq) and 4-Dimethylaminopyridine (1.2 mg, 9.7x10⁻³ mmol, 0.01 eq) were dissolved in dry dichloromethane (20 mL) and stirred for three days at room temperature. The mixture was diluted in dichloromethane (30 mL) and the organic phase was washed with a 0.5 M solution of HCl (2x40 mL) and a saturated solution of NaHCO₃ (2x40 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduce pressure to obtain a crude product which was purified on silica gel (100 g, eluted with cyclohexane/ethyl acetate 1/1, v/v). The compound 8 was obtained as a light yellow solid (0.410 g, 82%).

1H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 7.41-7.37 (m, 5 H, 3H_{Trt} and 2H_{Ph}), 7.27-7.19 (m, 10 H, 8H_{Trt} and 2H_{Ph}), 6.94 (s, 4H, 4H_{Trt}), 3.79 (s, 2H, CH₂), 2.83 (s, 4H, NHS)

Compound 9:

To a solution of **8** (0.410 g, 0.81 mmol, 1.0 eq) in dry dichloromethane (4 mL), trifluoroacetic acid (0.162 mL, 2.10 mmol, 2.6 eq) and triethylsilane (0.517 mL, 3.24 mmol, 4.0 eq) were added. After stirring one hour at room temperature, the mixture was diluted with dichloromethane (40 mL) and washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ (2x40 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduce pressure to obtain a crude product which was purified on silica gel (100 g, eluted with cyclohexane/ethyl acetate, 1/1, v/v). The compound **9** was obtained as a light yellow solid (0.220 g, 86%).

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, 298 K): δ = 7.29-7.19 (m, 4H, $4H_{Ph}$), 3.88 (s, 2H, CH_2), 2.84 (s, 4H, NHS)

Compound 10:

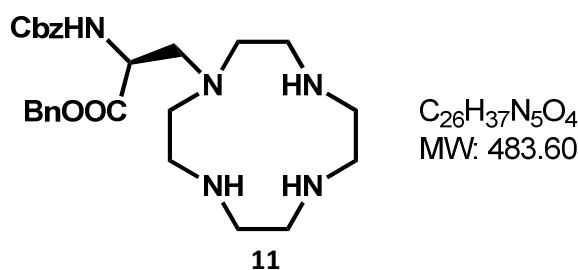
Adpated from the procedure described by Wang et al⁶

To a solution of azido acetic acid (0.300 g, 2.95 mmol, 1.0 eq) and N-hydroxysuccinimide (0.408 g, 3.54 mmol, 1.2 eq) in dry dichloromethane (30 mL) was added 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.678 g, 3.54 mmol, 1.2 eq) at 0 °C and stirred for 12 hours at room temperature. The reaction mixture was washed with saturated $NaHCO_3$ aqueous solution (2x25 mL) and then with brine (2x25 mL). The organic solution was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to afford the compound **10** as a white solid (0.280 g, 48%).

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz, 298 K): δ = 4.24 (s, 2H, CH_2), 2.88 (s, 4H, NHS)

c) DOTA derivative

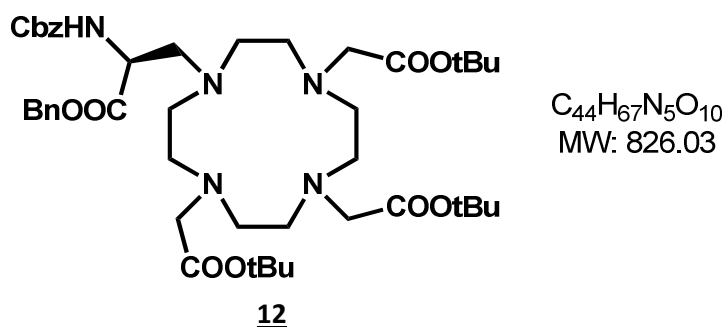
The two next reactions were adapted from the procedure described by Boros et al⁷

Compound 11:

To a solution of cyclen (0.785 g, 4.56 mmol, 2 eq) in dry acetonitrile (60 mL), potassium carbonate (0.315 g, 2.28 mmol, 1 eq) was added. The reaction mixture was heated at 50°C and the crude mesylate **4** (2.28 mmol, 1 eq) was added. Then the mixture was stirred at 50 °C for 16h, filtrated and evaporated under reduced pressure. The resulting product was solubilized in EtOAc (50 mL) and washed with water (3x20 mL) and with brine (20mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure to give the crude compound **11** (0.845 g, 77 %, Rf = 0.9) as a yellow oil used without further purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ = 7.41-7.21 (m, 10H, 10H_{Ar}), 6.46 (d, J=7.7 Hz, 1H, NH), 5.33-5.00 (m, 4H, 2 CH₂Ar), 4.48 (dd, J=5.6, 7.7 Hz, 1H, CHCH₂), 2.9 (d, J=5.6 Hz, 2H, CHCH₂), 2.62-2.29 (m, 16H, 8CH₂cyclen)

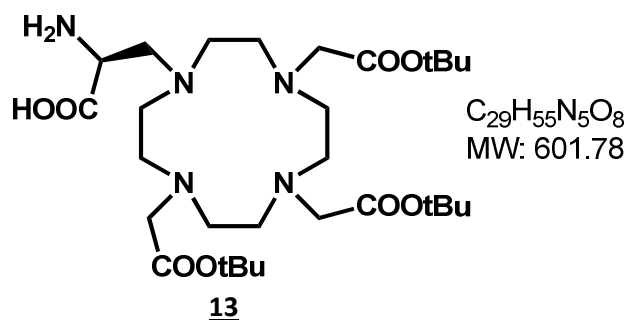
ES-MS (m/z): 242.6 [**11**+2H]²⁺; 484.3 [**11**+H]⁺; 795.4 [Di-substituted+H]⁺

Compound 12:

To a solution of the crude compound **11** (0.842 g, 1.74 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (50 mL), potassium carbonate (2.42 g, 17.4 mmol, 10 eq) and *tert*-butyl bromoacetate (0.82 mL, 5.57 mmol, 3.2 eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for 16h, filtrated and evaporated under reduced pressure. The resulting product was solubilized in EtOAc (100 mL) and washed with water (2x100 mL) and brine (100 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtrated and evaporated under reduced pressure to give the crude compound as a yellow solid. This one is filtrated on a silica gel 60 RP18 and purified by preparative HPLC to obtain the compound **12** as a white solid (0.530 g, 38%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ = 7.38-7.27 (m, 10H, 10HAr), 6.95 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, NH), 5.20-5.05 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.48 (m, 1H, CHCH_2), 4.00-3.00 (m, 24H, 8CH_2 Cyclen, CHCH_2 , $3\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.43 (s, 27H, $9\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$)
ES-MS (m/z): 848.4 [**12**+Na] $^+$

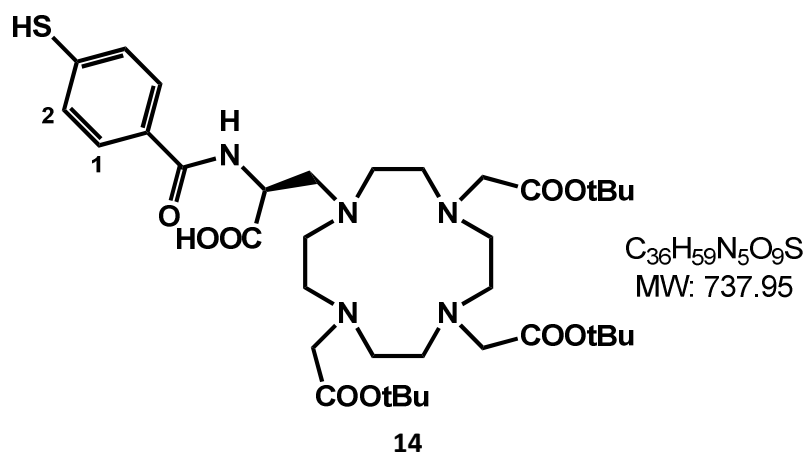
Compound 13:



The compound **12** (0.210 g, 0.254 mmol) was dissolved in ethanol. Pd/C (0.110 g, 10% w/w) was added to afford a slurry which was subjected to H_2 (2.4 bar) for 3 h. The Pd/C was filtered off on celite and the filtrate was concentrated *in vacuo* to afford the product **13** (0.200 g, quant.) as a colorless oil which was used without further purification in the subsequent reaction step.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz, 298 K): δ = 4.85-4.80 (m, 1H, CHCH_2), 4.0-3.0 (m, 24H, 8CH_2 Cyclen, CHCH_2 , $3\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (s, 27H, $9\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$)

Compound 14:

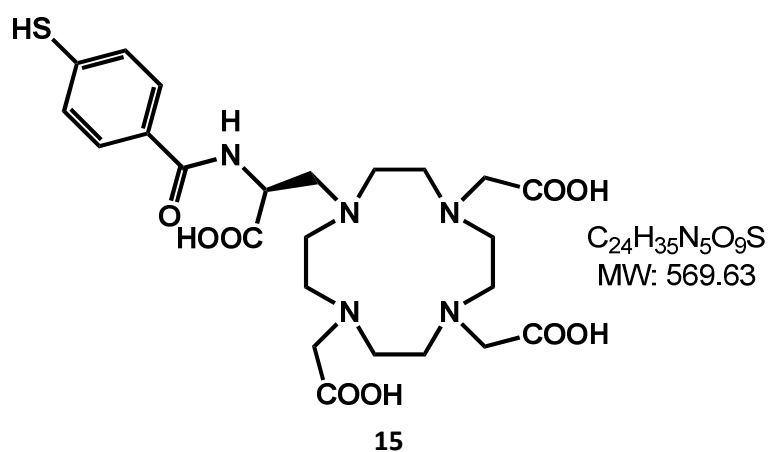


To a solution of the crude product **13** (0.254 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile, compound **6** (0.102 g, 0.406 mmol, 1.6 eq), tris(2-carboxyethyl)phosphine (0.116 g, 0.406 mmol, 1.6 eq) and N,N-diisopropylethylamine (69 μL , 0.406 mmol, 1.6 eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for three days. Then the solvent was evaporated under reduced pressure to afford the crude product **14** (0.410 g, quant.).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 400 MHz, 298 K): δ = 7.96 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H_1), 7.48 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H_2), 4.26-4.22 (m, 1H, CHCH_2), 3.85-3.81 (m, 2H, CHCH_2), 3.25-2.25 (m, 22H, 8CH_2 Cyclen, $3\text{CH}_2\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (s, 27H, $9\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$)

ES-MS (m/z): 738.4 [**14**+H] $^+$; 602.4 [**13**+H] $^+$

Compound 15:

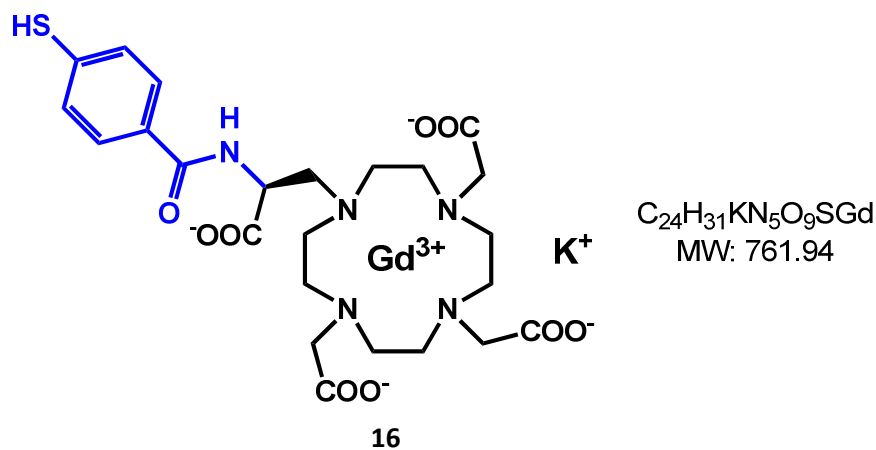


The crude compound **14** (0.254 mmol) was put in presence of a 6 M solution of HCl (6 mL) and the mixture was stirred at 40°C. The reaction was followed by analytical HPLC. After completion of the reaction, the pH of the solution was raised to 6.5 by addition of KOH. The mixture was purified by HPLC preparative (method 1) to obtain the ligand **15** (8.4 mg, 6%).

ES-MS (m/z): 570.3 [**15**+H]⁺ ; 1139.0 [**15-15**+H]⁺

Analytical HPLC Rt= 6 min, purity = 96% (method 1)

Compound 16: [Gd(DO3ApropSH)(H₂O)]



To a solution of **15** (8.4 mg, 0.015 mmol, 1.0 eq) in degassed water (0.3 mL), gadolinium chloride (0.32 mL of a 50 mM degassed solution, 0.016 mmol, 1.1 eq) and tris(2-carboxyethyl)phosphine (4.5 mg, 0.016 mmol, 1.1 eq) were added. The pH was raised to 6.5 using KOH. The reaction mixture was stirred under argon for three days at 60°C. The pH was raised every day to 6.5 using a concentrated solution of KOH. The mixture was purified by preparative HPLC (method 1) to obtain the pure complex **16** (1.3 mg, 10%).

ES-MS (m/z): 723.2 [**16**]⁻ ; 1445.1 [**16-16**-H]⁻

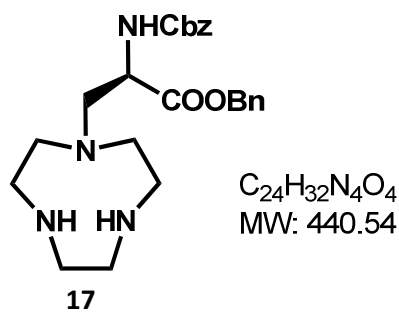
HRMS (m/z) : calcd for $C_{24}H_{31}N_5O_9SGd$: 721.5999, found: 721.6010

Analytical HPLC: Rt= 26 min, purity = 98% (method 1)

NB : The mass spectrometry does not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

d) ebpatcn derivative

Compound 17:

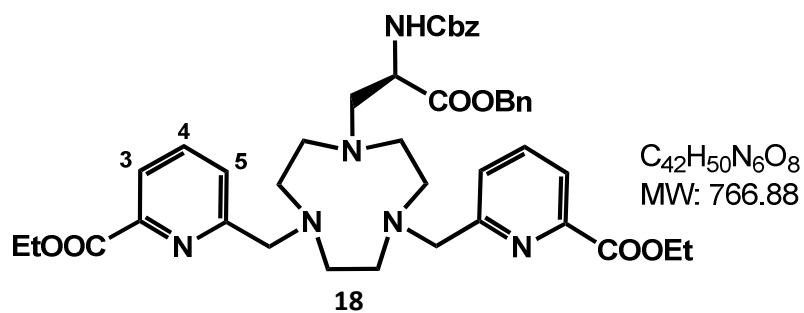


To a solution of tacn.3HCl (2.22 g, 9.30 mmol, 3.0 eq) in dry acetonitrile (60 mL), potassium carbonate (1.93 g, 13.5 mmol, 4.5 eq) was added. The reaction mixture was heated at 50°C and stirred for 1 h. Then the crude mesylate **4** (3.10 mmol, 1.0 eq) was added. The reaction was stirred at 50°C overnight, filtrated and evaporated under reduced pressure. The resulting oily product was solubilized in EtOAc (200 mL). The organic phase was washed with water (5x100 mL) and brine (2x100 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and reduced under pressure to give the compound **17** (1.00 g, 73%) as colorless oil and used without further purification.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K): δ = 7.45-7.27 (m, 10H, 10H_{Ar}), 6.73 (s broad, 1H, NH), 5.22-5.02 (m, 4H, 2CH₂Ar), 4.50-4.40 (m, 1H, CHCH₂), 3.14-2.59 (m, 14H, CHCH₂ and 6CH₂ tacn)

ES-MS (m/z): 441.4 [**17**+H]⁺

Compound 18:



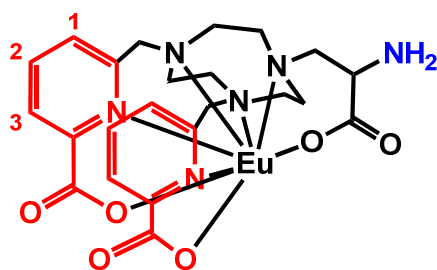
To a solution of the crude compound **17** (1.03 g, 2.34 mmol, 1.0 eq) in dry 1-2 dichloroethane (100 mL), aldehyde **3** (0.860 g, 4.80 mmol, 2.05 eq) was added. After stirring for 1 h at room temperature, NaBH(OAc)₃ (1.24 g, 5.85 mmol, 2.5 eq) was added. The reaction was stirred at room temperature overnight. A saturated aqueous NaHCO₃ solution (100 mL) was added to the reaction mixture. After decantation and separation, the aqueous layer was extracted with dichloromethane (4 x 100 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure to give the crude compound **18** (2.52 g, quant.) as an orange oil. The crude product was purified over activated III alumina (150 g, EtOAc/EtOH, 95/5, v/v) to give the compound **18** (0.90 g, 50%) as a yellow oil.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K): δ = 7.92 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H, H_3), 7.67 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H, H_4), 7.58 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H, H_5), 7.34-7.30 (m, 10H, 10H_{Ar}), 5.14-5.04 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{Ar}$), 4.44 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 4H, $2\times\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4.43-4.32 (m, 1H, CHCH_2), 3.86 (s, 4H, $2\text{CH}_2\text{Py}$), 2.96-2.65 (m, 14H, CHCH_2 and 6CH_2 tacn), 1.39 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 6H, $2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)

ES-MS (m/z): 767.5 [$\mathbf{18}+\text{H}$] $^+$

- *Europium complexes*

Compound 19: [$\text{Eu}(\text{ebpatcnNH}_2)(\text{H}_2\text{O})$]



$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_6\text{Eu}$
MW: 635.46

19

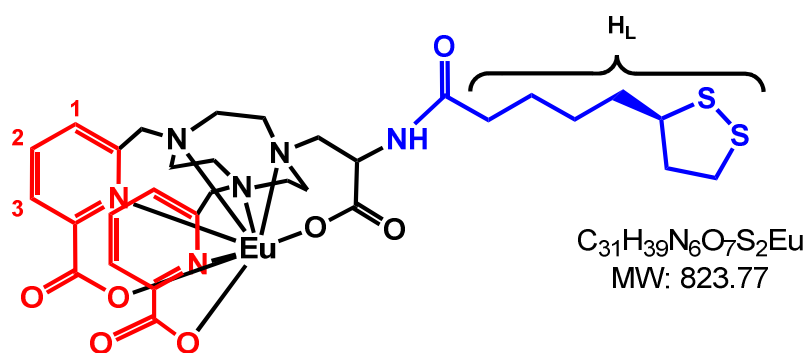
The compound **18** (0.300 g, 0.391 mmol, 1 eq) was put in presence of a 1 M solution of HCl (5 mL) and the mixture was stirred at reflux for 6 h. The reaction was monitored by analytical HPLC (method 2). The reaction was stopped and the pH was raised to 6.5 using a concentrated solution of KOH. Then europium chloride hexahydrate (0.158 g, 0.430 mmol, 1.1 eq) was added to the mixture and the pH was raised to 6.5 using a 0.5 M solution of KOH in water at room temperature during half an hour. The mixture was purified by preparative HPLC (method 2) to afford the complex **19** (60 mg, 25%, $\text{rt}=11.8$ min).

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 400 MHz, 298 K, $\text{pD} = 7.4$): δ = -13.74 (s, 1H, CH_2), -7.97 (s, 1H, CH_2), -7.43 (s, 1H, CH_2), -4.64 (s, 1H, CH_2), -3.33 (s, 1H, CH_2), -1.63 (s, 1H, CH_2), -1.16 (s, 1H, CH_2), -0.65 (s, 1H, CH_2), -0.19 (s, 1H, CH_2), -0.01 (s, 1H, CH_2), 0.22 (s, 1H, CH_2), 0.95 (s, 1H, CH_2), 1.67 (s, 1H, CH_2), 4.20 (s, 1H, CH_2), 5.12 (s, 1H, CH_2), 5.47 (s, 1H, CH_2), 6.27 (s, 1H, H_3), 6.42 (s, 1H, H_3), 6.93-6.85 (m, 3H, H_1+CH_2), 7.72 (s, 1H, H_2), 8.65 (s, 1H, H_2), 9.35 (s, 1H, CH_2), 25.24 (s, 1H, CH_2)

ES-MS (m/z): 637.3 [$\mathbf{19}+\text{H}$] $^+$

Analytical HPLC: $\text{Rt} = 11.6$ min, purity = 95% (method 2)

Compound 20: [Eu(ebpatcnSS)(H₂O)]



To a solution of **19** (44 mg, 0.069 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated lipoyl acid **5** (23 mg, 0.076 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (13 μ L, 0.076 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **20** (6.5 mg, 15%).

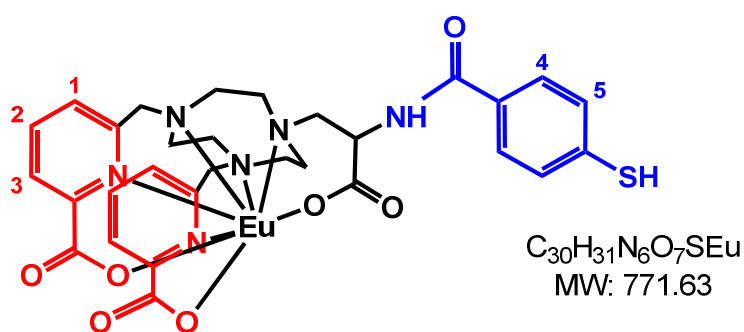
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K, pD = 7.4): δ = -14.18 (s, 1H, CH₂), -9.54 (s, 1H, CH₂), -9.28 (s, 1H, CH₂), -7.07 (s, 1H, CH₂), -3.83 (s, 1H, CH₂), -2.34 (s, 1H, CH₂), -1.76 (s, 1H, CH₂), -1.63 (s, 1H, CH₂), -1.52 (s, 1H, CH₂), -0.02 (s, 1H, CH₂), 0.17 (s, 1H, CH₂), 0.34 (s, 1H, CH₂), 0.82 (s, 1H, CH₂), 1.21-1.11 (m, 3H, H_L), 1.43-1.30 (m, 2H, H_L), 1.56-1.47 (m, 2H, H_L), 1.68-1.56 (m, 1H, H_L), 2.24-2.16 (m, 1H, H_L), 2.73-2.66 (m, 1H, H_L), 3.67-3.54 (m, 2H, H_L), 3.89-3.79 (m, 2H, H_L+CH₂), 5.69 (s, 1H, CH₂), 6.15 (s, 1H, CH₂), 6.52 (m, 2H, H₃), 6.84 (d, J=7.6Hz, 1H, H₁), 7.00 (d, J=7.6Hz, 1H, H₁), 7.94 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 8.08 (t, J= 7.6Hz, 1H, H₂), 8.18 (s, 1H, CH₂), 9.40 (s, 1H, CH₂), 26.86 (s, 1H, CH₂)

ES-MS (m/z): 825.3 [**20**+H]⁺

HRMS (m/z) : calcd for C₃₁H₃₉N₆O₇S₂EuNa: 847.1425, found: 847.1431

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 99% (method 3)

Compound 21: [Eu(ebpatcnSH)(H₂O)]



To a solution of **19** (15.2 mg, 0.024 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated mercaptobenzoic acid **6** (6.6 mg, 0.026 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (5 μ L, 0.03 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **21** (2.3 mg, 15%).

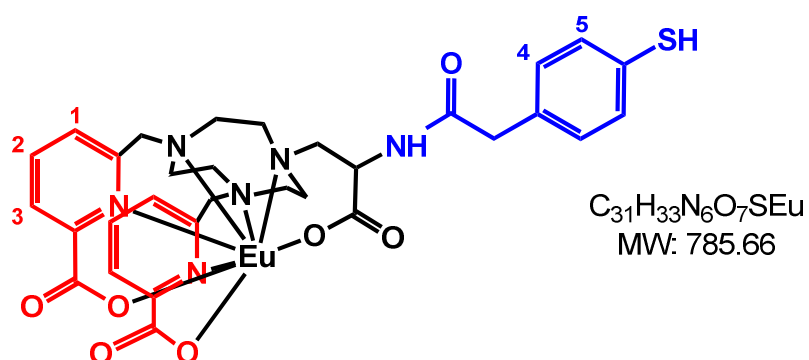
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K, pD =7.4): δ=-14.07 (s, 1H, CH₂), -9.20 (s, 1H, CH₂), -7.03 (s, 1H, CH₂), -4.21 (s, 1H, CH₂), -2.16 (s, 1H, CH₂), -1.59 (s, 1H, CH₂), -1.50 (s, 1H, CH₂), -0.44 (s, 1H,CH₂), -0.08 (s, 1H, CH₂), 0.08 (s, 1H,CH₂), 1.06 (s, 1H, CH₂), 1.35 (s, 1H, CH₂), 1.92 (s, 1H, CH₂), 3.73 (s, 1H, CH₂), 5.60 (s, 1H, CH₂), 6.06 (s, 1H, CH₂), 6.39 (s, 1H, H₃), 6.56 (s, 1H, H₃), 6.82 (d, J=7.2Hz, 2H, H₅), 6.93 (m, 2H, H₁), 7.16 (d, J=7.2Hz, 2H, H₄), 7.86 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 8.15 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 8.40 (s, 1H, CH₂), 9.71 (s, 1H, CH₂), 27.13 (s, 1H, CH₂)

ES-MS (m/z): 782.2 [**21-21**+Na+H]²⁺; 793.2 [**21-21**+2xNa]²⁺; 801.2 [**21-21**+Na+K]²⁺; 1563.1 [**21-21**+Na]⁺

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 97% (method 3)

NB: The NMR and mass spectrometry do not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

Compound 22: [Eu(ebpatcnCH₂SH)(H₂O)]



22

To a solution of **19** (30 mg, 0.047 mmol, 1.0 eq) in dry degassed dimethylformamide (2 mL), the activated mercaptophenyl acetic acid **9** (14 mg, 0.051 mmol, 1.1 eq), tris(2-carboxyethyl)phosphine (15 mg, 0.051 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (9 μL, 0.051 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **22** (1.2 mg, 4%).

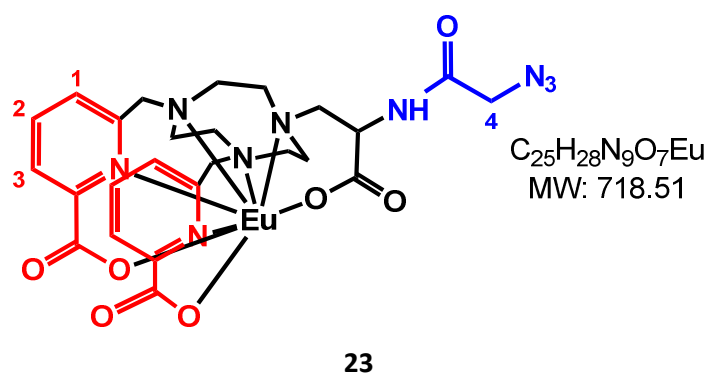
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K, pD =7.4) : δ=-14.13 (s, 1H, CH₂), -9.25 (s, 1H, CH₂), -7.25 (s, 1H, CH₂), -4.23 (s, 1H, CH₂), -2.42 (s, 1H, CH₂), -1.80 (s, 1H, CH₂), -1.65 (s, 1H, CH₂), -0.32 (s, 1H,CH₂), -0.25 (s, 1H, CH₂), 0.09 (s, 1H,CH₂), 1.28 (s, 1H, CH₂), 1.54 (s, 1H, CH₂), 2.07 (s, 1H, CH₂), 2.35 (s, 1H, CH₂), 2.62 (s, 1H, CH₂), 3.65 (s, 1H, CH₂), 5.48 (s, 1H, CH₂), 5.98 (s, 1H, CH₂), 6.38 (s, 1H, H₃), 6.73 (s, 1H, H₃), 6.93-6.85 (m, 2H, H₅), 7.16 (d, J=7.6Hz, 1H, H₁), 7.38 (d, J=7.6Hz, 1H, H₁), 7.48-7.54 (m, 2H, H₄), 7.80 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 7.97 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 8.17 (s, 1H, CH₂), 9.34 (s, 1H, CH₂), 26.75 (s, 1H, CH₂)

ES-MS (m/z): 389.2 [**22**+2xH]²⁺; 411.2 [**22**+H+Na]²⁺; 427.2 [**22**+H+K]²⁺; 1591.2 [**22-22**+Na]⁺

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 96% (method 3)

NB: The NMR and mass spectrometry do not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

Compound 23: [Eu(ebpatchnN₃)(H₂O)]



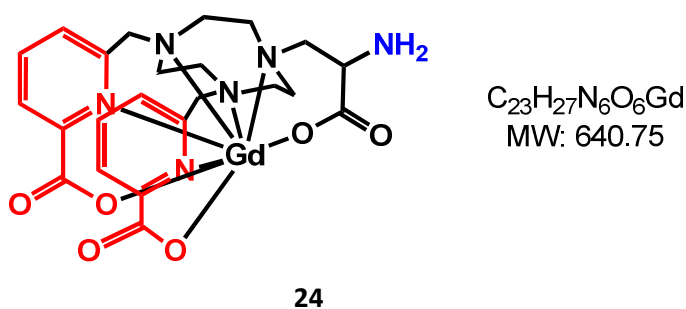
To a solution of **19** (15.1 mg, 0.024 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated acid **10** (5.2 mg, 0.026 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (5 μ L, 0.026 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparativ HPLC (method 3) to obtain the compound **23** (2.3 mg, 15%).
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K, pD =7.4): δ =-13.92 (s, 1H, CH₂), -9.05 (s, 1H, CH₂), -7.04 (s, 1H, CH₂), -3.93 (s, 1H, CH₂), -2.25 (s, 1H, CH₂), -1.87 (s, 1H, CH₂), -1.60 (s, 1H, CH₂), -1.36 (s, 1H, CH₂), -0.35 (s, 1H, CH₂), -0.09 (s, 1H, CH₂), 0.08 (s, 1H, CH₂), 1.03 (s, 1H, CH₂), 1.96 (s, 1H, CH₂), 3.19 (s, 2H, H₄), 3.88 (d, J=15.2Hz, 1H, CH₂), 5.53 (d, J=6.8Hz, 1H, CH₂), 6.12 (s, 1H, CH₂), 6.44 (d, J= 7.6Hz, 1H, H₃), 6.56 (d, J= 7.6Hz, 1H, H₃), 6.88 (d, J= 7.6Hz, 1H, H₁), 6.98 (d, J= 7.6Hz, 1H, H₁), 7.90 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 8.12 (t, J=7.6Hz, 1H, H₂), 8.19 (s, 1H, CH₂), 9.79 (s, 1H, CH₂), 26.80 (s, 1H, CH₂)

ES-MS (m/z): 718.2 [**23**+H]⁺; 742.2 [**23**+Na]⁺; 758.2 [**23**+K]⁺; 1459.1 [**23-23**+Na]⁺

Analytical HPLC: Rt= 15 min, purity = 99% (method 3)

- Gadolinium complexes

Compound 24: [Gd(ebpatchnNH₂)(H₂O)]

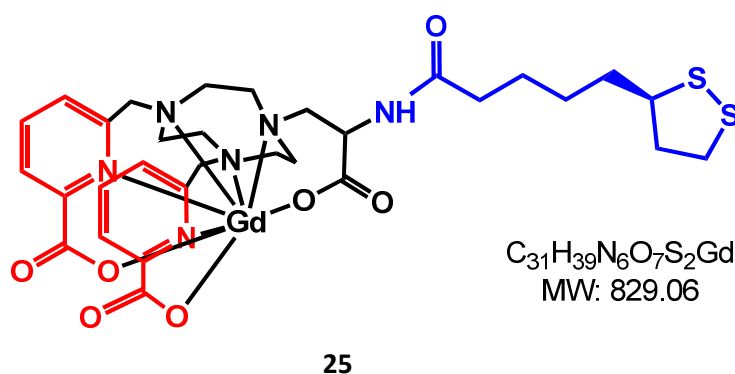


The compound **18** (0.200 g, 0.26 mmol, 1 eq) was put in presence of a 1 M solution of HCl (5 mL) and the mixture was stirred at reflux. The reaction was monitored by analytical HPLC (method 2). The reaction was stopped after 6 h and the pH was raised to 6.5 using a concentrated solution of KOH at room temperature during half an hour. Then gadolinium chloride hexahydrate (0.097 g, 0.26 mmol, 1 eq) was added to the mixture and the pH was raised to 6.5 using a 0.5 M solution of KOH in water. The mixture was purified by preparative HPLC (method 2) to afford the complex **24** (22 mg, 15%).

ES-MS (m/z): 642.2 [**24**+H]⁺

Analytical HPLC: Rt= 11.6 min, purity = 96 % (method 2)

Compound 25: [Gd(ebpatcnSS)(H₂O)]



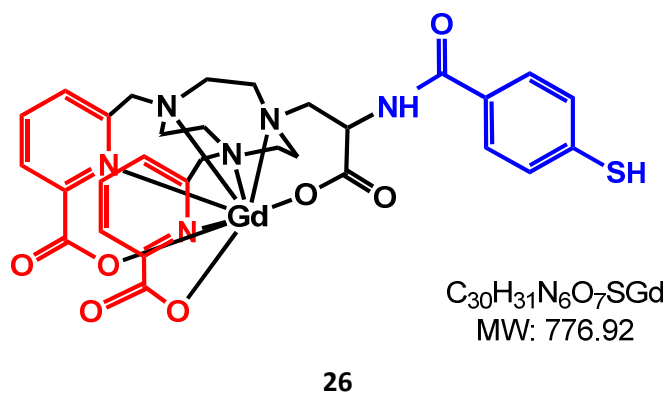
To a solution of **24** (22 mg, 0.034 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated acid **5** (12 mg, 0.038 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (6.5 μ L, 0.04 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **25** (6.5 mg, 23%).

ES-MS (m/z): 830.2 [**25**+H]⁺; 852.2 [**25**+Na]⁺; 868.2 [**25**+K]⁺; 1659.0 [**25-25**+H]⁺; 1681.0 [**25-25**+Na]⁺; 1697.0 [**25-25**+K]⁺

HRMS (m/z) : calcd for C₃₁H₃₉N₆O₇S₂GdNa: 852.1451, found: 852.1464

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 98% (method 3)

Compound 26: [Gd(ebpatcnSH)(H₂O)]



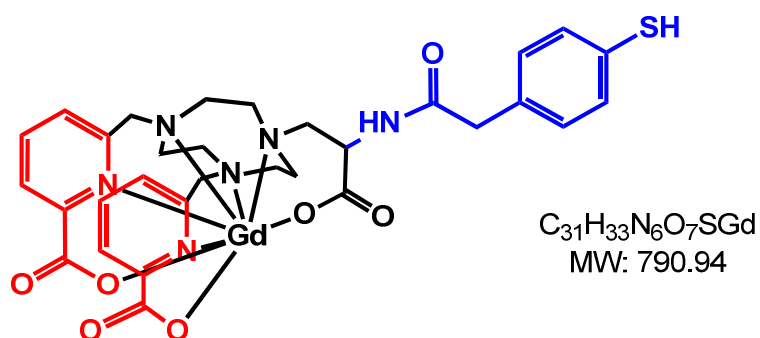
To a solution of **24** (13 mg, 0.020 mmol, 1.0 eq) in dry degassed acetonitrile (2 mL), the activated acid **6** (5.6 mg, 0.022 mmol, 1.1eq), tris(2-carboxyethyl)phosphine (6 mg, 0.022 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (3.8 μ L, 0.022 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **26** (2 mg, 13%, rt=21 min).

ES-MS (m/z): 799.0 [**26-26**+2xNa]²⁺; 1574.2 [**26-26**+Na]⁺

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 98% (method 3)

NB: The mass spectrometry does not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

Compound 27: [Gd(ebpatcnCH₂SH)(H₂O)]



27

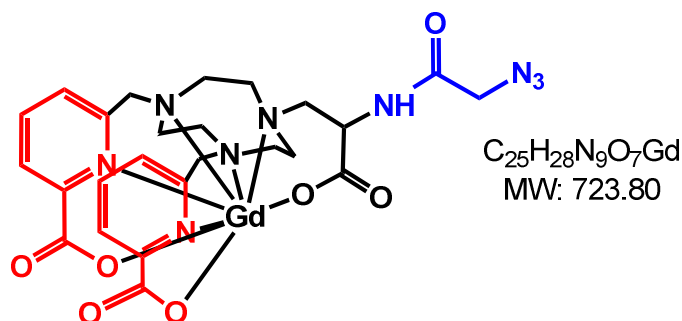
To a solution of **24** (32 mg, 0.050 mmol, 1.0 eq) in dry degassed dimethylformamide (2 mL), the activated acid **9** (15 mg, 0.055 mmol, 1.1 eq), tris(2-carboxyethyl)phosphine (17 mg, 0.055 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (9.8 μL, 0.06 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **27** (1.6 mg, 5%).

ES-MS (m/z): 396.7 [**27**+2xH]²⁺; 791.3 [**27-27**+2H]²⁺, 1581.2 [**27-27**+H]⁺

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 97% (method 3)

NB: The mass spectrometry does not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

Compound 28: [Gd(ebpatcnN₃)(H₂O)]



28

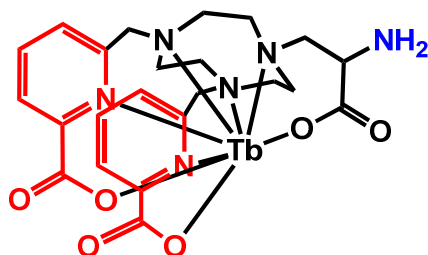
To a solution of **24** (12 mg, 0.019 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated acid **10** (4.1 mg, 0.021 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (3.6 μL, 0.021 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **28** (5.0 mg, 36%).

ES-MS (m/z): 725.3 [**28**+H]⁺; 744.2 [**28**+Na]⁺; 763.2 [**28**+K]⁺; 1447.2 [**28-28**+H]⁺; 1469.2 [**28-28**+Na]⁺; 1487.2 [**28-28**+K]⁺

Analytical HPLC: Rt= 14 min, purity = 99% (method 3)

- *Terbium complexes*

Compound 29: [Tb(ebpatchnNH₂)(H₂O)]



C₂₃H₂₇N₆O₆Tb
MW: 642.42

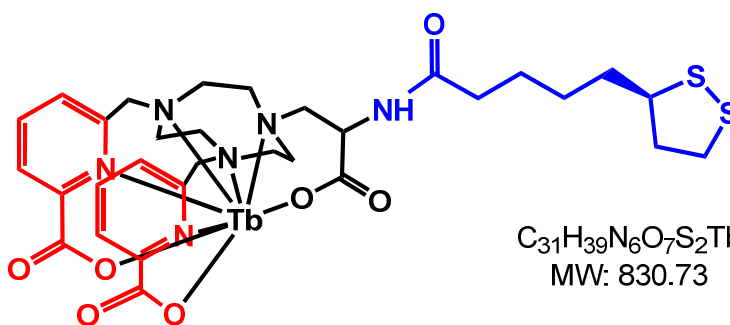
29

The compound **18** (0.220 g, 0.29 mmol, 1.0 eq) was put in presence of a 1 M solution of HCl (3 mL) and the mixture is stirred at reflux. The reaction was monitored by analytical HPLC (method 2). The reaction was stopped after 6 h and the pH was raised to 6.5 using a concentrated solution of KOH at room temperature during half an hour. Then terbium chloride hexahydrate (0.118 g, 0.32 mmol, 1.1 eq) was added to the mixture and the pH was raised to 6.5 using a 0.5 M solution of KOH. The mixture was purified by preparative HPLC (method 2) to afford the complex **29** (27 mg, 15%).

ES-MS (m/z): 643.3 [**29**+H]⁺

Analytical HPLC: Rt= 11.6 min, purity = 97% (method 2)

Compound 30: [Tb(ebpatchnSS)(H₂O)]



C₃₁H₃₉N₆O₇S₂Tb
MW: 830.73

30

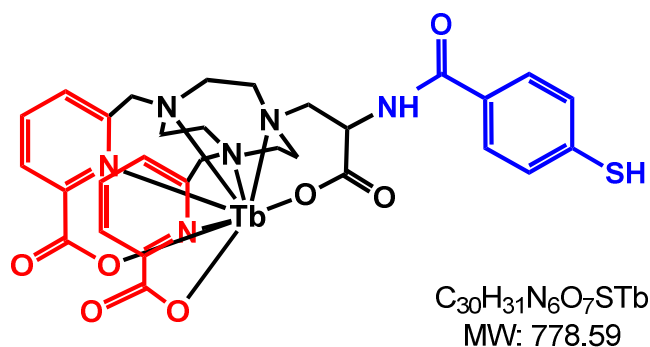
To a solution of **29** (26 mg, 0.040 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated acid **5** (13 mg, 0.044 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (7.5 μL, 0.044 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **30** (2.5 mg, 8%).

ES-MS (m/z): 831.3 [**30**+H]⁺ 853.3 [**30**+Na]⁺; 869.2 [**30**+K]⁺

HRMS (m/z) : calcd for C₃₁H₃₉N₆O₇S₂Tb: 829.1498, found: 829.1497

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 99% (method 3)

Compound 31: [Tb(ebpatchnSH)(H₂O)]



31

To a solution of **29** (30 mg, 0.047 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated acid **6** (13 mg, 0.050 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (9 μ L, 0.050 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **31** (1.2 mg, 4%).

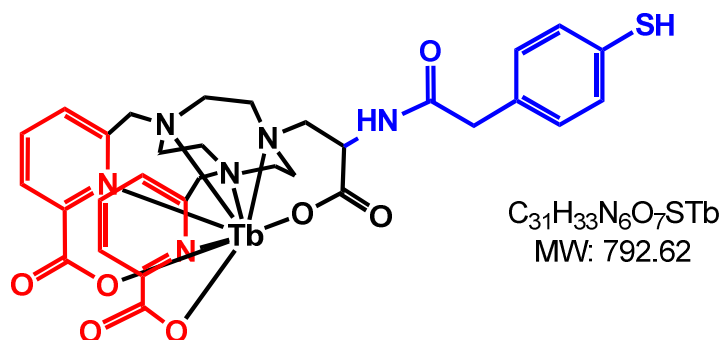
ES-MS (m/z): 778.2 [**31**+H]⁺; 797.2 [**31**+Na]⁺; 1555.2 [**31-31**+H]⁺; 1577.2 [**31-31**+Na]⁺

HRMS (m/z) : calcd for C₃₀H₃₁N₆O₇STb: 777.1071, found: 777.1150

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 98% (method 3)

NB: The mass spectrometry does not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

Compound 32: [Tb(ebpatchnCH₂SH)(H₂O)]



32

To a solution of **29** (30 mg, 0.046 mmol, 1.0 eq) in dry degassed dimethylformamide (2 mL), the activated acid **9** (14 mg, 0.050 mmol, 1.1 eq), tris(2-carboxyethyl)phosphine (15 mg, 0.050 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (9 μ L, 0.051 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **32** (2.8 mg, 8%, rt=21 min).

ES-MS (m/z): 803.3 [**32-32**+H+Na]²⁺; 814.3 [**32-32**+2xNa]²⁺; 1605.2 [**32-32**+Na]⁺

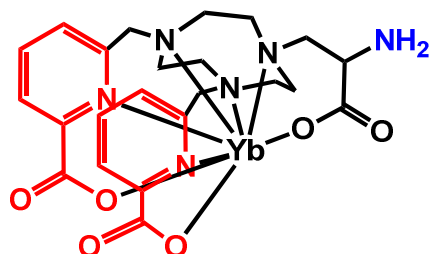
HRMS (m/z) : calcd for C₃₁H₃₃N₆O₇STb: 791.1313, found: 791.1307

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 97% (method 3)

NB: The mass spectrometry does not allow the distinction between the dimer (linked by a disulfide bridge) or a monomer.

- *Ytterbium complexes*

Compound 33: [Yb(ebpatcnNH₂)(H₂O)]



C₂₃H₂₇N₆O₆Yb
Mw: 656.55

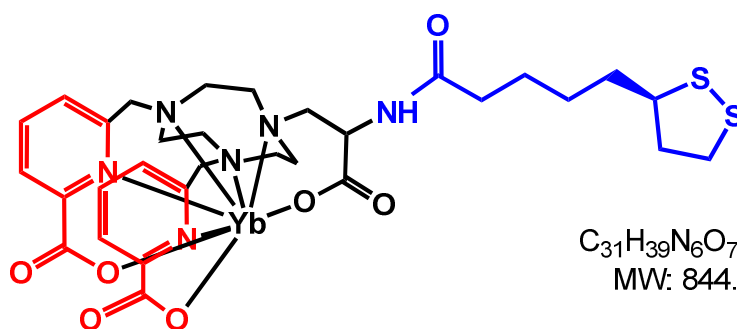
33

The compound **18** (0.22 g, 0.29 mmol, 1 eq) was put in presence of a 1 M solution of HCl (3 mL) and the mixture was stirred at reflux. The reaction was monitored by analytical HPLC (method 2). The reaction was stopped and the pH was raised to 6.5 using a concentrated solution of KOH at room temperature during half an hour. Then ytterbium chloride hexahydrate (0.13 g, 0.32 mmol, 1.1 eq) was added to the mixture and the pH was raised to 6.5 using a 0.5 M solution of KOH. The mixture was purified by preparative HPLC (method 2) to afford the complex **33** (29 mg, 15%).

ES-MS (m/z): 658.3 [**33**+H]⁺

Analytical HPLC: Rt= 11.6 min, purity = 96% (method 2)

Compound 34: [Yb(ebpatcnSS)(H₂O)]



C₃₁H₃₉N₆O₇S₂Yb
MW: 844.86

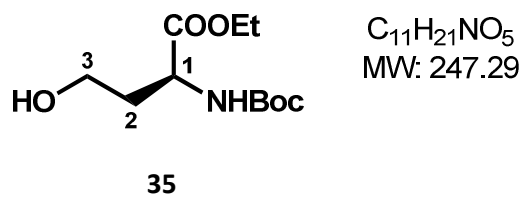
34

To a solution of **33** (29 mg, 0.043 mmol, 1.0 eq) in dry acetonitrile (2 mL), the activated acid **5** (15 mg, 0.048 mmol, 1.1 eq) and N,N-diisopropylethylamine (8.5 μL, 0.048 mmol, 1.1 eq) were added. The reaction mixture was stirred overnight then the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by preparative HPLC (method 3) to obtain the compound **34** (3.1 mg, 8%, rt=21 min).

ES-MS (m/z): 846.2 [**34**+H]⁺ 868.2 [**34**+Na]⁺; 884.3 [**34**+K]⁺

HRMS (m/z) : calcd for C₃₁H₃₉N₆O₇S₂Yb: 844.1642, found: 844.1633

Analytical HPLC: Rt= 21 min, purity = 99% (method 3)

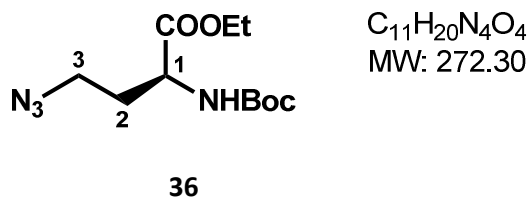
e) N₃dpaaOEtCompound 35:

Adapted from the procedure described by M. Sisido et al²

Di-*tert*-butyldicarbonate (1.378 g, 6.31 mmol, 1.2 eq) in 1,4-dioxane (10 mL) was added dropwise to a stirred solution of L-homoserine (0.627 g, 5.263 mmol, 1.0 eq) in H₂O (10 mL) and 1,4-dioxane (5 mL) at 0°C for 10 min. After stirring overnight at room temperature, the solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in H₂O and the aqueous layer was washed with diethyl ether (2 x 10 mL), acidified to pH 2 with 1 M aqueous KHSO₄ solution (≈ 20 mL) and extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated by three quarter. Dicyclohexylamine (1.26 mL, 6.312 mmol) was added and the resulting salt was filtered and dried under reduced pressure. The formed salt (1.732 g, 82%) was used without further purification.

The dicyclohexylammonium *N*-*tert*-butoxycarbonyl-L-homoserine (1.732 g, 4.320 mmol) salt was suspended in DMF under argon atmosphere. Ethyl bromide (0.677 mL, 9.078 mmol) was added at once and the heterogeneous mixture was stirred for 21h at room temperature. The mixture was poured into H₂O (40 mL) and the aqueous suspension was extracted with ethyl acetate (6 x 20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Purification of the crude pale yellow oil (5.496 g) over silica (100 g, ethyl acetate/cyclohexane 50/50) yielded to the desired product **35** as a pale yellow oil (0.662 g, 62%).

¹H NMR : (CD₃CN, 200 MHz, 298 K): δ= 5.71 (s broad, 1H, NH) , 4.12-4.28 (m, 3H, H₁, COOCH₂CH₃), 3.55-3.66 (m, 2H, H₃), 2.86 (s broad, 1H, CH₂OH), 1.67-1.86 (m, 2H, H₂), 1.40 (s, 9H, NHCOOC(CH₃)₃), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃)

Compound 36:

Adapted from the procedure described by M. McLaughlin et al⁸

To a solution of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-homoserine ethyl ester **35** (0.420 g, 1.70 mmol, 1.0 eq) in anhydrous dichloromethane (20 mL), freshly distilled triethylamine (0.36 mL, 2.55 mmol, 1.5 eq) was added at room temperature. The reaction mixture was cooled at 0°C and mesyl chloride (0.15 mL, 1.87 mmol, 1.1 eq) was added dropwise. After stirring for 30 minutes at 0°C, ethyl acetate (20 mL)

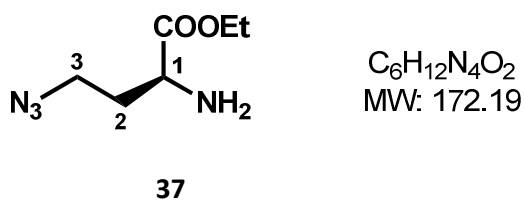
Experimental part

was added and the resulting solution was filtered through a pad of silica and evaporated to dryness. The resulting white solid (0.595 g) was used without further purification in the next step.

The above crude mesylate (0.595 g) was dissolved in anhydrous dimethylformamide (50 mL) and sodium azide (0.331 g, 5.1 mmol, 3 eq) was added. After stirring for 44 hours at room temperature, the solvent was removed under vacuum. The resulting product was dissolved in half-saturated aqueous NaCl solution (20 mL), extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The resulting oil (0.992 g) was purified by column chromatography on silica gel (60 g, cyclohexane/ethyl acetate: 90/10) to give the compound **36** as a clear oil (0.413 g, 89%).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 5.20 (s broad, 1H, NHCOOC(CH₃)₃), 4.40 (s broad, 1H, H₁), 4.22 (q, J=7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 3.41 (t, J=6.8 Hz, 2H, H₃), 1.85-2.17 (m, 2H, H₂), 1.45 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃)

Compound 37:

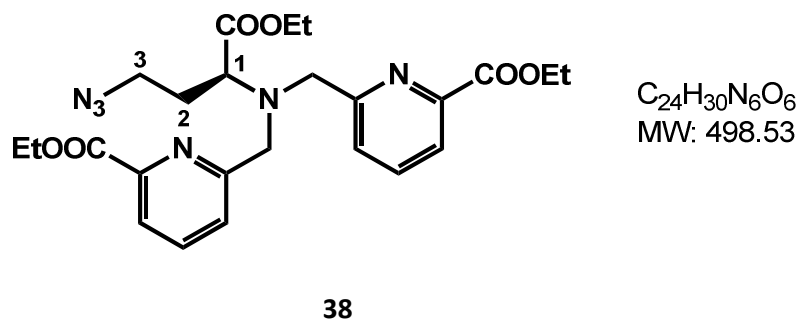


To a solution of ethyl 4-azido-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)butanoate **36** (0.410 g, 1.51 mmol, 1 eq) in dichloromethane (10 mL), trifluoroacetic acid (2.3 mL, 30.12 mmol, 20 eq) was added dropwise at 0°C. After stirring for 1 hour and a half, the reaction mixture is poured carefully on saturated aqueous NaHCO₃ solution (40 mL) and extracted with dichloromethane (6 x 50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporation to dryness give the desired compound **37** as a pale yellow oil (0.249 g, 96%).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz, 298 K): δ = 4.197 (q, J = 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 3.40-3.60 (m, 3H, H₁, H₃), 2.00-2.12 (m, 1H, H₂), 1.76-1.84 (m, 1H, H₂), 1.57 (s broad, 2H, CHNH₂), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃)

ES-MS (m/z): 173.1 [**37**+H]⁺

Compound 38:



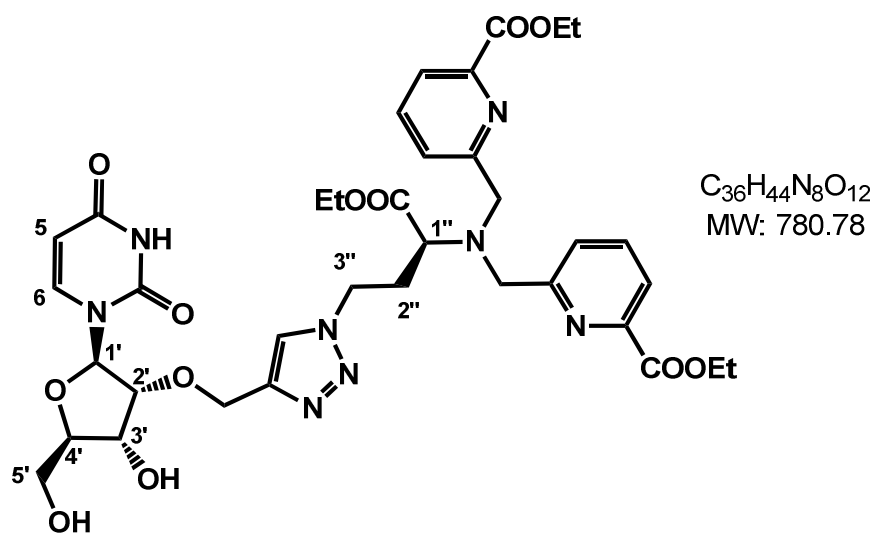
Ethyl 6-(chloromethyl)pyridine-2-carboxylate (0.612 g, 3.066 mmol, 2.2 eq), diisopropylethylamine (0.51 mL, 3.066 mmol, 2.2 eq) and KI (0.509 g, 3.066 mmol, 2.2 eq) were successively added to a solution of ethyl 2-amino-4-azidobutanoate **37** (0.240 g, 1.394 mmol, 1.0 eq) in anhydrous acetonitrile (20 mL) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at reflux for 23h. After filtration and evaporation of the reaction mixture, the resulting crude product (1.536 g) was purified by column chromatography on silica gel (90 g, cyclohexane/ethyl acetate: 55/45) to give the desired compound **38** as a pale yellow oil (0.595 g, 86%).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 400 MHz, 298 K): δ = 7.89 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H_{py}), 7.80 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 7.70 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H_{py}), 4.49 (q, J = 7.2 Hz, 4H, $\text{pyCOOCH}_2\text{CH}_3$), 4.19 and 4.21 (ABX₃, J_{AB} = 4.7 Hz, $J_{\text{AX}} = J_{\text{BX}} = 7.0$ Hz, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4.01 and 4.05 (AB, $J_{\text{AB}} = 19.2$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{py})_2$), 3.44-3.64 (m, 3H, H_3 , H_1), 1.96-2.08 (m, 2H, H_2), 1.37 (t, J = 7.2 Hz, 6H, $\text{pyCOOCH}_2\text{CH}_3$), 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)

ES-MS (m/z): 521.2 [**38**+Na]⁺

f) GddpaadU

Compound 39:



39

Adapted from the procedure described by J. Hovinen et al.⁹

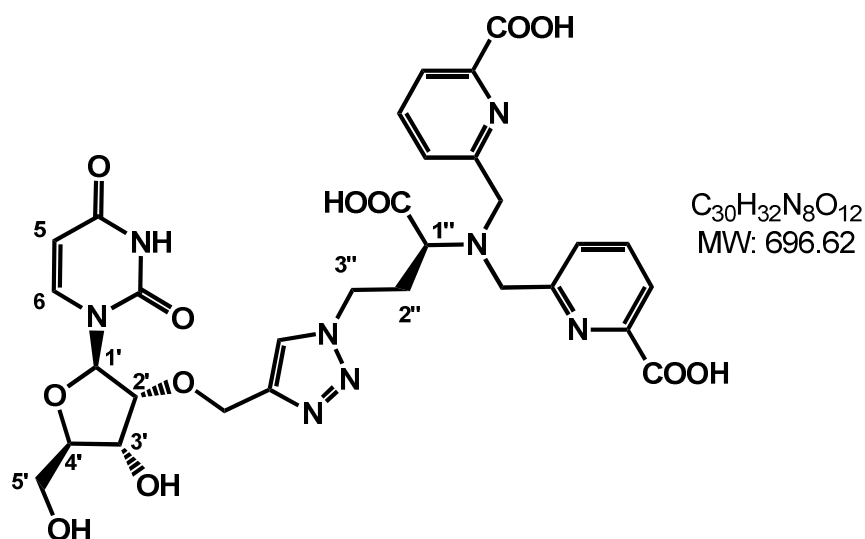
2'-propargyl-uridine (10 mg, 35.4 μmol , 1 eq) and ethyl 2,2'-[bis((6-(ethoxycarbonyl)pyridin-2-yl)methyl)amino]-4-azidobutanoate **38** (35 mg, 70.8 μmol , 2 eq) were dissolved in DMSO (2 mL). The mixture was flushed with argon and a catalytic amount of copper iodide was added. The reaction mixture was stirred overnight at 60°C in the dark. After concentration, the residue was dissolved in dichloromethane (4 mL), washed with a 0.1 M solution of Na_2EDTA (4x2 mL) and evaporated. The crude product (39.6 mg) was purified by semi-preparative TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$, 95/5) to give the desired compound **39** as orange oil (17.4 mg, 63%).

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 400 MHz, 298 K): δ = 8.96 (s broad, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, H_{Tz}), 7.85 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 7.74 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 7.71 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H_6), 5.82 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H_1), 5.55 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_5), 4.79-4.88 (m, 1H, $\text{H}_{3''}$), 4.74 and 4.68 (AB, $J_{\text{AB}} = 12.0$ Hz, 2H,

CH_2tz), 4.59-4.68 (m, 1H, $H_{3''}$), 4.32 (q, $J = 7.3$ Hz, 4H, $pyCOOCH_2CH_3$), 4.18 (qd, $J = 2.9$ Hz, 7.3 Hz, 2H, $COOCH_2CH_3$), 4.05-4.13 (m, 1H, $H_{3'}$ or $H_{4'}$), 3.98 and 4.07 (AB, $J_{AB} = 14.7$, 4H, CH_2py), 3.88-3.94 (m, 1H, $H_{3'}$ or $H_{4'}$), 3.65 and 3.75 (ABXY, $J_{AX} = J_{BX} = 2.9$ Hz, $J_{AY} = J_{BY} = 5.1$ Hz, $J_{AB} = 12.4$ Hz, 2H, $H_{5'}$), 3.54 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, $OH_{3'}$), 3.37 (dd, $J = 5.9, 9.5$ Hz, 1H, $OH_{5'}$), 3.30 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 2.28-2.46 (m, 2H, $H_{2'}$, $H_{2''}$), 2.08-2.16 (m, 1H, $H_{2'}$), 1.32 (t, $J = 7.3$, 6H, $pyCOOCH_2CH_3$), 1.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $COOCH_2CH_3$)

ES-MS (m/z): 781.4 [$39+H$] $^+$, 803.5 [$39+Na$] $^+$; 779.3 [$39-H$] $^-$, 815.1 [$39+Cl$] $^-$

Compound 40:



40

A 1M aqueous solution of potassium hydroxide (0.13 mL) was added to a solution of compound **39** (17 mg, 21.8 μ mol) in ethanol (1 mL). The reaction mixture was stirred at 60°C overnight. After cooling at room temperature, the potassium salt was precipitated by addition of ethanol, filtrated, washed with ethanol (3 x 2 mL) and ethyl ether (3x2 mL) and dried *in vacuo* to give the desired compound **40** (14.7 mg, 84%) as a white solid.

1H NMR (D_2O , 400 MHz): $\delta = 7.76$ (s, 1H, H_{Tz}), 7.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{py}), 7.67 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{py}), 7.50 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H_{py}), 7.47 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_6), 5.87 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, $H_{1'}$), 5.71 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_5), 4.61 and 4.72 (AB, $J = 12.8$ Hz, 2H, CH_2tz), 4.33-4.59 (m, 2H, $H_{3'}$, $H_{3''}$), 4.29-4.33 (m, 1H, $H_{3''}$), 4.20 (t, $J = 5.5$ Hz, $H_{2'}$), 4.09 (q broad, $J = 3.7$ Hz, 1H, $H_{4'}$), 3.89 and 4.03 (AB, $J_{AB} = 14.7$ Hz, 4H, CH_2py), 3.78 and 3.95 (ABX, $J_{AX} = 2.9$ Hz, $J_{BX} = 4.4$ Hz, $J_{AB} = 12.5$ Hz, 2H, $H_{5'}$), 3.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, $H_{1''}$), 2.26-2.42 (m, 2H, $H_{2'}$),

ES-MS (m/z): 695.2 [$40-H$] $^-$, 733.2 [$40-2H+K$] $^-$, 771.1 [$40-3H+2K$] $^-$, 347.1 [$40-2H$] $^{2-}$, 366.1 [$40-3H+K$] $^{2-}$.

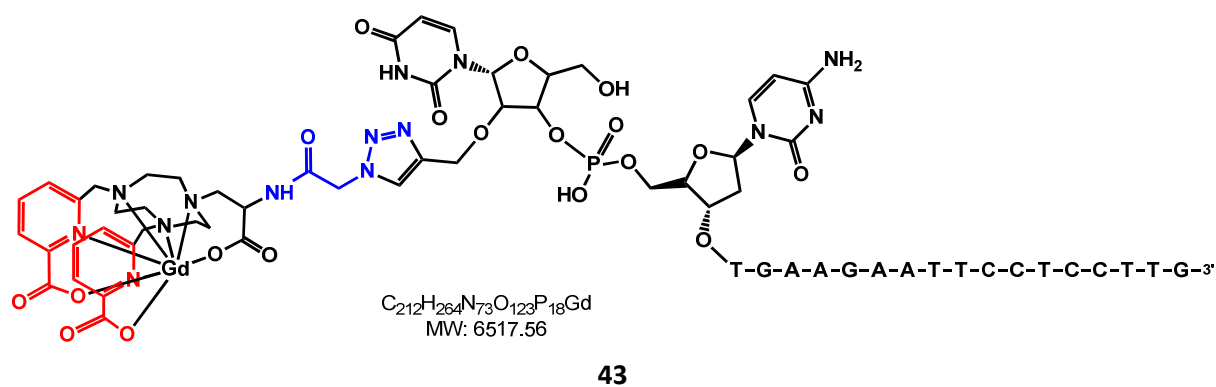
reaction mixture was then purified by semi-preparative HPLC to give the compound **42** with 18% yield.

MALDI-ToF (m/z): 2836.3 [**42**+H]⁺

Analytical HPLC: Rt = 22 min, purity = 95%

h) Gebpatcn18mer

Compound 43:



To a 1 mM solution of 18merECOR1 (200.0 μ L, 0.2 μ mol, 1 eq), copper iodide (19.0 μ L of a 52.5 mM solution in acetonitrile, 1.0 μ mol, 5 eq), N,N-diisopropylethylamine (17.3 μ L of 58 mM solution in water, 1.0 μ mol, 5 eq) and GdebpatcnN₃ **27** (174.0 μ L of 3.45mM solution in water, 0.6 μ mol, 3 eq) were added. The mixture was adjusted to 1 mL with mQ water and was stirred at 35°C overnight. The reaction mixture was then purified by semi-preparative HPLC to give the compound **43** with 48% yield.

MALDI-ToF (m/z): 3258.8 [**43**+2H]²⁺; 6516.5 [**43**+H]⁺

Analytical HPLC: Rt = 32 min, purity = 98%

Oligonucleotides (ODNs) and the 5' biotin labeled complementary sequences were hybridized via incubation at 90°C for 3 mins in a buffer of 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), containing 1 mM EDTA and 150 mM KCl. This incubation was followed by slow cooling, until room temperature was reached.

Samples were run on a 15% polyacrylamide gel under non-denaturing conditions and were electrophoresed in TBE buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM boric acid and 5 mM EDTA, pH 8) for 3h at 300 V. The gel was then immersed in a 1:10,000 dilution of SybrGold stain solution. Detection and imaging of ODN duplexes was performed on the Imager ChemiDoc XRS+ system (BioRad) using a UV transilluminator.

i) Synthesis of hydroxyquinoline complexes

Ln(III) stock solutions were prepared by dissolving the appropriate amounts of $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in water.

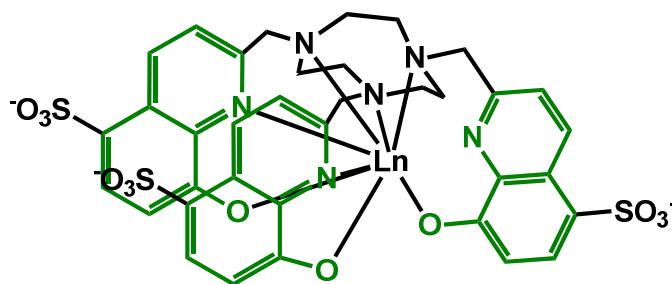
Ln(III) solutions titration : To a 10 mL solution of acetate buffer (0.1 M, pH=4.5), 100 μL of a Ln(III) solution in water and 4 or 5 drops of xylenol orange as colored indicator were added. The resulting solution is titrated with a 5 mM solution of EDTA. According to the following equation:



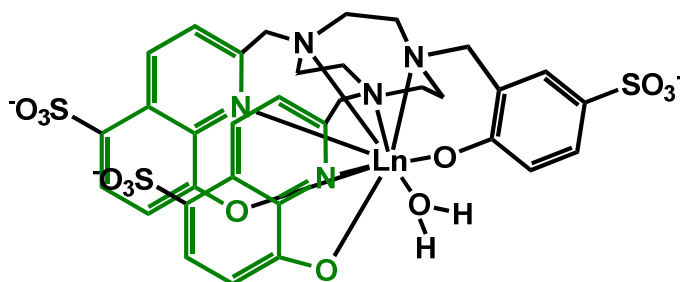
The Ln(III) concentration can be calculated as :

$$\text{Equation VI-2 : } C(\text{Ln(III)}) = \frac{C(\text{EDTA}) \times V(\text{EDTA})}{V(\text{Ln(III)})}$$

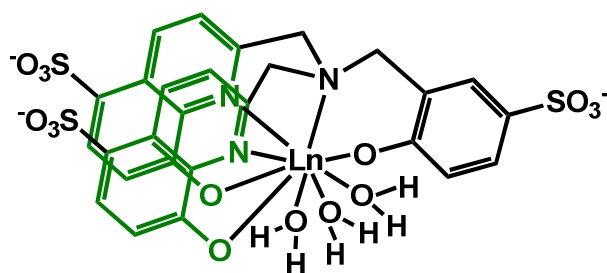
When the pH is between 3 and 5, the xylenol orange complexed with the lanthanide is violet and yellow otherwise.



Solutions of $[\text{Ln}(\text{thtqtcnSO}_3)]^{3-}$ (Ln=Y, Gd, Yb) were prepared *in situ* by mixing the appropriate amounts of thtqtcnSO₃ ligand (1 eq) and $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.9 eq) in mQ water followed by adjustment of the pH with KOH and HCl solutions in water (5 M, 0.5 M and 0.05 M).



Solutions of $[\text{Ln}(\text{dhqtcnSO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (Ln=Y, Gd, Yb) were prepared *in situ* by mixing the appropriate amounts of dhqtcnSO₃ ligand (1 eq) and $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.9 eq) in mQ water followed by adjustment of the pH with KOH and HCl solutions in water (5 M, 0.5 M and 0.05 M).



Solutions of $[\text{Ln}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ ($\text{Ln}=\text{Y}, \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Yb}$) or were prepared *in situ* by mixing the appropriate amounts of dhqNSO_3 ligand (1 eq) and $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.9 eq) in mQ water followed by adjustment of the pH with KOH and HCl solutions in water (5 M, 0.5 M and 0.05 M).

All solutions were checked with the xylenol orange test to verify the absence of free metal. 10mM solutions were used for silica nanoparticles synthesis described in part 5.

2. Characterization and measurements

a) Scanning electron microscopy (SEM)

The size and morphology of the silica nanoparticles were measured using scanning electron microscopy (SEM Zeiss Ultra plus 55). A mother suspension of prepared nanoparticles (see synthesis hereafter) was diluted in 10 mL of ethanol and a drop of the resulting solution was deposited on an Ultra-thin carbon film supported by a lacey carbon film on a 400 mesh copper grid from Eloise. After evaporation of the solvent, the particles were observed at an operating voltage of 15 kV with Inlens and STEM detectors.

b) Dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic diameter of nanoparticles dispersed in water was measured by dynamic light scattering (DLS), using a Malvern Zeta Sizer (NanoZS). The samples have been thoroughly filtrated with centrifugal filters from VWR (MWCO 30k) and dispersed in MilliQ water (18 m Ω) prior to the measurements. Given the sensitivity of the instrument, multiple runs (> 3) were performed to avoid erroneous results. The spectra have been corrected for viscosity (0.882 mPa.s at 298 K), absorption (at 532 nm), solvent (water), refractive index (1.33) and material (InP or silica) refractive index (3.1). The data were collected in automatic mode and are expressed in number-percent. The average diameter \bar{d} is calculated using the equation VI-3.

$$\text{Equation VI-3 : } \bar{d} = \frac{\sum d_i N_i}{\sum N_i}$$

c) UV-visible absorption spectroscopy

UV-Vis absorption spectroscopy was performed on a HP 8452A spectrophotometer. It is a single beam spectrophotometer operating in the wavelength range 190-820 nm using a diode array for detection. The background run and the sample acquisition were performed in series on the same cuvette holder. In the absorption spectra, absorbance is plotted against wavelength (nm). UV-visible ChemStation has been used as operating software. For all the measurements, a quartz cuvette of 1 cm width has been used.

d) Luminescence measurement

- *Emission spectra*

Fluorescence spectra of the quantum dots were measured on a F-4500 spectrofluorometer (Hitachi) with a quartz cell of 1 cm by dispersing quantum dots in suitable solution. Except otherwise noted, all the measurements were performed with the following Instrument Parameters:

Scan mode: Emission

Data mode: Fluorescence

Scan speed: 1200 nm/min

Delay: 0 s

Excitation Slit: 5.0 nm

Emission Slit: 5.0 nm

Voltage: 700 V

Response: 2.0 s

Luminescence data of the lanthanide complexes were recorded using a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrometer (using FLWINLAB for Windows v2.2) and a modular Fluorolog FL3-22 spectrometer from Horiba-Jobin Yvon-Spex. Samples were held in a 4 mm quartz capillary tube and a cutoff filter (450 nm) was used to avoid second-order diffraction effects.

For the measurements in the NIR spectral range, the spectrometer was fitted with a second measuring channel equipped with a FL-1004 single grating monochromator. The light intensity was measured by two Jobin-Yvon solid state InGaAs detectors (i) DSS-IGA020L, cooled to 77 K (range 800-1600 nm) and (ii) DSS-IGA020A (range 800-1700 nm) working at room temperature and inserted into a LN₂ housing including an elliptical mirror (90° beam path). The detector was coupled to a Jobin Yvon SpectrAcq2 data acquisition system.

- *Quantum yield*

The fluorescence quantum yield (QY) is the ratio of the number of photons emitted to the number of photons absorbed.

$$\text{Equation VI-4: } \Phi = \frac{h\nu_{em}}{h\nu_{abs}}$$

One way to determine the relative quantum yield of the quantum dots is by comparing the integrated photoluminescence of the sample with that of a standard dye of known quantum yield according to the following equation:

$$\text{Equation VI-5 : } \Phi_x = \Phi_{ref} \frac{I_x A_{ref} n_x^2}{I_{ref} A_x n_{ref}^2}$$

With :

- Φ_{ref} the quantum yield of the standard dye
- I_x and I_{ref} the integral of the fluorescence spectrum of the sample and the standard
- A_x and A_{ref} the absorption at the excitation wavelength for the emission spectra (must be below 0.1)
- n_x and n_{ref} the optical indices corresponding to the solvents used for the measurement

The QY of the quantum dots were determined by comparing with Fluorescein in NaOH (0.1 M) (QY = 92%). Both the sample and the reference were excited at the same wavelength and the room temperature solvent refractive index of water (1.33 at 20°C)¹⁰ was taken into consideration. The integrated fluorescence intensity vs. optical density was plotted then the slopes of the linear fit for the sample and the standard were compared.

Another way to calculate the quantum yield is by an absolute method.¹¹ The absolute quantum yield of lanthanide complexes was calculated using the following expression:

$$\text{Equation IV-6 : } \Phi = \frac{Ec}{La-Lc} = \frac{Ec}{\alpha La} \text{ with } \alpha = \frac{La-Lc}{La}$$

where Ec is the emission spectra in the emission range of the sample (ex: if the emission maximum is 620 nm, the range of this spectrum will be from 450 to 750 nm), Lc is the emission spectra of the excitation wavelength of the sample, and La is the emission spectra of the excitation wavelength of the reference (quartz capillary tube 4 mm in diameter filled with the solvent used). The values reported are the average of three independent determinations for each sample.

The quantum yield of the lanthanide complexes were determined using an excitation source was a 450 W Xe arc lamp. All spectra were corrected for detection and optical spectral response (instrumental functions) of the FL3-22 spectrofluorimeter. It is equipped with a double grating excitation monochromator and a iHR320 imaging spectrometer coupled to a R928P Hamamatsu photomultiplier for visible measurement.

- *Lifetime measurements*

Excitation of the quantum dots was accomplished by a SpectraLED source S-390 (FWHM 15 nm) from Horiba Scientific and coupled to a Jobin Yvon NL-C2 Pulse Diode controller and a DH-HT TCSPC controller including a SpectraLED output. The output signal of the photomultiplier was fed to a PC and controlled and analyzed with the Data Station (v2.7) and Decay Analysis (v6.8) software from Horiba Scientific. Lifetimes are averages of 3 independent determinations with a calculated Chi-square < 2.

Excited-state lifetime measurements of lanthanide complexes were made on a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrometer (using FLWINLAB for Windows). Lifetimes were measured by direct excitation (273 nm) of the sample with a short 40 ms pulse of light (500 pulses per point) followed by monitoring the integrated intensity of light (617 nm for Eu and 546 nm for Tb) emitted during a fixed gate time of 0.1 ms, at a delay time later. Delay times were set at 0.1 ms intervals, covering four or more lifetimes. Excitation and emission slits were set to 5:5 nm bandpass, respectively.

Hydration number

The obtained decay curves were fitted to a single monoexponential first-order decay curve using Origin Lab to determine the lifetimes (τ). Hydration number (q) was calculated using the following equations:¹²

$$\text{Equation VI-7-a : } q = 1.2(kH_2O - kD_2O - 0.25) \text{ for Eu ; with } k = \frac{1}{\tau}$$

$$\text{VI-7-b : } q = 5(kH_2O - kD_2O) \text{ for Tb}$$

e) Relaxometric measurements

- *Concentration of Complex in Solution*

The concentration of Gd(III) complexes were determined from bulk magnetic susceptibility (BMS) shift. The paramagnetic Ln(III) ions induce a susceptibility shift of the H₂O proton resonance frequency which is proportional to the concentration of the ions. This BMS shift was readily obtained as the difference of the measured frequencies in capillaries (1.7 mm OD, 1.3 mm ID, 110 mm in length) containing Gd content and a diamagnetic reference.

To a good approximation, the BMS shift Δ may be expressed by the equation:¹³

$$\text{Equation VI-8 : } \Delta = \frac{4\pi cs}{T} \left(\frac{\mu_{eff}}{2.84} \right)^2 \times 10^3$$

where the concentration of paramagnetic solute is given by c in mol/L, s is dependent on the shape of the sample and its position in the magnetic field ($s = 1/3, 1/6$ and 0 for a cylinder parallel to the main field, a cylinder perpendicular to the main field and a sphere, respectively), T is the absolute temperature and μ_{eff} is the effective magnetic moment for a particular lanthanide ion. For superconducting magnets, $s = 1/3$. The theoretical effective magnetic moment of the gadolinium is 7.94.¹⁴

The diamagnetic references are water for diluted solutions of Gd complexes, non-grafted oligonucleotides or quantum dots for the corresponding grafted object with Gd complexes and silica nanoparticles doped with yttrium complexes for the same nanoparticles doped with Gd complexes.

To lock the external magnetic field, a capillary filled with a 3mM solution of the [Tb(ttha)]³⁻ complex (ttha = triethylene tetraamine hexaacetate) in D₂O was juxtaposed in the 5mm NMR holder tube, parallel to the first capillary containing the investigated solution (the reference or the Gd sample). The [Tb(ttha)]³⁻ complex was used to induce a significant paramagnetic susceptibility shift of the

resonance frequencies of the deuterium nuclei and residual HOD protons.¹⁵ Then, the spectrometer field could be locked to the deuterium frequency of the auxiliary solution, the residual HOD protons giving a signal well separated from that of the H₂O protons in the sample.

The concentration of the samples might be at least 0.5 mM to have an accurate measurement by BMS shift. The error on the measurement is ± 0.1 mM.

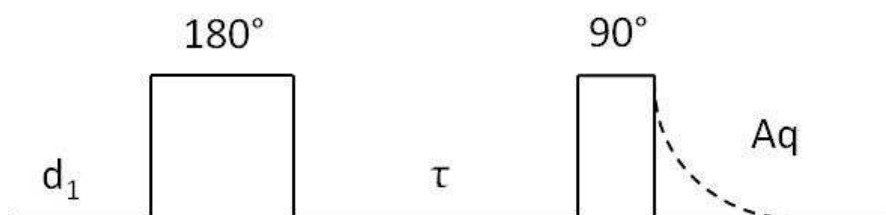
- *Relaxivity measurements*

The low frequency T_1 measurements between 5 kHz and 35 MHz were performed on a Stelar Spinmaster FFC-2000 NMR relaxometer (Stelar s.r.l., Mede PV, Italy) in a 5mm diameter NMR tube. The T_1 values at higher frequencies were measured on spectrometers at 20 (Bruker minispec), 50 (Bruker Minispec “mqvar” ND2318), 200 (Bruker A200) and 400 MHz (Bruker A400) in capillaries (1.7 mm OD, 1.3 mm ID, 110 mm in length). The measurements at 100 MHz (Bruker Avance) have been realized with the Pr. Lothar Helm (EPFL).

On the conventional spectrometers, the relaxation time T_1 of the H₂O protons in the capillaries, corresponding to the relaxation time along the axis of magnetization, was determined with the sequences of inversion recovery. The relaxation time T_2 of the protons in the capillaries, corresponding to the relaxation time in the transverse plane of magnetization were determined with the sequences of Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).¹⁶ Before each measurement on conventional spectrometers, the 90° pulse was calibrated and the delay d_1 (relaxation delay) was fixed at 5 times T_1 . For each experiment, the data treatment was realized in intensities and integrals to check that the results were the same. The error on the measurements is about 5%.

T_1 measurement :

The basic part of an inversion recovery sequence is a 180 degree radiofrequency (RF) pulse that inverts the magnetization followed by a variable delay τ and a 90 degree RF pulse that brings the residual longitudinal magnetization into the x-y or transverse plane. Aq corresponds to the acquisition time and d_1 is the delay of the relaxation of the magnetization.



Scheme VI-1 : Inversion recovery sequence for measuring T_1

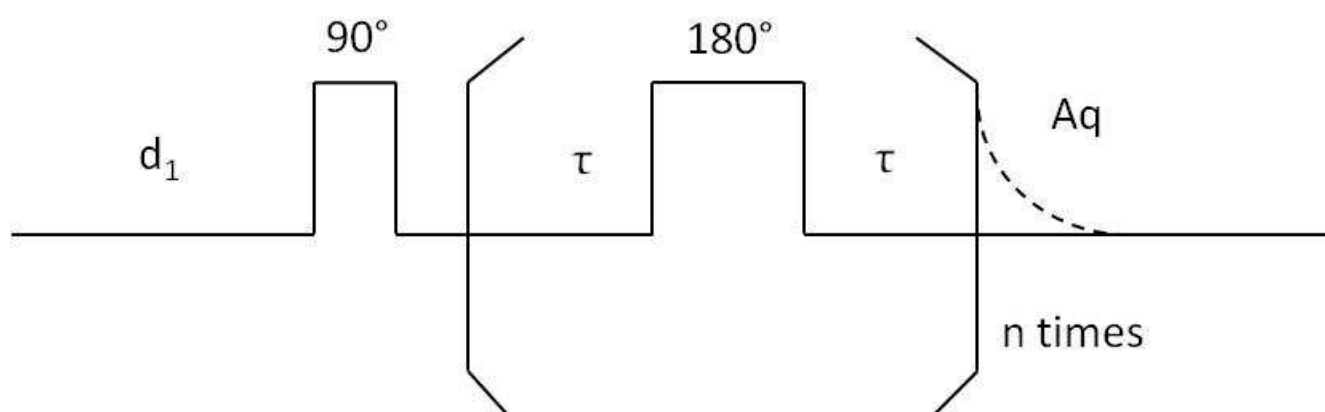
According to Bloch equations, the relaxation of magnetization is given by the following equation:

$$\text{Equation VI-9 : } M_z(\tau) = M_0 \left[1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right]$$

For each sample, the T_1 values are obtained by adjusting of a three parameters exponential, considering the imperfect inversion of magnetization after the 180 pulse, for delay τ varying from few milliseconds to d_1 .

T_2 measurement :

This type of spin echo pulse sequence consists in a 90° radio frequency pulse followed by an echo train induced by successive 180° pulses. It allows defocusing and refocusing the spins and suppressing the effect of chemical shift to let only the transversal magnetization.



Scheme VI-2 : CPMG sequence for measuring T_2

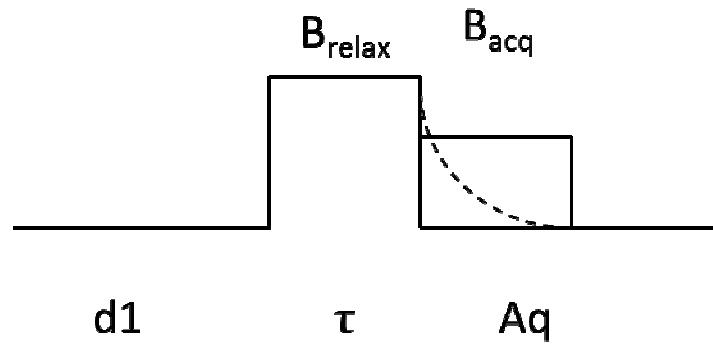
The relaxation of magnetization is given by the following equation:

$$\text{Equation VI-10 : } M_z(\tau) = M_0 \left[\exp\left(-\frac{2n\tau}{T_1}\right) \right]$$

The time τ was fixed at 1 ms and the number of times n the sequence was repeated, was varied. This one has to be even to decrease the effects of translational diffusion. The treatment is similar to the one of T_1 measurements by adjusting three parameters of the exponential.

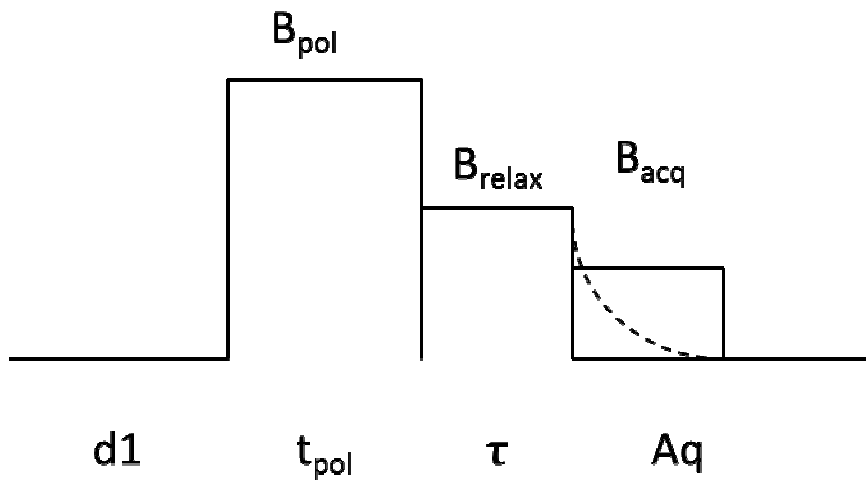
Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion (NMRD) profiles

The low frequency T_1 measurements between 5 kHz and 35 MHz were performed on a Stelar Spinmaster FFC-2000 NMR relaxometer covering magnetic fields from 2.5×10^{-4} T to 0.9 T. A non-polarized sequence was used for the frequencies between 35 and 12 MHz. For lower frequencies, a prepolarized sequence was used.



Scheme VI-3 : non polarized sequence (between 12 and 35 MHz)

The frequency of the acquisition field (B_{acq}) is 20.8MHz, the one of the relaxation field (B_{relax}) is variable and the one of the polarization field (B_{pol}) is 28 or 35 MHz. The depolarization time (t_{pol}) is fixed at 4 times the T_1 of the polarization field. The delay τ is between 0 and 4 times the T_1 max.



Scheme VI-4 : Prepolarized sequence (between 0.01 and 12 MHz)

3. Grafting of lanthanide complexes on quantum dots

a) Quantum dots synthesis

The synthesis of the InPZnS/ZnSe/ZnS alloy core gradient shell NCs was based on the following procedures.^{17, 18} This procedure consist in three distinctive steps: (1) Precursor preparation (2) QD core synthesis (3) Shell Growth (Steps 2 and 3 are performed in a one pot reaction).

- *Preparation of precursor solutions*

-Preparation of indium myristate (In(MA)₃)(0.1 M):

Indium acetate (2 mmol, 1 eq) was mixed under inert atmosphere with myristic acid (MA) (6 mmol, 3 eq) and 1-octadecene (ODE) (20 mL) in a 100 mL three-neck flask. The mixture was heated to 100-120°C for 1 h under vacuum until a clear solution was obtained. After backfilling the flask with Ar and cooling to room temperature, the indium myristate solution was stored in the glovebox.

-Preparation of zinc stearate (Zn(St)₂) stock solution (0.1 M; for core synthesis and 0.5 M for shell growth):

The required amount of Zn(St)₂ (2-10 mmol) was mixed with ODE (20 mL) in a 100 mL flask the resulting suspension was degassed under vacuum at room temperature for 30 min and at 80°C for 30-60 min. Ar was flushed into the flask and the mixture was heated up to 130°C until the totality of the Zn(St)₂ powder was fully dissolved. The resulting solution was also stocked in the glovebox and used as a suspension.

-Preparation of the TOP-Se stock solution (1 M; for shell growth):

The TOP-Se precursor was prepared in the glovebox dissolving Se powder (20 mmol) in 20 mL of trioctylphosphine (TOP) (20 mL). The suspension was agitated until the totality of the Se powder was dissolved. The resulting solution was stocked as such without further precipitation in the glovebox.

-Preparation of the TOP-S stock solution (1 M; for shell growth):

The TOP-S stock solution was prepared with the same procedure to that of TOP-Se using S powder (20 mmol) and TOP (20 mL).

- *Synthesis of InPZnS alloy nanocrystals*

In the glovebox, In(MA)₃ (0.1 mmol, 1 mL of 0.1 M solution, 1 eq), Zn(St)₂ (0.1 mmol, 1 mL of 0.1 M solution, 1 eq), 1-dodecanethiol (DDT) (0.1 mmol, 1 eq) and ODE (7-8 mL) were mixed into a 50 mL three-neck

flask. Meanwhile, P(TMS)₃ (0.1 mmol, 1 eq) was diluted in ODE (1 mL) in a sample tube under inert atmosphere. The three neck flask was connected to a Schlenk line and the suspension was degassed at room temperature for 15 minutes. Ar was flushed into the flask and a fast Ar flow was set up. The resulting reactive mixture was heated up to 300°C in less than 2 minutes (Molten salt bath at 320°C). When the temperature in the flask reached 100°C (After 15 to 30 seconds of reaction), the solution of PTMS was injected stiffly into the flask. A yellow coloration significant of the NC formation was instantly observed. The resulting mixture was stirred firmly 30 min at 300 °C to allow the growth of

the QD. When the desired colour was obtained, the reaction mixture was cooled down below 220°C in order to stop the reaction and continue with the shell growth.

- *Growth of ZnSe/ZnS gradient shell*

For the ZnSe/ZnS gradient shell growth, a high molar amount of precursors was used compared to the core synthesis, with a precursor ration of In:P:Zn:(Se + S) = 0.1:0.1:1:1. The composition of the gradient shell was controlled by the ratio $r = \text{Se}:\text{S}+\text{Se}$. In this project $r = 0.1$.

In a typical synthesis, Zn(St)₂ (1 mmol, 2 mL of the 0.5 M stock solution, 1 eq), was added dropwise to the reactive mixture while the temperature was below 220°C. This was followed by the successive injection of TOP-Se (0.1 mmol, 0.1 mL of the 0.1 M solution, 0.1 eq) and TOP-S (0.9 mmol, 0.9 mL of the 0.1 M solution, 0.9 eq). The resulting mixture was slowly heated up back to 300°C (within 10 minutes). The shell growth was then allowed at 300°C for 20 more minutes (leading to a total time of reaction of approximately 30 minutes), after which the reactive mixture was allowed to cool down slowly to room temperature. During both the core and the shell growth, the formation of the nanocrystals was followed using photoluminescence emission.

Once the mixture cooled down, the purification of the QD was performed via cycles of precipitation. Firstly, the mixture was suspended in 10 mL of a 1:1 (v/v) mixture of chloroform/methanol and 100 mL of acetone was added. Then the resulting suspension was centrifuged (8000 rpm for 5 minutes) and the obtained solid collected. This operation was repeated until a nice orange powder was obtained (usually 3 cycles).

b) Synthesis of penicillamine–capped QDs (QD-pen)

Thorough purification of the initial QDs assuring the removal of excess hydrophobic ligands is crucial for the successful phase transfer. The procedure is based on the following procedure.¹⁹ 5 mL of the QDs in organic solvent were mixed with anhydrous ethanol (1:3) and centrifuged at 10 000 rpm (rotations per minute) for 6 minutes. The clear solution of supernatant was discarded and the precipitate was re-dispersed in 15 mL of a 1:3 chloroform:ethanol mixture and centrifuged again. The precipitate was dispersed in a minimum amount of chloroform. The concentration was estimated from the first excitonic peak in the UV-Vis spectrum. A 0.2 M solution of penicillamine in degassed MilliQ water (1mL) with pH adjusted at 9 with 0.5 M TMAH, was mixed with a ~5 μM dispersion of the QDs in chloroform (1.5 mL). The resulting biphasic mixture was stirred vigorously at 1400 rpm for 2 hrs to afford a fine aqueous suspension of QD-pen which was separated from the organic layer (yield: 60%).

c) Synthesis of Ln complexes grafted-QD

Solutions of lanthanide complexes (0.25 mL, 2.1 mM, 200 eq) and TCEP (0.046 mL, 0.5 M, 9000 eq) in degassed water were added to the suspension of QD-pen (0.5 mL, 5.2 μM, 1 eq) in degassed water, and the pH of the resulting suspension was adjusted to 9 with 0.5M TMAH solution. The mixture was shaken at 800 rpm overnight at 20°C. The resulting fine suspension was purified by size exclusion chromatography with a NAPTM-25 columns (SephadexTM G-25 DNA Grade from GE Healthcare) eluted with mQ water for Gd complexes grafted and with PBS buffer for Eu and Tb complexes.

The quantum dots grafted Ln complexes were characterized by DLS measurement, UV-visible spectroscopy and luminescence.

The volume of the obtained solution was reduced to 100 μL for relaxivity measurements in capillaries. The presence of salts promotes the precipitation of the QD during the reduction of the volume. That is why the QD grafted Gd complexes are dispersed in mQ water. Then the solution is diluted three times to measure the low fields' relaxation time in 5 mm NMR tube.

The number of Gd complexes per QD was determined for independent syntheses by combined magnetic susceptibility measurements and UV-visible spectroscopy.

4. Silica nanoparticles

a) General information

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Acros, Fluka and used without further purification. Tetraethoxysilane (TEOS, 99.999 %), TritonTM X-100, Hexanol (> 99 %), IgepalTM CO-520, Cyclohexane (> 99.5 %), Ammonium Hydroxide (28 - 30 %), and albumin bovine serum were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. D₂O (99.9 % atom D) was obtained from Eurisotop. 2-[methoxy(polyethyleneoxy)21-24propyl]trimethoxysilane was purchased from Gelest. Fetal bovine serum was purchased from BioWhittaker. All water solutions were prepared from ultrapure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore MilliQ reverse-osmosis cartridge system (resistivity 18 M Ωcm).

b) Nanoparticle synthesis

- *Ternary system*

A ternary microemulsion procedure was used, adapted from a previously reported method.²⁰ 1.3 mL of Igepal CO-520 was stirred with 10 mL of cyclohexane during 10 min to produce a homogeneous system. Then, 480 μL of a doping aqueous solution (different ratio between water and 10 mM aqueous solution of lanthanide complexes) were added, followed by 100 μL of NH₄OH (28 - 30 % by weight). The resulting mixture was stirred for 30 min and finally 100 μL of TEOS were added. The reactive medium was left at room temperature for 24 h under gentle magnetic stirring. The resulting microemulsion was disrupted by adding 30 mL of acetone and the formed silica nanoparticles were washed three times with ethanol, and three times with water. After the addition of acetone and each washing, the suspension of nanoparticles was centrifuged at 10,000 rpm during 15 min and the supernatant was carefully removed. Finally, the wet residue of NPs (about 150 mg) was dispersed in 200 μL of H₂O containing 0.1% of xanthan gum to yield about 320 μL of a metastable mother suspension of nanoparticles suitable for high resolution liquid NMR spectroscopy. The pH of the suspension was adjusted to 7.4-7.6 with a solution of HCl 1M.

- *Quaternary system*

A quaternary microemulsion procedure was used, adapted from a previously reported method.²⁰ 1.6 mL of Triton X-100 and 1.65 mL of hexanol were stirred with 7.5 mL of cyclohexane during 10 min to produce a homogeneous system. Then, 480 µL of a doping aqueous solution (different ratio between water and 10 mM aqueous solution of lanthanide complexes) were added, followed by 100 µL of NH₄OH (28 - 30 % by weight). The resulting mixture was stirred for 30 min and finally 100 µL of TEOS were added. The reactive medium was left at room temperature for 24 h under gentle magnetic stirring. The resulting microemulsion was disrupted by adding 30 mL of acetone and the formed silica nanoparticles were washed three times with ethanol, and three times with water. After the addition of acetone and each washing, the suspension of nanoparticles was centrifuged at 10,000 rpm during 15 min and the supernatant was carefully removed. Finally, the wet residue of nanoparticles (about 150 mg) was dispersed in 200 µL of H₂O containing 0.1% of xanthan gum to yield about 320 µL of a metastable mother suspension of NPs suitable for high resolution liquid NMR spectroscopy. The pH of the suspension was adjusted to 7.4-7.6 with HCl 1M.

- *Variation of Gd amount in silica nanoparticles*

The following table presents the size of the nanoparticle in function of the amount of Gd complexes added during the synthesis. The given volume is the volume of 10 mM solution of Gd complexes in water.

Name	Loading	Volume	Name	Loading	Volume
25T	1,6 µmol	160 µL	55Q	1,6 µmol	160 µL
40T	2,4 µmol	240 µL	60Q	2,4 µmol	240 µL
50T	3,2 µmol	320 µL	65Q	3,2 µmol	320 µL
55T	4,8 µmol	480 µL	80Q	4,8 µmol	480 µL

Table VI-1 : Different nanoparticles obtained in function of Gd complexes amount

- *Bimodal nanoparticles*

Bimodal nanoparticles were synthesized with the quaternary system using different ratios of 10 mM solutions of Ln complexes. Two types of nanoparticles have been synthesized: [Gd(dhqNSO₃)(H₂O)₃]³⁻ / [Gd(thqtcnSO₃)]³⁻ and [Gd(dhqtcnSO₃)(H₂O)]³⁻ / [Gd(dhqtcnSO₃)(H₂O)]³⁻. Different ratios of the 10 mM Ln(III) complexes solutions have been used to obtain silica nanoparticles doped with 5 or 10 % of Yb complexes.

	[Gd(dhqtcnSO ₃)(H ₂ O)] ³⁻	[Yb(dhqtcnSO ₃)(H ₂ O)] ³⁻	[Gd(dhqNSO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻	[Yb(thqtcnSO ₃)] ³⁻
5%	1,52 µmol	0,08 µmol	1,52 µmol	0,08 µmol
10 %	1,48 µmol	0,16 µmol	1,48 µmol	0,16 µmol

Table VI-2 : Ratios used for bimodal nanoparticles synthesis

The concentration of lanthanide complexes incorporated in silica nanoparticles was calculated by BMS shift. The theoretical magnetic moment of ytterbium is 4.5.¹³ To calculate the concentration we consider that the gadolinium and ytterbium complexes were incorporated at the same percentage as they were added in the synthesis. So the effective magnetic moment of the system was:

$$\mu_{eff} = 0.95\mu_{Gd} + 0.05\mu_{Yb} \text{ for the 5\% Yb doped nanoparticles}$$

$$\mu_{eff} = 0.90\mu_{Gd} + 0.1\mu_{Yb} \text{ for the 10\% Yb doped nanoparticles}$$

The concentration can be calculated at different temperature using the BMS shift equation (4) described earlier.

- *PEG chains grafting*

1 mL of the metastable suspension of silica nanoparticles containing $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ complexes was diluted in 4 mL of water and 5 mL of ethanol. 2-[methoxy(polyethyleneoxy)21-24propyl]trimethoxysilane (0.1 g, 80 μmol) was added to the solution. The reactive medium was left at room temperature for 24 h under gentle magnetic stirring. Then the nanoparticles grafted were washed three times with ethanol, and three times with water. After each washing the suspension of nanoparticles was centrifuged at 10,000 rpm during 15 min and the supernatant was carefully removed. Finally, the wet residue of grafted nanoparticles (about 150 mg) was dispersed in 200 μL of H_2O to yield about 320 μL of a metastable mother suspension of nanoparticles suitable for high resolution liquid NMR spectroscopy.

- c) Nanoparticles characterization

The silica nanoparticles were characterized by SEM and DLS (see the description of the techniques above).

- *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

The size and morphology of the doped silica nanoparticles were measured by scanning electron microscopy (SEM Zeiss Ultra plus 55). A mother suspension of prepared nanoparticles was diluted in 10 mL of ethanol and a drop of the resulting solution was deposited on an Ultra-thin carbon film supported by a lacey carbon film on a 400 mesh copper grid from Eloise. After evaporation of the solvent, the particles were observed at an operating voltage of 15 kV with Inlens and STEM detectors.

- *Number of complexes per particle*

The mean number of complexes per particle n in a suspension was derived from the volume of the nanoparticle V , the mass m of silica of the suspended NPs, and the Gd(III) concentration C in a precise volume V_c of the suspension of doped nanoparticle. The mass of silica was obtained by lyophilizing the suspension for 24 h to afford dry silica of density $\rho = 1.95 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$.²¹

$$\text{Equation VI-11 : } N = \frac{1}{V}$$

The number of nanoparticles N_{NP} can be calculated knowing N , which is the number of nanoparticles in 1m^3 .

$$\text{Equation V-12: } N_{NP} = \frac{m \times N}{\rho}$$

The number of complexes N_{NC} can be calculated using the Avogadro constant.

$$\text{Equation VI-13: } N_{NC} = C \times V_c \times Na$$

The number of complexes per particle is obtained by doing the relation between the number of complexes and the number of particle.

$$\text{Equation VI-14: } n = \frac{N_{NC}}{N_{NP}}$$

For example, 15 mg of dry 25 nm nanoparticles were obtained by lyophilizing 0.5 mL of a NP solution with Gd(III) concentration of 0.18 mM, leading to $n \approx 60$.

- *Number of coordinated water molecules*

Phosphorescence lifetimes were measured in time-resolved mode on a Fluorolog FL 3-2iHr spectrometer from Horiba-Jobin Yvon-Spex equipped with a double grating excitation monochromator, a iHR320 imaging spectrometer and a Hamamatsu R928P photomultiplier. Quartz cells with an optical path of 1 cm were used in a FL-1057 housing including an elliptical mirror and a focusing lens.

Selective excitation of $\text{Eu}(^5\text{D}_0)$ level was accomplished by a SpectraLED source S-390 (FWHM 15 nm) from Horiba Scientific and coupled to a Jobin Yvon NL-C2 Pulse Diode controller and a DH-HT TCSPC controller including a SpectraLED output. The output signal of the photomultiplier was fed to a PC and controlled and analyzed with the Data Station (v2.7) and Decay Analysis (v6.8) software from Horiba Scientific. Lifetimes are averages of 3 independent determinations with a calculated Chi-square < 2 . The emission lifetimes of the $\text{Eu}(^5\text{D}_0)$ excited level have been measured in D_2O and H_2O and were used to calculate the number of co-ordinated water molecules q by using the equation established²² using crystalline complexes:

$$\text{Equation VI-15 -a: } q = 1.05 \times \Delta k_{obs}$$

$$\text{VI-15-b: } \Delta k_{obs} = k_{obs}(\text{H}_2\text{O}) - k_{obs}(\text{D}_2\text{O})$$

$$\text{VI-15-c: } k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}}$$

d) NMR measurement

- *BMS shift measurement*

The concentration of Gd complexes on silica nanoparticles was determined by BMS shift (see the description above). Considering the viscosity of the suspension, silica nanoparticles doped with Yttrium complexes were synthesized for each sample to have a suitable diamagnetic reference to measure the BMS shift.

Capillary NMR tubes: 55 μL of a suspension of nanoparticles in H_2O were put in a sealed Wilmad capillary tube (1.7 mm OD, 1.5 mm ID, 110 mm in length). Then, the capillary was placed in a 5 mm NMR tube as holder with the auxiliary capillary containing $[\text{Tb}(\text{ttha})]^{3-}$ complex in D_2O to lock the external magnetic field.

5 mm NMR tube. A volume of 100 μL of the mother suspension of freshly prepared nanoparticles in H_2O was diluted with an equal volume of H_2O (100 μL) in order to get a large proton NMR signal at the resonance frequencies and then transferred into a 5 mm NMR tube.

- *Reproducibility*

Concentration: As said earlier, the gadolinium complexes concentration was calculated by BMS shift. To have a precise measurement, the shift was measured at least two times for each sample: at 200 and 400 MHz; 298 and 310 K. The error on the measurement is ± 0.1 mM that is why a minimal concentration of 0.5 mM is necessary to have an accurate measure of the concentration.

Relaxation times: When it was measured for the first time, the relaxation time was measured at least two times on the same batch. For each experiment the data treatment was realized in intensities and integrals to check that the values were the same. The error on the experiment is about 5%.

Relaxivity values: The concentration and the relaxation times were measured at least two or three times on different batches for each relaxivity value. The error on the relaxivity values for the 25 nm particles is bigger than for the 55 nm ones because the gadolinium concentration is lower. The following table shows an example of three relaxivity values obtained on three different batches for the two sizes of particles in water containing $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ at 298 K:

	50 MHz	200 MHz	400 MHz
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @25T (1)	77.5	18.3	8.6
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @25T (2)	79.3	19.8	9.2
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @25T (3)	72.6	16.5	7.8
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @55Q (1)	19.8	13.2	6.0
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @55Q (2)	20.5	14.0	6.4
$[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @55Q (3)	18.7	12.8	5.7

Table VI-3 : Different relaxivity values obtained for $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @25T and $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @55Q in water at 298 K

The same measurements were done for nanoparticles suspended in serum, BSA and anions. The series of measurements allowed concluding that the error on the relaxivity values is 8% for the 25 nm particles and 5% for the 55 nm ones.

- *Relaxation time of deuterium*

To measure the relaxation time of deuterium, the wet residue obtained at the end of the nanoparticles synthesis was suspended in 200 μL of a mixture of 50% H_2O and 50% D_2O . The suspension was placed in a capillary tube to do the NMR measurement.

The relaxation time of deuterium was measured at 9.4 T using conventional spectrometer

To measure the relaxivity in BSA, the wet residue obtained at the end of the nanoparticles synthesis was suspended in a certain volume of a 1.4 mM of a solution of BSA in a mixture of 50% H_2O and 50% D_2O . Volumes of 50 μL , 100 μL and 200 μL were used. The total volume was completed to 200 μL using the mixture of 50% H_2O and 50% D_2O .

- *Measure in serum*

To measure the relaxivity in serum, the wet residue obtained at the end of the nanoparticles synthesis was suspended in 200 μL of fetal bovine serum.

- *Measure in bovine serum albumin (BSA)*

To measure the relaxivity in BSA, the wet residue obtained at the end of the nanoparticles synthesis was suspended in 200 μL of 0.68 mM of a solution of BSA in water.

- *Measure in anions*

To measure the relaxivity in anions, the wet residue obtained at the end of the nanoparticles synthesis was suspended in 200 μL of anions in solution in water. Quantities varying from 50 to 200 equivalents of carbonate, phosphate and citrate were used. The pH was adjusted to 7.4 with a 1 M HCl solution.

e) Transmetallation

The transmetallation process in the presence of Zn^{2+} was monitored for both $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ and $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @SiNPs in phosphate buffer by relaxometry.²³ The $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ was reacted with one equivalent of ZnCl_2 in phosphate buffer. Relaxation times were measured at 50 MHz and 25°C at different times. The kinetic index is defined as the time required to reach $R_1(t)/R_1(t=0)=0.8$. The $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @SiNPs was also reacted with one equivalent of ZnCl_2 in phosphate buffer. Relaxation times were measured at 50 MHz and 25°C at different times to determine the kinetic index.

f) MRI measurement

- *MRI phantoms*

The $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @25T; The $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @25TPEG; The $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @55Q and The $[\text{Gd}(\text{dhqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ @55QPEG were prepared and 5 or 6 different dilutions in physiological serum (NaCl solution at 0.9%) of these samples have been made. 200 μL of all these solutions have been placed on a 1 mL syringe. 5 or 6 syringes have been put on a homemade rack to be suitably placed under the MRI magnet.

The measurements have been done in Clinatoc on Bruker 4.7 T/400 mm scanner with a 600 mT/m magnetic field gradient, using a homogenous coil for transmission and a rat head surface coil for reception. Spin echo T_1 weighted RARE type (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) has been used by the following parameters:

$T_E = 10$ ms

T_E effective = 20 ms

Rare factor = $4 \times T_R = 1000$ ms

Accumulation number: 4

Acquisition time: 2 min 8 s

Spin echo T_2 weighted turbo RARE type (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) has been used by the following parameters:

$T_E = 10$ ms

T_E effective = 20 ms

Rare factor = $4 \times T_R = 2000$ ms

Accumulation number : 4

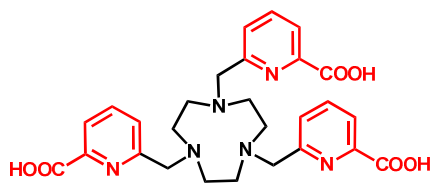
Acquisition time : 4 min 16 s

5. References

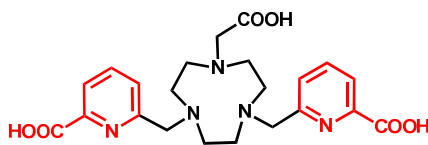
1. R. Fornasier, D. Milani, P. Scrimin and U. Tonellato, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1986, 233-237.
2. M. Kuwahara, M. Arimitsu and M. Sisido, *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**, 256-257.
3. D. Shetty, J. M. Jeong, C. H. Ju, Y. J. Kim, J. Y. Lee, Y. S. Lee, D. S. Lee, J. K. Chung and M. C. Lee, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 2010, **18**, 7338-7347.
4. A. Shibata, T. Uzawa, Y. Nakashima, M. Ito, Y. Nakano, S. Shuto, Y. Ito and H. Abe, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 14172-14178.
5. J. Bartels, P. Lu, K. Maurer, A. V. Walker and K. D. Moeller, *Langmuir*, 2011, **27**, 11199-11205.
6. H. Wang, J. M. Zhuang and S. Thayumanavan, *ACS Macro Letters*, 2013, **2**, 948-951.
7. E. Boros, M. Polasek, Z. Zhang and P. Caravan, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 19858-19868.
8. M. McLaughlin, R. M. Mohareb and H. Rapoport, *The Journal of Organic Chemistry*, 2003, **68**, 50-54.

9. J. Ketola, J. Katajisto, H. Hakala and J. Hovinen, *Helvetica Chimica Acta*, 2007, **90**, 607-615.
10. M. J. Weber, *Handbook of Optical Materials*, 2002.
11. J. C. deMello, H. F. Wittmann and R. H. Friend, *Advanced Materials*, 1997, **9**, 230-&.
12. A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams and M. Woods, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1999, 493-503.
13. D. M. Corsi, C. Platas-Iglesias, H. van Bekkum and J. A. Peters, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2001, **39**, 723-726.
14. J. A. Peters, J. Huskens and D. J. Raber, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1996, **28**, 283-350.
15. P. H. Fries and D. Imbert, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 2010, **55**, 2048-2054.
16. D. Canet, *Advances in Inorganic Chemistry - Including Bioinorganic Studies, Vol 57*, 2005, **57**, 3-40.
17. L. Li and P. Reiss, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 11588-11589.
18. J. Lim, W. K. Bae, D. Lee, M. K. Nam, J. Jung, C. Lee, K. Char and S. Lee, *Chemistry of Materials*, 2011, **23**, 4459-4463.
19. S. Tamang, G. Beaune, I. Texier and P. Reiss, *ACS Nano*, 2011, **5**, 9392-9402.
20. R. P. Bagwe, C. Y. Yang, L. R. Hilliard and W. H. Tan, *Langmuir*, 2004, **20**, 8336-8342.
21. S. V. Eliseeva, B. Song, C. D. B. Vandevyver, A.-S. Chauvin, J. B. Wacker and J.-C. G. Bunzli, *New Journal of Chemistry*, 2010, **34**, 2915-2921.
22. W. D. Horrocks and D. R. Sudnick, *Journal of the American Chemical Society*, 1979, **101**, 334-340.
23. S. Laurent, L. Vander Elst, C. Henoumont and R. N. Muller, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2010, **5**, 305-308.

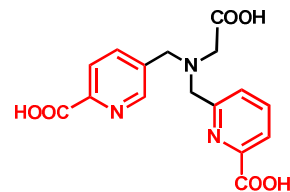
Ligands développés au laboratoire



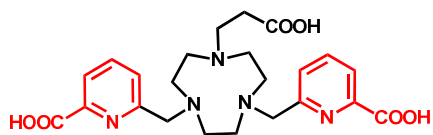
H₃tpatcn



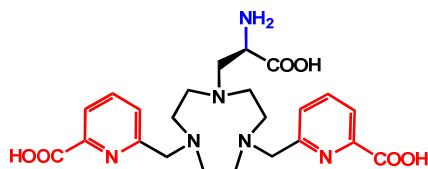
H₃bpatcn



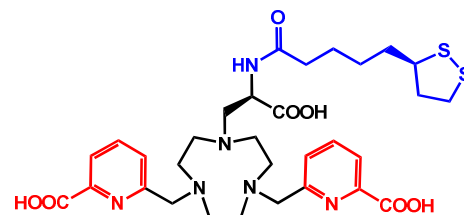
H₃dpaa



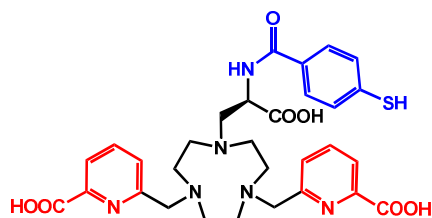
H₃ebpatcn



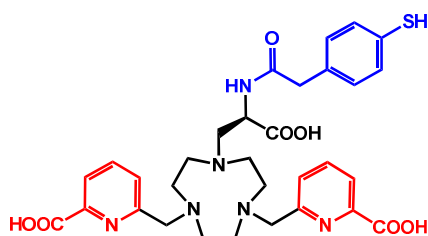
H₃ebpatcnNH₂



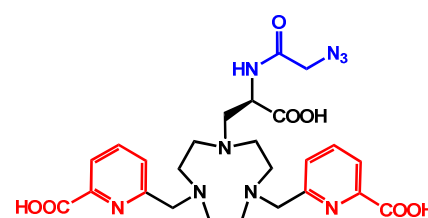
H₃ebpatcnSS



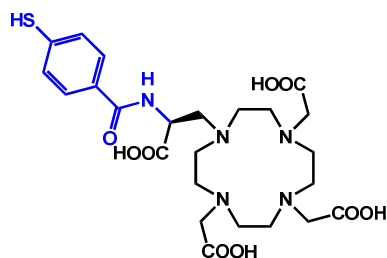
H₃ebpatcnSH



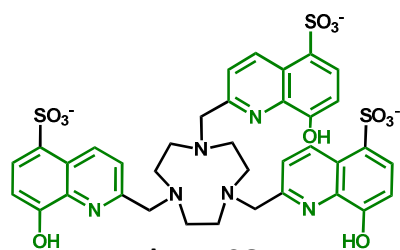
H₃ebpatcnCH₂SH



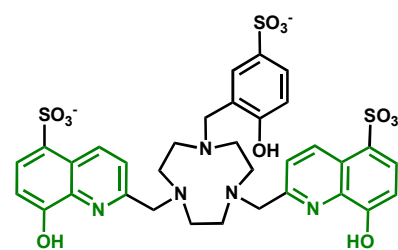
H₃ebpatcnN₃



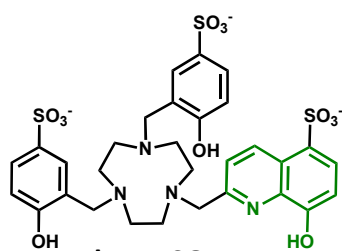
H₄DO3ApropSH



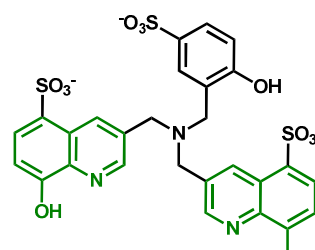
thqtcnSO₃



dhqtcnSO₃

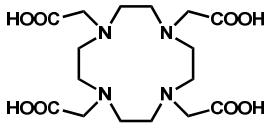


hqtcnSO₃

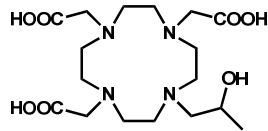


dhqNSO₃

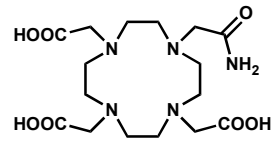
Ligands commerciaux



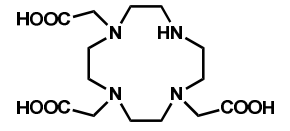
H₄DOTA



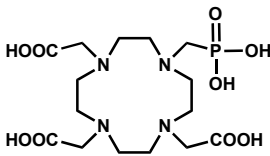
H₃HPDO3A



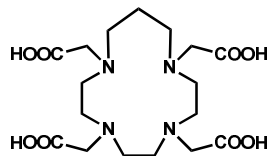
H₃DOTAmonoamide



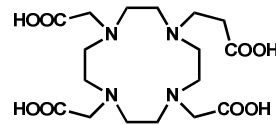
H₃DO3A



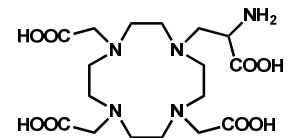
H₅DO3AP



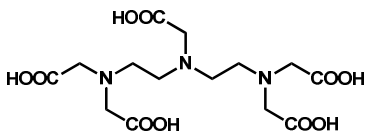
H₄Trita



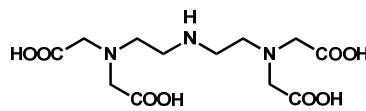
H₄DO3Aprop



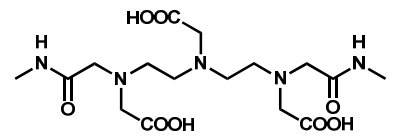
H₄DO3ApropNH₂



H₅DTPA



H₄DTTA



H₃DTPA-BMA

Résumé

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est une technique de choix pour l'imagerie moléculaire, soit la visualisation d'événements biologiques à l'échelle moléculaire. En effet, elle est non invasive et possède une haute résolution. Cependant, elle manque de sensibilité. L'utilisation d'agents de contraste commerciaux, qui sont pour la plupart des chélates de Gd(III), peut pallier à ce problème lors d'examen cliniques mais ils ne sont pas assez efficaces en vue de l'imagerie moléculaire. Leur efficacité, définie par leur relaxivité, peut être améliorée en optimisant les paramètres qui la gouvernent, comme le nombre de molécules d'eau coordonnées, la vitesse d'échange de l'eau ou la dynamique de rotation du complexe. Deux stratégies sont envisagées pour améliorer la sensibilité : la première est de rassembler un grand nombre de complexes de Gd(III) possédant une haute relaxivité dans une seule entité ; la seconde est la conception de sondes bimodales IRM/imagerie optique, permettant de tirer profit à la fois de la haute résolution de l'IRM et de la très bonne sensibilité de l'imagerie optique.

Ce travail de thèse a consisté à incorporer des agents de contraste à base de Gd(III) possédant des propriétés de relaxivité améliorées dans des systèmes macromoléculaires ou des nanoobjets. Pour cela, des complexes ayant des paramètres de relaxivité optimisés connus au laboratoire ont été fonctionnalisés pour être greffés sur des quantum dots, pour le caractère bimodal et sur des oligonucléotides afin de réaliser des sondes ADN. L'utilisation de billes de silice a permis d'incorporer des complexes de Gd(III) de manière non covalente et d'obtenir à la fois une relaxivité par Gd(III) et par particule très élevée. L'incorporation simultanée de complexes d'Yb(III) permet également d'obtenir une sonde bimodale avec une émission dans le proche infrarouge. Tous ces systèmes ouvrent la possibilité au développement de sondes IRM avec des propriétés optimisées, prometteuses pour l'imagerie moléculaire.

Abstract

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is a widely used diagnostic method in medicinal practice. It is the ideal technique for molecular imaging, which allows biological events to be observed at the molecular scale thanks to its high resolution. However it has a very low sensitivity. Commercial contrast agents can palliate this lack of sensitivity, but their efficiency, defined as relaxivity, is too low for molecular imaging. The relaxivity of Gd(III) chelates depends on parameters such as the hydration number, the exchange rate and the rotational dynamics of the complex, which can be optimized to improve the relaxivity. Two strategies can be considered to improve the sensitivity: the first one is to gather a high number of complexes demonstrating an optimized relaxivity on a nanoobject ; the second one is the design of a bimodal probe MRI/Optical imaging to combine the high resolution of MRI and the high sensitivity of optical imaging.

In this work we present the incorporation of gadolinium chelates into macromolecular systems and two different types of nanoobjects. Gd(III) chelates with improved relaxometric properties have been functionalized and grafted onto quantum dots for the design of a bimodal probe and into oligonucleotides for the conception of a DNA probe. The non-covalent incorporation of Gd(III) in silica spheres allows both a high relaxivity per Gd(III) and per particle. The simultaneous incorporation of Yb(III) complexes emitting in the near infrared permits the design of a bimodal probe. All of these systems lead to the development of a new class of promising probes for molecular imaging.