



HAL
open science

Synthèse et caractérisation de bispidines, chélatants du ^{64}Cu , en vue d'applications pour la tomographie à émission de positrons

Raphaël Gillet

► **To cite this version:**

Raphaël Gillet. Synthèse et caractérisation de bispidines, chélatants du ^{64}Cu , en vue d'applications pour la tomographie à émission de positrons. Autre. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAF058 . tel-01716376

HAL Id: tel-01716376

<https://theses.hal.science/tel-01716376>

Submitted on 23 Feb 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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien

Thèse présentée par :
Raphaël GILLET
soutenue le : 13 octobre 2017

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/S spécialité : Chimie

**Synthèse et caractérisation de
bispidines, chélatants du ^{64}Cu , en vue
d'applications pour la tomographie à
émission de positrons**

Thèse dirigée par :

Dr CHARBONNIERE Loïc

Directeur de thèse, CNRS Strasbourg

Rapporteurs :

Dr JAKAB TOTH Eva

Rapporteur Externe, Centre de Biophysique Moléculaire

Prof. TRIPIER Raphaël

Rapporteur Externe, Université de Bretagne Occidentale

Autres membres du jury :

Prof. COMBA Peter

Examineur, Universität Heidelberg

Dr NONAT Aline

Co-encadrante de thèse, CNRS Strasbourg

Invité

Dr BRANDEL Jérém y

CNRS Strasbourg

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Loïc Charbonnière. Voilà désormais quelques années que je travaille sous votre supervision et que je profite de vos conseils, d'abord pour des travaux pratiques à l'ECPM, puis pour mon stage master et enfin pour cette thèse. Votre façon de manager vos étudiants, avec flexibilité, autonomie et rigueur m'a permis d'apprécier le travail au labo et m'a permis de progresser aussi. Je vous remercie pour cela ainsi que pour les discussions scientifiques, les échanges humains et les nombreuses choses que j'ai apprises au cours de ces années.

En premier lieu, je souhaite remercier le Docteur Aline Nonat. Merci de m'avoir aidé et conseillé quasiment au quotidien pendant toute cette période de thèse. Ton infatigable optimisme a contrebalancé mon pessimisme récurrent. Merci pour tes nombreuses explications, clarifications et tes encouragements réguliers !

Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury, le Docteur Eva Toth, le Professeur Raphaël Tripier et le Professeur Peter Comba. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Un grand merci au Docteur Jérémy Brandel pour sa formation et son aide concernant les études physico-chimiques. Merci pour ta patience et pour ton aide précieuse à l'interprétation des résultats.

Un grand merci également au Docteur Sandrine Huclier, qui m'a accueilli dans son laboratoire à St-Herblain et m'a formé à la radiochimie. Merci pour ton temps et ton aide sur place qui m'ont permis de découvrir cette discipline.

Je remercie également le Docteur Graham Stasiuk ainsi que Thomas Price pour les tests avec le ^{68}Ga .

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de soutenance à mi-parcours, le Docteur Ali Ouadi et le Docteur Gilles Ulrich. Je remercie également le Docteur Franck Camerel pour les structures cristallographiques, Jean-Marc Strub pour son temps consacré aux spectres de masse ainsi que le Docteur Mourad El Habiri pour son temps pour les études électrochimiques.

Un merci tout particulier à l'ensemble des chercheurs et étudiants que j'ai croisés au cours de ces années au LIMAA, Cécile pour tes encouragements, Zouhair pour ton souci que les conditions de travail soient toujours bonnes et ton art de la négociation, Alexandre pour ton ingénierie et tes conseils pratiques, Pascale pour ta bonne humeur, Anne pour ces discussions et expériences sur l'enseignement. Mam's #blagueur/baratineur et Joan

#DiorHomme un grand merci à vous pour ces midis passés à raconter soit n'importe quoi, soit n'importe quoi ou encore n'importe quoi avec un peu de géopolitique et de football (pour ne pas mentionner les pires) ; parce que la chimie ça se passe (surtout) à la paillasse ! Nabila, j'ai apprécié partager un couloir de paillasse avec toi, Cyrille pour ton humour subtil et bien assaisonné (sels et caillasse), Amadine pour m'avoir formé en stage master, Soumaya pour ton rire contagieux, Gaoyang pour le partage culturel, Akram, Marion, Marie-Julie, Mehdi, Lilia, Chi, Sylvana, Jérémie, Abdoulaye, Claudia, Sophie, Ping-Ping, Tao, Sylvie, Nicolas et ceux que j'ai oublié.

Tout ça n'aurait pas été possible sans (de nombreux) amis/piliers des BertHom et du Local (et plus récemment de nouveaux lieux sympas)/réguliers des soirées de réflexion spirituelle fine équipe (Ketsia, Pierre, Pauline, Simon, Mickael, Florine, Joël², Rachel et d'autres encore !) qui se prolongent en ville. Merci pour tous ces moments, ces amitiés où le reste ne compte pas vraiment ! J'en profite pour remercier les gens de l'église dont certains, je sais, ont beaucoup pensé à moi pendant cette période. Tout ça n'aurait pas été possible non plus sans ma famille aux alentours, en particulier mes frères et sœurs Micaël, Sarah et Samuel, les parties de squash avec Sam pour se défouler (trop parfois !), les moments/repas régulièrement passés ensemble, le bonheur de la naissance de deux perles pleines de vie !

Ont été nécessaires à la rédaction de ce manuscrit environ 600 h de travail, 40 litres de bières (et pas de la pils !) plus l'équivalent en bon vin gersoïis ou en boisson du sud-ouest (au final, à part ma bagnole, ça m'a rien coûté !), une bonne trentaine de sorties les weekends, à droite à gauche avec les amis ou la famille, pour mieux repartir ensuite !

Contrairement à l'époque, ça m'a pas coûté en machine à écrire, en rubans de machine à écrire ou encore en pinceaux, mais les touches « ctrl + Z » ont été utilisées un nombre incalculable de fois, probablement autant que les touches « ctrl + S », de nombreuses feuilles de papiers sont partis à la poubelle, j'ai pour la première fois de ma vie vraiment finit l'encre d'un bic bleu, j'ai posé tout un tas de questions parce que j'avais jamais écrit une thèse avant...

Mais la voici !

Sommaire

Chapitre I Introduction	I
1. TEP	I
1.1 Principe	I
1.2 Radionucléide et méthode de production	2
2. Chimie de coordination du cuivre(II)	8
2.1 Propriétés des complexes de cuivre(II)	8
2.2 Définition d'un chélatant bifonctionnel (CBF)	10
2.3 CBF usuels du Cu(II)	11
2.4 Comparaison des ligands phosphonate par rapport à leurs analogues carboxylate	13
3. Les bispidines	19
3.1 Généralités	19
3.2 Nouveaux chélatants de type bispidine	23
3.3 Fonctionnalisation	44
4. Présentation du travail de thèse	57
Références	58
Chapitre II Synthèse	65
1. Objectif	65
2. Synthèse des précurseurs	66
2.1 Rétro-synthèse	66
2.2 Précurseur pipéridone P ¹	67
2.3 Précurseur pipéridone P ²	70
2. Synthèse du synthon aminophosphonate	73
4 Synthèse des bispidines : bispidones et bispidols	75
4.1 Ligand L ¹	75
4.2 Ligand L ²	81
4.3 Ligand L ³	84
4.4 Ligand L ⁴	89
4.5 Ligand L ⁵	90
4.6 Ligand L ⁷	94
5. Conclusion	97
Références	99
Chapitre III Etude physico-chimique	101
1. Propriétés acido-basique de L³	101
1.1 Potentiométrie	102
1.2 Spectrophotométrie d'absorption UV-visible	103
1.3 RMN	108
2. Propriétés de complexation de L³	112

2.1	Spectrophotométrie d'absorption UV-visible	112
2.2	Potentiométrie	117
2.3	RMN du complexe de Zn(II)	120
3.	Etude de stabilité	124
3.1	Electrochimie	125
3.2	Cinétique de dissociation	132
4.	Conclusion	134
	Références	135
Chapitre IV Radiomarquage des agents chélatants par le ⁶⁴Cu		137
1.	Objectifs	137
2.	Mise en œuvre expérimentale	137
2.1	Composition des sources de ⁶⁴ Cu	137
2.2	Description du protocole utilisé	140
2.3	Conditions de suivi par Radio-CCM	141
3.	Résultats obtenus	143
3.1	Ligand L ³	143
3.2	Ligand L ¹¹	149
3.3	Ligand L ¹²	152
3.4	Ligand L ¹³	154
4.	Radiomarquage au ⁶⁸Ga sur L¹²	155
5.	Conclusion	156
	Références	159
Chapitre V Stratégies de fonctionnalisation		161
1.	Stratégies de synthèse envisagées	161
1.1	Ligands cibles	161
1.2	Rétro-synthèse	162
2.	Stratégie 1	163
2.1	Synthèses préliminaires	163
2.2	Protection de l'acide phosphonique	164
2.3	Synthèse de L ¹⁷	166
2.4	Synthèse de L ¹⁸	172
2.5	Conclusion	174
3.	Stratégie 2	175
3.1	Preuve de concept	175
3.2	Essai sur L ³	177
4.	Stratégie 3	179
4.1	Ligand L ²⁵	179
4.2	Voie A.	180
4.3	Voie B	200
4.4	Conclusion	205

5. Stratégie 4	206
5.1 Ligand L ³⁵	206
5.2 Voie C	210
5.3 Voie D	214
5.4 Conclusion	219
6. Conclusion générale	220
Références	224
Chapitre VI Conclusion Générale	225
Chapitre VII Partie expérimentale	227
References	254
Abréviations	255
Publications et communications	257
Publications	257
Communications	257
Orales	257
Poster	257

Chapitre I

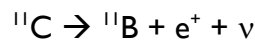
Introduction

1. TEP

1.1 Principe

La tomographie à émission de positron (TEP) est une technique d'imagerie nucléaire basée sur la désintégration d'un radioisotope émetteur de positrons.¹

Un isotope d'un élément possédant un excès de protons est sujet à une instabilité et donc à une désintégration radioactive, dont une des voies possible de désintégration consiste en la transformation d'un proton du noyau en un neutron et un positron (e^+). Ce dernier, ainsi qu'un neutrino (ν) non-détecté, sont émis. Il s'agit de l'émission de positron, connu également comme désintégration β^+ . Un exemple est donné par l'Equation 1.1 avec le ^{11}C .



Equation 1.1. Désintégration β^+ du ^{11}C

Le positron émis possède une énergie cinétique, elle-même variable suivant le radioisotope, et parcourt une certaine distance dans le milieu dans lequel il se trouve, de l'ordre de 0,1-1 mm dans les tissus, avant de se combiner avec un électron du milieu dans lequel il se trouve. Il s'ensuit alors un phénomène appelé annihilation, qui consiste en la conversion de la masse du positron et de l'électron en énergie électromagnétique, selon l'équation d'équivalence masse-énergie d'Einstein (Equation 1.2).

$$E = mc^2$$

Equation 1.2 Equation d'équivalence masse-énergie d'Einstein

Le positron est l'antiparticule de l'électron, ce qui signifie qu'ils ont la même masse mais une charge opposée. De ce fait, il résulte de l'annihilation l'émission de deux photons de même énergie (511 keV), de même direction mais de sens opposé. La détection de ces deux rayons γ par une caméra TEP circulaire permet de déterminer la position où l'annihilation a eu lieu (Figure 1.1).

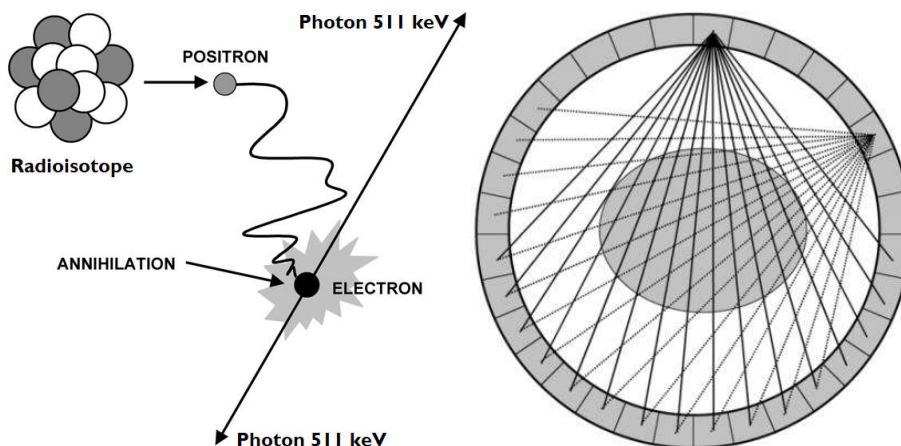


Figure 1.1 Principe de la TEP (gauche) et détecteur rayons gamma (droite)

La TEP est une des techniques d'imagerie parmi les plus utilisées, puisqu'elle permet d'effectuer un diagnostic avec une résolution importante et ce dans de nombreux cas, comme l'oncologie, la neurologie et encore les maladies cardio-vasculaires. Du fait de l'énergie des photons, ceux-ci sont émis en dehors du corps humain et peuvent ainsi être détectés. Un avantage de la TEP est que la direction des photons émis est très proche du point d'annihilation et une très bonne indication de la position du radioisotope est obtenue après reconstruction de l'image TEP. Un autre avantage est que l'énergie des photons émis est identique quel que soit l'isotope émetteur de positron utilisé. Ceci permet d'utiliser un scanner TEP unique avec l'ensemble des radioisotopes émetteurs de positrons.

Par rapport à d'autres techniques d'imagerie, la sensibilité de la TEP est avantageuse. En effet, la quantité de radiotracer nécessaire pour obtenir une image TEP est de l'ordre de la nanomole.

1.2 Radionucléide et méthode de production

1.2.1 Radionucléide

Initialement, la TEP exploitait principalement les propriétés des radioisotopes émetteurs de positrons tels que le ^{11}C , le ^{13}N et le ^{15}O . Ceux-ci ont des temps de demi-vie courts, respectivement de 20, 10 et 2 minutes. De tels temps de demi-vie sont très contraignants. En effet, après production, les isotopes sont utilisés pour la synthèse des radiotraceurs qui sont eux-mêmes purifiés avant d'être utilisés pour de l'imagerie. Avec des temps de demi-vie de quelques minutes seulement, il est nécessaire d'avoir des installations permettant d'utiliser les isotopes immédiatement après production. Pour cela, le réseau de cyclotrons disponibles pour la production de ces radioisotopes doit être dense.

Un autre isotope a alors fait l'objet de nombreuses recherches, le ^{18}F . Celui-ci possède un temps de demi-vie de 109 min et des propriétés idéales pour la TEP (97 % β^+ , 0,635 MeV). L'essor important de ce radioisotope en fait aujourd'hui le plus utilisé cliniquement en analyse de routine. Le radiotracer le plus développé à partir du ^{18}F est le 2- ^{18}F fluoro-2-déoxy-D-glucose (FDG) (Schéma 1.1) ; il est utilisé dans plus de 90 % des études TEP.² Sa synthèse est possible par fluorination électrophile à partir du triacétyl glucal et par fluorination nucléophile à partir du tetra-O-acétyl-mannose triflate.^{3,4,5}

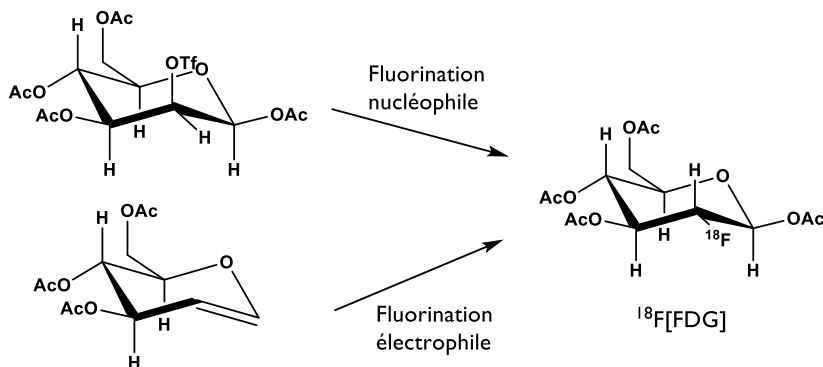


Schéma 1.1. Structure et synthèse générale du ^{18}F [FDG]

Avec le développement de l'immuno-TEP, de nouveaux radionucléides possédant des temps de demi-vie plus long sont nécessaires. L'immuno-TEP consiste à développer des radiotraceurs ou radiopharmaceutiques liés à des biomolécules vectrices capables d'intervenir dans des processus physiologiques ou d'atteindre une cible biologique d'intérêt. Une telle technique donne accès à un outil de grande efficacité, qui peut non seulement être utilisé pour le diagnostic précoce d'une pathologie par la présence de biomarqueurs spécifiques, mais aussi pour évaluer l'efficacité des thérapies ciblées. En oncologie, c'est l'outil de choix pour une approche théranostique.

Ainsi, lorsqu'il s'agit de développer un radiopharmaceutique à partir de ^{18}F , les diverses étapes de synthèse et de purification peuvent être problématique du fait de la présence d'une biomolécule ainsi qu'au vue du temps de demi-vie relativement court. Le temps nécessaire pour effectuer ces diverses étapes impliquent une décroissance radioactive importante.⁶ De plus, l'utilisation de vecteurs biologiques comme des anticorps allonge considérablement le temps de circulation des radiotraceurs dans l'organisme qui devient alors nettement supérieur au temps de demi-vie du ^{18}F .

C'est pourquoi un intérêt fort concerne le développement de radiotraceurs à partir de radioisotopes métalliques avec des temps de demi-vie plus long. Quelques-uns d'entre eux ainsi que leurs propriétés sont résumés dans le Tableau I.1. Dans ce tableau, seule la désintégration de type émission de positron est prise en considération. On peut noter que le ^{68}Ga a un temps de demi-vie plus court que le ^{18}F , mais du fait de son mode de production (par des générateurs à base de Ge), celui-ci est bien plus disponible.

Radioisotope	Temps de demi-vie (h)	E_{max} de l'émission β^+ (MeV)	Pourcentage mode β^+ (%)	Méthode de production ⁷
^{18}F	1,83	0,63	97	Cyclotron $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$
^{68}Ga	1,03	1,89	88	Générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$
^{44}Sc	3,9	1,47	94	Générateur $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$
^{64}Cu	12,7	0,65	17	Cyclotron $^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$
^{86}Y	14,7	1,22	12	Cyclotron $^{86}\text{Sr}(p, n)^{86}\text{Y}$
^{89}Zr	78,4	0,90	23	Cyclotron $^{89}\text{Y}(p, n)^{89}\text{Zr}$

Tableau I.1. Exemple de radioisotopes utilisés en TEP.

Le temps de demi-vie, encore appelé la période radioactive, est défini en fonction de la loi de décroissance radioactive (Equation 1.3), qui décrit le nombre d'atomes radioactifs présents dans un échantillon en fonction du temps. Il s'agit d'une loi exponentielle :

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$$

Equation I.3. Loi de décroissance radioactive

Le temps de demi-vie correspond à la durée au bout de laquelle le nombre de radionucléides présents dans l'échantillon est réduit de moitié.

I.2.2 Production du ^{64}Cu et isotopes du Cu(II)

a) Isotopes du cuivre

Le cuivre est un métal ayant pour numéro atomique 29. Sa configuration électronique est $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$. Ainsi, à certains degrés d'oxydation, la sous-couche 3d est partiellement remplie, ce qui implique que le cuivre appartient à la famille des métaux de transition.

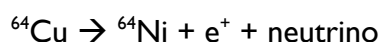
Il s'agit du troisième métal le plus abondant dans l'organisme, après le fer et le zinc.⁸ Il est nécessaire à l'organisme car il est présent comme cofacteur dans de nombreuses enzymes telles que la Cu/Zn superoxyde dismutase, le cytochrome c oxidase, la tyrosinase et d'autres protéines cruciales, pour la respiration et le transport du fer par exemple.^{9,10}

Il existe 27 isotopes connus du cuivre, dont deux sont naturellement stables, le ^{63}Cu (69,17 % de la proportion totale de cuivre naturel) et le ^{65}Cu (30,83 %). Parmi les isotopes du cuivre, 5 présentent des propriétés radioactives intéressantes pour l'imagerie moléculaire parmi lesquelles quatre sont émetteurs de positron : ^{60}Cu (93 % β^+ , $t_{1/2} = 23,7$ min), le ^{61}Cu (60 % β^+ , $t_{1/2} = 3,32$ h), le ^{62}Cu (98 % β^+ , $t_{1/2} = 9,7$ min) et le ^{64}Cu (19 % β^+ , $t_{1/2} = 12,7$ h).¹¹

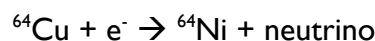
Le ^{64}Cu est l'isotope le plus prometteur pour la TEP, du fait de son temps de demi-vie élevé. Sous la forme $^{64}\text{CuCl}_2$, il est l'isotope le plus étudié pour des applications en imagerie nucléaire.

Le ^{64}Cu est un isotope qui possède trois voies de désintégration possibles :

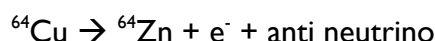
1. 19 % par émission de positron selon la réaction suivante :



2. 43 % par capture d'électron selon la réaction suivante :



3. 39 % par désintégration β^- selon la réaction suivante :



Un autre isotope du cuivre possédant des propriétés radioactives intéressantes est le ^{67}Cu . Il s'agit d'un émetteur 100 % β^- possédant un temps de demi-vie de 61,83 h. Ces propriétés en font un candidat potentiel pour la radio-immunothérapie.¹¹

La paire $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ est donc intéressante dans le cadre d'une approche théranostique.

b) Cyclotron

La production des radio-isotopes est assurée dans de nombreux cas par l'intermédiaire des cyclotrons. Les cyclotrons sont des accélérateurs de particules qui permettent de mettre en place des réactions nucléaires.

Un cyclotron (Figure 1.2) est un appareil formé de deux cavités semi-cylindriques appelées « dees », séparées d'un petit intervalle.¹² Au centre est situé un émetteur de particules. Au cours d'une manipulation, l'ensemble du système est soumis à un vide poussé. Un champ magnétique B est appliqué dans l'appareil, perpendiculairement à la vitesse des particules. C'est sous l'effet de ce champ magnétique que les particules chargées courbent leur trajectoire. Dans l'intervalle entre les « dees », une différence de potentiel est appliquée. Celle-ci permet de fournir de l'énergie à la particule chargée et de l'accélérer au passage dans l'intervalle. Ainsi, la vitesse de cette particule augmente graduellement, comme le montre le schéma vitesse= f (temps) sur la Figure 1.2. Dès lors que sa vitesse est augmentée, le rayon de sa trajectoire circulaire augmente, jusqu'à atteindre la limite des « dees » où elle est éjectée en direction de la cible.

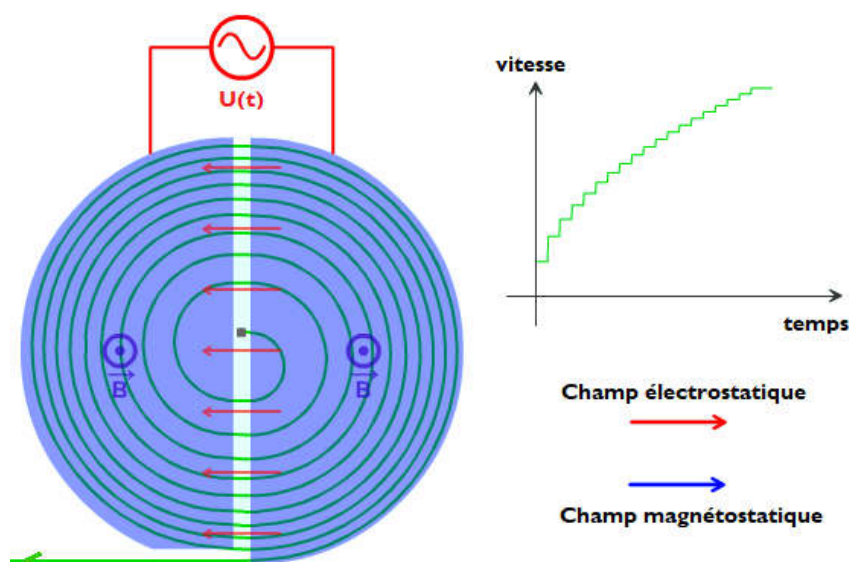


Figure 1.2. Principe de fonctionnement d'un cyclotron. Vue en coupe des « dees »¹²

Pour la suite des éléments sur le cyclotron, prenons comme exemple le cyclotron du site ARRONAX (Accélérateur pour la Recherche en Radiochimie et Oncologie à Nantes Atlantique), le C70, situé à St-Herblain.¹³ C'est ce cyclotron qui a produit les batches de ^{64}Cu utilisés au chapitre IV.

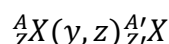
Le C70 est un cyclotron capable de délivrer des particules avec une énergie allant jusqu'à 70 MeV, tandis que la plupart des cyclotrons bio-médicaux sont généralement limités à 30 MeV. Cela lui permet de travailler dans une gamme d'énergie plus large, et avec différentes particules, toutes chargées positivement (Tableau 1.2).

Particules extraites	Éventail des énergies (MeV)
H ⁺ (proton)	35-70
He ²⁺ (α)	70
HH ⁺ (proton)	35
D ⁺ (deutéron)	15-35

Tableau I.2. Particules accélérées par le C70

Le C70 est également équipé de deux sorties distinctes lors de l'accélération de protons ou de deutérons, permettant ainsi une double extraction des particules. Il possède également 4 dispositifs cibles et 6 lignes de transport de faisceaux.

Diverses réactions nucléaires sont possibles, en fonction des particules émises par le cyclotron. Typiquement une réaction nucléaire est définie de la manière suivante :



où A_ZX = élément que constitue la cible, y = particule incidente, z = particule émise, ${}^{A'}_{Z'}X$ = élément produit

Equation I.4. Description générale d'une réaction nucléaire

c) Production du ${}^{64}\text{Cu}$

Plusieurs possibilités existent pour la production du ${}^{64}\text{Cu}$ et sont rapportées dans la littérature.^{14,15,16,17} Ces techniques impliquent les réactions nucléaires suivantes : ${}^{64}\text{Zn}(n, p){}^{64}\text{Cu}$, ${}^{64}\text{Zn}(d, 2p){}^{64}\text{Cu}$, ${}^{64}\text{Ni}(d, 2n){}^{64}\text{Cu}$ et ${}^{64}\text{Ni}(p, n){}^{64}\text{Cu}$.

Les techniques à partir de ${}^{64}\text{Zn}$ ont un grand intérêt par le fait que le ${}^{64}\text{Zn}$ est moins onéreux que le ${}^{64}\text{Ni}$. En revanche, plus d'impuretés métalliques sont présentes après production (${}^{61}\text{Cu}$, ${}^{65}\text{Zn}$ ou ${}^{66}\text{Ga}$ et ${}^{67}\text{Ga}$ lorsque le ${}^{64}\text{Cu}$ est produit à partir de Zn naturel non enrichi).¹⁵

La réaction nucléaire la plus souvent mise en œuvre est ${}^{64}\text{Ni}(p, n){}^{64}\text{Cu}$, soit le bombardement de protons sur une cible de ${}^{64}\text{Ni}$ enrichi.

Cette technique est largement décrite dans la littérature. Le ${}^{64}\text{Ni}$ est électro-déposé sur des disques d'or par réduction du ${}^{64}\text{NiCl}_2$.^{18,19} Il est important alors de contrôler le diamètre et l'épaisseur du dépôt, qui ont des conséquences sur les rendements ainsi que sur le coût de production.

La cible de nickel est alors irradiée par un faisceau de proton émis par le cyclotron. Divers paramètres influencent le rendement et l'efficacité de l'irradiation, en particulier le courant appliqué (de l'ordre de 40-50 μA) et l'énergie du faisceau. En effet, la section efficace dépend de l'énergie du faisceau et dans le cas de ce type d'irradiation, elle est la plus élevée pour une énergie de faisceau comprise entre 9-12 MeV.^{14,18,20} La section efficace est une grandeur physique liée à la probabilité d'interaction d'une particule. Dans le cas présent, il s'agit de la probabilité de collision entre le proton projeté et un atome de ${}^{64}\text{Ni}$.

La purification après irradiation est généralement effectuée par des résines échangeuses d'anions. En milieu HCl concentré, la formation de chloro-complexe anionique de cuivre²¹

permet sa rétention sur les résines. Ainsi les impuretés métalliques sont éluées dans un premier temps à partir d'une solution HCl de concentration supérieure ou égale à 6 M et ensuite le cuivre est élué à partir d'une solution HCl de concentration en principe inférieure ou égale à 1 M.^{22,23}

Sur le site arronax, le ^{64}Cu est produit au sein d'un cyclotron, par irradiation de deutons sur une cible de ^{64}Ni enrichi (min > 98 %), électrodéposé sur un disque d'or, selon la réaction $^{64}\text{Ni}(d, 2n)^{64}\text{Cu}$.

La raison qui explique ce choix est le fait que des rendements similaires ont été obtenus par cette méthode d'irradiation, pour des épaisseurs de dépôt plus faible, limitant ainsi le coût de production du ^{64}Cu . En comparaison, pour la réaction $^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$ le maximum de la section efficace est de (508 ± 66) mb (milli barn) pour 10,3 MeV d'après les travaux de Szelecsenyi et al¹⁴ contre 800 mb à 14 MeV pour la réaction $^{64}\text{Ni}(d, 2n)^{64}\text{Cu}$.²⁰ Cela confirme l'intérêt de cette seconde réaction nucléaire à partir du ^{64}Ni . D'autre part, pour des énergies proches de ce maximum situé à 14 MeV, la section efficace diminue de manière moins drastique pour l'irradiation de deuteron que dans le cas de l'irradiation de proton.²⁰

Sur le site Arronax, le procédé de purification est le suivant :²³

1. Dissolution du nickel irradié dans de l'acide nitrique chaud 2 M puis évaporation à sec
2. Le résidu est ensuite solubilisé dans une solution HCl 10 M
3. L'éluion est faite sur une résine échangeuse d'anions fortement basique Bio-Rad AG1x8 (sous la forme Cl⁻)
4. La séparation du Ni(II) et du Co(II) présents est faite par une première éluion à partir d'une solution HCl 10 M, qui permet d'éluer le Ni(II) tandis que le Co(II) et le Cu(II) demeurent sur la résine.^{24,25} Ensuite l'éluion d'une solution HCl 6 M permet d'extraire sélectivement le Co(II) du Cu(II) du fait que les chloro-complexes de Cu ont une affinité plus forte avec la résine.
5. Le cuivre est ensuite élué avec une solution HCl 0,01 M. Cette méthode ainsi développé à l'avantage d'avoir lieu sur la même résine.
6. Au final, dans les fractions contenant le Ni et le Co, aucune trace de ^{64}Cu n'a été observée. De même, dans la solution contenant le Ni, aucune trace de Co ou de Cu n'a été détectée.

Le rendement de récupération pour le Cu est supérieur à 92 % avec une déviation standard de 3 %.

Le rendement de récupération pour le ^{64}Ni est supérieur à 95 % avec une déviation standard de 4 %.

2. Chimie de coordination du cuivre(II)

2.1 Propriétés des complexes de cuivre(II)

2.1.1 Propriétés de coordination du cuivre

La chimie de coordination du cuivre en milieu aqueux se résume à 3 états d'oxydation possibles, de +I à +3.

Les complexes de Cu(I) sont diamagnétiques (configuration $[\text{Ar}]d^{10}$) et forment des complexes sans énergie de stabilisation du champ cristallin. Ils sont ainsi plus labiles et ne sont pas utilisés pour l'imagerie *in vivo*. En revanche, le Cu(I) est présent dans les cellules du fait de leur fort pouvoir réducteur. Dans le cas de Cu(III), les cas où celui-ci est observé sont rares.²⁶

Le Cu(II) est la forme majoritaire en milieu aqueux avec une configuration électronique $[\text{Ar}]3d^9$.²⁷ Les complexes formés bénéficient d'une énergie de stabilisation du champ cristallin. L'affinité de l'ion Cu(II), classé parmi les cations de dureté moyenne selon la théorie de Pearson,²⁸ est importante pour les donneurs frontières que sont les amines, imines et les ligands bidentates de type bipyridine.^{26,27} La complexation du Cu(II) est également forte avec des dérivés carboxylate ou phosphonate.⁸ La géométrie des complexes formés dépend du nombre de sites de coordination : le Cu(II) ayant un nombre de coordination allant de 4 à 6 (rayon ionique relativement faible de 57 pm pour une coordination de 4 et de 73 pm pour une coordination de 6)²⁹ avec des complexes de géométrie carré-plan, carré-plan distordue, pyramide à base trigonale, pyramide à base carrée et octaédrique distordue.²⁶

Les complexes de Cu(II) sont sujets à des distorsions de type Jahn-Teller.

Dans une géométrie octaédrique, la théorie du champ cristallin implique une différenciation d'énergie entre les orbitales d_{xy} , d_{xz} et d_{yz} (symétrie t_{2g}) et les orbitales d_{z^2} et $d_{x^2-y^2}$ (symétrie e_g), de plus haute énergie (Figure 1.3). Du fait de la configuration électronique du Cu(II), un électron est libre de se déplacer entre les deux orbitales du niveau e_g . Cela implique que l'état fondamental est dégénéré.

Selon le postulat fait par H. Jahn et E. Teller³⁰ en 1937 et révisé par C. Housecroft et A. Sharpe en 2008,³¹ tout système moléculaire non-linéaire dans un état fondamental dégénéré sera instable et sera soumis à une distorsion de sorte à former un système de plus basse énergie et de plus basse symétrie, impliquant une levée de dégénérescence du niveau d'énergie des orbitales.

La distorsion observée concerne soit une élongation des liaisons selon l'axe z (liaisons axiales plus longues que les liaisons équatoriales) ou bien une compression tétragonale (liaisons équatoriales plus longues que les liaisons axiales). Elle implique une diminution des répulsions électrostatiques et ainsi une diminution globale de l'énergie du complexe.

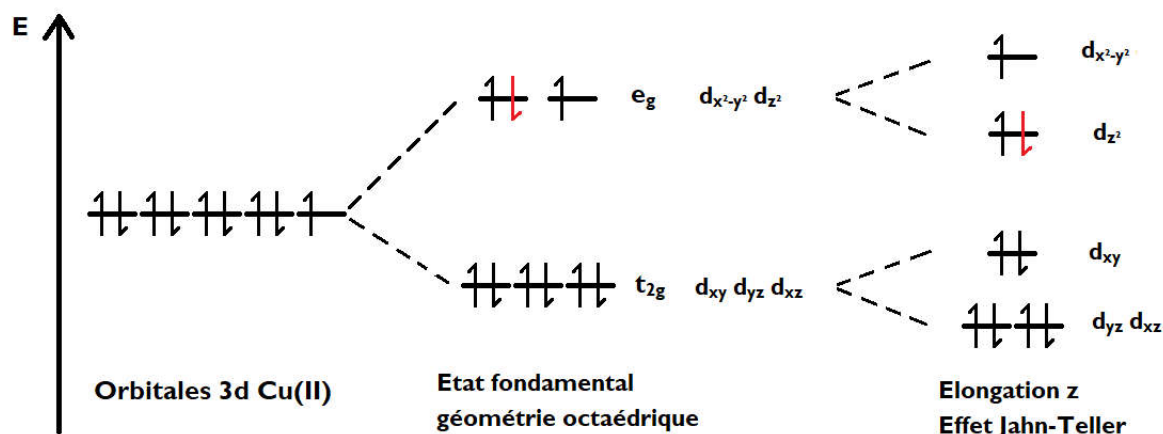


Figure 1.3. Illustration de l'effet Jahn-Teller (géométrie octaédrique – elongation selon z)

La Figure 1.3 représente le cas d'une elongation des liaisons selon l'axe z, ainsi les niveaux d'énergie des orbitales impliquant l'axe z (d_{z^2} , d_{yz} et d_{xz}) sont diminués.

C'est ce qui est observé par exemple dans le cas du complexe $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ où une déformation de la géométrie est observée en solution ainsi qu'à l'état cristallin.³²

La formation de chélate cyclique à 5 membres est particulièrement appropriée pour la complexation du Cu(II).³³ De plus, l'effet chélate est accompagné dans le cas du Cu(II) d'un effet macrocyclique, puisque les constantes de stabilité des complexes de cuivre des macrocycles sont plus importantes que les dérivés similaires acycliques.³⁴

2.1.2 Propriétés spectroscopiques

Les propriétés spectroscopiques des complexes de cuivre(II)³⁵ sont liées à différents types de transitions électroniques :

- transition d'électrons entre les sous-couches d
- transfert de charge : du ligand vers le métal et du métal vers le ligand.

Les transitions d-d sont en principe contrôlées par deux règles de sélection qui sont la règle de Laporte, qui stipule que les transitions électroniques d'une orbitale à une autre orbitale de même symétrie sont interdites, et la règle de spin, qui impose que $\Delta S = 0$ pour que la transition soit autorisée.

Du fait de sa configuration électronique en d^9 , les transitions d-d du cuivre(II) sont autorisées par le spin (multiplicité de spin inchangée) et interdites par la règle de Laporte. Pour les complexes de cuivre(II), ces transitions ont typiquement lieu au-delà de 500 nm et ont un coefficient d'absorption molaire faible de l'ordre de 1-100 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Du fait de l'absorption d'un photon dans le spectre visible, les complexes de Cu(II) sont colorés, la couleur de ceux-ci correspond alors à la couleur complémentaire du photon absorbé.

L'énergie des transitions d-d, qui dépend de la différence d'énergie entre les orbitales, est directement dépendante de la stéréochimie et de la géométrie du complexe. En effet, la géométrie du complexe est liée à la levée de dégénérescence des niveaux d'énergie des 5 orbitales d, et donc à l'énergie des transitions d-d. Ainsi, la longueur d'onde associée à une transition est une indication sur la géométrie adoptée par le complexe en solution (Figure I.4).

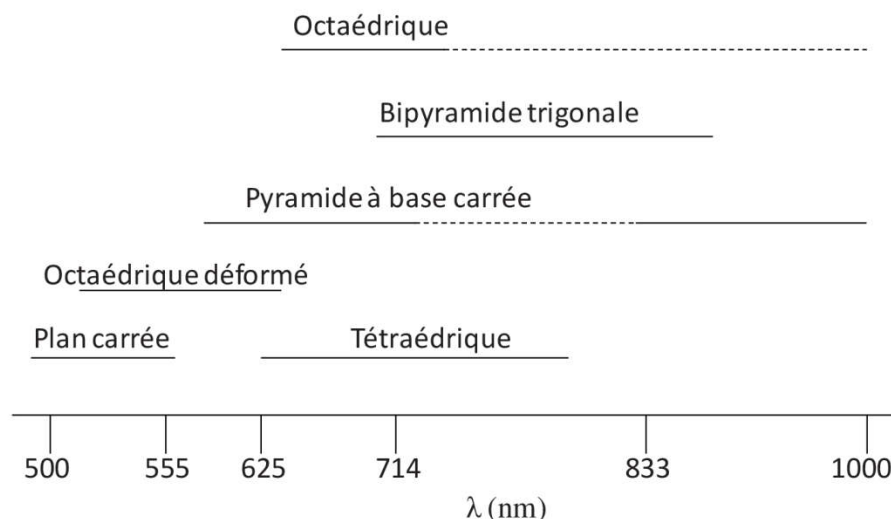


Figure I.4. Corrélation entre la longueur d'onde des transitions d-d et la géométrie du complexe de Cu(II).

2.2 Définition d'un chélatant bifonctionnel (CBF)

Dans le cadre d'une application en TEP, il est nécessaire de développer des chélatants bifonctionnels (CBF) pour piéger et transporter ces radioisotopes.

De manière générale, un radiopharmaceutique basé sur un radioisotope métallique contient différentes composantes qui peuvent être modifiées : le radioisotope (β^+ dans le cadre de la TEP), le chélatant pour assurer la complexation du radioisotope et la stabilité du complexe dans le corps humain, la fonction de greffage (ou espaceur) liée au chélatant et enfin le vecteur biologique choisi.⁷

Le chélatant bifonctionnel correspond au chélatant auquel est rattachée par un espaceur la fonction de greffage, capable de former une liaison covalente avec une biomolécule vectrice d'intérêt (Figure I.5).

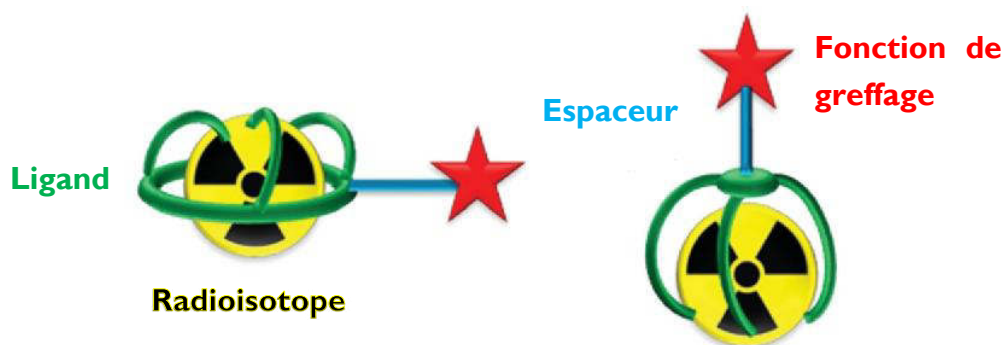


Figure I.5. Description générale du CBF

Pour une application en TEP, les CBFs doivent respecter le cahier des charges suivant :

1. Complexation rapide dans des conditions diluées, à température ambiante et dans une large gamme de pH.^{36,37}
2. Stabilité *in vivo* élevée afin d'éviter les mécanismes de transmétallation avec des métaux présents dans l'organisme^{7,38} et de trans-chélation avec des chélatants présents dans l'organisme (ex : transferrin³⁹, superoxide dismutase⁴⁰). En effet, dès lors que le métal est dissocié du ligand, il n'atteindra pas la cible biologique visée.
3. Conjugaison facile avec des vecteurs biologiques, de préférence à température ambiante.

La bioconjugaison du chélatant doit être possible sans pour autant modifier les propriétés de coordination de celui-ci vis-à-vis du radioisotope métallique,³⁶ ni compromettre la stabilité de la fonction de greffage ou du biomarqueur. Plusieurs voies de fonctionnalisations usuelles sont rappelées dans la partie 3.3.1 de ce chapitre.

2.3 CBF usuels du Cu(II)

Le choix du ligand est d'une grande importance pour la stabilisation du radioisotope métallique.

Pour le Cu(II), une grande variété de ligands a été développée de manière à respecter le cahier des charges mentionné auparavant.³⁷ Pour cela, l'entité de complexation doit être choisie de manière adéquate en fonction de l'affinité du radioisotope pour divers atomes coordinants selon la théorie de Pearson,²⁸ du nombre de coordination et de la géométrie adoptée par les complexes.

Plusieurs générations de ligands ont ainsi été développées, à partir de trois poly-aza macrocycles de bases : le tacn (triazacyclononane), le cyclen (1,4,7,10-tétrazacyclododécane) et le cyclam (1,4,8,11-tétrazacyclotétradécane) (Schéma I.2), du fait que les ligands macrocycles ont été démontrés comme des chélatants plus stables du cuivre que leurs homologues acycliques.³⁴

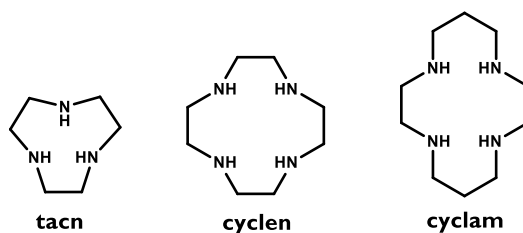


Schéma I.2. Structure du tacn, du cyclen et du cyclam

Parmi les ligands développés dans la littérature, quelques-uns d'entre eux sont représentés ainsi que certaines de leurs propriétés thermodynamiques et cinétiques dans le Tableau I.3. Cette sélection de ligands permet d'illustrer les critères importants concernant le choix du ligand pour le cuivre(II).

De ces données, on peut déduire que la rigidité et la pré-organisation géométrique du ligand est d'importance, puisque ce sont des caractéristiques qui augmentent généralement la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique d'un complexe. On remarque par exemple une forte augmentation de la constante de formation du complexe de cuivre entre le TETA et le CB-Cyclam ($\log K_{\text{Cu-L}}(\text{TETA}) = 20,49$ contre $\log K_{\text{Cu-L}}(\text{CB-cyclam}) = 27,1$) et une forte augmentation de l'inertie cinétique ($t_{1/2}$ en milieu acide) entre le TETA et le CB-TE2A.

Ligand	log K	$t_{1/2}$	Conditions radiomarquage	E_{red} (mV/NHE)
TETA	20,49 ^{a,41}	3,5 jrs (5 M HCl 30°C) ⁴²	25°C, pH 5-7, 60 min ⁴³	-980 (irrev) ²⁶
CB-Cyclam	27,1 ^{b,44}	18,5 jrs (5 M HCl 30°C) ⁴²	75°C, (4,7 % IN NaOH /EtOH), 1 h, 10 mM ⁴⁴	-
CB-TE2A	-	6,4 jrs (5 M HCl 90°C) ⁴²	95°C, pH 8, 2 h, 10 μM ⁴⁵	-880 ($E_{1/2}$)
Diamsar ^{46,47,48}	-	40 h (5M HCl, 90°C)	25°C, pH 5,5, 30 min immunoconjugué (rituximab) ⁵⁰	-900 (irrev)
NOTA	21,63 ^{c,49}	< 3 min (5 M HCl, 30°C) ²⁷	t.a, 20 min, pH 7, 125 nM	-700 (irrev)
NO3PY ⁵¹	27,4 ^a			-545 (q-rev)

Conditions ; 25°C, ^al = 0,1 M KNO₃ ; ^b0,1 M KCl ; ^c1 M NaClO₄

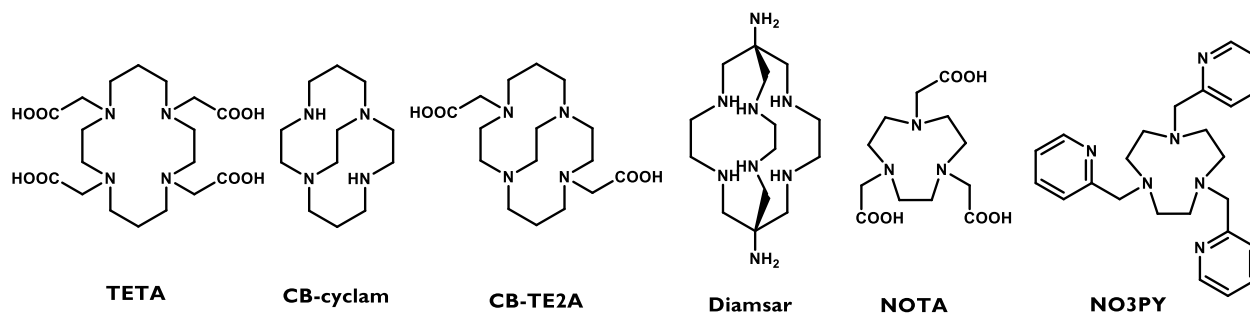


Tableau I.3. Propriétés de quelques ligands macrocycliques du Cu(II)

A l'inverse, les composés macrocycles ou de type cages ont parfois des cinétiques de complexation plus lentes. Dans le cas du CB-TE2A par exemple, le radiomarquage nécessite un chauffage à 95°C pendant 2 h.⁴⁵

Un point également important dans le développement d'un CBF et qui permet d'en évaluer la stabilité *in vivo*, est de connaître le potentiel de réduction du Cu(II) ainsi que le comportement du complexe après réduction du Cu(II) en Cu(I). Par exemple, la réduction du Cu(II) en Cu(I) dans le cas du complexe avec le diamsar est une réaction irréversible, ce qui caractérise l'instabilité du complexe du Cu(I) avec le ligand diamsar, contrairement au ligand NO3PY pour lequel la réaction est quasi-réversible. En revanche, le potentiel de réduction du Cu(II) dans le cas du diamsar est très bas.

Enfin le choix du groupement coordinant est primordial comme le montre la différence nette entre la constante de stabilité thermodynamique du NOTA par rapport à celle du NO3PY pour lequel les groupements acide carboxylique sont remplacés par des pyridines. Les fonctions usuelles sont les groupements pyridines, picolines, les fonctions méthylène carboxylate ou phosphonate.

Au vu du caractère pré-organisé et rigide des ligands macrocycliques de type bispidine, ceux-ci sont prometteurs pour la formation de complexes de cuivre dans le cadre de l'imagerie nucléaire.

2.4 Comparaison des ligands phosphonate par rapport à leurs analogues carboxylate

L'objet de cette partie de ce chapitre est de comparer les propriétés de coordination des chélatants développés possédant un groupement carboxylate comme site de coordination et leurs analogues possédant un phosphonate.

2.4.1 Dérivés du cyclen

Un des premiers ligands développés pour la complexation du cuivre(II) est le DOTA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique), basé sur la structure du cyclen, possédant 4 fonctions acide méthylcarboxylique. Les dérivés possédant 2 ou 3 acides carboxyliques (DO2A et DO3A) plutôt que 4 ont également été étudiés. Pour tester l'influence d'un groupement acide phosphonique sur la coordination du cuivre, les analogues DO2P, DO3P et DOTP ont également été étudiés (Schéma 1.3).

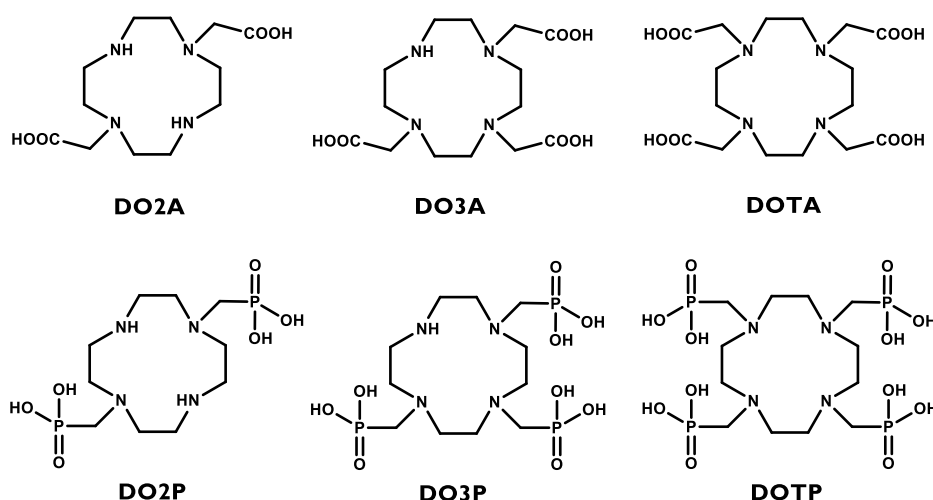


Schéma 1.3. Structure des dérivés DO2A, DO3A, DOTA et leurs analogues

Quelques-unes des propriétés associées à ces ligands sont annotées dans le Tableau 1.4.

Ligand	$\log K_{\text{Cu-L}}$	$t_{1/2}$	Conditions radiomarquage	Rendement radiomarquage
Cyclen ⁵²	24,60 ^a	9,5 min (5 M HClO ₄ , 25°C)	-	-
DO2A ⁵³	18,9 ^b	-	t.a, pH 5,5, 2 h, 5 mM	100
DO3A ⁵⁴	22,87 ^c			
DOTA	22,25 ^{d, 41}	< 1 min (5 M HCl 90°C) ⁴²	t.a, pH 5,5, 2 h, 5 mM	99 ⁵³
DO2P ⁵³	28,7 ^b	-	90°C, pH 6,5, 4h, 2 mM	97,8
DO3P ⁵³	26,9 ^b	-	t.a, pH 6,5, 2 h, 2 mM	96,6
DOTP ⁵³	26,2 ^b	-	t.a, pH 6,5, 2 h, 2 mM	96,9

Conditions ; 25°C, ^al = 0,1 M ; ^b0,1 M KCl ; ^c0,1 M Me₄NCl ; ^d0,1 M Me₄NNO₃.

Tableau 1.4. Propriétés des ligands basés sur la structure du cyclen

Dans le cas des dérivés du cyclen, une nette évolution de la constante de formation du complexe de cuivre(II) est constatée lors du remplacement des groupements coordinants acides carboxyliques par des acides phosphoniques. La stabilité est en effet plus importante pour les dérivés acide phosphonique ($\log K_{\text{Cu-DOTA}} = 22,63$ contre $\log K_{\text{Cu-DOTP}} = 26,2$ par exemple).

D'autre part, on constate que la constante de stabilité du DOTP possédant 4 acides phosphoniques est inférieure à celle du DO2P ($\log K_{\text{Cu-DOTP}} = 26,2$ contre $\log K_{\text{Cu-DO2P}} = 28,7$), qui possède par ailleurs la constante la plus élevée de ces 7 ligands.

La constante de stabilité thermodynamique est certes plus élevée pour DO2P que DOTP, en revanche, les conditions de radiomarquage sont dures dans le cas du DO2P (90°C, 4h), ce qui n'est pas adéquat dans le cadre du développement de CBF. A l'inverse, les dérivés DO3P et DOTP ont une constante de stabilité plus faible, mais des conditions de radiomarquage douces.

Il est nécessaire de prendre en compte plusieurs paramètres pour identifier l'influence de la présence de groupement phosphonate par rapport au groupement carboxylate.

La stabilité des complexes est souvent considérée en milieu acide car la mesure du temps de demi-vie dans ce milieu est considérée comme un bon critère de comparaison de la stabilité *in vivo* pour des chélatants du cuivre-64.⁵⁵ On remarque que la stabilité du DOTA en milieu acide est faible.

2.4.2 Dérivés du tacn

Parmi les dérivés du tacn, le ligand possédant 3 acides carboxyliques, le NOTA est l'un des premiers qui a été développé pour la complexation du cuivre(II). Plusieurs dérivés phosphinates ont également fait l'objet d'étude, dont le NOPO et le TRAP-Pr (Schéma 1.4).^{51,56,57}

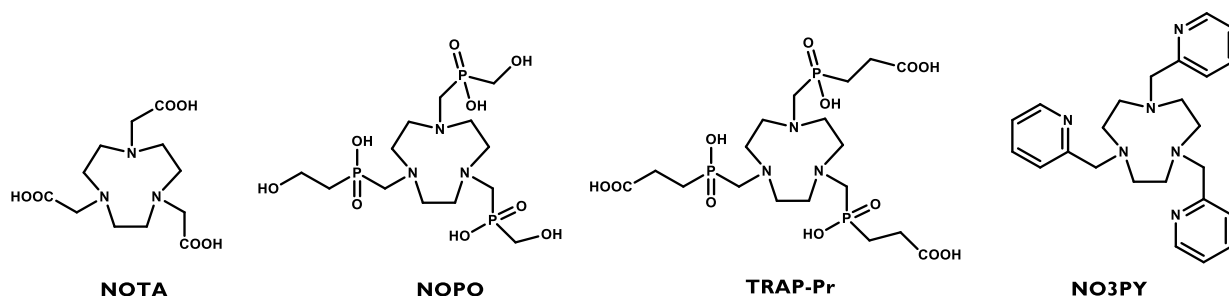


Schéma 1.4. Formule du NOTA, NOPO, TRAP-Pr et NO3PY

Les propriétés de ces ligands nous montrent que l'influence des groupements acide phosphinique dans ce cas n'est pas aussi nette que celle des acides phosphoniques dans le cas des dérivés du cyclen.

Ligand	log K_{Cu-L}	$t_{1/2}$	Conditions radiomarquage	Rendement radiomarquage
NOTA	21,63 ^{a,49}	< 3 min (5 M HCl, 30°C) ²⁷	immunoconjugué (rituximab) t.a, 20 min, pH 7, 125 nM	> 90 ⁵⁰
NOPO	-	-	25°C, pH 3, 5 min, 1 μ M	100 ⁵⁶
TRAP-Pr	19,1 ^{b,57}	2 hrs (pH 3,5, 25 °C) ⁵⁷	25°C, pH 3, 5 min, 1 μ M	100 ⁵⁶
NO3PY	27,4 ^{c,51}	-	-	-

Conditions ; 25°C, ^al = 1 M NaClO₄ ; ^b0,15 M NaCl ; ^c0,1 M KNO₃

Tableau 1.5. Propriétés de quelques chélatants dérivés du tacn

Le NOTA possède une constante de stabilité de 21,63 contre 19,1 dans le cas du TRAP-Pr, dont l'inertie cinétique est de 2 heures à pH 3,5. D'autre part, le NOTA, tout comme le NOPO ou le TRAP-Pr sont radiomarqués dans des conditions douces.

Les études sur les dérivés du tacn concernent principalement l'utilisation de groupements coordinants tels que la pyridine,⁶⁰ par exemple le NO3PY (Schéma 1.4),⁵¹ les acides picoliniques^{51,59} ou encore des acide glutamique.^{60,61} On remarque ici que la constante de stabilité du NO3PY pour le cuivre(II) est très élevée. D'autres ligands dérivés du cyclen présentent des propriétés de coordination très satisfaisante pour le cuivre(II).

2.4.3 1^{ère} génération de dérivés du cyclam

A partir du cyclam, un des premiers ligands développés est le TETA (acide 1,4,7,10-tetraazacyclotetradécane-1,4,7,10-tetraacétique), possédant 4 groupements acides carboxyliques, similairement au DOTA. De nombreux dérivés du TETA ont été développés, y compris les dérivés phosphonates TE2P et TETP (Schéma 1.5).

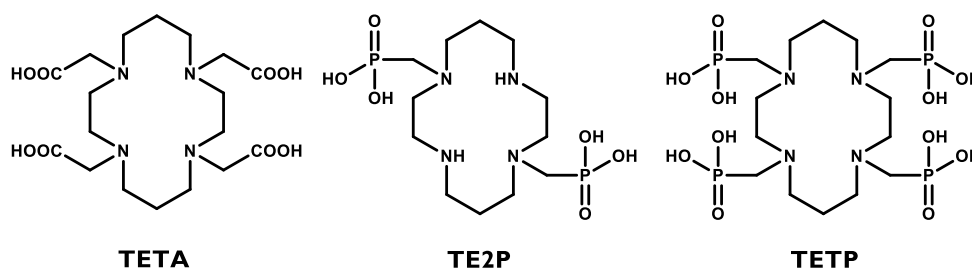


Schéma 1.5. Formule du TETA, TE2P et TETP

Les propriétés associées à ces ligands sont annotées dans le Tableau 1.6.

Ligand	$\log K_{\text{Cu-L}}$	$t_{1/2}$	Conditions radiomarquage	Rendement radiomarquage
Cyclam	27,2 ^{a,62}	2,7 jrs (5 M HCl 30°C) ⁴²	-	-
TETA	20,49 ^{b,41}	3,5 jrs (5 M HCl 30°C) ⁴²	25°C, pH 5-7, 60 min	> 95 ⁴³
TE2P	26,5 ^{c,63}	6,7 mois (5 M HClO ₄ 25°C) ⁴²	-	-
TETP	26,6 ⁴	-	-	-

Conditions : 25°C ; ^a1 = 0,1 M KCl ; ^b0,10 M N(CH₃)₄NO₃ ; ^c0,10 M KNO₃

Tableau 1.6. Propriétés des ligands basés sur la structure du cyclam

Concernant les ligands dérivés du cyclam, il est intéressant de constater que la constante de formation du complexe CuL pour le cyclam est supérieure à celle pour le TETA ($\log K_{\text{Cu-TETA}} = 20,49$ contre $\log K_{\text{Cu-Cyclam}} = 27,2$), possédant pourtant quatre bras coordinants acide carboxylique supplémentaires.

D'autre part, on remarque que la modification des groupements carboxylate par des groupements phosphonate implique une nette augmentation de la constante de stabilité des complexes de cuivre(II) ($\log K_{\text{Cu-TETA}} = 20,49$ contre $\log K_{\text{Cu-TETP}} = 26,6$), une constante similaire étant obtenue pour le TE2P et le TETP.

Enfin, le TETA permet un radiomarquage quantitatif dans des conditions douces.

En revanche, la stabilité en milieu acide de ces composés, testée à 30°C dans HCl pour le cyclam et le TETA, n'est pas très importante.

C'est à partir de ce constat qu'une autre famille de composés dérivés du cyclam a été développée, possédant un pont entre les azotes 1 et 8 ou 4 et 11 (CB pour Cross-Bridged). Les deux premiers ligands de cette famille sont le CB-Cyclam et le CB-TE2A, possédant un pont éthylène (Schéma I.6).

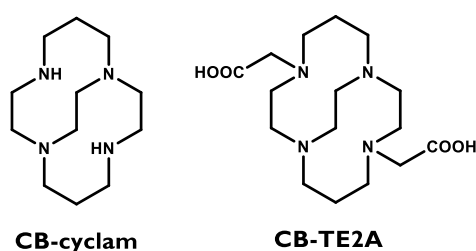


Schéma I.6. Formule du CB-cyclam et CB-TE2A.

Le CB-cyclam ainsi développé possède une constante de formation du complexe identique à celle du cyclam, tandis que celle du CB-TE2A n'a pu être déterminée car trop importante (Tableau I.7).

Ce qui est observé, c'est la forte inertie cinétique en milieu acide par rapport aux ligands et au TETA ne possédant pas ce pont éthylène :

- $t_{1/2}$ (CB-cyclam) = 18,5 jrs (5 M HCl 90°C) contre 2,7 jrs (5 M HCl 30°C) pour le cyclam
- $t_{1/2}$ (CB-TE2A) = 6,4 jrs (5 M HCl 90°C) contre 3,5 jrs (5 M HCl 30°C) pour le TETA.

Ligand	$\log K_{\text{Cu-L}}$	$t_{1/2}$	Conditions radiomarquage	Rendement radiomarquage
CB-Cyclam	27,1 ^{a,44,62}	18,5 jrs (5 M HCl 30°C) ⁴²	75°C, (4,7 % in NaOH /EtOH), 1 h, 10 mM	99 ⁶²
CB-TE2A	-	6,4 jrs (5 M HCl 90°C) ⁴²	95°C, pH 8, 2 h, 10 μM	95 ⁶³

Conditions : 25°C ; $\approx 0,1$ M KCl

Tableau I.7. Propriétés pour le CB-cyclam et le CB-TE2A

Il est néanmoins constaté que le pont éthylène a également pour conséquence la nécessité d'appliquer des conditions fortes pour le radiomarquage, 75°C pendant 1 h pour le CB-cyclam et 95°C pendant 2 h à pH 8 pour le CB-TE2A.

2.4.4 2^{ème} génération de dérivés du cyclam

D'autres dérivés du cyclam plus rigides ont donc été développés de manière à obtenir une bonne inertie cinétique en milieu acide, comme c'est le cas pour le CB-Cyclam et le CB-TE2A, ainsi que la possibilité de former le complexe dans des conditions douces.

Parmi ces composés, plusieurs possèdent une ou plusieurs fonctions acides carboxyliques et phosphoniques.

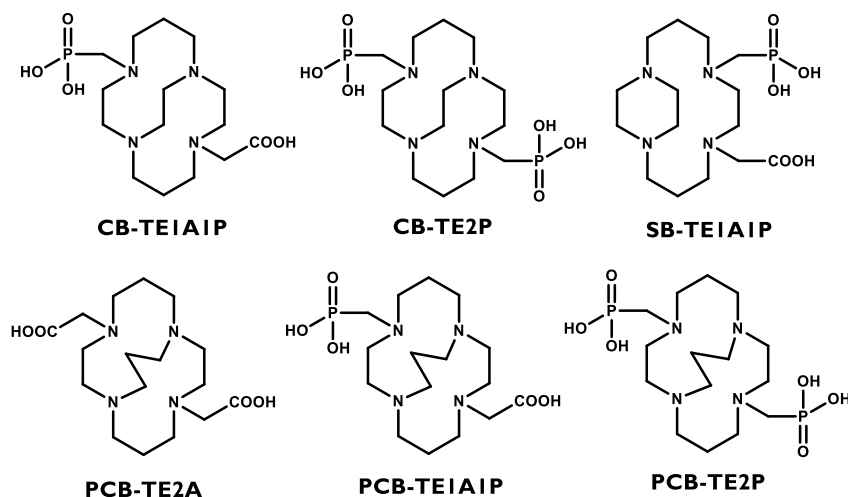


Schéma I.7. Formules chimiques de la 2^{ème} génération de dérivés du cyclam

Les propriétés mentionnées dans le Tableau I.8 concernent l'inertie cinétique en milieu acide et les conditions de radiomarquage nécessaires pour chaque ligand.

Ligand	$t_{1/2}$	Conditions radiomarquage	Rendement radiomarquage
CB-TE2A	6,4 jrs (5 M HCl 90°C) ⁴²	95°C, pH 8, 2 h, 10 μ M	95 ⁴⁵
CB-TE2P ⁶⁵	3,8 h (5 M HCl, 90°C)	t.a, pH 8,1, 30 min, 26,5 μ M	>95
CB-TE1AIP ⁶⁵	6,8 h (5 M HCl, 90°C)	t.a, pH 8,1, 30 min, 26,5 μ M	>95
SB-TE1AIP ⁶⁶		95°C, pH 7,5, 1 h, 2 mM	98
PCB-TE2A ⁶⁷	> 7 jrs (12 M HCl, 90°C)	70°C, pH 8, 60 min, 5 mM	100
PCB-TE2P ⁶⁸	> 2 jrs (5 M HCl, 90°C)	90°C, pH 8, 10 min, 5 mM	100
PCB-TE1AIP ⁶⁹	8 jrs (12 M HCl, 90°C)	60°C, pH 8, 1 h, 25 μ M	95

Tableau I.8. Propriétés des ligands de 2^{ème} génération, dérivés du cyclam

Lorsque l'on compare les ligands CB-TE2A et CB-TE2P, on remarque que l'inertie cinétique du CB-TE2A est remarquable et bien plus élevée que celle du CB-TE2P ($t_{1/2}$ (CB-

TE2P) = 3,8 h (5 M HCl 90°C) contre 6,4 jrs (5 M HCl 90°C) pour le CB-TE2A). A l'inverse, les conditions de radiomarquage du CB-TE2A sont dures et ne peuvent être appliquées en présence de fonctions chimiques fragiles, contrairement au CB-TE2P, qui est marqué à plus de 95 % à température ambiante et en 30 min, à un niveau de dilution important.

Le dérivé CB-TEIAIP combine une fonction carboxylate et une fonction phosphonate. Sa stabilité cinétique est plus importante que le CB-TE2P ($t_{1/2}$ (CB-TE2P) = 3,8 h (5 M HCl 90°C) contre 6,8 h (5 M HCl 90°C) pour le CB-TEIAIP) et il peut être radiomarké dans les mêmes conditions que le CB-TE2P. De plus, il a été reporté que la stabilité *in vivo* du CB-TE2P et du CB-TEIAIP est élevée.⁶⁵

Un ligand similaire au CB-TEIAIP avec un pont éthylène entre les positions 1 et 4, le SB-TEIAIP a également été testé, mais celui-ci requiert des conditions de marquage dure également, 95°C pendant 1 h.

Lorsque le pont éthylène est remplacé par un groupement propylène, l'inertie cinétique en milieu acide des ligands développés, PCB-TE2A, PCB-TE2P et PCB-TEIAIP est nettement améliorée, avec par exemple $t_{1/2}$ = 8 jrs (12 M HCl, 90°C) pour le PCB-TEIAIP contre 6,8 h (5 M HCl, 90°C) pour l'équivalent éthylène. Néanmoins, la cinétique de complexation est plus longue et le radiomarquage de ces ligands est effectué à température élevée.

Ainsi, dans le cas des dérivés du cyclam, la présence de la fonction phosphonate permet non seulement d'augmenter la constante de stabilité du complexe CuL, comme c'est le cas pour les dérivés de première génération, mais elle permet également que la formation des complexes en présence de ⁶⁴Cu soit effectuée dans des conditions douces, conditions nécessaires pour le développement de CBFs.

3. Les bispidines

3.1 Généralités

3.1.1 Historique

Les molécules de type bispidines ont été découvertes la première fois par C. Mannich et P. Mohs⁷⁰ en 1930 et apparaissent comme une sous-unité de la spartéine,⁷¹ molécule naturelle et agent anti-arythmique. Le cycle bispidine correspond à un diazabicyclononane, généralement obtenu avec une fonction cétone et formant ainsi une bispidone, diazabicyclononanone, dont la numérotation usuelle est représentée au Schéma I.8.

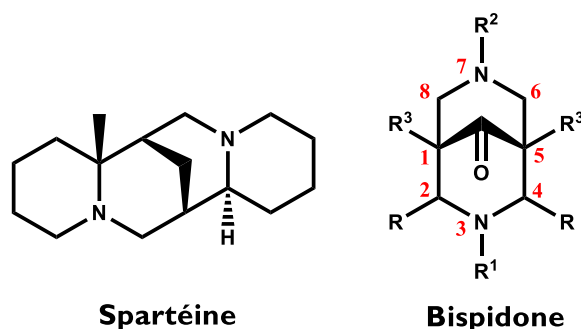


Schéma I.8. Représentation de la spartéine et d'une bispidone.

Le plus souvent, le groupement R correspond à un groupement aromatique coordinant dans le cas de la coordination de métaux (acide picolinique, pyridine, quinoline), le groupement R³ est un groupement électroattracteur, généralement un ester méthylique. Les groupements R¹ et R² sont l'objet d'une optimisation qui dépend de la fonction recherchée pour la bispidine. De nombreuses fonctions ont été introduites, tels que des chaînes alkyles, des aromatiques ou des carboxylates.

Historiquement, les bispidines ont été développées dans le cadre de la recherche médicale pour leurs propriétés analgésiques.^{72,73,74,75,76,77,78} Dès 1976, les bispidines ont ensuite été mises en évidence comme famille de composés agonistes envers les récepteurs opiacés de type kappa, de par l'étude du composé B1 (Schéma I.9) qui a montré une activité antalgique.⁷² Ces récepteurs sont des récepteurs de neurotransmetteurs largement distribués dans le cerveau. Ils modulent différentes fonctions dans l'organisme comme la réponse à la douleur, au stress et au contrôle des émotions, d'où les propriétés antalgiques d'agonistes de tels récepteurs. Des études par l'équipe de C. Nachtsheim en 1994 ont confirmé cette découverte.⁷⁹ Les ligands B2 et B3 montrent alors une affinité sélective pour ces récepteurs.^{79,80}

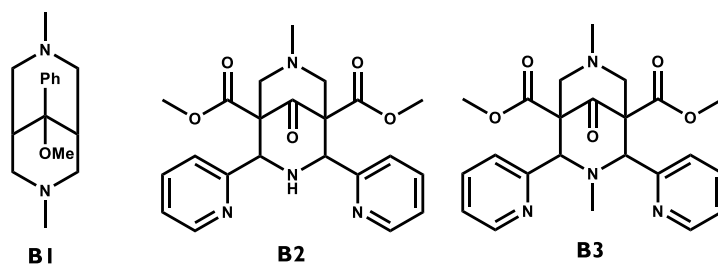


Schéma I.9. Formule des composés B1, B2 et B3

C'est le groupe de P. Comba qui a largement contribué aux développements des bispidines dans le cadre de la complexation des métaux de transition.

En 1971, un complexe de cobalt a d'abord été étudié, il s'agit de $[\text{Co}(\text{B3})(\text{NO}_3)]^+$ où le cobalt est hexacoordiné (l'ion nitrate étant bidentate), une géométrie octaédrique distordue est mise en évidence à partir de la structure cristallographique.⁸¹

Le groupe de R. Hancock mentionne en 1994 la complexation du cuivre par la bispidine B4 (Schéma I.10) non substituée ainsi que sa structure à l'état solide.^{82,83} Par la suite, en 2001, l'équipe de P. Comba présente un complexe de Cu(II) à partir de la bispidine B5 substituée

en position 2 et 4, qui montre que la rigidité du ligand est favorable à la complexation du Cu(II).⁸⁴

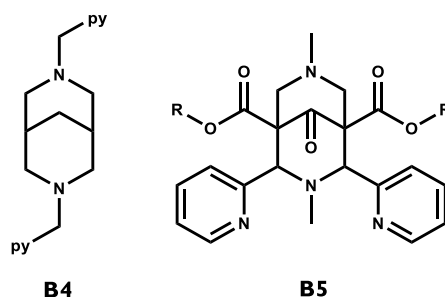


Schéma I.10. Formule des composés B4 et B5

Ces travaux ont introduits de nombreuses études sur la complexation des métaux de transition tels que le Co(II), Ni(II), Zn(II), Fe(II)/(III), Mn(II) ou le Cu(II) par les ligands de type bispidine.⁸⁵ Ces complexes sont étudiés dans le cadre de diverses applications telles que la catalyse^{86,87,88,89,90} ou l'imagerie médicale.^{91,92,93,94,95}

Les bispidines substituées en position 2 et 4 sont l'objet du travail de cette thèse.

3.1.2 Synthèse et stéréochimie

La synthèse des bispidones (9-oxo-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane) s'effectue par deux réactions consécutives de double-Mannich (Schéma I.11).⁹⁶ La première synthèse donne lieu à l'obtention d'un intermédiaire de type pipéridinone à partir d'une cétone énolisable possédant deux groupements électroattracteurs en position β , d'un aldéhyde et d'une amine. La seconde étape donne lieu à l'obtention d'une bispidone à partir d'une seconde amine et de formaldéhyde.

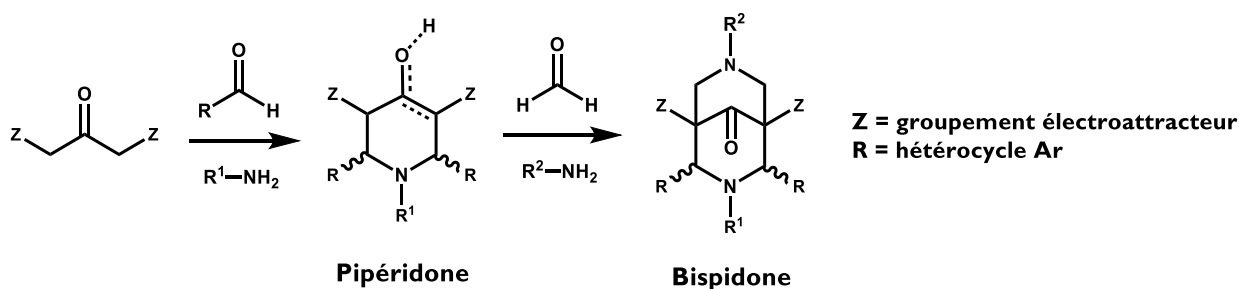


Schéma I.11. Synthèse d'une bispidone

Le rendement de formation de la bispidone, tout comme la stéréochimie de celle-ci dépendent fortement des groupements R, R¹ et R².

Dans le cas de bispidines substituées avec R = 2-pyridyl et R¹ et R² = 2-pyridylméthyle ou 2-(2-pyridyl)éthyle, les rendements de la seconde étape varient de 25 % à 68 % par exemple.⁹⁷

La conformation des bispidones peut varier entre différents cas : chaise-chaise, bateau-chaise, chaise-bateau. La forme bateau-bateau a été déterminée comme défavorable.⁹⁸ De plus, les substituants en position 2 et 4 peuvent se trouver soit en position axiale soit en position équatoriale par rapport au cycle pipéridone. Ainsi ils peuvent se trouver en position

cis ou *trans* l'un par rapport à l'autre (Schéma I.12 sur lequel les groupements Z ne sont pas représentés pour plus de clarté).

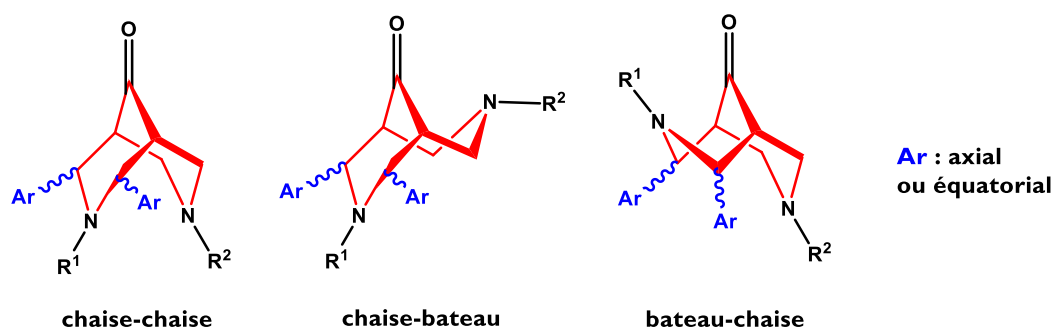


Schéma I.12. Conformation du cycle bispidone

La conformation chaise-bateau est observée lorsque le groupement R^2 est stériquement encombrant comme un *tert*-butyl ou un adamantyl.^{99,100} Cependant, même dans le cas d'un groupement adamantyl, la proportion en composés de conformation chaise-chaise est plus élevée que celle en conformation chaise-bateau.¹⁰¹

La conformation bateau-chaise a été observée pour R^1 = éthyle, propyle, butyle et allyle, cas pour lesquels les substituant en C2 et C4 sont en conformation *trans*.⁷¹ Un cas supplémentaire est mentionné avec une telle conformation, il s'agit de la bispidone pour laquelle $R^1 = R^2 = \text{CH}_2\text{COOEt}$. La stabilité de cet isomère est attribuée à la présence de liaisons hydrogènes faibles qui influencent la conformation générale de la bispidone.⁹⁵ Cette observation confirme le fait que l'encombrement stérique ne permet pas d'expliquer à lui seul la conformation de la bispidone, puisque des chaînes alkyles plus longues ont été introduites en R^1 sur des bispidones demeurant en conformation chaise-chaise.¹⁰²

De plus, la position de l'hétéroatome sur le cycle aromatique génère également des isomères de structures. Par exemple, avec Ar = 2-pyridyl la position de l'atome d'azote par rapport au cycle pipéridone génère des isomères *syn* ou *anti* (Schéma I.13).⁷¹

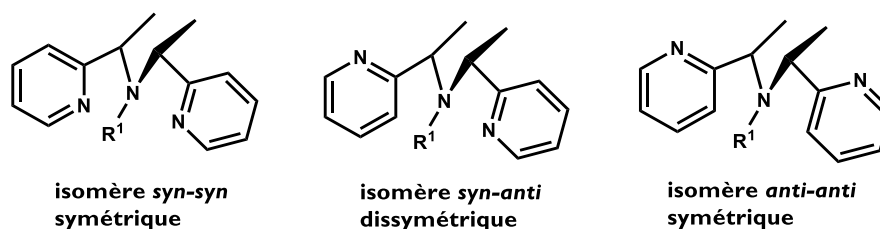


Schéma I.13. Isomères de structure

Du fait de l'application visée par ce travail de thèse, à savoir la complexation du $^{64}\text{Cu(II)}$, la conformation qu'il est nécessaire d'obtenir pour la coordination du cuivre est la conformation chaise-chaise avec les substituants R en position *cis*. De cette façon, le squelette bispidine est pré-organisé et rigide, ce qui améliore la stabilité du complexe de Cu(II).

Dans les deux parties suivantes de cette introduction sur les bispidines, nous allons nous concentrer sur les bispidines développées ces 3 dernières années (partie 3.2). Il s'agit ici de décrire les travaux effectués sur les bispidines substituées en position 2 et 4 quelle que soit leurs applications ou de bispidines appliquées à l'imagerie nucléaire. Ensuite, les diverses bispidines fonctionnalisées connues à ce jour seront décrites (partie 3.3).

3.2 Nouveaux chélatants de type bispidine

3.2.1 « Bispidine dioxotetraaza macrocycles: a new class of bispidines for ^{64}Cu PET imaging »

Le groupe de Peter Comba a développé trois nouvelles bispidines dioxotetraaza et a étudié leurs propriétés.¹⁰³

a) Synthèse

De par l'effet macrocyclique et du fait que les ligands macrocycles dioxotetraaza possèdent deux amides déprotonés donneurs d'électrons, ceux-ci forment des complexes de Cu(II) très stables et neutres. L'équipe de P. Comba a cherché à combiner ces propriétés à la rigidité du squelette des bispidines.

La synthèse des trois composés H₂B1, H₂B2 et H₂B3 a donc été développée, à partir du bis(α -chloroacétamide) et de la 5,7-diméthyle-3,7-diazabicyclononane (Schéma I.14).

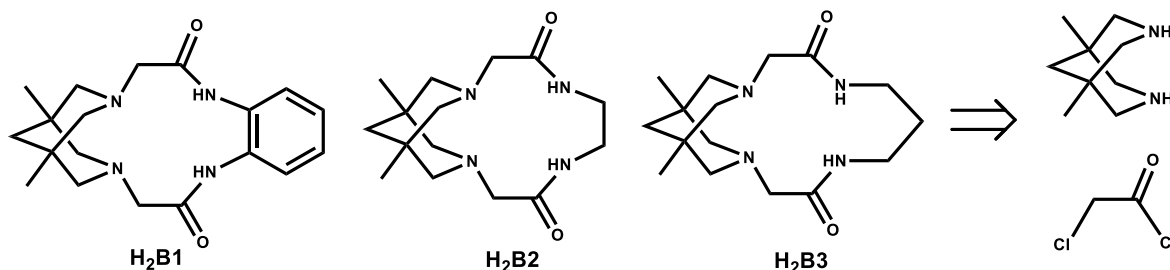


Schéma I.14. Schéma des ligands synthétisés

b) Structure

Les structures de ces 3 ligands (Figure I.6) ont été obtenues par diffraction des rayons X.

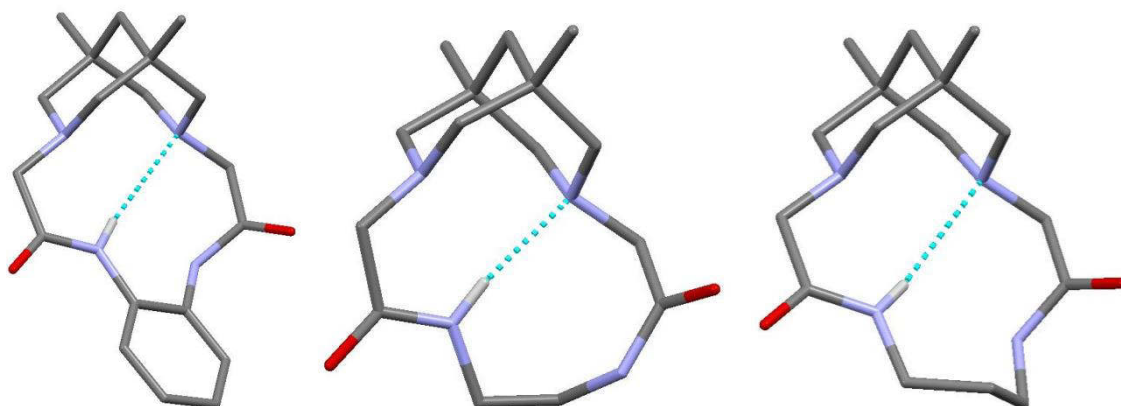


Figure I.6. Structure RX des ligands H₂B1, H₂B2, H₂B3, de gauche à droite (pointillé bleu : liaisons hydrogènes)

Elles révèlent une liaison hydrogène avec le proton de l'une des fonctions amide avec l'azote opposé. La position de l'hydrogène de la seconde fonction amide est proximale par rapport au plan moyen formé par les 4 azotes. Le ligand H₂B1 est montré comme le plus rigide des trois ligands mais en termes de taille de cavité, le ligand H₂B3 semble le meilleur candidat pour la complexation du cuivre.

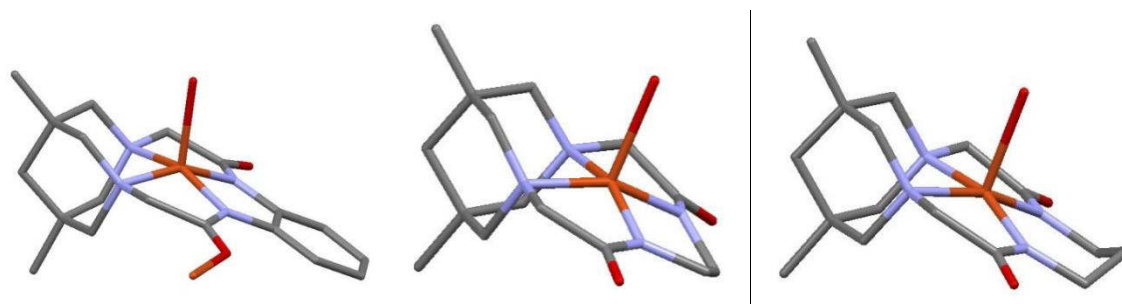


Figure I.7. Structure RX des complexes CuB1(H₂O), CuB2(H₂O), CuB3(H₂O), de gauche à droite,

Concernant la structure des complexes, il est noté que dans le cas de H₂B1 et H₂B2, le cuivre n'est pas situé dans le plan formé par les 4 azotes, du fait que ces deux ligands sont des macrocycles à 12 atomes, légèrement trop petits pour le Cu(II). Ce phénomène est moins présent pour H₂B3 qui est un macrocycle à 14 atomes.

Tous ont une géométrie pyramidale à base carrée avec une molécule d'eau présente en position apicale.

c) Propriétés électroniques

Les spectres UV-visibles de ces complexes ont été mesurés dans du méthanol, où les transitions des bandes d-d ont été observées. Une différence marquante est notée entre la bande d'absorption maximale des complexes CuB1(H₂O), CuB2(H₂O) (macrocycles à 12 atomes) et CuB3(H₂O) (macrocycle à 14 atomes) puisque dans ce dernier cas, la bande des transitions d-d est déplacée d'environ 2 000 cm⁻¹ vers une plus basse énergie. Ceci est

attribué au fait que les liaisons avec le cuivre sont plus longues dans ce cas et donc que le champ du ligand est plus faible.

d) Propriétés rédox

Les potentiels rédox du couple Cu(II)/Cu(I), visibles uniquement dans la DMF, sont tous inférieurs à -2 V (vs $K_3[Fe(CN)_6]$), ce qui montre une forte stabilisation du Cu(II) par chacun de ces ligands.

De plus, il est montré que l'énergie nécessaire à oxyder Cu(II) évolue dans l'ordre suivant $B2 < B1 < B3$, montrant que le ligand avec le pont éthylène stabilise le plus le Cu(III). Les potentiels rédox dans le cas du couple Cu(III)/Cu(II) ont été mesurés dans différents solvants. Dans l'eau, les potentiels sont de 219, 71 et 418 mV (vs Ferrocène/Férricinium⁺) pour les ligands B1, B2 et B3 respectivement.

e) Radiochimie

Des essais de radiomarquage en présence de $^{64}Cu(II)$ suivis par radio-CCM ont montré qu'à température ambiante dans un tampon MES/NaOH à pH 5,5, le radiomarquage n'est pas mis en évidence. En revanche, à pH 6,5 et à 50°C, le rendement de radiomarquage est supérieur à 95 % pour les trois ligands (100 µg ligand/100µL MES/NaOH).

L'activité spécifique est de 26 GBq/µmol pour $^{64}CuB1$ et de 22 GBq/µmol pour $^{64}CuB2$ et $^{64}CuB3$.

f) Essais de stabilité

La stabilité des complexes radiomarqués est testée en présence d'un excès (3 équivalents) de l'enzyme superoxide dismutase (SOD) humaine et en sérum humain.

Le plus stable des trois complexes est le complexe $^{64}CuB1$ avec, après 1 h d'incubation à 37°C, (1,5 ± 0,5) % de transchelation dans le sérum SOD et (2,3 ± 0,9) % en sérum humain. Ceci montre que la rigidité du ligand est importante pour la stabilité du complexe.

g) Lipophilie

Le coefficient de partition dans le mélange biphasique octanol-eau à pH physiologique ($\log D = \frac{[composé]_{octanol}}{[composé]_{eau}}$) permet d'avoir une idée de la lipophilie ou de l'hydrophilie d'un complexe est de prédire ainsi le type de tissus dans lequel celui-ci sera accumulé et par quelle voie il sera extrait. Les log D ont été mesurés à pH 7,4 et ils sont de -2,22, -2,33 pour CuB3 et CuB2 et de 0,21 pour CuB1. Il est constaté que la présence du groupement benzyle pour B1 rend son complexe de Cu(II) légèrement lipophile contrairement aux complexes CuB3 et CuB2 qui sont hydrophiles.

h) Bio-distribution

Des tests de bio-distribution dans le rat ont été effectués sur le complexe $^{64}CuB1$. Ils montrent, 5 min après injection, une accumulation prédominante de l'activité dans les reins, le foie et l'intestin. Plus de la moitié de la dose injectée est d'ores et déjà éliminée via le

système hépato-biliaire. Une accumulation significative est également notée au niveau des tissus adipeux blanc.

Après 1 h \pm 6) % de l'activité se situe dans les intestins et après 24 h, la quasi-totalité de l'activité est éliminée de l'organisme. Cette élimination rapide du complexe radiomarqué montre une bonne stabilité du $^{64}\text{CuBI}$ dans l'organisme.

3.2.2 « Fluorous bispidine: a bifunctional reagent for copper-catalyzed oxidation and Knoevenagel condensation reactions in water »

Le groupe de Y. Lam a développé en 2015 des bispidines fluorées comme catalyseur dans le tandem oxydation aérobie/condensation de Knoevenagel.¹⁰⁴

a) Présentation du contexte

Cette publication concerne l'évaluation des bispidines fluorées sous forme de complexes de cuivre comme catalyseur pour l'oxydation d'alcool benzylique ou allylique ainsi que des liaisons C-H de carbones sp^3 allylique. Aussi, les bispidines sont évaluées en tant que catalyseur (base) dans une réaction de condensation de Knoevenagel. En effet, la basicité des amines des bispidines semble pouvoir agir au niveau de la condensation de Knoevenagel des malononitriles. Les bispidines peuvent ainsi jouer le rôle d'éponges à protons. Typiquement, les bases impliquées dans la condensation de Knoevenagel sont NaOH, NaOEt ou la pipéridine mais dans tous les cas, elles ne sont pas récupérables du fait de la formation de beaucoup de déchets.

Les bons rendements et la régénération du catalyseur ont permis de les utiliser en tant que réactifs bifonctionnels dans le tandem oxydation/condensation de Knoevenagel.

Cette étude s'inscrit dans une démarche de chimie verte et la récupération du catalyseur par extraction sur phase solide est considérée. De ce point de vue, l'intérêt est de pouvoir effectuer des séquences réactionnelles en one-pot sans traitement ni purification entre deux synthèses.

b) Synthèse

La synthèse des bispidines est effectuée selon des procédures connues pour ce genre de composé (Schéma I.15).

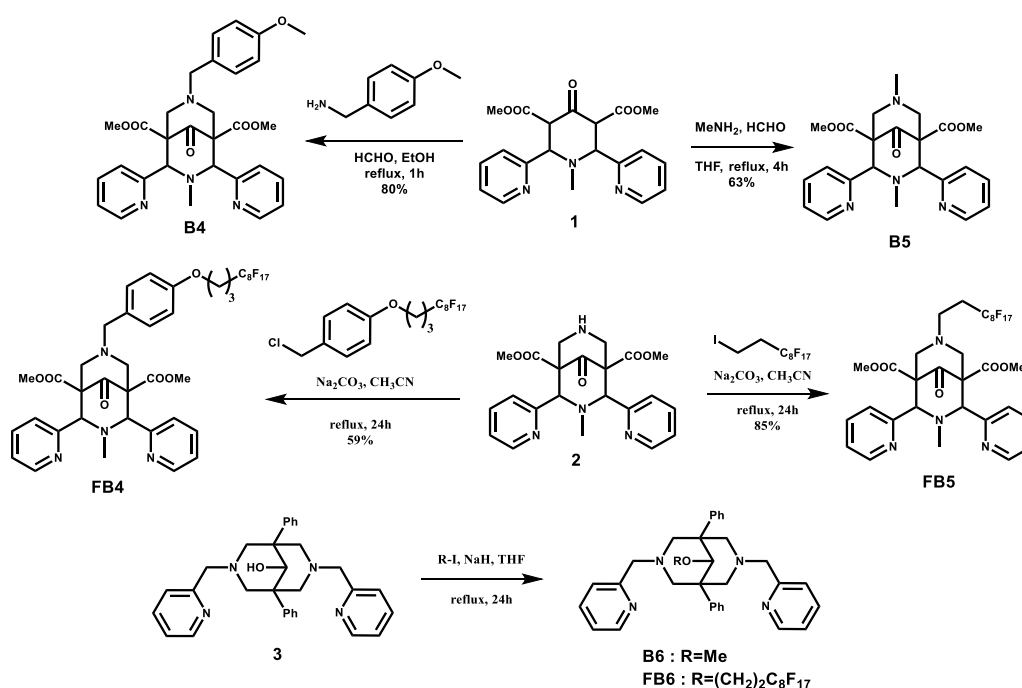


Schéma I.15. Schéma des synthèses des bispidines de cette publication

Les synthèses de B4 et B5 sont effectuées par une réaction de Mannich à partir de 1, en présence de formaldéhyde et d'une amine primaire correspondant à la bispidine souhaitée. Les bispidines FB4 et FB5 sont synthétisées à partir de la bispidine 2 par substitution nucléophile de l'amine secondaire sur un dérivé halogéné. Les bispidines B6 et FB6 sont obtenues par alkylation de type Williamson sur la bispidine 3.

Chaque bispidine est synthétisée ainsi que la bispidine fluorée correspondante.

c) Oxydation aérobie

Les premiers tests sont effectués sur l'alcool benzylique primaire 4 pour obtenir l'aldéhyde correspondant 5 (Schéma I.16).

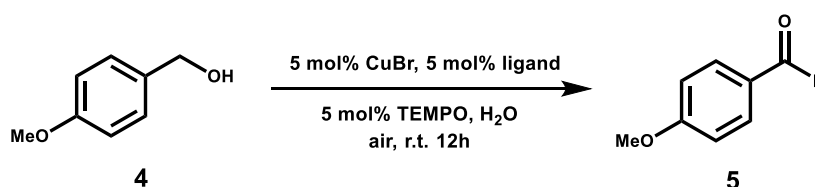


Schéma I.16. Schéma général de l'oxydation aérobie de 4

Le meilleur résultat est obtenu avec la bispidine FB5 comme catalyseur, avec un rendement de 90 % dans ces conditions. Sans catalyseur, la même réaction a donné un rendement de 57 % avec 13 % de composé de départ récupéré. L'influence de FB5 est donc nette.

Le temps de réaction optimal à température ambiante est de 5 h, le même rendement étant obtenu après 2 h à 50°C. Des essais sur d'autres alcools benzyliques (p-nitro ; p-O-allylique, p-chloro), dans les mêmes conditions, avec FB5 comme catalyseur, avec toutefois des temps de réaction variables (de 5h à 24h, le plus souvent < 10 h) ont démontré des rendements également satisfaisants. Cela montre que ces conditions sont applicables avec des groupements divers sur le cycle benzylique.

Du fait de la présence du fluor, la récupération du catalyseur peut être envisagée par F-SPE (Fluorous - Solid Phase Extraction qui utilise une phase stationnaire fluorée) en fin de réaction et jusqu'à 94 % du catalyseur a été récupéré.

Sur des alcools benzyliques secondaires, un chauffage à 50°C ainsi que des temps de réaction plus long (> 12h) est nécessaire puisque ces composés sont moins réactifs. Ceci leur a permis de tester la sélectivité de la réaction entre des alcools primaires et des alcools secondaires (Schéma I.17).

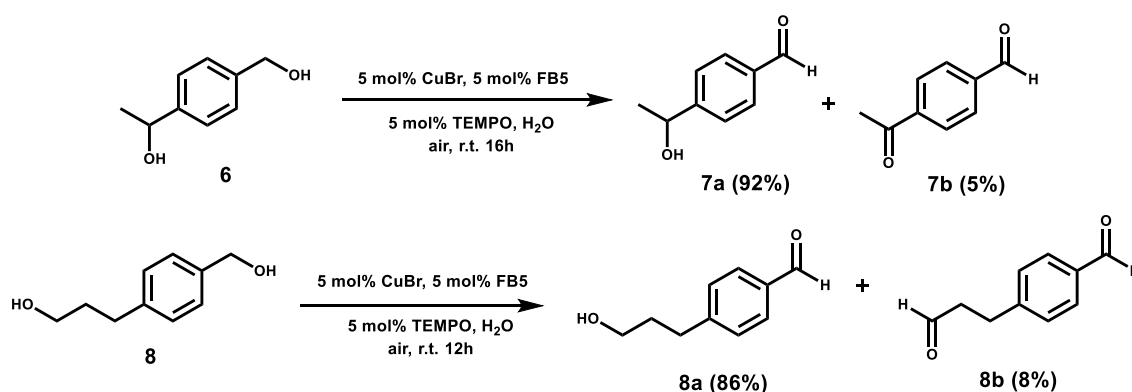


Schéma I.17. Test de sélectivité sur les alcools primaires

A partir du composé 6, possédant un alcool primaire et un alcool secondaire, la réaction a été effectuée pendant 16h à température ambiante. 92 % du composé 7a, sur lequel l'oxydation n'a eu lieu que sur l'alcool primaire, est obtenu contre 5 % pour 7b, doublement oxydé.

Le groupe a ensuite déterminé (Schéma I.18) les conditions optimales pour l'oxydation de liaison C-H de carbone sp³ en position allylique ou benzylique.

Dans les deux cas, la réaction d'oxydation se déroule en présence de 5 équivalents de *tert*-Butyl hydroperoxide (T-hydro) en tant qu'oxydant, de 5 mol% de CuI comme sel de cuivre, de 5 mol% de ligand, dans l'eau et à température ambiante pendant 12 h et des rendements de 69 à 90 % ont été obtenus.

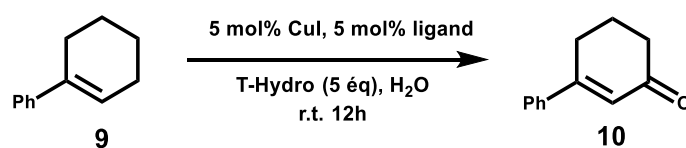


Schéma I.18. Schéma général de l'oxydation de 9

Le ligand FB4 est le plus efficace dans ces conditions.

De même que précédemment, la récupération du catalyseur a été faite par F-SPE et 97 % de celui-ci a pu être récupéré.

d) Condensation de Knoevenagel

La preuve de concept a été effectuée à partir de la réaction du benzaldéhyde avec le malononitrile en présence d'une bispidine éponge à proton. Les ligands B4, B5 et FB5 ont été testés et les conditions optimales déterminées sont les suivantes : en présence de 1 mol% de FB5, 40°C, 2 h avec un rendement de 96 %. La récupération du catalyseur est donc facilitée par le fait que le catalyseur le plus efficace soit une bispidine fluorée.

Des réactions dans les conditions mentionnées au Schéma 1.19 ont été faites avec divers composés, quelques-uns sont annotés dans le Tableau 1.9.

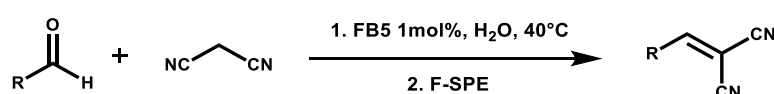


Schéma 1.19. Schéma général de la condensation de Knoevenagel étudiée

Pour le 4-nitrobenzaldéhyde une diminution du rendement est observée. Elle est attribuée à la présence d'un groupement électro-attracteur en position para. Dans le cas de l'aldéhyde avec un groupement cyano en position meta, le rendement est supérieur à 90 %.

Aldéhyde	Produit	Temps (h)	Rendement (%)
		2	96
		2	71
		2	94
		2	91
		2	79
		2	88

Tableau 1.9. Essais généralisés sur différents aldéhydes

Les aldéhydes allyliques ou aliphatiques donnent également de très bons résultats.

La modification d'un des groupements cyano du malononitrile par un ester éthylique n'a pas altéré la réussite de la réaction, puisqu'un rendement de 94 % est obtenu dans les mêmes conditions.

e) Tandem oxydation/knoevenagel condensation

Enfin, les deux réactions précédemment développées ont été mises en place. Dès lors que la réaction d'oxydation aérobie était terminée, montré par CCM, le composé malononitrile était alors ajouté au milieu réactionnel et la réaction était poursuivie dans les conditions de la réaction de Knoevenagel (Schéma I.20)

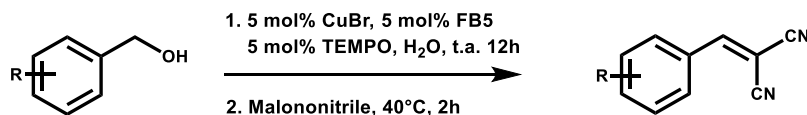


Schéma I.20. Synthèse tandem oxydation/condensation de Knoevenagel

La réaction a été effectuée sur plusieurs substrats (Tableau I.10).

Aldéhyde/cétone	Produit	Temps (h)	Rendement (%)
		5	79
		24	49
		5	80
		13	66
		12 + 6 (étape 2)	42

Tableau I.10. Essais de la réaction tandem sur différents substrats

La réaction est un succès, avec des alcools benzyliques possédant des groupements électro-attracteurs ou électro-donneurs. Elle est constaté comme étant moins efficace pour le dérivé nitro ou l'alcool benzylique secondaire phényle-éthanol qui ont été obtenus avec des rendements de 49 % et 42 % respectivement sur les deux étapes.

Les rendements globaux sont proches ou légèrement inférieurs aux rendements mentionnés pour certains de ces produits dans d'autres conditions, n'utilisant pas les bispindines comme catalyseur.

Néanmoins, des conditions plus respectueuses de l'environnement ont été développées par cette étude.

Un dernier point concerne la récupération et la ré-utilisation des catalyseurs FB4 et FB5. Plusieurs réactions successives sont effectuées avec ces catalyseurs. Ils sont récupérés à la fin de chacune et ré-utilisés dans la suivante avec des rendements de récupération du catalyseur

compris entre 92 et 97 %. Seule une faible baisse de l'efficacité du catalyseur est observée après 5 utilisations successives (les rendements de réaction diminuent d'environ 5 %).

3.2.3 « Synthesis and transition metal coordination chemistry of a novel hexadentate bispidine ligand »

Le groupe de P. Comba a présenté en 2015 une nouvelle bispidine hexadentate. La chimie de coordination avec divers métaux de transition est étudiée.¹⁰⁵

a) Synthèse

Pour la synthèse du nouveau composé présenté par l'équipe de P. Comba, 2 voies ont été empruntées. La première est la voie classique, c'est-à-dire une réaction de Mannich à partir d'une pipéridone (Schéma 1.21). Le composé 2 est préalablement synthétisé à partir de la bis-pyridyl cétone 1.

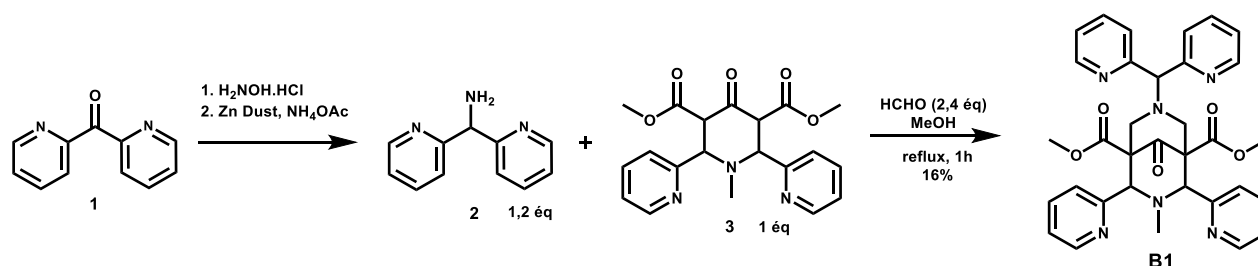


Schéma 1.21. Synthèse de B1 – voie 1

Le rendement de la réaction de Mannich menant au composé B1 est de 16 %.

La deuxième voie consiste à obtenir une bispidone avec un hydrogène en R2 pour ensuite obtenir B1 par alkylation (Schéma 1.22). Le composé 6 est préalablement synthétisé à partir de la bis-pyridyl cétone 1.

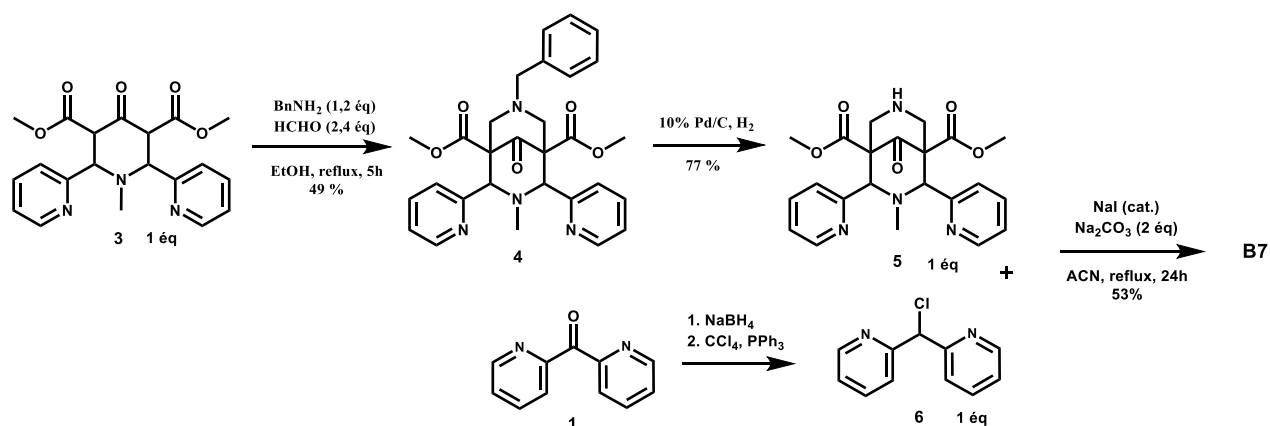


Schéma 1.22. Synthèse de B1 – voie 2

Le rendement de l'alkylation sur la bispidone 5 est de 53 %, soit bien plus avantageux que par la voie I.

Pour des raisons de stabilité, la bispidone B1 est réduite en bispidol B2 en présence de tétraborohydrure de sodium, avec un rendement de 93 % (Schéma I.23).

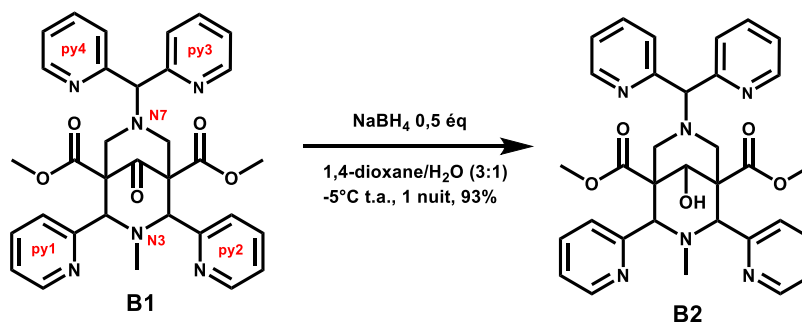


Schéma I.23. Réduction de B1

b) Complexes de cuivre

Les structures des complexes $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^{2+}$ et $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^{2+}$ sont obtenues par diffraction des rayons X. Elles sont représentées sur la Figure I.8.

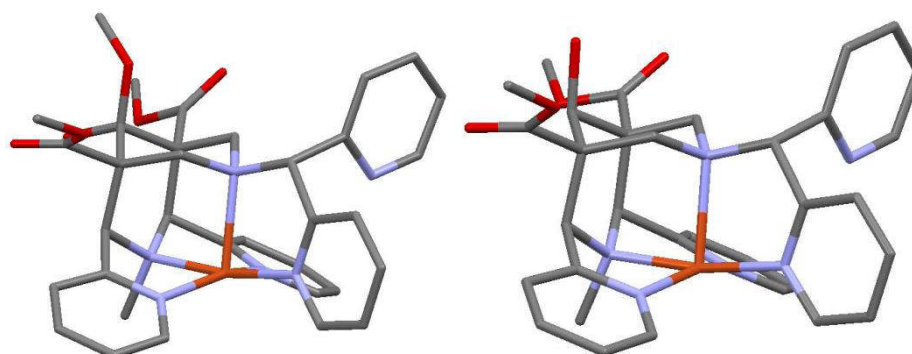


Figure I.8. Structure des complexes $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^{2+}$ (gauche) et $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^{2+}$ (droite)

Dans les deux cas, le cuivre est pentacoordonné, avec un fluor du tétrafluoroborate en interaction avec le cuivre. On observe la position extérieure d'un groupement pyridine avec toutefois le cycle pyridine orienté vers le $\text{Cu}(\text{II})$, montrant que la charge du cuivre influence la rotation du cycle pyridine.

Il est montré pour ces deux complexes de cuivre que l'axe Jahn-Teller est selon la liaison Cu-N7 , plus longue ($\approx 2,23 \text{ \AA}$) que les autres liaisons Cu-X ($\text{X} = \text{atome coordiant}$), de l'ordre de 2 \AA . La distorsion de la géométrie du complexe est principalement liée à l'angle entre py1-Cu-py3 particulièrement faible et à l'angle py1-Cu-N7 . Ces éléments indiquent que la distorsion est liée à la présence du cycle py4 qui augmente la contrainte de la structure ($d_{\text{Cu-py4}} = 3,85 \text{ \AA}$).

Il est mentionné dans cette publication qu'au vu des propriétés très similaires entre ces complexes et d'autres précédemment synthétisés, la structure en solution est identique de celle en phase solide : pyramide à base carrée avec une faible interaction avec le cycle py4 .

Au niveau du potentiel rédox, du fait que la réduction implique une légère diminution du champ du ligand qui déstabilise un peu la coordination du Cu(II), on retrouve un potentiel rédox plus positif pour $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^{2+} = -459 \text{ mV}$ que pour $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^{2+} = -515 \text{ mV}$ (vs Ag/AgCl dans l'eau).

A partir de la corrélation établie par les auteurs¹⁰⁶ entre le potentiel rédox et les constantes de stabilité du cuivre(II) pour cette série de complexes, les constantes de stabilité prédites pour ces deux ligands sont les suivantes : $\log K([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^{2+}) = 16,0$ et $\log K([\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^{2+}) = 16,3$.

c) Complexes de fer

Dans le cas des complexes de Fe(II), dont les structures sont représentées Figure I.9. La coordination octaédrique du fer est complétée par un ion Cl^- dans le cas du complexe avec B1 et par une molécule de MeOH dans le cas de B2, tous deux en position *trans* par rapport à N7. L'influence du groupement pyridine py4 est d'autant plus forte, avec cette fois $d_{\text{Fe-py4}} = 3,03 \text{ \AA}$. Etant donné cette distance, ce groupement est considéré comme semi-coordinant.

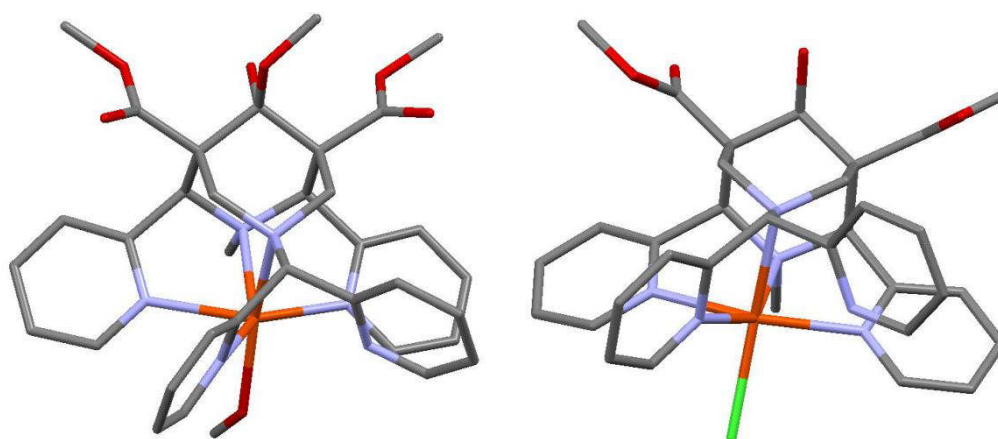


Figure I.9. Structure des complexes $[\text{Fe}(\text{B1})\text{OHMe}]^{2+}$ (gauche) et $[\text{Fe}(\text{B2})\text{Cl}]^+$ (droite)

Cette interaction entre py4 et le fer, tend à augmenter la distance Fe-N7 et donc à diminuer la distance Fe-N3, comme précédemment pour les complexes de cuivre. De plus, la présence proche de py4 accentue l'asymétrie vis-à-vis de la coordination des groupements py1 et py2 (angles py1-Fe-py3 proche de 85° contre 140° pour l'angle py2-Fe-py3).

La structure d'un complexe de Fe(III) avec L a également été obtenue au cours de ce travail. Elle confirme une géométrie octaédrique distordue similaire aux complexes de Cu(II). Une liaison courte de $1,79 \text{ \AA}$ est notée entre le coligand anionique MeO^- et le Fe(III).

d) Complexe de manganèse

Le complexe $[\text{Mn}^{\text{II}}(\text{B1})(\text{Cl})]^{2+}$ a été obtenu par l'équipe de P. Comba ainsi que sa structure par diffraction des rayons X. Deux structures indépendantes sont présentes (Figure I.10) et ont toutes deux été pleinement caractérisées.

Une différence importante par rapport aux complexes de cuivre et de fer, est que cette fois, le Mn^{II} est heptacoordiné et que la structure du complexe est une bipyramide à base pentagonale, comme les angles mesurés le confirment. Cette fois, la liaison entre le cycle py4 est plus courte et considérée comme une liaison, $d_{Mn-py4} = 2,53 \text{ \AA}$ et $2,65 \text{ \AA}$ pour les deux structures.

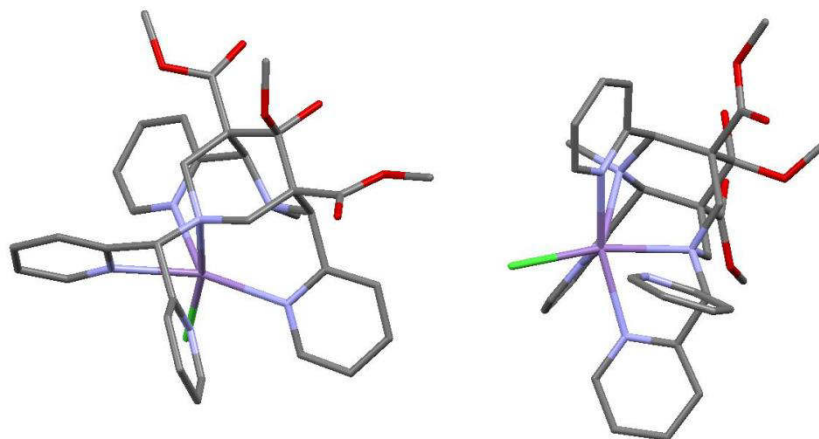


Figure I.10. Structures du complexe $[Mn^{II}(BI)(Cl)]^{2+}$

La distorsion principale sur ces structures concerne la position de N3 (angle N3-Mn-N7 aigu) et des cycles py3 et py4 (cycles chélates impliquant N7 particulièrement tendus), qui se retrouvent au-dessus du plan équatorial moyen.

3.2.4 « Kinetically inert bispidol-based Cu(II) chelate for potential application to $^{64/67}Cu$ nuclear medicine and diagnosis »

Le groupe de L. Charbonnière a présenté en 2015 la synthèse et la caractérisation de 3 nouvelles bispidines.⁹³

a) Synthèse

La synthèse des bispidones $I_{9,10}$ a été effectuée via une réaction de double-Mannich. A partir de cela, deux conditions de réductions différentes ont abouti à la synthèse de 2_1 dont un des groupements ester a été réduit également (10 éq $NaBH_4$ à $0^\circ C$) et des bispidols $2_{2,3}$ (1,5 éq $NaBH_4$ à $-77^\circ C$) (Schéma I.24).

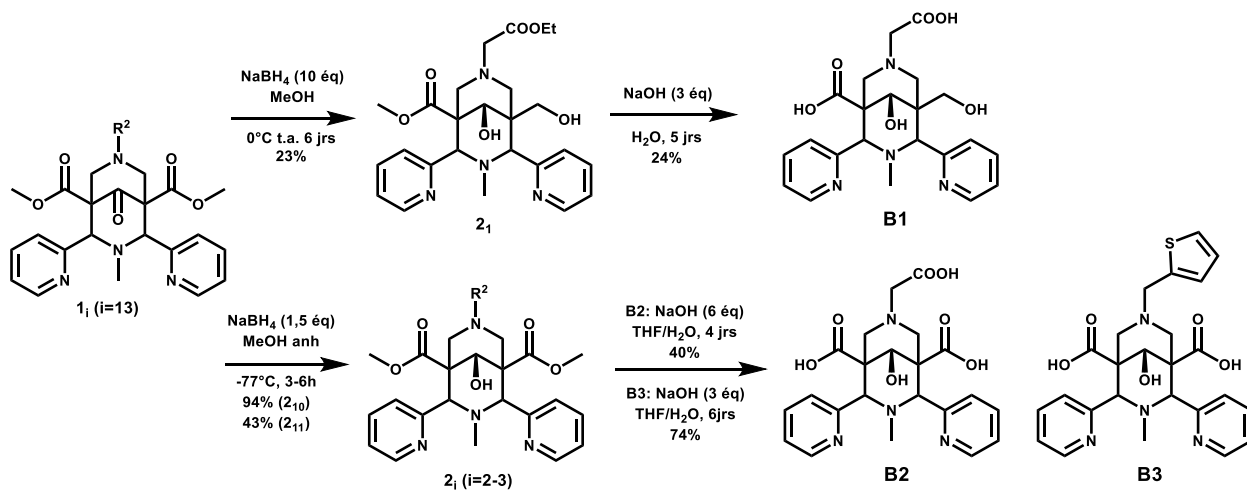


Schéma I.24. Synthèse des nouvelles bispidines B1, B2 et B3.

Après saponification, les bispidines B1, B2 et B3 sont décrites. La stéréochimie de la réduction ainsi que la conformation des trois bispidines sont déterminés par une étude RMN. Dans les trois cas, l'alcool pointe vers N₃ et les bispidines sont en configuration *cis* chaise-chaise.

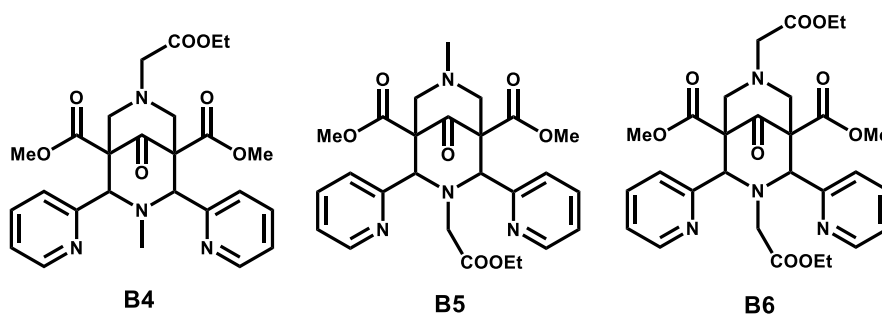


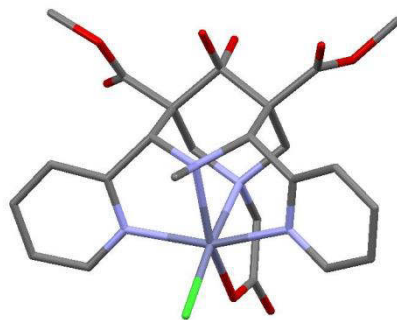
Schéma I.25 Formules chimiques des ligands B4, B5 et B6

Par la suite, une caractérisation concernant les ligands B4, B5 et B6 est également effectuée. La synthèse des bispidones B5 et B6 conduit à une conformation bateau-chaise.

b) Complexe Zn(II)

La coordination avec le Zn(II) des ligands B1-B6 a été effectuée et une première étude RMN dans le MeOD a été effectuée. Dans le cas de B5 et B6, du fait de leur conformation, l'étude a montré la présence de multiples espèces. Pour les autres ligands, l'étude RMN est cohérente avec la présence d'une seule espèce. Du fait de la coordination avec le Zn(II), une modification importante des déplacements chimiques de certains protons est observée. Dans le cas de B4, une hydrolyse sélective de l'ester éthylique est observée lors de la coordination du zinc.

Les cristaux du complexe [Zn(B4)(Cl)] ont été obtenus par évaporation lente de MeOH. La structure à l'état solide est représentée sur la Figure I.11.

Figure I.11. Structure du complexe $[Zn(B4)(Cl)]$

Le Zn(II) est hexacoordiné avec le cycle bispidine, un groupement carboxylate et également un ion chlorure. La géométrie du complexe est octaédrique distordue.

c) Etudes physico-chimiques

Dans un premier temps, les constantes de protonation des ligands B1 et B3, possédant chacun 6 sites de protonation, ont été déterminées par la combinaison de titrages potentiométriques et spectrophotométriques. Dans des conditions très acide, $0 < \text{pH} < 2$, la technique du titrage en batch a été appliquée.

Pour chacun des deux ligands, 4 constantes ont été déterminées et une attribution est proposée (Tableau I.11).

$\log K_n^H$	B1	B3	Attribution
$\log K_1^H$	> 12	> 12	Ntert
$\log K_2^H$	10,6(6)	11,8(2)	
$\log K_3^H$	4,5(1)	3,6(1)	COOH
$\log K_4^H$	2,0(2)	2,3(3)	
$\log K_5^H$	0,82(1)	0,62(7)	Pyridines
$\log K_6^H$	< 0,82	< 0,62	

Tableau I.11. Constantes de protonation des ligands B1 et B3

Ainsi par ce travail, l'équipe de L. Charbonnière a montré qu'à pH physiologique, seule une espèce est présente en solution dans le cas de chacun des ligands, $B1H_2$ et $B3H_2$.

Constante de stabilité des complexes

La formation du complexe de cuivre pour la bispidine B1 est suivie par un titrage spectrophotométrique en batch pour un $\text{pH} < 2$. La formation du complexe est complète dès $\text{pH} = 1,3$. La position de la bande d'absorption des transitions d-d suggère que le complexe possède une géométrie pyramidale à base carrée.

Les constantes de stabilité des complexes de Zn(II), Ni(II) et Co(II) ont également été déterminées pour évaluer la sélectivité de B1 pour le Cu(II) par rapport aux autres métaux de transition. Ces complexes ont également été caractérisés par potentiométrie.

Différentes formes sont observées en fonction du pH (protonation du complexe, formation d'hydroxyde). Les constantes associées à ces espèces sont résumées dans le Tableau 1.12.

cste stabilité ^a	Cu	Zn	Ni	Co
$\log \beta_{\text{MBI}}$	19,2(3) ^b	14,45(2) ^c	12,2(3) ^{b,c}	11,1(2) ^{b,c}
$\log \beta_{\text{MBIH}}$			16,7(2) ^{b,c}	15,02(3) ^c
$\log \beta_{\text{MBIOH}}$			3,4(4) ^{b,c}	

^a $[\text{M}] = 0,1 \text{ M}$; $T = 25,0^\circ\text{C}$; ^bspectrophométrie ; ^cpotentiométrie

Tableau 1.12 Constantes de stabilité des complexes MBI (M = Cu, Zn, Ni, Co)

Ce travail permet de montrer la bonne sélectivité de BI pour le Cu(II) comparé au Zn(II) > Ni(II) > Co(II), en accord avec la série d'Irving-Williams. L'espèce CuBI, est l'espèce majoritaire dans toute la gamme $2 < \text{pH} < 12$.

Electrochimie du complexe CuBI

Le potentiel de réduction du Cu(II) en Cu(I) est mesuré dans l'eau pour le complexe CuBI, de sorte à s'assurer qu'il est inférieur à -0,4 V (vs ENH), potentiel réducteur seuil *in vivo*.

Dans le cas de CuBI, le potentiel de réduction est de -0,56 V vs ENH, assurant une bonne stabilisation du Cu(II) par la bispidine BI. De plus, la quasi-réversibilité de la réaction électrochimique est montrée entre $4,3 < \text{pH} < 9,3$.

La dissociation du Cu(I) n'est observé que pour un $\text{pH} = 2,38$.

Inertie cinétique

De manière à évaluer le ligand BI comme potentiel radiopharmaceutique, sa cinétique de dissociation est suivie dans une solution 5 M HClO₄ à 25°C et suivi par spectrophotométrie UV-visible. Le temps de demi-vie du complexe CuBI dans ces conditions est de 110 jrs et de 140 jrs pour CuB3.

Ces temps de demi-vie indiquent un haut degré de stabilité dans un milieu acide.

3.2.5 « Synthesis and coordination chemistry of hexadentate picolinic acid based bispidine ligands »

Dans cette publication, le groupe de P. Comba présente la synthèse de deux nouvelles bispidines possédant chacune une fonction acide picolinique comme groupement coordinant.¹⁰⁷ La complexation du Cu(II) est testée ainsi que plusieurs autres métaux de transition. Du fait de l'introduction d'un oxygène donneur, la complexation avec le Ga(III) est également étudiée.

a) Synthèse

La synthèse des bispidines BI et B2 est effectuée à partir des composés 2 et 5 dont les synthèses sont décrites (Schéma 1.26). Le dérivé picolinate I est obtenu par estérification de

l'acide méthyl picolinique avec le *tert*-butyl trichloroacétamide puis par bromation radicalaire avec le N-bromosuccinimide.

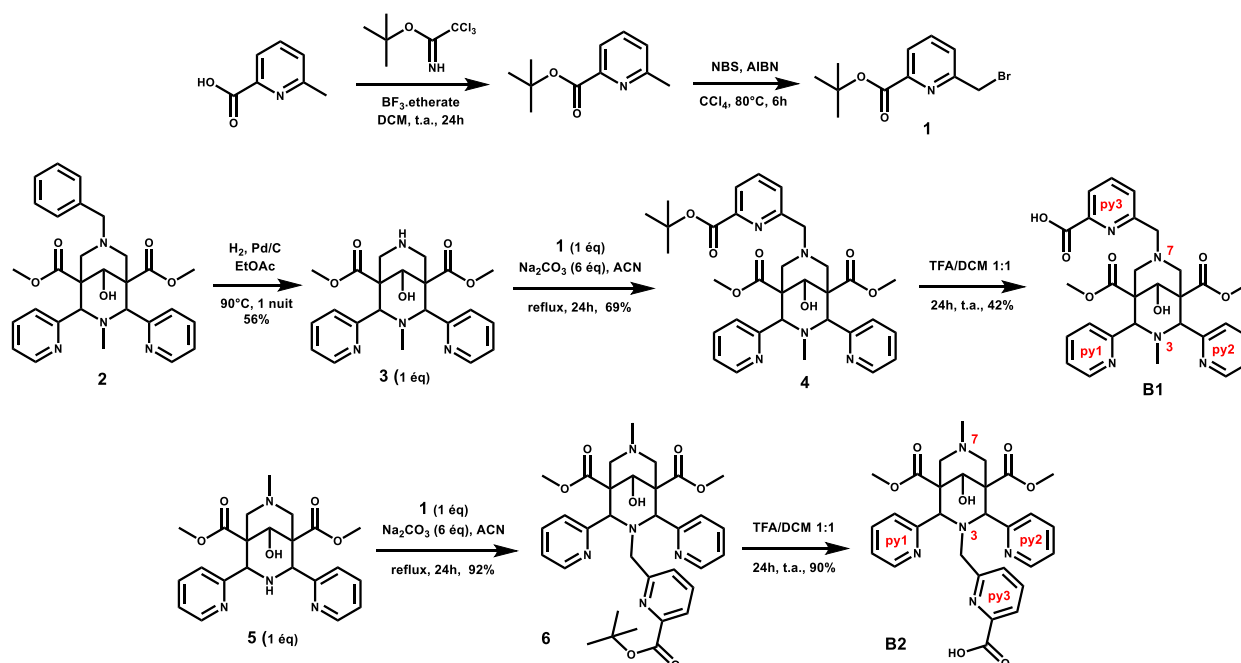


Schéma I.26. Synthèse des bispidines B1 et B2

La bispidine B1, possédant un acide picolinique en N7 est obtenu par S_N2 de N7 sur le dérivé 1 puis par hydrolyse de l'ester picolinate avec le TFA. De manière similaire, B2 est obtenu par S_N2 de N3 sur le dérivé 1 puis par hydrolyse acide. Les deux composés cristallisent dans le MeOH sous forme protonée.

b) Structure

Les structures cristallines des composés sont représentées sur la Figure I.12.

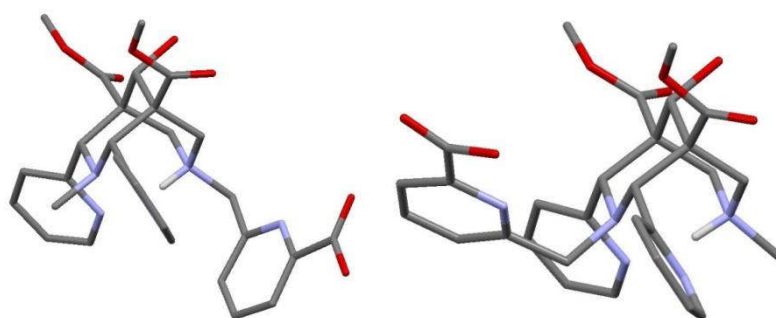


Figure I.12. Structures de HB1 (gauche) et HB2 (droite)

Ces structures confirment la conformation cis chaise-chaise des bispidines et des substituants pyridine. De plus, la protonation en N7, visible sur les structures, implique l'orientation des atomes d'azote des pyridines vers le centre de la cavité.

Pour les deux complexes de Cu(II), tout comme pour l'ensemble des complexes de Ni(II), Co(II) et Zn(II), les structures ont été obtenues également. Toutes adoptent une géométrie

octaédrique distordue. Dans le cas du Cu(II) (Figure I.13) une élongation Jahn-Teller est également observée.

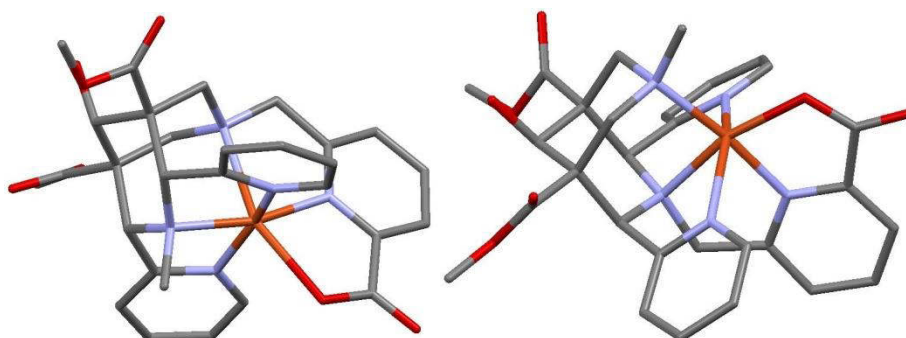


Figure I.13. Structure $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^+$ (gauche) et $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^+$ (droite)

Dans le cas de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^+$ l'élongation est observée selon l'axe N7-Cu-O_{pic} comme c'est souvent le cas pour des ligands bispidines pentadentate ($d_{\text{M-N7}} > d_{\text{M-N3}}$). En revanche, la flexibilité de la liaison M-N7 est contrainte par la présence d'un cycle chélate à 5-membres supplémentaire (acide picolinique-py3). Cela conduit à une stabilisation du Cu(II) et de Co(II) mais à une déstabilisation du Ni(II), Zn(II) et Ga(III). Ainsi, B1 ne suit pas la série d'Irving-Williams car la stabilité du complexe de Co(II) est supérieure à celle du Ni(II).

Dans le cas de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^+$ l'élongation est observée selon l'axe py1-Cu-py2. La présence de l'acide picolinique sur N3 a pour conséquence de raccourcir la longueur de la liaison M-N7 pour les complexes de Cu(II), Zn(II) et Ga(III) où par conséquent $d_{\text{M-N3}} > d_{\text{M-N7}}$.

c) Spectroscopies RMN, UV-Vis et RPE

Par une étude RMN des complexes de Zn(II) et Ga(III) incluant des expériences de corrélation, la présence d'un complexe est mise en évidence.

Par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique, différents points ont été déduits et viennent confirmer les observations faites sur les structures expérimentales :

- asymétrie des ligands B1 et B2 importantes
- similarité des structures en phase solide et en solution
- le modèle de recouvrement angulaire appliqué confirme les axes d'élongation tétraogonales déterminées sur les structures solides
- le champ des ligands dans le plan équatorial est plus fort pour le ligand B2 que pour le ligand B1
- l'interaction entre la fonction carboxylate et le Cu(II) est plus forte dans le cas de B2.

d) Voltampérométrie cyclique

Les potentiels rédox ont été mesurés pour les complexes $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B1})]^+$ et $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{B2})]^+$. Ceux-ci sont égaux respectivement à -1,02 V et -1,17 V vs ferrocène/férricinium⁺. Du fait de la corrélation entre le potentiel rédox et la stabilité thermodynamique pour cette série de complexes,¹⁰⁶ il est attendu que le ligand B2 forme un complexe de Cu(II) plus stable que B1.

e) Potentiométrie

Des titrages potentiométriques à 25°C en milieu aqueux avec une force ionique de 0,1 M (KNO₃) ont été effectués. Trois valeurs de pKa ont ainsi été déterminées pour chacun des ligands, possédant chacun six sites de protonation. Le pKa le plus élevé est attribué dans chacun des cas à l'une des amines tertiaires du cycle bispidine, en accord avec la structure cristalline.

Ligand	pKa	log K _{CuL}	pCu
B1	7,73(3), 3,95(5), 1,82(2)	18,88(10)	19,3
B2	9,05(7), 6,10(14)	19,44(18)	18,7

Tableau I.13. pKa, log K_{CuL} et pCu (pH = 7,4 ; 25°C ; [L] = 10 μM et [M] = 1 μM) pour B1 et B2

Les constantes de stabilité ont été déterminées en compétition avec un second ligand dans les conditions suivantes : ratio 1:1:1 Cu(II)/L/L' avec L = B1 ou B2 et L' = EDTA. Elles sont mentionnées dans le Tableau I.13 ainsi que la valeur du pM à pH = 7,4.

Il est noté que la stabilité des complexes, à priori meilleure pour le ligand B2 par rapport à B1 au vu des log K_{CuL}, est inversée à pH physiologique lorsque les pCu sont comparés.

3.2.6 « Octadentate picolinic acid-based bispidine ligand for radiometal ions »

Très récemment, les groupes de P. Comba ainsi que de C. Orvig ont rapporté la synthèse d'un ligand octadentate de type bispidine et la caractérisation de ses complexes d'indium(III), de lutétium(III) et de lanthane(III), ce dernier du fait de ses similitudes avec l'Actinium(III).¹⁰⁸

a) Synthèse

La bispidone 3 est synthétisée (Schéma I.27) à partir de la pipéridone 1, de l'amine diméthoxybenzyle et de formaldéhyde via une réaction de double-Mannich. Après réduction de la cétone en alcool pour former le dérivé 4, la fonction amine en N7 est déprotégée en présence de TFA et le composé 5 est formé. Il est à noter que le choix de la méthode de protection n'est pas anodin car la méthode usuelle de déprotection du groupement benzyle avec du Pd/C ne fonctionne pas dans le cas où R1 est un hydrogène. C'est un constat que nous avons également fait au cours de nos manipulations.

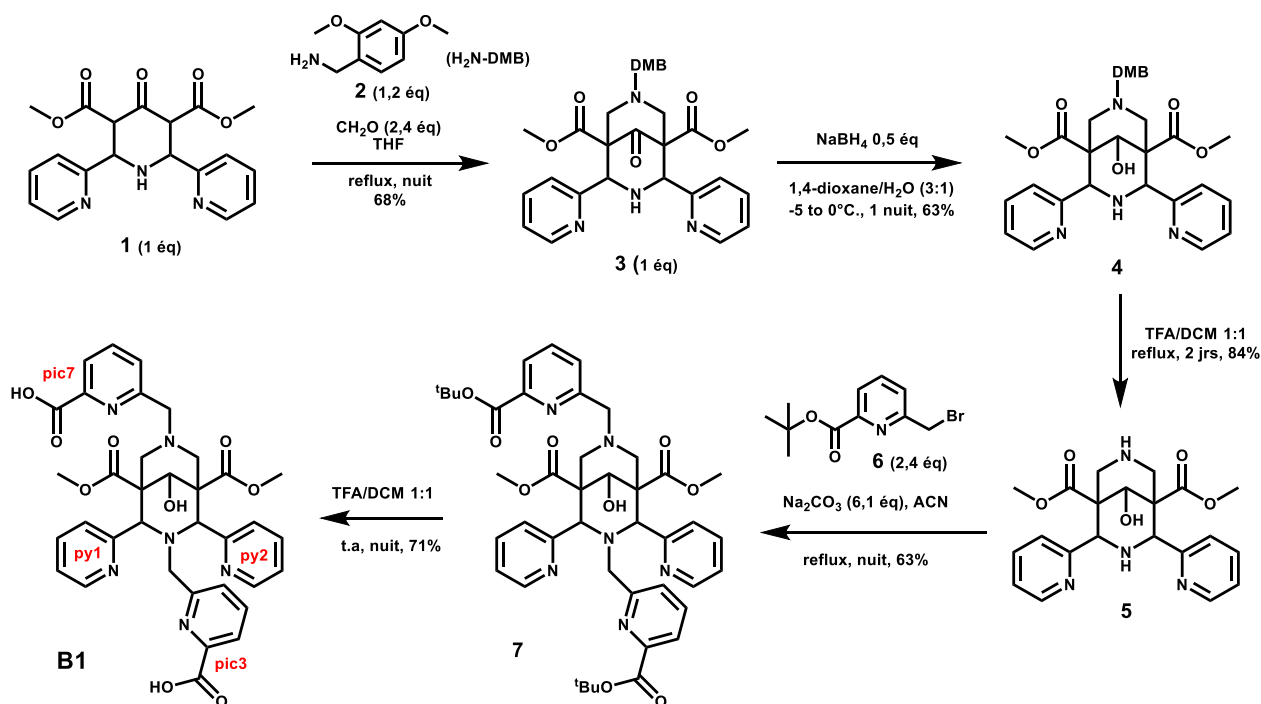


Schéma I.27. Synthèse de B1.

Les deux amines en N3 et N7 sont ensuite fonctionnalisées avec des groupements picolinique de *tert*-butoxyle pour former la bispidine 7. Après hydrolyse acide des ester picoliniques, la bispidine B1 est obtenue avec un rendement d'hydrolyse de 71 %.

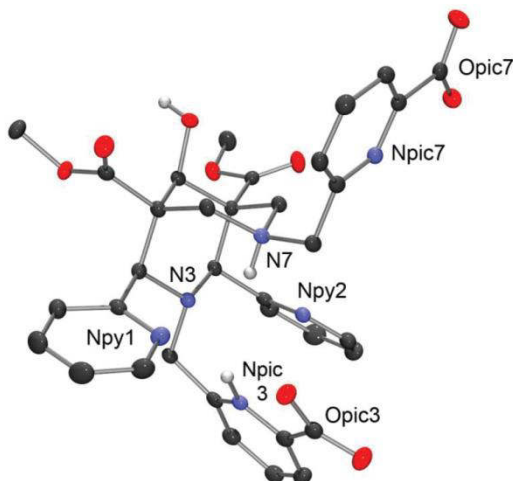


Figure I.14. Représentation ORTEP de B1.

B1 cristallise sous forme de zwitterion, protoné en N7 et pic3, avec 7 molécules d'eau dans l'unité asymétrique. La conformation de la bispidine est chaise-chaise.

b) Synthèse des complexes et caractérisation structurale

La complexation des cations In(III), Lu(III) et La(III) a été étudiée. Pour cela, des quantités équimolaires de ligand et de sels des cations métalliques (acétate pour In et Lu, chlorure pour La) ont été placés dans du MeOH (Lu et La) ou un mélange MeOH/H₂O (In).

La formation des complexes est confirmée par HRMS et par spectroscopie ^1H et ^{13}C . Dans l'ensemble des cas, la complexation implique des modifications significatives des déplacements chimiques ainsi que des couplages.

En particulier, dans le cas des complexes de Lu(III) et de La(III), les protons méthylènes associés aux acide picoliniques deviennent diastéréotopes et leur couplage est observé, ce qui est caractéristique d'une structure rigide en solution. De plus, les déplacements chimiques de tous les différents protons sont différents.

En revanche, dans le cas de l'In(III), ces protons donnent des signaux larges et leur couplage n'est pas observé, ce qui est caractéristique d'une certaine fluxionnalité en solution.

La structure du complexe d'In(III) a été obtenue par diffraction des rayons X (Figure I.15). Elle révèle que le cation est coordonné par 8 groupes donneurs (N_6O_2) du ligand BI doublement déprotoné au niveau des acides picoliniques. Néanmoins, le groupement py1 est seulement semi-coordinant ($d_{\text{py1-In}} = 3,1073(11) \text{ \AA}$).

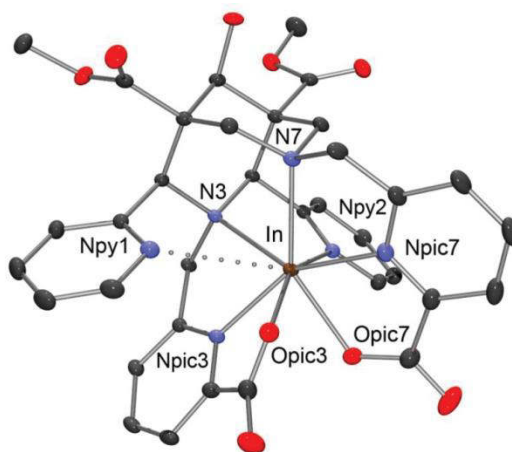


Figure I.15. Représentation ORTEP de $[\text{In}(\text{BI})]^+$

Cette dernière observation est confirmée par des calculs de la taille de la cavité du ligand BI effectués par le groupe de P. Comba. Ces calculs permettent de montrer la contrainte induite par une complexation en fonction de la distance moyenne des liaisons métal-ligand. Par leurs calculs, il est montré que le cation La(III) a une taille idéale par rapport à la cavité du ligand BI. En revanche, une légère contrainte est présente du fait de la complexation du cation In(III), ce qui explique le fait que py1 est semi-coordinant. La contrainte est plus importante dans le cas du cation Lu(III).

c) Radiomarquage

Le radiomarquage de BI avec le $^{111}\text{In}(\text{III})$ est effectué en 10 min à température ambiante dans AcONa (10 mM, pH 4) avec un rendement supérieur à 99 %, pour $[\text{L}] = 10^{-4} - 10^{-7} \text{ M}$ avec une activité spécifique de 89 MBq/ μg .

Le radiomarquage avec le $^{177}\text{Lu(III)}$ requiert en revanche un chauffage à 40°C pendant 60 min pour un rendement supérieur à 99 % pour $[\text{L}] = 10^{-4}$ M. Un rendement de 49 % seulement est obtenu dans les mêmes conditions que pour l' $^{111}\text{In(III)}$.

Enfin, des tests sont effectués avec l' Ac(III) du fait de ses propriétés intéressantes en tant qu'émetteur alpha et du fait que les donneurs de type pyridines sont idéaux pour la complexation sélective des actinides.

Le radiomarquage avec le $^{225}\text{Ac(III)}$ a été tenté à température ambiante, pour $[\text{L}] = 10^{-4}$, 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-8} M dans un tampon acétate d'ammonium à $\text{pH} = 6$. Les rendements de radiomarquage ainsi obtenus sont respectivement de 98, 94, 64 et 2 % après 30 min.

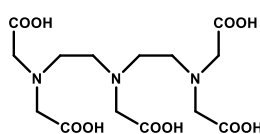
d) Stabilité des complexes

Titration potentiométrique.

Après obtention des constantes de protonation du ligand BI, $\text{pK}_a = 7,45$; $5,62$ et $3,31$, attribuées respectivement à une amine tertiaire du squelette bispidine et aux deux acides picoliniques, des titrages potentiométriques ont permis d'obtenir les constantes de stabilité thermodynamiques.

De manière surprenante, les constantes de stabilité thermodynamique de $[\text{Lu(BI)}]^+$ et de $[\text{La(BI)}]^+$ sont respectivement égales à $8,51(3)$ et $11,42(6)$ et sont bien plus faibles que celles généralement mesurées dans la série des ligands 'pa'.

La constante de stabilité thermodynamique du complexe $\text{In}^{\text{III}}\text{BI}$ a été obtenue par compétition avec l'EDTA, elle est de $24,39(6)$ (avec $\text{pM} = -\log[\text{M}]_{\text{libre}} = 25$), contre 18,3 pour la transferrin, chélatant compétiteur pour l' In(III) *in vivo*. Cette constante est supérieure à celle du complexe $\text{In}^{\text{III}}\text{DOTA}$ ($23,9(1)$ et $\text{pM} = 18,8$) et inférieure à celle du $\text{In}^{\text{III}}\text{DTPA}$ ($29,0$ et $\text{pM} = 29$) (la formule chimique du DTPA est présentée au Schéma 1.28).



DTPA

Schéma 1.28. Formule chimique du DTPA

Milieu biologique

La stabilité des complexes $[\text{In}^{\text{III}}(\text{BI})]^+$, $[\text{Lu}^{\text{III}}(\text{BI})]^+$ et $[\text{Ac}^{\text{III}}(\text{BI})]^+$ est testée en sérum humain.

La proportion de complexe $[\text{In}^{\text{III}}(\text{BI})]^+$ stable dans ce sérum est de 88, 87 et 87 % après 1 h, 1 et 5 jours respectivement. Une transchélation relativement faible de 12 % est observée après une heure, mais le complexe restant demeure stable pendant 5 jours. La stabilité par exemple du complexe $[\text{In}^{\text{III}}(\text{DOTA})]^-$ est similaire, 89 % après 1 jour.

b) Amide

Du fait de la grande stabilité de la liaison amide dans des conditions neutres à 25°C,¹¹⁶ la stratégie de bioconjugaison consistant à former une liaison amide est très exploitée. La présence d'une fonction amine sur l'acide aminé qu'est la lysine permet de former de telles liaisons.

Une première possibilité (notée A sur le Schéma I.30) est d'effectuer une réaction de couplage peptidique en présence d'un agent de couplage tel que ceux de la famille des carbodiimides ou HBTU (N,N,N',N'-Tetraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate) par exemple.¹¹⁷

Une autre possibilité (notée B sur le Schéma I.30) est la réaction d'un résidu lysine avec un ester activé, tel qu'un ester NHS ou un ester TFP (tétrafluorophényle). L'avantage de cette 2^{ème} méthode est qu'elle ne nécessite pas la présence d'un second agent de couplage.¹¹⁸

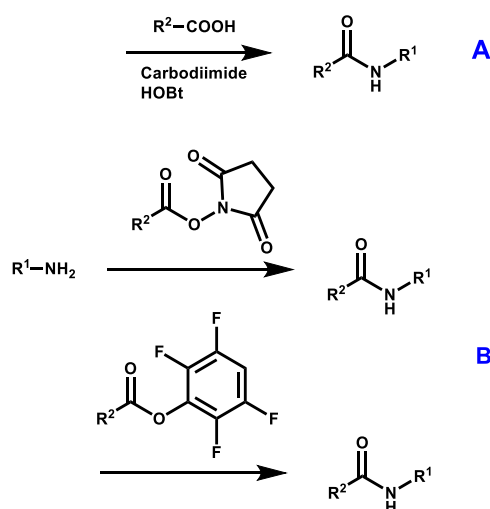


Schéma I.30. Bioconjugaison via la formation d'une amide

c) Double-liaison carbone-azote

Une troisième voie de fonctionnalisation possible est la formation d'une double-liaison carbone azote. Celle-ci implique un processus simple de condensation d'un dérivé aminé sur un aldéhyde ou une cétone, menant à la formation d'une hydrazone (voie notée A) ou d'un oxime (voie notée B) (Schéma I.31).¹¹⁹ Divers exemples sont mentionnés dans la littérature sur des oligonucléotides ou des glucides.^{120,121,122}

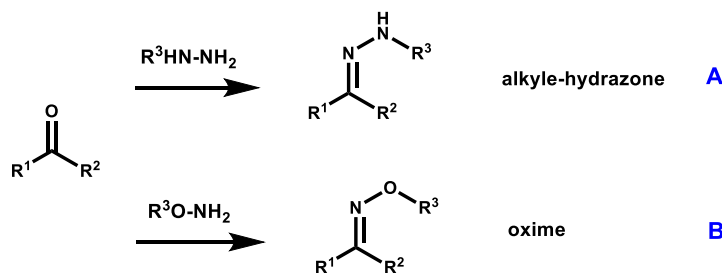


Schéma I.31. Fonctionnalisation sur une cétone.

En revanche, les hydrazones et les oximes sont tous deux sujets à des hydrolyses, en particulier les dérivés hydrazones. La durée de vie des oximes dans des conditions physiologiques est évaluée à un mois.¹¹⁹

d) Cycloaddition Huisgen

La cycloaddition de Huisgen implique la réaction, catalysée par le cuivre(I), entre un alcyne vrai et un azide terminal pour former un triazole 1,4-substitué.¹¹⁷ Cette réaction a été utilisée dans de nombreux cas.^{123,124,125,126} La catalyse permet d'avoir une réaction rapide et quantitative et cette réaction est souvent nommée comme une réaction « click ».¹²⁷

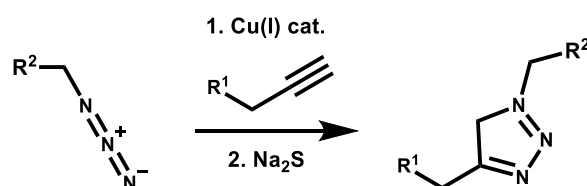


Schéma I.32. Cycloaddition de Huisgen

Cette réaction est néanmoins difficile à envisager avec les ligands qui possèdent une forte affinité pour le Cu(II). Cependant, dans certains cas, un ajout de Na₂S permet de piéger le Cu(II) sous forme de sulfure de cuivre et d'éviter une complexation avec le chélate.⁷

Plusieurs groupes ont développé une méthode permettant d'effectuer cette cycloaddition avec une cinétique rapide sans catalyseur, en utilisant des dérivés du cyclooctyne.^{128,129,130}

e) Thio-urée

Une dernière possibilité que l'on peut citer ici est la formation de groupement thio-urée, également utilisée parmi les techniques usuelles de fonctionnalisation. Une thio-urée est formée à la suite de la réaction entre un isothiocyanate et une amine primaire (Schéma I.33).^{117,118,119}

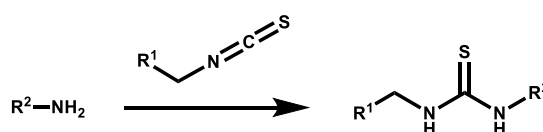


Schéma I.33. Formation d'un thio-urée

3.3.2 « Hexadentate bispidine derivatives as versatile bifunctional chelate agents for copper(II) radioisotopes »

Cette publication du groupe de P. Comba⁹¹ mentionne la synthèse et les propriétés de coordination de 3 nouvelles bispidines, B1, B2 et B4 (Schéma I.34). Cette dernière a été fonctionnalisée par une molécule biologiquement active, analogue de la bombésine (bispidine B5) puis marquée au ⁶⁴Cu.

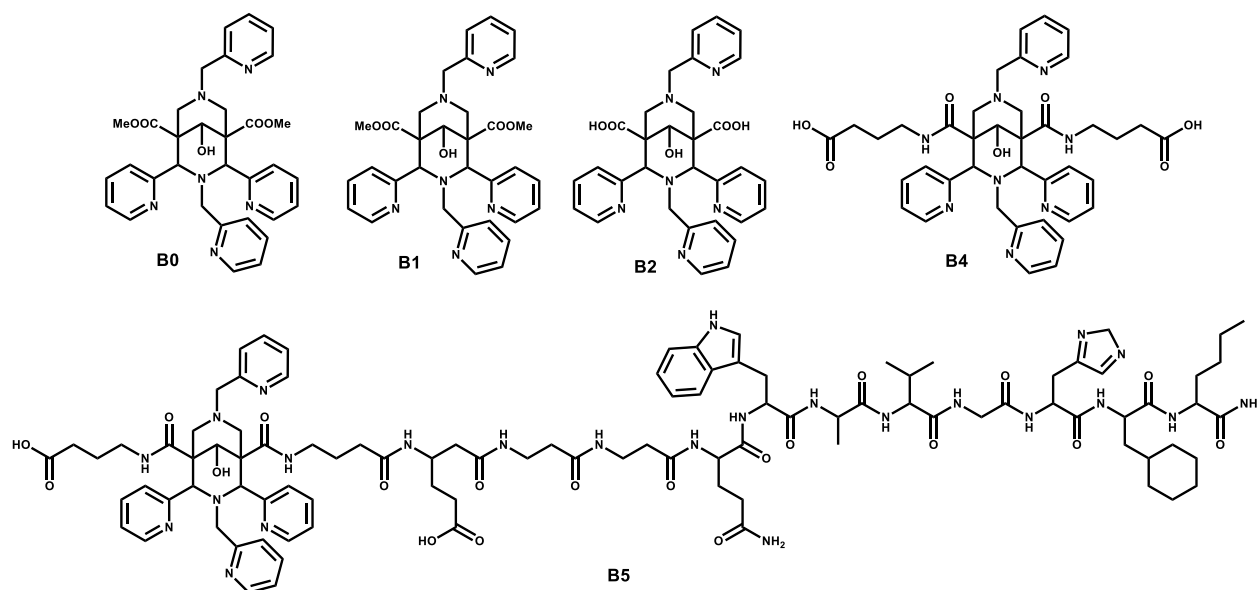


Schéma I.34. Bispidines discutées dans cette publication

a) Synthèse de B5

Il est intéressant de noter que du fait de la faible réactivité de la fonction cétone de B0, la fonctionnalisation sur la cétone n'a pas été possible. Le couplage est donc effectué sur les acides carboxyliques.

Dans un premier temps, un espaceur, l'acide 4-amino-butrique, est fixé sur B2 de manière à obtenir B4. Pour cela, des conditions de couplage peptidique sont appliquées à partir de 1 équivalent de B2 et des réactifs suivants : éthyle-4-aminobutyrate (1,8 éq), HBTU (2 éq), DIPEA (4,7 éq). L'agent de couplage HBTU est placé avec B2 dans la DMF anhydre, solution à laquelle sont ajoutés la DIPEA et l'ester aminobutyrate à 0°C. Un rendement de 17 % est obtenu pour la synthèse de B3.

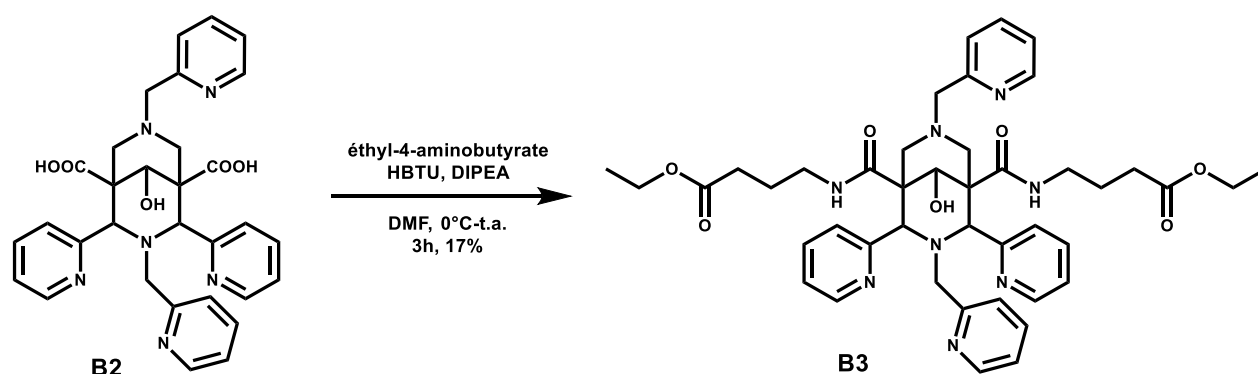


Schéma I.35. Synthèse de B3 par couplage peptidique.

Dans un second temps, les ester éthyliques sont saponifiés et B4 est obtenue avec un rendement de 90 % calculé après recristallisation dans l'éthanol.

La synthèse de B5 (Schéma I.36) est ensuite effectuée dans la DMF anhydre avec 1 équivalent de HATU comme agent de couplage. 7 équivalents de base (DIPEA) sont utilisés ainsi que 0,67 éq du dérivé bombésine. Après 3 h à température ambiante, le composé B5 est obtenu avec 19 % de rendement. Il est mentionné qu'une cyclisation intramoléculaire conduit à la formation d'un sous-produit indésirable.

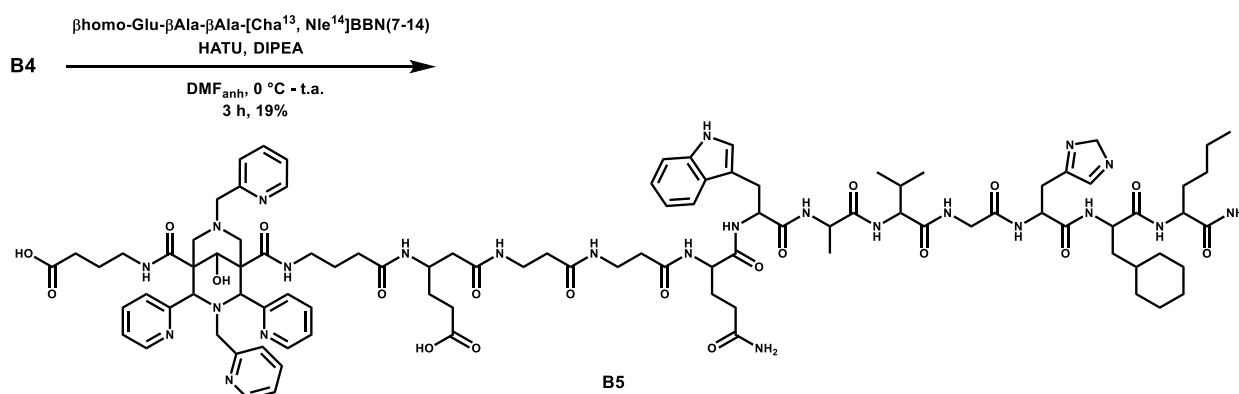


Schéma I.36. Synthèse de B5

Après purification par HPLC (ACN/H₂O), le composé est caractérisé par HR-MS.

Les bispidines B0, B1, B2 et B5 ont fait l'objet d'une étude radiochimique et d'une étude *in vivo*.

b) Radiochimie

Les tests sont effectués en présence de ⁶⁴Cu (200 μ L (0,1 mM) de ligand, dissous dans ACN/NH₄OAc (1/1) auquel est ajouté une solution aqueuse de ⁶⁴CuCl₂ (500 kBq, 100 μ L, 0,1 M NH₄OAc)). Un suivi par radio-CCM de ces tests révèle que dans ces conditions, les complexes de ⁶⁴Cu avec B0, B1 et B2 sont quantitativement formés après 1 min.

Dans le cas de la bispidine bifonctionnelle activée, le temps de radiomarquage pour atteindre un rendement quantitatif est de 1 h à température ambiante et de 30 min à 37°C.

Cette cinétique plus longue est attribuée par l'équipe de P. Comba au fait que une étape initiale de complexation ait pu avoir lieu au niveau du peptide (groupement donneur comme l'imidazole par exemple).

Des essais de stabilité en présence d'un excès (1000 équivalents) de cyclam pendant 24 h n'a montré aucune trans-chélation du ⁶⁴Cu pour les bispidines B0, B1 et B2. Pour ces ligands, il en est de même en présence de 1000 équivalents de superoxide dismutase.

c) Etude *in vivo*

Le choix du peptide bombésine est lié à son affinité importante pour les récepteurs GRPs (Gastrin-Releasing Peptide receptor) qui sont surexprimés dans une variété de cellules humaines cancéreuses (poumon, pancréas par exemple).

Dans l'organisme, une accumulation proche de celle du $^{64}\text{CuCl}_2$ est observée pour $^{64}\text{CuB1}$, $^{64}\text{CuB2}$ et $^{64}\text{CuB5}$; dans le foie et les reins pour les trois et tous les trois (y compris le plus hydrophile) sont extraits par la voie hépatobiliaire.

Le complexe $^{64}\text{CuB5}$ a été éliminé le plus rapidement et seule une faible accumulation a été observée dans le pancréas, pourtant un tissu qui exprime généralement des récepteurs GRP. Ce résultat peut être lié à un rapide métabolisme du peptide et à une élimination rapide du radiotraceur.

Des prélèvements sanguins sont effectués en fonction du temps afin de suivre la stabilité métabolique des complexes de cuivre. L'activité du plasma du sang (obtenu après centrifugation et précipitation des protéines) est mesurée.

Dans le cas de $^{64}\text{CuB1}$, aucune dégradation du complexe n'est observée. Le radiochromatogramme d'origine de $^{64}\text{CuB1}$ et celui obtenu dans le sang prélevé après 60 min sont parfaitement identiques et correspondent à la quasi-totalité de l'activité mesurée.

En revanche, pour $^{64}\text{CuB5}$, les radiochromatogrammes montrent l'apparition de plusieurs espèces plus hydrophiles et après 60 min, seul 3 % de l'activité correspond au composé $^{64}\text{CuB5}$ initial.

Finalement, une étude préliminaire PET a montré une accumulation importante du composé $^{64}\text{CuB5}$ dans les tissus exprimant les GRPr (au niveau de la tumeur, Figure I.16). La concentration maximale en radiotraceur dans la tumeur a été obtenue après 12,5 min ($2,25 \pm 0,13$ Standardized Uptake Value). Un point négatif est que l'activité a été rapidement éliminée de la tumeur. L'intensité nécessaire après 45 min pour différencier la tumeur est élevée, du fait d'un bruit de fond important.

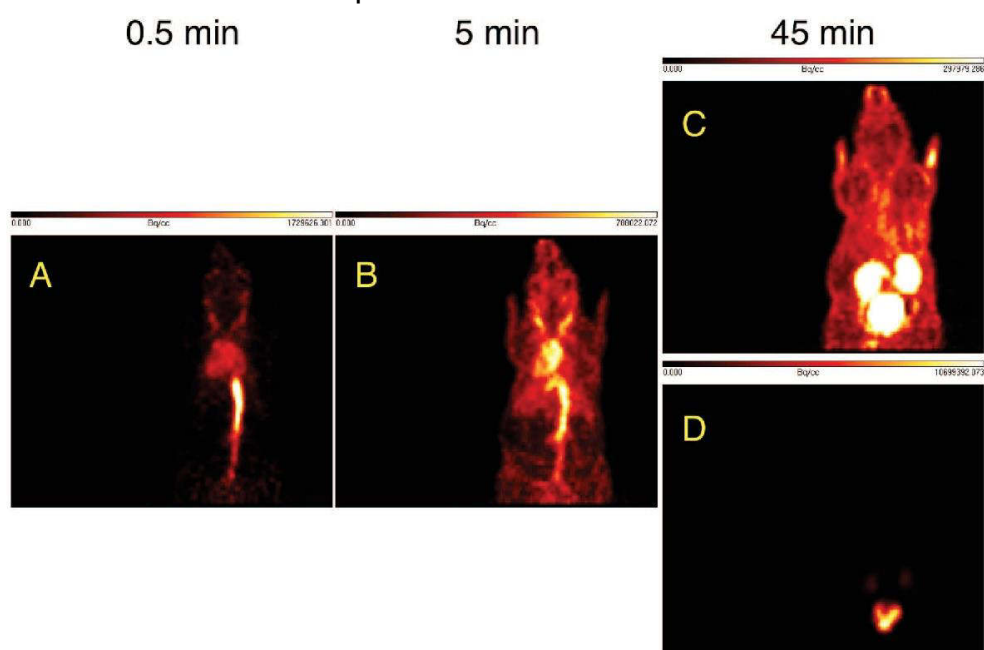


Figure I.16. Section coronaire de l'étude PET sur un rat après injection intraveineuse de $^{64}\text{CuB5}$ à 0,5min (A), 5 min (B) et 45 min (C, haute intensité et D faible intensité)

3.3.3 « Bispidines for Dual Imaging »

En 2014, l'équipe de P. Comba présente le développement d'une bispidine fonctionnalisée par un groupement fluorescent pour accéder à une sonde d'imagerie bimodale, TEP et imagerie optique.¹³¹

a) Synthèse et structure

La synthèse de trois nouveaux CBF de type bispidine est décrite dans cette publication. La bispidine-carbonate 2 est synthétisée à partir du chloroformate de 4-nitrophényle et du bispidol I. La réactivité du carbonate est ensuite exploitée dans la synthèse de B1, B2 et B3 (Schéma I.37).

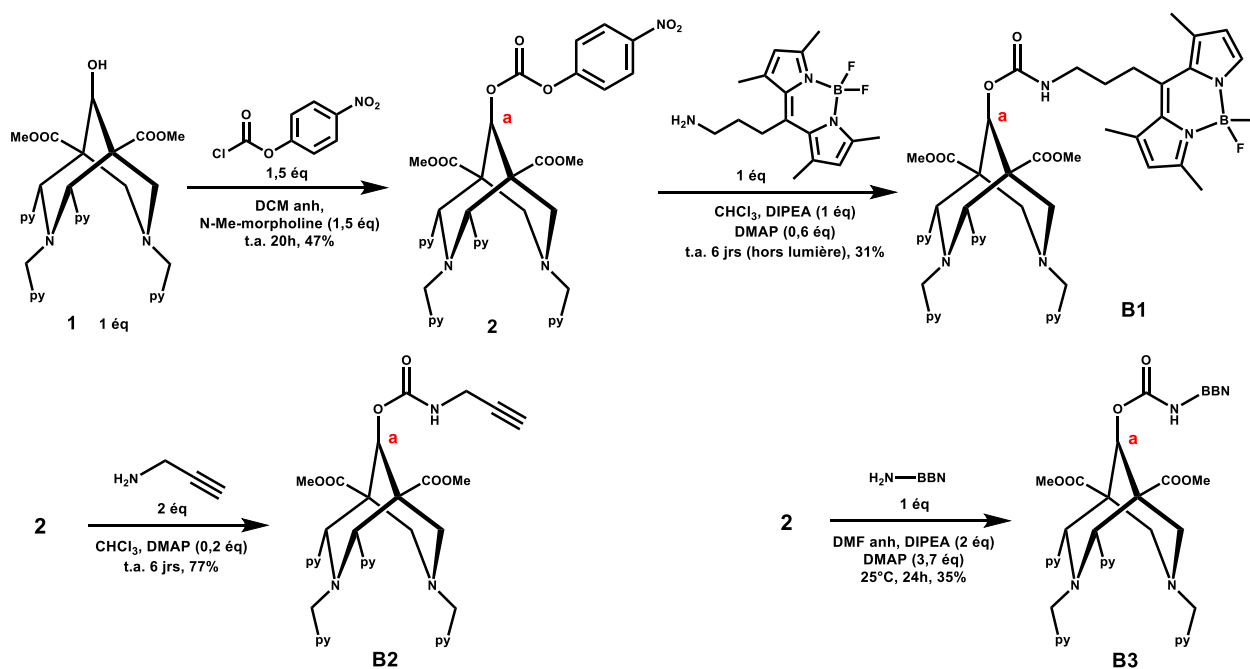


Schéma I.37. Synthèse des bispidines bifonctionnelles

Le dérivé B1 obtenu par recristallisation dans l'acétonitrile possède un groupement BODIPY, connu pour ses propriétés spectroscopiques intéressantes. Le composé B2 est un CBF possédant une fonction alcyne vrai et est obtenu après purification par HPLC. Le composé B3 est fonctionnalisé avec un dérivé stabilisé bombésine (BBN) et est obtenu après purification par HPLC.

La principale différence au niveau du spectre ^{13}C RMN sur le squelette bispidine est une modification du déplacement chimique du carbone a.

La structure cristalline de B1 (Figure I.17) confirme la préorganisation et la conformation du squelette bispidine ainsi que l'orientation des substituants pyridines.

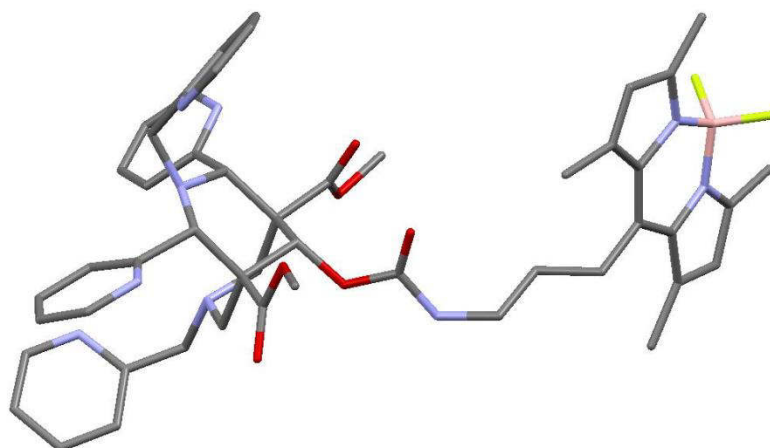


Figure I.17. Structure de B1

b) Propriétés photo-physique de B1

Les propriétés spectroscopiques testées correspondent à la présence de l'unité BODIPY, avec une bande d'émission à 505 nm et une bande d'absorption à 460 nm.

La complexation du Cu(II), Zn(II) et Ni(II) par B1 est testée et il est remarqué au niveau des propriétés spectroscopiques que la présence du métal influence le signal d'absorption de la bispidine, suggérant que la complexation a lieu. D'autre part, la complexation du cuivre quench fortement la luminescence du BODIPY, ce qui n'est pas le cas pour le zinc ou le nickel. Ce phénomène est expliqué par un phénomène de transfert d'électron photo-induit.

c) Expérience de radiomarquage

Des expériences de radiomarquage avec B1 ont été conduites avec une source de ^{64}Cu contenant 10 éq de ^{64}Ni . Le radiomarquage est quantitatif ($\geq 99\%$) en 30 min, à température ambiante et à pH 6,2, l'activité spécifique de chaque échantillon étant de 10-30 GBq. μmol^{-1} . De plus, en présence d'une quantité équimolaire de Cu(II) non radioactif ainsi que de Zn(II), la sonde $^{64}\text{CuB1}$ demeure intacte pendant au moins 24 h, ce qui confirme la stabilité du complexe ^{64}Cu -bispidine. De même aucune trans-chélation ou démétallation n'est observée en sérum humain pendant 24 h.

d) Complexes de Ln

La complexation de B1 vis-à-vis des ions Tb^{III} , Eu^{III} et Nd^{III} a été testée dans l'acétonitrile. Différentes espèces ont été obtenues avec des constantes de formation relativement élevées pour des complexes hexacoordinés : $\log\beta_{3:1}(\text{Eu}^{\text{III}}\text{B1}) = 17,0$; $\log\beta_{3:1}(\text{Tb}^{\text{III}}\text{B1}) = 17,2$; $\log\beta_{3:1}(\text{Nd}^{\text{III}}\text{B1}) = 17,5$.

L'étude spectroscopique qualitative a permis de vérifier que la luminescence des Ln est également observée en milieu biologique, sous excitation à 260 nm, ce qui peut être intéressant pour effectuer de la résolution temporelle. De plus, il est intéressant de noter qu'il n'y a aucune contribution de l'unité BODIPY.

3.3.4 « Cu^{II}-Selective Bispidine–dye Conjugates »

A la suite de cette étude il a été envisagé par le groupe de P. Comba d'utiliser les bispidines couplées à des fluorophores organiques comme capteur du Cu(II).⁹²

a) Synthèse

La synthèse de la bispidine B1 est effectuée par deux méthodes (Schéma I.38).

La première méthode consiste en la synthèse du dérivé 2 par une réaction de double-Mannich, suivie d'une réduction diastéréosélective pour former le bispidol 3. L'alcool primaire introduit est alors remplacé par un groupement azide par une réaction de Mitsunobu et transformé *in situ* en amine primaire par une réaction de Staudinger.

La seconde méthode consiste en la synthèse de la bispidone 4 par une réaction de double-Mannich, suivie d'une réduction diastéréosélective pour former le bispidol 5. La fonction protectrice de l'amine primaire est enlevée par l'action du TFA pour donner la bispidine B1.

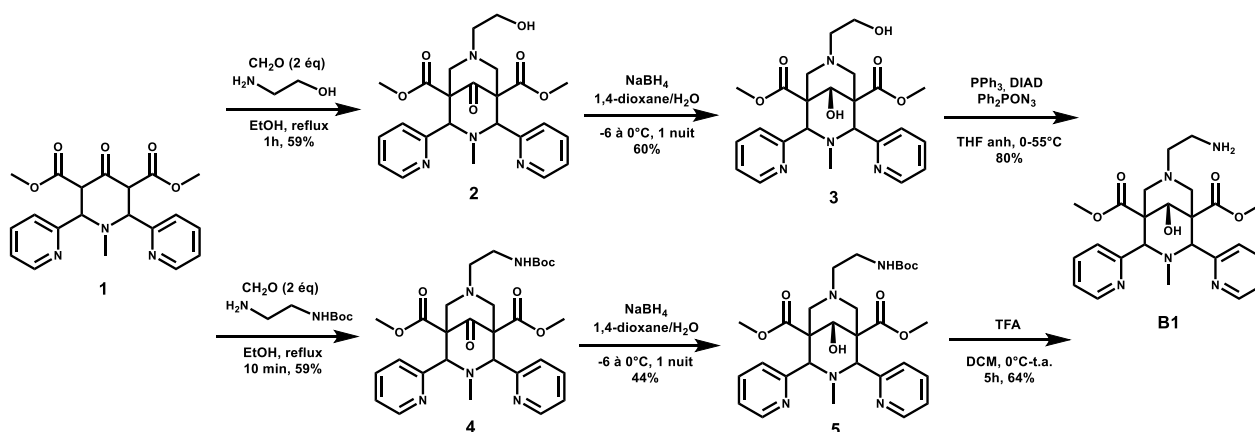


Schéma I.38. Synthèse de B1

La conjugaison de B1 est faite avec la rhodamine verte Atto532 et la cyanine rouge Cy5.5 pour donner les sondes fluorescentes B2 et B3, par réaction avec un ester-NHS, impliquant la formation d'une liaison amide (Schéma I.39).

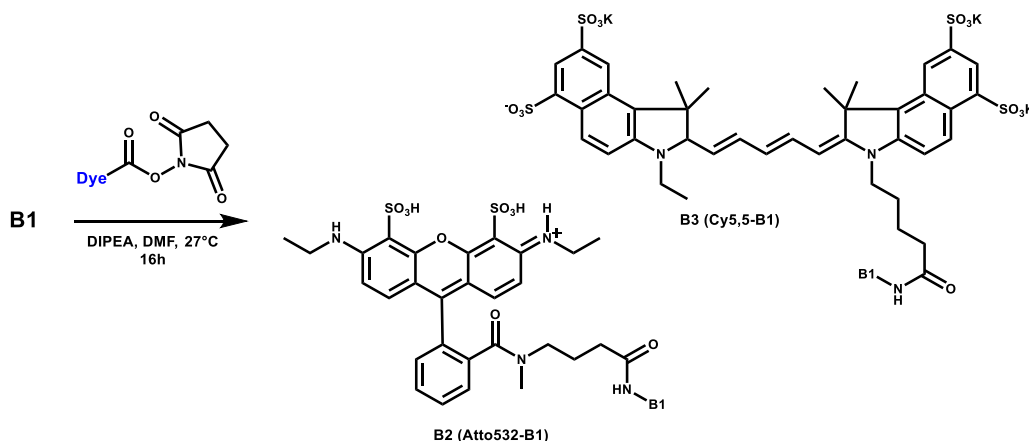


Schéma I.39. Synthèse des sondes B2 et B3.

b) Titrages avec des métaux

La sensibilité des bispidines pour le Cu(II) a été testée par des titrages en solution aqueuse avec les cations Cu(II), Fe(II), Ni(II), Co(II), Ca(II) et Mg(II). Les spectres d'émission des complexes sont mesurés à chaque étape du titrage.

Les observations sont les suivantes :

- L'ajout de Cu(II) implique une diminution de la fluorescence. Ce phénomène est moins important pour les autres cations testés.
- Le phénomène de piégeage se déroule en 2 phases :
une première phase où l'évolution est linéaire (piégeage statique), attribuée à la complexation du Cu(II) puis, pour un excès de Cu(II), un piégeage secondaire, dont le mécanisme n'est pas identifié. Il est noté que ce piégeage secondaire est plus fort que le primaire pour B3 tandis que l'inverse est observé pour B2.

En appliquant sur le premier piégeage linéaire le modèle de Stern-Volmer (Equation I.5), la constante de stabilité estimée pour la formation du complexe est de $1,0(2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour B2 et $3,0(4) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour B3.

$$\frac{I_{f0}}{I_f} = 1 + K_S[M]$$

avec I_f : intensité fluorescence mesurée ; K_S : constante de stabilité ; $[M]$: concentration ion métallique

Equation I.5. Modèle pour un piégeage statique

- Ce modèle n'est en réalité pas suffisant pour décrire le comportement du piégeage ici ; par comparaison avec la potentiométrie qui a permis de déterminer que $\log K$ de B1 non-substitué est de 16,56. Les constantes de formation des complexes avec B2 et B3 sont supposées supérieures ou égales à 10^7 M^{-1} .
- Des expériences de contrôles ont montré que le piégeage de la fluorescence n'est pas observé lors de titrage en présence des colorants seuls. De ce résultat, il est déduit que le complexe de cuivre avec la bispidine n'est pas seulement responsable du piégeage statique mais également du piégeage secondaire. Le modèle de ce second piégeage est a priori complexe (il ne s'agit ni de la formation d'une dimérisation ni d'un piégeage dynamique). En effet, de nombreuses conformations des dérivés bispidine conjugués sont possibles, ainsi de nombreuses espèces sont présentes. La distribution de ces différentes espèces donne lieu à ce comportement.

c) Titrages en milieu biologique

Des titrages sont effectués également en présence de lysate et de sérum de sang humain. Les observations faites dans ces cas sont les suivantes :

- Le phénomène de piégeage est observé à différents facteurs de dilution (0,01 à 1) de lysate ou de sérum dans un tampon phosphate (PBS : pH 7,4) mais les expériences montrent que le piégeage est moins important dans les deux cas par rapport aux tests en solution aqueuse. Cette différence est attribuée à la présence de protéines ou autres sites de coordination du cuivre, qui réduisent son activité.

- Le piégeage est plus important dans la lysate pour B3 que pour B2. L'inverse est observé dans le sérum.
- A dilution fixée, un titrage par ajout de Cu(II) dans ces milieux biologiques permet de déterminer les constantes de stabilité par application du modèle de piégeage statique. Elles sont inférieures aux précédentes d'un facteur 10 (ordre de grandeur).

Ces expériences montrent que les conjugués sont adéquats pour détecter le Cu(II) dans ces milieux biologiques pour des concentration de l'ordre du μM .

3.3.5 « Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography »

Cette publication décrit la synthèse de trois chélatants bifonctionnels de type bispidine pour une application en imagerie TEP.¹³²

a) Synthèse du CBF BI

Le premier CBF mentionné est BI et possède un résidu amine primaire. La synthèse de BI est une synthèse en 4 étapes, dont la séquence est décrite sur le Schéma I.40.

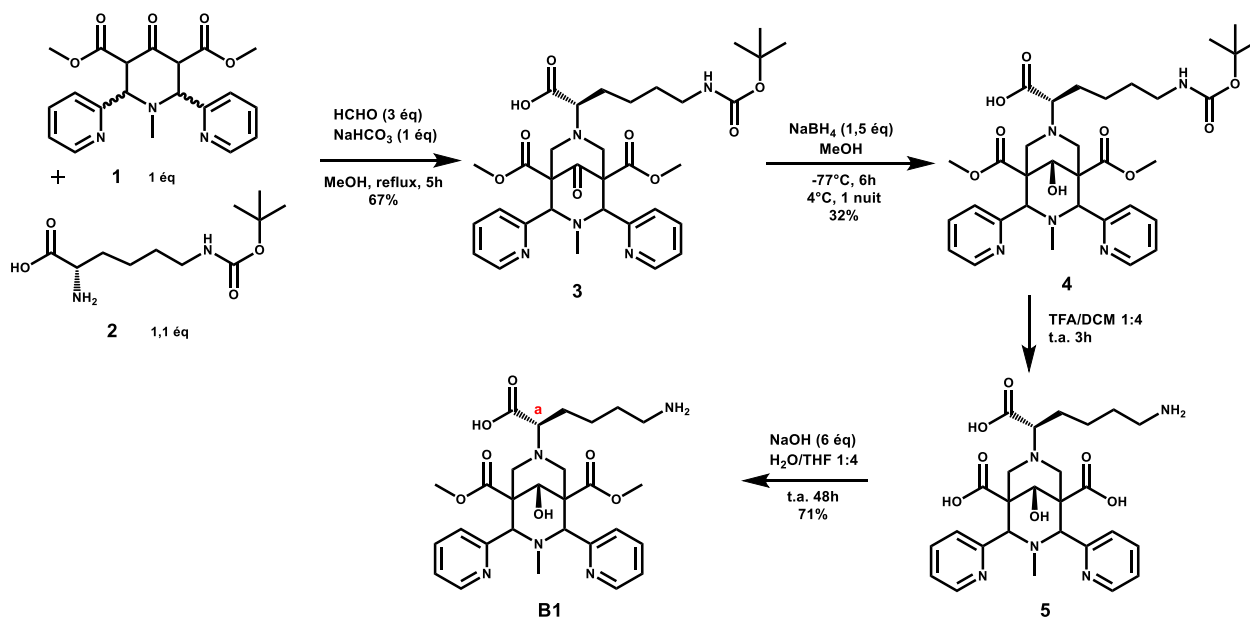


Schéma I.40. Synthèse de BI

La bispidine 3 est obtenue sous une conformation *cis* chaise-chaise, comme démontré par une étude RMN. La réduction chémo- et stéréosélective à basse température de celle-ci permet d'obtenir le bispidol 4, après purification par chromatographie sur phase inverse. Après déprotection avec du TFA, la bispidine BI est obtenue par saponification du bispidol 5, sous forme de sel de sodium. Le rendement global des quatre étapes est de 17%.

Un fait important observé en RMN ^1H est la présence de deux multiplets correspondant au proton noté a, caractéristique de la présence d'une molécule chirale.

b) Synthèse du CBF B2

Le second CBF décrit, B2, est fonctionnalisé avec un groupement biotine. Il est développé dans le cadre des stratégies de pré-ciblage, qui tirent profit de l'interaction entre la biotine et la streptavidine, cette dernière pouvant être fixée à un anticorps.

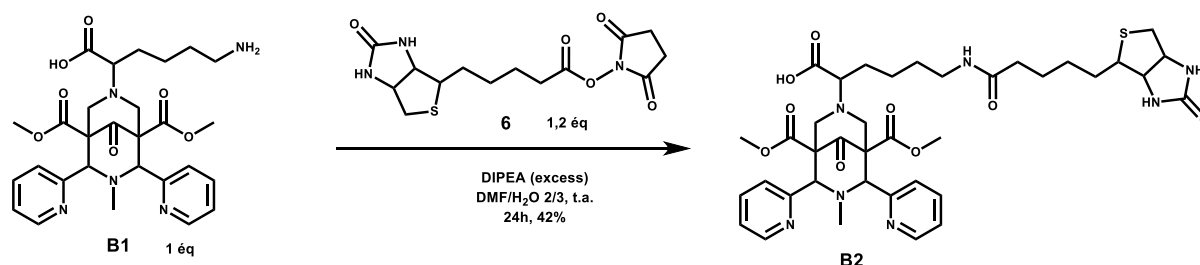


Schéma 1.41. Synthèse de B2

Sa synthèse est effectuée à partir de l'ester activé NHS-biotine 6, préalablement synthétisé, et du ligand B1 en présence de DIPEA (Schéma 1.41). Il est obtenu après purification par chromatographie sur phase inverse avec un rendement de 42 %, relativement faible et attribué à une faible solubilité de B1 dans le mélange DMF/H₂O.

c) Synthèse du CBF B3

Du fait de la réactivité entre la fonction maléimide et la fonction thiol, présente sur les résidus cystéine des protéines, le dernier CBF, B3, possède un groupement maléimide comme fonction réactive pour l'introduction d'une fonction de ciblage.

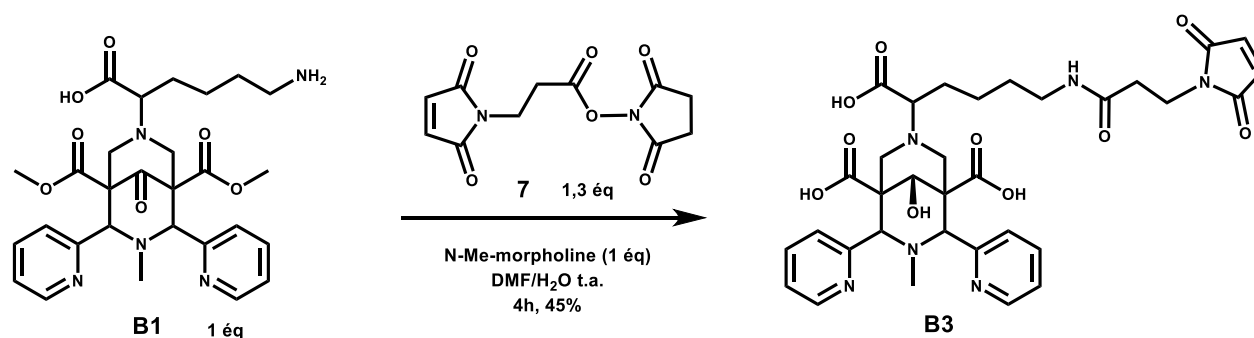


Schéma 1.42. Synthèse de B3

B3 est obtenue par réaction entre B1 et un second ester activé, le NHS-maléimide 7 (Schéma 1.42). Il est caractérisé par une étude ¹H et ¹³C RMN mono et bidimensionnelle ainsi que par ES-MS.

Le composé B3 a été ensuite couplé à un peptide modèle GP120 possédant 9 acides aminés, dont une lysine et une cystéine, afin de confirmer la sélectivité de la fonction maléimide pour les thiols (Schéma 1.43).

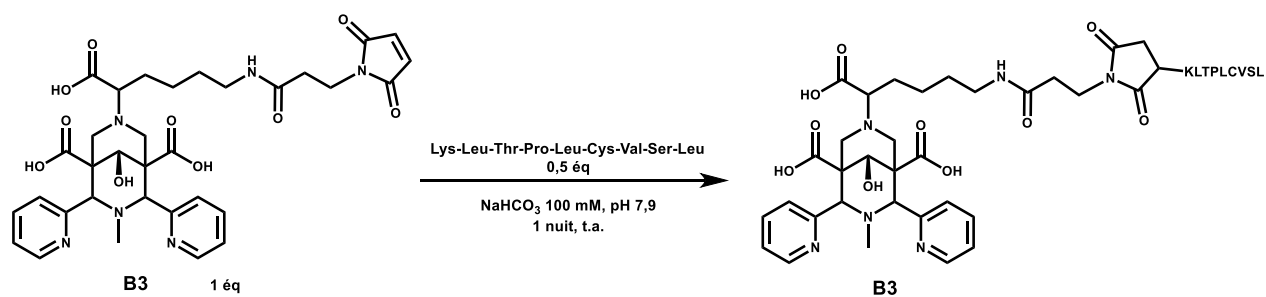


Schéma I.43. Couplage B3 avec le peptide modèle GP120

Un couplage quantitatif est observé et confirmé par spectrométrie MALDI-TOF. Aucune fonction thiol n'est présente en fin de couplage (test à l'iodoacétamide).

La seconde partie de cette publication concerne le radiomarquage de B1 avec le ⁶⁴Cu. Ce travail fait partie intégrante du travail de cette thèse et est décrit au chapitre IV.

4. Présentation du travail de thèse

Les résultats obtenus au sein du laboratoire LIMA^{93,132} ainsi que les nombreuses études sur les propriétés de coordination des bispidines avec le Cu(II) présentées ci-avant ont montré le fort potentiel des chélatants de type bispidines pour la complexation du Cu(II) pour des applications en TEP. D'autre part, la présence d'un groupement coordinant de type méthylène phosphonate en remplacement d'un groupement méthyl carboxylate permet dans certains cas d'améliorer les propriétés thermodynamiques des complexes de Cu(II).

C'est pour cette raison que le travail de cette thèse porte notamment sur la synthèse, développée au chapitre II, d'une bispidine possédant un groupement phosphonate. Le chapitre III concerne l'étude physico-chimique de cette bispidine afin d'en comparer les propriétés thermodynamiques avec une bispidine équivalente possédant un groupement carboxylate. Ensuite le chapitre IV porte sur des tests de radiomarquage avec du ⁶⁴Cu(II) pour différentes bispidines développées au laboratoire. Enfin, le chapitre V énonce les différentes stratégies de synthèse étudiées afin de fonctionnaliser cette bispidine.

La conclusion générale de cette thèse est l'objet du chapitre VI.

Références

1. Cherry, S. R.; Dahlbom, M. In *PET*; Springer, **2006**; pp 1–117.
2. Krasikova, R. N.; Aliev, R. A.; Kalmykov, S. N. *Mendeleev Commun.* **2016**, 26 (2), 85–94.
3. Agence internationale de l'énergie atomique. *Cyclotron produced radionuclides guidance on facility design and production of [¹⁸F] fluorodeoxyglucose (FDG).*; 2012.
4. Coenen, H. H.; Elsinga, P. H.; Iwata, R.; Kilbourn, M. R.; Pillai, M. R. A.; Rajan, M. G. R.; Wagner, H. N.; Zaknun, J. J. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, 37 (7), 727–740.
5. Diksic, M.; Jolly, D. *Appl. Radiat. Iso.* **1983**, 34 (6), 893–896.
6. Jahan, M.; Nag, S.; Krasikova, R.; Weber, U.; Muhs, A.; Pfeifer, A.; Spenger, C.; Willbold, D.; Gulyás, B.; Halldin, C. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, 39 (3), 315–323.
7. Price, E. W.; Orvig, C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 43 (1), 260–290.
8. Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, 23 (8), 957–980.
9. Bertini, I.; Cavallaro, G.; McGreevy, K. S. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254 (5), 506–524.
10. Puig, S.; Thiele, D. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6 (2), 171–180.
11. Niccoli Asabella, A.; Cascini, G. L.; Altini, C.; Paparella, D.; Notaristefano, A.; Rubini, G. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 2014, 1–9.
12. Principe du cyclotron (Animation Flash) http://www.sciences.univ-nantes.fr/sites/genevieve_tulloue/Meca/Charges/cyclotron.html (accessed Aug 6, 2017).
13. Romao, L. M.; Abs, M.; Amelia, J. C.; Beeckman, W.; Delvaux, J. L.; Jongen, Y.; Kleeven, W.; Paradis, Y.; Vandeplassche, D.; Zaremba, S. In *Conference on Cyclotrons and their Applications*; 2007.
14. Szelecsényi, F.; Blessing, G.; Qaim, S. M. *Appl. Radiat. Iso.* **1993**, 44 (3), 575–580.
15. Abbas, K.; Kozempel, J.; Bonardi, M.; Groppi, F.; Alfarano, A.; Holzwarth, U.; Simonelli, F.; Hofman, H.; Horstmann, W.; Menapace, E.; Lešetický, L.; Gibson, N. *Appl. Radiat. Iso.* **2006**, 64 (9), 1001–1005.
16. Obata, A.; Kasamatsu, S.; McCarthy, D. W.; Welch, M. J.; Saji, H.; Yonekura, Y.; Fujibayashi, Y. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, 30 (5), 535–539.
17. Daraban, L.; Adam Rebeles, R.; Hermanne, A. *Appl. Radiat. Iso.* **2009**, 67 (4), 506–510.
18. Manrique-Arias, J. C.; Avila-Rodriguez, M. A. *Appl. Radiat. Iso.* **2014**, 89, 37–41.
19. McCarthy, D. W.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Bass, L. A.; Margeneau, W. H.; Cutler, C. S.; Anderson, C. J.; Welch, M. J. *Nucl. Med. Biol.* **1997**, 24 (1), 35–43.
20. Alliot, C.; Audouin, N.; Barbet, J.; Bonraisin, A.-C.; Bossé, V.; Bourdeau, C.; Bourgeois, M.; Duchemin, C.; Guertin, A.; Haddad, F.; Huclier-Markai, S.; Kerdjoudj, R.; Laizé, J.; Métivier, V.; Michel, N.; Mokili, M.; Pageau, M.; Vidal, A. *Front. Med.* **2015**, 2.
21. Gill, N. S.; Taylor, F. B.; Hatfield, W. E.; Parker, W. E.; Fountain, C. S.; Bunger, F. L. *Inorg. Synth.*; Jr, S. Y. T., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 1967; pp 136–142.

22. Toyota, T.; Hanafusa, T.; Oda, T.; Koumura, I.; Sasaki, T.; Matsuura, E.; Kumon, H.; Yano, T.; Ono, T. *J Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, 298 (1), 295–300.
23. Alliot, C.; Michel, N.; Bonraisin, A.-C.; Bossé, V.; Laizé, J.; Bourdeau, C.; Mokili, B. M.; Haddad, F. *Radiochim. Acta Inter. J. Chem. Asp. Nucl. Sci. Tech.* **2011**, 99 (10), 627–630.
24. Kraus, K. A.; Moore, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75 (6), 1460–1462.
25. Fritz, J. S.; Pietrzyk, D. J. *Talanta* **1961**, 8 (2), 143–162.
26. Shokeen, M.; Anderson, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42 (7), 832–841.
27. Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (5), 2858–2902.
28. Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (22), 3533–3539.
29. Shannon, R. D. *Acta Cryst. Sect. A*: **1976**, 32 (5), 751–767.
30. Jahn, H. A.; Teller, E. *Proc. R. Soc London A: Math. Phys. Eng. Sci.* **1937**, 161 (905), 220–235.
31. Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *Inorg. Chem.*, 3rd ed.; Pearson Prentice Hall: Harlow, Essex, 2008.
32. Musinu, A.; Paschina, G.; Piccaluga, G.; Magini, M. *Inorg. Chem.* **1983**, 22 (8), 1184–1187.
33. Mukherjee, R. In *Comp. Coord. Chem. II*; McCleverty, J. A., Meyer, T. J., Eds.; Pergamon: Oxford, 2003; pp 747–910.
34. Cabiness, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (23), 6540–6541.
35. Hathaway, B.; Billing, D. E. *Coord. Chem. Rev.* **1970**, 5 (2), 143–207.
36. Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (40), 15702–15724.
37. Brasse, D.; Nonat, A. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (11), 4845–4858.
38. Muehllhner, G.; Karp, J. S. *Phys. Med. Biol.* **2006**, 51 (13), R117.
39. Ferreira, C. L.; Lamsa, E.; Woods, M.; Duan, Y.; Fernando, P.; Bensimon, C.; Kordos, M.; Guenther, K.; Jurek, P.; Kiefer, G. E. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21 (3), 531–536.
40. Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (6), 1465–1474.
41. Chaves, S.; Delgado, R.; Da Silva, J. J. R. F. *Talanta* **1992**, 39 (3), 249–254.
42. Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2005 (23), 4829–4833.
43. Anderson, C. J.; Dehdashti, F.; Cutler, P. D.; Schwarz, S. W.; Laforest, R.; Bass, L. A.; Lewis, J. S.; McCarthy, D. W. *J Nucl Med* **2001**, 42 (2), 213–221.

44. Sun, X.; Wuest, M.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Reed, D. P.; Boswell, C. A.; Motekaitis, R.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (2), 469–477.
45. Wadas, T. J.; Anderson, C. J. *Nat. Protocols* **2007**, *1* (6), 3062–3068.
46. Bartolo, N. M. D.; Sargeson, A. M.; Donlevy, T. M.; Smith, S. V. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, *0* (15), 2303–2309.
47. Bartolo, N. D.; Sargeson, A. M.; Smith, S. V. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (17), 3350–3357.
48. Paterson, B. M.; Buncic, G.; McInnes, L. E.; Roselt, P.; Cullinane, C.; Binns, D. S.; Jeffery, C. M.; Price, R. I.; Hicks, R. J.; Donnelly, P. S. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (11), 4901–4909.
49. Bevilacqua, A.; Gelb, R. I.; Hebard, W. B.; Zompa, L. J. *Inorg. Chem.* **1987**, *26* (16), 2699–2706.
50. Cooper, M. S.; Ma, M. T.; Sunassee, K.; Shaw, K. P.; Williams, J. D.; Paul, R. L.; Donnelly, P. S.; Blower, P. J. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (5), 1029–1039.
51. Guillou, A.; Lima, L. M. P.; Roger, M.; Esteban-Gómez, D.; Delgado, R.; Platas-Iglesias, C.; Patinec, V.; Tripier, R. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (18), 2435–2443.
52. Ševčík, R.; Vaněk, J.; Lubal, P.; Kotková, Z.; Kotek, J.; Hermann, P. *Polyhedron* **2014**, *67*, 449–455.
53. Sun, X.; Wuest, M.; Kovacs, Z.; Sherry, D.; Motekaitis, R.; Wang, Z.; Martell, A.; Welch, M.; Anderson, C. J. *Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8* (1-2), 217–225.
54. Kumar, K.; Tweedle, M. F.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z. *Inorg. Chem.* **1995**, *34* (26), 6472–6480.
55. Odendaal, A. Y.; Fiamengo, A. L.; Ferdani, R.; Wadas, T. J.; Hill, D. C.; Peng, Y.; Heroux, K. J.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J.; Weisman, G. R.; Wong, E. H. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (7), 3078–3086.
56. Šimeček, J.; Wester, H.-J.; Notni, J. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (45), 13803–13806.
57. Baranyai, Z.; Reich, D.; Vágner, A.; Weineisen, M.; Tóth, I.; Wester, H.-J.; Notni, J. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (24), 11137–11146.
58. Bergmann, R.; Ruffani, A.; Graham, B.; Spiccia, L.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Stephan, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 434–446.
59. Roger, M.; Lima, L. M. P.; Frindel, M.; Platas-Iglesias, C.; Gestin, J.-F.; Delgado, R.; Patinec, V.; Tripier, R. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (9), 5246–5259.
60. Ghosh, S. C.; Pinkston, K. L.; Robinson, H.; Harvey, B. R.; Wilganowski, N.; Gore, K.; Sevick-Muraca, E. M.; Azhdarinia, A. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (2), 177–183.
61. Eisenwiener, K.-P.; Prata, M. I. M.; Buschmann, I.; Zhang, H.-W.; Santos, A. C.; Wenger, S.; Reubi, J. C.; Mäcke, H. R. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13* (3), 530–541.

62. Motekaitis, R. J.; Rogers, B. E.; Reichert, D. E.; Martell, A. E.; Welch, M. J. *Inorg. Chem.* **1996**, *35* (13), 3821–3827.
63. Kotek, J.; Lubal, P.; Hermann, P.; Císařová, I.; Lukeš, I.; Godula, T.; Svobodová, I.; Táborský, P.; Havel, J. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (1), 233–248.
64. Pisareva, S. A.; Bel'skii, F. I.; Medved', T. Y.; Kabachnik, M. I. *Russ. Chem. Bull.* **1987**, *36* (2), 372–376.
65. Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
66. Boswell, C. A.; Regino, C. A. S.; Baidoo, K. E.; Wong, K. J.; Milenic, D. E.; Kelley, J. A.; Lai, C. C.; Brechbiel, M. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (2), 548–552.
67. Pandya, D. N.; Dale, A. V.; Kim, J. Y.; Lee, H.; Ha, Y. S.; An, G. I.; Yoo, J. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (3), 330–335.
68. Bhatt, N.; Soni, N.; Ha, Y. S.; Lee, W.; Pandya, D. N.; Sarkar, S.; Kim, J. Y.; Lee, H.; Kim, S. H.; An, G. I.; Yoo, J. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6* (11), 1162–1166.
69. Dale, A. V.; An, G. I.; Pandya, D. N.; Ha, Y. S.; Bhatt, N.; Soni, N.; Lee, H.; Ahn, H.; Sarkar, S.; Lee, W.; Huynh, P. T.; Kim, J. Y.; Gwon, M.-R.; Kim, S. H.; Park, J. G.; Yoon, Y.-R.; Yoo, J. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (17), 8177–8186.
70. Mannich, C.; Mohs, P. *Ber. dtsch. Chem. Ges. A/B* **1930**, *63* (3), 608–612.
71. Kuhl, U.; Korff, M. von; Baumann, K.; Burschka, C.; Holzgrabe, U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, *0* (10), 2037–2042.
72. Smissman, E. E.; Ruenitz, P. C. *J. Med. Chem.* **1976**, *19* (1), 184–186.
73. Holzgrabe, U.; Cambareri, A.; Kuhl, U.; Siener, T.; Brandt, W.; Straßburger, W.; Friderichs, E.; Englberger, W.; Kögel, B.; Haurand, M. *Il Farmaco* **2002**, *57* (7), 531–534.
74. Yamaotsu, N.; Fujii, H.; Nagase, H.; Hirono, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (12), 4446–4452.
75. Singh, N.; Nolan, T. L.; McCurdy, C. R. *J. Mol. Graph. Model* **2008**, *27* (2), 131–139.
76. Holzgrabe, U.; Brandt, W. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (8), 1383–1389.
77. Benyhe, S.; Márki, A.; Nachtsheim, C.; Holzgrabe, U.; Borsodi, A. *Acta. Biol. Hung.* **2003**, *54* (2), 147–155.
78. Siener, T.; Cambareri, A.; Kuhl, U.; Englberger, W.; Haurand, M.; Kögel, B.; Holzgrabe, U. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3746–3751.
79. Borsodi, A.; Benyhe, S.; Holzgrabe, U.; Márki, Á.; Nachtsheim, C. *Regul. Pept.* **1994**, *54* (1), 27–28.
80. Brandt, W.; Drosihn, S.; Haurand, M.; Holzgrabe, U.; Nachtsheim, C. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1996**, *329* (6), 311–323.
81. Comba, P.; Nuber, B.; Ramlow, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, No. 3, 347–352.

82. Hosken, G. D.; Allan, C. C.; Boeyens, J. C. A.; Hancock, R. D. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 0 (22), 3705–3708.
83. Hosken, G. D.; Hancock, R. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 0 (11), 1363–1364.
84. Comba, P.; Lienke, A. *Inorg. Chem.* **2001**, 40 (20), 5206–5209.
85. Comba, P.; Kanellakopulos, B.; Katsichtis, C.; Lienke, A.; Pritzkow, H.; Rominger, F. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, No. 23, 3997–4002.
86. Bukowski, M. R.; Comba, P.; Lienke, A.; Limberg, C.; Lopez de Laorden, C.; Mas-Ballesté, R.; Merz, M.; Que, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45 (21), 3446–3449.
87. Bukowski, M. R.; Comba, P.; Limberg, C.; Merz, M.; Que, L.; Wistuba, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43 (10), 1283–1287.
88. Born, K.; Comba, P.; Daubinet, A.; Fuchs, A.; Wadepohl, H. *J Biol Inorg Chem* **2006**, 12 (1), 36–48.
89. Comba, P.; Kuwata, S.; Linti, G.; Tarnai, M.; Wadepohl, H. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2007 (5), 657–664.
90. Haberberger, M.; Someya, C. I.; Company, A.; Irran, E.; Enthaler, S. *Catal. Lett.* **2012**, 142 (5), 557–565.
91. Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20 (2), 347–359.
92. Brox, D.; Comba, P.; Hertel, D.-P.; Kimmle, E.; Morgen, M.; Rühl, C. L.; Rybina, A.; Stephan, H.; Storch, G.; Wadepohl, H. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 148, 78–83.
93. Roux, A.; Nonat, A. M.; Brandel, J.; Hubscher-Bruder, V.; Charbonnière, L. *J. Inorg. Chem.* **2015**, 54 (9), 4431–4444.
94. Comba, P.; Hunoldt, S.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (14), 8131–8143.
95. Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (24), 11167–11176.
96. Jeyaraman, R.; Avila, S. *Chem. Rev.* **1981**, 81 (2), 149–174.
97. Börzel, H.; Comba, P.; Hagen, K. S.; Lampeka, Y. D.; Lienke, A.; Linti, G.; Merz, M.; Pritzkow, H.; Tsymbal, L. V. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 337, 407–419.
98. Siener, T.; Holzgrabe, U.; Drosihn, S.; Brandt, W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, No. 9, 1827–1834.
99. R. Caujolle, A. Lattes, J. Jaud and J. Galy, *Z. Kristallogr.* **1984**, 166,81.
100. U. Ashauer-Holzgrabe and T. Busch, *Z. Naturforsch. Teil B*, **1988**, 43, 873.
101. R. Caujolle, P. Castera and A. Lattes, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1984**, 413.
102. Barnes, N. A.; Brooker, A. T.; Godfrey, S. M.; Mallender, P. R.; Pritchard, R. G.; Sadler, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2008 (6), 1019–1030.

103. Comba, P.; Kubeil, M.; Pietzsch, J.; Rudolf, H.; Stephan, H.; Zarschler, K. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (13), 6698–6707.
104. Ang, W. J.; Chng, Y. S.; Lam, Y. *RSC Adv.* **2015**, *5* (99), 81415–81428.
105. Comba, P.; Rudolf, H.; Wadepohl, H. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (6), 2724–2736.
106. Comba, P.; Morgen, M.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (11), 6481–6501.
107. Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (24), 12531–12543.
108. Comba, P.; Jermilova, U.; Orvig, C.; Patrick, B. O.; Ramogida, C. F.; Rück, K.; Schneider, C.; Starke, M. *Chem. Eur. J.* **2017** Accepted.
109. Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. *Chem. Asian J.* **2009**, *4* (5), 630–640.
110. Gurd, F. R. *Meth. Enzymol.* **1972**, *25*, 424–438.
111. Aslam, M.; Dent, A. *Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences*; Macmillan reference Limited: London, **1998**.
112. Nielsen, M. L.; Vermeulen, M.; Bonaldi, T.; Cox, J.; Moroder, L.; Mann, M. *Nat. Methods* **2008**, *5* (6), 459–460.
113. Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (4), 252–260.
114. In *Bioconjugate Tech. (Second Edition)*; Hermanson, G. T., Ed.; Academic Press: New York, 2008.
115. Chemical Reagents for Protein Modification, Third Edition <https://www.crcpress.com/Chemical-Reagents-for-Protein-Modification-Third-Edition/Lundblad/p/book/9780849319839> (accessed Aug 30, 2017).
116. Radzicka, A.; Wolfenden, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (26), 6105–6109.
117. Ramogida, C. F.; Orvig, C. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (42), 4720–4739.
118. Zeglis, B. M.; Lewis, J. S. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6168–6195.
119. Kalia, J.; Raines, R. T. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14* (2), 138–147.
120. Zatsepin, T. S.; Stetsenko, D. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16* (3), 471–489.
121. Kremisky, J. N.; Wooters, J. L.; Dougherty, J. P.; Meyers, R. E.; Collins, M.; Brown, E. L. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15* (7), 2891–2909.
122. Neuner, P.; Gallo, P.; Orsatti, L.; Fontana, L.; Monaci, P. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (2), 276–281.
123. Kalia, J.; Raines, R. T. *ChemBiochem* **2006**, *7* (9), 1375–1383.
124. Zhou, Z.; Fahrni, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8862–8863.
125. Peschke, B.; Zundel, M.; Bak, S.; Clausen, T. R.; Blume, N.; Pedersen, A.; Zaragoza, F.; Madsen, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (13), 4382–4395.

126. Macpherson, L. J.; Dubin, A. E.; Evans, M. J.; Marr, F.; Schultz, P. G.; Cravatt, B. F.; Patapoutian, A. *Nature* **2007**, *445* (7127), 541–545.
127. Wangler, C.; Schirrmacher, R.; Bartenstein, P.; Wangler, B. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (11), 1092–1116.
128. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
129. Lutz, J.-F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2182–2184.
130. Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (12), 2253–2255.
131. Stephan, H.; Walther, M.; Fähnemann, S.; Ceroni, P.; Molloy, J. K.; Bergamini, G.; Heisig, F.; Müller, C. E.; Kraus, W.; Comba, P. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (51), 17011–17018.
132. Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. *Org. Biomol. Chem.* **2017**.

Chapitre II

Synthèse

1. Objectif

L'objectif premier est de déterminer l'influence sur les propriétés thermodynamiques du remplacement d'un groupement acide carboxylique comme site de coordination par un groupement acide phosphonique sur les bispidines. Pour cela, la synthèse du ligand L^3 (Schéma 2.1) a été envisagée. Après obtention du ligand, celui-ci pourra être étudié ainsi que les complexes de Cu(II) et de Zn(II) pour connaître l'évolution des propriétés thermodynamiques par rapport à des bispidines précédemment développées et ainsi évaluer son potentiel en tant que radiotracer pour la tomographie à émission de positron.

D'autres ligands cibles ont également été envisagés afin d'accéder à des sphères de coordination de plus haute denticité. En effet, des métaux tels que le ^{68}Ga ou le ^{44}Sc présentent également un intérêt pour la TEP.¹

D'une part l'introduction d'un groupement méthyl picolinate comme site de coordination en R2 est envisagée via la synthèse du ligand L^4 et permet d'obtenir un ligand hexadentate pour la complexation du Cu(II) ou du Ga(III).

D'autre part, du fait de l'introduction des groupements méthyl picolinate en position 2 et 4, le ligand L^5 et l'intermédiaire L^6 permettent d'accéder à des denticités supérieures (7 à 9) et peuvent être utilisés pour la coordination des métaux tels que le Sc^{3+} (nombre de coordination de 6 à 8)² ou les lanthanides Ln^{3+} (nombre de coordination de 8-9) pour le développement de sondes luminescentes pour des applications en imagerie optique.³ Le ligand L^5 est un premier exemple possédant un groupement coordinant en position R2 et l'intermédiaire L^6 est considéré comme une plateforme donnant accès à une nouvelle famille de bispidines possédant une denticité supérieure.

Les bispidines cibles sont représentées sur le Schéma 2.1 et le schéma rétrosynthétique sur le Schéma 2.2 :

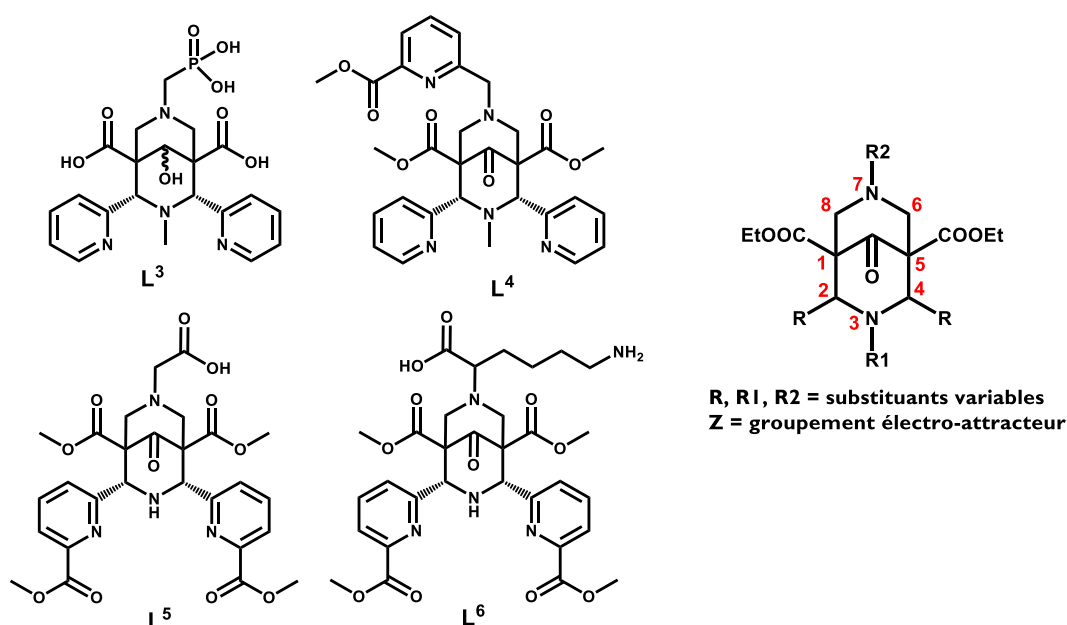
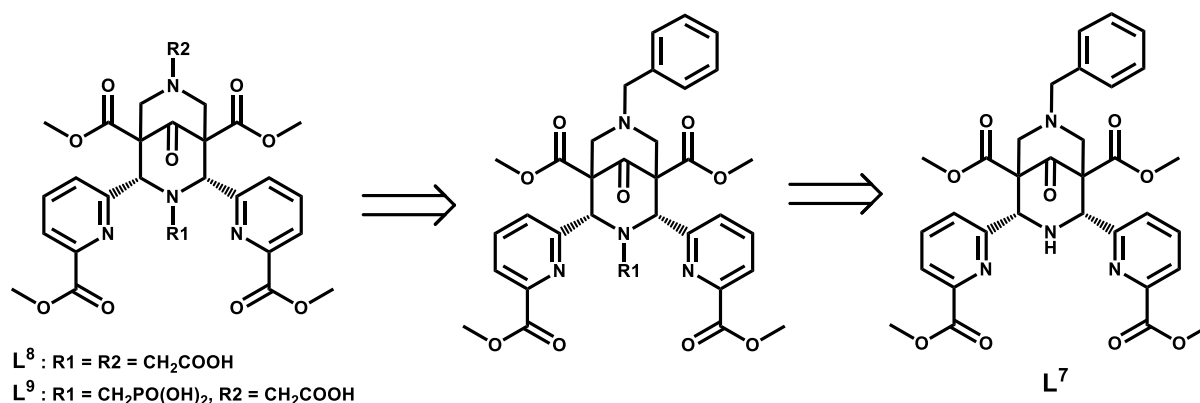


Schéma 2.1. Ligands cibles (L^3 , L^4 , L^5 , L^6) et numérotation du cycle bispidine

Schéma 2.2. Ligands cibles (L^7 , L^8 , L^9)

2. Synthèse des précurseurs

2.1 Rétro-synthèse

Les bispidines sont des composés obtenus par deux réactions de type double-Mannich.⁴ De manière générale, il s'agit d'une condensation impliquant un aldéhyde non-énolisable, une amine primaire ou secondaire ainsi qu'une cétone énolisable. Après formation d'une imine (si amine primaire) ou d'un ion iminium (si amine secondaire), l'énol présent en solution, en équilibre avec la cétone, attaque le centre électrophile de l'imine pour former une cétone fonctionnalisée avec un groupement amine en position γ .

Une première réaction de double-Mannich conduit à la formation d'un premier cycle pipéridone (Schéma 2.3), lui-même impliqué dans une seconde réaction de double-Mannich, en tant que cétone énolisable.

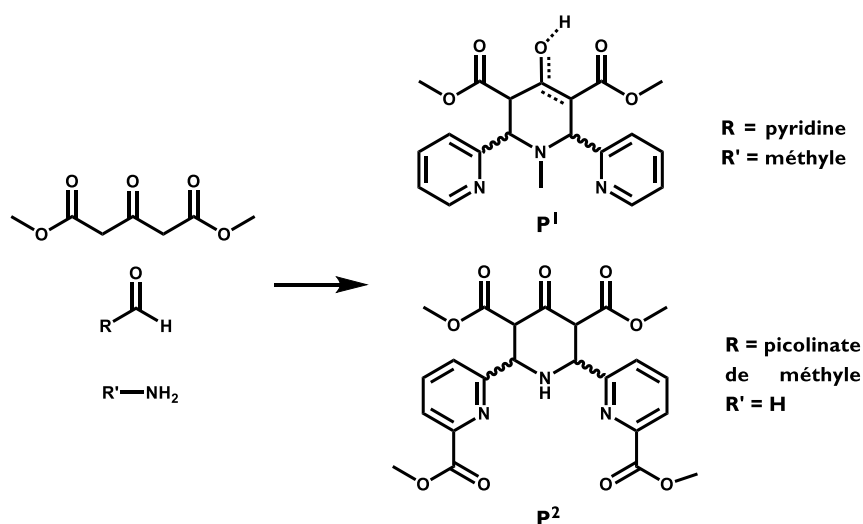


Schéma 2.3. Rétro-synthèse des pipéridones

La conception moléculaire de l'aldéhyde et de l'amine impliqués dans la réaction permet d'introduire les divers groupements cibles mentionnés plus haut.

2.2 Précurseur pipéridone P¹

2.2.1 Synthèse

Les ligands cibles L³ et L⁴ décrit sur le Schéma 2.1 possèdent tous deux des groupements pyridines en position 2 et 4 du bicyclic bispidine ainsi qu'un méthyle en position R1. La première synthèse est donc celle de la pipéridone P¹, cycle pipéridinone possédant ces mêmes groupements (Schéma 2.4).

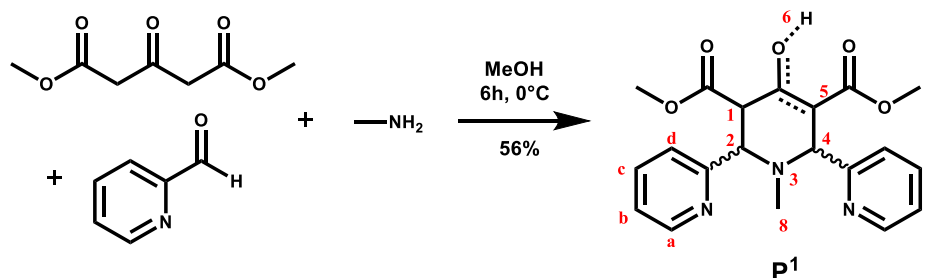


Schéma 2.4. Synthèse de P¹

La synthèse de la pipéridone P¹ a été réalisée selon le protocole décrit par T. Legdali et al⁵ et a été introduite par Knabe et Ruppental en 1964.⁶ Elle est effectuée à partir de méthylamine, de pyridine carboxaldéhyde et du diméthyl-1,3-acétone dicarboxylate, cétone β-diester énoisible. Cette réaction a lieu dans le méthanol, de 0°C à température ambiante et son rendement est proche de 60 %.

De par sa structure, on s'attend à ce que le composé existe sous la forme de 4 isomères. En effet, un équilibre céto-énolique existe du fait que la cétone possède deux protons énoisables (position 1 et 5). De plus, au cours de la synthèse, les groupements pyridine peuvent se positionner en position axiale ou équatoriale par rapport au cycle, et ainsi se trouver l'un par rapport à l'autre en configuration *trans* ou en configuration *cis*. En conséquence, 4 isomères sont possibles, comme représentés sur le Schéma 2.5.⁷

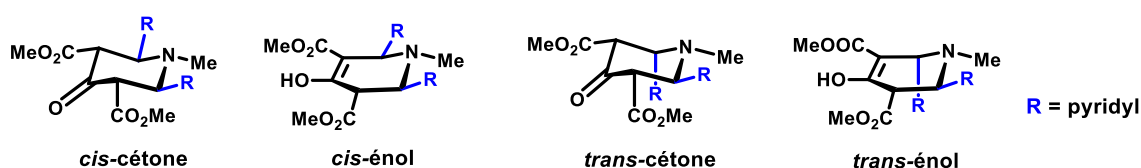


Schéma 2.5. Isomères de conformations de P¹

Du fait de l'instabilité de la fonction cétone et du fait que, de par le nombre d'isomères présents, le composé s'étale beaucoup sur silice, il n'est pas possible de le purifier par chromatographie sur couche mince. Il est isolé par recristallisation dans le méthanol.⁸ Dans ces conditions, les quatre isomères mentionnés ci-dessus sont obtenus dans des proportions qui peuvent varier en fonction des conditions de synthèse et de purification (type de solvant, temps de réaction, température). Dans le cas d'une synthèse dans un solvant polaire protique tel que le MeOH et d'une recristallisation dans ce même solvant, l'isomère

majoritaire est l'isomère *trans*-énol tandis que le *trans*-cétone est le moins favorable d'un point de vue thermodynamique.^{7,9}

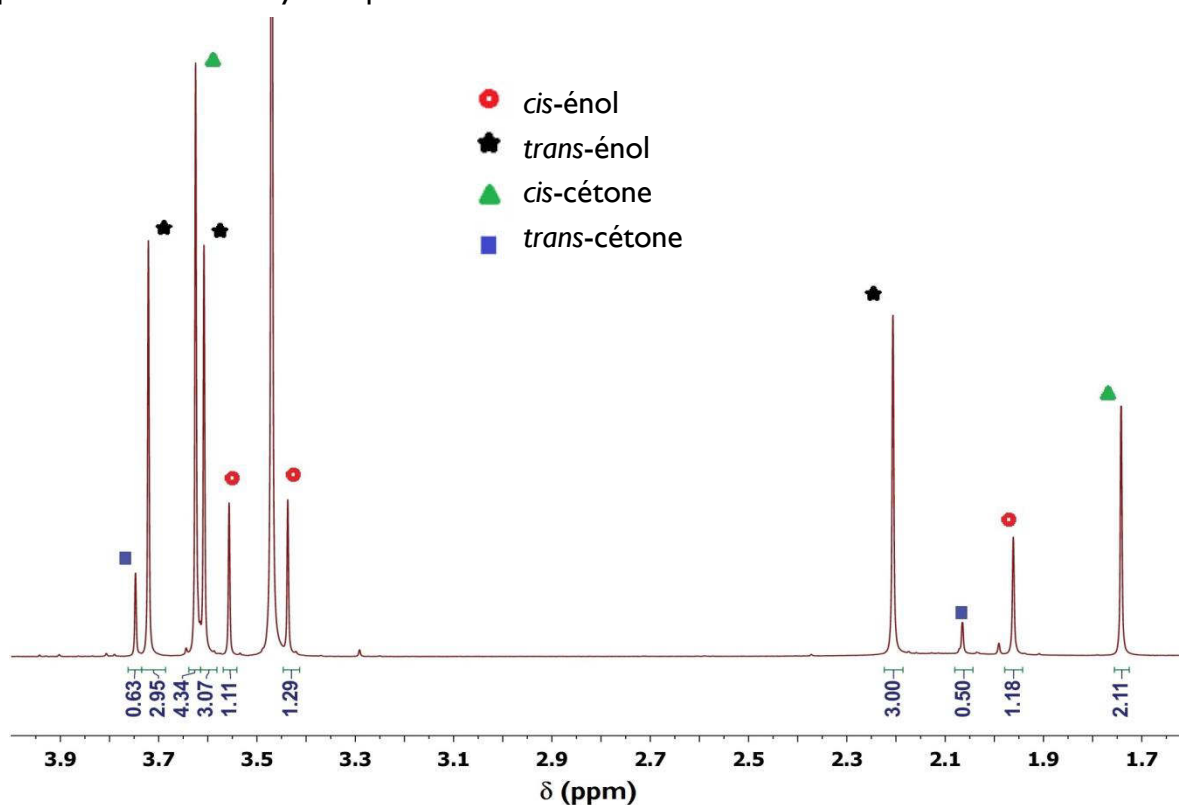


Figure 2.1. Agrandissement du spectre RMN ¹H de P¹ entre 1,6 et 4 ppm (400 MHz, CDCl₃)

Etant donné le nombre d'isomères, la RMN est particulièrement difficile à interpréter, mise à part pour le singulet du méthyle 8 ainsi que les signaux des esters méthyliques 7. Un agrandissement du spectre est montré sur la Figure 2.1. On remarque la présence de 4 singulets entre 1,7 et 2,2 ppm correspondant au méthyle 8 et confirmant la présence des 4 formes. A partir de ces intégrales, en considérant l'isomère *trans*-énol comme majoritaire et l'isomère *trans*-cétone comme minoritaire, les proportions des différentes formes ont pu être calculées : *trans*-énol 45 %, *cis*-cétone 32 %, *cis*-énol, 18 % et *trans*-cétone 6 %.

Nous avons pu constater expérimentalement que les isomères du précurseur P¹ sont sujets à un équilibre entre isomères. En effet, lors d'une synthèse de P¹, à la suite d'une cristallisation dans le méthanol, un batch contenant une proportion très majoritaire en isomère *trans* (environ 93 %) a été obtenu. Ce composé a été solubilisé dans du méthanol puis chauffé à reflux pendant 1h30. Le mélange analysé ensuite contenait alors une quantité très différente en isomère *trans* (environ 70 %). Les proportions des diverses formes ont été déterminées par RMN ¹H et sont résumées dans le Tableau 2.1.

	Recristallisation (%)	Après reflux (%)
<i>trans</i> -énol	84	63
<i>cis</i> cétone	4	20
<i>trans</i> cétone	9	8
<i>cis</i> énol	3	10

Tableau 2.1. Evolution des proportions des différentes espèces de P^I

P^I étant obtenu par recristallisation lente dans un solvant polaire protique tel que le méthanol, la proportion majoritaire en isomère *trans*-énol est en accord avec la littérature.⁷ Cependant, le reflux ici permet d'augmenter la proportion d'espèces en configuration *cis*, suggérant ici que ces espèces sont en équilibre en solution.

Toutefois, l'ion iminium formé lors de la réaction de type rétro-Mannich est également sujet à l'attaque d'autres composés nucléophiles présents. Ce mécanisme peut donc également être responsable de la dégradation du composé et de la formation de composés secondaires indésirables.

2.2.2 Isomérisation

Dans le cadre du sujet qui implique la coordination d'un métal dans la cavité des bispidines, la conformation finale nécessaire est la conformation chaise-chaise avec les deux substituants en position 2 et 4 en configuration *cis*. Il semble donc, au vu des proportions du mélange obtenu pour P^I, que seuls environ 50 % de bispidone *cis* puissent être obtenus après la deuxième étape de synthèse.

Cependant, dans certains cas mentionnés dans la littérature (les bispidones considérées sont représentées sur le Schéma 2.6),^{8,10} l'isomère *cis* est le plus stable thermodynamiquement et il peut être obtenu à partir de l'isomère *trans* par chauffage dans le MeOH.

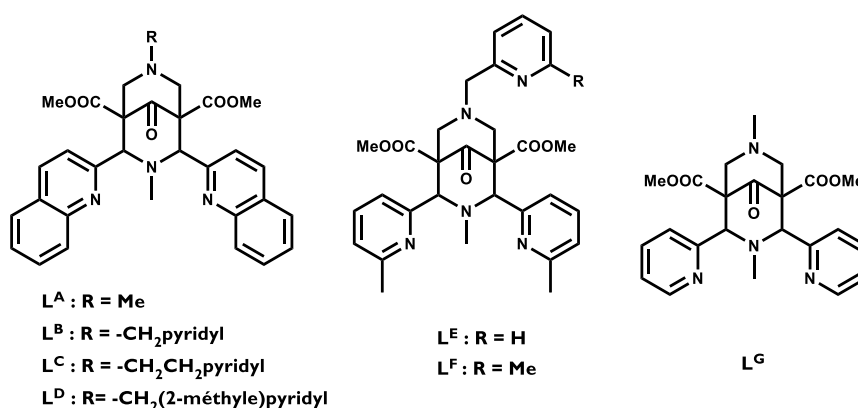


Schéma 2.6. Bispidones considérées dans la discussion

Cette isomérisation se déroule selon un mécanisme de type rétro-Mannich (Schéma 2.7).⁵ En milieu acide, ce mécanisme implique la protonation de la cétone de la bispidone. Par délocalisation d'électron au niveau du cycle pipéridone, celui-ci s'ouvre et un ion iminium est formé. Une rotation autour de la liaison N3-C2 est alors possible. Si l'énol formé attaque à nouveau l'ion iminium, la position du groupement en C4 est inversée.

Il en est de même pour les pipéridones qui s'isomérisent par un même mécanisme, vers la formation de l'isomère *trans*-énol plus stable.⁷

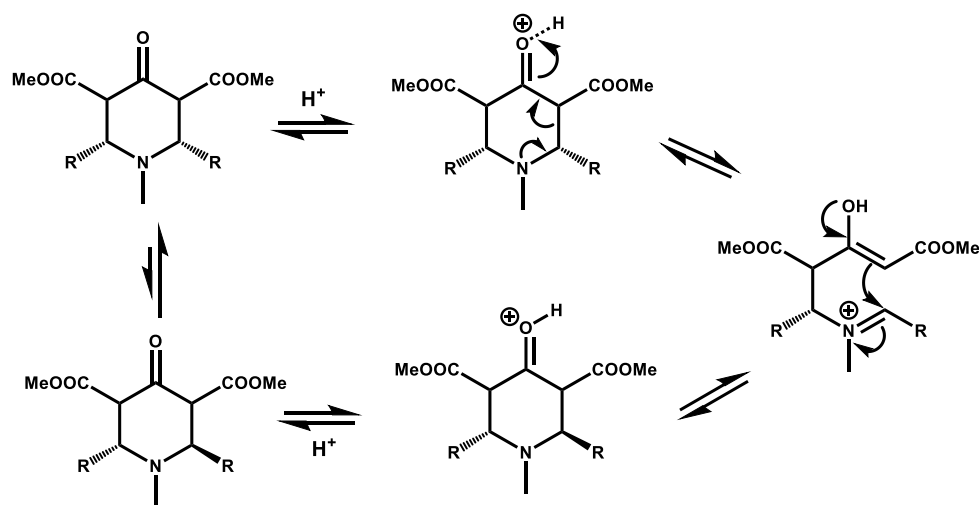


Schéma 2.7. Mécanisme d'isomérisation selon une réaction de type rétro-Mannich

Ainsi, pour ces composés et leurs analogues, la composition du mélange des divers isomères de structures des pipéridones après réaction n'influence pas le rendement de la formation des bispidones en ce qui concerne la formation de la bispidone *cis*. Le mélange obtenu à la suite de la synthèse de P¹ est utilisé sans purification pour la suite des synthèses.

2.3 Précurseur pipéridone P²

Afin d'envisager la possibilité de synthétiser les bispidines L⁵ à L⁸, une pipéridone avec deux substituants méthyl-picolinate au lieu de pyridines en position 2 et 4 ainsi qu'un hydrogène en R1 a été synthétisée.

Cependant, des travaux précédemment effectués au laboratoire¹¹ ont montré que le contrôle de la stéréochimie de ces familles de ligands était difficile. En particulier, l'encombrement stérique important généré par les groupements méthylpicolinate tend à favoriser les bispidones de configuration *trans*. En effet, la pipéridone a été obtenue sous forme d'un mélange *trans*-énol et de *cis/trans*-cétone 88/12,¹¹ pour donner la bispidone L⁵ en configuration *trans* (Schéma 2.8).

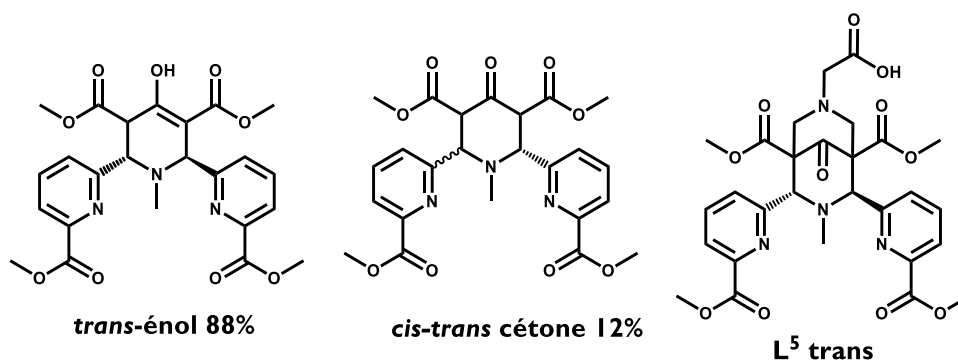


Schéma 2.8. Pipéridone P² et bispidine L⁶ obtenus précédemment

Dans ce cas, il a été montré que ni un chauffage dans le MeOH, ni une complexation avec le lutétium(III) n'ont permis de faire évoluer la bispidone vers une configuration *cis*. Il semble ici donc que la forme *trans* soit thermodynamiquement la plus stable. Ceci pourrait s'expliquer par un encombrement stérique important au niveau des positions 2, 3 et 4 comme cela a pu être observé pour d'autres composés.⁵

L'idée ici est donc de diminuer cet encombrement stérique afin de favoriser la configuration *cis* des substituants de la pipéridone, en ciblant la pipéridone P² avec un proton en position R1 plutôt qu'un méthyle.

La synthèse est donc effectuée à partir d'oxoglutarate de diméthyle, d'aldéhyde picolinate I précédemment synthétisée selon un procédé mentionné dans la littérature¹² et d'acétate d'ammonium, selon une adaptation de la méthode précédemment développée par Samhammer et *al.*¹⁰

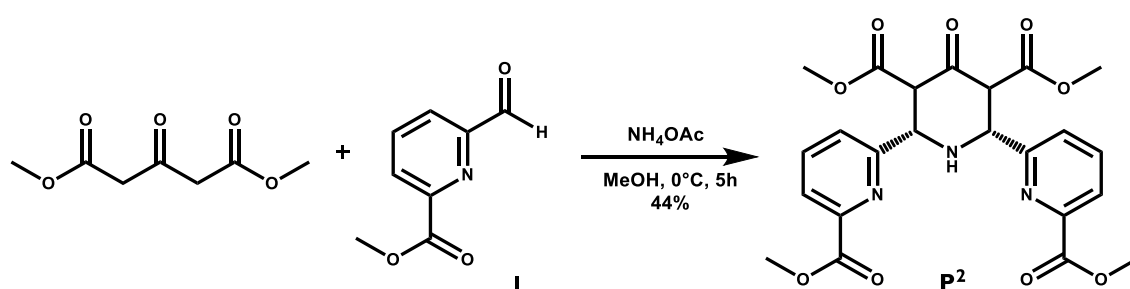


Schéma 2.9. Synthèse du précurseur P²

Ce composé est obtenu par recristallisation dans le MeOH, exclusivement sous forme *cis*-cétone. Le spectre RMN ¹H Figure 2.2 nous permet de confirmer que la pipéridone est symétrique d'une part et qu'il n'y a aucune forme énol présente d'autre part.

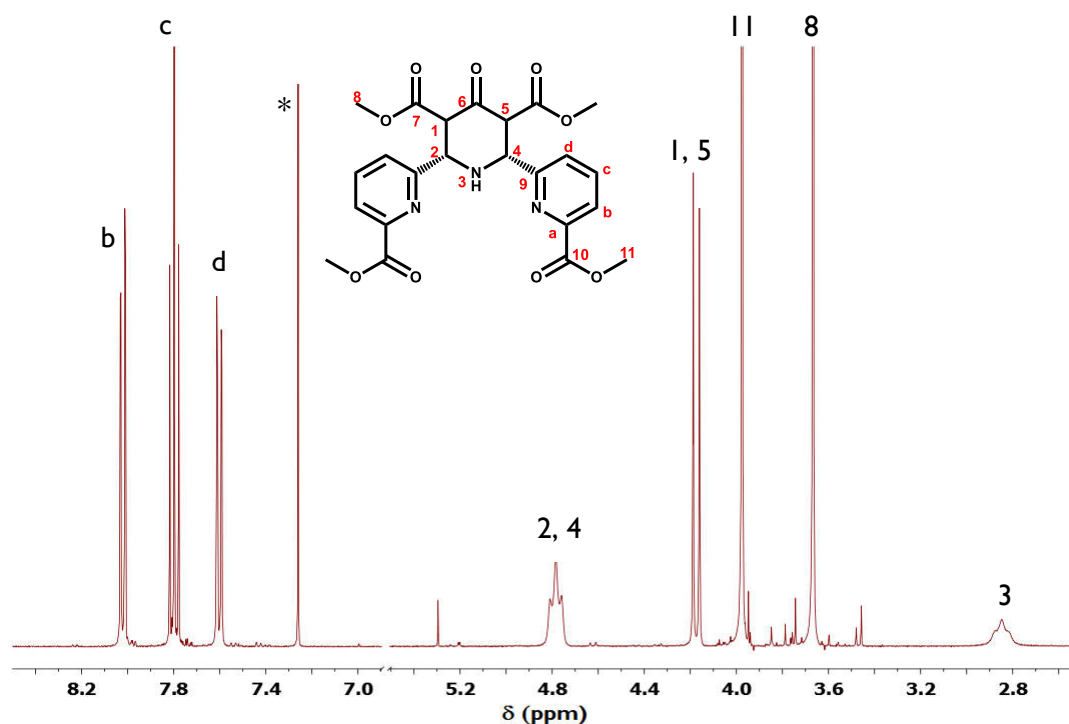


Figure 2.2. Spectre RMN ^1H du précurseur P^2 (500 MHz, $^*\text{CDCl}_3$).

On peut confirmer la présence du proton sur $\text{N}3$ par RMN COSY (COrrélation SpectroscopY), qui met en évidence les couplages scalaires, Figure 2.3, puisqu'un triplet est observé pour celui-ci, par couplage avec les protons 2 et 4. Une interaction entre les protons 2, 4 avec les protons 1, 5 est également observée.

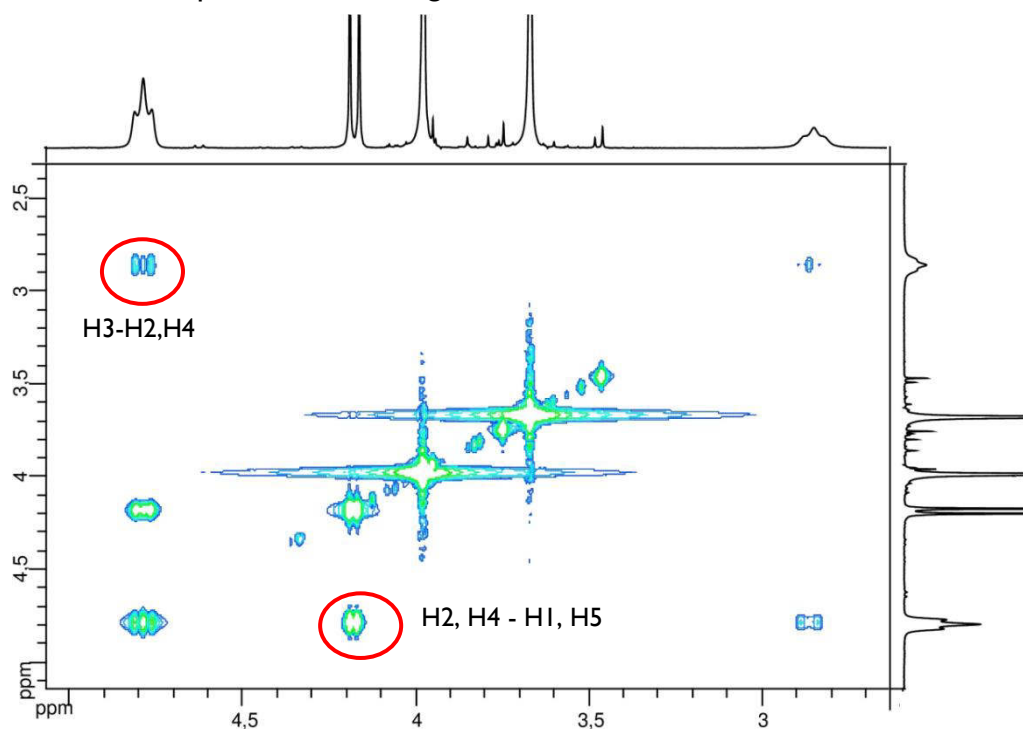


Figure 2.3. RMN ^1H - ^1H COSY P^2 (500 MHz, CDCl_3).

2. Synthèse du synthon aminophosphonate

De manière à pouvoir obtenir la bispidone possédant un substituant acide phosphonique, nous avons pensé l'obtenir par une seconde réaction de double-Mannich impliquant la réaction entre l'acide aminométhyle phosphonique, le formaldéhyde et une pipéridone.

Une voie de synthèse connue et bien décrite pour la synthèse des analogues phosphonates des acides aminés est la synthèse de Kabachnik-Fields.¹³ Cette dernière implique la réaction *in situ* d'une amine (primaire ou secondaire), d'un dérivé phosphite et d'un aldéhyde.

Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la synthèse du N,N-dibenzylaminométhylphosphonate de diéthyle 2 à partir de la dibenzylamine, du diéthyl phosphite et du formaldéhyde (Schéma 2.10) selon une adaptation d'une procédure développé dans la référence 14.

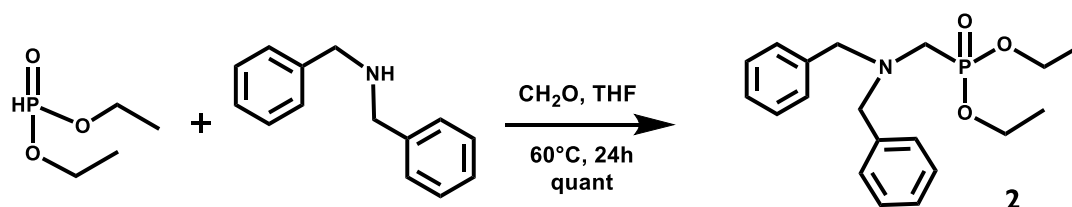


Schéma 2.10. Synthèse du N,N-dibenzylaminométhylphosphonate de diéthyle

D'après la littérature, deux voies mécanistiques sont envisageables.^{15,16,17} La première voie consiste en la réaction entre l'aldéhyde et l'amine pour la formation d'une imine dans le cas d'une amine primaire ou bien d'un α -hydroxy amine dans le cas d'une amine secondaire. Ce dernier, électrophile, réagit avec le dérivé phosphite, nucléophile pour former l'aminométhylphosphonate (Schéma 2.11).

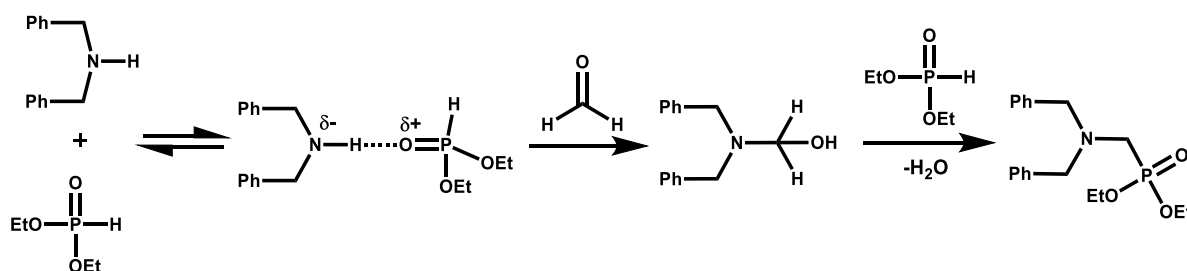


Schéma 2.11. Première voie mécanistique pour la synthèse du composé 1

Il semble qu'une deuxième voie soit possible, du fait de l'addition réversible d'Abramov, du dérivé phosphite sur l'aldéhyde. Cette réaction conduirait à la formation d'un α -hydroxy phosphonates (Schéma 2.12), bien qu'il n'y ait pas de preuves expérimentales de la formation de ce dernier.¹⁷ Certains auteurs affirment également qu'il est possible de former l'aminophosphonate à partir de l' α -hydroxy phosphonate.¹⁵

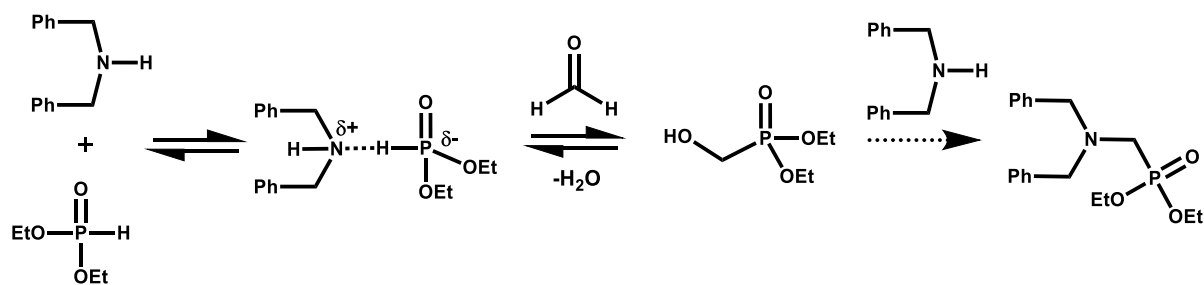


Schéma 2.12. Seconde voie mécanistique pour la synthèse du composé 1

Cependant, plus récemment, des travaux décrivant la réaction entre la cyclohexylamine, le benzaldéhyde et le dibutyl phosphite, ont montré que le gain énergétique de la formation de l' α -hydroxy amine puis de l'imine par élimination d'eau est inférieur à celui de la formation de l' α -hydroxyphosphonate.¹⁷ Ainsi, le passage de l' α -hydroxyphosphonate à l'aminophosphonate serait difficile car le gain énergétique est quasi nulle, suggérant donc une grande stabilité de l' α -hydroxyphosphonate.

Cette première étape conduit à la formation quantitative du N,N-dibenzylaminométhylphosphonate de diéthyle. Celui-ci subit par la suite une hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon (10 % Pd/C m/m) de sorte à éliminer les groupements benzyles protecteur de la fonction amine. Cette réaction est effectuée dans l'éthanol, à reflux pendant une nuit et permet d'obtenir l'aminophosphonate de diéthyle 3 avec un rendement quantitatif.

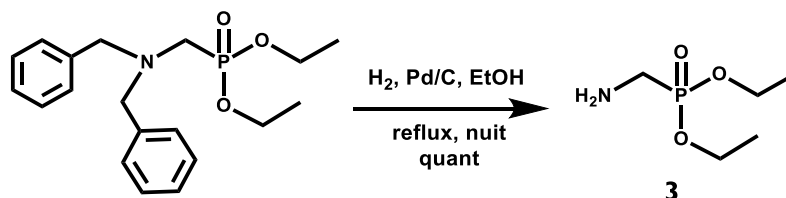


Schéma 2.13. Hydrogénolyse du N,N-dibenzylaminométhylphosphonate de diéthyle

La dernière étape de formation du dérivé acide aminométhyl phosphonique est l'hydrolyse en milieu acide du phosphonate de diéthyle. Pour cela, le diester est solubilisé dans une solution HCl 6 N et la solution est portée à reflux pendant 16 h.

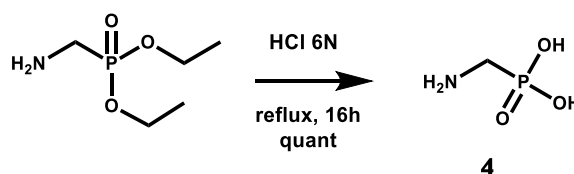


Schéma 2.14. Hydrolyse acide du phosphonate de diéthyle

Le composé final 4 est obtenu quantitativement sous forme d'un solide blanc.

4 Synthèse des bispidines : bispidonnes et bispidols

4.1 Ligand L¹

4.1.1 Synthèse

Afin d'obtenir le ligand cible L³, la première étape de synthèse est la réaction entre P¹ et le synthon acide aminométhyle phosphonique 3 précédemment synthétisé, comme décrit sur le Schéma 2.15.

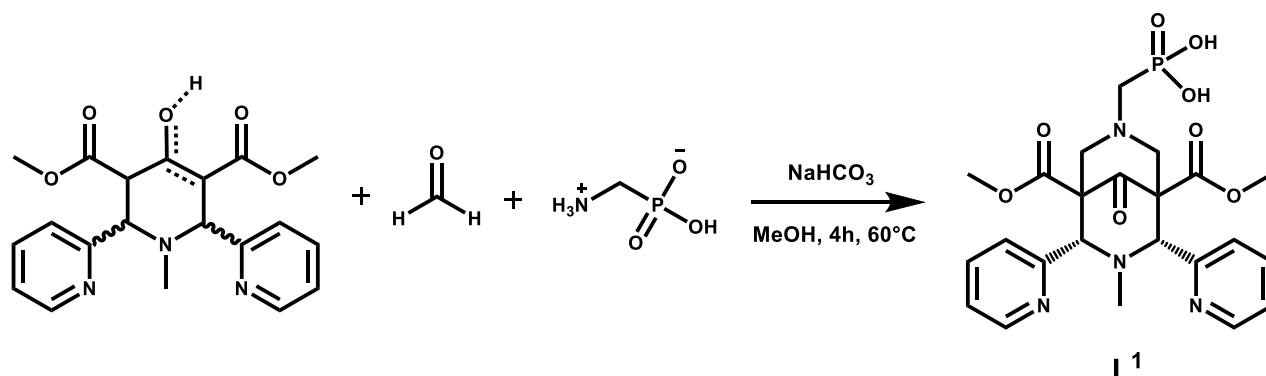


Schéma 2.15. Synthèse du ligand L¹

Plusieurs synthèses ont été effectuées pour l'obtention de L¹, chacune dans des conditions différentes, ce qui permet de définir des conditions optimales pour cette synthèse. Sur l'ensemble des synthèses, 3 équivalents de formaldéhyde par rapport à la pipéridone P¹ sont utilisés ainsi qu'un excès d'hydrogénocarbonate de sodium (1,5 éq), afin d'assurer la déprotonation de l'amine lors de la formation de l'imine.

Les différents essais de cette synthèse sont résumés dans le Tableau 2.2.

Après évaporation à sec du milieu réactionnel, celui-ci est repris dans un minimum de solvant (noté solvant de précipitation). Un insoluble est présent, isolé par centrifugation et lavé. Il correspond majoritairement au ligand L¹.

Essai	Solvant H ₂ O/MeOH (%)	éq acide	Conditions		Solvant précipitation	Rdt (%)
			Température	Temps		
1	37/63	1,1	60°C	4h	EtOH	16
2	45/55	1,1	60°C	6h40	EtOH	62
3	37/63	1,1	60°C	5h	EtOH	37
4	41/59	1,53	60°C	4h	EtOH	13
5	37/63	1,45	60°C	4h	EtOH	18
6	34/66	1,32	55°C	≤ 5h	MeOH	≤ 15
7	37/63	1,1	55°C	≤ 5h	MeOH	14
8	20/80	1	55°C	5h	MeOH	11
9	20/80	1,2	55°C	5h	MeOH	12
10	20/80	0,85	55°C	5h	MeOH	13

Tableau 2.2. Résumé des synthèses de L¹

D'après ces essais, plusieurs éléments peuvent être mis en évidence.

Tout d'abord, il semble que la modification de la quantité d'acide aminométhyl phosphonique ne soit pas prépondérante pour optimiser le rendement final (voir les réactions 8, 9 et 10). Aussi, le solvant de précipitation (MeOH ou EtOH) ne semble pas non plus modifier de manière importante le rendement. Les deux réactions pour lesquels le rendement est le meilleur sont les réactions 2 et 3, toutes deux effectuées à 60°C, un rendement optimal étant obtenu pour la réaction 2. Celle-ci, en plus d'avoir eu lieu dans un mélange H₂O/MeOH plus riche en eau que toutes les autres, a également duré un temps bien plus long, 6h40, contre 5h pour la réaction 3. Le temps est donc un critère qui paraît majeur, d'autant plus en comparant les réactions 3 et 5.

La disparition de P^I est suivie par CCM. La plaque CCM n'est ensuite pas très lisible car les bispidones s'étalent beaucoup sur plaque. Du fait que de nombreux intermédiaires peuvent être présents dans cette réaction, il est tout à fait possible que P^I soit totalement consommé par la réaction, bien que celle-ci ne soit pas encore terminée.

Les conditions optimales pour cette réaction semblent être proches des suivantes : 40-45% eau, 1.1 éq d'acide, 60°C, 6h30-7h, EtOH/MeOH comme solvant de précipitation.

En fin de synthèse, le ligand L^I est isolé uniquement dans la conformation chaise-chaise et avec les substituants pyridines en position *cis*, ceci étant démontré par des études RMN ¹H ainsi que par l'analyse de monocristaux obtenus par cristallisation dans le MeOH.

4.1.2 Etude RMN ¹H

Sur le spectre RMN ¹H (Figure 2.4), on peut constater la présence d'un doublet correspondant aux protons 9, à 2,55 ppm, qui indique un couplage scalaire avec le ³¹P (*J* = 13,0 Hz), deux singulets pour les protons 12 et 2, 4 (3,72 et 4,68 ppm), un système AB pour les protons 6, 8 en position axiale et équatoriale (3,15 ppm) ainsi que les protons aromatiques au-delà de 7 ppm). Cet ensemble de signaux correspond à une espèce symétrique puisqu'aucun des signaux n'est dédoublé. En RMN ³¹P, un seul pic est observé, il s'agit d'un multiplet à 15,29 ppm.

Pour pouvoir assurer une interprétation complète du spectre RMN ^1H , une analyse bidimensionnelle est nécessaire. Le spectre COSY permet d'attribuer les positions des protons aromatiques ainsi que celles des protons 6 et 8.

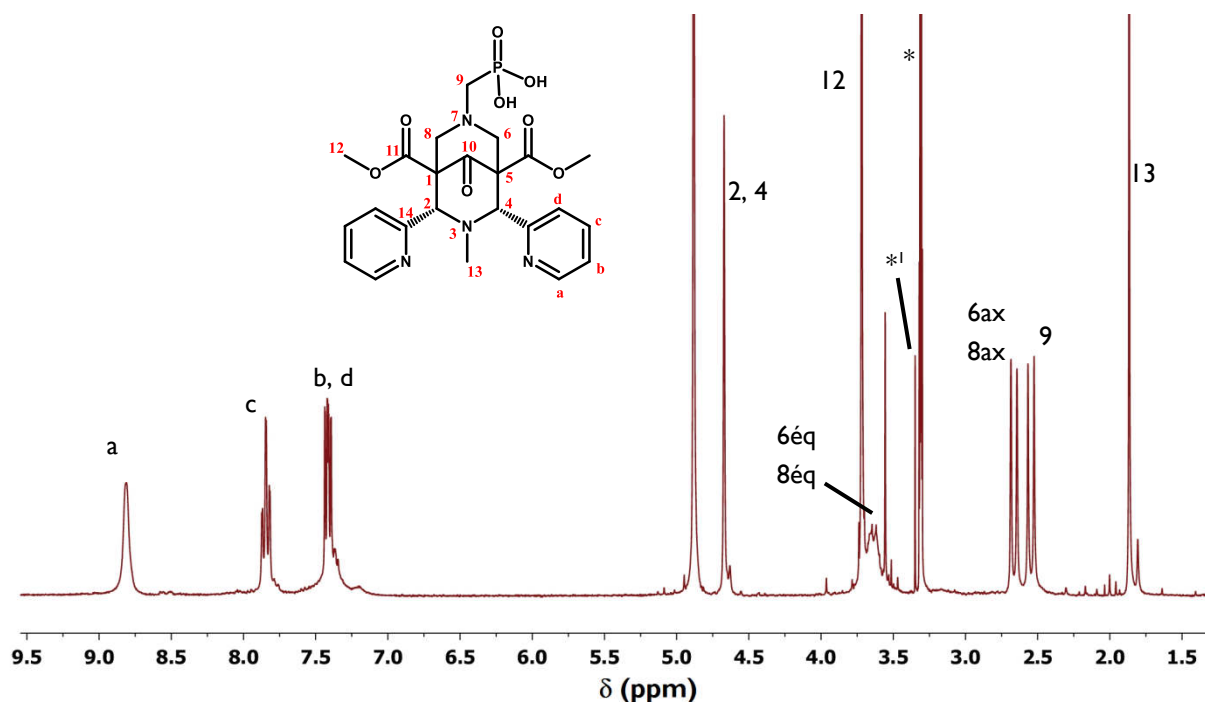


Figure 2.4. Spectre RMN ^1H de L' (400 MHz, *MeOD, *I MeOH résiduel)

Sur la Figure 2.5, les diverses interactions scalaires visibles sont notées. Cela nous permet d'attribuer les signaux des protons aromatiques. En considérant que le proton Ha est le proton le plus déblindé de par la présence d'un azote en position α (hétéroatome électroattracteur qui diminue la densité électronique du carbone portant Ha), le couplage avec Ha (8,81 ppm) le plus fort visible est celui avec le proton dont le déplacement chimique est de 7,4 ppm, qui correspond alors au déplacement chimique du proton Hb. De même, le proton b interagit avec le proton c, visible sur le spectre COSY comme indiqué, donnant accès au déplacement chimique de Hc. Enfin, on remarque des interactions moins visibles pour les protons d avec les protons c et b, Hd étant partiellement superposé au pic de Hb.

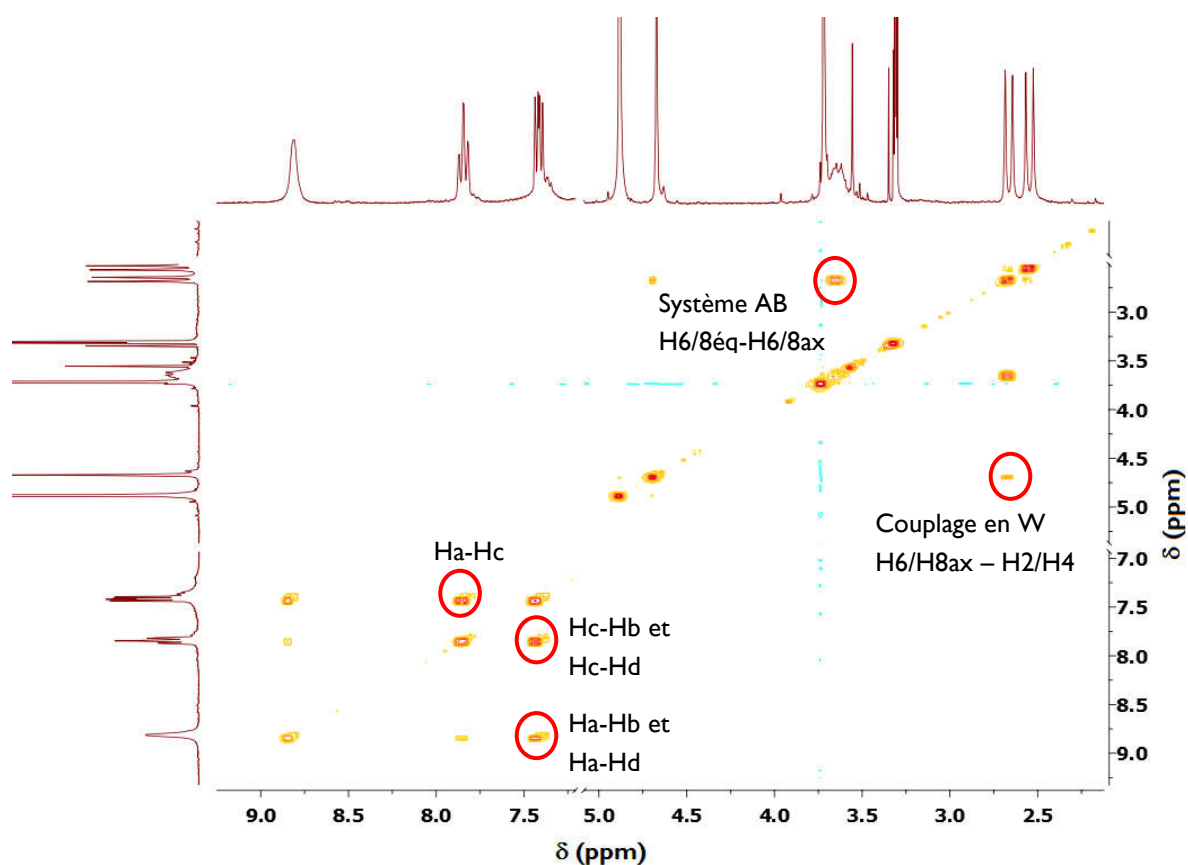


Figure 2.5. Spectre RMN ^1H ^1H COSY du ligand L¹

Ensuite, en position 6 tout comme en position 8, les protons axiaux et équatoriaux peuvent être différenciés, au vu des couplages observés qui suggèrent la présence d'un système AB.

De plus, nous sommes ici en présence de couplage 4J sur un système saturé. De tels couplages sont généralement trop faibles pour être détectés, sauf dans certaines configurations.^{18,19} C'est notamment le cas pour des protons présents sur des cycles saturés ayant des contraintes cycliques importantes. Deux couplages sont alors observables, ils sont liés à un alignement adéquat des orbitales entre les liaisons C-H et C-C. Deux configurations géométriques correspondent alors : la forme en W et la forme en U (Schéma 2.16), le « couplage en U » étant généralement plus rare. Par exemple, sur le Schéma 2.16 un couplage en W peut être observé entre les protons en position équatoriale (bleu) et un couplage en U peut être observé entre les protons en position axiale (rouge). La présence d'un tel couplage pour les bispidines est caractéristique d'une conformation chaise-chaise des deux cycles pipéridines.

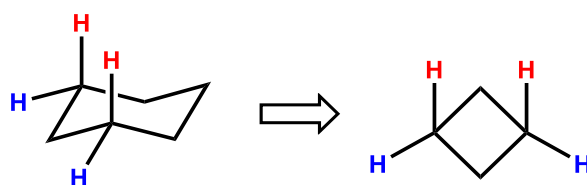


Schéma 2.16. Exemple représentation couplage W (bleu) et U (rouge)
(gauche : vue de côté ; droite : vue de face)

Dans le cas de L^1 , on remarque grâce au spectre RMN COSY qu'un tel couplage est présent entre les protons de la partie A du système AB à 2,66 ppm et le singulet des protons 2 et 4. Ces derniers étant en position axiale, ce couplage est à priori présent vis-à-vis des protons 6 et 8 axiaux. Par conséquent, on attribue le déplacement chimique des protons 6 et 8 en position équatoriale à 3,63 ppm. On confirme ainsi la conformation chaise-chaise adoptée par le ligand L^1 .

On observe enfin sur la RMN 1H - 1H COSY une interaction entre les protons 9 et les protons 6, 8 axiaux. Cette interaction est également un couplage 4J qui suggère la possibilité que les protons 9 soit dans une position vis-à-vis des protons 6,8 axiaux permettant un tel couplage. Ces couplages en W sont trop faibles ici pour que les constantes de couplage puissent être déterminées.

4.1.3 Structure cristallographique

En complément des études RMN, une structure cristallographique de L^1 , en tant que complexe de sodium, a pu être obtenue (Figure 2.6), en collaboration avec le Dr Franck Camerel (Institut des Sciences Chimiques de Rennes).

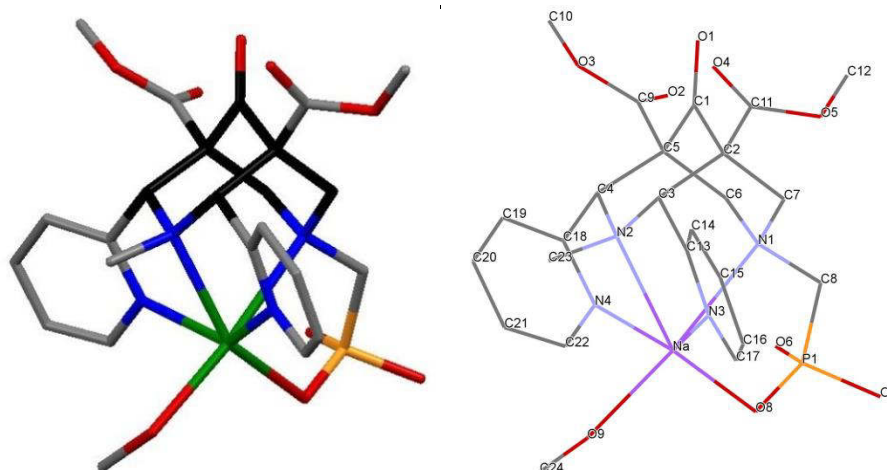


Figure 2.6. Structure cristallographique de NaL^1

L^1 cristallise dans le groupe d'espace P-1. Cette structure nous permet de confirmer la conformation de la bispidine, chaise-chaise. Elle met également en évidence la présence de l'acide phosphonique en R2. Celui-ci, sous forme $-P(O)OHO-$ participe à la coordination de l'atome de sodium présent dans la cavité, lui-même introduit par la présence de la base

NaHCO₃. On constate que, du fait de la présence du sodium, les deux substituants pyridines sont tournés vers la cavité et les azotes pyridiniques contribuent à la coordination du métal. Il en est de même pour les azotes N3 et N7 de la bispidine. Le sodium est hexacoordiné puisqu'une molécule de MeOH complète la sphère de coordination.

Un exemple de complexe bispidine-métal alcalin est celui de L⁶⁰ (Figure 2.7) dont la structure du complexe de lithium a été obtenue.²⁰ Les données de la structure de LiL⁶⁰ et de NaL^I sont résumées dans le Tableau 2.3 (numérotation d'après la structure annotée Figure 2.6).

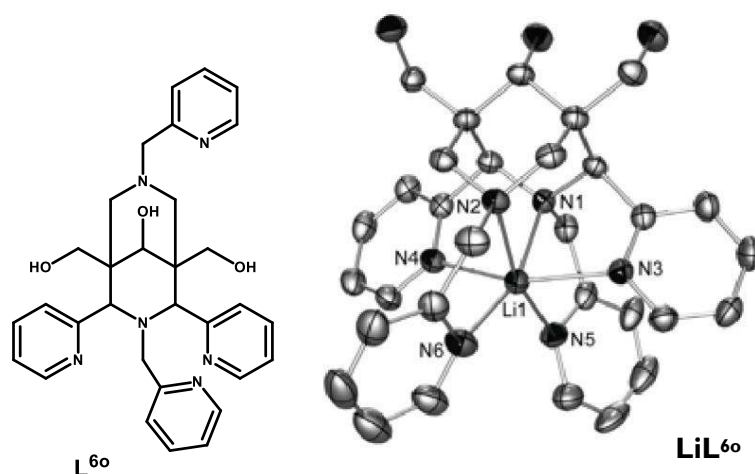


Figure 2.7. Formule du composé L⁶⁰ (gauche) et structure cristallographique de LiL⁶⁰ (droite)²⁰

	Complexe	
	NaL ^I	LiL ⁶⁰
Distances		
N1···N2	2,943(1)	2,89
N3···N4	4,652(1)	4,47
M···N1	2,455(1)	2,120(6)
M···N2	2,620(1)	2,236(6)
M···N3	2,480(1)	2,272(6)
M···N4	2,491(1)	2,315(6)
M···O8 ou M···N _{R2}	2,334(1)	2,092(6)
M···O9 ou M···N _{R1}	2,366(1)	2,191(6)
Angles		
N1···M···N2	70,8(4)	83,0(2)
N3···M···N4	138,7(1)	154,3(3)
N1···M···O8/N _{R2}	148.8	159.8(3)
N2···M···O9/N _{R1}	174.6	164.6(3)

Tableau 2.3. Données cristallographique expérimentales de NaL^I et LiL⁶⁰

Chacun des deux complexes a une géométrie octaédrique distordue, comme nous l'indiquent les différences au niveau des distances entre les atomes coordonnant et le métal (ces distances sont identiques sur une structure parfaitement octaédrique). Les angles indiqués nous montrent le même constat, puisqu'ils s'éloignent de 90° .

En revanche, ces deux structures sont très différentes. En effet, la position du métal alcalin n'est pas similaire sur les deux complexes. Les distances entre le sodium et les hétéroatomes sont significativement plus longues pour NaL^3 que pour le complexe de lithium. De même, pour NaL^3 , les angles caractérisent un écart plus important entre la structure du complexe et une structure octaédrique. Ces données mettent en évidence que le sodium est plus éloigné de la cavité que le lithium (les angles $\text{N1} \cdots \text{Na} \cdots \text{N2}$ de $70,8^\circ$ et $\text{N3} \cdots \text{Na} \cdots \text{N4}$ de $138,7^\circ$ sont particulièrement faibles).

Cette différence de position est probablement liée à la différence de rayon ionique entre le lithium (rayon ionique de 76 pm pour un nombre de coordination de 6) et le sodium (rayon ionique de 102 pm pour un nombre de coordination de 6).²¹ Ainsi le lithium a une densité électronique plus élevée que le sodium (charge identique mais le lithium est plus petit) donc il est probable que les interactions avec le chélatant soit plus forte pour celui-ci et ainsi que les distances de liaison soit plus courtes.

4.2 Ligand L^2

La bispidone L^1 est relativement instable du fait de la présence de la fonction cétone. Celle-ci peut, en milieu acide, être protonée et la présence d'une charge positive sur le cycle pipéridone peut entraîner une ouverture de celui-ci par un mécanisme de rétro-Mannich (Schéma 2.7).²² Ceci peut donc conduire à des isomérisations mais également à une dégradation.

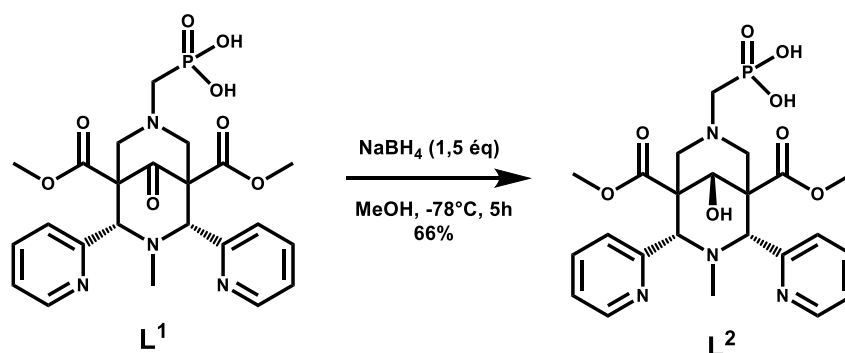


Schéma 2.17. Synthèse de L^2

Par conséquent, la fonction cétone de L^1 est réduite en alcool. Diverses conditions ont été étudiées pour cette étape.^{23, 24} La méthode appliquée ici est la réduction en présence de 1,5 équivalents de tétraborohydrure de sodium à -78°C (Schéma 2.17). Le maintien de cette température est effectué à l'aide d'un bain de carboglace et d'acétone. Il permet d'éviter la réduction des esters, la réaction est alors chimiosélective. Les études RMN ^1H et par effet

Overhauser nous permettent de confirmer la présence de la fonction alcool, la chimiosélectivité et de mettre en évidence que cette réaction est également stéréosélective.

Tout d'abord, sur le spectre RMN ^1H (Figure 2.8) la présence du pic à 4,55 ppm confirme l'apparition du proton 10 et le succès de la réduction. De même, sur le spectre RMN ^{13}C , la disparition du pic à 202,3 ppm correspondant au carbone de la cétone confirme que la réaction a bien eu lieu. On constate également un déplacement chimique très différent du signal du phosphore en RMN ^{31}P qui est désormais situé à 8,24 ppm contre 15,29 ppm pour L' .

Ensuite, nous sommes de nouveau en présence ici d'un système AB pour les protons H6 et H8. Un tel système ne montre pas nécessairement des effets du second ordre. En effet, lorsque la différence de déplacement chimique est très importante devant la constante de couplage J_{AB} deux doublets sont observés (les différents pics sont alors de même intensité). Les paramètres du système AB sont définis de la manière suivante.

Le paramètre $\Delta\nu$, calculé à partir de la position des pics du système caractérise la différence de déplacement chimique, assez élevée ici. Le calcul est le suivant :

$$\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4) \times (\nu_2 - \nu_3))}. \text{ Or ici on a } \nu_1 = 1699,8; \nu_2 = 1687,1; \nu_3 = 1510,9; \nu_4 = 1498,1 \text{ et donc on obtient } \Delta\nu = 189,2 \text{ Hz.}$$

La constante de couplage du système est quant à elle obtenue par interprétation du spectre RMN ^1H ; ici $J_{AB} = 12,3 \text{ Hz}$.

$$\text{Donc } \Delta\nu/J_{AB} = 14,9.$$

Des effets du second ordre sont visibles par l'apparition d'une structure en toit au niveau de l'intensité des pics, particulièrement mis en évidence lorsque le rapport $\Delta\nu/J_{AB} < 5$. Ici $\Delta\nu/J_{AB} > 5$ mais des effets du second ordre sont quelque peu visibles malgré tout.

A noter que pour les systèmes AB, les positions ν_A et ν_B du système sont obtenues par le calcul :

$$\nu_A = \nu_{\text{centre}} + \frac{1}{2}\Delta\nu \text{ et } \nu_B = \nu_{\text{centre}} - \frac{1}{2}\Delta\nu$$

$$\text{avec } \nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = \frac{1}{2}(1687,1 + 1510,9) = 1599,0 \text{ Hz}$$

Donc :

$$\nu_A = 1599,0 + \frac{1}{2} \times 189,2 = 1693,6 \text{ Hz}$$

$$\nu_B = 1599,0 - \frac{1}{2} \times 189,2 = 1504,4 \text{ Hz}$$

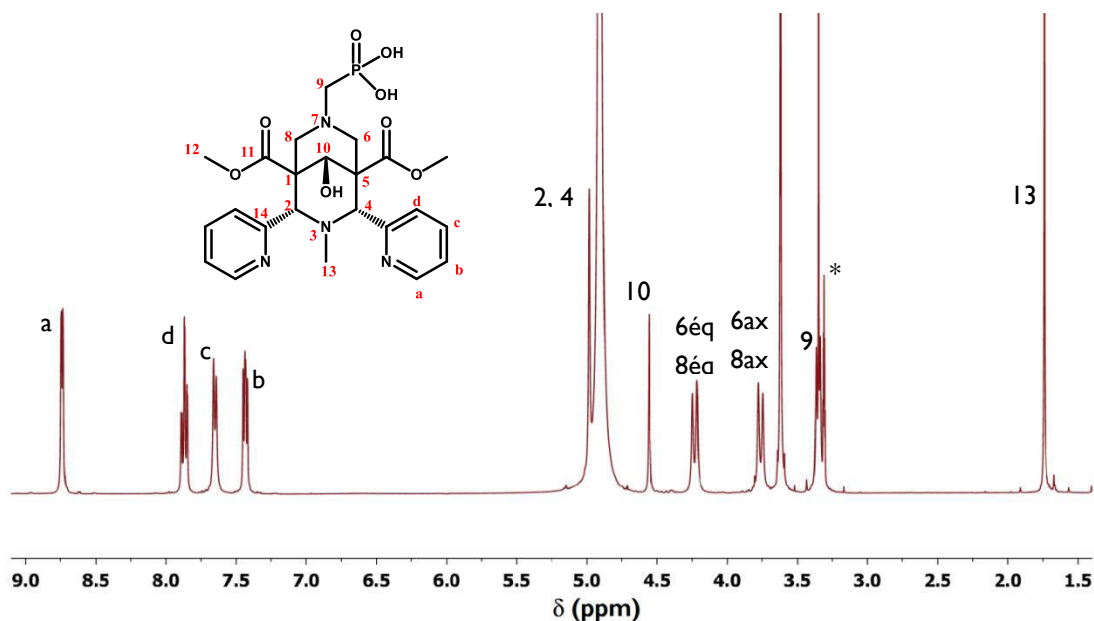
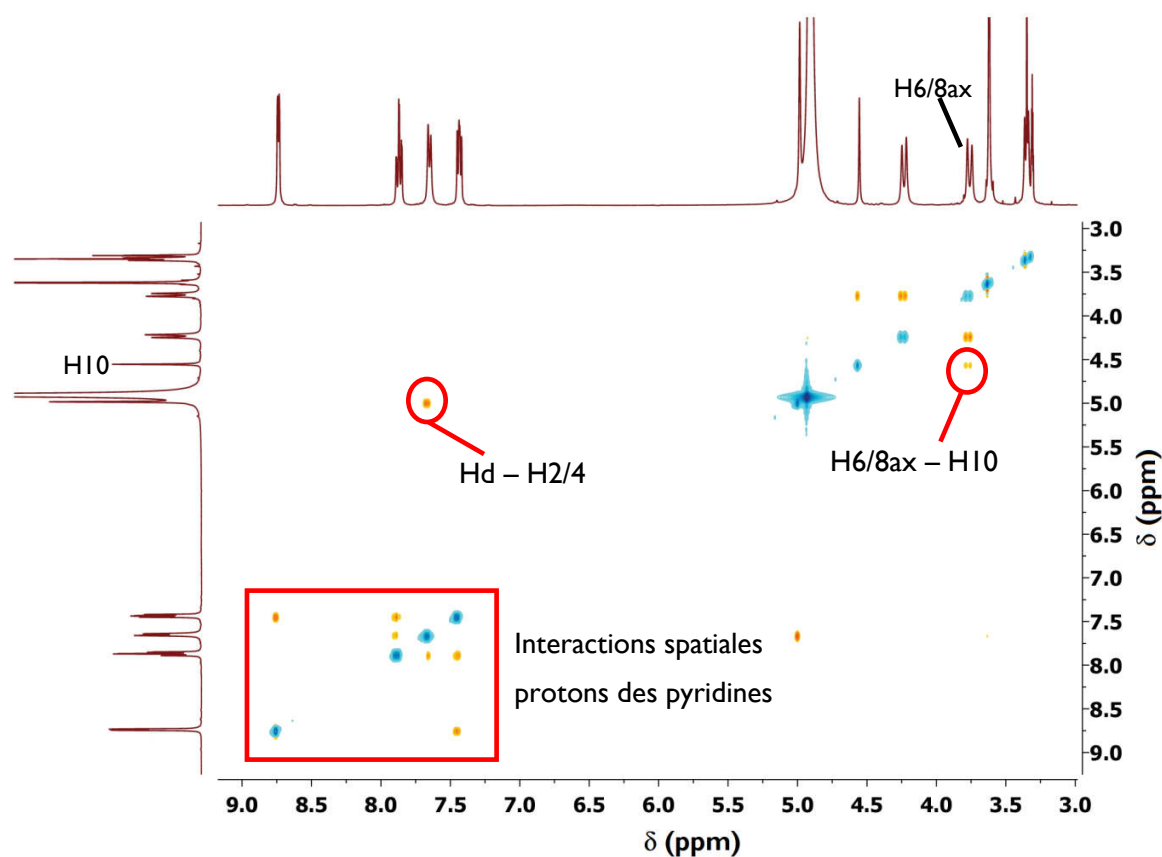


Figure 2.8. Spectre RMN ^1H de L^2 (400 MHz, CD_3OD^*)

En principe l'attaque de l'hydrure sur la fonction cétone peut avoir lieu de part et d'autre de celle-ci, du côté de R1 et du côté de R2. La formation de l'isomère pour lequel le groupement hydroxyle serait orienté vers R2 n'est pas observée, seul celui où le groupement hydroxyle orienté vers R1 est observé, comme montré sur le Schéma 2.17. Une interaction nette entre le proton H10 et les protons H6 et H8 axiaux est visible sur le spectre RMN par effet nucléaire Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy – NOESY) (Figure 2.9). Ainsi cette réduction est diastéréosélective.

Par ailleurs, une interaction est visible entre les protons Hd et les protons H2 et H4, permettant de dire que les azotes des cycles pyridines sont tournés vers la cavité de la bispidine. L'attribution des différents protons des cycles pyridines est effectuée comme précédemment pour L^1 , le spectre par effet Overhauser permet également de connaître le déplacement chimique de chacun d'entre eux.

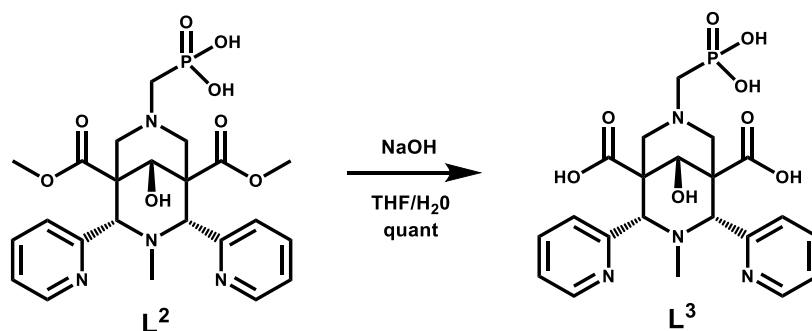
Figure 2.9. Spectre RMN NOESY de L² (400 MHz, CD₃OD)

4.3 Ligand L³

4.3.1 Synthèse

Une étape supplémentaire est nécessaire après l'obtention de L², il s'agit de la saponification des deux esters méthylique. L'ensemble des tests aura ensuite lieu dans des conditions de pH très variable ($-0,6 < \text{pH} < 12$) où ceux-ci ne seront pas chimiquement stables. D'autre part, des tests dans un sérum de rat sur le bispidol pour lequel R1 = R2 = -CH₂pyridyl ont permis de montrer que les fonctions ester sont partiellement ou totalement hydrolysées par des enzymes esterase.²³

Compte-tenu des substituants de la bispidine, cette saponification est également nécessaire pour favoriser la solubilité du ligand et du complexe en milieu aqueux.

Schéma 2.18. Saponification de L²

D'un point de vue expérimental, l'ajout d'hydroxyde de sodium est effectué de manière progressive en fonction de l'avancement de la réaction. De manière générale, un excès de base est utilisé, du fait que celle-ci est également impliquée dans la déprotonation des protons acides de l'acide phosphonique, ainsi que des ammoniums. En fin de réaction, le ligand L^2 peut être obtenu soit par précipitation dans une solution d'acide chlorhydrique, soit par chromatographie sur phase inverse en présence d'acide trifluoroacétique (conditions : C18, H_2O/ACN (0,1 % TFA) 100/0 à 80/20). Dans les deux cas, celui-ci est isolé totalement protoné. La teneur en HCl a été déterminée par dosage RMN en présence de 4-DMAP et par analyse élémentaire CHN. En fonction des batchs obtenus (conditions différentes), la quantité de base à utiliser peut varier (2 à 8 éq), ainsi que le temps de réaction (1 à 3 jours). La saponification est quantitative et le composé est obtenu propre comme le montre le spectre RMN 1H Figure 2.10. La pureté du composé est confirmée par le spectre RMN ^{31}P qui montre un signal unique à 16,28 ppm.

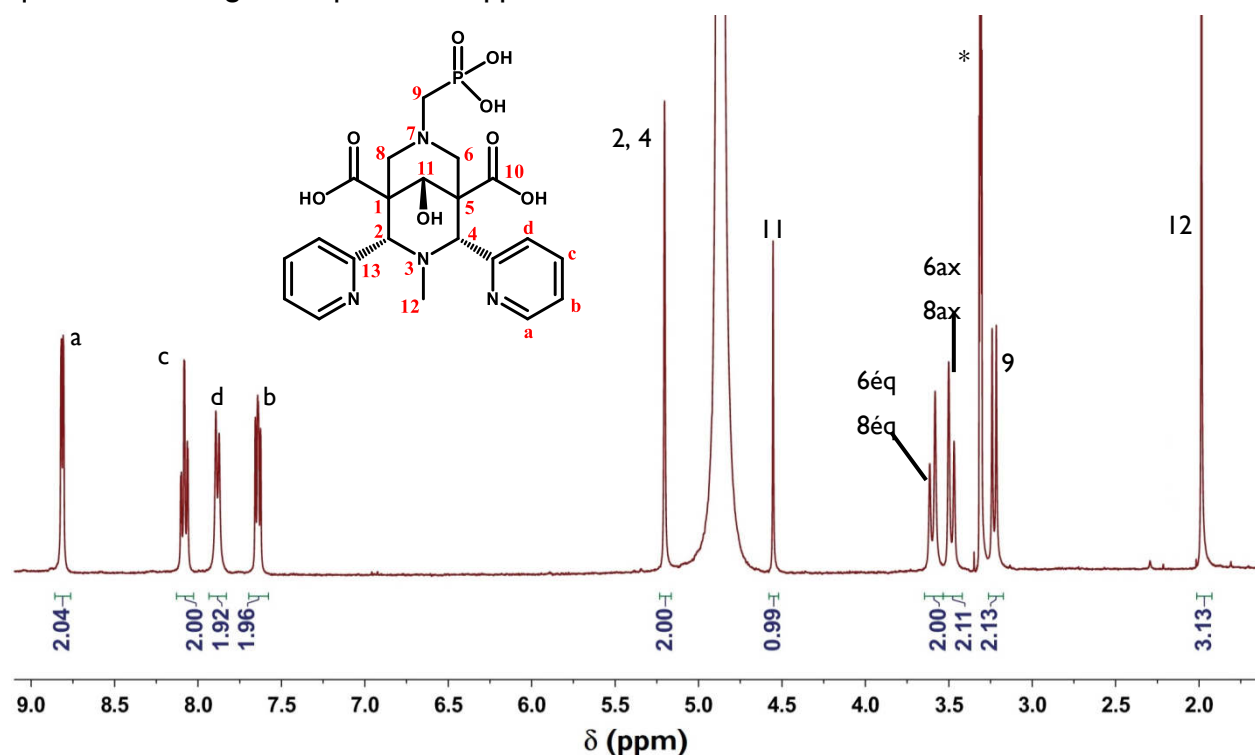


Figure 2.10. Spectre RMN 1H de L^3 (400 MHz, *CD_3OD)

En effet, l'obtention de L^3 est confirmée par la disparition du singulet correspondant aux esters méthyliques (3,62 ppm Figure 2.8). Comme décrit précédemment, un système AB est également observé pour L^3 au niveau des protons H6 et H8, mais ces caractéristiques évoluent. Pour L^2 , le rapport $\Delta\nu/J_{AB}$ était supérieur à 5 et de ce fait, le système AB ne présentait pas une structure en toit nette.

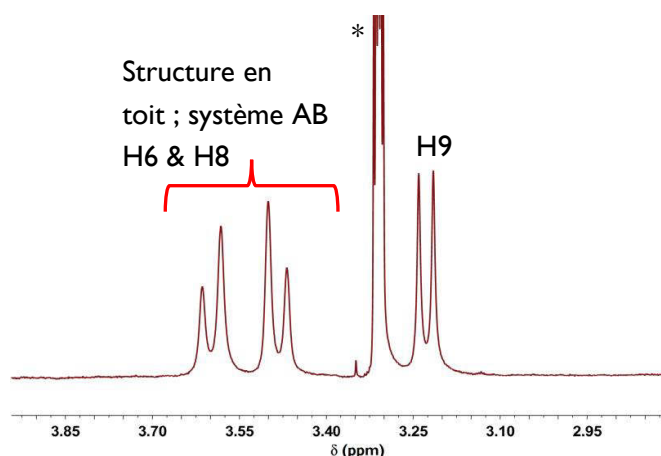


Figure 2.11. Agrandissement spectre RMN ^1H L^3 (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$)

Les paramètres du système pour L^3 ici sont les suivants :

$\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4) \times (\nu_2 - \nu_3))}$. Or on a ici $\nu_1 = 1446$; $\nu_2 = 1433,3$; $\nu_3 = 1400,6$; $\nu_4 = 1387,8$ et donc on obtient $\Delta\nu = 43,6$ Hz.

$\nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = \frac{1}{2}(1433,3 + 1400,6) = 1417,0$ Hz

Donc $\nu_A = 1438,8$ Hz et $\nu_B = 1395,7$ Hz

D'après le spectre RMN ^1H : $J_{AB} = 12,8$ Hz

Donc $\Delta\nu/J_{AB} = 3,4$, bien inférieur à 5 et on constate qu'une structure en toit est visible. Sur l'ensemble des trois ligands, la constante de couplage J_{AB} demeure quasiment constante.

Une étude RMN en fonction du pH de ce ligand est décrite dans le chapitre 3.

4.3.2 Structure cristallographique

Des cristaux de L^3 ont été obtenus par évaporation lente de MeOH et ont permis de connaître la structure cristallographique du ligand. Cette structure ainsi que les liaisons hydrogène d'intérêts sont décrites à la Figure 2.12.

Dans la discussion ci-après, la numérotation des atomes utilisée est celle de la structure Figure 2.12. Les atomes d'hydrogène, à l'exception de H2 (entouré en noir), H4, H6A et H7A ne sont pas représentés pour plus de clarté.

Par observation de l'effet nucléaire Overhauser, par RMN ^1H , on a pu confirmer la stéréosélectivité de la réduction, qui indique que l'alcool après réduction pointe en direction de R1. C'est également ce que nous indique la structure, puisque l'atome d'oxygène noté O002 est orienté vers N2 et que le proton H1 (provenant de l'hydrure) est orienté vers N1. La structure confirme également que les protons placés en C6 et C7 ont une interaction spatiale avec les protons aromatiques portés par C17 et C12, caractéristique d'une conformation chaise du cycle pipéridine pour lequel les substituant en C6 et C7, en position *cis* équatoriale, sont orientés vers la cavité. Cette orientation *syn* équatoriale des pyridines est rarement observée car une répulsion électrostatique des doublets des atomes d'azotes place habituellement les pyridines en position *anti*.^{5,25,26,27}

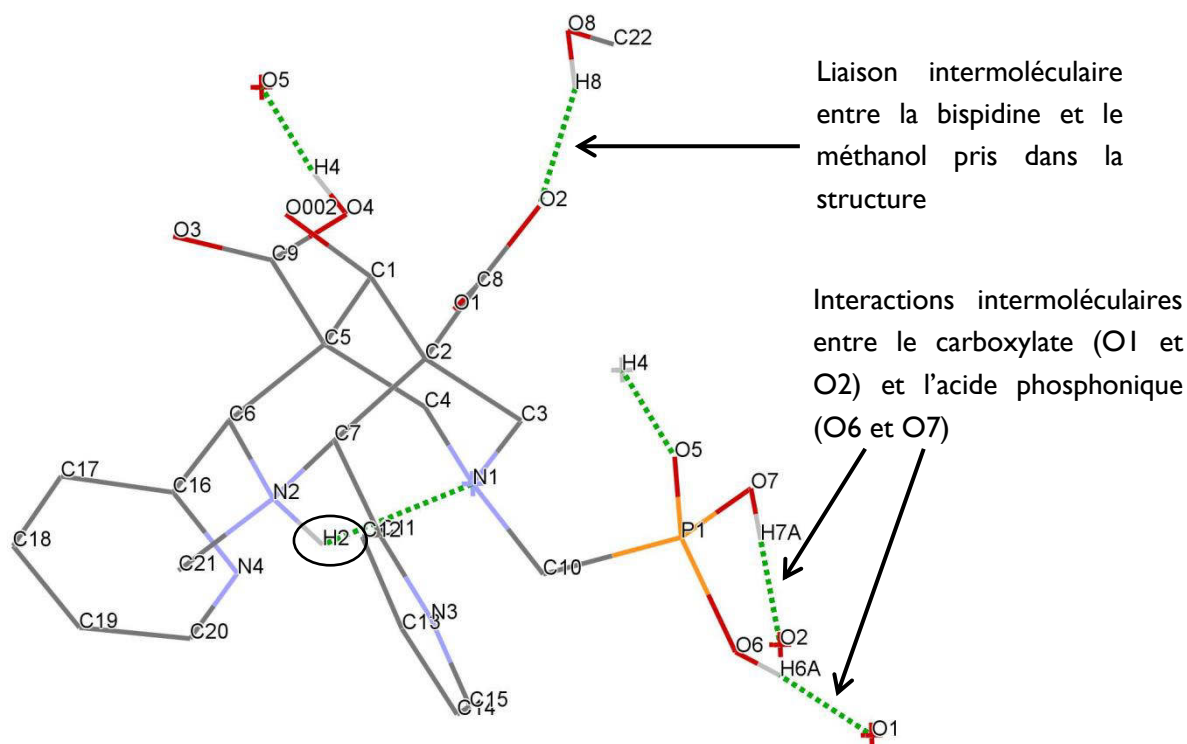


Figure 2.12. Structure cristallographique expérimentale de L^3

Sur cette structure, l'amine tertiaire en N2 est protonée et on observe la présence du proton H2. Cette protonation implique la présence d'une charge positive au sein de la cavité. La présence du proton H2 ($d_{N2-H2} = 0,894$) est fortement stabilisée par trois liaisons hydrogènes avec les atomes d'azote donneurs voisins N1 ($d_{H-N1} = 2,1142(105)$ Å ; liaison représentée en pointillé vert sur la Figure 2.12), N3 ($d_{H-N3} = 2,3543(78)$ Å) et N4 ($d_{H-N4} = 2,5267(86)$ Å), avec les cycles pyridines orientés vers la cavité. De plus, une liaison hydrogène intramoléculaire est indiquée entre N1 et N2, du fait de la protonation de N2 également.

Par ailleurs, diverses liaisons intermoléculaires sont présentes. L'acide phosphonique forme des liaisons hydrogènes avec les deux fonctions acides carboxyliques d'une bispidine voisine. Les hydrogènes H6A et H7A, respectivement portés par les oxygènes O6 et O7 de l'acide phosphonique, interagissent ainsi avec O1 et O2 (carboxylate). De même, l'oxygène O5 (formant une double liaison avec le phosphore) interagit avec H4 du second acide carboxylique protoné. En outre, une molécule de méthanol intervient dans la structure et on peut voir que l'oxygène O2 (carboxylate) interagit avec H8 du méthanol.

Ces interactions intermoléculaires expliquent l'état de protonation peu usuel dans lequel est isolé la bispidine. En effet, L^3 est obtenu avec un acide carboxylique (en C9), un carboxylate (en C8), les deux fonctions acides de l'acide phosphonique protonées. En principe, en solution aqueuse, le pKa d'un acide carboxylique est supérieur au second pKa d'un acide phosphonique.

Compte-tenu des interactions O6-H6A-O1 et O7-H7A-O2 il semble que les deux protons de l'acide phosphonique soient partagés entre celui-ci et le carboxylate.

Dans de telles conditions de protonation, on s'attend aussi à ce que l'amine tertiaire en R2 soit protonée, comme l'est l'amine tertiaire en R1, du fait du caractère basique d'une amine tertiaire. Ce n'est pourtant pas le cas. Cette structure nous permet donc de comprendre que la protonation de N2 implique également le doublet non-liant présent sur N1, dont le caractère basique n'est par conséquent pas observé.

Une comparaison peut être effectuée avec les ligands Hbipa^{1a} et Hbipa^{1b} développés par P. Comba.²⁸ Les structures cristallographiques de ces deux composés ont été obtenues en tant que sels de TFA et sont également protonées (Schéma 2.19).

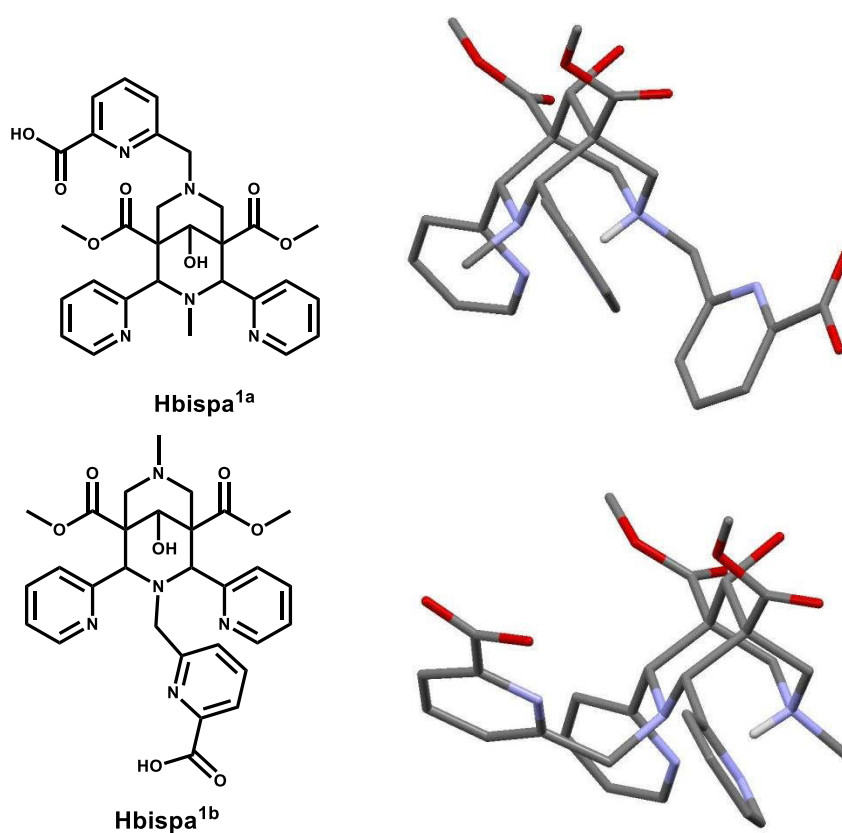


Schéma 2.19. Formules chimiques et structure cristallographique Hbipa^{1a} (haut) et Hbipa^{1b} (bas)

Un premier élément est que ces structures sont obtenus à pH acide et qu'une amine tertiaire du squelette bispidine est protonée (non les deux). Cette protonation implique une orientation *syn* des pyridines. Cependant, pour les ligands Hbipa^{1a} et Hbipa^{1b}, l'amine tertiaire protonée est N7 et non N3 comme c'est le cas pour L³. Cette différence est probablement liée à la présence de l'acide phosphonique qui influence le pKa de l'amine tertiaire en R2.

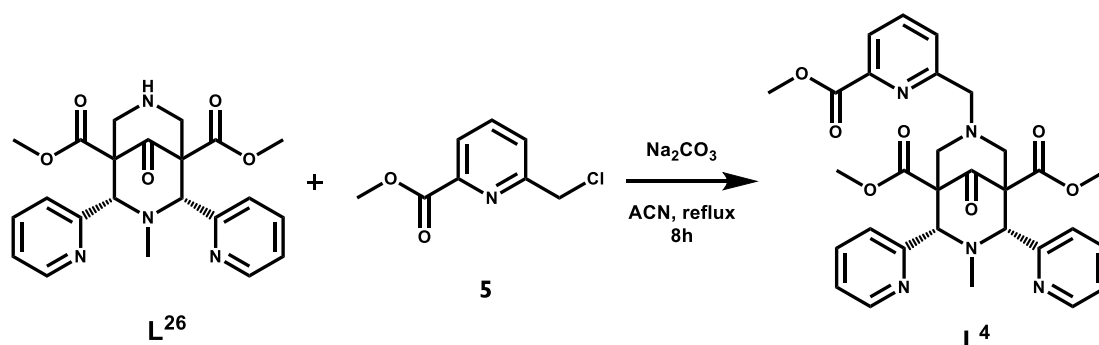
Ligand	Distance N3...N7	Distance N1py...N2py
Hbispal ^a	2,684(2)	4,922(3)
Hbispal ^b	2,664(2)	4,805(2)
L ³	2,693	4,691

Tableau 2.4. Données cristallographiques expérimentales

Les distances mesurées sur ces structures sont très similaires, une distance plus courte est toutefois mesurée entre les azotes des pyridines pour L³, ce qui peut être une conséquence de la protonation en N7.

4.4 Ligand L⁴

De manière à obtenir un ligand hexadentate pour la complexation, par exemple, du ⁶⁸Ga, la synthèse du ligand L⁴ a été effectuée à partir de la bispidone L²⁶ dont la synthèse est détaillée au chapitre 5. Cette réaction est une substitution nucléophile de l'amine secondaire en N7 sur un dérivé chloro-picolinate de méthyle, lui-même obtenu à partir de procédés mentionnés dans la littérature²⁹ (Schéma 2.20).

Schéma 2.20. Synthèse du ligand L⁴

A propos de cette réaction, la voie de synthèse de la bispidone L²⁶ est importante. Cette dernière avait été obtenue dans un premier temps en présence de sodium, et dans ce cas-là, la substitution nucléophile sur le dérivé chloré était inefficace. En revanche, après avoir obtenue L²⁶ une deuxième fois sans sodium, la substitution a été un succès. Le sodium peut être présent dans la cavité, comme c'est le cas pour L¹, il est donc possible que la réactivité de l'amine secondaire soit moins importante lorsque L²⁶ est obtenu sous forme de complexe de sodium.

Cependant, la publication simultanée des travaux de P. Comba²⁸ sur ce système a conduit à stopper nos recherches dans cette voie.

4.5 Ligand L⁵

4.5.1 Synthèse

La synthèse du ligand L⁵ effectuée préalablement par Amandine Roux avait conduit à la formation du ligand sous sa configuration *trans* exclusivement, comme représentée sur le Schéma 2.21.¹¹

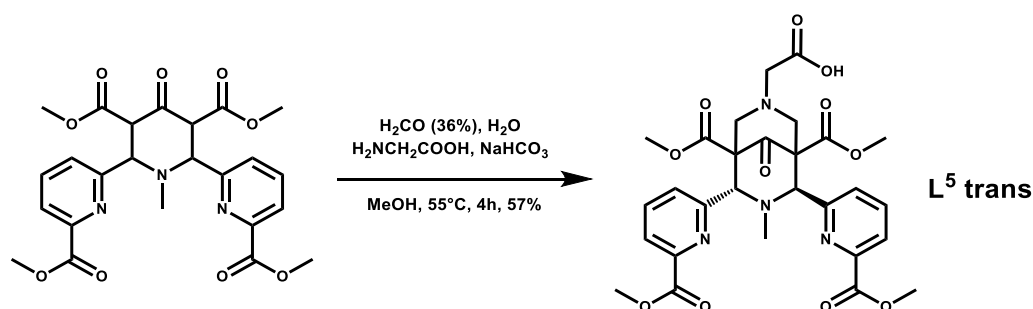


Schéma 2.21. Synthèse développée précédemment

Une nouvelle synthèse est donc prévue, cette fois dans l'intention de réduire l'encombrement stérique en R1. Pour cela, P² est utilisé et la nouvelle synthèse de L⁵ est montrée Schéma 2.22.

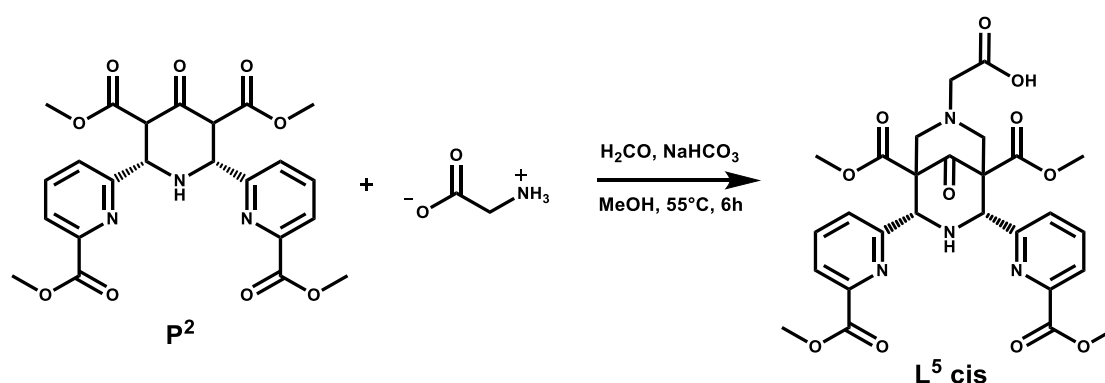


Schéma 2.22. Synthèse de L⁵

Le spectre RMN ¹H du brut réactionnel montre la présence du ligand en configuration *cis* comme espèce majoritaire et une recristallisation de celui-ci dans le méthanol a été effectuée. Des cristaux ont ainsi été formés, ce qui a permis de compléter l'analyse par RMN ¹H du ligand L⁶ par diffraction des rayons X.

4.5.2 Etude RMN ^1H

Au vu des signaux du spectre RMN ^1H montré sur la Figure 2.13, le ligand obtenu est bien symétrique, ce qui implique que les substituants méthyle picolinate sont bien en positions *cis*.

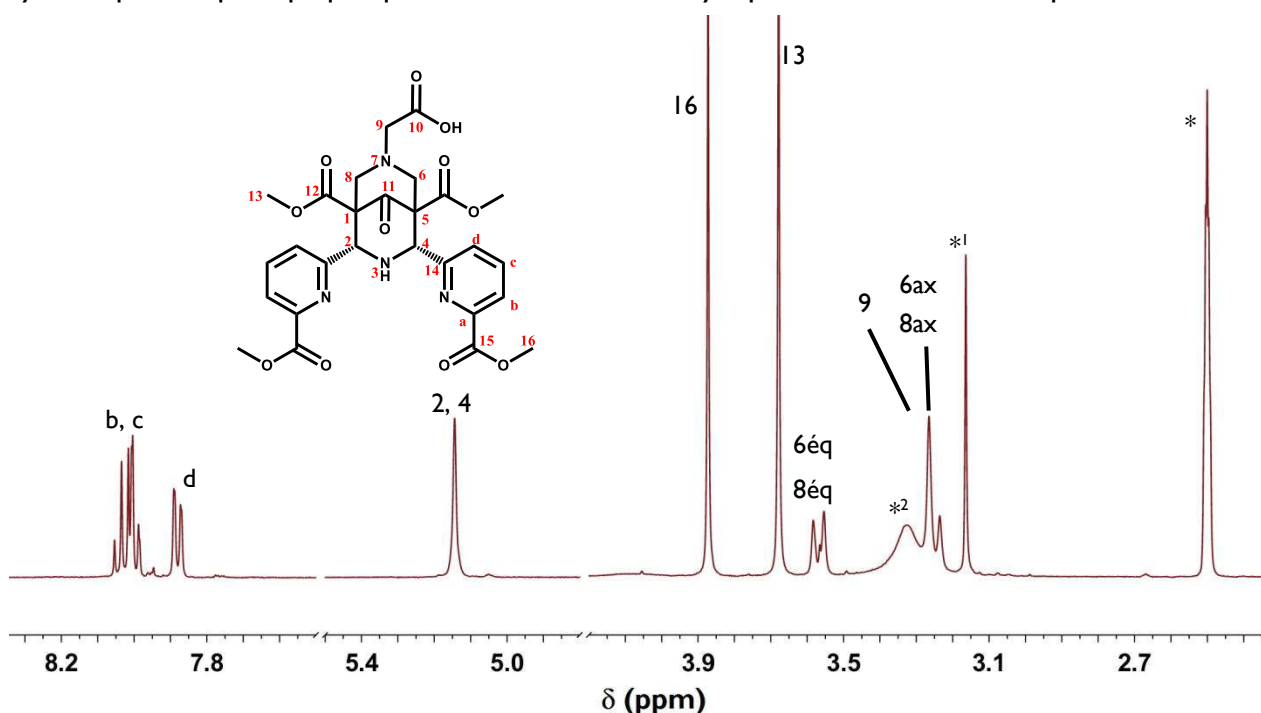


Figure 2.13. Spectre RMN ^1H de L^5 (400 MHz, *DMSO (* $^1\text{CH}_3\text{OH}$, * $^2\text{H}_2\text{O}$ résiduels))

De plus, une RMN bidimensionnelle ^1H - ^1H COSY (Figure 2.14) a permis de mettre en évidence le système AB entre les protons 6 et 8. Le couplage en W généralement présent était trop faible dans ce cas-ci pour être visible. Au niveau des protons aromatiques, on constate que les signaux des protons b et c sont superposés à 8 ppm et ne sont pas différenciables.

A partir de la RMN bidimensionnelle, il est possible de caractériser pleinement le système AB, dans ce cas :

$$\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4)(\nu_2 - \nu_3))}. \text{ Or on a ici } \nu_1 = 1433,8; \nu_2 = 1422,0; \nu_3 = 1306,4; \nu_4 = 1294,6 \text{ et donc on obtient } \Delta\nu = 126,8 \text{ Hz.}$$

$$\nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = \frac{1}{2}(1422,0 + 1306,4) = 1364,2 \text{ Hz}$$

$$J_{AB} = 11,8 \text{ Hz}$$

Donc :

$$\nu_A = \nu_{\text{centre}} + \frac{1}{2}\Delta\nu = 1364,2 + \frac{1}{2} \cdot 126,8 = 1427,6 \text{ Hz}$$

$$\nu_B = \nu_{\text{centre}} - \frac{1}{2}\Delta\nu = 1364,2 - \frac{1}{2} \cdot 126,8 = 1300,8 \text{ Hz}$$

$\Delta\nu/J_{AB} = 10,7 \text{ Hz}$. Compte-tenu du signal situé à 3,56 ppm, on remarque qu'une structure en toit apparaît, ce qui est cohérent au vu du rapport $\Delta\nu/J_{AB}$.

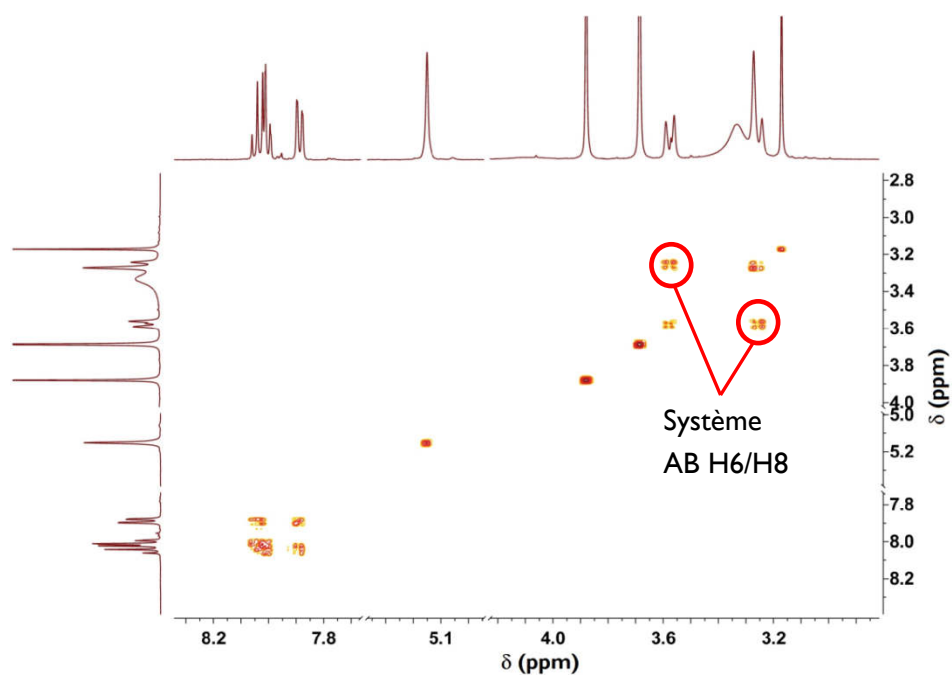


Figure 2.14. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY du ligand L^5 (400 MHz, $^*\text{d}^6$ -DMSO)

Une analyse par effet nucléaire Overhauser (Figure 2.15) a mis en évidence une interaction similaire à celle du ligand L^5 entre les protons 2, 4 et le proton d.

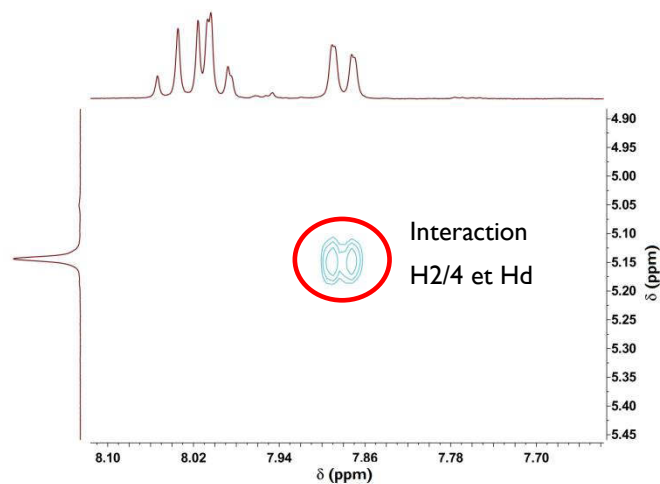


Figure 2.15. Spectre RMN ^1H ^1H NOESY du ligand L^5 (400 MHz, $^*\text{d}^6$ -DMSO)

Cette interaction suggère que les substituants pyridine sont en position *syn* équatoriale.

4.5.3 Structure cristallographique

Par évaporation lente de méthanol, le ligand L^5 cristallise dans le groupe d'espace $P2_1/m$ (Figure 2.16).

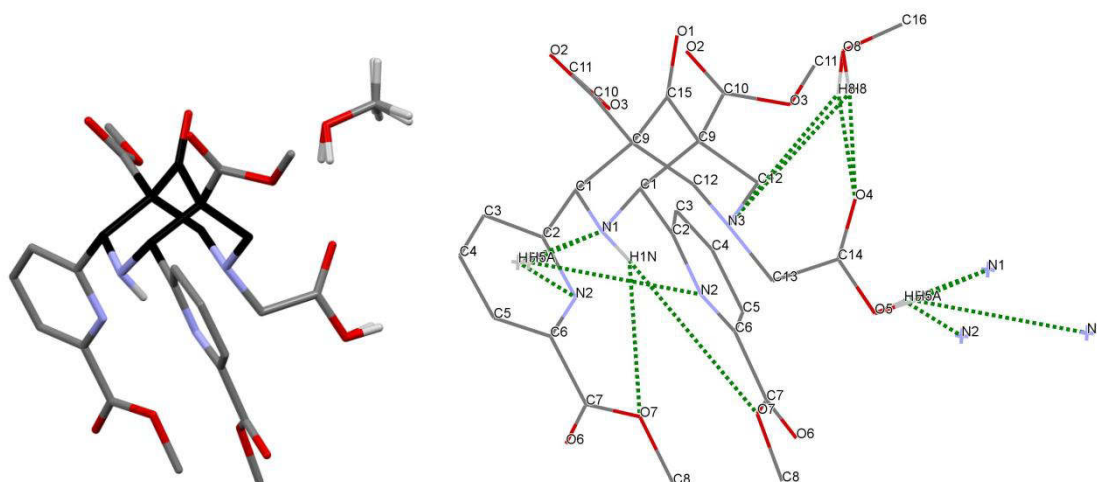


Figure 2.16. Structure cristallographique expérimentale de L^5 (gauche) ; interactions intermoléculaires en pointillé vert (droite)

Cette structure permet de confirmer différents éléments. Tout d'abord la présence et la configuration *cis* des groupements méthyle picolinate en C2 et C4, de l'hydrogène en R1 et du groupement méthyl carboxylate en R2. Le bicycle bispidine est bien en conformation chaise-chaise.

Plusieurs interactions sont présentes. Tout d'abord, l'azote N1 (numérotation de la structure) est impliqué dans des liaisons hydrogène avec l'hydrogène H5A de l'acide carboxylique présent en R2 sur une bispidine voisine. L'hydrogène H1N en R1 pointe vers la cavité de la bispidine. Ce proton est impliqué dans des liaisons hydrogènes avec les azotes donneurs d'électrons de la cavité : $d_{N2-H1N} = 2,471 \text{ \AA}$; $d_{N3-H1N} = 2,301 \text{ \AA}$ et $d_{N1-H1N} = 0,835 \text{ \AA}$ (du fait de la symétrie de maille, les azotes des pyridines sont identiques). On constate que l'hydrogène H1N interagit également avec les oxygènes O7 des acides picoliniques avec une distance plus élevée $d_{H1N-O7} = 3,999 \text{ \AA}$. Enfin, nous pouvons voir que la molécule de méthanol imbriquée dans la structure est impliquée dans des liaisons avec l'azote N3 et l'oxygène O4 de l'acide carboxylique en R2.

En comparaison avec le ligand L^3 , on remarque que la cavité de L^5 est moins contrainte, puisque les distances $N3 \cdots N7$ et $N_{py} \cdots N_{py}$ sont plus grandes pour L^5 (Tableau 2.5). On remarque également que les liaisons hydrogènes sont plus fortes pour le ligand L^3 par rapport à L^5 , du fait que les distances de ces liaisons hydrogènes sont globalement plus courtes pour L^3 .

D'autre part, lorsqu'on compare la distance entre N3 et N7 du cycle bispidine des quatre ligands mentionnés dans le Tableau 2.5, il est clair que celle-ci est bien plus courte dans les cas où une protonation est présente sur N3, c'est-à-dire pour les ligands L^3 et Hbisp^{1a}, la cavité étant plus particulièrement contrainte dans le cas de L^3 .

Enfin, la distance entre les azotes des cycles pyridines en position *anti* (ligand L^A)⁵ est très supérieure par rapport à celle lorsque les cycles sont en position *syn*.

Ligand	Distances				
	N3...N7	Npy...Npy	N1-H	N2-H	N3-H
L ⁵	2,808	4,740	0,835	2,471	2,301
L ³	2,693	4,691	0,894	2,354/ 2,527	2,1142
Hbispal ^a	2,684	4,922		-	
L ^A	2,888	7,186		-	

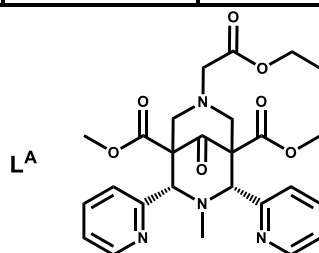


Tableau 2.5. Données cristallographiques expérimentales ; formule chimique de L^A

Un dernier élément que l'on observe sur la structure présentée sur la Figure 2.16 est que plusieurs hydrogènes sont doublement représentés, il s'agit de celui de l'acide carboxylique en R2 et de ceux de la molécule de méthanol imbriquée dans la structure. Ces hydrogènes sont en équilibre entre deux formes agitées, ce pourquoi deux positions distinctes sont indiquées pour ceux-ci.

4.6 Ligand L⁷

De manière à obtenir une bispidine avec un nombre de coordination de 7 et plus, un ligand possédant deux groupements picolinate en position 2 et 4 et un groupement benzyle en R2 a été envisagé. L'avantage de ce nouveau ligand L⁷ est que, après hydrogénation du groupement benzyle, la présence des amines secondaires en R1 et R2 devraient permettre la fonctionnalisation de ce ligand selon les stratégies développées au chapitre 5.

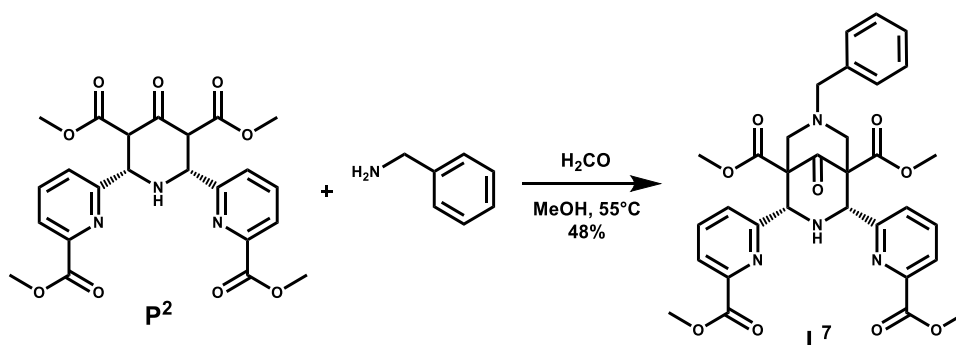


Schéma 2.23. Synthèse de L⁷

La synthèse est effectuée à partir de P², de benzylamine et de formaldéhyde, dans le MeOH 55°C. La bispidone L⁷ est obtenue par précipitation dans l'éthanol avec un rendement de 48 %. Le spectre RMN ¹H de ce composé (Figure 2.17) nous permet de déterminer la pureté de celui-ci, sa conformation et la configuration des groupements picolinate.

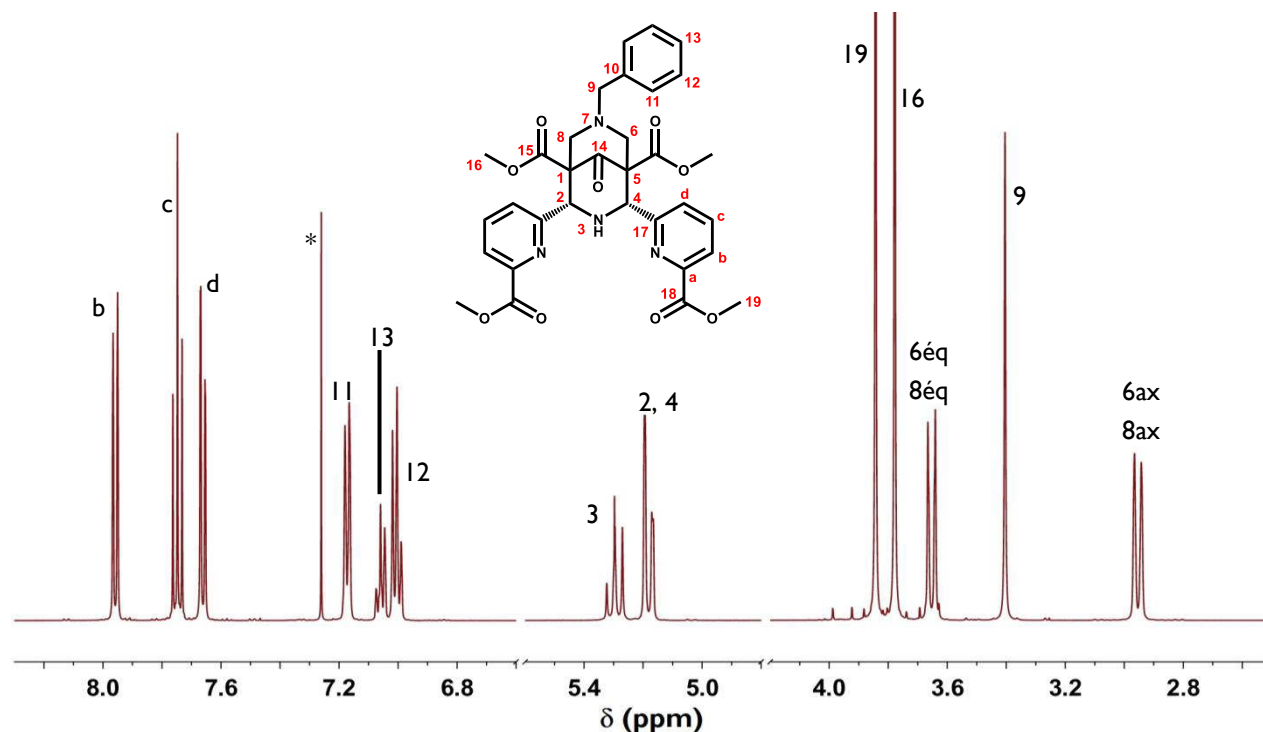


Figure 2.17. Spectre RMN ¹H de L⁷ (500 MHz, *CDCl₃)

Le composé obtenu est symétrique, ce qui permet de confirmer la configuration *cis* des substituants en C2 et C4. De plus, un couplage W entre H6, H8 ax et H2, H4 est observé (Figure 2.18, gauche), ce qui est caractéristique d'une conformation chaise-chaise pour la bispidine. On voit sur ce spectre que le système AB est un système avec un $\Delta\nu$ élevé.

Le spectre RMN par effet Overhauser nous permet de déterminer les signaux des cycles picolinate, puisqu'une interaction entre les protons 2 et 4 est observée avec le proton d (Figure 2.18 - droite).

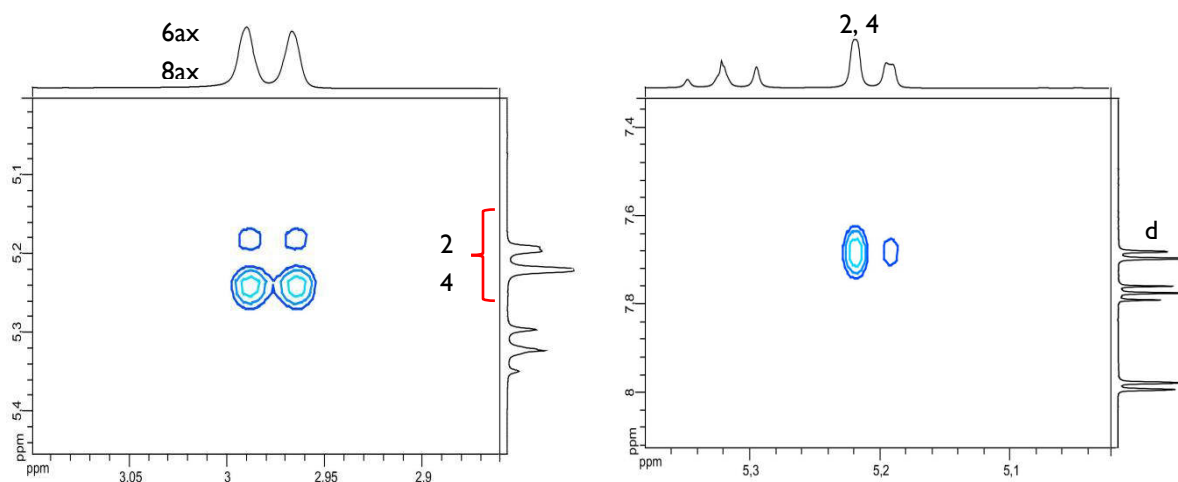


Figure 2.18. Agrandissement du spectre ^1H - ^1H COSY de L^7 (gauche) et NOESY (droite)

Entre 5,14 et 5,32 ppm, nous sommes en présence d'un système AK_2 pour les protons 2, 4 et 3 respectivement. Il s'agit d'un système à 3 spins pour lequel 2 des protons sont magnétiquement équivalents.¹⁸ La configuration du système dépend du rapport $\Delta\nu/J$. Lorsque ce rapport est très supérieur à 5, le signal observé s'apparente à un triplet (A , ν_A), plus déblindé, ainsi qu'un doublet (B_2 , ν_B), moins déblindé. Puis, lorsque $\Delta\nu/J$ diminue, on observe dans un premier temps un dédoublement du pic central du triplet ainsi qu'un dédoublement des deux pics du doublet. Un tel système est bien résolu lorsque $\Delta\nu/J < 5$. Cela conduit à la présence de 4 pics au niveau de ν_A ainsi qu'au niveau ν_B , avec des intensités entre les pics qui ne sont plus identiques.

C'est ce que l'on observe dans le cas de L^7 , bien que le dédoublement du pic central du triplet soit assez difficile à observer (Figure 2.19). Les déplacements chimiques sont définis de la manière suivante :

$$\nu_A = \nu_3 = 2648,5 \text{ Hz} ; \nu_K = (\nu_5 + \nu_7)/2 = (2598,6 + 2586,3)/2 = 2592,5 \text{ Hz}$$

$$J_{AK} = (\nu_1 - \nu_4 + \nu_6 - \nu_8)/3 = (2662,54 - 2636,08 + 2597,66 - 2583,68)/3 = 13,5 \text{ Hz.}$$

$$\text{Ici } \Delta\nu/J = (\nu_K - \nu_A) / J = 4,2.$$

Lorsque $\Delta\nu/J$ diminue encore, il apparaît un pic supplémentaire (contribution des deux systèmes). Le signal se complexifie alors en termes de déplacement chimique et d'intensité des pics.

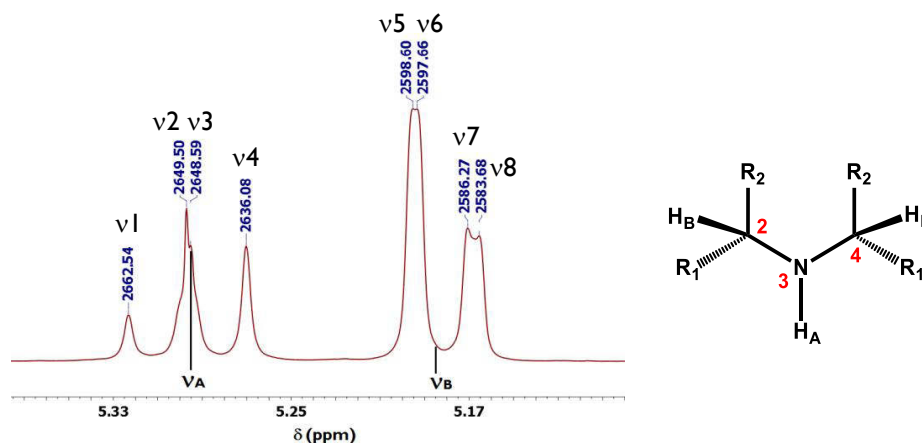


Figure 2.19. Signal ^1H RMN du système AK_2 sur le ligand L^7

5. Conclusion

Pour conclure sur ce chapitre, nous pouvons dire que nous avons réussi à poursuivre la synthèse de nouveaux composés de la famille des bispidines.

La synthèse de la bispidine L^3 , désormais disponible pour une étude physico-chimique complète, est un succès. Par une étude RMN ^1H mais également par l'obtention d'une structure obtenue par diffractions des rayons X, la stéréochimie du ligand est mise en évidence, au niveau de la fonction alcool et de la pré-organisation du cycle bispidine. Néanmoins, on remarque que la synthèse de la bispidone L^1 , première étape pour obtenir L^3 est complexe et que plusieurs paramètres (temps et température de la réaction, solvant) influencent la réaction de manière importante.

De plus, le ligand L^4 , incluant un groupe méthyle picolinate en position R_2 , a été obtenu par substitution nucléophile. Cette piste a été abandonnée du fait des travaux de l'équipe de P. Comba.²⁷

Les ligands L^5 et L^7 , incluant deux groupes picolinate de méthyle en position 2 et 4, ont aussi été obtenus à partir du précurseur P^2 , tous deux dans une conformation chaise-chaise et avec une configuration *cis* des groupements méthyle picolinate. Le précurseur P^2 a été synthétisé directement après obtention du synthon aldéhyde-picolinate. Ces deux ligands, L^5 et L^7 , sont la preuve qu'il est possible de développer cette famille de bispidines. En outre, L^7 est particulièrement adéquat pour envisager une fonctionnalisation sur R_2 . Même s'il est clair que la modification des groupements en position 2 et 4 peut poser des difficultés en termes de stéréochimie, ces difficultés ont pu être évitées avec la modification du substituant méthyle en R_1 par un atome d'hydrogène. Dans le cas de L^5 , une structure RX a permis de confirmer ces éléments.

Sur cette partie, plusieurs éléments peuvent être envisagés pour poursuivre le travail. Tout d'abord, des études de complexation peuvent être effectuées sur le ligand L^7 avec le Ga(III) ou le Sc(III) .

Ensuite, il serait intéressant de synthétiser un analogue du ligand L^5 avec un groupement lysine. Cela conduirait à la synthèse d'un dérivé fonctionnalisé.

Enfin, à partir de l'intermédiaire L^7 , de nouvelles structures peuvent être envisagées. Il est en effet possible de fonctionnaliser L^7 en R1 puis en R2 après élimination du groupement benzyle. Quelques pistes sont représentées Schéma 2.24.

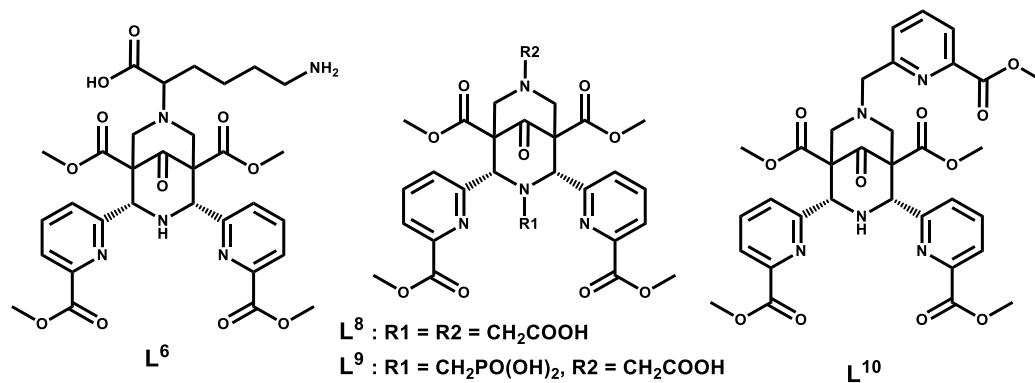


Schéma 2.24. Ligands cibles pour un travail antérieur

Références

1. Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (40), 15702–15724.
2. Kerdjoudj, R.; Pniok, M.; Alliot, C.; Kubiček, V.; Havlíčková, J.; Rösch, F.; Hermann, P.; Huclier-Markai, S. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (4), 1398–1409.
3. Sy, M.; Nonat, A.; Hildebrandt, N.; Charbonnière, L. J. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (29), 5080–5095.
4. Jeyaraman, R.; Avila, S. *Chem. Rev.* **1981**, 81 (2), 149–174.
5. Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (24), 11167–11176.
6. Knabe J.; Ruppenthal N. *Arch. Pharm.* **1964**, 297, 141-146.
7. Holzgrabe, U.; Erciyas, E. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1992**, 325 (10), 657–663.
8. Comba, P.; Lopez de Laorden, C.; Pritzkow, H. *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88 (3), 647–664.
9. Diwischek, F.; Arnone, M.; Engels, B.; Holzgrabe, U. *Tetrahedron.* **2005**, 61 (29), 6993–7001.
10. Samhammer, A.; Holzgrabe, U.; Haller, R. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1989**, 322 (9), 551–555.
11. Roux, A. *Synthèse et fonctionnalisation de bispidines pour la complexation du ⁶⁴Cu en vue d'applications en imagerie médicale par tomographie à émission de positrons et en radiothérapie*; Thèse de l'université de Strasbourg, 2014.
12. Jew, S.; Park, B.; Lim, D.; Kim, M. G.; Chung, I. K.; Kim, J. H.; Hong, C. I.; Kim, J.-K.; Park, H.-J.; Lee, J.-H.; Park, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13 (4), 609–612.
13. Fields, E. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74 (6), 1528–1531.
14. Szczepaniak, W.; Kuczynski, K. *Phosphorus and Sulfur and the Related Elements* **1979**, 7 (3), 333–337.
15. Rafael'A, C.; Galkin, V. I. *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67 (10), 857.
16. Keglevich, G.; Bálint, E. *Molecules* **2012**, 17 (12), 12821–12835.
17. Zefirov, N. S.; Matveeva, E. D. *Arkivoc* **2008**, 1 (11), 1–17.
18. Friebolin H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, VCH Publishers, New York, **1991**
19. Wiberg, K. B.; Barth, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (18), 5124–5130.

20. Bleiholder, C.; Börzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurency, G.; Lawrance, G. A.; Lienke, A.; Martin, B.; Merz, M.; Nuber, B.; Pritzkow, H. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (22), 8145–8155.
21. Shannon, R. D. *Acta Crystallogr. Sect A* **1976**, *32* (5), 751–767.
22. Siener, T.; Holzgrabe, U.; Drosihn, S.; Brandt, W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, No. 9, 1827–1834.
23. Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (2), 347–359.
24. Roux, A.; Nonat, A. M.; Brandel, J.; Hubscher-Bruder, V.; Charbonnière, L. *J. Inorg. Chem.* **2015**, *54* (9), 4431–4444.
25. Comba, P.; Hunoldt, S.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (14), 8131–8143.
26. Comba, P.; Lopez de Laorden, C.; Pritzkow, H. *HCA* **2005**, *88* (3), 647–664.
27. Bleiholder, C.; Börzel, H.; Comba, P.; Ferrari, R.; Heydt, M.; Kerscher, M.; Kuwata, S.; Laurency, G.; Lawrance, G. A.; Lienke, A.; Martin, B.; Merz, M.; Nuber, B.; Pritzkow, H. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (22), 8145–8155.
28. Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (24), 12531–12543.
29. Behera, H.; Ramkumar, V.; Madhavan, N. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (28), 10179–10184.

Chapitre III

Etude physico-chimique

Un chélatant du cuivre, développé pour des applications en imagerie nucléaire, doit respecter les conditions suivantes :

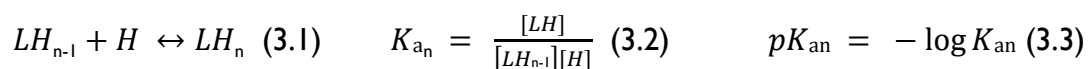
- Cinétique de complexation rapide
- Sélectivité pour le cuivre par rapport aux autres métaux de transition (Zn, Fe, Ni)
- Grande stabilité thermodynamique et inertie cinétique (en milieu réducteur et en milieu acide)

Dans ce chapitre, les propriétés du chélatant L³ sont étudiées, en collaboration avec le Dr Jérémy Brandel (Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire, DSA, IPHC). Tout d'abord, les propriétés acido-basiques sont déterminées par des études spectrophotométriques et potentiométriques. Ces propriétés sont indispensables pour déterminer ensuite ses propriétés de complexation, par des techniques similaires ainsi que par RMN. Ce travail est effectué pour le Cu(II) et pour le Zn(II). Enfin, le potentiel d'oxydoréduction du complexe CuL³ est déterminé par voltampérométrie cyclique afin d'évaluer sa stabilité en milieu réducteur et sa stabilité cinétique en milieu acide est évaluée par spectrophotométrie.

1. Propriétés acido-basique de L³

Dans un premier temps, l'étude va se concentrer sur la détermination des différents équilibres acido-basiques du ligand.

Un équilibre acido-basique (1), sa constante K_a (2) associée et le pK_a (3) sont définies par les équations ci-après.



Equations 3.1. Equilibre acido-basique (1), constantes d'équilibre (2) et pK_a (3)

La bispidine L³ (Schéma 3.1) possède au total 7 sites de protonation, en rappelant ici que la basicité de N7 n'est à priori pas observée, du fait que le doublet non-liant est impliqué dans la stabilisation de la charge positive suite à la protonation de N3. Dans la gamme 2 < pH < 12 quatre équilibres acido-basiques sont présents. Ceux-ci correspondent aux deux acides carboxyliques, à un équilibre correspondant à l'acide phosphonique ainsi qu'à l'amine tertiaire en N3. Pour des pH < 2 il sera sans doute possible de déterminer une voire deux constantes supplémentaires, liées à la seconde acidité de l'acide phosphonique ou encore à une amine pyridinique. D'autre part, la constante d'équilibre concernant la seconde amine pyridinique est à priori trop faible pour être déterminée.

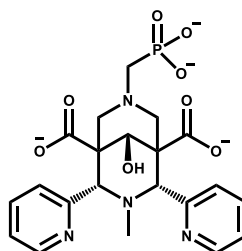


Schéma 3.1. L³ totalement déprotoné

1.1 Potentiométrie

Le principe général de la méthode est de suivre l'évolution de la différence de potentiel d'un électrolyte en fonction d'un volume ajouté de base ou d'acide, en mesurant le potentiel à une électrode de mesure par rapport à une électrode de référence. Dans ce cas-ci, une électrode combinée à membrane de verre est utilisée.

La valeur du pH en fonction du potentiel est donc obtenue par la relation notée Equation 3.2, caractéristique des électrodes à membrane de verre, où le potentiel et le pH sont liés par une fonction linéaire :

$$E = E^0 - \frac{2,303RT}{F} pH$$

Avec : F = constante de Faraday $96\,485,3 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$; R = constante des gaz parfaits $8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$; T = température de mesure en K ; E^0 = paramètre de l'électrode, déterminée par étalonnage de l'électrode.

Equation 3.2. $E = f(\text{pH})$ pour une électrode à membrane de verre

Suite à l'obtention des données expérimentales, l'exploitation de ces données se fait grâce à l'utilisation des logiciels Glee, pour la détermination du potentiel standard de l'électrode E^0 , et Hyperquad.¹ Ce dernier permet d'affiner un modèle mathématique qui correspond au mieux aux données expérimentales. Ainsi, les valeurs des constantes d'équilibres peuvent être déterminées.

La Figure 3.1 montre l'évolution du pH en fonction du ratio $n_{\text{KOH}}/n_{\text{L}}$. Visuellement, on constate la présence de deux sauts de pH.

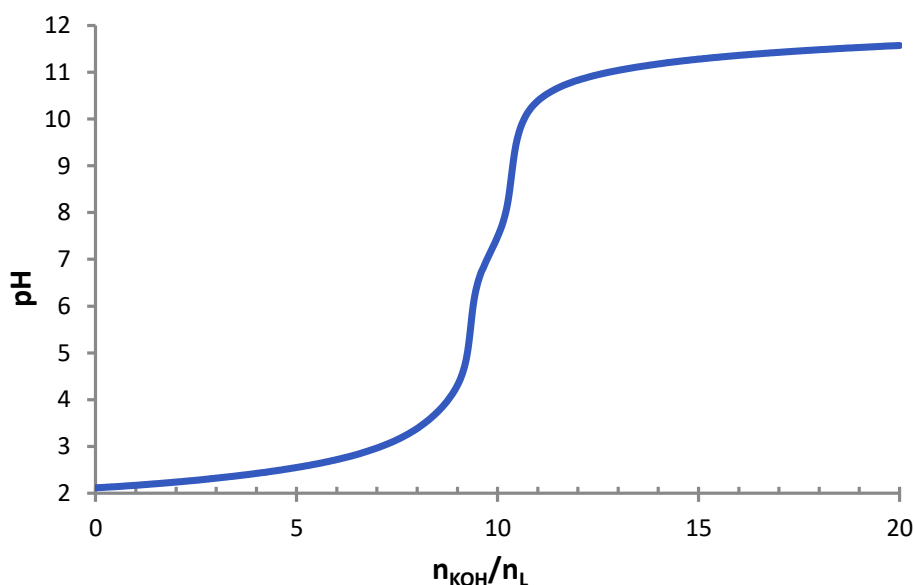


Figure 3.1. Courbe potentiométrique du ligand L^3 . Solvant : H_2O , $I = 0,1 \text{ M (KCl)}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $[L^3] = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

D'un point de vue expérimental, le pH de la solution est acidifié (pH proche de 2) par ajout d'acide chlorhydrique avant le début du titrage. De ce fait, l'ajout de la solution de KOH (0,1 M) neutralise dans un premier temps l'acide chlorhydrique. Ensuite deux équilibres acido-basiques sont mis en jeu au niveau du ligand : $LH_4-LH_3^-$ et $LH_3^--LH_2^{2-}$. Ces deux

équilibres sont observés au niveau du premier saut de pH situé pour $n_{\text{KOH}}/n_{\text{L}} \approx 9,3$. Un second saut de pH est observé sur la courbe pour $n_{\text{KOH}}/n_{\text{L}} \approx 10,3$, il correspond à l'équilibre acido-basique entre les espèces LH_2^{2-} - LH^{3-} . A noter qu'entre ces deux sauts de pH, nous avons bien ajouté un équivalent de base, ce qui souligne qu'un proton est titré dans cette zone. Au de-là de $\text{pH} = 10$ un dernier équilibre est présent entre les espèces LH^{3-} - L^{4-} .

Par traitement des données sur trois dosages indépendants, quatre constantes ont pu être mises en évidence : $\text{pK}_{\text{a}_1} = 11,5(3)$; $\text{pK}_{\text{a}_2} = 7,26(5)$; $\text{pK}_{\text{a}_3} = 3,93(3)$; $\text{pK}_{\text{a}_4} = 2,4(4)$ qui correspondent, à priori, respectivement à l'amine tertiaire, à la première acidité de l'acide phosphonique et aux deux acides carboxyliques. Ces valeurs sont résumées dans le Tableau 3.1.

1.2 Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

Le principe de la méthode est de suivre les variations du spectre d'absorption du ligand en fonction du pH. En effet, chaque espèce possède un spectre d'absorption propre et se différencie ainsi des autres espèces. En mesurant l'évolution du spectre d'absorption du ligand en fonction du pH, il est possible par déconvolution du signal par une méthode de régression non-linéaire aux moindres carrés, d'attribuer pour chaque forme le spectre qui lui correspond et de connaître les constantes d'équilibre acido-basique des différentes espèces présentes en solution.

L'exploitation des données se fait grâce à l'utilisation du logiciel Hypspec^{1,2} pour la détermination matricielle du modèle mathématique correspondant aux valeurs expérimentales.

Il est important de noter que si les variations spectrales entre deux espèces sont faibles, la détermination de la constante d'équilibre entre ces deux espèces ne sera pas possible. Etant donné la présence, à priori, de quatre équilibres pour le ligand L^3 pour un pH compris entre 2 et 12, il est probable que certains d'entre eux ne soient pas mis en évidence de manière concluante par cette méthode.

Cette étude spectrophotométrique, combinée aux résultats de l'étude potentiométrique, permet non seulement de confirmer les résultats mais aussi d'obtenir l'ensemble des valeurs des constantes d'équilibre.

a) $2 \leq \text{pH} \leq 12$

Entre $2 \leq \text{pH} \leq 12$, des dosages directs ont été effectués par ajouts successifs de solutions de KOH ($[\text{KOH}] = 1 ; 0,1 ; 0,01 \text{ M}$) dans une solution contenant L^3 , préalablement acidifiée à $\text{pH} \approx 2$ (voir la partie expérimentale pour plus de détails). Après chaque ajout, effectué à l'aide d'une micropipette, le pH de la solution est mesuré ainsi que son spectre d'absorption. A noter que dans cette gamme ($2 \leq \text{pH} \leq 12$), la force ionique est fixée à $0,1 \text{ M}$ (KCl).

Sur la Figure 3.2 l'évolution du spectre d'absorption est représentée. On constate que le spectre possède une bande d'absorption centrée sur 262 nm, attribuée à l'absorption due aux transitions π - π^* des cycles pyridines.^{3,4}

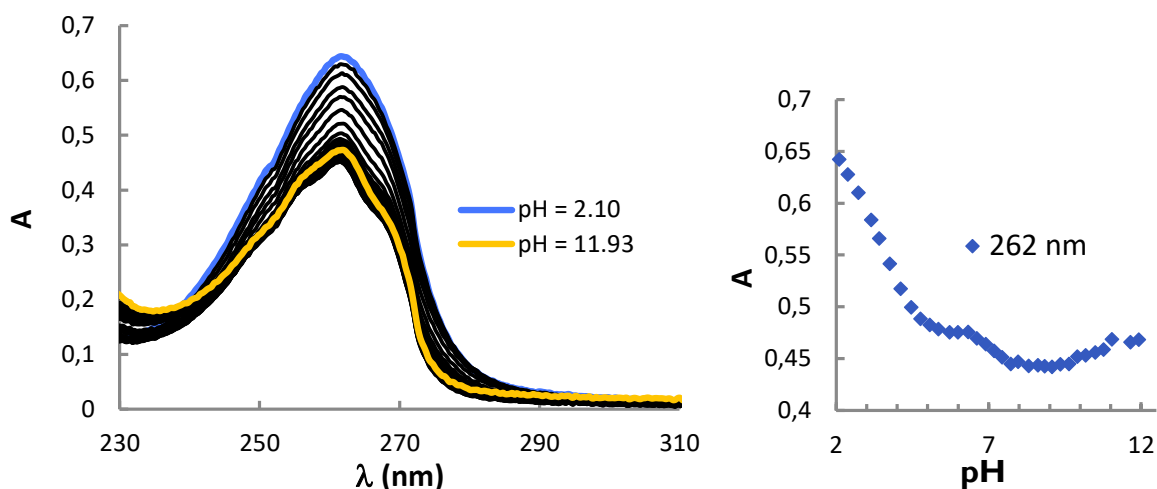


Figure 3.2. Dosage spectrophotométrique de L³ en fonction du pH. Gauche : Titrage direct, [L³]_{tot} = 4,80.10⁻⁵ M, 2,10 ≤ p[H] ≤ 11,93 (H₂O ; I = 0,1 M (KCl) ; T = 25,0(2) °C). Droite : évolution de l'absorbance à 262 nm en fonction du pH.

Le spectre d'absorption montre une évolution hypochrome lorsque le pH augmente jusqu'à pH 9 puis hyperchrome entre pH 9 et 12. Pour des pH > 5, une rigidification du système apparaît, ce qui est suggéré par la présence d'une structure hyperfine visible sur le spectre d'absorption, et qui traduit vraisemblablement l'implication d'un doublet non-liant des pyridines dans la formation de liaisons hydrogènes.^{5,6}

Dans cette gamme de pH, 3 constantes d'équilibre ont pu être déterminées (Tableau 3.1) : $pK_{a_2} = 7,18(3)$; $pK_{a_3} = 3,75(4)$; $pK_{a_4} = 2,40(5)$ attribuées, à priori, respectivement à la première acidité de l'acide phosphonique et aux deux acides carboxyliques. Cependant, les données expérimentales ne permettent pas de déterminer une constante d'équilibre qui serait en adéquation avec la présence de l'amine tertiaire N3. En effet, pour des pH supérieurs à 10, seules de faibles variations du spectre d'absorption sont observées entre 230 et 310 nm. Si une constante d'équilibre proche de 10 ou 11 est tout de même considérée dans le modèle, celle-ci est accompagnée d'une forte incertitude et n'est pas reproductible entre les dosages. Par conséquent, la valeur du pK_{a_1} de l'amine tertiaire utilisée par la suite est celle déterminée par potentiométrie.

b) $-0,6 \leq pH \leq 2$

Compte-tenu que l'électrode à membrane de verre n'est plus adéquate pour la mesure de pH inférieurs à 2, il est nécessaire dans la gamme $-0,59 \leq pH \leq 2$ d'utiliser la technique des batchs.⁷ Il s'agit de préparer pour chaque pH une solution individuelle, par ajout d'un volume connu d'acide chlorhydrique 5 M, pour laquelle le pH est calculé par la relation $pH = -\log[H_3O^+]$. A noter que dans ce cas, la force ionique ne peut être fixée du fait de la concentration élevée en acide perchlorique.

Les spectres d'absorptions obtenus sont représentés sur la Figure 3.3.

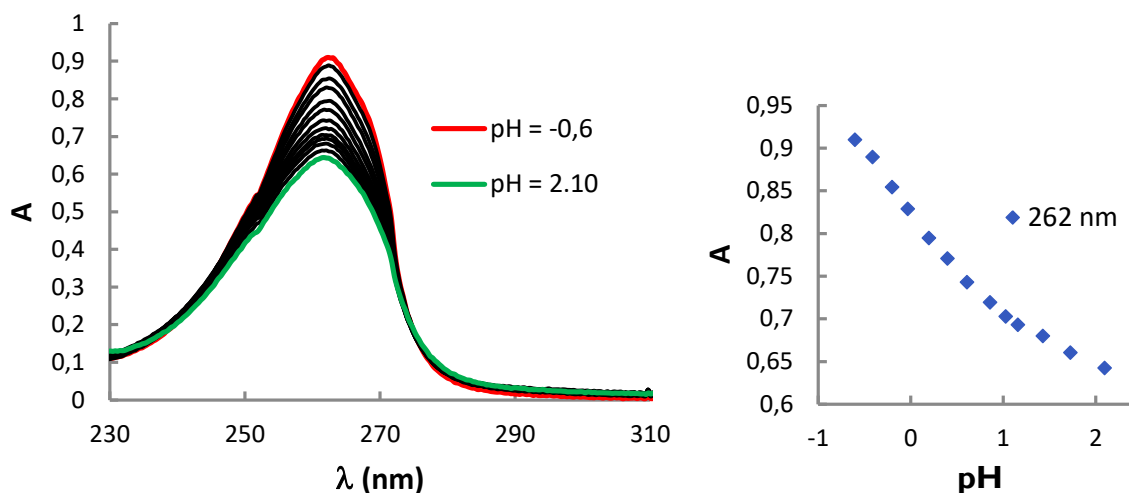


Figure 3.3. Dosage spectrophotométrique de L^3 en fonction du pH. Gauche : Titrage en batches, $[L^3]_{\text{tot}} = 5,35 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $-0,6 < p[H] < 1,73$; $T = 25,0(2)$. Droite : évolution de l'absorbance à 262 nm en fonction du pH.

Deux dosages ont été effectués dans cette gamme de pH, tous deux permettant par spectrophotométrie de mettre en évidence la présence d'un équilibre acido-basique supplémentaire.

c) Spectres électroniques

Dans la gamme de $0 < \text{pH} < 12$, cinq constantes ont pu être déterminées au total, comme résumées dans le Tableau 3.1.

	Spectrophotométrie	Potentiométrie	Moyenne
pK_{a_1}	-	11,5(3)	11,5(3)
pK_{a_2}	7,18(3)	7,26(5)	7,2(1)
pK_{a_3}	3,75(4)	3,93(3)	3,8(1)
pK_{a_4}	2,40(5)	2,4(4)	2,4(4)
pK_{a_5}	0,52(8)	-	0,5(1)

**Tableau 3.1. Constantes de protonations successives du ligand L^3
 H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$**

Ces études permettent donc de déterminer que 6 espèces sont associées au ligand L^3 . Les spectres électroniques, calculés pour chacune de ces espèces, sont représentés ci-après (Figure 3.4).

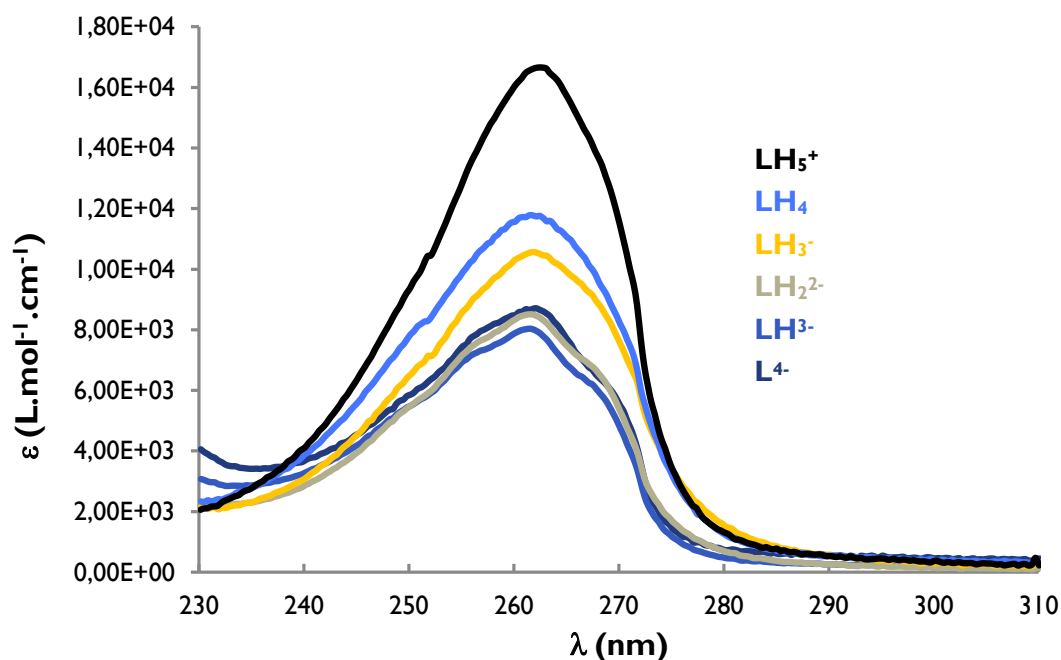


Figure 3.4. Spectres électroniques des espèces du ligand L^3

On remarque également que le coefficient d'absorption molaire diminue lorsque le pH augmente, ce qui est souvent attribué à la déprotonation des pyridines.⁶ On retrouve également, à partir de l'espèce LH_2^{2-} , la présence d'une structure hyperfine comme celle mise en évidence dans le cas du dosage entre $2 < \text{pH} < 12$.

d) Spéciation

Ces données donnent accès à la distribution des espèces en fonction du pH (à partir du logiciel Hyss)⁸ (Figure 3.5).

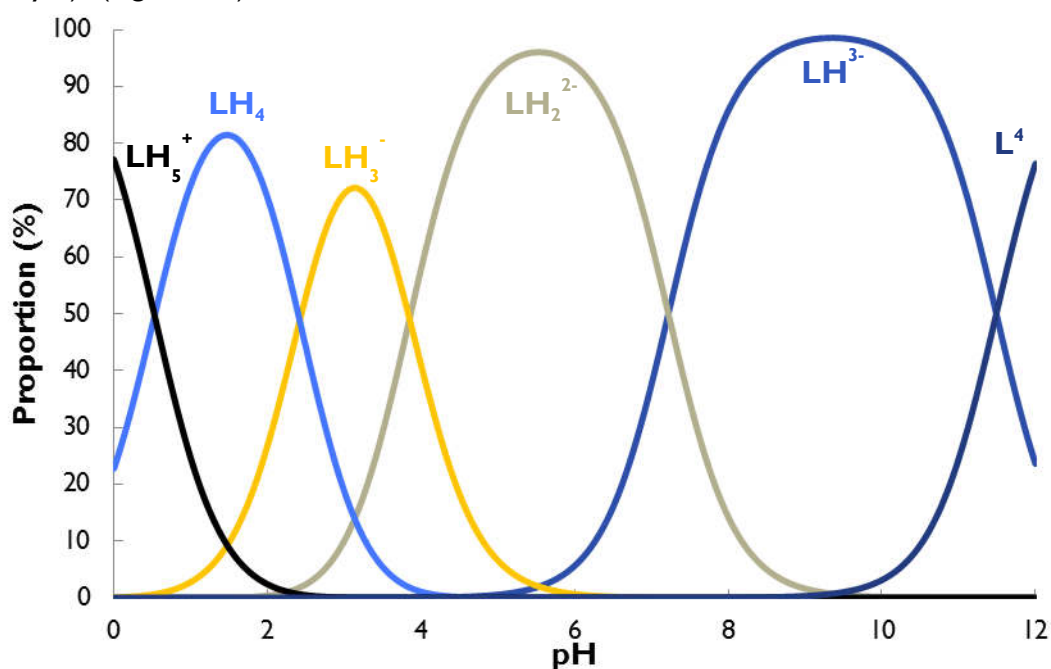


Figure 3.5. Distribution des espèces protonées de L^3 en fonction du pH. H_2O ; $I = 0,1 \text{ M (KCl)}$; $T = 25^\circ\text{C}$, $[L^3] = 5,35 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Du fait de la présence d'un équilibre acido-basique pour lequel $pK_a = 7,2$, deux espèces protonées sont présentes à pH physiologique, LH_2^{2-} et LH^{3-} .

e) Attribution des pK_a s

A partir des données de la littérature, résumées dans le Tableau 3.2 sur des composés ayant des groupements fonctionnels similaires, nous proposons une attribution des différents pK_a mesurés.

Ligand (conditions)	pK_a	Réf
L^C (H_2O , 0,1 M KCl)	0,82 / 2,0 / 4,5 / 10,6	9, 10
L^A (H_2O , 0,1 M KCl)	0,62 / 2,3 / 3,6 / 11,8	9
Hbisp ^a (H_2O , 0,1 M KNO_3)	7,73 / 3,95 / 1,82	11
aminophos	1,85-2,35 / 5,35-5,9	12
tetra P (H_2O , 0,1 M $NaClO_4$)	4,19 / 5,53 / 6,49 / 8,04 / 10,29 / 11,21	13
Cyclam (H_2O , 0,1 M KCl)	1,61 / 1,91 / 10,19 / 11,29	14
DOTA (H_2O , 0,1 M KCl)	11,14 / 9,69 / 4,85 / 3,95	15
NOIPA2PY (H_2O , 0,1 M KNO_3)	10,61 / 5,25 / 3,69 / 1,61	16

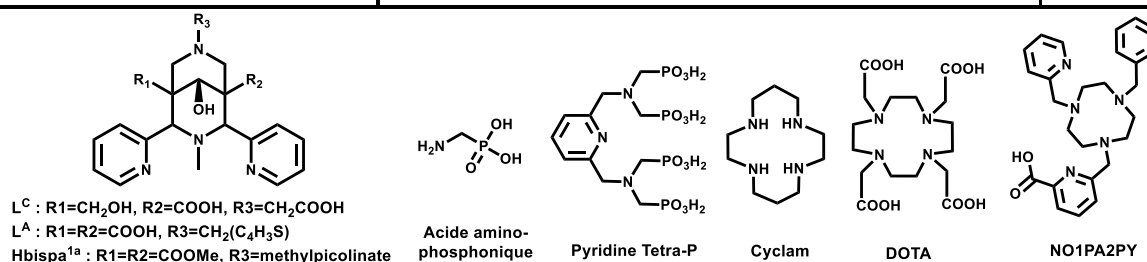


Tableau 3.2. Constantes de protonation successives de divers composés poly-amine et phosphonate.

Au vu des données cristallographiques (discuté au chapitre II), le pK_{a1} est attribué à l'amine tertiaire en N3. A priori, la première déprotonation de l'acide phosphonique possède un pK_a qui peut varier de 4 à 8 suivant la structure du composé, donc le pK_{a2} est attribué à l'acide phosphonique. En ce qui concerne le pK_{a5} , celui-ci peut être attribué à un des azotes pyridiniques. D'autre part, les acides carboxyliques ont chacun un pK_a entre 2 et 4, tout comme cela peut être le cas pour la seconde acidité de l'acide phosphonique. Ainsi un doute subsiste sur l'attribution des pK_{a3} et pK_{a4} . Le Schéma 3.2 résume cette attribution.

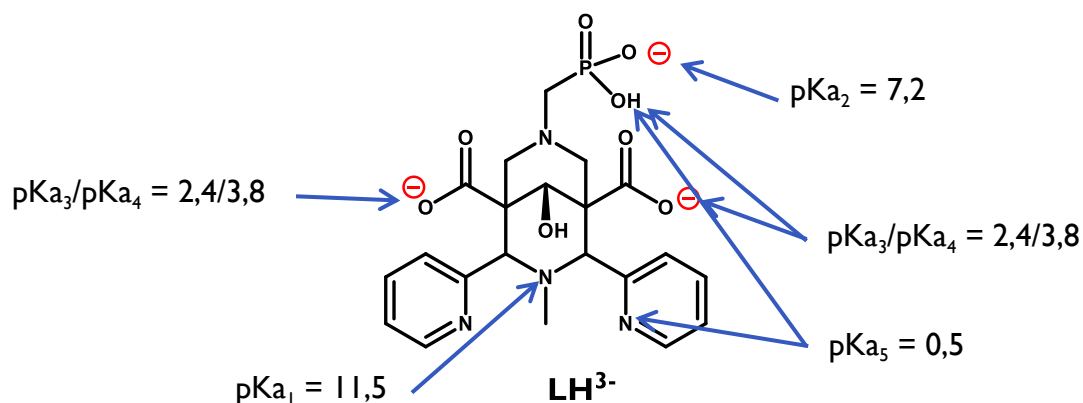


Schéma 3.2. Attribution des pK_a s de L^3

I.3 RMN

Du fait de l'existence de 6 espèces de protonation différentes, les pics obtenus par RMN (^1H ou ^{31}P) sont le résultat pondéré des pics de toutes les espèces. Les analyses effectuées par RMN ^1H et ^{31}P sont donc très dépendantes du pH. L'évolution du spectre RMN ^1H et ^{31}P de L^3 a été déterminée en fonction du pD. La numérotation de L^3 est rappelée sur la Figure 3.7. L'ensemble des spectres RMN ^1H est montré Figure 3.6.

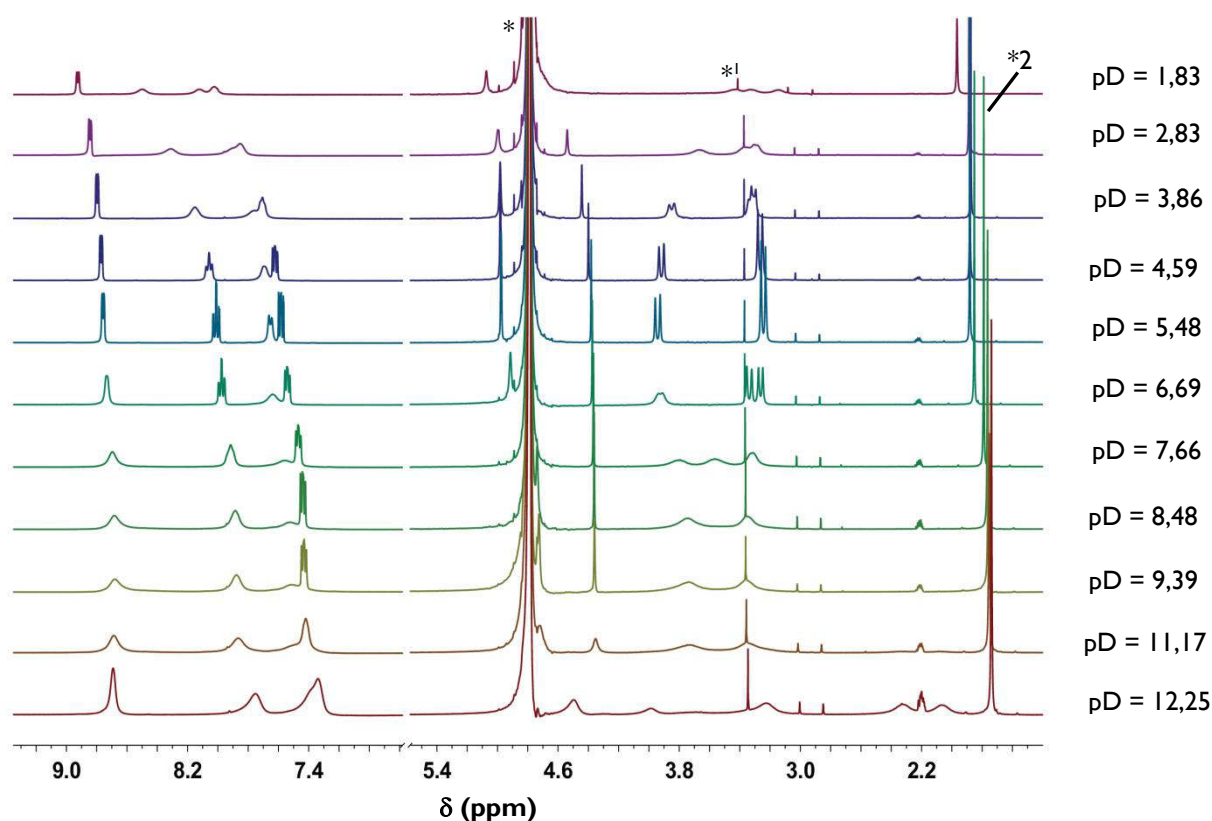


Figure 3.6. Dosage RMN de L^3 en fonction du pD (400 MHz, $^*\text{D}_2\text{O}$, $^*\text{MeOH}$, $^*\text{acide acétique}$)

Sur ces spectres, on remarque l'apparition de pics supplémentaires inconnus ; un multiplet à 2,2 ppm ainsi que trois singulets à 1,8 (qui pourrait correspondre à la présence d'acide acétique), 2,8 et 3 ppm ; impuretés qui n'étaient pas présentes sur le spectre RMN ^1H du ligand L^3 avant dosage et qui semblent provenir d'une impureté contenue dans la solution de DCI.

On constate que pour $\text{pD} \geq 7,66$, la plupart des signaux sont des pics larges et aucune constante de couplage n'est visible (protons H_b exceptés). L'interprétation de ces spectres est difficile ; le spectre RMN ^1H n'est résolu que pour certains pD donnés.

De la même manière que dans le chapitre 2, un spectre de corrélation à $\text{pH} = 6,40$ a été effectué de manière à connaître les positions des protons 6, 8 équatoriaux et 6, 8 axiaux ainsi que des protons 9. On sait ainsi qu'à ce pH, δ (ppm) (H_9) = 3,26 ; ($\text{H}_{6,8}$ ax) = 3,32 et ($\text{H}_{6,8}$ éq) = 3,92. Le suivi du déplacement chimique de ces trois groupements $-\text{CH}_2-$ semble

adéquat pour interpréter l'évolution du spectre en fonction du pH. Il semble en effet que le déplacement chimique de ces protons évolue beaucoup, en particulier pour $5,5 < pD < 7,5$. Des spectres supplémentaires ont été obtenus dans cette gamme de pD et l'évolution des déplacements chimiques est représentée à la Figure 3.7.

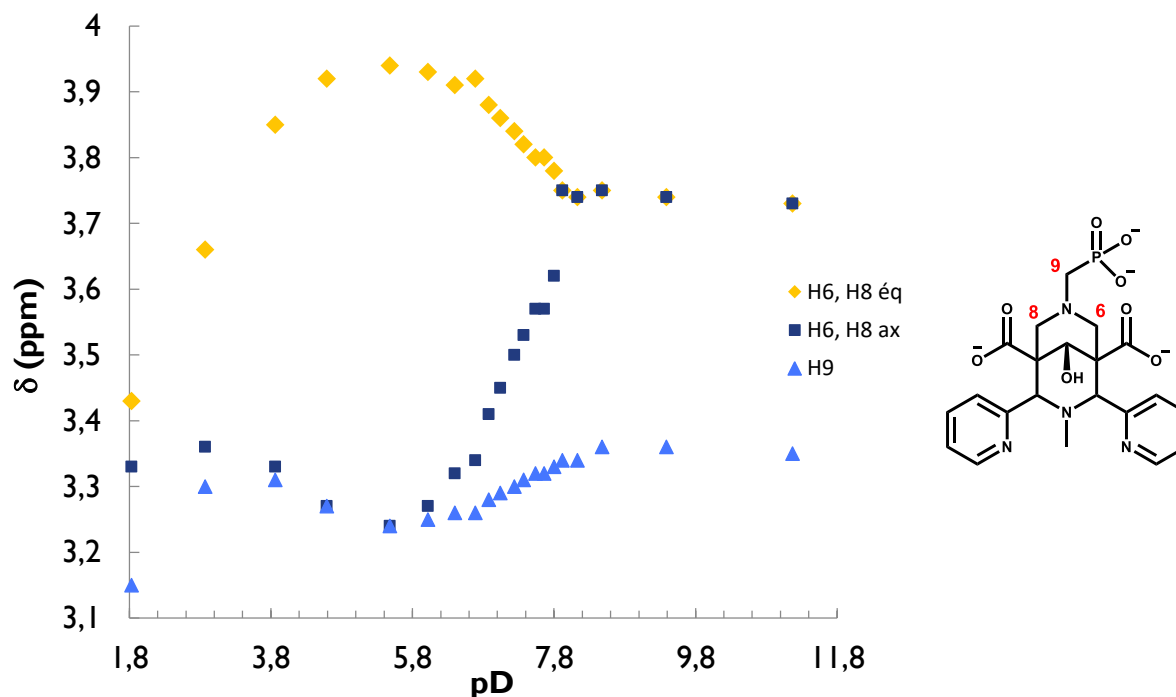


Figure 3.7. Déplacement chimique des protons 6, 8 et 9 en fonction du pD
Numérotation de L³

A partir de ces données, un équilibre acido-basique est clairement observé pour $5,8 < pD < 8$. On note que les protons 9, 6 et 8 axiaux sont plus déblindés du fait de l'augmentation de pD, tandis que l'inverse est observé pour H6 et H8 équatoriaux.

En appliquant la méthode des tangentes sur le graphique de la Figure 3.7, on peut déterminer un $pK_{aD} = 7,3(1)$ (la valeur entre parenthèse caractérise l'incertitude sur la valeur mesurée, du fait de la méthode de détermination). Ce pKa est noté pK_{aD} car celui-ci est déterminé à partir de la mesure du pH dans une solution de D₂O et non dans une solution aqueuse. Or, il existe une corrélation entre les valeurs de pH mesurées en solution aqueuse et de pH mesuré dans l'eau deutérée. De même, une corrélation existe entre un pKa déterminée dans D₂O (noté pK_{aD} ci-avant) et sa valeur correspondante dans H₂O (noté pK_{aH}).¹⁷

$$pK_{aH} = 0,929pK_{aD} + 0,42$$

Equation 3.2 Corrélation entre pK_{aH} et pK_{aD}

Ainsi, dans le cas de L³ : $pK_{aH} = 0,929 \times 7,3 + 0,42 = 7,2(1)$

Ce résultat est en excellente corrélation avec le pK_{a2} déterminé par spectrophotométrie et potentiométrie, qui est de 7,2(1).

Un second pKa semble pouvoir être déterminé puisqu'une seconde inflexion de la courbe est présente pour les protons 6, 8 axiaux. De la même manière, on obtient graphiquement un pK_{aD} égal à 4,1 pour la courbe des protons 6, 8 axiaux. Après calcul du pK_{aH} selon l'Equation 3.2, on trouve, $pK_{aH} = 4,2(2)$. Cette valeur est plus éloignée de la valeur de $pK_{a3} = 3,9$ précédemment déterminée. Plusieurs éléments pourraient expliquer cela. Tout d'abord, peu de points expérimentaux sont déterminés dans cette zone de pD (moins de points sur la courbe). De plus, on sait par les études spectrophotométriques et potentiométriques que deux pKas sont proches dans cette zone, tandis qu'un seul pKa n'est visible par RMN, ce qui rend sans doute plus difficile l'obtention d'une valeur exacte par cette méthode, contrairement au pKa proche de 7.

Pour compléter cette étude et afin de pouvoir attribuer avec certitude le pK_{aH} déterminé par RMN 1H , il est nécessaire de mesurer l'évolution du signal de ^{31}P en fonction de pD. Les spectres sont représentés sur la Figure 3.8.

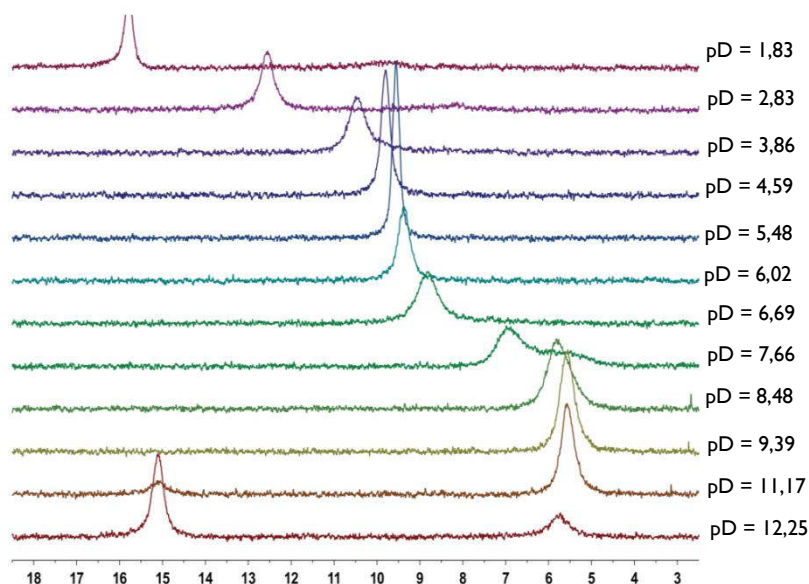


Figure 3.8. Evolution du déplacement chimique du ^{31}P de L^3 en fonction du pD (162 MHz, D_2O)

De manière similaire, la courbe d'évolution est tracée sur la Figure 3.9.

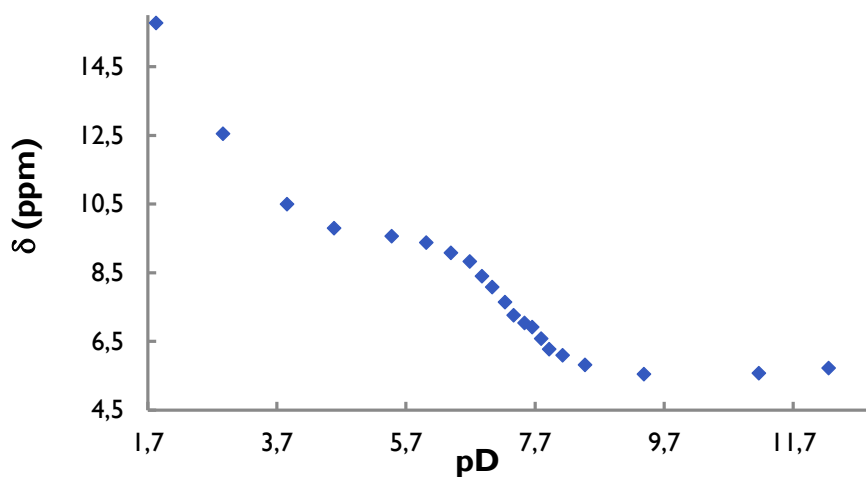


Figure 3.9. Déplacement chimique ^{31}P en fonction du pD

On remarque une évolution importante également pour $5,7 < \text{pD} < 8$, et la courbe permet également de déterminer un pK_{aD} graphiquement, on obtient 7,3(1), soit pK_{aH} de 7,2(1). Ce résultat confirme ce qui est observé en RMN ^1H . Compte-tenu de la forte évolution du déplacement chimique dans cette zone de pH, il est cohérent d'attribuer ce pK_{a} à l'acide phosphonique.

Néanmoins, une forte évolution du déplacement chimique est également observée pour chacun des signaux (RMN ^1H et ^{31}P) pour des $\text{pD} < 3$. Cette observation suggère la présence d'autre(s) équilibre(s) physico-chimiques, pour lesquels les protons 6, 8 éq et plus particulièrement le phosphore subissent un déplacement chimique très important ; pour $\text{pD} = 2,83$, δ (ppm) $^{31}\text{P} = 12,55$ ppm et 15,77 ppm pour $\text{pD} = 1,83$. De même, lorsque $\text{pD} = 4,59$ δ (ppm) H6,8 éq est de 3,92 ppm et 3,43 ppm pour $\text{pD} = 1,83$.

Au vu de la forte évolution du déplacement chimique du ^{31}P , il semble que l'équilibre mis en jeu dans cette gamme de pD correspond plutôt à la déprotonation de l'acide phosphonique qu'à la déprotonation d'un des acides carboxyliques. Ainsi il paraît cohérent d'attribuer le pK_{a4} à la seconde acidité de l'acide phosphonique. De cette manière, le pK_{a3} correspond à l'un des acides carboxyliques et le pK_{a} correspondant au second acide carboxylique n'a pas pu être déterminé par ces méthodes.

Deux éléments supplémentaires peuvent être discutés sur les spectres obtenus en RMN ^{31}P (Figure 3.8).

Le premier élément concerne la présence de deux pics pour $\text{pD} \geq 11,17$. Or, on sait qu'à ce pD, un équilibre acido-basique est observé au niveau de l'amine tertiaire N3. En effet, nous avons une coexistence de l'espèce LH^{3-} , protonée sur l'amine tertiaire, et L^{4-} totalement déprotonée. L'espèce LH^{3-} est majoritaire jusqu'à pD proche de 11 et est caractérisée par le signal du ^{31}P à 5,7 ppm. Au-delà, l'espèce L^{4-} apparaît sous la forme d'un singulet à 15,1 ppm. Le fort déblindage du signal du ^{31}P est sans doute lié à une modification structurale

importante entre LH^{3-} et L^{4-} . En effet, il est probable qu'en solution la présence de la charge positive implique une orientation de l'acide phosphonique vers la cavité. Ce n'est pas le cas sur la structure RX du fait des interactions fortes entre l'acide phosphonique et un acide carboxylique d'une bispidine voisine.

Le deuxième élément concerne l'apparition d'un pic très large pour le phosphore pour pD proche de 7-8, visible notamment sur le spectre pour lequel pD = 7,66 (Figure 3.8). A ce pD, on sait que l'acide phosphonique co-existe entre une forme totalement déprotonée $-P(O)O_2^{2-}$ et une forme partiellement protonée $-P(O)(OH)O^-$. Cette protonation peut avoir une influence sur l'orientation du groupement acide phosphonique. On remarque néanmoins que l'équilibre mis en jeu ici est suffisamment rapide pour qu'il soit difficile d'observer deux signaux distincts en RMN ^{31}P , contrairement à ce que l'on observe pour pD = 11,17.

2. Propriétés de complexation de L^3

Désormais, connaissant les constantes d'équilibre acido-basique de L^3 , il est possible d'étudier les constantes de stabilité des complexes, selon l'Equation 3.3. Ces études sont faites par les mêmes méthodes de titrage que précédemment.



Equation 3.3. Constante de formation d'un complexe M_xL_y

Le complexe peut également être impliqué dans des équilibres acido-basiques et la constante globale $\beta_{M_xL_yH_z}$ est alors définie.

2.1 Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

a) Cu(II)

Des titrages d'une solution aqueuse contenant le ligand et le Cu(II) (0,97 équivalent) en fonction du pH ont été effectués. De manière à observer la formation du complexe, des titrages en batchs ont été effectués dans la gamme $-0,6 < \text{pH} < 2$, en plus de titrages directs entre $2 < \text{pH} < 12$. Sur la Figure 3.10 sont représentés les spectres d'absorption dans toute la gamme de pH ainsi que l'évolution de l'absorbance à 262 nm dans la gamme de pH des titrages batchs.

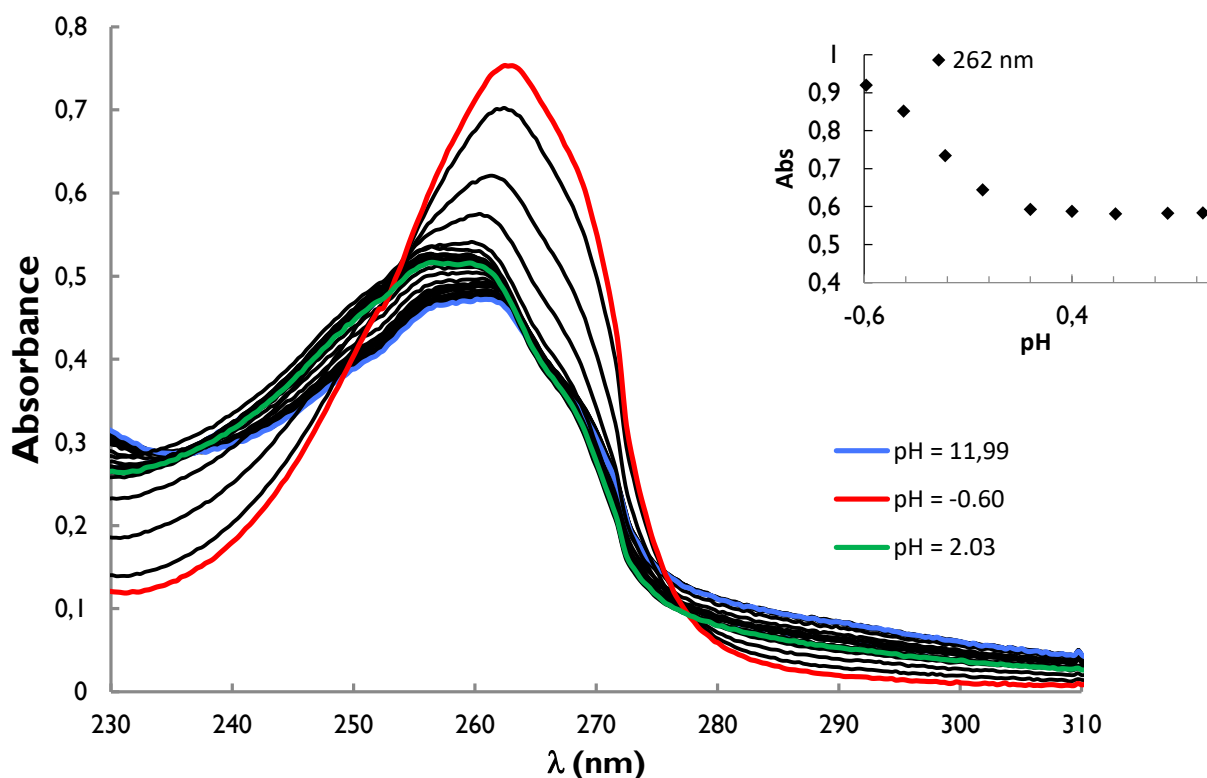


Figure 3.10. Titrage du mélange Cu:L³ 0,97:1 en fonction du pH. [L³] = 5,35.10⁻⁵ M ; [Cu] = 5,19.10⁻⁵ M; solvant : H₂O ; T = 25°C. Evolution de l'absorbance à 262 nm en fonction du pH.

Le spectre d'absorption montre une évolution hypochrome et hypsochrome jusqu'à pH = 0,61 où un plateau est formé. L'absorbance à 262 nm n'évolue plus ensuite jusqu'à pH = 2 et est indicative de la formation complète du complexe CuL³.

Au-delà de pH = 2, on observe une évolution hypochrome et bathochrome du spectre absorption jusqu'à pH = 11,99. Cependant, il ne s'agit plus d'une évolution significative et le traitement de ces spectres n'a pu aboutir à la détermination de constantes d'équilibre supplémentaires, mais il est mis en évidence que d'autres équilibres sont en jeu, probablement la formation d'une forme hydroxo CuL³(OH).

De ces données, après analyse avec le logiciel Hypspec, une constante a pu être déterminée sur deux dosages distincts, et est, préalablement à d'autres études, attribuée à la formation de l'espèce CuL³.

Un dosage en batch et un dosage direct ont également été effectués sur les bandes d-d du cuivre, de manière à confirmer les valeurs obtenues sur la bande correspondant aux transitions π - π^* des cycles pyridines. Le titrage est représenté Figure 3.11. La présence d'une bande d'absorption à 680 nm suggère plusieurs géométries possibles pour le complexe : octaédrique, tétraédrique ou pyramide à base carrée.¹⁸ Une structure tétraédrique donnerait également lieu à des transitions d-d dans cette gamme spectrale mais compte-tenu de la denticité du ligand, une telle structure ne serait pas cohérente.

Pour le titrage en batch, l'acide perchlorique est utilisé pour acidifier les batches. Au-delà de 880 nm, sa contribution sur le spectre d'absorption est importante, mais est nulle pour les

longueurs d'ondes prises en compte pour la détermination de la constante de stabilité du complexe ($\lambda < 800$ nm).

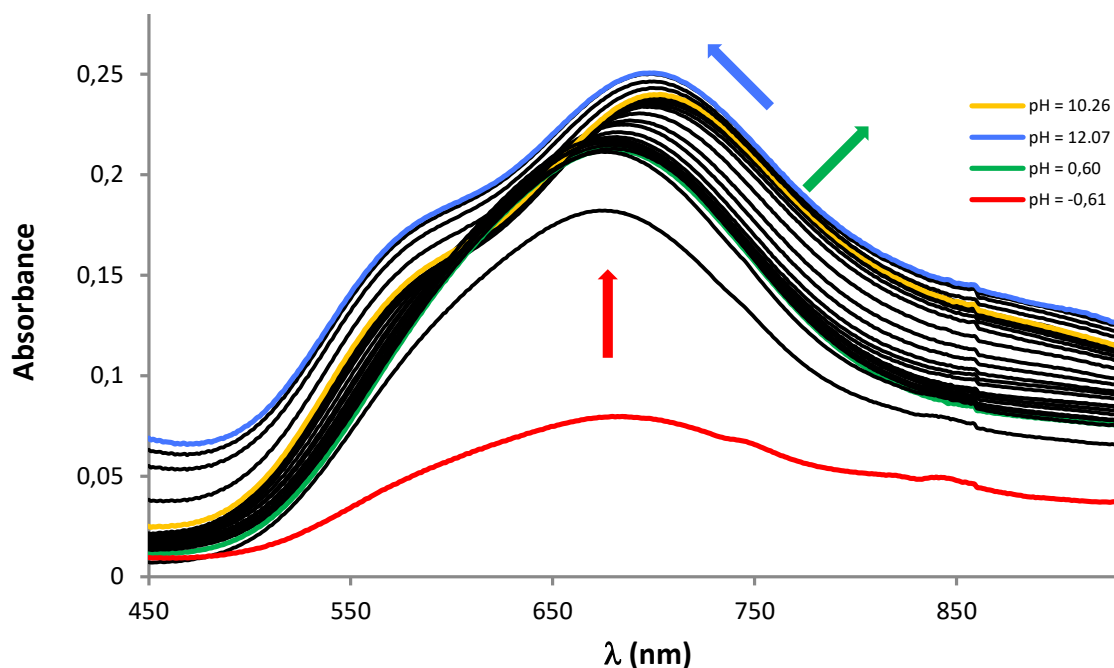


Figure 3.11. Titrage en batchs sur la bande du cuivre. $[L^3]_{\text{tot}} = 2,50 \cdot 10^{-3}$ M, $[Cu(II)]_{\text{tot}}/[L^3]_{\text{tot}} = 0,97$; $-0,61 < p[H] < 12,07$, H_2O , $T = 25,0(2)^\circ C$.

Entre $-0,61 < pH < 0,6$, soit jusqu'à la formation du complexe, un fort déplacement hyperchrome est observé. Puis entre $2 < pH < 6,74$ un déplacement hyperchrome et bathochrome est observé, qui suggère la présence d'équilibres entre diverses espèces. Le spectre d'absorption n'évolue plus ensuite jusqu'à un $pH > 10,26$ où un déplacement hyperchrome et hypsochrome est observé. Une forme supplémentaire semble apparaître donc à pH basique.

Contrairement au dosage de $2 < pH < 12$ sur les bandes du ligand qui ne permet pas de déterminer d'autres constantes d'équilibres, l'évolution du spectre d'absorption sur les bande d-d est suffisamment importante. Deux constantes d'équilibre, correspondant à des équilibres acido-basiques, sont ainsi déterminées. Du fait que les titrages en batch sont effectués à pH acide, la constante précédemment déterminée est désormais attribuée à la formation de l'espèce CuL^3H_2 ($\log\beta CuL^3 = 22,5(1)$) et les deux nouvelles constantes à la formation des espèces CuL^3 et CuL^3H ($\log\beta CuL^3H = 27,4(3)$ avec $pK_{a1} = 4,9(3)$; $\log\beta CuL^3H_2 = 30,5(3)$ avec $pK_{a2} = 3,1(3)$). A $pH > 10,26$, une espèce $CuL^3(OH)$ est probablement formé mais en quantité trop faible pour pouvoir en déterminer la constante de stabilité thermodynamique et le spectre électronique avec certitude.

Les constantes de stabilité du complexe de cuivre déterminées à partir des titrages sont données Tableau 3.3.

b) Zn(II)

De même que pour le cuivre, des dosages spectrophotométriques d'une solution aqueuse de L^3 contenant 0,97 équivalent de $ZnCl_2$ entre $-0,59 < pH < 2,03$ ont été effectués (Figure 3.12).

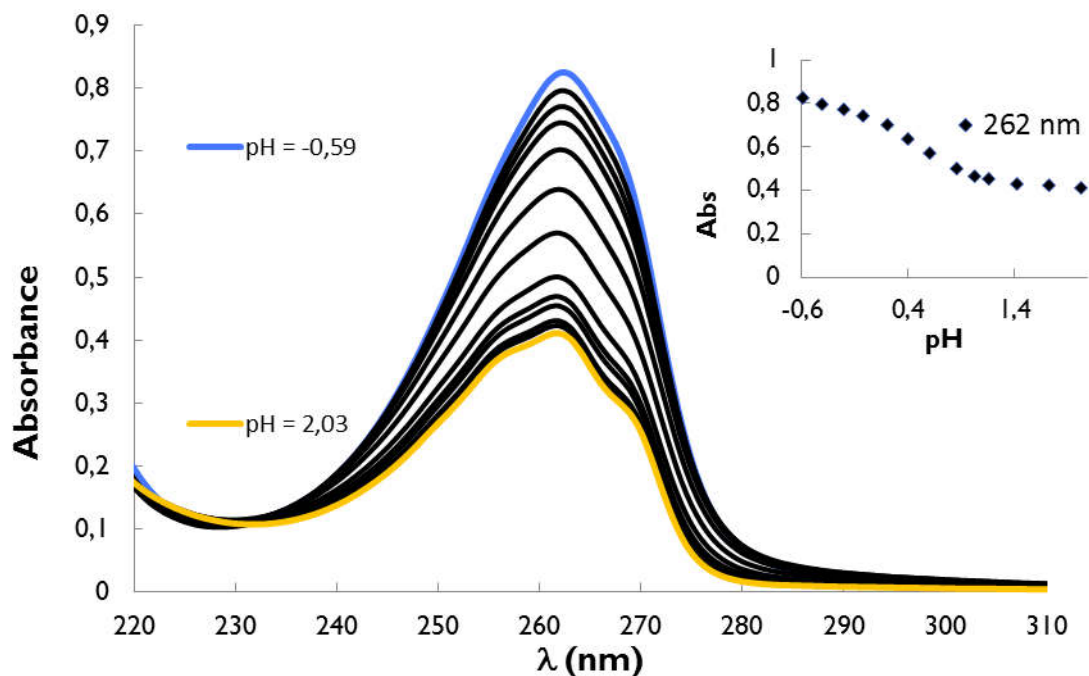


Figure 3.12. Titrage du mélange Zn:L³ 0,97:1 en fonction du pH ; H₂O, T = 25°C ; [L] = 5,62.10⁻⁵ M ; [M] = 5,45.10⁻⁵ M. Evolution de l'absorbance à 262 nm en fonction du pH.

On constate une allure très différente de l'évolution du spectre par rapport à la complexation du cuivre(II). Une structure hyperfine caractéristique de la formation du complexe apparaît à partir de $pH = 0,85$, contre $0,61$ dans le cas de CuL^3 . Ceci indique une meilleure affinité pour le Cu(II) que pour le Zn(II). Ces variations spectrales sont suffisamment importantes pour différencier la présence du complexe ZnL^3 et les différentes espèces protonées de L^3 . Ainsi une constante de formation attribuée, par analogie avec le Cu(II), à l'espèce ZnL^3H_2 a pu être mesurée ; $\log \beta(ZnL^3) = 18,8(1)$, elle est indiquée dans le Tableau 3.3.

Pour ce qui concerne le cuivre, les variations spectrales en spectrophotométrie sont plus nettes que pour le zinc lorsqu'on compare les variations liées à la protonation et les variations liées à la complexation. Pour le zinc, les spectres électroniques liés aux constantes déterminées par potentiométrie n'ont pas pu être calculés, contrairement aux espèces du complexe de cuivre, qui sont représentés sur la Figure 3.13.

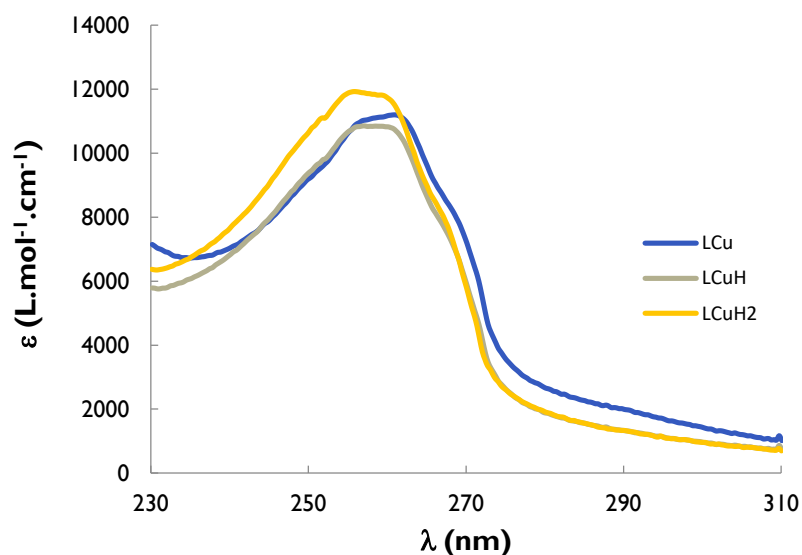


Figure 3.13. Spectres électroniques des espèces complexées CuL^3 .

A partir du logiciel Hyss, les courbes de distribution ont été calculées pour le cuivre et le zinc (Figure 3.14) à partir des constantes déterminées par les deux méthodes.

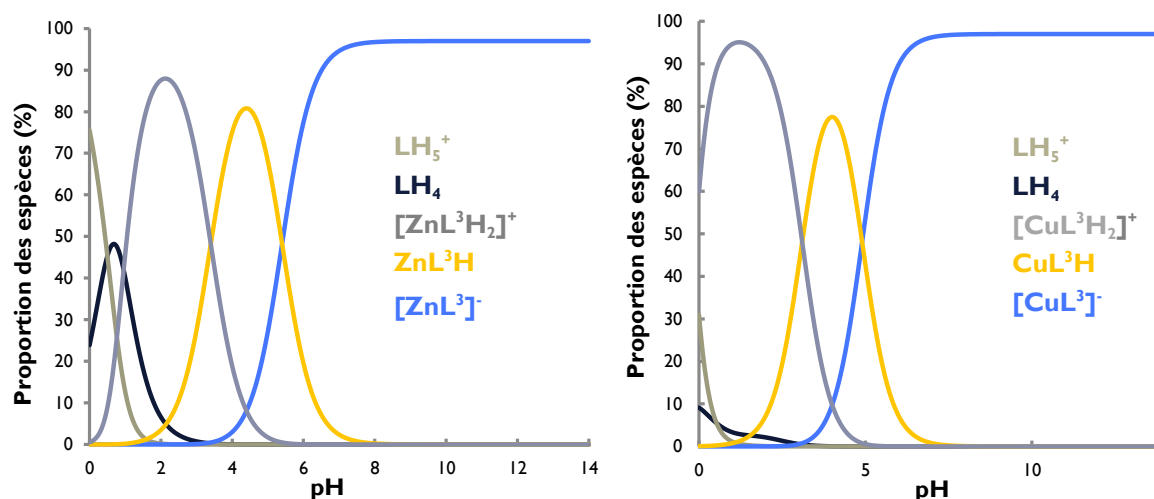


Figure 3.14. Diagramme de distribution des espèces CuL^3 et ZnL^3 . Conditions : H_2O , 0,1 M (KCl) ; $T = 25^\circ\text{C}$; Zinc : $[\text{Zn}] = 5,45 \cdot 10^{-5}$ M ; $[\text{L}] = 5,62 \cdot 10^{-5}$ M ; Cuivre : $[\text{Cu}] = 5,19 \cdot 10^{-5}$ M ; $[\text{L}] = 5,35 \cdot 10^{-5}$ M.

Dans le cas de CuL^3 , on constate que le complexe est présent majoritairement dans toute la gamme de pH, déjà à hauteur de 60 % à $\text{pH} = 0$. Cette prédominance du complexe à tout pH est importante si l'on considère que le pH dans l'organisme est compris entre 1,5 (estomac inférieur) et 7 (intestin) et le pH physiologique (sang et tissus sains) est maintenu à 7,4.¹⁹ A ce pH, seule l'espèce CuL^3 est présente.

On remarque que pour le complexe de zinc cette prépondérance est moins nette pour des $\text{pH} < 2$. Par exemple, l'espèce LH_4 est présente à hauteur de 55 % environ à $\text{pH} = 1$. A pH physiologique, seul l'espèce ZnL^3 est présente néanmoins.

2.2 Potentiométrie

a) Cu(II)

Par les titrages spectrophotométriques, nous avons pu mettre en évidence que plusieurs équilibres sont mis en jeu, de par les variations du spectre d'absorption entre $2 < \text{pH} < 7$ ainsi qu'à $\text{pH} > 10$. Les constantes d'équilibres ont pu être déterminées à partir du dosage sur les bandes d-d du cuivre. Des titrages potentiométriques ont également été effectués de manière à affiner le modèle (Figure 3.15).

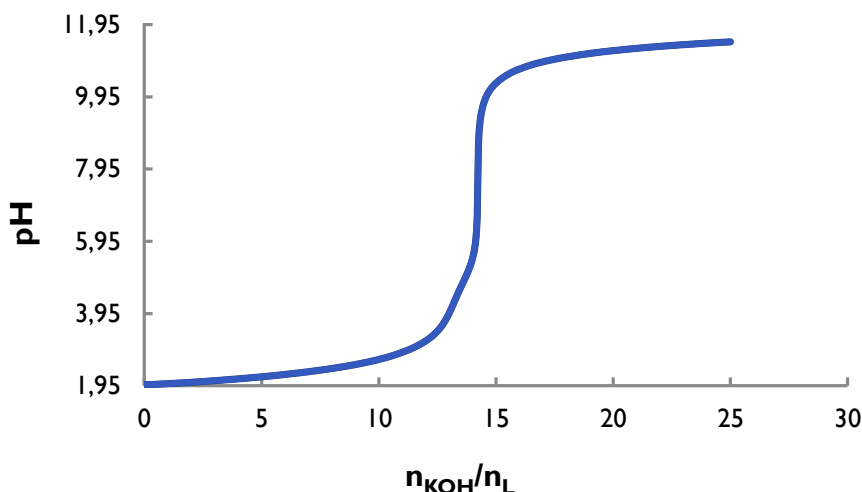


Figure 3.15. Courbe potentiométrique du mélange Cu:L³ 0,97:1. Conditions : H₂O, I = 0,1 M (KCl), T = 25°C ; [L] = 8,65.10⁻⁴ M ; [CuClO₄] = 8,39.10⁻³ M.

Ces dosages ont été réalisés par ajouts successifs d'une solution de KOH 0,1 M dans un mélange Cu:L³ de stœchiométrie 0,97:1 dont le pH est ajusté à pH = 1,95 par ajout d'acide chlorhydrique. De manière similaire au titrage potentiométrique du ligand libre, l'ajout de la solution de KOH neutralise dans un premier l'acide chlorhydrique.

Par la suite, on sait de par les titrages spectrophotométriques que dans cette zone de pH, l'espèce CuLH₂ est déjà totalement formée en solution. La valeur de la constante associée ($\log \beta(\text{CuL}^3\text{H}_2) = 30,5$) ne peut pas être déterminée par ce titrage potentiométrique entre $2 < \text{pH} < 12$ et est donc fixée pour l'exploitation des dosages par Hyperquad. L'allure de la courbe nous indique la présence de deux équilibres acido-basiques.

Ainsi, le premier virage observé vers un pH de 4 correspond à la déprotonation de CuL³H₂ et la formation de l'espèce CuL³H avec une constante associée de 27,4(3).

La seconde inflexion de la courbe, observée pour un pH proche de 8, implique la déprotonation de l'espèce CuL³H pour former CuL³ avec une constante associée de 22,5(1). Les constantes sont résumées dans le Tableau 3.3.

b) Zn(II)

De la même manière, ces dosages sont effectués pour le complexe de Zn(II) (Figure 3.16). Une observation similaire peut être faite concernant la courbe obtenue, un premier virage

est observé vers un pH de 4-5 avant une seconde inflexion de la courbe pour un pH proche de 8, suggérant que deux déprotonations successives sont présentes.

L'exploitation des dosages par hyperquad, effectuée en fixant la valeur $\log \beta(\text{ZnL}^3\text{H}_2) = 27,6$ déterminée par les titrages spectrophotométriques, a permis de déterminer les deux constantes de formation : $\log \beta(\text{ZnL}^3\text{H}) = 24,1(2)$ et $\log \beta(\text{ZnL}^3) = 18,8(2)$.

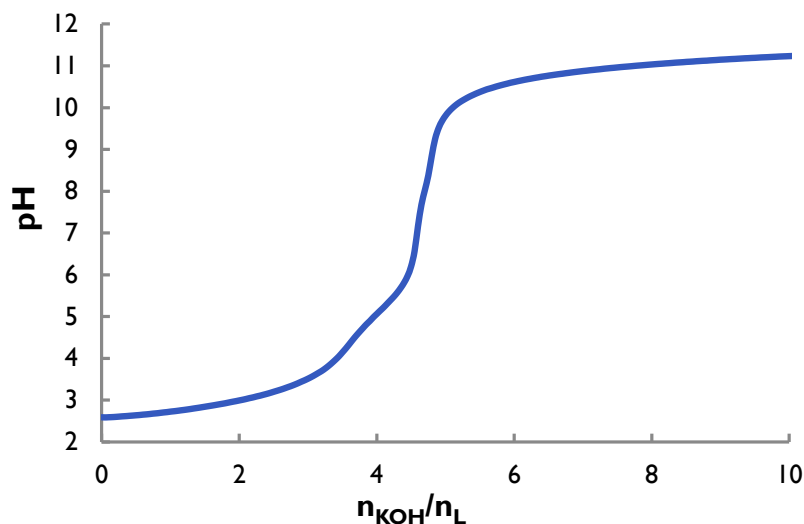


Figure 3.16. Courbe potentiométrique de ZnL^3 . Conditions : H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$; $[\text{L}] = 1,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{ZnClO}_4] = 0,97 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

De plus, à partir des constantes d'équilibre moyennes, déterminées par ces différentes méthodes, et du logiciel Hyss, il est possible de calculer la concentration en métal libre en un pH donné. Une propriété classiquement utilisée pour comparer le pouvoir chélatant de plusieurs ligands vis-à-vis d'un métal est le pM, introduit pour la première fois en 1979.²⁰ Il représente la concentration de métal libre à un pH donné et à des concentrations standards.

$$pM = -\log[M^{2+}]_{\text{libre}} \quad \text{avec } [M] = 10^{-6} \text{ M} ; [L] = 10^{-5} \text{ M}, \text{pH} = 7,4$$

Equation 3.4. Définition du pM

Défini ainsi, cela signifie que pour un pH donné, un chélatant est plus performant lorsque le pM est élevé, car cela implique une concentration faible de métal libre.

L'ensemble des constantes déterminées précédemment sont résumées dans le Tableau 3.3.

Constante	Cu		Zn	
	Moy		Moy	
$\log \beta(\text{ML})$	22,39(2) ^a /22,55(4) ^b	22,5(1)	- /18,82(6) ^b	18,8(1)
$\log \beta(\text{MLH})$	27,16(2) ^a /27,49(3) ^b	27,4(3)	- /24,13(3) ^b	24,1(2)
$\log \beta(\text{MLH}_2)$	30,5(3) ^a / -	30,5(3)	27,6(2) ^a / -	27,6(2)
pK_{a1}	4,9(3)		5,3(2)	
pK_{a2}	3,1(3)		3,5(2)	
$\text{pM} (\text{pH } 7,4)$		19,2		15,4

Tableau 3.3. Constantes de formation de ML^3 . H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$ a) titrages spectrophotométriques, b) titrages potentiométriques. Constantes prises en compte dans le calcul : $\log \beta_{\text{Cu}(\text{OH})} = -6,29$; $\log \beta_{\text{Cu}(\text{OH})_2} = -13,1$; $\log \beta_{\text{Zn}(\text{OH})} = -7,89$; $\log \beta_{\text{Zn}(\text{OH})_2} = -14,92$

Les constantes de complexation ainsi obtenues peuvent être comparées avec des chélatants du cuivre, développés dans le même cadre, dont les propriétés sont décrites dans la littérature. Quelques-uns d'entre eux sont mentionnés dans le Tableau 3.4 ci-après.

Ligand	pCu	pZn	Réf
TETA	15,1	-	21
L ^A	15,9	-	10
L ^B	16,3	-	22
L ^C	17,0	12,2	9, 10
DOTA	17,6		23
NO1PA2PY	17,8	13,3	16
L ³	19,2	15,4	
CB-Cyclam	19,29	-	24
Hbispa ^{1a}	19,3	-	11

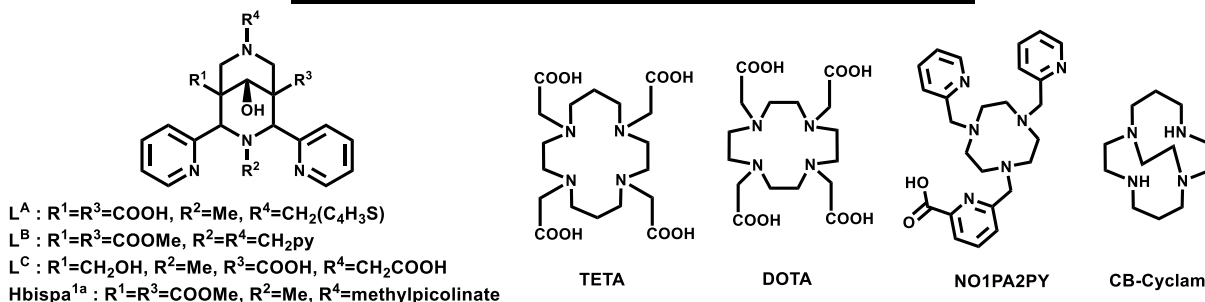


Tableau 3.4. pM calculés (M = Cu, Zn) pour [L] = 10⁻⁵ M et [M] = 10⁻⁶ M ; Structure des ligands discutés

Précédemment développé au LIMAA, le ligand L^C possède un pCu de 17,0 et un pZn de 12,2. La différence de pM entre deux métaux caractérise la sélectivité du ligand pour un métal plutôt qu'un autre. Le ligand L^C est particulièrement sélectif pour le cuivre(II) par rapport au zinc(II). En comparaison, L³ développé au cours de ce travail possède un pCu de 19,2 et pZn

est de 15,4. On peut donc dire que la quantité de cuivre libre, dans les conditions mentionnées (Equation 3.4), est particulièrement plus faible pour L^3 que L^C . En d'autres termes, le ligand L^3 est un chélatant plus fort que L^C pour le cuivre(II). En revanche, on constate également que la différence entre pCu et pZn est de 3,8 unités de pM pour L^3 contre 4,8 unités de pM pour L^C . Ainsi, L^3 est également un meilleur chélatant du zinc(II) et on constate donc qu'il est moins sélectif que L^C .

La présence de l'acide phosphonique en R2 plutôt qu'un acide carboxylique a donc pour conséquence d'augmenter de manière importante les propriétés de complexation de cette bispidine vis-à-vis du cuivre et du zinc, mais également d'en diminuer la sélectivité pour le cuivre par rapport au zinc. Cette sélectivité reste à priori suffisante pour les applications comme radiotraceur pour la TEP.

Lorsque l'on compare pCu de L^3 développé au cours de ce travail aux pCu observés pour d'autres chélatants du cuivre(II), on remarque que celui-ci est supérieur, entre 2 et 4 unités de pM à d'autres bispidines, telles que L^A ou L^B , ou des ligands basés sur les cycles de type cyclam, cyclen ou tacn, tels que le TETA, le DOTA ou encore le NOIPA2PY.

La bispidine Hbisp^a, formée avec un groupement méthyl picolinate, possède un pCu aussi élevé, ce qui conforte l'intérêt du développement de bispidine possédant ce groupement de coordination. Le CB-Cyclam, possédant un pont éthylène qui rigidifie le complexe de cuivre formé et le stabilise, a également un pCu du même ordre de grandeur.

En conclusion, la rigidité du squelette des bispidines lui confère des propriétés de complexation très intéressantes vis-à-vis du cuivre(II). Combiné avec l'ajout de groupement fonctionnel coordinant, ces propriétés sont similaires en termes de stabilité thermodynamique aux ligands les plus stables développés à partir de cycles poly-azotés. Avec l'obtention et les études des propriétés de coordination effectuées sur L^3 , on peut dire que l'utilisation d'un acide phosphonique améliore les propriétés thermodynamiques des bispidines et renforce son potentiel pour l'utilisation comme chélatant pour l'imagerie.

2.3 RMN du complexe de Zn(II)

Les propriétés diamagnétiques du zinc permettent d'étudier le complexe, formé par mélange dans une solution de D_2O du ligand et de 0,97 équivalent de $ZnCl_2$, par RMN 1H et ^{31}P , similairement à l'étude effectuée pour le ligand L^3 .

Le spectre RMN ^1H est représenté sur la Figure 3.17. Celui-ci est cohérent avec la formation du complexe ZnL^3 , en comparaison avec le spectre RMN ^1H de L^3 , effectué pour $\text{pD} = 12,25$ (Figure 3.6)

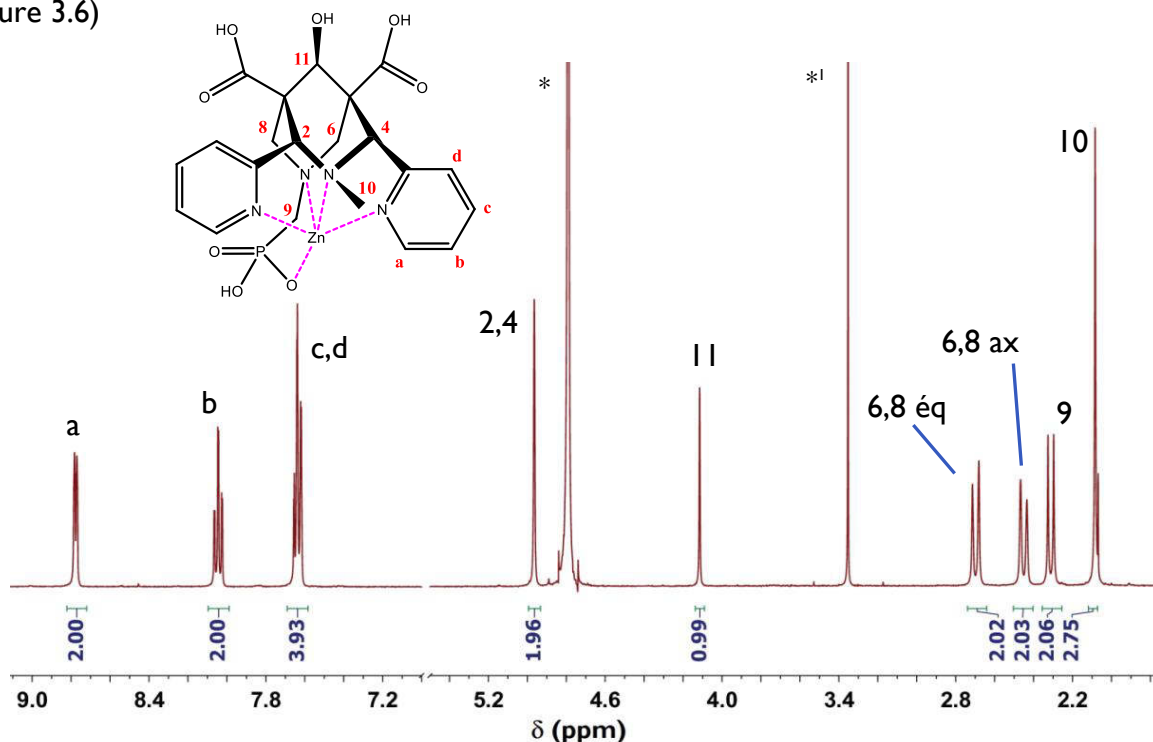


Figure 3.17. Spectre RMN ^1H solution $\text{L}^3 + \text{Zn}$ ($^*\text{D}_2\text{O}$, $\text{pD} = 12.6$, $^*\text{I MeOH}$)

En effet, le fait que les pics soient nets et fins, contrairement aux multiplets larges observés à ce pD pour L^3 (Figure 3.6), confirme la présence d'une seule espèce en solution. Le profil des pics aromatiques se différencie des signaux du ligand libre ; deux des signaux, pour les protons H_b et H_d , sont situés et superposés à 7,6 ppm. Une différence de déplacement chimique important est présente entre le ligand et le complexe au niveau du système AB observé pour les protons 6 et 8 ainsi que pour les protons 9, due à la coordination du Zn(II) par l'acide phosphonique.

Le spectre de corrélation montré Figure 3.18 confirme la présence du système AB ainsi que les déplacements chimiques suivants : H_9 à 2,31 ppm, H_6/H_8 ax à 2,45 ppm et H_6/H_8 éq à 2,70 ppm ; où l'interaction en W entre H_6/H_8 ax et H_2/H_4 est également visible.

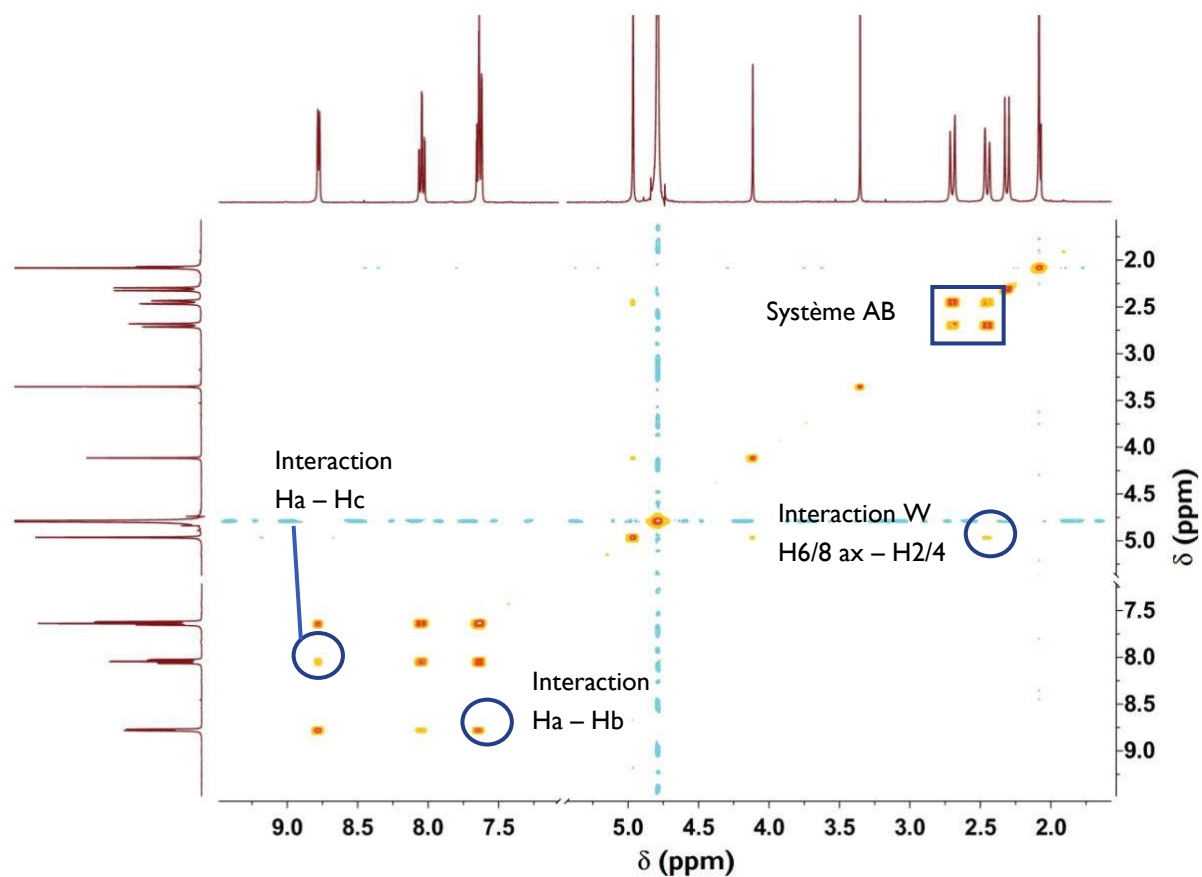


Figure 3.18. Spectre ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $^*\text{D}_2\text{O}$)

Par ajout successif de DCl ou de NaOD, le pD de la solution est modifié et divers spectres RMN ^1H ont été obtenus (Figure 3.19).

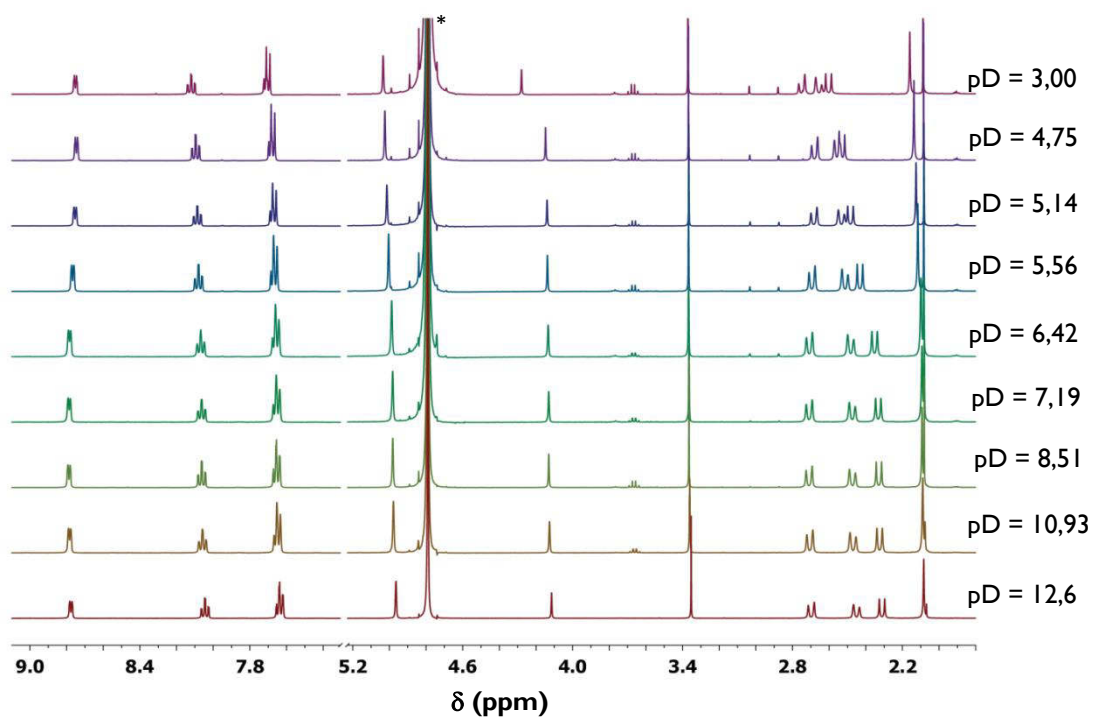


Figure 3.19. Spectre RMN ^1H ZnL^3 en fonction du pD (400 MHz, $^*\text{D}_2\text{O}$).

Les variations les plus importantes observées sur cet ensemble de spectres concernent les déplacements chimiques des protons 6, 8 axiaux, 6, 8 équatoriaux et 9. Sur la Figure 3.20 l'évolution des déplacements chimiques en fonction de pD sont représentés plus en détails.

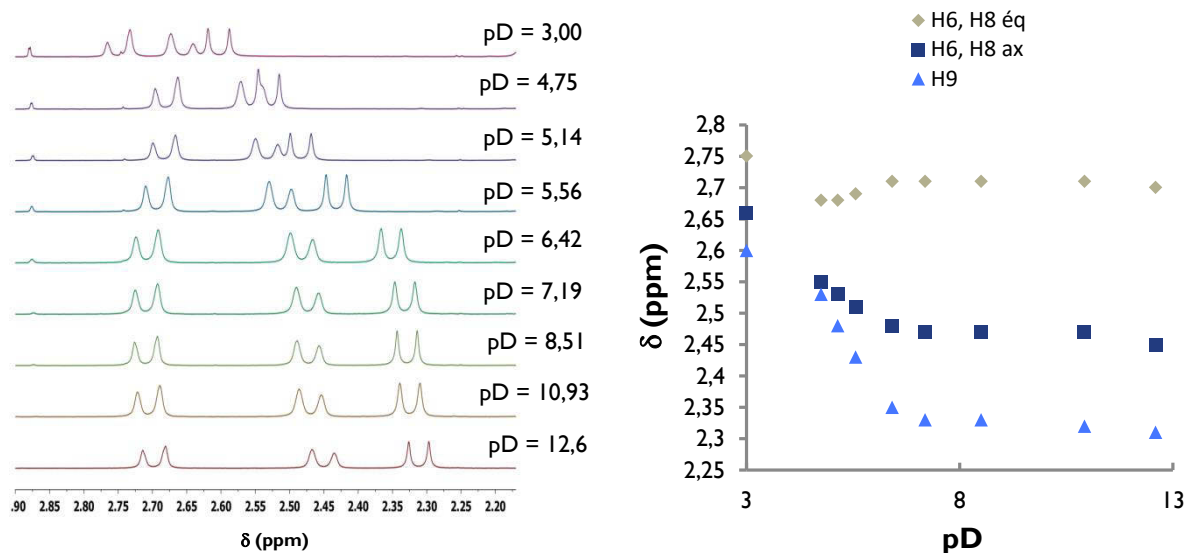


Figure 3.20. Evolution du déplacement chimique des protons H6, H8 et H9 de ZnL³ en fonction du pD, (400 MHz, D₂O)

Les variations du déplacement chimique des protons 6, 8 axiaux ne permettent pas de mettre en évidence un équilibre qui puisse être évalué graphiquement par la méthode des tangentes. Il est évident cependant qu'un ou plusieurs équilibres sont en jeu. A partir de la courbe des protons 6, 8 équatoriaux et des protons 9, on détermine, de manière similaire à précédemment, un $pK_{a_D} = 5,71$ (protons 6,8 éq) et $5,26$ (protons 9), soit $5,5(3)$ en moyenne. En appliquant la relation notée Equation 3.2, on trouve $pK_{a_H} = 5,5(3)$. D'après les titrages potentiométriques (Tableau 3.3), la constante d'équilibre entre les espèces ZnL³ et ZnL³H est de $5,3(2)$.

De nouveau, la valeur déterminée à partir du dosage RMN est en bonne corrélation avec les titrages potentiométriques, permettant ainsi de confirmer ce résultat.

Pour $pD < 4,75$ une forte variation est également observée, ce qui est indicatif de la présence d'une troisième espèce qui, d'après le modèle précédent, correspond à ZnL³H₂.

L'étude est également effectuée en RMN ³¹P. Les variations du déplacement chimique du signal de phosphore sont montrées Figure 3.21.

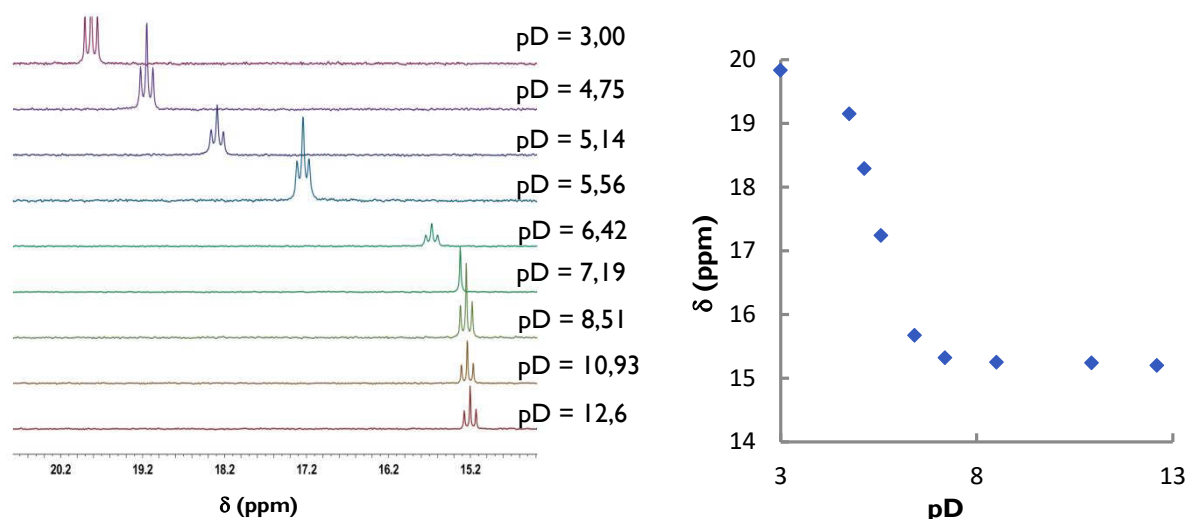


Figure 3.21. Déplacement chimique ^{31}P en fonction du pD de ZnL^3 (400 MHz, D_2O)

De même, graphiquement, on obtient $\text{pK}_{\text{aD}} = 5,5$, soit $\text{pK}_{\text{aH}} = 5,5$, ce qui confirme à nouveau les éléments présentés ci-avant. Ces variations permettent de confirmer que ce pK_{a} est associé à la déprotonation de groupement acide phosphonique. Ainsi l'espèce ZnL^3H_2 correspondrait à une espèce protonée sur l'acide phosphonique et sur un acide carboxylique.

3. Etude de stabilité

La stabilité du complexe de cuivre a été évaluée en conditions extrêmes, c'est-à-dire en milieu réducteur et en milieu très acide. Cette stabilité est comparée à celles des chélatants présents dans la littérature, dont les propriétés de quelques-uns d'entre eux sont annotées dans le Tableau 3.5. Ci-après, E_{red} correspond au potentiel de réduction du Cu(II) en cuivre Cu(I) et $t_{1/2}$ correspond au temps nécessaire à la dissociation de la moitié du complexe de Cu(II) en milieu acide.

Ligand	E_{red} (mV/NHE)	$t_{1/2}$	Réf
L^{C}	-560	71 jrs (5 M HClO_4 25 °C)	9, 10
L^{A}	-	46 jrs (5 M HClO_4 , 25 °C)	10
L^{B}	-303	-	22
NOIPA2PY	-518	204 min (3M, HCl, 90°C)	16
H_2L_2	-444, 588 (irr)	30,8 jrs (12M HCl, 90°C)	25
Cyclam	-480 (irr)	3,8 min (5M HCl, 90°C)	26
TETA	-	3,5 jrs (5M HCl, 30°C)	27
PCB-TEIAIP	-573 (quasi-rev)	8 jrs (12 M HCl, 90 °C)	28
CB-TEIAIP	-803 (irr)	6,8 h (5 M HCl, 90 °C)	29

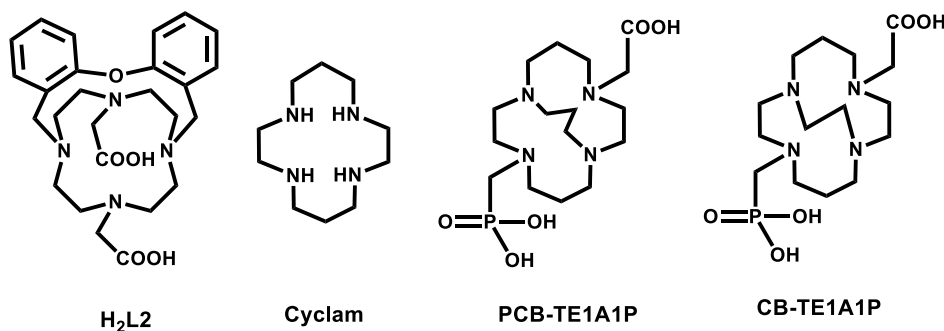


Tableau 3.5. Potentiel d'oxydo-réduction dans H_2O (E_{red}), temps de demi-vie en solution acide et structures des ligands discutés

3.1 Electrochimie

Un mécanisme principalement considéré comme lié à la dissociation des complexes de cuivre *in vivo* est la réduction du Cu(II) en Cu(I), suivie de la démétallation du complexe. Du fait de sa configuration électronique, d^{10} , le Cu(I) forme des complexes sans énergie de stabilisation du champ cristallin, contrairement au complexe de Cu(II) de configuration d^9 . Ceci explique que les complexes de Cu(I) sont généralement moins stables que les complexes de Cu(II) vis-à-vis de mécanisme d'échange de ligand ou de démétallation.²¹

Dans le milieu biologique, de nombreux réducteurs avec des potentiels d'oxydo-réduction très variés sont présents et susceptibles d'être responsable de la réduction du Cu(II) en Cu(I), possiblement suivi d'une dissociation du complexe. Il est communément admis que le potentiel de réduction minimum du milieu biologique est $E_{red} = 400$ mV (ENH). Ainsi, les complexes de cuivre pour lesquels E_{red} est inférieur à cette valeur sont stables dans les conditions biologiques.

Quelques-uns de ces réducteurs biologiques et leur potentiel d'oxydo-réduction sont rappelés dans le Tableau 3.6.^{30,31}

Couples oxydant/réducteur	Potentiel (mV/ENH)
Xanthine / hypoxanthine, H^+	-371
Acétoacétate, $2H^+$ / β -hydroxybutyrate	-346
NAD^+ , H^+ / NADH	-316
$NADP^+$, H^+ / NADPH	-315
FAD, $2H^+$ / $FADH_2$	-219
CH_3CHO , $2H^+$ / C_2H_5OH	-197
Pyruvate, $2H^+$ / lactate	-183
Ubiquinone, $2H^+$ / ubiquinol	45
Dehydroascorbate, $2H^+$ / ascorbate	54
Cytochrome a (Fe^{3+}) / cytochrome a (Fe^{2+})	290
O_2 , $2H^+$ / H_2O_2	300

Tableau 3.6. Potentiel d'oxydo-réduction de quelques systèmes biologiques (pH 7,0, 25°C)

Une étude électrochimique du complexe CuL^3 est donc nécessaire. Elle a pour objet de déterminer le potentiel d'oxydation et de réduction du cuivre après complexation, afin de savoir si le cuivre sera réduit dans l'organisme. Aussi, cette étude va permettre de s'assurer d'une bonne stabilité du complexe après réduction du cuivre. Enfin, il est également important de savoir si la réaction d'oxydation est réversible ou irréversible. Une irréversibilité de la réduction suggère une mauvaise adaptabilité du ligand pour stabiliser le Cu(I) .²⁶

a) Principe de la voltampérométrie

Le principe de la méthode est d'appliquer une différence de potentiel (E) dans une solution et de mesurer les variations d'intensité du courant (i) de la solution. L'intensité du courant de la solution électrochimique étudiée dépend des espèces présentes et de leur capacité à participer au courant électrique, donc à leur charge ou leur nombre d'oxydation dans le cas d'un métal. Lors du balayage en potentiel, l'espèce en présence est successivement oxydée (balayage d'un potentiel négatif à positif) puis réduite (variation sens inverse). Dès lors que l'espèce réduite est instable, seul le potentiel d'oxydation sera observé.

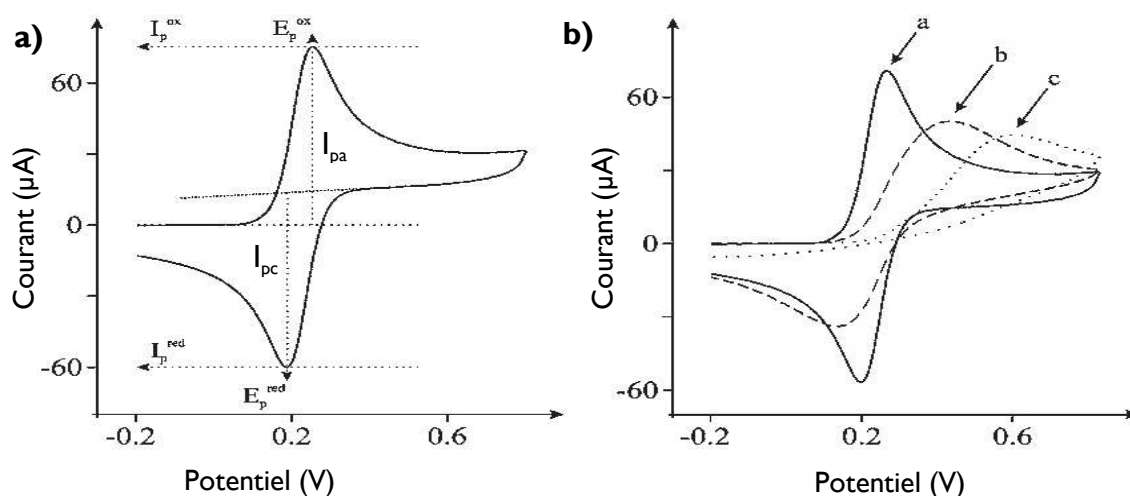
Le tracé de $i = f(E)$ permet de déterminer les potentiels d'oxydation et de réduction d'une espèce. L'intensité dépend de plusieurs paramètres, liés aux propriétés de diffusion de l'espèce électrochimique, sa concentration mais également de la vitesse de balayage³² selon l'équation de Randles-Sevcik (Equation 3.5).

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot [\text{ligand}] \cdot v^{1/2}$$

Avec : i_p = courant maximum en A ; n = nombre d'électrons transférés lors de la réaction électrochimique ; A = aire de l'électrode en cm^2 ; D = coefficient de diffusion cm^2/s ; [ligand] en mol/cm^3 ; v = vitesse de balayage en V/s.

Equation 3.5. Equation de Randles-Sevcik, T = 25°C

Le voltampérogramme $i = f(E)$ a une allure différente en fonction du type de processus : réversible, quasi-réversible ou irréversible, comme indiqué sur la Figure 3.22.



Dans le cas d'un processus réversible, l'équation de Nernst ci-après est vérifiée et permet de caractériser la réaction électrochimique.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Avec : $R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ constante des gaz parfaits ; T = température en Kelvin ; $F = 96485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$, constante de Faraday ; E^0 potentiel standard ; n = nombre électrons ; $[Ox]$ et $[Red]$ les activités chimiques de l'oxydant et du réducteur

Equation 3.6. Equation de Nernst

Pour des processus réversibles impliquant le transfert rapide d'un électron à $T = 25^\circ\text{C}$, l'équation de Nernst indique que l'écart $\Delta E_P = (E_P^{ox} - E_P^{red})$ est faible et correspond à une valeur proche de 57 mV. On peut aussi caractériser de manière générale ces systèmes par l'Equation 3.7.

$$E_P - E_{1/2} = 2,218 \frac{RT}{nF}$$

Equation 3.7. Equation de caractérisation du procédé électrochimique, avec $E_{1/2} = (E_{red} + E_{ox})/2$.

Cette équation permet d'avoir accès au calcul du nombre d'électron impliqué dans la réaction électrochimique.

Le complexe CuL^3 est ainsi étudié. Dès lors que le cuivre est dissocié du ligand, le potentiel d'oxydation du Cu(I) en Cu(II) observé lors du balayage retour sera différent du Cu(I) complexé. En revanche, si le Cu(I) n'est pas dissocié du ligand, on doit pouvoir observer un voltampérogramme comme montré sur la Figure 3.22 et mesurer les écarts entre les potentiels de réduction et d'oxydation de manière à caractériser le processus. On peut de cette manière dire si un complexe reste stable à l'échelle du temps de balayage. De plus, le relargage du Cu(I) rend également possible la réduction de celui-ci en Cu(0) et un précipité sera alors observé. On peut également mettre en évidence par cette technique la réversibilité ou l'irréversibilité de la réaction électrochimique.

Un transfert d'électron est caractérisé de réversible si les critères suivants sont vérifiés :

- Les potentiels E_{pa} (potentiel réaction à l'anode) et E_{pc} (potentiel réaction à la cathode) sont indépendants de la vitesse de balayage
- i_{pc} (courant cathodique) = i_{pa} (courant anodique)
- $\Delta E = 57 \text{ mV}$ pour une réaction électrochimique impliquant le transfert d'un électron
- i_{pc} et i_{pa} sont des fonctions linéaires de $v^{1/2}$ (v = vitesse de balayage)

b) Electrochimie de CuL^3

Des mesures ont été effectuées à différents pHs. De $4,04 < \text{pH} < 8,55$, les voltampérogrammes cycliques sont représentés sur la Figure 3.23.

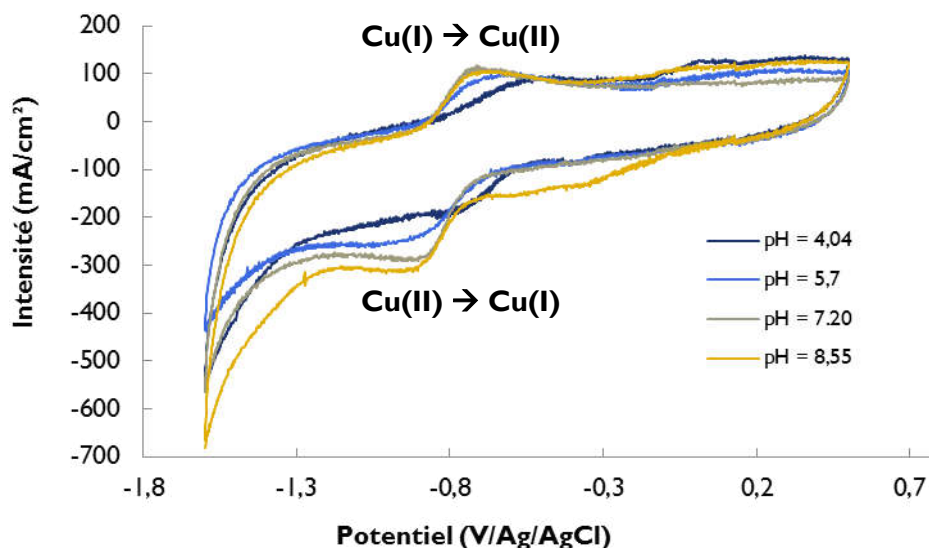


Figure 3.23. Voltampérogrammes cycliques de solution CuL^3 à pH variables ($v = 200 \text{ mV/s}$)
 Conditions : H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 9,96.10^{-4} \text{ M}$ (pH = 7,20 et 8,55) ; $[\text{CuL}^3] = 1,00.10^{-3} \text{ M}$
 (pH = 5,7 et 4,04) ; $T = 25^\circ\text{C}$

Plusieurs éléments peuvent être soulignés sur ces courbes. Tout d'abord, on constate qu'un seul pic de réduction et d'oxydation est observé et est similaire pour les valeurs de pH = 5,7 ; 7,20 et 8,55. On observe qu'à pH = 8,55 la courbe évolue différemment pour $E_{pc} = -0,3 \text{ V}$ suggérant que d'autres phénomènes commencent à apparaître. Ensuite pour un pH = 4,04, on constate une évolution nette des potentiels E_{pc} et E_{pa} . Nous savons de par les études précédentes qu'à pH $\geq 5,7$, l'espèce majoritaire présente en solution est l'espèce CuL^3 (à pH = 5,7 ; l'espèce CuL^3 correspond à 86,4 % du mélange), comme montré par la spéciation du complexe à la Figure 3.14. En revanche à pH 4,04, l'espèce CuL^3 ne représente que 11 % du mélange et l'espèce majoritaire est l'espèce CuL^3H à hauteur de 79,8 %. La variation des potentiels d'oxydation et de réduction est donc liée à ce changement de proportion des espèces en solution. A ce pH, nous n'observons pas de réduction du Cu(I) en Cu(0) car un seul pic d'oxydation et de réduction est observé. Nous pouvons dire que dans cette gamme de pH, le complexe Cu(I)L^3 est stable dans l'échelle de temps du balayage. Les potentiels de réduction et d'oxydation pour ces 4 valeurs de pH sont mentionnés dans le Tableau 3.7 ainsi que le potentiel d'oxydo-réduction du complexe, $E_{1/2} = (E_{\text{red}} + E_{\text{ox}})/2$. Enfin, au vu de l'allure du tracé $i = f(E)$, on remarque que la réaction électrochimique semble quasi-réversible.

pH	E_{pc}	E_{pa}	$E_{1/2}$	$E_{1/2}(\text{ENH})$
4,04	-0,760	-0,560	-0,660	-0,463
5,7	-0,890	-0,690	-0,790	-0,593
7,2	-0,870	-0,740	-0,805	-0,608
8,55	-0,890	-0,740	-0,815	-0,618

Tableau 3.7. Potentiels d'oxydation et de réduction mesurés à différents pHs (Ag/AgCl).
 Calcul du potentiel d'oxydo-réduction du complexe.

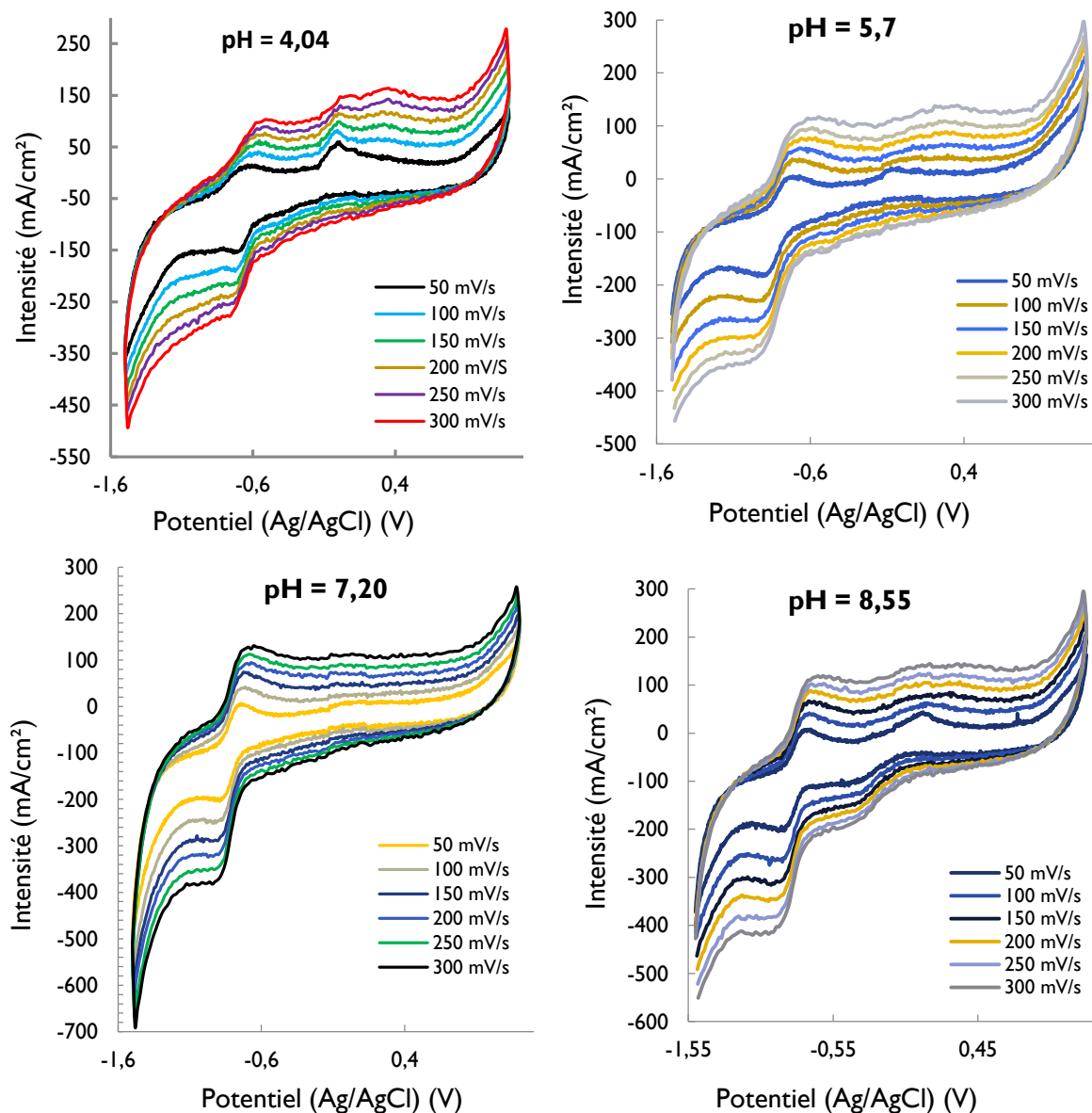


Figure 3.24. Voltampérogrammes enregistrés pour le complexe CuL^3 à pH = 5,7 ; 8,55 ; 7,20 en mode interactif ($v = 50, 100, 150, 200, 250, 300 \text{ mV/s}$). Conditions : H_2O ; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4) ; $[\text{CuL}^3] = 9,96 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (pH = 7,20 et 8,55) ; $[\text{CuL}^3] = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (pH = 5,7 et 4,04) ; $T = 25^\circ\text{C}$.

On constate à partir des voltampérogrammes tracés sur la Figure 3.24 que malgré la variation de la vitesse de balayage, les potentiels de réduction et d'oxydation ne varient que légèrement, ce qui suggère que la réaction électrochimique est quasi-réversible.

De surcroît, en appliquant l'Equation 3.7 à partir de la courbe $i = f(E)$ à pH = 7,20 ; on détermine que $n = 1,14$. Cette valeur suggère que la réaction électrochimique implique le transfert d'un électron. Cependant, on constate tout de même que les voltampérogrammes s'éloignent du modèle de la réaction réversible. Ainsi l'Equation 3.7 n'est pas applicable à toutes les valeurs de pH. Ce constat suggère également que la réaction est quasi-réversible.

De plus, on peut tracer l'évolution du courant anodique et cathodique en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage. Une évolution linéaire est un des critères de la

réversibilité de la réaction. Les données sont montrées pour les pH = 4,04 et 7,20 sur la Figure 3.25.

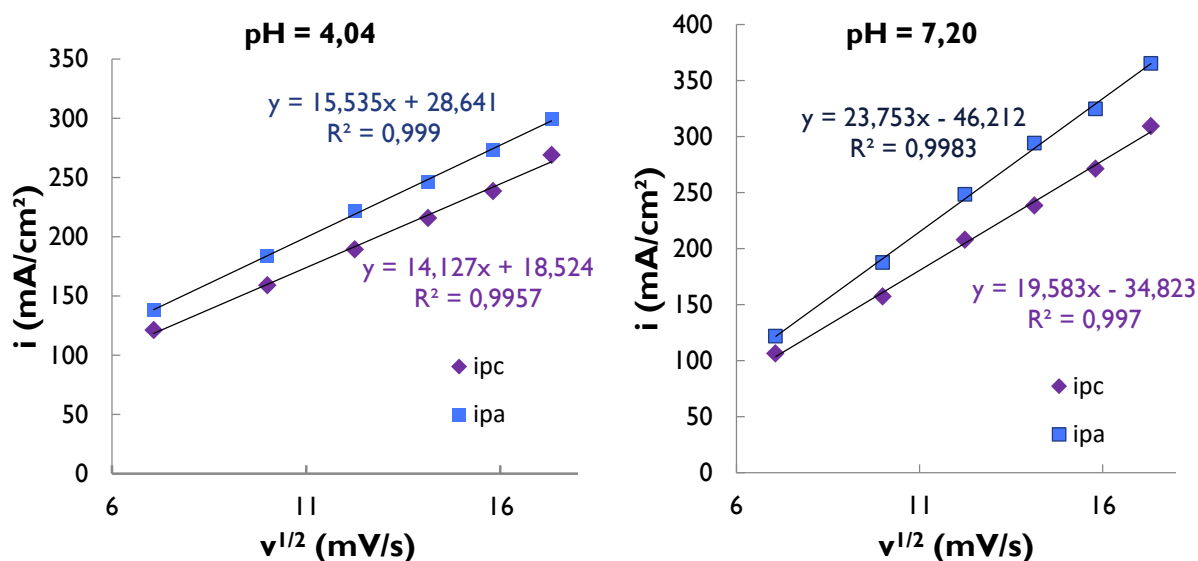


Figure 3.25. Influence de la vitesse de balayage. Conditions : H₂O, I = 0,1 M (NaClO₄), [CuL³] = 9,96.10⁻⁴ M (pH = 7,20 et 8,55) ; [CuL³] = 1,00.10⁻³ M (pH = 5,7 et 4,04).

On constate bien une évolution linéaire, également vraie lorsque pH = 8,55, ce qui suggère également que la réaction est quasi-réversible.

Enfin, un dernier critère concerne l'égalité entre le courant anodique et le courant cathodique. Les données sont présentées pour les intensités mesurées à pH = 7,20, en fonction de la vitesse de balayage.

v (mV/s)	i_{pc} (mA/cm ²)	i_{pa} (mA/cm ²)
50	106,5	121,7
100	157,2	187,7
150	208,0	248,6
200	238,4	294,2
250	271,4	324,6
300	309,4	365,2

Tableau 3.8. Evolution du courant anodique et cathodique à pH = 7,20.

Sur ce critère, on constate de nouveau que la réaction électrochimique n'est pas totalement réversible, puisque i_{pa} est différent de i_{pc} et cette différence s'accroît lors de l'augmentation de la vitesse de balayage.

Ainsi, sur l'ensemble des critères, on peut affirmer que pour ces pHs la réaction électrochimique est quasi-réversible. Il est intéressant de constater que c'est également le cas à pH = 4,04 lorsque l'espèce CuL³H est majoritaire, bien qu'à ce pH un autre phénomène semble présent.

Si l'on considère d'autres valeurs de pH, plus acide et basique, d'autres phénomènes sont mis en jeu, comme on peut l'observer sur les voltampérogrammes de la Figure 3.26.

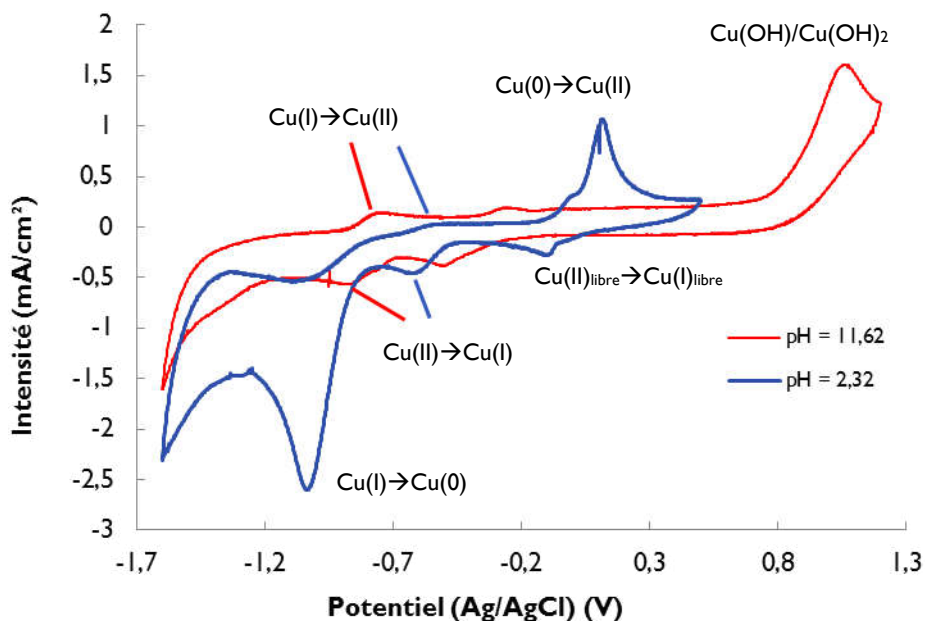
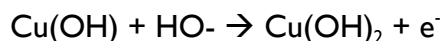
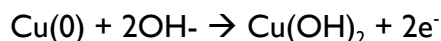
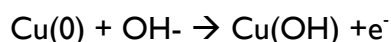


Figure 3.26. Voltampérogrammes cycliques de solution CuL^3 à pH variables ($v = 200 \text{ mV/s}$). Conditions : H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$ (NaClO_4), $[\text{CuL}^3] = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($\text{pH} = 2,32$) ; $[\text{CuL}^3] = 9,96 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ($\text{pH} = 11,62$) ; $T = 25^\circ\text{C}$

A $\text{pH} = 2,32$, on peut désormais voir, pour un potentiel proche de -1 V (Ag/AgCl), la réduction du Cu(I) en Cu(0) , qui suggère que le Cu(I) est dissocié du ligand. De ce fait, d'autres réactions électrochimiques sont présentes, probablement liées au potentiel d'oxydation du Cu(0) en Cu(I) et au potentiel de réduction du $\text{Cu(II)}_{\text{libre}}$ en $\text{Cu(I)}_{\text{libre}}$. Les potentiels de réduction et d'oxydation du cuivre complexé sont visibles également, de manière moindre pour l'oxydation, du fait qu'une majorité du cuivre est désormais sous forme de Cu(0) .

A $\text{pH} = 11,62$, l'apparition d'espèces supplémentaires est visible. Celles-ci peuvent être le résultat de diverses réactions d'oxydo-réduction. Quelques-unes d'entre elles sont mentionnées ci-après :³⁴



En conclusion sur cette partie, plusieurs éléments sont importants. Tout d'abord, le potentiel Cu(II)/Cu(I) du complexe est évalué à $-0,805 \text{ V}$ (Ag/AgCl), soit $-0,608 \text{ V/ENH}$, ce qui est inférieur au potentiel des couples oxydo-réducteur présents dans l'organisme, ce qui nous assure que notre complexe ne devrait pas être réduit ou dissocié par les processus biologiques. D'autre part, pendant les mesures effectuées dans la gamme $5,7 < \text{pH} < 8,55$ aucune démétallation n'est observée, suggérant que le ligand L^3 est capable de stabiliser le Cu(I) . La réaction est par ailleurs qualifiée de quasi-réversible dans cette gamme, tout comme à $\text{pH} = 4,04$ où l'espèce CuL^3H est majoritaire. Enfin, en comparaison avec des

données de la littérature (Tableau 3.5), on constate que le potentiel rédox dans le cas du complexe CuL^3 est inférieur à celui mesuré pour la majorité des ligands mentionnés à l'exception des chélatants PCB-TEIAIP et NOIPA2PY, basé sur la structure du tacn, pour lesquels les propriétés sont similaires à L^3 .

Seul le chélatant CB-TEIAIP possède un potentiel d'oxydo- inférieur à L^3 . En revanche, on remarque pour ce ligand, tout comme pour le cyclam ou H_2L_2 (basé sur la structure du cyclen), que la réaction électrochimique est irréversible, contrairement à L^3 .

3.2 Cinétique de dissociation

Classiquement, de manière à comparer l'inertie cinétique en milieu acide des chélatants du cuivre(II), les complexes sont placés dans une solution concentrée en acide (acide chlorhydrique ou perchlorique 5 à 12 M) et le suivi de la dissociation dans ce milieu est effectué en mesurant le spectre d'absorption de la solution en fonction du temps. En effet, pour des applications en radiopharmaceutique, la cinétique de dissociation est un critère important.²⁶ La mesure du temps de demi-vie dans ce milieu est considérée comme un bon critère de comparaison de la stabilité *in vivo* pour des chélatants du cuivre-64.³⁵

En ce qui concerne CuL^3 , nous l'avons placé dans un milieu 5 M en acide perchlorique ($\text{pH}_{\text{calculé}} = -0,7$). Nous savons qu'à ce pH le complexe CuL^3 n'est pas formé et il est donc possible de suivre sa cinétique de dissociation par spectrophotométrie sur les bandes d'absorption correspondant aux transitions des pyridines $\pi\text{-}\pi^*$ et d-d du ligand.

Avec le temps, le spectre d'absorption du complexe CuL^3 (le spectre en bleu correspond au spectre du complexe dès son placement en milieu acide) évolue vers le spectre d'absorption du ligand libre L^3 (en violet), les spectres d'absorption en gris sur la courbe ont été mesurés à divers intervalles de temps. La stabilité a été suivie sur un total de 20 mois.

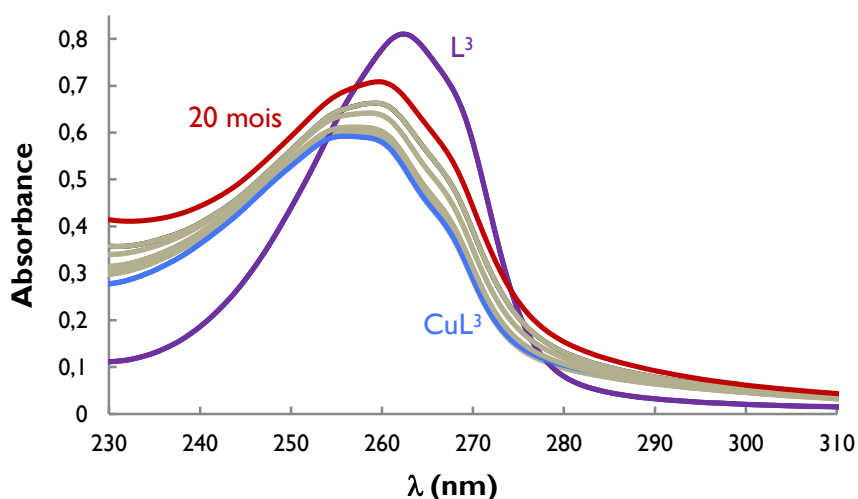


Figure 3.27. Evolution du spectre d'absorption en fonction du temps. Conditions : 5 M HClO_4 ; $[\text{L}^3] = 5,00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{CuClO}_4] = 4,83 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $T = 25^\circ\text{C}$

Après 20 mois la présence d'une structure hyperfine sur le spectre observé suggère la présence encore importante du complexe CuL^3 . Malheureusement, l'évolution de ces spectres d'absorption n'a pas permis de calculer avec plus de précision le temps de demi-vie du complexe. D'autres phénomènes perturbent le suivi de cette évolution ; on voit notamment un décalage apparaître au niveau de l'absorbance à 230 nm. Ceci est peut-être lié au signal de l'acide perchlorique.

Sur la bande d-d du ligand, un même suivi est donc opéré. L'évolution du spectre d'absorption est montrée sur la Figure 3.28.

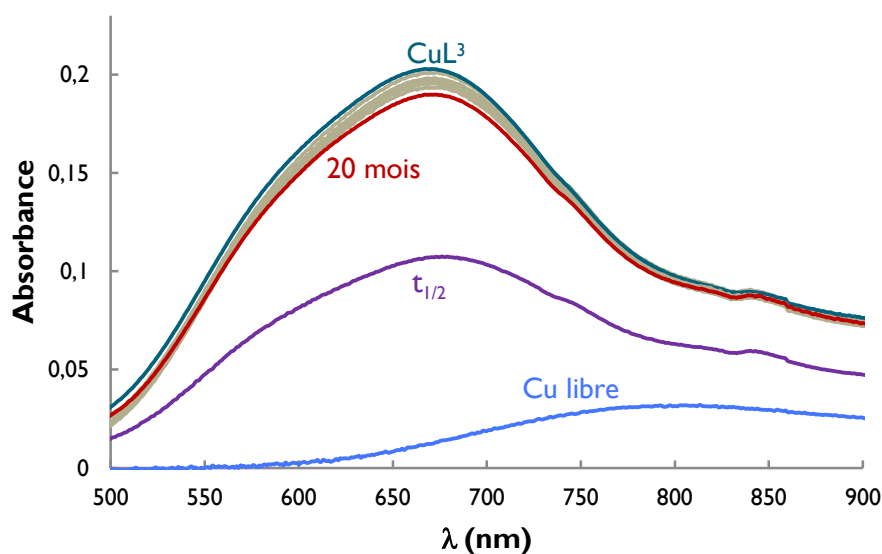


Figure 3.28. Evolution du spectre d'absorption en fonction du temps ; spectre d'absorption du cuivre libre ; spectre calculé $t_{1/2} = (\text{absorbance Cu libre} + \text{absorbance } t=0)/2$. Conditions : 5 M HClO_4 ; $[\text{L}^3] = 2,67 \cdot 10^{-3}$ M ; $[\text{CuClO}_4] = 2,59 \cdot 10^{-3}$ M, T = 25°C

Dans ce cas, seules de faibles variations du spectre d'absorption sont visibles après 20 mois de présence du complexe en milieu acide. Au vu de ces faibles variations au cours du temps, il n'a pas été possible de déterminer $t_{1/2}$ du complexe. En revanche, le tracé du spectre à $t_{1/2}$ (en violet sur la Figure 3.1), calculé à partir des spectres d'absorption du ligand libre et du cuivre libre montre que la dissociation du complexe après 20 mois n'est pas significative. On en déduit donc que dans ces conditions, $t_{1/2} \gg 20$ mois.

Des ligands tels que le cyclam ou un cyclam fonctionnalisé de première génération, le TETA (Tableau 3.5) possèdent des temps de demi-vie qui sont particulièrement faibles. Des ligands plus récents démontrent en revanche des temps de demi-vie supérieurs, c'est le cas du NOIPA2PY, testé à 90°C ou encore d'un ligand du type cyclen tel que le H_2L_2 qui possède un temps de demi-vie très élevé dans des conditions très fortes (12 M HCl , 90°C).

Une seconde génération de ligand du type cyclam tels que le CB-TEIAIP ou PCB-TEIAIP, qui possèdent un pont éthylène ou propylène entre 2 azotes du cycle, ont été développés de manière à améliorer les propriétés observées pour le TETA. On constate que dans le cas du

PCB-TEIAIP la stabilité en milieu acide est également remarquable, bien supérieure à celle de CB-TEIAIP, peut-être de manière contre-intuitive puisque la rigidité du squelette du ligand CB-TEIAIP est à priori supérieure.

En comparaison avec d'autres bispidines développées, la stabilité de CuL^3 testée dans ce travail est considérablement améliorée. En effet, le $t_{1/2}$, calculé pour CuL^3 est de 71 jours, à priori nettement moins élevé que le temps de demi-vie du complexe CuL^3 développé au cours de ce travail.

4. Conclusion

Les propriétés physico-chimiques du ligand L^3 sont désormais connues, grâce à cet ensemble d'études spectrophotométrique, potentiométrique, électrochimique par voltampérométrie cyclique et par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.

Parmi ces propriétés, cinq constantes d'équilibre associées aux équilibres acido-basiques ont pu être obtenues. Nous avons ensuite obtenu les constantes de stabilité thermodynamiques des complexes de cuivre et de zinc qui nous permettent de constater la sélectivité de L^3 pour le cuivre par rapport au zinc ($\Delta \log \beta = 3,7$). Nous avons parallèlement mis en évidence l'existence des espèces ML^3 , ML^3H et ML^3H_2 pour chacun de ces complexes. De plus, placé dans des conditions réductrices, nous avons montré que le complexe CuL^3 possède un potentiel d'oxydo-réduction suffisamment bas ($E = -0,608 \text{ V/ENH}$) pour $5,7 < \text{pH} < 8,55$ pour ne pas intervenir dans les processus biologiques et que le complexe Cu(I)L^3 demeure stable dans la gamme $4,04 < \text{pH} < 8,55$. Nous avons montré que la réaction électrochimique est quasi-réversible dans cette même gamme de pH. Enfin, nous avons observé la stabilité particulièrement élevée de CuL^3 en milieu acide perchlorique 5 M.

Ces résultats sont excellents lorsqu'on considère les critères nécessaires, rappelés en début de chapitre, pour un chélatant utilisé dans le cadre de l'imagerie nucléaire comme la TEP.

Pour aller plus loin, le ligand L^3 , ainsi que d'autres chélatants, ont été testés en présence de cuivre 64 dans diverses conditions stœchiométriques et de pH. Ces tests vont permettre de confirmer les résultats obtenus dans ce chapitre dans des solutions radiochimiques. C'est l'objet du chapitre 4.

Références

1. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, 43 (10), 1739–1753.
2. P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Annali di Chimica*, (1999), **89**, 45-49
3. Coppens, G.; Gillet, C.; Nasielski, J.; Donckt, E. V. *Spectrochimica Acta* **1962**, 18 (11), 1441–1453
4. Gottarelli, G.; Samori, B. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 11 (24), 2055–2058.
5. Fischer, A.; King, M. J.; Robinson, F. P. *Can. J. Chem.* **1978**, 56 (24), 3059–3067.
6. Meyer, M.; Frémond, L.; Tabard, A.; Espinosa, E.; Vollmer, G. Y.; Guillard, R.; Dory, Y. *New J. Chem.* **2005**, 29 (1), 99–108.
7. Moulinet d'Hardemare, A. du; Gellon, G.; Philouze, C.; Serratrice, G. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (22), 12142–12151.
8. Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184 (1), 311–318.
9. Roux, A. *Synthèse et fonctionnalisation de bispidines pour la complexation du ⁶⁴Cu en vue d'applications en imagerie médicale par tomographie à émission de positrons et en radiothérapie*; Thèse de l'université de Strasbourg, 2014.
10. Roux, A.; Nonat, A. M.; Brandel, J.; Hubscher-Bruder, V.; Charbonnière, L. J. *Inorg. Chem.* **2015**, 54 (9), 4431–4444.
11. Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2016**.
12. Freedman, L. D.; Doak, G. O. *Chem. Rev.* **1957**, 57 (3), 479–523.
13. Abada, S.; Lecointre, A.; Christine, C.; Ehret-Sabatier, L.; Saupe, F.; Orend, G.; Brasse, D.; Ouadi, A.; Hussenet, T.; Laquerrière, P.; Elhabiri, M.; Charbonnière, L. J. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (47), 9601–9620.
14. Motekaitis, R. J.; Rogers, B. E.; Reichert, D. E.; Martell, A. E.; Welch, M. J. *Inorg. Chem.* **1996**, 35 (13), 3821–3827.
15. Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorg. Chim. Acta* **1991**, 190 (1), 27–36.
16. Roger, M.; Lima, L. M. P.; Frindel, M.; Platas-Iglesias, C.; Gestin, J.-F.; Delgado, R.; Patinec, V.; Tripier, R. *Inorg. Chem.* **2013**, 52 (9), 5246–5259.
17. Krezel, A.; Bal, W. J. *Inorg. Biochem.* **2004**, 98 (1), 161–166.
18. Hathaway, B. J.; Billing, D. E. *Coord. Chem. Rev.* **1970**, 5 (2), 143–207.
19. *Le corps humain - Étude, structure et fonction*; 2017.
20. Raymond, K. N.; Carrano, C. J. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12 (5), 183–190.

21. Shokeen, M.; Anderson, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (7), 832–841.
22. Born, K.; Comba, P.; Ferrari, R.; Lawrance, G. A.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (2), 458–464.
23. Ševčík, R.; Vaněk, J.; Lubal, P.; Kotková, Z.; Kotek, J.; Hermann, P. *Polyhedron* **2014**, *67*, 449–455.
24. Sun, X.; Wuest, M.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Reed, D. P.; Boswell, C. A.; Motekaitis, R.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (2), 469–477.
25. Esteves, C. V.; Lamosa, P.; Delgado, R.; Costa, J.; Désogère, P.; Rousselin, Y.; Goze, C.; Denat, F. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (9), 5138–5153.
26. Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005* (23), 4829–4833.
27. Price, T. W.; Greenman, J.; Stasiuk, G. J. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (40), 15702–15724.
28. Dale, A. V.; An, G. I.; Pandya, D. N.; Ha, Y. S.; Bhatt, N.; Soni, N.; Lee, H.; Ahn, H.; Sarkar, S.; Lee, W.; Huynh, P. T.; Kim, J. Y.; Gwon, M.-R.; Kim, S. H.; Park, J. G.; Yoon, Y.-R.; Yoo, J. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (17), 8177–8186.
29. Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
30. Krebs, H. A.; Kornberg H. L.; Burton K. *Energy Transformations in Living Matter - A Survey* Springer, **1957**.
31. *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements*, 12 Marcel Dekker, New York **1976**.
32. Zanello, P.; Nervi, C.; Biani, F. F. de. *Inorganic Electrochemistry : Theory, Practice and Application*; Royal Society of Chemistry: Cambridge; **2011**.
33. Brownson, D. A. C.; Banks, C. E. In *The Handbook of Graphene Electrochemistry*; Springer London: London, 2014; pp 23–77.
34. Abd el Haleem, S. M.; Ateya, B. G. *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.* **1981**, *117* (2), 309–319.
35. Odendaal, A. Y.; Fiamengo, A. L.; Ferdani, R.; Wadas, T. J.; Hill, D. C.; Peng, Y.; Heroux, K. J.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J.; Weisman, G. R.; Wong, E. H. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (7), 3078–308.

Chapitre IV
Radiomarquage des agents
chélatants par le ^{64}Cu

1. Objectifs

Au vu des très bons résultats des études de complexation de L^3 ainsi que ceux effectués précédemment sur L^{11} , nous avons complété l'évaluation de ces composés comme potentiels radiotraceurs pour la TEP, par des tests de complexation à chaud, par le ^{64}Cu .

Plusieurs ligands développés au laboratoire ont été sélectionnés pour cette étude (Schéma 4.1), y compris un chélatant bifonctionnel L^{12} et un agent développé pour l'imagerie bimodale TEP/optique, L^{13} . Les expériences de radiomarquage ont été conçues de sorte à évaluer à température ambiante les trois paramètres suivants :

- la cinétique de radiomarquage,
- l'influence de la stœchiométrie (n_L/n_M) sur le radiomarquage,
- l'influence du pH.

Pour les mesures, deux séjours ont été réalisés au cyclotron Arronax de Nantes, en collaboration avec le Dr Sandrine Huclier (Laboratoire Subatech, UMR 6457).

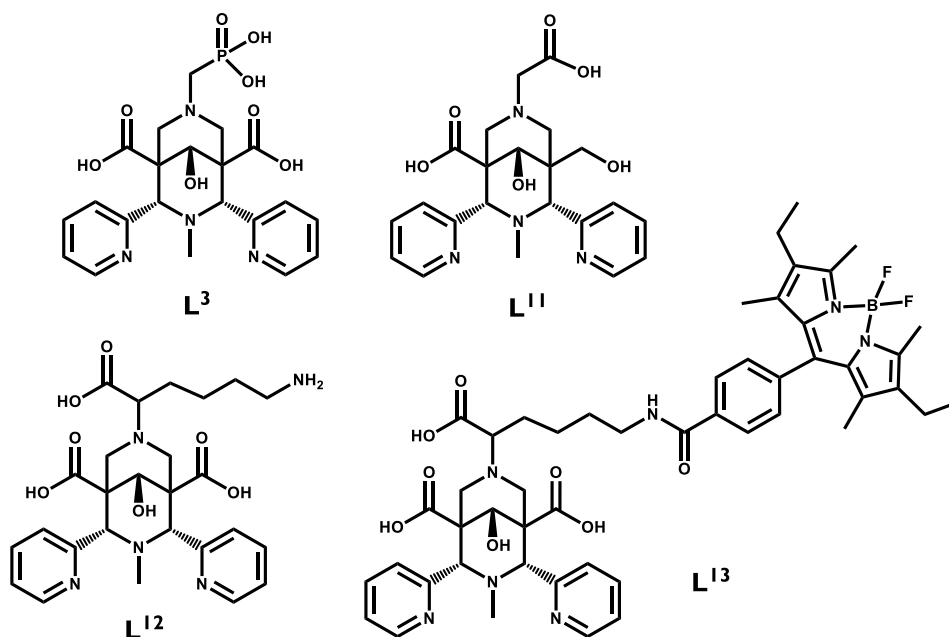


Schéma 4.1. Ligands testés en présence de ^{64}Cu

2. Mise en œuvre expérimentale

2.1 Composition des sources de ^{64}Cu

a) Production

Sur le site arronax, le ^{64}Cu est produit au sein d'un cyclotron, par irradiation de deutons sur une cible de ^{64}Ni enrichi (min > 98 %), électrodéposé sur un disque d'or, selon la réaction suivante $^{64}\text{Ni}(d, 2n)^{64}\text{Cu}$.

La purification radiochimique est effectuée par élution sur une résine échangeuses d'anion Bio-Rad AG1x8 (forme Cl^-). L'élution du nickel et du cobalt, préalable à celle du cuivre, est

effectuée par de l'acide chlorhydrique 10 M puis 6 M. Ensuite le cuivre est élué avec une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M. Après évaporation à sec, l'éluat contenant le cuivre 64 est resolubilisé dans de l'acide chlorhydrique 0,01 M avant d'être utilisé pour les tests. Cette technique conduit à un rendement de purification de 92 % avec une déviation standard de 3 %.²

La pureté radionucléique est déterminée par un détecteur HPGe (High-Purity Germanium detector), détecteur de particules basé sur la technologie des semi-conducteurs.

La pureté chimique est déterminée par ICP-OES à la suite de laquelle l'activité totale et l'activité spécifique sont données. L'activité totale correspond à la mesure de la radioactivité d'un échantillon donné. L'activité spécifique est une activité massique, c'est-à-dire qu'elle correspond à l'activité d'une masse donnée de composé radioactif. Dans le rapport d'analyse des sources fournies par Arronax, l'activité spécifique est donnée en fonction de la quantité de matière de la somme des métaux (il s'agit ici d'une activité molaire) et en fonction de la quantité de matière de cuivre (Tableau 4.2 et Tableau 4.5).

b) Sources utilisées

Lors de nos deux séjours de manipulation, deux sources de composition significativement différentes ont été obtenues et pour chaque séjour, deux solutions nous ont été fournies. Chacune de ces solutions possédait le jour de la livraison une activité totale d'environ 50 MBq. Pour chaque séjour, la deuxième solution étant fournie le deuxième jour, son activité totale lors de la calibration était d'environ 200 MBq. Après 24 h, du fait de la décroissance du ^{64}Cu selon la loi de décroissance radioactive, l'activité totale était bien de 50 MBq à la livraison. A noter que cette deuxième source était également utilisée 24 h après la livraison, soit avec une activité totale à nouveau divisée par 4.

La première série de manipulation a été effectuée avec la source I ayant une composition métallique comme indiquée dans le Tableau 4.1. L'activité spécifique de cette solution est inscrite dans le Tableau 4.2, par rapport à la totalité des métaux présents ainsi que par rapport à la quantité de cuivre.

Métal	Concentration (ppm)
Co	<0,27
Cu	2,48
Fe	6,38
Ni	0,71
Zn	<0,11
Total	9,57 ± 0,24

Tableau 4.1. Composition métallique de la source I

Activité spécifique / Σ métaux	8,78 MBq/nmol
Activité spécifique / Cu	$34,8 \pm 3,2$ MBq/nmol

Tableau 4.2. Activité spécifique de la source 1

La source 1 a ensuite été diluée dans une solution acétate d'ammonium 0,25 M tamponnée à pH = 5,37 pour donner les 3 batchs qui seront directement utilisés pour les expériences de radiomarquage. Le batch 1 est préparé et utilisé le 1^{er} jour (c'est-à-dire le jour de la calibration de ^{64}Cu), le batch 2 est préparé et utilisé le 2^{ème} jour et le batch 3 est utilisé le 3^{ème} jour et est obtenu par décroissance du batch 2. La composition de ces batchs est décrite dans le Tableau 4.3.

	Batch 1	Batch 2	Batch 3 (décroissance batch 2)
Volume initial (ml)	0,0344	0,143	-
Volume dilué (ml)	0,9	0,9	0,9
Activité /ml (MBq)	50	52,5	13,125
[Σ Métaux] (M)	$6,05 \cdot 10^{-6}$	$2,48 \cdot 10^{-5}$	$2,48 \cdot 10^{-5}$
[^{64}Cu] (M)	$1,57 \cdot 10^{-6}$	$1,61 \cdot 10^{-6}$	$4,02 \cdot 10^{-7}$
$n(^{64}\text{Cu})$ (pmol)/ échantillon préparé	15,69	8,04	8,04

Tableau 4.3. Caractéristiques des batch obtenus à partir de la source 1

Similairement, la deuxième série de manipulation a été effectuée avec la source 2 ayant une composition métallique comme indiquée dans le Tableau 4.4. L'activité spécifique de cette solution est inscrite dans le Tableau 4.5, par rapport à la totalité des métaux présents ainsi que par rapport à la quantité de cuivre.

Metal	Concentration (ppm)
Co	$0,335 \pm 0,062$
Cu	$2,86 \pm 0,32$
Fe	$1,13 \pm 0,28$
Ni	$2,24 \pm 0,18$
Zn	$4,8 \pm 2,4$
Total	$11,4 \pm 2,4$

Tableau 4.4. Composition métallique de la source 2

Activité spécifique / Σ métaux	6,37 MBq/nmol
Activité spécifique / Cu	$25,3 \pm 2,9$ MBq/nmol

Tableau 4.5. Activité spécifique de la source 2

La composition des 3 batchs obtenus à partir de cette solution est décrite dans le Tableau 4.6. De la même manière, le batch 4 est utilisé le jour de la calibration, le batch 5 le jour suivant et le batch 6 le troisième jour.

	Batch 4	Batch 5	Batch 6 (décroissance batch 5)
Volume initial (ml)	0,049	0,137	1
Volume dilué (ml)	1	1	1
Activité /ml (MBq)	55,71	38,94	9,735
$[\Sigma\text{Métaux}]$ (M)	$8,97 \cdot 10^{-6}$	$2,51 \cdot 10^{-5}$	$2,51 \cdot 10^{-5}$
$[^{64}\text{Cu}]$ (M)	$2,25 \cdot 10^{-6}$	$1,57 \cdot 10^{-6}$	$3,93 \cdot 10^{-7}$
$n(^{64}\text{Cu})$ (pmol)/ échantillon	22,51	15,73	15,73

Tableau 4.6. Caractéristiques des batch obtenus à partir de la source 2

Pour chaque source, il est important de noter que la proportion de cuivre par rapport à l'ensemble des contaminants métalliques est seulement d'environ 25 % juste après purification des solutions radiochimiques. Cette proportion diminue ensuite au cours du temps, selon la loi de décroissance. En revanche la quantité de métaux totale n_M , qui concerne l'ensemble des métaux présents, reste constante. Afin de simplifier les calculs dans les tests de radiomarquage effectués par la suite, les ratios n_L/n_M seront donc calculés par rapport à l'ensemble des métaux présents en solution. De par la composition des sources, nous pouvons déjà noter que la sélectivité des bispidines pour le Cu^{2+} par rapport aux autres métaux de transition et en particulier le Fe(II)/(III) (source 1), le Zn(II) (source 2) et le Ni (source 2) est un paramètre important.

2.2 Description du protocole utilisé

Tout d'abord, des solutions aqueuses de ligand, de concentration 1 mg/L, ont été préparées. Ensuite, en fonction des conditions testées (ratio n_L/n_M donné à un pH donné), une fraction de cette solution de ligand a été prélevée puis placée dans un tampon acétate d'ammonium 0,1 M ajusté au pH souhaité. A cette solution tamponnée en pH, contenant n_L moles de ligand, est ajouté un volume de chacun des batchs décrit ci-avant contenant le ^{64}Cu . Du fait de la décroissance radioactive des sources, le volume des batchs prélevé est adapté, il est compris entre 5 μL et 40 μL .

Le volume total de chacun des échantillons testés est de 500 μL .

Suite à la préparation des échantillons, ceux-ci sont incubés à température ambiante et un suivi cinétique de la réaction est réalisé en prélevant des aliquots des solutions marquées à différents temps (5, 10, 15, 30, 45 et 60 min) et le rendement de radiomarquage est évalué par radio-CCM.

Pour chaque chélate, deux séries de mesures ont été réalisées : la première, à pH fixe ($2 < \text{pH} < 6$), vise à évaluer l'influence du rapport n_L/n_M et la seconde, à ratio n_L/n_M fixé ($1,25 < n_L/n_M < 5$), permet d'optimiser le pH de radiomarquage. Dans chaque cas, la cinétique de la réaction de marquage est suivie sur une période de 5 à 60 min.

2.3 Conditions de suivi par Radio-CCM

a) Optimisation de l'élution

Dans un premier temps, une optimisation à froid des conditions d'élution est effectuée pour chacun des ligands étudiés afin d'assurer une bonne séparation entre le CuCl_2 (cuivre « libre ») et le complexe LCu. Etant donné que le ligand libre n'est pas révélé sur les plaques radiochromatographiques, son rapport frontal n'a pas d'importance.

Le groupe de Peter Comba a utilisé lors de tests similaires un éluant composé de MeOH/tampon acétate 2 M 1/1 sur des plaques alumine, système pour lequel le rapport frontal de $^{64}\text{CuCl}_2$ est égal à 0 et celui du complexe entre 0,6 et 0,7.³ Un système quasiment identique avait été utilisé au préalable par le groupe de Carolyn J. Anderson, un mélange 1/1 MeOH/10 % tampon acétate d'ammonium sur silice.⁴ Des tests sur des complexes de $^{44\text{m}/44}\text{Sc}$ sur le site Arronax ont été effectués sur silice à partir d'un système d'élution comprenant un mélange 25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2/1/1.⁵

Nous avons dans un premier temps fait des essais sur des plaques de silice, en utilisant le système d'élution 25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ en faisant varier la proportion en MeOH : 1/2/1 ou 1/4/1. Pour cela, des solutions contenant chacun des ligands ainsi que CuCl_2 dans les proportions stœchiométriques ont été préparées. Sur CCM, trois composés ont été déposés : $\text{CuCl}_{2(\text{aq})}$ d'une part, la solution mélange d'autre part ainsi qu'un co-dépôt correspondant à chacune des deux solutions déposées individuellement. Les rapports frontaux sont calculés à partir du co-dépôt.

Le Tableau 4.7 résume les rapports frontaux correspondant au $\text{CuCl}_{2(\text{aq})}$ et au complexe CuL. A noter que sur l'ensemble de ces tests, la concentration de la solution de CuCl_2 de référence étant assez concentrée, le CuCl_2 apparaît comme une traînée sur CCM et est par conséquent légèrement élué. Une solution concentrée a été utilisée afin de s'assurer d'une bonne séparation, le CuCl_2 n'étant pas visible dans la solution contenant le complexe.

Ligand	25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/2/1		25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/4/1	
	R_f CuCl_2	R_f complexe	R_f CuCl_2	R_f complexe
L^3	0,2	0,8	0,16	0,74
L^{12}	0,09	0,44	0,13	0,63
L^{11}	0,28	0,92	0,16	0,87
L^{13}	0,2	0,76	0,18	0,64

Tableau 4.7. Rapports frontaux de CuCl_2 et des complexe CuL sur silice

Pour chacun des ligands, les conditions permettant une plus grande élution du complexe et donc une séparation plus importante (notées en bleu dans le tableau) sont utilisées pour les élution des solutions de radiomarquage contenant $^{64}\text{CuCl}_2$ et ^{64}CuL .

b) Technique de révélation des radio-CCM avec le « Cyclone Plus »

Après marquage des solutions de ligand avec le ^{64}Cu , les solutions sont déposées sur des plaques CCM. Après élution et séchage, celles-ci sont exposées, dans des cassettes autoradiographiques pendant une durée déterminée (la durée influence la netteté de l'image obtenue finalement ainsi que la fiabilité de l'exploitation), à un système d'écrans de phosphores de stockage à haute efficacité. Ces derniers stockent l'énergie dans des cristaux photo-stimulables ($\text{BaFBr} \cdot \text{Eu}^{2+}$). L'énergie du radio-isotope ionise l' Eu^{2+} en Eu^{3+} libérant les électrons de la bande de conduction des cristaux de phosphore.

Ces écrans sont ensuite placés dans le système « Cyclone Plus », conçu avec une optique confocale de pointe et un système de balayage hélicoïdal. À l'intérieur du cyclone, les écrans de phosphore sont parcourus par une lumière laser stimulante à 633 nm focalisée et émettent des photons de 390 nm. L'image sous-jacente est détectée optiquement afin de créer une image numérisée haute résolution avec des données quantitatives.

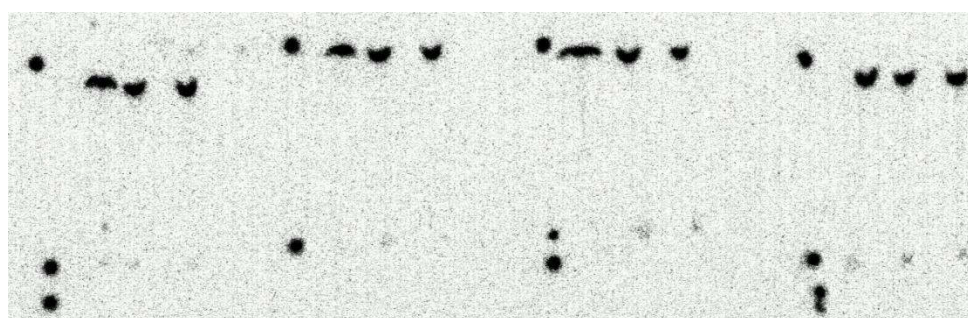


Figure 4.1. Exemple d'image obtenue par le Cyclone Plus

Sur l'image montrée à la Figure 4.1, 5 plaques CCM ont été exposées sur les écrans de phosphore. À gauche de chacune d'entre elles figurent trois points qui permettent sur l'image finale de situer chacune des plaques CCM entre elles ainsi que le bas de la plaque, la ligne de dépôt ainsi que le front de l'éluant. L'interprétation est alors possible à l'aide du logiciel Optiquant. Cette étude est quantitative, évaluée avec $\pm 5\%$, par intégration de

l'intensité sur chacune des tâches présentes sur la plaque, comme montré sur l'exemple Figure 4.2.

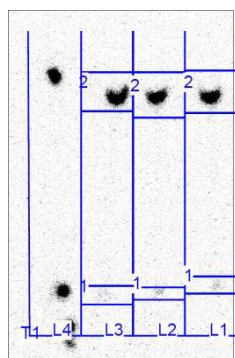


Figure 4.2. Exemple d'interprétation d'une radio-CCM

T1 signifie qu'il s'agit de la première plaque mise en place par Optiquant sur l'image enregistrée par le Cyclone Plus.

Quatre lignes (L1, L2, L3 et L4) sont mises en places sur Optiquant, L4 servant de référence à gauche. Les trois autres lignes correspondent aux trois dépôts (temps de radiomarquage variable) sur la plaque CCM.

Deux intégrations sont enregistrées par ligne, désignées par les zones 1 et 2, et les résultats sont donnés en pourcentage de l'intensité totale ainsi que les rapports frontaux correspondants.

3. Résultats obtenus

3.1 Ligand L^3

a) Influence du ratio n_L/n_M

L'influence du ratio n_L/n_M est évaluée à $\text{pH} = 5,37$, fixé par une solution tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M. Pour l'ensemble des tests, le batch de ^{64}Cu utilisé est le batch 3 dont la $[\Sigma\text{Métaux}] = 2,48 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (cf Tableau 4.3 pour la composition détaillée). Un suivi par radio-CCM sur plaque de silice (25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/2/1) permet un bon suivi de la réaction de marquage. Les rendements calculés avec le logiciel Optiquant sont résumés dans le tableau Tableau 4.8.

Ratio n_L/n_M	t (min)					
	5	10	15	30	45	60
0,25	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
0,75	0	0	0	12	11	11
1,25	100	100	100	95	96	94
2,5	92	93	93	94	92	100
12,5	100	100	100	100	100	100
25	100	100	100	100	100	100

Tableau 4.8. Rendement de radiomarquage de L^3 en fonction du ratio n_L/n_M ; batch 3, 25°C

Pour certains points (surlignés en gris), le temps d'exposition des plaques à l'écran de phosphore était trop faible de sorte que le dépôt sur plaque correspondant au cuivre libre, généralement peu intense, n'était alors pas visible. Du fait de la faible intensité des dépôts sur plaque, l'erreur sur ces valeurs est importante.

Les autres valeurs nous permettent de dégager deux tendances. Tout d'abord, dès lors que le ratio $n_L/n_M \geq 1,25$, le rendement de radiomarquage est quantitatif, il atteint un ordre de grandeur de 95 % en seulement quelques minutes. Pour un ratio de 2,5, le rendement atteint 100 % pour un temps de 60 min. Il en est de même pour des ratios supérieurs (Figure 4.3). De tels résultats sont excellents et en bonne corrélation par rapport aux études de stabilité thermodynamique précédemment effectuées (cf chapitre III).

Sur la Figure 4.4, au point A, il est remarqué qu'on ne voit plus la trace correspondant au cuivre libre sur la ligne de dépôt, seul le complexe est visible avec un $R_f = 0,9$. Le cuivre libre est néanmoins visible pour les points B et C, mais avec une intensité très faible.

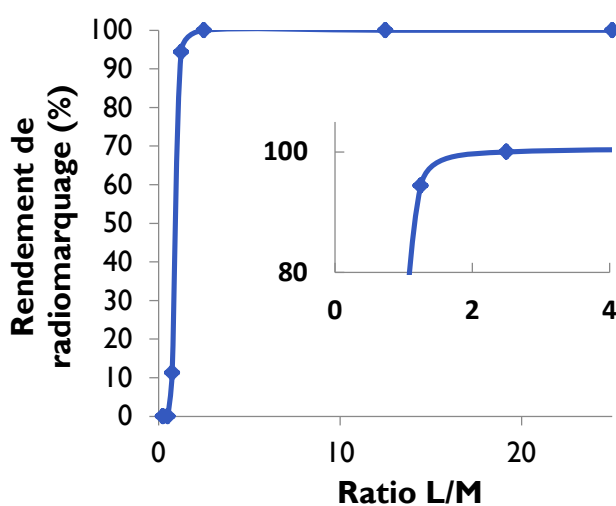


Figure 4.3. Rendement de radiomarquage en fonction du ratio n_L/n_M



Figure 4.4. Représentation CCM (pH = 5,37, $n_L/n_M = 2,5$) L^3Cu . A = 60 min, B = 45 min, C = 15 min. Eluant : 25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

b) Comparaison avec les données de la littérature

Les conditions de radiomarquage ainsi que les rendements de radiomarquage d'autres chélatants du $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ mentionnés dans la littérature sont données Tableau 4.9. Pour certains d'entre eux, les ratios n_L/n_{Cu} ou n_L/n_M sont donnés.

Ligand	Conditions	Rdt (%)	n_L/n_{Cu}	n_L/n_M	réf
DOTA	t.a., pH 5,5, 120 min, 5 mM	99			6
NOIPA2PY	t.a., 30 min, pH 6-7 0,1 mM, 1 mM, 10 mM	100	6, 60, 600	1,5, 15, 150	7
PCB-TEIAIP	pH 8, 1 h, 25 μM , 50°C 60°C	40 >95	-	-	8
CBTEIAIP	t.a., pH 8,1, 30 min, 26,5 μM	>95	-	-	9
L ^A	t.a., 1 min, pH 6,5	quant.	1200-8000	-	10
L ^B	t.a., 1 min, pH 5,5	quant.	390-650	-	11
L ^C	50°C, 60 min, pH 6,5	>95	220-1460	-	12

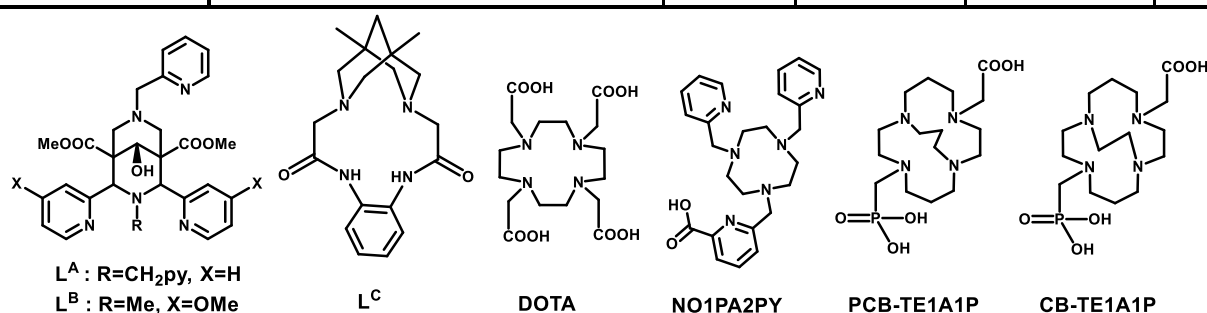


Tableau 4.9. Conditions de radiomarquage de chélatants du cuivre 64.

Parmi les chélatants mentionnés dans le Tableau 4.9, quatre d'entre eux permettent de complexer la totalité du cuivre 64 à température ambiante, il s'agit du NOIPA2PY, du DOTA, de L^A et de L^B. Les mesures sont faites à un pH similaire pour chacun d'entre eux. Pour L^A et L^B, la principale différence réside dans le ratio n_L/n_{Cu} des échantillons analysés. Dans le cas de L^C, ce ratio est égal à 62. En effet, du fait de la décroissance de la source 1, la proportion en cuivre par rapport à la somme des métaux présents est divisé par 16 pour $t = 2t_{1/2}$. Ainsi, pour L^C, les tests sont effectués avec une quantité de matière de ligand par rapport au cuivre très inférieure aux tests pour L^A et L^B. Une telle différence peut expliquer pourquoi la cinétique est plus rapide pour ces derniers. Par rapport au DOTA, les tests sont effectués à une concentration bien plus élevée de ligand, de l'ordre de 5 mM, tandis que les tests pour L^C sont effectués pour $[L] = 1 \mu\text{M}$ pour $n_L/n_M = 2,5$. Malgré cela, le radiomarquage est plus rapide et rendement est meilleur pour L^C.

Pour NOIPA2PY, plusieurs conditions ont été appliquées et un rendement de 100 % est obtenu quelles qu'elles soient, pour une cinétique plus rapide que dans le cas de L^C. Un élément peut être noté malgré tout : pour L^C, $n_L/n_M = 1,25$ pour $n_L/n_{\text{Cu}} = 78$ tandis que pour le ligand NOIPA2PY $n_L/n_M = 1,5$ pour $n_L/n_{\text{Cu}} = 6$, ce qui implique que la source utilisée dans le dernier cas contient une proportion plus importante de cuivre par rapport à la somme des métaux, en comparaison avec la source utilisée pour L^C. La compétition avec les autres métaux est donc significativement plus forte pour les tests avec le ligand L^C que ceux pour NOIPA2PY.

Pour ce qui concerne les autres ligands, basés sur la structure du cyclam, le CB-TEIAIP et le PCB-TEIAIP, tous deux permettent d'obtenir, à des concentrations faibles de ligands (25 μM), des rendements de radiomarquage très performants. Cependant, le radiomarquage du PCB-TEIAIP n'est effectué qu'à partir de 50°C où le rendement est de seulement 40 % et à 60°C pour un rendement > 95 %. Le marquage n'est pas possible pour celui-ci à température ambiante. En revanche, le chélatant CB-TEIAIP est performant à température ambiante. La rigidité apportée par le pont éthylène et la présence d'une fonction acide phosphonique, tout comme dans L^3 , permettent à ce ligand d'avoir un rendement de radiomarquage similaire à L^3 .

Ensuite, on peut remarquer que le rendement de radiomarquage pour des ratios $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} < 1$ est nul ou très faible. Ceci est certainement lié au fait que de nombreux contaminants métalliques (principalement du fer et du nickel) sont présents en plus du ^{64}Cu . Ainsi la sélectivité du ligand L^3 vis-à-vis du fer (en particulier du Fe(III)) et du nickel serait à définir pour une interprétation vraiment complète. D'autre part, étant donné que pour un ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 2,5$, le rendement atteint 100 % seulement après 60 min, il semble que la cinétique soit également un facteur important et pourrait expliquer des rendements faibles pour des ratios inférieurs à 1.

Ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}}$	Rendement de radiomarquage	
	40 min	60 min
0,25	0	4
0,5	0	6
0,75	13,3	22

Tableau 4.10. Rendement de radiomarquage après chauffage à 80°C.

Afin de valider cette hypothèse, trois échantillons ($n_{\text{L}}/n_{\text{M}} < 1$) ont été chauffés à 80°C. Les résultats, notés dans le Tableau 4.10, montrent qu'après 1h de chauffage, la formation du complexe est mise en évidence pour un ratio de 0,25 et que le rendement de radiomarquage est de l'ordre de 20 % pour un ratio de 0,75. La cinétique de la complexation du ^{64}Cu est ralentie par la formation de complexes intermédiaires soit du ligand avec le Fe(II/III) ou le Ni(II) par exemple, soit du ^{64}Cu avec les autres anions présents en solution comme l'acétate provenant du tampon. Cependant, ces résultats indiquent également une bonne sélectivité thermodynamique du ligand pour le Cu^{2+} sans laquelle il serait impossible d'observer un radiomarquage à des ratios $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} < 1$. En pratique les expériences de radiomarquage sont rarement réalisées dans des conditions aussi compétitives.

A titre d'exemple, pour le ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 0,25$ on a $n_{\text{L}}/n_{\text{Cu}} = 15,5$. Seul le ligand NOIPA2PY est testé dans de telles conditions, même plus faibles encore, mais avec une source contenant une proportion en cuivre bien plus importante que le batch 3 et dans un milieu bien plus concentré également ($[\text{NOIPA2PY}] = 10^{-4} \text{ M}$ contre $[\text{L}^3] = 10^{-6} \text{ M}$). On peut noter qu'à ce

niveau de concentration, la cinétique de complexation, autrement dit la compétition avec les contaminants métalliques est particulièrement importante.

Une modélisation avec le logiciel Hyss¹³ a été effectuée dans les conditions du batch 3 pour un ratio $n_L/n_M = 0,25$. Etant donné que les constantes de stabilité ne sont connues que pour le cuivre et le zinc et en considérant que les propriétés de complexation de L^3 suivent la série d'Irving-Williams,¹⁴ la sélectivité de L^3 pour les autres métaux est en principe inférieure au zinc. Cela a d'ailleurs été vérifié lors d'études sur d'autres bispidines.^{1,15}

La modélisation a donc été effectuée dans le cas le plus défavorable, en considérant que l'ensemble des contaminants métalliques forment des complexes aussi stables que ceux obtenus avec le zinc. En d'autres termes $[\text{Zn}] = [\sum \text{Métaux}] - [\text{Cu}]$.

Ainsi, dans ces conditions : $[\sum \text{Métaux} - \text{Cu}] = 2,44 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Cu}] = 4,02 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. Les constantes de stabilité sont mentionnées Tableau 3.3.

La courbe de distribution des espèces LM présentes dans ces conditions est représentée sur la Figure 4.5. Les espèces du ligand libre ne sont pas représentées pour plus de clarté.

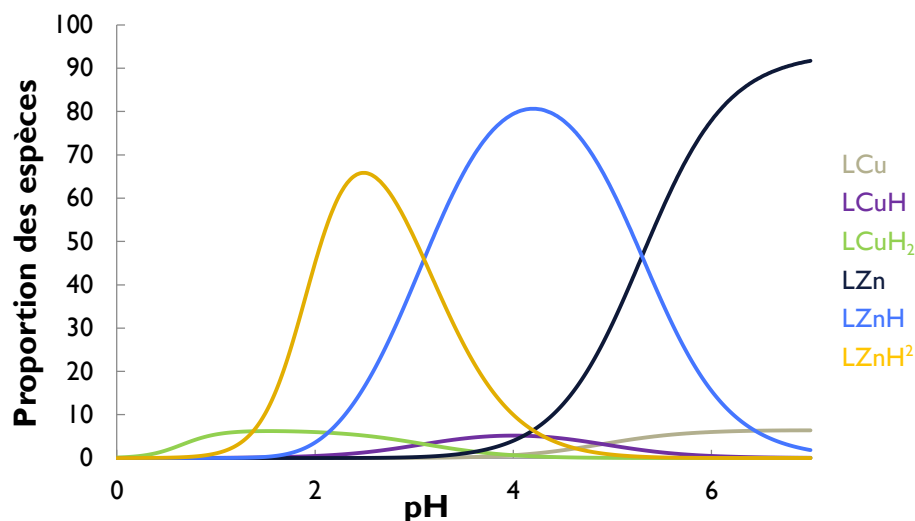


Figure 4.5. Courbe de distribution des espèces $L^3 M$. $M = \text{Cu, Zn}$; $[\text{Zn}] = [\sum \text{Métaux}] - [\text{Cu}] = 2,44 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Cu}] = 4,02 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

D'après ces courbes, on constate la formation du complexe de cuivre à $\text{pH} < 1$. Dans ces conditions, le rendement de complexation du cuivre est quantitatif dès $\text{pH} = 1,47$. De plus, malgré l'excès important de zinc par rapport au cuivre, le complexe de cuivre est quantitativement formé dans toute cette gamme de pH.

De ce fait, le rendement de radiomarquage faible observé dans ces conditions lors des tests en présence de ^{64}Cu est probablement lié à un problème de cinétique. Ce batch provenant d'une source qui contient beaucoup de fer, il est également possible que la quantité de Fe(III) soit non-négligeable et que la sélectivité du ligand par rapport au Fe(III) ne soit pas bonne.

c) Influence du pH

Les résultats de radiomarquage étant satisfaisants dès $n_L/n_M = 1,25$, les tests d'influence du pH ont été effectués pour ce même ratio. Le pH est assuré dans chaque cas par un tampon acétate d'ammonium 0,1 M.

Les tests pour des pH > 4 ont été effectués avec le batch 3 ($[\Sigma\text{Métaux}] = 2,48 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) tandis que les tests pour des pH < 4 ont été effectués avec le batch 4 ($[\Sigma\text{Métaux}] = 8,97 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) ; ces deux batch ayant des compositions métalliques différentes.

Le Tableau 4.11 résume l'ensemble des résultats obtenus par exploitation des radio-CCM. Pour les résultats grisés, il faut noter que la tâche correspond au $^{64}\text{CuCl}_2$ était particulièrement faible, le temps d'exposition était trop court pour pouvoir obtenir une intégration fiable pour ces points.

pH	t (min)					
	5	10	15	30	45	60
2,13	36	39	49	61	70	74
3,30	60	69	-	87	89	90
4,6	100	100	100	-	-	-
5,37	100	100	100	95	96	94
6,6	100	100	100	-	-	-

Tableau 4.11. Rendement de radiomarquage en fonction du pH ; $n_L/n_M = 1,25$
Conditions : batch 3 pour pH > 4 ; batch 4 pour pH < 4, T = 25°C

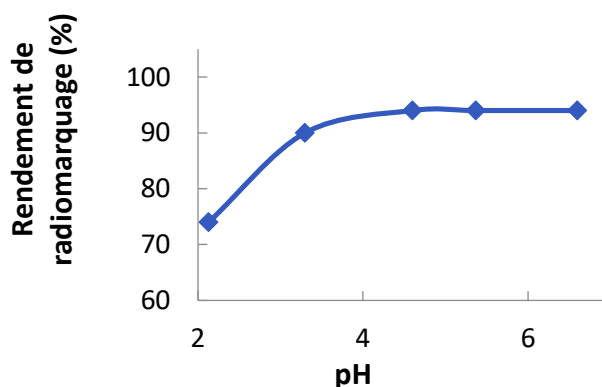


Figure 4.6. Rendement de radiomarquage en fonction du pH, t = 60 min, T = 25°C

On constate Figure 4.6 que la cinétique de complexation est lente à pH acide (pH < 4,6). A pH = 2,13 un rendement de radiomarquage de 74 % est obtenu après 1 h, et de 90 % à pH = 3,30. En revanche, dès lors que pH \geq 4,6 le rendement est de l'ordre de 95-100 % et ce avec une cinétique rapide puisque le rendement est atteint en 5 min. Cette cinétique plus lente pourrait s'expliquer par le fait qu'à ce pH, il est possible que l'acide phosphonique se protone et ralentisse ainsi la complexation du cuivre.

d) Compétition avec les anions acétate et citrate

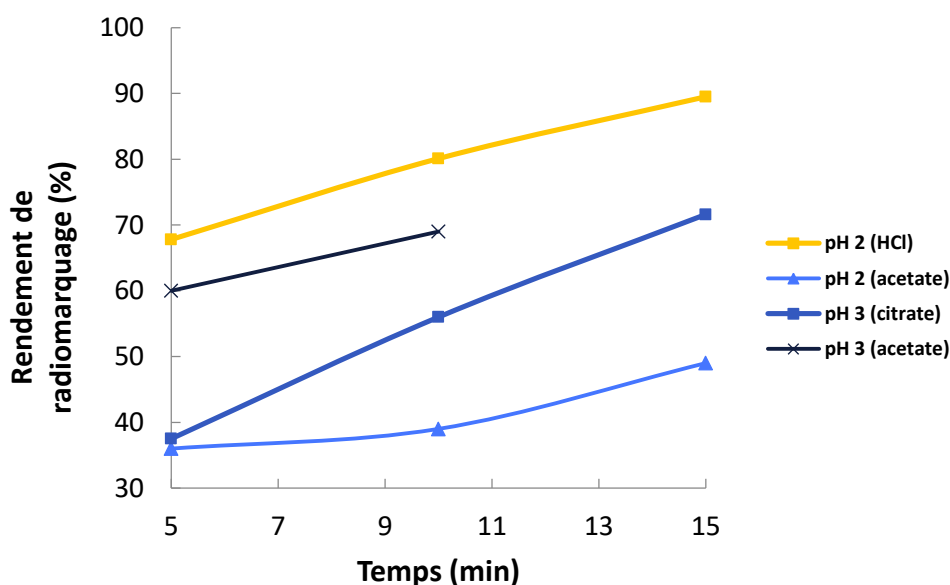


Figure 4.7. Compétition avec d'autres anions en présence

Les premiers tests de radiomarquage à pH acide, effectués dans des solutions autres qu'acétate d'ammonium, nous ont permis de mettre en évidence une influence de la solution tampon sur le déroulement de la réaction de radiomarquage.

En effet, le test à pH = 2 s'est déroulé dans une solution acide chlorhydrique et à pH = 3,06 dans un tampon citrate 0,1 M.

Les résultats de radiomarquage sont alors très différents en termes de cinétique comme le montre la Figure 4.7. Après 15 min de réaction, le rendement en solution acide chlorhydrique à pH 2 est de l'ordre de 90 % contre 49 % seulement dans un tampon acétate d'ammonium. Par ailleurs, après 10 min à pH 3, la formation de $^{64}\text{CuL}^3$ est de l'ordre de 70 % dans un tampon acétate d'ammonium, contre seulement 56 % en présence d'ions citrate.

Cela nous permet de conclure que les anions contenus dans les solutions tampons utilisées sont également des chélatants du cuivre avec l'affinité suivante $\text{Cl}^- \ll \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{citrate}$ (tridentate) et met en évidence la compétition cinétique entre ces anions, présents en très large excès (0,1 M) et le ligand de type bispidine pour la coordination du ^{64}Cu . A priori, les interactions présentes entre les anions acétate et citrate avec le cuivre sont plus rapides que la complexation avec le ligand L^3 étudié. En revanche, la stabilité thermodynamique est à l'inverse en faveur de L^3 .

3.2 Ligand L^1

a) Influence du ratio n_L/n_M

De même que précédemment, l'influence du ratio n_L/n_M est évaluée à pH = 5,37, fixé par une solution tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M.

Pour ces tests, le batch 5 ($[\Sigma\text{Métaux}] = 2,51 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) a été utilisé et les résultats sont présentés dans le Tableau 4.12.

Ratio L:M	t (min)					
	5	10	15	30	45	60
1	75	89	93	93	95	94
2	92	94	100	92	93	94
3	92	92	94	93	95	-
5	92	93	92	94	93	94
10	91	93	90	89	89	91
100	88	91	91	-	-	-

Tableau 4.12. Rendement de radiomarquage de L^{II} en fonction du ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}}$; batch 5, $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Pour ce ligand, le rendement de radiomarquage atteint 90-95 % après 1 h, et cela également dans les proportions stœchiométriques. La cinétique est un peu plus rapide lorsque qu'on travaille avec un ratio supérieur à 1, puisque ce rendement est atteint après quelques minutes seulement. 15 minutes sont en revanche nécessaires pour $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 1$.

Cependant, il est important de noter que, quelles que soient les conditions, la présence de $^{64}\text{CuCl}_2$ est toujours mise en évidence, le rendement de radiomarquage n'atteignant pas 100 % dans ces conditions.

b) Influence du pH

Le batch utilisé pour ces tests est le batch 6 ($[\text{Métaux}] = 2,51 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) sauf pour les tests à pH 5 déjà fait lors des tests d'influence du ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}}$ (batch 5). Les tests sont effectués pour un ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 1$. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 4.13.

pH	t (min)					
	5	10	15	30	45	60
2	82	90	93	93	92	95
3	85	91	94	94	93	94
4	90	92	93	92	91	95
5	75	89	93	93	95	94
6	90	90	92	93	94	93

Tableau 4.13. Rendement de radiomarquage de L^{II} en fonction du pH ; $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 1$
Conditions : batch 5 à pH 5, batch 6 pour autres pH, $T = 25^{\circ}\text{C}$.

On peut remarquer une influence importante entre le pH 5, où le rendement après 5 min est d'environ 75 %, et les pH 4 et 6 où le rendement après 5 min est d'environ 90 %. La cinétique est donc différente pour ces échantillons. Deux éléments peuvent intervenir au niveau de la cinétique : la compétition avec les autres métaux présents et la quantité de matière de cuivre par rapport à la quantité de matière des autres métaux (ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{Cu}}$). Comme précisé plus haut, le batch 5 est utilisé pour le test à pH = 5 et le batch 6 pour les tests aux autres pH. Le batch 6 correspond au batch 5 après 24h de décroissance, il contient donc la même quantité de matière de métaux, mais une proportion de cuivre environ divisée par 4 par rapport au batch 5. Cela signifie que, bien que le ratio $n_{\text{L}}/n_{\text{M}}$ soit identique pour

l'ensemble des tests, le ratio L/Cu est quatre fois plus élevé pour le test à pH = 5. Il semble d'après les résultats que la cinétique plus lente à pH 5 soit liée au rapport n_L/n_{Cu} , tout comme cela est suggéré pour ce qui concerne le ligand L^3 . D'un point de vue de la stabilité thermodynamique, aucune différence n'est remarquée : après 15 min de complexation, les rendements de radiomarquage sont tous identiques quels que soit le pH et sont compris entre 90 et 95 %.

c) Comparaison L^3 - L^{11}

Globalement, on constate que le ligand L^{11} ne permet pas la complexation de la totalité du cuivre 64 , puisque 5 à 10 % de celui-ci sont toujours présents après 60 minutes et il en est ainsi quelles que soient les conditions appliquées. Cela permet de confirmer l'intérêt de la présence de la fonction acide phosphonique en R2 pour la complexation du cuivre, puisqu'un rendement de radiomarquage de 100 % est observé pour L^3 ($n_L/n_M \geq 2,5$). Ces tests confirment également les données de stabilité thermodynamique déterminées au chapitre 3 et rappelées Tableau 4.14 pour ces deux ligands, qui montrent que la constante de stabilité du complexe est supérieure pour le ligand L^3 .

	Cu		Zn	
	L^3	L^{11}	L^3	L^{11}
log β (ML)	22,5	19,2	18,8	14,45
log β (MLH)	27,4		24,1	
log β (MLH ₂)	30,5		27,6	
pM	19,2	17	15,4	12,2

Tableau 4.14. Rappel des constantes de stabilité de L^3 et L^{11} vis-à-vis de Cu(II) et Zn(II)

En effet, si nous considérons comme valeur de comparaison le pCu, celui-ci est de 17,0 pour L^{11} contre 19,2 pour L^3 , ce qui implique une meilleure stabilité thermodynamique du complexe CuL^3 par rapport à CuL^{11} . Cette différence importante peut expliquer les différences de rendement en faveur de L^3 .

D'autre part, à titre de comparaison, la simulation effectuée pour L^3 a également été effectuée, dans les mêmes conditions, avec les constantes du ligand L^{11} . La courbe de distribution obtenue est représentée sur la Figure 4.8. De même que pour L^3 , on constate une bonne sélectivité de L^{11} pour le cuivre par rapport au zinc dans cette gamme de pH. Une différence est néanmoins observée sur la capacité du ligand L^{11} à former un complexe de cuivre à pH < 2. Dans ce cas-ci, le rendement de complexation du cuivre est quantitatif pour pH = 2,2.

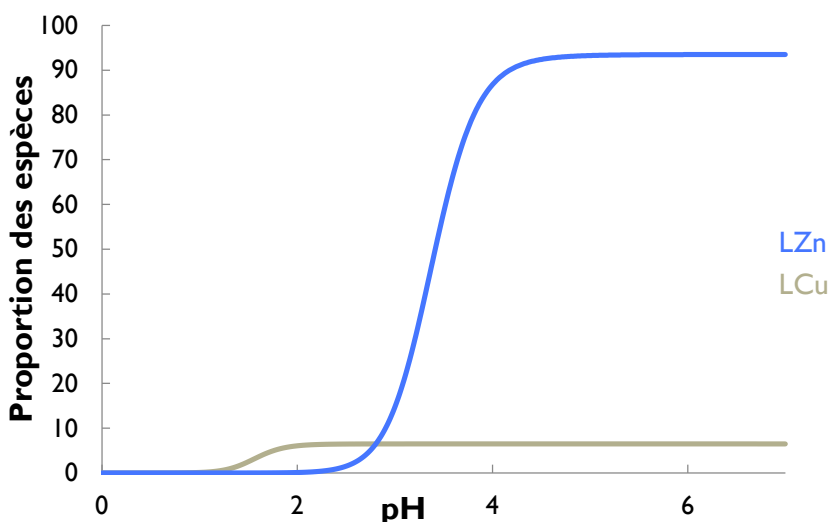


Figure 4.8. Courbe de distribution des espèces ML^{11} . $\text{M} = \text{Cu, Zn}$; $[\text{Zn}] = [\sum \text{Métaux}] - [\text{Cu}] = 2,44 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Cu}] = 4,02 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

3.3 Ligand L^{12}

De même que pour L^3 , l'influence du ratio n_L/n_M est évaluée à $\text{pH} = 5,37$, fixé par une solution tampon d'acétate d'ammonium 0,1 M.

Pour l'intégralité de ces tests, le batch 2 ($[\sum \text{Métaux}] = 2,48 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) a été utilisé.

a) Représentation des plaques CCM pour le ligand L^{12}

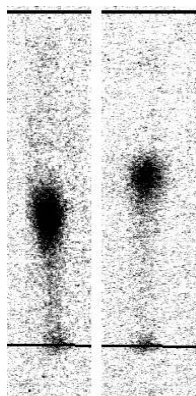


Figure 4.9. Plaque CCM de L^{12} , $n_L/n_M = 10$, SiO_2 , éluant : NH_3 (25 %)/ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; gauche 1/4/1, droite 1/6/1)

Les premiers tests d'éluion de ^{64}Cu L^{12} ont permis de mettre en évidence que pour le complexe $^{64}\text{CuL}^{12}$ il était préférable d'utiliser un éluant 25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1/6/1. En effet sur la Figure 4.9, la plaque représentée à gauche montre l'éluion du complexe avec ce même éluant dans les proportions 1/4/1 et celle de droite dans les proportions 1/6/1. Lorsque la proportion en MeOH est augmentée, on remarque que la tâche révélée est plus éluee, elle permet donc une séparation plus nette du cuivre libre et du complexe.

b) Influence du ratio n_L/n_M

Ces nouvelles conditions nous ont permis d'étudier l'influence du ratio n_L/n_M . Les rendements de radiomarquage déterminés par radio-CCM sur silice (conditions d'éluion) sont résumés dans le Tableau 4.15.

Ratio n_L/n_M	t (min)					
	5	15	20	30	45	60
1	16	17	24	28	34	33
2	67	83	79	-	-	-
3	84	87	87	-	-	-
5	77	80	81	-	-	-
10	87	87	84	90	89	90
50	84	84	83	77	84	83
100	81	81	83	85	85	86

Tableau 4.15. Rendement de radiomarquage de L^{12} en fonction du ratio n_L/n_M ; batch 2, $T = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,4$.

Le rendement de radiomarquage du ligand L^{12} atteint un maximum de 90 % dans ces conditions pour des ratios $n_L/n_M \geq 2$. Pour ces mêmes ratios, la cinétique de complexation est rapide et le complexe est formé en moins de 15 min.

Dans les proportions stœchiométriques, la cinétique de complexation est néanmoins plus longue et seul environ 35 % du complexe est formé après 60 min.

c) Influence du pH

Afin de s'assurer d'un rendement de radiomarquage de 85 % et d'une cinétique rapide, les tests d'influence du pH ont été effectués pour un ratio constant $n_L/n_M = 5$.

Ces tests ont intégralement été effectués avec le batch 4 ($[\Sigma\text{Métaux}] = 8,97 \cdot 10^{-6} \text{ M}$).

pH	t (min)					
	5	10	15	30	45	60
2	16	23	31	55	67	79
3	29	37	44	58	63	72
4	86	87	90	91	91	90
5.4	77	80	81	-	-	-
6	85	88	89	87	88	90

Tableau 4.16. Rendement de radiomarquage de L^{12} en fonction du pH ; $n_L/n_M = 5$; batch 4, $T = 25^\circ\text{C}$.

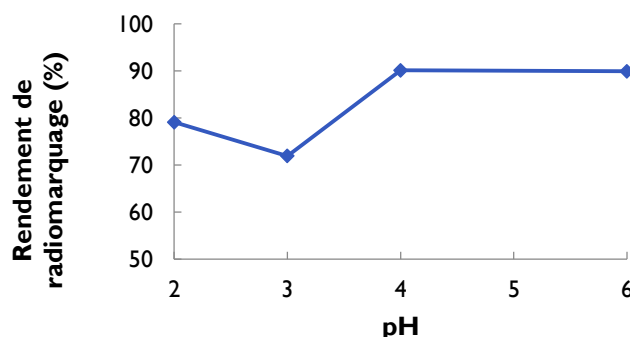


Figure 4.10. Rendement de radiomarquage de L^{12} en fonction pH (60 min), $T = 25^\circ\text{C}$

Sur la Figure 4.10 ci-contre figure l'évolution du rendement de radiomarquage à différents pH après 60 min. On peut constater que la cinétique de complexation est également plus faible à $\text{pH} < 4$; comme observé pour le ligand L^3 .

Concernant L^{12} et L^{11} , une différence moyenne de 5-10 % est observée au niveau du radiomarquage, en faveur de L^{11} . La principale différence entre ces deux ligands est que L^{12} possède une fonctionnalité supplémentaire qui peut influencer la coordination du cuivre. De plus, cette amine primaire est chargée positivement pour des $\text{pH} < 7$ et cette charge peut également jouer un rôle dans le rendement de radiomarquage. En revanche, avec les données que nous avons, il est difficile de conclure sur l'influence de ces deux éléments.

3.4 Ligand L^{13}

Des tests identiques, à $\text{pH} = 5,37$, ont été effectués sur le chélatant bimodal L^{13} . Le batch utilisé dans ce cas est le batch 6 ($[\Sigma\text{Métaux}] = 2,51 \cdot 10^{-5} \text{ M}$).

a) Représentation des plaques CCM pour le ligand L^{13}

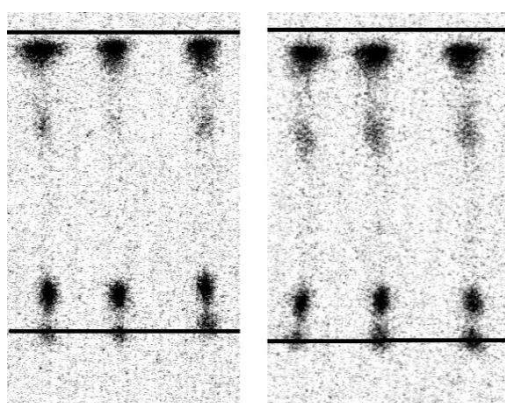


Figure 4.11. Plaque CCM L^{13} , $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 50$ (gauche) & $n_{\text{L}}/n_{\text{M}} = 100$ (droite). Gauche à droite; $t = 10, 30, 60 \text{ min}$. Eluant : 25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} 1/2/1$

Ci-contre Figure 4.11 sont montrées deux plaques CCM pour des ratios de 50 et 100 où trois tâches sont présentes après élution. A priori, le composé présent pour un $R_f = 0,9$ serait $^{64}\text{CuL}^{13}$. Il est possible vu que l'éluant utilisé ici (25 % $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} 1/2/1$) ne permet pas une élution importante du complexe $^{64}\text{CuL}^{13}$ que celui-ci soit présent pour un $R_f = 0,1$. On peut également voir du cuivre libre sur la ligne de dépôt. La troisième tâche présente pour un $R_f = 0,7$ pourrait correspondre au ligand L^{13} après la perte du bore, ce qui correspond à une dégradation courante pour une fonction BODIPY.

La fonction BODIPY est une fonction dont la stabilité dans le temps est limitée, en particulier lorsque le composé est exposé aux rayons lumineux, ce qui peut expliquer la présence de tâches supplémentaires sur les plaques. Malgré les précautions prises pour le stockage du composé, il est très probable que celui-ci ait subi une dégradation menant à la formation du ligand L^{12} et à la perte du bore.

En conséquence, le rendement de radiomarquage est donné pour chacune des tâches présentes indépendamment ainsi que pour la totalité de celles-ci.

b) Influence du ratio n_L/n_M

Pour des questions de temps, seul l'influence du ratio n_L/n_M est étudiée sur ce ligand.

Ratio n_L/n_M	Tâches (haut en bas)	t (min)			
		10	30	60	total
1	1	19	20	26	80
	2	36	51	53	
2	1	22	32	55	89
	2	47		34	
5	1	28	35	36	88
	2	58	53	52	
10	1	37	31	39	89
	2	49	57	50	
50	1	29	37	32	90
	2	9		7	
	3	49	53	51	
100	1	19	21	23	89
	2	15	14	13	
	3	49	51	53	

Tableau 4.17. Rendement de radiomarquage de L^{13} en fonction du ratio n_L/n_M ; batch 6, T = 25°C, pH = 5,4.

Dans le Tableau 4.17, des pourcentages de radiomarquage sont donnés pour diverses tâches présentes sur la CCM ; deux pour les tests avec des ratios jusqu'à 10 puis trois pour les ratios 50 et 100. Ce dernier atteint 80 % pour un ratio 1/1 et 90 % pour des ratios supérieurs ou égaux à 2. Dès lors que le ratio est supérieur ou égal à 5, la cinétique de complexation est également plus rapide : après 10 min, 85 % pour un ratio de 5 contre 68 % pour un ratio 2.

Si on considère l'ensemble des espèces présentes, les rendements pour L^{13} sont très similaires à ceux de L^{12} . Cependant, du fait de l'instabilité du composé, il est difficile de pouvoir utiliser de tels résultats pour comparer L^{12} et L^{13} , puisque l'on ne connaît pas véritablement le comportement du ligand L^{13} .

4. Radiomarquage au ^{68}Ga sur L^{12}

Un intérêt important concerne également l'utilisation de ^{68}Ga pour la TEP, et cet intérêt peut être attribué à sa disponibilité et donc au développement de générateur $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, pour lesquels la désintégration du ^{68}Ge produit le ^{68}Ga .¹⁶ De tels générateurs sont plus accessibles que les cyclotrons nécessaires à la production, par exemple, du ^{64}Cu . Bien que le temps de demi-vie du gallium soit plus court que le cuivre ($t_{1/2} (^{68}\text{Ga}) = 68 \text{ min}$), celui-ci peut être considéré dans le cadre de l'imagerie du fait que l'installation de générateurs $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ est

adaptable au milieu médical.¹⁷ Des exemples d'utilisation du ^{68}Ga pour l'imagerie TEP sont présents dans la littérature.^{18, 19}

Des essais de radiomarquage sur le ligand L^{12} en présence de ^{68}Ga ont donc été effectués pour évaluer le potentiel des bispidines comme chélatant du gallium, d'autant que celui-ci possède un nombre de coordination similaire au cuivre, préférentiellement 6 en formant des complexes octaédriques. Ces tests ont été possibles grâce à la collaboration avec le Dr Graeme Stasiuk de l'université de Hull.

A partir d'une solution de ligand, $[L] = 100 \mu\text{M}$, dans un tampon acétate 0,1 M, les tests de marquage ont été effectués à différent pH. Le suivi cinétique est également effectué par radio-TLC, au bout de 15, 30, 45 et 60 minutes.

Les rendements de radiomarquage obtenus sont résumés dans le Tableau 4.18.

pH	t (min)			
	15	30	45	60
4,03	51	71	73	95
4,44	69	83	86	84
4,96	71	78	84	85
5,66	65	74	76	70
6,14	90	95	95	95

Tableau 4.18. Rendements de radiomarquage avec ^{68}Ga pour L^{12} , $T = 37,5^\circ\text{C}$

Sur la Figure 4. 12, l'évolution du rendement de radiomarquage du ^{68}Ga en fonction du temps est représentée pour des échantillons préparés à 5 pHs différents.

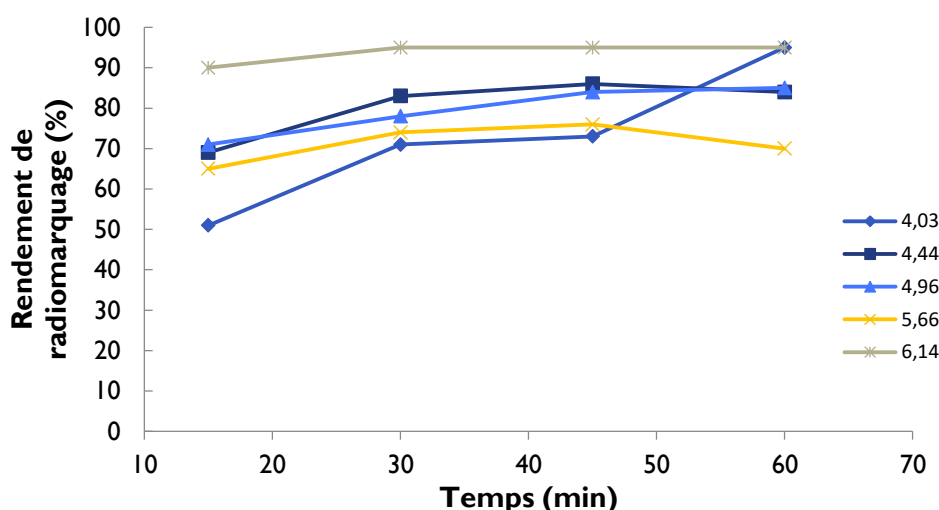


Figure 4. 12. Cinétique de radiomarquage de ^{68}Ga par L^{12} pour différents pHs, $T = 37,5^\circ\text{C}$

On remarque que le rendement n'évolue plus de manière significative après 30 min, à part pour un pH = 4,03 où celui-ci passe de 72 % à 95 %. Néanmoins, le signal sur radio-TLC

semblait étrange lorsque comparé aux autres. Un doute subsiste sur cette valeur et d'autres tests sont nécessaires. Néanmoins, on peut affirmer que pour un $\text{pH} = 6,14$, un rendement très satisfaisant de 95 % est atteint après 30 min et déjà 90 % après 15 min.

Si on compare ce rendement avec celui du complexe $^{64}\text{CuL}^{12}$, on remarque une différence de l'ordre de 5 % en faveur du complexe de ^{68}Ga (pour un pH proche de 6). Sa formation est néanmoins cinétiquement plus rapide puisqu'il est formé après 10 min.

D'autre part, à partir de la Figure 4.13 qui représente le radiomarquage à des temps donnés en fonction du pH , on note une diminution importante du rendement à $\text{pH} = 4$, en excluant la valeur pour $t = 60$ min.

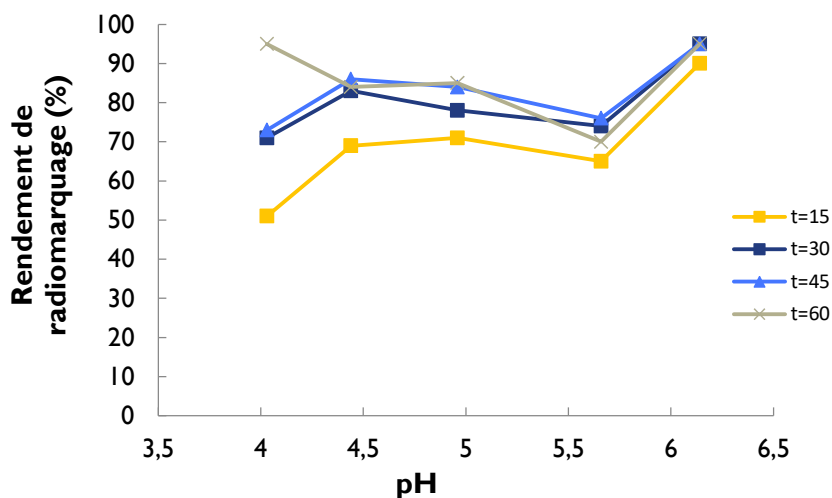


Figure 4.13. Evolution du rendement de radiomarquage en fonction du pH , $T = 37,5^\circ\text{C}$

Ces premiers tests sont satisfaisants et encourageants. De nouveaux essais sont prévus afin de confirmer ces premiers résultats et de s'assurer du résultat à $\text{pH} 4$ après 60 minutes. D'autre part, des essais sont envisagés avec le ligand L^3 .

5. Conclusion

Dans ce chapitre, plusieurs chélatants du ^{64}Cu et une sonde pour l'imagerie bimodale TEP/optique ont été testés en termes de rendement de radiomarquage avec le cuivre 64, dans l'eau et à température ambiante à partir de plaques radiochromatographiques. Après des tests de complexation avec du Cu(II) et d'éluion afin d'assurer une bonne séparation entre le complexe et le cuivre libre, les chélatants ont été placés en solution, dans des conditions variables, et leur complexation avec le cuivre 64 a été évaluée. Pour chacun d'entre eux, l'influence de la cinétique et de la quantité de matière de ligand par rapport à la quantité de métaux présents (ratio n_L/n_M) ont pu être déterminées, tout comme l'influence du pH à un ratio n_L/n_M donné.

Le chélatant L^3 est le plus performant et démontre un rendement de radiomarquage supérieur aux autres dans des conditions similaires. Celui-ci possède un groupement acide

phosphonique en R2, contrairement aux autres ligands qui possèdent un acide carboxylique en R2, substitué ou non. En effet, seul L^3 atteint un rendement de radiomarquage de 100 % après 1h pour $n_L/n_M = 2,5$. Dans ces mêmes conditions, L^{12} atteint un rendement de l'ordre de 90 % contre 95 % pour L^{11} . Pour ce qui concerne L^{13} , il est difficile de conclure sur son rendement de radiomarquage.

Les tests effectués à des ratios $n_L/n_M < 1$ montrent que bien que les constantes thermodynamiques montrent une bonne sélectivité pour le cuivre vis-à-vis du Zn, la compétition entre les différents métaux implique des formations de complexe avec des cinétiques particulièrement lente.

De plus, ces tests permettent de mettre en évidence les performances très compétitives du ligand L^3 , marqué à température ambiante et à une concentration particulièrement faible, en comparaison avec les chélatants testés par d'autres groupes dans le cadre du développement de CBF pour la TEP.

Désormais, ces résultats étant particulièrement prometteurs pour ce qui concerne L^3 et pour finaliser son étude, il serait intéressant d'effectuer un suivi cinétique dans du sérum biologique afin de confirmer sa stabilité *in vitro*.

Ceci nous a encouragé à développer un analogue de ce ligand possédant une fonction de greffage pour une molécule biologique de type peptide ou anticorps afin d'obtenir un radiotraceur utilisable en TEP.

Références

1. Roux, A. *Synthèse et fonctionnalisation de bispidines pour la complexation du ^{64}Cu en vue d'applications en imagerie médicale par tomographie à émission de positrons et en radiothérapie*; Thèse de l'université de Strasbourg, **2014**.
2. Alliot, C.; Michel, N.; Bonraisin, A.-C.; Bossé, V.; Laizé, J.; Bourdeau, C.; Mokili, B. M.; Haddad, F. *Radiochim. Acta* **2011**, *99* (10), 627–630.
3. Comba, P.; Hunoldt, S.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (14), 8131–8143.
4. Sun, X.; Wuest, M.; Kovacs, Z.; Sherry, D. A.; Motekaitis, R.; Wang, Z.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8* (1-2), 217–225.
5. Huclier-Markai, S.; Kerdjoudj, R.; Alliot, C.; Bonraisin, A. C.; Michel, N.; Haddad, F.; Barbet, J. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* Suppl, e36–e43.
6. Sun, X.; Wuest, M.; Kovacs, Z.; Sherry, D. A.; Motekaitis, R.; Wang, Z.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8* (1-2), 217–225.
7. Roger, M.; Lima, L. M. P.; Frindel, M.; Platas-Iglesias, C.; Gestin, J.-F.; Delgado, R.; Patinec, V.; Tripier, R. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (9), 5246–5259.
8. Dale, A. V.; An, G. I.; Pandya, D. N.; Ha, Y. S.; Bhatt, N.; Soni, N.; Lee, H.; Ahn, H.; Sarkar, S.; Lee, W.; Huynh, P. T.; Kim, J. Y.; Gwon, M.-R.; Kim, S. H.; Park, J. G.; Yoon, Y.-R.; Yoo, J. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (17), 8177–8186.
9. Ferdani, R.; Stigers, D. J.; Fiamengo, A. L.; Wei, L.; Li, B. T. Y.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (7), 1938–1950.
10. Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. *Bioconj. Chem.* **2009**, *20* (2), 347–359.
11. Comba, P.; Hunoldt, S.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (14), 8131–8143.
12. Comba, P.; Kubeil, M.; Pietzsch, J.; Rudolf, H.; Stephan, H.; Zarschler, K. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (13), 6698–6707.
13. Alderighi, L.; Gans, P.; Lenco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184* (1), 311–318.
14. Irving, H.; Williams, R. J. P. *J. Chem. Soc.* **1953**, 3192–3210.
15. Born, K.; Comba, P.; Ferrari, R.; Lawrance, G. A.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (2), 458–464.
16. Fani, M.; André, J. P.; Maecke, H. R. *Cont. Media Mol. Imag.* **2008**, *3* (2), 53–63.

17. Vis, R.; Lavalaye, J.; van de Garde, E. M. *EJNMMI Res.* **2015**, *5*, 27.
18. Mirzaei, A.; Jalilian, A. R.; Shabani, G.; Fakhari, A.; Akhlaghi, M.; Beiki, D. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2016**, *307* (1), 725–732.
19. Sahlmann, C.-O.; Meller, B.; Bouter, C.; Ritter, C. O.; Ströbel, P.; Lotz, J.; Trojan, L.; Meller, J.; Hijazi, S. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **2016**, *43* (5), 898–90

Chapitre V

Stratégies de fonctionnalisation

1. Stratégies de synthèse envisagées

Les chapitres 3 et 4 développés ci-avant nous permettent d'affirmer que les bispidines sont de bons chélatants pour le cuivre, en particulier en ce qui concerne L³. De tels résultats nous ont encouragés à poursuivre le travail sur L³ de manière à obtenir un chélatant bifonctionnel, capable de former une liaison covalente avec une biomolécule vectrice (peptide, anticorps).

1.1 Ligands cibles

Pour fonctionnaliser les bispidines, quatre stratégies ont été suivies au cours de cette thèse afin d'incorporer un espaceur possédant une fonction amine terminale sur le squelette bispidine. Cette fonction amine pourra ensuite être activée par les méthodes de synthèse usuelles et être couplée à la biomolécule d'intérêt.¹ Les deux premières stratégies consistent à fonctionnaliser le ligand L³ directement soit sur les acides carboxyliques via couplage peptidique (stratégie 1) soit sur l'alcool par alkylation de type Williamson (stratégie 2) (la représentation des chélatants cibles est donnée au Schéma 5.1). L'intérêt d'une fonctionnalisation sur l'alcool est qu'elle ne vient pas modifier les pKas du ligand L³ et aura donc moins d'influence sur la coordination qu'une fonctionnalisation sur l'acide carboxylique.

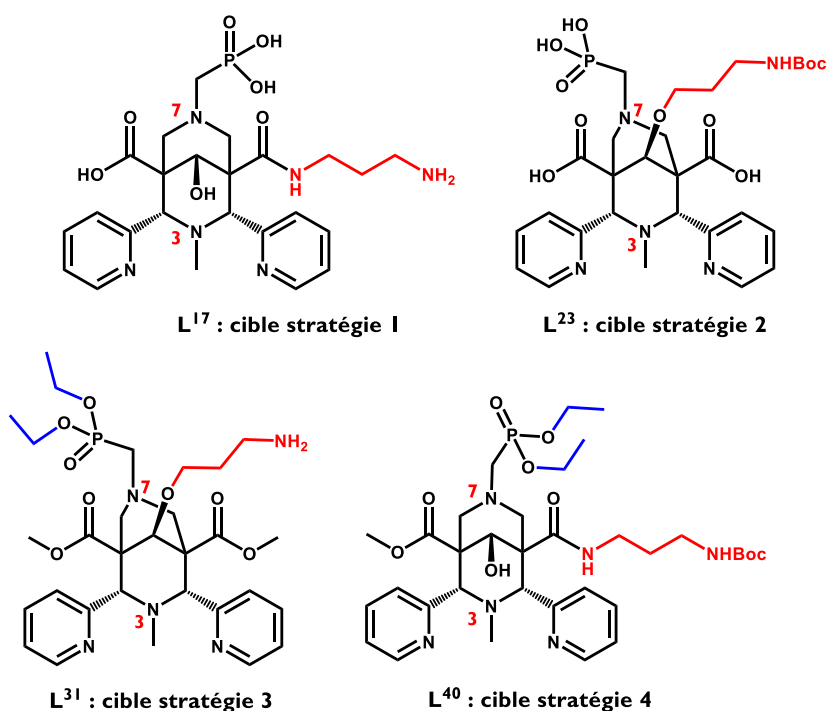


Schéma 5.1. Ligands cibles ; en noir : chélatant du cuivre ; en bleu : groupements protecteurs ; en rouge : espaceur et fonction de couplage.

Les deux stratégies suivantes consistent à insérer cette fonction supplémentaire au cours de la synthèse du ligand, non nécessairement comme dernière étape. Cela permet d'une part de créer des squelettes bispidines bifonctionnels dont la fonction en N7 peut être variable et ainsi de générer de nouvelles familles de ligands et d'autre part de travailler en milieu organique. En effet, après la déprotection des fonctions d'intérêt et la saponification des

esters, la solubilisation des bispidines en milieu organique est impossible. Ainsi, la troisième stratégie impliquait également une fonctionnalisation par alkylation de type Williamson pour cibler le ligand L³¹ et la quatrième et dernière stratégie consistait à obtenir le ligand L³⁵ par couplage peptidique.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'obtention d'une bispidine avec un groupement phosphonate en position R2.

1.2 Rétro-synthèse

Pour ce qui concerne les stratégies 1 et 2, le ligand L³ étant déjà synthétisé, il ne manque qu'une étape avant l'obtention des molécules cibles indiquées au Schéma 5.1.

Pour chacune des deux autres stratégies, deux voies de synthèse ont été imaginées, de manière à maximiser les possibilités pour obtenir les composés cibles mais aussi de manière à obtenir les conditions optimales pour ces synthèses. Pour chacune des deux voies, la bispidone de départ est la même, il s'agit de la bispidone L²⁵ pour la stratégie 3 et de la bispidone L³² pour la stratégie 4.

Dans le cas de la stratégie 3, la première voie (voie A, en bleu sur le Schéma 5.2) implique la phosphorylation de la bispidone L²⁶ suivie de la fonctionnalisation par une synthèse de type Williamson pour conduire à L³¹. L'inverse est appliqué pour la deuxième voie (voie B, en orange sur le Schéma 5.2) où la O-alkylation est effectuée avant la phosphorylation.

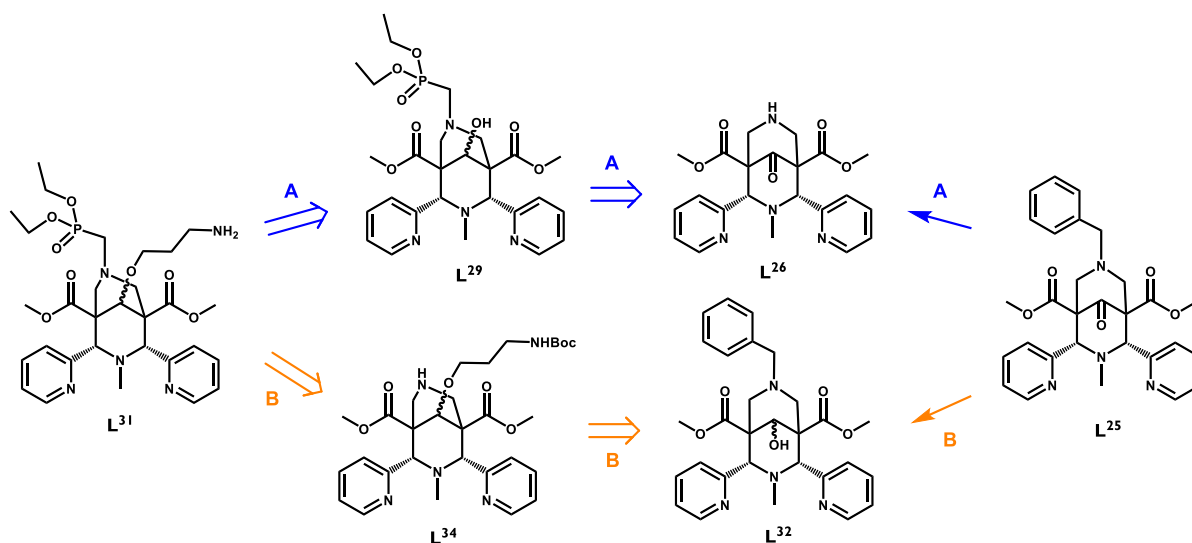


Schéma 5.2. Schéma (rétro)-synthétique de la stratégie 3

La stratégie 4 est basée sur l'utilisation d'une bispidone dissymétrique monoacide monoester L³⁵, obtenue par saponification sélective de L³². Cette stratégie permet ainsi d'éviter les risques de double-couplage lors de l'introduction de l'espaceur. La première voie (voie C, en bleu sur le Schéma 5.3) implique la phosphorylation d'abord, suivie de la fonctionnalisation par couplage peptidique sur l'acide carboxylique de L⁴¹. L'inverse est appliqué pour la deuxième voie (voie D, en orange sur le Schéma 5.3) où le couplage sur l'acide est effectué à partir de L³⁵ avant la phosphorylation sur L³⁸.

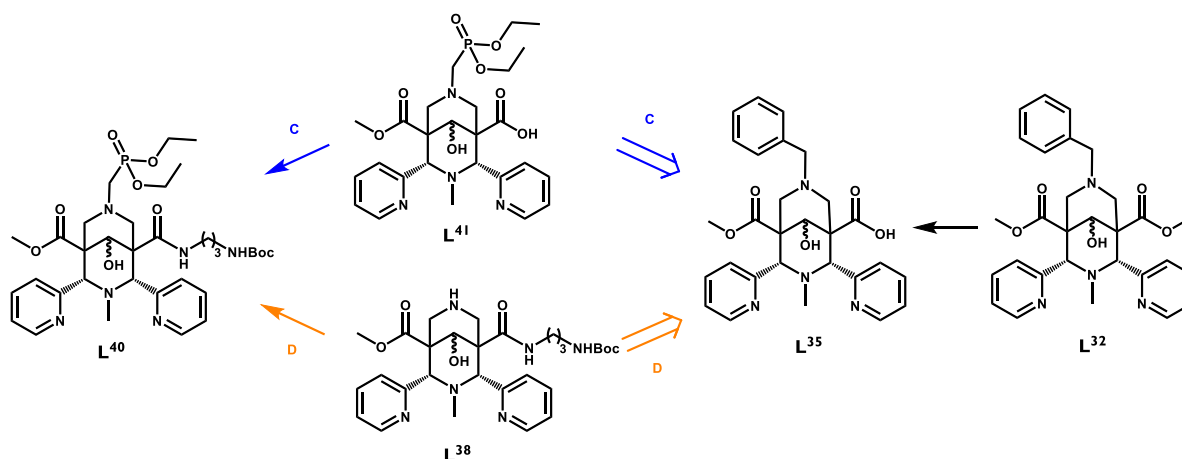


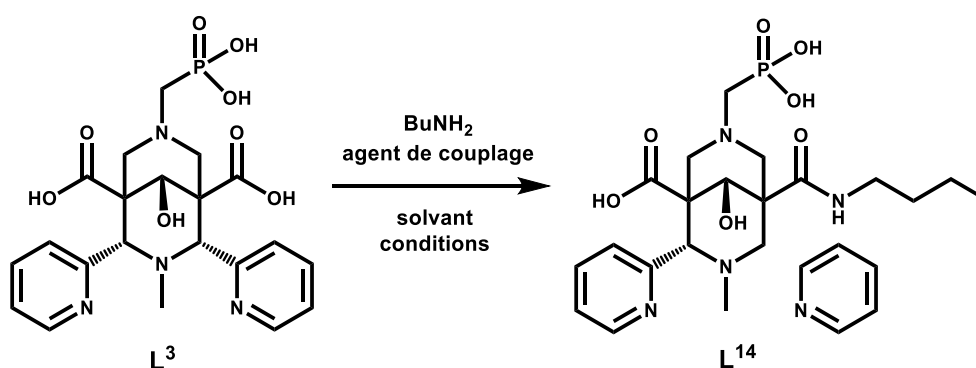
Schéma 5.3. Schéma (rétro)-synthétique de la stratégie 4

2. Stratégie 1

2.1 Synthèses préliminaires

A partir du ligand L^3 possédant deux acides carboxyliques aux positions 1 et 5, il semble possible de les activer à partir d'agents de couplage pour former un dérivé mono ou di-amide.

Plusieurs conditions ont été testées avec la butylamine comme amine (Schéma 5.4).

Schéma 5.4. Synthèse générale du ligand L^{14}

A) EDCI/NHS dans le DMSO

Comme premier agent de couplage, un composé de type carbodiimide a été employé, il s'agit de la 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDCI). Le ligand (1 éq), l'agent de couplage (1 éq) ainsi que la butylamine (1 éq) ont été placés dans du DMSO à température ambiante pendant plusieurs heures. La solubilité du ligand dans le DMSO n'était alors pas totale. Ne voyant pas d'évolution sur CCM après plusieurs heures, une addition de triéthylamine (1 éq) a été effectuée, sans évolution supplémentaire néanmoins. Afin de favoriser l'activation des acides carboxyliques, un second agent de couplage, le N-hydroxysuccinimide (NHS, 1 éq) a été ajouté et le milieu agité pendant une nuit. Après

purification par chromatographie sur colonne en phase inverse C18, le ligand L³ a été isolé, sans trace du composé activé.

B) EDCl/NHS dans l'eau

Ce premier essai n'étant pas un succès, nous avons modifié quelques éléments, en particulier en termes de solubilité. Un nouvel essai similaire a donc été testé, mais cette fois dans l'eau, solvant dans lequel la solubilité de L³ ne pose pas de difficulté. Par ailleurs, la réaction est effectuée à partir de 2 équivalents d'EDCl et chauffée à 45°C. Le suivi sur plaque CCM n'indiquait alors pas d'évolution après 5h. Du NHS (1 éq) est alors ajouté avant de chauffer à nouveau pendant 1 nuit. Ne voyant toujours pas d'évolution nette, un second équivalent de butylamine est alors ajouté et le tout est agité pendant 2 jours. Une FPLC du mélange est effectuée sur phase inverse. Cette purification n'a conduit à nouveau qu'à l'isolation du ligand L³.

Le suivi sur plaque CCM pose beaucoup de difficultés, malgré que l'éluant soit composé de 1 % de TFA, de nombreuses formes protonées de L³ co-existent. C'est d'autant plus le cas que le milieu réactionnel est basique. En présence d'EDCl, de NHS et de Et₃N, plusieurs tâches sont présentes, même s'il ne s'agit pas de l'apparition d'un produit de réaction.

C) HBTU, H₂O/DMSO

Cet essai est basé sur un couplage effectué par le groupe de P. Comba.² Il s'agit donc d'utiliser un agent de couplage différent des précédents, l'hexafluorophosphate de O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium (HBTU). Placé en excès (3 éq) dans un mélange 50/50 H₂O/DMSO contenant L³, la butylamine (1 éq) et la DIPEA (1 éq), la réaction est effectuée à température ambiante pendant une nuit.

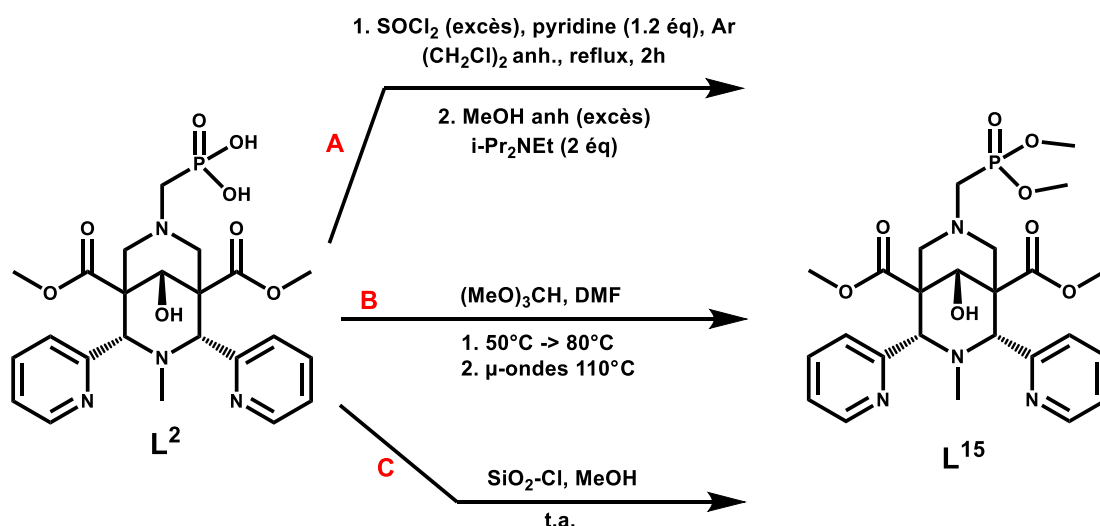
Le rendement mentionné dans la littérature est de 17% après 3 h de réaction en considérant un couplage sur chacun des acides carboxyliques, ce qui est un rendement faible.

Après un traitement par précipitation à l'éther afin de séparer les composés du DMSO, les signaux obtenus en RMN correspondent à ceux de L³ et aucune trace de butylamine n'est mise en évidence. Dans notre cas, ce couplage conduit à un résultat négatif

Les premières tentatives pour cette synthèse ont ainsi été infructueuses.

2.2 Protection de l'acide phosphonique

Au vu de la difficulté d'effectuer un couplage peptidique direct sur L³ il a été envisagé de protéger l'acide phosphonique en formant un diester méthylique afin de favoriser la solubilité du composé en milieu organique et d'éviter l'implication de l'acide phosphonique dans les réactions de couplage peptidique. Les diverses conditions testées sont résumées au Schéma 5.5.

Schéma 5.5. Essais d'estérification de l'acide phosphonique sur L²

Le premier essai, noté **A** sur le Schéma 5.5, consiste à activer l'acide phosphonique avec le chlorure de thionyle, présent en excès, et ainsi à former un intermédiaire phosphonate dichloré.^{3,4} Cette réaction est effectuée en présence de pyridine (dont le rôle est la déprotonation de l'acide phosphonique suite à l'attaque nucléophile de celui-ci sur le chlorure de thionyle) dans le dichloroéthane à reflux pendant 2h, sous atmosphère inerte. L'ajout *in situ* de méthanol et de DIPEA permet en principe d'obtenir l'ester diméthyl phosphonate. Néanmoins, le traitement de cette réaction n'a pas révélé la formation du diester. Seul le composé de départ a pu être isolé à nouveau.

Le deuxième essai, noté **B** sur le Schéma 5.5, est basé sur la réactivité de l'orthoformate de triméthyle avec les acides carboxylique, phosphonique ou phosphinique.⁵ Selon cette publication, la réaction consiste à chauffer l'acide en question pendant 1 à 3h selon les cas en présence d'orthoformate de triméthyle, la réaction ayant lieu dans un liquide ionique. Cependant, selon le solvant, les rendements peuvent varier de 30 à 98 %, entre autres 80 % dans la DMF. C'est donc un essai en présence de DMF qui a été effectué, d'abord en chauffant à l'aide d'un bain d'huile, puis au four à micro-ondes dans des conditions plus fortes. Malgré cela, après traitement par chromatographie, la seule fraction propre obtenue contenait le produit de départ ; aucune trace de la présence d'ester phosphonique.

Le troisième essai, noté **C** sur le Schéma 5.5, concernait l'utilisation d'un catalyseur hétérogène, le chlorure de silice, pour favoriser l'estérification d'acide phosphonique ou phosphorique dans des conditions douces (température ambiante, 20-40 min).⁶ La transformation d'un certain nombre d'acide phosphonique est mentionnée avec un rendement moyen d'environ 90 %.

Tout d'abord, le catalyseur a été préparé en agitant vigoureusement du gel de silice (20 g) dans du dichlorométhane (50 mL), suspension à laquelle est ajouté au goutte à goutte du chlorure de thionyle (20 g). Après 1 h d'agitation, le solvant est évaporé et le chlorure de

silice ainsi formé est séché. Puis le ligand L^2 a été placé dans du MeOH avec une suspension de ce catalyseur ; les ratios molaires mentionnés dans la littérature ne permettant pas d'effectuer la réaction, un excès de méthanol a été utilisé.

Cependant seul le ligand L^2 a été récupéré en fin de réaction, il n'y avait aucune trace du diester ou du mono-ester de l'acide phosphonique.

2.3 Synthèse de L^{17}

De nouvelles conditions de couplage ont donc été testées.

Tout d'abord, en préalable à la synthèse du couplage, le ligand L^3 est solubilisé dans de l'eau et le pH est neutralisé par ajout de triéthylamine. Du fait de la méthode de purification de L^3 , celui-ci est obtenu sous forme acide et le pH lors de sa solubilisation dans l'eau est acide ($\text{pH} \approx 4$). Cette neutralisation permet d'assurer ensuite l'activation de l'acide carboxylique.

Ensuite, les conditions suivantes de couplage sont appliquées : EDCI en présence d'hydroxy benzotriazole (HOBt) comme second agent de couplage dans le DMSO à température ambiante, avec 1 équivalent de triéthylamine (Schéma 5.6). Dans ces conditions, le ligand L^3 est bien soluble.

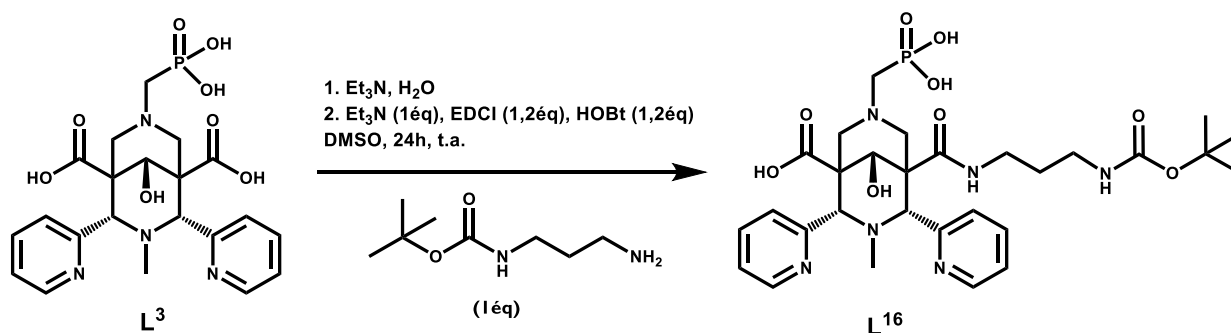
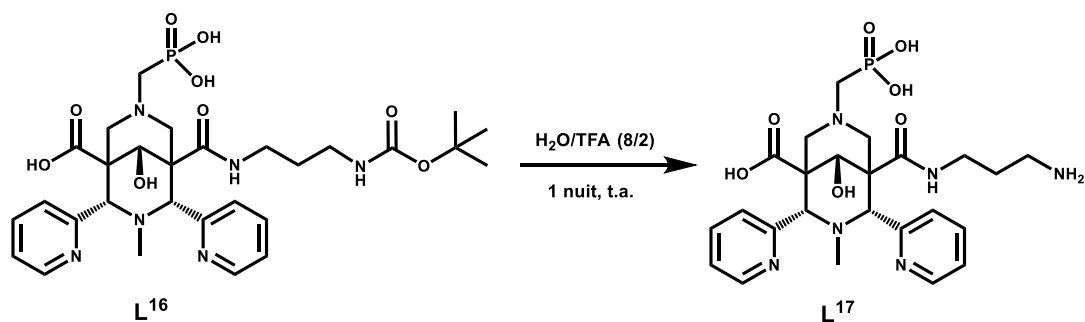


Schéma 5.6 Synthèse du ligand L^{16}

Le suivi sur CCM (phase inverse, $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) n'est pas fiable. La présence sur le dépôt de triéthylamine et d'EDCI ne permet pas d'obtenir clairement l'apparition d'une tâche supplémentaire, signe de l'avancement de la réaction.

De manière à pouvoir poursuivre avec une purification similaire à celle de L^3 , la présence du *tert*-butoxy carbonyl pose des difficultés. Nous n'avons donc pas cherché à isoler le ligand L^{16} et le milieu réactionnel, après évaporation à sec est solubilisé dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 8/2 de manière à déprotéger l'amine primaire (Schéma 5.7).

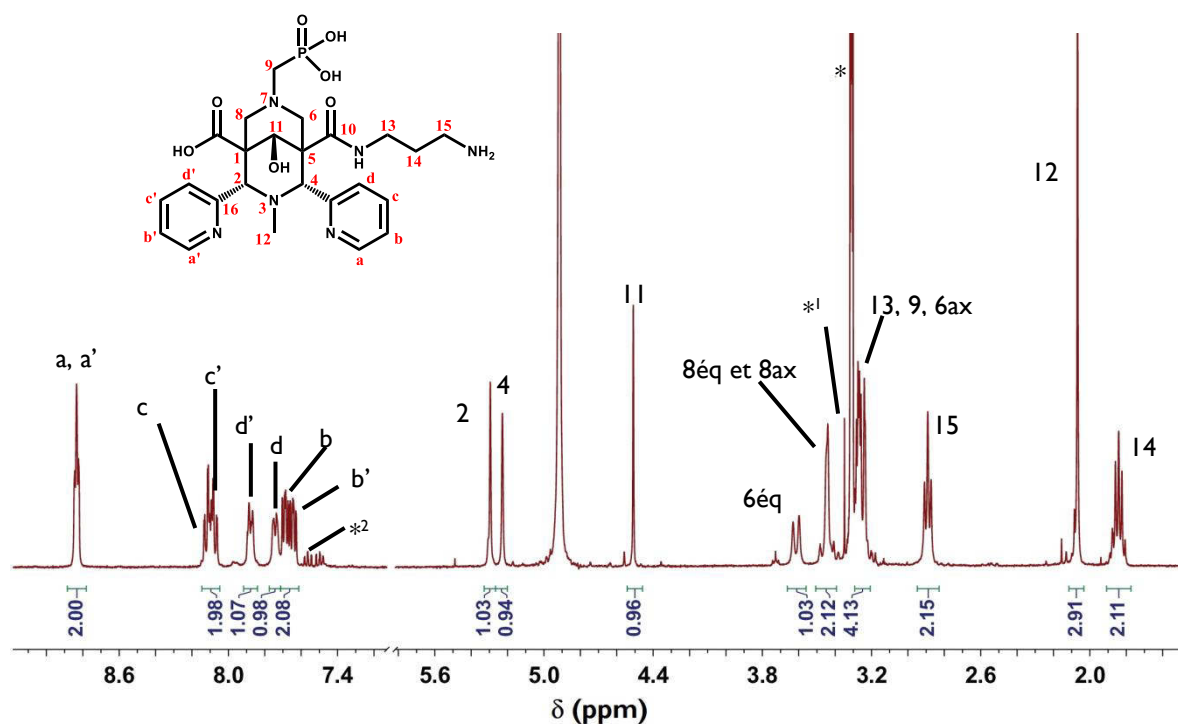
Schéma 5.7. Synthèse du ligand L¹⁷

Après agitation pendant 1 nuit, le mélange réactionnel est évaporé à sec et celui-ci est purifié par FPLC sur une colonne C18 à l'aide d'un éluant H₂O/ACN 100/0 à 70/30 (0,1 % TFA). En milieu acide, les chaînes aminées présentes sont protonées et éliminées dans les premières fractions éluées, tandis que le composé désiré et L³ sont plus longuement retenus.

Cette première étape de purification a permis de mettre clairement en évidence la présence de L¹⁷. Le spectre RMN ¹H obtenu est représenté à la Figure 5.1.

Tout d'abord, on constate sur cette RMN la présence de ce qui semble être un reste d'agent de couplage (HOBt). Néanmoins, on constate bien la présence des protons aromatiques, de la chaîne propyle, des protons 6, 8 et 9 avec visiblement des systèmes impliquant des signaux de second ordre. Tout cela est confirmé par le spectre RMN ¹H-¹H COSY (Figure 5.2 et Figure 5.5)

Pour l'exploitation, du fait de la proximité du proton 2 avec l'acide carboxylique en position 1, celui-ci est considéré plus déblindé que le proton 4. Cela permet de déterminer la position des protons 6 et 8 axiaux et équatoriaux.

Figure 5.1. Spectre RMN ¹H de L¹⁷ (400 MHz, *CD₃OD, *¹MeOH, *²HOBt)

Le spectre RMN ^1H - ^1H COSY représenté à la Figure 5.2 nous informe sur les couplages scalaires présents. Deux systèmes AB sont mis en évidence, pour les protons 6 et pour les protons 8. Il est intéressant de noter la différence entre ces deux systèmes. Les calculs ci-après sont effectués à partir des signaux observés en RMN ^1H - ^1H COSY.

Les paramètres du système pour les protons 6 sont calculés ci-après :

$\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4) \times (\nu_2 - \nu_3))}$. Or on a ici $\nu_1 = 1458,3$; $\nu_2 = 1444,8$; $\nu_3 = 1310,2$; $\nu_4 = 1297,6$ et donc on obtient $\Delta\nu = 147,6$ Hz.

$J_{AB} = 13,0$ Hz soit $\Delta\nu/J_{AB} = 10,5$. Une structure en toit commence à apparaître pour ce système AB. De plus : $\nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = 1371,2$ et donc $\nu_A = \nu_{\text{centre}} + \frac{1}{2}\Delta\nu = 1445,0$ Hz et $\nu_B = \nu_{\text{centre}} - \frac{1}{2}\Delta\nu = 1297,4$ Hz.

Les paramètres du système pour les protons 8 ne peuvent être calculés. En effet, 4 pics distincts doivent être définis de manière à pouvoir déterminer la constante de couplage ainsi que le $\Delta\nu$ ou ν_{centre} . Sur le spectre RMN, les pics 2 et 3 sont trop proches pour être correctement définis, il en est de même sur le spectre COSY. En revanche, on peut noter que la constante de couplage a l'air assez proche du système pour les protons 6 avec par contre un $\Delta\nu$ très faible.

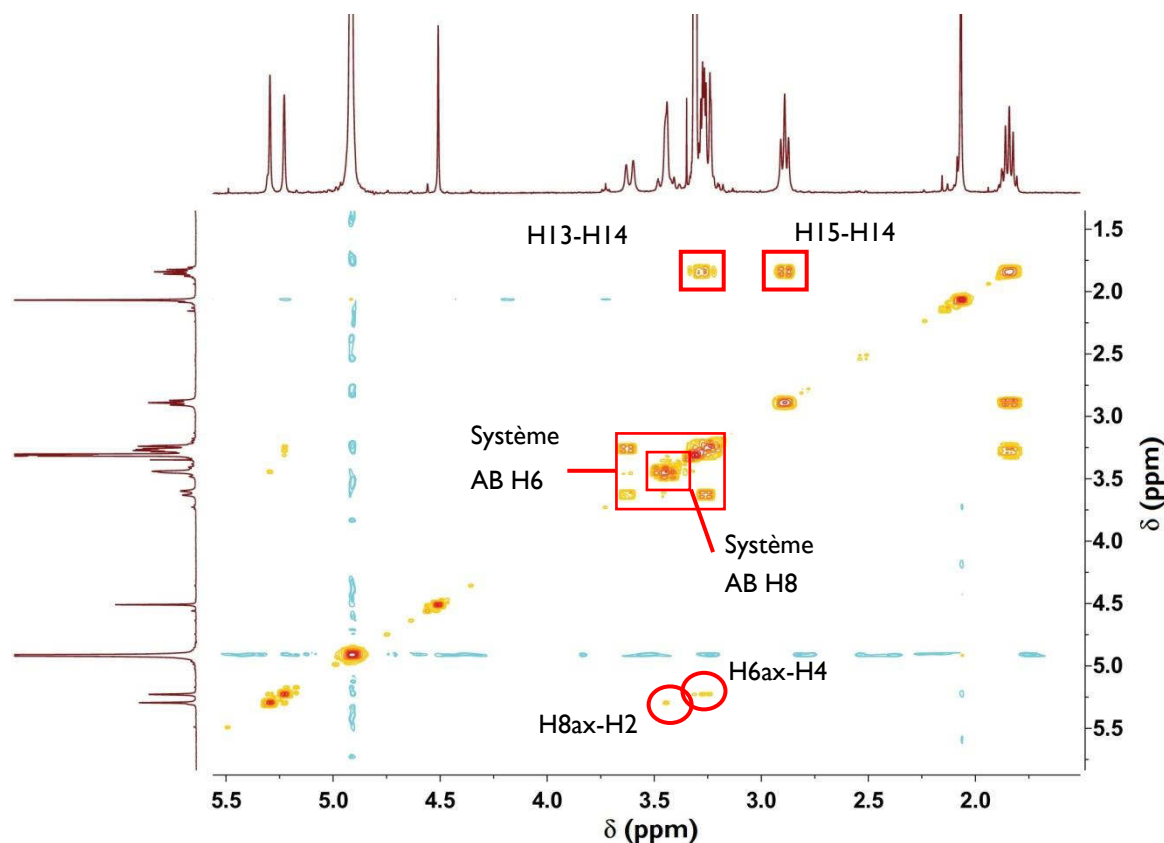


Figure 5.2. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{17} (400 MHz, CD_3OD)

Sur la Figure 5.2, des couplages en W sont également annotées entre les protons 2 et 8ax ainsi qu'entre les protons 4 et 6ax. Enfin, des couplages sont observés au niveau des protons de la chaîne propyle, entre les protons 13 et 14 ainsi qu'entre les protons 14 et 15. Le signal

correspondant aux protons 14 n'est cependant pas un quintuplet, ce qui implique que les constantes de couplage avec les protons 13 et les protons 15 sont différentes, bien que le signal moyen soit visiblement proche d'un quintuplet.

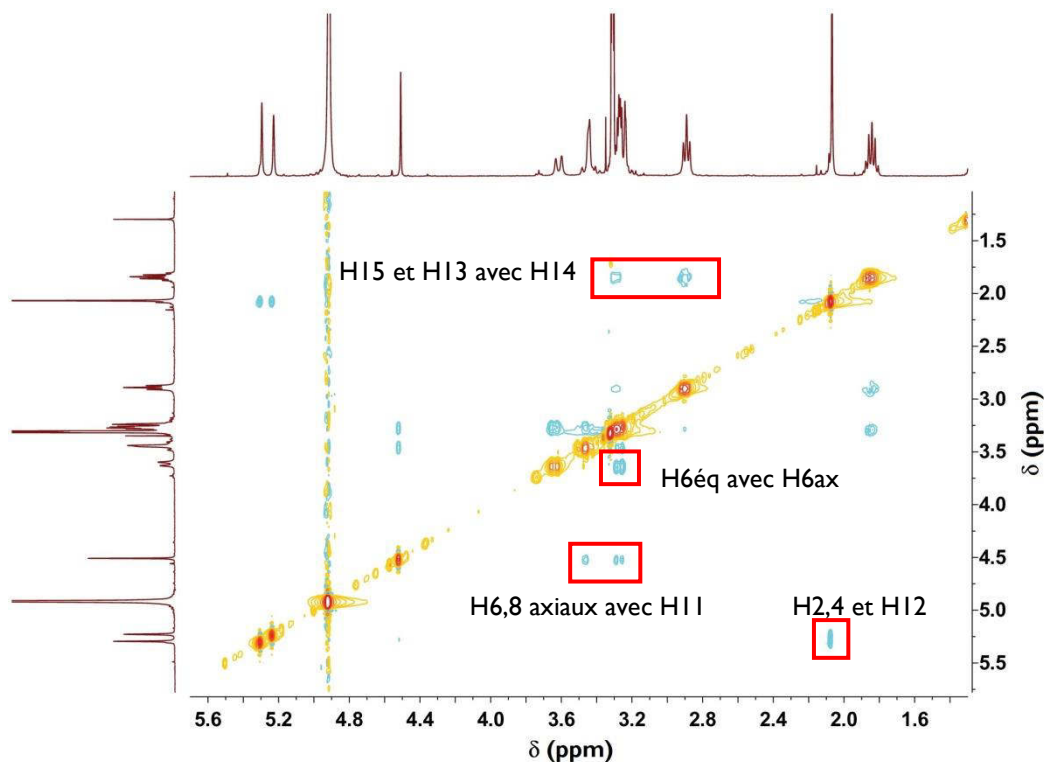


Figure 5.3. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de L^{17} (400 MHz, CD_3OD)

Le spectre RMN ^1H - ^1H NOESY dans cette même zone de déplacement chimique permet de confirmer par les interactions spatiales l'attribution que nous avons déduite de l'observation des couplages scalaires. On note en effet l'interaction entre les protons 6,8 axiaux et le proton 11 ainsi qu'entre le méthyle en R1 et les protons 2 et 4. La proximité des protons de la chaîne est également remarquée.

L'analyse RMN ^1H - ^1H NOESY permet d'obtenir une information supplémentaire par rapport à la position des protons Hd et Hd'. En effet les protons 2 et 4 interagissent respectivement avec Hd' et Hd.

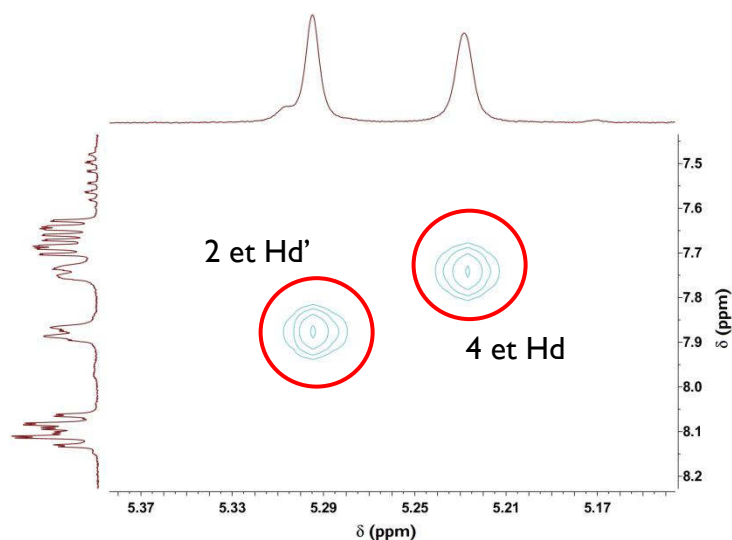


Figure 5.4. Agrandissement du spectre NOESY de L^{17} (400 MHz, CD_3OD)

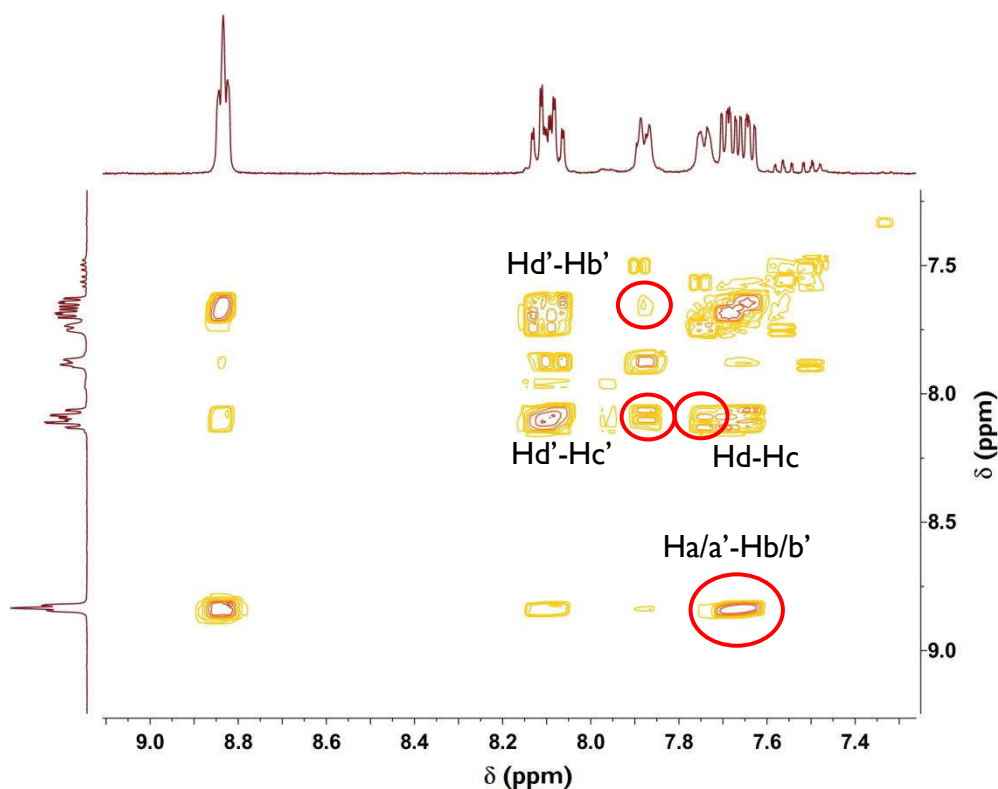


Figure 5.5. Agrandissement du spectre RMN 1H - 1H COSY de L^{17} (400 MHz, CD_3OD)

Ensuite, à partir du spectre de corrélation 1H - 1H COSY (Figure 5.5) dans la zone des protons aromatiques, il est possible de différencier les protons d'un cycle pyridine à l'autre.

Par ailleurs, de manière à confirmer la formation de L^{17} , un spectre de masse haute résolution (ESI-HRMS) a été effectué. Le zoom dans la zone du composé confirme sa formation (Figure 5.6).

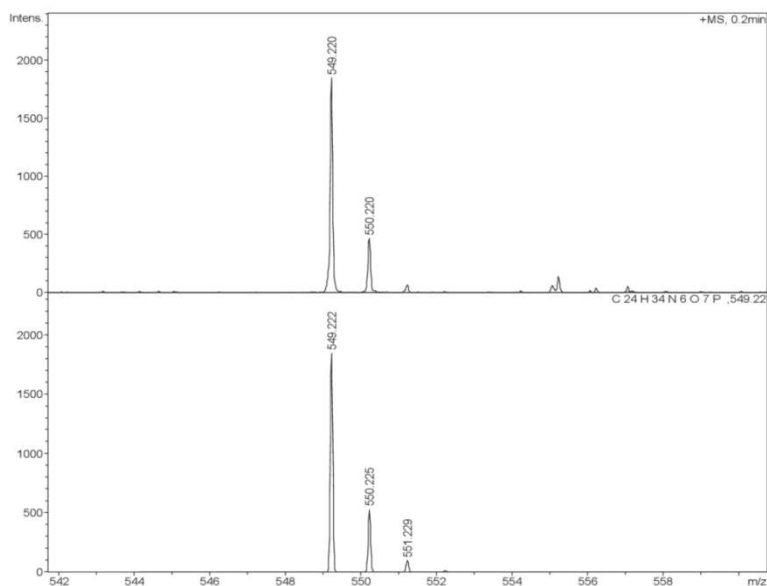


Figure 5.6. Spectre de masse ESI-HRMS en mode positif (masse exacte de L¹⁷ = 549.220 g/mol) Haut : composé obtenu par la synthèse. Bas : simulation avec distribution isotopique

De manière à obtenir un chélatant pur, la purification de L¹⁷ s'est poursuivie par d'autres essais et, faisant suite à une première purification par FPLC décrite ci-avant, une seconde colonne sur phase inverse a été réalisée.

Cette fois, le système H₂O/MeOH a été utilisé comme éluant, dans des proportions allant de 100/0 à 70/30. Une différence importante sur cette deuxième purification par FPLC est la modification du débit de l'éluant. Généralement, les colonnes par FPLC sont effectuées à un débit tel qu'un volume de colonne soit élué en 3 min (exemple : pour une colonne de 71 mL, le débit est classiquement réglé à 25 mL/min ; ainsi en 3 min, 75 mL d'éluant sont prélevés, ce qui correspond environ au volume de la colonne). Pour cette seconde purification, le débit a été fixé à 10 mL/min. Dans ces conditions, la purification a permis d'isoler un résidu de ligand L³, l'agent de couplage et le composé L¹⁷ recherché. Le rendement est alors de 17 % sur les deux étapes (couplage peptidique et déprotection de l'amine).

Une nouvelle analyse RMN ¹H a donc été effectuée et le spectre correspondant est représenté Figure 5.7.

La présence du composé L¹⁷ est nettement mise en évidence.

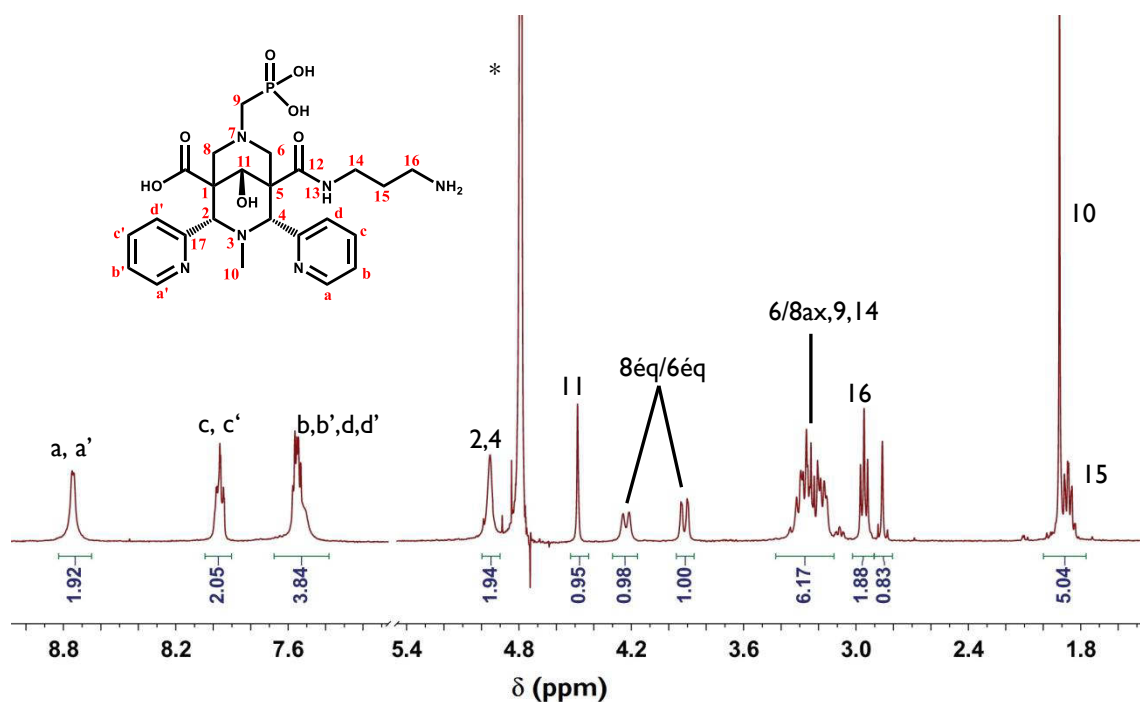


Figure 5.7. Spectre RMN ^1H de L^{17} (400 MHz, $^*\text{D}_2\text{O}$)

Cette fraction a été analysée par ESI-HRMS en mode positif. Le spectre de masse révèle la présence majoritaire du composé L^{17} avec $m/z = 549,223$ correspondant à $[\text{L}^{17}+\text{H}]^+$ et $m/z = 555,229$ correspondant à $[\text{L}^{17}+\text{Li}]^+$.

D'autre part, ce travail a révélé la formation du composé di-couplé sur les deux acides carboxyliques. Celui-ci a été mis en évidence par l'analyse des bruts réactionnels par spectrométrie de masse et peut-être séparé par chromatographie.

Néanmoins, il serait intéressant d'envisager une saponification sélective de L^2 (tout comme cela est le cas pour L^{35} , voir plus loin dans ce chapitre) de manière à pouvoir maximiser le rendement de cette réaction.

2.4 Synthèse de L^{18}

Possédant désormais une bispidine fonctionnalisée avec une fonction amine primaire, il est possible d'envisager d'introduire une fonction activée capable de réagir dans des conditions douces avec un anticorps ou encore un peptide. Le choix effectué pour cela est d'ajouter au ligand L^{17} une fonction ester NHS, comme discuté dans l'introduction. Ce groupement est en effet réactif vis-à-vis de groupements nucléophiles tels que les amines présentes dans de nombreux peptides.

Dans cet objectif, le composé 6, succinate de bis-NHS, est synthétisé à partir d'un mode opératoire décrit dans la littérature par C. Hocquelet et *al.*⁷ Il s'agit d'une synthèse impliquant le dichlorure de succinyle en présence de N-hydroxysuccinimide et d'une base

dans l'acétonitrile (Schéma 5.8). Le composé 6 précipite et est obtenu par filtration avec un rendement de 41 %.

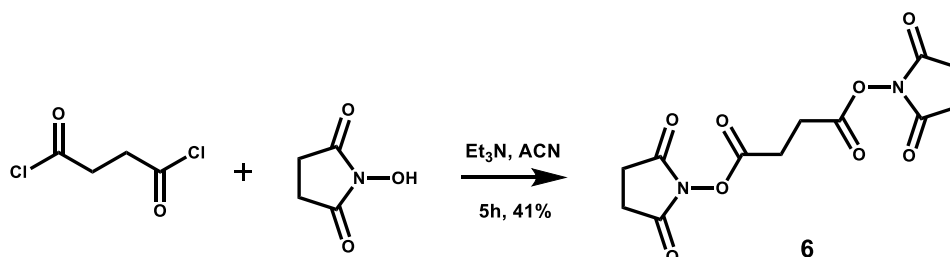


Schéma 5.8. Synthèse du composé 6.

Ce composé possède deux fonctions ester NHS. Il est donc possible d'ajouter ce composé sur L¹⁷ tout en possédant une fonction ester NHS disponible pour un second couplage.

La synthèse est effectuée selon le Schéma 5.9 à partir de conditions mises au point dans notre laboratoire. Une différence réside dans le fait que le pH est neutralisé avec de la N-méthyle-morpholine au préalable de la réaction en solubilisant L¹⁷ dans de l'eau (à noter que le ligand L¹⁷ utilisé ici n'était pas parfaitement pur). Nous pensons qu'il est préférable d'effectuer cette réaction en milieu neutre plutôt qu'en milieu acide. Après séchage, la réaction est effectuée dans le DMSO avec le composé 6.

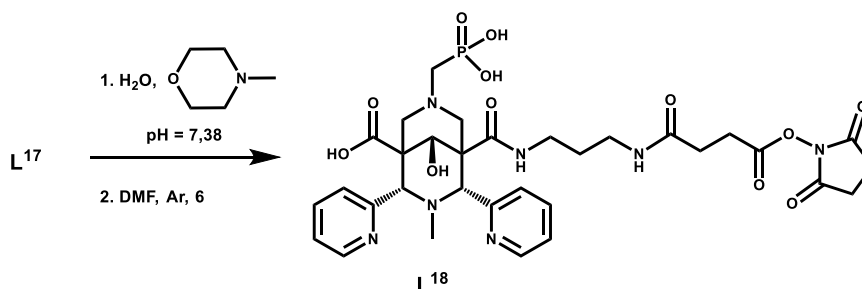
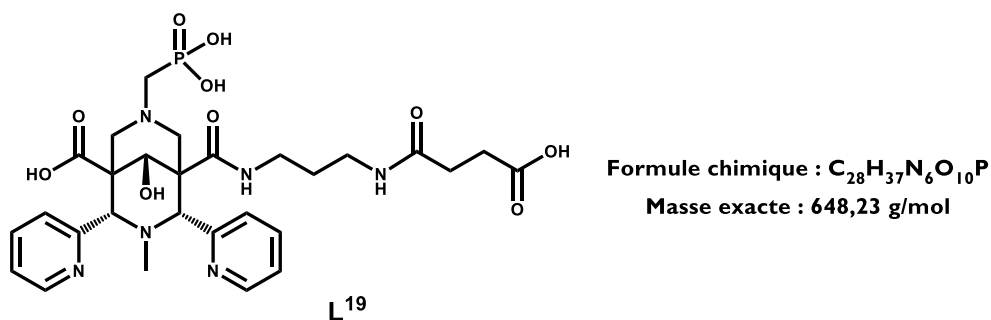
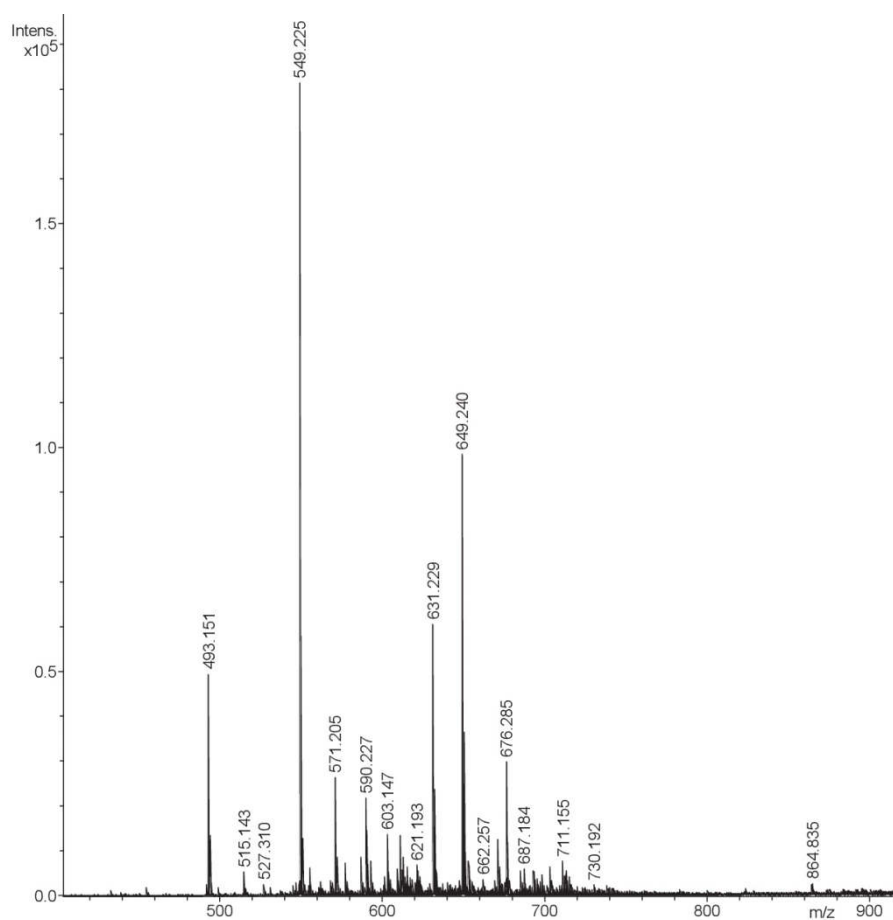


Schéma 5.9 Synthèse de L¹⁸

Une difficulté concernant ce couplage est l'instabilité de la fonction ester-NHS obtenu en fin de réaction, puisque celle-ci est très réactive vis-à-vis de composés nucléophiles. Malgré les précautions prises lors de la purification, on observe une hydrolyse totale de l'ester NHS. En effet, une analyse par ESI-MS en mode positif (Figure 5.8) a révélé la formation du composé L¹⁹ (Schéma 5.10) ; un pic pour lequel $m/z = 649,240$ est présent, il correspond à $[L^{19}+H]^+$. Il permet malgré tout de montrer que la réaction a bien eu lieu.

Schéma 5.10. Formule chimique du composé L¹⁹

Cependant, de nombreux autres pics sont présents. Ceux-ci témoignent du fait que le composé L¹⁷ n'a pas été obtenu pur et il est possible que des réactions secondaires aient lieu avec l'ester NHS présent sur L¹⁸. On retrouve également le composé L¹⁷, produit de départ de la réaction, avec un m/z de $[L^{17}+H]^+ = 549,225$. Ceci suggère que la réaction n'est pas complète.

Figure 5.8. Spectre de masse ESI-MS d'un échantillon de L¹⁷ en mode positif

2.5 Conclusion

En conclusion sur cette stratégie, on peut dire qu'un inconvénient important demeure, il s'agit du rendement de l'étape de couplage peptidique, qui pourrait être amélioré si le couplage était effectué sur un composé mono-acide mono-ester. En revanche, ces résultats

sont considérés comme un succès, puisqu'il est démontré que cette voie peut aboutir à l'obtention d'un CBF activé. De plus, le principal avantage de cette stratégie est qu'elle nécessite moins d'étapes de synthèses que les stratégies 3 et 4.

3. Stratégie 2

3.1 Preuve de concept

La voie de fonctionnalisation via une O-alkylation par une réaction de type Williamson a été dans un premier temps testée sur un ligand précédemment développé par A. Roux, le ligand L²⁰ possédant un méthyle en position R1 et un groupement -CH₂COOH carboxylate de méthyle en position R2.⁸ La réaction de Williamson consiste à une substitution nucléophile d'un alcool sur un dérivé halogéné en présence d'une base forte (typiquement NaH), capable de déprotoner l'alcool. Cette réaction se passe sous atmosphère inerte dans un solvant polaire aprotique, tel que la DMF ou l'acétonitrile. Classiquement utilisée avec des alcools primaires, la question était de savoir si cette synthèse pouvait fonctionner sur l'alcool secondaire d'un dérivé bispidol, en termes de réactivité ou de disponibilité de cet alcool.

La synthèse, représentée sur le Schéma 5.11, a tout d'abord été effectuée à partir d'une chaîne bromopropyle, en présence d'hydrure de sodium, sous argon et dans la DMF anhydre.

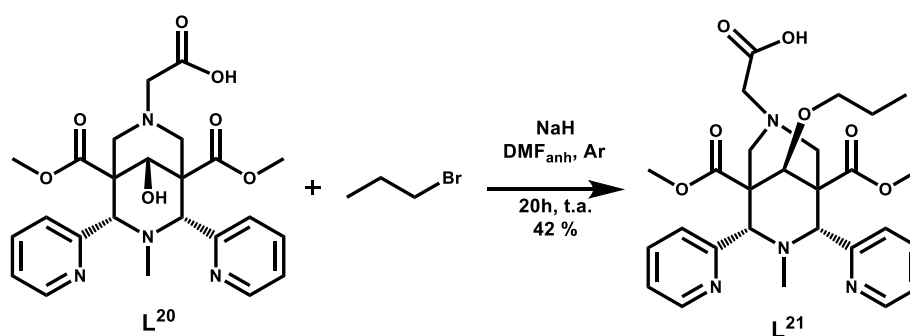


Schéma 5.11. Synthèse de L²¹ par alkylation de Williamson

Après purification sur gel de silice (DCM/MeOH 95/5 à 80/20), le ligand L²¹ a été obtenu, comme le confirme le spectre RMN ¹H de la Figure 5.9.

La présence de la chaîne propyle est mise en évidence par les deux triplets à 0,95 ppm et 4,06 ppm correspondant respectivement aux protons 18 et 16. La présence d'un multiplet qui s'apparente à un sextuplet à 1,65 ppm est observée ; il correspond aux protons 17.

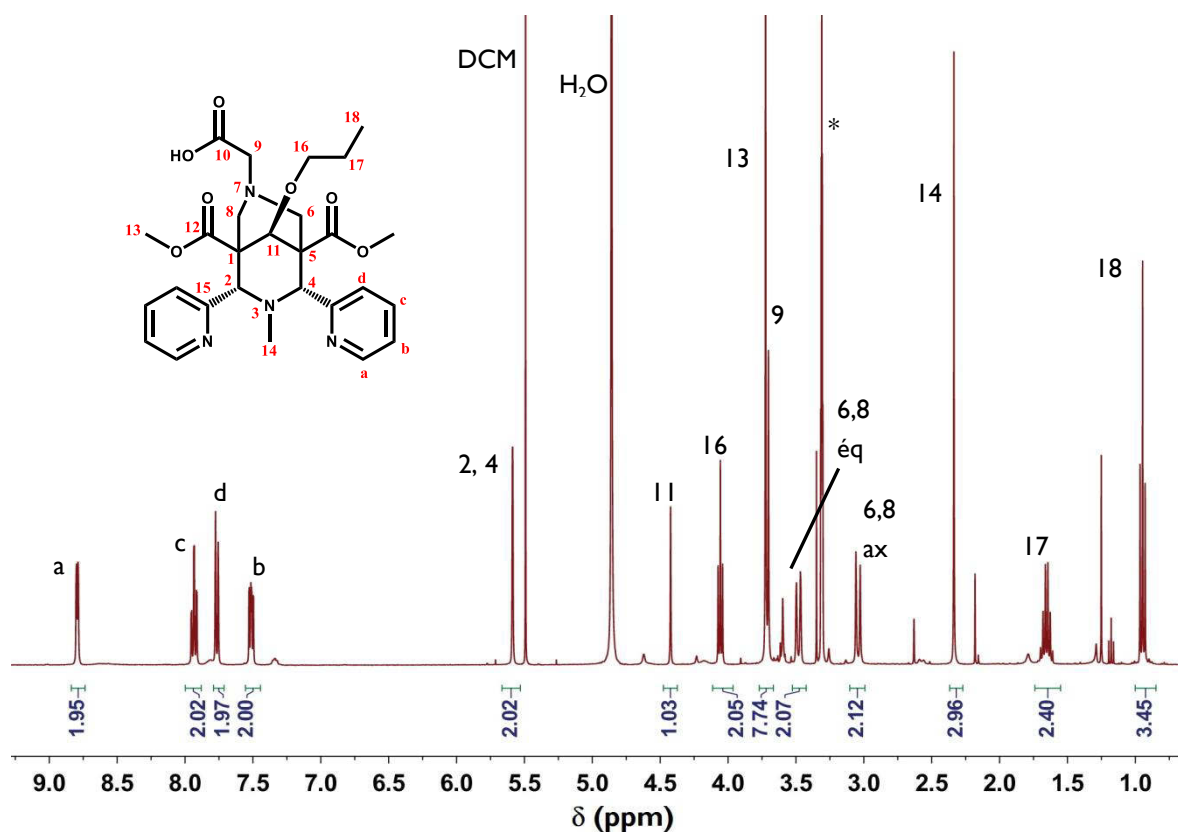


Figure 5.9. Spectre RMN ^1H de L^{21} (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$)

Puisque nous savons désormais que l'alkylation sur l'alcool secondaire du bispidol est possible, une synthèse identique a été reproduite, cette fois en présence d'un dérivé possédant une fonction amine primaire protégée par un groupement *tert*-butoxy carbonyle (Schéma 5.12), pour former la bispidine L^{22} .

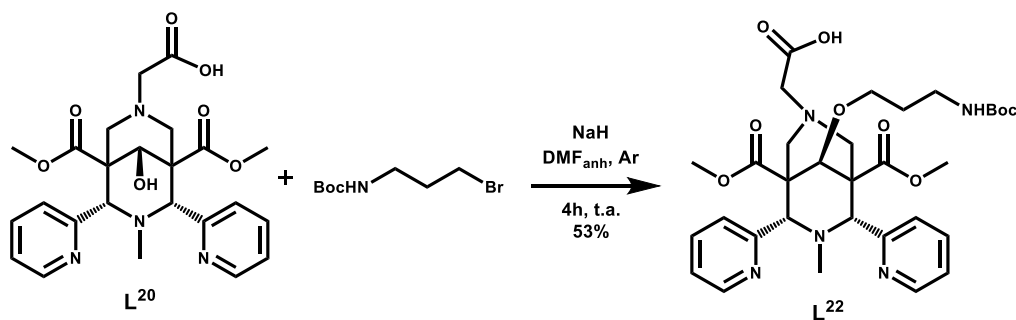


Schéma 5.12. Synthèse de L^{22}

La formation et la pureté du ligand L^{22} sont confirmées par la RMN ^1H présentée sur la Figure 5.10, ainsi que par les analyses de spectrométrie de masse et l'analyse élémentaire. La chaîne propyle est mise en évidence par la présence de deux triplets à 3,27 et 3,49 ppm correspondant respectivement aux protons 18 et 16. Un multiplet (proche du signal d'un quintuplet) attribué aux protons 17 est d'autre part présent à 1,80 ppm ainsi qu'un singulet correspondant aux protons 21 du *tert*-butyle.

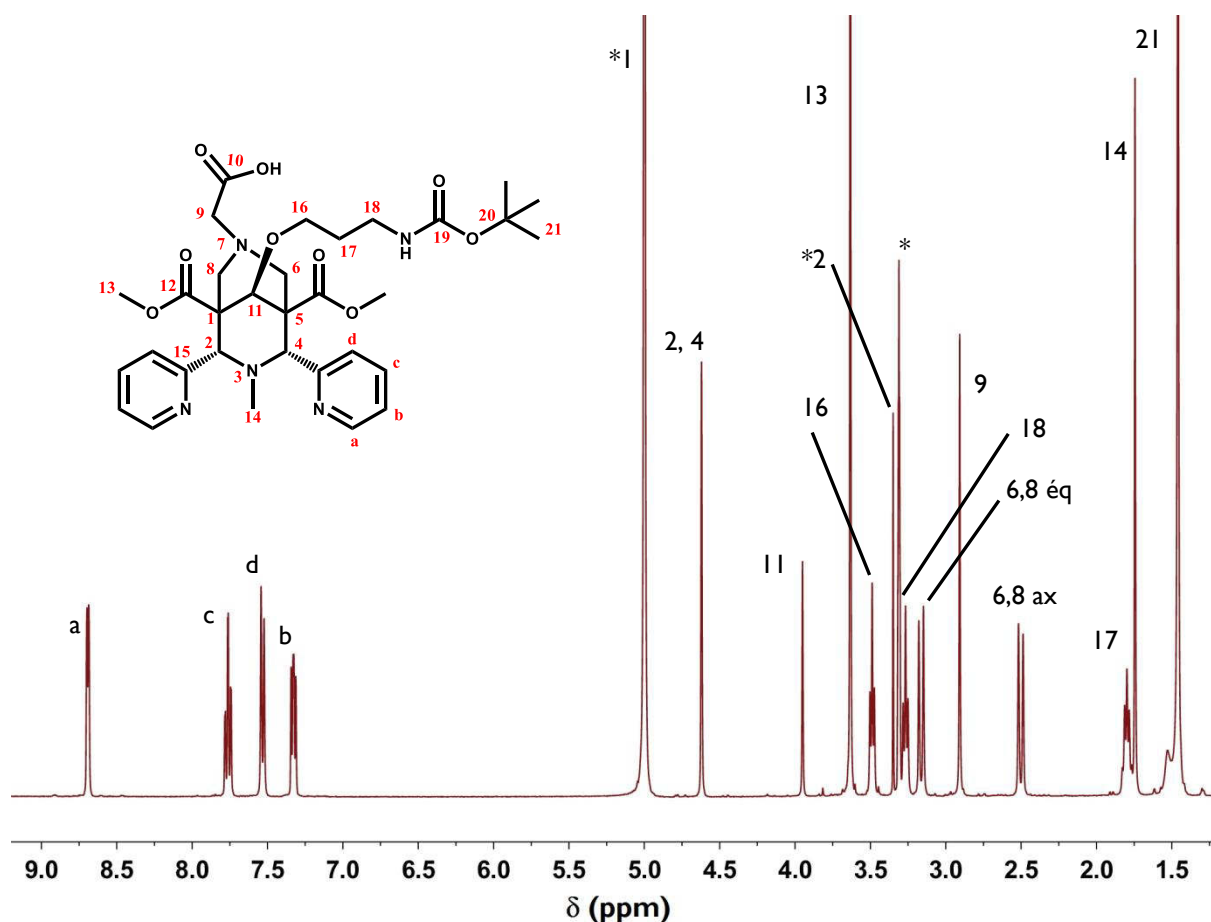


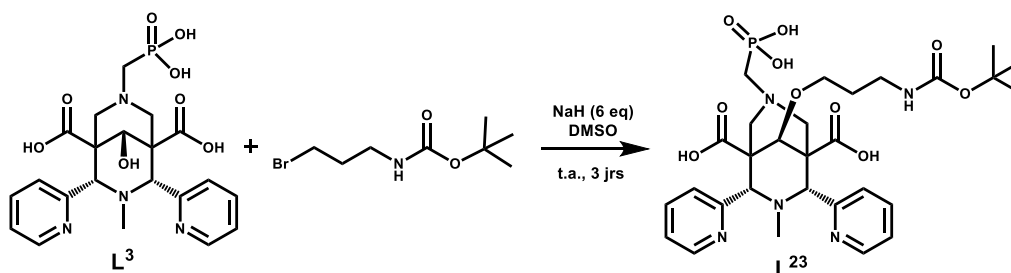
Figure 5.10. Spectre RMN ^1H de L^{22} en présence de NaOD (400 MHz, $^*\text{CD}_3\text{OD}$, $^*\text{H}_2\text{O}$, $^*\text{MeOH}$)

En milieu basique (MeOD + NaOD), une seule famille de signaux est observée. Cela met en évidence qu'une seule espèce alkylée est présente. En l'absence de NaOD, on observe des pics plus larges ou plusieurs familles de pics mais qui correspondent à différents états de protonation de la molécule.

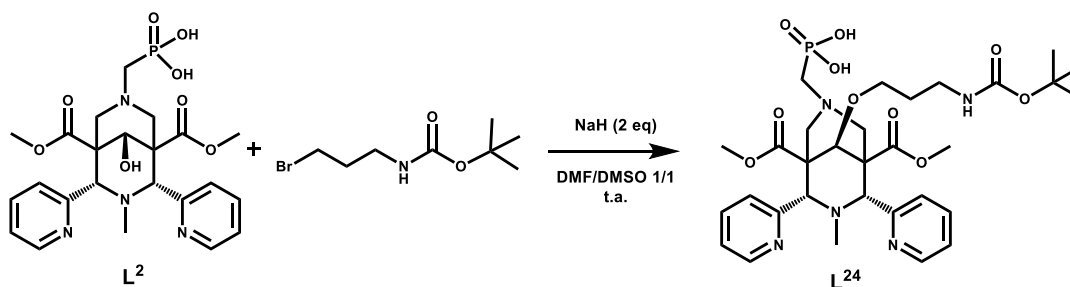
3.2 Essai sur L^3

Par la suite, des essais sur L^2 et L^3 ont été effectués de manière à obtenir le ligand L^{23} , soit directement à partir du ligand L^3 (Schéma 5.13), soit via la synthèse du ligand L^{24} à partir du ligand L^2 (Schéma 5.14).

Pour cette synthèse, une difficulté concerne la solubilité de L^3 dans la DMF, précédemment utilisée pour L^{22} . La synthèse est donc lancée à partir de DMSO.

Schéma 5.13. Synthèse de L²³.

Le problème de solubilité dans la DMF est d'ores et déjà moins important lorsque le ligand L² est utilisé en début de synthèse ; un mélange DMF/DMSO 1/1 est alors utilisé et la quantité d'hydroxyde de sodium nécessaire est ainsi diminué.

Schéma 5.14. Synthèse de L²⁴.

Dans les deux cas, il est mis en évidence qu'une réaction avec la chaîne 3-bromo-(*tert*-butoxycarbonyl)-aminopropyle soit possible dans ces conditions, mais à priori sur l'acide phosphonique et non sur l'alcool. Du fait de l'acidité de l'acide phosphonique, celui-ci est doublement déprotoné par ajout de base. Il est alors sous la forme $-P(O)O_2^{2-}$ et possède un caractère nucléophile qui peut réagir avec la chaîne bromée. Du fait de la faible acidité de l'alcool secondaire du bispidol, cette réaction a probablement lieu avant la formation de l'alcoolate.

Dans le cas de la synthèse de L²³, une forme dissymétrique, incluant à priori la chaîne bromée, est observée à la suite de la réaction. Ce composé dissymétrique est attribué à la réaction entre le groupement phosphonate et la chaîne bromée.

Dans le cas de la synthèse de L²⁰, le mélange réactionnel est bien plus complexe. En effet, la présence d'eau génère la formation d'ions hydroxydes et une saponification est observée. De nombreuses formes sont ainsi présentes, dissymétriques du fait d'une mono-saponification ou du fait de l'attaque du phosphonate sur la chaîne bromée.

Etant donné les difficultés observées pour la protection de l'acide phosphonique, cette stratégie est abandonnée au profit de la stratégie 3.

4. Stratégie 3

4.1 Ligand L²⁵

Le point de départ des deux voies de cette stratégie de synthèse est l'obtention de la bispidone L²⁵ possédant un groupement benzyle en R₂, précédemment développée.⁹

Cette synthèse s'effectue à partir du précurseur P¹, de la benzylamine et de formaldéhyde, comme décrit au Schéma 5.15.

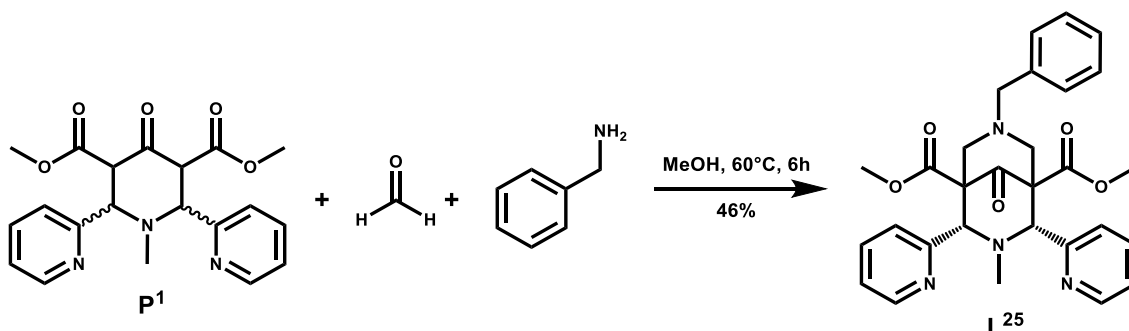


Schéma 5.15. Synthèse du ligand L²⁵

Cette bispidone est très facilement isolée par précipitation dans l'EtOH, dans la configuration *cis* chaise-chaise nécessaire pour la suite de la synthèse, comme le montre le spectre RMN ¹H Figure 5.11.

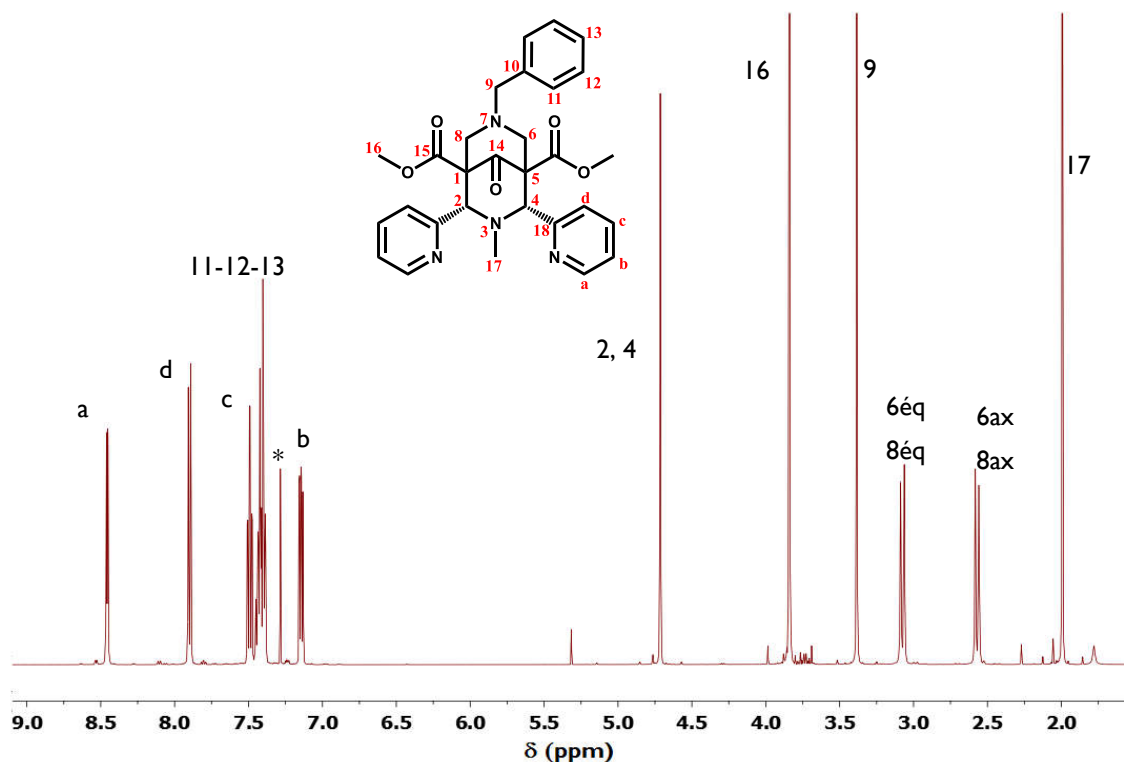


Figure 5.11. Spectre RMN ¹H de L²⁵ (*CDCl₃, 400 MHz)

En ce qui concerne les signaux aromatiques, la présence des protons b plus déblindés que les protons c suggère que les atomes d'azote des cycles pyridines sont orientés vers l'extérieur de la cavité. Il est possible de confirmer cette observation avec les expériences de RMN bidimensionnelles. De même que dans des cas précédents, la RMN COSY ^1H ^1H indique que les protons 6ax et 8ax sont plus blindés que les équatoriaux, du fait de leur interaction avec les protons 2 et 4. Dans ce cas-ci, la RMN NOESY nous montre une interaction entre les protons d et les protons 6éq et 8éq et non entre les protons d et les protons 2 et 4, confirmant l'orientation des cycles pyridines.

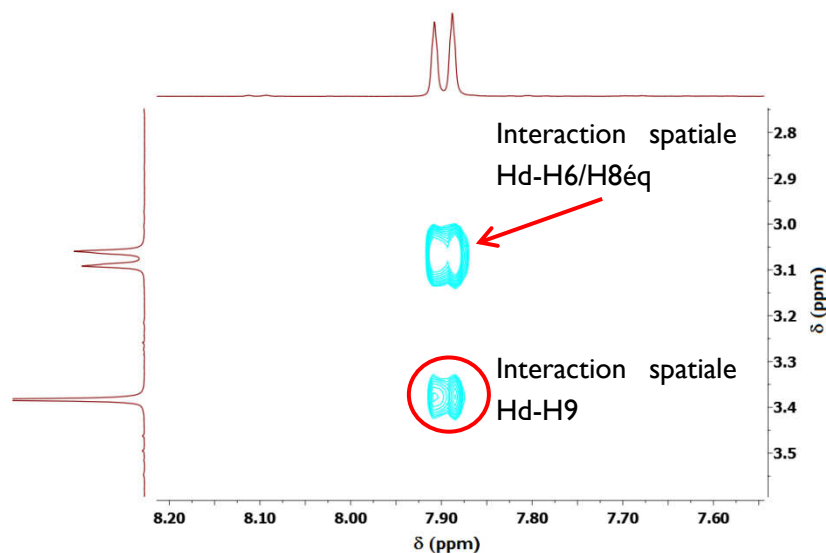


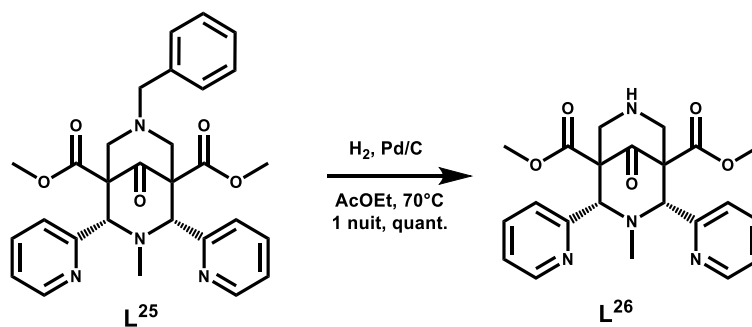
Figure 5.12. Agrandissement du spectre ^1H - ^1H NOESY L^{25} (400 MHz, CDCl_3)

A partir de ce composé, deux voies ont été empruntées, la voie A dont la première synthèse est l'hydrogénation de L^{25} (en **bleu** sur le Schéma 5.2) et la voie B dont la première synthèse est la réduction de la bispidone (en **orange** sur le Schéma 5.2).

4.2 Voie A.

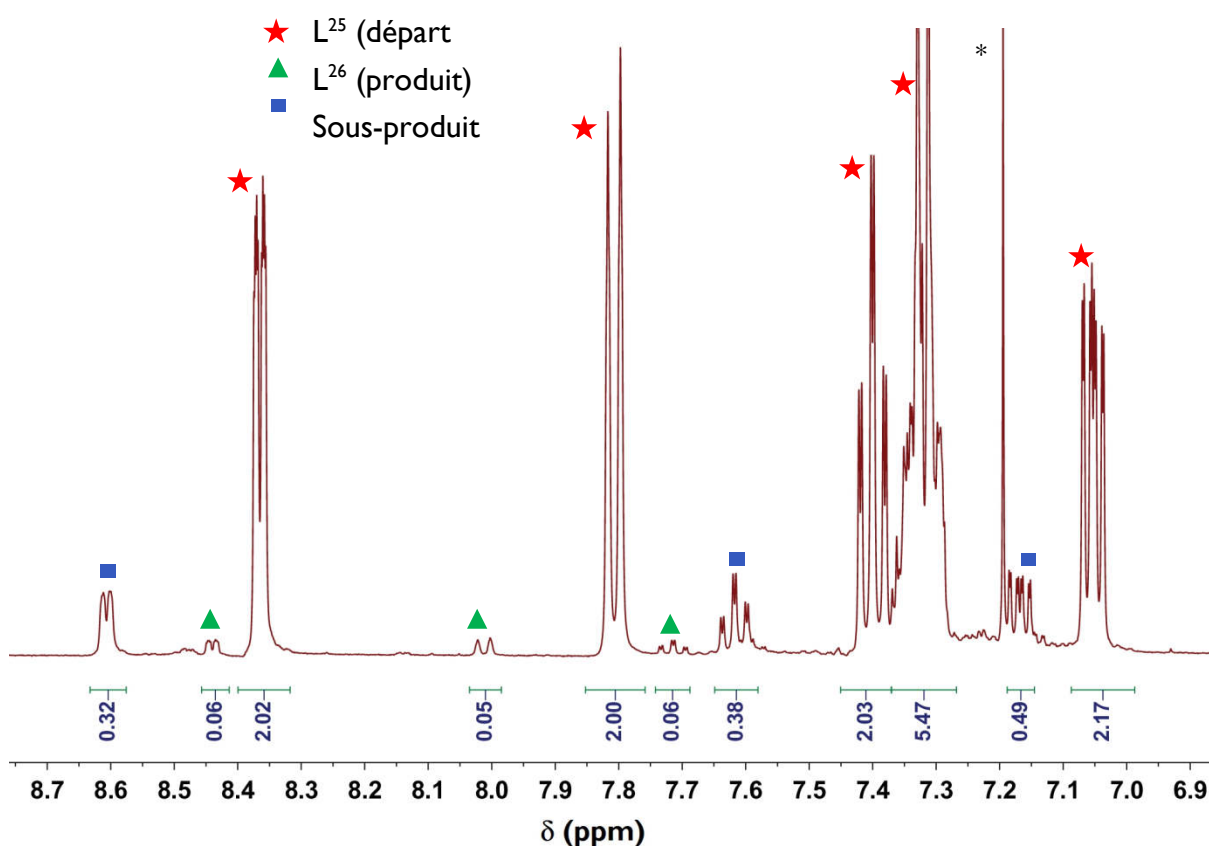
A) Ligand L^{26}

L'hydrogénation de la bispidine L^{25} permet d'obtenir la bispidine L^{26} comme montrée sur le Schéma 5.16. Cette réaction est également décrite dans les conditions suivantes : présence d'hydrogène (1 atm), 70°C dans l'acétate d'éthyle pendant une nuit.⁹

Schéma 5.16. Synthèse du ligand L²⁶

La première synthèse a donc été lancée dans ces conditions, à l'exception de la méthode d'hydrogénation. Nous disposons au laboratoire d'un générateur hydrogène qui fonctionne en système ouvert ; bullage à un certain débit d'hydrogène par une aiguille qui plonge dans la solution. Cette technique a démontré dans d'autres réactions d'excellents résultats.

Cependant après 1 nuit complète, une analyse ¹H RMN du brut réactionnel a montré la présence d'impuretés aromatiques en plus du produit, dans des quantités non négligeables (environ 15 %), d'autant que l'avancement de la réaction n'est évalué qu'à environ 16 % à ce stade-là, comme le montre l'agrandissement au niveau des protons aromatiques du spectre RMN ¹H Figure 5.13. Les conditions mentionnées dans la publication n'ont alors pas suffi pour que cette synthèse soit un succès immédiat.

Figure 5.13. Spectre RMN ¹H de l'essai d'hydrogénolyse de L²⁵ (400 MHz, *CDCl₃)

Cette synthèse a été relancée, cette fois en utilisant l'éthanol comme solvant, celui-ci étant utilisé dans la synthèse du synthon aminométhyl phosphonate de diéthyle. Après quelques heures de réaction, une nouvelle analyse RMN du brut réactionnel a révélé une dégradation importante du ligand L²⁵, suggérant que l'utilisation de l'éthanol pour cette synthèse est inadéquate.

De ce fait, la pureté du solvant utilisé dans cette synthèse a été remise en cause. Un batch d'acétate d'éthyle a donc été purifié selon un procédé de distillation.¹⁰ Le solvant est d'abord chauffé à reflux en présence d'anhydride acétique (1 L/55 mL) et de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. L'anhydride acétique permet, dans le cas de la présence d'éthanol comme impureté, de le transformer en acétate d'éthyle voulu. Par la suite, une première distillation de l'acétate d'éthyle est effectuée. Une seconde distillation est effectuée après avoir agité le solvant en présence de carbonate de potassium.

L'hydrogénation catalytique a donc été relancée à partir de ce solvant, mais la synthèse a révélé que le solvant contenait une quantité importante d'anhydride acétique, malgré la double distillation.

En effet, le composé isolé en fin de synthèse est pur, son spectre RMN ¹H est montré Figure 5.14. Il s'agit vraisemblablement du composé L²⁷, possédant un groupement acétate en R2.

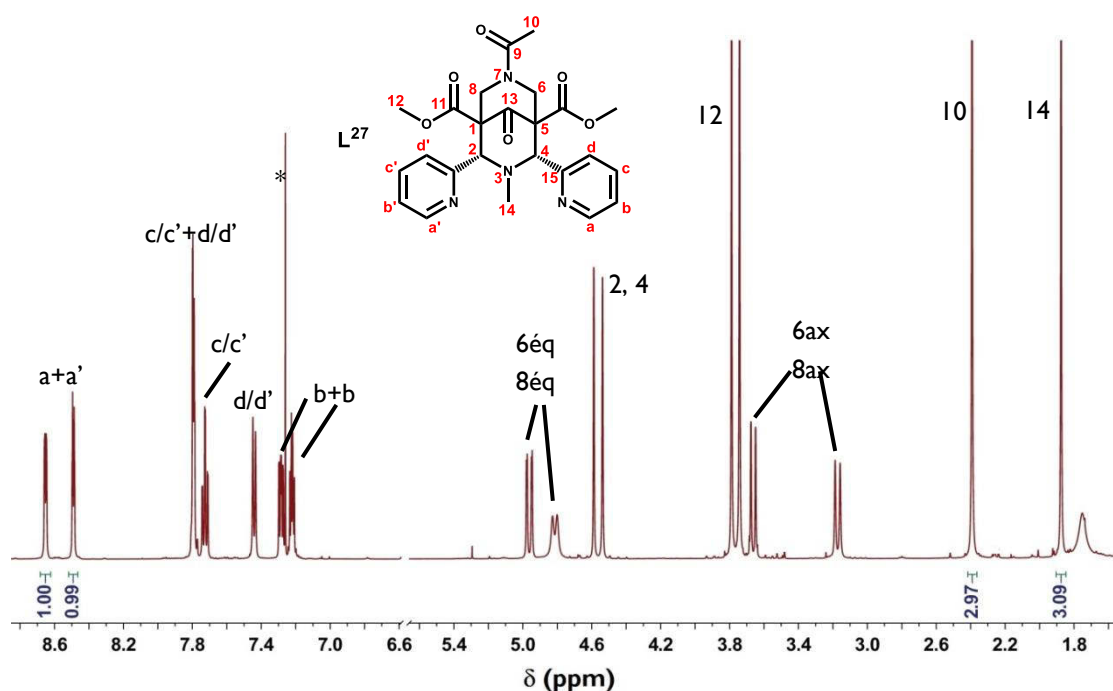


Figure 5.14. Spectre RMN ¹H du ligand L²⁷ (500 MHz, *CDCl₃)

On distingue en effet sur ce spectre la présence d'un singulet à 2,39 ppm qui intègre pour 3 protons, comparé au pic correspondant aux protons a dont l'un est calibré avec un intégrale égale à 1. Le spectre RMN ¹³C révèle également un pic à 170,3 ppm qui pourrait correspondre à la présence d'une fonction amide supplémentaire. Seuls ces deux pics

supplémentaires apparaissent à la suite de l'hydrogénation. D'autre part, on constate que cette bispidone formée est dissymétrique, au vu du dédoublement de l'ensemble des signaux obtenus (2 systèmes AB, deux singulets pour H2 et H4, deux singulets pour les esters et le dédoublement de tous les protons aromatiques).

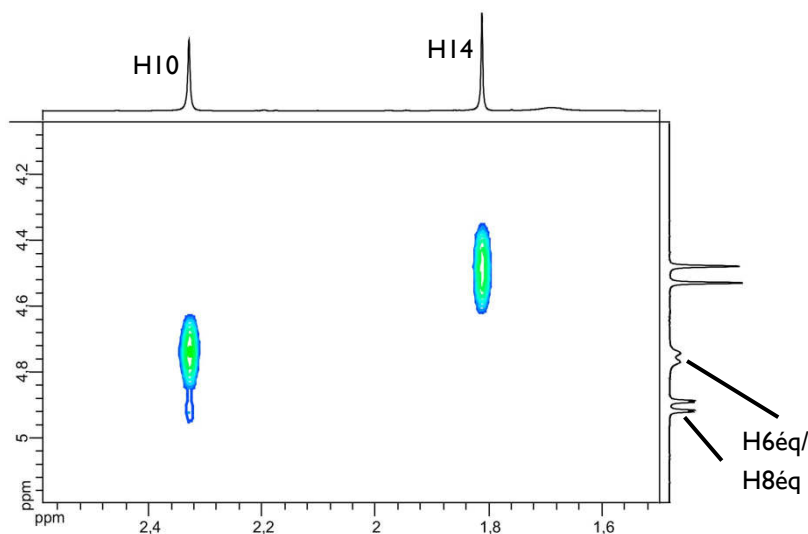


Figure 5.15. Agrandissement du spectre RMN ^1H - ^1H NOESY L^{26}

Cette chiralité mise en évidence par cette analyse RMN suggère une orientation spécifique de la fonction amide, probablement du fait d'interaction de type Van der Waals ou de liaisons hydrogène avec la fonction carbonyle.¹¹ Si l'on considère le plan contenant le méthyle en position 14, l'azote N3, la cétone de la bispidone ainsi que l'azote N7, celui-ci est un plan de symétrie pour le ligand L^{25} . Désormais, la molécule est chirale, suivant la position de la fonction amide (carbonyle et méthyle) par rapport à ce plan.¹¹ Comme on peut le montrer sur la RMN par effet Overhauser Figure 5.15, le méthyle en position 10 interagit très majoritairement avec l'un des protons équatoriaux H6 ou H8, suggérant qu'il est préférentiellement positionné d'un côté du plan de symétrie de L^{25} .

Suite à cette constatation, une nouvelle synthèse dans de l'acétate d'éthyle de qualité supérieure a été effectuée. Le composé L^{26} a été obtenu pur comme le montre la RMN ^1H Figure 5.16. Malgré la présence de triplet pour les protons H6 et H8, suite à un couplage avec le proton 7, la constante n'a pas pu être déterminée avec certitude. En revanche, on note l'absence des signaux dus au groupement benzyle.

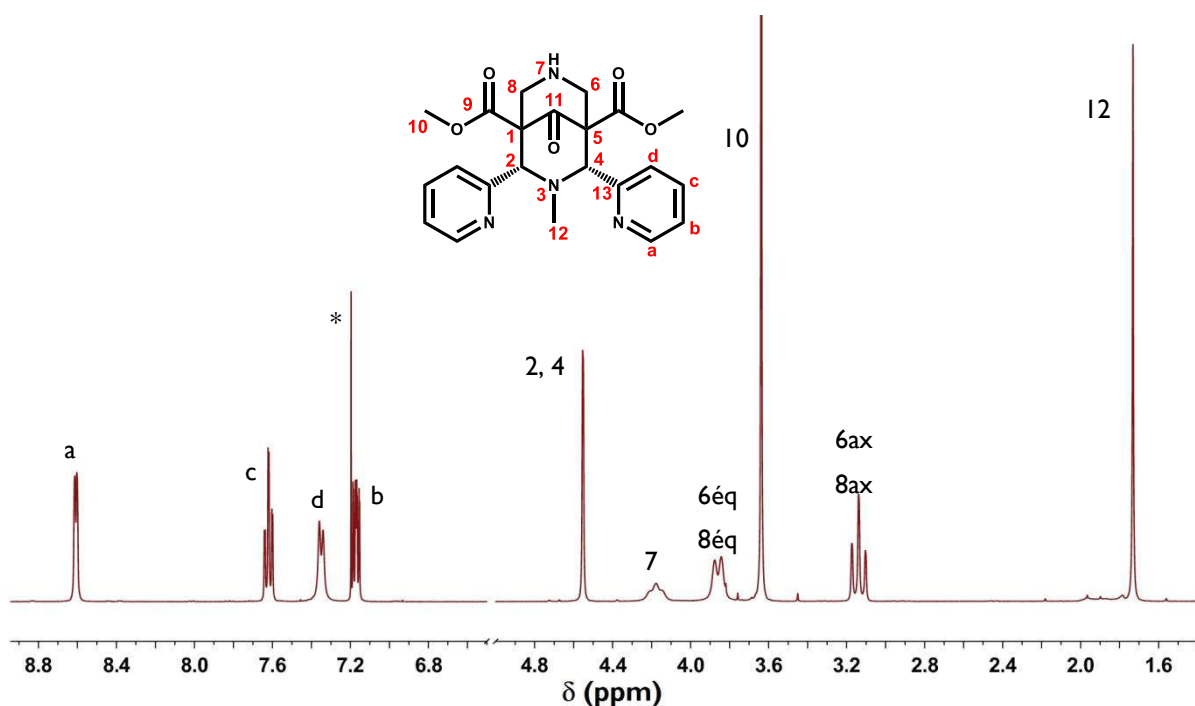


Figure 5.16. Spectre RMN ^1H de L^{26} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$)

B) Ligand L^{28}

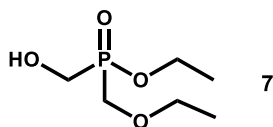
De nombreux essais ont été effectués pour l'étape suivante qui consiste à phosphoryler L^{26} sur l'amine secondaire désormais disponible en R2 ; deux voies de synthèse sont testées pour cette phosphorylation.

a) 1^{ère} voie

La première voie de synthèse consiste à effectuer une réaction de type Kabachnik-Fields,¹² à partir de L^{26} en tant qu'amine secondaire, de formaldéhyde et de diéthyle phosphite.

Plusieurs essais ont été réalisés à cet effet, ils sont résumés dans le Tableau 5.1.

Pour les trois premières réactions, le résultat obtenu était similaire, puisque dans les trois cas la formation du composé α -hydroxyphosphonate 7 a été observée (Schéma 5.17). Cela signifie que dans ce cas-ci, la réaction entre l'amine secondaire et le formaldéhyde menant à la formation de l'ion iminium n'est pas observée et est défavorable par rapport à la réaction entre le diéthyle phosphite et le formaldéhyde. Cela est observé malgré des différences de conditions réactionnelles au niveau des réactifs : choix de la base, assistance basique pour la déprotonation de l'amine secondaire, du solvant, du formaldéhyde (en solution aqueuse ou sous forme de paraformaldéhyde) et des conditions de température et de temps.

Schéma 5.17. Composé 7 : α -hydroxyphosphonate de diéthyle

Exp	Réactifs	Conditions	Traitement et observations
1	L ²⁶ (1 éq) CH ₂ O (2 éq) HPO(OEt) ₂ (1,2 éq)	1. THF, 60°C, 1 nuit	Extraction DCM/H ₂ O <ul style="list-style-type: none"> dégradation de L²⁶ formation du composé α-hydroxyméthyl phosphonate
2	L ²⁶ (1 éq) CH ₂ O (2 éq) HPO(OEt) ₂ (1,2 éq)	K ₂ CO ₃ (1,2 éq), ACN, ta, 1 nuit puis 40°C, 1 nuit	Cristallisation dans EtOH <ul style="list-style-type: none"> cristaux de L²⁶ formation du composé α-hydroxyméthyl phosphonate
3	1. L ²⁶ (1 éq) HPO(OEt) ₂ (1,2 éq) paraformaldéhyde (10 éq) 2. triéthylamine (2 éq)	1. ACN, 50°C 1h 2. ta, 1 nuit puis 50°C, 1 nuit	Formation du composé α -hydroxyméthyl phosphonate
4	1. L ²⁶ (1 éq) triéthylamine (2 éq) tamis moléculaire 2. paraformaldéhyde (10 éq) 3. HPO(OEt) ₂ (1,2 éq)	1. ACN, reflux 1h 2. reflux, 1h 3. reflux, 2 nuits	<ul style="list-style-type: none"> Dégradation de L²⁶, formation d'une espèce insaturée formation du composé α-hydroxyméthyl phosphonate
5 ¹³	L ²⁶ (3 éq) HPO(OEt) ₂ (1 éq) CH ₂ Cl ₂	DMF, Ar, 75°C, 5h	Récupération de L ²⁶ après FPLC

Tableau 5.1. Résumé des synthèses de L²⁸ à partir de L²⁶ via une synthèse de type Kabachnik-Fields

L'essai 4 noté dans le Tableau 5.1 a été effectué dans des conditions différentes. En effet, dans un premier temps, le ligand L²⁶ a été placé en présence de base et de tamis moléculaire, seul, puis chauffé à reflux pendant 1 h. Dans un second temps, l'addition de paraformaldéhyde a été effectuée. L'idée ici était de former l'ion iminium avant de rajouter le diéthyle phosphite, la présence de tamis moléculaire permettant de piéger l'eau formée *in situ*. Après 1h à reflux, le diéthyle phosphite a été additionné au milieu réactionnel.

Deux espèces ont été formées pendant cette réaction, l'une correspond au composé 5, la seconde est liée à une dégradation du ligand L²⁶. Le spectre RMN de ce composé ainsi que la numérotation de L²⁸ sont montrés sur la Figure 5.17.

Plusieurs éléments permettent d'avoir une idée de ce dont il s'agit. Tout d'abord, sur le spectre RMN ¹H, la présence des singulets à 1,60 ; 3,67 et 4,76 ppm suggère que les protons 10, 12, 2 et 4 observés pour le ligand L²⁶ sont toujours présents. Il en est de même pour les protons aromatiques. En revanche, le second cycle pipéridine a visiblement disparu puisque

les protons 6 et 8 (généralement présent sous la forme d'un système AB) sont absents. De plus, l'apparition d'un doublet et d'un triplet à 6,44 et 6,00 ppm, intégrant chacun pour deux protons, est également observée. Pour ce type de déplacement chimique, il semble que ces protons soient liés à un carbone sp^2 , provoquant un tel déblindage. La multiplicité des signaux est un indice sur l'environnement de ces protons. On sait d'après la RMN 1H 1H COSY que ces deux signaux interagissent entre eux et que le triplet à 6,00 ppm interagit également avec les protons 2, 4.

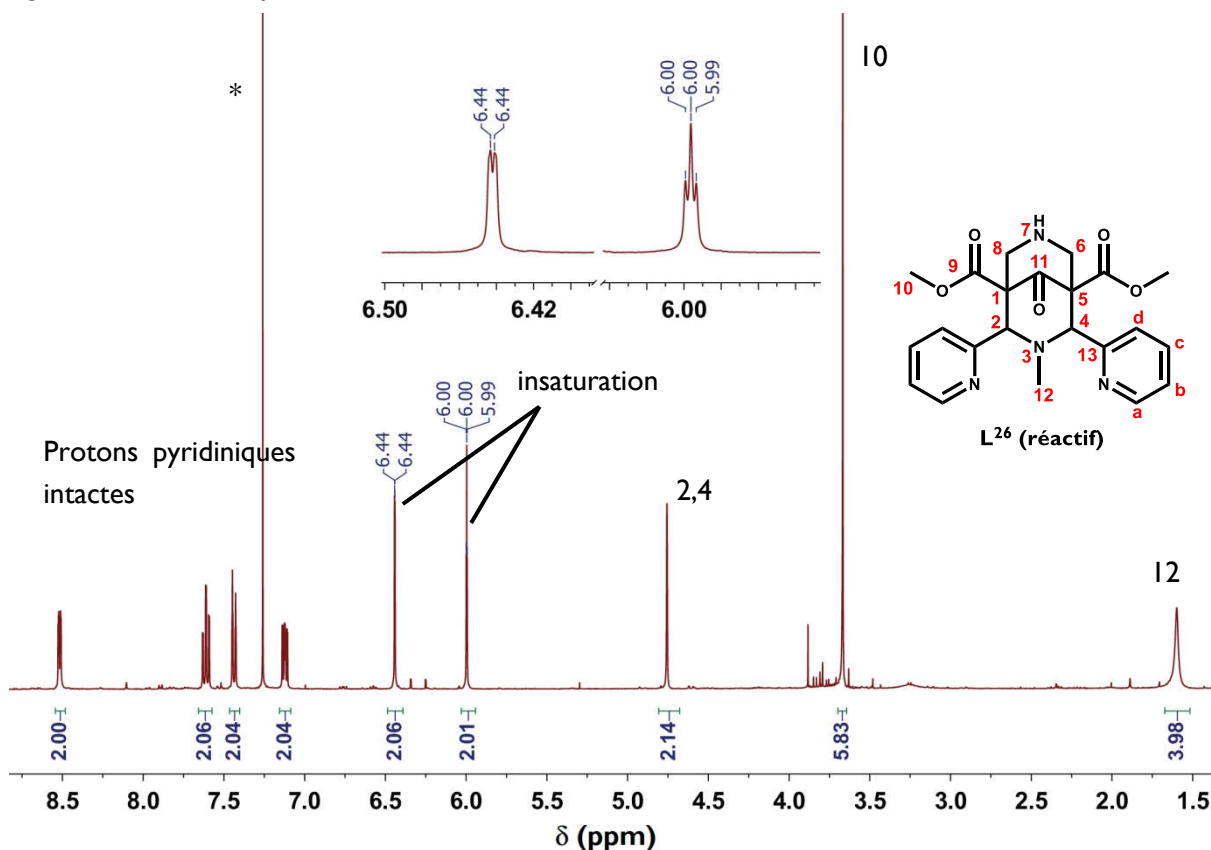


Figure 5.17. Spectre RMN 1H de l'espèce formée pendant la synthèse de L^{28} (400 MHz, *CDCl_3)

Par ailleurs, l'analyse par RMN ^{13}C nous indique la disparition de la fonction cétone et l'apparition de deux carbones, l'un quaternaire (d'après la RMN ^{13}C DEPT) et d'un carbone secondaire, portant les 4 protons supplémentaires, d'après la RMN de corrélation HSQC 1H - ^{13}C .

Malgré ces indices, il est difficile de conclure sur la structure du composé formé. Il semble néanmoins qu'il s'agisse d'un cycle pipéridone dont la fonction cétone aurait évolué vers une forme portant une insaturation. D'autres analyses auraient pu nous permettre d'en savoir plus, mais nous nous sommes concentrés sur la synthèse de L^{28} .

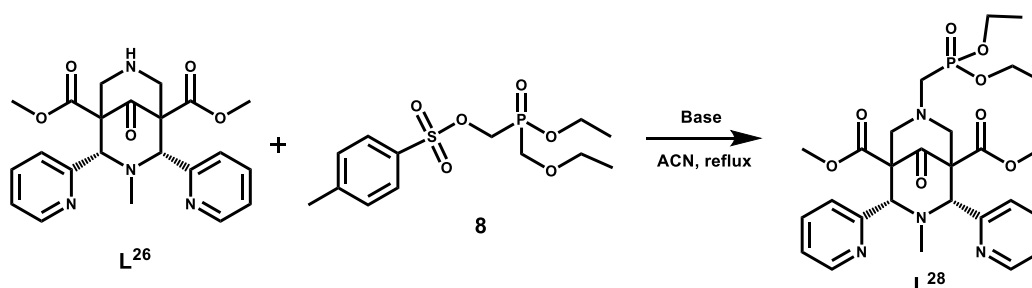
Le dernier essai est une adaptation d'un mode opératoire de la littérature,¹³ qui mentionne la formation de composé de type α -aminophosphonate via la réaction entre un dérivé phosphite, une amine, du dichlorométhane en présence de triéthylamine dans des conditions assez fortes : DMF, $T = 100^\circ C$, 12 h. Au de la stabilité des bispidones, la réaction a été testée à $75^\circ C$ et la formation du composé désiré n'a pas été observé.

b) 2^{ème} voie

Synthèse

La phosphorylation par une réaction de type Kabachnik-Fields n'ayant pas fonctionné, une seconde possibilité a été testée, qui devrait permettre d'obtenir L²⁸ par substitution nucléophile SN₂ de l'amine secondaire de L²⁶ sur un nucléofuge portant le diester phosphonate de diéthyle ciblé 8. Diverses réactions de ce type à partir de L²⁶ ont été décrites par l'équipe de P. Comba, mais font généralement intervenir un dérivé chloré.^{9,14}

Une première synthèse a été lancée, comme montré sur le Schéma 5.18 à partir du tosylate de l'hydroxyméthyl phosphonate de diéthyle.

Schéma 5.18. Synthèse de L²⁸, par réaction SN₂, conditions générales.

Cette synthèse a lieu dans l'acétonitrile à reflux en présence d'une base. Divers ajouts de base ont été appliqués.

Ajout	Base	Nbre éq	tps (h)	Intégrale ³¹ P		Protons Ha		Protons H2 & H4		η
				15,2 ppm réactif	23,6 ppm produit	Réactif	Produit	Réactif	Produit	
1	K ₂ CO ₃	2	2		0	2	0	2	0	0
2	Et ₃ N	1	4			2	0,1	2,0	0,1	4
3	Et ₃ N	3	nuit	6,7	1	2	0,3	2,1	0,2	12
4	Et ₃ N	1	3	5,8	1	2	0,3	2,1	0,3	13
5	Et ₃ N	2,5	nuit	3,9	1	2	0,4	2,0	0,5	19
6	Et ₃ N	3	4	3,5	1	2	0,5	2,0	0,6	22
7	Et ₃ N	5	6	2,9	1	2	0,7	2,0	0,6	25
8	Et ₃ N	10	6	2,5	1	2	0,9	2,0	0,8	28
9	Et ₃ N	10	6	1,8	1	2	1,8	2,1	1,9	42

Tableau 5.2. Suivi de la réaction de phosphorylation

Cette première réaction est suivie par RMN ¹H et ³¹P. L'interprétation des plaques CCM est en effet difficile. Les rapports frontaux des deux composés sont en effet très proches et la présence du phosphonate de diéthyle et de la bispidone forment des trainées sur plaque. C'est pourquoi le suivi a été effectué par RMN, d'une part, en comparant l'intégrale du pic du phosphore du produit de la réaction et l'intégrale du pic du phosphore du dérivé

phosphonate. Nous pouvons ainsi connaître l'avancement de la réaction (noté η dans le tableau) en fonction du temps. Son évolution est mentionnée Tableau 5.2.

D'autre part, le suivi de l'avancement se fait également par RMN ^1H en comparant de la même manière les intégrales des protons de la bispidone de départ L^{26} et de la bispidone-produit de la réaction L^{28} . Le suivi est également montré dans le Tableau 5.2. Différents signaux sont considérés, il s'agit de ceux des protons Ha ainsi que des protons H2 et H4.

La réaction est stoppée dès lors que l'avancement de celle-ci était suffisamment important pour permettre de travailler sur les traitements du mélange réactionnel. Bien que l'avancement puisse être déterminé par RMN en suivant les intégrales de protons spécifiques, diverses autres espèces sont présentes et visibles en RMN ^{31}P et ^1H . Après purification sur colonne, une fraction correspondant au produit final quasi-pur est isolée. Cette synthèse a donc permis de confirmer la possibilité d'obtenir L^{28} par substitution nucléophile.

Néanmoins, cette réaction est particulièrement lente, des produits de dégradation sont formés au cours de celle-ci et il est encore nécessaire de déterminer une méthode de purification adéquate. La dégradation est très probablement liée soit au temps de réaction, soit à la température (reflux d'acétonitrile dont le point d'ébullition est de 82°C) ou encore au choix de la base.

D'autres essais ont permis de confirmer ces observations et de déterminer les conditions de réaction qui semblent les plus adaptées pour cette synthèse. Ces essais sont résumés dans le Tableau 5.3.

Exp	Base	T	Temps	Conditions	Observations
1	NaH	1. 0°C --> t.a. 2. 40°C	1. 2h 2. 2*1 nuit		Dégradation
2	K_2CO_3	1. reflux 2. μ -ondes, 100°C	1. 2 nuits 2. 1h	présence NaI	1. Formation iodométhyl diéthyl phosphonate 2. Dégradation
3	Na_2CO_3	60°C	8 jours	DMF	Dégradation
4	Na_2CO_3	70°C μ -ondes, 70°C	1. 10 jours 2. 2*1h	2 éq tosylate	Pas de dégradation réaction en cours
5	Na_2CO_3	85°C	15 jours		formation de sous- produits minoritaires
6	Et_3N (large excès)	1. reflux 2. 65°C 3. 70°C 4. reflux 5. 80°C	1. 3 nuits 2. 1 nuit 3. 1 nuit 4. 1 nuit 5. 7 jrs	large excès tosylate (10éq)	Similaire à la première synthèse Conditions plus douces Avancement évalué à 70%
7	Na_2CO_3	70°C	6 semaines	1,1 éq tosylate	Fonctionne de manière similaire à la précédente Avancement évalué à 68%

Tableau 5.3. Résumé des synthèses pour L^{28}

En analysant les données de ces divers essais, une dégradation des composés mis en jeu est observée dès lors qu'une base forte est utilisée (telle que NaH, cf exp 1) ou que le milieu est placé au four à micro-ondes (en particulier pour des températures élevées, cf exp 2 et 4). Il semble par ailleurs que des sous-produits soient observés quelles que soient les conditions.

Pour ce qui concerne la purification, les essais par chromatographie flash sur gel de silice n'ont été que peu concluants. Les bispidones ne sont pas des composés très stables sur silice. Du fait du caractère acide de la silice, il est probable que les cycles pipéridones subissent des dégradations par ouverture de cycle. Il est en principe préférable d'effectuer des purifications par chromatographie seulement après réduction de la bispidone. Aussi, une recristallisation à partir du brut réactionnel est difficile car celui-ci contient plusieurs composés.

En revanche, dans le cas de L²⁸ il a été remarqué que les impuretés formées lors de cette réaction pouvaient être extraites. Après évaporation à sec du milieu réactionnel, il est repris dans du dichlorométhane et est lavé avec de l'eau pour extraire les sels de tosylate. Ensuite, une précipitation dans le diéthyl éther permet d'obtenir un mélange uniquement composé de L²⁶ et L²⁸ à partir duquel il est possible d'obtenir L²⁸ par cristallisation dans l'acétate d'éthyle. En revanche, cette précipitation dans le diéthyl éther n'est pas sélective à 100 % mais une grande majorité du composé cible peut être obtenue de cette façon.

Après une étude des conditions, la synthèse de L²⁸ a été effectuée sur une quantité bien plus importante, selon le Schéma 5.19. Le carbonate de sodium est utilisé comme base et le milieu est chauffé à 70°C pendant 26 jours. Je pense qu'il est tout à fait possible de faire cette réaction à une température un peu plus élevée (cf expérience 6), mais afin d'éviter toute dégradation sur un batch aussi important, la température est volontairement gardée un peu plus basse.

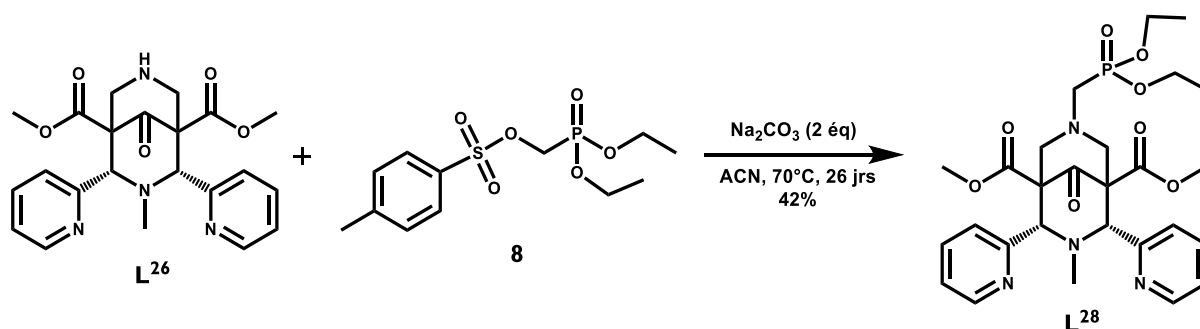


Schéma 5.19. Synthèse finale de L²⁸

Cette réaction est également suivie par RMN ¹H et ³¹P de manière similaire que précédemment. Dans ce cas, il a été possible également de contrôler l'avancement en intégrant les signaux des protons 6 et 8 axiaux.

Jours	Intégrale ^{31}P		Avancement
	15,2 ppm réactif	23,6 ppm produit	%
2	1	6,7	13
6	1	2,4	30
12	1	1,4	41
16	1	1,1	49
21	1	0,9	52
26	1	0,8	57

Tableau 5.4. Suivi de l'avancement de la réaction de formation de L^{28} par RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3)

On constate qu'il y a une bonne corrélation entre les deux suivis. Le suivi par RMN ^{31}P a pour avantage que seuls ces deux signaux à 15,2 et 23,6 ppm sont présents, mais le suivi de l'intégrale des signaux de divers protons permet d'obtenir une moyenne plus fiable.

Protons Ha		Protons H2 & H4		Protons H6 & H8 axiaux		Avancement
Réactif	Produit	Réactif	Produit	Réactif	Produit	%
2	0,22	1,98	0,24	2,02	0,23	10
2	0,72	2,06	0,71	2,1	0,76	26
2	1,17	1,99	1,16	2,05	1,25	37
2	1,69	1,98	1,65	2,07	1,715	46
2	2,07	2,11	2,11	2,24	2,13	50
2	2,52	1,89	2,58	2,22	2,79	56

Tableau 5.5. Suivi de l'avancement de la réaction de formation de L^{28} par RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Du fait de l'augmentation significative de la quantité de réactif, et pour des questions de gain de temps, la réaction est stoppée dès lors que l'avancement est évalué à 56 % comme le montrent les informations fournies Tableau 5.4 et Tableau 5.5 et les traitements sont réalisés.

Le rendement de la réaction, qui fait suite à une extraction liquide/liquide, une précipitation et une recristallisation est de 42 %, ce qui est tout de même élevé compte-tenu des traitements.

Etude RMN

Le spectre RMN ^1H du ligand L^{28} est représenté sur la Figure 5.18. Un seul ensemble de signaux est observé, ce qui montre que le ligand obtenu est symétrique. Cela nous permet de savoir que les groupements pyridines en position 2 et 4 sont en configuration *cis*. De plus, au niveau des signaux aromatiques, on constate une inversion de l'ordre des signaux. En effet, les déplacements chimiques des protons aromatiques du ligand L^{26} sont dans l'ordre suivant : Ha-Hc-Hd-Hb, tandis que pour L^{28} la position des protons Hc et Hd est inversé. Ceci suggère une modification de l'orientation des cycles pyridines par rapport à la cavité. Il

semble que pour le ligand L²⁶ les pyridines sont en position *syn* (atomes d'azote des pyridines orientés vers la cavité) et que pour le ligand L²⁸ les pyridines sont en position *anti* (atomes d'azote des pyridines orientés en dehors de la cavité).

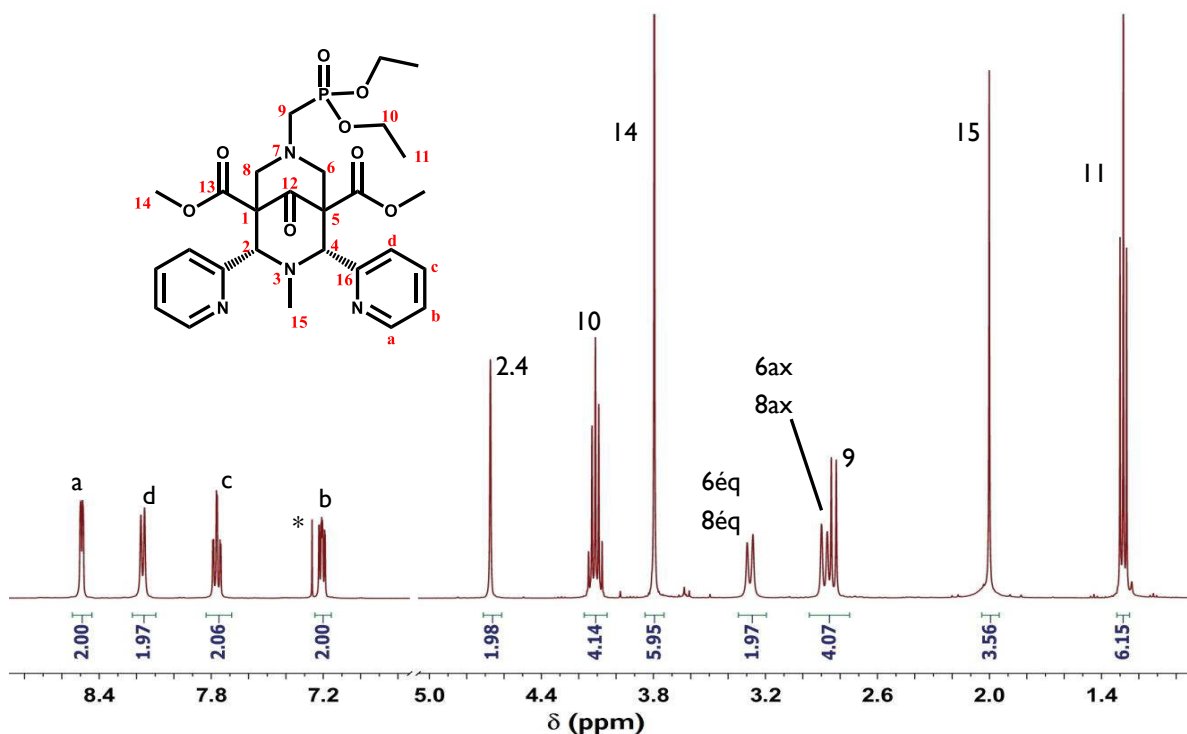


Figure 5.18. Spectre ¹H RMN ligand L²⁸ (400 MHz, *CDCl₃)

Un système AB est visible pour les protons H6 et H8, les paramètres sont les suivants :

$\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4) \times (\nu_2 - \nu_3))}$. Or on a ici $\nu_1 = 1319,4$; $\nu_2 = 1307,1$; $\nu_3 = 1160,2$; $\nu_4 = 1147,9$ et donc on obtient $\Delta\nu = 158,8$ Hz.

$J_{AB} = 12,3$ Hz soit $\Delta\nu/J_{AB} = 12,9$. Une structure en toit apparaît pour ce système AB.

Pour ce système : $\nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = 1233,6$ et donc $\nu_A = \nu_{\text{centre}} + \frac{1}{2}\Delta\nu = 1313,0$ Hz et $\nu_B = \nu_{\text{centre}} - \frac{1}{2}\Delta\nu = 1154,2$ Hz.

On note encore la présence de l'ester phosphonate de diéthyle avec un triplet à 1,28 ppm correspondant aux méthyles H11 ainsi qu'un quintuplet à 4,11 ppm correspondant aux protons H10. Ce quintuplet indique une interaction scalaire entre les protons H10 et les protons H11 ainsi que le ³¹P avec une constante de couplage ³J identique et égal à 7,2 Hz. Le couplage avec le ³¹P est également visible pour les protons H9 puisqu'un doublet est observé pour ceux-ci, avec une constante de couplage ²J de 10,7 Hz.

Le signal du ³¹P est montré sur la Figure 5.19 ci-après. Celui-ci s'apparente à un septuplet, ce qui est cohérent avec les couplages observés entre le ³¹P et les protons H9 et H10. En revanche, bien que le septuplet soit visible, le signal est assez large et les pics très rapprochés. Aussi, on sait de par la RMN ¹H que les constantes de couplage entre le ³¹P et

les protons H9 et entre le ^{31}P et les protons H10 sont différentes. Ce signal est par conséquent considéré comme un multiplet.

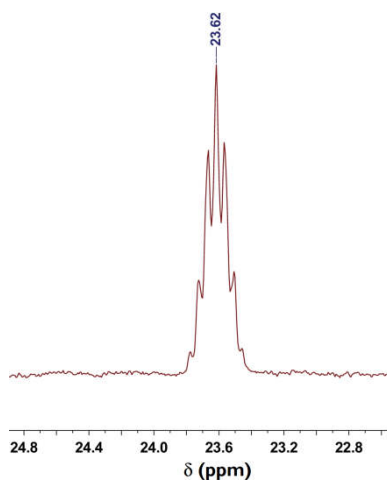


Figure 5.19. Signal ^{31}P du ligand L^{28} (162 MHz, CDCl_3)

Le spectre de corrélation ^1H - ^1H COSY permet de confirmer ces éléments, comme le montre la Figure 5.20. On remarque aussi sur ce spectre la présence d'un couplage 4J en W entre les protons H6,8 ax et les protons H2, H4 qui démontre que la bispidine est bien dans une conformation chaise-chaise.

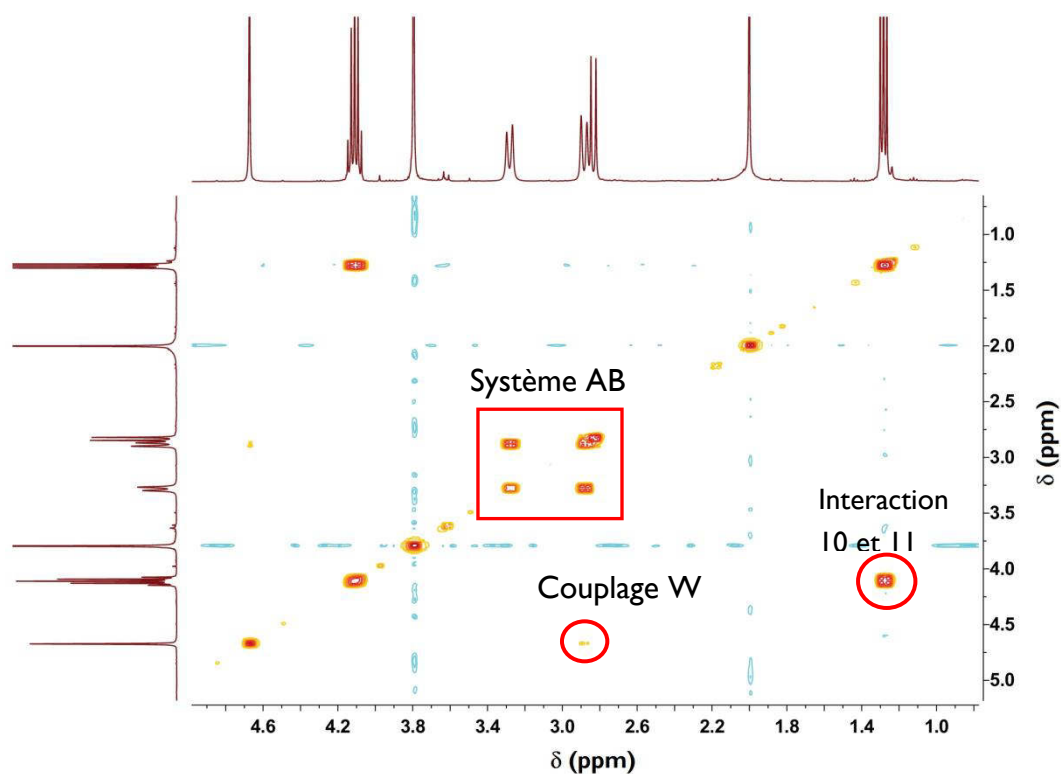


Figure 5.20. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{28} entre 0,8 et 5 ppm (400 MHz, CDCl_3)

Dans la zone des protons aromatiques, les interactions présentes entre les différents protons permettent d'attribuer les signaux correspondant (Figure 5.21).

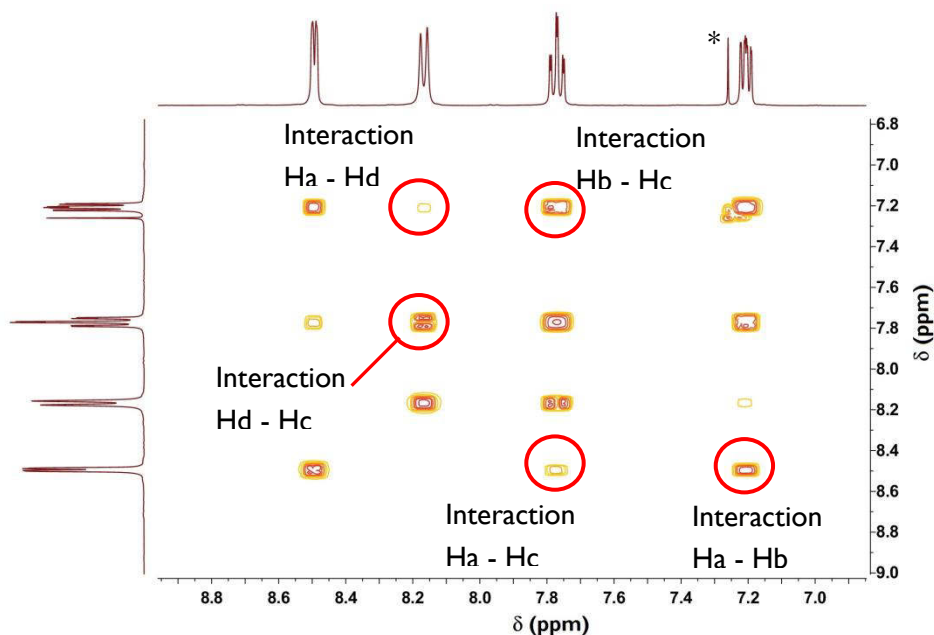


Figure 5.21. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{28} entre 6,8 et 9,1 ppm (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$)

Sur le spectre RMN par effet Overhauser plusieurs interactions sont importantes (Figure 5.22). Tout d'abord, on remarque la proximité spatiale des protons H10 et H11 du diéthyle phosphonate. Ensuite, au niveau des protons H9, on constate qu'ils interagissent dans l'espace avec les protons H6 et H8, mais préférentiellement avec les protons H6 et H8 en position équatoriale (interaction plus forte qu'avec les protons H6 et H8 en position axiale, très peu visible sur la Figure 5.22). Une interaction est également présente entre les protons H9 et les protons Hb. Il s'agit d'une interaction qui n'est pas observé lorsque les groupements pyridine sont en position *syn*. Il en est de même pour l'interaction visible entre les protons Hd et les protons H6, H8 éq. Enfin, malgré cette position des groupements pyridines, les protons Hd ont également une interaction spatiale avec les protons H2, H4 et les protons du méthyle en RI.

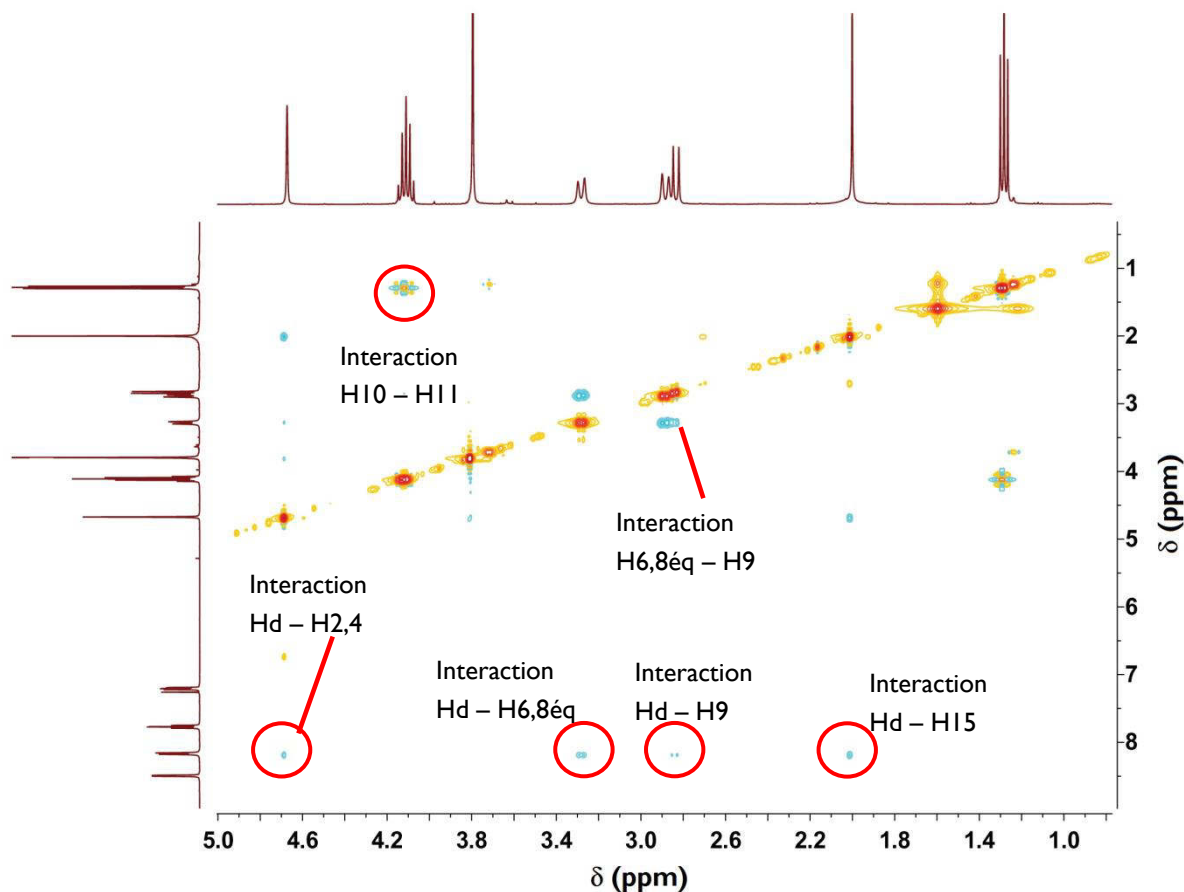
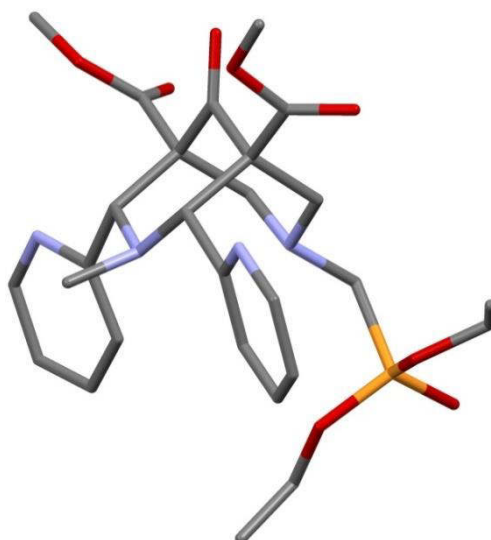


Figure 5.22. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de L^{28} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$)

Etude cristallographique

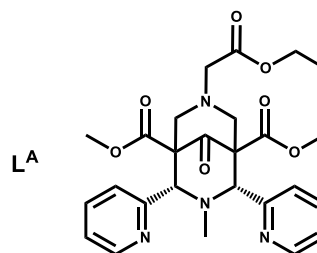
Par évaporation lente d'acétate d'éthyle, des monocristaux ont été obtenus de ce ligand dont la structure expérimentale a été déterminée par diffraction des rayons X.

Le ligand L^{28} cristallise dans le groupe d'espace $\text{P2}_1/\text{n}$, sa structure est représentée sur la Figure 5.23. Celle-ci permet de confirmer la conformation chaise-chaise de la bispidine. Dans ce cas-ci, aucune interactions intramoléculaires ne permettent un positionnement des cycles pyridines en position *syn*. Elles sont donc positionnées en *anti*. D'autre part, on note la présence du phosphonate de diéthyle en R2.

Figure 5.23. Structure cristallographique expérimentale de L²⁸

Des interactions intramoléculaires et intermoléculaires de type Van der Waals existent au sein de cette structure. Ces interactions impliquent les azotes pyridiniques, les azotes du cycle bispidine, les esters méthyliques mais également le diester phosphonate, qui interagit simultanément avec plusieurs bispidines voisines.

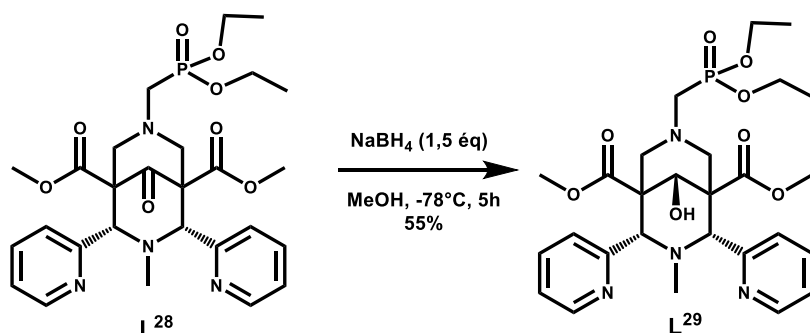
Ligand	Distance	
	N3 ...N7	Npy ...Npy
L ²⁸	2,966	7,181
L ^A	2,888	7,186

Tableau 5.6. Comparaison avec L^A

Si l'on compare les distances liées à la cavité et le positionnement des groupements pyridines par rapport à L^A,¹⁵ dont les groupements pyridines sont également en position *anti*, on remarque que les deux bispidines sont très similaires.

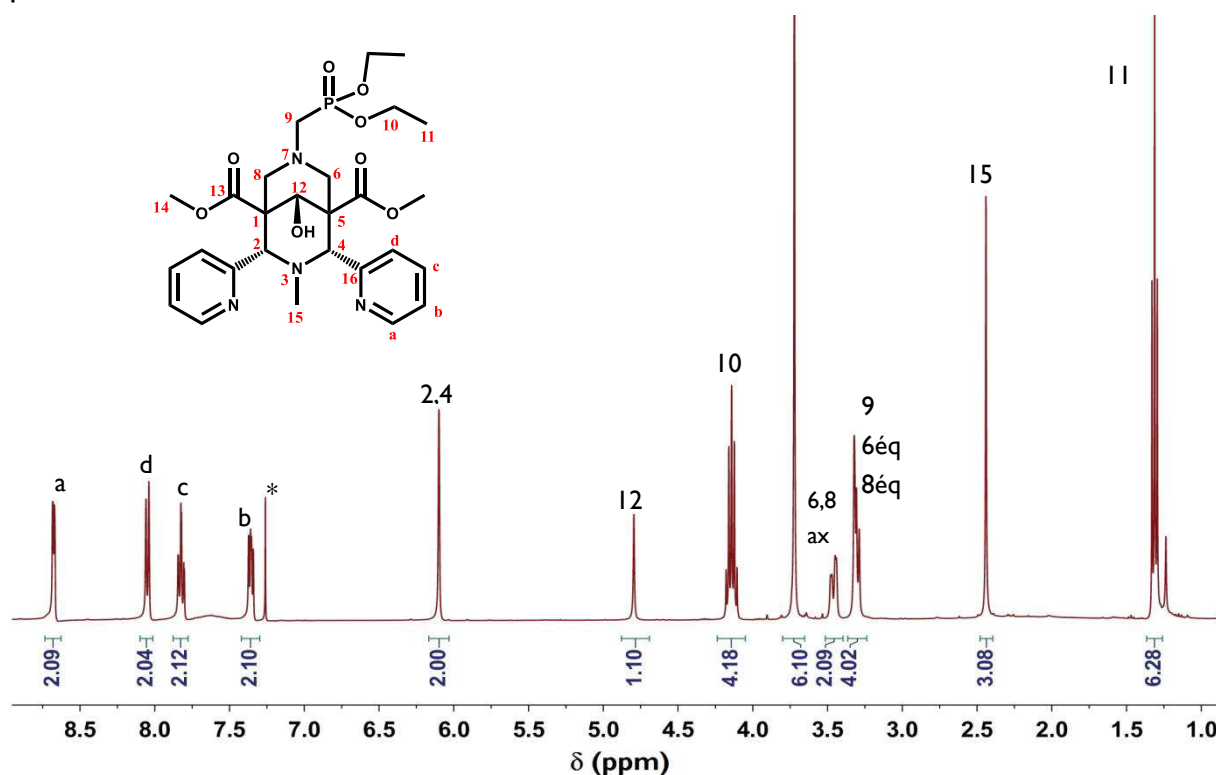
C) Ligand L²⁹

Suite à l'obtention de la bispidone L²⁸, celle-ci est réduite en bispidol par un mode opératoire classique : 1,5 éq d'hydruroborate de sodium dans le MeOH à -78°C. La réaction dure 5 h avant d'être stoppée par ajout de chlorure d'ammonium. Un avantage considérable ici est que le composé peut-être extrait par le dichlorométhane par extraction liquide-liquide.

Schéma 5.20. Synthèse de L²⁹

Après recristallisation dans l'acétate d'éthyle, le ligand est obtenu sous forme de poudre blanche. La pureté du composé est montrée par une étude RMN ¹H dont le spectre est représenté à la Figure 5.24.

Le succès de la réduction est vérifié par l'apparition du singulet à 4,80 ppm correspondant au proton H12.

Figure 5.24. Spectre RMN ¹H du ligand L²⁹ (400 MHz, *CDCl₃)

Par ailleurs, on remarque que les protons H6, H8 sont impliqués dans un système ABX. En effet, un couplage est observé entre les protons H6, H8 axiaux et les protons H6, H8 équatoriaux ainsi qu'un couplage en W entre les protons H6, H8 axiaux et les protons H2, H4. Ceux-ci sont révélés par l'analyse RMN ¹H-¹H COSY (Figure 5.25).

La constante J_{AB} mesurée est de 12,0 Hz tandis que la constante liée au couplage en W est $J_{BX} = 3,2$ Hz. Elle est observable au niveau du signal des protons H6, H8 axiaux mais seul un

singulet est observable pour les protons H2, H4. En revanche, aucun couplage n'est visible entre les protons H6, H8 axiaux et les protons H2, H4 ; il n'y a donc pas de couplage AX.

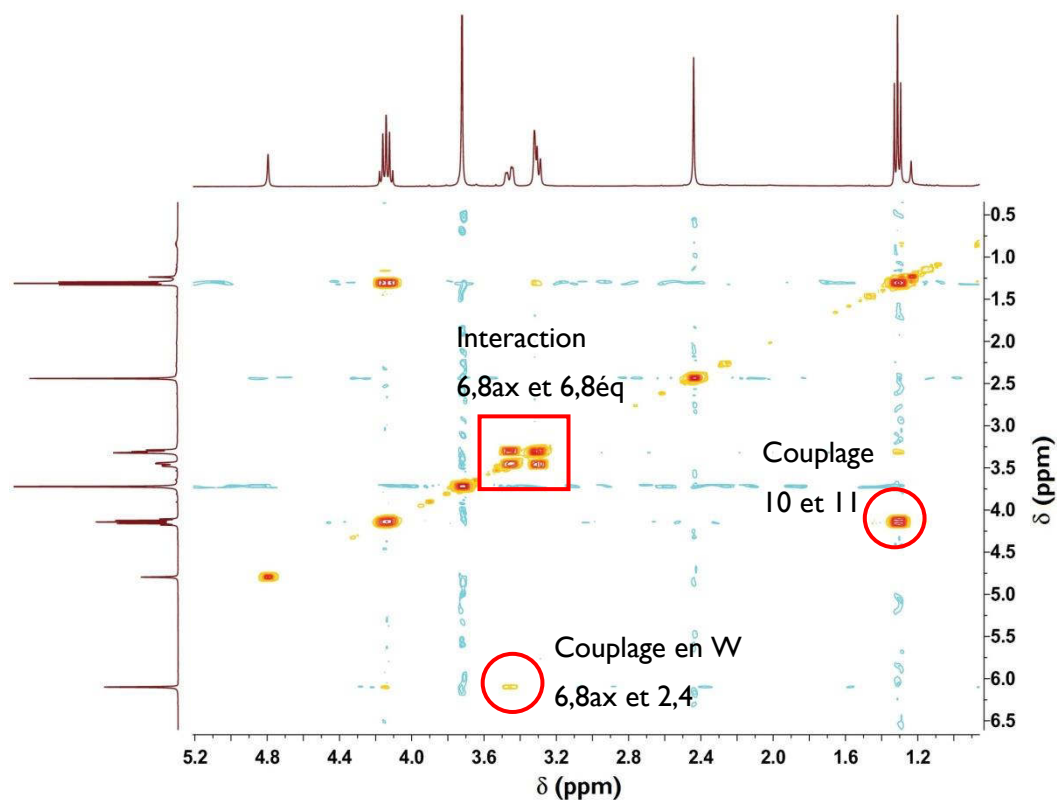


Figure 5.25. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY du ligand L^{29} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$)

Le spectre RMN ^1H - ^1H NOESY (Figure 5.26) nous permet de connaître la stéréochimie de la réduction telle qu'elle est annotée sur le Schéma 5.20.

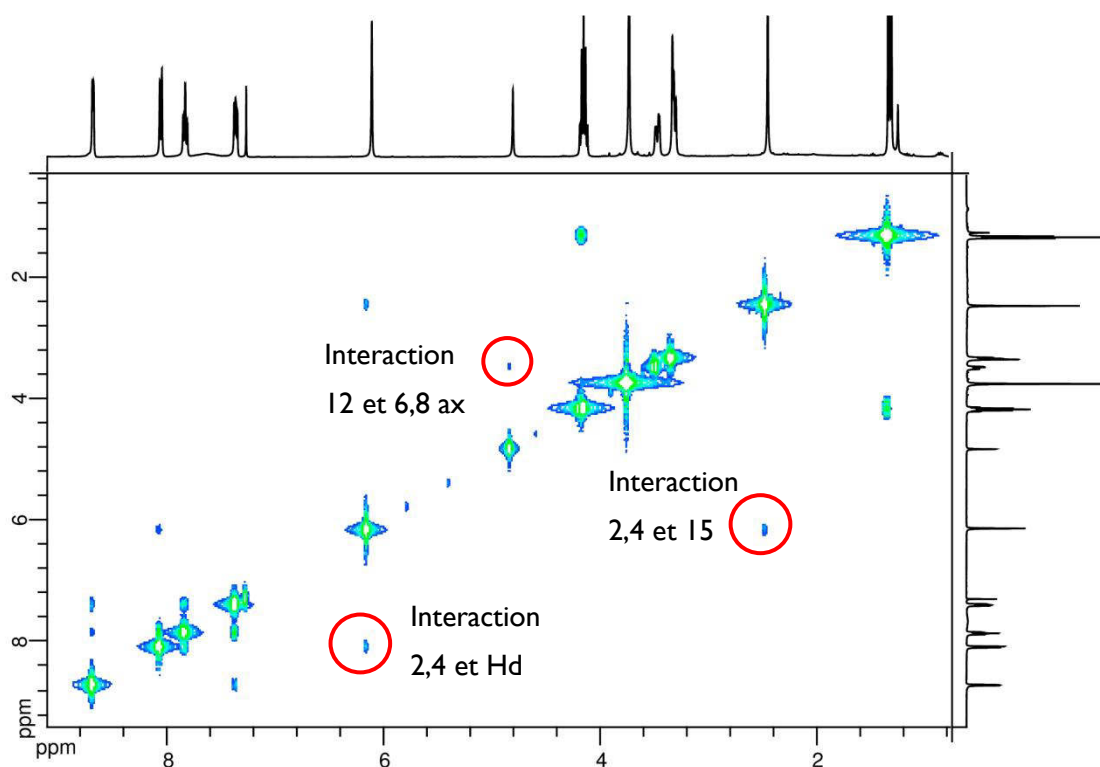


Figure 5.26. RMN ^1H - ^1H NOESY de L^{29} (400 MHz, CDCl_3).

En effet, une interaction spatiale est présente entre le proton H12, résultat de l'attaque de l'hydruire sur la cétone, et les protons H6, H8 axiaux. Cela implique que le proton H12 est orienté en direction de R2.

D) Ligand L^{30}

Désormais, à partir du ligand L^{29} , il est possible d'envisager la fonctionnalisation de celui-ci sur l'alcool secondaire et d'obtenir ainsi L^{30} , de même que pour la synthèse du ligand L^{22} . La déprotection successive de l'amine primaire permettrait d'obtenir le chélatant bifonctionnel L^{31} (Schéma 5.21).

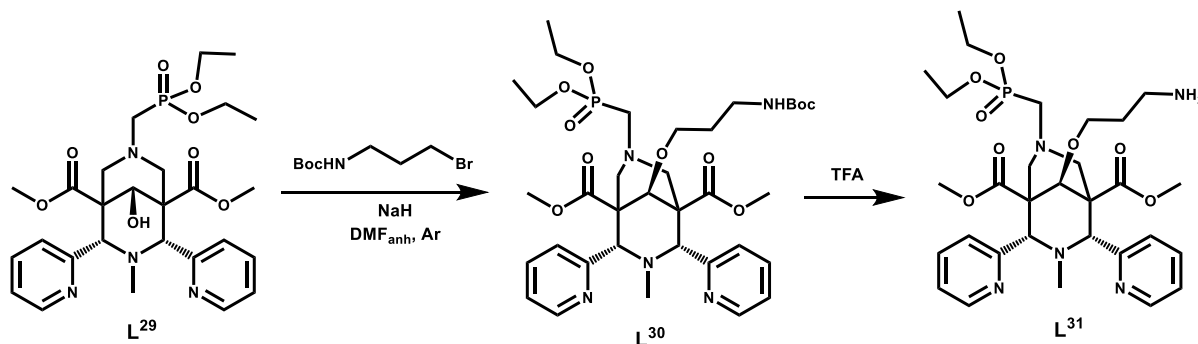


Schéma 5.21. Synthèse générale de L^{30} et L^{31}

Cette synthèse a été réalisée dans différentes conditions.

- Des conditions similaires à la synthèse de L^{22} ont tout d'abord été utilisées : DMF anhydre, hydruire de sodium à température ambiante.

- Dans un second temps, l'ajout de base a été effectuée à -42°C , température maintenue pendant 2 h après ajout, à l'aide d'un bain acétonitrile/azote liquide, les autres conditions demeurant identiques à la synthèse de L^{22} .
- Un essai a également été effectué en utilisant le n-butyllithium, base plus forte que l'hydrure de sodium.

Au vu des analyses RMN de divers bruts réactionnels, il semblait que la réaction n'ait pas lieu et des dégradations des réactifs ont été en général observées. Le suivi CCM dans ce cas-ci est également difficile, les composés, si toutefois présents, sont difficilement différenciables. Les dégradations sont probablement liées entre autres aux esters phosphonate et carboxylate.

Dans le cas de l'utilisation du n-butyllithium, il est probable que d'autres mécanismes de dégradation aient eu lieu.

D'autre part, du fait de ce mélange de composés, il a été difficile de confirmer par RMN si la réaction de fonctionnalisation était effectivement efficace.

Malgré tout, dans le cas de l'essai réalisé à -42°C , la réaction a été stoppée après 5 h (2 h à -42°C puis 3 h à température ambiante) par ajout d'une solution aqueuse de chlorure d'ammonium. Une extraction liquide-liquide dans un mélange DCM/ H_2O a été réalisée ensuite. Le mélange obtenu en phase organique a été analysé par spectrométrie de masse (ESI-MS en mode positif) et le spectre de masse obtenu est représenté à la Figure 5.27.

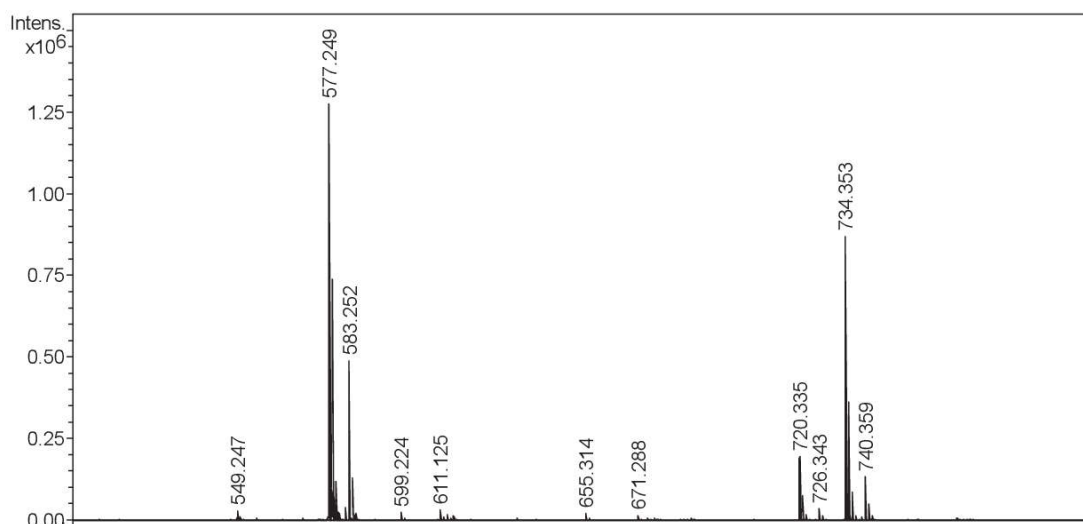


Figure 5.27. Spectre de masse (ESI-MS) d'un échantillon de la synthèse de L^{30} en mode positif

Le ligand L^{29} possède une masse moléculaire exacte de 576,23 g/mol, ainsi le pic pour lequel $m/z = 577,249$ correspond à l'espèce $[\text{L}^{29}+\text{H}]^+$. De même, le ligand L^{30} possède une masse moléculaire exacte de 733,35 g/mol, ainsi le pic pour lequel $m/z = 734,353$ correspond à l'espèce $[\text{L}^{30}+\text{H}]^+$. Etant donné la distribution isotopique des pics pour lequel $m/z = 583,252$ et 740,359, ceux-ci correspondent à priori aux adduits de lithium, soit $[\text{L}^{29}+\text{Li}]^+$ et $[\text{L}^{30}+\text{Li}]^+$.

Ainsi on constate dans le mélange obtenu la présence du produit de départ mais également du composé L^{30} désiré.

D'autre part, un pic pour lequel $m/z = 720,335$ est également visible, il pourrait correspondre au ligand protoné L^{30} dont l'un des esters carboxylate serait saponifié (la masse exacte de L^{30} est de 719,33 g/mol).

A partir de cela, les conditions de purification par FPLC sont en cours d'optimisation, le ligand L^{30} pur n'a pas été obtenu à ce jour.

4.3 Voie B

La seconde voie possible à partir de L^{25} consiste à la réduction de la bispidone en bispidol de sorte à pouvoir effectuer l'alkylation, avant de déprotéger l'amine en R2.

A) Ligand L^{32}

La première synthèse concerne donc la réduction en présence d'hydruroborate de sodium dans le MeOH à -78°C .

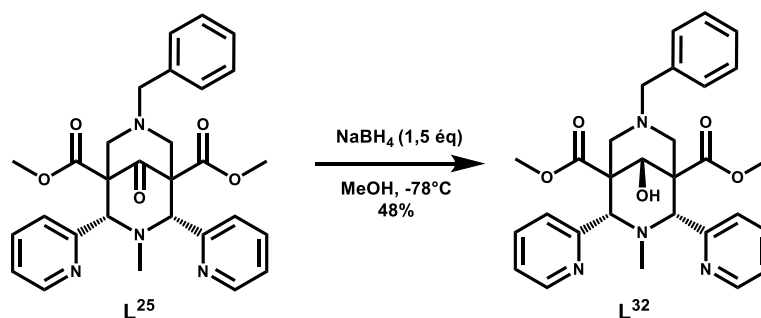


Schéma 5.22. Synthèse du ligand L^{32} Le ligand L^{32} est ensuite obtenu par purification sur une colonne de gel de silice (DCM/MeOH 100/0 à 70/30). Le composé est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 48 %.

Le spectre RMN ^1H obtenu dans le CDCl_3 est représenté sur la Figure 5.28.

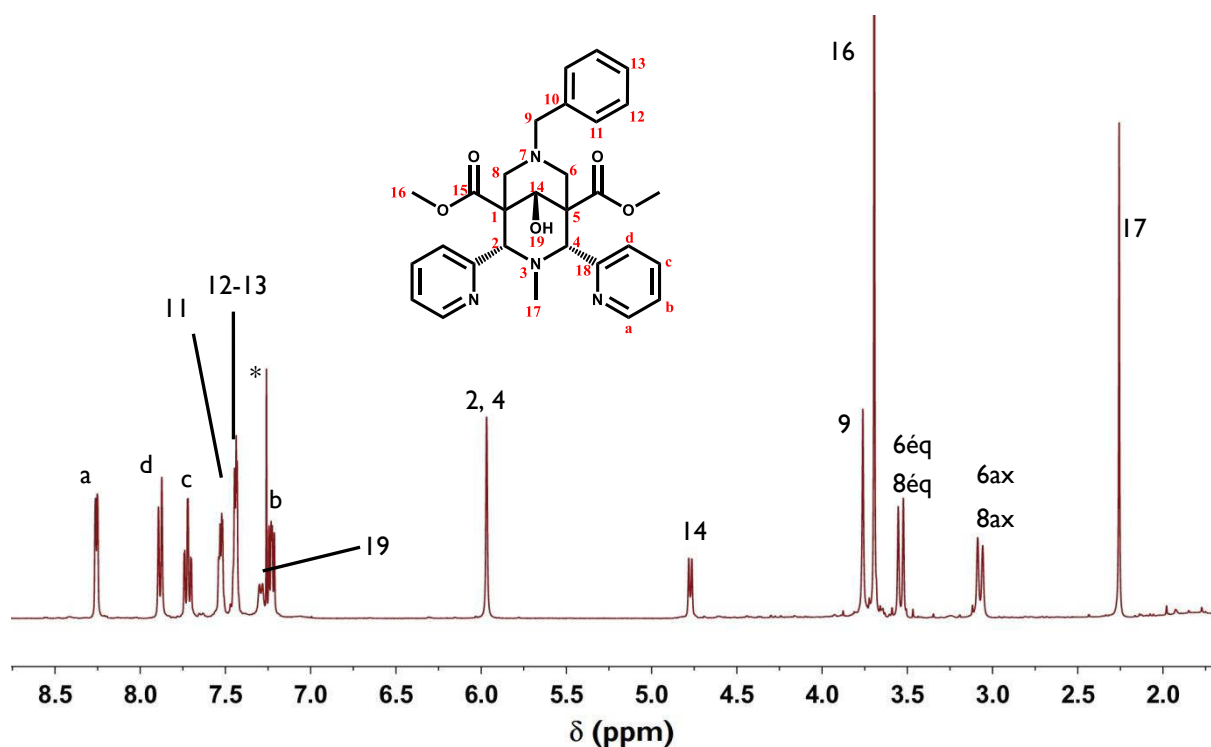


Figure 5.28. Spectre RMN ^1H de L^{32} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$)

Un élément remarquable sur ce spectre RMN ^1H est la présence d'un doublet correspondant au proton de l'alcool H19 pour un déplacement chimique de 7,3 ppm. Un couplage est observé entre celui-ci et le proton 14. Ce couplage est mis en évidence sur le spectre RMN ^1H - ^1H COSY représenté ci-après (Figure 5.29).

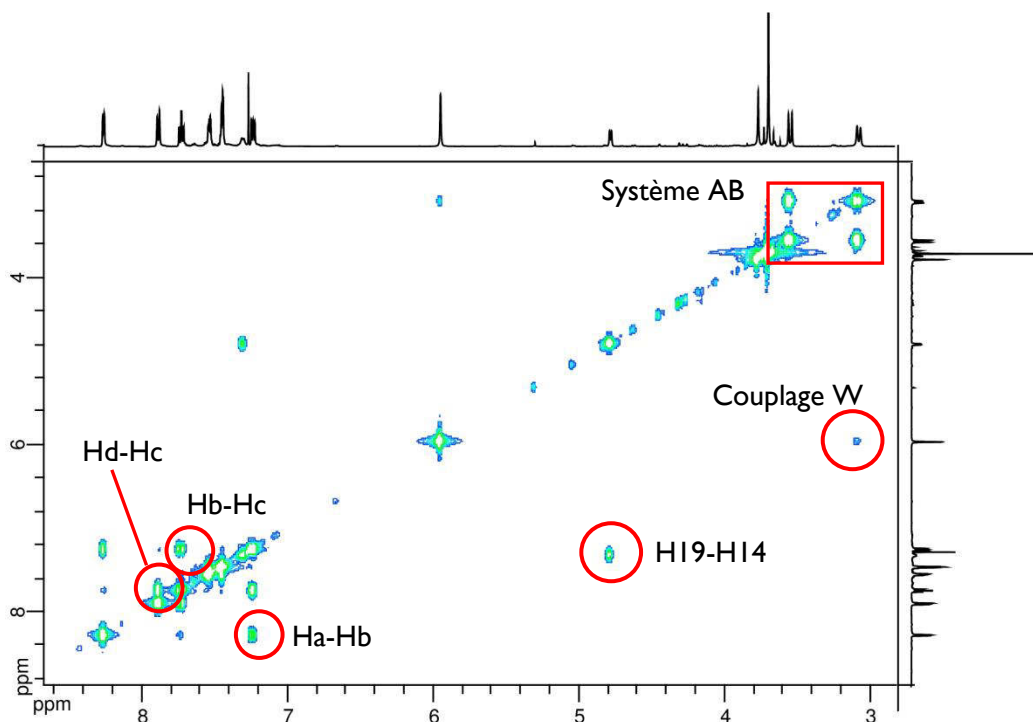


Figure 5.29. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{32} (500 MHz, CDCl_3)

On note également la présence du système AB pour les protons H6 et H8 pour lequel les

paramètres sont les suivants : $\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4)(\nu_2 - \nu_3))}$.

Or ici $\nu_1 = 1393,4$; $\nu_2 = 1381,1$; $\nu_3 = 1230,9$; $\nu_4 = 1219,1$ et donc on obtient $\Delta\nu = 158,8$ Hz. Aussi, $J_{AB} = 12,1$ Hz soit $\Delta\nu/J_{AB} = 13,5$. Une structure en toit est légèrement visible pour ce système AB. Enfin : $\nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = 1306,0$ Hz et donc $\nu_A = \nu_{\text{centre}} + \frac{1}{2}\Delta\nu = 1387,0$ Hz et $\nu_B = \nu_{\text{centre}} - \frac{1}{2}\Delta\nu = 1225,1$ Hz.

Un couplage en W dont la constante est trop faible ici est présent entre les protons H6, H8 axiaux et les protons H2, H4.

Enfin, les couplages observés au niveau des protons aromatiques permettent d'attribuer la position de chacun des protons des cycles pyridines.

Un dernier élément concerne la stéréochimie de la réduction. L'agrandissement du spectre NOESY (Figure 5.30) nous permet de voir une interaction spatiale entre H14 et les protons H6, H8 axiaux, démontrant ainsi la stéréochimie notée sur le Schéma 5.22.

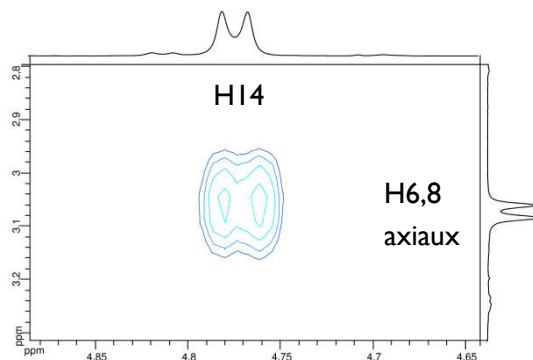


Figure 5.30. Agrandissement du spectre ^1H - ^1H NOESY de L^{32} (500 MHz, CDCl_3)

B) Ligand L^{33}

Les conditions de la réaction d'O-alkylation ici sont des conditions classiques. Le ligand L^{32} est placé dans de la DMF, à température ambiante et sous atmosphère inerte. A ce mélange l'hydruide de sodium est ajouté ainsi que la chaîne bromo-propyle NHBoc. La réaction se déroule à température ambiante en suivant l'apparition sur plaque CCM du ligand L^{33} (Schéma 5.23).

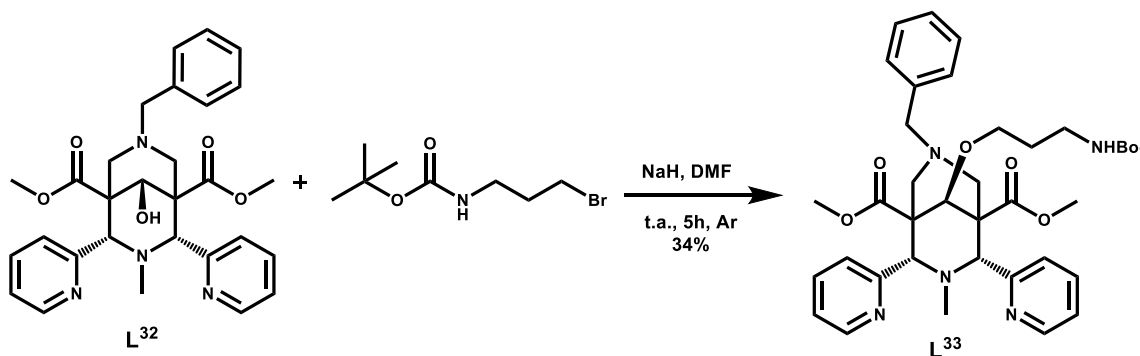


Schéma 5.23. Synthèse de L^{33}

Le rendement de cette réaction est de 34 %. Le rendement pourrait être augmenté par l'ajout d'un excès de NaH, mais la présence d'eau implique alors une saponification des esters méthyliques.

Le spectre RMN ^1H obtenu après purification sur colonne de gel de silice avec comme éluant le système DCM/MeOH de 100/0 à 70/30 est représenté sur la Figure 5.31. Il semble que le composé soit présent sous différentes formes protonées et des pics larges sont obtenus pour celui-ci. Il est possible que des liaisons hydrogène présentes entre la chaîne et des atomes d'azote du squelette bispidine ou des cycles pyridines soient responsables d'un élargissement du signal. Ces interactions n'ont néanmoins pas pu être mises en évidence par la RMN NOESY bidimensionnelle.

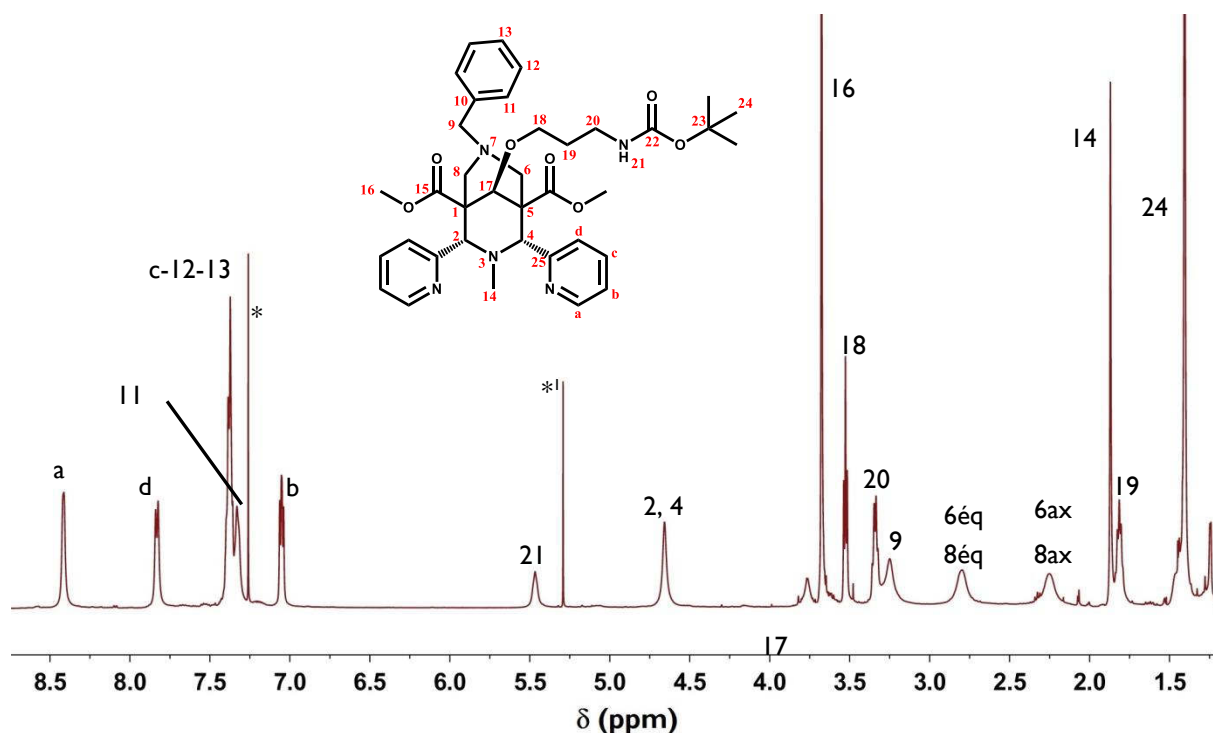


Figure 5.31. Spectre RMN ^1H de L^{33} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$, $^*\text{1DCM}$)

On remarque en RMN ^1H - ^1H COSY (Figure 5.32) que dans ce cas-ci, le couplage entre les protons H6, H8 axiaux et les équatoriaux est très faible, contrairement à L^{25} ou L^{32} . En revanche, cette même analyse permet de mettre en évidence les couplages au niveau de la chaîne alkyle, puisque les protons H19 interagissent avec les protons H18 et H20. Un couplage de cette chaîne est également visible entre H20 et H21.

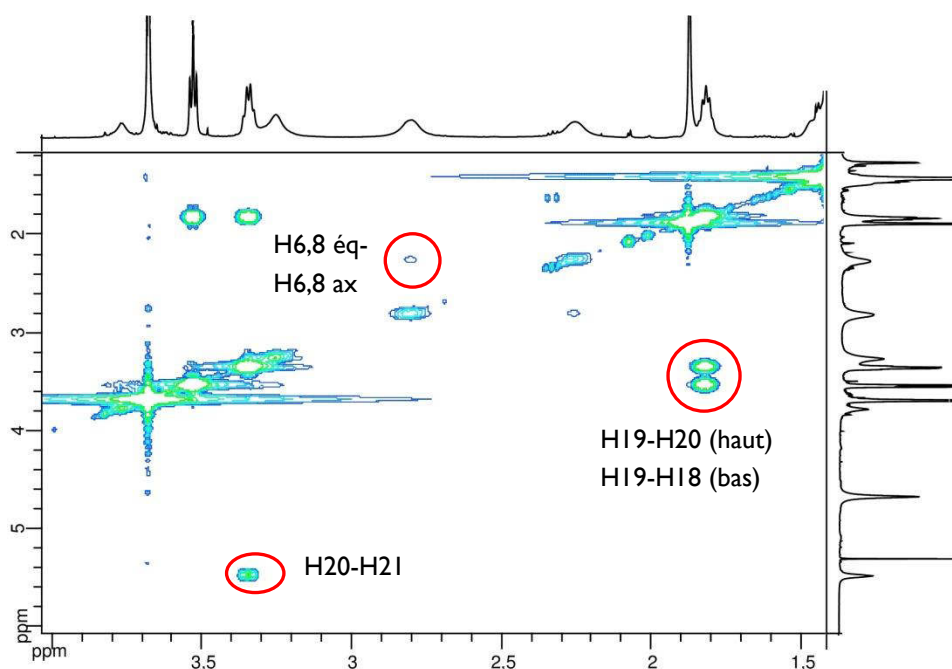


Figure 5.32. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{33} (400 MHz, CDCl_3)

On peut voir d'après la RMN NOESY bidimensionnelle (Figure 5.33) que les cycles pyridines sont en position anti. En effet, une interaction spatiale est présente entre les protons Hd et les protons H6 et H8 en position équatoriale, interaction qui n'est possible que dans cette configuration. On remarque également que le motif des aromatiques sur le spectre RMN ^1H est identique à L^{29} . L'interaction spatiale visible entre H9 et H11 permet d'attribuer la position des protons H11.

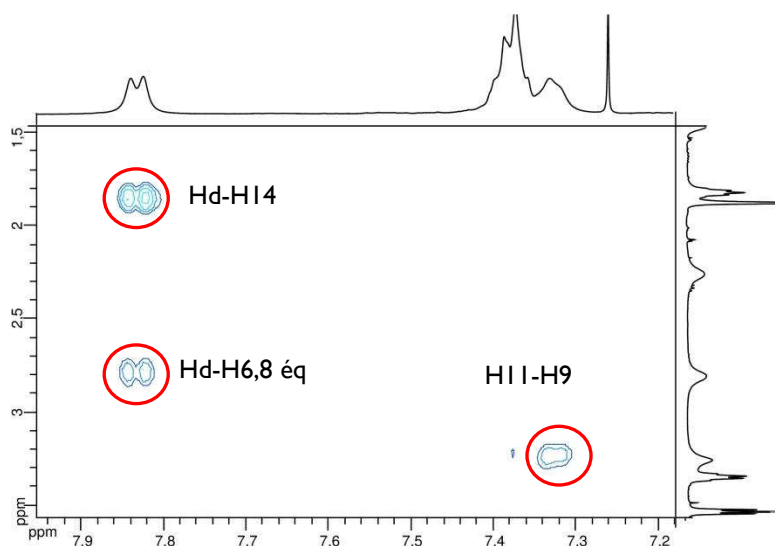
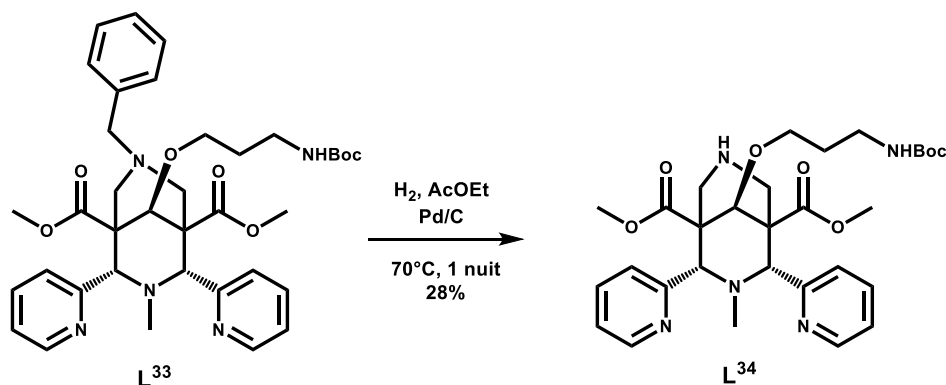


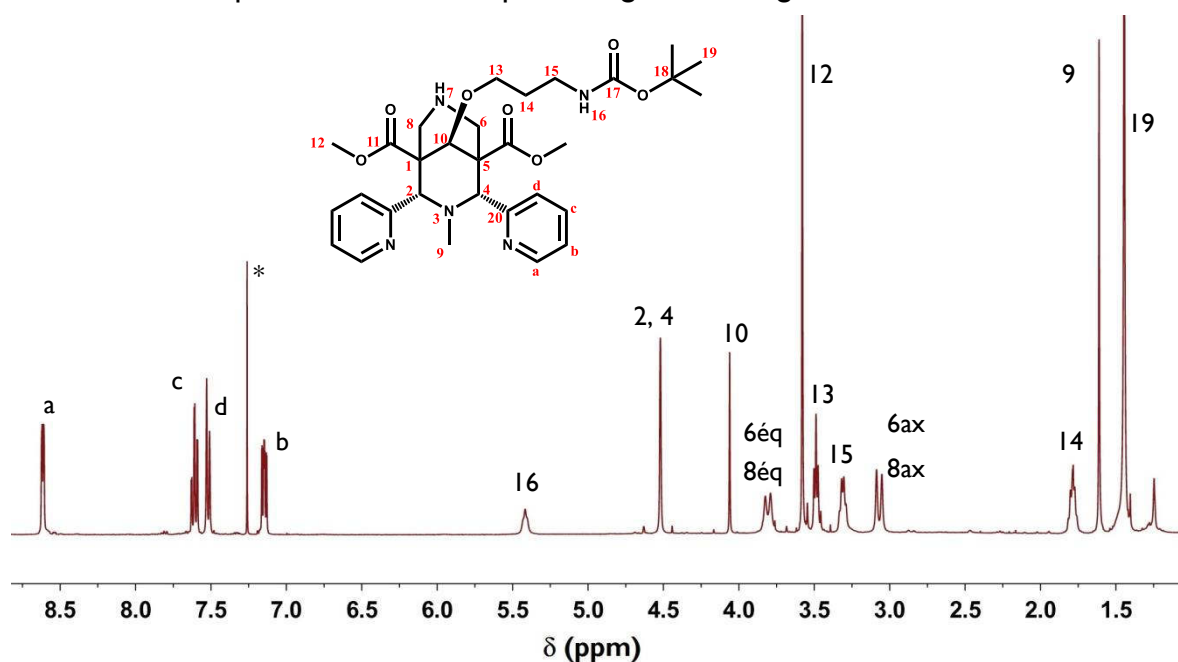
Figure 5.33. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de L^{33} (400 MHz, CDCl_3).

C) Ligand L^{34}

La dernière étape effectuée pour cette voie est l'hydrogénolyse de L^{33} . Cette synthèse est effectuée dans l'acétate d'éthyle, à 70°C pendant 1 nuit.

Schéma 5.24. Synthèse de L³⁴.

Au cours de la synthèse, qui possède un rendement assez faible, une dégradation a été observée. Néanmoins, l'analyse RMN ¹H a révélé la présence du composé avec la disparition du groupement benzyle par rapport à L³³. Aussi, ce composé s'est dégradé avec le temps. L'attribution du spectre est effectuée par analogie avec le ligand L³³.

Figure 5.34. Spectre RMN ¹H de L³⁴ (400 MHz, *CDCl₃).

On remarque au niveau des signaux des protons aromatiques une inversion entre les protons Hd et les protons Hc par rapport à L³³. Il semble qu'une inversion de la position des cycles pyridines se soit produite et que ceux-ci soit désormais en position *syn*. Cette inversion est peut-être liée aux interactions entre le ligand et le catalyseur au cours de la réaction.

4.4 Conclusion

En conclusion sur cette stratégie, il est très satisfaisant de constater qu'elle peut permettre l'obtention du CBF L³⁰ pour lequel il est encore nécessaire d'optimiser les conditions de

purification et d'effectuer la déprotection de l'amine primaire. Il semble cependant que la voie A est plus intéressante que la voie B. L'étape de phosphorylation étant lente, il est préférable de l'effectuer sur le composé L²⁸ plutôt que L³⁴. De plus, une dégradation est observée voie B pour la synthèse de L³⁴. Un dernier point qu'il est intéressant de rappeler est que la fonctionnalisation par cette stratégie influence peu la coordination par rapport à la stratégie I ; les pKas du ligand ne sont pas modifiés et la fonction de greffage est plus éloignée dans l'espace du site de coordination.

5. Stratégie 4

Cette quatrième stratégie consiste à coupler sélectivement la bispidine L³² précédemment obtenue lors de la stratégie 3 sur une fonction acide carboxylique. Cette stratégie implique l'obtention du dérivé mono-acide L³⁵.

5.1 Ligand L³⁵

Le ligand L³⁵, représenté sur le Schéma 5.3, est particulièrement important puisqu'il est le produit de départ des deux voies de synthèse suivies pour la stratégie 4. Sa synthèse est effectuée dans des conditions douces : à température ambiante pendant plusieurs jours et en présence d'hydroxyde de lithium (Schéma 5.25).

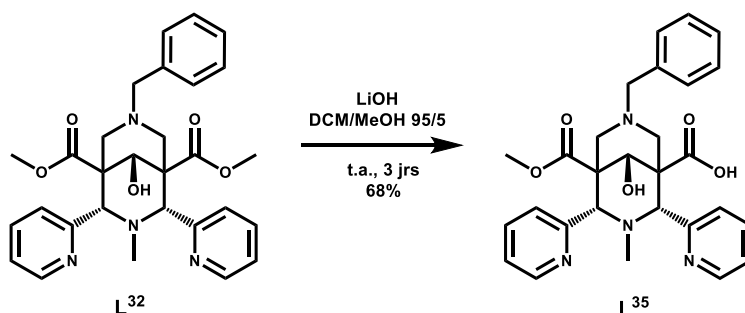


Schéma 5.25. Synthèse du ligand L³⁵.

Dans des conditions plus fortes (utilisation d'une base plus forte, par exemple l'hydroxyde de sodium, des températures plus élevées (par ex 40°C) ou encore un excès trop important de base), la saponification du second ester est également observée. Pour purifier ce composé, deux chromatographies (phase normale puis phase inverse) sont nécessaires. Au cours de cette purification, environ 50% du produit de départ est récupéré, ce qui permet d'obtenir le ligand avec un rendement satisfaisant de 68%. Le spectre RMN ¹H est annoté sur la Figure 5.35.

Cette saponification sélective de L³² a permis d'obtenir un bispidol dissymétrique, avec d'une part un carboxylate de méthyle en position C1 et un acide carboxylique en position C5 (ou inversement). Cela implique une différenciation des déplacements chimiques des signaux à proximité de ces deux différentes fonctions.

Grâce aux analyses RMN NOESY et COSY, il est possible de connaître et de différencier les déplacements chimiques de chacun des protons.

Sur le Schéma 5.26 le bispidol est représenté dans deux configurations différentes. Le bispidol est partagé en deux parties, de part et d'autre du plan formé des atomes N3, N7 et de la fonction alcool, colorées en violet et bleu et les interactions NOESY mentionnées ci-après sont notées par des parenthèses vertes.

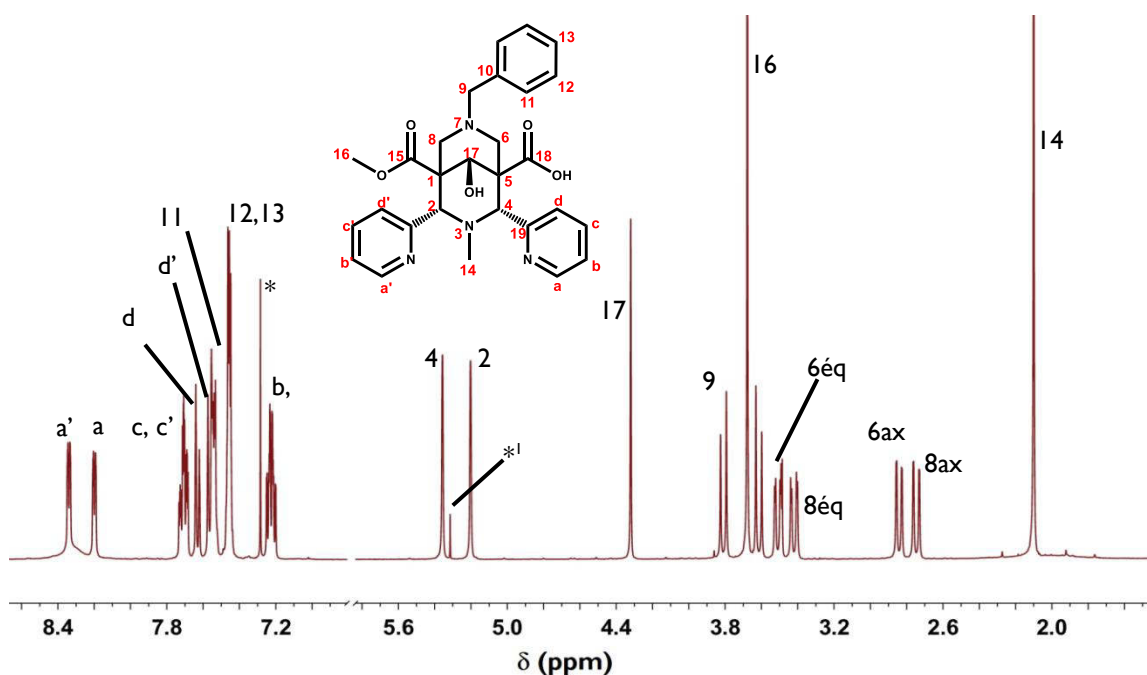


Figure 5.35. Spectre RMN ^1H de L^{35} (500 MHz, $^*\text{CDCl}_3$, $^*\text{DCM}$)

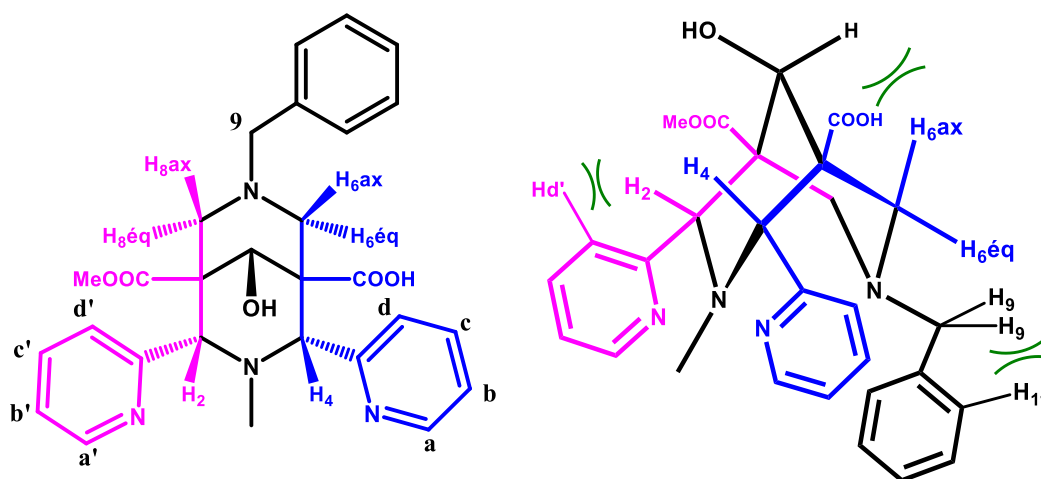


Schéma 5.26. Structure du bispidol L^{35}

Sur le Tableau 5.7 figure l'ensemble des déplacements chimiques des atomes d'hydrogènes présents de chaque côté avec en gras celui qui se trouve en position la plus déblindée.

Protons	δ (ppm) Côté violet	δ (ppm) Côté bleu
H2/H4	5,18	5,33
H6ax/H8ax	2,72	2,82
H6éq/H8éq	3,4	3,49
Ha/Ha'	8,32	8,18
Hb/Hb'	7,19	7,21
Hd/Hd'	7,54	7,61

Tableau 5.7. Déplacements chimiques des atomes d'hydrogène de L³⁵ obtenus par RMN ¹H (500 MHz, *CDCl₃)

Du fait de l'effet inductif donneur plus fort de l'acide carboxylique par rapport à l'ester carboxylique, un déblindage plus fort est attribué aux protons H4 et H6, en position β par rapport à l'acide carboxylique. De ce fait on a $\delta_{H2} = 5,18 > \delta_{H4} = 5,33$. A partir du déplacement chimique de ces deux protons, il est possible de connaître le déplacement chimique des protons H6 et H8 axiaux.

Nous sommes ici en présence d'un système AA'XX' au niveau des protons H6 et H8 avec un couplage ⁴J en W comme nous en avons déjà rencontré, mais également un couplage en U Figure 5.36. On observe en effet sur le spectre RMN ¹H-¹H COSY (Figure 5.37) une interaction scalaire entre les protons H6 axial (X) et H8 axial (X') ainsi qu'une interaction entre les protons H6 équatorial (A) et H8 équatorial (A'). La première est un couplage en U et la seconde un couplage en W.

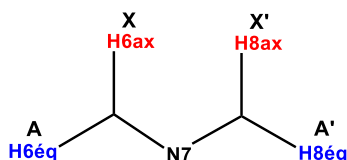


Figure 5.36. Description du système AA'BB'

Le couplage fort du système est un couplage entre A et X ainsi qu'entre A' et X' avec $J_{AX} = J_{A'X'} = 12,8$ Hz. Le couplage en W entre A et A' est un couplage plus faible avec $J_{AA'} = 2,5$ Hz. Enfin, le couplage en U entre X et X' est un couplage faible avec $J_{XX'} = 1,4$ Hz. Aucun couplage n'est observé entre X et A' ou entre A et X', puisque l'arrangement spatial ne le permet pas.

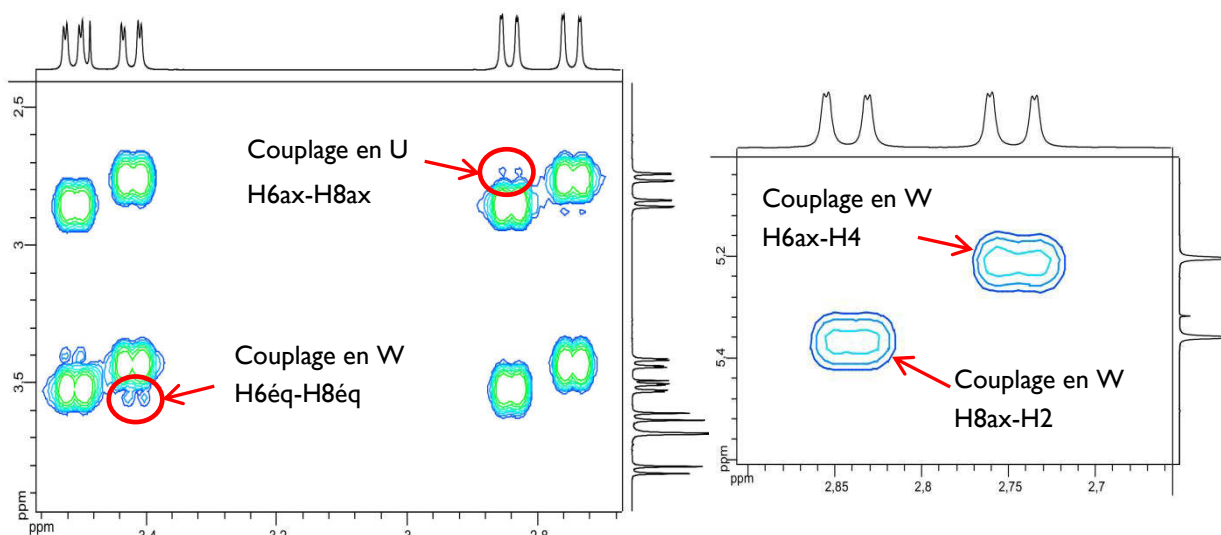


Figure 5.37. RMN ^1H - ^1H COSY de L^{35} (500 MHz, CDCl_3) mettant en évidence les couplages en U et en W.

Sur la Figure 5.37, un couplage en W est également présent entre les protons H6 et H8 axiaux et les protons H2 et H4. Cependant, ce couplage est trop faible pour pouvoir en déterminer la constante.

Un système AB est visible pour les protons 9, les paramètres sont les suivants :

$$\Delta\nu = \sqrt{((\nu_1 - \nu_4) \times (\nu_2 - \nu_3))} \text{ avec } \nu_1 = 1900,1 ; \nu_2 = 1887,3 ; \nu_3 = 1803,2 ; \nu_4 = 1790,4 ;$$

on obtient donc $\Delta\nu = 96,0$ Hz. Aussi, $J_{AB} = 12,8$ Hz soit $\Delta\nu/J_{AB} = 7,5$. Une structure en toit apparaît pour ce système AB.

Pour ce système : $\nu_{\text{centre}} = \frac{1}{2}(\nu_2 + \nu_3) = 1845,2$ et donc $\nu_A = \nu_{\text{centre}} + \frac{1}{2}\Delta\nu = 1893,2$ Hz et $\nu_B = \nu_{\text{centre}} - \frac{1}{2}\Delta\nu = 1797,2$ Hz.

D'autre part, il est possible de connaître, à partir du spectre NOESY bidimensionnel, la position de chacun des cycles pyridine par rapport aux deux parties du ligand, côté acide carboxylique ou côté ester. En effet, une interaction spatiale est visible entre H2 et Hd', de même qu'entre H4 et Hd.

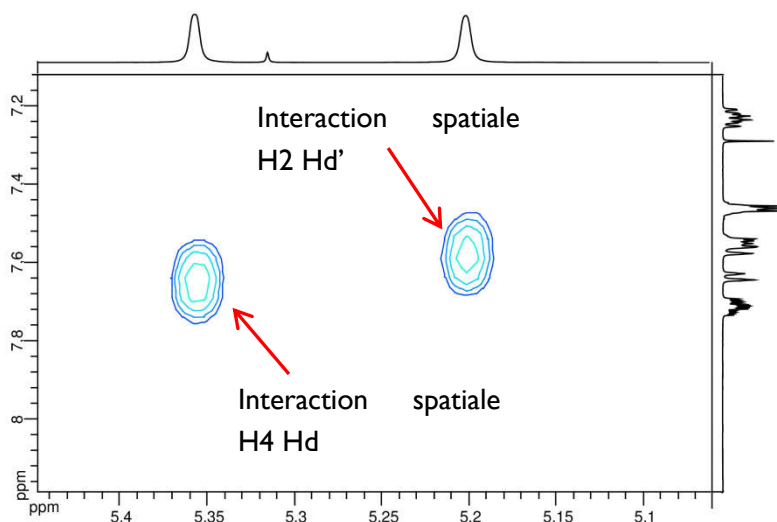


Figure 5.38. RMN ^1H - ^1H NOESY de L^{35} (500 MHz, CDCl_3).

A partir de ces données, la RMN COSY ^1H - ^1H permet de déterminer le déplacement chimique des différents protons des cycles pyridines, et ainsi de les différencier. Sur la Figure 5.39 (partie gauche) des interactions scalaires entre Ha' et Hb' , entre Ha et Hb sont présentées. Pour les protons c et c' , les déplacements chimiques sont très similaires et ils ne sont pas différenciables. En revanche, à partir des protons a et a' , bien que l'interaction soit plus faible, il est possible de confirmer la différenciation entre Hd et Hd' observée en NOESY.

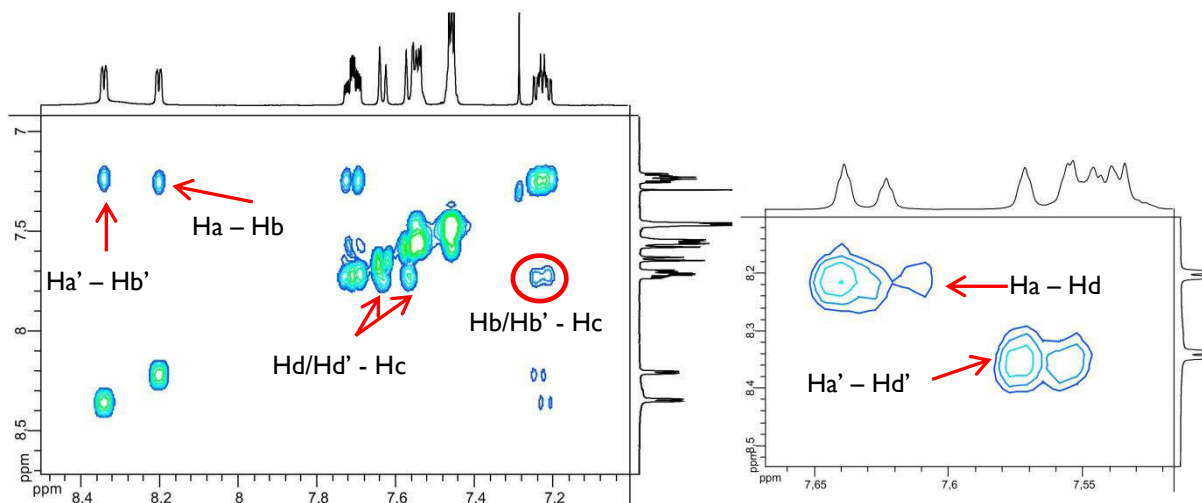


Figure 5.39. RMN ^1H - ^1H COSY de L^{35} ; protons aromatiques (500 MHz, CDCl_3).

5.2 Voie C

A) Ligand L^{36}

La voie C consiste à effectuer la déprotection de l'amine en R2 avant de fonctionnaliser sur l'acide carboxylique. Pour cela, le ligand L^{35} est placé dans des conditions d'hydrogénolyse

qui avaient été utilisés au préalable de cette synthèse : EtOH, catalyseur au palladium, le tout placé à reflux sous un bullage d'hydrogène.

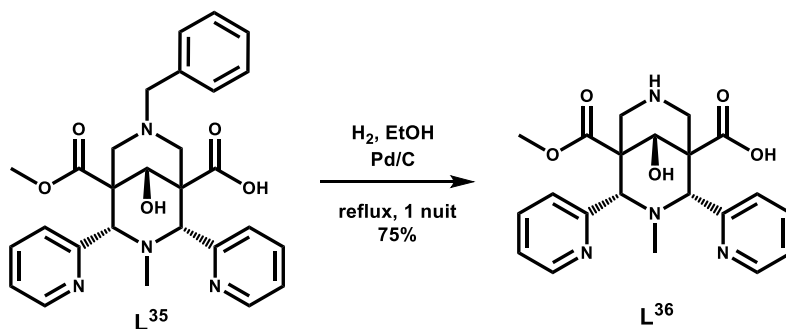


Schéma 5.27. Synthèse du ligand L³⁶

Plus tard dans les synthèses effectuées au cours de cette thèse, il a été remarqué (voir la synthèse de L²⁶) que d'utiliser l'EtOH comme solvant provoquait une dégradation de L²⁶. Ici une telle dégradation était bien moins importante, mais tout de même présente, comme le montre le spectre RMN ¹H représenté sur la Figure 5.40. Le rendement de cette synthèse est de 75 %.

Tout d'abord, on constate que le groupement benzyle n'est plus présent et qu'une dissymétrie est observée, de même que pour L³⁵. Il est également possible de différencier les signaux des protons, en considérant également que la présence de l'acide carboxylique implique un déblindage plus fort.

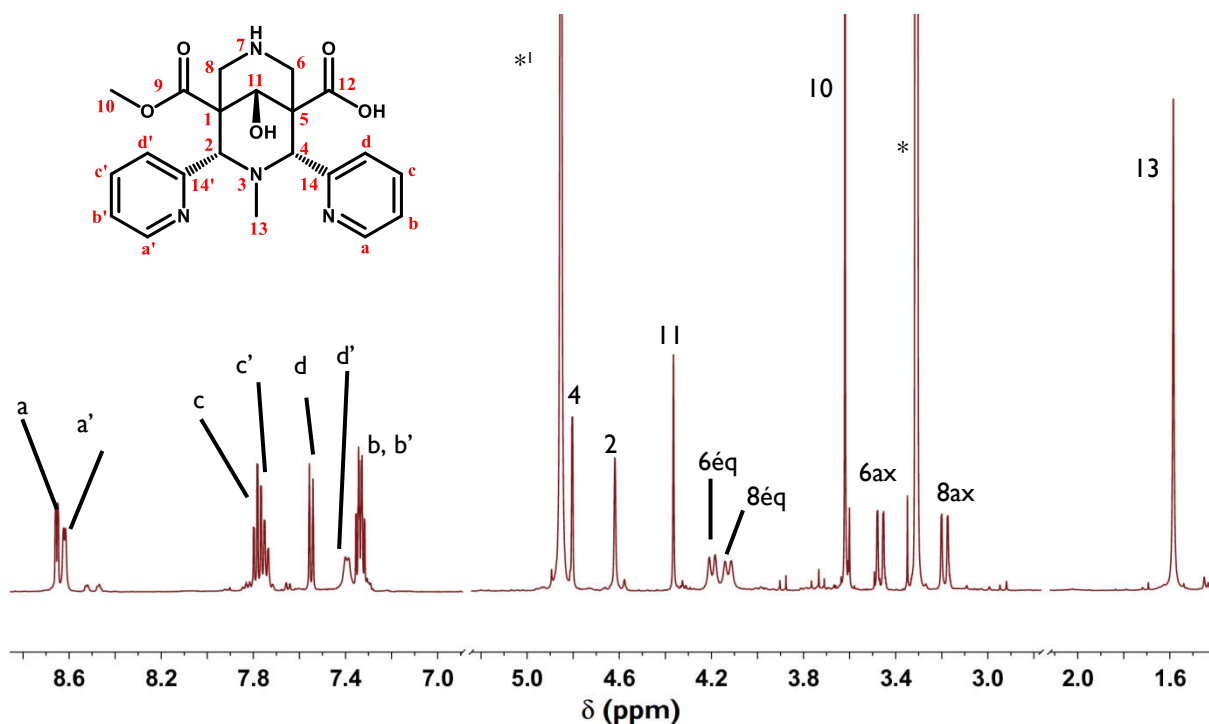


Figure 5.40. Spectre RMN ¹H de L³⁶ (400 MHz, *MeOD, *H₂O)

Par ailleurs, on remarque sur le spectre ^1H - ^1H COSY (Figure 5.41) que les protons H6 et les protons H8 sont impliqués dans des systèmes ABX. En effet, un couplage est observé entre le proton H6 axial et le proton H6 équatorial ainsi qu'entre le proton H6 axial et le proton H4 (système ABX 1). Il en est de même entre les protons H8 axial, H8 équatorial et le proton H2 (système ABX 2).

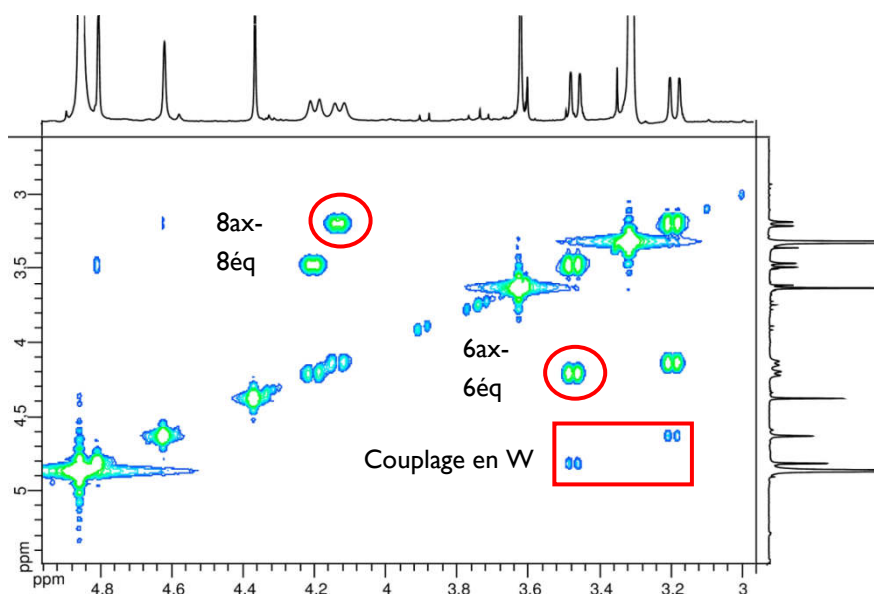


Figure 5.41. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{36} (400 MHz, MeOD)

Pour le système ABX 1, une constante forte J_{AB} ($A = \text{H6éq}$, $B = \text{H6ax}$) égale à 12,9 Hz est observée et un couplage plus faible $J_{BX} = 1,4$ Hz ($X = \text{H4}$).

Pour le système ABX 2, une constante forte J_{AB} ($A = \text{H8éq}$, $B = \text{H8ax}$) égale à 13,5 Hz est observée et un couplage plus faible $J_{BX} = 1,1$ Hz ($X = \text{H2}$).

Le spectre ^1H - ^1H COSY dans la zone des protons aromatiques est représenté sur la Figure 5.42. Il nous permet d'attribuer le déplacement chimique des protons aromatiques et de différencier les protons a, c et d des protons a', c' et d'.

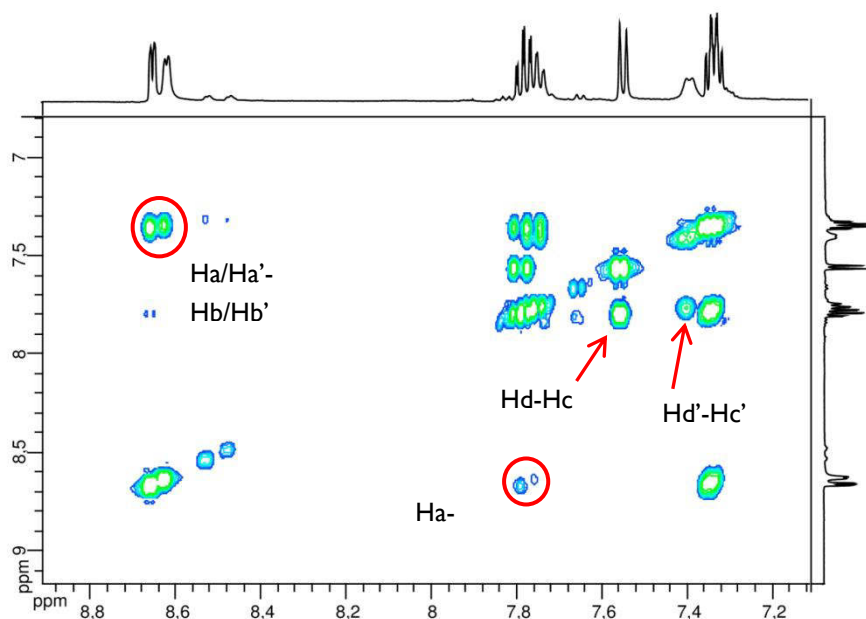


Figure 5.42. Agrandissement de la partie aromatique du spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{36} (400 MHz, MeOD).

C'est à l'aide de la RMN par effet nucléaire Overhauser que l'on détermine quels protons aromatiques correspondent à la pyridine sur C2 ou la pyridine sur C4. En effet, une interaction spatiale est visible entre le proton H4 et le proton Hd, tout comme entre le proton H2 et le proton Hd'.

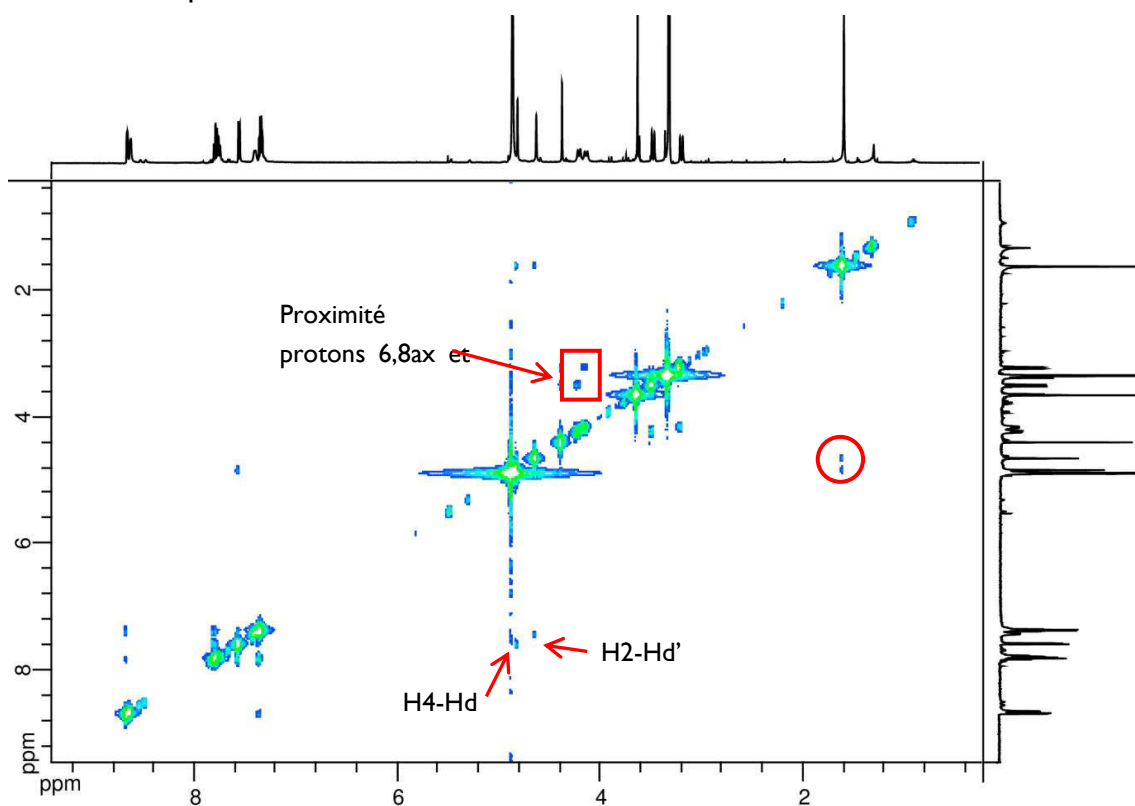


Figure 5.43. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de L^{36} (400 MHz, MeOD)

Les deux étapes manquantes pour obtenir le composé cible n'ont pas pu être étudiées et pour cette stratégie 4, un travail plus important a été effectué sur le couplage sur L³⁵ par la voie D.

5.3 Voie D

A) Ligand L³⁷

Après obtention de L³⁵ par saponification sélective d'un ester méthylique, celui-ci possède une fonction acide carboxylique disponible pour effectuer une réaction de type couplage peptidique.

Cette synthèse est effectuée par l'utilisation d'un carbodiimide, l'EDCI (1-éthyl-3-(3-diméthyleaminopropyl)carbodiimide), d'une chaîne diaminopropyle avec une des fonctions amine protégée par un groupement Boc et avec l'aide d'une amine tertiaire comme base (ici la DIPEA a été utilisée) (Schéma 5.28).

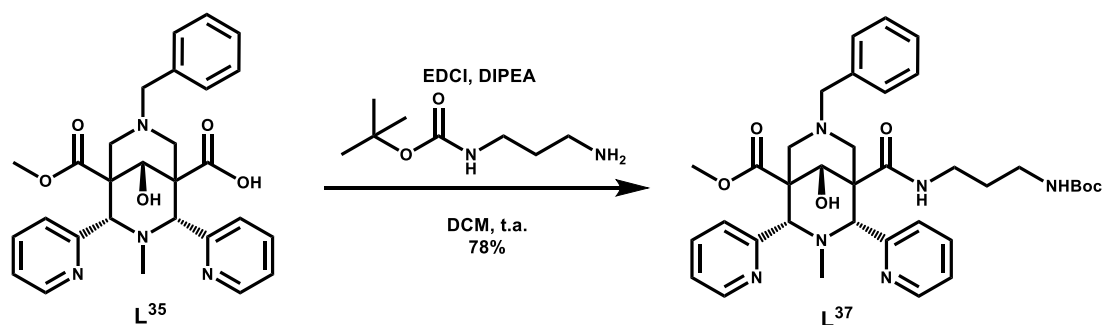


Schéma 5.28. Synthèse de L³⁷.

Le suivi par CCM de cette réaction est également difficile du fait de la présence de plusieurs composés aminés et du fait que les ligands L³⁵ et L³⁷ se différencient peu sur plaques CCM dans ces conditions. Néanmoins, après 2 jours, une extraction liquide-liquide est réalisée et le composé, extrait dans la phase organique, est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/MeOH 100/0 à 90/10). Le composé est obtenu sous forme de poudre blanche avec un rendement de 78 %.

Le spectre RMN ¹H obtenu est représenté sur la Figure 5.44. L'attribution de l'ensemble des pics est complexe. La dissymétrie observée implique un dédoublement de l'ensemble des signaux, tout comme pour les ligands précédents. La chaîne propyle est mise en évidence par la présence de différents multiplets impliqués dans plusieurs interactions et on constate également la présence du singulet à 1,43 ppm qui correspond au groupement *tert*-butyle. L'attribution des signaux n'est possible que par une étude précise des RMN bidimensionnelles.

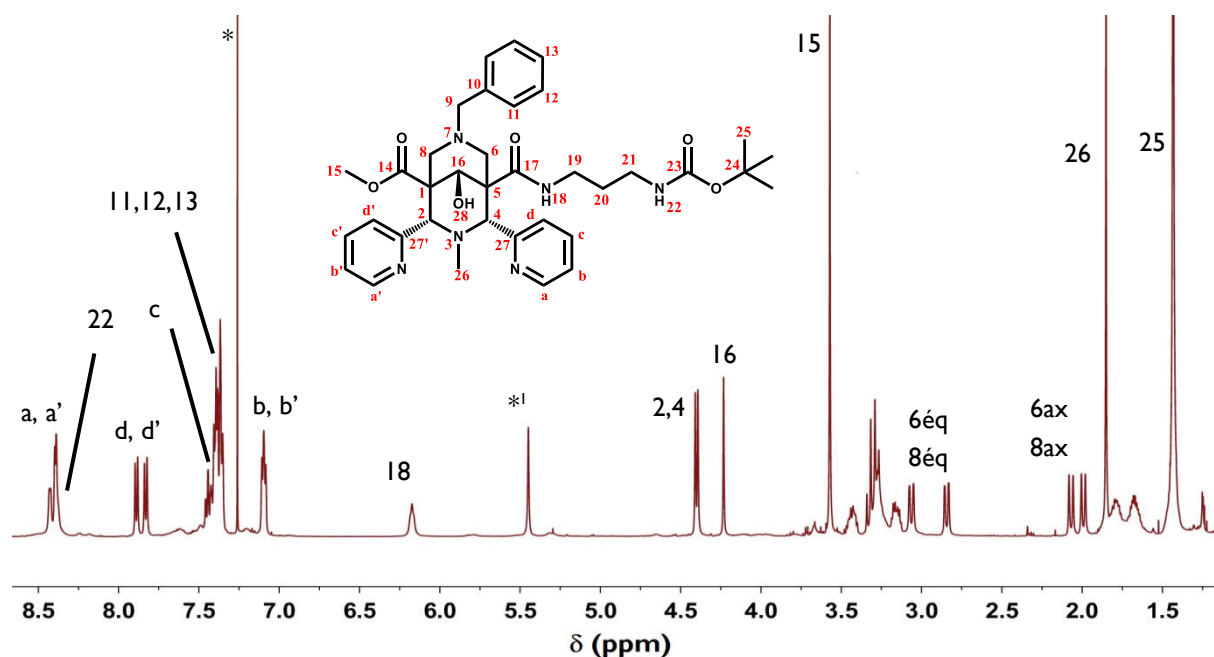


Figure 5.44. Spectre RMN ^1H de L^{37} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$, $^*\text{IDCM}$)

Un élément important nécessite d'être mentionné concernant le spectre RMN ^1H de L^{37} . Celui-ci concerne les signaux des protons de la chaîne propyle, dont un agrandissement est représenté sur la Figure 5.45 (gauche).

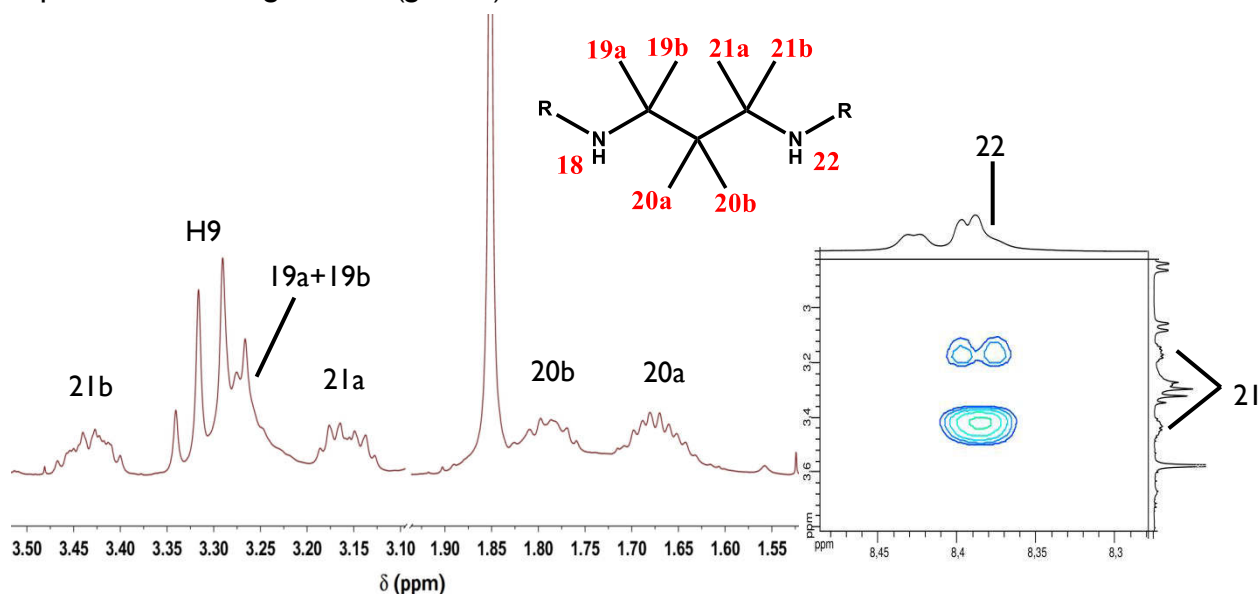


Figure 5.45. Gauche : agrandissement du spectre RMN ^1H de L^{37} .
Droite : agrandissement du spectre RMN ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3)

Sur chaque carbone de la chaîne, les 2 protons n'étant pas équivalents, une constante 2J forte est ainsi observé entre chacun d'eux. On peut se demander pourquoi on observe un tel phénomène. En effet, pour le ligand L^{17} , ces constantes 2J entre deux protons portés par le même carbone ne sont pas observées (le spectre RMN ^1H est représenté sur la Figure 5.1 page 167), ce qui suggère que les protons sont équivalents. Dans les deux cas (L^{17} et L^{37}), la molécule est chirale donc la chiralité ne permet d'expliquer cette différence.

En revanche, une différence est constatée au niveau des interactions spatiales observées en NOESY. Dans le cas de L^{37} , une interaction spatiale est visible entre le proton H22 et les protons H2 et H4 (Figure 5.46). Cette interaction suggère que la chaîne est repliée vers le groupement RI de la bispidine. Cette orientation particulière de la chaîne propyle permet d'apporter un élément de réponse sur la complexité des signaux observés en RMN 1H . Un autre élément de réponse est le fait que le spectre RMN NOESY ne révèle aucune tâche d'échange, ce qui suggère la présence d'une seule espèce rigide en solution.

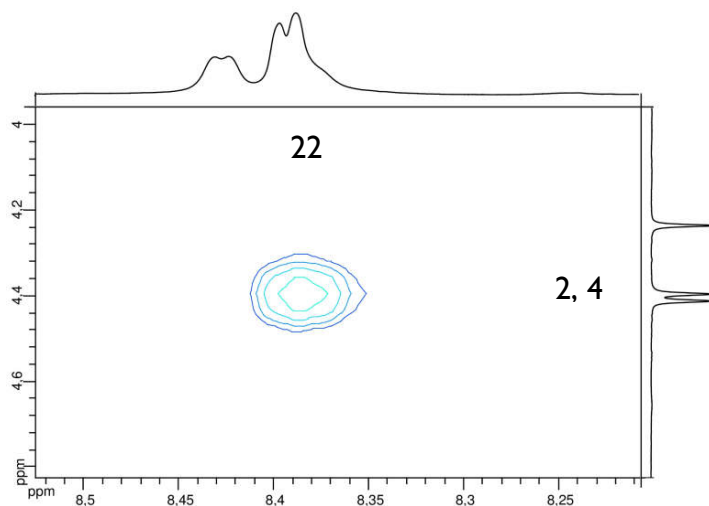


Figure 5.46. Agrandissement du spectre RMN NOESY de L^{37} ((400 MHz, $CDCl_3$))

En plus des couplages en 2J , d'autres interactions sont présentes avec des protons voisins, comme détaillé sur la RMN 1H - 1H COSY (Figure 5.47) où sont annotés les couplages suivants :

- entre le proton H20a et le proton H21b
- entre le proton H20b et le proton H21a
- entre les protons H20a, H20b et les protons H19
- les protons H19 et le proton H18 de l'amide
- les protons H21 et le proton H22 de l'amide (Figure 5.45 droite)

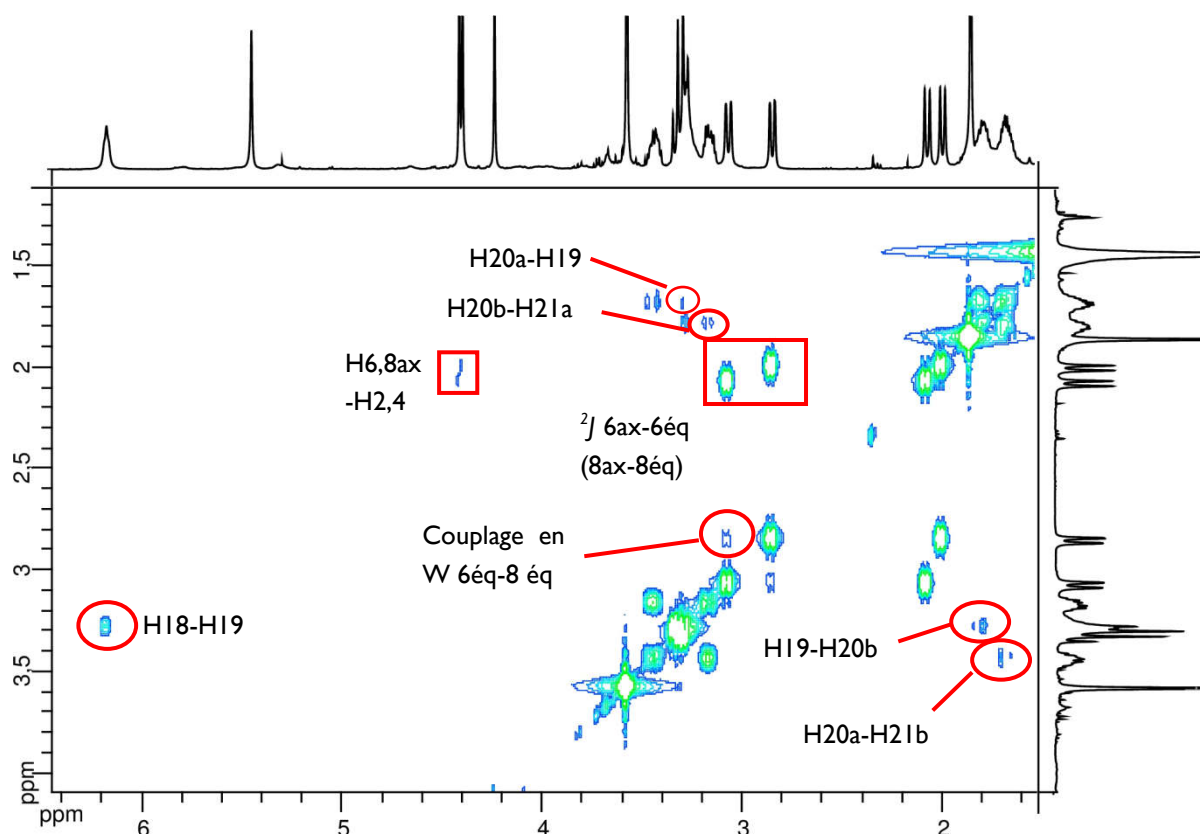


Figure 5.47. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{37} (400 MHz, CDCl_3)

D'autres couplages scalaires sont annotés sur la Figure 5.47. Parmi ceux-ci, un système $\text{AA}'\text{XX}'$ est présent entre les protons H6 et H8 axiaux et équatoriaux, de manière similaire à L^{35} (Figure 5.36). Pour L^{37} les protons H6 sont positionnés sur un carbone en position β d'une fonction amide tandis que les protons H8 sont positionnés en position β d'une fonction ester. Il est moins évident d'affirmer lesquels de ces protons sont plus déblindés que les autres par rapport à L^{35} . Il en est de même pour les protons H2 et H4. Arbitrairement et pour plus de simplicité, les protons H6 sont considérés comme plus blindés et les protons H8 comme plus déblindés.

Ainsi, par rapport au système $\text{AA}'\text{XX}'$, on a le proton H6 axial = X, H8 axial = X', H6 équatorial = A et H8 équatorial = A'.

Les couplages forts du système sont des couplages entre A et X ainsi qu'entre A' et X' avec deux constantes de couplage différentes : $J_{\text{AX}} = J_{6\text{ax}6\text{eq}} = 12,3 \text{ Hz}$ et $J_{\text{A}'\text{X}'} = J_{8\text{ax}8\text{eq}} = 12,7 \text{ Hz}$. Le couplage en W entre A et A' est un couplage plus faible avec $J_{\text{AA}'} = 1,4 \text{ Hz}$. Néanmoins aucun couplage en U n'est visible dans ce cas-ci.

Comme on le constate sur la Figure 5.45, il n'est pas évident de discerner et de connaître les paramètres du système AB présent pour les protons 9. En revanche, ce système AB est très bien révélé par le spectre RMN ^{13}C - ^1H HSQC (Heteronuclear single quantum coherence). Celui-ci est décrit sur la Figure 5.48.

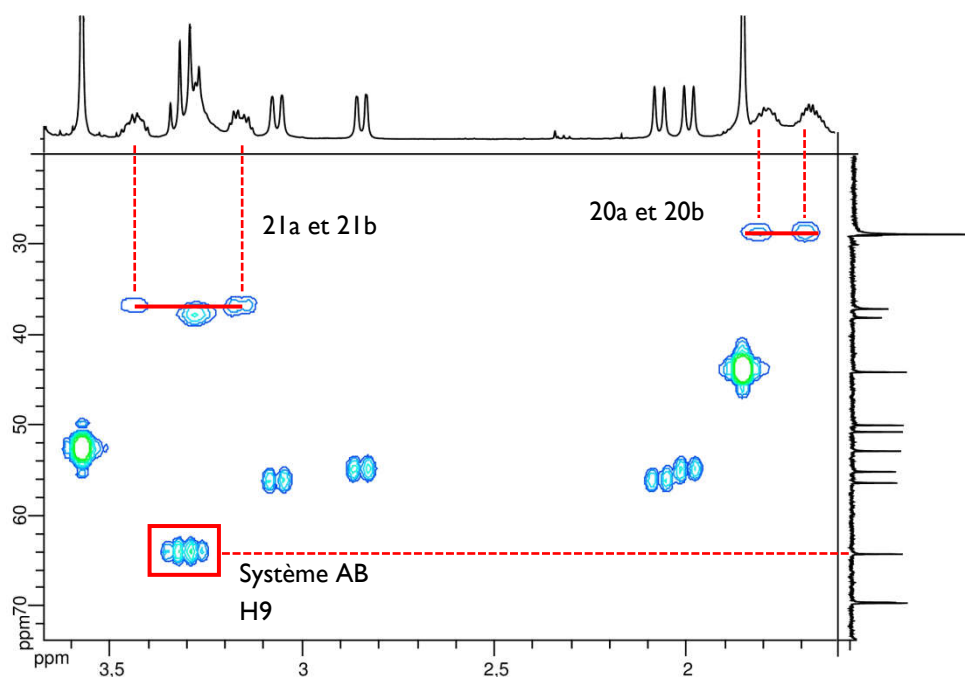


Figure 5.48. Spectre RMN ^{13}C - ^1H HSQC de L^{37} .

On remarque que le système à 3,30 ppm est porté par un seul carbone et qu'il est composé de 4 signaux distincts, dont la position est désormais plus nette.

Il est intéressant également de confirmer sur ce spectre l'attribution des signaux de la chaîne propyle. On remarque bien en effet que les protons H20a et H20b, qui forme un large doublet, sont portés par le même carbone, de même que les protons H21a et H21b. Finalement on note aussi la présence des signaux des protons H19, situé au même déplacement chimique que les protons H9.

Le spectre RMN ^1H - ^1H COSY au niveau des protons aromatiques nous permet d'attribuer la position des signaux de ces protons. On constate des interactions fortes pour les protons portés par des carbones voisins : Ha-Hb, Hb-Hc ou Hc-Hd, ainsi qu'au niveau du groupement benzyle.

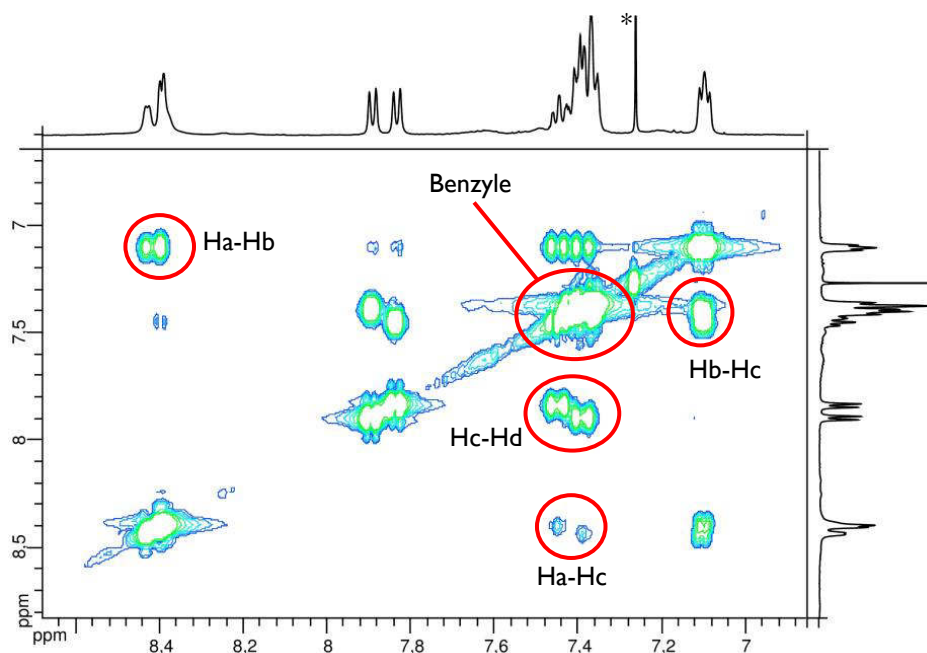


Figure 5.49. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de L^{37} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$)

B) Ligand L^{38}

L'obtention de L^{37} permet d'accéder à l'étape suivante de la voie D de cette stratégie de synthèse. Cette étape consiste, comme déjà observé précédemment, à déprotéger l'amine secondaire en R2, par une réaction d'hydrogénolyse (Schéma 5.29).

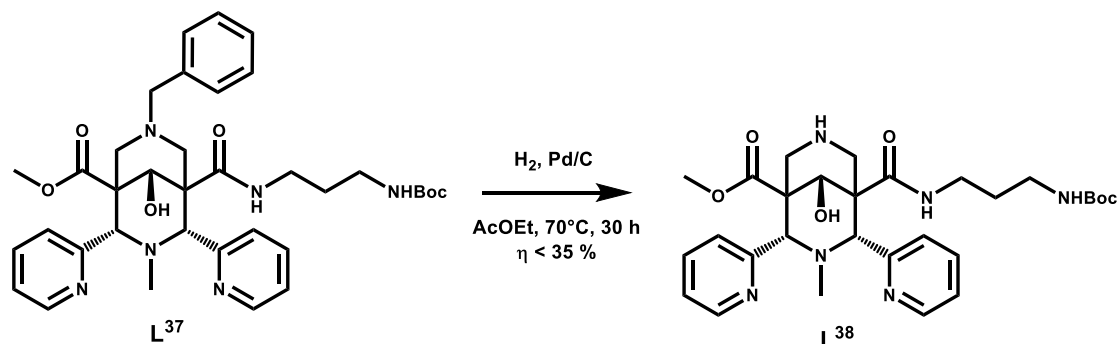


Schéma 5.29. Synthèse de L^{38} .

Divers essais ont conduit à l'obtention de L^{38} dont le spectre RMN ^1H est montré à la Figure 5.50. Une attribution de la position des protons est proposée sur ce spectre, par analogie avec les précédents, bien que l'étude RMN bidimensionnelle n'ait pas été effectuée.

Malgré des dégradations observées sur plusieurs essais, notamment liées à perte de la fonction *tert*-butoxy carbonyle, le composé obtenu n'a pas fait l'objet de purification supplémentaire.

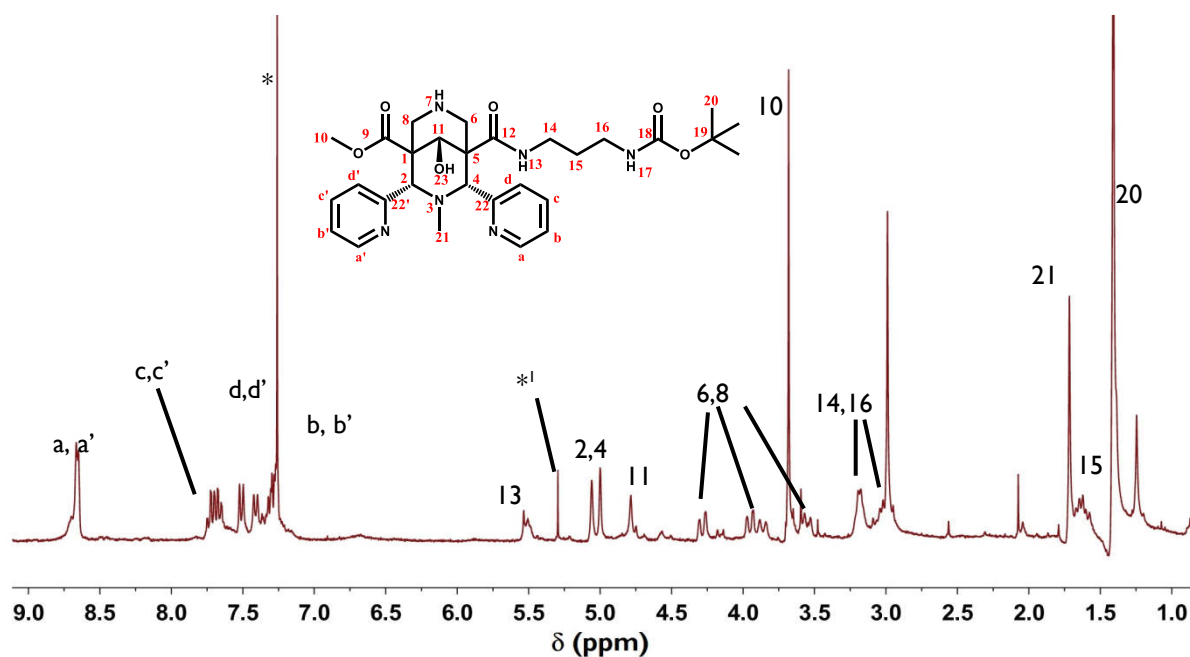


Figure 5.50. Spectre RMN ^1H de la phase organique de L^{38} (400 MHz, $^*\text{CDCl}_3$, $^*\text{DCM}$)

On sait de par le travail sur la stratégie 3 que la phosphorylation est une réaction difficile et longue. Il est possible que la présence de la chaîne ajoutée dans cette stratégie complexifie d'autant plus cette réaction, notamment de par la présence du boc pendant autant de temps à température élevée.

Néanmoins, il apparaît possible d'obtenir un chélatant bifonctionnel au cours de la synthèse de celui-ci, après reproduction et optimisation des conditions de réaction et de purification.

5.4 Conclusion

La stratégie 4 présente un grand intérêt puisqu'elle introduit la possibilité d'effectuer un couplage peptidique sélectif sur un acide carboxylique avec un rendement très satisfaisant. Au vu des difficultés pour obtenir le ligand L^{28} , il semble peu probable qu'il soit possible d'utiliser les composés L^{36} et L^{38} pour réagir avec le composé 8. En revanche, la voie D donne accès au ligand L^{38} que l'on peut considérer comme une plateforme pour accéder à diverses bispidines bifonctionnelles. Néanmoins, une optimisation est encore nécessaire, car on constate que la réaction d'hydrogénéolyse dans les conditions testées, en présence d'une chaîne propyle avec une fonction amine terminale protégée, conduit à des dégradations. Une possibilité serait d'utiliser une autre méthode de protection, par exemple avec le diméthoxybenzyle.

6. Conclusion générale

Dans ce chapitre, quatre stratégies ont été explorées pour obtenir une bispidine bifonctionnelle phosphonatée, chélatant du cuivre-64 pour la TEP. Pour cela, ces stratégies

ont ciblées la synthèse de bispidines possédant un espaceur avec une amine primaire terminale.

Deux stratégies ont été envisagées à partir du ligand L^3 développé au chapitre 2. La stratégie I, consistant à obtenir le ligand L^{17} par une alkylation sur la fonction acide carboxylique, est un succès. Les analyses effectuées ont confirmé l'obtention du composé. Ce CBF peut désormais faire l'objet d'une activation pour permettre la fixation d'une fonction de greffage. En revanche, la seconde stratégie à partir de L^3 , visant le ligand L^{23} par alkylation de type Williamson n'a pas donné de résultat positif.

Les deux stratégies suivantes, chacune envisagée selon deux voies possibles, ont fait l'objet de nombreuses synthèses.

La stratégie consistait à obtenir le ligand L^{31} par phosphorylation et par alkylation de type Williamson. L'intérêt de cette fonctionnalisation sur l'alcool est de ne pas influencer les pKas du ligand ni les propriétés du complexes de cuivre correspondant. Le bilan des synthèses effectuées par la voie A de la stratégie 3 est résumé au Schéma 5.30. Sur ce schéma, on peut voir en noir l'ensemble des ligands obtenus. Cette voie de synthèse permet également d'obtenir le CBF L^{30} pour lequel un travail de purification et une synthèse supplémentaire, annotée en **bleue**, sont encore nécessaires. Une optimisation importante de la réaction permettant d'obtenir le ligand L^{28} a été effectuée. Le résultat par cette voie est ainsi satisfaisant.

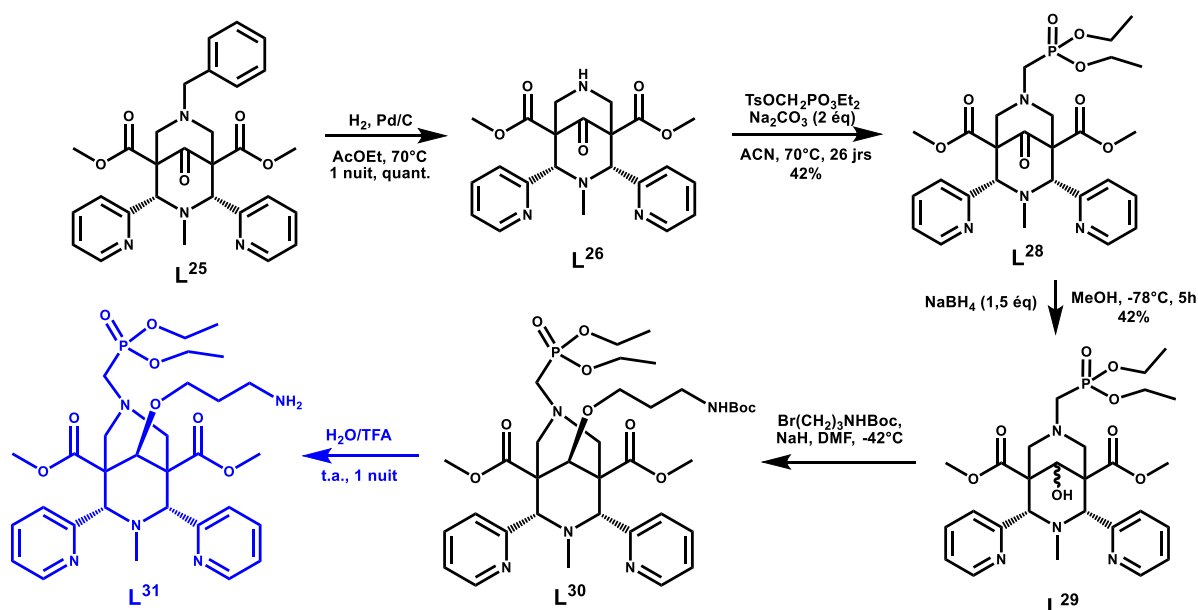


Schéma 5.30. Bilan de la stratégie 3 – voie A

La voie B empruntée pour la stratégie 3 a permis d'aboutir à la synthèse du composé L^{34} possédant une amine secondaire en R2 (Schéma 5.31). Du fait que l'amine secondaire peut réagir par des synthèses de type SN_2 , la bispidine L^{34} , représentée en vert, est donc très intéressante en tant que plateforme donnant accès au développement d'une nouvelle famille de bispidines bifonctionnelles. En revanche, au vu de la difficulté pour obtenir L^{28} par

phosphorylation, il semble que la synthèse de L³⁰ (représentée en rouge) par cette voie soit difficile et n'est pas envisagée pour la suite.

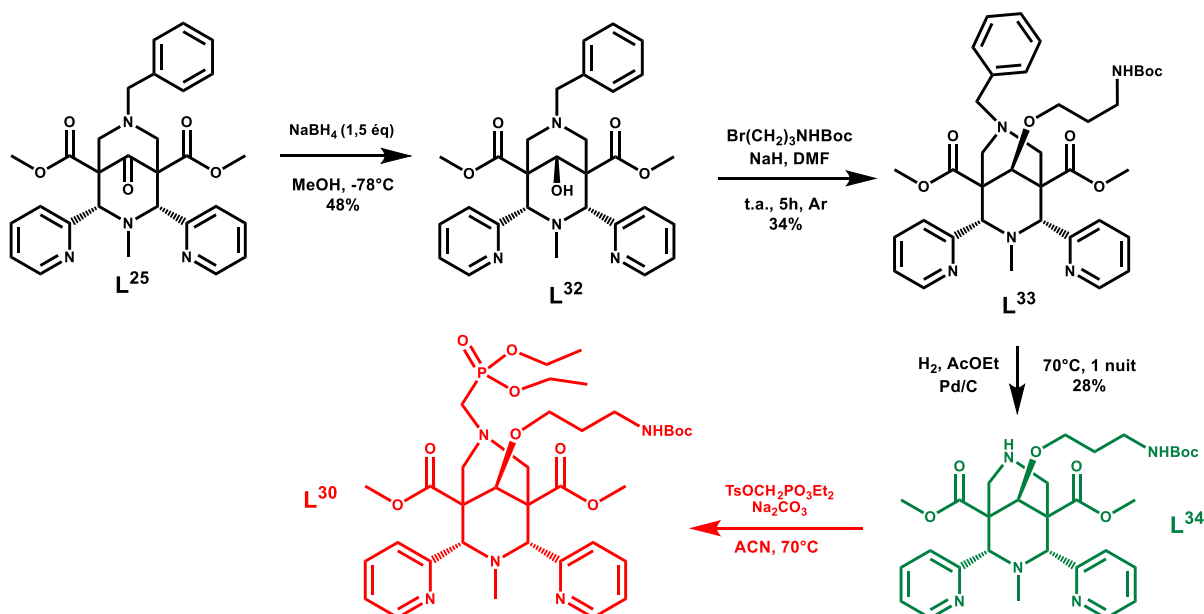


Schéma 5.31. Bilan de la stratégie 3 – voie B

La stratégie 4 consistait à obtenir le ligand L⁴⁰ par phosphorylation et par couplage peptidique. Le bilan des synthèses effectuées par la voie C de la stratégie 4 est résumé sur le Schéma 5.32. Bien que cette voie n'ait pas été poursuivie au vu de la difficulté de la réaction de phosphorylation, un grand intérêt est porté sur la saponification sélective d'un des esters méthyliques. Cette saponification sélective peut être déterminante dans l'obtention quantitative de L¹⁶.

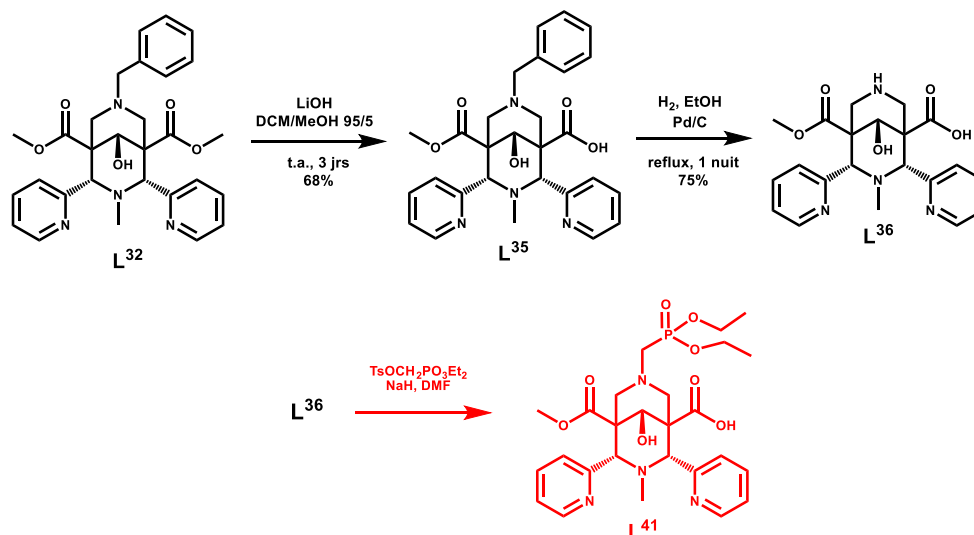


Schéma 5.32. Bilan de la stratégie 4 - Voie C

La voie D empruntée pour la stratégie 4 a permis d'aboutir à la synthèse du composé L³⁸, représentée en vert, qui est, similairement à L³⁴, très intéressant pour la synthèse de

bispidines bifonctionnelles. En effet, l'espaceur a pu être ajouté à la bispidine et la présence de l'amine secondaire en N7 permet de lier un groupement coordinant supplémentaire en R2.

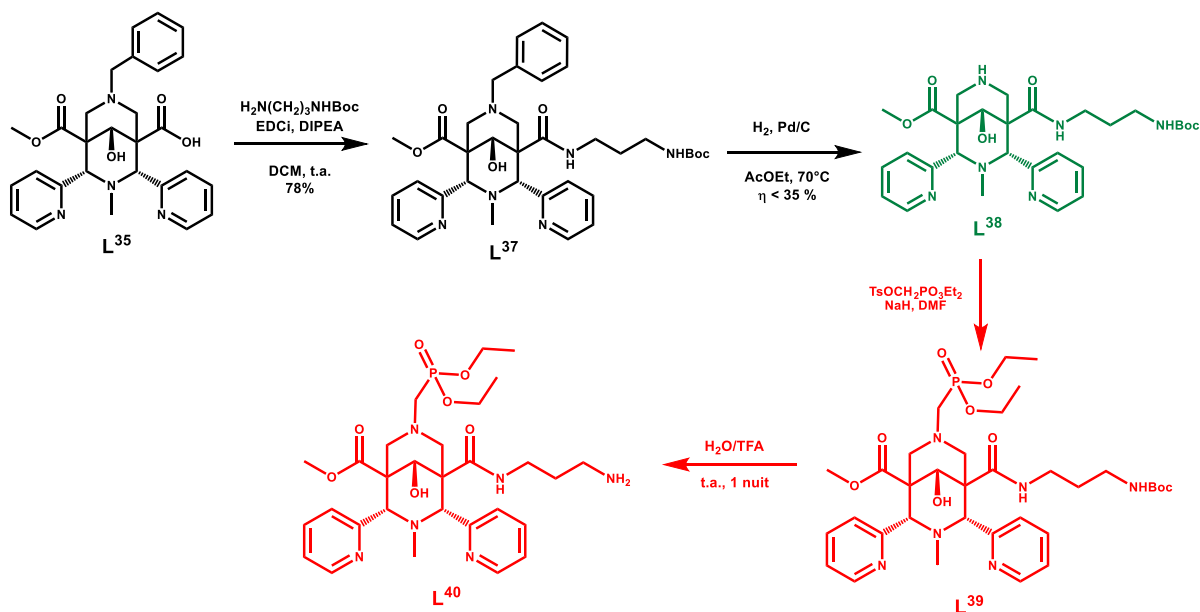


Schéma 5.33. Bilan de la stratégie 4 - Voie D

Ainsi, toutes les stratégies n'ont pas abouti à la synthèse des ligands ciblés au départ. En revanche, deux bispidines bifonctionnelles ont été développées, L¹⁷ et L³⁰. Elle possède toutes deux un espaceur, une chaîne propyle possédant une fonction amine réactive qui permet de lier une fonction de greffage. Cette étape est d'ailleurs en partie mise en évidence avec la synthèse de L¹⁸.

D'autre part, deux plateformes bifonctionnelles ont été développées pour la suite du développement des bispidines comme chélatant du ⁶⁴Cu.

En perspective sur ce travail, plusieurs éléments peuvent être mentionnés.

Tout d'abord, la dernière étape de déprotection de L³⁰ pour former L³¹ doit être effectuée. Ensuite, à partir des ligands L¹⁷ et L³¹, la suite du travail consiste à les activer pour pouvoir introduire la fonction de greffage. Plusieurs possibilités existent, elles sont rappelées dans la partie 3.3.1 du chapitre I : formation d'un ester-NHS activé (ligand L¹⁸).^{16,17} Ces esters permettent ensuite de former des liaisons peptidiques avec les dérivés peptides, anticorps... de par la présence d'amine primaire nucléophile. Il est possible aussi d'ajouter le maléimide comme fonction de greffage,^{16,17} très réactif vis-à-vis des thiols. D'autres pistes consistent à introduire une fonction isocyanate ou isothiocyanate, réactif vis-à-vis des groupements hydroxyle et amine respectivement pour former des liaisons carbamate ou encore des liaisons de type urée avec des dérivés amine.^{17,18}

Enfin, il peut être envisagé de travailler sur les plateformes que sont les composés L³⁴ et L³⁸. Plusieurs groupements coordinants peuvent être introduits en R2, un groupement pyridine, un groupement méthylène carboxylate, un acide picolinique ou encore une pyridine phosphonate par exemple.

Références

1. Brasse, D.; Nonat, A. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (11), 4845–4858.
2. Juran, S.; Walther, M.; Stephan, H.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Comba, P. *Bioconj. Chem.* **2009**, 20 (2), 347–359.
3. Dang, Q.; Kasibhatla, S. R.; Reddy, K. R.; Jiang, T.; Reddy, M. R.; Potter, S. C.; Fujitaki, J. M.; van Poelje, P. D.; Huang, J.; Lipscomb, W. N.; Erion, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (50), 15491–15502.
4. Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (18), 9154–9218.
5. Yoshino, T.; Imori, S.; Togo, H. *Tetrahedron* **2006**, 62 (6), 1309–1317.
6. Sathe, M.; Gupta, A. K.; Kaushik, M. P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (18), 3107–3109.
7. Hocquelet, C.; Jankowski, C. K.; Pelletier, A. L.; Tabet, J.-C.; Lamouroux, C.; Berthault, P. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, 69 (1-2), 75–84.
8. Roux, A. *Synthèse et fonctionnalisation de bispidines pour la complexation du ⁶⁴Cu en vue d'applications en imagerie médicale par tomographie à émission de positrons et en radiothérapie*; Thèse de l'Université de Strasbourg, **2014**.
9. Comba, P.; Rudolf, H.; Wadepohl, H. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (6), 2724–2736.
10. Hurd, C.; Strong, J. *Anal. Chem.* **1951**, 23 (3), 542–542.
11. Wang, Z.; Islam, M. J.; Vukotic, V. N.; Revington, M. J. *J. Org. Chem.* **2016**, 81 (7), 2981–2986.
12. Szczepaniak, W.; Kuczynski, K. *Phosphorus and Sulfur and the Relat. Elem.* **1979**, 7 (3), 333–337.
13. Zhao, Y.; Chen, X.; Chen, T.; Zhou, Y.; Yin, S.-F.; Han, L.-B. *J. Org. Chem.* **2015**, 80 (1), 62–69.
14. Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19 (27), 8839–8849.
15. Legdali, T.; Roux, A.; Platas-Iglesias, C.; Camerel, F.; Nonat, A. M.; Charbonnière, L. J. *J. Org. Chem.* **2012**, 77 (24), 11167–11176.
16. Ramogida, C. F.; Orvig, C. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (42), 4720–4739.
17. Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. *Org. Biomol. Chem.* **2017**.
18. Kalia, J.; Raines, R. T. *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14 (2), 138–147.

Chapitre VI

Conclusion Générale

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont porté sur le développement et la caractérisation de chélatants bifonctionnels pour des applications en Tomographie par Emission de Positrons. Compte-tenu de l'intérêt que présente le ^{64}Cu en tant que radioisotope métallique pour la TEP et de la rigidité et la pré-organisation du squelette bispidine, notre choix s'est plus particulièrement tourné vers le développement de chélatants de type bispidine. D'autre part, la présence d'un bras phosphonate comme groupement coordonnant a permis, dans le cas d'autres chélatants du Cu(II) , d'améliorer les propriétés thermodynamiques de leurs complexes de Cu(II) ou d'adoucir les conditions nécessaires à leur formation (diminution de la température et accélération de la cinétique de formation).

Ainsi le travail de cette thèse avait comme principal objectif la synthèse, la caractérisation, la fonctionnalisation et l'étude du radiomarquage d'une bispidine possédant un groupement méthyl phosphonate.

La synthèse tri-étape de la bispidine L^3 a été un succès. L'obtention de L^3 est confirmée par les différentes analyses : RMN, IR, analyse élémentaire et spectrométrie de masse, mais également par l'obtention de cristaux adéquats pour une analyse par diffraction des rayons X. De plus, l'obtention d'un nouveau précurseur P^3 ainsi que deux bispidines L^5 et L^7 ouvre la voie vers le développement d'une nouvelle famille de bispidines fonctionnalisées en position 2 et 4 avec des groupements picolinate.

Ensuite, les propriétés thermodynamiques du chélatant L^3 ont été étudiées par des titrages spectrophotométriques et potentiométriques ainsi que par des études RMN ^1H et ^{31}P . Les constantes de protonation et les constantes de stabilité des complexes de Cu(II) et de Zn(II) ont ainsi été déterminées. La constante de stabilité pour le cuivre est élevée ($\log \beta_{\text{CuL}^3} = 22.5$) et une bonne sélectivité est observée pour le Cu(II) par rapport au Zn(II) ($p\text{Cu} = 19.2$ contre $p\text{Zn} = 15.4$ dans des conditions identiques). D'autre part, le potentiel de réduction du Cu(II) du complexe est bas dans la gamme $5,7 < \text{pH} < 8,55$ ($E_{\text{red}} = -606 \text{ mV/ENH}$) et la réaction électrochimique est quasi-réversible dans cette même gamme de pH. De plus, l'inertie cinétique du complexe en milieu acide est très importante.

Par la suite, des tests de radiomarquage en présence de ^{64}Cu ont été effectués sur divers ligands développés, y compris sur L^3 . Ces tests ont permis de mettre en évidence l'influence du pH et du ratio n_L/n_M pour chaque ligand. Le ligand L^3 possède un rendement de radiomarquage qui atteint 100 % pour 2,5 équivalents de ligand par rapport à la quantité de métaux, après 1 h à température ambiante. Hormis dans le cas d'un excès de métaux, le radiomarquage est systématiquement effectué à température ambiante et à une concentration en ligand de l'ordre de 1 nM.

Enfin, quatre stratégies ont été explorées pour obtenir une bispidine bifonctionnelle phosphonagée. Dans un premier temps, ces stratégies ont impliquées des essais sur le ligand L³. L'obtention du ligand L¹⁷ nécessite une optimisation mais peut être considérée comme un succès, d'autant que la présence de la bispidine L¹⁹ est mise en évidence. Dans un second temps, deux nouvelles voies multi-étapes ont été étudiées et l'obtention de la bispidine L²⁹ est également un succès. La bispidine bifonctionnelle L³⁰ est mise en évidence par spectrométrie de masse mais nécessite toutefois un développement supplémentaire. Ces deux voies multi-étapes ont également permis l'obtention de deux plateformes bifonctionnelles.

Plusieurs pistes sont désormais ouvertes pour la suite de ce travail.

Les tests de radiomarquage du ⁶⁸Ga(III) à partir de L¹² ont montré que la coordination d'autres métaux par les bispidines est également prometteuse. A partir du précurseur P³, il est possible de développer une nouvelle famille de bispidines fonctionnalisées avec des groupements picolines : introduction d'un groupement phosphonate ou d'un troisième groupement picolinate en R2 par exemple. La présence de ces groupements bidentates en position 2 et 4 donne accès à des bispidines avec une denticité supérieure, pour la coordination de nouveaux métaux comme les Ln(III) ou le Sc(III).

Un travail sur les étapes de synthèses manquantes à l'obtention des ligands L³¹ et L⁴⁰ est également nécessaire. De cette manière, deux bispidines phosphonagées et fonctionnalisées, l'une sur l'acide carboxylique et l'autre sur l'alcool secondaire, seront disponibles pour des couplages avec des fonctions de greffage. Ces nouvelles unités bispidines pourraient conduire ensuite à des tests *in vivo* de biodistribution ou de marquage de pathologies données.

Les deux plateformes bifonctionnelles que sont les ligands L³⁴ et L³⁸ sont également des points de départ vers l'obtention de nouvelles familles de chélatants bifonctionnels de type bispidine.

Chapitre VII

Partie expérimentale

General Methods

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Acros and Alfa Aesar and used without further purification unless specified. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum One Spectrophotometer as solid samples and only the most significant absorption bands are given in cm^{-1} . Elemental analyses and mass spectrometry analyses were carried out by the Service Commun d'Analyses of the University of Strasbourg or by the Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (LSMBO, IPHC) or by the Plateforme Analytique of the Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM, IPHC). The pH values given are corrected for the deuterium isotopic effects.¹ Elemental analysis and monoisotopic masses were calculated with the chemcalc software.² Purifications were made on a SPOT II Interchim Flash Purification Liquid Chromatography. Distilled water was purified by passing through a mixed bed of ion-exchanger (Bioblock Scientific R3-83002, M3-83006) and activated carbon (Bioblock Scientific ORC-83005). The stock solutions were prepared by weighing solid products using an AG 245 Mettler Toledo analytical balance (precision 10^{-2} mg). Metal cation solutions were prepared from their perchlorate salts ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98%, Fluka; $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98,9%, Alfa Aesar). The prepared metal cations were titrated with EDTA (Titriplex III) according to standard procedures.³ Sodium hydroxide and hydrochloric acid were used to adjust the pH while titrating and the ionic strength was fixed at 0.1 M adding potassium chloride (KCl, Fluka, 99.0 %).

*CAUTION! Perchlorate salts combined with organic ligands are potentially explosive and should be handled in small quantities and with the adequate precautions.*⁴

X-Ray Crystallography

Suitable crystals for X-ray diffraction were obtained for NaL^1 , L^3 , L^5 and L^{28} . The crystals were placed in oil, and a single crystal was selected, mounted on a nylon loop and placed in a low-temperature N_2 stream. X-Ray diffraction data collection was carried out on a Bruker APEX II Kappa-CCD diffractometer equipped with an Oxford Cryosystem liquid N_2 device, using $\text{Mo-K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at 150(2) K (Centre de diffractométrie X, Université de Rennes I, France).

Bruker SMART program were used to refine the values of the cell parameters. Data reduction and correction for absorption (SADABS) were carried out using the Bruker SAINT programs. The structures were solved by direct methods using the SIR97 program⁵ and then refined with full-matrix least-square methods based on F^2 (SHELX-97)⁶ with the aid of the WINGX program.⁷ All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic atomic displacement parameters.

Solution NMR Studies

^1H , ^{13}C NMR spectra and 2D COSY, NOESY, HSQC experiments were recorded on Avance 300, Avance 400 and Avance 500 III HD spectrometers operating at 300, 400 and 500 MHz respectively.

Chemical shifts are reported in ppm, with residual protonated solvents as internal reference.⁸ The multiplicity are given as followed: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, qt = quintuplet, m = multiplet.

Potentiometry

The protonated species of L^3 and the stability constants of L^3 complexes with Cu(II) and Zn(II) were characterized and quantified by potentiometric titrations in water. All the solutions used in the potentiometric experiments were prepared from boiled and degassed water. Titrations were performed using an automatic titrator system (DMS 716 Titrino, Metrohm) with a combined glass electrode (Metrohm, 6.0234.100, Long Life) filled with NaCl 0.1 M. The electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amount of hydrochloric acid with CO_3^{2-} free potassium hydroxide solutions. The GLEE program^{9,10} was used for the glass electrode calibration.

In a typical experiment, an aliquot of 10 mL of L^3 (around $2 \cdot 10^{-3}$ M) or M:L (M = Cu(II), Zn(II), $[\text{M}]/[\text{L}] \approx 1$) was introduced into a thermostated jacketed cell ($25.0(2)^\circ\text{C}$, Metrohm) and kept under argon during the titrations. The solutions were acidified with a known volume of HCl and the titrations were then carried out by addition of known volumes of KOH solution over the pH range 2-12. The potentiometric data of L^3 and its metal complexes were refined with the Hyperquad 2008 program¹¹ which uses non-linear least-squares methods, taking into account the formation of metal hydroxide species. The titration of each system was repeated at least in duplicate and the sets of data for each system were treated independently, then merged together and treated simultaneously to give the final stability constants. The distribution curves as a function of pH of the protonated species of L^3 and L^3 complexes were calculated using the HYSS 2009 program.¹²

Spectrophotometry

The protonation constants of L^3 and the stability constants of M:L³ (M = Cu(II) and Zn(II) $[\text{M}]/[\text{L}] \sim 1$, $[\text{L}] \sim 5 \cdot 10^{-5}\text{M}$) were also determined by UV-Visible spectrophotometric titrations versus pH. Since complexation started in very acidic medium, the titrations were carried out in two different ways.

Between pH = -0.6 and pH = 2, batch solutions were prepared. Each sample was prepared separately by mixing a known amount of L^3 stock solution, a known amount of standardized HClO_4 (70 %) to adjust the pH ($\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$) and a known amount of Cu(II) stock solution

in 10^{-3} M HCl in the case of the study of the complexes ($[\text{Cu(II)}]/[\text{L}] = 1$). An absorption spectrum of each sample was recorded in a 1 cm quartz suprasil spectrophotometric cell using a Varian (Cary 3) UV-Visible spectrophotometer.

Between pH 2 and 12.5, direct titrations were carried out. Typically, an aliquot of 10 mL of L^3 solution was introduced into a thermostated jacketed titration vessel ($25.0(2)^\circ\text{C}$) with 1 equivalent of metal (M) in the case of M:L titrations. A known volume of hydrochloric acid solution was added to adjust the pH around 2 and the titrations were carried out by addition of known volumes of potassium hydroxide solution. After each addition, the pH was allowed to equilibrate, an aliquot was transferred to a 1 cm quartz suprasil spectrophotometric cell, a spectrum was recorded using a Varian (Cary 3) spectrophotometer, the aliquot was transferred back to the titration vessel and a new addition was made. The free hydrogen ion concentrations were measured with a Mettler Toledo U402-S7/I20 (pH 0-14) combined glass electrode. Potential differences were given by a Tacussel LPH430T millivoltmeter. Standardization of the millivoltmeter and verification of the linearity of the electrode were performed with three commercial buffer solutions (pH 4.01, 7.01 and 10.01, 25°C). The software Hypspec V1.1.33 was used to determine the coordination model and calculate the stability constants ($\log \beta$) of the formed species.^{13,14,15,16}

Cyclic voltammetry

Cyclic voltammetry (CV) was carried out on the CuL^3 complex at room temperature with a PC interfaced Radiometer Analytical MDE150/PST50. The CV experiments were performed using a glassy carbon working electrode (0.071 cm^2 , BASi). The electrode surface was polished routinely with $0.05 \mu\text{m}$ alumina–water slurry on a felt surface immediately before use. The counter electrode was a Pt coil, and the reference electrode was a Ag/AgCl electrode. The CuL^3 complex was measured in Ar-degassed water with ionic strength fixed at 0.1 M with NaClO_4 and the pH of the solutions were adjusted with NaOH and HClO_4 solutions. Seven different values of pH (pH = 2.36, 4.04, 5.70, 7.2, 8.55, 10.23, 11.62) and different scan rates (50-300 mV/s) were considered.

Acid dissociation study

Acid-decomplexation study was performed under pseudo first-order conditions on two solutions of CuL^3 complex in 5 M HClO_4 at 25°C . Changes in the absorption spectra with time over a period of 20 months were monitored using a Perkin-Elmer Lambda 950 spectrophotometer. 1.69×10^{-4} mmol of Cu(II)L^3 complex were used to monitor the $\pi\text{-}\pi^*$ transition at 262 nm and 9.06×10^{-3} mmol to follow the d-d transition at 680 nm.

Radiolabeling

The volume of ^{64}Cu sources sampled for the tests depends on the activity of it, and therefore depends on the date of the sampling. Due to the half-life time of copper, 12.7 h, the activity decreases by a factor 4 every 24 h. The volume sampled of the ligand solution is then also adapted, the calculation being done according to the tests.

Typically, the general procedure is as following:

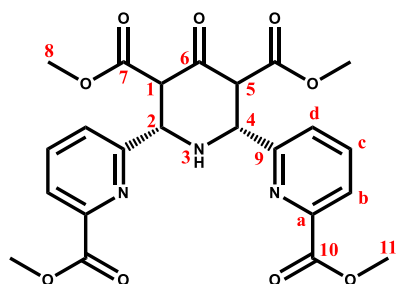
1. Batch preparation: each batch, of a total volume of 500 μl , contains:
 - Ligand solution, depending on the ratio tested and the volume of ^{64}Cu source
 - From 5 to 40 μl of ^{64}Cu solution
 - The corresponding volume of buffer solution, depending on the pH
2. Each batch is deposited on silica plates at specific time: 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min. Due to practice facts, the spots were made at different time for some ligands (5, 15 and 20 min)
3. Elution of the TLC plates in the $\text{NH}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ solvents system at appropriate ratios
4. Revelation of the plates is done using a CyclonePlus machine (PerkinElmer).

Crystallographic data

	L'Na	L³
Formule	C ₂₄ H ₃₀ N ₄ NaO ₉ P, CH ₃ OH	C ₂₁ H ₂₅ N ₄ O ₈ P, 2 CH ₃ OH
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	604.52	556.50
Temperature (K)	150(2)	150(2)
Crystal size (mm)	041 × 0.24 × 0.11	0.55 × 0.49 × 0.43
Crystal system	Triclinic	Monoclinic
Space group	P-1	P2 ₁ /n
Unit-cell dim. (Å, °)	a= 8.3045(2) b= 13.5397(5) c= 14.3175(6) α= 113.495(2) β= 91.526(2) γ= 93.495(2)	a= 13.4531(5) b= 10.6527(3) c= 18.3216(7) β= 92.1580(10)
Volume (Å ³); Z	1471.37(9); 2	2623.84(16); 4
Density (calc.) (g.cm ⁻³)	1.364	1.409
Abs. coeff. (mm ⁻¹)	0.168	0.167
F(000)	636	1176
θ _{max}	27.48	27.52
Reflections collected	14303	23378
Independent reflections (I>2σ(I))	4964	5409
Parameters	378	357
R1, wR2 (I>2σ(I))	0.0511, 0.1307	0.0367, 0.098
R1, wR2 (all data)	0.0695, 0.1433	0.041, 0.1017

	L ²⁸	L ⁵
Formule	C ₂₇ H ₃₅ N ₄ O ₈ P	C ₂₇ H ₂₈ N ₄ O ₁₁ ,CH ₄ O,O
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	574.56	632.57
Temperature (K)	298(2)	150(2)
Crystal size (mm)	0.45 × 0.39 × 0.13	0.25 × 0.12 × 0.10
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /n	P2 ₁ /m
Unit-cell dim. (Å, °)	a= 12.1816(8) b= 20.2314(13) c= 12.8688(8) α 90 β 115.897(2) γ 90	a 8.6168(4) b 15.7247(6) c 10.6249(5) α 90 β 91.665(2) γ 90
Volume (Å ³); Z	2853.0(3); 4	1439.03; 2
Density (calc.) (g.cm ⁻³)	1.338	1.46
Abs. coeff. (mm ⁻¹)	0.152	0.117
F(000)	1216	664
θ _{max}	27.57	27.513
Reflections collected	59485	21331
Independent reflections (I>2σ(I))	4477	2888
Parameters	366	227
R1, wR2 (I>2σ(I))	0.056, 0.1109	0.0526, 0.1407
R1, wR2 (all data)	0.0943, 0.1321	0.0633, 0.1507

Synthesis of precursor P²



Chemical Formula: C₂₃H₂₃N₃O₉

Molecular Weight: 485.45 g/mol

To a MeOH (20 mL) solution containing dimethyl 3-oxopentanedioate (359 mg, 297 μ L, 2.06 mmol, 1 eq), was added methyl 6-formylpicolinate (680 mg, 4.12 mmol, 2 eq) previously dissolved in 5 mL of MeOH. To this mixture, a solution of ammonium acetate (175 mg, 2.27 mmol, 1.1 eq) in 3 mL of MeOH was slowly dropped at 0°C. After the addition, the mixture was left at room temperature for 5h30 and placed in a refrigerator overnight. After evaporation to dryness, the solid was suspended in a minimum of MeOH, to give a white precipitate. The latter was isolated by centrifugation, washed with cold MeOH (3x10 mL) and the final product was obtained as a white powder (596 mg, 59.6 %).

Elemental analysis on crystals of P² will be done shortly.

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (P³) = 0.78).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 2.85 (t, J = 12.3 Hz, 1H, H3); 3.67 (s, 6H, H8); 3.97 (s, 6H, H11); 4.17 (d, J = 10.6 Hz, 2H, H1 + H5); 4.78 (t, J = 10.3 Hz, 2H, H2 + H4); 7.60 (dd, J_1 = 7.8, J_2 = 1.0 Hz, 2H, Hd); 7.80 (t, J = 7.8 Hz, 2H, Hc); 8.02 (dd, J_1 = 7.8, J_2 = 1.1 Hz, 2H, Hb).

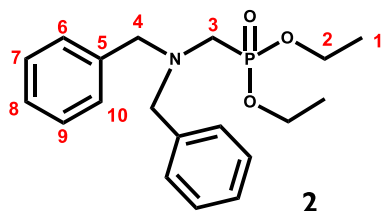
¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 52.30 (2C, C8); 52.81 (2C, C11); 62.29 (C1 + C5); 63.42 (C2 + C4); 124.81 (2C, Cb); 127.18 (2C, Cd); 137.98 (2C, Cc); 147.95 (2C, C9); 158.00 (2C, Ca); 165.48 (2C, C7); 168.68 (2C, C10); 200.59 (C6).

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1431 – 1589 (m, C=C); 1706 – 1735 (C=O ester) 1740 (C=O cétone).

Mass Spectrometry (ESI+ / MS): m/z = 486.15 ([M+H]⁺, 100%)

Synthesis of compound 4

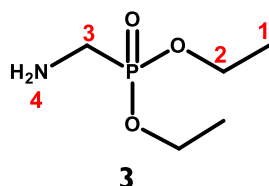
4 was obtained in three steps from diethyl phosphite according to the Kabachnik-Fields reaction, according to an adaptation of the procedure used in reference.¹⁷



To a solution of diethylphosphite (3.27 mL, 94%, 20.7 mmol, 1.2 eq) in THF (9 mL) were successively added dibenzylamine (3.39 mL, 98%, 17.27 mmol, 1 eq) and formaldehyde (3.06 mL, 37% in water, 34.5 mmol, 2eq). The mixture was heated at 60°C under stirring for 24 h and the reaction was monitored by TLC. After completion of the reaction, the mixture was taken to dryness under vacuum and the as-obtained yellow oil was dissolved in cyclohexane (60 mL) and washed with water (3 × 15 mL). Diethyl((dibenzylamino)methyl)phosphonate was obtained as a colorless oil after evaporation of the cyclohexane under reduced pressure (6 g, quantitative).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H1), 2.77 (d, J = 10.5 Hz, 2H, H3), 3.67 (s, 4H, H4), 3.95 (qd, J_1 = 7.1 Hz, J_2 = 7.5 Hz, 4H, H2), 7.11-7.28 (m, 10H, H6-H10).

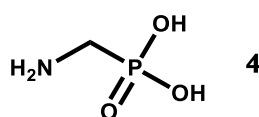
³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ (ppm) = 25.7.



Palladium over charcoal (10%, 600 mg) was added to a solution of diethyl((dibenzylamino)methyl)phosphonate **2** (6 g, 17.27 mmol) in EtOH (300 mL) and the mixture was refluxed under a flow of hydrogen for 24h. The crude mixture was filtrated on a sintered-glass filter funnel filled with celite and the solvent was removed under vacuum to yield diethyl(aminomethyl)phosphonate (4.8 g, quantitative).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 1.25 (t, J = 6.7 Hz, 6H, H1), 1.97 (s, 2H, NH₂), 2.94 (d, J = 10.2 Hz, 2H, H3), 4.05 (m, 4H, H2).

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ (ppm) = 27.35 ppm (qd, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 9.2 Hz).



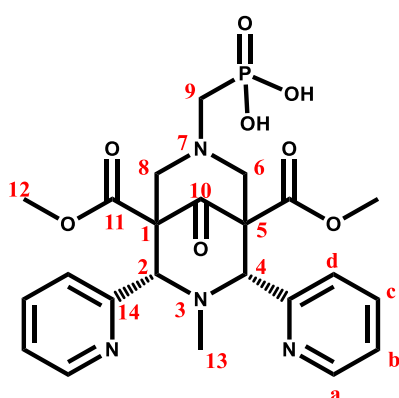
Diethyl(aminomethyl)phosphonate **3** (4.81 g, 28.8 mmol) was dissolved in 6 M hydrochloric acid (300 mL) and the mixture was refluxed for 16 h under stirring. After evaporation to dryness under reduced pressure, (aminomethyl)phosphonic acid **4** was obtained as a white powder (4.25 g, quantitative).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) = 3.00 (d, J = 13.0 Hz, 2H).

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ (ppm) = 12.18 ppm.

Synthesis of the ligands

Ligand L^I



Chemical Formula: C₂₃H₂₇N₄O₈P

Molecular Weight: 518.46 g/mol

In a solution of H₂O/MeOH (7/4) (11 ml), the aminomethyl phosphonic acid (126 mg, 1.13 mmol, 1.1 eq) was stirred at room temperature in the presence of sodium hydrogenocarbonate (143.1 mg, 1.7 mmol, 1.7 eq). Piperidone P^I (395.7 mg, 1.0 mmol, 1 eq) in 8 ml of MeOH, was then added as well as formaldehyde (93.0 mg, 3.1 mmol, 3 eq, 0.23 ml, 37 % solution). The reaction mixture was heated to 60°C for 5 h, the reaction being monitored by TLC. After completion of the reaction, the solvent were evaporated under reduced pressure and the crude product was suspended in EtOH (10 mL). Ligand L^I was isolated by centrifugation as a white powder (187 mg, 35 %). Crystals were obtained by slow evaporation of MeOH.

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (P^I) = 0.8 and R_f (L^I) = 0.26).

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) = 1.87 (s, 3H, H13); 2.53 (d, 2H, J = 13 Hz, H9); 3.15 (AB system, δ_A = 2.66, H6ax + H8ax, δ_B = 3.64, H6eq + H8eq, 4H, J_{AB} = 12.3 Hz); 3.72 (s, 6H, H12); 4.68 (s, 2H, H2 & H4); 7.35 (m, 2H, Hd); 7.42 (ddd, 2H, J = 7.7, 4.9, 0.9 Hz, Hb); 7.84 (td, 2H, J_t = 7.8 Hz, J_d = 1.5 Hz, Hc); 8.83 (m, 2H, Ha).

³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz): δ (ppm) = 15.29.

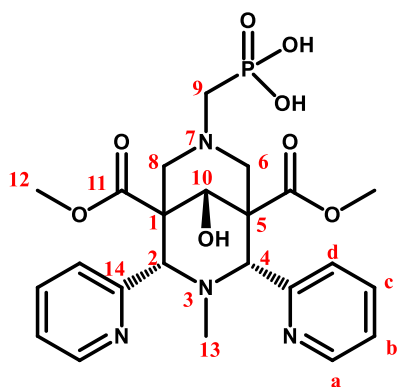
¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) = 42 (C13); 52 (C12); 57.2 (d, J = 147.2 Hz, C9); 60.9 (C6 + C8); 63 (C1 + C5); 72.4 (C2 + C4); 123.8 (2C, Cb); 124.7 (2C, Cd); 137.6 (2C, Cc); 150.6 (2C, Ca); 156.3 (2C, C11); 167.5 (2C, C14); 202.3 (C10).

IR (cm^{-1} , ATR) ν 1152 (s, P=O); 1273 (s, C-N); 1443 – 1590 (m, C=C); 1712 (m, C=O ester), 1760 (s, C=O ketone).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 519.17$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Elemental Analysis calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8\text{PNa} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 50.28, H, 4.95, N, 10.20. Found: C, 50.39, H, 4.75, N, 10.27.

Ligand L²



Chemical Formula: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}$

Molecular Weight: 520.48 g/mol

The ligand L¹ (1.2 g, 2.3 mmol, 1 eq) was dissolved in 80 ml of anhydrous MeOH by heating and using ultrasound. The solution was then cooled -78°C and the sodium borohydride (107 mg, 2.8 mmol, 1.5 eq) was gradually added. The reaction was monitored by TLC. After 5h30, the reaction was quenched at -78°C by the addition of a saturated NH_4Cl aqueous solution (5 ml). The solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by FPLC on a C18 reverse phase column (eluent system: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 0.1 % TFA), giving the bispidol L² (0.79 g, 66 %).

TLC: (C18; eluent: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 7/3; revelator: UV); R_f (L²) = 0.28

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) = 1.74 (s, 3H, H13); 3.35 (d, 2H, $J_d = 11$ Hz, H9); 3.62 (s, 6H, H12), 4.0 (AB system, $\delta_A = 3.76$ (H6ax + H8ax), $\delta_B = 4.23$ (H6eq + H8eq), $J = 12.7$ Hz, 4H); 4.55 (s, 1H, H10); 4.98 (s, 2H, H2 & H4); 7.43 (dd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 2H, Hb); 7.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Hd); 7.87 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.6$ Hz, 2H, Hc); 8.74 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H, Ha).

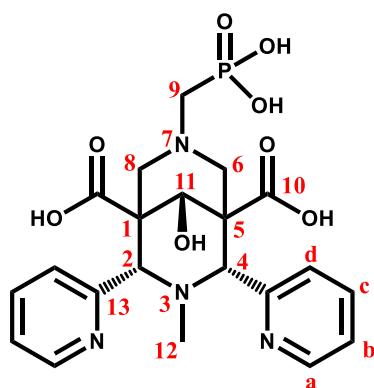
³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz): δ (ppm) = 8.24

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) = 40.69 (C13); 51.22 (C1 + C5); 51.77 (2C, C12); 53.16 (d, $J = 133.9$ Hz, C9); 55.77 (C6 + C8); 66.16 (C2 + C4); 71.88 (C10); 123.91 (2C, Cb); 127.56 (2C, Cd); 137.37 (2C, Cc); 149.33 (2C, Ca); 155.53 (2C, C11); 168.70 (2C, C14).

IR (cm^{-1} , ATR) ν 1075 (s, P=O); 1437 – 1599 (m, C=C); 1735 (s, C=O ester), 3221 (broad, O-H).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 521.18$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100%).

Elemental Analysis calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_8\text{P} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$, C, 52.17, H, 5.71, N, 10.58. Found: C, 51.94, H, 5.56, N, 10.41.

Ligand L³

Chemical Formula: C₂₁H₂₅N₄O₈P

Molecular Weight: 492.42 g/mol

The bispidol L² (514 mg, 1 mmol, 1 eq) was dissolved in a THF/H₂O (1:1) mixture (30 ml) and a solution of sodium hydroxide (200 mg, 5 mmol, 5 eq) in water (5 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature and the reaction was monitored by TLC (eluent system: H₂O/ACN 8:2 0.1 % TFA). After completion of the reaction, the mixture was evaporated to dryness, redissolved in 1 M hydrochloric acid and purified by flash chromatography with a C18 reverse phase column (eluent system: H₂O/ACN 0.1 % TFA), to give ligand L³ NaCl 4H₂O (621 mg, quantitative)

TLC: (C18; eluent: H₂O/ACN 8/2 0.1 % TFA; revelator: UV); R_f (L³) = 0.65.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) = 1.99 (s, 3H, H12); 3.23 (d, J = 10.1 Hz, 2H, H9); 3.54 (AB system, δ_A = 3.48 (H6ax + H8ax), δ_B = 3.60 (H6eq + H8eq), J = 12.8 Hz, 4H); 4.55 (s, 1H, H11); 5.2 (s, 2H, H2 + H4); 7.64 (dd, J₁ = 6.8 Hz, J₂ = 5.3 Hz, 2H, Hb); 7.88 (d, J = 7.7 Hz, 2H, Hd); 8.08 (td, J_t = 7.8 Hz, J_d = 1.5 Hz, 2H, Hc); 8.81 (d, J = 4.2 Hz, 2H, Ha).

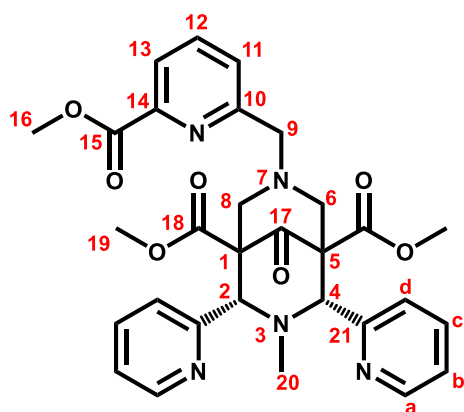
³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz): δ (ppm) = 15.00

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ (ppm) = 42.88 (C12); 51.74 (C1 + C5); 59.15 (C6/C8); 59.24 (C6/C8); 60.51 (d, J = 144.0 Hz, C9); 68.26 (C2 + C4); 74.80 (C11); 122.03 (2C, Cb); 125.72 (2C, Cc); 136.14 (2C, Cd); 149.52 (2C, Ca); 160.62 (2C, C13); 178.34 (2C, C10).

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1111 (s, P=O); 1267 (s, C-N); 1460 – 1530 (m, C=C); 1715 (s, C=O acid); 3418 (broad, O-H)

Mass Spectrometry (ESI+/MS): m/z = 493.14 [M+H]⁺

Elemental Analysis calculated for C₂₁H₂₅N₄O₈P·NaCl 4H₂O, C, 40.49, H, 5.34, N, 8.99. Found: C, 40.32, H, 5.03, N, 8.92.

Ligand L⁴

Chemical Formula: C₃₀H₃₁N₅O₇

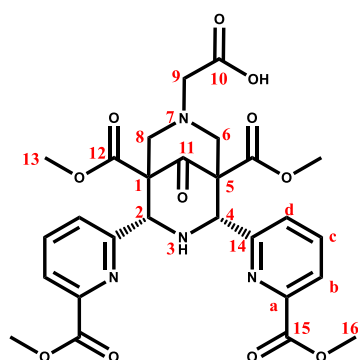
Molecular Weight: 573,61 g/mol

This synthesized was made by adaptation of a protocol described in references.^{18,19}

The ligand L²⁶ (50 mg, 1.18 mmol, 1 eq) was dissolved in 25 mL of acetonitrile. To this solution, the compound 5 (23.5 mg (93 %), 1.18 mmol, 1 eq) and sodium hydrogencarbonate (25 mg, 2.36 mmol, 2 eq) were added. Sodium iodide (catalytic amount) was finally added and the mixture was refluxed for 24 h. Crystals were obtained by slow evaporation of MeOH and the ¹H NMR confirmed the formation of L⁴.

The product was eventually published by another group.²⁰

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 1.91 (s, 3H, H₂₀); 3.01 (AB system, δ_B = 2.79 (H_{6ax} + H_{8ax}), δ_A = 3.22 (H_{6eq} + H_{8eq}), J = 12.2 Hz, 4H); 3.63 (s, 2H, H₉); 3.73 (s, 6H, H₁₉); 3.95 (s, 3H, H₁₆); 4.58 (s, 2H, H₂ + H₄); 7.07 (m, 2H, H_b); 7.46 (td, J_t = 7.7 Hz, J_d = 1.8 Hz, 2H, H_c); 7.60 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H₁₁); 7.78 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H₁₂); 7.94 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H₁₃); 7.85 (m, 1H, H_d); 8.05 (m, 1H, H_d); 8.39 (m, 2H, H_a).

Ligand L⁵

Chemical Formula: C₂₇H₂₈N₄O₁₁

Molecular Weight: 584.54 g/mol

In an erlenmeyer, the glycine amino acid (49.8 mg, 0.66 mmol, 1.1 eq) and sodium hydrogen carbonate (55.7 mg, 0.66 mmol, 1.1 eq) were mixed in 30 mL of MeOH and stirred at room temperature for 30 min. In a round bottom flask P² (293 mg, 0.60 mmol, 1 eq) was dissolved in 30 mL of MeOH and formaldehyde (54 mg, 1.8 mmol, 135 μL (37 %), 3 eq) was added.

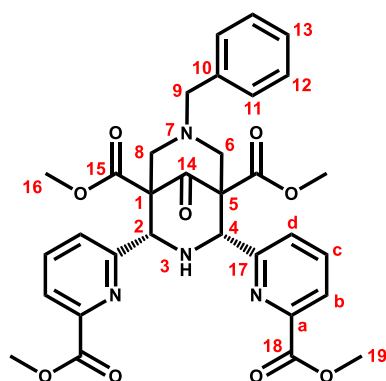
The solution containing the amino acid was then gradually added into the piperidone solution and the whole mixture was heated at 55°C under stirring. The loss of P³ was monitored by TLC and the reaction was stopped after 5h30. The crude solution was evaporated to dryness, and the residue was dissolved in 30 mL of DCM. After extraction with water (3x20 mL) and evaporation under reduced pressure, crystals were obtained from a crystallization in MeOH.

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (L⁵) = 0.24).

¹H NMR (d⁶-DMSO, 400 MHz): δ (ppm) = 3,41 (AB system, δ_A = 3,25 (H6ax + H8ax), δ_B = 3,57 (H6eq + H8eq), J_{AB} = 11,8 Hz, 4H); 3,68 (s, 6H, H13); 3,87 (s, 6H, H16); 5,14 (s, 2H, H2 + H4); 7,88 (d, J = 7,3 Hz, 2H, Hd); 8,03 (m, 4H, Hc + Hb).

¹³C NMR (d⁶-DMSO, 101 MHz): δ (ppm) = 57,26 (C6 + C8); 56,20 (C9); 52,39 (2C, C13); 52,91 (2C, C16); 61,16 (C1 + C5); 65,90 (C2 + C4); 127,26 (2C, Cd); 124,34 (Cc/Cb); 138,94 (Cc/Cb); 146,70 (2C, C14); 158,06 (2C, Ca); 165,42 (2C, C12); 169,29 (2C, C15); 172,25 (C10); 205,34 (C11).

Ligand L⁷



Chemical Formula: C₃₂H₃₂N₄O₉

Molecular Weight: 616.63 g/mol

To 100 mL of a solution of P³ (1 g, 2.06 mmol, 1 eq) in 30 mL of MeOH was added formaldehyde (186 mg, 6.2 mmol, 462 μL (37 %), 3 eq) under stirring at room temperature. Then benzylamine (243 mg, 2.26 mmol, 247 μL, 1.1 eq) was poured into the mixture, which was heated at 55°C. The reaction was monitored by TLC (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1). Complete disappearance of P³ was observed after 5h30, when the reaction was stopped and the crude material evaporated to dryness. The residue was suspended in a minimum of EtOH, leading to the formation of a precipitate which was isolated by centrifugation and washed with cold EtOH (3x10 mL) to give the final product L·2/3(EtOH) as a white powder (613 mg, 9.94 mmol, 46 %).

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (L⁷) = 0.40).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) =

3.30 (AB system, δ_A = 2.95 (H6ax + H8ax), δ_B = 3.65 (H6eq + H8eq), J = 12.5 Hz, 4H); 3.40 (s, 2H, H9); 3.78 (s, 6H, H16); 3.84 (s, 6H, H19); 5.25 (AK2 system, δ_A = 5.30 (H3), δ_B = 5.19

(H2 + H4), $J_{AK} = 13.5$ Hz, 3H); 7.00 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H12); 7.06 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H13); 7.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H11); 7.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Hd); 7.75 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, Hc); 7.96 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, Hb).

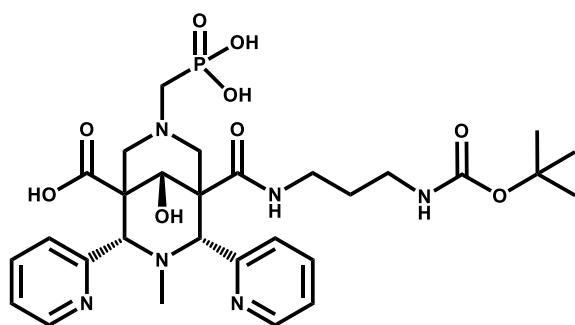
^{13}C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 52.36 (2C, C16); 52.56 (2C, C19); 57.79 (C6 + C8); 60.98 (C9); 61.48 (C1 + C5); 66.24 (C2 + C4); 124.10 (2C, Cb); 126.47 (2C, Cd); 127.20 (C13); 128.02 (2C, C12); 129.23 (2C, C11); 137.63 (Cc + C10); 147.05 (2C, C17); 157.61 (2C, Ca); 165.56 (2C, C15); 169.44 (2C, C18); 204.66 (C14).

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1437 – 1509 – 1585 (m, C=C); 1718 - 1720 (s, C=O ester); 1733 (s, C=O cétone); 3290 (m, N-H).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 617.22$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%)

Elemental Analysis calculated for C₃₂H₃₂N₄O₉ · 2/3(CH₃CH₂OH), C, 61.85, H, 5.61, N, 8.66. Found: C, 61.26, H, 5.12, N, 8.19.

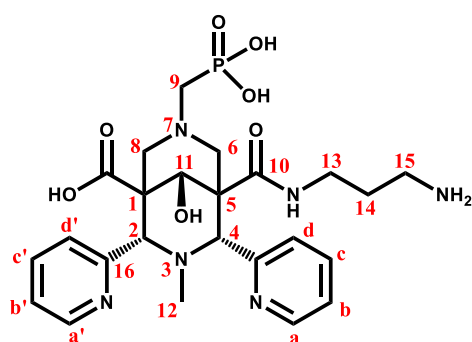
Ligand L¹⁶



Chemical Formula: C₂₉H₄₁N₆O₉P

Molecular Weight: 648.65 g/mol

At first, the ligand L³ (417 mg, 0.85 mmol, 1 eq) was dissolved in water and the pH was adjusted to pH 7.5 with triethylamine. Water was then evaporated. Dry L³ was dissolved in 5 mL DMSO, to which were added a solution of EDCI (243 mg, 1.27 mmol, 1.5 eq) in 2 mL of DMSO, a solution of HOBt (171.6 mg, 1.27 mmol, 1.5 eq) in 2 ml of DMSO and triethylamine (117 μL , 0.85 mmol, 1 eq). The *tert*-butyl (3-aminopropyl)carbamate (147.3 mg, 0.85 mmol, 1 eq) was then added to the mixture, which was stirred at room temperature. The complete disappearance of the starting L³ was monitored by TLC (C18, eluent: H₂O/ACN). After 24 h, DMSO was removed by precipitation in diethyl ether. The precipitate was not further purified and the crude product was subjected to the next step.

Ligand L¹⁷

Chemical Formula: C₂₄H₃₃N₆O₇P

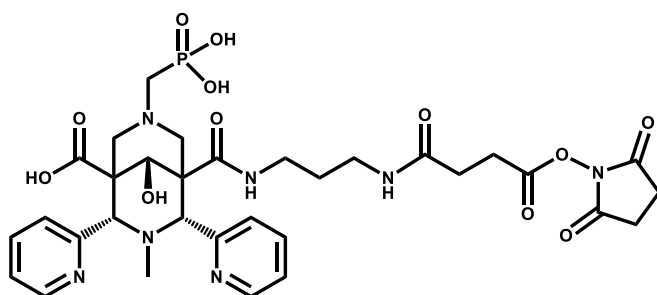
Molecular Weight: 548.54 g/mol

The crude product from the synthesis of L¹⁶ was dissolved in a 15 mL of a solution of H₂O/TFA 9/1. The mixture was then stirred overnight at room temperature. Water and excess of TFA were removed by evaporation under reduced pressure. The residue was subjected to a first time FPLC on a reverse phase (C18, H₂O/ACN 100/0 to 70/30 (0,1 % TFA)). The main fraction containing the desired product was purified by a second FPLC (C18, H₂O/MeOH 100/0 to 70/30) to give L¹⁷ as a white powder (80 mg, 17 % over two steps). Further optimization is required.

¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ (ppm) = 1.87 (s, 2H, H14); 1.91 (s, 3H, H12); 2.96 (s, 3H, H15); 3.24 (m, 4H, H9+ H13 + H6ax + H8ax); 3.91 (AB system, H6/H8 eq, J_{AB} = 13 Hz, 1H); 4.22 (AB system, H6/H8 eq, J_{AB} = 12.5 Hz, 1H); 4.49 (s, 1H, H11); 4.95 (s, 2H, H2 + H4); 7.55 (m, Hb + Hb' + Hd + Hd', 4H); 7.96 (m, Hc + Hc', 2H); 8.75 (m, Ha + Ha', 2H).

³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz): δ (ppm) = 15.20

Mass Spectrometry (ESI+/MS): m/z = 549,223 [L¹⁷+H]⁺; 555,229 [L¹⁷+Li]⁺

Ligand L¹⁸

Chemical Formula: C₃₂H₄₀N₇O₁₂P

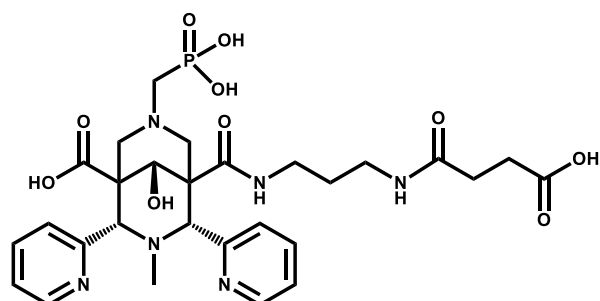
Molecular Weight: 745.68 g/mol

The synthesis of L¹⁸ was an attempt for the functionalization of L³.

At first, the ligand L¹⁷ (27.2 mg, 0.05 mmol, 1 eq) was dissolved in water and the pH was adjusted to pH 7.38 with N-methylmorpholine. Water was then evaporated. Dry L¹⁷ was dissolved in 5 mL distilled DMF under inert atmosphere, to which was added the di-NHS-ester 6 (62 mg, 0.20 mmol, 4 eq) together with N-methylmorpholine (5.5 μ L, 0.05 mmol, 1 eq). The mixture was then stirred at room temperature under inert atmosphere overnight when 1.5 equivalent of N-methylmorpholine were added. The reaction was pursued

overnight. DMF was then removed by precipitation in diethyl ether and the product was purified by FPLC (C18, eluent: H₂O/ACN 1 % TFA from 100/0 to 50/50). after being dissolved in 1 mL of a TFA 1 % solution.

This first experiment lead to the formation of the hydrolyzed species L¹⁹ as confirmed by the ESI/MS spectrum.

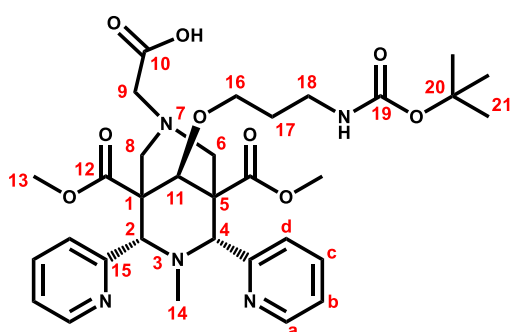


Chemical Formula: C₂₈H₃₇N₆O₁₀P

Molecular Weight: 648,61 g.mol

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 549.217 [L^{17}+H]^+$; $649.233 [L^{19}+H]^+$

Ligand L²²



Chemical Formula: C₃₂H₄₃N₅O₉

Molecular Weight: 641,72 g/mol

Ligand L²⁰ (350 mg, 0.72 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (20 mL) and the mixture was stabilized at 0°C for the addition of NaH (58 mg, 1.45 mmol, 2 eq). N-boc-3-bromopropylamine (206 mg, 0.87 mmol, 1.2 eq) was added and the reaction was placed at room temperature under stirring overnight. Solvents were removed under reduced pressure and extraction with H₂O/Et₂O gave the crude product in the aqueous phase. After evaporation and FPLC purification (C18, H₂O/MeOH 90/10 to 0/100), pure L²² was obtained (246 mg, 53 %).

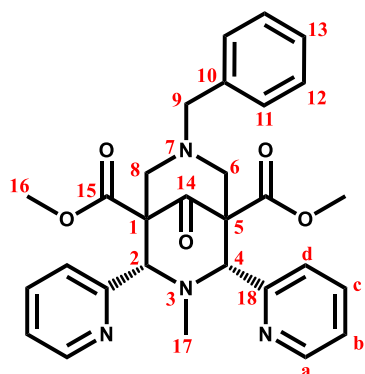
TLC: (C18; eluent: H₂O/MeOH 25/75; revelator: UV); R_f (L²²) = 0.45.

¹H NMR (MeOD, 400 MHz): δ (ppm) = 1.46 (s, 9H, H₂₁); 1.74 (s, 3H, H₁₄); 1.80 (m, 2H, H₁₇); 2.84 (AB system, $\delta_A = 2.51$, $\delta_B = 3.17$, $J_{AB} = 12$ Hz, 4H, H₆ + H₈); 2.91 (s, 2H, H₉); 3.27 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz, H₁₈); 3.49 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz, H₁₆); 3.63 (s, 6H, H₁₃); 3.95 (s, 1H, H₁₁); 4.62 (s, 2H, H₂ + H₄); 7.35 (m, 2H, H_b); 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_d); 7.78 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_c); 8.71 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, H_a).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 1305.60 ([2M+Na]^+, 100\%)$

Elemental Analysis calculated for $C_{32}H_{42}N_5O_9 \cdot Na \cdot H_2O$, C, 56.38, H, 6.51, N, 10.27.
Found: C, 56.71, H, 6.53, N, 10.33.

Ligand L²⁵



Chemical Formula: $C_{29}H_{30}N_4O_5$

Molecular Weight: 514.58 g/mol

This product was obtained from an adaptation of the protocol described in reference.¹⁹

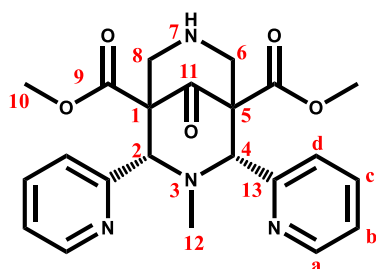
To a solution of piperidone P¹ (499 mg, 1.30 mmol, 1 eq) in methanol (60 mL) was added formaldehyde (117 mg, 3.91 mmol, 3 eq, 292 μ L, 37% aqueous solution) and then a solution of benzylamine (153 mg, 1.43 mmol, 1.1 eq, 156 μ L) in 5 mL of MeOH. The reaction mixture was heated at 60°C for 6 h and evaporated to dryness. The crude product was then dissolved in a minimum of EtOH and the precipitate formed was filtered. After recrystallization from ethanol, the final product was obtained as a white powder (308 mg, 0.598 mmol, 46 %).

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (L²⁵) = 0.43.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 1.97 (s, 3H, H17); 2.8 (AB system, $\delta_A = 2.55$ (H6ax + H8ax), $\delta_B = 3.05$ (H6eq + H8eq), $J_{AB} = 12.1$ Hz, 4H); 3.36 (s, 2H, H9); 3.81 (s, 6H, H16); 4.69 (s, 2H, H2 + H4); 7.12 (ddd, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, 2H, Hb); 7.38 (m, 5H, H11 + H12 + H13); 7.47 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 2H, Hc); 7.87 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Hd); 8.44 (ddd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, $J_3 = 0.7$ Hz, 2H, Ha).

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 43.39 (C17); 52.63 (2C, C16); 59.14 (C6 + C8); 62.24 (C9); 62.59 (C1 + C5); 73.91 (C2 + C4); 123.00 (2C, Cb); 123.54 (2C, Cd); 136.28 (2C, Cc); 149.20 (2C, Ca); 127.77 (C13); 128.55 (2C, C12); 130.55 (2C, C11); 137.04 (C10); 158.57 (2C, C18); 168.67 (2C, C15); 203.82 (C14).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 515.23$ [M+H]⁺, 100 %

Ligand L²⁶

Chemical Formula: C₂₂H₂₄N₄O₅

Molecular Weight: 424.46 g/mol

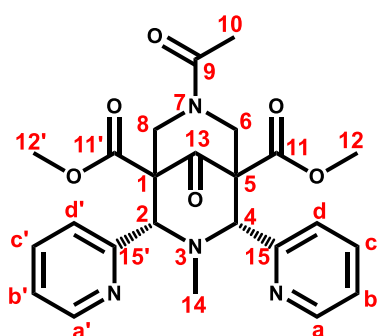
This protocol is described in the reference.¹⁹

After solubilization of L²⁵ (500 mg, 0.97 mmol, 1 eq) in 40 mL of ethyl acetate (puriss p.a. ACS reagent grade), palladium on activated charcoal (5 % m/m, 25 mg) was added. The solution was stirred, hydrogen gas was bubbled into it and the mixture was heated at 70°C overnight. The reaction mixture was then evaporated to dryness, suspended in dichloromethane and the catalyst was removed by vacuum filtration over celite. After evaporation, the product was obtained quantitatively (412 mg) as a white powder.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.79 (s, 3H, H12); 3.57 (ABX system, $\delta_A = 3.21$, H6ax + H8ax, $\delta_B = 3.93$, H6eq + H8eq, $\delta_X = 4.27$, H7, $J_{AB} = 13.1$ Hz, 5H); 3.70 (s, 6H, H10); 4.62 (s, 2H, H2 + H4); 7.24 (ddd, $J_1 = 7.5$, $J_2 = 4.8$, $J_3 = 1.1$ Hz, 1H, Hb); 7.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Hd); 7.62 (td, $J_t = 7.7$, $J_d = 1.8$ Hz, 1H, Hc); 8.67 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ha).

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 42.75 (C12); 52.38 (2C, C10); 55.19 (C6 + C8); 64.51 (C1 + C5); 73.85 (C2 + C4); 123.36 (2C, Cb); 124.50 (2C, Cd); 136.67 (2C, Cc); 150.20 (2C, Ca); 157.35 (2C, C13); 168.84 (2C, C9); 203.06 (C11).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 425.17$ ([M+H]⁺, 100%).

Ligand L²⁷

Chemical Formula: C₂₄H₂₆N₄O₆

Molecular Weight: 466.49 g/mol

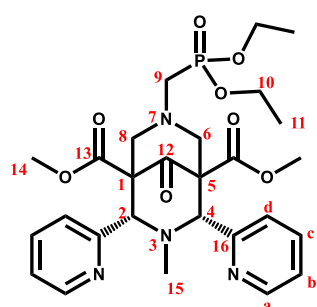
This product was obtained by accident. After solubilization of L²⁵ (500 mg, 0.97 mmol, 1 eq) in 40 mL of ethyl acetate (containing anhydride acetic as impurity), palladium on activated charcoal (10 %) was added (10 %, 50 mg). The solution was stirred, hydrogen gas was bubbled into it and the mixture was heated at reflux overnight. The reaction mixture was then evaporated to dryness, suspended in dichloromethane and the catalyst was removed by

vacuum filtration over celite. After evaporation, the product was obtained quantitatively as a white powder.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.88 (s, 3H, H14); 2.39 (s, 3H, H10); 3.74 (s, 3H, H10/H10'); 3.79 (s, 3H, H10/H10'); 4.24 (AA'XX' system, $\delta_A = 3.17$ (H6ax/H8ax); $\delta_X = 3.66$ (H6ax/H8ax); $\delta_X = 4.81$ (H6eq/H8eq); $\delta_A = 4.96$ (H6eq/H8eq), $J_{AA'} = 14,5$ Hz, $J_{XX'} = 13,4$ Hz, $J_{AX} = 2,5$ Hz, 4H); 4.54 (s, 1H, H2/H4); 4.59 (s, 1H, H2/H4); 7.22 (m, 1H, Hb/Hb'); 7.28 (ddd, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $J_3 = 1.0$ Hz, 1H, Hb/Hb'); 7.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hd/Hd'); 7.73 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 1H, Hc/Hc'); 7.80 (m, 2H, Hc/Hc' + Hd/Hd'); 8.49 (d, $J = 4.7$, 1H, Ha/Ha'); 8.65 (d, $J = 4.7$, 1H, Ha/Ha').

¹³C RMN (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 22.20 (C10); 43.16 (C14); 47.50 (C6/C8); 50.80 (C6/C8); 52.70 (C10/C10'); 52.77 (C10/C10'); 62.09 (C1/C5); 62.20 (C1/C5); 73.52 (C2/C4); 75.31 (C2/C4); 123.59 (Cb/Cb'); 123.65 (Cb/Cb'); 124.63 (Cd/Cd'); 124.98 (Cd/Cd'); 136.78 (Cc/Cc'); 137.03 (Cc/Cc'); 149.20 (Ca/Ca'); 150.05 (Ca/Ca'); 156.68 (C15/C15'); 157.28 (C15/C15'); 167.69 (C11/C11'); 168.08 (C11/C11'); 170.32 (C9); 202.50 (C13).

Ligand L²⁸



Chemical Formula: C₂₇H₃₅N₄O₈P

Molecular Weight: 574.57 g/mol

The compound 8 (555 mg, 1.65 mmol, 1.4 eq) was added to a solution of acetonitrile (250 mL) containing the compound L²⁶ (500 mg, 1.18 mmol, 1 eq). Sodium carbonate (250 mg, 2.36 mmol, 2 éq) was then added to the mixture which was stirred and heated at 70°C. The reaction was monitored by ¹H and ³¹P NMR and stopped after 26 days. The reaction mixture was evaporated to dryness, solubilized in 30 mL of dichloromethane and washed with water (3 times 20 mL). The organic phase was then evaporated to dryness and the addition of diethyl ether (≈ 10 mL) led to the formation of a precipitate, which was isolated by centrifugation. The supernatant diethyl ether solution was evaporated to dryness. The compound L²⁸ was obtained by crystallization from ethyl acetate as L28·0.5H₂O (282 mg, 0.5 mmol, 41 %).

Elemental analysis on new crystals will be done once more shortly.

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (L²⁸) = 0.67).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 1.30 (t, 6H, $J = 7.1$ Hz, H11); 2.02 (s, 3H, H15); 2.85 (d, $J = 10.7$ Hz, 2H, H9); 3.09 (AB system, $\delta_A = 2.89$, H6 + H8ax, $\delta_B = 3.29$, H6 + H8 eq, $J_{AB} = 12.3$ Hz, 4H); 3.81 (s, 6H, H14); 4.12 (qt, $J = 7.2$ Hz, 2H, H10); 4.69 (s, 2H, H2/H4); 7.22

(ddd, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, 2H, Hb); 7.78 (td, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 2H, Hc); 8.19 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Hd); 8.51 (ddd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, $J_3 = 0.7$ Hz, 2H, Ha).

^{31}P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ (ppm) = 23.64 (m)

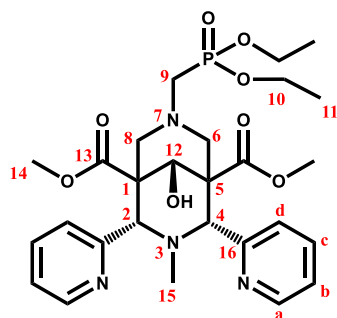
^{13}C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 16.57 (d, $J = 6.0$ Hz, 2C, C11); 43.27 (C15); 52.69 (d, $J = 157.5$ Hz, C9); 52.67 (2C, C14); 59.92 (d, $J = 8.2$ Hz, C6 + C8); 62.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 2C, C10); 62.66 (C1 + C5); 74.03 (C2 + C4); 123.19 (2C, Cb); 124.29 (2C, Cd); 136.75 (2C, Cc); 149.36 (2C, Ca); 158.57 (2C, C16); 168.52 (2C, C13); 203.10 (C12).

IR (cm⁻¹, ATR) v 1019 (s, P-O-C); 1279 (s, P=O); 1466 – 1590 (m, C=C); 1722 (s, C=O).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 581.236$ ([M+Li]⁺, 100%)

Elemental Analysis calculated for C₂₇H₃₅N₄O₈P·0.5H₂O: C, 55.57, H, 6.22, N, 9.60. Found: C, 55.29, H, 6.14, N, 8.87.

Ligand L²⁹



Chemical Formula: C₂₇H₃₇N₄O₈P

Molecular Weight: 576.59 g/mol

The bispidone L²⁸ (948 mg, 1.6 mmol, 1 eq) was dissolved in 150 ml of anhydrous MeOH. The solution was cooled at -78°C and this temperature was kept during the reaction. Sodium borohydride (94 mg, 2.5 mmol, 1.5 eq) was then gradually added. The reaction was monitored by TLC (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1). After 5h, the reaction was quenched by the addition of 15 mL of a saturated NH₄Cl aqueous solution at -78°C. The solvent was finally evaporated under vacuum using a rotary evaporator. The residue was dissolved in 50 mL of dichloromethane and washed three times with 40 mL of water. The organic phase was evaporated to dryness under reduced pressure. The ligand L²⁹ was purified by crystallization from ethyl acetate and obtained as L²⁹·NaCl·2.5H₂O (523 mg, 47 %).

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (L²⁹) = 0.57).

^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H11); 2.45 (s, 3H, H15); 3.3-6.2 (ABX system, $\delta_A = 3.32$, H6 + H8ax, $\delta_B = 3.47$, H6 + H8eq, $\delta_X = 6.14$, H2 + H4, $J_{AB} = 12.0$ Hz, $J_{BX} = 3.2$ Hz, 6H); 3.33 (m, 2H, H9); 3.73 (s, 6H, H14); 4.15 (m, 4H, H10); 4.81 (s, 1H, H12); 7.36 (ddd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $J_3 = 0.9$ Hz, 2H, Hb); 7.82 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 2H, Hc); 8.06 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Hd); 8.68 (dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, 2H).

^{31}P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ (ppm) = 24.66 (m).

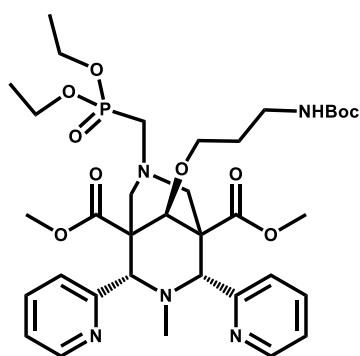
^{13}C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 16.57 (d, J = 5.7 Hz, 2C, C11); 43.54 (C15); 51.01 (d, J = 139.8 Hz, C9); 52.55 (C1 + C5); 53.03 (2C, C14); 54.39 (C6 + C8); 61.82 (d, J = 7.0 Hz, 2C, C10); 65.54 (C2 + C4); 72.51 (C12); 124.44 (2C, Cb); 128.72 (Cd); 137.64 (2C, Cc); 149.33 (2C, Ca); 152.32 (2C, C16); 169.24 (2C, C13).

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1019 (s, P-O-C); 1275 (s, P=O); 1466 – 1588 (m, C=C); 1723 (m, C=O).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): m/z = 577.240 ([M+H]⁺, 100%)

Elemental Analysis calculated for C₂₇H₃₇N₄O₈P·NaCl·2.5H₂O: C, 47.69, H, 6.23, N, 8.24.
Found: C, 47.7, H, 5.99, N, 8.40.

Ligand L³⁰



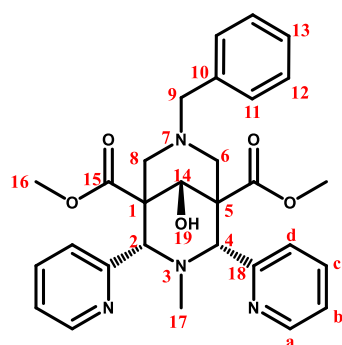
Chemical Formula: C₃₅H₅₂N₅O₁₀P

Molecular Weight: 733.80 g/mol

The synthesis described here is a first attempt which lead to the formation of L³⁰ as confirmed by ESI+/MS.

Ligand L²⁹ (150 mg, 0.26 mmol, 1 eq) was dissolved in DMF (10 mL) under inert atmosphere and the mixture was stabilized at -42°C for the addition of NaH (12.5 mg, 0.52 mmol, 2 eq). N-boc-3-bromopropylamine (74 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq) was added. The mixture was stirred for 2 hours at -42°C and 3 hours placed at room temperature. After 5 hours, the reaction was stopped by the addition of 1 ml of a solution of saturated NH₄Cl. DMF was removed by precipitation in diethyl ether. The precipitate was then dissolved in 10 mL DCM and washed with water (3x10 mL). The organic phase revealed the presence of L³⁰. A further FPLC on the organic phase (SiO₂, DCM/MeOH 100/0 to 80/20) did not allow the purification of L³⁰ yet.

Mass Spectrometry (ESI+/MS): m/z = 734,353 [L³⁰+H]⁺

Ligand L³²

Chemical Formula: C₂₉H₃₂N₄O₅

Molecular Weight: 516.60 g/mol

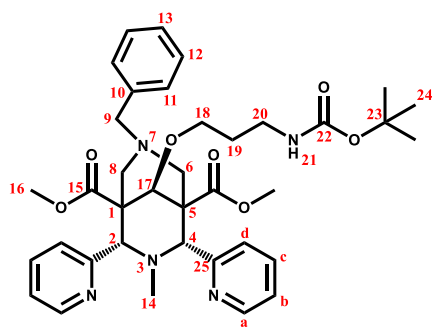
This ligand was obtained by an adaptation of the protocol described in the reference.¹⁷ At first, the bispidone L²⁵ (2 g, 3.9 mmol, 1 eq) was dissolved in 300 ml of anhydrous MeOH. The solution was cooled at -78°C and this temperature was kept during the reaction. Sodium borohydride (220 mg, 5.83 mmol, 1.5 eq) was then gradually added. The reaction was monitored by TLC (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1). After 6h, the reaction was quenched at -78°C by the addition of 20 mL of a saturated NH₄Cl aqueous solution. The solvent was finally evaporated under vacuum using a rotary evaporator. The residue was suspended in THF and the precipitate was isolated by centrifugation. The product was purified by chromatography (SiO₂, eluent: DCM/MeOH 100/0 to 80/20) and was obtained as a white powder (964 mg, 48%).

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 9/1; revelator: UV); R_f (L³²) = 0.37.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 2.25 (s, 3H, H17); 3.31 (AB system, δ_A = 3.09 (H6ax + H8ax); δ_B = 3.53 (H6eq + H8eq), J_{AB} = 12.2 Hz, 4H); 3.69 (s, 6H, H16); 3.76 (s, 2H, H9); 4.77 (d, J = 7.0 Hz, 1H, H14); 5.94 (s, 2H, H2 + H4); 7.23 (ddd, J = 7.6 ; 4.8 ; 1.0 Hz, 2H, Hb); 7.30 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H19); 7.44 (m, 3H, H12/H13); 7.52 (m, 2H, H11); 7.72 (td, J_t = 7.7 , J_d = 1.8 Hz, 2H, Hc); 7.88 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Hd); 8.25 (dd, J = 4.8 ; 0.9 Hz, 2H, Ha).

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 42,54 (C17); 51,98 (C1 + C5); 52,99 (2C, C16); 54.97 (C6 + C8); 62,10 (C9); 65,84 (C2 + C4); 72.98 (C14); 123,99 (2C, Cb); 127,96 (2C, Cd); 128,20 (3C, C12 + C13); 130,81 (2C, C11); 134,98 (C10); 137,16 (2C, Cc); 148,98 (2C, Ca); 152,91 (2C, C15); 169,26 (2C, C18).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): m/z = 517.26 ([M+H]⁺, 100%)

Ligand L³³

Chemical Formula: C₃₇H₄₇N₅O₇

Molecular Weight: 673.81 g/mol

Ligand L³² (50 mg, 0.097 mmol, 1 eq) was dissolved in ACN (10 mL) under inert atmosphere and the mixture was stabilized at 0°C for the addition of NaH (5.8 mg (60 %), 0.14 mmol, 1.5 eq). N-boc-3-bromopropylamine (26 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq) was added 10 minutes later and the reaction was placed at room temperature under stirring overnight. Acetonitrile was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DCM in which a precipitate was formed and removed by filtration. The crude product was purified by FPLC (SiO₂, DCM/MeOH 100/0 to 80/20) and the ligand L³³·NaBr·H₂O was obtained as a white powder (22 mg, 29 %).

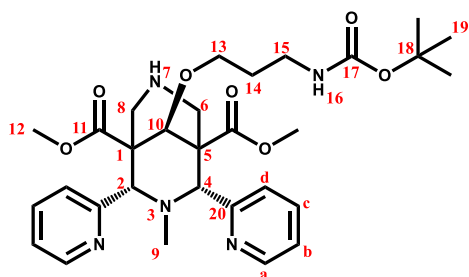
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.41 (s, 9H, H24); 1.82 (qt, *J* = 5.7 Hz, 2H, H19); 1.87 (s, 3H, H14); 2.52 (AB system, δ_A = 2.25, δ_B = 2.80, 4H, H6 + H8); 3.25 (s, 2H, H9); 3.34 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, H20); 3.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H18); 3.68 (s, 6H, H16); 3.77 (s, 1H, H17); 4.66 (s, 2H, H2 + H4); 5.47 (s, 1H, H21); 7.05 (dd, *J*₁ = 6.5 Hz, *J*₂ = 5.4 Hz, 2H, Hb); 7.35 (m, 7H, H11 + H12 + H13 + Hc); 7.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Hd); 8.41 (s, 2H, Ha).

¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 28.61 (C24); 29.81 (C19); 38.08 (C20); 43.77 (C14); 50.96 (C1 + C5); 52.28 (2C, C16); 56.55 (C6 + C8); 63.78 (C9); 67.87 (C2 + C4); 70.60 (C18); 78.76 (C23); 81.84 (C17); 122.16 (2C, Cb); 123.95 (2C, Cd); 127.63 (C13); 128.45 + 130.73 (4C, C12 + Cc); 135.90 (2C, C11); 148.38 (2C, Ca); 156.33 (C22), 161.78 (2C, C25); 172.34 (2C, C15).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): *m/z* = 674.36 ([M+H]⁺, 100%)

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1504 – 1591 (m, C=C); 1694 (s, N-H); 1736 (s, C=O ester); 1757 (s, C=O carbamate); 3302 (s, N-H)

Elemental Analysis calculated for C₃₇H₄₇N₅O₇·NaBr·H₂O: C, 55.92, H, 6.22, N, 8.81. Found: C, 56.34, H, 6.19, N, 8.62.

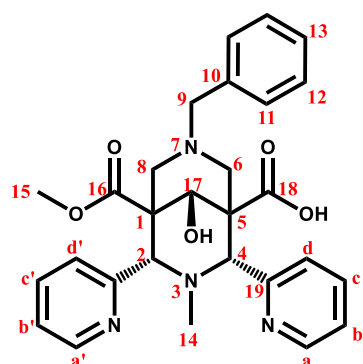
Ligand L³⁴

Chemical Formula: C₃₀H₄₁N₅O₇

Molecular Weight: 583.69 g/mol

The ligand L³³ (52.9 mg, 0.078 mmol, 1 eq) was dissolved in 15 mL ethyl acetate (puriss p.a. ACS reagent grade). To this solution Pd/C 10 % was added (5 % m/m). The solution was stirred, hydrogen gas was bubbled into it and the mixture was heated at 70°C overnight. The reaction mixture was then evaporated to dryness, suspended in dichloromethane and the catalyst was removed by vacuum filtration over celite. After evaporation, the product was subjected to a purification by FPLC (SiO₂, DCM/MeOH from 100/0 to 80/20) and the ligand L³⁴ (12.3 mg, 27 %) was obtained as a white powder.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.45 (s, 1H, H19); 1.61 (s, 1H, H9); 1.79 (m, 2H, H4); 3.31 (dd, $J = 11.3, 5.5$ Hz, 2H, H15); 3.44 (AB system, $\delta_A = 3.07, \delta_B = 3.81, J = 13.5$ Hz, 4H, H6 + H8); 3.49 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, H13); 3.58 (s, 6H, H12); 4.06 (s, 1H, H10); 4.52 (s, 2H, H2 + H4); 5.42 (s, 1H, H16); 7.15 (ddd, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, 2H, Hb); 7.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Hd); 7.61 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 2H, Hc); 8.61 (dd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz, 2H, Ha).

Ligand L³⁵

Chemical Formula: C₂₈H₃₀N₄O₅

Molecular Weight: 502.57 g/mol

The ligand L³² (1.07 g, 2.1 mmol, 1 eq) was dissolved in 25 mL of a mixture of 95/5 DCM/MeOH. To this mixture under stirring was added, at room temperature, a total amount of 69.4 mg of lithium hydroxide (2.9 mmol, 1.4 eq) over three days. The reaction was monitored by TLC. After completion, the mixture was evaporated to dryness under reduced pressure at 35°C. The crude product was then purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/MeOH gradient: 100/0 to 80/20). The fractions containing the final product

(0.502 g in total) were mixed together for further purification by flash chromatography (C18, eluent: H₂O/ACN; gradient 100/0 to 70/30). From this second chromatography, the final product L.H₂O was obtained as a white powder with a 66 % yield (374 mg).

TLC: (SiO₂; eluent: DCM/MeOH 85/15; revelator: UV); R_f (L³⁵) = 0.39.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 2.07 (s, 3H, H14); 3.11 (AA'XX' system, $\delta_{X'} = 2.72$ (H8ax), $\delta_{A'} = 2.82$ (H6ax), $\delta_{X} = 3.40$ (H8eq), $\delta_{A} = 3.49$ (H6eq), $J_{XX'} = 12.8$ Hz, $J_{AA'} = 11.9$ Hz, $J_{AX} = 2.5$ Hz, $J_{A'X'} = 1.4$ Hz, 4H); 3.65 (s, 3H, H15); 3.69 (AB system, $\delta_A = 3.59$, $\delta_B = 3.79$, $J_{AB} = 12.8$ Hz, 2H, H9); 4.30 (s, 1H, H17); 5.18 (s, 1H, H2); 5.33 (s, 1H, H4); 7.19 (ddd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, $J_3 = 1.2$ Hz, 1H, Hb'); 7.21 (ddd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, 1H, Hb); 7.43 (m, 3H, H12+H13); 7.52 (m, 2H, H11); 7.54 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hd'); 7.61 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hd); 7.69 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 2H, Hc/Hc'); 7.71 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 2H, Hc/Hc'); 8.18 (ddd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, $J_3 = 0.7$ Hz, 1H, Ha'); 8.32 (ddd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, $J_3 = 0.8$ Hz, 1H, Ha).

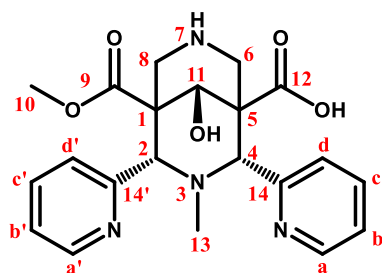
¹³C NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 42.81 (C14); 49.91 (C5); 50.97 (C1); 52.79 (C15); 55.10 (C6); 56.54 (C8); 62.27 (C9); 73.37 (C17); 66.18 (C4); 68.80 (C2); 123.73 (Cb/Cb'); 123.87 (Cb/Cb'); 125.42 (Cd'); 127.31 (Cd); 128.34 (C13); 128.55 (2C, C12); 131.07 (2C, C11); 133.94 (C10); 137.09 (Cc/Cc'); 137.76 (Cc/Cc'); 148.82 (Ca); 149.25 (Ca'); 153.60 (C19/C19'); 154.16 (C19/C19'); 169.94 (C16); 172.10 (C18).

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1473 – 1588 – 1625 (m, C=C); 1744 (s, C=O); 2885 (m, O-H)

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 503.24$ ([M+H]⁺, 100%)

Elemental Analysis calculated for C₂₈H₃₀N₄O₅·H₂O: C, 64.60, H, 6.20, N, 10.76. Found: C, 64.8, H, 6.06, N, 10.45.

Ligand L³⁶



Chemical Formula: C₂₁H₂₄N₄O₅

Molecular Weight: 412.45 g/mol

The ligand L³⁵ (50 mg, 0.1 mmol, 1 eq) was dissolved in 25 mL of ethanol. To this solution Pd/C 10 % was added (5 % m/m). The solution was stirred, hydrogen gas was bubbled into it and the mixture was heated at reflux overnight. The catalyst was removed by centrifugation. After evaporation to dryness, the product L³⁶ was obtained with 10 % of an impurity as evaluated by ¹H NMR (25 mg, 60 %).

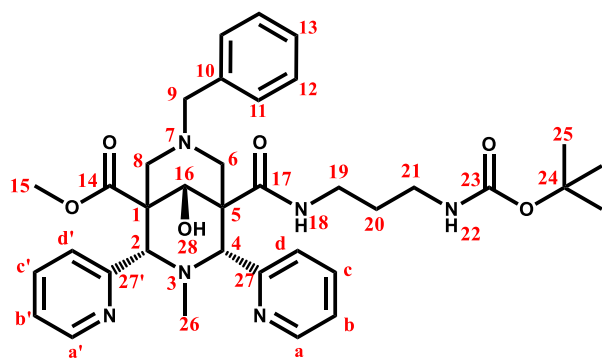
¹H NMR (MeOD, 500 MHz): δ (ppm) = 1.58 (s, 3H, H13); 3.62 (s, 3H, H10); 3.66 (AB system, $\delta_A = 3.19$, (H8ax), $J_d = 1.1$ Hz, $\delta_B = 4.13$, (H8eq), $J_{AB} = 13.5$ Hz, 2H); 3.84 (AB system,

$\delta_A = 3.47$, (H6ax), $J_d = 1.4$ Hz, $\delta_B = 4.20$, (H6eq), $J_{AB} = 12.9$ Hz, 2H); 4.36 (s, 1H, H11), 4.62 (s, 1H, H2); 4.80 (s, 1H, H4); 7.34 (m, 2H, Hb + Hb'); 7.39 (d, $J_d = 6.9$ Hz, 1H, Hd'); 7.55 (d, $J_d = 7.8$ Hz, 1H, Hd); 7.75 (td, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.5$ Hz, 1H, Hc'); 7.79 (dd, $J_t = 7.7$ Hz, $J_d = 1.8$ Hz, 1H, Hc); 8.62 (d, $J_d = 4.1$ Hz, 1H, Ha'); 8.65 (ddd, $J = 4.8, 1.6, 0.7$ Hz, 1H, Ha).

^{13}C RMN (MeOD, 126 MHz): δ (ppm) = 42.21 (C13); 48.37 (C6); 48.62 (C8); 50.56 (C1 + C5), 52.89 (C10); 67.98 (C4); 69.67 (C2); 74.49 (C11); 124.59 (Cb + Cb'); 127.44 (Cd'); 128.97 (Cd); 137.87 (Cc); 138.57 (Cc'); 150.30 (Ca'); 150.45 (Ca); 159.09 (C14/C14') 159.46 (C14/C14'); 170.83 (C9); 175.3 (C12).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): $m/z = 419.2$ ($[\text{M}+\text{Li}]^+$, 100%)

Ligand L³⁷



Chemical Formula: $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_6$

Molecular Weight: 658,80

Ligand L³⁵ (143 mg, 0.28 mmol, 1 eq) was dissolved in 20 mL of DCM. To this solution were added *tert*-butyl (3-aminopropyl)carbamate (49.6 mg, 0.28 mmol, 1 eq), EDCI (109 mg, 0.57 mmol, 2 eq) and the diisopropylethylamine (100 μL , 0.28 mmol, 2 eq). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 days after which a DCM/H₂O extraction was performed. The organic phase was evaporated. The residue was purified by FPLC (SiO₂, DCM/MeOH 100/0 to 90/10) and the ligand L³⁷ was obtained as a white powder (147.3 mg, 78 %)

^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.43 (s, 9H, H25); 1.73 ($\delta_{20a} = 1.67$, $\delta_{20b} = 1.80$, $^2J = 63.7$ Hz, 2H, H20); 1.85 (s, 3H, H26); 2.50 (AA'XX' system, $\delta_{X'} = 1.99$ (H8 ax), $\delta_X = 2.07$ (H6 ax), $\delta_{A'} = 2.84$ (H8 eq), $\delta_A = 3.06$ (H6 eq), $J_{AX} = J_{6ax6eq} = 12.3$ Hz, $J_{A'X'} = J_{8ax8eq} = 12.7$ Hz, $J_{AA'} = 1.4$ Hz, 4H); 3.27 (m, 2H, H19); 3.30 (AB system, $\delta_A = 3.28$, $\delta_B = 3.32$, $J_{AB} = 12.1$ Hz, 2H, H9); 3.30 ($\delta_{21a} = 3.16$, $\delta_{21b} = 3.43$, $^2J = 134.0$ Hz, 2H, H21); 3.57 (s, 3H, H15); 4.23 (s, 1H, H16); 4.39 (s, 1H, H2/H4); 4.41 (s, 1H, H2/H4); 6.17 (s, 1H, H18); 7.10 (m, 2H, Hb + Hb'); 7.38 (m, 6H, H11 + H12 + H13 + Hc/Hc'); 7.44 (td, $J_t = 7.6$ Hz, $J_d = 1.1$ Hz, 1H, Hc/Hc'); 7.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hd/Hd'); 7.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hd/Hd'); 8.39 (m, 2H, Ha/Ha' + H28); 8.43 (m, 1H, Ha/Ha').

^{13}C RMN (CDCl₃, 126 MHz): δ (ppm) = 28.55 (C25); 28.68 (C20); 43.75 (C26); 36.78 (C19); 37.75 (C21); 49.61 (C1/C5); 50.34 (C1/C5); 52.46 (C15); 54.74 (C6/C8); 55.97

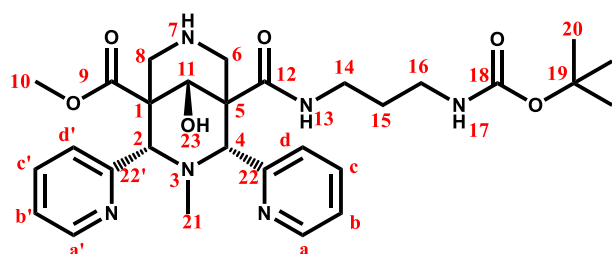
(C6/C8); 63.82 (C9); 69.15 (C2/C4); 69.23 (C2/C4); 73.25 (C16); 78.68 (C24); 122.56 (Cb/Cb'); 122.42 (Cb/Cb'); 123.21 (Cd/Cd'); 124.04 (Cd/Cd'); 127.41 (C13); 128.33 (2C, C12); 130.59 (2C, C11); 136.14 (Cc/Cc'); 136.07 (Cc/Cc'); 137.20 (C10); 147.64 (Ca/Ca'); 148.05 (Ca/Ca'); 156.42 (C23); 160.65 (C27/C27'); 161.00 (C27/C27'); 171.91 (C14); 175.54 (C17).

IR (cm⁻¹, ATR) ν 1469 – 1531 – 1590 (m, C=C); 1651 (s, N-H); 1703 (s, C=O); 3342 (s, N-H).

Mass Spectrometry (ESI+/MS): m/z = 659.37 (100%)

Elemental Analysis calculated for C₃₆H₄₆N₆O₆ · 1.5MeOH: C, 63.72, H, 7.41, N, 11.89. Found: C, 63.57, H, 6.93, N, 11.60.

Ligand L³⁸



Chemical Formula: C₂₉H₄₀N₆O₆

Molecular Weight: 568,68 g/mol

The ligand L³⁷ (50 mg, 0.076 mmol, 1 eq) was dissolved in 20 mL ethyl acetate (puriss p.a. ACS reagent grade). To this solution Pd/C 10 % was added (5 % m/m). The solution was stirred, hydrogen gas was bubbled into it and the mixture was heated at 70°C for 30 h. The catalyst was removed by centrifugation. After evaporation to dryness, the residue was dissolved in dichloromethane and it was purified by chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 100 to 80/20) to give a fraction mainly containing the final product (17 mg, < 35 %).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1.41 (s, 9H, H20); 1.62 (m, 2H, H15); 1.72 (s, 3H, H21); 2.99 (m, 2H, H14/H16); 3.18 (m, 2H, H14/H16); 3.68 (s, 3H, H10); 3.75 (AB system, δ_A = 3.55 (H6ax/H8ax), δ_B = 3.95 (H6eq/H8eq), 2H); 4.07 (AB system, δ_A = 3.86 (H6ax/H8ax), δ_B = 4.28 (H6eq/H8eq), 2H); 4.78 (s, 1H, H11); 5.00 (s, 1H, H2/H4); 5.06 (s, 1H, H2/H4); 5.51 (m, 1H, H13); 7.30 (m, 2H, Hb + Hb'); 7.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H, Hd/Hd'); 7.51 (d, J = 7.8 Hz, 1H, Hd/Hd'); 7.70 (m, 2H, Hc + Hc'); 8.66 (m, 2H, Ha + Ha').

The chemical shifts for the protons H6 and H8 were attributed by analogy with L³⁷.

References

1. Mikkelsen, K.; Nielsen, S. O. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64* (5), 632–637.
2. Patiny, L.; Borel, A. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (5), 1223–1228.
3. *Méthodes d'analyses complexométriques par les "titriplex"*; E. Merck AG, 1960.
4. K. N. Raymond *Chem. Eng. News Archive* **1983**, *61* (49), 4–5.
5. Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J Appl Cryst, J Appl Crystallogr* **1999**, *32* (1), 115–119.
6. Sheldrick, G. M. *Acta Cryst. A* **2008**, *64* (1), 112–122.
7. Farrugia, L. J. *J Appl. Cryst.* **1999**, *32* (4), 837–838.
8. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7512–7515.
9. Gans, P.; O'Sullivan, B. *Talanta* **2000**, *51* (1), 33–37.
10. P. Gans and B. O'Sullivan, GLEE 3.0.15, Protonic Softwares 2005, Leeds, U.K. and Berkeley, CA.
11. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43* (10), 1739–1753.
12. Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184* (1), 311–318.
13. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1985**, *32* (4), 257–264.
14. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1985**, *32* (2), 95–101.
15. Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1986**, *33* (12), 943–951.
16. Rossotti, F. J. C.; Rossotti, H. S.; Whewell, R. J. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1971**, *33* (7), 2051–2065.
17. Szczepaniak, W.; Kuczynski, K. *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.* **1979**, *7* (3), 333–337.
18. Kolanowski, J. L.; Jeanneau, E.; Steinhoff, R.; Hasserodt, J. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (27), 8839–8849.
19. Comba, P.; Rudolf, H.; Wadepohl, H. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (6), 2724–2736.
20. Comba, P.; Grimm, L.; Orvig, C.; Rück, K.; Wadepohl, H. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (24), 12531–12543.

Abréviations

ACN	Acétonitrile
AIBN	AzobisIsoButyroNitrile
BBN	Bombésine
BODIPY	BOre-DIPYrométhene
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CBF	Chélatant BiFonctionnel
CB-TE2A	cross-bridged 4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2] hexadecane
CB-TE2P	cross-bridged 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,8-di(methanephosphonic acid)
CB-TE1A1P	cross-bridged 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1-(methanephosphonic acid)-8-(methanecarboxylic acid)
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DCM	DiChloroMethane
DIAD	Dilsopropyl AzoDicarboxylate
Diamsar	1,8-Diamino-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo(6,6,6)eicosane
DIPEA	DilsopropylEthylAmine
DMAP	4-DiMethyl-AminoPyridine
DMB	DiMethoxyBenzyle
DMF	DiMethyl Formamide
DMSO	DiMethylSulfOxide
DO2A	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,7-diacetic acid
DO3A	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DO2P	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,7-diphosphonic acid
DO3P	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-triphosphonic acid
DOTP	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrphosphonic acid
DTPA	DiethyleneTriamine PentaAcetic acid
EDCI	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-TetraAcétique
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
EtOH	Ethanol
ESI	ElectroSpray Ionization
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-déoxy-D-Glucose
F-SPE	Fluoro-Solid Phase Extraction
GRP	Gastrin Releasing Peptide
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate

HBTU	N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HOBT	Hydroxybenzotriazole
HPGe	High-Purity Germanium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-MS	High Resolution – Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
MES	2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid
NBS	N-BromoSuccinimide
NHS	N-HydroxySuccinimide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NOIPA2PY	1,4,7-triazacyclononane-monomethylpicolinate-dipicolyl
NO3PY	1,4,7-triazacyclononane-tripyrityl
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NOTA	1,4,7-triazacyclononane-triacetic acid
NOPO	1,4,7-triazacyclononane-1,4-bis[methylene(hydroxymethyl)phosphinic acid]-7-[methylene(2-carboxyethyl)phosphinic acid]
ORTEP	Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SOD	superoxide dismutase
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy or 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl
TEP	Tomographie à Emission de Positron
TETA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-TetraAcetic acid
TE2P	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,7-diPhosphonic acid
TETP	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-TetraPhosphonic acid
TFA	Acide TriFluoroAcétique
TFP	TetraFluoroPhényle
THF	Tetrahydrofuran
T-hydro	tert-Butyl hydroperoxide
TRAP	TRiAzacyclononane-Phosphinate
UV	Ultra-Violet

Publications et communications

Publications

Roux, A.; Gillet, R.; Huclier-Markai, S.; Ehret-Sabatier, L.; Charbonnière, L. J.; Nonat, A. M. *Org. Biomol. Chem.* **2017**

Accepted Manuscript

Raphaël Gillet, Amandine Roux, Jérémy Brandel, Sandrine Huclier-Markai, Véronique Hubscher-Bruder, Franck Camerel, Olivier Jeannin, Aline M. Nonat, Loïc J. Charbonnière.

“New bispidol chelate with phosphonate pendant arm: synthesis, Cu(II) complexation and ⁶⁴Cu labeling.”

Communications

Orales

« Bifunctional bispidine ligands form kinetically inert complexes with Cu(II): promising theragnostic agents »

R. Gillet, A. M. Nonat, J. Brandel, S. Huclier-Markai, L. J. Charbonnière

« New bispidine based ligand as stable copper chelate for nuclear imaging application »

R. Gillet, A. M. Nonat, J. Brandel, S. Huclier-Markai, L. J. Charbonnière

« Radiolabeled bispidine-⁶⁴Cu complexes for positron emission tomography »

R. Gillet, A. M. Nonat, J. Brandel, S. Huclier-Markai, L. J. Charbonnière

Poster

« Bifunctional bispidine-based ligands for ⁶⁴Cu complexation for use in Positron Emission Tomography »

R. Gillet, A. M. Nonat, J. Brandel, S. Huclier-Markai, L. J. Charbonnière

« Cu(II) chelating agents based on a bispidine backbone: metal complexes for theranostic applications »

R. Gillet, A. M. Nonat, J. Brandel, S. Huclier-Markai, L. J. Charbonnière

Synthèse et caractérisation de bispidines, chélatants du ^{64}Cu , en vue d'applications pour la tomographie à émission de positrons

Résumé

Ce travail de thèse avait pour objectif de développer de nouveaux chélatants du cuivre(II) de type bispidine pour des applications en Tomographie à Emission de Positrons. Le ^{64}Cu est un radioisotope métallique dont les propriétés sont intéressantes pour la TEP. Les bispidines sont des chélatants dont la structure est préorganisée et rigide. Cette propriété confère au bispidine de bonnes propriétés de coordination vis-à-vis des métaux de transition, en particulier le cuivre(II).

Ce travail présente le développement d'un ligand de type bispidine possédant un groupement phosphonate ainsi que le développement de bispidines permettant la synthèse de nouvelles familles de chélatants pour le cuivre(II).

La bispidine phosphonatée a ensuite fait l'objet d'une étude physico-chimique par différentes techniques, révélant ainsi qu'elle possède les caractéristiques requises pour des applications en TEP. Le radiomarquage en présence de ^{64}Cu a été étudié pour une sélection de plusieurs chélatants et montre le fort potentiel des ligands de type bispidine pour la complexation du ^{64}Cu .

Enfin, diverses stratégies de fonctionnalisation ont été étudiées pour l'obtention d'un chélatant bifonctionnel basé sur la bispidine phosphonatée. Ces stratégies démontrent la possibilité d'obtenir deux ligands bifonctionnels. De surcroît, deux plateformes bifonctionnelles peuvent faire l'objet de point de départ pour le développement de nouvelles familles de bispidines bifonctionnelles.

Mots-clés : bispidine, cuivre(II), TEP, chélatant bifonctionnel

Abstract

This PhD work aimed at developing new bispidine-based copper(II) chelating agents for applications in Positron Emission Tomography (PET). On one hand, ^{64}Cu is a metallic radioisotope which possesses interesting properties for PET imaging and on the other hand, bispidines have a pre-organized and rigid structure. This property makes them good chelating agents for numerous transition metals, particularly copper(II).

This work presents the development of a new bispidine-based ligand having a phosphonate pendant arm as well as the development of bispidines allowing the synthesis of new chelating agents for copper(II).

The physico-chemical properties of the phosphonated bispidine were thoroughly studied by different techniques, showing that it would be adequate for PET applications. Radiolabeling experiments were also done in the presence of ^{64}Cu for various bispidines and show the high potential of bispidine ligands for the complexation of ^{64}Cu .

Finally, several functionalization strategies were studied in order to get bifunctional chelates based on the phosphonated bispidines. This study proved the possibility to develop two bifunctional bispidines based on the phosphonated one and also it allowed us to develop two bifunctional bispidines as synthon for the synthesis of new families of bifunctional bispidines.

Keywords : bispidine, copper(II), PET, bifunctional chelate