



Développement de nouveaux agents de contraste pour
l'IRM à base de β - et α -cyclodextrines
régio-fonctionnalisées par des ligands
pyridino-carboxylate et -phosphonate.

Celia Sappei

► To cite this version:

Celia Sappei. Développement de nouveaux agents de contraste pour l'IRM à base de β - et α -cyclodextrines régio-fonctionnalisées par des ligands pyridino-carboxylate et -phosphonate.. Chimie thérapeutique. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR030 . tel-01858354

HAL Id: tel-01858354

<https://theses.hal.science/tel-01858354>

Submitted on 20 Aug 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de « Université de Rouen Normandie »

Développement de nouveaux agents de contraste pour l'IRM à base de β - et α -cyclodextrines régio-fonctionnalisées par des ligands pyridino-carboxylate et -phosphonate

**Présentée et soutenue par
Célia Sappei**

Thèse soutenue publiquement le 25.05.2018
devant le jury composé de

Mme Véronique Bonnet	Maître de Conférence, HDR Université Picardie Jules Vernes	Rapporteur
M. Bernold Hasenknopf	Professeur Sorbonne Université	Rapporteur
Mme Célia Bonnet	Chargé de Recherche Université d'Orléans	Examineur
Mme Pascale Delangle	Chercheur INAC, CEA-Grenoble	Examineur
Mme Géraldine Gouhier	Professeur Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. Franck Suzenet	Professeur Université d'Orléans	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Mme Géraldine Gouhier (COBRA) et M. Franck Suzenet (ICOA)



A mon Caïpi, mon soutien infailible ...

Remerciements

Ma première année s'est déroulée au sein du laboratoire COBRA, à l'IRCOF à Rouen, sous la direction du Pr. Géraldine Gouhier que je remercie pour avoir donné un second souffle à cette thèse ainsi que Pr. François Estour avec qui j'ai appris beaucoup sur moi-même. Mes deux dernières années se sont déroulées au sein de l'ICOA à Orléans, sous la co-direction du Pr. Franck Suzenet, que je remercie vivement pour l'ensemble de ses conseils, pour son humanité et sa patience ainsi qu'en collaboration avec l'équipe du Dr. Eva Jakab-Tóth, au CBM à Orléans, que je remercie aussi vivement pour sa disponibilité et ses conseils avisés.

J'ai donc eu la chance de travailler dans trois laboratoires différents, avec chacun ses compétences mais aussi et surtout avec ses personnes et personnalités différentes. Je tiens donc à commencer par remercier l'ensemble des directeurs de laboratoire qui ont su faciliter ce travail inter-laboratoire. Merci au Pr. Xavier Pannecoucke pour le laboratoire COBRA de l'Université de Rouen ainsi qu'aux Pr. Olivier Martin et Pr. Pascal Bonnet pour l'ICOA et au Dr. Eva Jakab-Tóth pour le CBM, de l'Université d'Orléans.

Je finirai par remercier pour ses conseils, Pr. Thomas Lecourt comme référent de ma thèse et Pr. Pierre-Yves Renard en tant que directeur de l'école doctorale, pour son soutien.

Il est aussi important pour moi de remercier les membres du jury : Dr. Véronique Bonnet et Pr. Bernold Hasenknopf, qui ont accepté en tant que rapporteur de cette thèse de lire ce travail et de le juger ainsi que Dr. Pascale Delangle et Dr. Célia Bonnet qui ont accepté d'examiner cette thèse.

Etrangement, les remerciements sont souvent la dernière partie que nous écrivons, parfois dans la précipitation, et pourtant, ils sont sûrement tout aussi important que le reste. Les remerciements représentent la thèse. A travers eux, il est facile de comprendre l'environnement dans lequel elle s'est déroulée, il est aussi facile de comprendre comment elle a été menée, et comment, le doctorant, à participer à celle-ci. Pour ma part, il est certain que la partie humaine de cette expérience fût plus qu'importante et j'espère que par ces quelques pages j'arriverai à remercier comme il se doit toutes les personnes qui m'ont entourée, encouragée, soutenue, écoutée et aidée, mais aussi avec qui j'ai ri, partagé et évolué.

Il est tout naturel de continuer ces remerciements par l'IRCOF, lieu de commencement de cette thèse. Toutes les personnes citées ici ont contribué activement à toujours me faire aller de l'avant. Avant quoique ce soit d'autre, merci pour ça.

Tout d'abord, un grand merci à Anaïs, pour l'accueil, pour les discussions enflammées, parce la complicité c'est important et que même après ton départ, tu as toujours été là. Merci pour ton dynamisme. Merci à toi, William. Sans toi, cette thèse aurait pris un tout autre tournant. Je n'ai jamais autant appris qu'à tes côtés, et il est certain que si maintenant, je n'ai pas d'appréhension en chimie, c'est grâce à toi. Ton savoir m'impressionnera toujours. Et cette cellule n'aurait rien été sans Caro. Tu sais, je crois que jamais je ne rencontrerai quelqu'un qui te ressemble de près ou de loin. C'était vraiment enrichissant d'évoluer à tes côtés pendant un an.

Merci ensuite à mes deux acolytes de première année : Matthieu et Amandine. Cette première année sans vous aurez été bien difficile. Je suis fière d'avoir nouée cette relation avec vous, qui n'aurait soi-disant jamais dû exister... Et, Amandine tu ne me contrediras pas, désolée Matthieu pour les discussions « chats » !

En parlant des relations inter-1er étage, je crois qu'on peut dire que la liaison a aussi été établie jusqu'au 3ème étage ! Je suis tellement contente de vous avoir rencontrés et à la fois déçue de ne pas avoir pu passer plus de temps avec vous. Merci à Jonathan, Ezra (ou Tim, vous choisissez !) et mon jumeau Kevin, le trio de choc du 3ème ! Et Manu, tu le sais, je te dois beaucoup.

Et les relations inter-labos... Marion, je pense à toi, je garde bien en mémoire nos soirées, chez moi, au labo, le petit trio avec Willy. J'ai vraiment passé de supers moments avec toi. Je t'assure que je ne les oublie pas. Dans la même lignée, je dois aussi remercier du fond du cœur, Arlette ! Je te classe dans les découvertes inter-labo, je ne sais plus si c'est par PBS que l'on s'est rencontrées la 1^{ère} fois mais peu importe. Mes derniers souvenirs avec toi sont nos interminables discussions quand, toi et Matthieu, avait eu la gentillesse de me prêter un toit lors de mes déplacements sur Rouen...

La frustration de ne pas avoir de mots pour chacun d'entre vous se fait sentir, mais si on rassemble les souvenirs de Rouen je dirai : Merci à l'O'Kallaghan'S d'exister, la terrasse modulable à l'infinie était clairement nécessaire et merci aux apéro-labos parce qu'ils m'ont marquée et pas que ma mémoire (petite pensée au mollet de Matthieu ☺) !

Enfin, j'aimerais remercier Paulo, AdEline, Gilles, Papa Ours (ou Alex au choix)... Vous avez participé vous aussi à mon bien être à Rouen, loin de mes montagnes et de mon lac !

Repenser, et écrire sur cette période me touche beaucoup. J'espère avoir l'occasion de tous vous remercier de vive voix bientôt.

Mes deux dernières années de thèse se sont déroulées à l'ICOA. J'ai adoré la configuration de cet Institut qui rend, pour moi, les interactions entre les personnes beaucoup plus faciles et naturelles.

Merci tout d'abord à l'équipe analytique, et plus particulièrement au Pr. Claire Elfakir, Laetitia Fougère et Sandrine Zubrzycki qui m'ont permis de mettre en place rapidement les analyses HPLC et LC-MS qui ont été essentielles. J'ai passé de très bons moments en bas, merci à vous.

J'en profite aussi pour remercier Cédric Maffre, sans qui je n'aurai jamais pu résoudre tous les problèmes d'appareillage auxquels j'ai dû faire face. Tu as toujours été réactif et attentif, bien plus qu'on ne peut le souhaiter, merci énormément. Et Dr. Cyril Colas, qui, même si on n'a pas su résoudre tous mes problèmes, a été d'une aide et d'une patience inconsiderable pour les analyses HRMS.

Ensuite, les copains, pour les innombrables discussions sur la passerelle et/ou la tisanerie, pour les barbecs à l'île charlemagne, pour les soirées rue de bourgogne, et j'en passe... merci à tous : Ben, Max, R3, Jo, Antho, Matthieu, Gregory V2, Nico, Pierre et petite dédicace à Alex avec qui « parler musique » signifiait quelque chose ! Vous avez marqué mon passage à l'ICOA ; je vous en remercie du fond du cœur.

Merci à mon équipe : en commençant par celle qui m'a été d'un grand soutien et qui m'a prise par la main lors de ma 1^{ère} semaine à l'ICOA, merci Doina du fond du cœur. Chaque instant

passé avec toi est apaisant. Merci au L3. Merci Régis ! Les mots me manquent pour te dire à quel point tu as été important dans cette période. Merc pour tes conseils, professionnels et personnels. A bientôt en Finlande ! Merci ensuite à mon Cousmin (ou Cosmin, mais j'aime bien t'embêter un peu) car pour rigoler, pour travailler, pour pleurer, pour boire un coup, pour écouter la musique, en fait, pour à peu près tout, tu es là, toujours dispo. Je n'ai jamais rencontré quelqu'un qui donnait autant. Merci à Souksouk, il y a un vide dans le labo depuis que tu es partie, crois-moi ! Et enfin, merci Nicolas, tu es l'oreille attentive, la patience même et les conseils en or. Je suis désolée d'avoir autant parlé mais je te remercie de m'avoir écoutée, répondue et conseillée. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite. Enfin je remercie, Marie-Aude, Floris, Matthieu, Fanny, Abdelmoula et Kamal.

Merci aux merveilleuses rencontres faites au détour d'un couloir, d'un café, d'une raclette... Merci Dr. Bérengère Claude pour avoir contribué à l'élargissement de ma culture, merci Dr. Agnès Chartier pour tes sages conseils, merci Pr. Philippe Morin, pour ces discussions improvisées (à côté du DEDL, dans un couloir...) qui sont systématiquement « une pépite » et merci à Reine, parce que tu as été une des plus belles découvertes de cette année, tu vas « presque » me manquer.

Et pour finir, Giuliano, mon italien préféré, mon frère des « contre » pauses, mon oreille attentive pour chaque étape et chaque épreuve de cette thèse... Tu réponds toujours présent et tes conseils sont importants pour moi. Merci d'avoir été et d'être toujours là.

...

...

...

Ah zut j'oubliais ! Ghazi ! Ah ah ah elle est bonne celle-là non ?! Une chose est sûre, tu es LA découverte. Sans toi, cette thèse aurait été vraiment trop difficile, je me suis fait un petit frère, un ami, un soutien à chaque épreuve. Promis, bientôt les rôles seront inversés ! Mais bien sûr, toi c'est pire ! Ne t'inquiète pas, je viendrai te cuisiner des légumes ! Ta joie de vivre m'a permis de faire face à beaucoup de chose. Merci Ghazi.

Cette 2ème et 3ème année de thèse ont aussi été marquées par mon passage au CBM. J'en profite pour remercier de nouveau Dr. Eva Jakab-Tòth. Merci aussi à Dr. Célia Bonnet, pour ton aide et tes conseils, j'ai adoré travailler et discuter avec toi. De Célia à Célia, merci. Enfin, 1000 fois merci à Agnès. Tu étais toujours disponible, toujours de bons conseils, et surtout particulièrement patiente. Merci pour tout ce que tu m'as transmis, je te garderai toujours en exemple pour la rigueur et le professionnalisme.

Merci à tous les thésards et maintenant docteurs, et post-doc de l'étage, vous avez m'accueilli les bras ouverts, et avez vraiment facilité mon travail inter-labo, je vous remercie tous du fond du cœur : Alba (une belle découverte), Doudou (musique), Patrick (Comme jamais !), Maamar (Cigarette !) et Medhi (Mécréan !).

Et enfin, à toute l'équipe ...

La diversité fait la force, et vous en êtes l'exemple même, merci à vous, mes amis et ma famille qui m'avez soutenue de loin.

Pour commencer, ma 2ème famille, les filles de St Jo : Matt Po, Less, Meli, Laurette, Po, Cyn, Elize, K, Flav, Mat Bass, Clemi, Debo, Lullu. Sans vous je n'aurai plus de repères. Merci d'exister, merci d'être là, merci de me faire sentir à la maison à chaque fois que je reviens à Annecy. Et vivement le prochain AperMix !

Merci aussi, à mes amis lyonnais, vous êtes un bol d'air frais, et une force dans ma vie. Merci énormément : Max, Toinou, Clem, Elo, Sylvain, Dim, Bapt, Maud, Tristan. Vivement le prochain « Cantal » ! Certaines personnes n'aiment pas la routine, pour moi, une routine comme le « Cantal » est une marque d'attachement, de ralliement, de besoin de se retrouver...

Mes derniers mots vont à ma famille... Merci à mes parents d'être toujours présent, de m'avoir poussée à aller toujours plus loin et surtout de ne pas mesurer leur effort et leur amour. Merci à mon frère. Tous les deux, on avance, et j'espère que maintenant, je trouverai le temps de venir te visiter dans tous tes pays !

Merci à mes oncles, tantes et cousin(e)s : Joude, Fouz, Sandrine, Rich, Jean, Mélissa, Maurane, Léna, Sarah, Jérémy et Martine. Votre soutien est sans faille et sans frontière.

Merci enfin, à ceux qui ont été ou qui sont toujours à mes côtés et derrière moi, mes grands-parents : ma mamie Jany, ma mamie Fati et mon papi Abdou.

Je vous aime.

Abréviations

A

AC : Agent de contraste

ARM : Angiographie par résonance magnétique

ACN : Acétonitrile

AcOEt : Acétate d'éthyle

B

BOM : groupement BenzylOxyMethyle

Bn : Groupement benzyle

C

CD : Cyclodextrine

CEST : Chemical exchange saturation transfert

CCM : Chromatographie sur couche mince

D

DTPA : Diethylenetriaminepentaacetic acid

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

DMSO : diméthylsulfoxyde

DMF : diméthylformamide

DMA : *N,N*-diméthylaminoéthyle

DiOH : 1,3-phenylenebis(bis(4-tert-butylphenyl)methanol)

DiCl : 1,3-bis(bis(4-tert-butylphenyl)chloromethyl)benzene

DMAP : Diméthylaminopyridine

DP : Dérivé pyridinique

DIPEA : diisopropyléthylamine

DCM : Dichlorométhane

DEDL : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière

E

EMA : European medicines agency

EP : Ether de pétrole

F

FID : Free induction decay

FT : Fourier transformation

FSN : Fibrose systémique néphrogénique

FDA : Food and drug administration

H

HSA : Human serum albumin

HRMS : High resolution mass spectrometry

HPLC : High pressure liquid chromatography

I

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IS : Inner-sphere

K

K_{GdL} : Constante de stabilité thermodynamique du complexe GdL

k_{ex} : Vitesse d'échange des molécules d'eau

K_a : Constante d'association

L

LC-MS : Liquid chromatography – Mass spectrometry

M

Ms : Groupement mésyle

MO : Micro-onde

N

NMRD : Nuclear magnetic relaxation dispersion

NBS : *N*-bromosuccinimide

NC : Nombre de coordination

NL : Nombre de liaison de coordination

O

OS : Outer-sphere

P

PM : Poids moléculaire

PAMAM : Dendrimère polyamidoamine

PDN : Polarisation dynamique nucléaire

Pyr : Pyridine

Q

q : Nombre d'hydratation

R

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RF : Radiofréquence

r_1 : Relaxivité longitudinale

r_2 : Relaxivité transversale

S

SPIO : Superparamagnetic iron oxyde

SM : Spectrométrie de masse

S, D ou T_{0-x} : Niveau 0-x singulet, doublet ou triplet d'énergie

T

TEP : Tomographie par émission de positon

T_1 : Temps de relaxation longitudinale

T_2 : Temps de relaxation transversale

$T_{1,e}$: Temps de relaxation longitudinale électronique

τ_m : Temps de résidence des molécules d'eau

τ_r : Temps de corrélation rotationnel

THF : tétrahydrofurane

Temp. : Température

TBTA : trichloroacétamide de *tert*-butyle

TA : Température ambiante

TBS : groupement *tert*-butyl diméthylsilyle

TMS : groupement triméthylsilyle

U -

UV : Ultra-violet

2S : Second sphere

$\Delta V^\ddagger$: Volume d'activation

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
---------------	---

ABREVIATIONS	6
--------------	---

INTRODUCTION GENERALE	12
-----------------------	----

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE	15
--	----

I.	Introduction - Une technique d'imagerie performante	15
A.	Le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire	17
B.	L'application à l'Imagerie par Résonance Magnétique	20
1.	La relation entre la RMN et l'IRM	20
2.	Le contraste des images IRM	20
II.	Les agents de contraste utilisés en IRM	21
A.	Les agents T_1	23
1.	La toxicité	25
2.	La relaxivité	28
B.	Les agents T_2	46
C.	Les agents CEST	49
D.	Les agents hyperpolarisés	53
E.	Les agents fluorés	53
F.	Résumé	55
III.	L'imagerie moléculaire	56
A.	Les sondes sensibles aux enzymes	56
1.	Basées sur des agents T_1	56
2.	Basées sur des agents paraCEST	57
B.	Les sondes sensibles aux cations	58
C.	Les sondes sensibles au pH	62
1.	Basées sur des agents T_1	62
2.	Basées sur des agents paraCEST	63

IV.	Les défis à venir	64
V.	Bibliographie	65
CHAPITRE II : LES CYCLODEXTRINES (CDS)		69
I.	Des structures à fort potentiel	69
II.	Les caractéristiques physico-chimiques	70
A.	La réactivité	72
B.	Domaines d'intérêts	73
III.	Les agents de contraste pour l'IRM à base de cyclodextrine	73
A.	Les ACs développés à base de CDs - <i>Complexes hôte-invité</i>	74
B.	Les ACs développés à base de CDs - <i>Liaisons covalentes</i>	79
1.	Plateforme pour chélates de Gd(III) connus	79
2.	Plateforme pour la conception de nouveaux chélates de Gd(III)	83
C.	Contexte et objectifs de ce projet de thèse	85
IV.	La chimie des cyclodextrines <i>Modification de la face I des cyclodextrines</i>	89
A.	Les agents pontants	91
1.	La di-substitution de la face I	91
2.	La tri-substitution de la face I	94
3.	La tétra-substitution de la face I	95
4.	Conclusion	96
B.	Les agents encombrants	97
C.	La déprotection sélective	98
D.	Conclusion	99
V.	Bibliographie	101

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I : DEVELOPPEMENT DES SYNTHES ET ANALYSES DES LIGANDS BASEES SUR LES β - ET α -CYCLODEXTRINES		107
I.	Les dérivés de la β -cyclodextrine	107
A.	Synthèse de la β -CD tétra-hydroxylée - <i>Tétrol</i> 46	107
B.	Tétra-fonctionnalisation du <i>Tétrol</i> 46 par la pyridine-carboxylate de méthyle 52	111
1.	Synthèse de la pyridine-carboxylate de méthyle : 6-bromométhyl-2-pyridinecarboxylate de méthyle 52	111
2.	Synthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée 53	112
C.	Stratégie alternative 1 : Tétra-fonctionnalisation par une liaison amine	117
1.	Aménagement fonctionnel du <i>tétrol</i> 46	118
2.	Synthèse des pyridine-carboxylates : 6-aminométhyl- (55) et 6-bromométhyl- (59) 2-pyridinecarboxylate de <i>tert</i> -butyle	119
3.	Synthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée par un lien amine 56	121
D.	Stratégie alternative 2 : Tétra-fonctionnalisation du <i>Tétrol</i> 46 par la pyridine-carboxylate de <i>tert</i> -Butyle 59	125
1.	Développement des conditions d'analyses en HPLC et identification des sous-produits par LC-MS	126
2.	Synthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée 63	130
3.	Optimisation des conditions de purification du tétra-ester 63	132
4.	Déprotection des esters <i>tert</i> -butyliques du composé 63 - Accès au composé final L8	136
II.	Les dérivés de l' α -cyclodextrine	137
A.	Synthèse de l' α -CD tri-hydroxylée - <i>Triol</i> 47	137
B.	Tri-fonctionnalisation du <i>Triol</i> 47 par la pyridine-phosphonate d'éthyle 69	139
1.	Synthèse du diethyl 6-bromomethylpyridin-2-ylphosphonate 69	139
2.	Synthèse de l' α -CD tri-fonctionnalisée 73	142
3.	La déprotection des phosphonates du composé 73 - Tentatives d'accès au composé Lα'	146
C.	La tri-fonctionnalisation du <i>Triol</i> par la pyridine-ester <i>tBu</i> 59	150
1.	La synthèse de l' α -CD tri-fonctionnalisée 75	150
2.	La déprotection des esters <i>tert</i> -butyliques du composé 75 - Accès au composé Lα	152
III.	Conclusion	154
IV.	Bibliographie	156

CHAPITRE II : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES LIGANDS L β ET L α ET DE LEUR COMPLEXE DE GD(III) _____ 158

I.	Etude du ligand Lβ et du complexe GdLβ	158
A.	Détermination de la stœchiométrie du complexe	158
1.	Dosage relaxométrique	158
2.	Dosage en luminescence	159
B.	Stabilité du complexe - <i>Etude potentiométrique</i>	161
C.	Etude structurale en solution par RMN ^1H en fonction du rapport M : L	165
D.	Mesure du nombre d'hydratation q	167
E.	Discussion	168
F.	Conclusion	174
II.	Etude du ligand Lα et du complexe GdLα	176
A.	Détermination de la stœchiométrie du complexe	176
1.	Dosage relaxométrique	176
2.	Dosage en luminescence	176
B.	Stabilité du complexe - <i>Etude potentiométrique</i>	178
C.	Etude structurale en solution par RMN ^1H en fonction du rapport M : L α	180
D.	Mesure du nombre d'hydratation q	181
E.	Discussion	182
F.	Conclusion	186
III.	Bibliographie	188

CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____ 189

PARTIE EXPERIMENTALE

I.	Materials and Methods	194
II.	Synthesis	197

Introduction générale

L'imagerie médicale permet de diagnostiquer, suivre et traiter des dysfonctionnements biologiques ou maladies en visualisant l'intérieur du corps humain. Les différents outils mis à la disposition du praticien s'appuient sur un phénomène physique différent qui sera plus ou moins invasif et permettra de visualiser différents tissus à des profondeurs variables. Les principales techniques utilisées en clinique peuvent être classées en deux catégories : celles utilisant des rayons ionisants invasifs tels que les rayons X pour les radiographies ou les scanners et les rayons γ pour l'imagerie par Tomographie par Emission de Positron (TEP) ; et les techniques non-invasives tels que l'échographie, utilisant les ondes sonores et l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) utilisant les champs magnétiques et ondes radio.

Le coût d'une IRM reste encore plus élevé que celui de son concurrent direct, le scanner, mais l'aspect non-invasif de la technique ainsi que l'accès à une plus haute résolution d'image en font une des techniques d'imagerie les plus utilisées et indispensables pour le diagnostic de certaines maladies. Son principe repose sur la résonance magnétique nucléaire des protons de l'eau de l'organisme. Différentes séquences d'impulsion d'onde de radiofréquence ont été développées pour obtenir des images pondérées soit en T_1 , qui dépendent du temps de la relaxation longitudinale des spins des protons, soit en T_2 , qui dépendent du temps de la relaxation transversale des spins des protons ou bien par densité de proton. La plupart du temps, l'IRM se suffit à elle-même mais, dans environ 30% des cas, le contraste naturel entre les différents tissus à analyser n'est pas suffisant et nécessite l'injection d'un agent de contraste (AC).

Depuis 1988, année de la mise sur le marché du premier agent de contraste, plusieurs catégories d'ACs ont vu le jour. Les principaux ACs utilisés sont les complexes de Gadolinium (Gd(III)) qui agissent sur le temps de relaxation longitudinale T_1 . Le Gd(III) dans son état libre est toxique pour l'organisme, c'est pourquoi il est toujours injecté sous forme de chélate. Depuis 2006, une maladie, due au Gd(III) libéré dans l'organisme de patients atteints d'insuffisance rénale, appelée la Fibrose Systémique Néphrogénique, a été mise en évidence obligeant les chercheurs à accroître leurs efforts tant sur l'efficacité que sur la stabilité des complexes synthétisés. Ainsi, de nouveaux ligands complexant du Gd(III) voient le jour afin d'optimiser la stabilité et l'efficacité des chélates.

Une des voies utilisées pour améliorer cette efficacité des complexes de Gd(III) est de diminuer leur temps de corrélation rotationnel en augmentant leur poids moléculaire. Dans cette optique, de nouveaux ACs utilisant des protéines, des dendrimères mais aussi des cyclodextrines (CD) ont été utilisées comme plateformes hautement modulables.

L'objectif de cette thèse est de développer de nouveaux agents chélatant à base de pyridine-carboxylate et pyridine-phosphonate immobilisés sur une cyclodextrine modifiée et de démontrer l'influence positive de l'utilisation d'un tel macrocycle sur la relaxivité (T_1) et sur la stabilité des complexes de Gd(III).

La première partie propose une étude bibliographique divisée en deux chapitres. Le premier détaille le principe de la technique d'IRM et compare les différentes familles d'agents de contraste existantes. Le deuxième chapitre traite des cyclodextrines en abordant tout d'abord les caractéristiques particulières de ces macrostructures puis leur utilisation en tant qu'agents de contraste. Enfin, la chimie des CDs permettant de mener à bien ce projet est décrite.

La deuxième partie traite l'ensemble des travaux réalisés durant cette thèse en commençant par la synthèse des nouveaux ligands de Gd(III) à base de β - et α -cyclodextrines. La conception de ces nouvelles structures nous a amené à effectuer, dans un premier temps, des aménagements fonctionnels des CDs afin de pouvoir, par la suite, les régiofonctionnaliser par les bras chélatants du Gd(III), pyridino-carboxylate et pyridino-phosphonate. Cette partie se termine par la caractérisation physico-chimique des nouveaux ligands de Gd(III) synthétisés et de leur complexe de Gd(III) qui nous a permis d'évaluer leur stabilité thermodynamique et leur efficacité en tant qu'agents de contraste pour l'IRM.

Etude bibliographique

Chapitre I : L'Imagerie par Résonance Magnétique

I. Introduction - *Une technique d'imagerie performante*

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une analyse spectroscopique qui repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), appliqué à l'étude des molécules d'eau dans les organismes vivants. Le concept de la RMN a vu le jour à la fin de la seconde guerre mondiale grâce aux travaux de deux groupes américains indépendants, celui de Felix Bloch à l'Université de Stanford en Californie et celui d'Edward M. Purcell à l'Université d'Harvard à Boston dans le Massachusetts.^[1] Cette découverte majeure a été rapidement récompensée par un prix Nobel de physique en 1952. C'est en 1973, que le champ d'application de la RMN s'ouvre grâce aux travaux de Lauterbur^[2] de l'Université de Stony Brook à New-York et Mansfield^[3] de l'Université de Nottingham en Angleterre. Ils ont montré, pour la première fois, que la RMN pouvait générer des images, non plus à une dimension, mais à deux, voire trois dimensions.^[4] Par la suite, dans les années 1977-1978, Damadian et ses collaborateurs ont construit le premier scanner IRM et effectué le premier scan d'un corps humain (Figure 1). En démontrant la possibilité de différencier des tumeurs malignes de tissus sains, Damadian a grandement participé à faire de l'IRM un outil de choix pour le diagnostic clinique.^[5]



Figure 1 : Raymond Damadian et Larry Minkoff à l'intérieur de leur appareil d'IRM. Source: <http://www.fonar.com/news/100511.htm>

Depuis, les appareils IRM ont connu de nombreuses améliorations et la technique est devenue l'un des outils le plus performant, autant dans le diagnostic clinique que dans la recherche biomédicale. Celle-ci permet, maintenant, d'accéder à des informations anatomiques et fonctionnelles avec une des plus hautes résolutions spatiales, de l'ordre du millimètre en clinique et du micromètre en recherche.^[6]

L'Imagerie par Résonance Magnétique fait partie des quatre principales techniques d'imagerie employées pour l'Homme (Tableau 1). Leurs principes sont différents et permettent, de ce fait, d'accéder à des informations complémentaires. En effet, une image générée par Tomographie par Emission de Positons (TEP) permet, grâce à des sondes spécifiques, de suivre des activités métaboliques bien précises, tandis que le scanner va se focaliser davantage sur les tissus durs tel que les os, contrairement à l'IRM qui s'intéresse plus aux tissus mous. Les ultrasons vont, quant à eux, être très appréciés pour les échographies car, ils représentent un examen sans stress, pouvant être répété plusieurs fois sans risque et surtout peu cher. Il est possible d'utiliser des plateformes multimodales, basées sur le couplage entre plusieurs techniques (ex : TEP-scan, TEP-IRM, etc.), permettant d'apporter un maximum d'informations en diminuant le temps et le coût des analyses.

Techniques d'imagerie	IRM	TEP	Scanner	Ultrason
Onde électromagnétique utilisée pour générer l'image	Ondes radios	Rayonnement γ	Rayon X	Ondes sonores de très hautes fréquences
Résolution spatiale	4-100 μm	1-2 mm	15-200 μm	50-500 μm
Temps	Minutes / Heures	Minutes	Minutes / Heures	Secondes
Coût	Elevé	Très élevé	Moyen	Faible
Principales applications	Anatomique (Tissus mous) Fonctionnelle	Métabolique	Poumon et os	Imagerie vasculaire

Tableau 1 : Comparaisons des différentes techniques d'imagerie médicales ^[7]

L'IRM est, néanmoins, d'autant plus appréciée qu'elle est considérée comme non-invasive de par l'utilisation d'un champ magnétique, reconnu comme n'ayant pas d'impact sur la santé, contrairement aux rayonnements ionisants tels que les rayons X utilisés pour les scanners. Les inconvénients majeurs de l'IRM concernent le temps d'examen long, contraignant pour le patient, pouvant dépasser les trente minutes, ainsi que le coût.

A. Le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN est une technique spectroscopique qui permet d'étudier tous les noyaux possédant un nombre quantique de spin I , non nul, leurs conférant ainsi des propriétés magnétiques, dont les plus courants sont les ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F et ^{31}P . Pour le proton, au même titre que pour tous les noyaux de spin $I = \frac{1}{2}$, la mécanique quantique démontre qu'il ne pourra exister que deux sous-états de spin. Ceux-ci sont caractérisés par les nombres quantiques $m_i = \pm \frac{1}{2}$ appelés, moment magnétique du proton μ , décrit par l'Equation 1 et représentés Figure 2.a.

(1) $\mu_z = m_i \gamma \hbar$ avec μ_z , composante z du moment magnétique μ ; γ , le rapport gyromagnétique et $\hbar$, constante de Planck réduite ($\hbar = h/2\pi$).

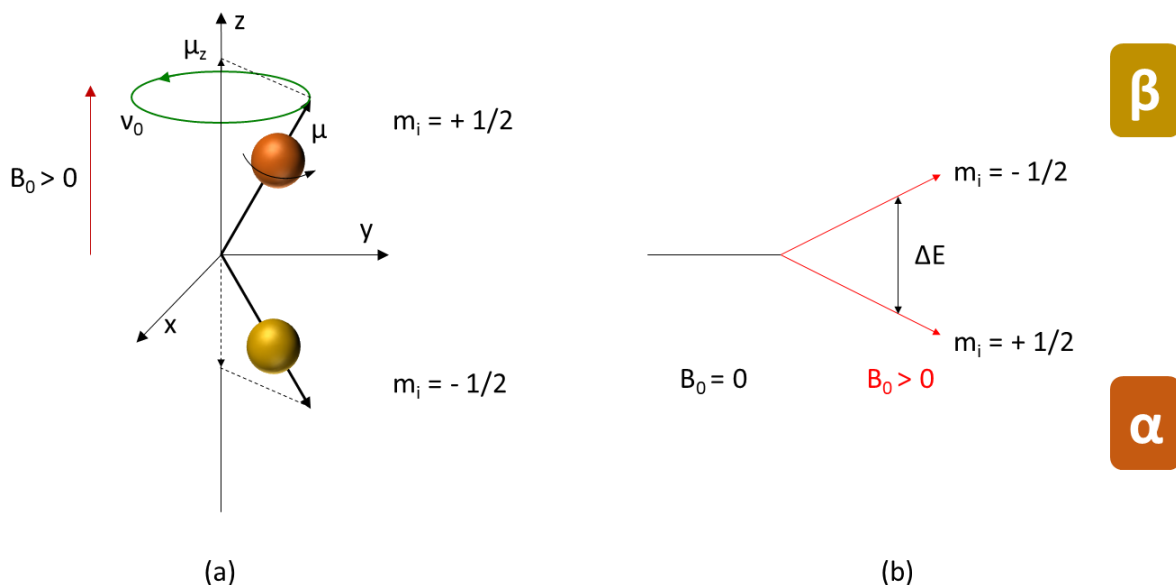


Figure 2 : (a) Représentation de l'orientation des spins dans l'espace, par leur moment magnétique μ , lorsque le proton est soumis à champs magnétique intense B_0 , (b) Représentation schématique de la dégénérescence des niveaux d'énergie α et β , induite par B_0

Lorsque les noyaux sont soumis à un champ magnétique intense noté B_0 , le moment magnétique μ interagit avec ce dernier et conduit à la dégénérescence des niveaux d'énergie générant ainsi les niveaux (Figure 2.b) :

- α pour l'état stationnaire, le plus stable, pour lequel $m_i = + \frac{1}{2}$
- β pour l'état excité, le moins stable, pour lequel $m_i = - \frac{1}{2}$

Cette levée de dégénérescence entraîne une différence d'énergie ΔE , qui dépend du champ magnétique imposé B_0 (Equation 2).

$$(2) \Delta E = E_\beta - E_\alpha = -\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0 + \frac{1}{2}\gamma\hbar B_0 = \gamma\hbar B_0 \quad \text{avec } E_\beta \text{ l'énergie du niveau } \beta \text{ et } E_\alpha, \text{ celle du niveau } \alpha$$

De plus, un spin soumis à un champ magnétique subit une précession autour de l'axe z avec une certaine vitesse angulaire appelée fréquence de Larmor ν_0 (Figure 2). Cette dernière, liée à ΔE par l'Equation 3, dépend donc aussi de la nature du noyau (γ) ainsi que du champ magnétique (B_0).

$$(3) \Delta E = h\nu_0 \rightarrow \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

L'origine du signal RMN est directement corrélée à cette perturbation des niveaux d'énergie. En effet, lors de l'acquisition d'un spectre RMN, c'est l'ensemble des spins présents dans l'échantillon qui est considéré. Cela signifie que l'on ne s'intéresse plus à un moment magnétique μ mais à une magnétisation totale, ou polarisation, M_0 qui correspond à la somme des composantes sur l'axe z de tous les spins dégénérés, μ_z (Figure 3). M_0 est ainsi aligné à B_0 en suivant l'axe z. Puis une onde de radiofréquence (RF) est appliquée, avec

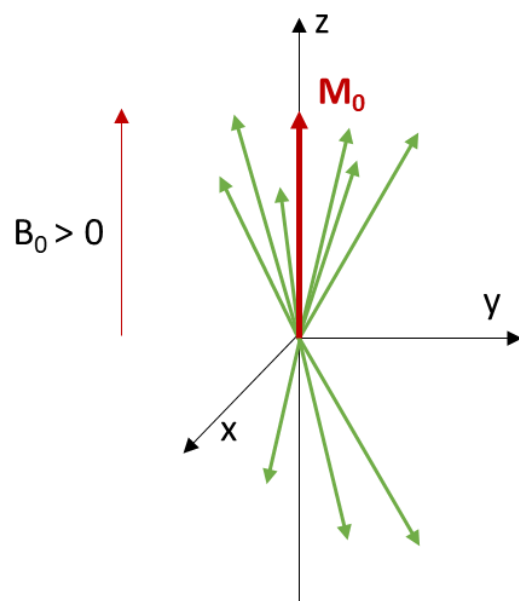


Figure 3 : Représentation de la magnétisation totale M_0 correspondant à la somme des μ_z de l'ensemble des spins présents

un champ magnétique B_1 perpendiculaire à B_0 et une fréquence ν_1 proche de ν_0 (Figure 4.b). La durée de l'impulsion de B_1 est calculée de telle sorte à entraîner un basculement de M_0 de 90° sur l'axe y. A la fin de l'impulsion, les spins vont alors chercher à retourner à leur état d'équilibre, c'est la relaxation (Figure 4.c). En précessant autour de l'axe z, la magnétisation suivant l'axe z, M_z , va augmenter exponentiellement avec un temps T_1 , dit longitudinale, tandis que la magnétisation dans le plan (x,y), M_{xy} , va diminuer exponentiellement avec un temps T_2 , dit, cette fois, transversale (Figure 5). Cette dernière induit un courant électrique qui va être capté par une bobine, puis converti en une sinusoïde amortie appelée Free

Induction Decay (FID) (Figure 4.d). La transformée de Fourier (FT), appliquée à cette FID, permet d'obtenir le spectre RMN de fréquence (Figure 4.e).

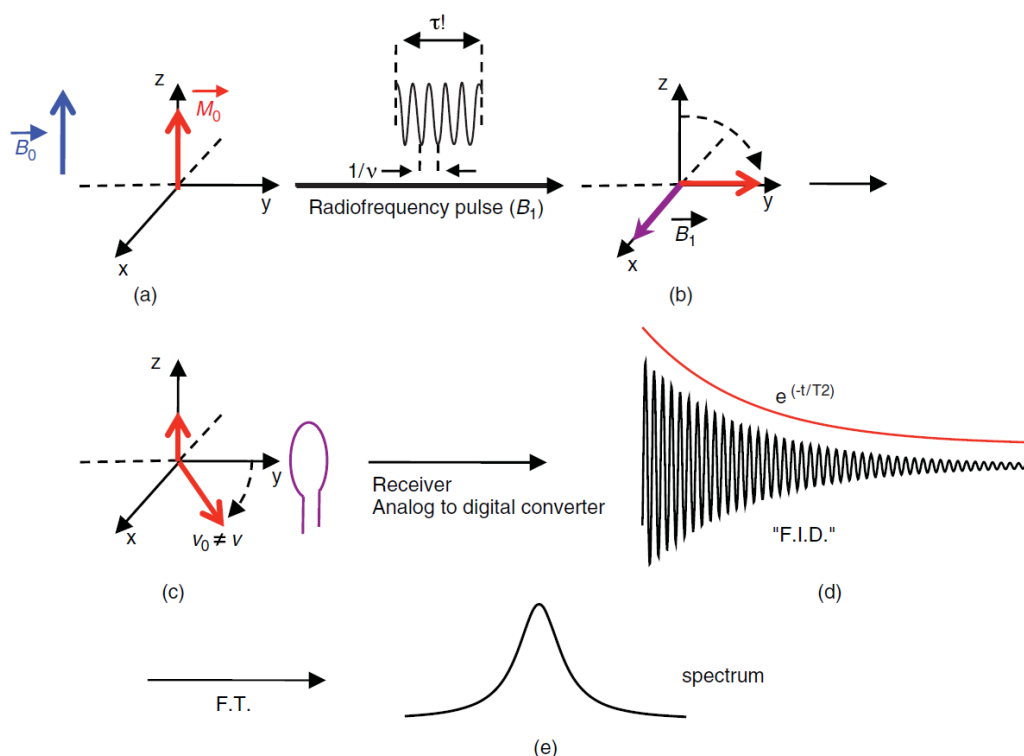
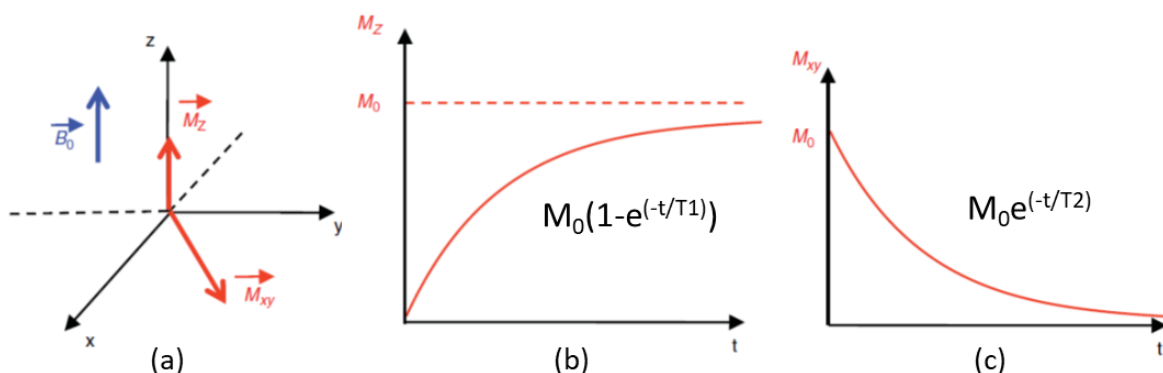


Figure 4 : Description d'une expérience RMN : de la magnétisation totale M_0 des spins jusqu'à l'acquisition du spectre [8]



**Figure 5 : (a) Retour à l'équilibre de la magnétisation M_0 suivant l'axe z , M_z et dans le plan (x,y) , M_{xy}
(b) Evolution de la magnétisation M_z en fonction du temps
(c) Evolution de la magnétisation M_{xy} en fonction du temps [8]**

La relaxation longitudinale est due aux interactions enthalpiques entre les noyaux excités et leur environnement, et donc principalement aux entités possédant un moment magnétique tel que les protons et les électrons non appariés. Ces agents magnétiques créent une distribution de fréquence qui peut atteindre la fréquence de résonance des noyaux excités et ainsi favoriser leur relaxation, tandis que la relaxation transversale s'assimile à un phénomène

entropique correspondant au déphasage des spins (Figure 5). T_2 est influencé par la contribution des champs magnétiques non-homogènes environnants.

B. L'application à l'Imagerie par Résonance Magnétique

Par corrélation avec la RMN, le terme « magnétique », présent aussi dans IRM, fait référence au champ magnétique B_0 utilisé pour dégénérer les niveaux d'énergie tandis que « résonance » fait allusion à l'onde de radiofréquence qui entre en résonance avec la fréquence de Larmor des spins des protons étudiés.

1. La relation entre la RMN et l'IRM

L'IRM permet d'accéder, non plus à un simple spectre, mais à des images di- ou tri-dimensionnelles, grâce à une localisation des spins dans les trois dimensions de l'espace en utilisant des gradients de champ magnétique linéaire. Ces gradients génèrent des encodages particuliers, ainsi, les données brutes rassemblées après relaxation des protons ne seront plus dans un espace temporel (FID) comme en RMN mais dans un espace dit de Fourier, appelé k-space (Figure 6). Une double transformée de Fourier inverse donnera l'image finale en 2D.

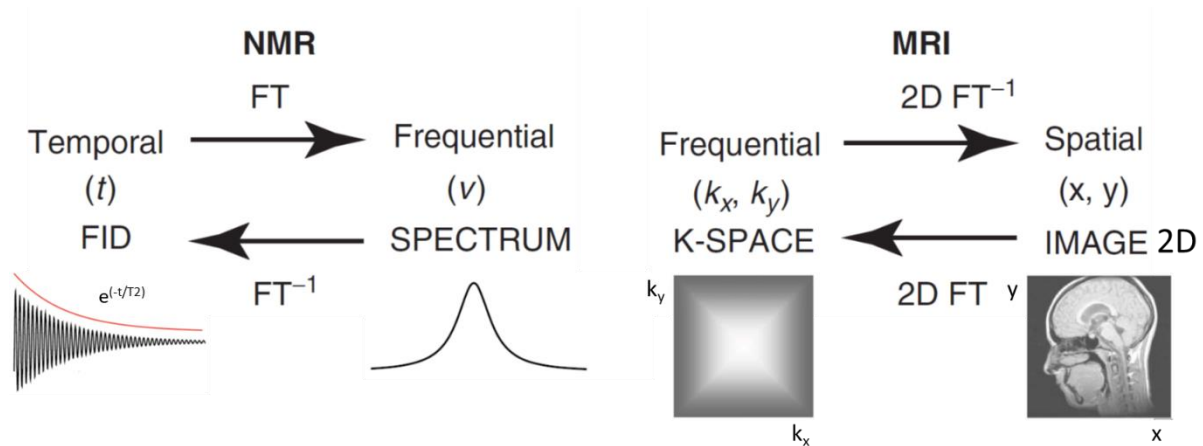


Figure 6 : Comparaison des traitements des données entre RMN et IRM (modifiée de [8])

2. Le contraste des images IRM

Le contraste des images est dû aux différences de temps de relaxation T_1 ou T_2 ou bien de la densité de proton ρ entre les différents tissus. De multiples séquences d'impulsion d'onde de radiofréquence ont été mises en place dont les plus courantes sont les séquences d'écho de spin, d'écho de gradient et d'inversion-reconversion. Chacune possède des paramètres

intrinsèques pouvant être modulés dans le but de modifier la sensibilité de l'expérience et ainsi obtenir des images pondérées en T_1 , T_2 ou ρ (Tableau 2).

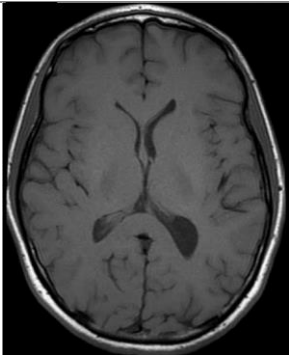
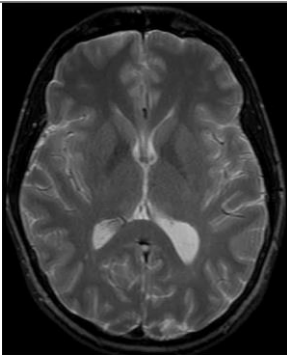
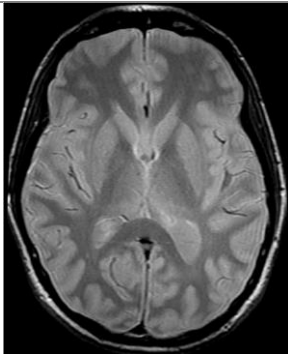
Pondération	T_1	T_2	ρ
Image IRM			

Tableau 2 : Différences de contraste suivant la pondération T_1 , T_2 ou ρ

L'accès à une image de qualité en IRM se fait par l'augmentation du contraste de l'image en diminuant les temps de relaxation des protons de l'eau. Malgré la très haute résolution de l'IRM, cette technique souffre d'une faible sensibilité intrinsèque dû au faible contraste naturel de certaines parties du corps. Dans 70% des cas, l'IRM se suffit à elle-même, contrairement à d'autres techniques qui nécessitent l'injection de produit contrastant comme la TEP. Afin de contourner le faible contraste sur les 30% restants, des produits permettant d'augmenter le contraste de l'image sont développés.

II. Les agents de contraste utilisés en IRM

Les agents de contraste (ACs) ont fait leur première apparition sur le marché en 1988 avec le premier complexe de Gadolinium (III) développé et commercialisé par BayerSchering : le Magnevist® (Figure 7).^[9] Depuis, ils se sont imposés comme des outils de diagnostics performants et indispensables dans 30% des IRM cliniques. L'injection des ACs a permis d'améliorer le contraste et donc la qualité des images anatomiques du corps et en particulier, la différenciation entre les tissus sains et malades.^[10,11] En parallèle, l'IRM fonctionnelle a vu le jour vers les années 1990 et a donné accès à de nouvelles informations sur le fonctionnement de certains organes.^[12] Enfin, une amélioration notable du confort des patients est obtenue puisque le temps de l'examen est alors réduit.

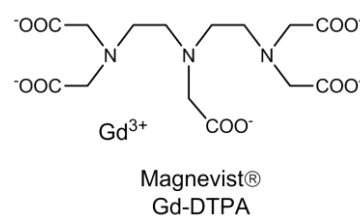


Figure 7 : Structure chimique du Magnevist®

Jusqu'à très récemment (2015), les ACs étaient classés suivant deux grandes familles qui se distinguaient par leur capacité à diminuer plutôt le T_1 (agents T_1) ou le T_2 (agents T_2).^[13] La recherche dans le domaine s'étant fortement accrue, utiliser cette classification est devenue réductrice. C'est pourquoi, depuis environ trois ans, une répartition en cinq familles basées sur les différents mécanismes de contraste est apparue^[14,15] : les agents T_1 , T_2 , CEST (Chemical Exchange Saturation Transfert), hyperpolarisés et fluorés (Figure 8).

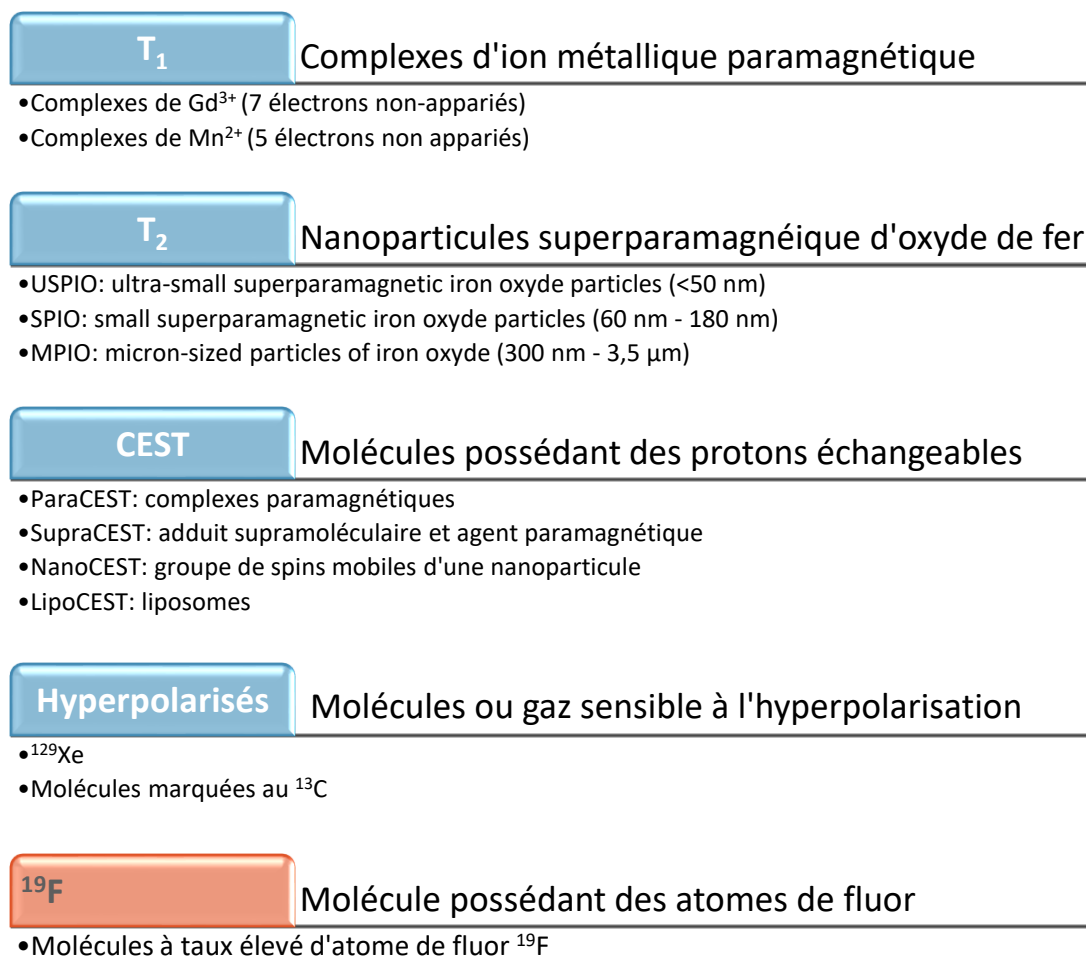


Figure 8 : Les différentes familles d'agents de contraste pour l'IRM

En règle générale en IRM, ce ne sont pas les ACs injectés que l'on visualise mais leur action sur leur environnement, excepté pour les agents fluorés. Chacun de ces ACs présente des avantages et des inconvénients qui seront discutés par la suite. De plus, la faible sensibilité de l'appareil et la non-spécificité de la majorité des ACs, font que les quantités de produits injectées sont souvent de l'ordre du milli-molaire, bien au-dessus des nano-molaires utilisés en imagerie nucléaire. Pour pallier à ce problème et dans le but d'affiner l'analyse IRM, le

principal challenge de la recherche d'aujourd'hui porte sur le développement de sondes spécifiques telles que ^[16–18]:

- Les **biomarqueurs**, basés sur leur affinité envers certaines molécules présentes dans l'organisme comme des protéines avec par exemple, le Vasovist®, spécifique de l'albumine (Angiographie par Résonance Magnétique – ARM)
- Les **agents intelligents** qui répondent à des variations de paramètres physiologiques (température, pH, enzyme, cation, etc.).

Même si, dans le contexte de cette thèse, nous nous intéresserons aux agents de contraste T_1 et plus particulièrement aux complexes de Gadolinium, la suite du chapitre décrira l'ensemble des familles énumérées précédemment afin d'avoir une vue d'ensemble des ACs.

A. Les agents T_1

De manière générale, les agents de contraste T_1 sont des complexes paramagnétiques de Gadolinium Gd(III) ou de Manganèse Mn(II). Cependant, les agents T_1 actuellement sur le marché et approuvés par la Food & Drug Administration (FDA) et/ou l'European Medicine Agency (EMA) sont majoritairement des complexes de Gd(III) (un seul complexe de Mn(II) ^[19]). Les ligands utilisés pour complexer l'ion Gd(III) sont des polyaminocarboxylates sous des formes macrocycliques ou linéaires qui peuvent se présenter sous forme ioniques ou neutre (Tableau 3).

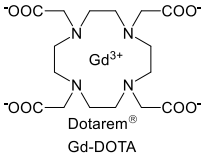
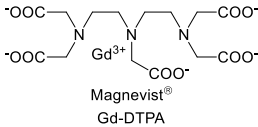
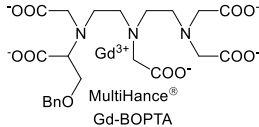
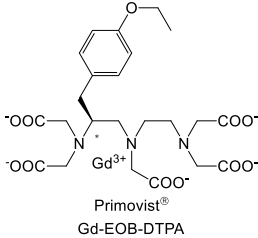
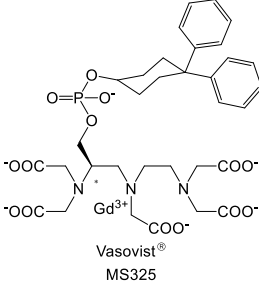
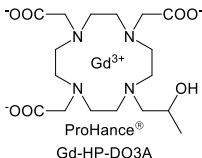
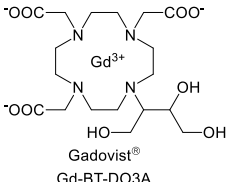
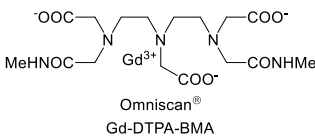
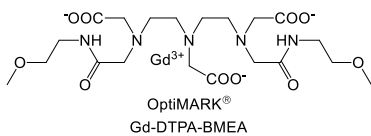
	Macrocyclique	Linéaire	
Ionique			
			
Neutre			
			

Tableau 3 : Structure des agents de contraste T_1 commerciaux

Le Gadolinium possède des propriétés intrinsèques remarquables pour une utilisation en tant qu'agent de contraste pour l'IRM^[8] :

- 7 électrons célibataires qui en font l'ion métallique paramagnétique le plus stable
- Une relaxation électronique lente qui est essentielle pour l'efficacité des ACs

Ces complexes paramagnétiques engendrent des interactions de type dipôle-dipôle entre les spins des protons de l'eau et le champ magnétique local créé par les 7 électrons célibataires du Gd(III). Cet ion métallique possède 8 à 9 sites de coordinations. Afin que l'agent de contraste joue son rôle, il est indispensable qu'au moins un de ces sites reste libre pour la coordination d'une molécule d'eau. Les complexes actuels ont été construits de telle sorte à occuper au maximum 7 à 8 de ces sites. Le contact entre la/les molécule(s) d'eau et le Gd(III) permettra l'accélération du temps de relaxation longitudinale T_1 . Ces ACs sont dits positifs car ils engendrent un contraste plus lumineux et donc plus facile à détecter. C'est pourquoi il est préféré au contraste négatif provoqué par les agents T_2 (voir §I.B.3.).

1. La toxicité

Le Gadolinium sous sa forme libre Gd(III) présente une toxicité avérée dans l'organisme.^[9,20] En effet, son rayon ionique (107,8 pm) étant très proche de celui de l'ion Calcium Ca(II) (114 pm), il entre en compétition avec ce dernier dans de nombreux processus biologiques.^[21] Il est reconnu comme bloqueur inorganique des canaux calciques dépendant du voltage, inhibiteur de l'activité des certaines enzymes (ATPases, kinases...) et il entraîne la surexpression de plusieurs cytokines. En 2006, Grobner a évoqué pour la première fois le lien entre la présence de Gd(III) dans le corps et l'apparition d'une maladie appelée Fibrose Systémique Néphrogénique (FSN).^[22] Cette maladie apparaît majoritairement chez des patients insuffisants rénaux qui éliminent alors difficilement l'agent de contraste. Des études ont montré que la toxicité des ACs était directement liée à la libération du Gd(III) libre dans l'organisme lui permettant de se déposer dans les os mais aussi dans les organes tels que le foie, les reins, la peau mais aussi le cerveau. La FSN devient mortelle lorsque la fibrose atteint des tissus du cœur (myocarde, péricarde) ou des poumons (plèvre). Outre la FSN, de récentes études menées par la FDA permettent d'affirmer qu'à la suite d'injections répétées de certains agents de contraste, une accumulation de Gd(III) dans le cerveau est observée.^[23] Bien qu'aucun signe de neurotoxicité n'a pour le moment pu être démontré, la communauté des radiologistes a pour consigne de limiter l'utilisation de ces ACs chez les femmes enceintes et les enfants, et d'en réduire au mieux le dosage pour les autres.

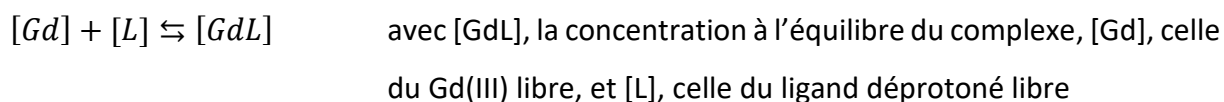
Ces observations confirment l'importance de limiter le relargage de Gd(III) libre dans l'organisme et donc d'orienter la recherche vers des produits stables plus efficaces, permettant d'injecter des doses plus faibles (actuellement de 0,1 à 0,3 mmol/kg). Deux paramètres sont à prendre en compte lorsqu'on évalue la toxicité des ACs :

- L'osmolalité : pour éviter un phénomène d'hyperosmolalité et ainsi améliorer la tolérance au produit, l'osmolalité doit être proche de celle du plasma ($0,3 \text{ osmol.kg}^{-1}$).^[24]
- La stabilité : le relargage du Gd(III) libre dans l'organisme est le principal facteur de toxicité. La stabilité est directement liée à la dissociation du complexe. Elle se détermine en analysant deux constantes : la constante de stabilité thermodynamique

K_{GdL} (Equation 4) et la constante de dissociation k_d ou le temps de demi-vie du complexe $T_{1/2}$ pour l'inertie cinétique du complexe.^[8,9]

- La stabilité thermodynamique

La stabilité thermodynamique traduit l'affinité du Gd(III) avec son ligand. Elle s'exprime par la constante de stabilité du complexe, K_{GdL} , qui est déterminée à partir de l'équilibre complexe – espèces libres suivant :



$$(4) K_{GdL} = \frac{[GdL]}{[Gd][L]}$$

Cette grandeur s'exprime, le plus souvent, sous sa forme logarithmique. Ainsi, plus celle-ci sera grande, plus l'affinité Gd-Ligand sera importante et donc, le complexe sera stable. Cependant, les différents produits sont parfois comparés en fonction de leur constante de stabilité conditionnelle K'_{GdL} qui correspond à K_{GdL} à pH physiologique 7,4, et qui se rapproche des conditions réelles d'utilisation. L'histogramme suivant construit à partir des valeurs de $\log K'$ d'une revue de Caravan *et al.* ^[25] et d'une publication de Port *et al.* ^[21] souligne que les ACs commerciaux ioniques sont plus stables thermodynamiquement que les neutres (Figure 9).

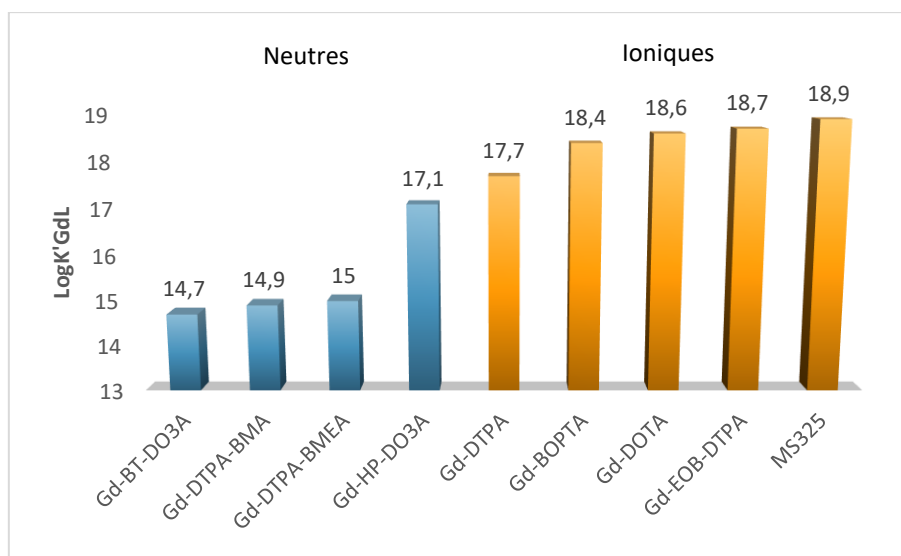


Figure 9 : Représentation des $\log K'_{GdL}$ en fonction de la structure des complexes de Gd(III) commerciaux

- La stabilité cinétique

Tous les chélates métalliques utilisés comme outil diagnostique ou thérapeutique doivent être inertes cinétiquement. La stabilité cinétique est un facteur qui a trop souvent été négligé et qui a été de nouveau étudié plus en détail depuis la découverte de la FSN. La stabilité thermodynamique est donnée pour un système à l'équilibre, or, *in vivo*, les variations physico-chimiques peuvent déplacer cet équilibre et ainsi favoriser la dissociation du complexe ou la transmétallation du Gd(III) par des métaux endogènes comme les ions Cu(II) ou Zn(II). Il est donc important d'évaluer le temps avant la libération du Gd(III) dans l'organisme, sachant que le temps de demi-vie de l'ACs dans le corps humain est approximativement de 90 minutes. Port *et al.* rapportent que les valeurs de k_d et $T_{1/2}$ publiées diffèrent d'un auteur à l'autre en raison de la forte dépendance aux conditions expérimentales de ces mesures.^[21] Cette équipe a alors analysé chacun des ACs commerciaux en suivant un même protocole (dosage arsenazo¹ à pH = 1 et T = 25°C) dont les $T_{1/2}$ obtenus sont reportés dans la Figure 10 suivante :

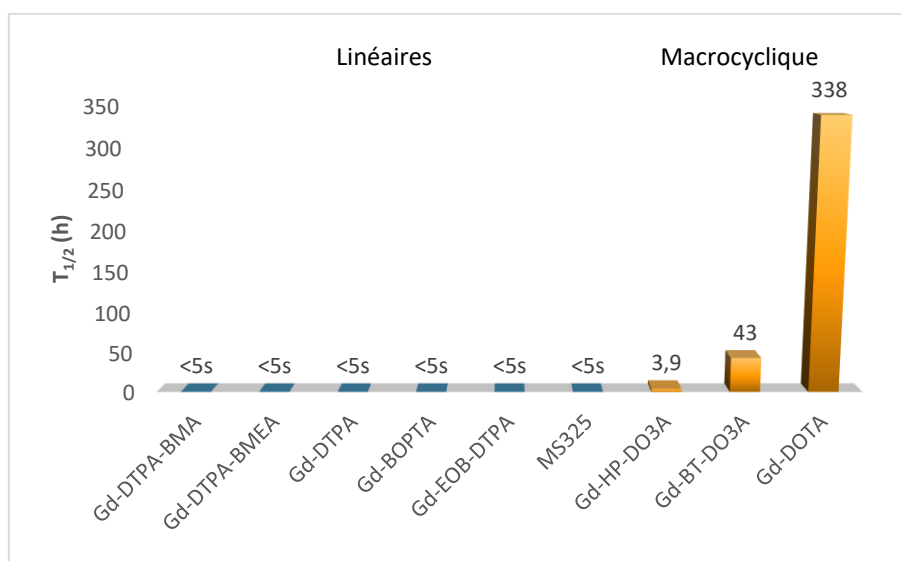


Figure 10 : Représentation des $T_{1/2}$ en fonction de la structure des complexes de Gd(III) commerciaux

Les complexes macrocycliques ne libèrent le gadolinium qu'après plusieurs heures, voire plusieurs jours, tandis que pour les complexes linéaires l'ordre de grandeur du temps de libération du Gd(III) est aux alentours de la seconde.

De nombreuses publications confirment ces constatations et sont unanimes quant à la supériorité, d'un point de vue stabilité, des complexes macrocycliques ionique.^[9,13,20,21,26–28]

¹ Dosage colorimétrique par complexation du Gd(III) par l'Arsenazo

2. La relaxivité

L'efficacité des agents de contraste T_1 et T_2 est exprimée par une valeur appelée relaxivité r_1 et r_2 , respectivement, qui doit être la plus élevée possible et qui est directement liée au temps de relaxation (Equation 5)^[26] :

$$(5) \frac{1}{T_{i\text{ obs}}} = \frac{1}{T_{i\text{ d}}} + \frac{1}{T_{i\text{ p}}} = \frac{1}{T_{i\text{ d}}} + r_i[\text{Gd}]$$

Avec :

- ✓ $i = 1$ ou 2
- ✓ $1/T_{i\text{ obs}}$, la vitesse de relaxation du proton en s^{-1}
- ✓ $1/T_{i\text{ d}}$, la participation diamagnétique exprimée en s^{-1} qui correspond à la vitesse de relaxation des protons de l'eau en l'absence d'ACs
- ✓ $1/T_{i\text{ p}}$, la participation paramagnétique, qui correspond à l'accélération de la vitesse de relaxation due à la présence de l'ACs, exprimée aussi en s^{-1} et qui est proportionnelle à la concentration en Gd(III)
- ✓ r_i , la relaxivité en $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$
- ✓ $[\text{Gd}]$ la concentration en gadolinium en mM

Des relaxivités élevées sont atteintes en diminuant T_i . La relaxivité globale, résulte de la contribution de trois phénomènes dépendant de l'organisation des molécules d'eau autour du complexe (Equation 6) : la relaxivité de sphère interne (inner sphere = IS), r_i^{IS} , due à la molécule d'eau directement liés au cation métallique ; la relaxivité de sphère externe (outer sphere = OS), r_i^{OS} , engendrée par la diffusion translationnelle aléatoire des molécules d'eau dans l'environnement indirect du complexe ; et enfin la relaxivité de seconde sphère (2S), r_i^{2S} , générée par les molécules d'eau qui interagissent par liaisons hydrogènes avec certaines fonctions du ligand ou la sphère interne (Figure 11). Cette dernière est souvent négligée ou incluse dans la contribution de la sphère externe, car considérée comme bien plus faible que les deux autres.^[29]

$$(6) r_i = r_i^{\text{IS}} + r_i^{\text{OS}} + r_i^{\text{2S}}$$

Cette équation peut aussi être exprimée en termes de vitesse de relaxation (Equation 7) :

$$(7) \frac{1}{T_{i\text{ p}}} = \left(\frac{1}{T_{i\text{ p}}}\right)^{\text{IS}} + \left(\frac{1}{T_{i\text{ p}}}\right)^{\text{OS}} + \left(\frac{1}{T_{i\text{ p}}}\right)^{\text{2S}}$$

La contribution de chacune des sphères sur la relaxivité globale dépend de la structure du complexe tels que sa taille, la présence d'accepteur de liaisons hydrogène, sa charge ainsi que son hydrophilicité.^[30] Les ACs commerciaux sont tous de petites molécules polyaminocarboxylés monohydratés avec des contributions de l'IS et l'OS quasiment équivalentes. L'approche élaborée par Solomon, Bloembergen et Morgan a permis de mettre en avant l'influence de différents paramètres sur les différents mécanismes de relaxation (IS, OS ou 2S). Il est cependant plus facile d'augmenter la contribution de la sphère interne.^[8]

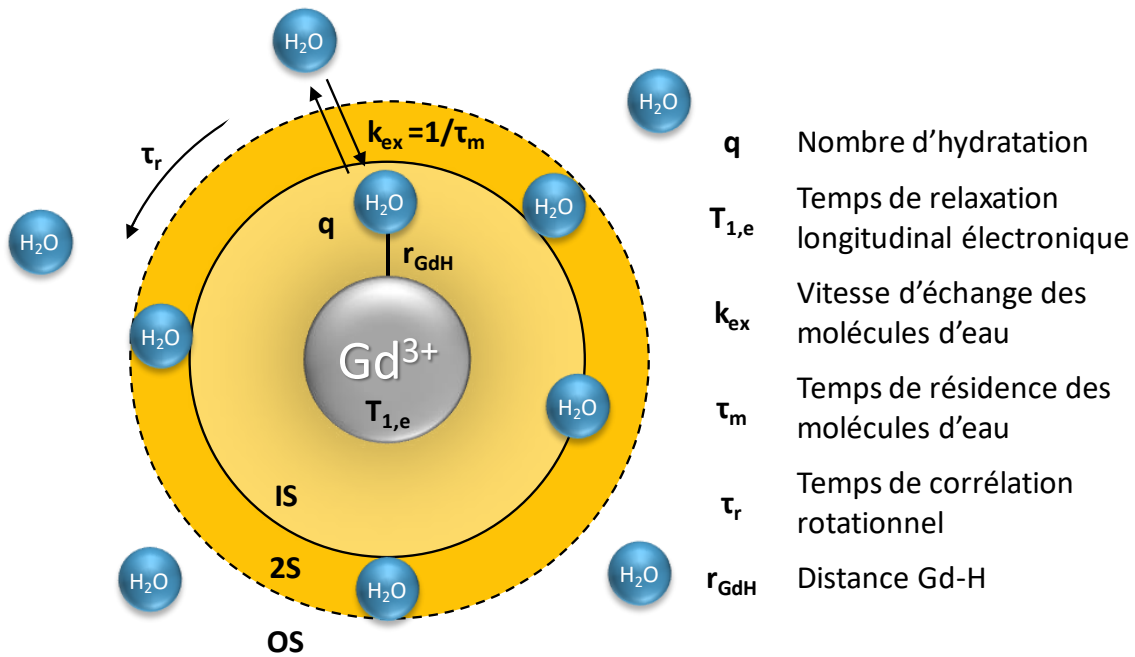


Figure 11 : Représentation de l'environnement d'un complexe de Gd et des paramètres influençant la relaxivité

a. La relaxivité de sphère interne

Dans le cadre du développement des agents T_1 , objet de cette thèse, la suite du paragraphe portera davantage sur la relaxivité longitudinale r_1 . Les Equations 8 – 10 expriment la relation entre la relaxivité longitudinale de sphère interne r_1^{IS} et les différents paramètres inhérents au complexe.^[29]

$$(8) r_1^{IS} = \frac{[AC]q}{55,6} \frac{1}{T_{1M} + \tau_M}$$

$$(9) \frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r_H^6} \left[\frac{3\tau_{C1}}{1 + \omega_H^2 \tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{C2}^2} \right]$$

$$(10) \frac{1}{\tau_{Ci}} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_{ie}} \quad (i = 1, 2)$$

Avec :

- ✓ [AC] la concentration en agent de contraste
- ✓ **q** le nombre d'hydratation
- ✓ T_{1M} le temps de relaxation longitudinal des protons de l'eau liée au métal
- ✓ **τ_m** le temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne
- ✓ γ_I le rapport gyromagnétique du noyau
- ✓ g le facteur Landé des électrons libres
- ✓ μ_B le magnéton de Bohr
- ✓ S le nombre quantique de spin de l'électron
- ✓ **r_H** la distance entre le proton et le Gd(III)
- ✓ τ_{Ci} le temps de corrélation global
- ✓ ω_H, ω_S la fréquence de Larmor du proton et de l'électron
- ✓ **τ_r** le temps de corrélation rotationnel
- ✓ **$T_{i,e}$** le temps de relaxation électronique de l'ion métallique

Cinq paramètres ressortent de ces trois équations comme étant des variables pouvant être modulées dans le but d'augmenter r_1^{15} et donc la valeur de r_1 : **q, τ_m , r_H , τ_r et $T_{i,e}$** .

Comme r_H est à la puissance 6 et que $T_{i,e}$ contribue au temps de corrélation global, ces paramètres influencent grandement la relaxivité (une variation de r_H de $\pm 0,15 \text{ \AA}$ équivaut à un changement d'environ 16% de la relaxivité), cependant, ils sont tous deux difficiles à anticiper et à mesurer expérimentalement. De ce fait, l'optimisation de la relaxivité de sphère interne se fait majoritairement par la modulation des trois autres paramètres : q, τ_m et τ_r .

i. Le nombre d'hydratation « q »

Le nombre d'hydratation q correspond au nombre de molécules d'eau directement liées au cation métallique. D'après l'Equation 8, la relaxivité est proportionnelle à cette valeur, et une augmentation de q entraîne une relaxivité de sphère interne plus élevée. Cependant, elle est souvent accompagnée d'une diminution de la stabilité thermodynamique et cinétique du complexe, synonyme d'une toxicité plus importante. C'est pourquoi, l'ensemble des ACs autorisés sur le marché ne possède qu'une molécule d'eau dans leur sphère interne. Comme vu précédemment, le nombre de sites de coordination du Gd(III) peut aller jusqu'à 9. Avec q

= 1, 8 sites de coordinations sont occupés par le ligand. En augmentant q , on diminue alors la chélation du métal, le laissant ainsi plus apte à la dissociation. Le choix d'un ligand très coordonnant est essentiel lorsque l'on veut augmenter le nombre d'hydratation. Outre ces problèmes de stabilité, l'augmentation du nombre d'hydratation est aussi accompagné d'un risque de formation d'un complexe ternaire.^[8] Les anions tels que les carbonates, phosphates et citrates, présents dans les fluides biologiques, peuvent remplacer les molécules d'eau de la sphère interne du complexe et ainsi diminuer fortement, jusqu'à 60%, la relaxivité.^[31] Bien que ce phénomène existe aussi pour les complexes monohydratés, il peut être, dans ce dernier cas, négligé.

De nombreux efforts ont alors été menés pour synthétiser de nouveaux complexes dihydratés résistants à la chélation d'anions endogènes.

- Ligands polyaminocarboxylés

La majorité des nouveaux ligands a été conçue à partir des squelettes du DTPA et du DOTA. Le premier dérivé du DOTA bishydraté est le ligand DO3A **1** (Tableau 4 et Tableau 11²). Le complexe Gd-DO3A possède une relaxivité légèrement supérieure à celle du Gd-DOTA de $4,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 40°C et 20 MHz. Cependant, en présence d'ions endogènes à l'organisme, il perd ses deux molécules d'eau coordonnées au Gd(III) en faveur des complexes ternaires thermodynamiquement stables. Ce prototype de complexe heptacoordiné a ouvert la porte à d'autres dérivés du DOTA bishydratés, comme le PCTA **2** et trishydraté, le PC2A **3**. Aime et son équipe ont montré que le $[\text{Gd}(\text{PCTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$ possédait d'aussi bonnes propriétés que le DO3A ($r_1 = 5,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 40°C et 20 MHz) et qu'il était résistant face aux anions présents dans le plasma.^[32] En parallèle, Tòth *et al.* ont développé des ligands innovants polyaminocarboxylés, non cycliques, dihydratés, stables thermodynamiquement et cinétiquement, et construits sur un noyau pyridine. Le ligand Py **4**^[33] présente une relaxivité $r_1 = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 500 MHz qui a ensuite été améliorée par l'insertion d'hydrazines pour donner le ligand HYD **5** ($r_1 = 7,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C , 20 MHz)^[34].

² Le tableau 11 regroupe l'ensemble des données présentes dans ce chapitre sur les complexes de Gd(III) et se trouve à la fin de celui-ci, p29-30.

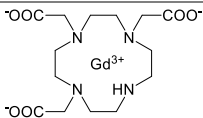
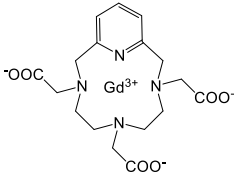
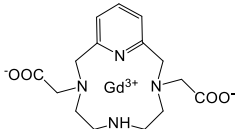
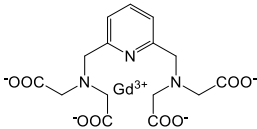
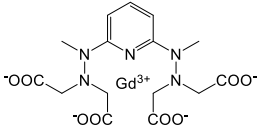
Formule du complexe	Structure	q
1 [Gd(DO3A)(H ₂ O) ₂]		2
2 [Gd(PCTA)(H ₂ O) ₂]		2,4
3 [Gd(PC2A)(H ₂ O) ₃]		3,3
4 [Gd(Py)(H ₂ O) ₂] ⁻		2
5 [Gd(HYD)(H ₂ O) ₂] ⁻		2

Tableau 4 : Exemples de complexes à q > 1 polyaminocarboxylés

- Ligands HOPO

En 1995, Raymond *et al.* ont développé un nouveau type de ligand qui diffère des polyaminocarboxylates synthétisés jusqu'alors : le TREN-Me-3,2-HOPO **6** (Tableau 5 et Tableau 11).^[35] Le complexe de Gd(III) possède une relaxivité de 10,5 mM⁻¹.s⁻¹ à 37°C et 20 MHz, ainsi qu'une stabilité thermodynamique de 20,3, valeurs toutes deux bien supérieures à celles des ACs commerciaux. Cette structure fut à l'origine de nombreux nouveaux complexes de Gd possédant des nombres d'hydratation de 2 voire 3. Ces ligands sont basés sur l'oxophilie du cation métallique Gd(III). Ainsi, en favorisant la présence d'atomes d'oxygènes dans leur structure par rapport aux atomes d'azotes, la valeur de q a pu être augmentée tout en conservant de bonnes stabilités. L'équipe de Raymond a donc travaillé sur l'optimisation de ces hydroxypyridionates (HOPO), soit en modifiant directement le noyau HOPO **7**, soit la nature du lien entre les unités coordinantes **8**, soit en substituant une des trois unités HOPO par un dérivé de téréphthalamide **9**. Ainsi, des complexes avec des stabilités thermodynamiques (log K_{GdL} = 18 - 21) et des relaxivités élevées (r = 7 - 13 mM⁻¹.s⁻¹) ont été obtenus, ceci même en présence d'excès de PO₄³⁻, CO₃²⁻, etc.^[36,37] Bien que cette équipe

avance une bonne stabilité cinétique de ses composés, d'autres auteurs sont plus prudents et prétendent qu'une hexacoordination peut difficilement être accompagnée d'une bonne inertie cinétique.^[8,38]

Formule du complexe	Structure	q
6 $[\text{Gd}(\text{TREN}(1\text{-Me-3,2-HOPO})_3(\text{H}_2\text{O})_2)]$		2
7 $[\text{Gd}(\text{TREN}(6\text{-Me-3,2-HOPO})_3(\text{H}_2\text{O})_2)]$		2
8 $[\text{Gd}(\text{TREN}(\text{Gly-1-Me-3,2-HOPO})_3(\text{H}_2\text{O})_2)]$		2
9 $[\text{Gd}(\text{TREN}(1\text{-Me-3,2-HOPO})_2(\text{TAM-Me})(\text{H}_2\text{O})_2)]^-$		2

Tableau 5 : Exemples de complexes à $q = 2$ basés sur un squelette HOPO

- Ligands AAZTA

En 2004, Aime et ses collaborateurs ont décrit une synthèse simple et rapide de nouveaux ligands de Gd(III) avec des propriétés similaires aux HOPO.^[39] Leur premier ligand de la série, AAZTA ou 6-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine tetraacetic acid **10**

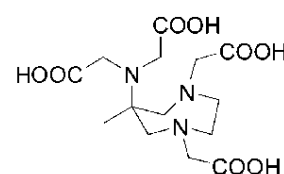


Figure 12 : Ligand AAZTA 10

(Figure 12 et Tableau 11) peut intégrer deux molécules d'eau dans sa sphère interne avec une bonne stabilité thermodynamique et une relaxivité légèrement inférieure au HOPO, mais meilleures que celles des ACs commerciaux ($\log K_{\text{GdL}} = 19,3$ et $r = 7,1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).

- ii. La vitesse d'échange k_{ex} ou le temps de résidence des molécules d'eau τ_m

La constante de vitesse d'échange k_{ex} des protons caractérise l'échange des molécules d'eau coordonnées au métal avec celles présentes dans la seconde sphère et la sphère externe. Dans la littérature, il est tout aussi fréquent de comparer les valeurs de k_{ex} des ACs que les temps de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne, τ_m . Ces deux paramètres sont directement liés par la relation : $k_{ex} = 1/\tau_m$. Ce temps est dépendant du mécanisme d'échange, de l'encombrement stérique et la rigidité du ligand, ainsi que de la charge globale du complexe.^[38] Pour ces agents de contraste T_1 qui visent à diminuer le temps de relaxation des protons de l'eau, l'objectif est d'accélérer la vitesse d'échange afin d'augmenter le nombre de protons susceptibles de subir l'effet paramagnétique du Gd(III). Caravan *et al.* ont étudié l'influence de $T_{1,e}$, τ_m et τ_r et ont montré qu'à des champs magnétiques élevés utilisés en clinique (1,5 T et plus), la relaxivité dépend majoritairement de q , τ_m et τ_r , et que la valeur optimale de τ_m est d'environ 10 ns (Figure 13).^[25] Cependant, les τ_m des ACs actuels (Tableau 11) sont loin de cet optimum. Le meilleur temps de résidence est obtenu avec le ligand MS325 ($\tau_m = 69$ ns), mais celui-ci peut atteindre les 1000 ns pour le DTPA-BMA et BMEA.

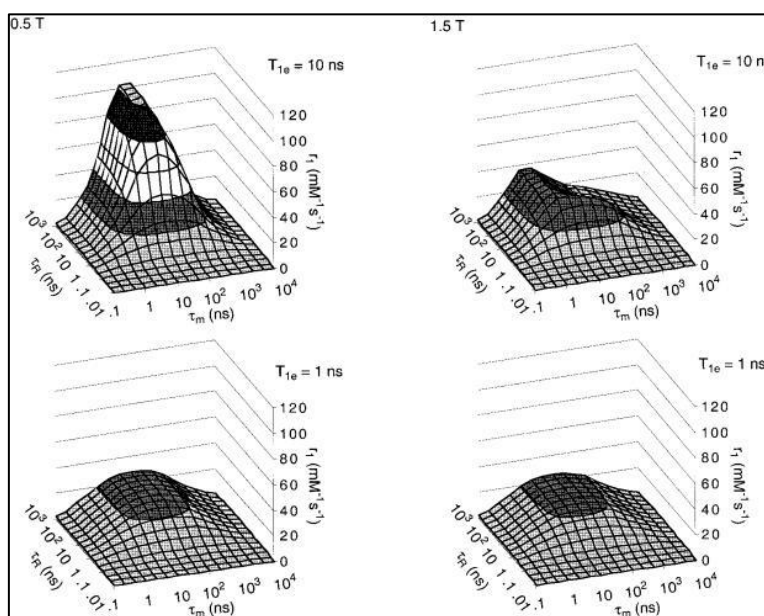


Figure 13 : Relaxivités de sphère interne calculées en fonction de τ_m et τ_r pour différentes valeurs de $T_{1,e}$ à 0,5 T et 1,5 T^[25]

Le mécanisme adopté par le complexe pour le transfert des molécules d'eau de la sphère interne à la sphère externe, entraînera des k_{ex} plus ou moins élevées. La vitesse d'échange k_{ex} est liée, par l'Equation 11, au volume d'activation $\Delta V^\ddagger$ qui traduit l'état de transition du mécanisme d'échange.

(11) $\frac{1}{\tau_m} = k_{ex} = (k_{ex})_0^T e^{-\Delta V^\ddagger P/RT}$ avec $(k_{ex})_0^T$ la vitesse d'échange des molécules d'eau à la pression $P = 0$ atm et une température T , et R la constante universelle des gaz parfaits.

Ainsi, plus la valeur négative de $\Delta V^\ddagger$ est élevée, plus la valeur de k_{ex} est grande et inversement, plus la valeur positive de $\Delta V^\ddagger$ est élevée, plus la valeur de k_{ex} est petite. Le volume d'activation est mesuré par RMN ^{17}O à pressions variables et permet aussi d'établir le type de mécanisme (Figure 14) :

- ✓ $\Delta V^\ddagger > 0 \rightarrow$ mécanisme dissociatif D caractérisé par le départ de la molécule d'eau coordonnée au métal suivi par l'arrivée d'une nouvelle molécule d'eau
- ✓ $\Delta V^\ddagger < 0 \rightarrow$ mécanisme associatif A caractérisé par l'arrivée d'une molécule d'eau suivi du départ de la molécule d'eau coordonnée au métal
- ✓ $\Delta V^\ddagger = 0 \rightarrow$ mécanisme d'échange (interchange) I pour lequel le départ et l'arrivée des molécules d'eau se fait simultanément
- ✓ $\Delta V^\ddagger_I < \Delta V^\ddagger < \Delta V^\ddagger_D \rightarrow$ mécanisme d'échange dissociatif (dissociative interchange) I_d pour lequel le départ est légèrement prédominant par rapport à l'arrivée
- ✓ $\Delta V^\ddagger_I > \Delta V^\ddagger > \Delta V^\ddagger_A \rightarrow$ mécanisme d'échange associatif (associative interchange) I_a pour lequel l'arrivée est légèrement prédominante par rapport au départ

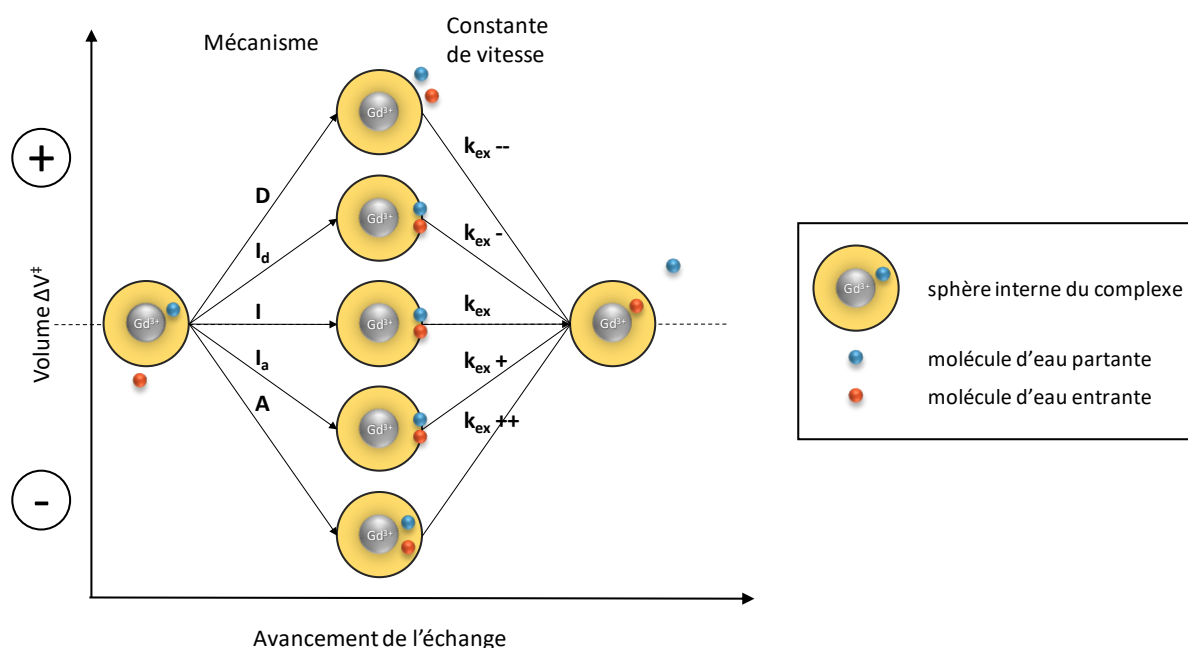


Figure 14 : Représentation schématique des mécanismes de transfert des molécules d'eau de la sphère interne à la sphère externe du complexe (modifié à partir de [8])

Les agents de contraste commerciaux agissent tous suivant un mécanisme dissociatif, ce qui explique leurs k_{ex} faibles ($0,4 < k_{\text{ex}} < 4,1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$), tandis que l'aqua-ion ($[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$) agit avec un mécanisme associatif et possède un k_{ex} de $804 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Cependant, très peu de complexes décrits dans la littérature opèrent par un mécanisme associatif. Le ligand TREN-bis(6-Me-HOPO-TAM)-TRI **11**^[40], de la famille des ligands HOPO, ainsi que le PDTA **12**, un dérivé de l'EDTA, sont parmi les rares ligands à générer un mécanisme I_a et ainsi à avoir des k_{ex} plus élevés : $53 \cdot 10^6$ et $102 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$, respectivement (Tableau 6 et Tableau 11).

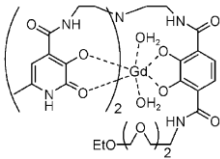
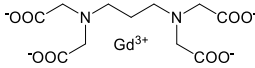
Nom du complexe	$[\text{Gd}(\text{TREN-bis(6-Me-HOPO-TAM)-TRI})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$	PDTA
Structure		
	11	12
$\Delta V^\ddagger \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$	-5	-1,5
$k_{\text{ex}} 10^6 \text{ s}^{-1}$	53	102

Tableau 6 : Exemples de complexes de Gd à mécanisme associatif I_a

Dans la littérature on constate que la recherche se focalise majoritairement sur l'amélioration de la valeur du k_{ex} plutôt que sur l'obtention d'un mécanisme associatif. Celui-ci semble plus difficile à prédire. Cependant, le départ de l'eau coordonnée étant l'étape déterminante pour un mécanisme dissociatif, deux facteurs influençant celle-ci ont été identifiées : la charge du complexe et l'encombrement stérique autour du site de coordination. Sur cette base, de nombreux nouveaux ligands, souvent des dérivés du DOTA ou du DTPA, ont été synthétisés.

L'augmentation de la charge en ajoutant un bras carboxylate sur un des azotes du macrocycle du DOTA (DOTASA **13**) conduit à une légère amélioration de la vitesse d'échange, de $4,1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ pour le DOTA à $6,3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ pour le DOTASA (Tableau 7 et Tableau 11).^[41] Mais de bien meilleurs résultats ont été obtenus en jouant sur l'encombrement stérique. La stratégie consiste à encombrer le site de coordination sans apporter de rigidité dans le système. L'insertion d'un CH_2 entre deux azotes sur le DTPA et sur le DOTA, formant respectivement les ligands EPTPA **14** et TRITA **15**, engendre des k_{ex} de $330 \cdot 10^6$ et $270 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$.^[42] Il en est de même lorsque des ligands plus coordinants sont utilisés pour remplacer les carboxylates. En effet, la substitution des trois fonctions carboxylates du PCTA-12 par trois acides phosphoniques pour

former le PCTP-12 **16** entraîne une amélioration du k_{ex} de 121%.^[43] On constate ce même effet positif des fonctions acides phosphoniques sur le ligand EN-Py₂PHOS₂ **17** dont le complexe possède un k_{ex} , proche de l'aqua-ion, de 700.10^6 s^{-1} . Cependant il est intéressant de relever que l'insertion d'un cyclohexyle entre les deux azotes (CH-Py₂PHOS₂ **18**) rigidifie la structure et diminue d'un facteur 5 le k_{ex} : 150.10^6 s^{-1} .^[44]

Formule du complexe	Structure	$k_{ex} (10^6 \text{ s}^{-1})$
13 [Gd(DOTASA)(H ₂ O) ₂] ²⁻		6,3
14 [Gd(EPTPA)(H ₂ O)] ²⁻		330
15 [Gd(TRITA)(H ₂ O)] ⁻		270
16 [Gd(PCTP-12)(H ₂ O)] ³⁻		170
17 [Gd(EN-Py ₂ PHOS ₂)(H ₂ O)] ³⁻		700
18 [Gd(CH-Py ₂ PHOS ₂)(H ₂ O)] ³⁻		150

Tableau 7 : Exemples de complexes de Gd aux k_{ex} améliorés

iii. Le temps de corrélation rotationnel τ_r

A des champs magnétiques élevés ($\geq 1,5 \text{ T}$), le temps de corrélation rotationnel τ_r tend à dominer le temps de corrélation global τ_c des complexes de Gd(III) à faible poids moléculaire.^[30] D'après les Equations 8 – 10, l'augmentation de τ_r et donc de τ_c entraîne de meilleures relaxivités r_1 . Le moyen le plus simple pour diminuer la vitesse de rotation du complexe est de construire des structures à plus haut poids moléculaire soit en liant, de manière covalente ou non, un complexe de Gd à un substrat macromoléculaire (protéines,

polysaccharides, micelles, liposomes, dendrimères, etc.) soit en incorporant plusieurs unités paramagnétiques dans le même squelette (systèmes multimériques, nanoparticules).^[13] De plus, il est intéressant de noter qu'une symétrie dans la molécule, positionnant l'ion métallique au barycentre du complexe lui permettant ainsi d'être sur l'axe de rotation, favorise l'augmentation de la relaxivité.^[38,45,46]

Aime *et al.* ont comparé le profil ^1H NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) qui décrit la relaxivité en fonction de la fréquence utilisée, du $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$ **19** (Tableau 9), de son complexe d'inclusion dans une β -cyclodextrine (1 kDa), ainsi que de l'adduit non-covalent avec l'albumine du sérum humain (HSA) (> 65 kDa) (Figure 15 et Tableau 11).^[30] Cet exemple montre de manière

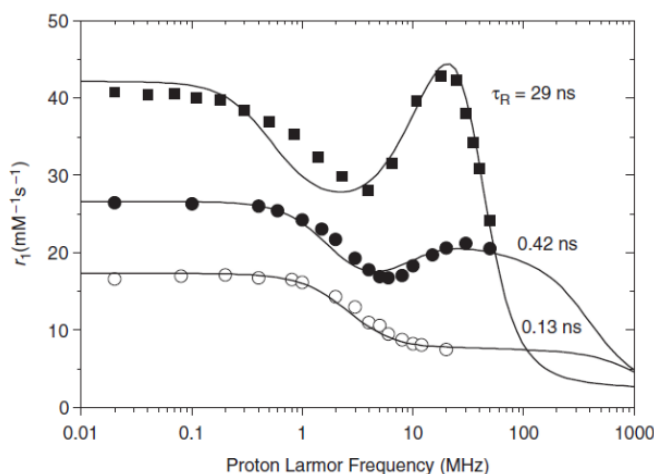


Figure 15 : Profil ^1H NMRD du $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$ (cercle ouvert), du $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$ - β -CD (cercle plein) et du $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$ - HSA (carré)^[30]

significative l'influence du poids moléculaire sur τ_r et r_1 . Le complexe de Gd(III) seul est caractérisé par $\tau_r = 0,13 \text{ ns}$ et $r_1 = 7,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Le fait d'inclure ce complexe, grâce au bras hydrophobe BOM (BenzylOxyMéthyle) dans une β -cyclodextrine améliore par un facteur 3,2 ces deux paramètres. Le complexe formé avec l'albumine humaine entraîne, quant à lui, un τ_r 22 fois supérieur et un relaxivité 6 fois plus importante. Ces résultats mettent aussi en évidence la non linéarité de la relation entre le poids moléculaire, le temps de corrélation rotationnel et la relaxivité. En effet, une trop grande flexibilité de la structure globale ou du bras espaceur entre le chélate de Gd(III) et la macromolécule diminue considérablement l'impact de l'augmentation du poids moléculaire sur la relaxivité.^[8] Le Tableau 8 reprend les poids moléculaires (PM) et relaxivités de différents complexes élaborés à partir du complexe Gd-DTPA couplé à un polymère linéaire de lysine plus ou moins grand.^[47] La non influence du poids de la molécule sur la relaxivité est flagrante, se stabilisant autour de $10 - 11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ quelle que soit la taille du polymère.

Dérivés DTPA	PM (kDa)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
DTPA	0,5	4,6
DTPA-polylysine-1	36	10,4
DTPA-polylysine-2	43,9	11,9
DTPA-polylysine-3	139	10,9
DTPA-polylysine-4	480	10,9

Tableau 8 : Relaxivité de complexes analogues à base de Gd-DTPA couplé à un polymère linéaire de lysine en fonction du poids moléculaire global

Cependant, lorsque le chélate de Gd(III) est lié à un polymère de nature plus rigide, comme un dendrimère de type PAMAM, la relaxivité peut dépasser les 30 mM⁻¹s⁻¹ (Figure 16).^[48]

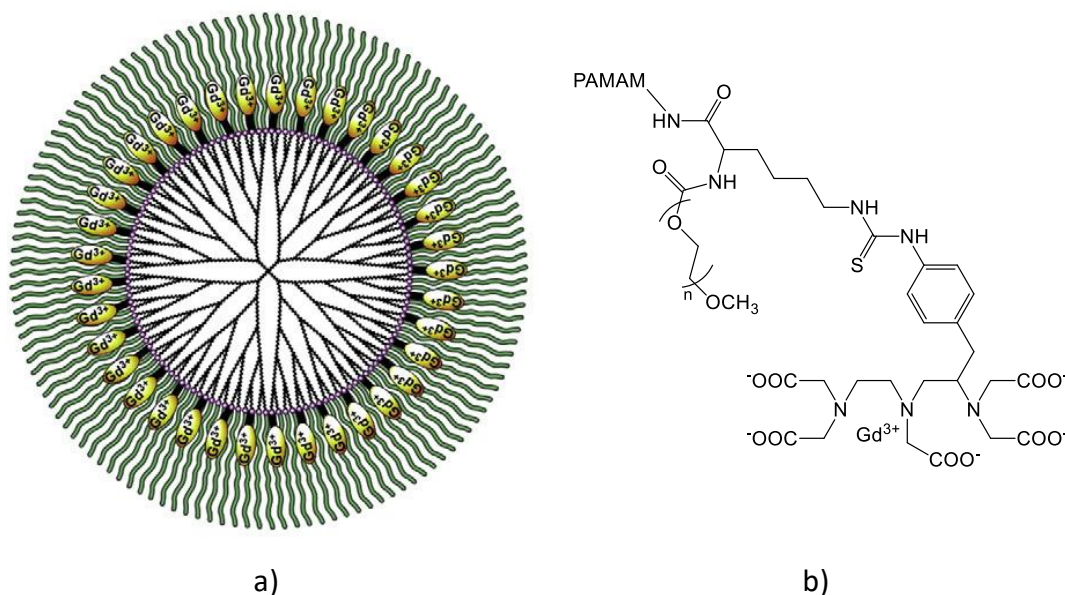


Figure 16 : a) Exemple d'un dendrimère PAMAM (PEG2k-PAMAM-G4) sur lequel est lié plusieurs chélates DTPA-Gd possédant une relaxivité globale de $r_1 = 30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; b) Structure de la surface du dendrimère (modifiée à partir de [48])

Cette valeur reste tout de même faible par rapport à la taille de la molécule (> 60 kDa) et ceci s'explique par les rotations internes et indépendantes de chaque complexe de Gd(III), fixé à la surface du dendrimère, qui se trouve être bien plus rapide que celle de la structure dendrimérique totale. Il faut néanmoins relever que la construction d'ACs à partir de polymère de plusieurs kDa n'est pas obligatoire pour atteindre de bonnes relaxivités. L'équipe d'Hermann a développé une sonde bimodale fluorescence/IRM sur un squelette de β -cyclodextrine (G5F2C) **20** et a obtenu une relaxivité de 22 mM⁻¹s⁻¹.^[49]

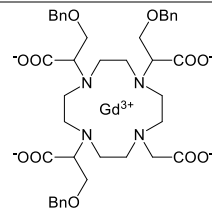
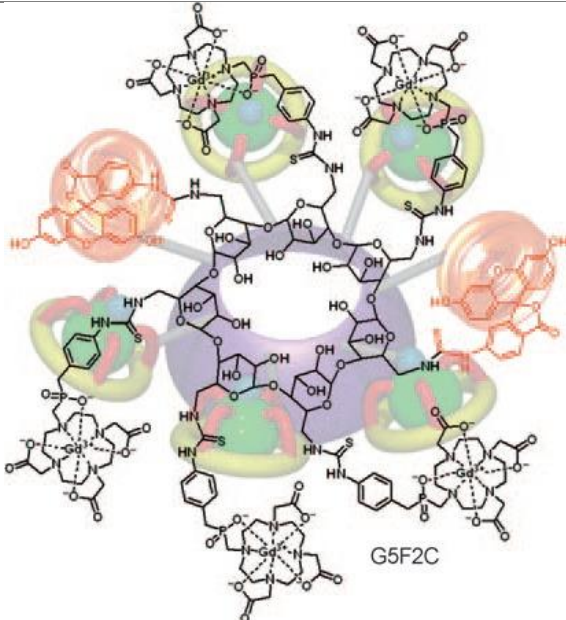
Formule du complexe	Structure
19	
$[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$	
20	
G5F2C	

Tableau 9 : Structures citées dans le cadre de l'amélioration de la relaxivité par le ralentissement de la vitesse de rotation du complexe

b. La relaxivité de sphère externe (OS) et seconde sphère (2S)

Comme énoncé précédemment, la relaxivité globale dépend aussi de la contribution de la sphère externe et de la seconde sphère d'hydratation du complexe (Equation 6 et 7). Botta a grandement développé ce sujet dans une revue.^[29] L'étude de complexes possédant un nombre d'hydratation égale à 0 (Tableau 10) a permis de distinguer les contributions de la sphère externe et de la seconde sphère en s'affranchissant de celle de la sphère interne.

Abréviation	Structure
21 $[\text{Gd}(\text{N}_4\text{P}_4\text{Bn}_4)]^-$	
22 $[\text{Gd}(\text{N}_4\text{P}_3\text{Me}_3\text{CONBu}_2)]$	
23 $[\text{Gd}(\text{N}_4(\text{PO}_3^{2-})_4)]^{5-}$	
24 Bn-N ₆	

Tableau 10 : Structures utilisées pour démontrer l'influence de l'OS et de la 2S

En effet, le complexe **21** dépourvu de sphère d'hydratation interne possède tout de même une relaxivité d'environ $2 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ qui s'explique par la diffusion translationnelle des molécules d'eau présentes dans la sphère externe à une distance de $4,35 \text{ \AA}$ du métal. En remplaçant les groupements benzyles par des méthyles moins encombrants, et en substituant un phosphonate par un amide favorable aux liaisons hydrogènes avec l'eau, on obtient le complexe **22** avec une amplitude de son ^1H NMRD augmentée par rapport à **21** (Figure 17).

Ceci s'explique par la présence de molécules d'eau dans la seconde sphère d'hydratation à une distance de 3,6 Å, suffisamment faible pour que les protons de l'eau puissent être relaxés. De plus, ce rôle de la 2S a pu résoudre des incompréhensions qui persistaient autour du complexe **23**. En effet, ce macrocycle portant quatre acides phosphoniques suscitait de

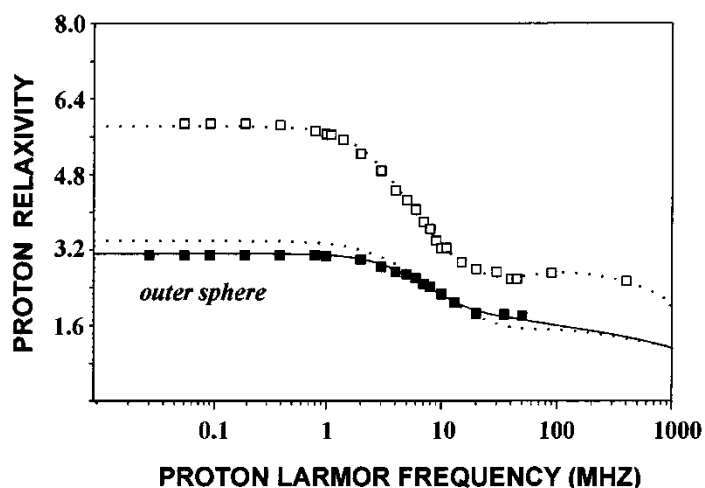
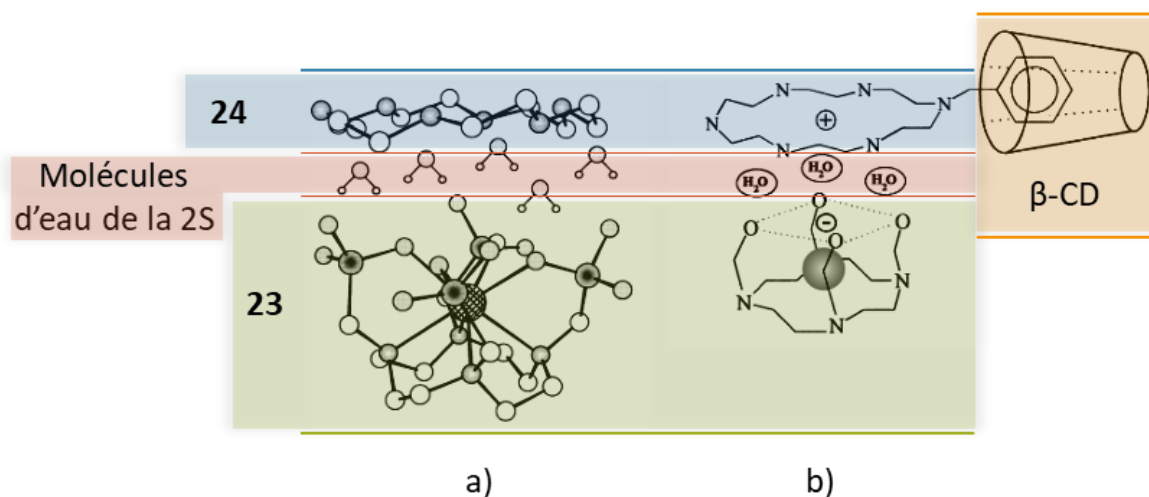


Figure 17 : Profil ^1H NMRD des complexes **20** (carré plein) et **21** (carré vide)^[29]

l'intérêt, mais présentait des propriétés de relaxivités difficilement interprétables qui ont laissé place à de nombreuses hypothèses telles que la formation d'oligomères. Cependant, la distance de 3,26 Å déterminée pour un $q = 1$ semblait trop importante pour une sphère interne. L'équipe de Botta a alors utilisé la théorie de la seconde sphère et a mis en avant un nombre d'hydratation de la sphère interne nul et la présence de deux molécules d'eau dans la seconde sphère à une distance de 3,89 Å. A partir de ce dernier complexe, l'influence de la taille de la molécule et donc de τ_r a été démontrée. En effet, la relaxivité est améliorée en formant une paire d'ions entre **23** et **24** ($r_1 = 8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 20 MHz) mais plus encore lorsque cette paire d'ion forme un complexe d'inclusion avec la β -cyclodextrine (β -CD) ($r_1 = 18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 20 MHz) (Figure 18).



**Figure 18 : a) Modèle de la paire d'ion formée entre 23 et 24, sans la fonction benzylique, piégeant les molécules d'eau de la seconde sphère d'hydratation du complexe 23 ;
b) Représentation du complexe ternaire (23)-24-β-CD (modifiée à partir de [29])**

L'histogramme (Figure 19) rassemble les relaxivités de chacun de ces complexes en dissociant l'effet des différentes sphères. Ceci permet de visualiser aisément que l'effet de sphère externe est présent mais varie peu d'un complexe à l'autre et qu'au contraire, l'effet de seconde sphère est finalement, une source d'amélioration de la relaxivité non négligeable. Il convient d'affirmer que c'est en considérant l'ensemble des sphères d'hydratation que l'amélioration de la relaxivité pourra être optimale. Le premier exemple illustrant cette stratégie est le $[\text{Gd}(\text{PCTP-12})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ **16** construit en remplaçant un acide phosphonique par un noyau pyridine et laissant donc la place pour une molécule d'eau dans la sphère interne tout en conservant l'hydratation de la seconde sphère ($r_1 = 7,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 20 MHz) .

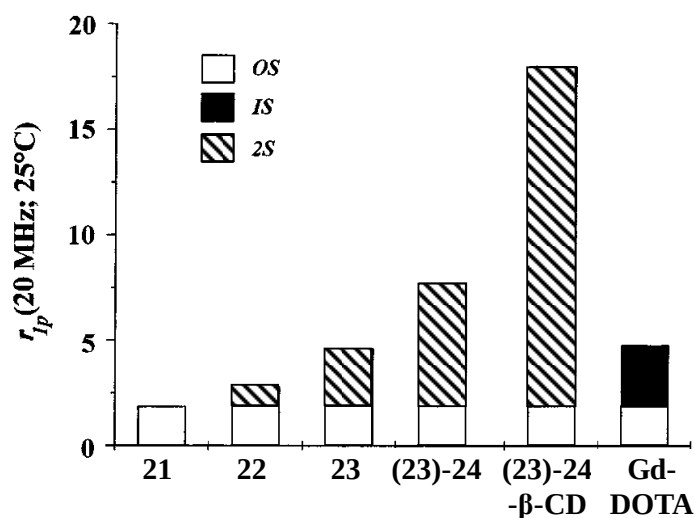


Figure 19 : Histogramme représentant la contribution de chacune des sphères sur la relaxivité globale des complexes (modifiée de [29])

Tableau 11 : Valeurs des principaux paramètres des complexes cités dans ce paragraphe

#	Complexes	q	k _{ex} (10 ⁶ s ⁻¹)	τ _m (ns)	τ _r (ps)	M (g.mol ⁻¹)	r ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹) 20MHz	K _{GdL}
Aqua ion								
	[Gd(H ₂ O) ₈] ³⁺	8	804	1,2	41	301		
ACs commerciaux								
	[Gd(DOTA)(H ₂ O)] ⁻	1	4,1	108/122	77/90/56	575	3,83 /3,5 (40°C)	18,6
	[Gd(HP-DO3A)(H ₂ O)]	1	2,7	217	51	576	3,7 (40°C)	17,1
	[Gd(BT-DO3A)(H ₂ O)]	1		176	57	622	3,6 (40°C)	14,7
	[Gd(DTPA)(H ₂ O)] ²⁻	1	3,3	130/143	58 /103	563	4,02 (37°C)	17,7
	[Gd(EOB-DTPA)(H ₂ O)] ²⁻	1	3,6	82	84/93/178	696	5,3 (37°C)	18,7
	[Gd(BOPTA)(H ₂ O)] ²⁻	1	3,45	140	88	683	4,39 (39°C)	18,4
	[Gd(MS325)(H ₂ O)] ³⁻	1		69		906	6,6 (37°C)	18,9
	[Gd(DTPA-BMA)(H ₂ O)]	1	0,45	1000/967	66/167	591	3,96 (37°C)	14,9
	[Gd(DTPA-BMEA)(H ₂ O)]	1	0,39	1130/1320	88	679	4,7 (40°C)	15
q > 1								
1	[Gd(DO3A)(H ₂ O) ₂]	2	6,3/11	77	66/160	536	4,8 (40°C)	21
2	[Gd(PCTA-12)(H ₂ O) ₂]	2,4	14		44/70	570	6,9 (25°C)	
3	[Gd(PC2A)(H ₂ O) ₃]	3,3			40		7,5 (25°C)	16,6
5	[Gd(HYD)(H ₂ O) ₂] ⁻	2	7,8		92,6		7,7 (25°C)	18,3
6	[Gd(TREN(1-Me-3,2-HOPO) ₃ (H ₂ O) ₂]	2					10,5 (37°C)	20,3
10	[Gd(AAZTA)(H ₂ O) ₂] ⁻	2	10	90			7,1 (25°C)	19,3

#	Complexes	q	k_{ex} ($10^6 s^{-1}$)	τ_m (ns)	τ_r (ps)	M (g.mol ⁻¹)	$\frac{r_1}{20MHz}$ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	K _{GdL}
k_{ex} ++								
11	[Gd(TREN-bis(6-Me-HOPO-TAM)-TRI)(H ₂ O) ₂] ⁻	2	53					24,9
12	[Gd(PDTA)(H ₂ O) ₂] ⁻	2	102			495	7,4 (25°C)	13,7
13	[Gd(DOTASA)(H ₂ O)] ²⁻	1	6,3		125	633	5,0 (37°C)	
14	[Gd(EPTPA)(H ₂ O)] ²⁻	1	330		150	578		22,8
15	[Gd(TRITA)(H ₂ O)] ⁻	1	270			590		28,6
16	[Gd(PCTP-12)(H ₂ O)] ³⁻	1	170	6	106	658	7,5 (25°C)	
17	[Gd(EN-Py ₂ PHOS ₂)(H ₂ O)] ³⁻	0,6	700			688		
18	[Gd(CH-Py ₂ PHOS ₂)(H ₂ O)] ³⁻	0,6	150			742		
τ_r ++								
19	[Gd(DOTA-BOM ₃)(H ₂ O)] ⁻	1				936	5 < r < 10 ^a	
	[Gd(DOTA-BOM ₃)(H ₂ O)] ⁻ - βCD	1				2071	≈ 20 ^a	
	[Gd(DOTA-BOM ₃)(H ₂ O)] ⁻ - HSA	1				> 65 kDa	40 < r < 45 ^a	
20	G5F2C					≈ 6 kDa	22 (25°C)	

Ce tableau a été construit à partir des références [13,25,26,43,49–51]

^a estimation faite à partir du profil ¹H NMRD

B. Les agents T_2

Les agents T_2 influencent le temps de relaxation transversal dans le plan (x,y) qui est modifié par la contribution des champs magnétiques non-homogènes environnants. Ces derniers sont surtout apportés par des nanoparticules d'oxyde de fer appelées agents superparamagnétiques (SuperParamagnetic Iron Oxide – SPIO).^[52] Ce sont des agents dits négatifs, car en accélérant T_2 , l'intensité du signal diminue. Une forte relaxivité r_2 équivaut alors à une image foncée.

En fonction de la voie de synthèse, les particules peuvent posséder des tailles hydrodynamiques différentes qui influenceront leur distribution dans l'organisme^[53–55]. De ce fait, trois catégories de nanoparticules sont décrites^[8,56–58] :

USPIO (Ultra-Small: <50 nm) < **SPIO** (Small: 60 nm – 180 nm)
< **MPIO** (Micron-sized: 300 nm - 3,5 μ m)

Le Tableau 12 résume les ACs T_2 actuellement utilisés en clinique et reprend certains de leurs paramètres physico-chimiques ainsi que leurs domaines d'applications. Il est intéressant de noter que ces agents superparamagnétiques agissent à la fois sur T_2 mais aussi sur T_1 et que la relaxivité r_2 reste bien supérieure à r_1 .

Bien que ces agents négatifs présentent de très bonnes relaxivités et soient encore considérés comme non-toxiques^[59], un seul, le Resovist® est, depuis 2015, autorisé dans quelques pays^[60]. Ceci s'explique par les faits suivants :

- L'image avec un agent T_2 étant relativement foncée, elle apporte une confusion entre les signaux issus d'autres conditions pathogènes comme les hémorragies ou la calcification ;
- Les forts moments magnétiques des agents superparamagnétiques peuvent causer des artéfacts engendrant une image moins nette ;
- L'élimination des particules est très lente et peut atteindre des mois pour les plus larges pouvant entraîner des effets secondaires à long terme ;
- Le temps d'acquisition en T_2 est plus long qu'en T_1 .

Pour pallier au problème de contraste négatif, des nouvelles nanoparticules d'oxyde de fer, plus petites sont à l'étude.^[61] En diminuant la taille vers 5 nm, la relaxivité transversale r_2 diminue fortement tandis que la relaxivité longitudinale r_1 augmente considérablement pouvant aller de 2 à 50 mMol⁻¹.s⁻¹. Ainsi, ces nouveaux USPIO pourraient, à l'avenir, être utilisés pour l'IRM pondérée en T_1 .

Catégories	Nom commerciaux	Fabricants	Tailles	Relaxivités $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 1,5 T	Applications
USPIO					
	Sinerem® Combidex®	Guerbet AMAG pharmaceuticals	20 – 40 nm	$r_1 = 19,5$ $r_2 = 87,6$	Foie, rate, ganglions lymphatiques, agent intravasculaire, activité des macrophages (<i>in vivo</i>), marquage cellulaire (<i>in vitro</i>)
	Supravist®	Bayer Schering Pharma AG	30 nm	$r_1 = 10,7$ $r_2 = 38$	Agent intravasculaire, activité des macrophages (<i>in vivo</i>), marquage cellulaire (<i>in vitro</i>)
	Clariscan®	GE Healthcare	20 nm	$r_1 = 20$ $r_2 = 35$ (0,47 T)	Agent intravasculaire
	Ferumoxytol	AMAG pharmaceuticals	30 nm	$r_1 = 15$ $r_2 = 89$	Agent intravasculaire, activité des macrophages (<i>in vivo</i>)
SPIO					
	Endorem® Feridex®	Guerbet AMAG pharmaceuticals	80 – 180 nm	$r_1 = 9,95$ $r_2 = 158$	Foie, rate, moelle osseuse marquage cellulaire (<i>in vitro</i>)
	Resovist®	Bayer Schering Pharma AG	62 nm	$r_1 = 9,7$ $r_2 = 189$	Foie, rate, MRA, marquage cellulaire (<i>in vitro</i>)
MPIO					
	Lumirem® Gastromark®	Guerbet AMAG pharmaceuticals	300 nm	$r_1 = /$ $r_2 = /$	Voie digestive
	Abdoscan®	GE Healthcare	3500 nm	$r_1 = /$ $r_2 = /$	Voie digestive

Tableau 12: Liste des agents de contraste T_2 commerciaux

C. Les agents CEST

L'effet CEST ou Chemical Exchange Saturation Transfert a été introduit dans les années 2000 par Balaban et Ward et amène ainsi une technique supplémentaire pour améliorer le contraste d'une image IRM.^[62] Il correspond à une diminution du signal, émis par les protons de l'eau de l'organisme, qui survient suite à une saturation sélective de protons échangeables de l'agent de contraste CEST (Figure 20).^[8,63,64] Cette saturation est engendrée par une onde de radiofréquence (RF) à une fréquence donnée.

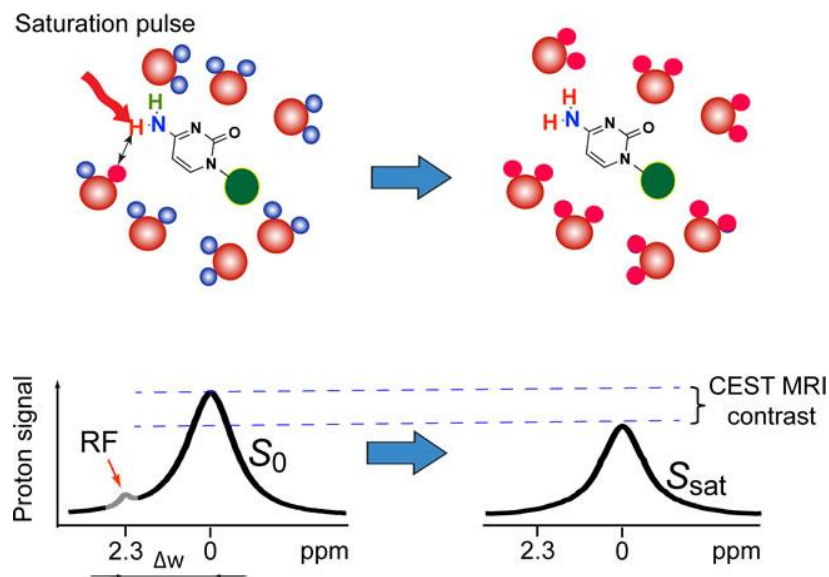


Figure 20 : Description du principe de l'effet CEST ^[65]

Par exemple, l'agent CEST dérivé de cytosine, possède deux protons labiles, c'est-à-dire échangeables, sur l'amine primaire (Figure 20). A t_0 , les protons de l'eau possèdent un signal RMN avec une certaine intensité S_0 , à une fréquence ou déplacement chimique, ramené à 0 ppm pour l'exemple. Il en est de même pour l'agent CEST à 2,3 ppm. Cette différence de fréquence est notée $\Delta\omega$ (rad.s⁻¹) et doit être suffisamment grande pour que les signaux ne se chevauchent pas. Les protons labiles de l'agent CEST et de l'eau de l'organisme vont alors s'échanger à une certaine vitesse k_{CEST} .

Dans un premier temps, une onde de radiofréquence (ou impulsion de saturation), avec une amplitude B_2 , est envoyée à la fréquence de résonance de l'agent CEST, ω_{CEST} , sous la condition que la vitesse d'échange des protons soit relativement lente : $\Delta\omega > k_{\text{CEST}}$. Cette irradiation va entraîner une disparition du signal CEST et une diminution de l'intensité du signal de l'eau S_{sat} .

due au transfert de saturation de l'agent CEST vers l'eau. On assimile donc ces agents CEST à des agents négatifs comme les agents T_2 .

L'effet des agents CEST est fonction de leur capacité à améliorer le contraste des images. Celui-ci est mesuré en pourcentage du transfert de saturation (%TS) et dépend de nombreux facteurs tels que le pH, la température, le champ magnétique, k_{CEST} , $\Delta\omega$, le nombre de protons labiles, etc. Cette catégorie d'agents de contraste peut se diviser en deux sous-parties déterminées en fonction de leur magnétisation : les diamagnétiques CEST et les paramagnétiques CEST.^[8,66] Le Tableau 13 décrit et illustre les différentes catégories d'agents CEST existantes.

Le Iopamidol® (Tableau 13) est un produit commercialisé depuis 1981 en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie par rayons X. Sa structure possède un grand nombre de protons labiles (OH et NH) qui en font un très bon candidat pour l'imagerie CEST.^[67] Aime *et al.* ont, de ce fait, mis en avant l'intérêt de cette molécule dans le cadre de cartographies du pH par imagerie CEST.^[68] Le produit ayant déjà obtenu les autorisations de mise sur le marché, ceci a facilité l'approbation pour une utilisation clinique en IRM-CEST, ouvrant la porte au développement de futurs agents CEST.^[8] L'utilisation de ces agents est, en règle générale, focalisée sur l'imagerie moléculaire plutôt que sur l'amélioration du contraste globale de l'image IRM. On reviendra donc sur certains de ces agents dans le paragraphe qui couvrira cet aspect. Cependant, il est à noter que le plus grand avantage de l'imagerie CEST réside en la possibilité d'obtenir un signal « on/off » en choisissant d'appliquer l'impulsion de saturation ou non. Il est ainsi possible d'injecter plusieurs agents CEST et d'observer une sélectivité d'un agent par rapport aux autres en fonction de la radiofréquence choisie.

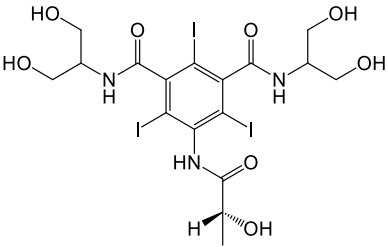
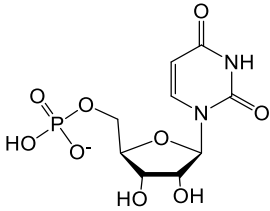
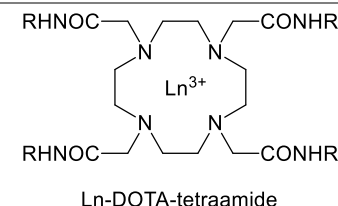
Types	Descriptions	Exemples
Diamagnétique CEST (DiaCEST)		
Petites molécules	- Petites molécules organiques avec un ou plusieurs protons labiles : amine, amide, thiol, alcool... $\Delta\omega$ faible k_{CEST} lent - Concentration élevée pour obtenir une sensibilité encore trop faible : 1 à 10 mM	 Iopamidol Iopamidol : petite molécule diamagnétique utilisée usuellement pour des CT-scans mais testée et efficace pour de l'imagerie CEST : $\Delta\omega = 5$ ppm, [Iopamidol] = 7 μM, $B_2 = 12,4$ μT^[67]
Macromolécules	- Nombre de protons labiles possédant le même $\Delta\omega$ considérablement augmenté (polymère, dendrimère...) : améliore la sensibilité - Concentration nécessaire : μM	 Acide uridylique Poly(rU) : polymère de l'acide uridylique possédant à la fois des imines et hydroxyles détectables en CEST : $\Delta\omega = 6$ ppm, [poly(rU)] = 5 μM, effet CEST = 49%^[69]

Tableau 13 : Présentation des différents agents CEST actuellement développés

Paramagnétique CEST

ParaCEST

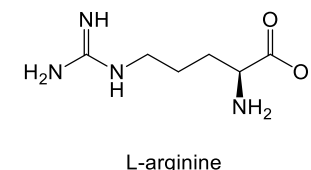
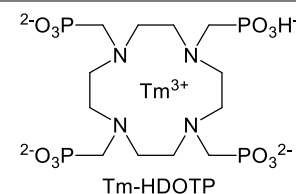
- Complexes de Lanthanide Ln(III)
- Protons labiles présents sur l'agent lui-même : soit par les molécules d'eau directement coordonnées au Ln(III) soit sur le ligand
- $\Delta\omega$: souvent aux alentours de 100 ppm et dépendant du Lanthanide choisi
- k_{CEST} plus rapide dans la limite où $k_{\text{CEST}} < \Delta\omega$ ^[70]



Structure générale de complexe de Ln(III) ayant de bon effet CEST. Exemple avec R = H et Ln = Eu : $\Delta\omega = 50$ ppm, [Eu] = 63 mM, effet CEST = 57%^[71]

SupraCEST

- Adduits supramoléculaires non-covalents entre l'agent paramagnétique, ne possédant pas de site CEST, et un substrat, de préférence une macromolécule, agissant comme donneur de protons labiles^[72]
- Grand nombre de protons labiles : améliore la sensibilité



Système supramoléculaire constitué de poly-L-arginine et du complexe de Thulium dans un ratio de 1 : 18 présentant des propriétés CEST intéressantes : $\Delta\omega = 25$ ppm, [poly-L-arginine] = 1,7 mM, [[Tm(Hdotp)]⁴⁻] = 30 mM, $B_2 = 25$ μ T, effet CEST = 5 %

LipoCEST

- Nanoparticules constituées de complexes de lanthanide encapsulés par des liposomes
- Très grand nombre de protons labiles
- Importance de la taille pour la biodistribution et le k_{cest} : plus le liposome est grand plus k_{cest} est lent
- $\Delta\omega = 4$ ppm max : faible

Tableau 13 (suite) : Présentation des différents agents CEST actuellement développés

D. Les agents hyperpolarisés

Les agents hyperpolarisés sont les plus sensibles des ACs. L'hyperpolarisation consiste à accentuer la valeur de la magnétisation totale M_0 (Voir Chapitre I : §1.0. p.17) et donc à augmenter la population de spins orientés dans le sens de la magnétisation. Pour ce faire, on utilise des techniques de polarisation telle que la Polarisation Dynamique Nucléaire (PDN ou DNP en anglais), le laser à pompage optique, etc. Grâce à cette technique, l'intensité du signal est augmentée jusqu'à 10 000 fois en comparaison avec l'IRM classique, ce qui engendre une diminution de la quantité d'AC à injecter.^[15,73]

Les ACs hyperpolarisés sont récents. La première image IRM utilisant du Xénon ^{129}Xe hyperpolarisé date de 1994.^[74] Depuis, d'autres agents ont été développés et la sensibilité a été augmentée. Des gaz hyperpolarisés comme l'hélium ^3He ou le ^{129}Xe sont désormais utilisés en clinique pour l'imagerie de l'appareil respiratoire.^[75] Le $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé, développé à l'Université de Californie, est actuellement en phase clinique pour le diagnostic du cancer de la prostate.^[76] De l'eau hyperpolarisée est également étudiée dans le cadre d'Angiographie par Résonance Magnétique (ARM) sur grand animal.^[77]

Les principales limites de l'IRM hyperpolarisée sont la courte durée de vie de l'hyperpolarisation des ACs, les obstacles techniques ainsi que le coût élevé. Cependant, la méthode est encore très récente et suscite de l'intérêt afin de répondre à ces challenges.

E. Les agents fluorés

Le noyau du fluor, ^{19}F , possède le spin le plus sensible après celui du proton. Il possède une abondance naturelle de 100% et un spin de $\frac{1}{2}$. Bien que l'IRM du ^1H possède de très grandes qualités, telle que la haute résolution spatiale ou bien la non utilisation de rayons ionisants, l'IRM du ^{19}F offre de nouveaux avantages.^[78-83]

Les premières molécules fluorées utilisées pour l'IRM ont été développées dès 1977 par l'équipe de Holland pour des applications quantitatives.^[84] La quantification est possible grâce à l'absence de signal intrinsèque et de par la relation linéaire entre la quantité de fluor et l'intensité du signal.

Contrairement au ^1H très fortement présent dans l'organisme, le ^{19}F est quasi-indétectable ($< 10^{-6}$ M dans le corps humain), ceci entraînant une très forte diminution de l'intensité de la ligne de base et donc à une meilleure visualisation de l'agent de contraste générant des « hot-spots » là où s'accumule le produit. En effet, dans le cas des agents de contraste fluorés, ce n'est pas l'effet de celui-ci sur son environnement qui permet la création de l'image, mais l'excitation directe des noyaux des atomes de fluor présents sur l'AC. C'est pourquoi, afin d'obtenir une sensibilité suffisante, les molécules décrites sont basées sur des structures telles que des polymères, des nanoparticules, des assemblages micellaires, etc. maximisant ainsi le nombre d'atomes de fluor (Figure 21).^[78]

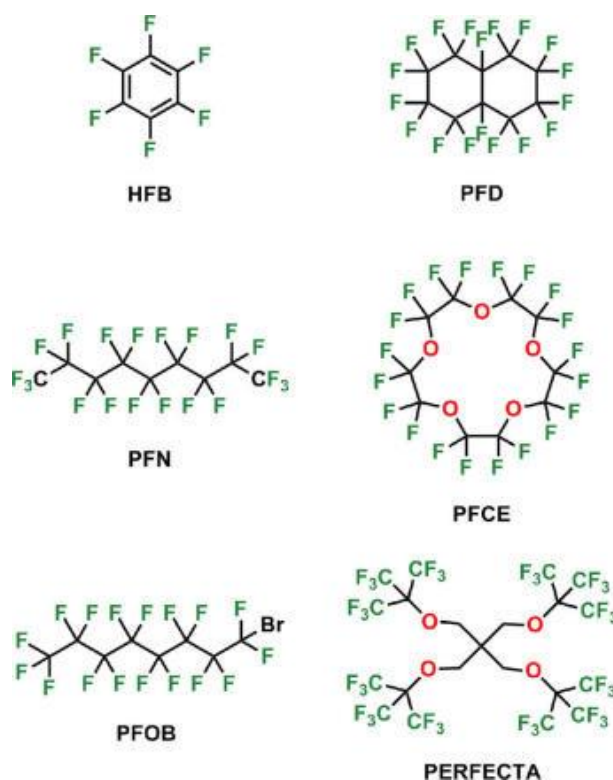


Figure 21 : Exemples de sondes fluorées pour l'IRM^[78]

La principale limitation à l'IRM du fluor est technique, car les appareils d'IRM sont quasiment tous dédiés au proton. De plus, l'objectif de l'IRM ^{19}F n'est pas de remplacer l'IRM ^1H mais d'être complémentaire. La superposition des deux images permet d'obtenir l'information anatomique reconnue de l'IRM ^1H et les « hot spots » générés par les sondes en IRM ^{19}F apportant les informations très spécifiques recherchées (Figure 22).

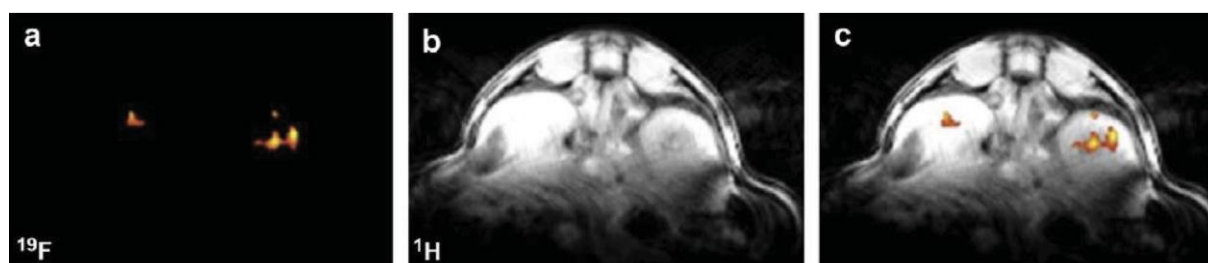


Figure 22 : IRM ^{19}F et ^1H d'un rein de souris, a) IRM ^{19}F après injection d'un agent de contraste polyfluoré, b) IRM ^1H , c) Superposition des deux images (modifiée de [85])

F. Résumé

Les avantages et les inconvénients des différents agents de contraste étudiés dans ce chapitre sont résumés dans le Tableau 14.

Types d'ACs	Avantages	Inconvénients
T₁	• Contraste positif • Grandement étudié (compréhension des mécanismes d'actions) • Large possibilité d'amélioration • Faible coût	• Toxicité du Gd libre
T₂	• Non toxique • Relaxivité élevée	• Contraste négatif • Elimination lente • Temps d'acquisition long
CEST	• Contraste on/off	• Faible sensibilité
Fluorés	• Possibilité de quantification	• Manque d'appareil dédié à l'IRM ¹⁹F
Hyperpolarisés	• Les plus sensibles	• Courte durée d'hyperpolarisation • Coût élevé • Manque d'appareil générant les gaz

Tableau 14 : Principaux avantages et inconvénients des différents types d'ACs

III. L'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire vise à détecter et suivre des processus biologiques inhérents aux cellules, tissus et organismes vivants.^[7] Des sondes moléculaires, appelées agents « intelligents », « sensibles » ou encore « activables », dont les propriétés de contraste varient en fonction d'un paramètre physico-chimique (Figure 23 - b), sont alors utilisées.^[8] En IRM, l'imagerie moléculaire s'est essentiellement développée autour des agents T_1 et CEST (Figure 23 - a) en ciblant principalement des enzymes, des modifications de pH et la présence de certains ions (Figure 23 - b).

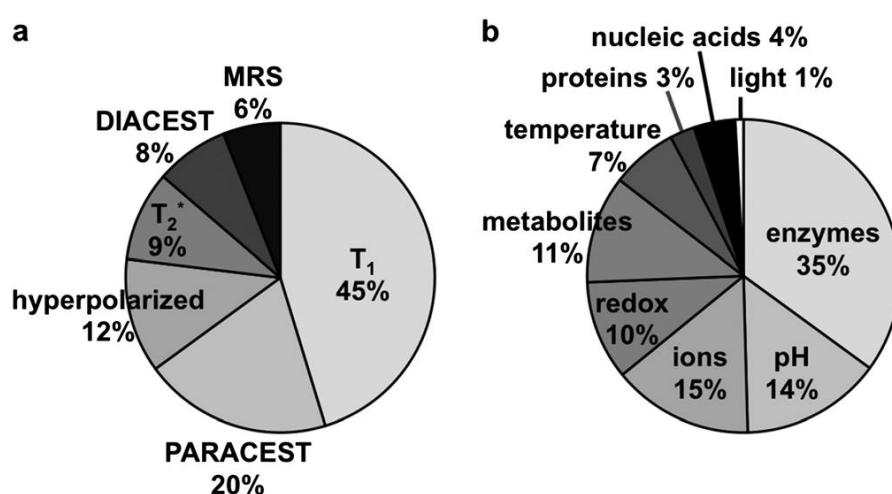


Figure 23 : Distribution des agents intelligents référencés par Pagel et al. (117 au total) sur la période 2005-2014 a) en fonction du mécanisme de détection, b) en fonction du perturbateur physico-chimique ^[15]

A. Les sondes sensibles aux enzymes

1. Basées sur des agents T_1

Wang *et al.* ont développé en 2007 un complexe de Gd(III), sensible à la β -galactosidase, le [Gd(DOTA-FPG)(H₂O)] (Figure 24).^[86] En effet, ce dérivé du DOTA possède un groupement 2-difluorométhylphényl-galactopyranoside (FPG), à la place d'une des fonctions carboxyliques qui, en présence de l'enzyme β -galactosidase, perd sa partie galactopyranose. Ceci crée un phénolate réactif qui va se lier à une protéine, entraînant une augmentation de la masse de l'agent de contraste, donc une diminution de τ_r et donc une augmentation de la relaxivité longitudinale r_1 .

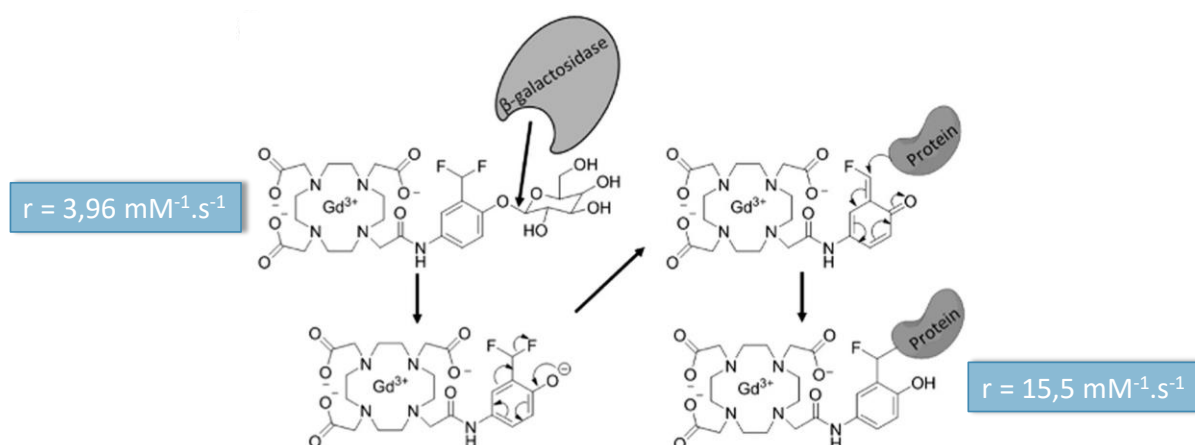


Figure 24 : Action de la β -galactosidase sur l'agent intelligent $[\text{Gd}(\text{DOTA-FPG})(\text{H}_2\text{O})]$ dont le remplacement du galactopyranose par une protéine (HSA) améliore la relaxivité (modifiée à partir de [15])

2. Basées sur des agents paraCEST

En 2008, Toth *et al.* ont, quant à eux, développé la première plateforme d'agents paraCEST visant une grande variété d'enzymes (Figure 25).^[87] Le complexe de lanthanide est relié au substrat de l'enzyme convoité par un bras auto-immolable. Ainsi, après clivage enzymatique, le bras espaceur s'auto-élimine, modifie l'environnement du chélate et engendre un effet CEST.

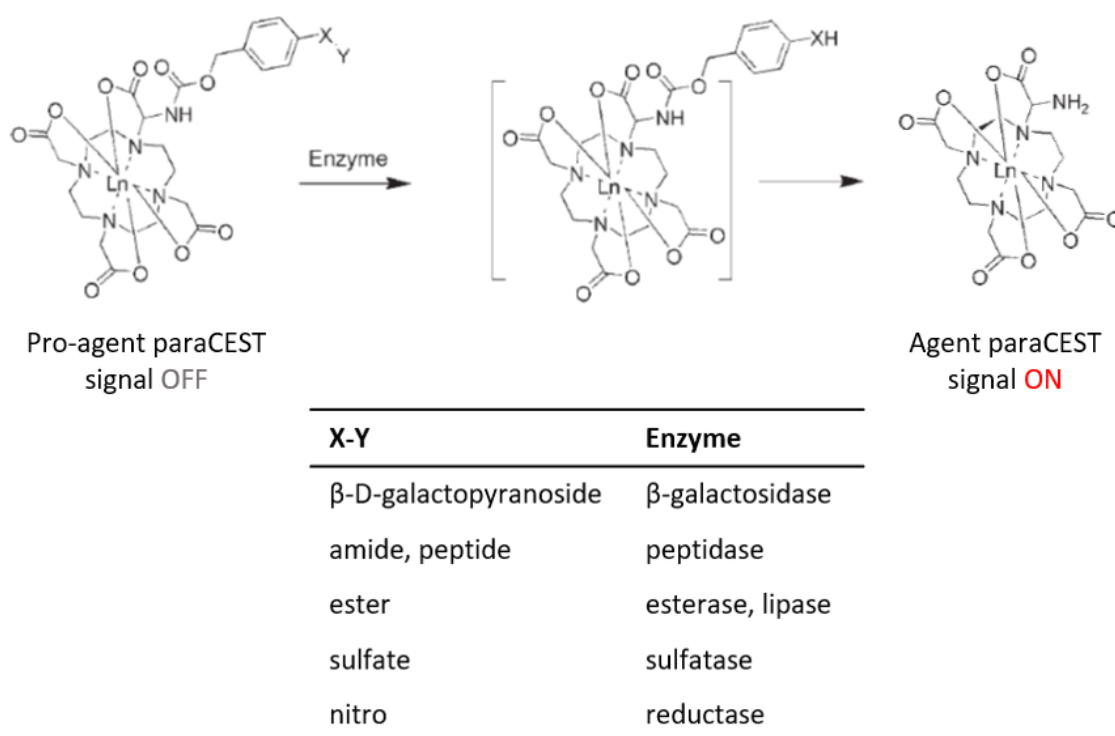
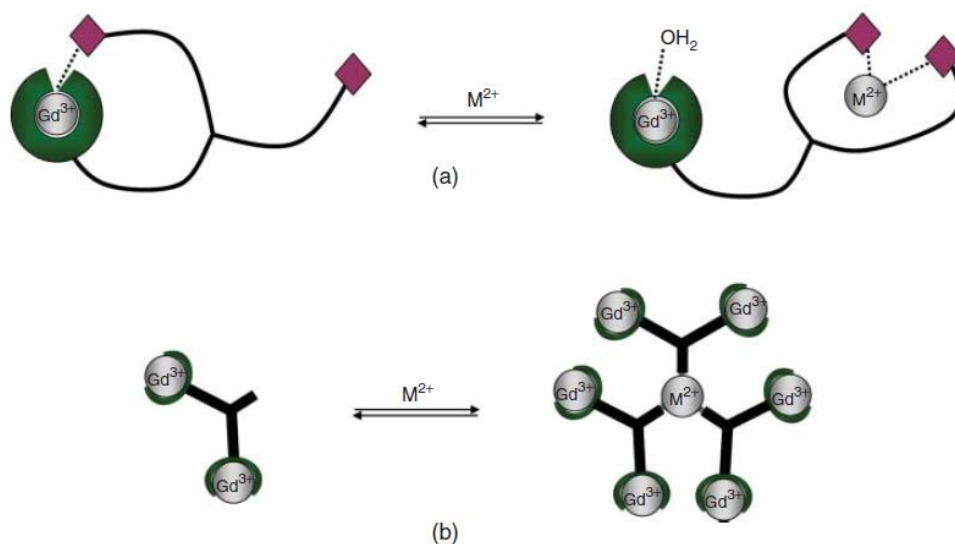


Figure 25 : Plateforme d'agents paraCEST pouvant viser différentes enzymes (modifiée de [87])

B. Les sondes sensibles aux cations

Les cations tels que le calcium, le zinc, le cuivre et le fer ont des rôles primordiaux dans les mécanismes biologiques et leur mauvaise régulation est directement liée à certaines pathologies comme des cancers ou des maladies neurodégénératives. C'est pourquoi, des sondes spécifiques à ces cations ont été développées afin de les détecter et de les quantifier. La plupart sont des complexes de Gd(III) pour lesquels deux stratégies de modification de relaxivité ont été mises en place (Figure 26) : soit par changement du nombre d'hydratation q du complexe, soit par augmentation de la taille du complexe et donc du temps de corrélation rotationnel τ_r .



**Figure 26 : Stratégie de modification de la relaxivité des complexes de Gd(III) par :
(a) changement de q , (b) variation de τ_r .^[8]**

Les tableaux suivants présentent différents exemples de sondes spécifiques aux cations Zn^{2+} (Tableau 15), Cu^+ et Cu^{2+} (Tableau 16) et Ca^{2+} (Tableau 17).

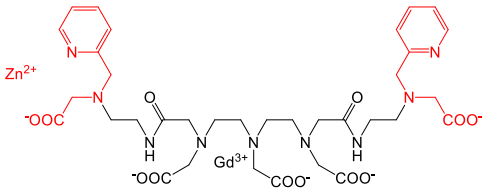
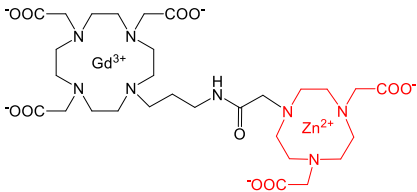
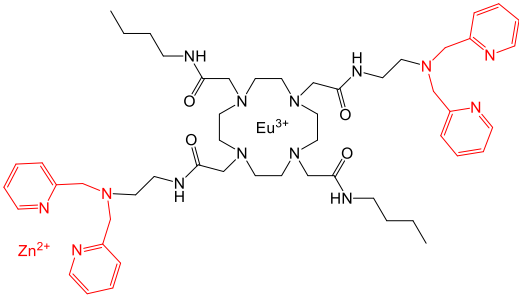
Métal	Rôle du métal dans l'organisme	Exemples de sondes	Commentaires
Zinc	2^{ème} métal de transition le plus abondant dans le corps humain - Impliqué dans les maladies d'Alzheimer et Parkinson		- Agent T₁ - Squelette : DTPA Ligand du zinc : dérivé du DPA sélectif par rapport aux ions Ca²⁺ et Mg²⁺ - Détection du zinc : chute de la relaxivité de 30% - Référence : ^[88] – 2002
			- Agent T₁ - Squelette : DO3A Ligand du zinc : NO2A sélectif par rapport aux ions Ca²⁺ et Mg²⁺ - Détection du zinc : augmentation de la relaxivité jusqu'à 200% - Référence : ^[89] – 2015
			- Agent paraCEST - Squelette : dérivé du DOTA Ligand du zinc : DPA sélectif par rapport aux ions Ca²⁺ et Mg²⁺ - Détection du zinc : extinction de l'effet CEST - Pas de détection de Ca²⁺ et Mg²⁺ en CEST - Référence : ^[90] - 2005

Tableau 15 : Exemples de sondes spécifiques aux cations Zn²⁺ présents dans l'organisme

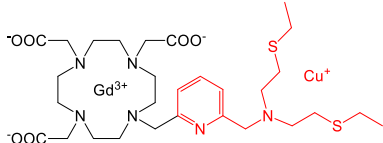
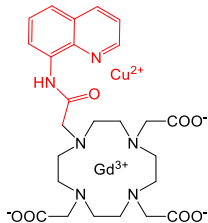
Métal	Rôle du métal dans l'organisme	Exemples de sondes	Commentaires
Cuivre	3^{ème} métal de transition le plus abondant dans le corps humain		- Agent T₁ - Squelette : DO3A - Ligand du cuivre : thioéther sélectif par rapport au Cu²⁺ et tous les autres cations - Détection du cuivre I : augmentation de la relaxivité jusqu'à 360% - Référence : ^[91] - 2009
	Impliqué dans les maladies d'Alzheimer, de Menkès et de Wilson		- Agent T₁ - Squelette : DO3A - Ligand du cuivre : 8-amidequinoléine spécifique au Cu²⁺ - Détection du cuivre II : augmentation de la relaxivité jusqu'à 71% - Référence : ^[92] - 2011

Tableau 16 : Exemples de sondes spécifiques aux cations Cu⁺ et Cu²⁺ présents dans l'organisme

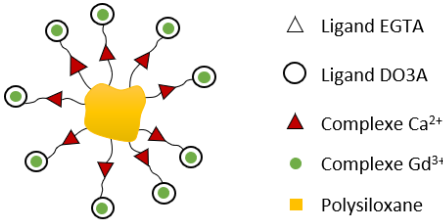
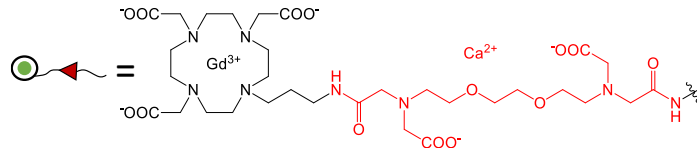
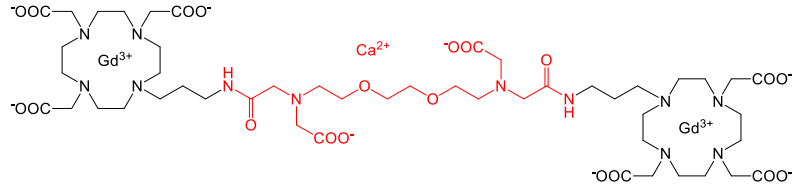
Métal	Rôle du métal dans l'organisme	Exemples de sondes	Commentaires
Calcium	Rôle physiologie et biochimique : • Transduction du signal • Neurotransmission • Co-facteur d'enzyme • Fertilisation	 $\triangle$ Ligand EGTA $\bigcirc$ Ligand DO3A $\blacktriangle$ Complexe Ca^{2+} $\bullet$ Complexe Gd^{3+} $\blacksquare$ Polysiloxane 	• Agent T_1 : ultrasmall nanoplateform • Cœur : nanoparticules de complexe de Gd sur matrice inorganique de polysiloxane • Squelette : DO3A • Ligand du calcium : EGTA • Détection du calcium : Extinction de l'effet CEST • Référence : ^[93] - 2015
			• Agent T_1 • Squelette : DO3A (x2) • Ligand du calcium : EGTA • Détection du calcium : augmentation de la relaxivité de 83% • Référence : ^[94] - 2008

Tableau 17 : Exemples de sondes spécifiques aux cations Ca^{2+} présents dans l'organisme

C. Les sondes sensibles au pH

Les variations de pH *in vivo* sont significatives pour certaines pathologies comme des maladies des reins, des cancers ou des infections. C'est pourquoi établir une cartographie du pH avec une haute résolution spatiale est utile autant pour du diagnostic que pour le suivi de maladie. Majoritairement, les sondes sensibles au pH sont soit des complexes de Gadolinium pour lesquels q , τ_r ou τ_M varient en fonction du pH, soit des agents paraCEST.

1. Basées sur des agents T_1

a. Reposant sur des variations de nombre d'hydratation « q »

Les sondes sensibles au pH en faisant varier le nombre d'hydratation utilise, entre autres, la capacité des complexes bishydratés à former des complexes ternaires en présence d'anions endogènes tels que les carbonates, citrates ou phosphates (Paragraphe I.B.1.b). Le nombre d'hydratation du complexe passe de $q = 2$ à $q = 0$ provoquant ainsi une variation de la relaxivité. C'est le cas du complexe Gd-DO3AMC (Figure 27) dont la relaxivité chute de 7,2 à 1,9 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour un pH variant de 6 à 8.^[8]

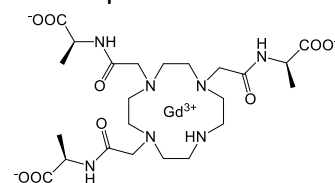


Figure 27 : Structure du Gd-DO3AMC

La sensibilité au pH peut aussi se ressentir intramoléculairement, comme pour le complexe Gd-DO3A-SA, dont l'azote du sulfonamide peut être soit protoné à pH acide, soit ligué au métal à pH basique (Figure 28). L'accès au métal par les molécules d'eau est ainsi limité par l'occupation d'un site de coordination supplémentaire, mais aussi par l'encombrement stérique. La relaxivité diminue de 5,5 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour un pH allant de 5,5 à 8,5.

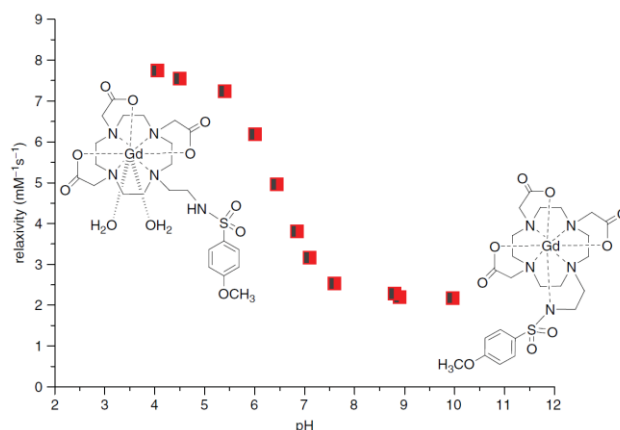


Figure 28 : Variation de la relaxivité en fonction du pH du complexe Gd-DO3A-SA^[5]

b. Basées sur des variations de temps de corrélation rotationnel τ_r

Le pH peut aussi faire varier la conformation d'une macromolécule et ainsi modifier sa vitesse de rotation comme l'ont montré Sisti *et al.* sur un polymère comportant trente unités du complexe Gd-DO3ASQ et 114 résidus d'ornithine (Figure 29).^[95] Ainsi, la relaxivité de cette macromolécule évolue de $23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour un pH inférieur à 4 jusqu'à se stabiliser à $32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ lorsque l'on dépasse un pH = 8. Cette dépendance au pH est due à la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires en fonction de la protonation des fonctions amines. En effet, à pH acide, les amines sont protonées empêchant ainsi la formation de liaisons hydrogène. Le polymère est donc dans une conformation plus linéaire qu'à pH élevé. La vitesse de rotation est alors plus rapide que dans le cas d'une conformation plus rigide et plus volumineuse et une relaxivité plus faible est donc observée à pH acide.

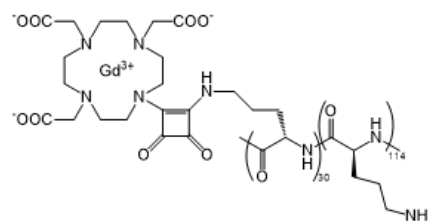


Figure 29 : Structure du (Gd-DO3ASQ)₃₀-Orn₁₁₄

2. Basées sur des agents paraCEST

La vitesse d'échange des protons, k_{ex} , des agents CEST possédant des amines est fortement dépendante du pH. En effet, à pH > 5, la catalyse basique prédomine, accélérant k_{ex} .^[7] Plusieurs exemples illustrent le phénomène comme dans cette récente étude de Sherry *et al.* où différents complexes d'Europium ont montré un effet CEST on/off en fonction du pH.^[96] Un exemple de ces complexes est présenté Figure 30 et montre qu'à pH inférieur à 5 l'effet CEST est important, mais qu'au-dessus de cette valeur, il décline jusqu'à ne plus être détectable à pH > 7.

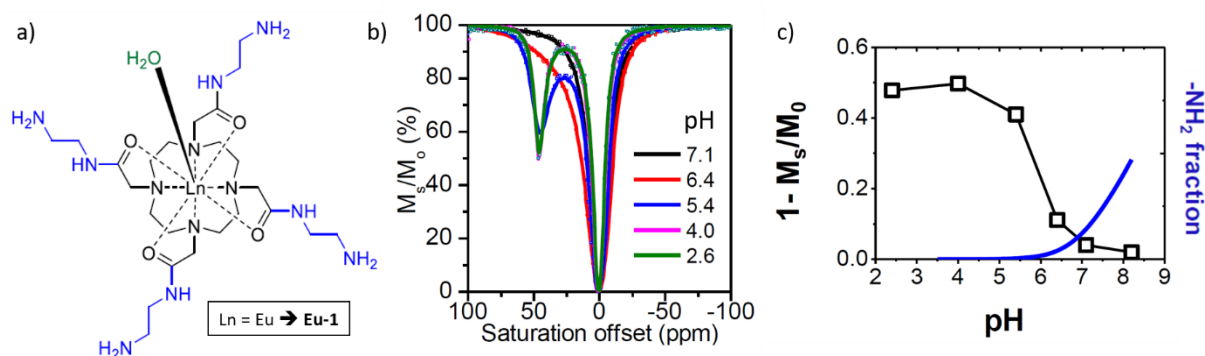


Figure 30 : a) Structure du complexe Eu-1 ; b) Spectre CEST du complexe Eu-1 à différents pH ; c) Effet CEST de Eu-1 et pourcentage d'amine déprotonée en fonction du pH (modifiée de [96])

IV. Les défis à venir

Depuis 1988, de nombreux nouveaux agents de contraste ont vu le jour, cependant, les agents T₁ à base de Gd(III) dominant toujours le marché. En effet, ces agents répondent le mieux aux attentes des radiologues grâce à leur efficacité, leur faible coût et leur facilité de mise en œuvre. D'autres agents comme les hyperpolarisés montrent des avantages qui ne peuvent être ignorés mais sont encore trop difficiles à utiliser de par le manque de moyen technique déployé. L'intérêt pour les complexes de Gd(III) est constant, mais celui pour les agents CEST est grandissant. Cette technique offre des perspectives prometteuses à conditions que la sensibilité des agents puisse être augmentée. En attendant, de nouveaux agents T₁ sont toujours recherchés avec plus d'efficacité et de stabilité.

En parallèle, l'imagerie moléculaire se développe grandement afin de rendre l'IRM plus compétitive face à des techniques d'imagerie spécifiques comme l'imagerie nucléaire. On combine ainsi les connaissances accumulées depuis des années sur les agents de contrastes avec la chimie médicinale afin de cibler et d'accroître nos connaissances sur les phénomènes biologiques présents dans l'organisme pour accéder à des diagnostics toujours plus performants, pour suivre la libération des médicaments et effectuer un suivi personnalisé des maladies.

V. Bibliographie

- [1] H. Günther, *NMR Spectroscopy: Basics Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*, Wiley-VCH, **2013**.
- [2] P. C. Lauterbur, *Nature* **1973**, 242, 190–191.
- [3] P. Mansfield, P. K. Grannell, *J Phys C Solid State Phys* **1973**, 6, L422–L426.
- [4] E. Haacke, R. W. Brown, M. R. Thompson, R. Venkatesan, *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles And Sequence Design*, John Wiley & Sons, **1999**.
- [5] R. Damadian, *Science* **1971**, 171, 1151–1153.
- [6] H. Kasban, M. A. M. El-Bendary, D. H. Salama, *Int. J. Inf. Sci. Intell. Syst.* **2015**, 4, 37–58.
- [7] N. Long, W.-T. Wong, *The Chemistry of Molecular Imaging*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [8] L. Helm, A. E. Merbach, É. Tóth, Eds. , *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, **2013**.
- [9] J.-F. Morfin, J.-C. Beloeil, E. Jakab-Toth, *Tech. Ing.* **2014**, 1–19.
- [10] I. R. Young, G. J. Clarke, D. R. Baffles, J. M. Pennock, F. H. Doyle, G. M. Bydder, *J. Comput. Tomogr.* **1981**, 5, 543–547.
- [11] D. H. Carr, J. Brown, G. M. Bydder, H.-J. Weinmann, U. Speck, D. J. Thomas, I. R. Young, *The Lancet* **1984**, 323, 484–486.
- [12] C. T. Moonen, P. van Zijl, J. A. Frank, D. L. Bihan, E. D. Becker, *Science* **1990**, 250, 53–61.
- [13] L. M. De León-Rodríguez, A. F. Martins, M. C. Pinho, N. M. Rofsky, A. D. Sherry, *J. Magn. Reson. Imaging* **2015**, 42, 545–565.
- [14] E. Terreno, S. Aime, *Front. Pharmacol.* **2015**, 6, 1–4.
- [15] D. V. Hingorani, A. S. Bernstein, M. D. Pagel, *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, 10, 245–265.
- [16] R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901–927.
- [17] N. Grenier, P. Brader, *Pediatr. Radiol.* **2011**, 41, 144–160.
- [18] R. Weissleder, *Molecular Imaging: Principles and Practice*, PMPH-USA, **2010**.
- [19] D. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, G. M. Lanza, *Tetrahedron* **2011**, 67, 8431–8444.
- [20] M. Rogosnitzky, S. Branch, *BioMetals* **2016**, 29, 365–376.
- [21] M. Port, J.-M. Idée, C. Medina, C. Robic, M. Sabatou, C. Corot, *BioMetals* **2008**, 21, 469–490.
- [22] T. Grobner, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, 21, 1104–1108.
- [23] B. B. Zobel, C. C. Quattrocchi, Y. Errante, R. F. Grasso, *Radiol. Med. (Torino)* **2016**, 121, 478–481.
- [24] A. E. Merbach, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons Inc, **2001**.
- [25] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293–2352.
- [26] É. Tóth, L. Helm, A. E. Merbach, in *Ref. Module Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*, Elsevier, **2015**.
- [27] J.-M. Idée, **2014**.
- [28] T. Frenzel, P. Lengsfeld, H. Schirmer, J. Hütter, H.-J. Weinmann, *Invest. Radiol.* **2008**, 43, 817–828.
- [29] M. Botta, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2000, 399–407.
- [30] S. Aime, M. Botta, E. Terreno, in *Adv. Inorg. Chem.*, Academic Press, **2005**, pp. 173–237.
- [31] M. Botta, S. Aime, A. Barge, G. Bobba, R. S. Dickins, D. Parker, E. Terreno, *Chem. – Eur. J.* **2003**, 9, 2102–2109.

- [32] S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. B. Giovenzana, G. Jommi, R. Pagliarin, M. Sisti, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 0, 1885–1886.
- [33] L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Villette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud, É. Tóth, *Chem. Commun.* **2008**, 0, 6591–6593.
- [34] C. S. Bonnet, S. Laine, F. Buron, G. Tircsó, A. Pallier, L. Helm, F. Suzenet, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 5991–6003.
- [35] J. Xu, S. J. Franklin, D. W. Whisenhunt, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7245–7246.
- [36] E. J. Werner, A. Datta, C. J. Jocher, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8568–8580.
- [37] A. Datta, K. N. Raymond, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 938–947.
- [38] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2008**, 3027–3047.
- [39] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano, M. Sisti, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 7588–7590.
- [40] M. K. Thompson, M. Botta, G. Nicolle, L. Helm, S. Aime, A. E. Merbach, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14274–14275.
- [41] J. P. André, H. R. Maেকে, É. Tóth, A. A. Merbach, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, 4, 341–347.
- [42] S. Laus, R. Ruloff, É. Tóth, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3555–3566.
- [43] S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, E. Terreno, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36, S200–S208.
- [44] E. Balogh, M. Mato-Iglesias, C. Platas-Iglesias, É. Tóth, K. Djanashvili, J. A. Peters, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 8719–8728.
- [45] D. A. Fulton, E. M. Elemento, S. Aime, L. Chaabane, M. Botta, D. Parker, *Chem. Commun.* **2006**, 0, 1064–1066.
- [46] D. A. Fulton, M. O'Halloran, D. Parker, K. Senanayake, M. Botta, S. Aime, *Chem. Commun.* **2005**, 0, 474–476.
- [47] V. S. Vexler, O. Clément, H. Schmitt-Willich, R. C. Brasch, *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, 4, 381–388.
- [48] C. Kojima, B. Turkbey, M. Ogawa, M. Bernardo, C. A. S. Regino, L. H. Bryant, P. L. Choyke, K. Kono, H. Kobayashi, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, 7, 1001–1008.
- [49] Z. Kotková, J. Kotek, D. Jiráček, P. Jendelová, V. Herynek, Z. Berková, P. Hermann, I. Lukeš, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 10094–10102.
- [50] K. W.-Y. Chan, W.-T. Wong, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 2428–2451.
- [51] A. Forgács, G. B. Giovenzana, M. Botta, E. Brücher, I. Tóth, Z. Baranyai, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2074–2086.
- [52] Q. L. Vuong, P. Gillis, A. Roch, Y. Gossuin, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**.
- [53] S. Laurent, S. Boutry, I. Mahieu, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 4712–4727.
- [54] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064–2110.
- [55] D. L. J. Thorek, A. K. Chen, J. Czupryna, A. Tsourkas, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, 34, 23–38.
- [56] C. F. G. C. Geraldes, S. Laurent, *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, 4, 1–23.
- [57] Y.-X. J. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *Eur. Radiol.* **2001**, 11, 2319–2331.
- [58] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, M. Port, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, 58, 1471–1504.
- [59] Z. Shen, A. Wu, X. Chen, *Mol. Pharm.* **2017**, 14, 1352–1364.
- [60] Y.-X. J. Wang, *World J. Gastroenterol.* **2015**, 21, 13400–13402.

- [61] L. Zeng, W. Ren, J. Zheng, P. Cui, A. Wu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 2631–2636.
- [62] K. M. Ward, A. H. Aletras, R. S. Balaban, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 79–87.
- [63] P. C. M. van Zijl, N. N. Yadav, *Magn. Reson. Med.* **2011**, *65*, 927–948.
- [64] E. Vinogradov, A. D. Sherry, R. E. Lenkinski, *J. Magn. Reson.* **2013**, *229*, 155–172.
- [65] Y. Li, H. Chen, J. Xu, N. N. Yadav, K. W. Y. Chan, L. Luo, M. T. McMahon, B. Vogelstein, P. C. M. van Zijl, S. Zhou, et al., *Oncotarget* **2016**, *7*, 6369–6378.
- [66] E. Terreno, D. D. Castelli, S. Aime, *Contrast Media Mol. Imaging* **2010**, *5*, 78–98.
- [67] S. Aime, L. Calabi, L. Biondi, M. De Miranda, S. Ghelli, L. Paelari, C. Rebaudengo, E. Terreno, *Magn. Reson. Med.* **2005**, *53*, 830–834.
- [68] D. L. Longo, W. Dastrù, G. Digilio, J. Keupp, S. Langereis, S. Lanzardo, S. Prestigio, O. Steinbach, E. Terreno, F. Uggeri, et al., *Magn. Reson. Med.* **2011**, *65*, 202–211.
- [69] K. Snoussi, J. W. M. Bulte, M. Guéron, P. C. M. van Zijl, *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 998–1005.
- [70] O. M. Evbuomwan, E. Terreno, S. Aime, A. D. Sherry, in *Chem. Mol. Imaging*, John Wiley & Sons, Inc, **2014**, pp. 225–243.
- [71] M. Woods, D. E. Woessner, A. D. Sherry, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 500–511.
- [72] S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4527–4529.
- [73] J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 10158–10163.
- [74] M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer, A. Wishnia, *Nature* **1994**, *370*, 199–201.
- [75] Z. Liu, T. Araki, Y. Okajima, M. Albert, H. Hatabu, *Eur. J. Radiol.* **2014**, *83*, 1282–1291.
- [76] S. J. Nelson, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, P. E. Z. Larson, A. L. Harzstark, M. Ferrone, M. van Criekinge, J. W. Chang, R. Bok, I. Park, et al., *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*.
- [77] K. Wigh Lipsø, E. S. S. Hansen, R. S. Tougaard, C. Laustsen, J. H. Ardenkjær-Larsen, *Magn. Reson. Med.* **2017**, *78*, 1131–1135.
- [78] I. Tirotta, V. Dichiarante, C. Pigliacelli, G. Cavallo, G. Terraneo, F. B. Bombelli, P. Metrangolo, G. Resnati, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1106–1129.
- [79] J. C. Knight, P. G. Edwards, S. J. Paisey, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 1415–1425.
- [80] Q. Peng, Y. Yuan, H. Zhang, S. Bo, Y. Li, S. Chen, Z. Yang, X. Zhou, Z.-X. Jiang, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 6441–6446.
- [81] T. Lammers, M. E. Mertens, P. Schuster, K. Rahimi, Y. Shi, V. Schulz, A. J. C. Kuehne, S. Jockenhoevel, F. Kiessling, *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 2669–2671.
- [82] C. Zhang, S. S. Moonshi, Y. Han, S. Puttick, H. Peng, B. J. A. Magoling, J. C. Reid, S. Bernardi, D. J. Searles, P. Král, et al., *Macromolecules* **2017**, *50*, 5953–5963.
- [83] J. Yu, V. D. Kodibagkar, W. C. and R. P. Mason, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 819–848.
- [84] G. N. Holland, P. A. Bottomley, W. S. Hinshaw, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 133–136.
- [85] J. M. Criscione, B. L. Le, E. Stern, M. Brennan, C. Rahner, X. Papademetris, T. M. Fahmy, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3946–3955.
- [86] Y.-T. Chang, C.-M. Cheng, Y.-Z. Su, W.-T. Lee, J.-S. Hsu, G.-C. Liu, T.-L. Cheng, Y.-M. Wang, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1716–1727.
- [87] T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B.-T. Doan, F. Noury, B. Badet, J.-C. Beloeil, É. Tóth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4370–4372.
- [88] K. Hanaoka, K. Kikuchi, Y. Urano, M. Narazaki, T. Yokawa, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1027–1032.
- [89] M. Regueiro-Figueroa, S. Gündüz, V. Patinec, N. K. Logothetis, D. Esteban-Gómez, R. Tripiet, G. Angelovski, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 10342–10350.

- [90] R. Trokowski, J. Ren, F. K. Kálmán, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6920–6923.
- [91] E. L. Que, E. Gianolio, S. L. Baker, A. P. Wong, S. Aime, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8527–8536.
- [92] W.-S. Li, J. Luo, Z.-N. Chen, *Dalton Trans.* **2010**, *40*, 484–488.
- [93] A. Moussaron, S. Vibhute, A. Bianchi, S. Gündüz, S. Kotb, L. Sancey, V. Motto-Ros, S. Rizzitelli, Y. Crémillieux, F. Lux, et al., *Small* **2015**, *11*, 4900–4909.
- [94] G. Angelovski, P. Fouskova, I. Mamedov, S. Canals, E. Toth, N. K. Logothetis, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1729–1734.
- [95] S. Aime, S. G. Crich, M. Botta, G. Giovenzana, G. Palmisano, M. Sisti, *Chem. Commun.* **1999**, 1577–1578.
- [96] L. Zhang, A. F. Martins, P. Zhao, Y. Wu, G. Tircso, D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16626–16630.

Chapitre II : Les cyclodextrines (CDs)

L'un des paramètres à moduler afin d'améliorer l'efficacité des agents de contraste pour l'IRM est l'augmentation du temps de corrélation rotationnel τ_r des complexes de Gd(III) en augmentant leur poids moléculaire. Dans cette optique, de nouveaux ACs utilisant des protéines, des dendrimères mais aussi des cyclodextrines (CD) ont été utilisées comme plateformes hautement modulables.

I. Des structures à fort potentiel

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités glucopyranosiques liés par des liaisons α -(1,4) (Figure 31). La dégradation enzymatique de l'amidon par une glycosyltransférase entraîne la formation de trois cyclodextrines différenciées notamment par la taille de cycle : l' α -CD comportant 6 unités glucopyranosique, la β -CD avec 7 unités et la γ -CD avec 8 unités (Figure 31).

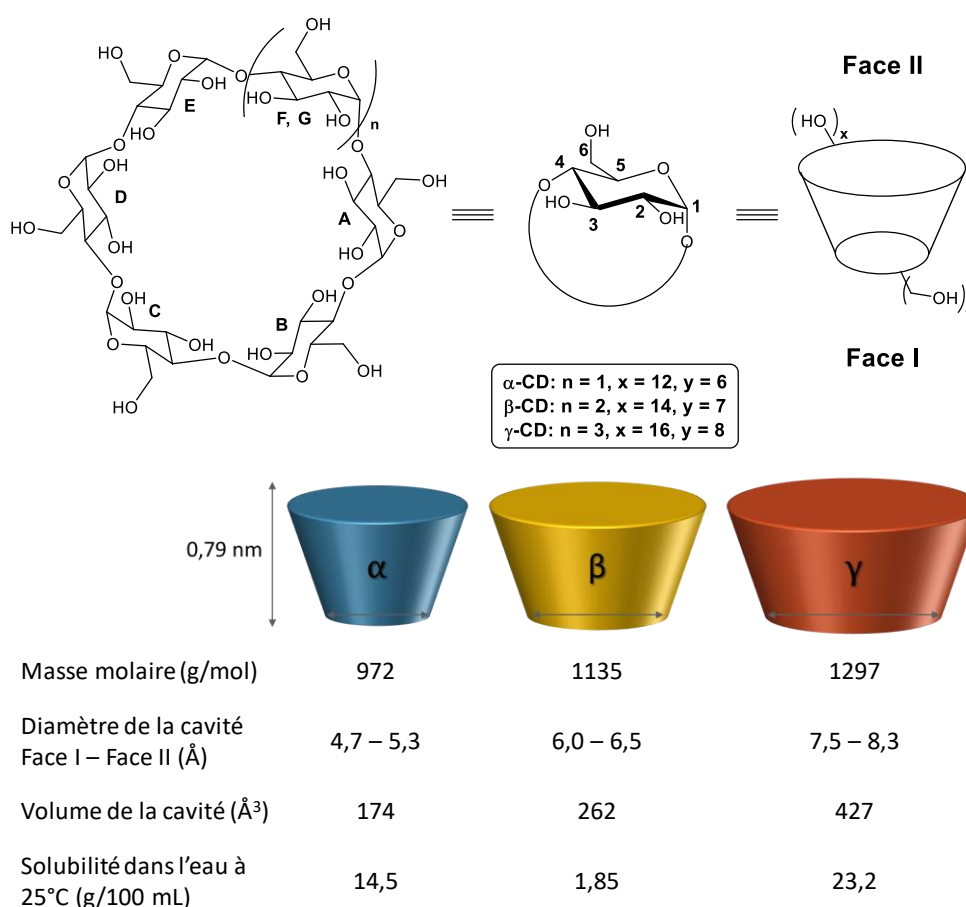


Figure 31 : Description des trois principales cyclodextrines natives : structures, différentes représentations schématiques, numérotation des positions et caractéristiques physico-chimiques

Il fallut près de 50 ans entre leur découverte et l'élucidation de leur structure. En 1891, Villers isole pour la première fois deux produits cristallins issus de la digestion de l'amidon par la bactérie *Bacillus amylobacter* et qui ne ressemblaient à aucune autre dextrine connue à l'époque.^[97] Ce n'est qu'en 1936^[98]-1942^[99] que les structures des α - et β -CDs furent élucidées par diffraction des rayons-X, suivie par la découverte de la γ -CD en 1948-50. Une première revue est apparue sur le sujet en 1957 et depuis, l'attractivité des cyclodextrines n'a cessé de croître (Figure 32).^[100]

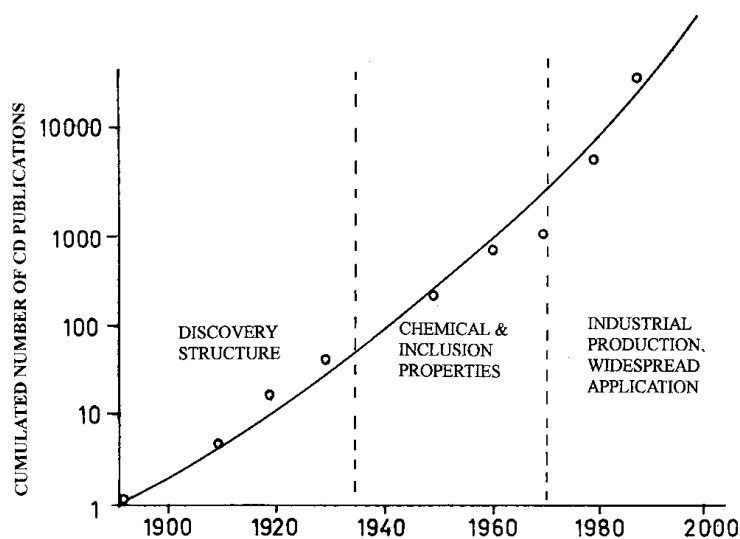
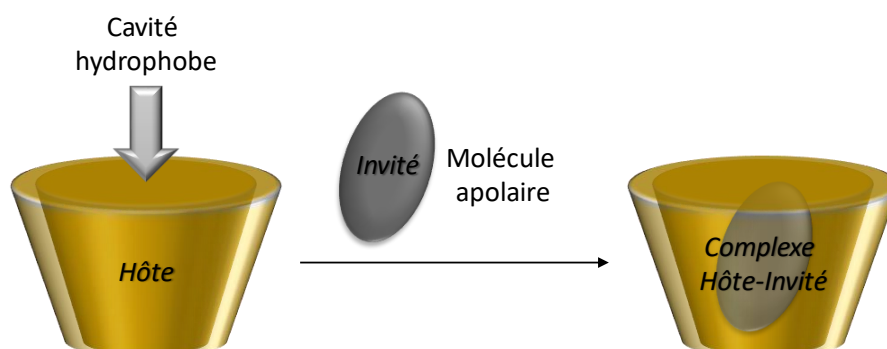


Figure 32 : Principales étapes du développement de la technologie des cyclodextrines et évolution du nombre de publications cumulé portant sur les cyclodextrines, de leur découverte jusqu'aux années 2000.^[98]

II. Les caractéristiques physico-chimiques

La structure des cyclodextrines, dites natives, c'est à dire entièrement hydroxylées, s'assimile à un cône tronqué (Figure 31) avec une plus petite face appelée face primaire (Face I) et une deuxième face, plus grande, appelée face secondaire (Face II). Les unités glucopyranosiques s'enchaînent de telle sorte que les hydroxyles primaires en position 6 (OH-6) forment la face I et que les hydroxyles secondaires en position 2 et 3 (OH-2 et OH-3) forment la face II.^[98] De plus, les atomes d'hydrogènes H-3 et H-5, ainsi que les doublets électroniques des atomes d'oxygènes des liaisons glycosidiques sont positionnés vers l'intérieur de la cavité lui conférant des propriétés hydrophobes tandis que la surface extérieure est, quant à elle, hydrophile.^[101] Cette différence a pour conséquence, d'une part, de rendre les CDs solubles dans les solvants polaires et d'autre part, de leur donner la capacité d'accueillir des molécules apolaires dans leur cavité (Figure 33).



**Figure 33 : Inclusion d'une molécule apolaire dans la cavité hydrophobe de la CD
Formation du complexe Hôte-Invité**

Aussi, les hydroxyles OH-2 et OH-3 de deux unités glucopyranosiques adjacentes ont la capacité de former des liaisons hydrogènes (Figure 34), modulant ainsi la rigidité des structures et la solubilité dans l'eau des trois cyclodextrines.^[102]

En effet, pour la β -CD, tous les OH-2 et OH-3 forment des liaisons hydrogènes entre eux, soit 7 au total, entraînant ainsi une forte rigidité et une plus faible solubilité dans l'eau de $18,5 \text{ g.L}^{-1}$. Pour l' α -CD, de par la distorsion d'une des unités glucopyranosiques, les hydroxyles secondaires ne forment au maximum que 4 liaisons hydrogène contre 6 théoriquement possibles, augmentant alors la solubilité de l' α -CD native à 145 g.L^{-1} . La γ -CD étant la plus grande et donc la plus flexible des cyclodextrines, sa structure ne favorise pas les interactions intramoléculaires entre les hydroxyles. Elle possède ainsi la plus forte solubilité dans l'eau s'élevant à 232 g.L^{-1} .

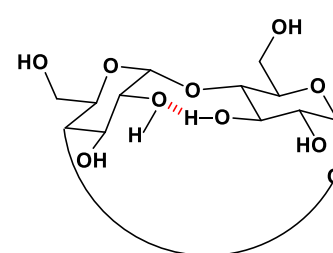


Figure 34 : Liaisons hydrogènes intramoléculaires entre les hydroxyles OH-2 et OH-3 sur la face II des CDs

Ainsi, les meilleurs solvants seront des solvants très polaires et aprotiques tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diméthylformamide (DMF) ou encore la pyridine utilisant principalement les interactions dipôle-dipôle plutôt que les liaisons hydrogène pour solubiliser les cyclodextrines (Tableau 18).^[103]

Cependant, pour favoriser la formation de complexe d'inclusion, l'utilisation de l'eau comme solvant sera privilégiée afin de forcer la molécule invitée apolaire à pénétrer dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine.

Solvant	Solubilité de la β -CD à 25°C (g/100 mL)	
Polaire aprotique	DMSO	41
	DMF	28,3
	Pyridine	3,5
Polaire protique	Eau	1,8
	Alcool	0

Tableau 18 : Solubilité de la β -CD en fonction de la nature des solvants

La hauteur du cône de 0,79 nm est fixée par l'unité glucopyranosique. Elle est donc identique quel que soit la taille du cycle, tandis que le diamètre interne de la cavité augmente de 0,49 nm pour l' α -CD à 0,62 nm pour la β -CD et 0,79 nm pour la γ -CD.

A. La réactivité

L'ensemble de ces caractéristiques confère aux trois types d'hydroxyles (OH-2, OH-3 et OH-6) des réactivités différentes qui vont permettre des modifications chimiques régiosélectives et ainsi enrichir les possibilités de fonctionnalisation du macrocycle (Figure 35).^[102]

- Les hydroxyles OH-6 :** Les hydroxyles primaires en position 6 sont les moins encombrés, les plus basiques et les plus nucléophiles. Ils réagissent ainsi plus facilement que les hydroxyles secondaires avec des réactifs électrophiles, même stériquement encombrés. L'utilisation d'une base faible (pyridine, imidazole, etc.) est suffisante pour les déprotoner et permet ainsi d'être sélectif sur cette position.
- Les hydroxyles OH-2 :** La liaison hydrogène existante avec les OH-3 voisins (Figure 34) et l'effet électroattracteur de la fonction acétale anomérique voisine rendent les hydroxyles secondaires en position 2 plus acides. Des conditions anhydre et basique (NaH) permettent ainsi une régiosélectivité sur cette position.

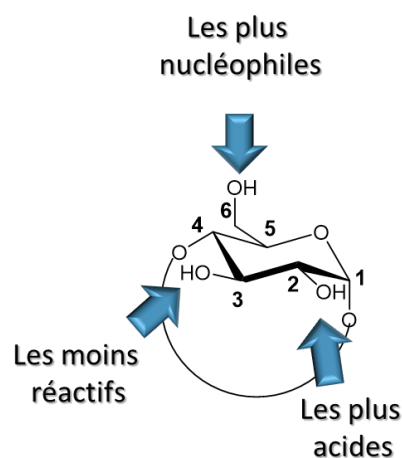


Figure 35 : Réactivités des différents hydroxyles de la CD

- **Les hydroxyles OH-3** : Ces derniers hydroxyles secondaires en position 3 sont les moins accessibles et donc les moins réactifs demandant ainsi la protection préalable des autres positions avant de pouvoir les régiofonctionnaliser.

En règle générale, des conditions trop basiques ou l'utilisation d'un électrophile trop puissant nuira à toute sélectivité.

B. Domaines d'intérêts

La capacité des CDs (hôte) à former des complexes d'inclusion hôte-invité est exploitée dans la majorité des applications industrielles. Elles sont utilisées comme :

- Agents solubilisants dans la formulation de médicaments ou vecteurs de principes actifs pour des applications pharmaceutiques^[104]
- Stabilisateurs ou conservateurs de goût dans le domaine de l'agroalimentaire et des cosmétiques^[105]
- Phases stationnaires pour colonne chromatographique pour des séparations chirales^[106]

Afin d'élargir le panel d'applications des CDs natives, des modifications structurales ont été mises au point. La diversité fonctionnelle ainsi apportée a permis d'améliorer les propriétés physico-chimiques de ces supramolécules telles que la solubilité ou bien la stabilité des complexes d'inclusion formés avec une molécule hôte, etc.^[99]

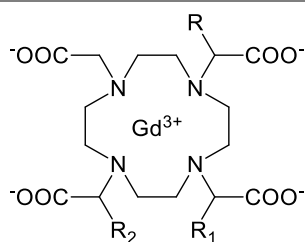
III. Les agents de contraste pour l'IRM à base de cyclodextrine

Les propriétés des cyclodextrines ont été exploitées pour élaborer de nouveaux agents de contraste T_1 pour l'IRM. Comme évoqué dans le chapitre précédent, les CDs apportent, de par leur taille, une augmentation du poids moléculaire globale du complexe de Gd(III) et influencent ainsi positivement la relaxivité en augmentant τ_R . Les CDs ont été utilisées de deux manières : soit en formant des complexes hôte-invité avec un ou plusieurs chélates de Gd(III) soit en greffant des ligands du Gd(III) par liaisons covalentes sur la CD.

A. Les ACs développés à base de CDs

Complexes hôte-invité

En 1991, l'équipe du professeur Aime s'est inspiré des travaux de Lauffer *et al.* qui ont observé l'augmentation du temps de corrélation τ_r et de la relaxivité r_1 , de complexes métalliques liés de manière covalente^[107] ou non^[108] à des protéines. Aime *et al.* ont ainsi élaboré des complexes d'inclusion entre des chélates de Gd(III) connus pour leur efficacité tels que le DOTA-Gd et DTPA-Gd, et la β -CD qui est utilisée ici comme macromolécule hôte dans le but de diminuer le τ_r du complexe et donc d'améliorer la relaxivité des ACs.^[109] L'inclusion dans la β -CD se fait grâce aux groupements hydrophobes benzyloxyméthyle ($-\text{CH}_2\text{OBn} = \text{BOM}$) insérés en α des carboxylates du DOTA qui permettent la formation des complexes métalliques $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_{1-3})(\text{H}_2\text{O})]^-$ (Tableau 19).



	Fonctionnalisation			Relaxivité 20 MHz – 25°C (mM ⁻¹ s ⁻¹)		Temps de corrélation rotationnel (ps)	
				r_1 sans β -CD	r_1 avec β -CD	τ_r sans β -CD	τ_r avec β -CD
	R	R ₁	R ₂				
DOTA-Gd	H	H	H	4,2	4,3	/	/
25	BOM	H	H	5,4	8,1	86	170
26	BOM	H	BOM	5,8	10,7	115	204
27	BOM	BOM	H	5,7	10,1	115	191
19	BOM	BOM	BOM	6,7	12,6	133	244

Tableau 19 : Résultats des travaux de Aime *et al.* sur l'influence de la formation de complexes hôte-invités entre des dérivés du DOTA et la β -CD sur la relaxivité r_1 et le temps de corrélation rotationnel τ_r ^[109]

Les interactions dues aux unités BOM, des complexes **19**, **25-27** avec la β -CD, ont été mises en évidence par comparaison au DOTA-Gd seul (Tableau 19). En effet, alors qu'une nette variation de r_1 est observée lorsque les complexes **19**, **25-27** sont en présence de β -CD, la

relaxivité du DOTA-Gd reste constante. De plus, les résultats montrent une influence positive du nombre de cyclodextrines sur la relaxivité due à l'augmentation considérable du τ_r ($r_1 = 12,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le complexe **19** : 3CDs).

Cette équipe italienne a initié et développé cette thématique basée sur la formation de complexes d'inclusion intermoléculaires pour améliorer l'efficacité des ACs. Ainsi, en 1999, ils ont utilisé des polymères de β -CDs et ont comparé la relaxivité obtenue avec le complexe d'inclusion entre un PCTA-Gd possédant un bras *p*-bromobenzyloxy (BBO) (**28** – Tableau 20) et le monomère, puis le polymère de β -CD.^[110] La relaxivité de **28**, initialement de $8,25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a été augmentée jusqu'à $17 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $32 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le complexe d'inclusion avec le monomère, puis le polymère, respectivement.

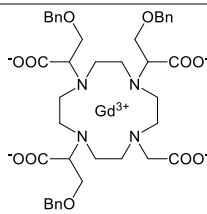
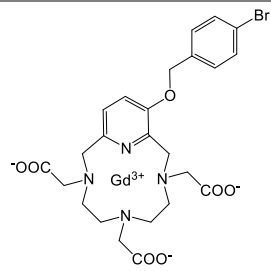
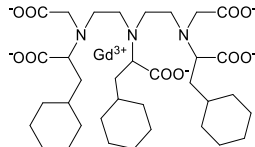
Formule du complexe	Structure	r_1 sans β -CD ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
19 $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$		6,7
28 $[\text{Gd}(\text{PCTA-BBO})(\text{H}_2\text{O})_x]$		8,25
29 $[\text{Gd}(\text{DTPA-CYM}_3)(\text{H}_2\text{O})_x]$		9,1

Tableau 20 : Structures des chélates de Gd(III) utilisés pour la formation de complexes d'inclusion avec la β -CD

D'autre part, un τ_r de 7000 ps a été atteint grâce à la combinaison des travaux précédents réalisés en 1991 et 1999. Le $[\text{Gd}(\text{DOTA-BOM}_3)(\text{H}_2\text{O})]^-$ **19** a, cette fois-ci, été mis en solution non plus avec la β -CD seule mais avec son polymère. Le polymère multidimensionnel de complexe d'inclusion (Figure 36) ainsi formé a engendré une relaxivité de $49 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[111]

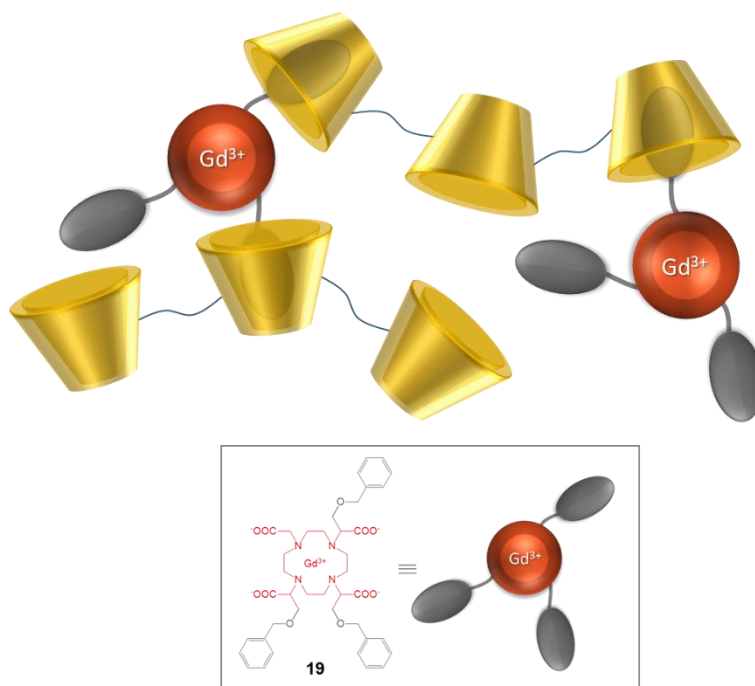


Figure 36 : Représentation schématique des complexes d'inclusions formés entre le $[Gd(DOTA-BOM_3)(H_2O)]^+$ et un poly- β -CD

Lorsque des chélates de Gd(III) connus (invité) sont utilisés pour former des complexes d'inclusion hôte-invité, il est considéré que la stabilité thermodynamique du chélate n'est pas influencée par les interactions avec les CDs. Il est cependant important de considérer la valeur de la constante d'association, décrite suivant les Equations 12, qui sera un critère essentiel pour comparer les différents complexes d'inclusion synthétisés.

$$(12) \quad \text{Equilibre} \quad [ML] + [\beta - CD] \rightleftharpoons [ML / \beta - CD]$$

$$\text{Constante d'association} \quad K_a = \frac{[ML / \beta - CD]}{[ML][\beta - CD]}$$

Ainsi, le complexe entre le $[Gd(PCTA-BBO)(H_2O)_x]$ **28** (Tableau 20) (x est inconnu) et la β -CD, qui possède un K_a de 8.10^2 M^{-1} , est légèrement plus stable que celui entre **28** et la protéine HSA avec un K_a de 4.10^2 M^{-1} . Les complexes d'inclusion avec la protéine HSA font partis des premiers à avoir été étudiés pour améliorer la relaxivité et servent ainsi de référence.^[110] Cette stabilité d'association a, depuis, été grandement optimisée en construisant des dimères et

trimères de β -CD (Figure 37), liés par des ponts triazoles. Ainsi, les complexes d'inclusion avec les $[\text{Gd}(\text{DTPA-CYM}_{1-3})(\text{H}_2\text{O})_x]$ possédant un à trois sites hydrophobes BOM (Tableau 20) ont été obtenus avec des K_a compris entre $1,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ et $6,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, des τ_R compris entre 356 et 1000 ps et ainsi, des r_1 élevés compris entre 11,5 et $35,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[112,113]

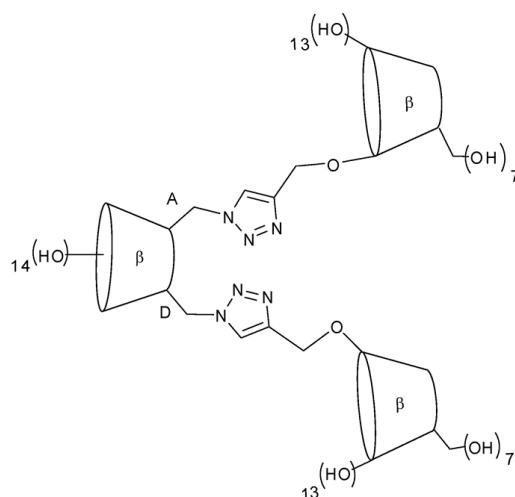


Figure 37 : Exemple d'une structure de trimère développé par Aime et al.^[13]

Une autre stratégie adoptée par l'équipe de Botta a consisté à fonctionnaliser un dendrimère PAMAM de première génération (G-1) avec huit CDs *via* des liaisons disulfures (Figure 38).^[114] Les chélates de Gd(III) sont des dérivés du ligand AAZTA ou du DOTA avec un bras hydrophobe adamantane ou benzyle pour permettre l'inclusion dans la CD.

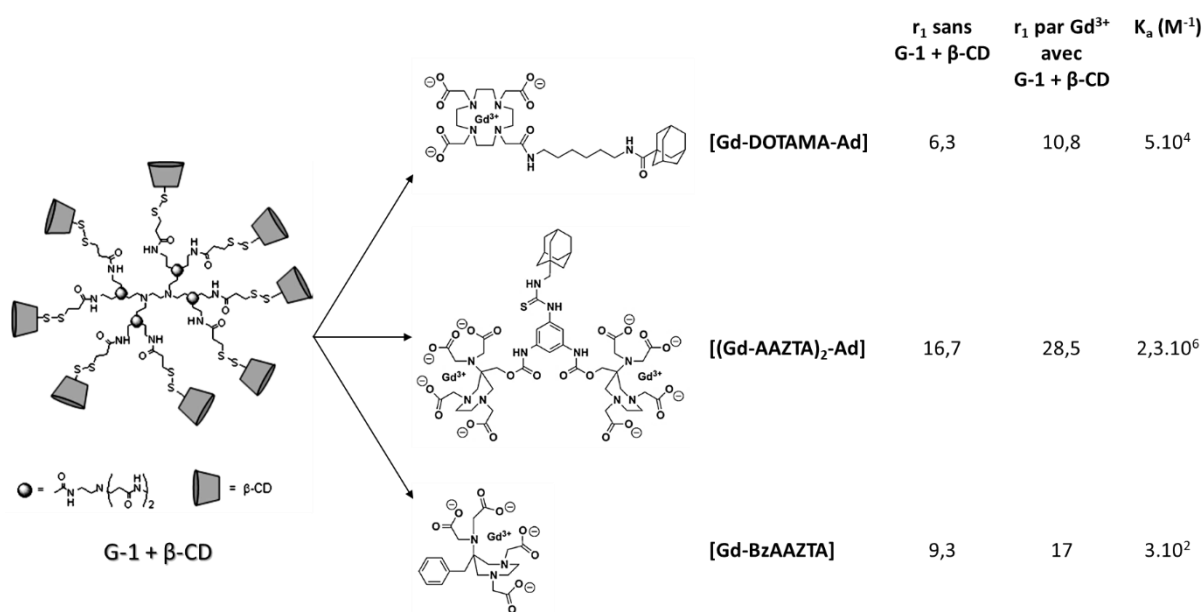


Figure 38 : Structure du dendrimère G-1 fonctionnalisé par des β -CD et les relaxivités et constantes d'association déterminées pour les complexes d'inclusions formés avec trois chélates de Gd(III) : [Gd-DOTAMA-Ad], [(Gd-AAZTA)₂-Ad] et [Gd-BzAAZTA] (modifiée à partir de [114])

L'adamantane a de très bonnes affinités avec les CDs, qui se confirme ici tout particulièrement avec le complexe [(Gd-AAZTA)₂Ad] possédant une K_a de l'ordre de 10^6 M^{-1} . De plus, après inclusion dans les cavités des CDs du dendrimère, la relaxivité des trois chélates de Gd(III) augmente d'un facteur 1,7.

Plus récemment, l'équipe américaine du professeur Lu a synthétisé des nanoparticules en greffant des β -CDs sur une plateforme connue et biocompatible POSS (Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane) (POSS- β -CD – Figure 39).^[115] L'agent de contraste bimodale (Figure 39) (IRM et fluorescence) vectorisé est ensuite construit grâce aux interactions hôte-invité entre les β -CDs et :

- L'Ad-PEG-cRGD  : peptide modifié permettant de cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$,
- L'Ad-DOTA-Gd  : DOTA-Gd modifié utilisé en tant qu'AC pour l'IRM,
- L'Ad-Cy5.0  : Cy5 modifié utilisé en tant qu'agent fluorescent.

Cet agent spécifique bimodal a été testé *in vivo* pour la détection des intégrines $\alpha_v\beta_3$ surexprimées dans les tumeurs malignes du sein.

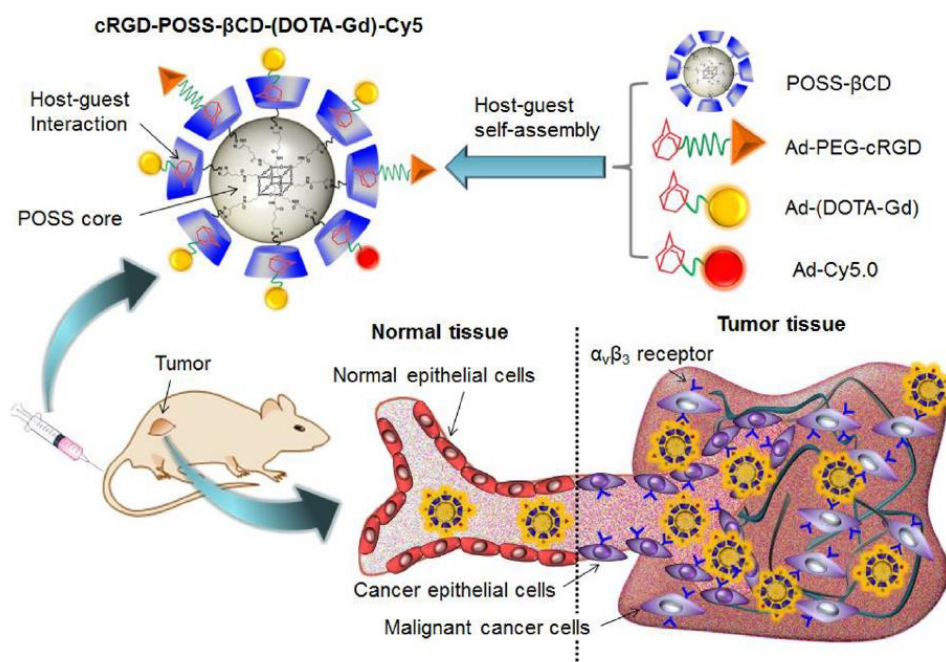
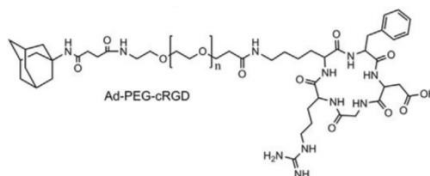
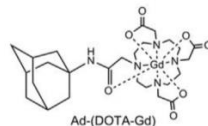


Figure 39 : Représentation schématique et mécanisme d'action de la sonde bimodale pour la détection du cancer du sein ^[115]

Sonde spécifique aux récepteurs intégrine $\alpha_v\beta_3$



Agent de contraste pour l'IRM



Agent de fluorescence

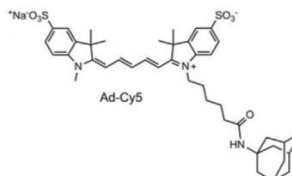


Figure 40 : Molécules invitées pour l'assemblage de la sonde bimodale pour la détection du cancer du sein (modifiée à partir de [115])

En ce qui concerne l'imagerie IRM, une augmentation de la relaxivité d'un facteur 3 est observée pour le complexe d'inclusion entre l'Ad-DOTA-Gd seul et la nanoparticule-CD. Cependant, aucune étude sur la stabilité des complexes d'inclusion, ni sur les chélates de Gd, n'est reportée.

En règle générale, la toxicité de ces assemblages à base de complexe d'inclusion n'est pas évoquée.

B. Les ACs développés à base de CDs

Liaisons covalentes

Les assemblages covalents entre les CDs et les ACs n'ont vu le jour que dans les années 2000 avec Skinner *et al.*^[116] La majorité des publications sur le sujet présente des synthèses de β -CD servant de plateforme pour des chélates de Gd(III) connus. Rares sont les exemples utilisant la β -CD comme base structurale de nouveaux ligands de Gd(III).

1. Plateforme pour chélates de Gd(III) connus

Skinner a donc été le premier à publier une combinaison chélate de Gd(III) – β -CD liée par un couplage peptidique ($[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ – β -CD **30**, Tableau 21). La relaxivité obtenue s'élève à $8,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ améliorant d'un facteur 2 la relaxivité initiale du DOTA-Gd, mais restant dans le même ordre de grandeur que celle du complexe d'inclusion **25** (Tableau 19). Cette initiative a ouvert la porte à la conception de plusieurs structures de ce type.

L'équipe de Aime a ainsi réalisé une mono-substitution *via* une liaison amine avec le chélate linéaire DTPA-Gd **31** générant une relaxivité de $11 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tableau 21).^[117] De plus, la création de liaisons covalentes entre la CD et les ligands du Gd(III) permet d'accéder à une structure portant plusieurs chélates de Gd(III), dépendant du nombre d'hydroxyles libres fonctionnalisables, contrairement aux complexes d'inclusion ne pouvant accueillir qu'un seul lanthanide.

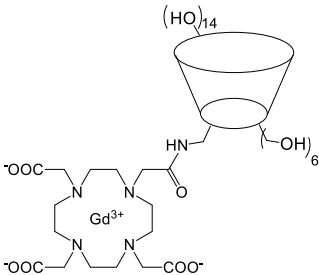
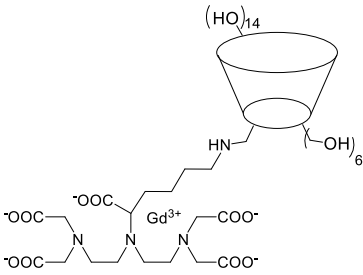
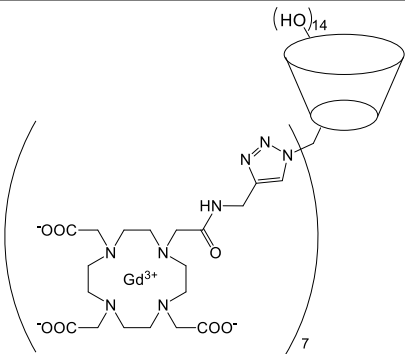
Meade *et al.* ont ainsi développé une β -CD hepta-fonctionnalisée par des DOTA-Gd **32** (Tableau 21) multipliant la relaxivité d'un facteur 3.^[118] Cette dernière structure a ensuite été utilisée par l'équipe de Liu pour une libération contrôlée de plasmide pDNA (fragments d'ADN circulaire présents dans la cellule bactérienne, indépendants du génome bactérien et dont la réplication est indépendante) en thérapie génique.^[119] Ainsi, 7 motifs DOTA-Gd occupent la face primaire de la CD tandis que les 14 autres hydroxyles de la face secondaire ont été fonctionnalisés par des polymères linéaires de méthacrylate de *N,N*-diméthylaminoéthyle (DMA) **33** (Tableau 21) formant ainsi un polymère étoile. Ces derniers piègent alors le pDNA par interactions ioniques. La relaxivité mesurée *in vivo* est légèrement inférieure à celle déterminée par Meade, mais reste largement suffisante pour suivre la délivrance du pDNA.^[118]

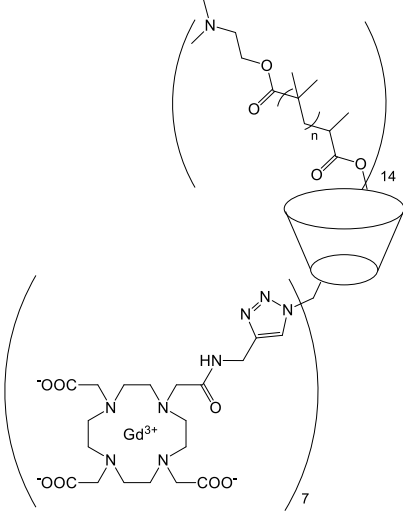
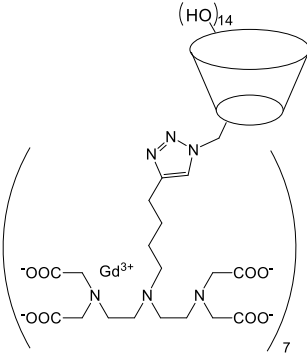
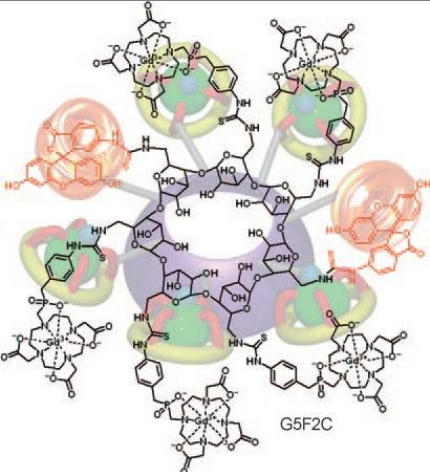
D'autres hepta-coordinations ont été effectuées avec l'utilisation d'un dérivé du ligand linéaire DTPA : le DTTA **34** ne possédant pas le bras carboxylate sur l'azote centrale (Tableau 21).^[120] Cette combinaison semble être moins satisfaisante que celle obtenue avec le DOTA, ne multipliant la relaxivité que d'un facteur 2.

Enfin, le développement de la sonde bimodale fluorescence-IRM **20** (Tableau 21), basée sur le dérivé du DOTA dont l'une des fonctions carboxylate a été remplacée par un groupement phosphonate (DO3AP), a permis d'atteindre une relaxivité record de $22 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par cation métallique Gd(III).^[49]

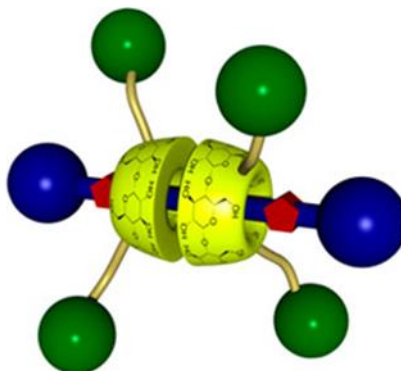
Pour combiner la multi-fonctionnalisation et l'optimisation du τ_R en assemblant plusieurs CDs, Hasenknopf *et al.* ont construit des polyrotaxanes d' α -CD, pouvant servir de plateforme hautement modulable pour des applications en imagerie optique (fluorescence), en IRM ou même en imagerie bimodale (**35** - Tableau 21).^[121,122] L' α -CD est fonctionnalisée sur la face primaire par une ou deux unités DOTAMA (DOTA-monoamide) liées par des triazoles. Le rotaxane se forme autour d'un axe alkyle à douze carbones. Ils ont ainsi pu obtenir deux

rotaxanes modèles avec deux (RotGd₂) ou quatre (RotGd₄) chélates de Gd(III). En étudiant séparément les structures DOTAMA – α-CD, puis les rotaxanes, ils ont mesuré des différences de relaxivité de 7 mM⁻¹s⁻¹, soit une valeur atteignant les 15,7 mM⁻¹s⁻¹ par unité de Gd(III) pour le RotGd₄.

Formule du complexe	Structure	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹ / Gd)	
		GdL	GdL – β-CD
30 [Gd(DOTAMA)(H ₂ O)] ⁻ – β-CD		3,8	8,5
25°C - 20 MHz			
31 [Gd(DTPA)(H ₂ O)] ⁻ – β-CD		4,02	11
37°C 25°C 20 MHz			
32 [Gd(DOTAMA)(H ₂ O)] ₇ – β-CD		3,5	12,2
40°C 37°C 20 MHz 60 MHz			

33	$[\text{Gd}(\text{DOTAMA})(\text{H}_2\text{O})_x]_7 - \beta\text{-CD} - (\text{PDMA})_{14}$		3,5	10,9
34	$[\text{Gd}(\text{DTTA})(\text{H}_2\text{O})_2]_7 - \beta\text{-CD}$		3,2	6,2
20	$[\text{Gd}(\text{DO3AP})(\text{H}_2\text{O})]_{6,9} - \text{F}_{0,1} - \beta\text{-CD}$		5,7	22

35 RotGd₄



DOTA-Gd : 3,8

(25°C - 20 MHz)

[Gd(DOTAMA)(H₂O)]

₂ - α-CD : 8,57

(37°C - 20 MHz)

RotGd₄ : 15,7

(37°C - 20 MHz)

Tableau 21 : Structures des différents ACs formés à partir d'interactions covalentes entre les ligands du Gd(III) connus (DOTA, DTPA, etc.) et les CDs

Les ACs présentées ici représentent les différents types de structures conçues à partir de CD et de chélates de Gd(III) connus, mais la liste des exemples n'est pas exhaustive. D'autres ACs de ce type ont été étudiés comme par exemple le polyrotaxane à base de [Gd(DO3A)HPCD] développé par l'équipe de Thompson avec une relaxivité de 34,08 mM⁻¹s⁻¹ à 20 MHz^[123] ou encore les nanoparticules pour l'imagerie bimodale (IRM-Scanner) à base d'α-CD fonctionnalisées par des dérivés du DTPA (DyNPs-Gd-Ir) dont la relaxivité de 4,65 mM⁻¹s⁻¹ à 20 MHz est similaire à celle du complexe Gd-DTPA^[124].

2. Plateforme pour la conception de nouveaux chélates de Gd(III)

La cavité hydrophobe des CDs natives (entièrement hydroxylées) ne permet pas l'inclusion d'entités hydrophiles comme un cation de lanthanide.^[125] Pour utiliser la CD comme plateforme pour la conception de nouveaux chélates de Gd(III), il faut donc modifier sa structure et la fonctionnaliser par des fonctions chélatantes.

En 2008, Delangle *et al.* ont étudié l'interaction du Gd(III) avec une α-CD modifiée servant, dans ce cas, de ligand.^[125] Pour cela, des ponts éthers ont été créés entre les positions C-3 et C-6 de chaque unité glucosidique de l'α-CD, formant la per-3,6-anhydro-α-CD (Tableau 22). Cette modification structurale rigidifie la structure et rend la cavité de la CD plus hydrophile permettant des interactions avec les cations métalliques. Afin de renforcer ces interactions, les six hydroxyles résiduels OH-2 ont été fonctionnalisés par des bras méthylcarboxylates formant le composé **36** (Tableau 22). Il a été mis en évidence que ce ligand pouvait coordonner jusqu'à deux cations métalliques engendrant une faible stabilité du complexe **36** de 7,5.

Cependant, une très bonne relaxivité de $22 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pu être mesurée, expliquée entre autres, par un τ_r élevé de 260 ps.

Yannakopoulou *et al.* ont, quant à eux, fonctionnalisé, par des groupements aminodicarboxylates, l'intégralité de la face primaire des α -, β - (**37**) et γ -CDs natives (Tableau 22).^[126] Pour le ligand construit à partir de la β -CD, les études en luminescence et spectrométrie de masse ont montré que trois cations métalliques interagissaient avec un nombre d'hydratation de 1,5 et une relaxivité par Gd(III) de $8,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cependant, aucune information n'est donnée sur la stabilité de ces complexes que l'on peut supposer faible puisque seul 7 coordinations (azote et carboxylate) sont possibles.

Au laboratoire, l'équipe de Gouhier a étudié l'influence de la seconde sphère d'hydratation en comparant deux β -CDs ayant leur face primaire entièrement carboxylée et la face secondaire hydroxylée **38** ou per-méthylée **39** (Tableau 22).^[127] Les deux complexes de Gd(III) correspondants possèdent un nombre d'hydratation identique compris entre 2 et 2,5 mais des relaxivités différentes de $6,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour **38** et de $4,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour **39**. La différence de poids moléculaire non-significative entre les deux structures et le même nombre d'hydratation ne permettent pas d'expliquer cette variation. Par conséquent, la présence des hydroxyles libres dans le complexe **38** pourrait justifier une affinité du ligand plus forte pour les molécules d'eau par liaisons hydrogène et donc une seconde sphère d'hydratation plus importante que dans le cas de la CD per-méthylée **39**. Une étude potentiométrique sur le composé **39** a permis d'établir une constante de stabilité faible de 6,6 pour le complexe GdL de stœchiométrie 1 : 1 et de souligner la présence d'autres espèces bimétallique et biligantée.^[128]

Formule du complexe	Structure	log K _{GdL}	r ₁ (mM ⁻¹ s ⁻¹)
36 [Gd(per-3,6-anhydro- α-CD)(H ₂ O)] ³⁻		7,5	22,4 25°C - 400 MHz
37 [Gd ₃ (BEDTA)(H ₂ O) _{1,5}] ⁵⁻			10,5 25°C – 100 MHz
38 [Gd(β-CD-OH)]			6,5 37°C – 20 MHz
39 [Gd(β-CD-pMe)]		6,6	4,6 37°C – 20 MHz

Tableau 22 : Structure des nouveaux ligands du Gd(III) à base de CDs

De manière générale, les complexes formés par liaisons covalentes avec la CD permettent d'assurer la stabilité de l'assemblage contrairement aux complexes d'inclusion basés sur un équilibre. En effet, celui-ci peut être déplacé en présence d'une molécule ayant une plus forte affinité pour la cavité de la CD. Bien que les relaxivités des deux types d'assemblage (inclusion ou covalent) soient proches, la plus grande stabilité de la voie covalente sera privilégiée en vue d'éventuelles applications *in vivo*.

C. Contexte et objectifs de ce projet de thèse

Au vu de l'impact des CDs sur les relaxivités des ACs, notre recherche s'est naturellement focalisée sur le développement de nouveaux dérivés afin d'exploiter au mieux ces macrostructures. De plus, nous avons montré dans le chapitre précédent l'intérêt grandissant pour les agents de contraste dits intelligents. L'avantage de l'utilisation des CDs dans ce

domaine est notable de par la réactivité différente des deux faces et donc leur possible différenciation.

Ainsi, en 2011, Gouhier et Estour ont déposé un brevet décrivant le concept d'un agent intelligent à base de CD (Figure 41).^[129] Celui-ci doit posséder une partie chélate de Gd(III)

 sur la face primaire de la CD, pouvant être des nouveaux ligands pyridino-carboxylate ou -phosphonate ou des ligands connus (DOTA, etc.) et un bras immolable sur la face secondaire porteur d'un élément de reconnaissance  d'une cible biologique. Le clivage  spécifique du bras espaceur par un processus biochimique (pH, enzyme, etc.) libère une partie hydrophobe  pouvant interagir avec la cavité de la CD. Cette modification de l'AC devrait entraîner une variation de signal IRM.

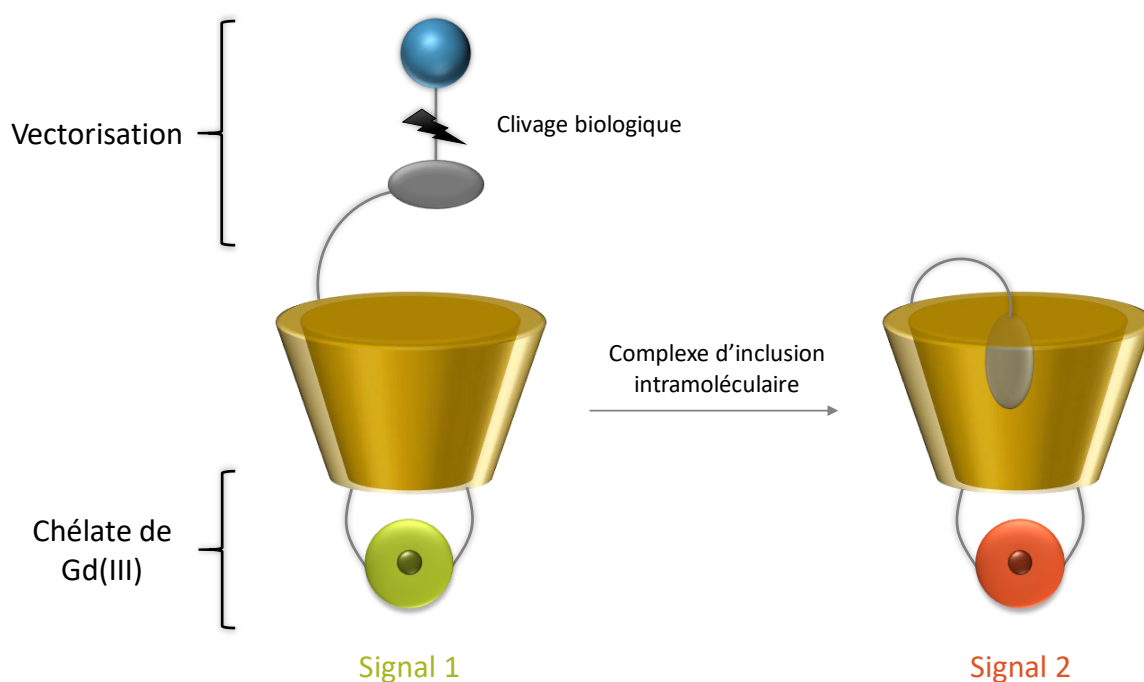


Figure 41 : Description du concept d'un agent intelligent pour l'IRM à base de cyclodextrine

D'un point de vue synthétique, ce projet peut être divisé en deux parties : l'une concerne la mono-fonctionnalisation de la face secondaire pour la vectorisation vers une cible biologique ; l'autre se focalise sur la conception de nouveaux agents de contraste avec poly-fonctionnalisation contrôlée de la face primaire et caractérisation des chélates de Gd(III) obtenus.

Mon sujet de thèse s'articule autour de cette seconde partie. Précédemment, l'équipe rouennaise a observé une augmentation notable du signal IRM lors d'un complexe d'inclusion inter- ou intramoléculaire, puis a poursuivi l'étude de l'influence des sphères d'hydratation des CDs sur la relaxivité.^[127,130,131] Pour cela, un ligand DOTA a été immobilisé sur la face primaire de β -CDs hydroxylée, per-méthylée ou partiellement méthylée. Cependant les résultats n'ont pas permis de confirmer nettement le rôle des hydroxyles libres dans la seconde sphère d'hydratation et donc sur la relaxivité globale du complexe.^[128]

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif se recentre sur la conception de nouveaux ACs plus efficaces et plus stables. Pour cela, l' α - et la β -CD serviront de support à deux types de ligands portant des fonctions chélatantes différentes : un groupement pyridino-carboxylate ou pyridino-phosphonate (Figure 42). Les hydroxyles non impliqués dans la fonctionnalisation seront méthylés pour faciliter les étapes de synthèse et de purifications et ce, sans perturber la relaxivité au regard des résultats précédents.

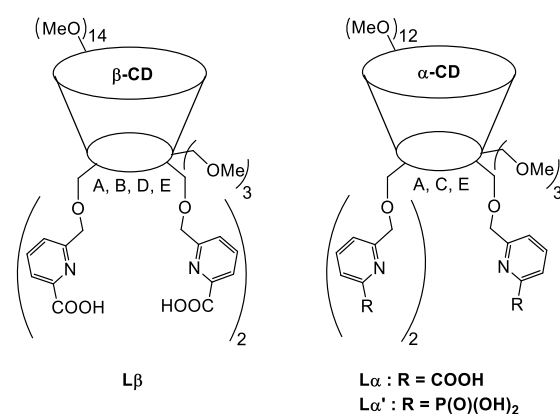


Figure 42 : Structures cibles de la thèse

Les ligands pyridinocarboxylates ont déjà prouvé leur efficacité quant à leur capacité à chélater le Gd(III), la grande majorité des complexes de Gd(III) étant basée sur ces liaisons de coordinations (*cf.* chapitre 1). Cependant, un grand intérêt se porte sur des nouvelles fonctions chélatantes de type phosphonate qui s'avèrent améliorer la stabilité thermodynamique et cinétique des complexes de lanthanide en formant des liaisons métal-phosphonate plus forte que les liaisons métal-carboxylate.^[132,133] La comparaison de dérivés dont les fonctions carboxylates sont remplacées par des phosphonates a montré systématiquement une amélioration de la constante de stabilité thermodynamique (Tableau 23).^[8,134]

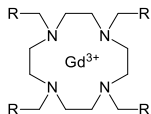
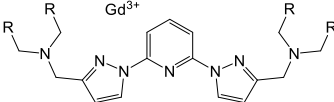
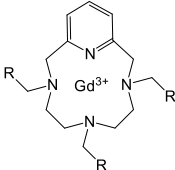
	Structure	R	Formule du complexe	Log K	q	r_1 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
DOTA		COO^-	$[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$	18,6	1,2	3,8
40		PO_3^{2-}	$[\text{Gd}(\text{DOTP})(\text{H}_2\text{O})]^-$	28,8	0,7	-
41		COO^-	-	16,2	0	-
42		PO_3^{2-}	-	20,4	0	-
2		COO^-	$[\text{Gd}(\text{PCTA-12})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$	-	2,4	6,9
16		PO_3^{2-}	$[\text{Gd}(\text{PCTP-12})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$	-	1	7,5

Tableau 23 : Influence des fonctions phosphonates par rapport aux fonctions carboxylates sur les log K, les q et les r_1 des complexes de Gd(III) ^[8,134,135]

Le dérivé du DOTA dont les quatre fonctions carboxylates ont été remplacées par des phosphonates **40** (DOTP) a permis d'augmenter la stabilité du complexe de Gd(III) passant de 18,6 à 28,8. Cette augmentation est aussi constatée dans le cas de l'étude comparative effectuée par Charbonnière *et al.* pour les dérivés **41** et **42**. De plus, l'encombrement stérique plus important des phosphonates réduit le nombre de molécules d'eau de la sphère interne des complexes, n'entraînant pas, pour autant, une diminution de la relaxivité en raison de la forte influence de la seconde sphère d'hydratation.^[43,132] Par exemple, le complexe formé à partir de fonctions carboxylate PCTA **2** possède un degré d'hydratation plus élevé et une relaxivité plus faible que son homologue phosphonate PCTP **16** (Tableau 23).^[43] Ainsi, l'utilisation de ces nouvelles fonctions chélatantes devraient répondre à nos objectifs d'amélioration de la stabilité et de la relaxivité de nouveaux agents de contraste.

Au vu de la taille et du potentiel de fonctionnalisation des cyclodextrines, il a été envisagé de greffer quatre ligands sur la β -CD et trois sur l' α -CD.

Les objectifs de cette thèse interdisciplinaire ont été divisés en quatre parties :

- Aménagement fonctionnel des cyclodextrines
- Synthèse des ligands
- Greffage des ligands sur les CDs
- Caractérisation des complexes de Gd(III) (en collaboration avec l'équipe d'E. Jakab-Tóth)

IV. La chimie des cyclodextrines

Modification de la face I des cyclodextrines

Sollogoub et Guieu ont recensé, en 2014, l'ensemble des méthodes utilisées pour modifier les CDs dans un chapitre *Advances in Cyclodextrin Chemistry* du livre *Modern Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry*.^[102] La mono-substitution des CDs est la réaction la plus utilisée et développée dans le domaine de la chimie des cyclodextrines. Cependant, dans l'optique de profiter au maximum des avantages des CDs, cinq stratégies d'aménagement fonctionnel ont été mises au point afin d'accéder à des CDs di-, tri- et tétra-fonctionnalisés (Figure 43 et Figure 44). Au regard des structures visées, le paragraphe suivant décrira uniquement les stratégies d'aménagement fonctionnel de la face primaire de la β - et de l' α -CD.

Ainsi les stratégies 1, 2 et 3 (Figure 43) ont pour objectif de libérer deux, trois ou quatre hydroxyles, pour ensuite permettre la régio-fonctionnalisation de ces positions. Les stratégies 4 et 5 (Figure 44) s'appuient, quant à elles, sur l'insertion, dans un premier temps, de groupements partants, qui seront par la suite substitués par le nucléophile choisi. Les trois premières voies favorisent l'accès à des CDs dont tous les hydroxyles non fonctionnalisés sont protégés par des groupements protecteurs de types méthoxy (OMe), benzyloxy (OBn) ou allyloxy (OAll), orthogonaux aux agents protecteurs initialement insérés, tandis que les deux dernières favorisent la fonctionnalisation de CDs natives.

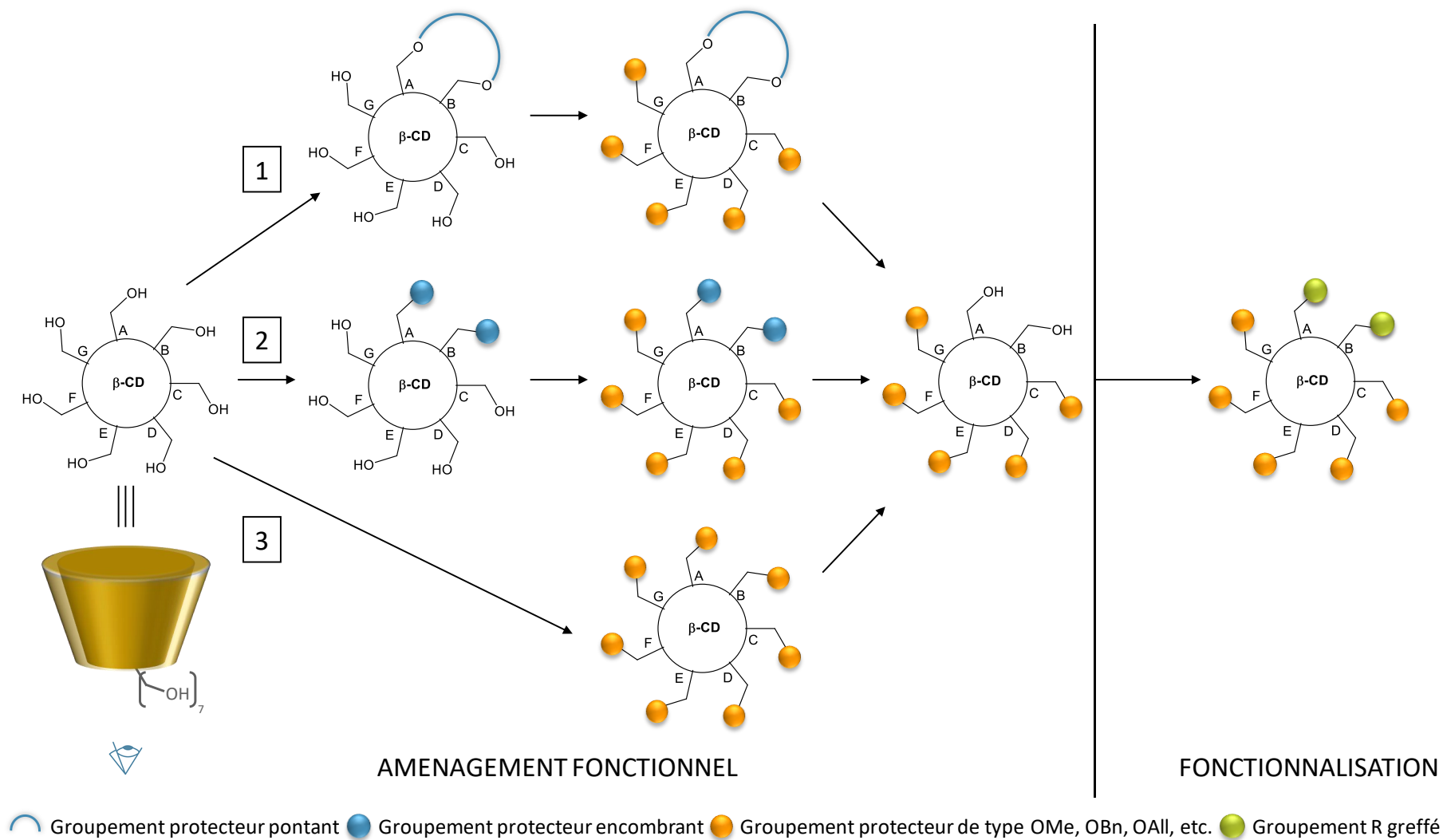


Figure 43 : Stratégies d'aménagement fonctionnel pour accéder à une régio-fonctionnalisation de CD protégée
Exemple d'une di-fonctionnalisation sur la β -CD

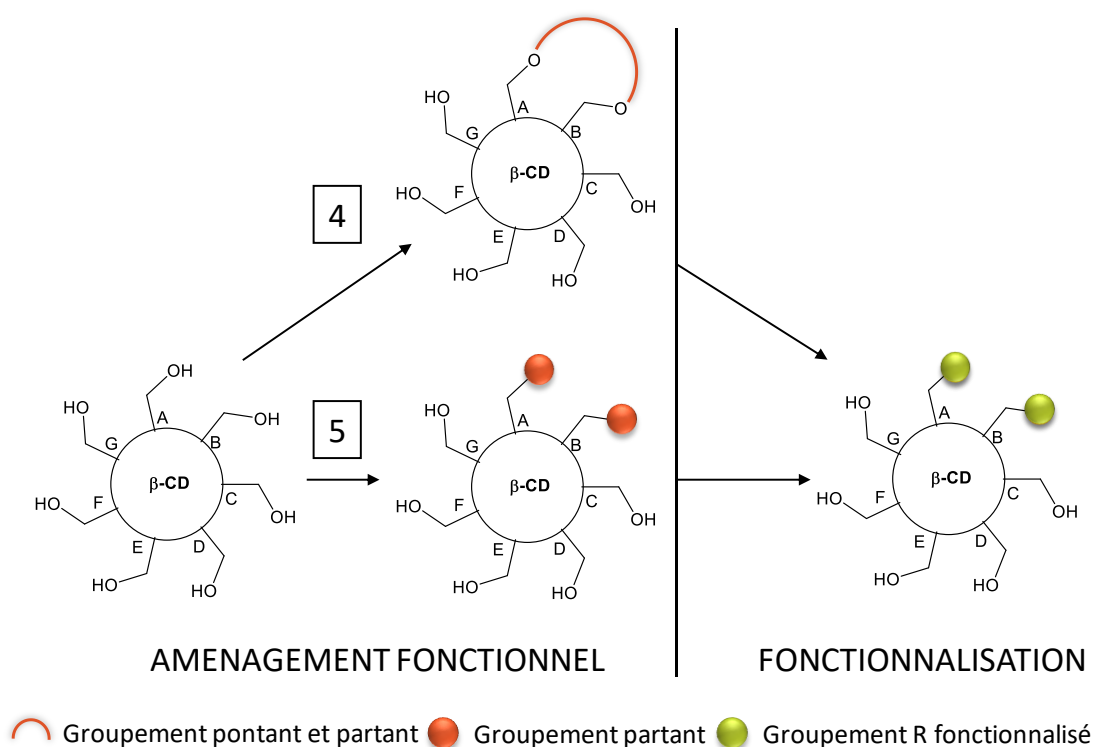


Figure 44 : Stratégies d'aménagement fonctionnel pour accéder à une régio-fonctionnalisation de CD native
 Exemple d'une di-fonctionnalisation sur la β -CD

Les stratégies 1 et 4 s'appuient sur l'utilisation d'agents pontants, qui en fonction de leur taille, substitueront deux, voire quatre positions de la CD. La stratégie 2 s'appuie sur des agents très encombrants qui permettront de favoriser la substitution de positions éloignées sur la CD. Tandis que la stratégie 3 s'appuie sur la déprotection sélective, induite par l'encombrement stérique, d'une CD dont tous les hydroxyles ont été préalablement protégés.

A. Les agents pontants

Les agents pontants ont principalement été développés pour l'aménagement fonctionnel de la β -CD qui est plus rigide et dont les distances entre les hydroxyles sont non-variables. Ainsi, il est plus aisé de prévoir la taille des agents en fonction des positions à substituer. Il y a néanmoins quelques exemples concernant l' α -CD.

1. La di-substitution de la face I

Plusieurs agents pontants pour la di-substitution directe de la face I de la β -CD ont été développés. Cette CD possède 7 hydroxyles en position 6 et permet donc trois pontages différents entre les positions : **A et B** ; **A et C** ou **A et D** (Figure 45). La géométrie et

l'encombrement stérique des agents permet de favoriser un des trois pontages afin d'obtenir majoritairement une des combinaisons.

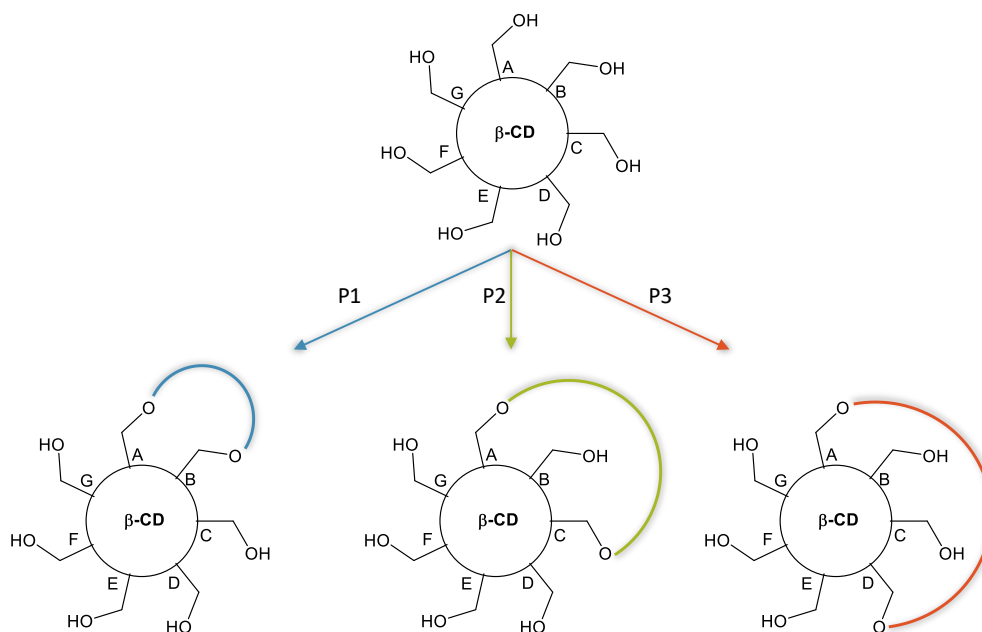


Figure 45 : Représentation schématique des trois pontages (P) possibles sur la face I de la β-CD

Le greffage entre les positions A et B est possible soit par la stratégie 1 en présence du composé 1,3-bis[bis(4-*tert*-butylphényl)chlorométhyl]-benzène **40** développé par Armspach *et al.* avec un rendement de 35%^[136] soit par la stratégie 4 en présence du chlorure de 4,6-diméthoxy-1,3-benzènedisulfonyl **41**^[137] avec 32% de rendement (Tableau 24). Tous les autres agents pontants sont des composés disulfonylés, adaptés pour la stratégie 4, dont le squelette a été modifié pour apporter de la flexibilité, de la rigidité ou encore, de la longueur. Ainsi, le dichlorure de 3,3'-disulfonylbenzophénone **42** permet de fonctionnaliser avec 20% de rendement les positions A et C et les chlorures de 4,4'-biphényldisulfonyl **43** et de 4,4'-transstilbènedisulfonyl **44**, les positions A et D avec respectivement 17% et 40% de rendement.

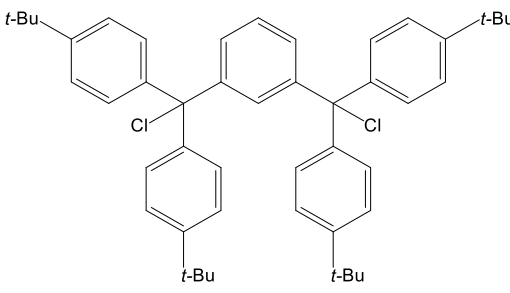
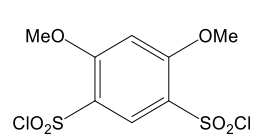
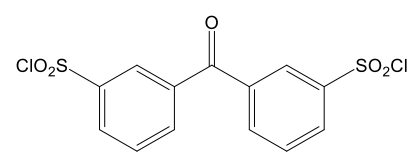
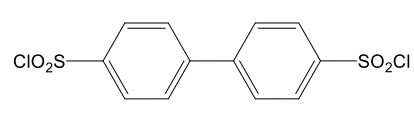
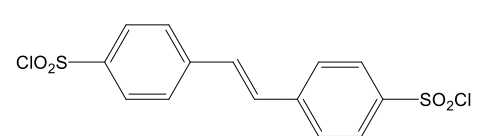
Pontage	Positions substituées	Agent pontant	Rendement
P1	A et B	 40 <i>1,3-bis[bis(4-tert-butylphényl)chlorométhyl]-benzène</i>^[136]	32%
		 41 <i>Chlorure de 4,6-diméthoxy-1,3-benzènedisulfonyl</i>^[137]	35%
		 42 <i>Dichlorure de 3,3'-disulfonylbenzophénone</i>^[138,139]	20%
P2	A et C	 43 <i>Chlorure de 4,4'-biphényldisulfonyl</i>^[138,139]	17%
		 44 <i>Chlorure de 4,4'-transstilbènedisulfonyl</i>^[138,139]	40%
P3	A et D		

Tableau 24 : Agents pontants utilisés pour la di-substitution de la face I de la β -CD sur les positions A, B ; A, C et A, D ainsi que les rendements du pontage associé

La fonctionnalisation sélective de l' α -CD a été beaucoup moins étudiée. Néanmoins, deux options permettent la substitution de la face primaire, soit en position **A et B** ou en **A et C** (Figure 46). La première voie s'appuie sur la stratégie 1 et utilise l'agent pontant **40** pour substituer l' α -CD en positions A et B avec 55% de rendement.^[136] La deuxième voie nécessite, de nouveau, un composé disulfonylé **45** avec un rendement de 18% (Stratégie 4).^[140]

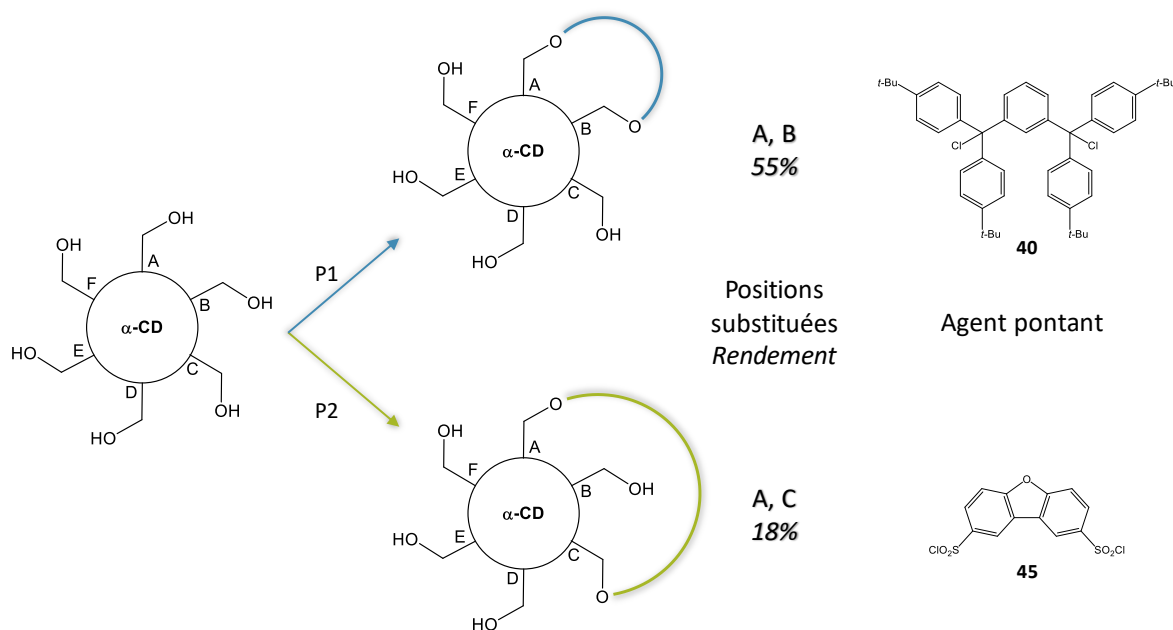


Figure 46 : Agents pontants utilisés pour la di-substitution de la face I de l' α -CD sur les positions A, B et A, C ainsi que les rendements du pontage associé

2. La tri-substitution de la face I

L'accès à une β -CD tri-substituée par action d'un agent pontant nécessite une première étape de mono-substitution. Un seul exemple dans la littérature décrit une telle méthode et s'appuie sur les stratégies 4 et 5.^[141] La β -CD est dans un premier temps mono-tosylée puis di-substituée par le composé **45**. Cette succession de réactions conduit à un mélange de régioisomères dont une fraction majoritaire de 23% est obtenue après purification par HPLC. L'action d'un nucléophile, le thiophénol, conduit ensuite à l'unique régioisomère tri-fonctionnalisée en positions A, C et E (Figure 47).

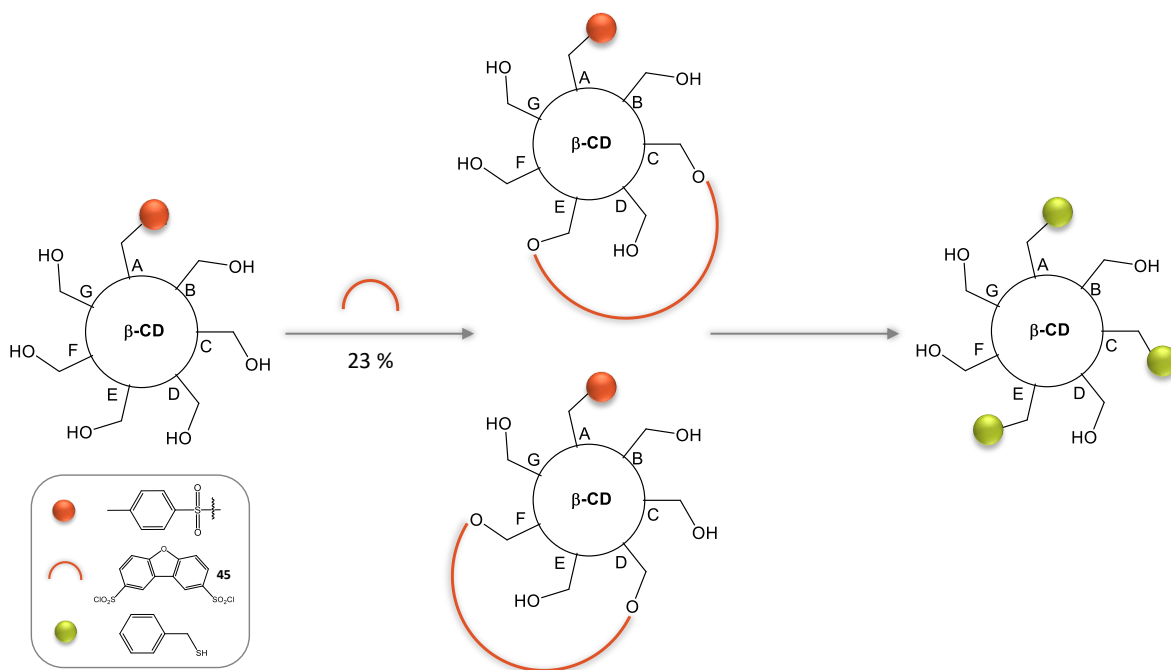


Figure 47 : Tri-fonctionnalisation de la β -CD par action d'un agent pontant

3. La tétra-substitution de la face I

Il est possible de réaliser une tétra-substitution en modifiant les conditions réactionnelles utilisées pour la di-fonctionnalisation (Figure 48). La deuxième insertion est plus difficile, mais du fait de l'encombrement stérique imposé par la première, elle est aussi plus sélective. Ainsi, en augmentant le nombre d'équivalents de l'agent **40** de 1 à 2,2 équivalents, Armspach *et al.* décrivent l'accès à une β -CD tétra-substituée en position A, B, D et E avec un rendement de 50% (Stratégie 1).^[142] De la même manière, Tabushi *et al.* ont augmenté de 1 à 2,6 équivalents la quantité de la benzophénone **42** pour obtenir 35% de β -CD tétra-substituée en position A, C, D et F (Stratégie 4).^[143]

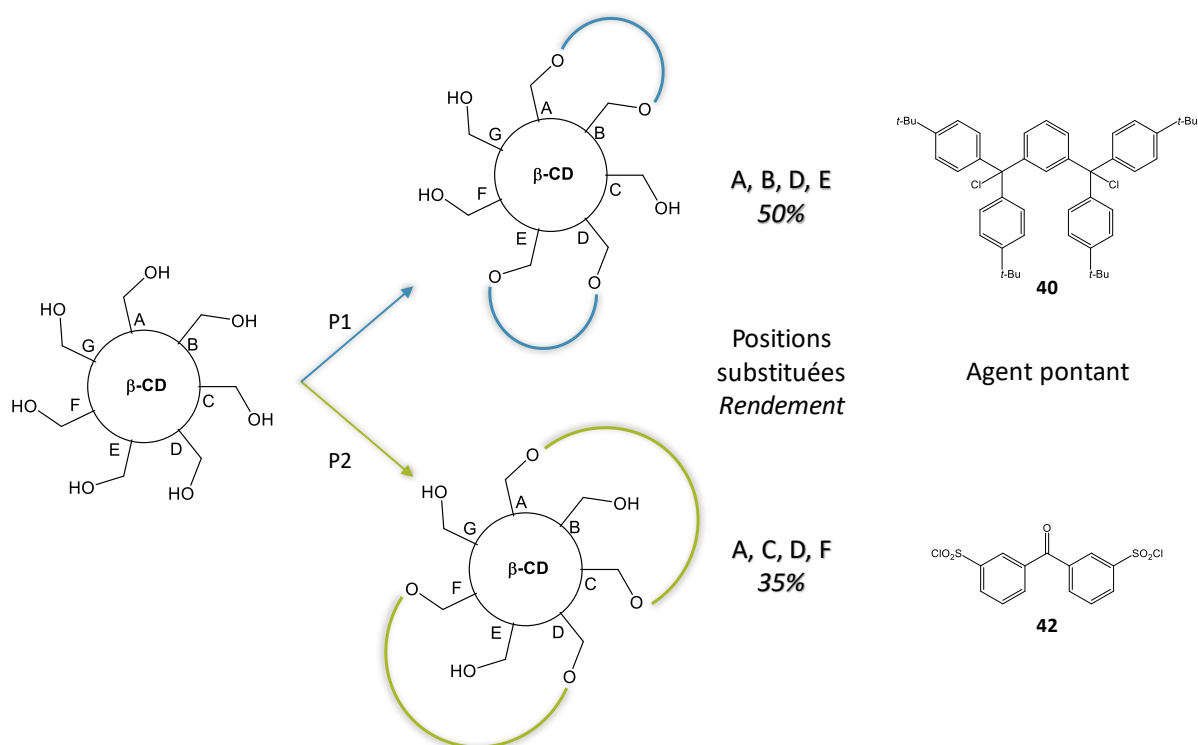


Figure 48 : Agents pontants utilisés pour la tétra-substitution de la face I de la β -CD sur les positions A, B, D, E et A, C, D, F ainsi que les rendements du pontage associé

4. Conclusion

Il existe deux types d'agents de pontage : le dérivé dichloré (**40**) pour l'application de la stratégie 1 et les dérivés disulfonylés (**41-45**) pour l'application de la stratégie 4. Le choix de l'agent pontant se fait, dans un premier temps, en fonction du type de CD finale recherchée et donc de la stratégie adoptée. Ensuite, pour ce qui est de la stratégie 4, la régio-substitution pourra être sélectionnée en fonction de l'agent disulfonylé utilisé.

Pour la stratégie 1, la di- ou tétra-substitution par l'agent **40**, suivi de la perméthylation de l'ensemble des hydroxyles libres puis de la déprotection de l'agent pontant en conditions acides (HBF_4) conduit aux composés di- et tétra-hydroxylés.^[142] Les hydroxyles ainsi libérés peuvent, par la suite, soit subir des modifications fonctionnelles (mésylate, azoture, amine...) puis être fonctionnalisés^[142], soit être directement fonctionnalisés par attaque nucléophile des alcoolates sur l'électrophile choisi.

Concernant l'aménagement fonctionnel de l' α -CD qui est plus petite, la technique privilégiée est l'utilisation de groupement très encombrants car les répulsions stériques sont plus efficaces (stratégie 2).

B. Les agents encombrants

La stratégie 2 consiste principalement en la protection statistique par des trityles (Tr)^[144] ou supertrityles (^sTr)^[145] de la face primaire de l' α -CD (Figure 49), en favorisant le nombre de substitutions par un choix stratégique des conditions opératoires (Figure 50).

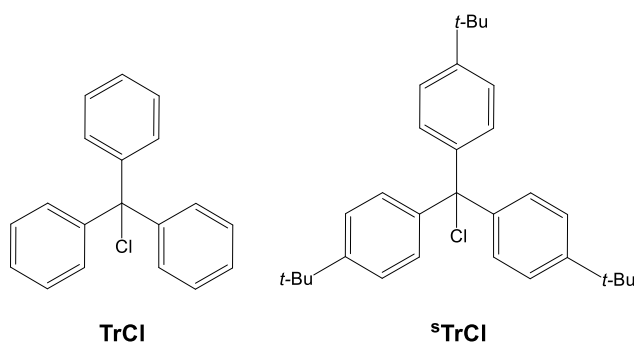


Figure 49 : Structures des agents protecteurs encombrant trityle (Tr) et super trityle (^sTr)

Le nombre d'équivalents d'agent protecteur *versus* celui de cyclodextrine, la température et le temps de réactions représentent les paramètres à étudier en fonction des structures finales désirées. Aucune technique n'est réellement sélective, mais il est possible de favoriser la formation d'un produit par rapport à un autre. Les rendements présentés correspondent aux composés per-méthylés, plus facilement isolables par chromatographie sur gel de silice.

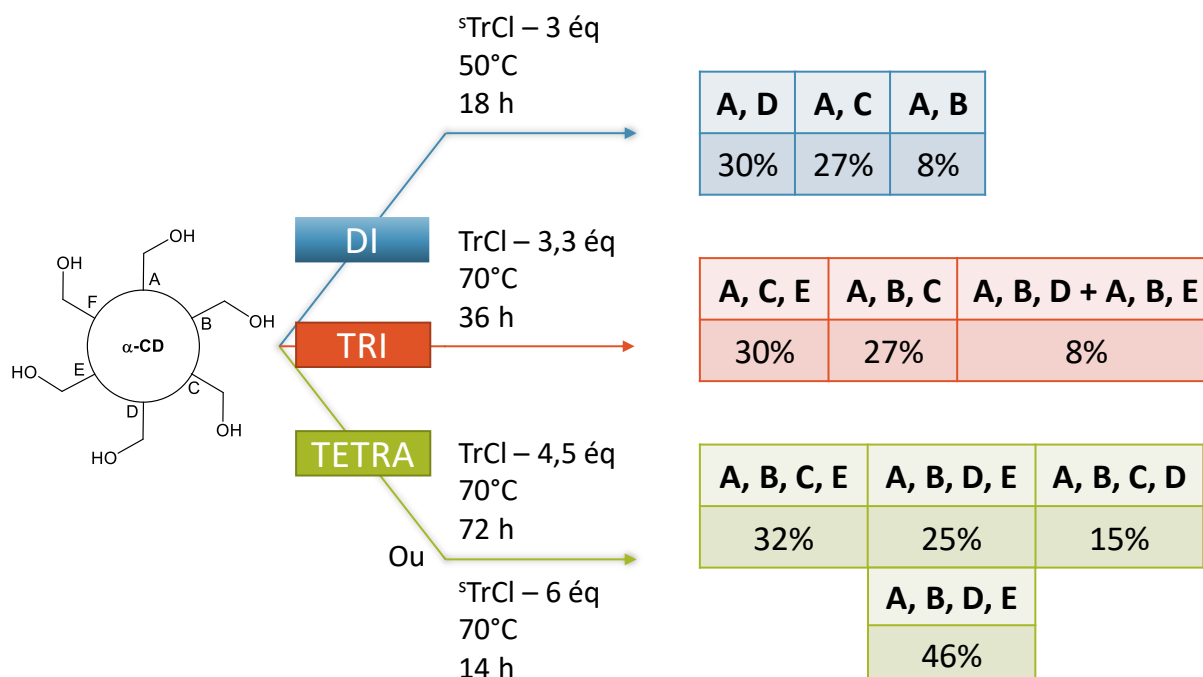


Figure 50 : Conditions opératoires optimisés pour di-^[146], tri-^[144] et tétra-^[144,145] substitution de la face I de l'α-CD

Ainsi, l'augmentation du nombre d'équivalent des trityles, la température et le temps de réaction favorise les degrés de substitution plus élevés. Le super-trityle permet quant à lui, de favoriser la di-substitution en présence de 3 équivalents mais également la tétra-substitution avec 6 équivalents. Cette meilleure régiosélectivité s'explique par son encombrement stérique plus important. L'augmentation de rendement de 25% à 46% entre le TrCl et le $^5\text{TrCl}$, respectivement, est notable, pour l'accès à l'α-CD 6A,6B,6D,6E fonctionnalisée.

Dans la même logique que pour la stratégie 1 et le dérivé **40**, les trityles ou super-trityles seront ensuite déprotégés en conditions acides ($\text{HCl}^{[147]}$, $\text{TFA}^{[148]}$, $\text{HBF}_4^{[145]}$, etc.) pour libérer les fonctions hydroxyles qui pourront par la suite être fonctionnalisés.

C. La déprotection sélective

L'équipe de Sinaï a développé et longuement étudié la déprotection sélective des CDs per-benzylées par action de l'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H). En jouant sur les conditions réactionnelles telles que la température, la concentration et le nombre d'équivalents de DIBAL-H engagés, ils ont ouvert l'accès aux CDs mono-, di-, tri- et tétra-hydroxylées avec l'ensemble des autres positions protégées par des groupements benzyles (Figure 51).

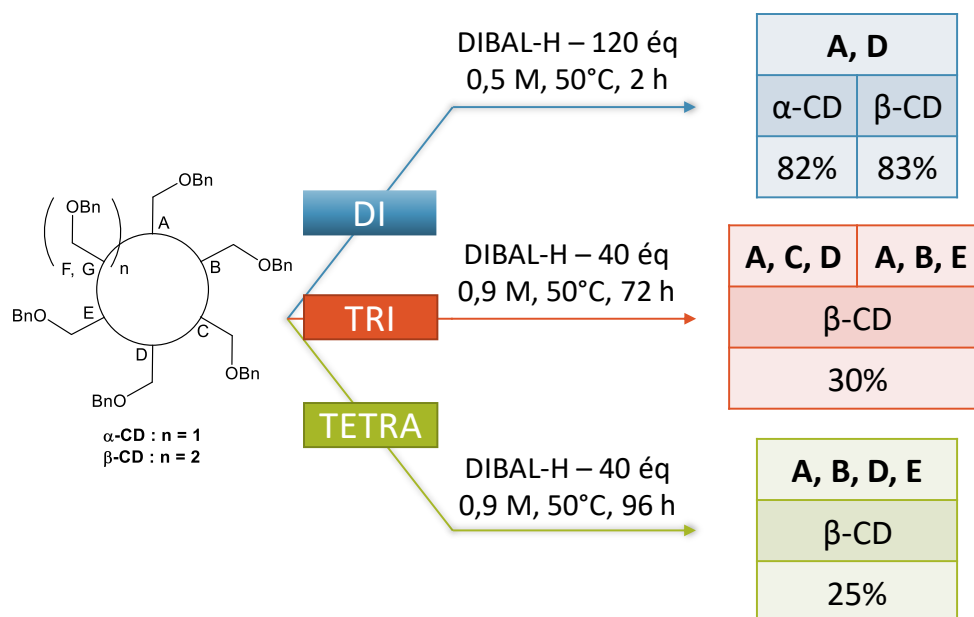


Figure 51 : Conditions opératoires optimisés pour accéder au α - et/ou β -CD di-^[149], tri-^[150] et tétra-^[150] hydroxylés

Ces conditions de déprotection au DIBAL-H ont également été testées sur des CDs perméthylées. La face secondaire étant alors moins encombrée, les groupements méthoxy en positions 2 et 3 se chélatent à l'aluminium favorisant ainsi une déprotection sur la face secondaire plutôt que sur la primaire.^[151]

D. Conclusion

L'aménagement fonctionnel de la face primaire des CDs peut s'effectuer suivant plusieurs voies de synthèse utilisant des réactifs aux propriétés différentes. Ainsi, celui de la β -CD se fait principalement par l'utilisation d'agents pontant dont deux catégories ont été mises en avant : la première utilisant l'agent dichloré **40** pour accéder à une β -CD di- ou tétra-hydroxylée avec le reste des hydroxyles protégés (Stratégie 1) et une deuxième utilisant les agents sulfonylés **41 – 44** pour accéder à une β -CD di- ou tétra-fonctionnalisée natives avec de plus faibles rendements (Stratégie 4).

L'aménagement fonctionnel de l' α -CD se fait, quant à lui, principalement par une étape de régio-protection avec des agents encombrants (Stratégie 2). Le TrCl reste le réactif privilégié pour accéder à l' α -CD tri-hydroxylée. Cependant, pour accéder aux dérivés di- et tétra-hydroxylés, le 5 TrCl a montré de meilleurs résultats grâce à son encombrement stérique plus important.

Une alternative plus récente consiste en la déprotection sélective d'α- et β-CD per-benzylée permettant de libérer deux hydroxyles, avec d'excellents rendements de 80%, puis trois et quatre hydroxyles avec des rendements de l'ordre de 30% similaires à ceux rencontrés avec les autres voies de synthèses (Stratégie 3).

Pour remplir les objectifs de cette thèse, les aménagements fonctionnels libérant quatre hydroxyles sur la β-CD et trois hydroxyles sur l'α-CD, menant respectivement au composé tétrol **46** et triol **47**, doivent être effectués (Schéma 1). Pour des facilités de synthèse et de purification les CDs seront per-méthylées. Ainsi, pour chacun des composés, une seule voie de synthèse est décrite. L'accès au Tétrol **46** se fera en suivant la stratégie 1 avec le ligand pontant dichloré **41** permettant la libération de quatre hydroxyles sur les positions A, B, D et E. L'accès au Triol **46** sera envisagé par la stratégie 2, plus adaptée à l'α-CD, par protection statistique en utilisant des groupements trityle. En effet, aucune voie de synthèse utilisant le ⁵TrCl n'est à ce jour décrite pour accéder au composé d'α-CD tri-hydroxylé. La symétrie du composé **47** facilitera les caractérisations des dérivés de CD synthétisés et permettra, *in fine*, une chélation équidistante du Gd(III).

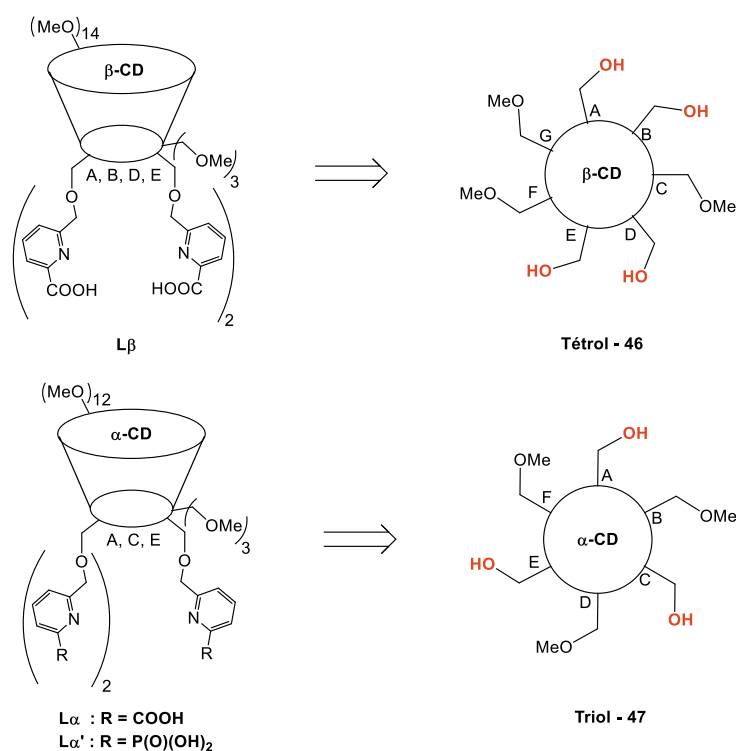


Schéma 1 : Rétrosynthèse pour accéder aux composés cibles Lβ, Lα et Lα' à partir des deux précurseurs de CD Tétrol 46 et Triol 47

V. Bibliographie

- [8] L. Helm, A. E. Merbach, É. Tóth, Eds., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, **2013**.
- [43] S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, E. Terreno, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, S200–S208.
- [44] E. Balogh, M. Mato-Iglesias, C. Platas-Iglesias, É. Tóth, K. Djanashvili, J. A. Peters, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8719–8728.
- [45] D. A. Fulton, E. M. Elemento, S. Aime, L. Chaabane, M. Botta, D. Parker, *Chem. Commun.* **2006**, *0*, 1064–1066.
- [46] D. A. Fulton, M. O'Halloran, D. Parker, K. Senanayake, M. Botta, S. Aime, *Chem. Commun.* **2005**, *0*, 474–476.
- [47] V. S. Vexler, O. Clément, H. Schmitt-Willich, R. C. Brasch, *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, *4*, 381–388.
- [48] C. Kojima, B. Turkbey, M. Ogawa, M. Bernardo, C. A. S. Regino, L. H. Bryant, P. L. Choyke, K. Kono, H. Kobayashi, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7*, 1001–1008.
- [49] Z. Kotková, J. Kotek, D. Jiráček, P. Jendelová, V. Herynek, Z. Berková, P. Hermann, I. Lukeš, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10094–10102.
- [50] K. W.-Y. Chan, W.-T. Wong, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2428–2451.
- [51] A. Forgács, G. B. Giovenzana, M. Botta, E. Brücher, I. Tóth, Z. Baranyai, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2074–2086.
- [52] Q. L. Vuong, P. Gillis, A. Roch, Y. Gossuin, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**.
- [53] S. Laurent, S. Boutry, I. Mahieu, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4712–4727.
- [54] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- [55] D. L. J. Thorek, A. K. Chen, J. Czubryna, A. Tsourkas, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 23–38.
- [56] C. F. G. C. Geraldes, S. Laurent, *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, *4*, 1–23.
- [57] Y.-X. J. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin, *Eur. Radiol.* **2001**, *11*, 2319–2331.
- [58] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, M. Port, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1471–1504.
- [59] Z. Shen, A. Wu, X. Chen, *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 1352–1364.
- [60] Y.-X. J. Wang, *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 13400–13402.
- [61] L. Zeng, W. Ren, J. Zheng, P. Cui, A. Wu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 2631–2636.
- [62] K. M. Ward, A. H. Aletras, R. S. Balaban, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 79–87.
- [63] P. C. M. van Zijl, N. N. Yadav, *Magn. Reson. Med.* **2011**, *65*, 927–948.
- [64] E. Vinogradov, A. D. Sherry, R. E. Lenkinski, *J. Magn. Reson.* **2013**, *229*, 155–172.
- [65] Y. Li, H. Chen, J. Xu, N. N. Yadav, K. W. Y. Chan, L. Luo, M. T. McMahon, B. Vogelstein, P. C. M. van Zijl, S. Zhou, et al., *Oncotarget* **2016**, *7*, 6369–6378.
- [66] E. Terreno, D. D. Castelli, S. Aime, *Contrast Media Mol. Imaging* **2010**, *5*, 78–98.
- [67] S. Aime, L. Calabi, L. Biondi, M. De Miranda, S. Ghelli, L. Paleari, C. Rebaudengo, E. Terreno, *Magn. Reson. Med.* **2005**, *53*, 830–834.
- [68] D. L. Longo, W. Dastrù, G. Digilio, J. Keupp, S. Langereis, S. Lanzardo, S. Prestigio, O. Steinbach, E. Terreno, F. Uggeri, et al., *Magn. Reson. Med.* **2011**, *65*, 202–211.

- [69] K. Snoussi, J. W. M. Bulte, M. Guéron, P. C. M. van Zijl, *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 998–1005.
- [70] O. M. Evbuomwan, E. Terreno, S. Aime, A. D. Sherry, in *Chem. Mol. Imaging*, John Wiley & Sons, Inc, **2014**, pp. 225–243.
- [71] M. Woods, D. E. Woessner, A. D. Sherry, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 500–511.
- [72] S. Aime, D. Delli Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4527–4529.
- [73] J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 10158–10163.
- [74] M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer, A. Wishnia, *Nature* **1994**, *370*, 199–201.
- [75] Z. Liu, T. Araki, Y. Okajima, M. Albert, H. Hatabu, *Eur. J. Radiol.* **2014**, *83*, 1282–1291.
- [76] S. J. Nelson, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, P. E. Z. Larson, A. L. Harzstark, M. Ferrone, M. van Criekinge, J. W. Chang, R. Bok, I. Park, et al., *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*.
- [77] K. Wigh Lipsø, E. S. S. Hansen, R. S. Tougaard, C. Laustsen, J. H. Ardenkjær-Larsen, *Magn. Reson. Med.* **2017**, *78*, 1131–1135.
- [78] I. Tirotta, V. Dichiarante, C. Pigliacelli, G. Cavallo, G. Terraneo, F. B. Bombelli, P. Metrangolo, G. Resnati, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 1106–1129.
- [79] J. C. Knight, P. G. Edwards, S. J. Paisey, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 1415–1425.
- [80] Q. Peng, Y. Yuan, H. Zhang, S. Bo, Y. Li, S. Chen, Z. Yang, X. Zhou, Z.-X. Jiang, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 6441–6446.
- [81] T. Lammers, M. E. Mertens, P. Schuster, K. Rahimi, Y. Shi, V. Schulz, A. J. C. Kuehne, S. Jockenhoevel, F. Kiessling, *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 2669–2671.
- [82] C. Zhang, S. S. Moonshi, Y. Han, S. Puttick, H. Peng, B. J. A. Magoling, J. C. Reid, S. Bernardi, D. J. Searles, P. Král, et al., *Macromolecules* **2017**, *50*, 5953–5963.
- [83] J. Yu, V. D. Kodibagkar, W. C. and R. P. Mason, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 819–848.
- [84] G. N. Holland, P. A. Bottomley, W. S. Hinshaw, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 133–136.
- [85] J. M. Criscione, B. L. Le, E. Stern, M. Brennan, C. Rahner, X. Papademetris, T. M. Fahmy, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3946–3955.
- [86] Y.-T. Chang, C.-M. Cheng, Y.-Z. Su, W.-T. Lee, J.-S. Hsu, G.-C. Liu, T.-L. Cheng, Y.-M. Wang, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1716–1727.
- [87] T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B.-T. Doan, F. Noury, B. Badet, J.-C. Beloeil, É. Tóth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4370–4372.
- [88] K. Hanaoka, K. Kikuchi, Y. Urano, M. Narazaki, T. Yokawa, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1027–1032.
- [89] M. Regueiro-Figueroa, S. Gündüz, V. Patinec, N. K. Logothetis, D. Esteban-Gómez, R. Tripier, G. Angelovski, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 10342–10350.
- [90] R. Trokowski, J. Ren, F. K. Kálmán, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6920–6923.
- [91] E. L. Que, E. Gianolio, S. L. Baker, A. P. Wong, S. Aime, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8527–8536.
- [92] W.-S. Li, J. Luo, Z.-N. Chen, *Dalton Trans.* **2010**, *40*, 484–488.
- [93] A. Moussaron, S. Vibhute, A. Bianchi, S. Gündüz, S. Kotb, L. Sancey, V. Motto-Ros, S. Rizzitelli, Y. Crémillieux, F. Lux, et al., *Small* **2015**, *11*, 4900–4909.
- [94] G. Angelovski, P. Fouskova, I. Mamedov, S. Canals, E. Toth, N. K. Logothetis, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1729–1734.
- [95] S. Aime, S. G. Crich, M. Botta, G. Giovenzana, G. Palmisano, M. Sisti, *Chem. Commun.* **1999**, 1577–1578.

- [96] L. Zhang, A. F. Martins, P. Zhao, Y. Wu, G. Tircso, D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16626–16630.
- [97] A. Villiers, in *Comptes Rendus Hebd. Séances Académie Sci. Publ. Par MM Secr. Perpétuels*, Gauthier-Villars, Paris, **1891**, pp. 536–538.
- [98] J. Szejtli, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1754.
- [99] E. M. M. Del Valle, *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046.
- [100] D. French, in *Adv. Carbohydr. Chem.*, Elsevier, **1957**, pp. 189–260.
- [101] H. Dodziuk, in *Cyclodext. Their Complexes - Chem. Anal. Methods Appl.*, Wiley-VCH, **2006**, pp. 1–26.
- [102] S. Guieu, M. Sollogoub, in *Mod. Synth. Methods Carbohydr. Chem.*, Wiley-VCH, **2013**, pp. 241–280.
- [103] W. J. Shieh, A. R. Hedges, *J. Macromol. Sci. Part A* **1996**, *33*, 673–683.
- [104] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045–2076.
- [105] H.-J. Buschmann, E. Schollmeyer, *J. Cosmet Sci* **2002**, 185–191.
- [106] Y. Xiao, S.-C. Ng, T. T. Y. Tan, Y. Wang, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1269*, 52–68.
- [107] R. B. Lauffer, T. J. Brady, *Magn. Reson. Imaging* **1985**, *3*, 11–16.
- [108] R. B. Lauffer, A. C. Vincent, S. Padmanabhan, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2216–2218.
- [109] S. Aime, M. Botta, M. Panero, M. Grandi, F. Uggeri, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 923–927.
- [110] S. Aime, M. Botta, L. Frullano, S. G. Crich, G. B. Giovenzana, R. Pagliarin, G. Palmisano, M. Sisti, *Chem. - Eur. J.* **1999**, *5*, 1253–1260.
- [111] S. Aime, M. Botta, F. Fedeli, E. Gianolio, E. Terreno, P. Anelli, *Chem. - Eur. J.* **2001**, *7*, 5261–5269.
- [112] S. Aime, E. Gianolio, F. Arena, A. Barge, K. Martina, G. Heropoulos, G. Cravotto, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *7*, 370–379.
- [113] S. Aime, E. Gianolio, G. Palmisano, B. Robaldo, A. Barge, L. Boffa, G. Cravotto, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1124–1130.
- [114] J. Martinelli, K. Thangavel, L. Tei, M. Botta, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 10944–10952.
- [115] Z. Zhou, Z. Han, Z.-R. Lu, *Biomaterials* **2016**, *85*, 168–179.
- [116] P. J. Skinner, A. Beeby, R. S. Dickins, D. Parker, S. Aime, M. Botta, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, *0*, 1329–1338.
- [117] A. Barge, G. Cravotto, B. Robaldo, E. Gianolio, S. Aime, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 489–495.
- [118] Y. Song, E. K. Kohlmeir, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6662–6663.
- [119] Y. Li, Y. Qian, T. Liu, G. Zhang, J. Hu, S. Liu, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 1743–1750.
- [120] J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1505–1509.
- [121] J. W. Fredy, J. Scelle, G. Ramniceanu, B.-T. Doan, C. S. Bonnet, É. Tóth, M. Ménand, M. Sollogoub, G. Vives, B. Hasenknopf, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1136–1139.
- [122] J. W. Fredy, J. Scelle, A. Guenet, E. Morel, S. Adam de Beaumais, M. Ménand, V. Marvaud, C. S. Bonnet, E. Tóth, M. Sollogoub, et al., *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 10915–10920.
- [123] Z. Zhou, Y. Mondjinou, S.-H. Hyun, A. Kulkarni, Z.-R. Lu, D. H. Thompson, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 22272–22276.
- [124] J. Zhou, Z. Lu, G. Shan, S. Wang, Y. Liao, *Biomaterials* **2014**, *35*, 368–377.

- [125] C. S. Bonnet, P. H. Fries, A. Gabelle, S. Gambarelli, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10401–10413.
- [126] D. Maffeo, M. Lampropoulou, M. Fardis, Y. G. Lazarou, I. M. Mavridis, D. A. I. Mavridou, E. Urso, H. Pratsinis, D. Kletsas, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1910–1921.
- [127] H. Idriss, F. Estour, I. Zgani, C. Barbot, A. Biscotti, S. Petit, C. Galaup, M. Hubert-Roux, L. Nicol, P. Mulder, et al., *RSC Adv.* **2013**, *3*, 4531–4534.
- [128] A. Biscotti, Synthèse d'agents de Contraste Oligosaccharidiques Pour l'IRM, Université de Rouen, **2016**.
- [129] G. Gouhier, F. Estour, *Smart Contrast Agents For MRI Imaging*, **2011**, PCT/EP2009/067587.
- [130] H. IDRISS, Développement de Nouveaux Agents de Contraste Pour l'IRM à Base de β -Cyclodextrine, **2013**.
- [131] I. Zgani, H. Idriss, C. Barbot, F. Djedaïni-Pilard, S. Petit, M. Hubert-Roux, F. Estour, G. Gouhier, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 564–569.
- [132] M. Elhabiri, S. Abada, M. Sy, A. Nonat, P. Choquet, D. Esteban-Gómez, C. Cassino, C. Platas-Iglesias, M. Botta, L. J. Charbonnière, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 6535–6546.
- [133] J. Galezowska, E. Gumienka-Kontecka, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 105–124.
- [134] N. N. Katia, A. Lecointre, M. Regueiro-Figueroa, C. Platas-Iglesias, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1689–1697.
- [135] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurphy, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- [136] D. Armspach, L. Poorters, D. Matt, B. Benmerad, F. Balegroune, L. Toupet, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2588–2592.
- [137] D.-Q. Yuan, S. Immel, K. Koga, M. Yamaguchi, K. Fujita, *Chem. – Eur. J.* **2003**, *9*, 3501–3506.
- [138] I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Yokota, L. C. Yuan, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 711–712.
- [139] I. Tabushi, K. Yamamura, T. Nabeshima, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5267–5270.
- [140] K. Koga, D.-Q. Yuan, K. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6855–6857.
- [141] M. Atsumi, M. Izumida, D.-Q. Yuan, K. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8117–8120.
- [142] R. Gramage-Doria, D. Rodriguez-Lucena, D. Armspach, C. Egloff, M. Jouffroy, D. Matt, L. Toupet, *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 3911–3921.
- [143] I. Tabushi, L. C. Yuan, K. Shimokawa, K. Yokota, T. Mizutani, Y. Kuroda, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2273–2276.
- [144] C.-C. Ling, A. W. Coleman, M. Miocque, *Carbohydr. Res.* **1992**, *223*, 287–291.
- [145] L. Poorters, D. Armspach, D. Matt, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 1377–1381.
- [146] D. Armspach, D. Matt, *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 129–133.
- [147] J. Boger, D. G. Brenner, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7630–7631.
- [148] L. Krejčí, M. Buděšínský, I. Císařová, T. Kraus, *Chem. Commun.* **2009**, 3557.
- [149] A. J. Pearce, P. Sinaÿ, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610–3612.
- [150] G. K. Rawal, S. Rani, S. Ward, C.-C. Ling, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *8*, 171–180.
- [151] S. Xiao, M. Yang, P. Sinaÿ, Y. Blériot, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1510–1516.

Travaux personnels

Les travaux réalisés durant cette thèse seront divisés en deux chapitres distincts.

L'axe du premier chapitre portera sur la mise au point des synthèses pour accéder aux ligands finaux **L β** , **L α** , **L α'** ainsi que sur les conditions analytiques HPLC associées indispensables. Ces travaux ont été réalisés dans les laboratoires COBRA et ICOA. L'association des connaissances des deux équipes a permis de contourner la majorité des difficultés rencontrées au cours de ces synthèses. Elles seront ici évoquées, ainsi que l'ensemble des alternatives et perspectives envisagées.

Le deuxième chapitre traitera, quant à lui, de la caractérisation physico-chimique des ligands préalablement synthétisés et de leur complexe de Gd(III) afin d'évaluer leur potentiel en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. Ces études ont été réalisées en collaboration avec l'équipe d'Eva Jakab-Tóth au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM).

Chapitre I : Développement des synthèses et analyses des ligands basées sur les β - et α -cyclodextrines

Ce chapitre est divisé en deux parties portant respectivement sur la modification de la β -CD, puis de l' α -CD.

I. Les dérivés de la β -cyclodextrine

Afin d'accéder au ligand final $L\beta$, des étapes d'aménagement fonctionnel et de greffage des groupements pyridiniques choisis étaient à développer à partir de la β -CD native (Schéma 2).

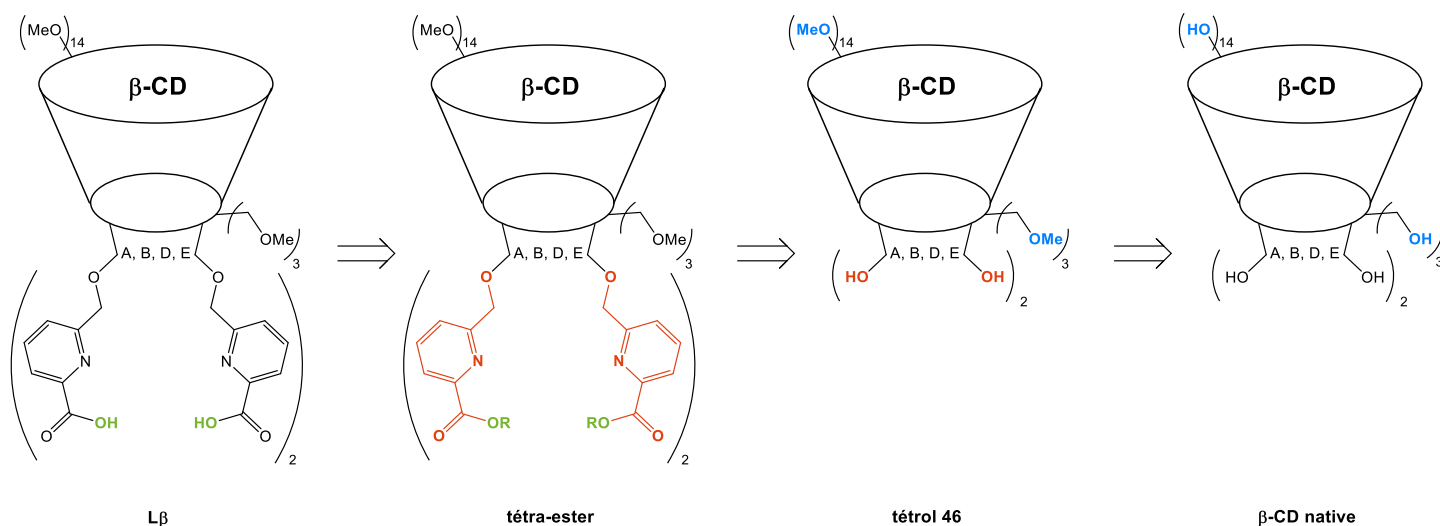


Schéma 2 : Rétrosynthèse pour accéder au ligand final $L\beta$ à partir du tétrol 46

A. Synthèse de la β -CD tétra-hydroxylée

Tétrol 46

Le précurseur β -CD tétra-hydroxylé sur la face primaire **46**, appelé ici tétrol, est le composé clé de cette synthèse pour permettre l'insertion sélective des bras pyridiniques sur les unités A, B, D et E. Cette synthèse est basée sur le protocole décrit par Armspach *et al.* utilisant l'agent pontant **41** à partir de la β -CD native (Schéma 3).^[152]

La formation de l'agent pontant dichloré **41** nécessite la synthèse du bistrityle dihydroxylé **48** synthétisé par addition de quatre équivalents de bromure de 4-(*tert*-butyl)phényl-magnesium, généré *in situ*, sur l'isophtalate de diméthyle (Schéma 3). Le composé **48** est ensuite chloré en conditions anhydres par le chlorure d'acétyle.

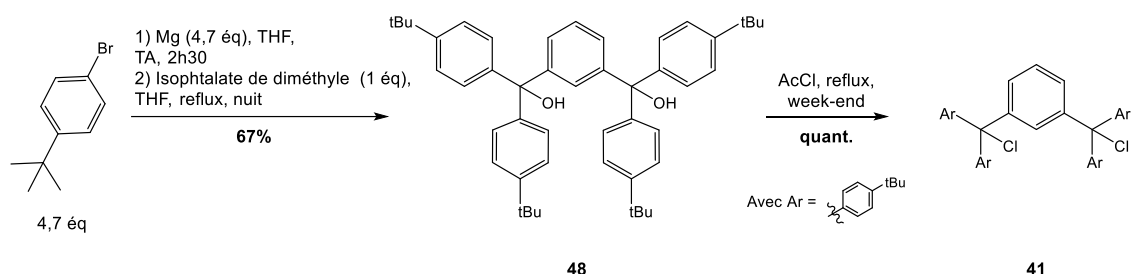


Schéma 3 : Synthèse de l'agent pontant bistrityle dichloré 41

La caractérisation du composé dichloré **41** obtenu est rendu complexe à la fois par la symétrie de sa structure et par sa similitude importante avec le dérivé **48**. Les spectres RMN ^1H du composé de départ **48** et du produit **41** sont en effet identiques et les spectres RMN ^{13}C n'ont révélé aucune variation significative du déplacement chimique du carbone quaternaire subissant la modification fonctionnelle, passant seulement de 81,8 à 81,2 ppm pour **48** et **41** respectivement (Figure 52). Par contre, les déplacements chimiques des signaux des carbones aromatiques compris entre 120 et 150 ppm, ont quant à eux subi une légère évolution. Le composé **48** n'étant pas décrit dans la littérature, aucune référence n'était disponible pour confirmer le passage de **48** à **41**.

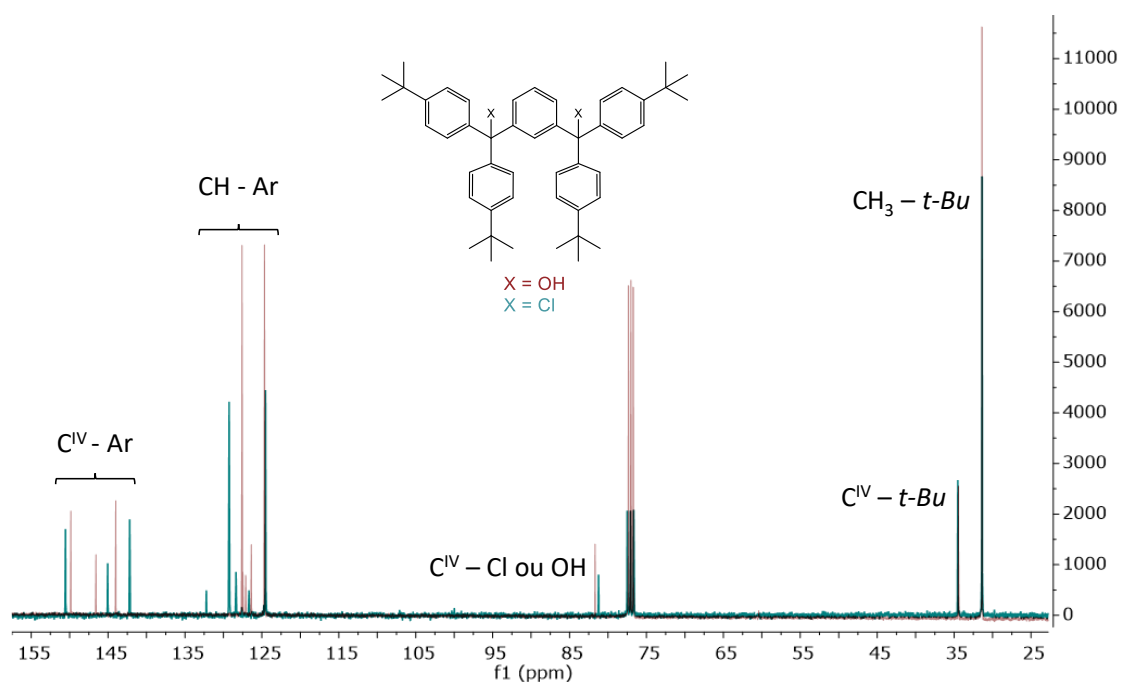


Figure 52 : Comparaison des spectres RMN ^{13}C à 25°C et 400 MHz du composé DiOH 48 et DiCl 41

De plus, les analyses en spectrométrie de masse du composé **41** ont permis d'identifier des pics à des rapports m/z de 663,4 ; 680,5 et 694,5, révélant ainsi des écarts inexpliqués par rapport au pic attendu à m/z = 703,4 (Figure 53).

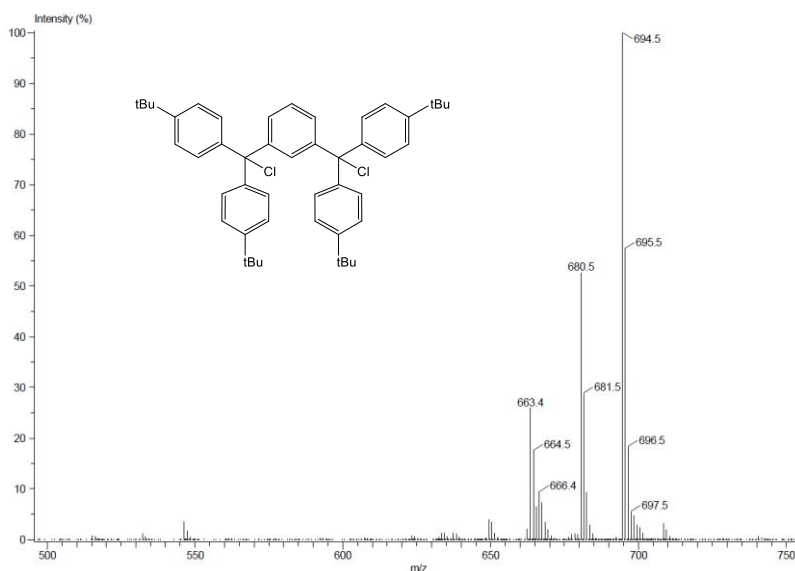


Figure 53 : HRMS du composé DiCl 41 (ES^+)

En l'absence d'analyses concluantes permettant d'établir avec certitude la structure du composé **41**, ce dérivé a été engagé dans la réaction de substitution nucléophile avec la β -CD native (Schéma 4) en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et de 2,2 équivalents de l'agent dialkylant **41**. Le mélange issu de l'alkylation a ensuite été directement engagé dans

l'étape suivante de perméthylation réalisée en présence d'hydruide de sodium et d'un large excès d'iodure de méthyle. La β -CD bis dipontée **49** en position A, B, D et E et perméthylée a pu être isolée ce qui a permis de confirmer, *a posteriori*, l'obtention quantitative du composé **41** selon le protocole décrit par Armspach *et al.*. Le composé **49** a ainsi été synthétisé avec un rendement de 29%.

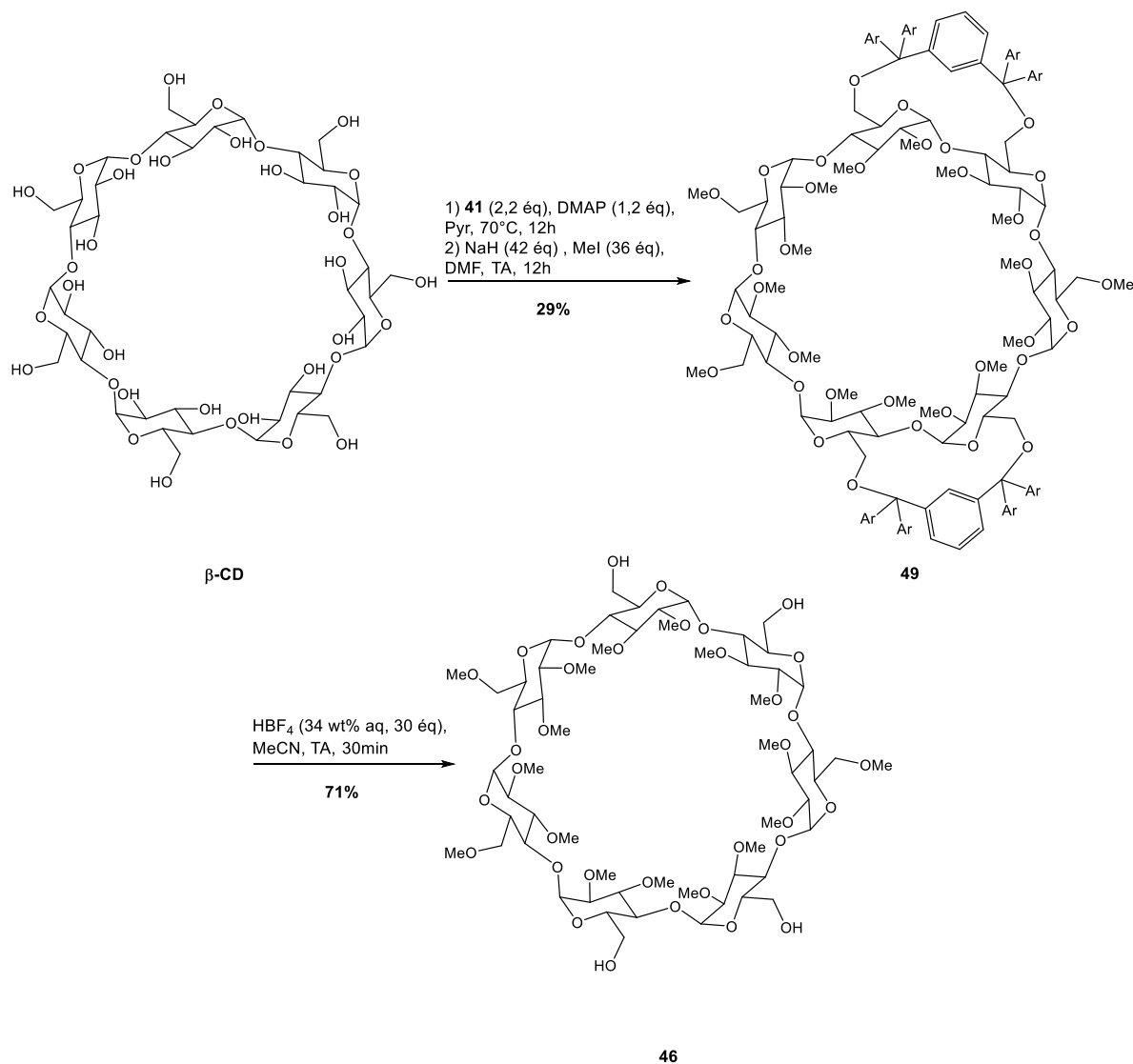


Schéma 4 : Synthèse du tétrol **46**

La tétra-substitution de la β -CD perméthylée a été confirmé par HRMS dont le pic moléculaire à $m/z = 2635,4963$ représente l'espèce $[M + H]^+$. Par comparaison des spectres RMN 1H et ^{13}C obtenus avec ceux précédemment décrits, il a été possible de confirmer la formation du composé **49** dont la structure avait été de surcroît étudiée par diffraction des Rayons X d'un monocristal par l'équipe d'Armspach.^[142]

Il est toutefois à noter que la montée en échelle de cette réaction fait grandement chuter le rendement passant de 38% pour une réaction effectuée sur 4 g de β -CD native à 25% et 16% pour des réactions effectuées respectivement sur 13 et 17 g d'oligosaccharide. Nous avons ainsi privilégié la préparation du composé **49** sur la base de plusieurs réactions lancées en parallèle et sur une plus petite échelle.

Enfin, la déprotection en conditions acides du composé **49**, initialement décrite comme quantitative, a permis dans notre cas d'obtenir le tétrol **46** avec, avec un rendement appréciable de 71%.^[152]

B. Tétra-fonctionnalisation du Tétrol **46** par la pyridine-carboxylate de méthyle **52**

1. Synthèse de la pyridine-carboxylate de méthyle : 6-bromométhyl-2-pyridinecarboxylate de méthyle **52**

Le premier dérivé pyridinique sélectionné pour fonctionnaliser le tétrol fut le 6-bromométhyl-2-pyridinecarboxylate de méthyle **52** portant en position 6 un substituant bomométhyle substituable par un alcoolate. En position 2 un ester méthylique hydrolysable permettra *in fine* d'obtenir les fonctions acides carboxyliques chélatantes du ligand **L β** (Schéma 5). Les conditions réactionnelles utilisées pour cette synthèse ont été décrites par Orvig *et al.*^[153] L'accès à l'ester méthylique **52** nécessite une première étape de réduction d'une des deux fonctions esters du 2,6-dicarboxylate de diméthylpyridine **50**, obtenu avec 35% de rendement (Schéma 5). Ce rendement, certes plus faible de 15% que celui décrit dans la littérature, est dû au parti pris de limiter la formation du produit diréduit pour permettre d'isoler plus facilement le diester **50** n'ayant pas réagi et ainsi de le réengager dans une nouvelle réaction. Le rendement, corrigé de la matière première non réagit, atteint alors jusqu'à 70%. L'alcool **51** est ensuite bromé par action d'un léger excès de tribromure de phosphore pour conduire au dérivé bromé **52** souhaité avec un excellent rendement de 95 % (Schéma 5).

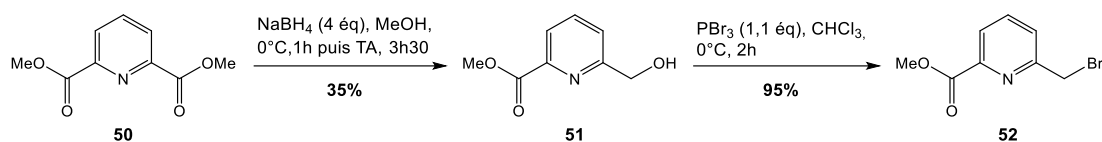


Schéma 5 : Synthèse du 6-bromométhylpicolinate de méthyle 52

2. Synthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée 53

La tétra-fonctionnalisation du tétrol **46** a été réalisée *via* une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2) du dérivé pyridinique **52** (Schéma 6).

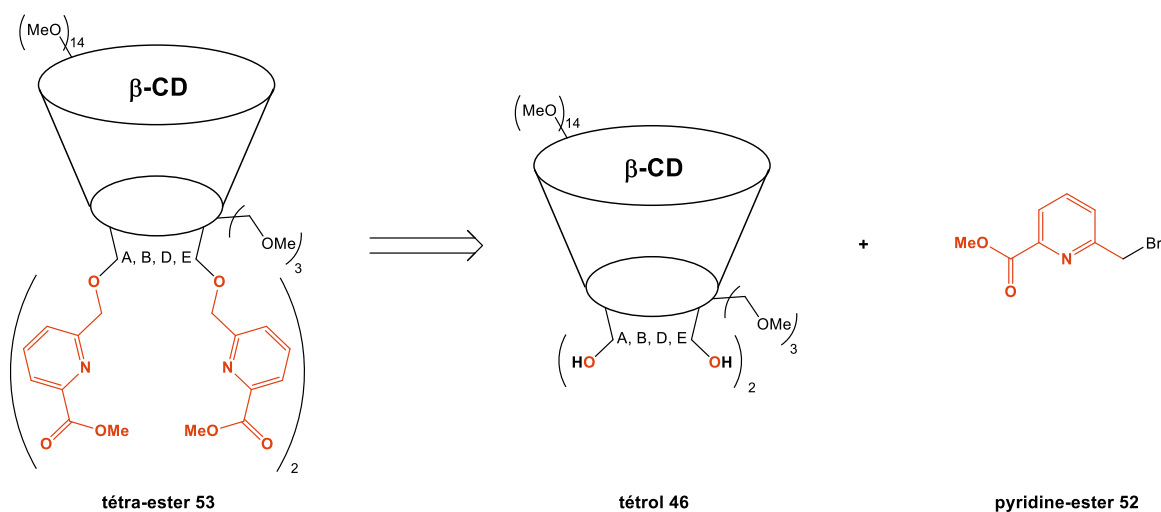


Schéma 6 : Rétrosynthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée 53 à partir du tétrol 46 et de la pyridine-ester Me 52

Dans un premier temps, des conditions usuelles de S_N2 précédemment utilisées au laboratoire ont été testées mettant en œuvre une première étape de déprotonation au NaH des alcools du macrocycle dans le THF ou le DMSO, suivie de l'addition à température ambiante du réactif électrophile **52**.^[131,154,155] Trois premiers essais ont ainsi été réalisés (Tableau 25) dans le THF (Entrée 1) ou le DMSO (Entrées 2 et 3) en faisant varier la quantité de l'électrophile additionné de 4,1 équivalents par rapport aux 4 hydroxyles libres du tétrol **46** (Entrées 1 et 2) à un large excès de 12 équivalents (Entrée 3), tout en jouant sur la durée de réaction de 1 à 5 jours.

#	Base	Equivalent 52	Solvant	Temp.	Durée	Dérivés de CD formés
1	NaH	4,1	THF	TA	5 j	46 /mono/di/tri/ 53
2	NaH	4,1	DMSO	TA	5 j	46 /mono/di/tri/ 53
3	NaH	12	DMSO	TA	1 j	46 /mono/di/tri/ 53

Tableau 25 : Conditions réactionnelles des premiers essais de fonctionnalisation du tétrol 46 par la pyridine-ester Me 52

Détermination des produits formés effectuée par SM sur les mélanges bruts

Chacune de ces réactions entraîne la formation de dérivés de CD avec des degrés de fonctionnalisation plus ou moins élevés (mono-, di-, tri- ou le produit **53** souhaité tétra-fonctionnalisé). De par la présence de ces différents produits en mélange, la CD **53** n'a jamais pu être isolée pure par chromatographie sur gel de silice, ne permettant pas de quantifier les résultats. Certains sous-produits ont cependant été eux isolables, et de ce fait, identifiables par RMN et HRMS. La structure hypothétique des autres composés non-isolables a été proposée sur la base des spectres de masse obtenus à partir du mélange.

Pour faciliter le suivi de l'analyse, nous avons classé ces différents sous-produits en deux catégories : les dérivés pyridiniques et les dérivés de CD (Tableau 26).

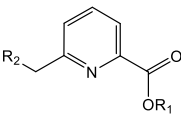
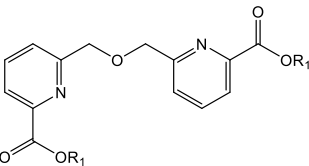
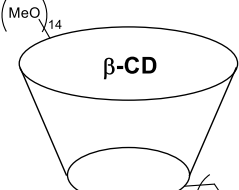
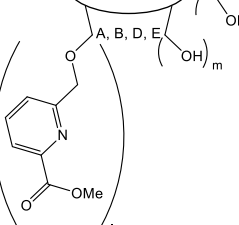
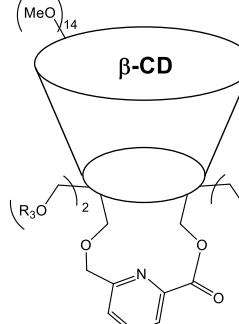
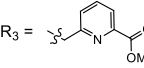
Sous-produits déterminés par SM	
Dérivés de la pyridine-ester Me 52	Dérivés de la CD
 DP1 : R₁ = Me et R₂ = OH DP2 : R₁ = H et R₂ = Br DP3 : R₁ = Me et R₂ = OMe  DP4 : R₁ = Me et R₁' = Me DP5 : R₁ = H et R₁' = Me DP6 : R₁ = H et R₁' = H	 β-CD  mono : l = 1 et m = 3 di : l = 2 et m = 2 tri : l = 3 et m = 1 tétra 53 : l = 4 et m = 0  trans-Me R₃ = 

Tableau 26 : Structures des sous-produits de la réaction de tétra-fonctionnalisation du tétrol 46 par la pyridine-ester Me 52 déterminés par SM

Les divers sous-produits du dérivé pyridinique **52** semblent tous être issus d'une première réaction de substitution du brome par un hydroxyle (**DP1**). Cette réaction secondaire est d'autant plus surprenante que l'ensemble de la verrerie ainsi que les produits utilisés ont tous été préalablement séchés sous vide afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau et que les réactions ont toutes été réalisées en conditions inerte sous argon. La réaction entre le dérivé **DP1**, déprotoné par le NaH en solution et le composé bromé **52** entraîne la formation du dimère **DP4** correspondant à un produit d'homocouplage. L'hydrolyse des esters méthyliques a elle aussi été observée, que ce soit sur le monomère pyridinique (**DP2**) ou sur les dimères (**DP5** et **DP6**). L'ion méthanolate ainsi généré peut substituer le brome du composé **52** pour former le dérivé **DP3**.

Les sous-produits dérivés de la cyclodextrine, dont la formation était plus prévisible, correspondent à des degrés « l » différents de fonctionnalisation du tétrol **46**, allant de l = 1 pour le dérivé mono-fonctionnalisé à l = 4 pour le dérivé tétra-fonctionnalisé **53**. Il faut noter que plusieurs régioisomères de composés mono-, di- et tri-fonctionnalisés pouvaient coexister mais qui, à ce stade, ne peuvent pas être différenciés. De plus, il semblerait qu'une réaction de transestérification intramoléculaire, entre l'ester méthylique d'un groupement pyridinique déjà inséré sur le tétrol **46** et une position hydroxyle adjacente libre du macrocycle, se produise pour former le dérivé **trans-Me** (Tableau 26). L'HRMS d'une fraction enrichie en ce composé confirme cette hypothèse avec l'apparition d'un pic à m/z = 894,8842 correspondant au composé **trans-Me** dichargé $[M + 2H]^{2+}$.

Afin de faciliter les purifications, et ainsi pouvoir isoler et donc quantifier le produit tétra-fonctionnalisé **53**, le principal objectif a été d'optimiser les conditions réactionnelles pour obtenir une meilleure efficacité de conversion du composé **46** en produit **53**, tout en minimisant la formation des sous-produits.

Pour cela, de nombreux essais d'optimisation (Tableau 27) ont été réalisés pour évaluer l'influence :

- Du nombre d'équivalent de l'électrophile **52** ajouté (4,1, 12 et 24),
- De la vitesse d'addition de l'électrophile **52** après déprotonation du tétrol **46** (instantanée ou au goutte à goutte (g à g)),
- Du solvant (THF, DMSO, DMF, 2,6-lutidine, ACN),

- De la base utilisée pour déprotoner le tétrol **46** (NaH),
- De la température (25°C, 50°C, 150°C),
- Et du temps de réaction (2 à 6 jours).

#	Base	Equivalent 52	Vitesse d'ajout 52	Solvant	Temp.	Durée*	Dérivés de CD formés déterminé par SM sur les produits bruts
1	NaH	4,1	instantané	THF	TA	> 4 j	46/mono/di/tri/53
2	NaH	4,1	instantané	DMSO	TA	> 4 j	46/mono/di/tri/53
3	NaH	12	instantané	THF	TA	> 4 j	Trans/ 53
4	NaH	12	instantané	THF	50°C	> 4 j	Trans/ 53
5	NaH	24	instantané	THF	50°C	> 4 j	Trans/ 53
6	NaH	12	g à g	THF	TA	> 4 j	Trans/ 53
7	NaH	12	instantané	THF	TA	12 h	Trans/ 53
8	NaH	12	instantané	DMSO	TA	< 2 j	46/mono/di/tri/53
9	NaH	12	instantané	DMF	TA	< 2 j	Di/trans/tri/ 53
10	NaH	12	instantané	ACN	TA	< 2 j	Di/trans/tri/ 53
11	-	12	instantané	lutidine	150°C	2 j	46

Tableau 27 : Optimisation des conditions réactionnelles de la tétra-fonctionnalisation du tétrol **46 par la pyridine-ester **Me 52****

Détermination des produits formés effectuée par SM sur les mélanges bruts

*Les temps de réaction > 4 j sont compris entre 4 j et 6 j

*Les temps de réaction < 2 j sont compris entre 12 h et 48 h

L'utilisation de 4,1 équivalents d'électrophile **52** dans le THF ou le DMSO n'a pas permis une conversion efficace du tétrol **46** en produit tétra-fonctionnalisé **53**, et a conduit à la formation d'un mélange complexe composé du réactif de départ **46** et de tous les dérivés de CD présentant différents degrés de substitution (Entrées 1 et 2). Afin d'améliorer la conversion en produit **53**, la quantité d'électrophile **52** ajouté a été augmentée à 12 équivalents (3 équivalents par fonction hydroxyle) dans le THF. Ceci a permis d'améliorer le taux de conversion en évitant la formation de dérivés de faibles degrés de substitution (mono, di, tri) mais n'a cependant pas empêcher la réaction secondaire de trans-estérification conduisant au composé **trans-Me** (Entrées 3). Dans le but de forcer davantage la conversion, des conditions énergétiques plus importantes ont été utilisées en chauffant thermiquement le milieu réactionnel à 50°C (Entrée 4). Cependant, les analyses par SM indiquent de nouveau

que la formation du composé tétra **53** est accompagnée de celle du composé **trans-Me**. Une hypothèse pour expliquer la formation de ce sous-produit a été de supposer un déficit en électrophile **52** dans le milieu dû, entre autres, à sa dégradation dans les conditions réactionnelles utilisées (Tableau 26 – **DP1-6**). La même réaction à 50°C a donc été réalisée doublant la quantité d'électrophile **52** (24 équivalents) (Entrée 5). Cependant, la formation du sous-produit **trans-Me** très contraignant pour la purification n'a pas pu être contournée. Nous avons alors décidé d'ajouter l'agent d'alkylation **52** goutte à goutte (Entrée 6) afin de limiter sa présence dans le milieu réactionnel basique avant substitution, mais aucune amélioration apparente n'a pu être mise en évidence. Afin de s'assurer que le temps réaction supérieur à 4 jours n'était pas la cause de la formation des sous-produits, celui a été diminué à 12 h (Entrée 7) et a montré des résultats similaires aux précédents signifiant qu'un temps de réaction long n'est pas nécessaire. A partir de ces résultats, différents solvants (DMSO, DMF, ACN) connus pour favoriser les SN_2 (Entrée 8 – 10) ont été criblés, sans qu'aucune amélioration ne soit constatée par rapport au THF. En complément, la réaction a été testée dans la 2,6-lutidine qui permet d'activer l'électrophile par formation du bromure de lutidinium (Entrée 11). Ces conditions avaient été étudiées par l'équipe de D'Souza et permis la monoalkylation de la face primaire de la β -CD avec un rendement de 35%.^[156] Cependant, en utilisant les mêmes conditions que décrites dans la littérature, seul le produit de départ **46** a été détecté en SM après 2 jours de réaction.

L'ensemble des conditions testées ne nous a jamais permis d'obtenir une conversion totale en composé **53**. De plus, les meilleures purifications réalisées ont permis d'obtenir, au mieux, un mélange de trans, tétra **53** et **DP4** de polarités très proches, ce qui ne nous a jamais permis de quantifier les résultats. Il semblerait cependant que les meilleures conditions, permettant l'accès à un mélange tétra-ester **53** / **trans-Me**, soit l'utilisation du NaH (12 équivalents), dans le THF suivi de l'ajout de 12 équivalents d'électrophile **52** (Schéma 7). Cependant, sans possibilité de quantifier les résultats il est difficile de comparer l'influence de la vitesse d'ajout de l'électrophile **52**, de la température et du temps de réaction.

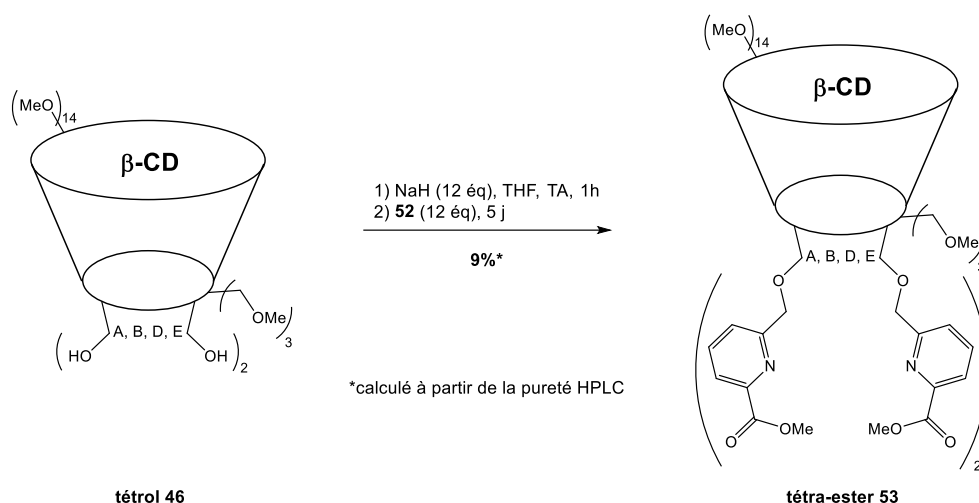


Schéma 7 : Synthèse de la β-CD tétra-fonctionnalisée 53

Afin d'améliorer la conversion et/ou de faciliter la purification du composé **53**, deux stratégies alternatives ont été explorées en parallèle. La stratégie alternative 1 s'est focalisée sur la modification de la nature du lien entre la CD et le motif pyridinique en envisageant une fonction amine, celle-ci présentant l'avantage d'être plus nucléophile que les hydroxyles. La stratégie alternative 2 s'est concentrée, quant à elle, sur la modification de l'ester méthylique **52** pour obtenir un ester plus stable dans les conditions réactionnelles utilisées et ainsi espérer éviter plus particulièrement la formation du sous-produit **trans-Me**.

C. Stratégie alternative 1 : Tétra-fonctionnalisation par une liaison amine

Le choix d'un lien éther-oxyde entre les ligands et le macrocycle avait été fait compte-tenu de sa stabilité dans des conditions physiologiques (résistance à l'hydrolyse chimique et enzymatique). Cependant, divers ACs à base de CDs décrits dans la littérature présentaient divers chélates de Gd(III) liés aux CDs par des liaisons amides (Tableau 21 – **30**)^[116], triazole (Tableau 21 – **32, 33, 34**)^[65,118,120] et amine (Tableau 21 et Tableau 22 – **31, 37**)^[117,126].

Afin de suivre la logique de la stratégie initiale qui consiste à lier le dérivé tétrol **46** à un motif pyridinique par un hétéroatome, nous avons orienté la stratégie alternative 1 sur la formation d'une liaison amine.

Pour cela, deux voies de synthèse, stratégiquement opposées, ont été explorées pour fonctionnaliser la β-CD (Schéma 8). La voie 1 est basée sur l'attaque nucléophile du dérivé

aminé **55** sur le composé de β -CD tétra-mésylé **54**. L'esther méthylique du groupement pyridinique a, par la même occasion, été modifié en un ester *tert*-butylique, plus encombré et ainsi plus stable en milieu basique. La voie 2, quant à elle, inverse les rôles en faisant réagir la β -CD tétra-aminée **58** sur l'électrophile **59**.

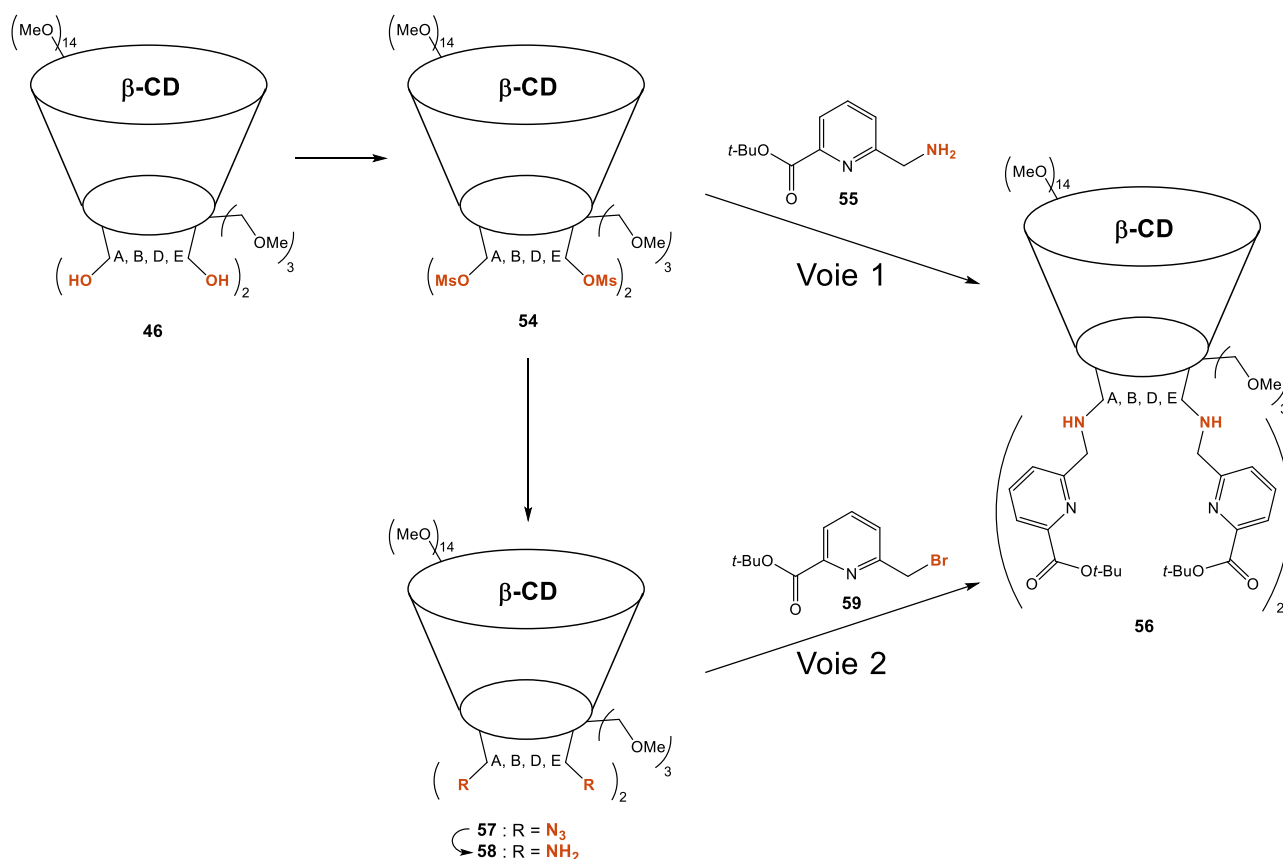


Schéma 8 : Stratégie alternative 1 : Voies de synthèses 1 et 2 envisagées pour accéder au composé tétra-fonctionnalisé 56

1. Aménagement fonctionnel du tétrol **46**

L'accès au composé tétra-mésylé **54** a été décrit par Armspach *et al.* à partir du tétrol **46**.^[152] Ce dernier mis en solution dans la pyridine avec 4 équivalents de DMAP, conduit par addition de chlorure de mésyle au composé **54** avec 95% de rendement. Il est à noter que le composé **54** engagé dans la voie 1 est également le précurseur du composé tétra-aminé **58** nécessaire pour la voie 2 (Schéma 9).

La voie de synthèse pour transformer le composé tétra-mésylé **54** en composé tétra-aminé **58** a été choisie en se basant sur la littérature. Les équipes de Yannakopoulou et Komiyama ont en effet, respectivement, décrit le passage de cyclodextrines natives bromées ou tosylées en

amine en deux étapes.^[126,157] Le groupement partant est tout d'abord substitué par une fonction azoture qui est ensuite réduite par réaction de Staudinger. Ainsi, le composé **54** a été engagé pendant 3 jours avec un excès de triazoture de sodium dans le DMF pour former avec 74% de rendement le composé tétra-azoturé **57** qui a ensuite été réduit quantitativement pour donner le composé **58**.

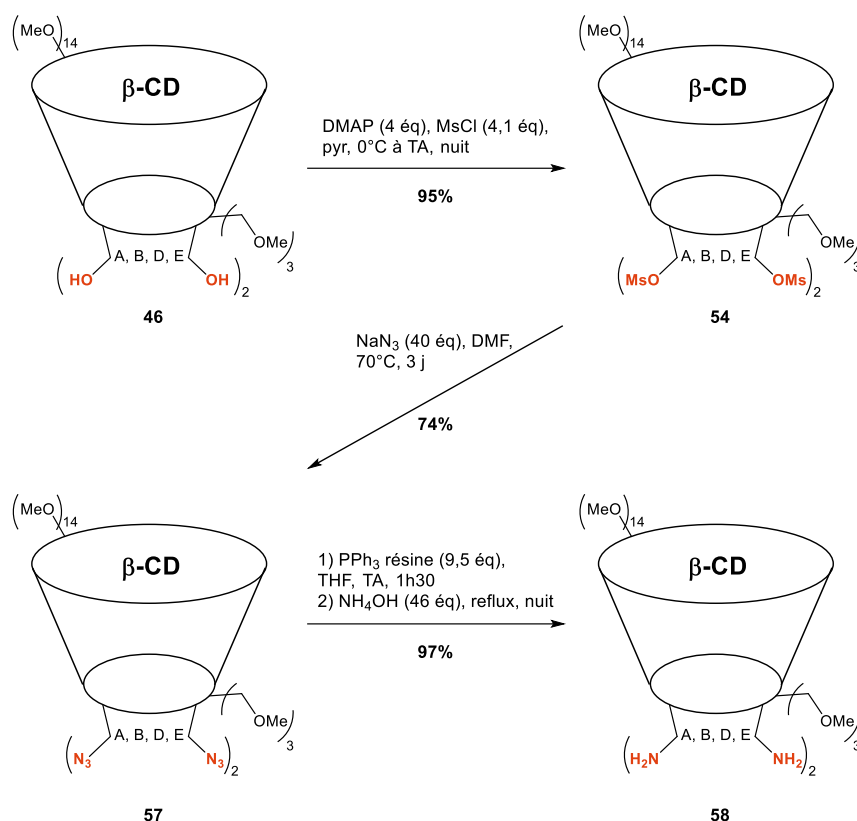


Schéma 9 : Synthèse des dérivés de CD tétra-mésylé **54, tétra-azoturé **57** et tétra-aminé **58****

2. Synthèse des pyridine-carboxylates : 6-aminométhyl- (**55**) et 6-bromométhyl- (**59**) 2-pyridinecarboxylate de *tert*-butyle

La synthèse du dérivé pyridinique aminométhylé **55** a été développée à partir de l'acide 6-méthylpicolinique **60** (Schéma 10). L'acide 6-méthylpicolinique a été dans un premier temps estérifié en présence de trichloroacétamide de *tert*-butyle avec 98% de rendement, puis le substituant méthyle en position 2 de la pyridine est bromée en conditions radicalaires. Ces conditions opératoires ont été développées par Tu *et al.* en 2001^[158] et

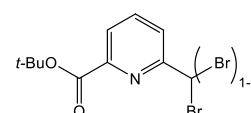


Figure 54 : Sous-produits polybromés de la synthèse de la pyridine-ester tBu **59**

utilisées au laboratoire par Fabien Caillé durant sa thèse.^[159] La bromation radicalaire des méthyles est limitée par la formation de composés polybromés (Figure 54). La simple réduction du nombre d'équivalents de *N*-bromosuccinimide (NBS) ne permet pas d'empêcher cette polybromation. Ainsi, le composé **61** est entièrement converti en produits mono-, di- et tri-bromés. Ce mélange est ensuite traité par de la diéthylphosphite en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA) permettant d'isoler le composé monobromé désiré **59** avec 64% de rendement.

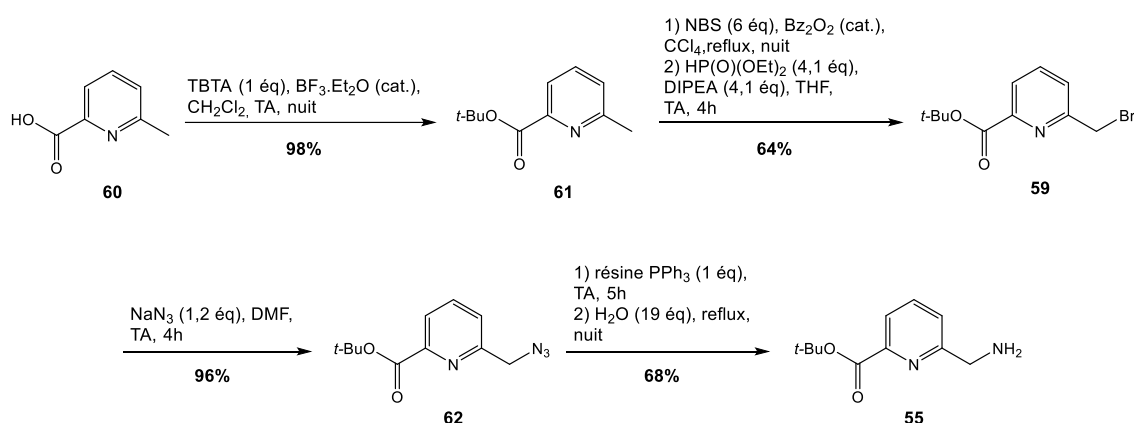


Schéma 10 : Synthèse des dérivés pyridiniques 6-bromo- (59**) et 6-amino- (**55**) 2-pyridinecarboxylate de tert-butyle**

En suivant les conditions décrites par Huc *et al.*, l'azoture **62** a été ensuite formé par réaction de l'azoture de sodium avec le dérivé bromé **59** avec un très bon rendement de 96%.^[160] Celui-ci a été réduit par réaction de Staudinger en présence de triphénylphosphine supportée sur résine, permettant ainsi d'éviter les difficultés de purification dues à la présence d'oxyde de triphénylphosphine formée durant la réaction. Le dérivé aminé **55** est ainsi synthétisé avec un bon rendement de 68%.

Le suivi de cette séquence réactionnelle peut être facilement effectuée par RMN ¹H, notamment grâce aux déplacements chimiques des protons benzyliques (Figure 55).

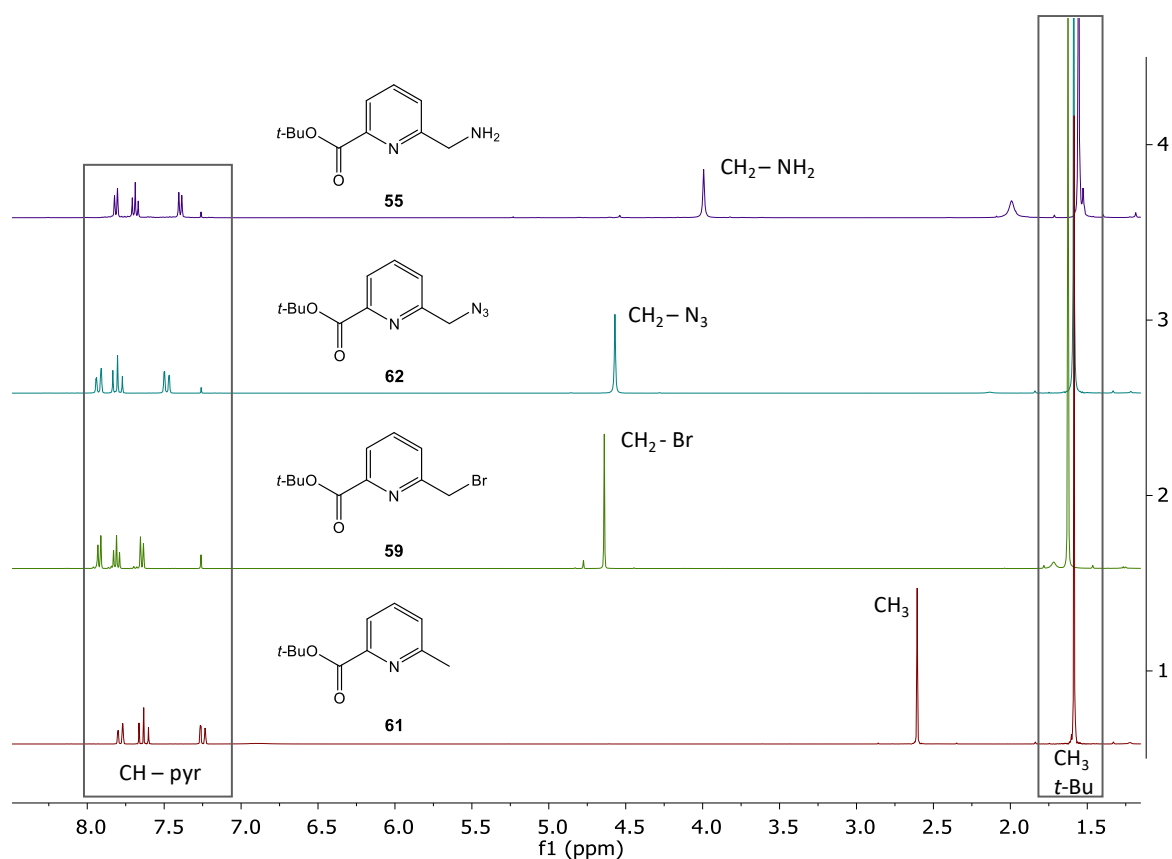


Figure 55 : RMN 1H à 25°C et 400 MHz des composés 61, 59, 62 et 55

3. Synthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée par un lien amine **56**

a. Voie 1

La voie 1 consiste en la tétra-fonctionnalisation de la β -CD tétra-mésylée **54** par un dérivé aminé (Schéma 11). Cette synthèse a été mise au point, dans un premier temps, à partir d'un substrat modèle, la benzylamine (BnNH_2).

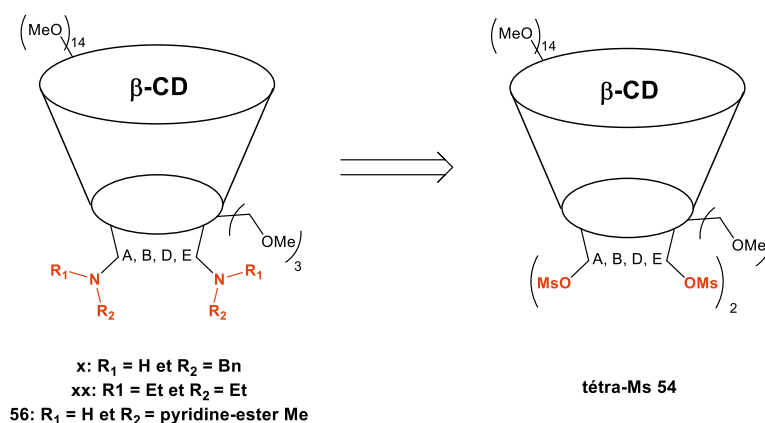


Schéma 11 : Rétrosynthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée par lien amine à partir du dérivé tétra-mésylé 54

Les essais réalisés sont résumés dans le Tableau 28. La mise en réaction de la benzylamine (8 équivalents) avec la CD possédant des groupements partants mésyle, aurait dû permettre une substitution facile des groupements partants (Entrée 1). Cependant, par spectrométrie de masse, seul le produit de départ **54** est détecté. La quantité d'amine, ainsi que le temps et la température de réaction ont alors été modifiés en utilisant une base telle que le NaH ou la DMAP. Le composé désiré n'a cependant jamais été détecté (Entrée 1) laissant place à ce qui pourrait s'apparenter à une dégradation des réactifs de départ. L'utilisation d'une amine moins encombrée et plus nucléophile telle que la diéthylamine a également été testée (Entrée 9) sans succès. Des essais complémentaires ont alors été réalisés avec le dérivé aminé **55** dans des conditions similaires à celles utilisées lors de la formation de la liaison éther (Entrées 10 et 11). Une nouvelle fois, le suivi par spectrométrie de masse n'a pas permis de mettre en évidence ni le composé désiré, ni les sous-produits potentiels avec des degrés de substitution différents.

#	Amine (éq)	Base (éq)	Additif	Solvant	Temp.	Durée	Résultats SM
1	BnNH ₂ (8)	/	/	DMF	TA	1 nuit	54
2	BnNH ₂ (8)	/	/	DMF	TA	9 j	54
3	BnNH ₂ (16)	/	/	DMF	MO – 90°C	6 h + 8 h	54 + dégradation
4	BnNH ₂ (16)	NaH (16)	/	DMF	TA → 80°C	7 j	dégradation
5	BnNH ₂ (16)	/	/	DMF	TA → 80°C	7 j	dégradation
6	BnNH ₂ (16)	/	KI (cat)	DMF	TA → 80°C	7 j	dégradation
7	BnNH ₂ (16)	DMAP (4)	/	DMF	TA → 80°C	7 j	dégradation
8	BnNH ₂ (16)	DMAP (4)	/	DMSO	TA → 80°C	7 j	dégradation
9	Et ₂ NH (16)	NaH (16)	/	DMF	80°C	4 j	dégradation
10	55	NaH (12)	/	DMF	TA	2 j	dégradation
11	55	NaH (12)	/	THF	TA	5 j	dégradation

Tableau 28 : Optimisation des conditions réactionnelles de la substitution du composé tétra-mésylé 54 par des dérivés aminés

Suite à ces résultats peu encourageants, cette voie de synthèse a été abandonnée (Schéma 12).

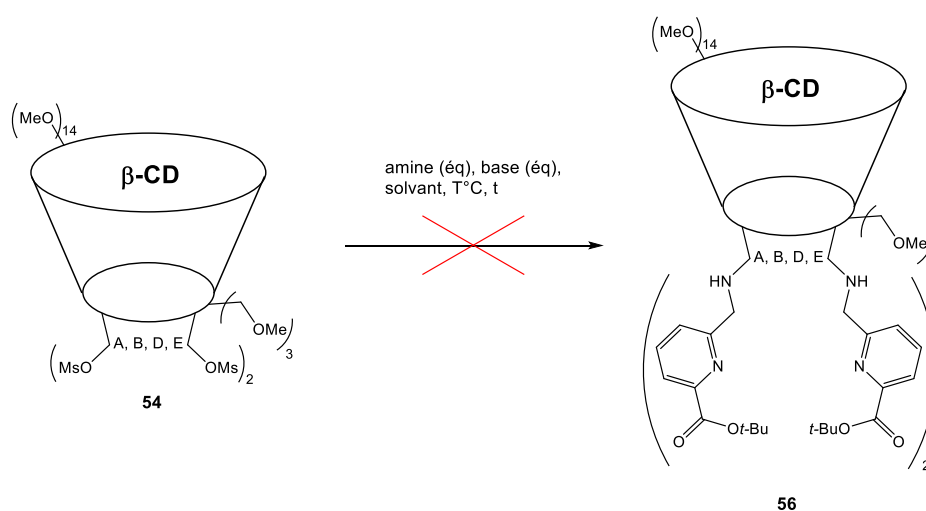


Schéma 12 : Substitution du composé tétra-mésylé 54 par des dérivés aminés

b. Voie 2

La voie 2 consiste à inverser les réactivités de la CD et du dérivé pyridinique par rapport à la voie 1 (Schéma 13). Pour cela, nous avons fait réagir la β -CD **58** en nucléophile (Schéma 9) sur la pyridine-carboxylate de *tert*-Butyle **59** jouant le rôle d'électrophile (Schéma 10).

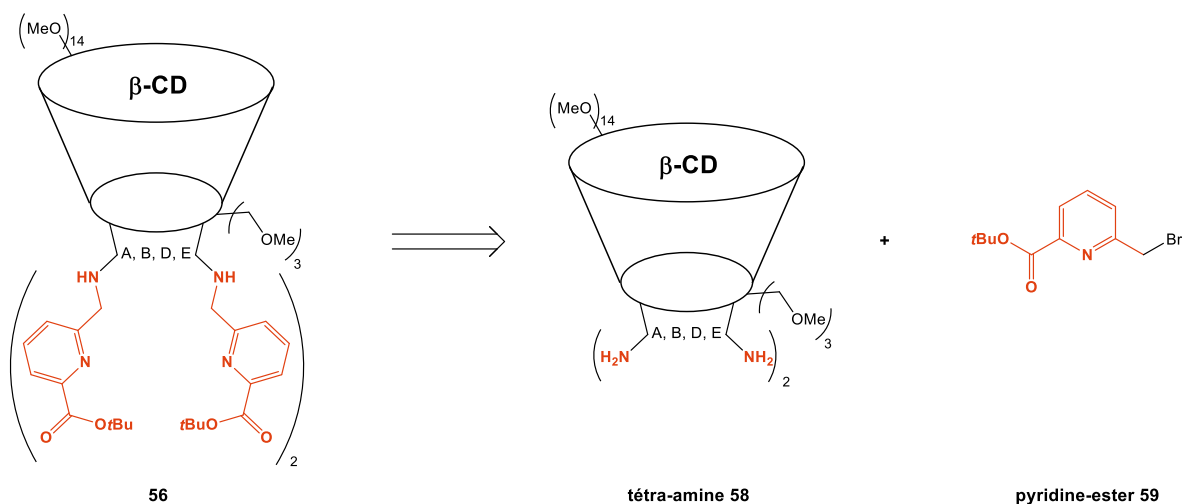


Schéma 13 : Rétrosynthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée par lien amine à partir du dérivé tétra-aminé **58**

La viabilité de cette voie de synthèse a été évaluée en utilisant des conditions similaires à celles utilisées lors de la fonctionnalisation par une liaison éther (Schéma 14). La nucléophilie des amines a été augmentée par déprotonation par une base forte tel que le NaH puis 12 équivalents de l'électrophile **59** ont été ajoutés. Les réactifs ont été solubilisés soit dans le DMF soit dans le THF à température ambiante pendant une durée allant de 12 h à 5 j.

Les réactions suivies par CCM, n'ont pas révélé la formation de nouveaux produits plus apolaires comme constaté lors de la tétra-fonctionnalisation par lien éther. De plus, la spectrométrie de masse n'a pas permis de mettre en évidence la formation de produits de substitution. Suite à ces résultats, nous avons de nouveau focalisé notre étude sur la formation de pont éther permettant d'atteindre le composé tétra-fonctionnalisé initialement désiré.

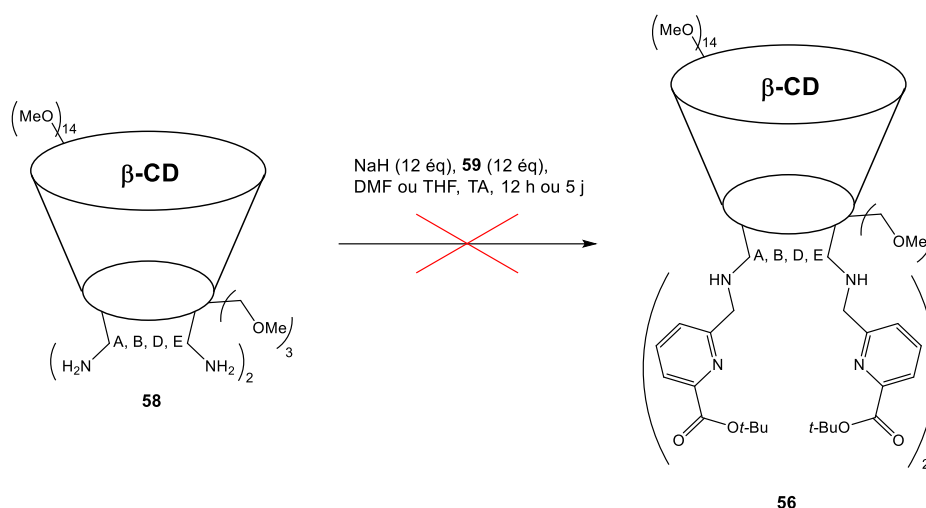


Schéma 14 : Substitution du dérivé bromé 59 par la β -CD tétra-aminé 58

D.Stratégie alternative 2 : Tétra-fonctionnalisation du Tétrol **46** par la pyridine-carboxylate de *tert*-Butyle **59**

La stratégie alternative 2, développée en parallèle de la première, s'est concentrée sur la modification de l'ester méthylique **52** dans le but d'améliorer sa stabilité face aux conditions réactionnelles utilisées, et notamment minimiser la formation du composé de transestérification (Schéma 15). Pour cela, le dérivé bromé **59**, portant l'ester *tert*-butylique plus encombré, déjà synthétisé nous permet de limiter le nombre d'étape de synthèse et de produits intermédiaires.

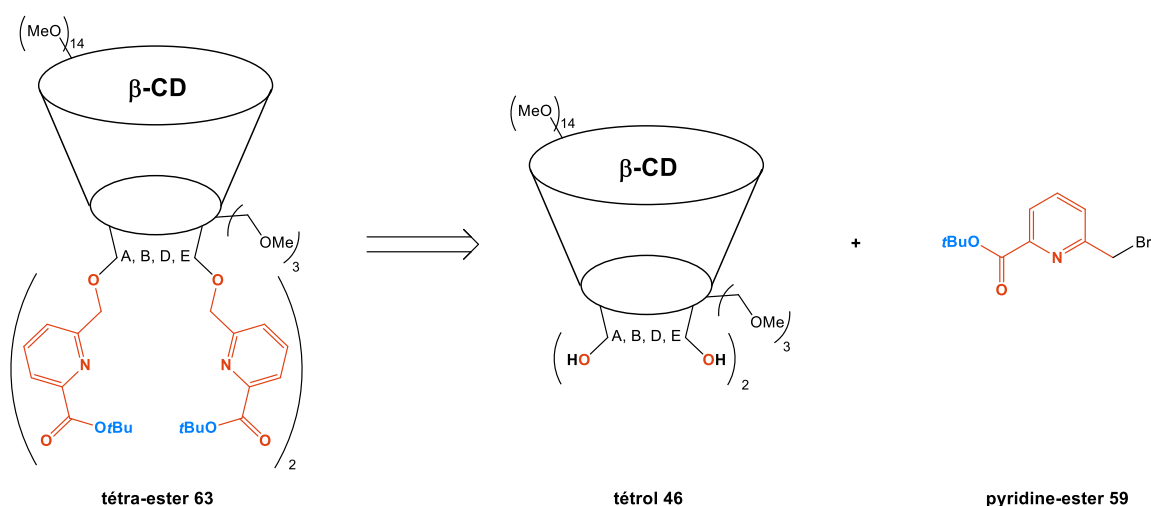


Schéma 15 : Rétrosynthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée 63 à partir du tétrol 46 et de la pyridine-ester *t*Bu 69

Pour pallier au problème de quantification et de purification rencontrés lors de la tétra-fonctionnalisation par le dérivé pyridinique **52** (Schéma 7), une méthode d'analyse en HPLC sera, dans un premier temps, développée à partir de mélanges bruts de la réaction avec l'ester *tert*-butylique du dérivé pyridinique **59**. En complément, la caractérisation en LC-MS des principaux sous-produits sera mise en place. Ces techniques analytiques ont pour objectif de faciliter l'optimisation des conditions de fonctionnalisation et de purification afin d'isoler la β -CD tétra-ester **63** et d'accéder au ligand final **L β** .

1. Développement des conditions d'analyses en HPLC et identification des sous-produits par LC-MS

Les conditions d'analyses de la réaction de fonctionnalisation du tétrol **46** par le dérivé bromé **59** ont été développées avec une colonne phase inverse C8 qui a montré une meilleure efficacité par rapport à une colonne C18. La phase mobile H₂O / ACN a permis une résolution des pics nettement supérieure qu'avec une phase mobile H₂O / MeOH. A noter que, le fait d'acidifier les phases mobiles avec 0,1% de TFA ou de HCOOH n'a amené aucune amélioration de la séparation. De nombreux gradients ont été testés et les méthodes retenues sont détaillées dans la partie expérimentale ainsi que les caractéristiques d'appareillage.

Les produits ont été détectés par des détecteurs UV (Ultra-Violet) et DEDL (Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière) complémentaires. En effet, la détection UV nous permet de visualiser tous les composés absorbants présents en solution, en revanche le tétrol **46** qui ne possède aucun groupement chromophore ne pourra pas être détecté (Figure 57). Cette technique ne sera utilisée que dans le cas d'analyse qualitative, car l'absorption des composés et donc l'aire des pics dépendent du coefficient d'absorption molaire ϵ qui est différent pour chaque composé. Ne connaissant pas ce coefficient pour les composés analysés, la spectroscopie UV ne peut pas être utilisée pour comparer les proportions des composés dans l'échantillon analysé. Le détecteur DEDL, quant à lui, est un détecteur universel qui a montré tout son intérêt lors de l'analyse de composés ne possédant pas de chromophore.^[161] De plus, il possède une très haute sensibilité et une grande facilité d'utilisation. Le principe du DEDL se divise en trois phases : la nébulisation en petite gouttelette par un gaz (air, N₂, etc.) de l'effluent en sortie de colonne ; l'évaporation du solvant ; et la détection par diffusion de la lumière (Figure 56).

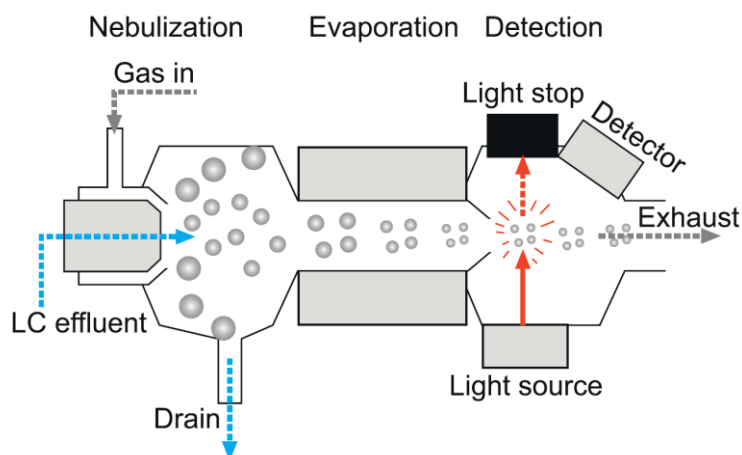


Figure 56 : Principe du détecteur DEDL^[161]

Dans notre cas, certains composés ne sont pas détectés par le détecteur DEDL (Figure 57). Normalement, ce genre de situation arrive lorsque les composés sont trop volatiles. Cependant, avant d’être analysés, les composés ont déjà été soumis à des étapes d’évaporation lors du traitement de la réaction, ce qui écarte cette hypothèse. Néanmoins, aucune autre explication n’a pu être donnée pour expliquer ce phénomène. Ceci ne perturbera pas pour autant l’étude envisagée ici.

De plus, Dreux *et al.* ont étudié la réponse de CD native et méthylée avec ce détecteur, et ont mis en avant la possibilité de corréler le rapport des aires à la proportion de composés analogues présents dans le mélange.^[162] Notre étude présentée ci-après se base sur cette propriété qui nous permet donc de comparer entre eux, les différents dérivés de CD obtenus.

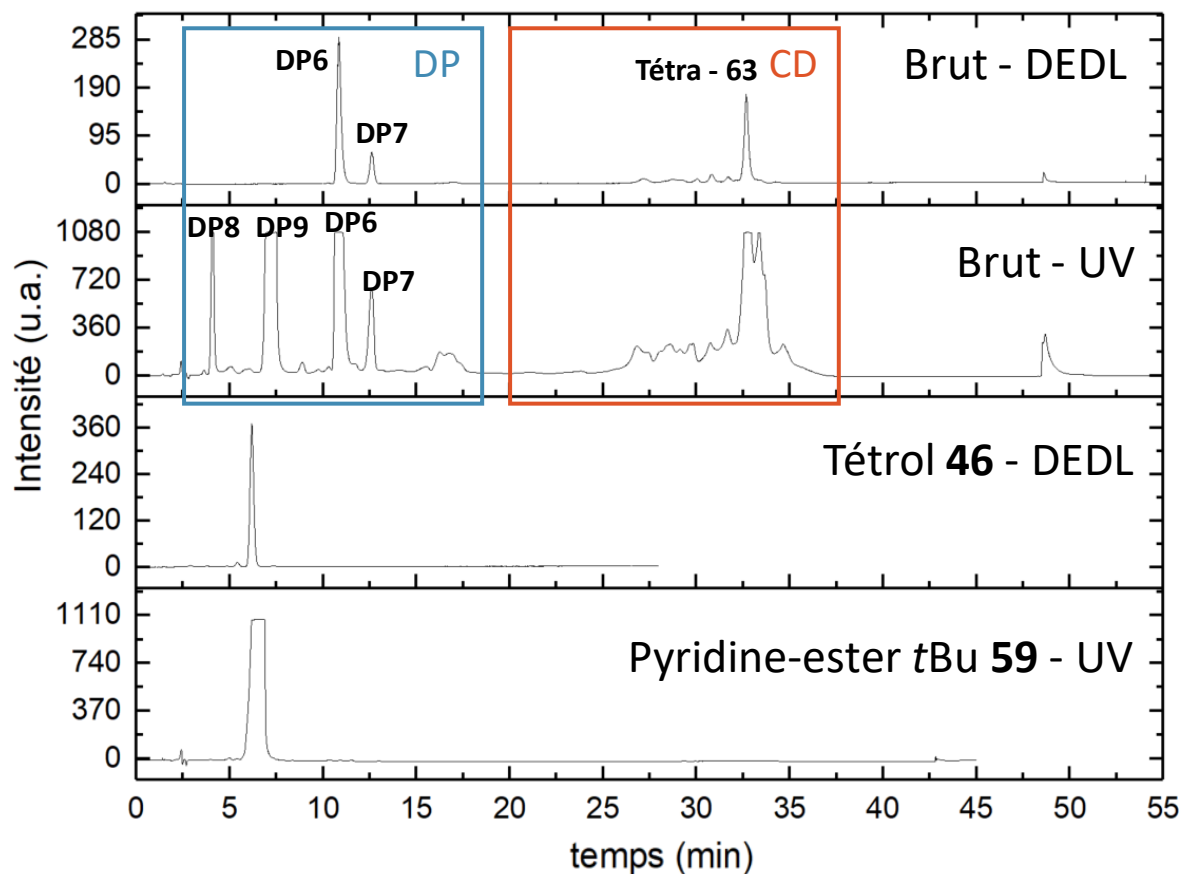
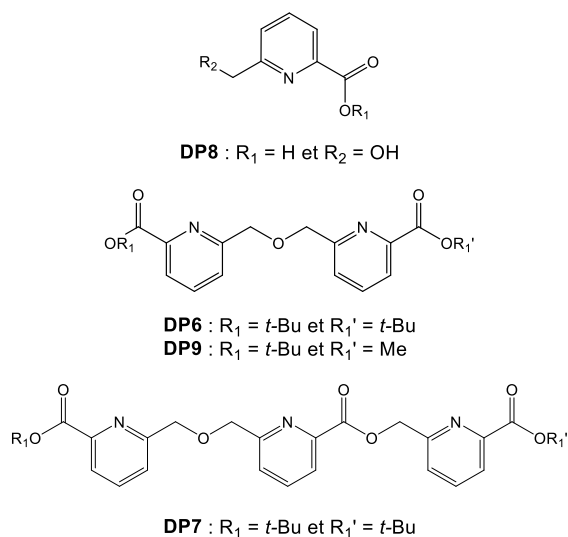


Figure 57 : Exemple de chromatogrammes obtenus sur un brut par détection DEDL et UV et des produits de départ tétrol 46 (DEDL) et pyridine-ester tBu 59 (UV)

Les analyses LC-MS effectuées avec ces mêmes conditions de séparation ont permis de diviser le chromatogramme des échantillons bruts en deux parties. Les pics sortant à des temps de rétention $t_R < 20$ minutes, correspondent à des dérivés du composé pyridinique **59**, notés **DP**, comme dans le cas de l'ester méthylique **52** (Tableau 29) et des pics aux $t_R > 20$ minutes correspondant aux dérivés de la CD substituée.

Sous-produits déterminés par LC-MS

Dérivés de la pyridine-ester *t*Bu 59



Dérivés de la CD

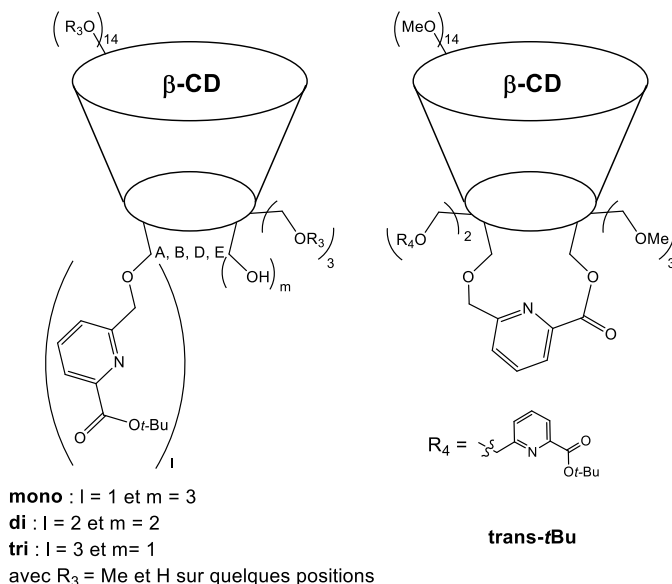


Tableau 29 : Structures des sous-produits de la réaction de tétra-fonctionnalisation du tétrol 49 par la pyridine-ester *t*Bu 59 déterminés par LC-MS

Les principaux sous-produits identifiés sont similaires à ceux précédemment obtenus avec le dérivé pyridinique **52** (Tableau 26). Les dérivés pyridiniques identifiés sur le chromatogramme (Figure 57) du produit réactionnel brut correspondent, pour des t_R croissants : au monomère hydrolysé **DP8**, au dimère dont une des fonctions ester *tert*-butylique a été substituée par un méthyle **DP9**, au dimère portant deux fonctions esters *tert*-butylique **DP6** et à un trimère avec deux fonctions ester *tert*-butylique en bout de chaîne **DP7**. D'autres dérivés présentant un degré d'hydrolyse plus ou moins prononcé des fonctions esters ont parfois été détectés par spectrométrie de masse, mais cela a été moins fréquent qu'avec l'ester méthylique, confirmant ainsi une stabilité chimique légèrement supérieure. Quant aux dérivés de la cyclodextrine, nous avons retrouvé les dérivés mono-, di-, tri- et tétra-substitués, ainsi que le composé transestérifié. La présence de ce composé **trans-*t*Bu** montre que le changement d'ester n'a pas permis de limiter sa formation. L'ensemble des pics présents à des t_R inférieurs à celui du tétra-substitué correspond aux dérivés ayant des degrés de substitution inférieurs. De plus, une déméthylation partielle des méthoxy présents sur la CD a pu être constatée, entraînant la formation de sous-produits supplémentaires. Grâce au développement analytique effectué sur cette réaction qui a permis une identification plus poussée des sous-

produits, cette voie de synthèse utilisant le dérivé pyridinique **59** a été privilégiée pour la suite de l'étude d'optimisation.

La LC-MS a confirmé que le composé tétra-fonctionnalisé **63** était bien séparé des autres dérivés de CD avec un pic à 32,8 minutes. Cette séparation est donc suffisante pour déterminer la proportion relative des différents dérivés de CD présents en mélange.

2. Synthèse de la β -CD tétra-fonctionnalisée **63**

La détermination des conditions réactionnelles optimales pour la tétra-fonctionnalisation avec l'ester *tert*-butylique **59**, s'est inspirée de ce qui avait été préalablement effectué avec l'ester méthylique **52** (Schéma 7). Cette fois-ci, la discrimination des différentes conditions a pu être faite sur la base de la proportion relative du tétra-ester **63** formé, calculé à partir des chromatogrammes des mélanges réactionnels bruts. Il faut noter que la quantification et donc le calcul d'un rendement HPLC restent impossibles sur la simple base de ces chromatogrammes car le mélange est composé, comme vu précédemment, de nombreux dérivés pyridiniques et de cyclodextrines qui ne répondent pas de la même manière aux détecteurs.

Le Tableau 30 d'optimisation résume les proportions en composé **63** obtenues en fonction des différentes conditions opératoires testées. Les différents solvants, la température, la quantité d'électrophile **59** à ajouter, la base utilisée ainsi que l'ordre d'addition ont ainsi pu être optimisés. A noter que l'ensemble de ces réactions ont été effectuées dans des conditions inertes et que le tétrol **46** a toujours été séché sous vide au minimum 24 h à 90°C avant utilisation.

#	Base	Equivalent 59	Ordre d'addition	Solvant	Temp.	Durée	Proportion de composé 63 (%)
1	NaH	12	1	THF	60°C	5 j	78
2	NaH	12	1	DMSO	60°C	5 j	84
3	NaH	12	1	DMF	60°C	5 j	0
4	NaH	24	1	DMF	TA	5 j	54
5	NaH	12	1	THF	TA	3 j	63
6	NaH	24	1	THF	TA	5 j	35
7	n-BuLi	12	1	THF	TA	5 j	0
8	NaH	12	2	THF	TA	5 j	0

Tableau 30 : Optimisation des conditions réactionnelles de la tétra-fonctionnalisation du tétrol 46 par la pyridine-ester tBu 59

Ordre d'addition 1 : ajout de l'électrophile sur la solution de tétrol déprotoné

Ordre d'addition 2 : ajout du tétrol déprotoné sur une solution de l'électrophile par canule ou seringue

La proportion de composé 63 est relative aux autres dérivés de CD et est calculée à partir des chromatogrammes HPLC-DEDL des produits bruts

En ajoutant 12 équivalents de l'électrophile **59** au tétrol **46** à 60°C, le THF (Entrée 1) et le DMSO (Entrée 2) sont les solvants qui favorisent le mieux la tétra-fonctionnalisation avec 78% et 84% de proportion en tétra-ester **63**, respectivement. Dans le DMF (Entrées 3 et 4), la conversion en **63** n'est observée que lorsque la quantité d'électrophile **59** ajoutée est poussée à 24 équivalents. En effet, la combinaison DMF/NaH est, depuis 2002, une méthode de déprotection des esters *tert*-butylique développé par Schmidt *et al.*^[163,164] Ainsi, le dérivé pyridinique **59** est probablement dégradé avant même d'avoir pu réagir avec le tétrol **46**. Parce que le DMSO et le THF engendrent des proportions en tétra-ester **63** du même ordre de grandeur, le THF a été privilégié pour des raisons de facilité d'utilisation. En comparant les deux réactions (Entrées 1 et 5), effectuées dans les mêmes conditions à 60°C et TA, respectivement, nous constatons que la température du milieu réactionnel n'a pas influencé pas la conversion (78% et 63%). De plus, augmenter la quantité d'électrophile **59** ajoutée à une solution de tétrol **46** dans le THF n'augmente pas la proportion de dérivé **63** formé (Entrée 6, 35%). L'utilisation d'une base plus forte (*n*-BuLi) entraîne la dégradation des réactifs (Entrée 7). L'ordre d'ajout n'avait pas été étudié lors de la première optimisation. L'objectif était ici, de contrôler la quantité d'électrophile **59** présent en solution et ainsi de limiter la formation des dérivés pyridinique, tout en favorisant leur substitution par le tétrol **46**. Cependant, l'ajout inversé du tétrol, préalablement déprotoné, sur une solution de

l'électrophile, effectué soit en canulant, soit en prélevant à la seringue ne nous a jamais permis de fonctionnaliser le tétrol (Entrée 8).

Les analyses LC-MS, précédemment évoquées, ont mis en avant la présence de dérivés de CD ayant subi des déméthylations partielles qui, lors de ces essais, n'ont ni pu être expliquées ni évitées. De plus, aucune condition réactionnelle permettant d'éviter l'hydrolyse de l'ester *tert*-butylique n'a été trouvée.

La proportion en composé tétra-ester **63** obtenue est, néanmoins, très satisfaisante dépassant les 70%. Les efforts se sont alors tournés vers l'optimisation de la purification afin d'isoler cette CD intermédiaire pure.

3. Optimisation des conditions de purification du tétra-ester **63**

Plusieurs conditions de purification par chromatographie ont été testées tout en sachant que les autres techniques de purification telles que la recristallisation ou la chromatographie par exclusion stérique n'étaient pas envisageables pour séparer des CD différant uniquement par leurs degrés de substitution.

L'objectif de cette séparation était double : séparer les dérivés pyridiniques (**DP**) des dérivés de CD (**CD**) et enrichir les fractions en produit tétra-fonctionnalisé **63**. En effet, bien que structuralement différents, certains **DP** (dimères et trimères) possèdent une polarité très proche de la CD **63**. Le Tableau 31 présente un résumé des conditions de séparation chromatographiques testées avec les phases stationnaires et les phases mobiles associées.

Phase stationnaire	Phase mobile	Séparation obtenue après chromatographie		
		Sur couche mince	Sur gel de silice	Par flash automatique
Silice C18	ACN / Eau	Mauvaise séparation	-	-
	ACN / Eau / TFA	Mauvaise séparation	-	-
	MeOH / Eau	Mauvaise séparation	-	-
Alumine	DCM / EP	Sépare DP des CD	Mélange DP / CD	-
Silice normale	DCM / MeOH	Sépare DP des CD	Mélange DP / CD	Mélange DP / CD
	AcOEt / EP	Mauvaise séparation	-	-
	AcOEt / DCM / MeOH	Mauvaise séparation	-	-
	Toluène / Acétone	Sépare DP des CD	Mélange DP / CD	Mélange CD

Tableau 31 : Conditions de purification testées afin d'isoler le composé tétra-fonctionnalisé 63

DP : dérivé pyridinique ; CD : dérivé de CD

Des essais de séparations sur plaque CCM en phase inverse C18 ont été effectuée par analogie à la séparation déjà établie en HPLC sur une colonne C8. Cependant, les conditions testées n'ont jamais permis de répondre aux objectifs. La séparation des DP et CD a pu être réalisée sur plaque CCM avec une phase stationnaire alumine ou silice normale (bleu). Néanmoins, lorsque ces conditions sont transposées à une purification par chromatographie sur gel de silice ou par flash automatique, les CD n'ont pas pu être isolées.

En revanche, grâce à la mise au point d'une purification par chromatographie flash automatisé avec un gradient contrôlé avec précision de toluène/acétone (rouge), les CD ont pu être, pour la première fois, isolés. Le tétra-ester **63** a alors été obtenu avec une pureté de 80% (Figure 58 – Chromatogramme 2) qui peut dorénavant être calculée puisque l'ensemble des produits du mélange sont des CD.

Afin d'isoler le composé tétra-fonctionnalisé **63** pur, les conditions de séparation identifiées en HPLC analytique ont été transcrites en HPLC semi-préparative. Malgré une séparation des

pics peu résolue, le rendement de purification a atteint 60% et le produit a pu être isolé avec une pureté de 100%, confirmée en HPLC-DEDL (Figure 58 – Chromatogramme 3) et -UV.

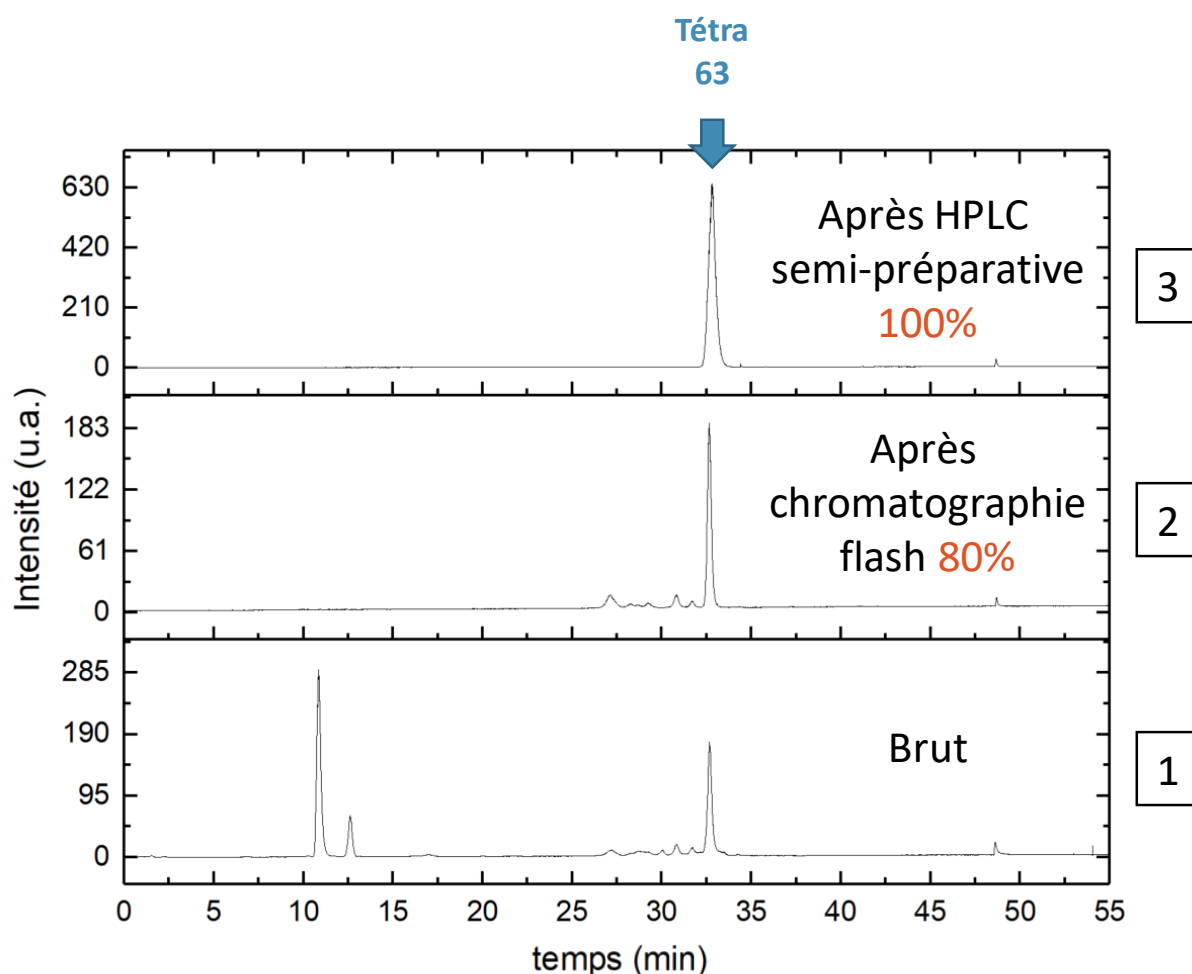


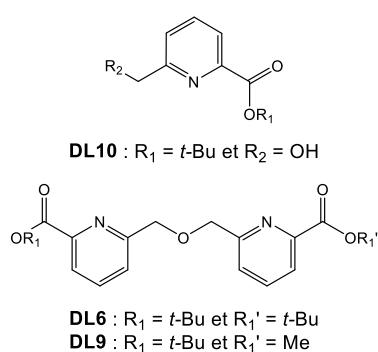
Figure 58 : Chromatogrammes du produit brut (1), du mélange après purification par chromatographie flash (2) et du composé 63 pur après HPLC semi-préparative (3) (pureté en rouge)

Les chromatographies flashes et l’HPLC semi-préparative ont aussi permis d’isoler et de caractériser quelques principaux sous-produits formés. Ainsi, les structures **DP6**, **DP9** et **trans** ont pu être confirmées par HRMS et RMN, de même que la déméthylation partielle de la CD (Tableau 32). Les méthyles des composés **DP9** (dimère pyridinique avec un ester *tert*-butylique et un ester méthylique) et **tri-méthylé** (tétrol tri-fonctionnalisé dont le 4^{ème} hydroxyle libre a été méthylé) ne peuvent provenir que des groupements méthoxy présents sur le tétrol. Cependant, les produits de départ (tétrol **46** et dérivé pyridinique **59**) n’ont montré aucun signe de dégradation permettant d’expliquer l’initiation de la formation de ces sous-produits. Ces derniers seraient donc le résultat d’une déméthylation au cours de la réaction d’une CD (tétrol **46**, mono, di, tri, tétra-**63**, etc.). Cette déprotection partielle des groupements méthoxy

est difficilement explicable sachant que ces groupements sont connus pour être stable face à de nombreuses conditions.^[165] Leur déprotection se réalise, normalement en présence d'acide de Lewis tel que le tribromure ou trifluorure de bore (BBr_3 ou BF_3) ou de composés silylés tels que le chlorure ou l'iodure de triméthylsilyle (Me_3SiCl ou Me_3SiI).^[165]

Sous-produits caractérisés par HRMS et RMN

Dérivés de la pyridine-ester *t*Bu 59



Dérivés de la CD

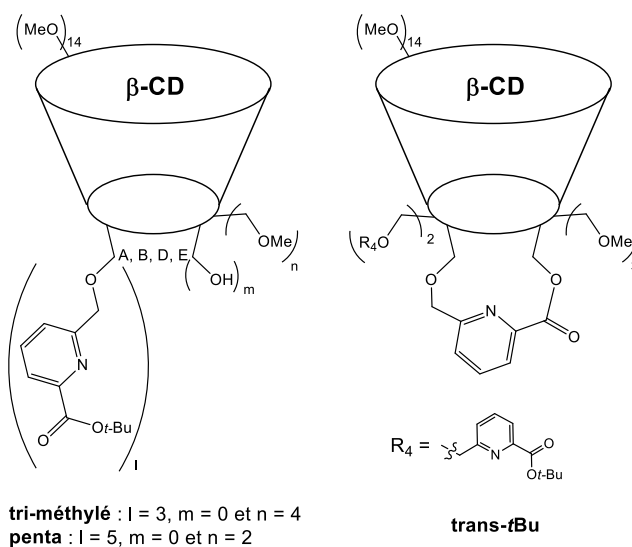


Tableau 32 : Structures des sous-produits de la réaction de tétra-fonctionnalisation du tétrol 46 par la pyridine-ester *t*Bu 59 isolés et caractérisés par HRMS et RMN

L'objectif principal restant la synthèse du ligand final **L β** , l'utilisation des conditions réactionnelles développées et de purifications optimisées précédemment ont permis de synthétiser plus de 300 mg du composé **63** (Schéma 16).

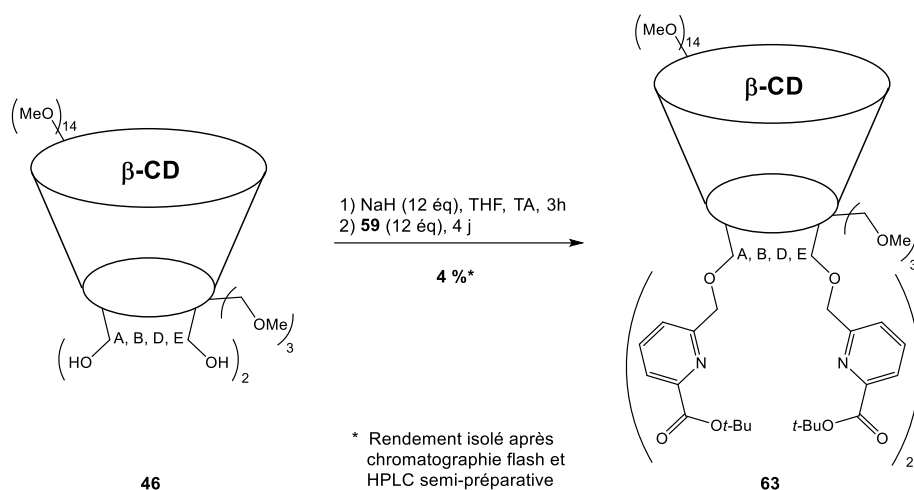


Schéma 16 : Synthèse de la β-CD tétra-fonctionnalisée 63

De plus, sur la base des rendements calculés à partir des chromatogrammes obtenus en HPLC - DEDL, nous avons montré que la montée en échelle faisait grandement chuter le rendement de la réaction (Tableau 33). En effet, les réactions réalisées dans les mêmes conditions à partir de moins d'un gramme de tétrol de départ permettaient d'atteindre entre 20 et 30% de rendement, tandis qu'à partir d'une quantité supérieure à un gramme, celui-ci chutait à 10%.

Malgré les différents obstacles rencontrés au cours du développement de cette synthèse, la quantité de composé **63** synthétisée était suffisante pour mettre en place la déprotection des fonctions esters afin d'accéder au composé final tétra-acide **Lβ**.

#	Quantité tétrol	Rendement
	de départ	HPLC
5	100 mg	22
9	685 mg	33
10	1 g	12
11	3,4 g	10

Tableau 33 : Effet de la montée en échelle sur le rendement de la tétra-fonctionnalisation du tétrol par la pyridine-ester 59

4. Déprotection des esters *tert*-butyliques du composé **63**

Accès au composé final Lβ

Les esters *tert*-butyliques étant plus stables en milieu basique qu'acide, les conditions d'hydrolyses préconisées sont l'utilisation d'acide trifluoroacétique (TFA) ou formique (HCOOH).^[165]

La réaction de déprotection s'est montrée efficace quelle que soit la nature de l'acide utilisé. La conversion a été totale après trois jours à température ambiante pour le TFA et à 50°C pour l'acide formique, avec des rendements supérieurs à 90%. Pour accéder au composé final, nous avons donc opté pour l'utilisation de l'acide formique, plus facile à éliminer et évitant la formation de sels de pyridinium qui seraient compromettant pour la caractérisation du ligand **Lβ** final (Schéma 17). Ainsi, 270 mg de composé final **Lβ** ont été obtenus.

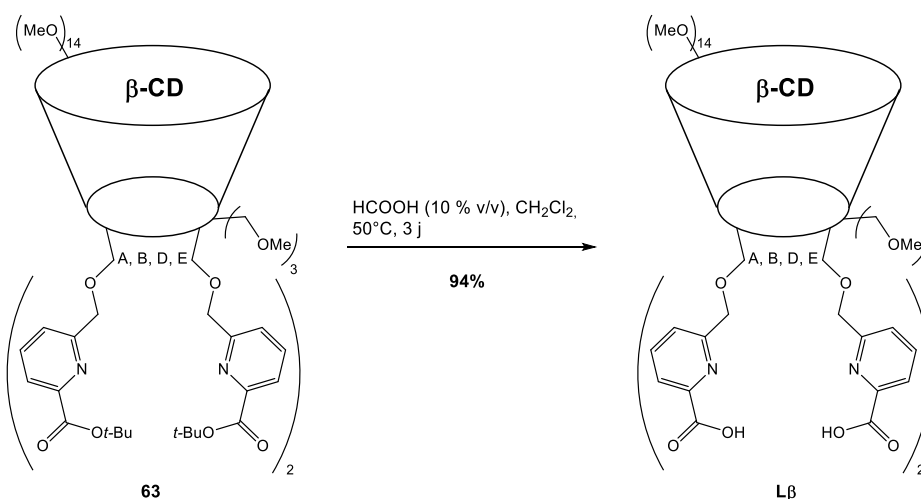


Schéma 17 : Synthèse du ligand final **Lβ**

Les deux autres ligands finaux ciblés dans cette thèse sont basés, quant à eux, sur l'α-CD et sont traités dans la partie suivante.

II. Les dérivés de l'α-cyclodextrine

A. Synthèse de l'α-CD tri-hydroxylée

Triol 47

La synthèse du dérivé d'α-CD tri-hydroxylé sur la face primaire **47**, qui permettra par la suite d'insérer les groupements pyridiniques sur les positions A, C, et E, est basée sur un protocole utilisé au laboratoire, préalablement développé à partir des conditions de Miocque *et al.* (Schéma 18).^[144] Cette stratégie de protection/déprotection a été détaillée dans la partie bibliographique (Chap.II, §IV.B. p.98). L'α-CD native a été protégée, dans une première étape, en utilisant 4,5 équivalents de chlorure de trityle. Puis l'ensemble des hydroxyles restés libres ont été méthylés. Ces deux premières étapes ont conduit au composé **64** tritylé sur les unités A, C et E avec un rendement de 17%, similaire à celui décrit dans la publication d'origine. La

formation de ce composé **64** s'est accompagnée, entre autres, de celle de l'isomère tritritylé sur les unités A, B et C (Figure 50) qui possède une polarité proche et qui complique alors la séparation. Cependant Miocque *et al.* ont montré que le composé **64**, possédant une symétrie interne, est facilement différenciable de son régioisomère par RMN ^1H . Les signaux des protons H-1 de **64** sont représentés par seulement deux doublets intégrant chacun pour trois protons, tandis que les signaux des protons H-1 du régioisomère A, B, C sont représentés par 6 doublets.

Ainsi, avec l'éluant adéquate (Et_2O /Heptane) et un gradient très lent, il est possible d'isoler majoritairement l'isomère souhaité **64**. Cette optimisation nous a permis de passer de 6% à 17% de rendement sur ces deux premières étapes. Les trityles du composé **64** ont ensuite été éliminés par action du TFA, permettant d'accéder au triol **47** de manière quasi quantitative.

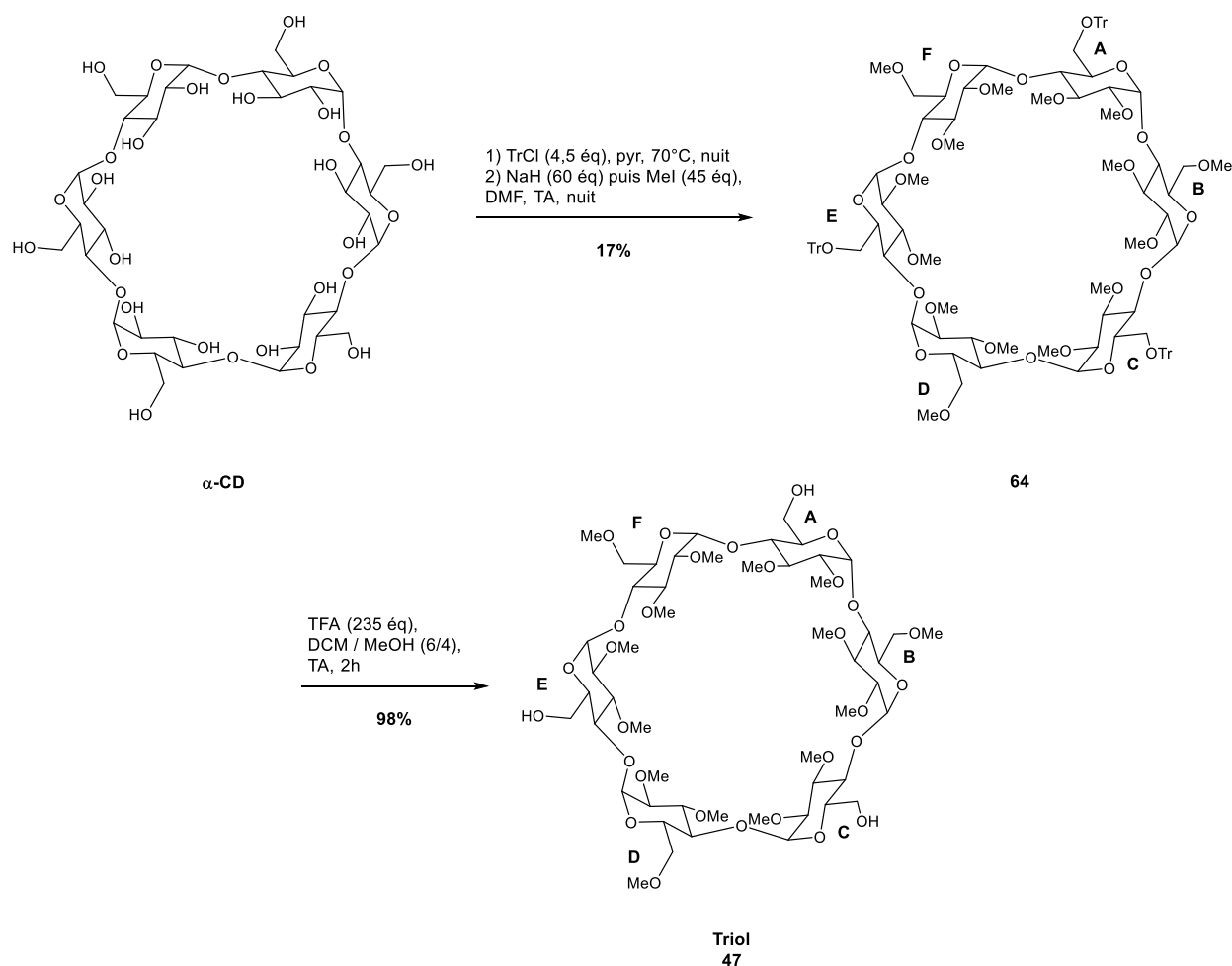


Schéma 18 : Synthèse du triol **47**

La tri-fonctionnalisation du triol **47** a été développée, dans un premier temps, avec l'entité pyridinique portant une fonction phosphonate **69**, puis avec le dérivé pyridinique **59** qui a préalablement été utilisé pour la tétra-fonctionnalisation de la β -CD.

B. Tri-fonctionnalisation du Triol **47** par la pyridine-phosphonate d'éthyle **69**

1. Synthèse du diethyl 6-bromomethylpyridin-2-ylphosphonate **69**

La création d'une liaison carbone-phosphore peut être réalisée de différentes manières en fonction de l'hybridation du carbone à fonctionnaliser. Dans notre cas (Schéma 19), le phosphore est directement lié au carbone 2 du noyaux pyridinique, hybridé sp^2 . La méthode la plus couramment utilisée dans la littérature est le couplage pallado-catalysée d'Hirao.^[166] Celui-ci met en réaction l'halogénure arylique ou vinylique en présence, le plus souvent, d'une phosphite (diéthyle ou diisopropyle), d'une base aminée (NEt_3 , DIPEA, etc.), du palladium ($Pd(PPh_3)_4$, $Pd(OAc)_2$, etc.) avec pour ligand de la triphénylphosphine (PPh_3) ou du diphénylphosphinoferrocène (dppf), solubilisé dans le toluène, l'acétonitrile ou le DMF (Tableau 34).^[167–169]

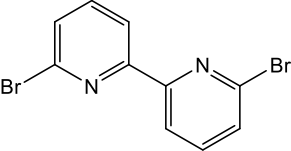
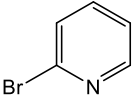
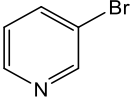
Couplage d'HIRAO							
Substrat	Phosphite $HP(O)(OR)_2$	Base	Source de Pd	Ligand	Solvant	Rendement (%)	Ref
	R = Et 2 éq	DIPEA 1,1 éq	$Pd(PPh_3)_4$ 10 mol%	PPh_3	Toluène	73	[167]
	R = <i>i</i> Pr 1,2 éq	DIPEA 1,3 éq	$Pd(PPh_3)_4$ 1 mol%	PPh_3	ACN	85	[168]
	R = Et 1,2 éq	NEt_3 1,3 éq	$Pd(OAc)_2$ 0,9 mol%	dppf	ACN	94	[168]

Tableau 34 : Exemples de conditions classiques de couplage d'Hirao

A partir de ces conditions opératoires, le couplage entre la diéthylphosphite et la 6-bromo-2-hydroxyméthylpyridine **66**, synthétisé à partir de la 2,6-dibromopyridine **65**, a été développé (Schéma 19 – Voie 1 et 2). Dans un souci d'efficacité, une autre méthode d'insertion du phosphonate a été envisagée par un échange lithium-halogène sur les composés **66** et **71** (Schéma 19 – Voie 3 et 4).

Dans un premier temps, la synthèse du composé **66** a été effectuée en trois étapes monotopes décrites par Renard *et al.* avec 92% de rendement.^[170] Après échange halogène-lithium d'un seul des deux atomes de brome, l'intermédiaire lithié réagit avec le DMF pour former l'aldéhyde qui est ensuite réduit en alcool par le tétrahydruoborate de sodium avec 84% de rendement.

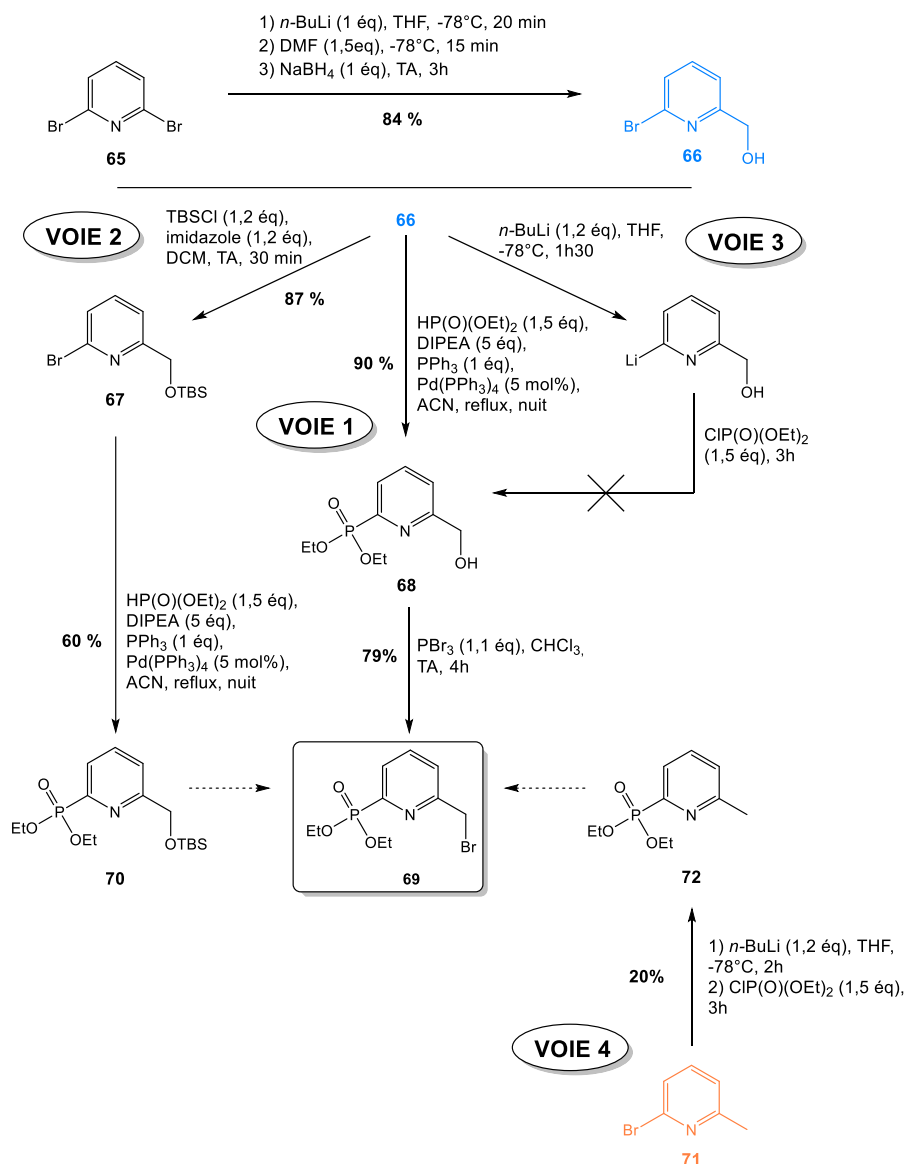


Schéma 19 : Voies de synthèse testées pour accéder à la pyridine-phosphonate 69 à partir de la 6-bromo-2-(hydroxyméthyl)pyridine 66 ou de la 2-bromo-6-méthylpyridine 71

Rapidement, les deux voies de synthèse basées sur l'échange halogène-lithium ont dû être écartées. En effet, la voie 3, effectuée à partir du composé **66** a entraîné la formation d'un grand nombre de sous-produits, sans pour autant conduire au composé phosphonate **68** désiré. Une partie de ces sous-produits étaient dus à la présence du groupement hydroxyle en position 2, qui après déprotonation par le *n*-BuLi peut attaquer lui aussi la diéthylphosphite. Pour pallier à ces réactions secondaires, la même réaction a été effectuée cette fois à partir de la 2-bromo-6-méthylpyridine **71** (Voie 4). L'introduction du phosphonate a pu être réalisé avec seulement 20% de rendement et la formation de nombreux produits secondaires.

Le couplage d'Hirao a été effectué à partir du composé **66** avec l'hydroxyle libre (Voie 1) et à partir du composé **67** protégé par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBS) (Voie 2). En criblant les différentes sources de palladium, de ligand et de solvant habituellement utilisés (Tableau 35), les conditions optimales amenant à un rendement très élevés de 90% ont été atteintes. Pour cela, la combinaison à utiliser a été : Pd(PPh₃)₄, PPh₃, DIPEA dans l'ACN (Entrée 2). Le rendement de cette réaction effectuée sur le dérivé protégé **67** (Entrée 4) dans des conditions similaires, a été, quant à lui, inférieur à celui de la voie 1 avec 60%, n'amenant ainsi aucun plus par rapport aux conditions précédentes.

#	Produit de départ	Pd ⁰ 5 mol%	Ligand 1 éq	Base 5 éq	Solvant	Rendement (%)
1	66	Pd(PPh ₃) ₄	PPh ₃	DIPEA	Toluène	0
2	66	Pd(PPh ₃) ₄	PPh ₃	DIPEA	ACN	90
3	66	Pd(OAc) ₂	dppf	DIPEA	ACN	68
4	67	Pd(PPh ₃) ₄	PPh ₃	DIPEA	ACN	60

Tableau 35 : Optimisation du couplage d'Hirao

Après bromation de l'hydroxyle libre par le tribromure de phosphore, le dérivé bromé **69** a été isolé avec 90% de rendement. De plus, la montée en échelle de la réaction de 100 mg à 3,4 g ne fait chuter que très légèrement le rendement, respectivement de 90% à 80%, permettant de synthétiser une quantité suffisante de composé **69** afin de développer sa substitution par le triol **63**.

2. Synthèse de l'α-CD tri-fonctionnalisée **73**

Pour fonctionnaliser le triol **47** avec la pyridine-phosphonate **69**, les conditions réactionnelles précédemment établies sur le tétrol **46** avec le composé **59** ont été appliquées et ont permis d'accéder directement à un rendement isolé de 27% (Schéma 20).

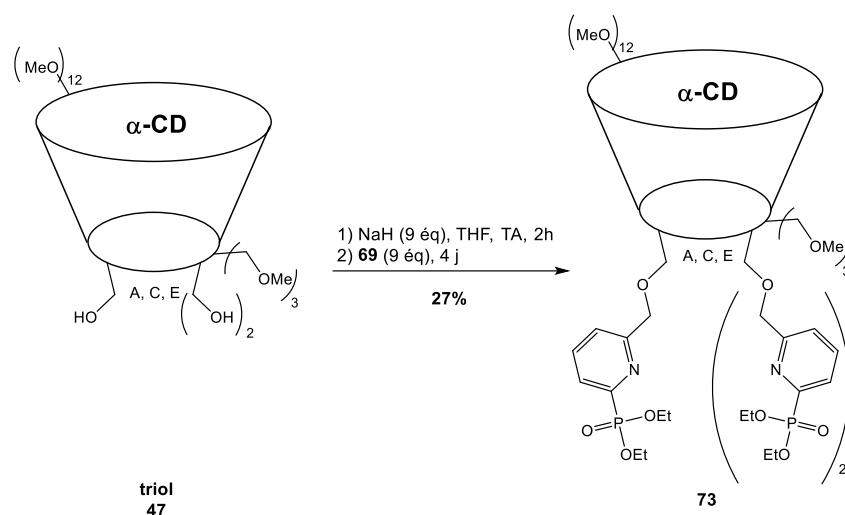


Schéma 20 : Synthèse de l'α-CD tri-fonctionnalisée 73

Ce premier essai a donné une conversion de 97% (Tableau 36 – Entrée 1) déterminée par HPLC-DEDL (Figure 59). Cette réaction n'a pas entraîné de formation de sous-produits dérivés de la cyclodextrine hormis le composé di-fonctionnalisé (Figure 60) à un temps de rétention de 15,2 min. Contrairement à la réaction précédente, les composés di- et tri-fonctionnalisés sont ici très bien résolus et très bien séparés (15,2 et 20,6 min, respectivement). Quelques sous-produits issus de la dégradation du dérivé pyridinique (hydrolyse et dimérisation) ont été observés en début de gradient, mais n'ont pas engendré de complication lors de la purification. En effet, même si le dimère du composé **69** possède une polarité, encore une fois, similaire au composé **73**, une simple purification par chromatographie sur gel de silice a permis d'isoler le composé **73**. Il est intéressant de noter que la pyridine-phosphonate **69** n'est pas entièrement consommée en fin de réaction, ceci pouvant signifier que la quantité engagée pourrait être diminuée. L'essai 2 (Entrée 2) a donc été réalisé avec deux fois moins de pyridine-phosphonate **69** (4,5 équivalents), ce qui n'a permis d'accéder qu'à une proportion en composé **73** de 3%, démontrant l'utilité du grand excès de l'électrophile pour favoriser la tri-fonctionnalisation du triol **47**. Les produits majoritairement formés, durant ces deux essais, ont été les dérivés mono- et di-fonctionnalisés, ainsi que des sous-produits, non-identifiés, dérivés de CD, à hauteur de, respectivement 27%, 34% et 36%. Malgré une conversion quantitative dans l'essai 1, le rendement isolé a atteint seulement 27%. Pour optimiser ce dernier, des essais à 50°C sans (Entrée 3) et avec (Entrée 4) de l'iodure de tétra-butyle ammonium (Bu₄NI) comme additif, ont été réalisés. Cependant, les rendements sont restés stables autour des 30% avec toujours des conversions quantitatives.

#	Equivalent 69	Additif	Temp.	Solvant	Proportion de composé 73 (%)	Rendement isolé
1	9	-	TA	THF	97	27
2	4,5	-	TA	THF	3	-
3	9	-	50°C	THF	99	23
4	9	Bu ₄ NI	50°C	THF	99	30

Tableau 36 : Optimisation des conditions réactionnelles de la tri-fonctionnalisation du triol 47 par la pyridine-phosphonate 69

La proportion de composé **73** est relative aux autres dérivés de CD et est calculée à partir des chromatogrammes HPLC-DEDL des produits bruts

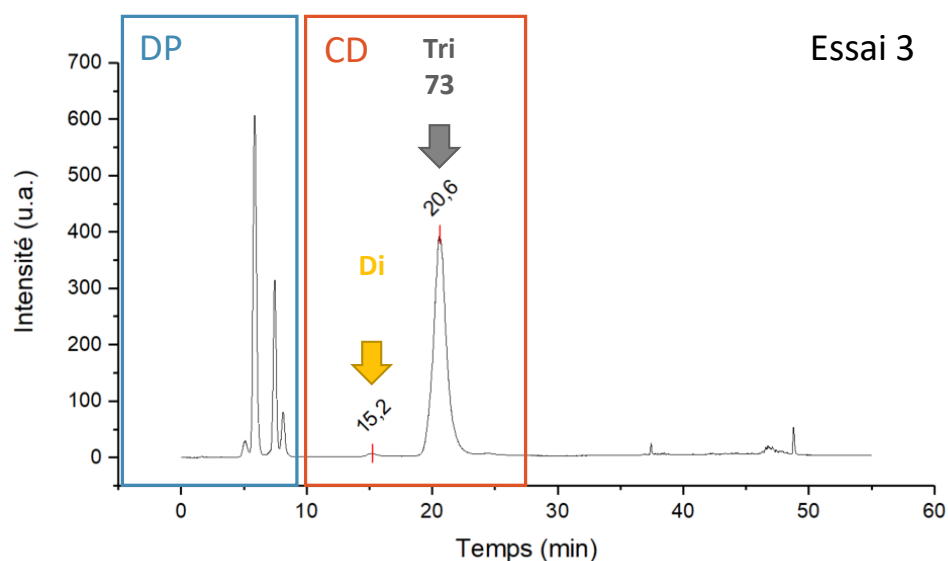


Figure 59 : Chromatogramme du produit brut de l'essai 1, représentatif de la synthèse du composé 73.
Chromatogrammes effectués en HPLC-DEDL (méthode 2).

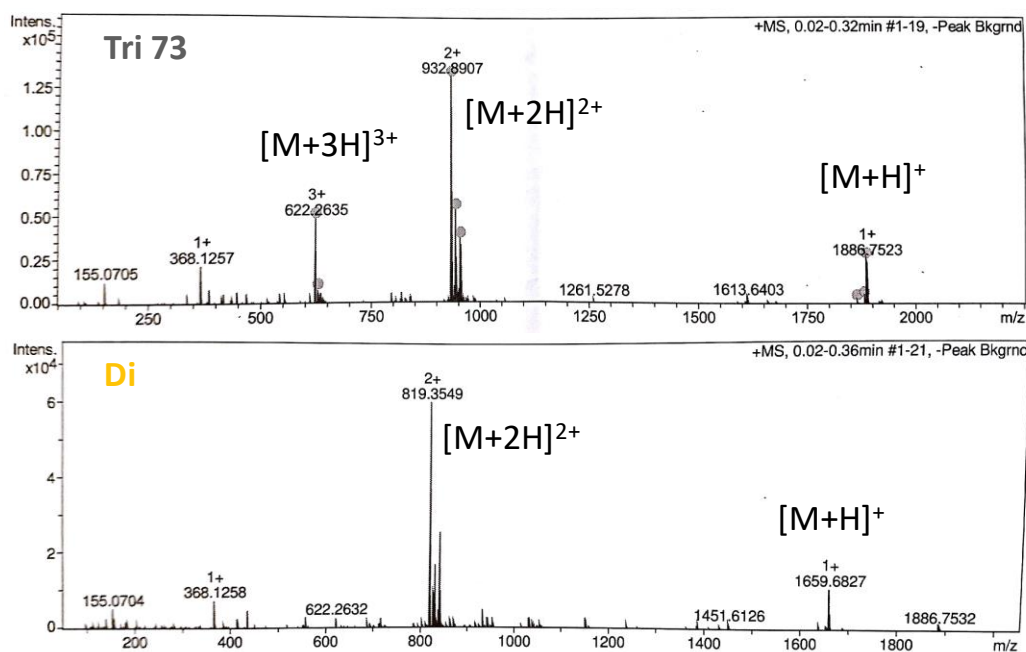


Figure 60 : HRMS ES⁺ des composés tri-fonctionnalisés 73 et di-fonctionnalisés

Afin de confirmer les conditions réactionnelles une comparaison des différents solvants habituellement utilisés a été testée (Figure 61). De manière significative, le THF se démarque du DMF et du DMSO qui ont engendré tous les deux un grand nombre de sous-produits dérivés de la pyridine-phosphonate. A noter que ces chromatogrammes ont été effectués avec des conditions de séparation différentes de celles présentées précédemment en utilisant un détecteur UV.

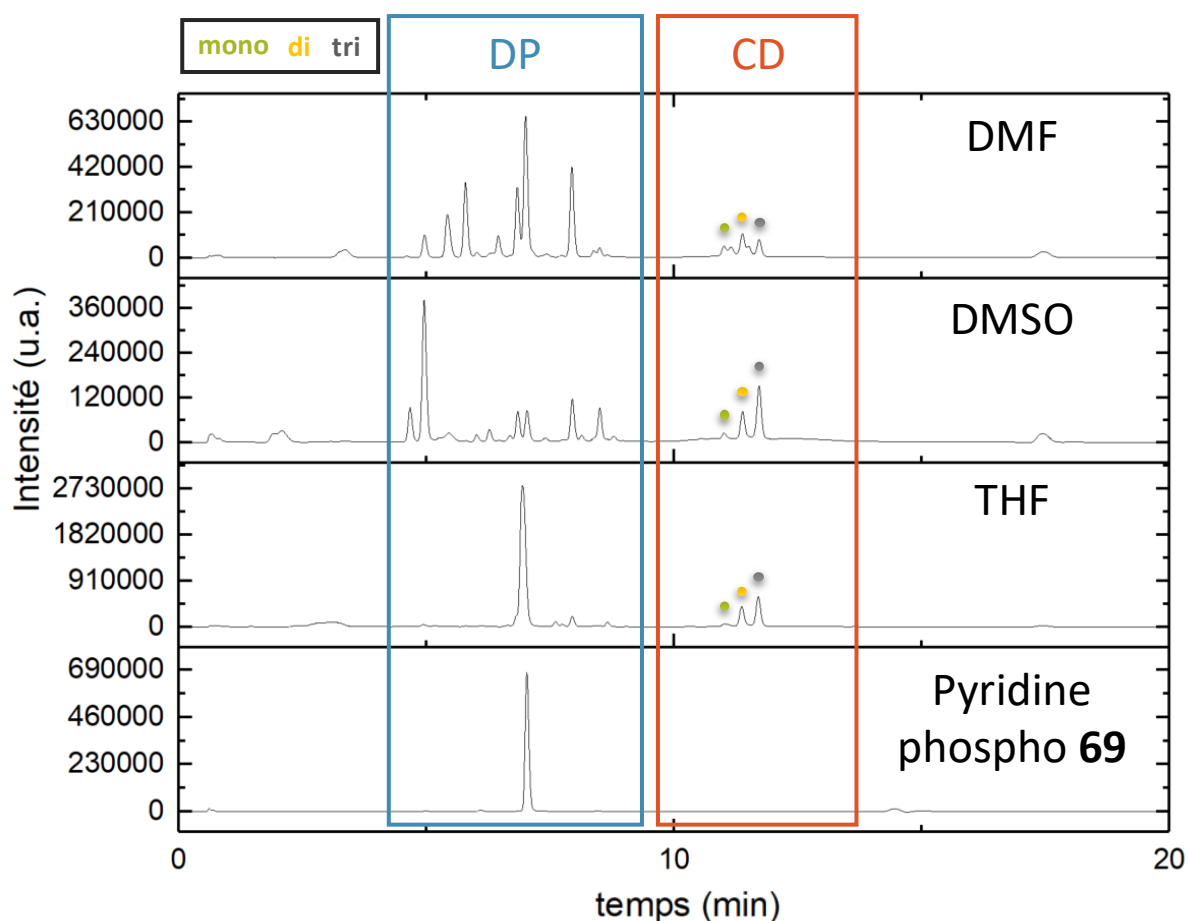


Figure 61 : Effet du solvant sur la synthèse du composé **73 après 90h de réaction.**
Chromatogrammes effectués en HPLC-UV (méthode 4).

Pour finir, le suivi dans le temps de la réaction, par LC-MS-UV, a mis en évidence que le triol **47** était entièrement consommé et que la proportion en composé tri-fonctionnalisé **73** n'évoluait plus au bout d'une heure de réaction.

Avec ces conditions optimisées, environ 500 mg d' α -CD tri-fonctionnalisée **73** ont pu être synthétisés, permettant de mettre en place la déprotection des groupements phosphonates en acide phosphonique, et ainsi d'accéder au ligand **La'**.

3. La déprotection des phosphonates du composé **73**

*Tentatives d'accès au composé **L α '***

Pour déprotéger des éthylphosphonates et accéder aux acides phosphoniques correspondants, les réactifs les plus couramment utilisés sont le bromure de triméthylsilane (TMSBr) et l'acide chlorhydrique concentré.^[171,172] La cyclodextrine pouvant être sensible aux conditions acides, les conditions utilisant le TMSBr ont été privilégiées. Afin de s'assurer de l'efficacité de ces conditions réactionnelles nous avons, tout d'abord, testé la déprotection des phosphonates du composé **69** (Schéma 21).

L'acide phosphonique **74** a ainsi été synthétisé et caractérisé en RMN et HRMS, sans difficultés apparentes, avec 88% de rendement.

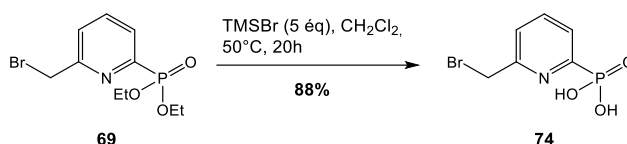


Schéma 21 : Synthèse du composé déprotégé **74**

Ainsi, des conditions similaires ont été transposées pour la réaction de déprotection des phosphonates présents sur la CD **73** (Schéma 22 et **Error! Reference source not found.** Tableau 37 – Entrées 1 et 2).

Les deux premiers essais ont été réalisés avec 18 équivalents de TMSBr, par irradiations micro-ondes et à température ambiante dans l'acétonitrile. Malgré la disparition totale du composé **73** et la formation de composés très polaires (Figure 62), il nous a été impossible de confirmer la formation du composé **L α '**.

#	Réactifs	Équivalent	Temp.	Solvant	Durée	Rendement
1	TMSBr	18	MO – 80°C	ACN	20 min	-
2	TMSBr	18	TA	ACN	18 h	-
3	NaOH (10 M)	-	reflux	-	16 h	-
4	HCl (12 M)	-	reflux	-	1 h	-

Tableau 37 : Conditions réactionnelles testées pour la déprotection des phosphonates du composé **73**

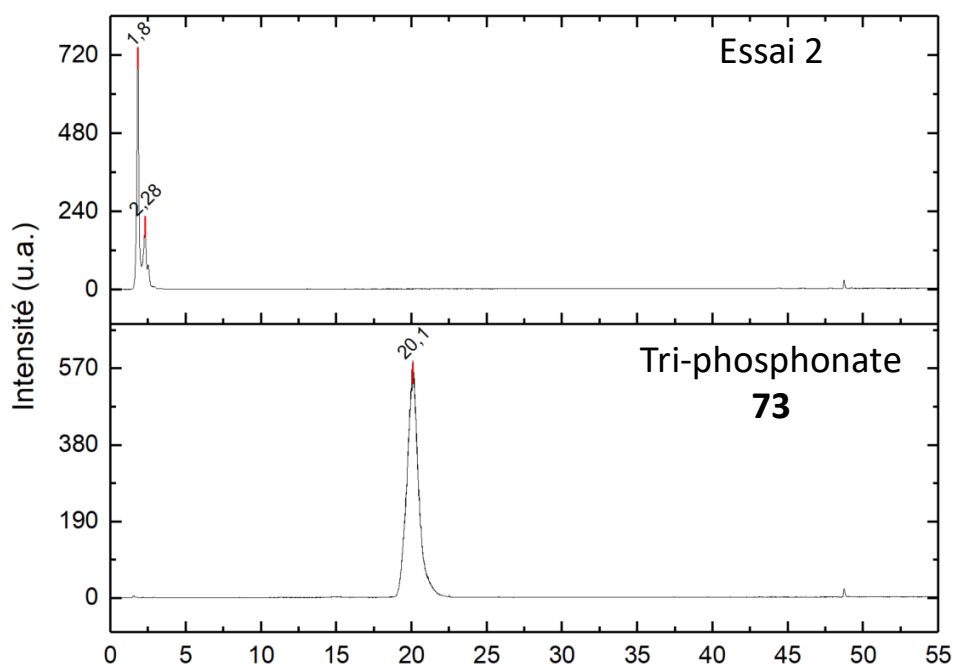


Figure 62 : Chromatogramme du composé **73 et du mélange brut de l'essai 2, représentatif de l'ensemble des différents essais effectués.**
Chromatogrammes effectués en HPLC-DEDL (méthode 2).

En effet, la polarité du produit obtenu, significativement plus importante que celle du phosphonate de départ **73**, laisse supposer la formation de l'acide phosphonique correspondant. Cependant, les spectres RMN ^1H (Figure 63) obtenus suite aux essais 1 et 2, révèlent que les groupements éthyles sont toujours présents alors que les spectres ^{31}P (Figure 64) révèlent la disparition du pic à 10,1 ppm correspondant au groupement phosphonate du composé **73** et l'apparition d'un seul nouveau pic à 3,5 ppm. L'analyse par spectrométrie de masse aurait pu aider à interpréter ces résultats divergeants. Or, bien que les spectres RMN ^1H indiquent la présence d'un composé similaire à l' α -CD tri-fonctionnalisée de départ **73** et que la révélation de la CCM par H_2SO_4 indique la présence d'un dérivé de sucre, aucune masse supérieures à 1000 Da pouvant correspondre à une cyclodextrine n'a pu être identifiée. Afin de résoudre ce problème de caractérisation, l'échantillon a été préparé, dans différentes conditions de pH et en présence de fer pour en analyser le complexe, ainsi que sous forme de sel d'ammonium. De plus, la méthode d'analyse en HRMS a subi des modifications au niveau de la phase mobile utilisée (avec ou sans HCOOH , etc.) et l'ionisation a toujours été effectué en électrospray positif et négatif. Malgré toutes ces tentatives, aucune analyse n'a permis l'identification d'une masse se rapprochant de celle du composé **La'**.

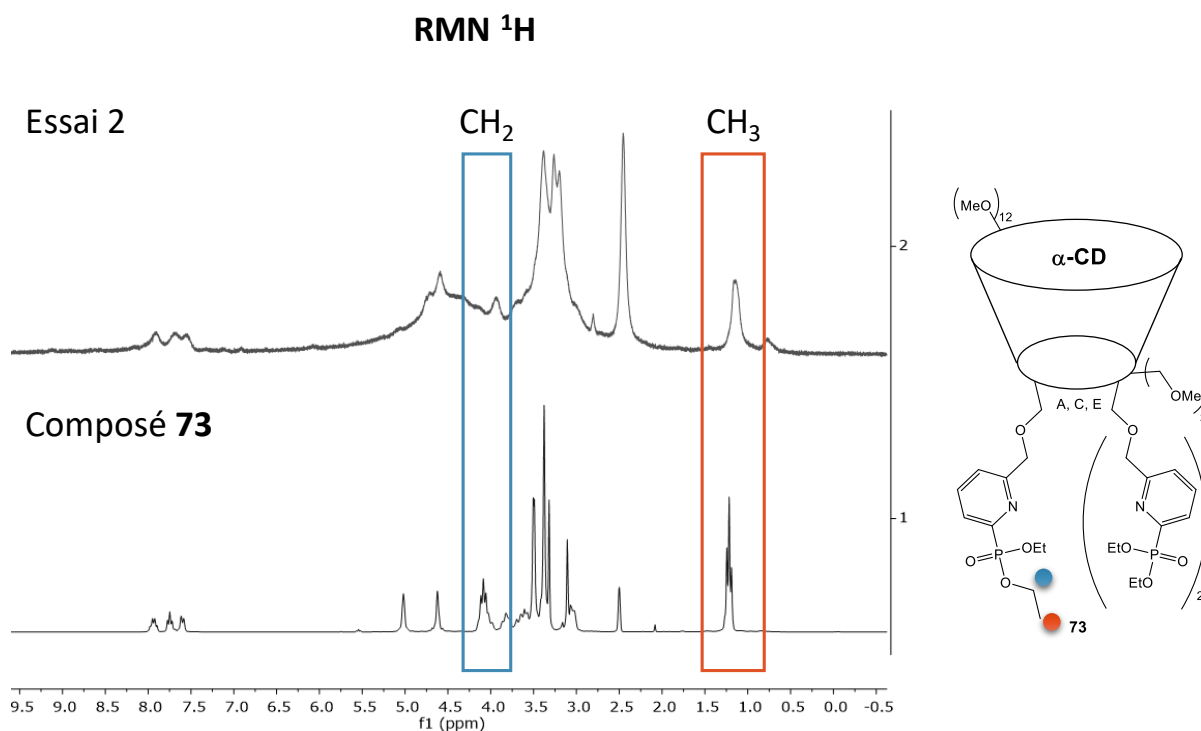


Figure 63 : Comparaison des RMN ^1H du composé **73 et du produit obtenu lors de l'essai de déprotection n°2**

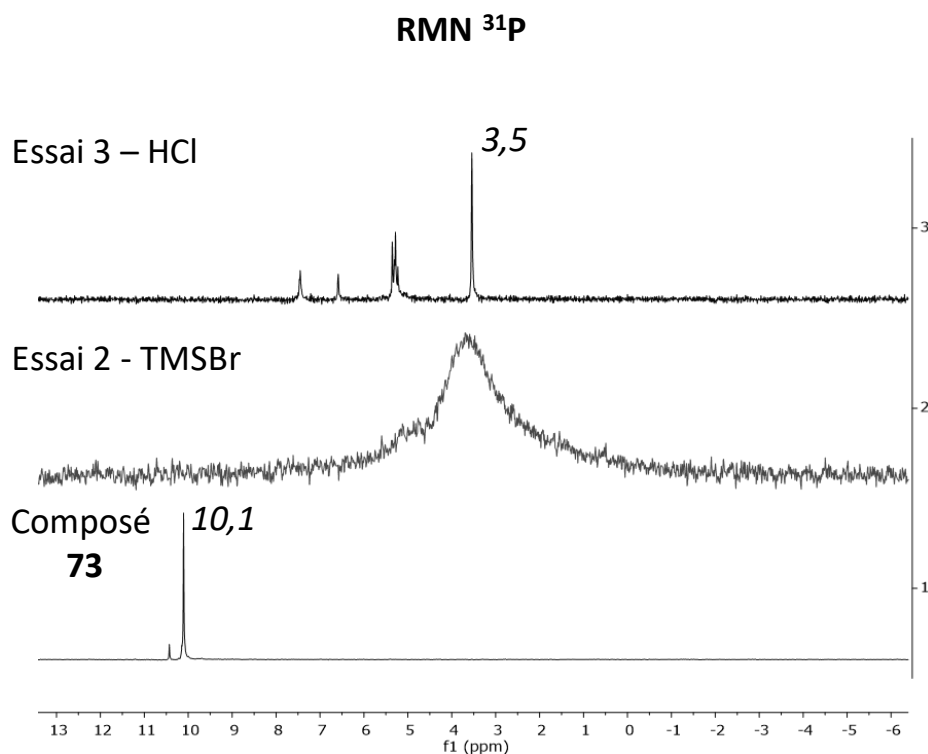


Figure 64 : Comparaison des RMN ^{31}P du composé **73 avec les essais de déprotection n°2 et 3**

En supposant que ces problèmes d'identification venaient de la méthode de déprotection utilisée, une voie de synthèse en milieu basique (Tableau 37 – Entrée 3) et une autre en milieu acide (Tableau 37 – Entrée 4) ont alors été testées. La déprotection en présence de soude n'a

apporté aucun résultat exploitable ni en RMN ^1H (pas résolu), ni en RMN ^{31}P (pas de pics), pas plus qu'en HRMS. La déprotection en présence d'HCl présentait, quant à elle, l'apparition de plusieurs pics en RMN ^{31}P (Figure 64), signifiant la formation de nouveaux composés intégrant du phosphore dans leur structure. De plus, un des pics possédait le même déplacement chimique que celui de l'essai 2 en présence de TMSBr. Cependant, les mêmes problèmes au niveau de la caractérisation en spectrométrie de masse nous ont empêché de confirmer la formation du composé **L α'** .

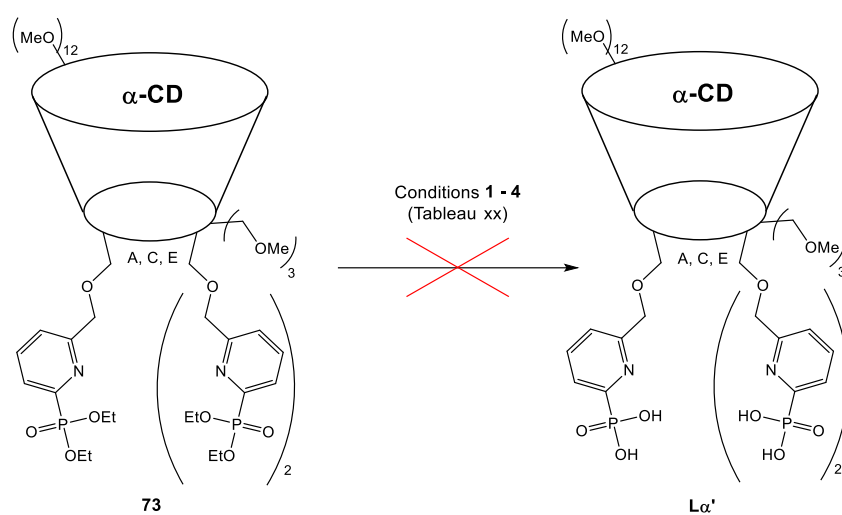


Schéma 22 : Accès au ligand **L α' par déprotection des phosphonates du composé **73****

Puisque l'acide phosphonique **74** avait pu être isolé et caractérisé, une solution alternative évidente au problème de déprotection du phosphonate présent sur la CD **73**, était de tester le greffage du composé **74** directement sur le triol **47** (Schéma 23). Cependant, par suivi HPLC-DEDL aucune réactivité n'a été observé, ne permettant pas, encore une fois, de former le ligand final **L α'** .

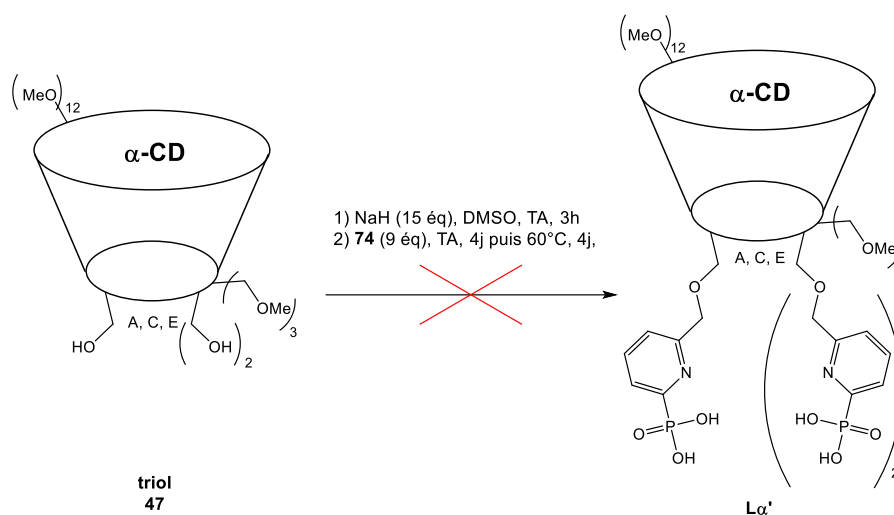


Schéma 23 : Synthèse du composé final La' par tri-fonctionnalisation du triol **47 par l'aide phosphonique **74****

Par faute de temps, les tentatives de formation et/ou de caractérisation du composé **La'** n'ont pas pu être approfondies davantage.

C. La tri-fonctionnalisation du Triol par la pyridine-ester *t*Bu

59

1. La synthèse de l' α -CD tri-fonctionnalisée **75**

La tri-fonctionnalisation du triol **47** par la pyridine-carboxylate de *tert*-butyle **59** a pu être réalisée sans développement méthodologique supplémentaire. Le suivi dans le temps nous a permis de déterminer le temps optimal de réaction, qui s'élève à 4 jours. L'utilisation des conditions préalablement optimisées pour le composé **73** (Schéma 24) a permis d'atteindre des proportions en composé **75**, de l'ordre de 70% (Figure 65) et des rendements HPLC compris entre 20% et 40%, ceci à partir d'un produit pré-purifié par chromatographie flash.

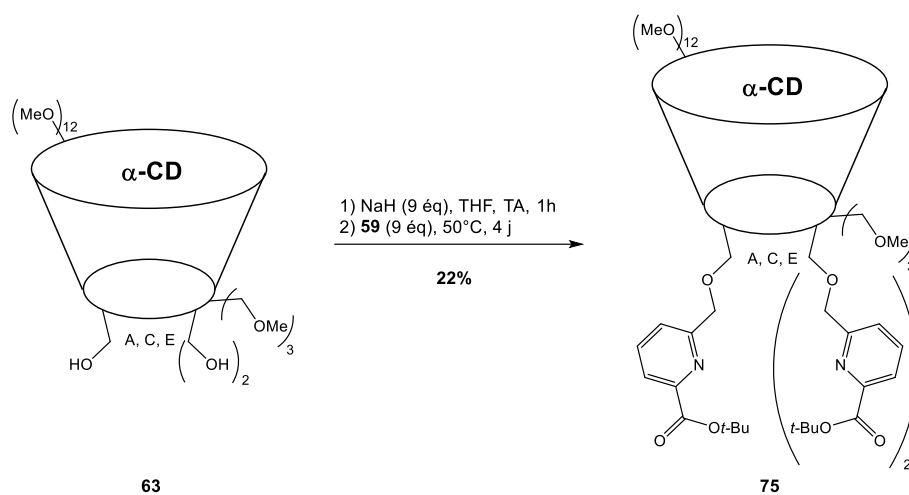


Schéma 24 : Synthèse du composé 75

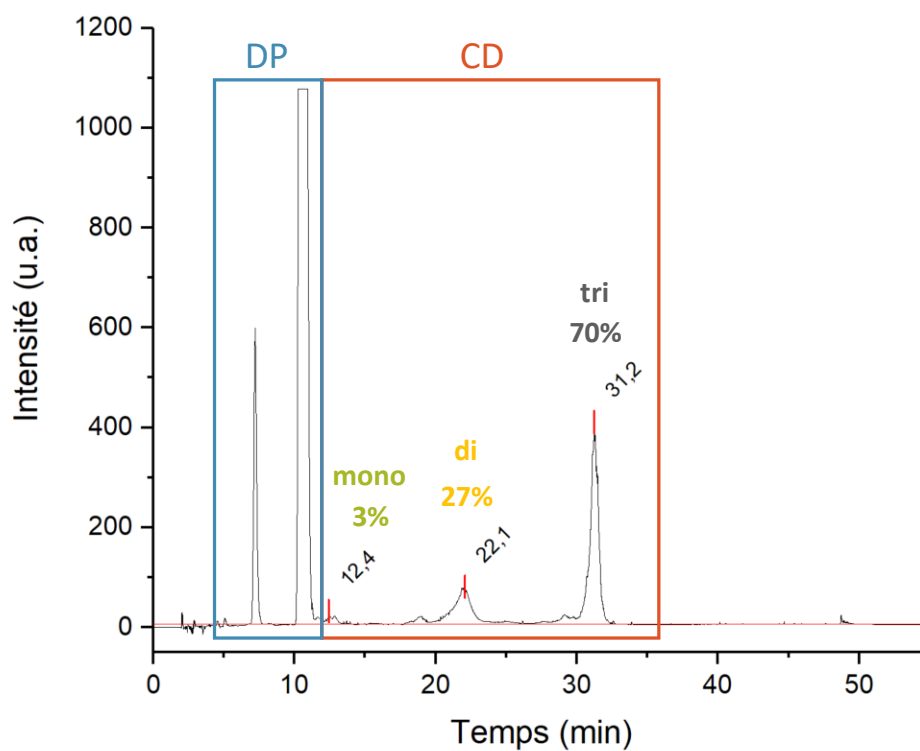


Figure 65 : Chromatogramme d'un produit brut après tri-fonctionnalisation du triol 47 par la pyridine-ester tBu 59

Chromatogramme effectué en HPLC-DEDL (méthode 2)

Bien que les différents dérivés de CD aient été très bien séparés par la méthode HPLC (12,4 ; 22,1 et 31,2 min), la fonctionnalisation du triol était toujours accompagnée de la formation de sous-produits dérivés du réactif pyridinique **59**, compliquant la purification par

chromatographie sur gel de silice. Ce composé n'a pu être isolé, lui aussi, que par HPLC semi-préparative.

Des essais ont été effectués par micro-ondes (MO) afin d'étudier l'influence de ce type d'activation sur le temps de réaction (Tableau 38).

#	Chauffage	Temp.	Solvant	Durée	Proportion (%) triol/mono/di/tri
1	Classique	50°C	THF	4 j	0/3/27/ 70
2	MO	100 °C	THF	3 h	7/ 65 /27/1
3	MO	160 °C	THF	1 h	42/ 53 /5/0

Tableau 38 : Comparaison des essais effectués par chauffage micro-onde (MO) par rapport au chauffage classique sur la proportion des dérivés de CD formée.

Proportions calculées à partir des chromatogrammes effectués en HPLC-DEDL.

L'activation micro-ondes ne nous a pas permis d'accélérer la cinétique de la réaction vers la formation du tri-ester **75** dans les deux essais effectués (Tableau 38 – Entrées 2 et 3). Cependant, il semblerait que cette technique puisse offrir une sélectivité vers la mono-fonctionnalisation de la cyclodextrine. Ce résultat serait à développer, mais pour ne pas nous éloigner des objectifs initiaux, l'amélioration de cette réaction n'a pas été plus investiguée dans le cadre de cette thèse.

Environ 400 mg de ce composé tri-ester **75** ont pu être synthétisés et ont permis d'accéder assez rapidement à l'étape de déprotection.

2. La déprotection des esters *tert*-butyliques du composé **75**

*Accès au composé **Lα***

La déprotection des fonctions esters *tert*-butylique par l'acide formique (Schéma 25) a été suivie au cours du temps par LC-MS (Figure 66) et a montré que cette réaction nécessitait une durée et une concentration en acide formique plus élevées que lors de la déprotection des esters *tert*-butylique sur la CD **63** (Schéma 17).

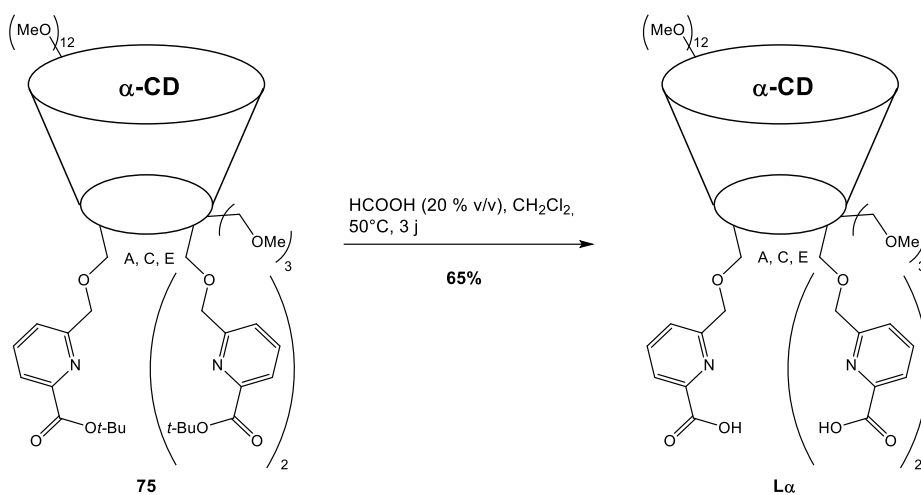


Schéma 25 : Synthèse du composé **L α**

En effet, la réaction a été initialement engagée avec 10% d'acide formique en solution dans le dichlorométhane. La réaction a évolué en passant par les formes partiellement déprotégées (mono- et di-acide). Après 45 h de réaction, l'ajout de 10% supplémentaire a permis de compléter la réaction après 96 h au total. Après traitement et lyophilisation du milieu, il est apparu nettement que le composé **L α** demeure la seule espèce dérivant d'une CD.

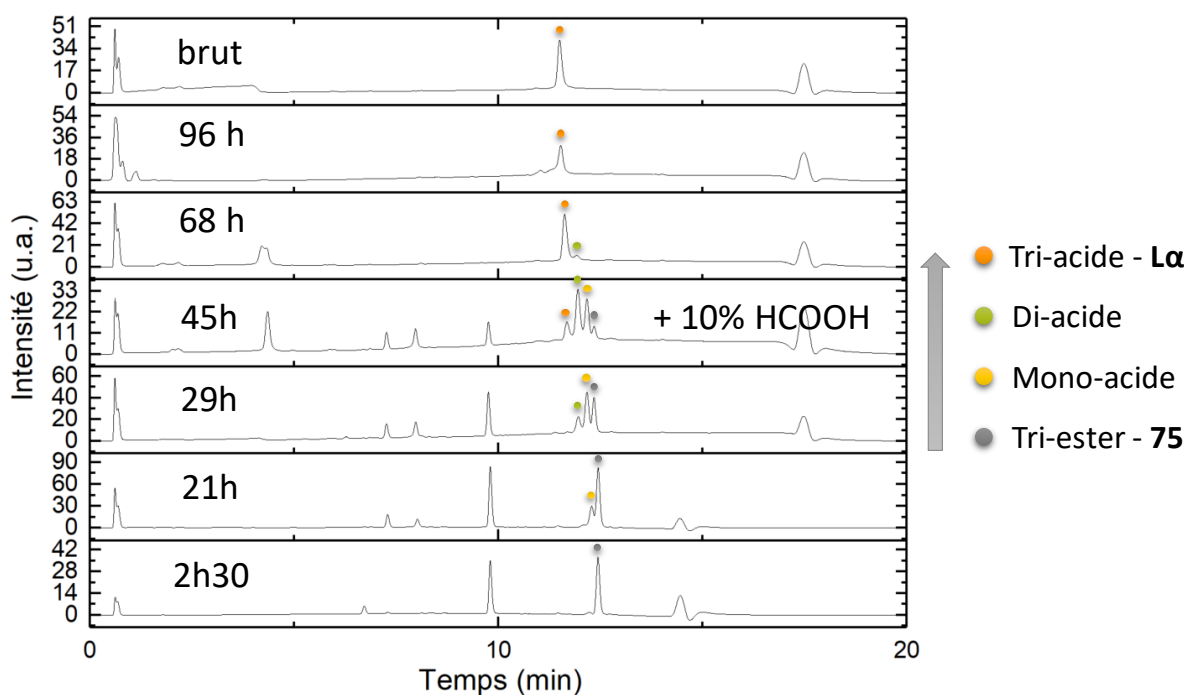


Figure 66 : Suivre de la réaction de déprotection du composé 75
Chromatogrammes effectués en HPLC-UV (méthode 4)

En démarrant la réaction directement avec 20% d'acide formique la réaction a été cette fois complète après 3 jours. Cette déprotection efficace, avec pour unique traitement des

évaporations et lyophilisations afin d'éliminer l'acide formique résiduel, a permis d'isoler 260 mg de composé final **L α** .

III. Conclusion

Les synthèses totales de deux des composés finaux visés **L β** et **L α** ont été menés à terme.

Suite aux difficultés de réactivité et de purification rencontrées lors de la tétra-fonctionnalisation du tétrol **46** par le dérivé pyridinique **52** portant l'ester méthylque, deux voies alternatives ont été envisagées.

La voie alternative 1 proposant de modifier le lien éther, initialement prévu, par un lien amine n'a pas été concluante. Les différentes voies de synthèse testées n'ont jamais permis d'accéder au composé tétra-fonctionnalisé.

La voie alternatives 2, quant à elle, proposait de modifier l'ester méthylque de la pyridine par un groupement plus stable qui empêcherait la formation de sous-produits contraignants pour la purification. La solution n'a pas tant été trouvée dans l'utilisation de ce nouvel ester mais dans le développement de conditions d'analyses en HPLC qui a joué, ici, un rôle clé. En effet, le suivi des réactions par HPLC a permis, dans un premier temps, de débloquent l'optimisation des synthèses mais aussi d'accéder à des conditions de purification pour isoler les trois CDs précurseurs des ligands finaux : **63**, **73** et **75**.

En règle générale, la fonctionnalisation de l' α -CD a été plus simple à mettre en œuvre par rapport à celle de la β -CD. La symétrie des dérivés d' α -CD a facilité la caractérisation par RMN et les réactions de fonctionnalisation ont engendré moins de sous-produits dérivés de CD facilitant l'analyse et la purification.

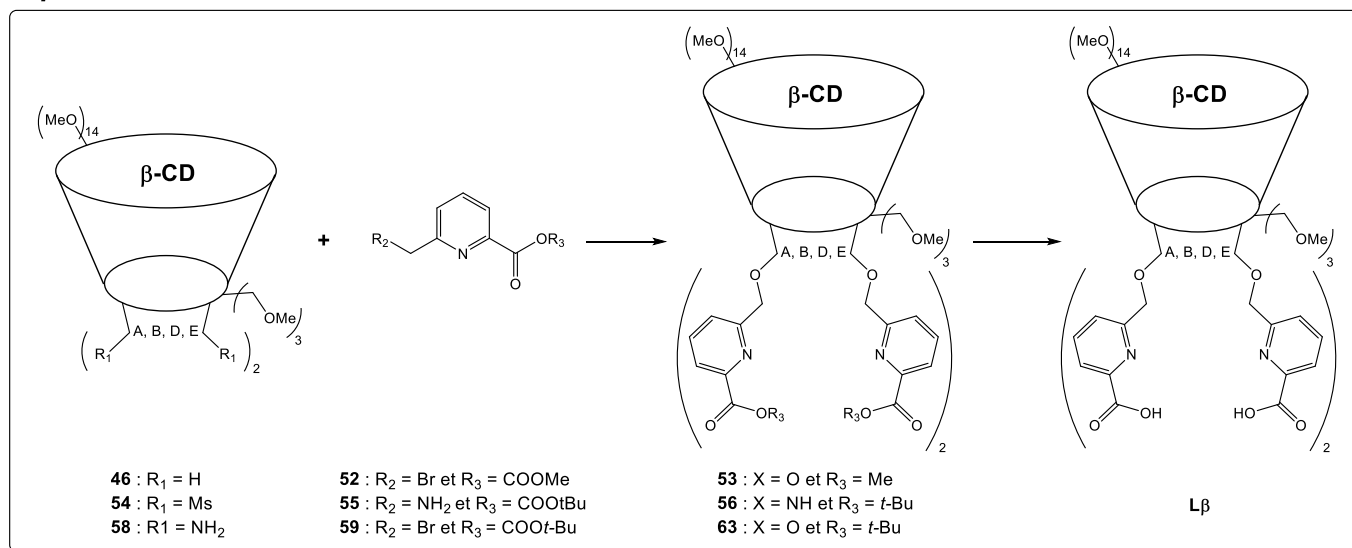
Cependant, la synthèse du composé final **L α'** possédant les trois groupement pyridine-phosphonate, est resté bloquée à la dernière étape de déprotection. En effet, les résultats de l'ensemble des analyses effectuées, suite aux divers essais de déprotection, divergent, ce qui n'a pas permis de confirmer la formation du composé déprotégé **L α'** .

Contrairement au cas des groupements phosphonates, les fonctions esters *tert*-butyliques des composés **63** et **75**, ont été facilement déprotégées menant aux deux composés finaux **L β** et

L α . Les quantités obtenues de ces deux produits ont été suffisantes pour envisager sereinement l'étape suivante de caractérisation physico-chimique des complexes de Gd(III).

L'ensemble des voies de synthèses étudiées pour accéder aux composés préparés est récapitulé dans le Schéma 26 ci-dessous.

β -CD



α -CD

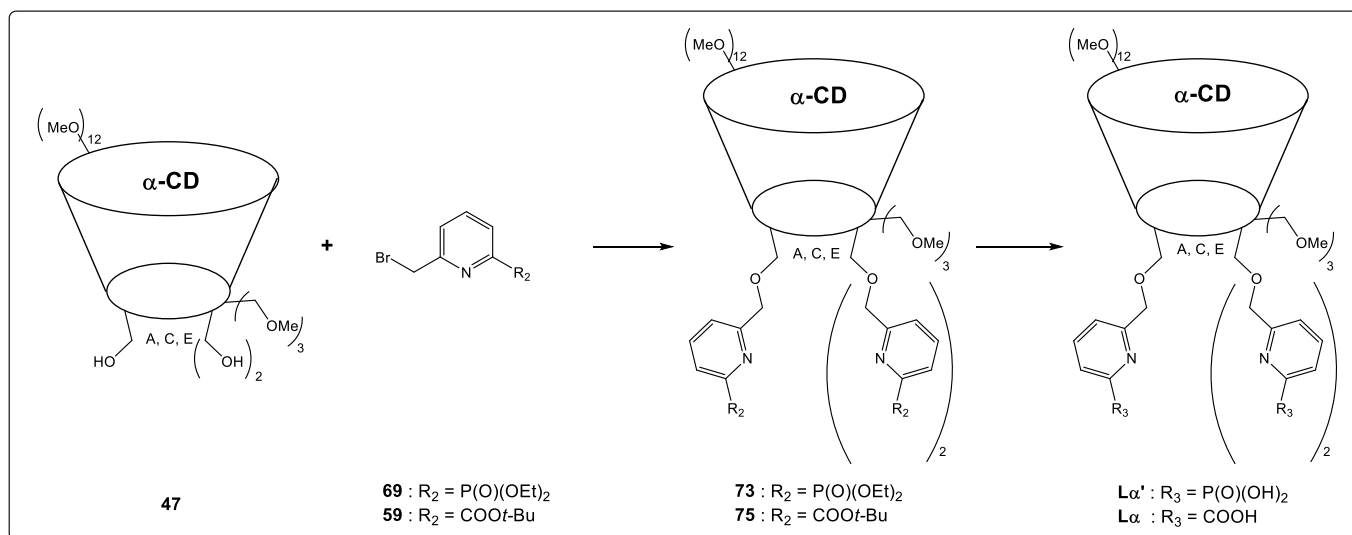


Schéma 26 : Résumé de l'ensemble des composés clés synthétisés ou ciblés

IV. Bibliographie

- [65] Y. Li, H. Chen, J. Xu, N. N. Yadav, K. W. Y. Chan, L. Luo, M. T. McMahon, B. Vogelstein, P. C. M. van Zijl, S. Zhou, et al., *Oncotarget* **2016**, 7, 6369–6378.
- [116] P. J. Skinner, A. Beeby, R. S. Dickins, D. Parker, S. Aime, M. Botta, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 0, 1329–1338.
- [117] A. Barge, G. Cravotto, B. Robaldo, E. Gianolio, S. Aime, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, 57, 489–495.
- [118] Y. Song, E. K. Kohlmeir, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6662–6663.
- [120] J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 1505–1509.
- [126] D. Maffeo, M. Lampropoulou, M. Fardis, Y. G. Lazarou, I. M. Mavridis, D. A. I. Mavridou, E. Urso, H. Pratsinis, D. Kletsas, K. Yannakopoulou, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1910–1921.
- [131] I. Zgani, H. Idriss, C. Barbot, F. Djedaïni-Pilard, S. Petit, M. Hubert-Roux, F. Estour, G. Gouhier, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 564–569.
- [142] R. Gramage-Doria, D. Rodriguez-Lucena, D. Armspach, C. Egloff, M. Jouffroy, D. Matt, L. Toupet, *Chem. – Eur. J.* **2011**, 17, 3911–3921.
- [144] C.-C. Ling, A. W. Coleman, M. Miocque, *Carbohydr. Res.* **1992**, 223, 287–291.
- [152] R. Gramage-Doria, D. Armspach, D. Matt, L. Toupet, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554–1559.
- [153] E. W. Price, J. F. Cawthray, G. A. Bailey, C. L. Ferreira, E. Boros, M. J. Adam, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 8670–8683.
- [154] S. Letort, Synthèse de Nouveaux Épurateurs Oligosaccharidiques d'agents Organophosphorés Neurotoxiques - Relations Structure-Activité, Université de Rouen, **2014**.
- [155] S. Letort, D. Mathiron, T. Grel, C. Albaret, S. Daulon, F. Djedaïni-Pilard, G. Gouhier, F. Estour, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 2601–2604.
- [156] S. Tian, H. Zhu, P. Forgo, V. T. D'Souza, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2624–2630.
- [157] A. Kuzuya, T. Ohnishi, T. Wasano, S. Nagaoka, J. Sumaoka, T. Ihara, A. Jyo, M. Komiyama, *Bioconjug. Chem.* **2009**, 20, 1643–1649.
- [158] P. Liu, Y. Chen, J. Deng, Y. Tu, *Synthesis* **2001**, 2078–2080.
- [159] F. Caillé, Synthèse et Caractérisation de Sondes Bimodales Pour l'IRM et l'imagerie Optique, Université d'Orléans, **2011**.
- [160] N. Delsuc, F. Godde, B. Kauffmann, J.-M. Léger, I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11348–11349.
- [161] L.-E. Magnusson, D. S. Risley, J. A. Koropchak, *J. Chromatogr. A* **2015**, 1421, 68–81.
- [162] I. Caron, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20, 1015–1035.
- [163] S. Paul, R. R. Schmidt, *Synlett* **2002**, 2002, 1107–1108.
- [164] E. Filali, G. Lloyd-Jones, D. Sale, *Synlett* **2009**, 2009, 0205–0208.
- [165] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**.
- [166] T. Hirao, T. Masunaga, Y. Ohshiro, T. Agawa, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 3595–3598.
- [167] E. Jablonkai, G. Keglevich, *Org. Prep. Proced. Int.* **2014**, 46, 281–316.
- [168] Y. Belabassi, S. Alzghari, J.-L. Montchamp, *J. Organomet. Chem.* **2008**, 693, 3171–3178.
- [169] L. J. Gooßen, M. K. Dezfali, *Synlett* **2005**, 2005, 445–448.

- [170] N. Maindron, S. Poupart, M. Hamon, J.-B. Langlois, N. Plé, L. Jean, A. Romieu, P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2357–2370.
- [171] L. Deng, J. Diao, P. Chen, V. Pujari, Y. Yao, G. Cheng, D. C. Crick, B. V. V. Prasad, Y. Song, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4721–4734.

Chapitre II : Caractérisation physico-chimique des ligands L β et L α et de leur complexe de Gd(III)

Ce chapitre porte sur la caractérisation physico-chimique des ligands L β et L α et de leur complexe de Gd(III) associé. Ce travail a été effectué au sein du Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) en collaboration avec l'équipe d'Eva Jakab-Tóth. L'objectif de cette étude est d'évaluer le type de complexe formé ainsi que leur stabilité (log K) et leur efficacité (r_1).

I. Etude du ligand L β et du complexe GdL β

A. Détermination de la stœchiométrie du complexe

Nous avons, dans un premier temps, évalué la stœchiométrie du complexe formé en utilisant deux techniques : un dosage relaxométrique et un dosage en luminescence. Il faut noter que les équivalents de cations métalliques ajoutés pour ces dosages sont calculés sur la base d'une pureté du ligand de 100%.

1. Dosage relaxométrique

Le ligand L β possède des sites de coordination (oxygènes des carboxylates et azote des pyridines) pouvant complexer les cations métalliques. Ainsi, il est possible d'évaluer la stœchiométrie du complexe en ajoutant, progressivement, à une solution de ligand une quantité connue de solution de trichlorure de gadolinium (GdCl₃) tout en mesurant le temps de relaxation T_1 des protons de l'eau. Dans le cas de la formation d'un complexe GdL stable, l'ajout de Gd(III) entraîne une augmentation constante de $1/T_{1p}$, dépendant de r_1 , jusqu'à complexation totale. Après quoi, le Gd(III) ajouté reste sous sa forme libre, contribuant ainsi à la relaxivité globale et provoquant une rupture de la pente.

Si on reprend l'Equation 5 :

(5) $\frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1d}} + r_1[Gd]$ où T_{1obs} est la valeur mesurée par le relaxomètre, $1/T_{1d} = 0,366$ à 25°C et 60 MHz et $r_1[Gd] = r_{1x}[Gd]_x + r_{1y}[Gd]_y + \dots$ où x, y, ... correspondent aux espèces comportant du Gd(III) présentes dans la solution, il est alors possible d'écrire :

$$(12) \frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1obs}} - \frac{1}{T_{1d}} = r_{1GdL}[GdL] + r_{1Gd^{3+}}[Gd^{3+}]$$

En traçant $1/T_{1p}$ en fonction de la quantité de $GdCl_3$ ajouté, on pourra alors déterminer la quantité de $Gd(III)$ à partir de laquelle le métal n'est plus complexé et donc le ratio M : L pour lequel 100% de $L\beta$ forme $ML\beta$.

Le dosage (Figure 67) est effectué à partir d'une solution de ligand à 1,02 mM dans un tampon urotropine à pH = 5,7 et d'une solution de $GdCl_3$, à 6,85 mM, à 25°C et à 60 MHz. Les incréments de $Gd(III)$ sont de 0,13 équivalent ce qui correspond à des ajouts de 10 μ L.

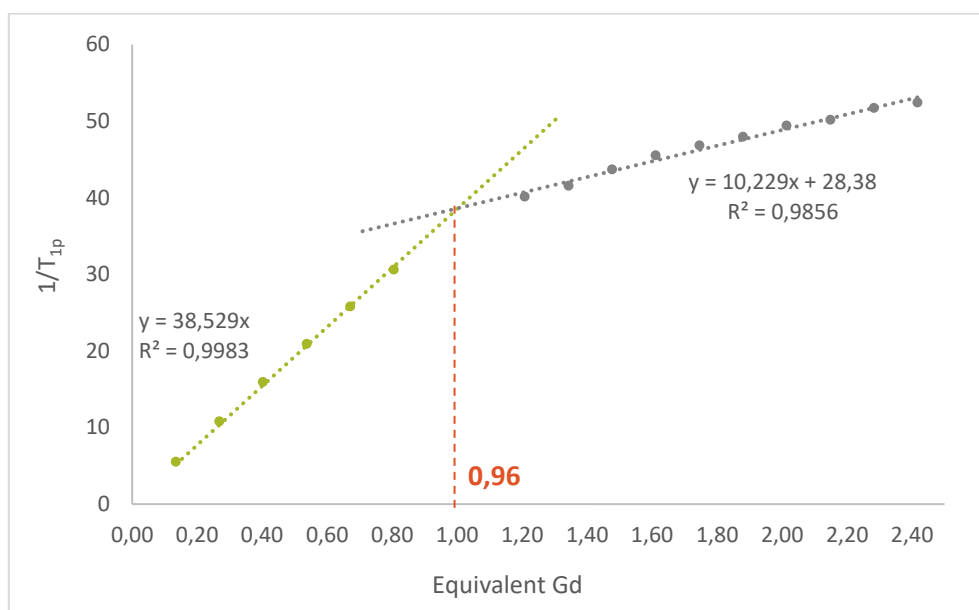


Figure 67 : Dosage relaxométrique du ligand $L\beta$ à une concentration de 1 mM à 25°C et 60 MHz

Les régressions linéaires des deux droites avant et après rupture de la pente du graphique obtenue (Figure 67) se croisent à 0,96 équivalent de $Gd(III)$ allant dans le sens de la formation d'un complexe $GdL\beta$ de stœchiométrie 1 : 1.

2. Dosage en luminescence

Ce dosage est basé sur le principe de l'effet antenne. En effet, la capacité d'absorption du lanthanide seul étant trop faible, il est nécessaire de passer par cet effet antenne pour observer la luminescence. Dans le cas où un groupement chromophore, telle que la pyridine, est porté par le ligand, celui-ci est capable de transférer son énergie au lanthanide, après excitation à la longueur d'onde d'absorption de celui-ci. Ainsi, les électrons passent du niveau singulet S_0 aux niveaux singulets d'énergie plus élevés S_1 , S_2 , etc.^[173] Puis, le retour à l'état

stationnaire S_0 est influencé par la présence du lanthanide, ici l'euporium Eu(III) . De ce fait, le croisement intersystème, permettant de remplir les états triplets T_1 du ligand, sera favorisé pour finalement conduire à un transfert d'énergie vers les niveaux excités de l'Euporium $^5D_{0-2}$, c'est l'effet antenne. La désexcitation par voie radiative, responsable de la luminescence, s'effectue entre le niveau 5D_0 et les niveaux de plus basses énergies $^7F_{0-4}$ correspondant à cinq bandes d'émission principales comprises entre 550 nm et 750 nm (Figure 68).

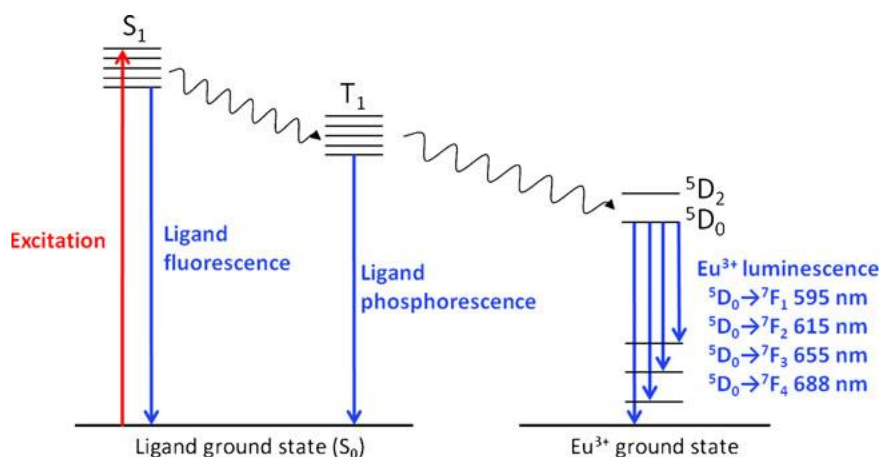


Figure 68 : Processus d'émission par luminescence d'un chélate d'euporium^[173]

Ainsi, l'ajout progressif d' Eu(III) à une solution de ligand augmentera le signal d'émission jusqu'à atteindre un palier qui correspondra à la formation totale de complexe. Le dosage s'effectue à partir d'une solution de ligand à 30 μM préparée dans le tampon urotropine à $\text{pH} = 5,7$. Puis l'ajout successif de 0,1 équivalent d'Euporium (solution à 1,5 mM d' EuCl_3), soit 5 μL jusqu'à 1,5 équivalents puis de 0,2 en 0,2 jusqu'à 2,9 équivalents, nous permet d'obtenir les spectres d'émission en luminescence suite à une excitation à 268 nm (Figure 69.a).

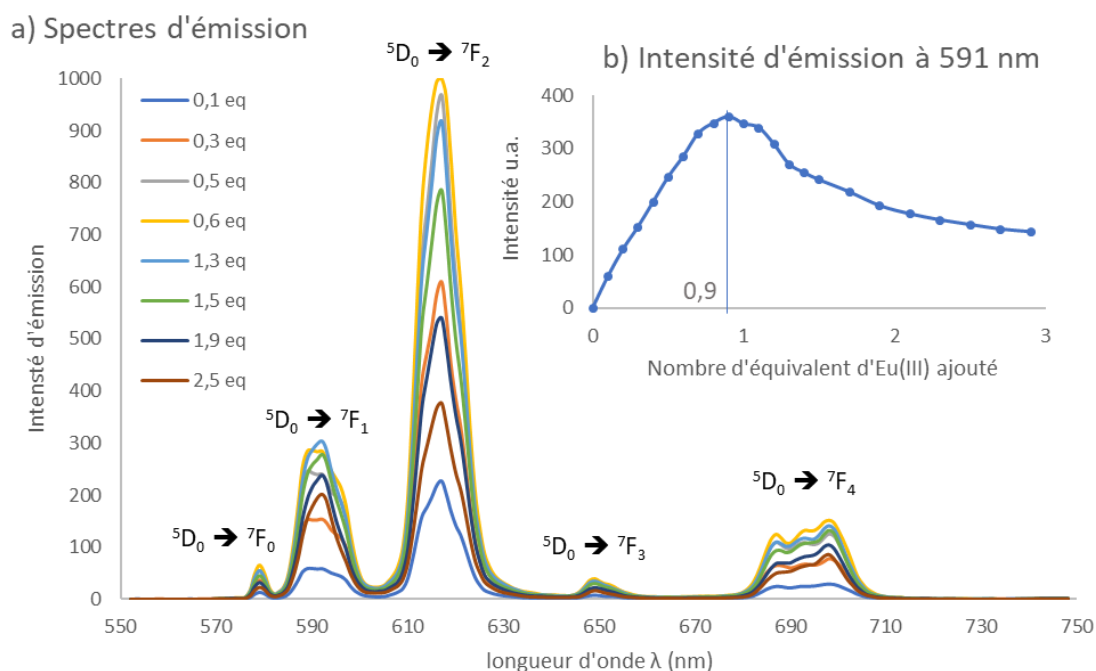


Figure 69 : a) Superposition des spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 268$ nm) d'une solution de ligand L6 à 30 μ M en présence d'un nombre d'équivalent d'Eu(III) progressif (légende à gauche) ; b) Graphique représentant l'évolution de l'intensité de luminescence de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (591 nm) en fonction du nombre d'équivalent d'Eu(III)

Le spectre d'émission du complexe EuL β est caractéristique d'un complexe d'Eu(III) classique avec ses cinq bandes d'émission, décrites précédemment. Les deux bandes les plus intenses correspondent aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ à 591 nm et $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ à 617 nm. La stœchiométrie du complexe peut s'évaluer à partir du tracé de l'intensité d'une de ces bandes en fonction du nombre d'équivalent d'Eu(III) ajouté (Figure 69.b).

La courbe atteint un maximum à 0,9 équivalent pour finalement décroître lentement. Ce maximum montre la formation d'une première espèce dans un ratio EuL 0,9 : 1, cohérent avec celui déterminé en relaxométrie. Cependant la décroissance qui suit est caractéristique d'un quenching de luminescence dû à la présence d'un deuxième cation métallique Eu(III), comme démontré par Bonnet *et al.*^[174]

B. Stabilité du complexe – Etude potentiométrique

Les constantes de stabilité thermodynamiques des espèces présentes en solution se déterminent par dosage potentiométrique. Trois titrations différentes, répétées chacune deux fois, sont effectuées en milieu KCl 0,1 M, permettant de garder la force ionique du milieu constante à 25°C et sous flux d'azote, afin d'éviter la formation de carbonates. La possibilité

d'une seconde espèce, bimétallique, a été étudiée en faisant varier le rapport Gd : L (0 : 1 ; 1 : 1 et 2 : 1) avec [L] = 2 mM.

On obtient alors les courbes de titrations suivantes :

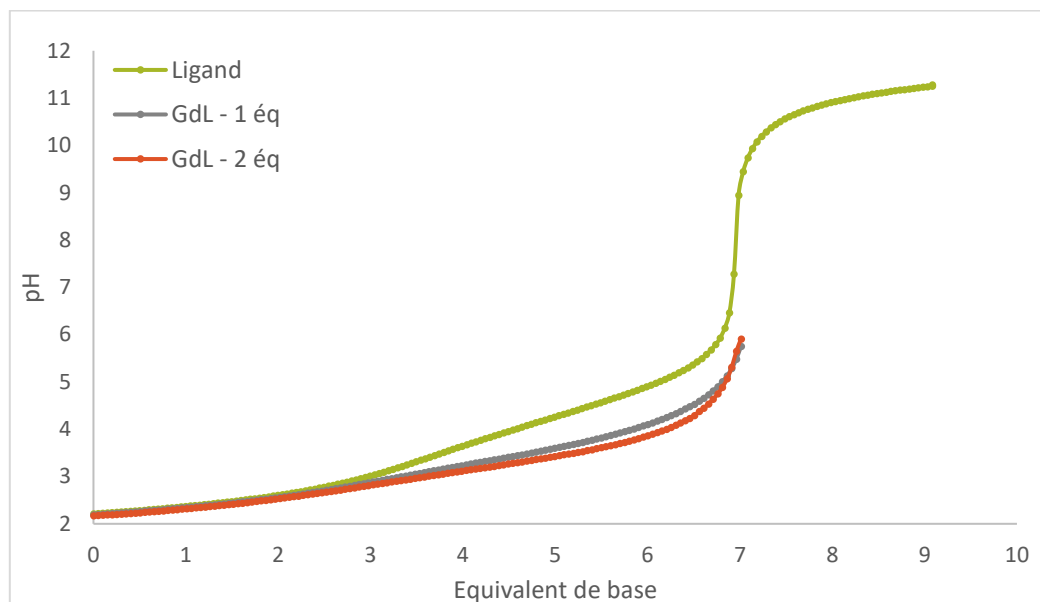


Figure 70 : Courbes des dosages potentiométriques d'une solution de ligand Lβ à 2 mM dans KCl 0,1 M à 25°C avec différentes proportions de Gd (0,1 éq et 2 éq)

Les courbes de titrage du ligand Lβ en présence de 1 et 2 équivalents de Gd(III) ne se superposent pas, ce qui va dans le sens de la formation d'une seconde espèce en solution.

Le logiciel Hyperquad 2008® nous permet de calculer quatre constantes de protonation ainsi que les constantes de stabilité thermodynamiques pour le complexe GdLβ, ses formes protonées et l'espèce supposée, Gd₂Lβ (Tableau 39 et Tableau 40).

	Equilibre	Constante
Protonation du ligand	$[LH_{i-1}] + [H] \rightleftharpoons [LH_i]$	$K_{Hi} = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H]}$
Formation des complexes	$[M_{m-1}L] + [M] \rightleftharpoons [M_mL]$	$K_{M_mL} = \frac{[M_mL]}{[M_{m-1}L][M]}$
Protonation des complexes	$[M_mLH_{i-1}] + [H] \rightleftharpoons [M_mLH_i]$	$K_{M_mLH_i} = \frac{[M_mLH_i]}{[M_mLH_{i-1}][H]}$

Tableau 39 : Définition des constantes de protonation et d'équilibre thermodynamique

Espèce	L β				GdL β		Gd ₂ L β	
log K	log K _{H1}	log K _{H2}	log K _{H3}	log K _{H4}	log K _{GdL}	log K _{GdLH}	log K _{GdLH2}	log K _{Gd2L}
	5,16(2)	4,52(6)	4,00(6)	3,3(1)	5,58(5)	4,2(5)	3,0(1)	3,4(1)

Tableau 40 : Constantes de protonation du ligand L β et de stabilité thermodynamiques des différentes espèces présentes en solution

Le chiffre entre parenthèses correspond à l'erreur sur le dernier chiffre

L'attribution des constantes de protonation se fait par comparaison avec des systèmes décrits dans la littérature, semblables à celui de Gd : L β .

Les seules études présentant des ligands avec quatre picolines, se rapprochant ainsi le plus de la coordination du ligand L β , ont été réalisées par Mazzanti *et al.* sur le ligand tpaen (Tableau 41).^[175] Les valeurs des log K_H de ce ligand ont été déterminées, mais leurs attributions sur les différents azotes et/ou carboxylates présents sur la structure ne sont pas décrites. On constate, cependant, une similarité avec les valeurs calculées pour le ligand L β .

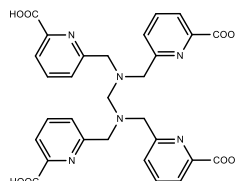
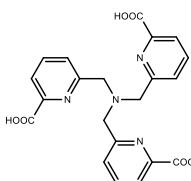
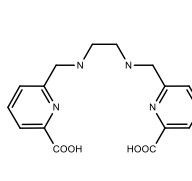
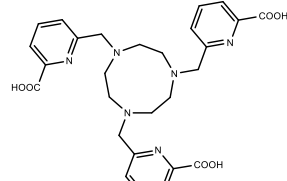
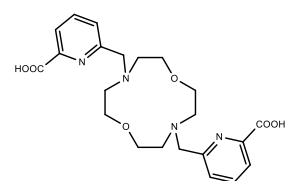
					
H ₄ tpaen ^a	H ₃ tpaa ^b	H ₂ bcpe ^c	H ₃ tpatcn ^d	H ₂ bp12c4 ^e	
log K _{H1}	7,8(1)	6,78(4)	8,69(1)	10,8(2)	9,16(3)
log K _{H2}	5,1(1)	4,11(6)	6,18(2)	5,7(2)	7,54(4)
log K _{H3}	3,9(2)	3,3(1)	3,08(2)	3,8(2)	3,76(5)
log K _{H4}	3,2(1)	2,5(5)	2,33(3)	3,0(1)	2,79(4)
log K _{H5}	2,8(1)			2,5(2)	
log K	EuL	GdL	TbL	GdL	
	15,3(3)	10,2(2)	17,4(4)	18,82(2)	

Tableau 41 : Structure, log K_H (jaune = log K_H des azotes et bleu = log K_H des carboxylates) et log K des ligands tpaen, tpaa, bcpe, tpatcn et bp12c4 pour comparaison avec le ligand L β

a) ref^[175] et attribution effectuée par analogie avec les 4 autres ligands,

b) ref^[176], c) ref^[177], d) ref^[178], d) ref^[179]

Le chiffre entre parenthèses correspond à l'erreur sur le dernier chiffre

En revanche, un grand nombre de ligand possédant entre un et trois groupements picolines ont été décrits.^[176–183] Ceux-ci sont toujours reliés par un atome central (tpaa), une chaîne alkyle (bcpe) ou un macrocycle azoté (tpatcn) et parfois oxygéné (bp12c4). Les log K_H de ces quatre exemples ont été décrits et attribués soit par analyse RMN ¹H en faisant varier le pH

soit par comparaison avec des structures proches. Pour chacun, les $\log K_H$ compris entre 2,5 et 4 sont associés aux carboxylates des picolines, tandis que les $\log K_H$ plus élevés sont attribués aux amines alkyles ou cycliques. Il est considéré que les azotes des pyridines possèdent des valeurs de pK_a trop faibles pour pouvoir être mesurées dans les conditions de titrages utilisées.^[180] Par analogie, les quatre premières constantes du ligand tpaen correspondent donc aux fonctions carboxylates (2,8 ; 3,2 ; 3,9 ; 5,1) et une dernière à un des atomes d'azote des fonctions amines (7,8). De même, celles du ligand L β peuvent être assimilées aux quatre groupements carboxylates.

Les constantes de stabilité thermodynamiques (Tableau 40) ont été déterminées et ont mis en avant la présence du complexe GdL β ($\log K_{GdL\beta} = 5,58(5)$) avec deux formes protonées GdL β H ($\log K_{GdL\beta H} = 4,2(5)$) et GdL β H₂ ($\log K_{GdL\beta H_2} = 3,0(1)$) ainsi qu'un complexe bimétallique Gd₂L β ($\log K_{Gd_2L\beta} = 3,4(1)$). Il est tout à fait rationnel d'observer une constante de stabilité pour l'espèce bimétallique inférieure à celle de l'espèce monométallique due à la diminution du nombre de sites coordinants apportés par les picolines. Lorsque deux Gd(III) sont présents dans le complexe (Gd₂L β), si la répartition est équitable, ils n'auront que quatre sites de coordination occupés chacun contre huit pour le Gd(III) présent dans l'espèce GdL β . De plus, la constante de stabilité du complexe GdL β est très faible au regard des constantes des produits commerciaux actuels dont les $\log K$ sont compris entre 15 et 25 (Tableau 11). De par la grande similitude entre les cations métalliques Eu(III), Tb(III) et Gd(III), il est possible de comparer les constantes calculées quel que soit le cation utilisé. La constante de stabilité du complexe d'Eu(III), formé avec le ligand tpaen possédant lui aussi quatre bras picolines, est bien plus élevée que celle du GdL β . La flexibilité apportée par le squelette méthyldiamine central du tpaen conduit certainement une coordination plus proche du Gd(III) et donc à la formation de cycle chélate très stables à cinq membres, expliquant cette constante de stabilité bien plus élevée. Néanmoins, des ligands heptadentate (tpaa) et octadentate (bp12c4) possédant moins de bras picolines présentent, eux aussi, des stabilités supérieures au complexe GdL β . Il est ainsi certain que la stabilité d'un complexe ne dépend pas uniquement de la denticité du ligand. La taille de la cavité de la β -cyclodextrine et donc de l'espacement entre les quatre picolines joue en défaveur de la stabilité du complexe. En effet, un phénomène similaire a été observé par C. S. Bonnet lors de l'étude de la formation d'un complexe entre le Gd(III) et une α -CD heptadentate, possédant sept acétates sur sa face

primaire.^[184] Ces ligands acétates, pourtant moins coordonnant que les picolines, permettent d'atteindre une stabilité de 7,5, certes supérieure, d'environ 2 unités, à celle du GdL β mais toujours très faible au regard des stabilités attendues pour ces nouveaux complexes de Gd(III).

Avec l'ensemble des constantes déterminées, il est possible de tracer le diagramme de spéciation grâce au logiciel HySS 2009® (Figure 71).

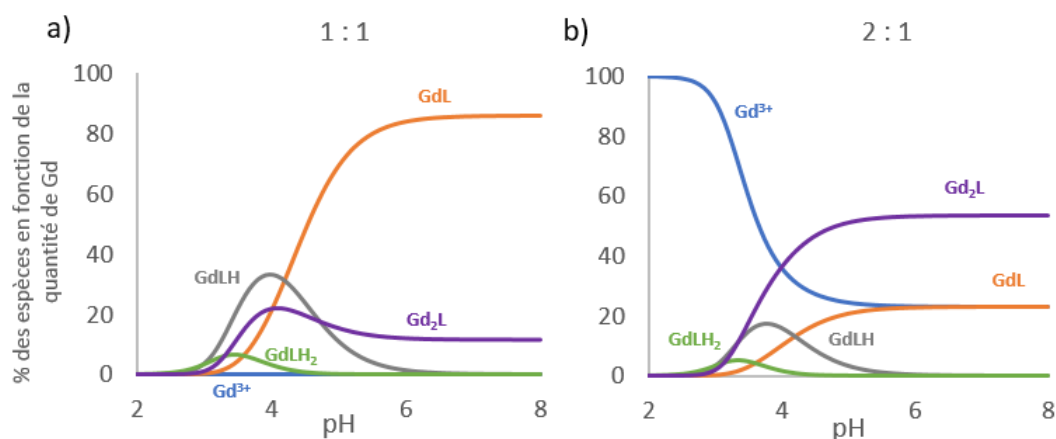


Figure 71 : Diagrammes de spéciation, relatif à la quantité de Gd(III), d'un mélange a) avec 1 éq et b) 2 éq de Gd(III), à une concentration de ligand de 1 mM

Les deux diagrammes montrent que la seconde espèce Gd₂L n'est pas négligeable par rapport à l'espèce GdL. Dans la configuration équimolaire à 1 mM, à pH = 6,2, où idéalement nous attendons 100% de GdL, le complexe ne représente que 85% des espèces métallées, le reste étant principalement du Gd₂L à hauteur de 12%. Et lorsque l'on vise à favoriser la formation de Gd₂L avec 2 équivalents de Gd(III), les proportions s'inversent mais le mélange des différentes espèces persiste avec 23% GdL, 54% Gd₂L et 23% de Gd libre. Par conséquent, aucune condition ne nous permet d'être en présence d'une unique espèce en solution. L'étude de spéciation sera, cependant, une aide précieuse pour d'étudier le système ML/M₂L et ainsi caractériser les deux espèces métalliques en jouant sur les différentes concentrations et proportions en réactifs.

C. Etude structurale en solution par RMN ¹H en fonction du rapport M : L

Il est possible de visualiser la formation de différents complexes par spectroscopie RMN ¹H. Pour cela, des spectres RMN ¹H de complexes d'Ytterbium (Yb(III)) ont été effectuées en

incrémentant la quantité de cation métallique de 0 à 3 équivalents par pas de 0,5 et 1 équivalent dans une solution à $[L\beta] = 1 \text{ mM}$ dans D_2O à 400 MHz (Figure 72). Sans Yb(III), le spectre 1H du ligand $L\beta$, décrit plus en détail dans la partie expérimentale, montre trois zones bien définies : les protons des pyridines ($7,5 < \delta < 8,5 \text{ ppm}$), les protons H-1 de la β -CD ($5,0 < \delta < 5,3 \text{ ppm}$) et tous les autres protons ($3,0 < \delta < 4,0 \text{ ppm}$). Avec l'ajout d'Yb(III), on distingue deux types de comportements dont la limite se trouve aux alentours de 1,5 équivalents. En effet, les trois spectres enregistrés pour des quantités d'Yb(III) de 0,5 ; 1 et 1,5 équivalents ne sont, d'une part, pas superposables et, présentent d'autre part, des pics très élargis pour lesquels il n'est plus possible d'attribuer les signaux. Ceci est caractéristique d'un système dynamique. A noter qu'aucun autre pic n'est visible sur une fenêtre de fréquence plus large ($-140 - +140 \text{ ppm}$), ce qui est normalement le cas pour des complexes de cation métallique paramagnétique. De plus, lorsque la quantité d'Yb(III) dépasse les 1,5 équivalents, la taille et le déplacement chimique des pics n'évoluent plus, en revanche, l'attribution des signaux reste impossible à effectuer. Cette constatation va dans le sens de la formation d'une deuxième espèce métallique qui reste, tout de même, dynamique elle aussi. Ces résultats sont concordants avec les données obtenues avec l'étude potentiométrique. Nous avons, en effet, la formation de deux espèces métalliques qui se trouvent être peu stables, en partie, à cause de la dynamique interne du complexe.

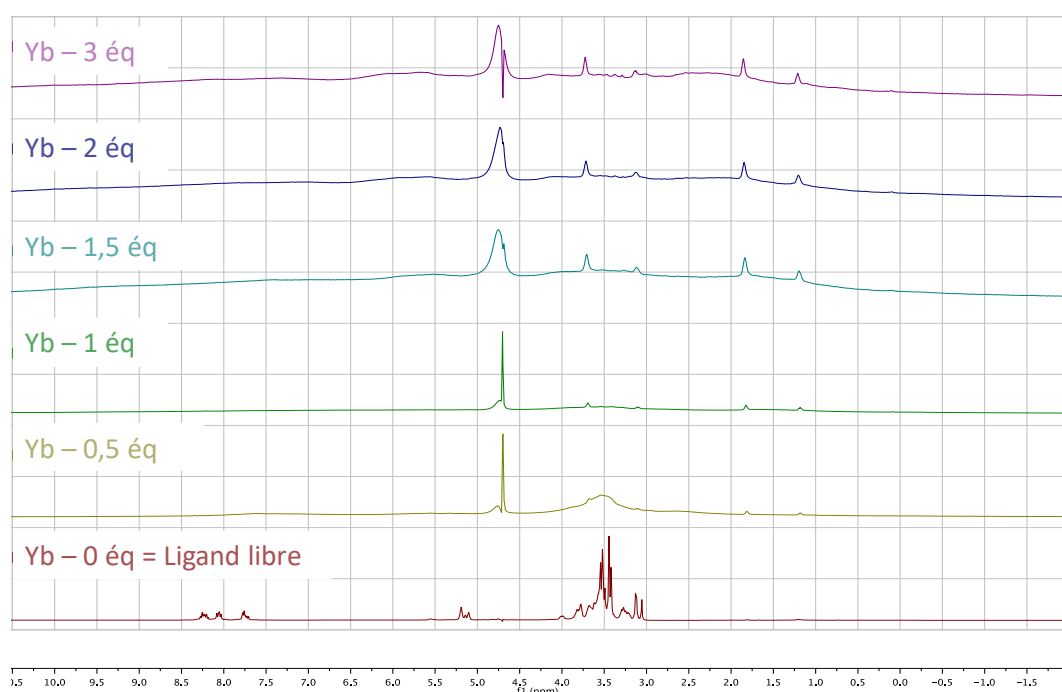


Figure 72 : RMN 1H à 400 MHz et 25°C de $L\beta$ à 1 mM dans D_2O avec différents équivalents de Yb(III) (0 à 3 éq)

D. Mesure du nombre d'hydratation q

La détermination d'un nombre d'hydratation se fait par mesure des temps de demi-vie en luminescence de complexes d'Eu(III) dans H₂O (τ_{H_2O}) puis D₂O (τ_{D_2O}) suite à l'excitation du ligand à sa longueur d'onde d'absorption.^[8] Le temps de demi-vie des complexes est directement lié au nombre de molécules d'eau présentes dans sa sphère interne, qui vont inhiber l'intensité de luminescence émise par le lanthanide, par la relation empirique (Equation 13)^[185]:

$$(13) q = A_{Eu(III)} \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) \quad \text{avec } A_{Eu(III)}, \text{ la constante spécifique au lanthanide choisi pour la mesure}$$

Le lanthanide utilisé doit, cependant, posséder des propriétés en luminescence. C'est le cas de l'Eu(III), utilisé ici, mais aussi du Tb(III). Les résultats obtenus sont transposables à ceux que nous pourrions observer avec le Gd(III) de par leur proximité dans le tableau périodique qui leur confère des propriétés similaires.

Au regard des résultats de l'étude potentiométrique, il sera difficile d'étudier chacun des deux complexes formés individuellement. En s'appuyant sur les diagrammes de spéciation, il est cependant possible de déterminer trois conditions favorables en jouant sur le nombre d'équivalent du cation métallique, pour calculer les nombres d'hydratation des deux espèces. Ainsi, les mesures ont été réalisées à pH = 6,2 avec une solution de ligand à [Lβ] = 10 μM et 0,6, 20 et 70 équivalents d'Eu(III) afin d'obtenir, respectivement, l'espèce EuLβ seule en solution, l'espèce EuLβ à hauteur de 66% et enfin l'espèce Eu₂Lβ à hauteur de 63%.

Les courbes de décroissance, suite à l'excitation du ligand à $\lambda = 268$ nm, ont pu être fittées suivant une double exponentielle nous apportant ainsi deux temps de demi-vie dans H₂O et deux autres dans D₂O (Figure 73).

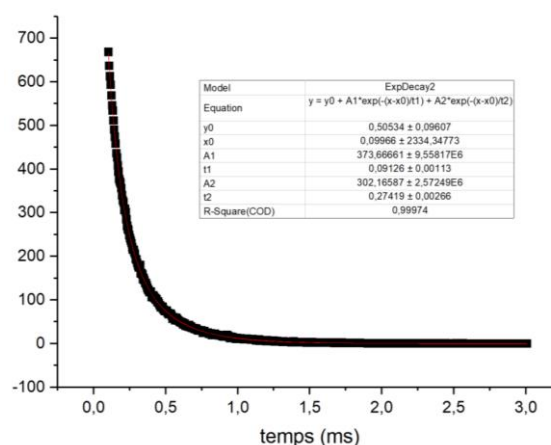


Figure 73 : Exemple de courbe de décroissance fittée en double exponentielle [Lβ] = 10 μM, Eu = 70 éq dans H₂O)

A partir de ces valeurs, deux nombres d'hydratation ont pu être calculés, correspondant aux complexes $GdL\beta$ et $Gd_2L\beta$, à partir de l'Equation 14, inspirée de l'Equation 13 précédente et améliorée par Horrocks *et al.* pour le cas de complexes à $q \geq 1$ ^[186]:

$$(14) q = 1,11 \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - 0,3 \right)$$

L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 42 suivant :

Eq Eu(III)	H ₂ O (ms)		D ₂ O (ms)		q	
	$\tau_1 - EuL\beta$	$\tau_2 - Eu_2L\beta$	$\tau_1 - EuL\beta$	$\tau_2 - Eu_2L\beta$	$q_1 - EuL\beta$	$q_2 - Eu_2L\beta$
0,6	0,31	/	2,09	/	2,67	/
20	0,24	0,10	2,83	0,20	3,81	5,76
70	0,27	0,10	3,03	0,26	3,36	6,95

Tableau 42 : Temps de vie en luminescence de solution de ligand L β à 10 μ M avec 0,6, 20 et 70 équivalents d'Eu(III) et des nombres d'hydratation associés calculés

Avec 0,6 équivalent, 100% de l'Eu(III) ajouté est présent dans $EuL\beta$. Le nombre d'hydratation de cette espèce peut ainsi être évaluée à environ $q_1 = 3$. Cependant, au vu des valeurs de q_1 calculées pour les analyses à 20 et 70 équivalents, il serait certainement plus juste de proposer un q_1 variant entre 3 et 4. De plus, les deux dernières mesures révèlent des τ_1 et τ_2 similaires avec toujours $\tau_1 > \tau_2$ soulignant une première espèce moins hydratée que la seconde. Cette constatation est confirmée par le calcul de q_2 , correspondant à l'espèce bimétallique, qui est compris, quant à lui, entre 6 et 7.

E. Discussion

L'ensemble des analyses effectuées sur le système M : $L\beta$ convergent vers la mise en évidence de deux espèces métalliques $ML\beta$ et $M_2L\beta$ qui sont peu stables et dynamiques. La faible affinité du ligand $L\beta$ est notable de par les constantes de stabilité très faibles déterminées en potentiométrie ($\log K_{GdL\beta} = 5,58(5)$ et $\log K_{Gd_2L\beta} = 3,4(1)$). Ainsi, peu de sites de coordination du cation métallique sont occupés, engendrant alors un nombre de molécules d'eau très élevé coordonnées au métal des deux complexes, allant de 3 – 4 pour $ML\beta$ à 6 – 7 pour $M_2L\beta$.

Le Gd(III) possède, le plus couramment, un nombre de coordination (NC) compris entre 8 et 9, qui peut, dans certains cas, descendre jusqu'à 6.^[187] Le nombre de liaisons, pouvant être formées entre $L\beta$ et Gd(III), peut se déterminer par soustraction du nombre d'atomes donneurs du ligand $L\beta$ (8) par le nombre de molécule d'eau du complexe. A ce stade, il est possible de formuler des hypothèses quant à la configuration des complexes formés.

Dans le cas du ML β , les nombreuses combinaisons envisageables avec un nombre d'hydratation compris entre 3 et 4 et un NC compris entre 8 et 9 entraînent des possibilités de nombre de liaison de coordination (NL) entre 4 et 6. Par exemple, le cation métallique peut être chélater par les atomes d'azote et d'oxygène de deux picolines voisines. Dans cette configuration, le ligand apporterait 4 liaisons et, pour combler les sites de coordination libres, 4 molécules d'eau seraient présentes dans la sphère interne générant ainsi un complexe octa-coordiné (Entrée 1 – Tableau 43 et Figure 74). Le système étant dynamique, le Gd(III) peut, probablement, se déplacer entre les différents picolines en changeant perpétuellement de site de coordination et alternant ainsi entre complexe octa- et nona-coordiné. Le nombre d'hydratation q et le nombre de liaison NL apportée par le ligand L β étant variables, quatre combinaisons q / NL peuvent être envisagées (Tableau 43).

#	NC	q	NL
1	8	4	4
2		3	5
3	9	4	5
4		6	3

Tableau 43 : Combinaisons possibles q /NL pour former des complexes GdL β octa- ou nona-coordinés
NL : Nombre de liaison de coordination Gd – L β

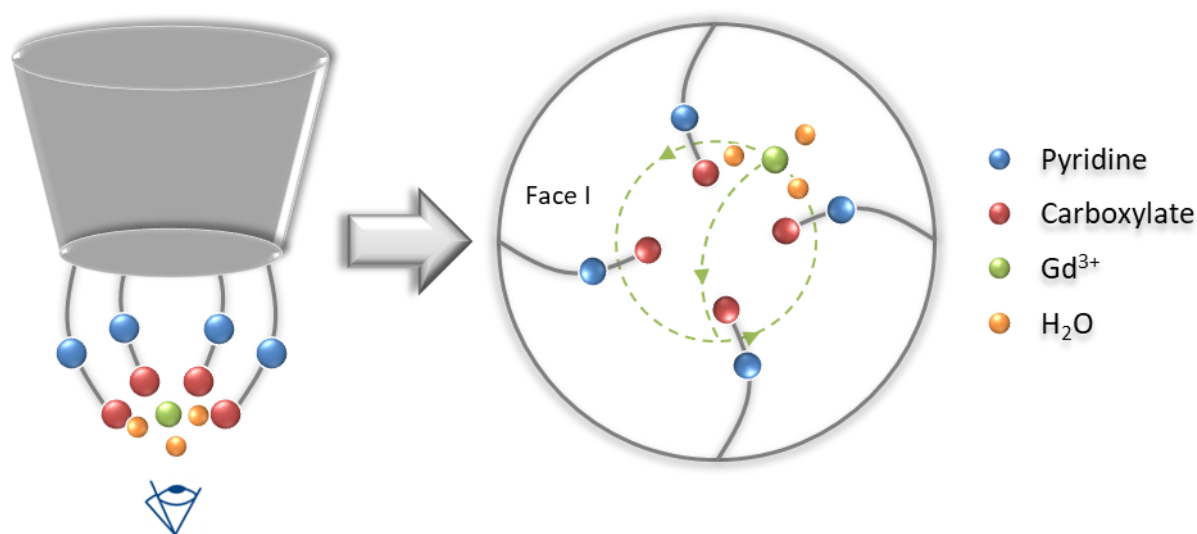


Figure 74 : Représentation schématique de la structure et de la dynamique interne du complexe GdL β avec $q = 3$

En suivant le même raisonnement, les deux cations métalliques présents dans l'espèce $Gd_2L\beta$ seraient plutôt chélatés chacun par deux picolines voisines avec 3 à 4 molécules d'eau environnantes laissant ainsi la possibilité de former 4 à 6 liaisons $Gd - L\beta$ pour accéder à des NC de 8 à 9 (Figure 75). Dans cette configuration, les bras picolines sont certainement tournés vers l'extérieur de la cavité de la cyclodextrine afin d'éviter les répulsions statiques entre les deux cations métalliques.

Cependant le nombre exact de molécule d'eau par $Gd(III)$ n'est pas connu (q = nombre de molécule d'eau du complexe $Gd_2L\beta$) ce qui conduit à un grand nombre de combinaison par $Gd(III)$ ayant pour limites raisonnables : $2 < q_{Gd} < 5$; $3 < NL < 7$ et $8 < NC < 9$.

L'équipe de Yannakopoulou a approfondi l'analyse structurale de leur complexe **37**, évoqué précédemment dans la partie bibliographie (Chap.II, §III.B.2. p.84), et ont démontré la participation d'un atome d'oxygène d'une unité glucopyranosique de la CD dans la chélation du cation métallique.^[126] Ce genre d'interaction permettrait, dans notre cas, d'expliquer les NL élevés.

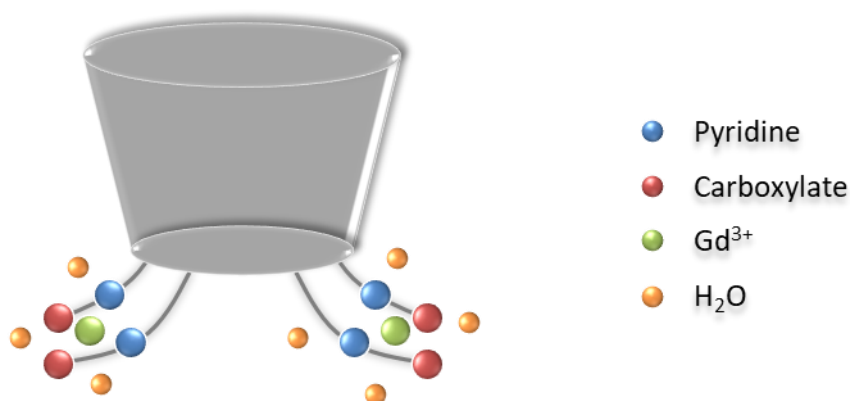


Figure 75 : Proposition schématique du complexe $Gd_2L\beta$ ($q = 7$)

L'ensemble de ces résultats confirme l'allure de la courbe obtenue lors du dosage en luminescence (décroissance due à la formation d'une espèce bimétallique) mais nous mène à réinterpréter le dosage relaxométrique. En effet, celui-ci était correct dans le cas de la formation d'une seule espèce stable. Afin de s'assurer du résultat sur la stœchiométrie obtenue, il est possible de connaître le pourcentage de chacune des espèces présentes à chaque point du dosage, grâce à la spéciation ($[L\beta] = 1$ mM et pH = 5,7). Le diagramme en bâton (Figure 76) reprend ces pourcentages théoriques et nous permet de visualiser la prédominance de l'espèce GdL jusqu'à 0,8 équivalent avec moins de 10% des autres espèces.

Mais très vite, sa proportion diminue pour laisser place au complexe $Gd_2L\beta$ et au $Gd(III)$ libre. De ce fait, il est difficile de conclure quant à la stœchiométrie exacte de $GdL\beta$ car $Gd_2L\beta$ peut apparaître avant la formation complète du $GdL\beta$.

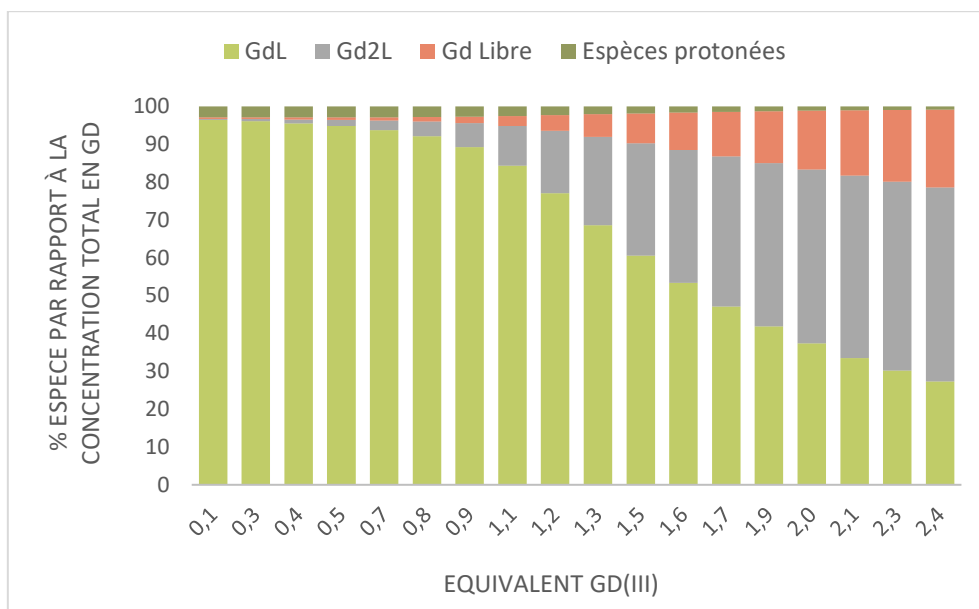


Figure 76 : Proportion relative des espèces présentes en solution durant le dosage relaxométrique avec $[L\beta] = 1 \text{ mM}$ et $pH = 5,7$

Ce diagramme nous permet, tout de même, de visualiser la zone dans laquelle il est possible de calculer la relaxivité. En effet, le temps de relaxation paramagnétique T_{1p} , s'exprimant rigoureusement en fonction des différentes espèces influençant la relaxivité, soit, Gd^{3+} , $GdL\beta$, $GdL\beta H$, $GdL\beta H_2$ et $Gd_2L\beta$, suit l'Equation 15 :

$$(15) \frac{1}{T_{1p}} = r_{Gd^{3+}}[Gd^{3+}] + r_{GdL\beta}[GdL\beta] + r_{GdL\beta H}[GdL\beta H] + r_{GdL\beta H_2}[GdL\beta H_2] + r_{Gd_2L\beta}[Gd_2L\beta]$$

Il va ici être possible, dans un premier temps, de négliger les termes correspondant aux espèces protonées qui représentent, tout au long du dosage, moins de 3% des espèces. Ensuite, l'espèce $GdL\beta$ prédomine jusqu'à 0,8 équivalent de $Gd(III)$. Ainsi, la pente de la droite $(1/T_{1p}) = f([Gd^{3+}])$, jusqu'à ce point, correspond à la relaxivité du complexe $GdL\beta$ (Figure 77).

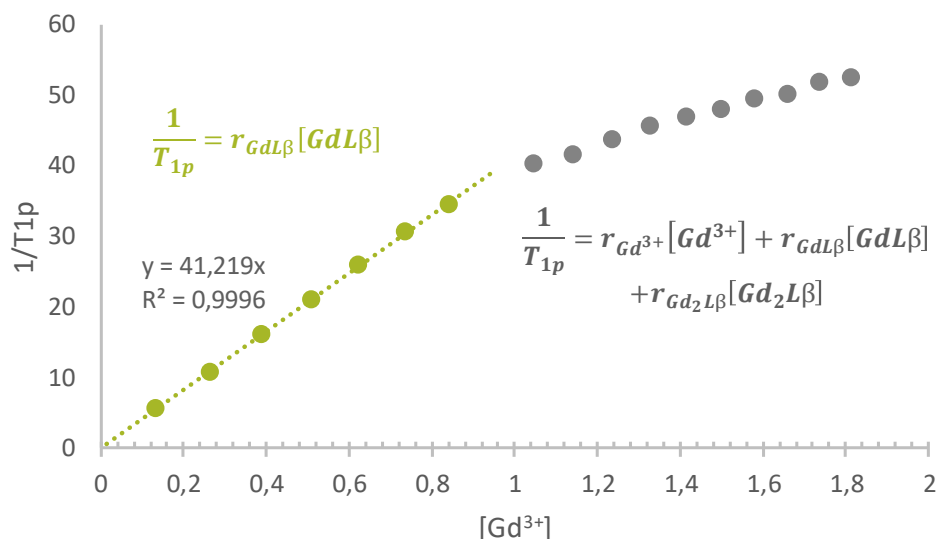


Figure 77 : Détermination graphique de la relaxivité de l'espèce $GdL\beta$ grâce au dosage relaxométrique effectué à 25°C, 60 MHz, avec une solution de ligand $[L\beta] = 1 \text{ mM}$ à $\text{pH} = 5,7$

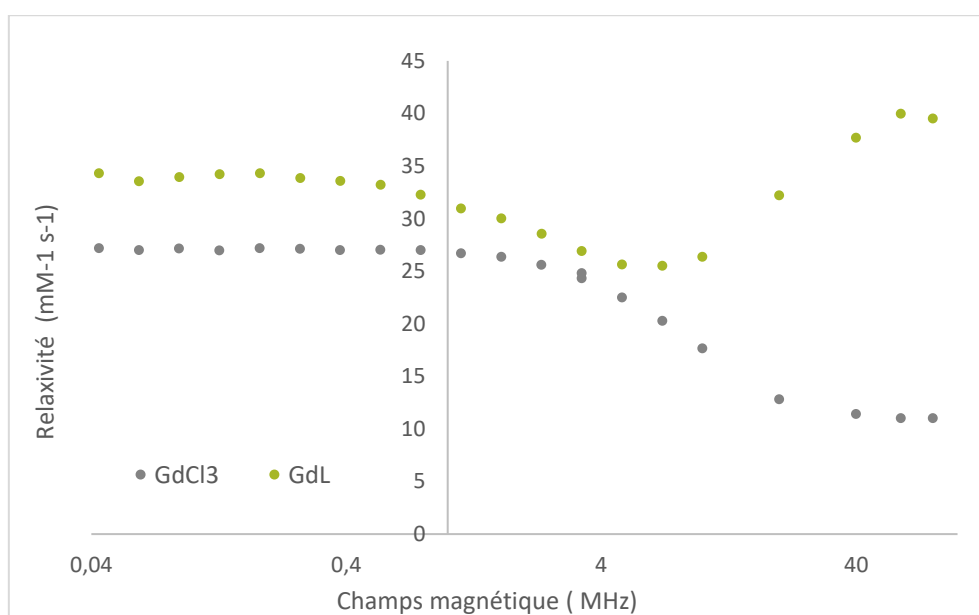
D'après la régression linéaire de la première partie de la courbe, la relaxivité du complexe $GdL\beta$ est de $41,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et 60 MHz. Cette valeur est bien au-dessus de celles des complexes de $Gd(\text{III})$ commerciaux (Tableau 11) dont la plus haute s'élève à $6,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $[Gd(\text{MS325})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$. Il faut cependant noter que ces complexes possèdent tous une seule molécule d'eau dans leur sphère interne. Le tableau présente aussi des complexes possédant des $q > 1$ dont le $[Gd(\text{PC2A})(\text{H}_2\text{O})_3]$, qui se rapproche le plus, en terme d'hydratation, de $GdL\beta$ ($q = 3$) et pour lequel la relaxivité est à hauteur de $7,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, là aussi, bien inférieure à celle de $GdL\beta$. En règle générale, des relaxivités aussi élevées sont atteintes avec des macrostructures assemblant plusieurs chélates de $Gd(\text{III})$, comme le complexe **34** développé par Reneke *et al.* (Tableau 21) dont la relaxivité globale atteint $43,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C et 400 MHz.

Néanmoins, il n'est pas possible de déterminer graphiquement la valeur de la relaxivité du deuxième complexe, $Gd_2L\beta$, car contrairement à $GdL\beta$ il n'est jamais présent seul en solution. Néanmoins, connaissant la relaxivité de Gd^{3+} à 60 MHz et 25°C ($11 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et ayant déterminé $r_{GdL\beta}$, il est possible d'utiliser l'Equation 16 pour calculer r_{Gd_2L} :

$$r_{Gd_2L\beta} = \frac{\frac{1}{T_{1p}} - r_{Gd^{3+}}[Gd^{3+}] - r_{GdL\beta}[GdL\beta]}{[Gd_2L\beta]}$$

Le calcul ne peut se faire que pour des proportions en $Gd_2L\beta$ suffisamment importante. Au-delà de 1,7 équivalents de $Gd(III)$, soit pour des proportions en $Gd_2L\beta > 40\%$, la relaxivité calculée en chaque point du dosage est constante et s'élève à $61 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (25°C , 60 MHz). Celle-ci est très supérieure à celle de $GdL\beta$, dû à la présence de six molécules d'eau dans la sphère interne du complexe.

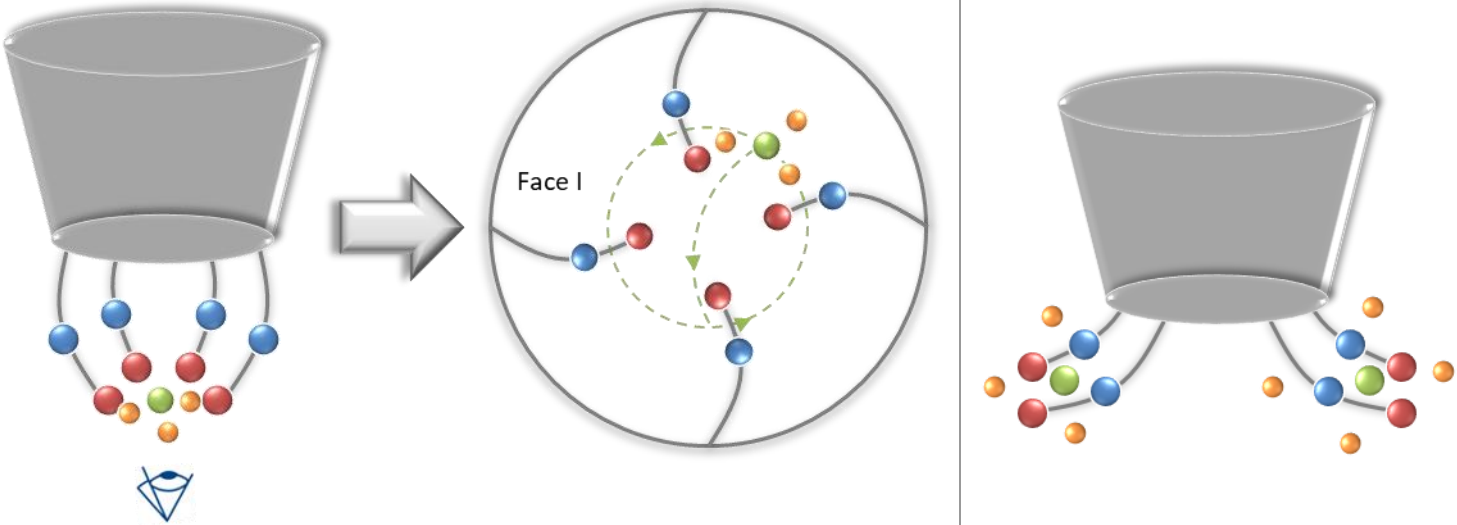
En se plaçant dans des conditions similaires au dosage relaxométrique ($[L\beta] = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 5,7$, 25°C) et avec 0,5 équivalent de $Gd(III)$, il est possible de tracer le profil NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) qui représente la relaxivité mesurée en fonction du champ magnétique (40 KHz à 80 MHz), caractéristique de l'espèce $GdL\beta$ (Figure 78).



F. Conclusion

La caractérisation du système métallique formé avec le ligand $L\beta$ a été difficile de par l'existence de deux espèces métalliques différentes : $ML\beta$ et $M_2L\beta$. Cependant, l'ensemble des analyses effectuées nous a permis de comprendre le fonctionnement du système et de formuler des hypothèses quant à la configuration des deux espèces formées. Celles-ci sont en parfait accord avec les données mesurées et nous permettent d'expliquer les faibles constantes de stabilité thermodynamiques calculées. En effet, la combinaison {systèmes dynamiques / faible affinité du ligand} ne plaide pas en faveur d'une stabilité importante. Néanmoins, la présence de la cyclodextrine influence les valeurs de relaxivité. L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 44.

Tableau 44 : Résumé de l'étude du système GdLβ / Gd₂Lβ

Complexe	GdLβ	Gd ₂ Lβ
logK _H	3,3(2) / 4,00(6) / 4,52(6) / 5,16(1)	
log K	log K _{GdLβ} = 5,58(5) / log K _{GdLβH} = 4,2(5) / log K _{GdLβH2} = 3,00(1)	log K _{Gd2Lβ} = 3,4(1)
q	3 - 4	6 - 7
r ₁	41,2 mM ⁻¹ .s ⁻¹	61 mM ⁻¹ .s ⁻¹
Représentation schématique		

II. Etude du ligand L α et du complexe GdL α

A. Détermination de la stœchiométrie du complexe

La stratégie utilisée lors de l'étude précédente a été appliquée pour déterminer la stœchiométrie du complexe GdL α .

1. Dosage relaxométrique

Le dosage relaxométrique du ligand L α (Figure 79) est effectué à partir d'une solution de ligand à 1 mM dans un tampon urotropine à pH = 5,7 et d'une solution de GdCl₃ à 5,16 mM, dosée au préalable par la méthode « Bulk Magnetic Susceptibility » (BMS) en RMN ¹H à 25°C et 60 MHz.^[188] Les incréments de Gd(III) furent de 0,05 jusqu'à 1 équivalent puis de 0,1 équivalent, ce qui correspond à des ajouts de 5 puis 10 μ L.

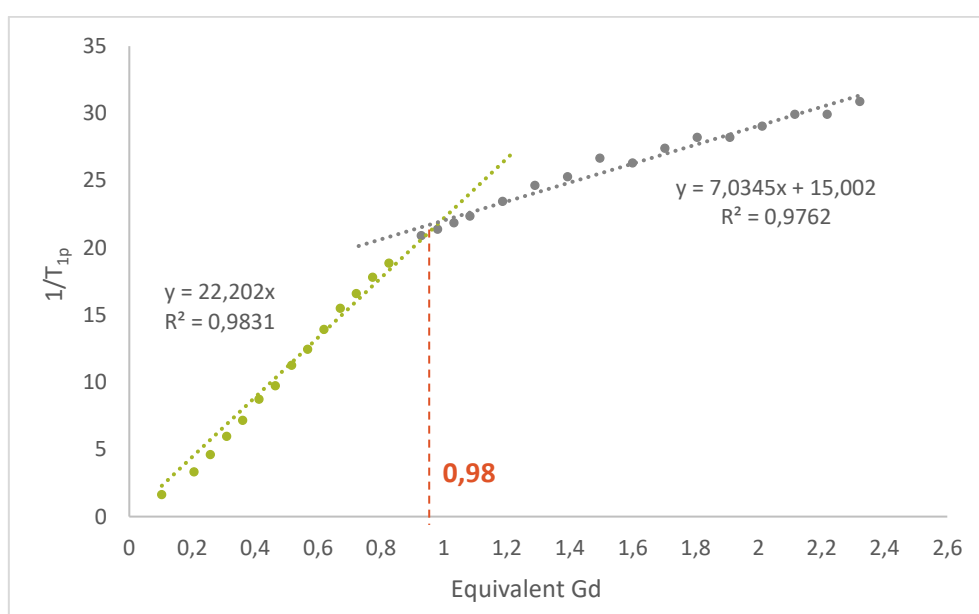


Figure 79 : Dosage relaxométrique du ligand L α à une concentration de 1 mM à 25°C et 60 MHz

L'intersection des régressions linéaires des deux droites avant et après rupture de la pente, à 0,98 équivalent de Gd(III) correspond à une stœchiométrie Gd : L α de 1 : 1.

2. Dosage en luminescence

Le dosage s'effectue à partir d'une solution de ligand L α à 30 μ M, dans le tampon urotropine, par ajout successif de 0,1 équivalent d'Europium (solution à 1,5 mM d'EuCl₃), soit 5 μ L jusqu'à 1,4 équivalents puis de 0,2 en 0,2 jusqu'à 2 équivalents.

Le spectre d'émission en phosphorescence du complexe EuL α (Figure 80.a), suite à une excitation à 268 nm, est caractéristique d'un complexe d'Eu(III). La courbe de dosage fut ensuite tracée à partir de l'intensité de la bande d'émission $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (620 nm) en fonction de la quantité d'Eu(III) ajoutée (Figure 80.b).

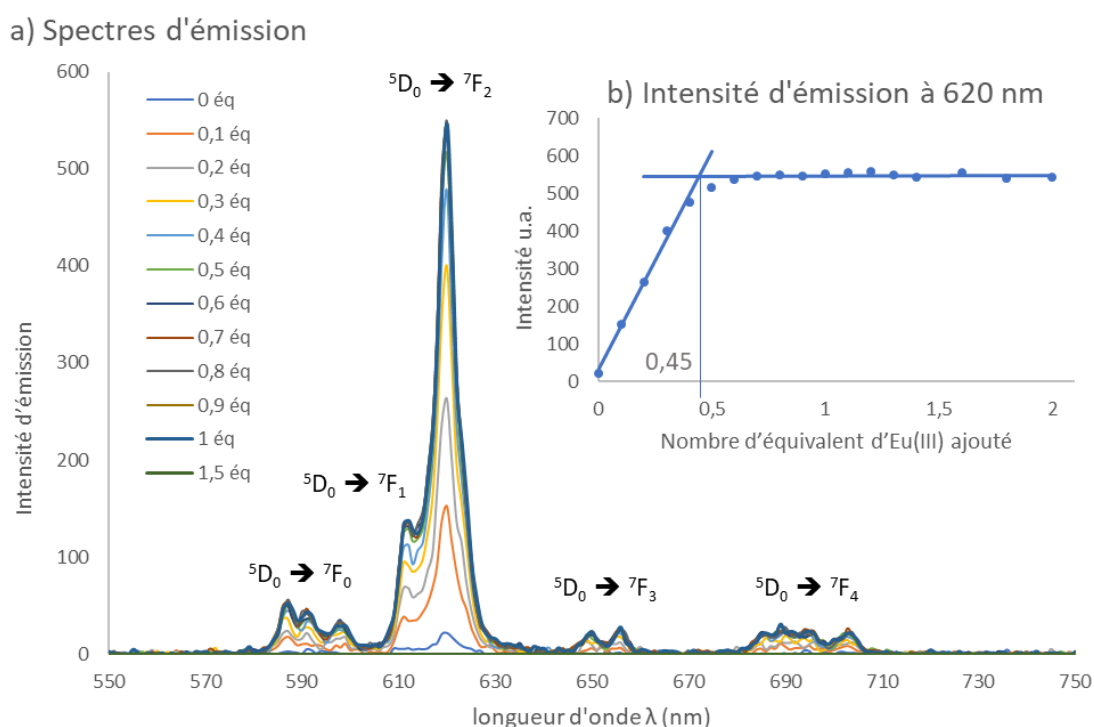


Figure 80 : a) Superposition des spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 268$ nm) d'une solution de ligand L α à 30 μ M en présence d'un nombre d'équivalent d'Eu(III) progressif (légende à gauche) ; b) Graphique représentant l'évolution de l'intensité de luminescence de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (620 nm) en fonction du nombre d'équivalent d'Eu(III)

Contrairement au dosage du ligand L β , la courbe se stabilise à partir de 0,45 équivalent d'Eu(III). On obtient donc l'allure attendue mais une stœchiométrie divisée par deux en comparaison avec le dosage relaxométrique. Les deux dosages ont été répétés plusieurs fois, avec de nouvelles solutions de ligand et de cation métallique et les résultats furent reproductibles.

D'après cette titration, la stœchiométrie Eu : L α est donc évaluée à 1 : 2. Les résultats des deux dosages sont divergents mais laissent supposer la formation de plusieurs espèces.

B. Stabilité du complexe - *Etude potentiométrique*

Afin d'établir la spéciation complète du système Gd : L α , plusieurs dosages potentiométriques ont été effectués en faisant varier le rapport Gd : L α (0 : 1 ; 1 : 2 ; 1 : 1). De plus, afin d'étudier l'influence du cation métallique sur le comportement du système et ainsi vérifier la cohérence des deux dosages précédents, un dosage en présence d'Eu(III) (1 : 2) a permis de compléter l'étude.

Les courbes de titration obtenues sont représentées Figure 81.

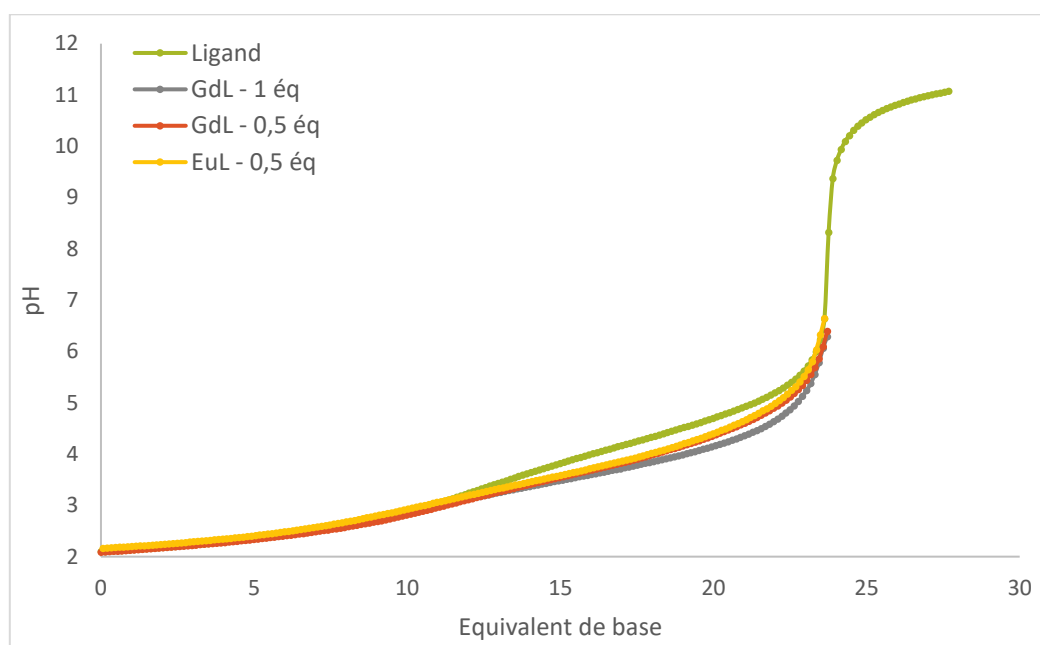


Figure 81 : Courbes de titrations potentiométriques d'une solution de ligand L α à 1 mM dans KCl 0,1 M à 25°C avec différentes proportions de Gd (0, 0,5 et 1 éq) et 0,5 éq d'Eu

Dans un premier temps, les courbes à 0,5 équivalent de Gd(III) et Eu(III) se superposent indiquant un comportement du système similaire quel que soit le cation métallique ; ce qui n'est pas le cas lorsque l'on compare les courbes à 0.5 et 1 équivalent, indiquant ainsi la formation d'au moins deux espèces différentes.

Le logiciel Hyperquad 2008® nous a permis de calculer trois constantes de protonation ainsi que les constantes de stabilités thermodynamiques pour les complexes GdL α et GdL α ₂ ainsi que leur forme protonée (Tableau 45), confirmant la présence d'une deuxième espèce métallée.

Espèce	L α			GdL α		GdL α_2	
log K	log K _{H1}	log K _{H2}	log K _{H3}	log K _{GdLα}	log K _{GdLαH}	log K _{GdLα_2}	log K _{GdLα_2H}
	4,91(2)	4,24(2)	3,49(5)	4,24(2)	3,89(4)	2,4(1)	5,1(2)

Tableau 45 : Constantes de protonation du ligand L α et de stabilités thermodynamiques des différentes espèces présentes en solution

Le chiffre entre parenthèses correspond à l'erreur sur le dernier chiffre

Les trois constantes de protonation sont identiques à celles déterminées pour le ligand L β (3,3 ; 4,00 ; 4,52 ; 5,15) et sont donc attribuées aux trois carboxylates des picolines.

En parallèle, la détermination des constantes de stabilité thermodynamiques nous a permis de mettre en évidence la formation de deux espèces, GdL α et GdL α_2 , qui, à l'identique des complexes avec le ligand L β , sont très faibles. GdL α est, d'une part, moins stable que les produits commerciaux ($15 < \log K < 25$), que les produits comportant trois groupements picolines (Tableau 41, $10 < \log K < 18$) mais aussi que GdL β ($\log K_{\text{GdL}\beta} = 5,58(5)$). En effet, le diamètre de la face primaire de l' α -CD étant certes plus petit que celui de la β -CD, le groupement picolinate en moins porte préjudice à la stabilité du complexe, plus faible d'environ une unité.

Les constantes déterminées permettent de tracer les diagrammes de spéciation (Figure 82).

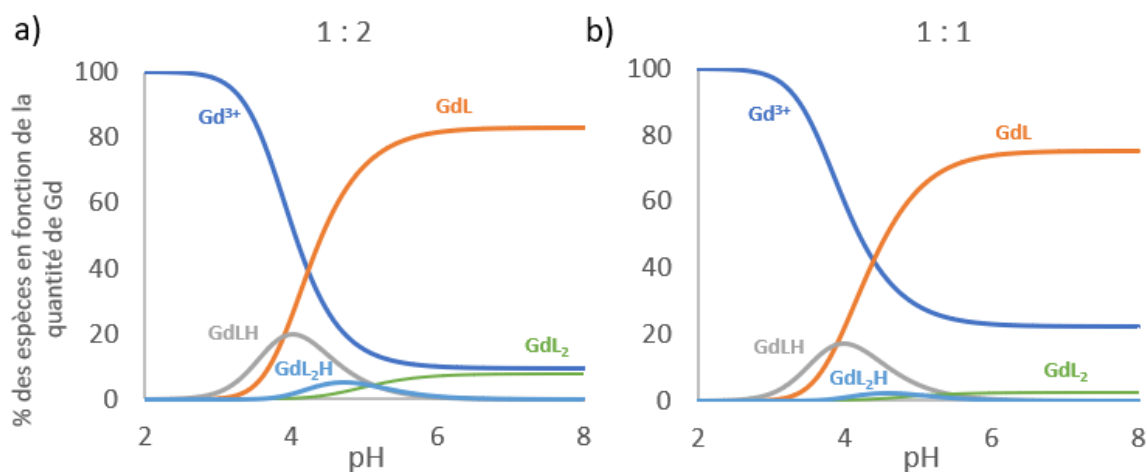


Figure 82 : Diagrammes de spéciation, relatif à la quantité de Gd, d'un mélange a) avec 0,5 éq de Gd et b) équimolaire, à une concentration de ligand de 1 mM

Ces diagrammes permettent de visualiser deux informations importantes. D'une part, le ligand a une faible affinité pour le Gd(III), ce qui ne permet pas, même dans des conditions favorables (deux fois plus de ligand que de Gd(III)), de complexer la totalité du métal (10% de Gd(III) libre

à pH > 6). D'autre part la proportion de $GdL\alpha_2$ est toujours très faible par rapport au $GdL\alpha$, atteignant à peine 10% dans des conditions propices à sa formation.

En faisant varier les proportions de Gd(III) par rapport au ligand $L\alpha$, il n'a jamais été possible de trouver des conditions permettant de ne former qu'une seule des deux espèces. Les études suivantes ont donc été effectuées sur des mélanges aux proportions contrôlées par la spéciation.

C. Etude structurale en solution par RMN 1H en fonction du rapport M : $L\alpha$

Plusieurs spectres RMN 1H d'un complexe diamagnétique avec le ligand $L\alpha$, effectué avec le Lutécium Lu(III), améliorant la définition des spectres par rapport à l'Yb(III), ont été enregistrées en incrémentant la quantité de métal de 0 à 1,5 équivalents par pas de 0,5 équivalent à 400 MHz. La Figure 83 représente la zone des aromatiques des différents spectres. On remarque très clairement l'élargissement des pics à chaque ajout de Lu(III). Cette évolution de la définition des spectres est caractéristique d'un système, encore une fois, très dynamique. Ceci peut se traduire par un mouvement du cation métallique entre les différents bras picolines ou encore par un échange du cation du complexe vers un ligand libre.

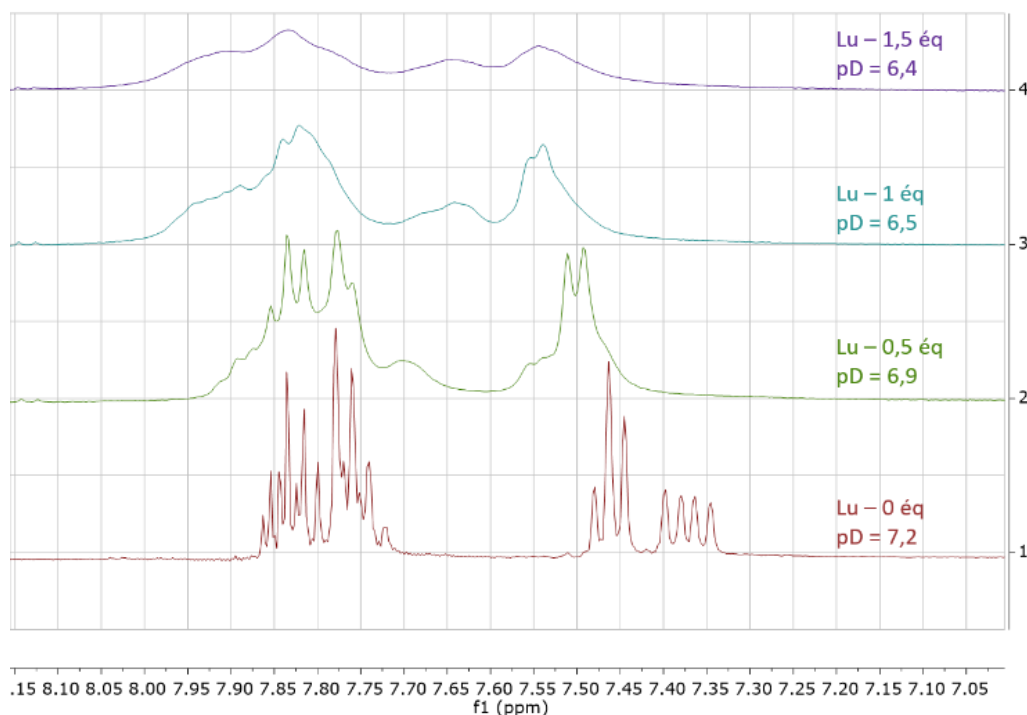


Figure 83 : RMN ^1H à 400 MHz et 25°C de La à 1 mM dans D_2O avec différents équivalents de Lu(III) (0 à 1,5 éq)

L'évolution constante des spectres, nous empêche, cependant, de confirmer la formation des deux complexes évoqués précédemment.

D. Mesure du nombre d'hydratation q

Au regard des résultats de l'étude potentiométrique, il est impossible d'étudier individuellement chacun des deux complexes formés. De plus, les diagrammes de spéciation mettent en évidence la formation restreinte de la deuxième espèce GdLa_2 . En effet, en jouant sur le ratio $\text{GdLa} / \text{GdLa}_2$, le pourcentage maximum de GdLa_2 formé s'élève seulement à 11%. Cependant, grâce aux résultats obtenus lors du premier dosage en luminescence, il semblerait que, même en très faible proportion, l'espèce GdLa_2 soit détectable par cette technique. Trois conditions ont donc été choisies pour calculer les nombres d'hydratation des deux espèces : 0,2, 0,5 et 1 équivalent d' Eu(III) pour une solution de ligand à $[\text{La}] = 30 \mu\text{M}$ et à $\text{pH} = 6,6$ afin d'obtenir respectivement les proportions d'espèces $\% \text{GdLa} / \% \text{GdLa}_2$ suivantes : 81% / 11%, 82% / 8% et 74% / 2,5%.

Les courbes de décroissance, suite à l'excitation du ligand à $\lambda = 268 \text{ nm}$, ont pu être fittées suivant une double exponentielle dans H_2O , contrairement aux solutions dans D_2O qui n'ont

pu être fittée qu'en simple exponentielle. Ceci peut s'expliquer par une très faible différence de temps de vie entre les deux espèces. Comme précédemment, nous utilisons la formule développée par Horrocks *et al.* pour calculer les nombres d'hydratation des deux espèces (Tableau 46)^[186] :

Eq Eu(III)	H ₂ O (ms)		D ₂ O (ms)	q	
	τ_1	τ_2	τ	q_1	q_2
0,2	0,238	0,64	2,39	3,87	0,95
0,5	0,234	0,65	2,34	3,94	0,90
1	0,205	0,65	2,31	4,60	0,90

Tableau 46 : Temps de vie en luminescence de solution de ligand L α à 30 μ M avec 0,2, 0,5 et 1 équivalent d'Eu(III) et des nombres d'hydratation associés calculés

Le temps de demi-vie τ_1 est environ trois fois inférieur à τ_2 indiquant une hydratation plus importante de la première espèce, qui est confirmée par le calcul avec un $q_1 \approx 4$ et $q_2 \approx 1$.

L'équation d'une double exponentielle se présente sous la forme : $y = A_1 e^{-\frac{x}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{x}{\tau_2}} + y_0$ avec A_1 et A_2 les facteurs pré-exponentiels dépendant de plusieurs paramètres, dont la concentration de l'espèce et le rendement quantique. Il n'est donc pas envisageable de confirmer la proportion exacte d'une espèce par rapport à l'autre. Cependant, d'après la spéciation, on sait qu'en augmentant la proportion de métal par rapport à celle du ligand, la formation de ML α est favorisée par rapport à ML α_2 .

Les facteurs A_1 et A_2 doivent donc suivre cette même tendance : $A_{EuL\alpha}$ augmente lorsque le ratio Eu / L augmente. Le Tableau 47 met bien en évidence l'augmentation du facteur A_1 avec le nombre d'équivalent d'Eu(III). C'est ainsi que l'on peut conclure que A_1 correspond à $A_{EuL\alpha}$ et A_2 et $A_{EuL\alpha_2}$. Ainsi, ML α possède quatre molécules d'eau ($q_1 = 4$) dans sa sphère interne contre une seule pour ML α_2 ($q_2 = 1$).

Eq Eu(III)	A_2/A_1
0,2	1,9
0,5	0,7
1	0,4

Tableau 47 : Parallèle entre le nombre d'équivalent d'Eu(III) et le ratio A_2/A_1

E. Discussion

Les analyses effectuées sur le système M : L α nous mènent à des conclusions similaires à celles du système M : L β . En effet, bien que la deuxième espèce formée soit composée, cette fois ci, de deux ligands L α pour un métal, le système est encore une fois peu stable ($\log K_{GdL\alpha} = 4,24$ et $\log K_{GdL\alpha_2} = 2,4$) et dynamique.

Quel que soit le ratio $Gd / L\alpha$, l'espèce majoritaire se trouve toujours être $GdL\alpha$ (1 : 1) pour laquelle a été calculé un nombre d'hydratation de quatre. Ainsi, le ligand $L\alpha$ occupe uniquement quatre à cinq sites de coordination du $Gd(III)$ avec donc un NC de 8 – 9. Le système étant encore une fois dynamique, il n'est pas possible d'affirmer le type de coordination avec le cation métallique mais il est certainement en échange constant entre les différents picolines, comme illustré Figure 84. En règle générale, le $Gd(III)$ n'est donc jamais suffisamment coordonné pour espérer obtenir une bonne stabilité.

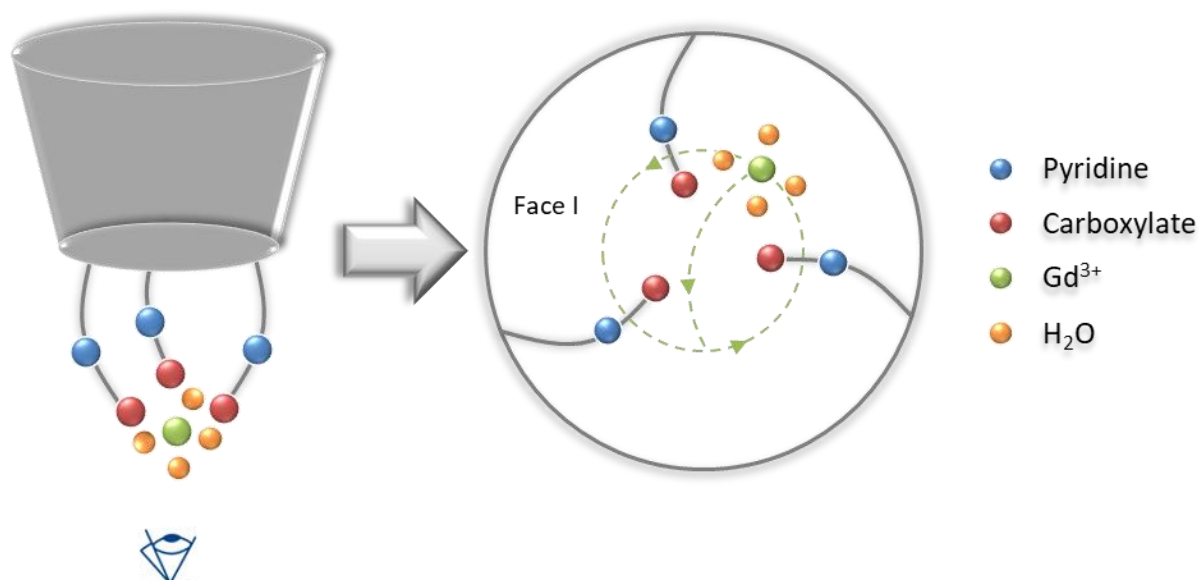


Figure 84 : Représentation schématique de la structure et de la dynamique du complexe $GdL\alpha$ ($q = 4$)

Le complexe $GdL\alpha_2$ est le seul de la série à pouvoir occuper le maximum de sites de coordination du $Gd(III)$. Dans l'hypothèse d'un NC = 8 – 9 avec un $q = 1$, les deux ligands $L\alpha$ se positionnent certainement de telle sorte que les groupements picolines participent à la coordination du cation métallique en formant au total sept à huit liaisons. De ce fait, la très faible stabilité ne s'explique pas, cette fois ci, par un manque de coordination du $Gd(III)$ mais par les répulsions électrostatiques entre les deux ligands qui possèdent chacun trois carboxylates (Figure 85).

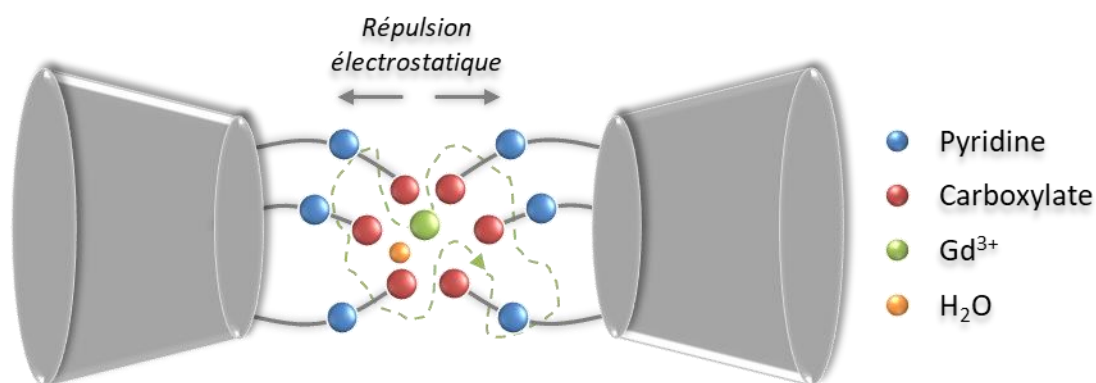


Figure 85 : Représentation schématique du complexe GdLa₂

Grâce à l'histogramme (Figure 86) représentant le pourcentage de chacune des espèces présentes en solution en chaque point du dosage relaxométrique, on visualise très distinctement la prédominance de l'espèce GdLa. Celle-ci, de par son nombre d'hydratation très élevé, doit logiquement avoir une relaxivité bien supérieure à toutes les autres espèces. On peut estimer que sur la première partie du dosage, où Gd(III) libre et GdLa₂ sont présent à moins de 10% chacun, la relaxivité globale est principalement dû à GdLa confirmant, d'une part, le dosage relaxométrique et le calcul de la relaxivité de ce complexe.

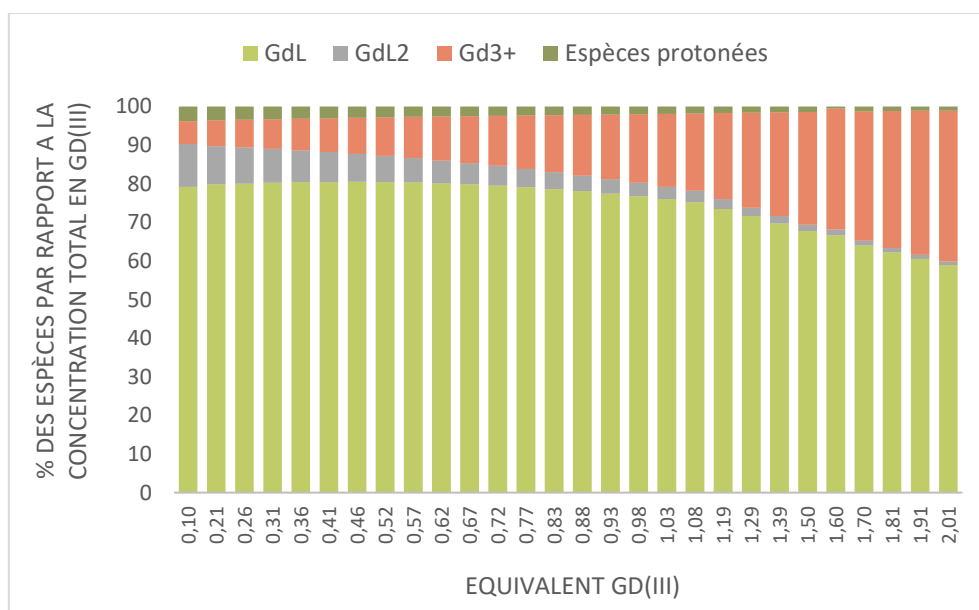


Figure 86 : Proportion relative des espèces présentes en solution durant le dosage relaxométrique avec [La] = 1 mM et pH = 5,7

Le temps de relaxation paramagnétique T_{1p} , s'exprime rigoureusement d'après l'Equation 16 :

$$(16) \frac{1}{T_{1p}} = r_{Gd^{3+}}[Gd^{3+}] + r_{GdL\alpha}[GdL\alpha] + r_{GdL\alpha H}[GdL\alpha H] \\ + r_{GdL\alpha_2}[GdL\alpha_2] + r_{GdL\alpha_2 H}[Gd(L\alpha)_2 H]$$

En traçant $1/T_{1p}$ en fonction de la concentration en Gd(III) (Figure 87), il est possible de déterminer la relaxivité de l'espèce désirée en formulant l'hypothèse que la droite, jusqu'à cassure de la pente, représente la relaxivité de l'espèce étudiée $GdL\alpha$. Ainsi, la relaxivité peut être estimée à environ $24,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ soit bien inférieure à la relaxivité de $GdL\beta$ ($41,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

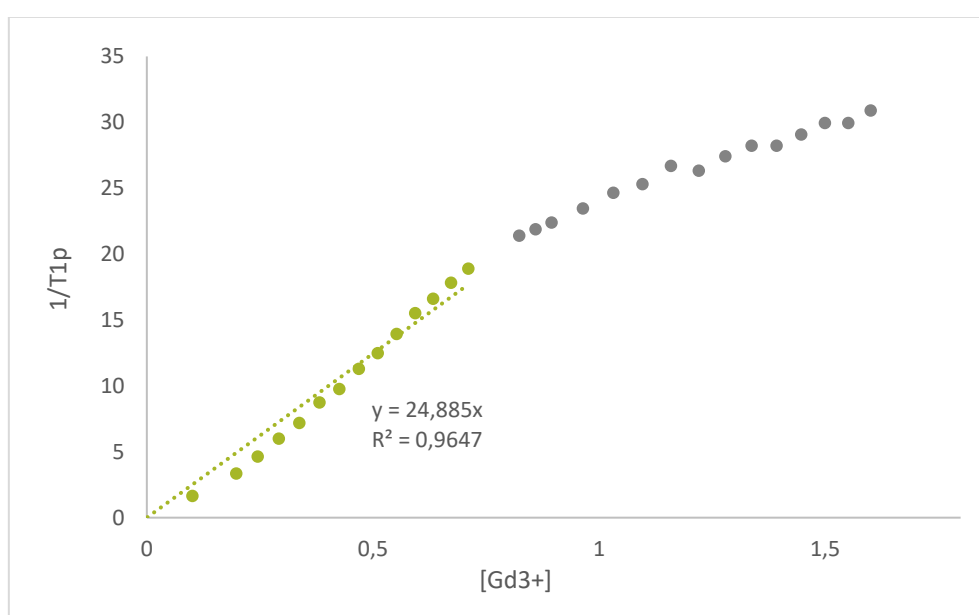


Figure 87 : Détermination graphique de la relaxivité de l'espèce $GdL\alpha$ grâce au dosage relaxométrique effectué à 25°C, 60 MHz, avec une solution de ligand $[L\alpha] = 1 \text{ mM}$ à $\text{pH} = 5,7$

La mesure de la valeur de la relaxivité de l'espèce $Gd(L\alpha)_2$ n'a pas donc pas été envisageable de par sa trop faible proportion en solution tout au long du dosage.

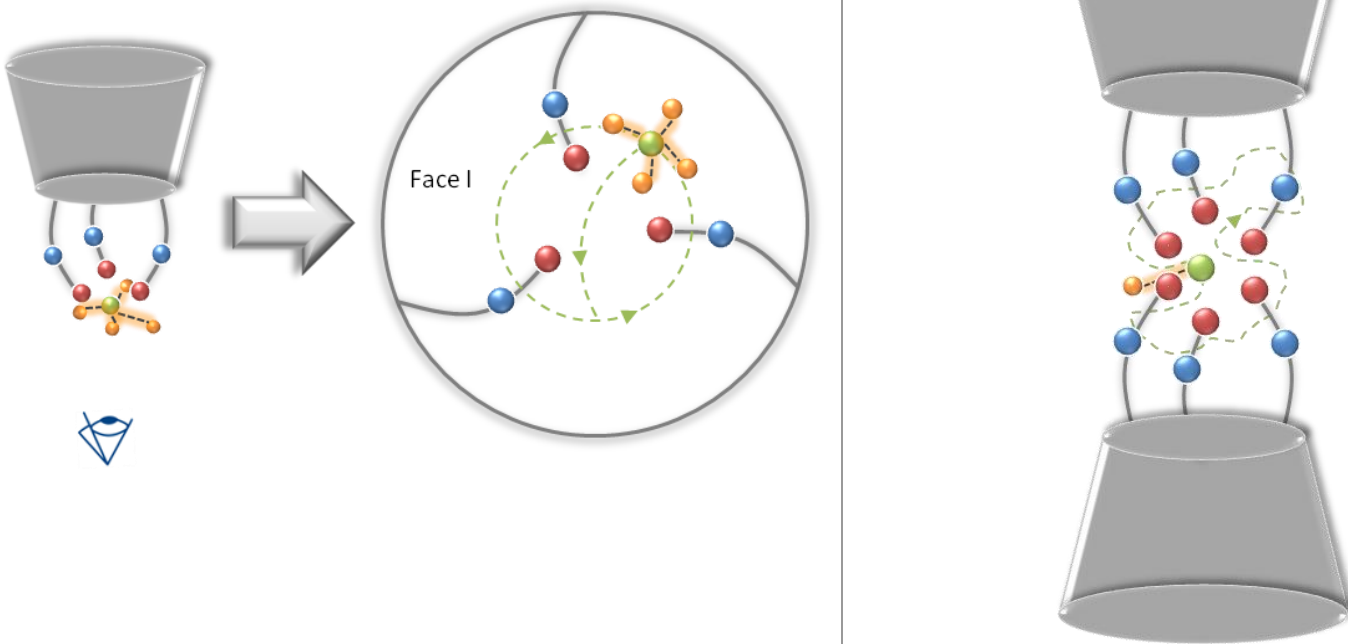
Pour les mêmes raisons, il est plus difficile de confirmer le dosage effectué en luminescence qui nous avait cependant mis sur la voie du complexe $Gd(L\alpha)_2$. Il est très étonnant qu'une espèce en concentration si faible puisse dominer un dosage. Néanmoins, si on prend en considération le fait que les molécules d'eau sont des désactivateurs vibrationnels non-radiatifs très efficaces, plus il y a de molécules d'eau coordonnées au cation métallique moins le retour à l'état stationnaire se fera par la radiation du cation métallique et donc moins il y aura de signal en luminescence. Ainsi, le dosage en luminescence (Figure 80.b) représente jusqu'à

0,45 équivalent d'Eu(III) le signal émis par l'espèce $\text{Eu}(\text{L}\alpha)_2$, avec une seule molécule dans sa sphère interne puis le plateau qui s'ensuit, est dû aux signaux des deux espèces qui se compensent. Cette hypothèse permet d'expliquer la différence entre les dosages relaxométrique et photophysique.

F. Conclusion

La complexité de l'étude du système métallique formé avec le ligand $\text{L}\alpha$ est similaire à celle du ligand $\text{L}\beta$. En effet, outre la formation du complexe attendu $\text{ML}\alpha$, l'existence d'une deuxième espèce a été prouvée avec non pas deux centres métalliques, mais deux ligands complexant un cation métallique $\text{M}(\text{L}\alpha)_2$. Ce deuxième complexe a rendu difficile l'interprétation des résultats de par son comportement variable en fonction des techniques utilisées. Il a cependant pu être mis en évidence, encore une fois, que le système était dynamique et très peu stable en corrélation avec soit un nombre d'hydratation élevé ($q_{\text{ML}\alpha} = 4$) soit des répulsions électrostatiques entre les carboxylates des deux ligands $\text{L}\alpha$ du complexe $\text{ML}\alpha_2$. L'influence de la cyclodextrine sur la relaxivité est de nouveau démontrée avec une valeur de $r_{\text{GdL}\alpha} = 24,9 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 48 suivant.

Tableau 48 : Résumé de l'étude du système GdL / GdL α

Complexe	GdL α	GdL α
logK _H	3,49(2) / 4,24(2) / 4,91(5)	
log K	log K _{GdLα} = 4,24(2) / log K _{GdLαH} = 3,89(4)	log K _{GdLα2} = 2,4(1) / log K _{GdLα2H} = 5,1(2)
q	4	1
r ₁	24,9 mM ⁻¹ .s ⁻¹	/
Représentation schématique		

III. Bibliographie

- [8] L. Helm, A. E. Merbach, É. Tóth, Eds., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, **2013**.
- [172] Z. A. Dziuganowska, K. Ślepokura, J.-N. Volle, D. Virieux, J.-L. Pirat, P. Kafarski, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4947–4954.
- [173] A. K. Hagan, T. Zuchner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2847–2864.
- [174] C. S. Bonnet, M. Devocelle, T. Gunnlaugsson, *Chem. Commun.* **2008**, *0*, 4552–4554.
- [175] N. Chatterton, Y. Bretonnière, J. Pécaut, M. Mazzanti, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7595–7598.
- [176] Y. Bretonnière, M. Mazzanti, J. Pécaut, F. A. Dunand, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6737–6745.
- [177] R. Ferreirós-Martínez, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, *Dalton Trans.* **2008**, *0*, 5754–5765.
- [178] G. Nocton, A. Nonat, C. Gateau, M. Mazzanti, *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 2257–2273.
- [179] Z. Pálinkás, A. Roca-Sabio, M. Mato-Iglesias, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 8878–8889.
- [180] A. Nonat, C. Gateau, P. H. Fries, M. Mazzanti, *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12*, 7133–7150.
- [181] A. Roca-Sabio, C. S. Bonnet, M. Mato-Iglesias, D. Esteban-Gómez, É. Tóth, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 10893–10903.
- [182] N. Chatterton, C. Gateau, M. Mazzanti, J. Pécaut, A. Borel, L. Helm, A. Merbach, *Dalton Trans.* **2005**, *0*, 1129–1135.
- [183] A. Rodríguez-Rodríguez, Z. Garda, E. Ruscsák, D. Esteban-Gómez, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, L. M. P. Lima, M. Beyler, R. Tripier, G. Tircsó, et al., *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 5017–5031.
- [184] C. Bonnet, Complexation Des Cations Lanthanides Trivalents Par Des Ligands d'origine Biologique Pour l'IRM : Structure, Thermodynamique et Méthodes, Université Joseph Fourier (Grenoble), **2006**.
- [185] N. Sabbatini, M. Guardigli, J.-M. Lehn, *Coord. Chem. Rev.* **1993**, *123*, 201–228.
- [186] R. M. Supkowski, W. D. Horrocks, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5616–5619.
- [187] R. D. Shannon, C. T. Prewitt, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1969**, *25*, 925–946.
- [188] D. M. Corsi, C. Platas-Iglesias, H. van Bekkum, J. A. Peters, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 723–726.

Conclusion et perspectives

Les objectifs de cette thèse étaient de concevoir de nouveaux agents de contraste pour l'IRM utilisant la β - et l' α -CD comme plateforme sur lesquels seraient insérés des bras chélatant du Gd(III) de type pyridino-carboxylate et pyridino-phosphonate (Figure 88).

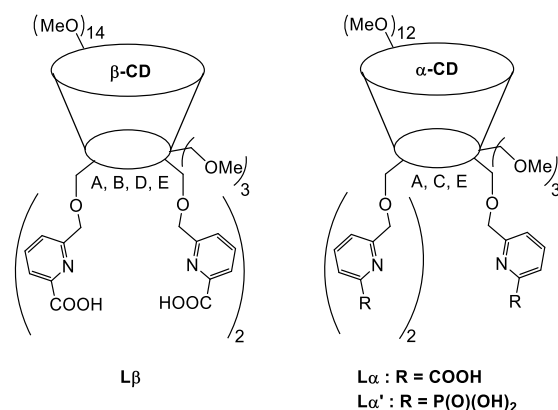


Figure 88 : Structures cibles de la thèse

La fonctionnalisation des cyclodextrines a été mis au point sur la β -cyclodextrine. La première étape d'aménagement fonctionnel de la β -CD native a été effectuée à partir des conditions décrites par Armspach *et al.* permettant ainsi d'accéder à la β -CD perméthylée et ne possédant que quatre hydroxyles libres en vue de leur alkylation, le tétrol **46**. Cette plateforme a été le point de départ de plusieurs voies de synthèse vers l'obtention d'un composé tétra-fonctionnalisé par les groupements pyridino-carboxylates.

La première fonctionnalisation envisagée avec le bras pyridine α -carboxylate de méthyle **52** a mis en évidence la formation d'un grand nombre de sous-produits rendant impossible l'isolement du produit tétra-fonctionnalisé **53**. Pour contourner ces difficultés, deux stratégies alternatives ont été mises en œuvre. D'un côté, la nature du lien entre le tétrol **46** et le groupement pyridine a été modifié, passant d'une fonction éther à une fonction amine. Cependant, lors des différents essais effectués, la tétra-fonctionnalisation n'a jamais pu être observée. En parallèle, la nature de l'ester porté par la pyridine a aussi été modifiée, passant de l'ester méthylique **52** à l'ester *tert*-butylique **59**, plus encombré et ainsi plus résistant aux conditions d'hydrolyse en condition basique et de transestérification. Cependant, comme avec la pyridine-carboxylate de méthyle **52**, la fonctionnalisation a lieu mais, de nouveau, avec la formation de nombreux sous-produits. Des conditions d'analyses en HPLC-UV-DEDL ont

donc été développées afin de séparer, détecter et quantifier l'ensemble des produits formés durant cette réaction. Un suivi analytique a alors été mis en place pour cribler un grand nombre de conditions réactionnelles et de les comparer en fonction de la proportion de produit tétra-fonctionnalisé **63** formé. Les conditions de séparation ont ensuite pu être transposées en HPLC semi-préparative permettant pour la première fois d'isoler la β -CD tétra-fonctionnalisée **63** avec un rendement faible de 4%. La déprotection des ester *tert*-butylique a ensuite été réalisée en milieu acide permettant ainsi d'isoler le ligand final **L β** .

Les conditions réactionnelles et analytiques développées lors de la tétra-fonctionnalisation de la β -CD ont permis de développer plus rapidement la tri-fonctionnalisation de l' α -CD. L'aménagement fonctionnel de l' α -CD native a, tout d'abord, été réalisé en adoptant la stratégie de protection/déprotection avec des groupements trityles qui sont suffisamment encombrants pour favoriser la substitution des positions A, C et E. Les tri-fonctionnalisations de l' α -CD par les groupements pyridine-phosphonate **69** et pyridine-carboxylate de *tert*-butyle **59** ont été réalisés avec des rendements de 27% et 22%, respectivement, bien plus élevés que pour la β -CD. Le ligand final **L α** , issu de l' α -CD tri-ester **75** a pu être isolé sans difficulté en utilisant, comme pour accéder à **L β** , une déprotection en milieu acide. Cependant, par faute de temps, la déprotection des phosphonates pour accéder au ligand final **L α'** n'a pas été menée à terme à cause d'un problème de caractérisation qui empêche d'affirmer la formation partielle ou totale des acides phosphoniques.

Les deux ligands finaux **L β** et **L α** obtenus ont été, par la suite, caractérisés avec différentes techniques analytiques permettant d'évaluer leur stabilité thermodynamique ainsi que leur efficacité en tant qu'agents de contraste pour l'IRM. Les deux systèmes étudiés ont montré des caractéristiques particulières qui ont compliqué l'interprétation des résultats.

Concernant le ligand **L β** , l'ensemble des analyses effectuées a permis d'établir qu'un ou deux cations métalliques Gd(III) pouvaient être complexés formant les espèces Gd**L β** et Gd₂**L β** avec des stabilités très faibles de 5,58(5) et 3,4(1) et des relaxivités très élevées de 41,2 mM⁻¹s⁻¹ et 61 mM⁻¹s⁻¹ respectivement. La β -CD est certainement trop large pour permettre la complexation du Gd(III) par les quatre groupements pyridine-carboxylates en même temps. Le système étant ainsi toujours dynamique ne favorise pas une conformation particulière du complexe. Néanmoins, la relaxivité, très élevée, obtenue pour le complexe Gd**L β** , qui s'explique d'une part, par l'augmentation du temps de corrélation rotationnel τ_r grâce à la CD

et d'autre part, par le nombre important de molécule d'eau dans la sphère interne ($q = 3 - 4$), est encourageante.

Pour le ligand $L\alpha$, le croisement des résultats issus des différentes techniques analytiques a permis, encore une fois, de mettre en évidence la formation de deux espèces métalliques, $GdL\alpha$ et $GdL\alpha_2$. Cette deuxième espèce est présente en faible quantité mais a perturbé l'interprétation des résultats en répondant différemment aux analyses effectuées en relaxométrie et en luminescence. Le système s'est avéré être encore une fois dynamique avec de faibles stabilités de 4,24(2) pour $GdL\alpha$ et 2,4(1) pour $GdL\alpha_2$ qui s'expliquent par le groupement carboxylate en moins par rapport au ligand $L\beta$. La relaxivité de $GdL\alpha$ a pu être calculée et s'élève à $24,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

De par sa taille et la symétrie de la structure, l' α -CD semble la cyclodextrine la plus adaptée pour élaborer de nouveaux complexes de Gd(III). Deux principales améliorations peuvent être envisagées pour accéder à des complexes plus stables.

Au vu de la meilleure chélation du Gd(III) apportée par les fonctions phosphonates par rapports aux fonctions carboxylates, il serait intéressant d'approfondir les travaux déjà réalisées sur la tri-fonctionnalisation de l' α -CD avec les pyridine-phosphonate. Les difficultés rencontrées lors de la déprotection des phosphonates afin d'accéder aux acides phosphoniques doivent ainsi être élucidées. Pour cela, le développement d'un nouveau gradient en HPLC, adaptés aux acides phosphoniques, doit être mis en place afin de suivre la déprotection. Les conditions d'élutions permettront aussi de purifier le composé obtenu et de le caractériser par RMN. Afin de permettre l'identification des produits synthétisés, l'utilisation d'une autre source d'ionisation pour l'HRMS, tel que le MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) peut être envisagée. D'autres méthodes de déprotection peuvent être considérées en changeant, dans un premier temps, la nature du phosphonate. En effet, les phosphonates de benzyle se déprotègent non plus par action du TMSBr ou HCl mais en condition réductrice utilisant du palladium sous charbon sous pression d'hydrogène.^[189]

Ensuite, il pourrait être envisagée la tétra-fonctionnalisation de l' α -CD par les groupements pyridine-ester, ce qui amènerait autant de bras pyridine que pour le ligand $L\beta$, mais où les sites coordinants seraient plus proche du centre métallique ce qui permettrait d'éviter la complexation de deux Gd(III). L'aménagement fonctionnel pour accéder au composé α -CD

tétra-fonctionnalisé en position A, B, D et E symétrique est décrit par Armspach *et al.* avec l'utilisation du super-trityle comme groupement protecteur.^[145] Il suffira ensuite d'appliquer les conditions réactionnelles développées durant cette thèse pour fonctionnaliser l' α -CD par les groupements pyridine-ester ou -phosphonate.

[145] L. Poorters, D. Armspach, D. Matt, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 1377–1381.

[189] F. Plénat, S. Ibrahim, H.-J. Cristau, *Synthesis* **1988**, 912–913.

Partie expérimentale

I. Materials and Methods

1. Solvents & Reagents

All reagents were purchased from commercial suppliers and were used without further purification. Anhydrous solvents: dry DMF and MeOH were purchased from Sigma-Aldrich. CH₂Cl₂ and CCl₄ were distilled under CaCl₂, and pyridine was distilled under KOH. THF, ACN were purified with a dry station GT S100 immediately prior to use.

2. Reactions Monitoring & Purification

The reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using aluminum sheets coated with silica gel 60 F254 or 60 RP-18 F254S. The TLCs were revealed under the appropriate conditions: ultraviolet lamp at 254 nm with 8% sulfuric acid solution in ethanol for cyclodextrin derivatives and ninhydrin for amines. Flash column chromatography was carried out using silica gel 60 Å (0.04–0.06 mm). C18 flash column chromatography was carried out using silica gel RP-18 (25 – 40 µm).

3. Analysis

- ✓ NMR spectra were recorded with a 250 MHz (¹H: 250 and ¹³C: 63 MHz) or 400 MHz (¹H: 400 and ¹³C: 100 MHz) Bruker spectrometer in a solution of an appropriate deuterated solvent and the chemical shifts are described in ppm with the residual peaks of the deuterated solvents as references. Coupling constants “*J*” are expressed in hertz (multiplicity: s = singlet, bs = broad singlet, d = doublet, dd = double doublet, dt = double triplet, t = triplet, m = multiplet ...).
- ✓ High-resolution mass spectroscopy (HRMS) was performed on a Bruker maXis mass spectrometer by the "Fédération de Recherche" ICOA/CBM (FR2708) platform.
- ✓ Elementary analyses were performed by the Service of Microanalyses of Institut de Recherche en Chimie Organique Fine of Mont Saint Aignan.
- ✓ High-pressure liquid chromatography was performed on an Agilent 1100 series with a column Macherey-Nagel, CC250/4 Nucleosil 50-5 C8 ec and two detectors: an Ultra-Violet (Spectroflow 783 UV: λ = 254 nm) and a Evaporating Light Scattering Detector (Sedex 55 DEDL: 55°C).

HPLC Methods:

1 (H ₂ O/ACN)		2 (H ₂ O/ACN)		3 (H ₂ O/ACN)		4 (H ₂ O + TFA 0,1%/ACN + TFA 0,1%)	
Temps	%ACN	Temps	%ACN	Temps	%ACN	Temps	%ACN + TFA 0,1%
0	40	0	40	0	40	0	5
15	60	10	60	10	60	10	5
25	60	22	60	22	60	15	100
26	100	35	100	35	100	20	5
30	100	45	100	40	100	25	5
30.1	40	48	40	40.1	40		
40	40	55	40	45	40		

- ✓ Liquid-chromatography Mass-spectroscopy (LC-MS) was performed on a Thermo Scientific UltiMate 3000 UHPLC with a column Waters Xtera C18 2.1 x 50mm, 3.5µm and two detectors: an UV ($\lambda = 254$ nm) and a quadrupole MSQ Plus ESI+ or -.

LC-MS methods:

5 (H ₂ O + HCOOH 0.1% / MeOH + HCOOH 0.1%)	
Temps	%MeOH
0	10
10	100
15	100
15.1	10
20	10

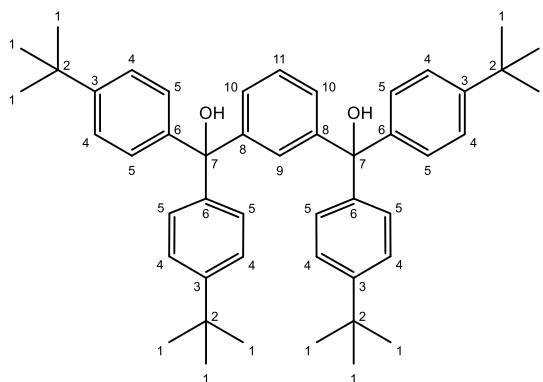
- ✓ Purification by semi-preparative chromatography was performed on a Puriflash Interchim with a column VP 250/21 Nucleosil 50-5 C8 ec with two detectors: an UV at $\lambda = 254$ nm and an ELSD and the method **2** used for HPLC analysis.

4. Characterization of the Ln^{3+} Complexes

- ✓ **Concentrations of the metal solutions** were determined similarly by complexometric titrations with standardized $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ in urotropine buffer (pH 5.6 – 5.8) in the presence of Xylenol Orange as an indicator or with BMS measurements.
- ✓ **Relaxometric studies:** Relaxometric titrations and NMRD profiles were performed on a Stelar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01 – 10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20 – 80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe. The longitudinal relaxation rates ($1/T_1$) were determined in water.
- ✓ **Luminescence studies:** Phosphorescence titration and lifetime measurements were performed on an Agilent Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer at 25°C by recording the decay of the emission intensity at 591 nm for M : $\text{L}\beta$ system and 620 nm for M : $\text{L}\alpha$ system, following an excitation at 268 nm. Measurements were performed in H_2O and D_2O solutions, for a concentration of $\text{L}\beta$ and $\text{L}\alpha$ of 30 μM . At least three decay curves were collected for each sample, all lifetimes were analyzed as mono- or double-exponential decays. The reported lifetimes are an average of at least three measurements.
- ✓ **Potentiometric studies:** Carbonate-free 0.1 M KOH and 0.1 M HCl were prepared from Fisher Chemicals concentrates. Potentiometric titrations were performed in 0.1 M aqueous KCl under nitrogen atmosphere, and the temperature was controlled to 25 ± 0.1 °C with a circulating water bath. The pH ($\text{p}[\text{H}] = -\log[\text{H}^+]$, concentration in molarity) was measured with a combined micro pH glass electrode (Metrohm 6.0224.100) filled with 3 M KCl. The electrode was calibrated in hydrogen ion concentration by titration of HCl with KOH in 0.1 M electrolyte solution. A plot of meter reading versus $\text{p}[\text{H}]$ allows the determination of the electrode standard potential (E°) and the slope factor (f). Continuous potentiometric titrations with KOH 0.1 M were conducted on aqueous solutions containing 2.5 mL of ligands or metal-complexes at 2 mM in 2.5 mL of KCl 0.1 M, and were automated by use of a 702 SM titrino system (Metrohm) connected to a computer piloted by the Tiamo 2.2 software to control titrant delivery. Experimental data were refined using the computer program Hyperquad 2008. The ionic product of water at 25 °C and 0.1 M ionic strength is $\text{pK}_w = 13.77$. Fixed values were used for pK_w , ligand acidity constants, and total concentrations of metal, ligand, and acid. All values and errors (one standard deviation) reported are at least the average of two or three independent experiments.
- ✓ **UV-visible spectroscopy:** UV-visible absorption spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 19 spectrometer in the region $\lambda = 200\text{--}500$ nm with data steps of 1 nm, with a 1 cm path length.

II. Synthesis

1,3-phenylenebis(bis(4-*tert*-butylphenyl)methanol) 48



Experimental procedure

In an oven-dried three-necked flask equipped with a condenser, dropping funnel, and argon system were placed Mg turnings (4.7 g, 192 mmol, 4.7 eq) with dry THF (110 mL). To start the reaction, few drops of 1-bromo-4-*tert*-butylbenzene followed by an iodine crystal and 1,2-dibromoethane (1 mL) were added. A solution of 1-bromo-4-*tert*-butylbenzene (97% purity, 34.3 mL, 192 mmol, 4.7 eq) in dry THF (30 mL) was added dropwise over 1 h 30. The reaction mixture, which turned grey, was stirred for 2h30 at room temperature. A solution of dimethyl isophthalate (99% purity, 8 g, 40.8 mmol) in THF (40 mL) was added dropwise over 1 h. The mixture was refluxed overnight under argon, whereupon the red mixture was cooled to room temperature before being poured into a mixture of concentrated H₂SO₄ (8 mL) and ice (300 g). The resulting suspension was extracted with Et₂O (3 × 300 mL). The combined organic extracts were washed with water (200 mL), then dried over MgSO₄. Solvent removal under vacuum gave a yellow solid. This crude diol was purified by trituration in pentane (600 mL) during 1h at reflux. The mixture was cooled to room temperature and the solid was filtrated and washed with minimum of pentane. The pure diol **48** was obtained after vacuum drying (18.3 g, 27.4 mmol, 67%).

R_f (Cy/EtOAc, 9/1, v/v): 0.4

Aspect: white powder

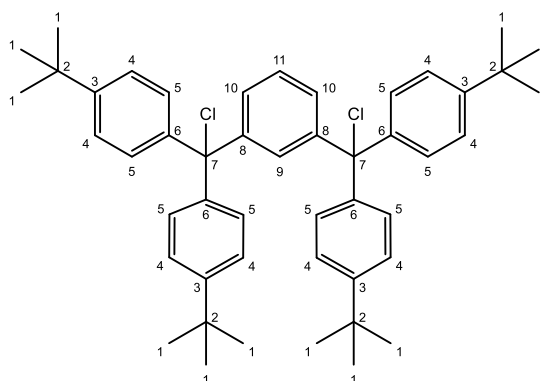
m.p.: 193°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{Na}_4\text{O}_2^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 689.4329 ; found 689.4324 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 649.4399 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.29 - 7.11 (m, 20H, Ar), 1.3 (s, 36H, *t*-Bu)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 150.0 (4C, C-6), 146.7 (2C, C-8), 144.1 (4C, C-3), 127.7 (C-9 or -11), 127.6 (4C, C-4 or C-5), 127.2 (2C, C-10), 126.5 (C-9 or C-11), 124.8 (4C, C-4 or C-5), 81.8 (2C, C-7), 34.6 (4C, C-2), 31.5 (12C, C-1)

1,3-bis(bis(4-*tert*-butylphenyl)chloromethyl)benzene 41



Experimental procedure

The pure diol **48** (18.3 g, 27.4 mmol) was dissolved in freshly distilled acetyl chloride used as a solvent (300 mL until complete solubilization). The limpid yellow solution was refluxed overnight. Acetyl chloride was removed under reduced pressure and the product thoroughly dried to afford **41** as a pure pale-yellow powder without further purification (19.3 g, 27.4 mmol, 100%).

R_f (Cy/EtOAc, 9/1, v/v): 0.4

Aspect: pale-yellow powder

m.p.: 175°C

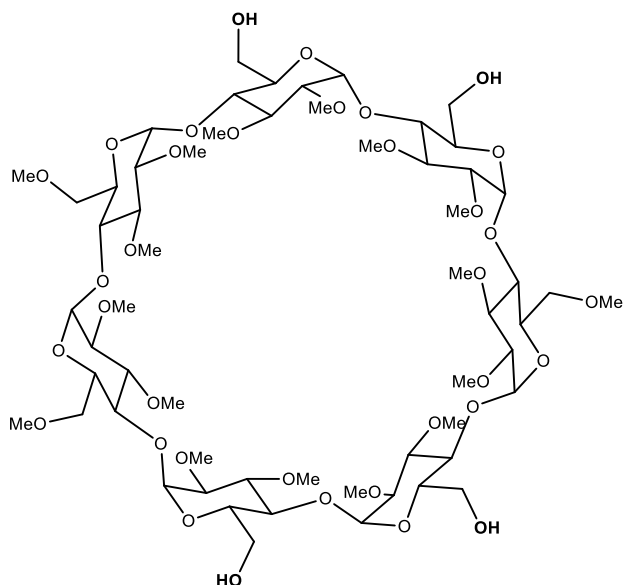
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.33 - 7.14 (m, 20H, Ar), 1.36 (s, 36H, *t*-Bu)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 150.5 (4C, C-6), 145.1 (2C, C-8), 142.2 (4C, C-3), 132.2 (C-9 or C-11), 129.3 (4C, C-4 or C-5), 128.4 (2C, C-10), 126.7 (C-9 or C-11), 124.5 (4C, C-4 or C-5), 81.2 (2C, C-7), 34.5 (4C, C-2), 31.4 (12C, C-1)

In accordance with: Armspach D. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2588–2592, DOI: 10.1039/b504012d

Tétrol 46

2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-Heptadeca-O-methyl- β -cyclodextrin



Experimental procedure

1. Protection of the four A, B, D, E positions

To a solution of dry β -cyclodextrin (4 g, 3.52 mmol), dissolved by heating at 50°C, in fresh distilled pyridine (100 mL) was added DMAP (517 mg, 4.23 mmol, 1.2 eq) followed by 1,3-bis(bis(4-*tert*-butylphenyl)chloromethyl)benzene **41** (5.42 g, 7.7 mmol, 2.2 eq) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 70°C overnight before being cooled down to room temperature. Pyridine was then removed under reduced pressure. The viscous product was dissolved in toluene and the residual pyridine was co-evaporated three-times until the achievement of a white-off powder. Addition of water (500 mL) to the residue produced a suspension that was filtrated. The cake was dried under reduced pressure at 50°C overnight under P₂O₅. This solid was used in the following step without further purification.

2. Per-methylation

The white-off solid was dissolved in DMF (150 mL) and NaH (60% in oil, 5.9 g, 148 mmol, 42 eq) was added carefully under argon atmosphere at 0°C before being warmed up to room temperature. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 2 h and cooled again at 0°C before a dropwise addition of MeI (7.8 mL, 125 mmol, 35 eq). The yellow suspension was stirred overnight at room temperature. MeOH (80 mL) was then added slowly

to quench excess NaH. The reaction mixture was poured into water (500 mL) under stirring before being extracted with Et₂O (3 x 300 mL). The combined organic layers were dried with MgSO₄ and evaporated under reduced pressure to dryness to afford a brown residue. The crude product was purified by two successive flash column chromatographies (PE/AcOEt, 100% to 50%) to give the desired product **49** as a colourless solid (2.7 g, 1.02 mmol, 29%); R_f (PE/EtOAc, 6/4, v/v): 0.5).

3. Deprotection of the four A, B, D, E positions: access to the Tetrol **46**

HBF₄ (48 wt% aq, 4.0 mL, 30.7 mmol, 30 eq) was added dropwise to a stirred solution of the protected cyclodextrin **49** (2.7 g, 1.02 mmol) in acetonitrile (30 mL) at room temperature. After 2 h, trimethylamine was added dropwise under stirring until neutral pH. Addition of fresh water (100 mL) to the reaction mixture precipitated the diol **48**. The resulting suspension was filtrated, washed with water and the filtrate was extracted with CHCl₃ (3 x 70 mL). The combined organic layers were washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution (100 mL) before being dried under MgSO₄. Removal of the solvent under reduced pressure gave tetrol **46** as a colorless solid (1 g, 0.73 mmol, 71%).

R_f (PE/ EtOAc, 7/3, v/v): 0.5

Aspect: colorless solid

m.p.: 141°C

HRMS ESI-TOF: calculated for C₅₉H₁₀₅O₃₅⁺ [M + H]⁺ 1373.6431 ; found 1373.6442 [M + H]⁺, 1390.6701 [M + NH₄⁺], 1395.6255 [M + Na]⁺, 698.3160 [M + H + Na]²⁺, 709.3072 [M + 2Na]²⁺

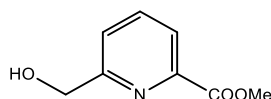
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (assignment made by analogy with *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554–1559) 5.20 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.15 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H, H-1), 5.07 (2H, H-1), 5.00 (2H, H-1), 4.00 - 3.30 (32H, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.61 (9H, OMe), 3.60 (s, 12H, OMe), 3.50 (6H, OMe), 3.49 (s, 6H, OMe), 3.47 (s, 9H, OMe), 3.35 (s, 9H, OMe-6), 3.19-3.14 (7H, H-2), 2.85 (bs, 4H, -OH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (assignment made by analogy with *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554–1559) [99.0, 98.9 (2C), 98.8 (2C), 98.7, 98.4 (7C, C-1)], [82.2, 82.2, 82.1 (2C), 82.1 (2C), 81.9, 81.9, 81.8, 81.74, 81.71, 81.6, 81.5, 81.3, 81.2, 80.7, 80.5, 80.0, 79.2 (2C), 78.5 (21C, C-2, C-3, C-4)], [77.4, 72.6, 72.4, 72.1 (4C, C-5^{A,B,D,E})], [71.9, 71.7, 71.6 (3C, C-6^{C,F,G})], [71.5 (2C), 71.4 (3C, C-5^{C,F,G})], [71.3, 62.1, 62.0, 61.8 (4C, C-6^{A,B,D,E})], [61.7 (2C), 61.6, 61.4, 61.3, 61.2, 61.1, 59.3 (2C), 59.1, 59.1, 59.0, 58.82, 58.77, 58.41, 58.36, 58.3 (17C, OMe)].

HPLC: method **3**, DEDL: t_R = 6.7 min; method **2**, DEDL: t_R = 6.2 min

In accordance with: R. Gramage-Doria, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554–1559,
DOI: 0.1002/anie.201005169

Methyl 6-hydroxymethylpicolinate 51



Experimental procedure

To a suspension of dimethylpyridine-2,6-dicarboxylate (99% purity, 10.0 g, 51.2 mmol) in anhydrous methanol (400 mL), cooled at 0°C, under argon, was slowly added sodium borohydride (7.7 g, 202.9 mmol, 4 eq) over a period of 1 h. The reaction mixture turned pink upon the addition of sodium borohydride. The temperature was raised up to room temperature and the reaction mixture was stirred for 3h30. The solution was diluted in dichloromethane (200 mL) and then quenched using saturated NaHCO₃ (~200 mL) until basic pH. The aqueous and organic layers were separated, and much of the methanol from the aqueous phase was evaporated under vacuum. The aqueous layer was then extracted with chloroform (2 × 100 mL) and ethyl acetate (3 × 100 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and concentrated under reduced pressure to dryness. The resulting white solid was purified by column chromatography (EtOAc/Cy 70% to 80% with 10% of triethylamine) to afford the product **51** as a white solid (3 g, 18 mmol, 35%).

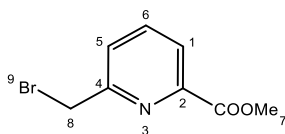
R_f (AcOEt): 0.4

Aspect: white powder

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.0 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, pyr), 7.8 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, pyr), 7.5 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, pyr), 4.8 (s, 2H, CH₂), 3.9 (s, 3H, Me)

In accordance with: E. W. Price, *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8670–8683, DOI: 10.1021/ja3024725

Methyl 6-bromomethylpicolinate 52



Experimental procedure

To a solution of methyl 6-hydroxymethylpicolinate **51** (3 g, 17.95 mmol) in chloroform (75 mL) under argon at 0°C was added phosphorus tribromide (1.9 mL, 19.74 mmol, 1.1 eq) in chloroform (7.5 mL) dropwise over 15 min with a syringe pump. During the addition, a white precipitate was formed, and the solution turned then bright yellow. The reaction mixture was stirred at 0°C for 2 h. The reaction mixture was quenched using a saturated solution of potassium carbonate in water (100 mL) and was extracted with chloroform (4 × 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to dryness. The crude product was purified through a short silica plug (Cy/EtOAc, 7:3) to afford **52** as an off-white solid (3.9 g, 16.95 mmol, 95%).

R_f (Cy/ EtOAc, 7/3, v/v): 0.8

Aspect: off-white powder

m.p.: 67°C

HRMS ESI-TOF: calculated for C₈H₉BrNO₂⁺ [M + H]⁺ 229.9811 ; found 229.9812 [M + H]⁺, 251.9633 [M + Na]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, pyr), 7.84 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, pyr), 7.67 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, pyr), 4.62 (s, 2H, CH₂), 3.99 (s, 3H, CH₃)

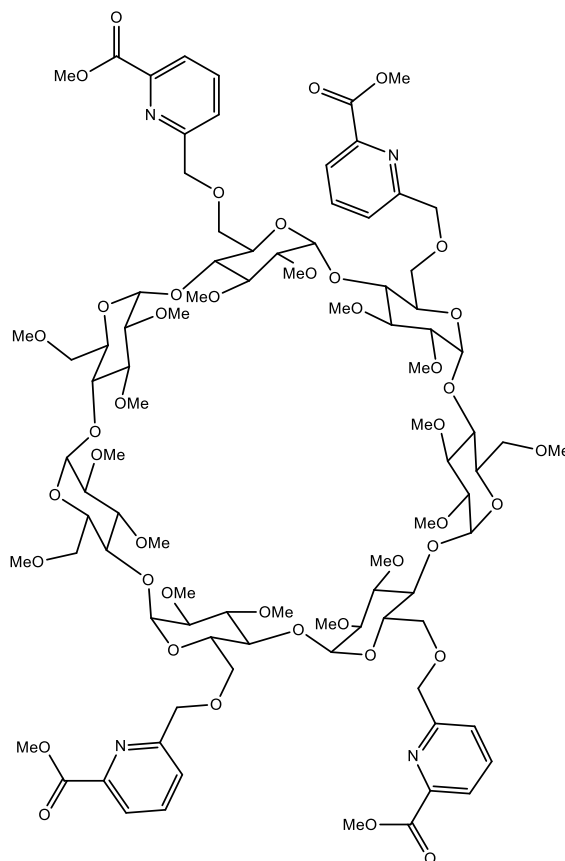
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.4 (C=O), 157.5 (C-4), 147.7 (C-2), 138.3 (C-6), 127.2 (C-5), 124.5 (C-1), 53.2 (C-7), 33.3 (C-8)

In accordance with: E. W. Price, *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8670–8683,
DOI: 10.1021/ja3024725

6A,6B,6D,6E-Tetra-O-(6-methylesterpyridin-1-yl)-

2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-heptadeca-O-methyl-β-cyclodextrin

53



Experimental procedure

Sodium hydride (60% in oil, 35 mg, 0.87 mmol, 12 eq) was added to a solution of tetrol **46** (100 mg, 0.073 mmol) in THF (3 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Methyl 6-bromomethylpicolinate **52** (201 mg, 0.87 mmol, 12 eq) was then added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 additional days. Water (2 mL) was added to quench the reaction. After removal of the THF under reduced pressure, the residue was extracted with EtOAc (3 x 8 mL), and the combined organic layers were dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100% to 90%). The tetra methyl-ester **53** was obtained with a HPLC purity of 36% (37 mg, 9% (*yield calculated from HPLC purity*)).

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, v/v): 0.4

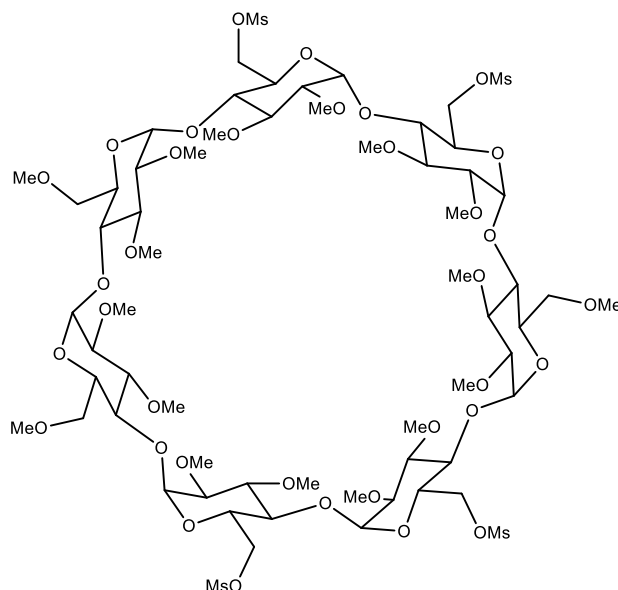
Aspect: white powder

HRMS ESI-TOF: calculated for $C_{91}H_{134}N_4O_{43}^{2+}$ $[M + 2H]^{2+}$ 985.4205 ; found 985.4212
 $[M + 2H]^{2+}$, 657.2835 $[M + 3H]^{3+}$, 493.2145 $[M + 4H]^{4+}$

1H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 8.10 – 7.47 (m, 12H, pyr), 5.24 – 5.01 (m, 3H, H-1), 4.90 – 4.65 (m, 4H, H-1), 4.40 – 3.00 (m, 58H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.97 (s, 9H, OMe), 3.66 - 3.48 (42H, OMe), 1.24 (s, 12H, COOMe)

HPLC: method **1**, DEDL: t_R = 18.7 min

6A,6B,6D,6E-Tetra-O-mesyl-2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-heptadeca-O-methyl- β -cyclodextrin 54



Experimental procedure

Methanesulfonyl chloride (230 μ L, 2.99 mmol, 4.1 eq) was added to a solution of tetrol **46** (1 g, 728 μ mol) and DMAP (350 mg, 2.88 mmol, 4 eq) in dry pyridine (30 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight before adding water (100 mL). The solution was extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The combined organic layers were washed sequentially with HCl 2 M (2 x 50 mL), NaOH 2 M (2 x 50 mL) and water (50 mL) before being dried (MgSO_4). Removal of the solvent under reduced pressure by co-evaporation with toluene gave tetramesylate **54** with 95% HPLC purity (1.18 g, 91%) as a colorless solid.

R_f (toluene/acetone, 55/45, v/v): 0.4

Aspect: colorless solid

m.p.: 130°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{63}\text{H}_{112}\text{O}_{43}\text{S}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1685.5533 ; found 1685.5539 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 843.3796 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ (assignment made by analogy with *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554–1559) 5.27 – 5.06 (m, 7H, H-1), 4.74 – 4.50 (m, 6H, H-6^{A,B,D,E}), 4.43 – 4.30 (m, 2H, H-6^{A,B,D,E}), 4.08 – 3.35 (m, 27H, H-3, H-4, H-5, H-6^{C,F,G}), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.63 (s, 6H, OMe), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.54 (s, 6H, OMe), 3.52

(s, 6H, OMe), 3.50 (s, 9H, OMe), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.39 (s, 3H, OMe) , 3.39 (s, 3H, OMe), 3.25-3.14 (m, 7H, H-2), 3.12 – 3.05 (m, 12H, -SO₂CH₃)

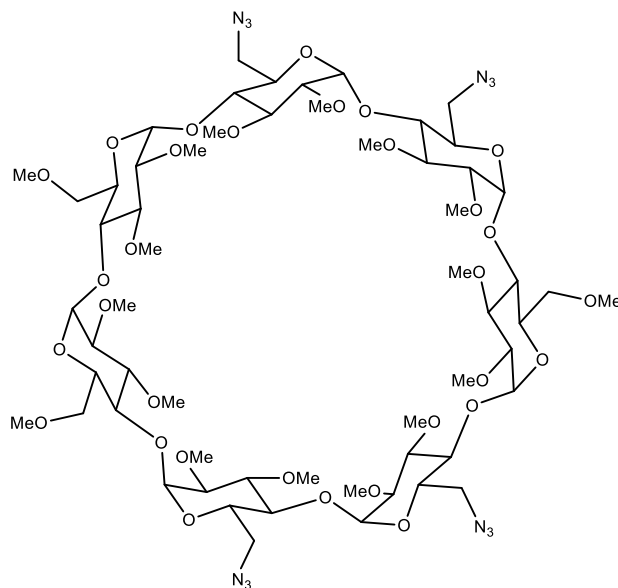
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (assignment made by analogy with *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554–1559) [99.2, 98.9, 98.4, 97.8 (7C, C-1)], [82.1, 82.0, 81.9, 81.8, 81.7, 81.5, 81.1, 80.6, 80.2, 80.1, 78.5, 78.2 (21C, C-2, C-3,C-4)], [71.4, 71.2 (3C, C-5^{C,F,G})], 71.0 (3C, C-6^{C,F,G}), [69.9, 69.4 (4C, C-6^{A,B,D,E})], [69.7, 69.6, 69.5, 69.42 (4C, C-5^{A,B,D,E})], [61.8, 61.7, 61.64, 61.60 (2C), 61.2, 61.2, 59.4, 59.4, 59.2 (2C), 59.1, 58.8, 58.5, 58.5 (2C), 58.3 (17C, OMe)], [37.5, 37.36, 37.32, 37.2 (4C, OMs)]

HPLC: method **2**, DEDL: t_R = 13.6 min

In accordance with: R. Gramage-Doria, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1554 –1559,
DOI: 0.1002/anie.201005169

6A,6B,6D,6E-Tetraazide-2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-heptadeca-

O-methyl- β -cyclodextrin 57



Experimental procedure

To a solution of the tetra-mesylate compound **54** (200 mg, 118.6 μ mol) in DMF (5 mL) was added NaN_3 (99% purity, 312 mg, 4.75 mmol, 40 eq). The reaction mixture was stirred 3 days at 70°C before being quenched with water (10 mL). The azide x was then extracted with Et_2O (4 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with NaCl (30 mL) and dried with MgSO_4 . Finally, the solvent was removed under reduced pressure to give the pure tetra azide **57** as a colorless solid with 89% of HPLC purity (145 mg, 87.8 μ mol, 74%).

R_f (toluene/acetone, 55/45, v/v): 0.6

Aspect: colorless solid

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{N}_{12}\text{NaO}_{31}^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1495.6510 ; found 1495.6490 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1490.6933 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$

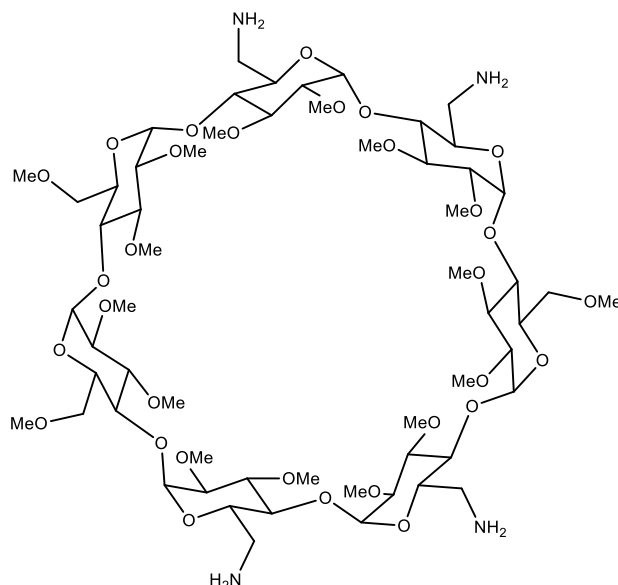
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 5.14 (d, J = 3.5 Hz, 1H, H-1), 5.11 (d, J = 3.7 Hz, 3H, H-1), 5.08 (d, J = 3.7 Hz, 2H, H-1), 5.06 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H-1), 4.0 - 3.3 (m, 32H, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.64 (m, 6H, OMe), 3.63 (s, 12H, OMe), 3.62 (s, 3H, OMe), 3.52 (s, 12H, OMe), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.50 (s, 6H, OMe), 3.40 (s, 6H, OMe), 3.38 (s, 3H, OMe), 3.22 – 3.14 (m, 7H, H-2)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [99.4, 99.3, 98.9, 98.7, 98.5 (7C, C-1)], [82.1, 82.0, 81.9, 81.9, 81.7, 81.7, 81.6, 81.6, 81.4, 81.2, 80.4, 80.1 (21C, C-2, C-3, C-4)], [71.7, 71.3, 71.2 (7C, C-6)], [71.18, 71.10, 70.07, 70.99, 70.96 (7C, C-5)], [61.68, 61.63, 61.60, 61.57, 61.54, 61.50, 59.20, 59.17, 58.97, 58.90, 58.84, 58.73 (17C, OMe)]

HPLC: method **2**, DEDL: t_R = 29.3 min

6A,6B,6D,6E-Tetraamine-2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-heptadeca-

O-methyl- β -cyclodextrin 58



Experimental procedure

To a solution of the tetra-azide **57** (652 mg, 0.44 mmol) in THF (12mL) was added a polymer-bound triphenylphosphine (≈ 3 mmol/g, 1.1 g, 9.5 eq) under argon atmosphere. The reaction mixture was slowly stirred at room temperature for 1 h 30. NH_4OH (0.8 mL, 46 eq) was added and the medium was refluxed overnight. The resin was filtrated, and washed with EtOAc. The solvent was removed under reduced pressure to give the pure tetra-amine **58** as a colorless solid (590 mg, 0.43 mmol, 97%).

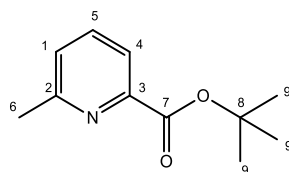
Aspect: colorless solid

m.p.: 127°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{59}\text{H}_{108}\text{N}_4\text{O}_{31}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1369.7070 ; found 1369.7056 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 685.3568 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, 457.2408 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, 343.1826 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 5.19 - 4.99 (m, 7H, H-1), 4.00 - 3.3 (m, 30H), 3.65 (s, 6H, OMe), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.61 (s, 3H, OMe), 3.60 (s, 3H, OMe), 3.59 (s, 6H, OMe), 3.51 (s, 3H, OMe), 3.50 (s, 6H, OMe), 3.47 (s, 12H, OMe), 3.36 (s, 9H, OMe), 3.20 - 3.05 (m, 12H), 2.61 (s, 8H, NH_2)

Tert-butyl 6-methylpicolinate 61



Experimental procedure

6-methylpicolinic acid **60** (97% purity, 10 g, 70.73 mmol) was suspended in anhydrous CH₂Cl₂ (260 mL). To the reaction mixture was added *tert*-butyl-2,2,2-trichloroacetimidate (95% purity, 13.8 mL, 70.73 mmol, 1 eq), followed by BF₃·etherate (0.8 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature under argon. The reaction mixture volume was reduced *in vacuo* to ~100 mL; the resulting white solid was filtered through a fritted glass filter and discarded. The filtrate was concentrated under reduced pressure to ~50 mL. The residual by-product, visualized by ninhydrin staining of TLC plates, was removed by precipitation in petroleum ether. The crude product was purified by silica (CH₂Cl₂, 100%) to yield product **61** as a clear colorless oil (13.5 g, 69.86 mmol, 98%).

Rf (PE/ EtOAc, 8/2, v/v): 0.4

Aspect: colorless oil

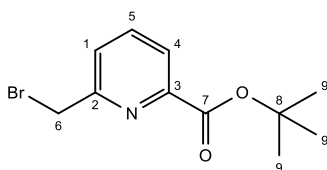
HRMS ESI-TOF: calculated for C₁₁H₁₆NO₂⁺ [M + H]⁺ 194.1176; found 194.1175 [M + H]⁺, 138.0551 [M – *t*-Bu]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-1 or H-4), 7.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.22 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1 or H-4), 2.58 (s, 3H, H-6), 1.56 (s, 9H, H-9)

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ 164.28 (C-7), 159.05 (C-2 or C-3), 148.83 (C-2 or C-3), 136.98 (C-5), 126.34 (C-1 or C-4), 121.95 (C-1 or C-4), 82.08 (C-8), 28.16 (C-9), 24.64 (C-6)

In accordance with: E. W. Price, *et al. Dalton Trans.*, **2014**, 43, 7176–7190,
DOI: 10.1039/c4dt00239c

Tert-butyl 6-bromomethylpicolinate 59



Experimental procedure

Tert butyl 6-methylpicolinate **61** (1.9 g, 9.83 mmol) was dissolved in dry CCl_4 (50 mL), followed by addition of *N*-bromosuccinimide (10.5 g, 59 mmol, 6 eq) and benzoyl peroxide (~10 wt%) in three portions every 2 h and was stirred overnight at reflux. The reaction mixture was cooled to room temperature, filtered through a fritted glass filter, concentrated to dryness under reduced pressure, reprecipitated in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$, again filtered through a fritted glass filter and reduced to dryness. The crude product was dissolved in EtOAc (50 mL) and washed with NaHCO_3 (2 x 40 mL), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (2 x 40 mL) and NaCl (1 x 40 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to dryness. To a cooled (0°C) solution of the residue in anhydrous THF (25 mL) were added diethylphosphite (5.3 mL, 40.5 mmol, 4.1 eq) and diisopropylethylamine (7 mL, 40.5 mmol, 4.1 eq). The mixture was stirred at room temperature for 4 h and hydrolyzed with water (50 mL). The solvent was evaporated and the residue was extracted with diethyl ether (3 x 60 mL). The combined organic layers were washed with brine (1 x 50 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to dryness. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (PE/EtOAc, 100% to 80%) to yield product **59** as a pale-yellow solid (1.2 g, 6.32 mmol, 64%).

R_f (PE/ EtOAc, 7/3, v/v): 0.5

Aspect: pale-yellow solid

m.p. : 90°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrNO}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 272.0281 ; found 272.0279 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 294.0097 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 215.9652 $[\text{M} - t\text{-Bu}]^+$

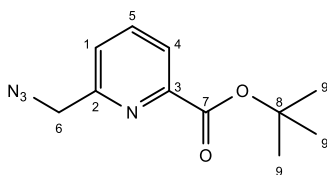
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.92 (d, $J = 7.8$ Hz, H-1 or H-4), 7.81 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5), 7.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1 or H-4), 4.64 (s, 2H, CH_2), 1.63 (s, 9H, *t*-Bu)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163.7 (C-7), 157.5 (C-2 or C-3), 149.1 (C-2 or C-3), 138.0 (C-5), 126.6 (C-1 or C-4), 124.0 (C-1 or C-4), 82.6 (C-8), 33.5 (C-6), 28.2 (3C, C-9)

HPLC: method **3**, *t_R* = 6.6 min

In accordance with: E. W. Price, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8670–8683,
DOI: 10.1021/ja3024725

Tert-butyl 6-azidomethylpicolinate 62



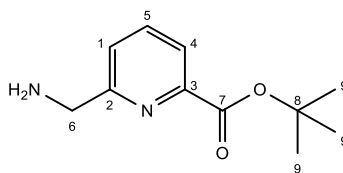
Experimental procedure

To a solution of *tert*-butyl 6-bromomethylpicolinate **59** (500 mg, 1.84 mmol) in dry DMF (7.5 mL) was added NaN₃ (99% purity, 146 mg, 2.25 mmol, 1.22 eq) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. DMF was removed under reduced pressure and CH₂Cl₂ (5 mL) was added. Undissolved salts were filtered off and the CH₂Cl₂ was evaporated to yield azide **62** (416 mg, 1.78 mmol, 96%).

HRMS ESI-TOF: calculated for C₁₁H₁₅N₄O₂⁺ [M + H]⁺ 235.1190 ; found 235.1189 [M + H]⁺, 257.1008 [M + Na]⁺, 179.0563 [M – *t*-Bu]⁺

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-1 or H-4), 7.80 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.48 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-1 or H-4), 4.57 (s, 2H, H-6), 1.59 (s, 9H, H-9)

Tert-butyl 6-aminomethylpicolinate 55



Experimental procedure

To a solution of the azide **62** (410 mg, 1.75 mmol) in dry THF (6 mL) was added a polymer-bound triphenylphosphine (≈ 3 mmol/g, 592 mg, 1.75 mmol, 1 eq) under argon atmosphere. The reaction mixture was slowly stirred at room temperature for 5 h. H₂O (0.6 mL) was added and the medium was refluxed overnight. The resin was filtrated and washed with EtOAc. The solvent was then evaporated and the residue was dissolved in EtOAc, and extracted with HCl 1N (3 x 30 mL). The aqueous layer was neutralized with NaHCO₃ (≈ 200 mL) and finally, the amine was extracted with EtOAc (3 x 40 mL). The combined organics layers were dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure to afford the pure amine **55** as a white solid (250 mg, 1.2 mmol, 68%).

Aspect: white solid

HRMS ESI-TOF: calculated for C₁₁H₁₇N₂O₂⁺ [M + H]⁺ 209.1238 ; found 209.1255 [M + H]⁺, 231.1354 [M + Na]⁺

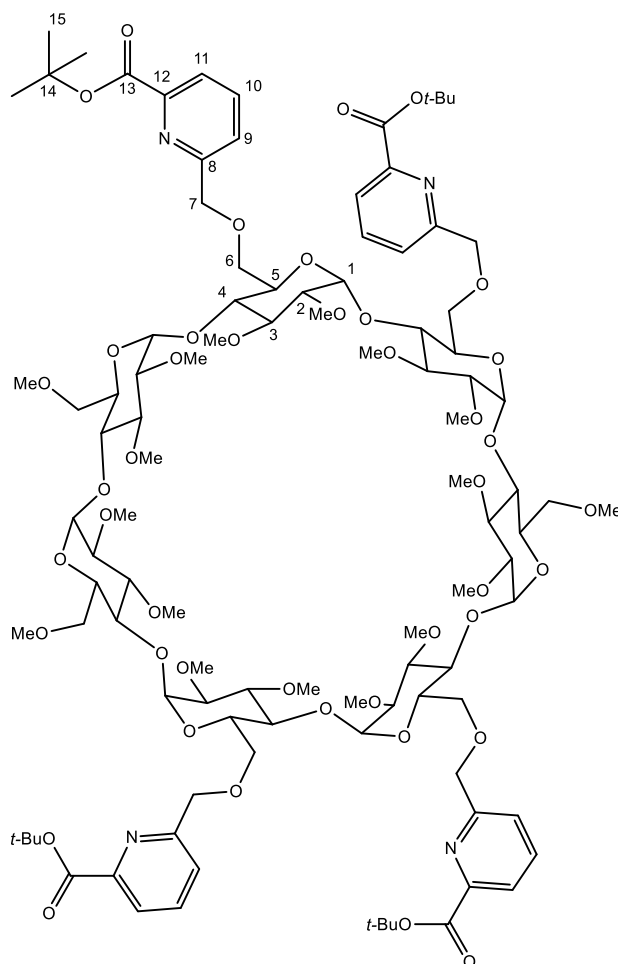
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-1 or H-4), 7.69 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.40 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-1 or H-4), 3.99 (s, 2H, H-6), 1.99 (s, 2H, NH₂), 1.56 (s, 9H, H-9)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 164.1 (C-7), 162.4 (C-2 or C-3), 148.8 (C-2 or C-3), 137.3 (C-5), 124.2 (C-1 or C-4), 122.9 (C-1 or C-4), 82.0 (C-8), 47.7 (C-6), 28.1 (3C, C-9)

6A,6B,6D,6E-Tetra-O-(6-*tert*-butylesterpyridin-1-yl)-

2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-heptadeca-O-methyl- β -cyclodextrin

63



Experimental procedure

Sodium hydride (95%, 750.4 mg, 29.7 mmol, 12 eq) was added to a solution of tetrol **46** (3.4 g, 2.5 mmol) in THF (110 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. *Tert*-butyl-6-bromomethylpicolinate **59** (8.1 g, 29.7 mmol, 12 eq) was then added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 additional days. Water (100 mL) was added dropwise to quench the reaction. After removal of the THF under reduced pressure, the residue was extracted with EtOAc (3 x 150 mL), and the combined organic layers were washed with a saturated NaCl solution (100 mL) and then dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was pre-purified by chromatography on silica gel (toluene/acetone, 90% to 50%). Thereafter, a final purification from the obtained sample was performed by semi-preparative HPLC (acetonitrile/water, following the conditions

described in the materials and methods section) to get the pure tetra-ester **63**. After freeze drying, the pure white product was obtained (212 mg, 99.1 μmol , 4%).

Rf (toluene/acetone, 55/45, v/v): 0.4

Aspect: white powder

m.p.: > 200°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{103}\text{H}_{159}\text{N}_4\text{O}_{43}^{3+}$ $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 713.7961 ; found 713.3453 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$, 1069.5144 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, 2160.0035 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

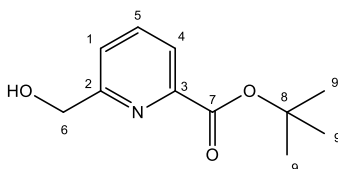
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 7.88 - 7.63 (m, 12H, H-9, H-10, H-11), 5.19 - 5.12 (m, 7H, H-1), 4.80 - 4.75 (m, 8H, H-7), 4.20 - 4.08 (m, 4H, H-6), 3.88 - 3.15 (m, 31H, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.67 (s, 9H, -OMe), 3.65 (s, 6H, -OMe), 3.63 (s, 3H, -OMe), 3.62 (s, 3H, -OMe), 3.62 (s, 3H, -OMe), 3.52 (s, 9H, -OMe), 3.50 (s, 3H, -OMe), 3.49 (s, 3H, -OMe), 3.48 (s, 6H, -OMe), 3.47 (s, 3H, -OMe), 3.46 (s, 3H, -OMe), 3.21 - 3.13 (m, 7H, H-2), 1.61 (s, 36H, *t*-Bu)

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 164.10 (2C, C-13), 164.07 (2C, C-13), 159.45 (2C, C-8 or C-12), 159.39 (2C, C-8 or C-12), 148.71 (2C, C-8 or C-12), 148.67 (2C, C-8 or C-12), 137.6 (2C, C-10), 137.4 (2C, C-10), 123.84 (2C, C-9 or C-11), 123.77 (2C, C-9 or C-11), 123.4 (4C, C-9 or C-11), 99.1 (7C, C-1), [82.32, 82.23, 82.20, 82.16, 82.14, 82.08, 81.99, 81.94, 81.88, 80.7, 80.5, 80.3, 80.2, 79.9, 79.7 (25C, C-2, C-3, C-4, C-14)], 77.4, 74.1 (2C, C-7), 73.9 (2C, C-7), 71.6 (3C, C-6), [71.5 (3C), 71.3, 71.2, 71.1, 71.0 (7C, C-5)], 69.9 (4C, C-6), [61.7, 61.7, 61.6 (2C), 61.5, 61.4, 61.3, 59.3 (2C), 59.2, 58.93, 58.86, 58.83, 58.7, 58.64, 58.63, 58.56 (17C, OMe)], 28.2 (12C, C-15, *t*-Bu)

HPLC: method **2**, DEDL: t_R = 32.8 min

By-products

Tert-butyl 6-(hydroxymethyl)picolinate DP10



Aspect: white solid

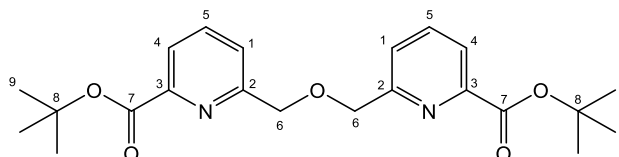
HRMS ESI-TOF: calculated for $C_{11}H_{16}NO_3^+$ $[M + H]^+$ 210.1125 ; found 210.1123 $[M + H]^+$, 232.0944

$[M + Na]^+$, 154.0500 $[M - tBu]^+$, 176.0319 $[M - tBu + Na]^+$

1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ 7.96 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5), 7.84 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-1 or H-4), 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-1 or H-4), 5.52 (bs, 1H, OH), 4.60 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H, H-6), 1.55 (s, 9H, H-9)

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO) δ 163.78 (C-7), 162.30 (C-2 or C-3), 147.86 (C-2 or C-3), 137.69 (C-5), 123.31 (C-1 or C-4), 122.62 (C-1 or C-4), 81.22 (C-8), 64.03 (C-6), 27.70 (3C, C-9)

***tert*-butyl 6-(((6-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl)methoxy)methyl)picolinate DP6**



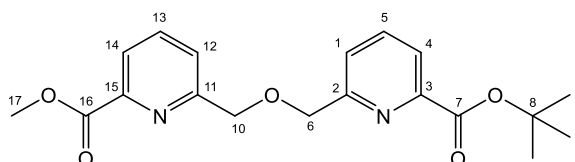
Aspect: white solid

HRMS ESI-TOF: calculated for $C_{22}H_{29}N_2O_5^+$ $[M + H]^+$ 401.2071 ; found 401.2069 $[M + H]^+$, 423.1889 $[M + Na]^+$, 289.0819 $[M - 2tBu]^+$

1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-5), 7.91 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, H-1 or H-4), 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-1 or H-4), 4.78 (s, 4H, H-6), 1.56 (s, 18H, H-9)

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO) δ 163.63(2C, C-7), 158.25 (2C, C-2 or C-3), 148.26 (2C, C-2 or C-3), 138.05 (2C, C-5), 124.39 (2C, C-1 or C-4), 123.33 (2C, C-1 or C-4), 81.38 (2C, C-8), 72.74 (2C, C-6), 27.69 (6C, C-9)

***di-tert*-butyl 6,6'-(oxybis(methylene))dipicolinate DP9**



Aspect: white solid

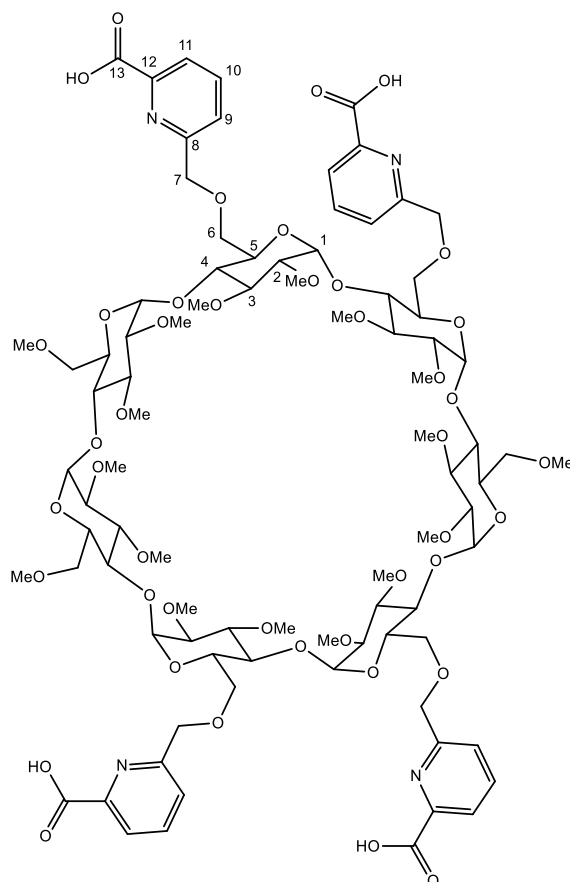
HRMS ESI-TOF: calculated for $C_{22}H_{29}N_2O_5^+$ $[M + H]^+$ 401.2071 ; found 401.2069 $[M + H]^+$, 423.1889 $[M + Na]^+$, 289.0819 $[M - 2tBu]^+$

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ 8.08 – 7.88 (m, 4H, H-5 and H-1 or H-4; H-13 and H-12 or H-14), 7.83 – 7.71 (m, 2H, H-1 or H-4 and H-12 or H-14), 4.79 (s, 2H, H-6 or H-10), 4.78 (s, 2H, H-6 or H-10), 3.88 (s, 3H, H-17), 1.55 (s, 9H, H-9)

¹³C NMR (63 MHz, DMSO) δ 164.3 (C-7 or C-16), 162.8 (C-7 or C-16), 157.6 (C-2 or C-3 or C-11 or C-15), 157.4 (C-2 or C-3 or C-11 or C-15), 147.4 (C-2 or C-3 or C-11 or C-15), 146.0 (C-2 or C-3 or C-11 or C-15), 137.4 (C-5 or C-13), 137.3 (C-5 or C-13), 124.1 (C-1 or C-4 and C-12 or C-14), 123.6 (C-1 or C-4 and C-12 or C-14), 122.86 (C-1 or C-4 and C-12 or C-14), 122.5 (C-1 or C-4 and C-12 or C-14), 80.6 (C-8), 71.9 (2C, C-6, C-10), 51.6 (C-17), 26.9 (3C, C-9)

6A,6B,6D,6E-Tetra-O-picolinic acid-2A,2B,2C,2D,2E,2F,2G,3A,3B,3C,3D,3E,3F,3G,6C,6F,6G-

heptadeca-O-methyl- β -cyclodextrin L β



Experimental procedure

The pure tetra ester **63** (100 mg, 46.8 μmol) was dissolved in a solution of formic acid in CH_2Cl_2 (17 mL, 10% v/v) and was stirred 3 days at 50°C. The solvent was removed under reduced pressure and the residual formic acid was co-evaporated three times with 15 mL of CH_2Cl_2 . After freeze drying, the pure fluffy white solid **L β** was obtained without further purification (84 mg, 43.9 μmol , 94 %).

Aspect: fluffy white solid

m.p.: 119°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{87}\text{H}_{125}\text{N}_4\text{O}_{43}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1913.7712 ; found 1913.7602 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 957.3892 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

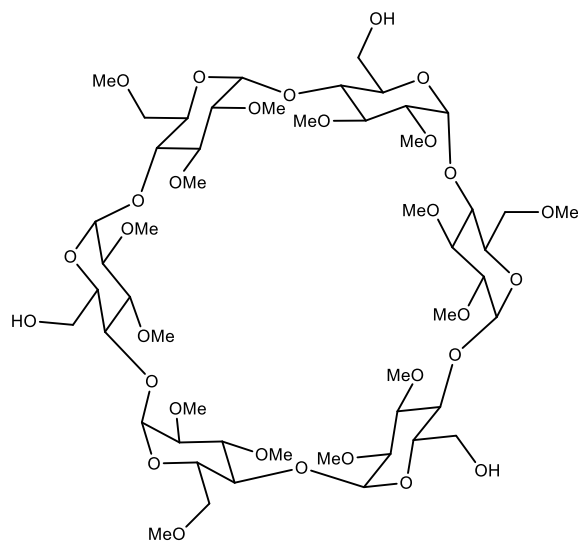
^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 8.04 (d, J = 7.6 Hz, 4H, H-9 or H-11), 7.91 – 7.82 (m, 4H, H-10), 7.68 – 7.59 (m, 4H, H-9 or H-11), 5.18 – 5.05 (m, 7H, H-1), 4.69 (d, J = 10.0 Hz, 8H, H-7), 4.22 –

4.01 (m, 4H, H-6), 3.99 – 3.42 (m, 21H, H-3, H-4, H-5), [3.67, 3.65, 3.63, 3.53, 3.51, 3.50, 3.49 (51H, OMe)], 3.27 (d, $J = 2.7$ Hz, 3H, H-6), 3.19 (p, $J = 4.3, 3.9$ Hz, 7H, H-2)

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 164.9 (4C, C-13), [157.9, 146.0, 139.2 (8C, C-8 or C-12)], 125.7 (4C, C-9 or C-11), 125.6 (4C, C-9 or C-11), 123.1 (4C, C-10), 99.5 - 99.1 (7C, C-1), [82.1, 81.9, 80.9, 80.6, 80.4, 80.3 (21C, C-2, C-3, C-4)], 77.4, 73.0 (2C, C-7), 72.8 (2C, C-7), 71.6 (3C, C-6), 71.3 - 71.1 (7C, C-5), 70.2 (4C, C-6), [61.7, 61.6, 61.6, 61.5, 61.4, 59.2, 59.1, 58.9, 58.8, 58.8, 53.6 (17C, OMe)]

Triol 47

2A,2B,2C,2D,2E,2F,3A,3B,3C,3D,3E,3F,6B,6D,6F-pentadeca-O-methyl- α -cyclodextrin



Experimental procedure

1. Protection of the four A, C, E positions

To a turbid solution of dry α -cyclodextrin (20 g, 20.56 mmol), dissolved by heating at 60°C, in fresh distilled pyridine (500 mL) was added trityl chloride (26.6 g, 92.5 mmol, 4.5 eq) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 70°C overnight and cooled down to room temperature before being poured onto a mixture of ice/water. The precipitate was filtrated, washed with fresh water and dissolved twice in toluene to remove the residual pyridine. The crude was dried under reduced pressure at 50°C overnight under P_2O_5 . The solid was used in the following step without further purification.

2. Per-methylation

The pale pink tritylated compound was dissolved in dry DMF (900 mL) and NaH (50 g, 1.23 mol, 60 eq) was added carefully under argon atmosphere over 20 min. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and then cooled at 0°C before a dropwise addition of MeI (60 mL, 925 mmol, 45 eq). The suspension was stirred overnight at room temperature. MeOH (150 mL) was then slowly added to quench excess NaH. The solvent was evaporated under reduce pressure and the crude product was dissolved in Et₂O (300 mL) before being washed with water (3 x 150 mL) and brine (2 x 150 mL). The etherated layer was dried with MgSO₄ and evaporated to dryness. The crude was purified by flash column chromatography

(Et₂O/Hept, 70% to 100%) to give the product **64** as a colorless solid (15.8 g, 20.6 mmol, 40%, R_f (Et₂O/Hept, 6/4, v/v) = 0.6).

3. Deprotection of the four A, C, E positions: access to the Triol **47**

The protected α -cyclodextrin **64** (15.8 g) was dissolved in a CH₂Cl₂/MeOH (215 mL/145 mL) mixture at room temperature. Trifluoroacetic acid (146 mL, 1.9 mol, 235 eq) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 2 h. NaHCO₃ was added until neutral pH and the triol **47** was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 150 mL). The combined organic layers were dried under MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100% to 90%) to give triol **47** as a colorless solid (4.3 g, 3.65 mmol, 17% yield over 3 steps).

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, v/v): 0.2

Aspect: colorless solid

m.p.: 125°C

HRMS ESI-TOF: calculated for C₅₁H₉₁O₃₀⁺ [M + H]⁺ 1183.5590 ; found 1183.5580 [M + H]⁺, 1205.5399 [M + Na]⁺, 611.2570 [M + Ca]²⁺

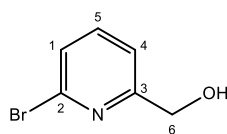
¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 5.03 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H, H-1), 4.97 (d, *J* = 3.3 Hz, 3H, H-1), 3.97 - 3.25 (m, 33H, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.50 (s, 9H, OMe), 3.48 (s, 9H, OMe), 3.38 (s, 9H, OMe), 3.36 (s, 9H, OMe), 3.21 (s, 9H, OMe), 3.00 (m, 6H, H-2)

¹³C NMR (63 MHz, DMSO): δ (assignment made by analogy with *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 7630–7631) 99.0 (3C, C-1), 97.9 (3C, C-1), [81.7, 81.49, 81.43, 81.24, 81.0, 72.1, 71.0 (3C, C-6), 70.0 (24C, C-2, C-3, C-4, C-5)], 61.0 (3C, OMe-2 or OMe-3), 60.9 (3C, OMe-2 or OMe-3), 59.9 (3C, C-6), 57.9 (3C, OMe-6), 57.4 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.1 (3C, OMe-2 or OMe-3)

HPLC: method **2**, DEDL: t_R = 7.4 min

In accordance with: J. Boger, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 7630–7631,
DOI: 10.1021/ja00519a035

6-bromopyridin-2-ylmethanol 66



Experimental procedure

To a cooled mixture of dry THF (25 mL) and *n*-BuLi in hexane (2.3 M, 18.35 mL, 42.2 mmol, 1 eq), a solution of 2,6-dibromopyridine (10 g, 42.2 mmol) in dry THF (60 mL) was added dropwise under an argon atmosphere, during 30 min. The resulting reaction mixture was left stirring for 20 min and dried DMF (5.1 mL, 65.4 mmol, 1.5 eq) was added. The reaction solution was further stirred at -78°C for 15 min, followed by addition of acetic acid (2.7 mL) in methanol (43 mL). Afterwards, NaBH₄ (1.6 g, 42.2 mmol, 1 eq) was introduced in several portions. The cooling bath was removed and the reaction mixture was warmed up to room temperature for 3 h. Thereafter, the reaction mixture was carefully quenched with saturated NH₄Cl (130 mL), then extracted with AcOEt (3 x 150 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting yellow oil was purified by flash-chromatography on silica gel (PE/EtOAc, 7:3) to afford the primary alcohol **66** as a pale-yellow oil (6.7 g, 35.63 mmol, 84%).

R_f (PE/ EtOAc, 7/3, v/v): 0.3

Aspect: pale-yellow oil

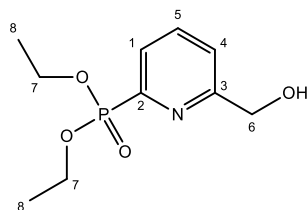
HRMS ESI-TOF: calculated for C₆H₇BrNO⁺ [M + H]⁺ 187.9706 ; found 187.9706 [M + H]⁺, 209.9527 [M + Na]⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, pyr), 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, pyr), 7.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, pyr), 4.75 (s, 2H, CH₂), 3.09 (bs, 1H, OH)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 161.4 (C-2), 141.5 (C-3), 139.2 (C-5), 126.8 (C-1 or C-4), 119.4 (C-1 or C-4), 64.3 (C-6)

In accordance with: N. Maindron, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 2357–2370, DOI: 10.1039/C0OB00832J

Diethyl 6-hydroxymethylpyridin-2-ylphosphonate **68**



Experimental procedure

To a solution of 6-bromopyridin-2-ylmethanol **66** (3.45 g, 18.35 mmol) in dry and degassed acetonitrile (110 mL), diethylphosphite (98% purity, 3.6 mL, 27.52 mmol, 1.5 eq), diisopropylethylamine (99% purity, 16.15 mL, 91.74 mmol, 5 eq), triphenylphosphine (4.8 g, 18.35 mmol, 1 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (1.1 g, 0.92 mmol, 0.05 eq) were added under inert atmosphere. The reaction was heat at 80°C for 65 h. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash-chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100% to 95%) to afford the pure phosphonate **68** as a colorless oil (3.6 g, 14.68 mmol, 80%). A precipitation using CH₂Cl₂/Et₂O was used to remove a residual by-product, visualized by ninhydrin staining of TLC plates.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 96/4, v/v): 0.4

Aspect: colourless oil

HRMS ESI-TOF: calculated for C₁₀H₁₇NO₄P⁺ [M + H]⁺ 246.0890 ; found 246.0889 [M + H]⁺, 268.0708 [M + Na]⁺

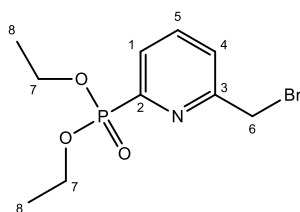
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (m, 2H, H-5 and H-1 or H-4), 7.45 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-1 or H-4), 4.80 (s, 2H, H-6), 4.32 – 4.09 (m, 4H, H-7), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-8)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 160.9 (d, *J* = 21.2 Hz, C-2 or C-3), 150.6 (d, *J* = 226.7 Hz, C-2 or C-3), 136.8 (d, *J* = 12.3 Hz, C-5 or C-1 or C-4), 126.7 (d, *J* = 24.7 Hz, C-5 or C-1 or C-4), 123.1 (d, *J* = 3.9 Hz, C-1 or C-4), 64.4 (C-6), 63.2 (d, *J* = 6.0 Hz, 2C, C-7), 16.4 (d, *J* = 6.2 Hz, 2C, C-8)

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ 10.6

LC-MS: UV (254 nm): t_R = 4.9 min, LRMS: m/z = 245.96 [M + H]⁺, 190.00 [M – 2Et]⁺

Diethyl 6-bromomethylpyridin-2-ylphosphonate 69



Experimental procedure

To a cold solution (0°C) of diethyl 6-hydroxymethylpyridin-2-ylphosphonate **68** (2.3 g, 9.38 mmol) in CHCl₃ (40 mL) was slowly added phosphorus tribromide (99% purity, 1 mL, 10.6 mmol, 1.1 eq). The reaction mixture was warmed up to room temperature, stirred for 4 h and quenched by NaHCO₃ (15 mL). The aqueous layer was extracted with CHCl₃ (3 x 50 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulted pink oil was purified by flash-chromatography on silica gel (EtOAc, 100%) to afford the bromophosphonate **69** as a pale-pink oil (2.3 g, 7.46 mmol, 79%).

Rf (CH₂Cl₂/MeOH, 96/4, v/v): 0.6

Aspect: pale-pink oil

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.90 – 7.73 (m, 2H, H-1, H-5), 7.58 (dd, *J* = 7.6, 2.2 Hz, 1H, H-4), 4.59 (s, 2H, H-6), 4.34 – 4.13 (m, 4H, H-7), 1.35 (t, *J* = 7.1, 6H, H-8)

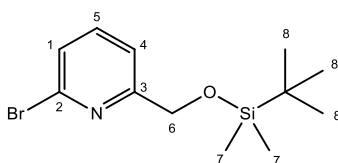
¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 158.0 (d, *J* = 23.0 Hz, C-2 or C-3), 152.0 (d, *J* = 226.5 Hz, C-2 or C-3), 137.2 (d, *J* = 12.3 Hz, C-5 or C-1 or C-4), 127.3 (d, *J* = 24.7 Hz, C-5 or C-1 or C-4), 126.0 (d, *J* = 3.8 Hz, C-5 or C-1 or C-4), 63.3 (d, *J* = 6.0 Hz, 2C, C-7), 33.3 (d, *J* = 0.8 Hz, C-6), 16.5 (d, *J* = 6.1 Hz, 2C, C-8)

³¹P NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 9.9

HPLC: method **2**, UV (254 nm): *t_R* = 5.1 min

LC-MS: UV (254 nm): *t_R* = 7.0 min, LRMS: *m/z* = 265,75 [M - Et]⁺, 253,75 [M - 2Et]⁺

6-Bromo-2-*tert*-butyldimethylsilyloxymethylpyridine 67



Experimental procedure

To a stirred solution of 6-bromopyridin-2-ylmethanol **66** (70 mg, 0.37 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) at 0°C was added imidazole (30.41 mg, 0.45 mmol, 1.2 eq), followed by *tert*-butyldimethylsilyl chloride (97% purity, 68.7 mg, 0.44 mmol, 1.2 eq). The reaction mixture was warmed to 25°C and stirred for 30 min. The reaction mixture was diluted in H₂O (2 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The obtained residue was purified by flash column chromatography (PE/EtOAc, 100% to 80%) to afford the protected alcohol **67** as a colorless oil (98 mg, 0.32 mmol, 87%).

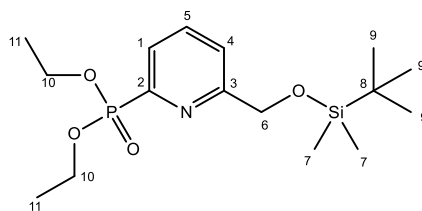
R_f (PE/ EtOAc, 9/1, v/v): 0.8

Aspect: colorless oil

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.53 (m, 2H, H-5 and H-1 or H-4), 7.35 (m, 1H, H-5 and H-1 or H-4), 7.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-5 and H-1 or H-4), 4.80 (s, 2H, H-6), 0.96 (s, 9H, H-8), 0.13 (s, 6H, H-7)

In accordance with: K. C. Nicolaou, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1698–1708,
DOI: 10.1021/jacs.5b12557

Diethyl 6-*tert*-butyldimethylsilyloxymethylpyridin-2-ylphosphonate 70



Experimental procedure

To a solution of 2-bromo-6-*tert*-butyldimethylsilyloxymethylpyridine **67** (98 mg, 0.32 mmol) in dried and gas-free acetonitrile (3 mL), diethylphosphite (63 μ L, 0.48 mmol, 1.5 eq), diisopropylethylamine (285 μ L, 1.62 mmol, 5 eq), triphenylphosphine (85 mg, 0.32 mmol, 1 eq) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (18.73 mg, 0.016 mmol, 0.05 eq) were added under inert atmosphere. The reaction was heat at 80°C overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100% to 95%) to afford the pure phosphonate **70** as a colourless oil (71 mg, 0.2 mmol, 60%).

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 96/4, v/v): 0.6

Aspect: colourless oil

HRMS ESI-TOF: calculated for C₁₆H₃₁NO₄PSi⁺ [M + H]⁺ 360.1754 ; found 360.1753 [M + H]⁺, 382.1573 [M + Na]⁺

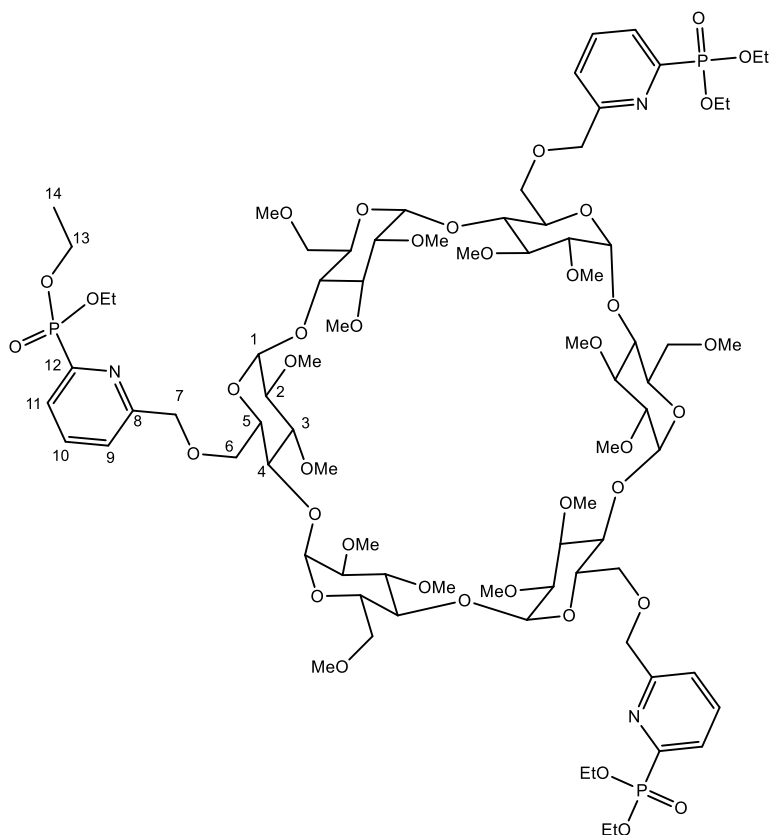
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 7.81 – 7.75 (m, 2H, H-5 and H-1 or H-4), 7.67 – 7.58 (m, 1H, H-5 and H-1 or H-4), 4.86 (s, 2H, H-6), 4.19 (m, 4H, H-10), 1.31 (td, *J* = 7.1 Hz, 9H, H-11), 0.92 (s, 9H, H-9), 0.09 (s, 6H, H-7)

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 161.2 (d, *J* = 21.3 Hz, C-2 or C-3), 150.4 (d, *J* = 227.0 Hz, C-2 or C-3), 136.7 (d, *J* = 12.3 Hz, C-5 or C-1 or C -4), 126.61 (d, *J* = 24.8 Hz, C-5 or C-1 or C -4), 123.15 (d, *J* = 3.9 Hz, C-5 or C-1 or C -4), 64.41 (C-6), 63.13 (d, *J* = 6.0 Hz, 2C, C-10), 25.74 (3C, C-9), 18.05 (C-8), 16.37 (d, *J* = 6.2 Hz, 2C, C-11), -3.5 (2C, C-7)

³¹P NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 11.17

6A,6C,6E-tri-O-(6-diethylphosphonatepyridin-1-yl)-

2A,2B,2C,2D,2E,2F,3A,3B,3C,3D,3E,3F,6B,6D,6F-pentadeca-O-methyl- α -cyclodextrin 73



Experimental procedure

Sodium hydride (60% in oil, 152 mg, 3.8 mmol, 9 eq) was added to a solution of dry triol **47** (500 mg, 0.42 mmol) in THF (6 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Diethyl 6-bromomethylpyridin-2-ylphosphonate **69** (1.17 g, 3.8 mmol, 9 eq) was then added and the reaction mixture was stirred at 50°C for 30 h. Water (10 mL) was added dropwise to quench the reaction. The mixture was extracted with EtOAc (3 x 20 mL), and the combined organic layers were dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was pre-purified by chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100% to 92%). Thereafter, a final purification from the obtained sample was performed by semi-preparative HPLC (acetonitrile/water, following the conditions described in the materials and methods section) to get the pure tri-phosphonate **73**. After freeze drying, the pure white fluffy product was obtained (185 mg, 0.1 mmol, 23 %).

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95/5, v/v): 0.5

Aspect: white fluffy solid

m.p.: 103°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $C_{81}H_{133}N_3O_{39}P_3^+$ $[M + H]^+$ 1864.7724 ; found 1864.7697 $[M + H]^+$, 932.8907 $[M + 2H]^{2+}$, 622.2635 $[M + 3H]^{3+}$

1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ 7.94 (q, J = 6.8 Hz, 3H, H-11), 7.75 (t, J = 6.7 Hz, 3H, H-10), 7.60 (d, J = 7.4 Hz, 3H, H-9), 5.02 (s, 6H, H-1), 4.62 (s, 6H, H-7), 4.09 (m, 12H, H-13), 3.9 - 2.9 (m, 36H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.50 (s, 9H, OMe), 3.49 (s, 9H, OMe), 3.38 (s, 18H, OMe), 3.32 (s, 9H, OMe), 1.22 (t, J = 6.8 Hz, 18H, H-14)

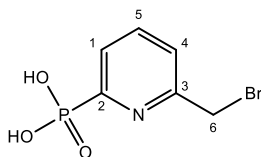
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO): δ 159.5 (d, J = 22.2 Hz, 3C, C-8 or C-12), 150.9 (d, J = 224.7 Hz, 3C, C-8 or C-12), 137.2 (d, J = 12.0 Hz, 3C, C-10), 126.2 (d, J = 25.4 Hz, 3C, C-9 or C-11), 123.6 (d, J = 4.1 Hz, 3C, C-9 or C-11), 99.0 (3C, C-1), 98.8 (3C, C-1), [81.9, 81.6, 81.0, 70.6, 70.4 (24C, C-2, C-3, C-4, C-5)], 73.1 (3C, C-7), 71.2 (3C, C-6), 69.3 (3C, C-6), 62.4 (d, J = 6.1 Hz, 6C, C-13), 61.0 (3C, OMe-2 or OMe-3), 60.9 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.9 (3C, OMe-6), 57.2 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.1 (3C, OMe-2 or OMe-3), 16.1 (d, J = 5.8 Hz, 6C, C-14)

^{31}P NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 10.1

HPLC: method 2, DEDL: t_R = 19.3 min

LC-MS: UV (254nm): t_R = 11.9 min, LRMS: m/z = 1865.94 $[M + H]^+$

6-Bromomethylpyridin-2-ylphosphonic acid 74



Experimental procedure

To a solution of the phosphonate **69** (250 mg, 0.8 mmol) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was added trimethylsilyl bromide (0.55 mL, 4.1 mmol, 5 eq). The reaction mixture was heated to 50°C for 20 h before being quenched by methanol (4 mL). The solvent was evaporated, and the obtained orange oil was purified by 3 co-evaporations with methanol until the apparition of a white solid. Finally, the solid was filtrated and washed again with methanol to yield the pure product **74** as a white solid (180 mg, 0.71 mmol, 88%).

Aspect: white solid

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_6\text{H}_8\text{BrNO}_3\text{P}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 251.9420 ; found 251.9420 $[\text{M} + \text{H}]^+$

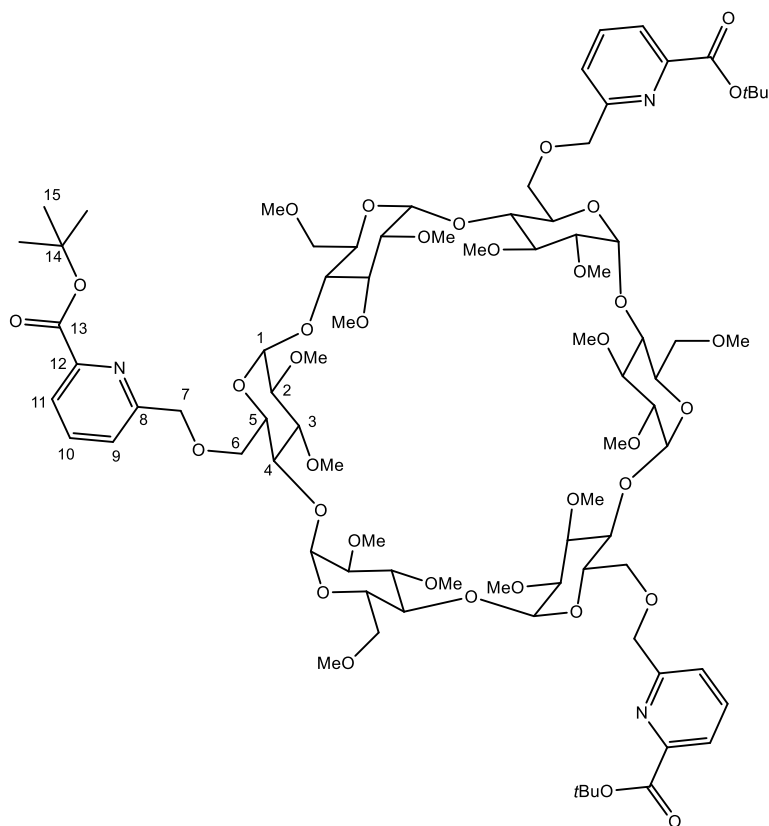
^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.95-7.87 (m, 1H, H-5 and H-1 or H-4), 7.78 – 7.61 (m, 2H, H-5 and H-1 or H-4), 4.73 (s, 2H, H-6)

^{31}P NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6.0

LC-MS: UV (254 nm): t_R = 0.88 min, LRMS: m/z = 253.74 $[\text{M} + \text{H}]^+$

6A,6C,6E-Tri-O-(6-tert-butylesterpyridin-1-yl)-

2A,2B,2C,2D,2E,2F,3A,3B,3C,3D,3E,3F,6B,6D,6F-pentadeca-O-methyl- α -cyclodextrin 75



Experimental procedure

Sodium hydride (95%, 19.2 mg, 760 μmol , 9 eq) was added to a solution of dry triol **47** (100 mg, 84.5 μmol) in dry THF (2 mL) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. *Tert*-butyl 6-bromomethylpicolinate **59** (207 mg, 760 μmol , 9 eq) was then added and the reaction mixture was stirred at 50°C for 5 days. Water (3 mL) was added to quench the reaction. The tri-substituted compound was extracted with EtOAc (3 x 20 mL), and the combined organic layers were dried over MgSO_4 . The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was pre-purified by chromatography on silica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 100% to 97%). Thereafter, a final purification from the obtained sample was performed by semi-preparative HPLC (acetonitrile/water, following the conditions described in the materials and methods section) to get the pure tri-ester **75**. After freeze drying, the pure white fluffy product was obtained (34 mg, 19.4 μmol , 22 %).

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95/5, v/v): 0.5

Aspect: white fluffy solid

m.p.: 109°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $C_{84}H_{130}N_3O_{36}^+$ $[M + H]^+$ 1756.8429 ; found 1756.8405 $[M + H]^+$, 878.9255 $[M + 2H]^{2+}$, 586.2860 $[M + 3H]^{3+}$

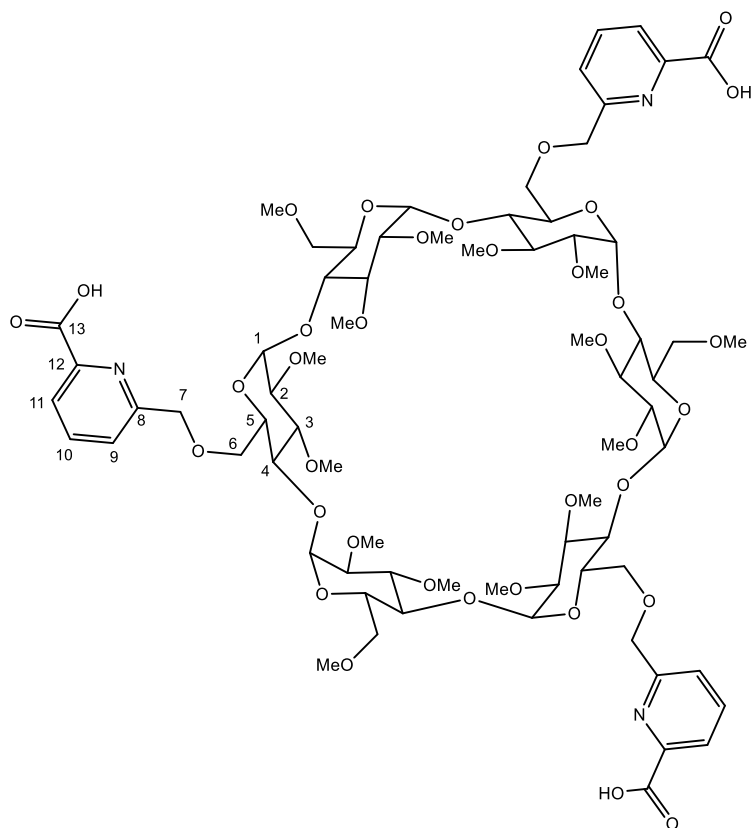
1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ 7.85 (m, 6H, H-9 and/or H-10 and/or H-11), 7.57 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-9 or H-11), 5.01 (s, 6H, H-1), 4.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 6H, H-7), 4.1 - 2.8 (m, 36H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.45 (s, 9H, OMe), 3.44 (s, 9H, OMe), 3.36 – 3.30 (m, 27H, OMe), 1.51 (s, 27H, H-15).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO): δ 163.6 (3C, C-13), 158.8 (3C, C-8 or C-12), 148.2 (3C, C-8 or C-12), 137.8 (3C, C-10), 124.0 (3C, C-9 or C-11), 123.1 (3C, C-9 or C-11), 98.9 (3C, C-1), 98.8 (3C, C-1), [81.8, 81.7, 81.5, 81.1, 70.6, 70.4 (24C, C-2, C-3, C-4, C-5)], 81.3 (3C, C-14), 73.0 (3C, C-7), 71.1 (3C, C-6), 69.4 (3C, C-6), 61.1 (3C, OMe-2 or OMe-3), 61.0 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.9 (3C, OMe-6), 57.2 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.2 (3C, OMe-2 or OMe-3), 27.7 (9C, C-15)

HPLC: method 2, DEDL: $t_R = 30.5$ min

LC-MS: UV (254nm): $t_R = 11.9$ min, LRMS: $m/z = 1865.94$ $[M + H]^+$

6A,6C,6E-tri-O-picolinic acid-2A,2B,2C,2D,2E,2F,3A,3B,3C,3D,3E,3F,6B,6D,6F-pentadeca-O-methyl- α -cyclodextrin **L_a**



Experimental procedure

The pure tri ester **75** (23 mg, 13.1 μ mol) was dissolved in a solution of formic acid in CH_2Cl_2 (5.5 mL, 22% v/v) and the mixture was stirred 3 days at 50°C. The solvent was removed under reduced pressure and the residual formic acid was co-evaporated twice with 10 mL of CH_2Cl_2 . The crude was purified by C18 flash chromatography ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95% to 50%). After freeze drying, the pure fluffy white solid **L_a** was obtained (14 mg, 8.8 μ mol, 65%).

R_f (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 5/5, v/v): 0.4

Aspect: white fluffy solid

m.p.: 119°C

HRMS ESI-TOF: calculated for $\text{C}_{72}\text{H}_{106}\text{N}_3\text{O}_{36}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1588.6550 ; found 1588.6545 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 794.8322 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.98 – 7.86 (m, 6H, H-9 and/or H-10 and/or H-11), 7.65 – 7.55 (m, 3H, H-9 or H-11), 5.01 (m, 6H, H-1), 4.64 (m, 6H, H-7), 4.1 – 2.95 (m, 36H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.50 (s, 9H, OMe), 3.49 (s, 9H, OMe), 3.38 (s, 15H, OMe), 3.37 (s, 12H, OMe)

¹³C NMR (63 MHz, DMSO) δ 166.1 (3C, C-13), 158.6 (3C, C-8 or C-12), 147.9 (3C, C-8 or C-12), 137.9 (3C, C-10), 124.2 (3C, C-9 or C-11), 123.2 (3C, C-9 or C-11), 99.0 (3C, C-1), 98.7 (3C, C-1), [81.7, 81.6, 81.5, 81.1, 70.7, 70.3 (24C, C-2, C-3, C-4, C-5)], 73.0 (3C, C-7), 71.1 (3C, C-6), 69.4 (3C, C-6), 61.0 (3C, OMe-2 or OMe-3), 60.9 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.9 (3C, OMe-6), 57.3 (3C, OMe-2 or OMe-3), 57.1 (3C, OMe-2 or OMe-3)

HPLC: method **4**, DEDL: *t*_R = 9.4 min

LC-MS: UV (254nm): *t*_R = 11.4 min, LRMS: *m/z* = 1588.82 [M + H]⁺

Abstract

Magnetic Resonance Imaging is one of the most important and non-invasive tools for clinical diagnostics and biomedical researches. Nevertheless, this modality suffers from intrinsic low sensitivity. To overcome this limitation, contrast agents, mostly based on polyaminocarboxylate complexes of gadolinium are used.

The aim of this project was to design new Gd(III)-based contrast agents using β - and α -cyclodextrins (CD), known to generate high relaxivity, functionalized with pyridine-carboxylate and pyridine-phosphonate ligands, known for their good affinity with the lanthanide cations.

Here we first investigated the regio-functionalization of the β -CD on the primary face to access to scaffold called **L β** with four pyridine-carboxylate ligands. To develop an efficient and reproducible synthesis, HPLC analysis was implemented. Then, using these conditions, carboxylate- and phosphonate-ester, precursors to access α -CD ligands **L α** and **L α'** , were synthesized. The carboxylate-ester deprotection step successfully afforded the ligand noted **L α** contrary to the deprotection of phosphonate ester which still have to be explored. Characterizations of these complicated Gd-ligands systems (Gd-**L α** et Gd-**L β**) were reported. Their stability and relaxivity were measured and very good relaxivities were obtained ($25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1} < r_1 < 40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). These new structures open the way to an improvement in term of stability.

Key words : MRI, cyclodextrin, gadolinium, contrast product

Résumé

L'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique d'imagerie possédant une des plus hautes résolutions d'images, utilisée pour le diagnostic clinique et en recherche. Cependant cette technique souffre d'une faible sensibilité intrinsèque due au faible contraste naturel entre les différents tissus. Pour pallier à cette limitation, des agents de contraste, principalement des complexes de Gd(III), sont actuellement utilisés et continus d'être développés.

Ce projet de thèse s'inscrit dans la volonté de concevoir de nouveaux agents de contrastes plus efficaces et plus stables en utilisant la β - et l' α -cyclodextrines (CD) comme plateforme capables d'intégrer trois ou quatre fonctions pyridine-carboxylates ou pyridine-phosphonates, connues pour leur pouvoir chélatant du Gd(III).

La première partie des travaux concerne les aménagements fonctionnels des CDs afin de pouvoir les fonctionnaliser régiosélectivement avec des bras chélatants du Gd(III) de types pyridino-carboxylate et pyridino-phosphonate. La deuxième partie traite de la caractérisation physico-chimique des nouveaux systèmes complexes Gd-ligands synthétisés (Gd-**L α** et Gd-**L β**). Les principales propriétés caractérisant les agents de contraste ont été mesurées. Ainsi, de très bonnes relaxivités ont été obtenues ($25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1} < r_1 < 40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Cependant, les stabilités des complexes se sont avérées faibles ($4,24 < \log K_{\text{GdL}} < 5,58$). En perspectives, il est nécessaire d'obtenir un juste équilibre entre une forte relaxivité et une stabilité élevée pour assurer la non-libération du Gd(III) toxique.

Mots clés : IRM, produit de contraste, cyclodextrine, gadolinium