



HAL
open science

Synthèse et coordination de triazacyclononanes et de dérivés bifonctionnels : vers des applications en imageries médicales

Amaury Guillou

► **To cite this version:**

Amaury Guillou. Synthèse et coordination de triazacyclononanes et de dérivés bifonctionnels : vers des applications en imageries médicales. Autre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0081 . tel-02110360

HAL Id: tel-02110360

<https://theses.hal.science/tel-02110360>

Submitted on 25 Apr 2019

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N°596
Matière, Molécules et Matériaux
Spécialité : Chimie Moléculaire et Macromoléculaire

Par

Amaury GUILLOU

**Synthèse et coordination de triazacyclononanes et de dérivés
bifonctionnels : vers des applications en imageries médicales**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 29 Novembre 2018
Unité de recherche : UMR CNRS 6521

Rapporteurs avant soutenance :

Loïc CHARBONNIERE, Directeur de Recherche, CNRS,
Institut Pluridisciplinaire Hubert-CURIEN (Rapporteur)

Olivier SIRI, Directeur de Recherche, CNRS,
Université d'Aix-Marseille (Rapporteur)

Composition du Jury :

Loïc CHARBONNIERE, Directeur de Recherche, CNRS,
Institut Pluridisciplinaire Hubert-CURIEN (Examineur)

Olivier SIRI, Directeur de Recherche, CNRS,
Université d'Aix-Marseille (Président du Jury)

Véronique PATINEC, Maître de Conférences,
Université de Bretagne Occidentale (Directrice de thèse)

Raphaël TRIPIER, Professeur d'université,
Université de Bretagne Occidentale (Directeur de thèse)

Invitée

Christine PAUL-ROTH, Maître de Conférences,
Université de Rennes 1 (Examineur)

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'UMR CNRS 6521 CEMCA « Chimie, Electrochimie Moléculaire et Chimie Analytique » au sein de l'équipe COSM, dans le groupe thématique « Macrocyclus azotés et Coordination ». Cette thèse a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je voudrais tout d'abord remercier Mr Loïc Charbonnière, Directeur de Recherche à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg et Mr Olivier Siri, Directeur de Recherche à l'Université d'Aix-Marseille d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs et président de jury respectivement. J'adresse également mes remerciements à Mme Christine Paul-Roth, Maître de Conférences à l'INSA de Rennes pour avoir accepté d'être examinatrice de ces travaux. Merci de l'intérêt porté à mes travaux mais aussi pour la longue discussion plus qu'enrichissante qui a suivi la soutenance.

Je tiens ensuite à remercier le Professeur Raphaël Tripier pour toutes ces années passées dans son équipe. Merci de cette discussion, au départ anodine, après un cours de chimie organique en M1, lors de laquelle tu m'as proposé de réaliser mon stage en collaboration avec l'équipe du Professeur Steve Archibald de l'Université de Hull. Ce fut mes premiers pas dans la chimie macrocyclique. Merci d'avoir eu confiance en moi pour me proposer un stage de M2 puis cette thèse par la suite. Je te remercie pour ta gentillesse et ta disponibilité, même tard le soir et le week-end. Je peux maintenant le dire, après avoir eu la chance de t'avoir comme enseignant puis comme directeur de thèse, tu es devenu comme un mentor pour moi.

Un énorme merci au Docteur Véronique Patinec, ma directrice de thèse. Merci d'avoir accepté de m'encadrer en stage de M2 puis durant ces trois années de thèse. Cela n'a pas dû être une tâche évidente. Je te suis on ne peut plus reconnaissant pour ta gentillesse, ton aide, ta patience, ta motivation, ta disponibilité mais aussi pour m'avoir appris tes savoirs faire sur la chimie de ce macrocycle. Plus qu'une belle expérience professionnelle, ces quatre années ont été une magnifique expérience humaine.

J'aimerais continuer en remerciant le Dr. Mark Bartholomä de la clinique Universitaire de Fribourg. Merci d'avoir publié, juste avant Noël, une molécule sur laquelle nous travaillions à cette époque,

et comme tu le dis « d'avoir ruiné ma thèse ». Cela aura permis de débiter une nouvelle collaboration et de m'offrir l'opportunité de venir à Fribourg pour une période d'un mois et développer de nouveaux radiopharmaceutiques. Merci également du savoir-faire que tu m'as transmis en chimie peptidique, radiomarquage et en biologie.

Je poursuivrai en remerciant tous les collaborateurs (nationaux et internationaux) qui ont permis de mener à bien ce travail de thèse, en commençant par le Docteur Olivier Maury de l'ENS Lyon. Merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire afin de réaliser les études de fluorescence, et merci à toi, Docteur Margaux Galland de m'avoir formé à ces techniques. Je remercie également, l'équipe du Professeur Alain Faivre-Chauvet du CRCINA de Nantes, pour les études de radiomarquage au cuivre-64 et les premières images confocales obtenues, en lien avec le projet ANR SaDAM. Ensuite, merci à Gyula Tirscó de l'Université de Debrecen pour son aide sur les études potentiométriques et relaxométriques. Je remercie aussi, le Professeur Rita Delgado et Docteur Luis Lima, de l'institut de chimie et Biologie de Oeiras au Portugal, pour toutes les études potentiométriques et de RPE réalisées dans le chapitre III ainsi que le Professeur Carlos Platas-Iglesias, de l'Université de La Corogne pour les calculs DFT.

Ensuite, je souhaite remercier tous les membres permanents et non permanents de l'équipe pour leurs aides et leur bonne humeur. Merci à Maryline et Thibault (supérieur hiérarchique), Hélène et Nathalie (pour qui les mécanismes réactionnels sont un jeu d'enfant) et merci à Olivier. Merci aux post-doc, Nadège (qui adore travailler dans le noir), Alex pour ton franc parlé inégalable et surtout merci à toi Rich, j'aurais aimé faire une balade à vélo avec toi... mais tu n'en as plus... Place aux doctorants maintenant : Merci aux thésardes CIFRE, Mariane pour ton humour dans le bureau (tu nous manques) et Gwladys pour ton magnifique rire ! Merci également à notre canadienne locale, Laura.

Je remercie ensuite mon acolyte du labo C131 et voisin de bureau, John ! Gros Big Up à toi, mon partenaire particulier (petit clin d'œil à la musique qu'on a écouté au labo). On en aura passé du temps à se battre et à se faire des concours de rendements pour la synthèse de ce bras « fluo ». Bon courage pour cette dernière année et pour la rédaction ! Inch'allah ça passe comme tu dis... On se retrouvera autours de quelques douceurs brestoises. Ensuite, les voisins du labo C140 et tout d'abord merci à toi, bébé Evan qui adore se laisser aller... Bon courage avec tes cyclams... Finalement on en arrive à toi, Thomas. Après avoir été mon camarade depuis la L3, tu es devenu voisin de bureau en stage de M2, puis thésard dans l'équipe au même moment que moi. Plus

qu'une rencontre c'est une vraie amitié qui s'est créée entre nous. Je te souhaite beaucoup de chance pour la suite et pour ta soutenance, bientôt je pourrais t'appeler Docteur !

J'aimerais également remercier mais surtout souhaiter bonne chance à Axia qui prend la suite de mes travaux... Même s'il y aura des moments difficiles avec le tacn, ne désespère pas, et tu verras ça va le faire.

Je finirais par remercier, mes amis, Keuj, Fab, Vince, Will, Caillote, Bard, Cous, Couscous, Math et Rom qui m'ont soutenu depuis de nombreuses années. Merci à mes frères, ma famille et aussi à toi, Manon d'avoir été là pour m'encourager le jour de la soutenance.

J'aimerais dédier ces dernières lignes et cette thèse à toi Papère ! Toi qui m'as donné le goût de la recherche depuis longtemps. Le chemin a été long jusqu'aujourd'hui mais je l'ai fait et je sais que c'est en grande partie grâce à toi. Merci encore.

LISTE DES ABREVIATIONS	13
FORMULAIRE	14
INTRODUCTION GENERALE	17

Chapitre I : Rappels Bibliographiques

1 Les complexes de cuivre : généralités, propriétés et spectroscopie	26
I. Propriétés de coordination du cuivre (II)	26
II. Caractéristiques spectroscopiques.....	27
III. Effet chélate et effet macrocyclique des complexes de cuivre.....	28
2 Propriétés des polyazamacrocycles <i>N</i>-acétate	30
I. Introduction	30
II. Géométrie des complexes et propriétés spectroscopiques.....	30
1. Détermination de la sphère de coordination d'un complexe ML ₆	30
2. Isomérisie des complexes ML ₆	31
3. Structures cristallographiques des complexes [Cu(nota)], [Cu(dota)] ²⁻ et [Cu(teta)] ²⁻	32
4. Caractéristiques spectroscopiques.....	33
III. Propriétés acido-basiques des polyazamacrocycles	33
IV. Stabilité thermodynamique des complexes	35
V. Inertie cinétique des complexes	37
VI. Stabilité électrochimique	38
1. Principe de la voltamétrie cyclique	38
2. Stabilité électrochimique des complexes [Cu(nota)], [Cu(dota)] ²⁻ et [Cu(teta)] ²⁻	39
VII. Conclusion sur les ligands acétate.....	40
VIII. Ligands dérivés du tacn étudiés au laboratoire	40
1. Structure à l'état solide et propriétés spectroscopiques.....	41
2. Propriétés thermodynamiques.....	42
3. Inertie cinétique	43
4. Stabilité électrochimique.....	43
5. Conclusions	44
3 Synthèse et <i>N</i>-fonctionnalisation du tacn	45
I. Rappels sur la synthèse du tacn.....	45
II. Méthodes de <i>N</i> -fonctionnalisation du tacn.....	47

1. N-fonctionnalisation statistique	47
2. N-fonctionnalisation sélective par utilisation de groupements protecteurs	48
3. N-fonctionnalisation sélective par reconstitution du cycle	50
4. N-fonctionnalisation sélective par utilisation de la chimie des amines	51
5. N-fonctionnalisation sélective par l'intermédiaire d'un orthoamide	52
Conclusion du chapitre I	54

Chapitre II : Synthèses de nouvelles plateformes bimodales TEP-fluorescence et IRM-
fluorescence à base de ligands triazamacrocycliques

INTRODUCTION	58
1 L'imagerie TEP	59
I. Principe	59
II. Radionucléides utilisés en TEP	60
III. Le cuivre-64 : production et isotopes	62
1. Production du ^{64}Cu	62
2. Isotopes du cuivre.....	63
IV. Cahier des charges d'un chélatant du Cu^{2+} pour une application en médecine nucléaire	64
V. Chélates polyazotés étudiés pour la complexation du Cu^{2+}	65
2 Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM)	69
I. Principe	69
II. Agents de contraste	71
1. Agents de contraste T_1	72
2. Agents de contraste T_2	72
III. Agents de Contraste à base de Gadolinium.....	73
IV. Agents de contraste à base de Métaux de transition.....	74
V. Cahier des charges d'un agent de contraste pour une application en milieu biologique.....	77
3 Imagerie Optique de fluorescence et sondes bimodales.....	78
I. Principe et applications en milieu biologique	78
II. Sondes fluorescentes à base de chromophores organiques	79
III. L'absorption biphotonique (TPA).....	80
IV. Sondes luminescentes à base de complexes de lanthanides	81

V.	Cahier des charges d'une sonde fluorescente pour une application in vivo	86
VI.	Exemples de sondes bimodales TEP-fluorescence et IRM-fluorescence.....	86
VII.	Présentation des cibles.....	87
4	Sonde bimodale TEP-fluorescence à motif tacn	90
I.	Synthèse et caractérisation du ligand Hno2py1fluo.....	90
1.	Synthèse d'un dérivé du picolinate substitué en position <i>para</i> par un atome d'iode	90
2.	Synthèse de l'antenne fluorescente à motif picolinate 10	91
3.	Synthèse et caractérisation du ligand Hno2py1fluo.....	93
4.	Synthèse des complexes [M ^{II} (no2py1fluo)] ⁺ (M ^{II} = Cu ²⁺ / Zn ²⁺)	96
II.	Etudes électrochimiques du complexe [Cu(no2py1fluo)] ⁺	97
1.	Etude par voltamétrie cyclique	97
2.	Caractérisation du complexe [Cu(no2py1fluo)] ⁺ par spectroélectrochimie.....	98
III.	Etudes des propriétés physico-chimiques.....	99
1.	Caractéristique UV-visible	99
2.	Rendements Quantiques.....	100
3.	Etude du phénomène d'extinction de fluorescence du complexe de cuivre	101
IV.	Radiomarquage au ⁶⁴ Cu et études in vitro	103
1.	Radiomarquage du ligand Hno2py1fluo au ⁶⁴ Cu	103
2.	Etudes in vitro : imagerie confocale.....	104
5	Synthèse et études d'une sonde bimodale IRM-fluorescence à motif tacn.....	107
I.	Synthèse et caractérisation du ligand Hno1fluo.....	107
1.	Méthode de synthèse par la voie d'une di- <i>N</i> -protection par des groupements Boc	108
2.	Voie de synthèse par la chimie des amins	110
II.	Etudes potentiométriques : propriétés acido-basiques du ligand Hno1fluo. Constantes de complexation	113
1.	Propriétés acido-basiques du ligand	113
2.	Constantes de complexation	115
III.	Etudes relaxométriques du complexe [Mn(no1fluo)] ⁺	117
	Conclusion du Chapitre II.....	119

Chapitre III : Synthèses et études de nouveaux chélates pour la complexation du Cu²⁺ **123**

1	Les ligands ambidents N/S pour la complexation du cuivre	124
I.	Les ligands ambidents N/S.....	124
II.	Ligands polyazamacrocycles ambidents N/S étudiés au laboratoire.....	125

1.	Géométrie des complexes	125
2.	Stabilité thermodynamique et inertie cinétique des complexes	126
III.	Objectifs	128
2	Synthèses et études de nouveaux chélates du Cu(II)	130
I.	Synthèses et caractérisations des ligands	130
1.	Synthèse et caractérisation du no3th	130
2.	Synthèse et caractérisation du Hno2th1tha	131
3.	Synthèse et caractérisation du H₂no1th2tha	135
4.	Synthèse et caractérisation du H₃no3tha	137
II.	Etudes potentiométriques : propriétés acido-basiques des ligands. Constantes de complexation	139
1.	Propriétés acido-basiques	139
2.	Constantes de complexation	142
3.	Sélectivité du Cu ²⁺ vis-à-vis du Zn ²⁺	148
4.	Conclusions des études potentiométriques	148
III.	Synthèses et caractérisations des complexes de M ^{II} L (M = Cu ²⁺ / Zn ²⁺)	149
1.	Synthèses des complexes	149
2.	Caractérisations des complexes [M ^{II} (no3th)] ²⁺	150
3.	Caractérisations des complexes [M ^{II} (no2th1tha)] ⁺	154
4.	Caractérisations des complexes de [M ^{II} (no1th2tha)]	156
5.	Caractérisations des complexes [M ^{II} (no3tha)] ⁻	158
IV.	Synthèses et caractérisations structurales de complexes Cu ₂ L ₃ (L = Hno2th1tha et H₃no3tha)	162
V.	Cinétique de métallation et de dissociation des complexes	166
1.	Vitesse de formation des complexes	166
2.	Cinétique de dissociation des complexes en milieu HCl	167
VI.	Stabilité Electrochimique	170
1.	Voltamétrie cyclique avant électrolyse	170
2.	Voltamétrie cyclique après électrolyse	171
3.	Conclusion de l'étude par voltamétrie cyclique	173
	Conclusion du chapitre III	174

Chapitre IV : Synthèses et études de nouveaux radiopharmaceutiques à base de tacn
bifonctionnels : Application pour le diagnostic des cancers du sein et de la prostate

1 Les radiopharmaceutiques pour le diagnostic et la thérapie des cancers	178
I. La Bombésine et le récepteur BB2	178
II. Facteurs influençant l'affinité biologique et la pharmacocinétique des radiopharmaceutiques dérivés de la bombésine.....	180
1. Influence de la séquence peptidique	180
2. Influence de l'espaceur.....	183
3. Influence de la charge	184
III. Radiopharmaceutiques en essais cliniques	187
IV. Objectifs	189
2 Synthèse des Agents Chélatants Bifonctionnels	191
I. Stratégies de synthèse et de bioconjugaison des ACB.....	191
1. Méthode de bioconjugaison.....	191
2. Stratégies d'obtention d'ACB à base de tacn	193
3. Présentation des cibles	195
II. Synthèse et caractérisation du no2thEtBzNCS	196
III. Synthèse et caractérisation du no3pyCOOH	199
1. Synthèse du bras méthylpyridine bifonctionnalisé	199
2. Synthèse et caractérisation du ligand no3pyCOO⁻K⁺	200
3 Synthèse, caractérisation et études in vitro de nouveaux radiopharmaceutiques 203	
I. Synthèse des métallopeptides d'intérêt	203
1. Synthèse et caractérisation d'un bioconjugué à partir du no2thEtBzNCS	203
2. Synthèse et caractérisation d'un bioconjugué à partir du Hno2th1tha	205
3. Synthèse et caractérisation d'un bioconjugué à partir du ligand no3pyCOO⁻K⁺	207
II. Radiomarquage au ⁶⁴ Cu et stabilité in vitro.....	208
1. Radiomarquage au ⁶⁴ Cu.....	209
2. Lipophilie des radiocomplexes	212
3. Stabilité in vitro avec un ligand compétiteur	213
4. Stabilité in vitro avec un métal compétiteur	215
III. Etudes in vitro : Affinité Biologique (IC ₅₀)	216
1. Affinité Biologique des bioconjugués 56 , 58 et 60	216
2. Affinité Biologique des métallopeptides [^{nat} Cu(56)], [^{nat} Cu(58)] et [^{nat} Cu(60)].....	218
Conclusion du chapitre IV	220

Chapitre V : Elaboration d'une nouvelle plateforme à base de triazacycloalcanes
C-fonctionnalisés

INTRODUCTION	224
1 Rappels sur la C-fonctionnalisation du tacn.....	225
I. Synthèse de tacn C-fonctionnalisés selon une méthode dérivée de celle de Richman et Atkins	225
II. Synthèse de tacn C-fonctionnalisés via la chimie des aminal	227
2 Etude de la synthèse de triazacycloalcanes C-nitrobenzylés.....	229
I. Etude de la C-fonctionnalisation du tacn	229
1. Synthèse de la <i>N</i> -(2-amino)-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,2-éthanediamine	229
2. Cyclisation de la <i>N</i> -(2-amino)-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,2-éthanediamine par action du chloroacétaldéhyde	232
II. Etude de la C-fonctionnalisation du triazacyclodécane (tacd).....	235
1. Synthèse de la <i>N</i> -(2-amino-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,3-propanediamine	235
2. Cyclisation de la <i>N</i> -(2-amino-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,3-propanediamine par action du chloroacétaldéhyde	237
3. Synthèse du 1,4,7-tribenzyl-3-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclodécane	239
Conclusion du chapitre V.....	242
CONCLUSION GENERALE	245
EXPERIMENTAL SECTION	251
X-RAY DATA	294
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	296
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	305

LISTE DES ABREVIATIONS

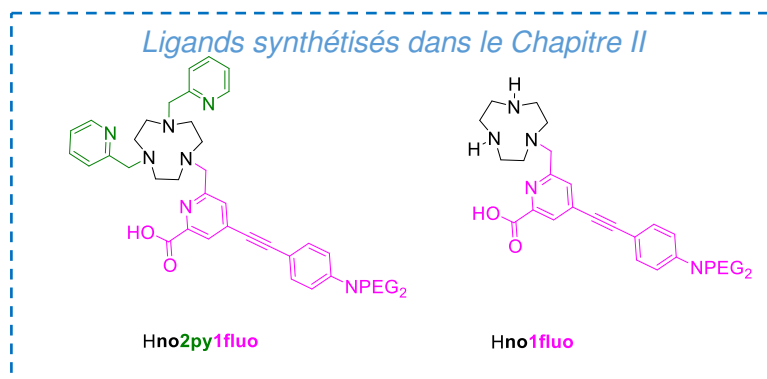
Abz	Aminobenzyle
ACB	Agents chélatants bifonctionnels
AHDA	Aminopipérazine
Ahx	Acide aminohexinoïque
Boc	<i>tertio</i> -butyloxycarbonyle
Boc-ON	2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitrile
CaP	Cancer de la prostate
CaS	Cancer du sein
cyclam	1,4,7,11-tétraazacyclotétradécane
cyclen	1,4,7,11-tétraazacyclododécane
CCM	Chromatographie sur couche mince
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DFT	Density functional theory
DRX	Diffraction des rayons X
¹⁸ F-FDG	[¹⁸ F]-fluoro-2-désoxyglucose
GRP	Gastrin releasing peptide
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HOBt	Hydroxybenzotriazole
H ₃ nota	1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique acide
H ₄ edta	Acide éthylène diamine tétraacétique
H ₄ dota	1,4,7,11-tétraazacyclododécane-1,4,7,11-tétraacétique acide
H ₄ teta	1,4,7,11-tétraazacyclotétradécane-1,4,7,11-tétraacétique acide
H ₅ dtpa	Acide diéthylène triamine pentaacétique
IO	Imagerie optique
IRM	Imagerie par résonance magnétique
NRI	Proche infrarouge
PBS	Tampon phosphate salin
PyBOP	(1H-benzotriazol-1-yloxy)-(tri-1-pyrrolidinyl)phosphonium
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
SPION	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
tacn	1,4,7-triazacyclononane
tacd	1,4,7-triazacyclodécane
TEP	Tomographie par émission de positons
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
USPIONS	Ultra small iron oxide nanoparticles
UV	Ultraviolet
232	<i>N,N'</i> -bis(2-aminoéthyl)-1,3-propanediamine

FORMULAIRE

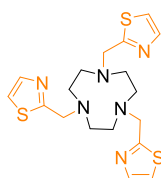
Ces quelques lignes ont pour but d'aider le lecteur à bien comprendre les noms relatifs aux ligands étudiés et synthétisés au cours de cette thèse. Dans ce manuscrit, les dérivés du tacn, seront nommés selon cette nomenclature simple, de type **HynoxAyB** (où **no** signifie triazacyclononane, **A** et **B** correspondent aux groupements fonctionnels introduits sur le macrocycle et **x** et **y** correspondent respectivement au nombre de groupements **A** et **B** présents sur le macrocycle). Une liste des groupements coordinants principalement abordés dans cette thèse est répertoriée ci-dessous (**Tableau 1**).

Groupement coordinant	diminutif	Formule chimique
acétate	a	
antenne fluorescente	fluo	
méthylpyridine	py	
méthylpyridine substitué	pyCOOH	
méthylthiazole	th	
méthylthiazole acide	tha	
picolinate	pa	

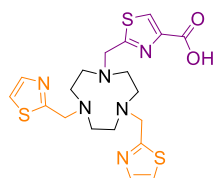
Tableau 1 : Liste des groupements coordinants abordés dans ce manuscrit



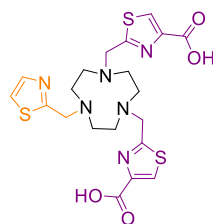
Ligands synthésisés dans le Chapitre III



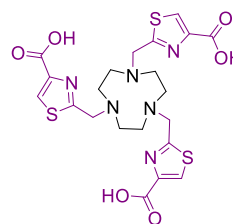
no3th



Hno2th1tha

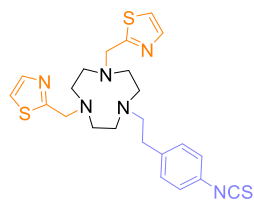


H₂no1th2tha

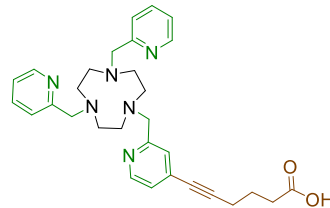


H₃no3tha

Ligands synthésisés dans le Chapitre IV



no2thEtBzNCS



no3pyCOOH

INTRODUCTION GENERALE

Les techniques d'imagerie et de thérapie actuelles utilisées en médecine telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie optique (IO) ou bien la radioimmunothérapie (RIT) mettent très souvent à profit les propriétés intrinsèques des métaux de transition et des lanthanides, et de métaux lourds (**Tableau 2**).

TEP	IRM	Imagerie Optique	RIT
$^{64}\text{Cu}^{2+}$	Gd^{3+}	Lanthanides	$^{67}\text{Cu}^{2+}$
$^{68}\text{Ga}^{3+}$	Ni^{2+}	Ir^{3+}	$^{90}\text{Y}^{3+}$
$^{89}\text{Zr}^{4+}$	Mn^{2+}	Ru^{2+}	$^{213}\text{Bi}^{3+}$
$^{131}\text{Tb}^{3+}$	Fe^{3+}	Re^{2+}	$^{212}\text{Pb}^{2+}$

Tableau 2 : Listes non exhaustives de métaux de transition, lanthanides et métaux lourds utilisés en imagerie et en thérapie

Pour ces applications, le métal est en général sous sa forme cationique. Cependant, si ce dernier est libre, il est souvent toxique et doit nécessairement être chélaté pour une utilisation in vivo. C'est ainsi que les polyazamacrocyces ont pris une place considérable dans ces différents domaines grâce à leurs excellentes propriétés de coordination.

En IRM, certains complexes de coordination peuvent servir d'agents de contraste, permettant ainsi une exaltation du signal par rapport à un scan usuel. L'agent de contraste le plus utilisé actuellement est le dotarem[®] (**Figure 1**). Il s'agit d'un complexe de Gadolinium (III) et du **dota**, cyclen *N*-fonctionnalisé par 4 bras acétate. Selon la théorie de Pearson^[1], les lanthanides et le gadolinium en particulier sont considérés comme de acides durs et forment des complexes très stables avec des ligands possédant des atomes donneurs durs comme l'oxygène. Ajouté à cela, l'effet chélate et l'effet macrocyclique^[2] induit par le polyazamacrocycle, font du dotarem[®] un des complexes les plus stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement.

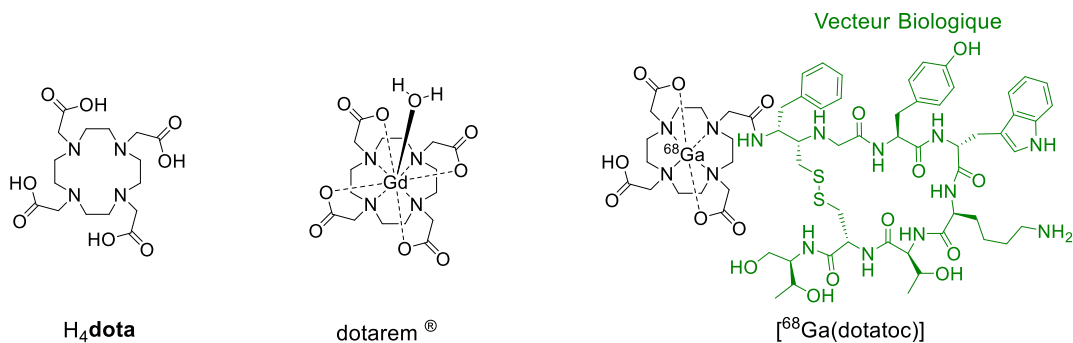


Figure 1 : Structures du H₄dota, du dotarem[®] et du dotatoc

Le **H₄dota** est considéré comme un des standards actuels pour la complexation de cations métalliques divalents et trivalents (i.e cuivre-64 et gallium-68) pour l'imagerie TEP ^[3,4]. De plus, son homologation par les agences américaine et française de santé (FDA et ANM) le rend ainsi incontournable pour des applications in vivo. Le [⁶⁸Ga(**dotatoc**)], dans lequel un le **H₄dota** est lié à un vecteur biologique ciblant les récepteurs de la somatostatine, est utilisé en clinique comme radiotraceur pour la détection des maladies neuroendocriniennes par exemple. Néanmoins, bien qu'il soit considéré comme un des meilleurs ligands pour la complexation de cations durs comme le gallium et le gadolinium, les complexes formés avec le cuivre-64 sont nettement moins inertes. Ce manque de stabilité entraîne la plupart du temps, une démétallation des complexes in vivo ^[5]. Il est donc nécessaire de synthétiser de nouveaux ligands pour l'élaboration de complexes du Cu(II) stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement.

Au laboratoire, l'équipe est spécialisée depuis de nombreuses années dans l'élaboration de nouveaux chélates à base de polyazamacrocycles pour la complexation de différents métaux de transition, de métaux lourds et de lanthanides. Les dérivés macrocycliques développés et étudiés au laboratoire proviennent de 4 plateformes différentes : les tacn, cyclen, pycen ou cyclam (**Figure 2**).

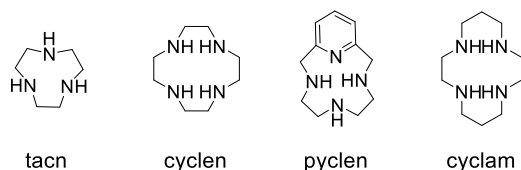


Figure 2 : Structures des plateformes macrocycliques

Une des thématiques majeures de l'équipe est liée à la synthèse et l'étude de chélates du Cu(II) pour une application en imagerie TEP. L'équipe a notamment montré l'importance de la *N*-fonctionnalisation de dérivés du cyclam par des groupements picolinate ^[6,7] (**Figure 3**). Elle a mis en évidence la capacité des cyclams monopicolinate à former des complexes du cuivre (II) de très haute stabilité et présentant des propriétés adaptées à une application en imagerie TEP. Par exemple, le ligand **Hte1pa** couplé à un anticorps possède une efficacité de ciblage des tumeurs comparable, voire meilleure lorsque le couplage est réalisée via une fonction présente sur le macrocycle ^[8], à un analogue formé avec le ligand **H₄dota** ^[5].

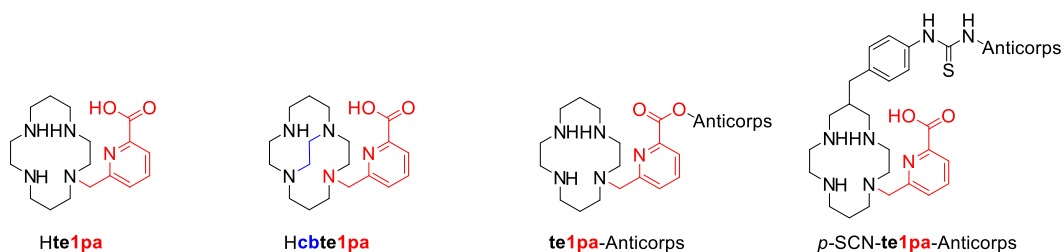


Figure 3 : Structures des ligands **Hte1pa**, **Hcbte1pa**, **te1pa-Anticorps** et du **p-SCN-te1pa-Anticorps** [5–8]

Bien que la plupart des recherches au laboratoire soient axées sur les tétraazamacrocycles, le 1,4,7-triazacyclononane, communément appelé tacn, a pris une place importante dans l'équipe depuis quelques années, pour diverses applications. Mélissa Roger a synthétisé et étudié durant sa thèse, différents ligands pour la complexation de métaux de transition. Dans le cadre de l'élaboration de nouveaux chélates du Cu(II), elle a étudié l'influence de la fonctionnalisation du tacn par des groupements méthylpyridine et picolinate (**Figure 4**). Elle a ainsi démontré que la stabilité des complexes de Cu(II) diminuait avec l'augmentation du nombre de fonctions picolinate sur le macrocycle. Les ligands **no3py** et **Hno2py1pa** possèdent d'excellentes propriétés de coordination pour le cuivre et les complexes formés ont une stabilité remarquable [9,10]. Ces deux ligands sont considérés comme des ligands de choix pour l'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques à base de chélates du Cu(II).

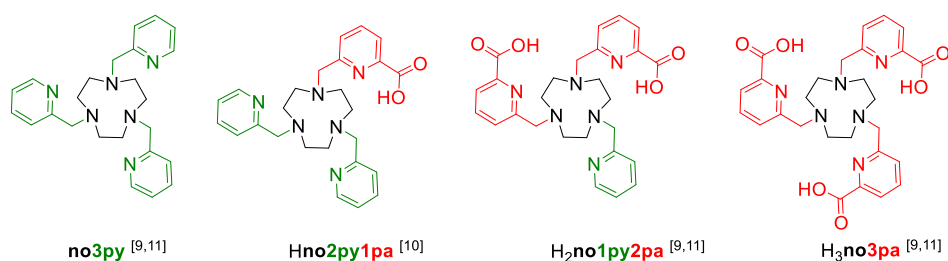


Figure 4 : Exemples de ligands *N*-fonctionnalisés par des groupements méthylpyridine et picolinate étudiés au laboratoire pour la complexation du Cu(II) [9–11]

Dans le domaine de l'IRM, notre équipe a développé des agents de contraste potentiels à base de Mn(II). Ces agents de contraste sont des dérivés du tacn di-*N*-fonctionnalisés par deux groupements acétate et un groupement méthyl, ou par un groupement picolinate (**Figure 5**), offrant ainsi un site vacant pour la coordination d'une molécule d'eau nécessaire à l'établissement du contraste. Les études à l'état solide et en solution ont en effet confirmé qu'une molécule d'eau

était bien coordonnée au cation métallique en sphère interne. Les valeurs de relaxivité obtenues sont également du même ordre de grandeur que le dotarem [12,13].

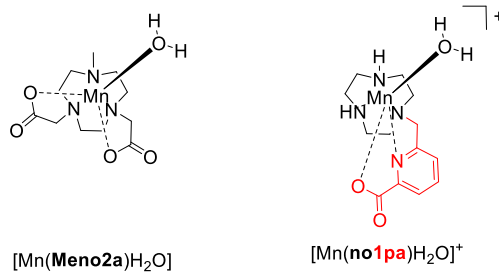


Figure 5 : Agents de contraste potentiels pour l'IRM développés au laboratoire [12,13]

Notre groupe s'intéresse également à la synthèse de sondes à base de lanthanides pour l'imagerie optique. Dans ce contexte, l'élaboration de dérivés tétraazamacrocycliques de la famille du cyclen *N*-fonctionnalisés par des antennes biphotoniques a été entrevue [14,15]. Ces bras à motifs picolinate substitué ont la capacité à jouer le rôle d'antenne pour pouvoir observer l'émission du lanthanide grâce à un transfert d'énergie du bras vers le cation. Ces composés permettent une excitation à deux photons du lanthanide. Des études *in vitro* ont montré que ces deux complexes cationiques, s'internaient dans les cellules et permettaient une imagerie à un ou deux photons. Ces résultats prometteurs, permettent d'envisager la synthèse de nouvelles sondes bioluminescentes et sont en cours de développement au laboratoire.

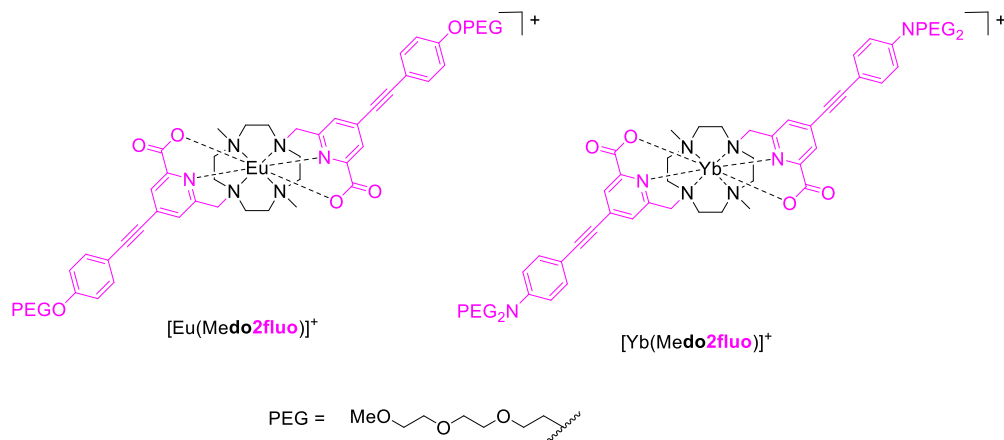


Figure 6 : Exemples de sondes lumineuses à base de Lanthanides développées au laboratoire [14,15]

Ces différents exemples montrent l'intérêt de développer de nouveaux chélatants à motifs méthylpyridine et picolinate.

Les travaux que nous décrivons dans cette thèse s'inscrivent à la suite de ces différents résultats et ont pour objectif de développer de nouveaux chélatants triazamacrocycliques pour des applications en TEP, IRM et en imagerie optique de fluorescence, en s'inspirant des modèles précédents.

La première partie de ce manuscrit est une introduction à la chimie de coordination du Cu(II) au travers de la chimie des polyazamacrocycles *N*-fonctionnalisés par des bras acétate. Après avoir également énoncé l'intérêt des groupements méthylpyridine et picolinate pour l'élaboration de complexes de coordination stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement, la dernière partie de ce chapitre est dédiée aux différentes voies de synthèses et de *N*-fonctionnalisation spécifique du tacn pour contrôler son habillage et ainsi moduler les propriétés de coordination des ligands.

Le deuxième chapitre de cette thèse, est consacré à l'élaboration de nouvelles sondes bimodales à base de dérivés de tacn-picolinate. La première partie permettra de définir les différentes techniques d'imagerie en lien avec ce travail qui sont la TEP, l'IRM et l'imagerie optique. Cette introduction sera complétée par des exemples pertinents de ligands élaborés au laboratoire et issus de la littérature tout en étudiant les propriétés nécessaires pour une application en milieu biologique. Ensuite la deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à la synthèse et les études en solution d'une sonde TEP-fluorescence à base d'un complexe de Cu(II). Les études réalisées sur une potentielle sonde IRM-fluorescence à base de Mn(II) viendront finir ce chapitre.

Le troisième chapitre de cette thèse est axé sur l'élaboration de nouveaux ligands triazamacrocycliques *N*-fonctionnalisés par des groupements méthylthiazole et méthylthiazole acide pour la complexation du Cu(II). La synthèse des chélatants et l'étude de leurs complexes de métaux de transition à l'état solide et en solution seront exposées. Une attention particulière sera donnée à la stabilisation des complexes de cuivre au degré d'oxydation (I).

Après avoir étudié différents chélatants du Cu(II) dans les chapitres I et III, pour une application en imagerie TEP, nous avons sélectionné ceux répondant aux critères imposés par le milieu biologique pour l'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques pour une application dans le cadre des cancers du sein et de la prostate. La première partie de ce quatrième chapitre fera un rappel sur l'utilisation de peptides comme vecteurs biologiques pour le ciblage spécifique de récepteurs surexprimés sur les cellules de ces deux types de cancer. Les synthèses de trois

nouveaux agents chélatants bifonctionnels seront ensuite détaillées. Enfin, après bioconjugaison sur un peptide d'intérêt, les études de radiomarquage au cuivre-64 des nouveaux bioconjugués et celles de stabilité en milieux compétiteurs seront présentées. Les premiers résultats in vitro viendront clore ce chapitre.

Un dernier chapitre décrit le travail préliminaire effectué sur une nouvelle génération de ligands triazamacrocycliques offrant une fonction vectorisable sur un atome de carbone du macrocycle. Ce chapitre V est une ouverture sur une nouvelle voie de synthèse de triazamacrocycles bifonctionnels via une méthode dite de C-fonctionnalisation.

Chapitre I : Rappels Bibliographiques

1 Les complexes de cuivre : généralités, propriétés et spectroscopie

Le cuivre est un élément appartenant à la quatrième ligne et la onzième colonne du tableau périodique. De numéro atomique $Z = 29$ et de configuration de type $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$, cet élément fait partie de la famille des métaux de transition. Ces derniers sont des éléments caractérisés par une sous-couche d incomplète ^[16]. Le cuivre existe dans les états d'oxydation de 0 à +III, l'état d'oxydation +II étant celui retrouvé le plus souvent en solution, du fait de sa plus grande stabilité.

I. Propriétés de coordination du cuivre (II)

Le cation Cu^{2+} , de configuration $[\text{Ar}]3d^9$, est considéré selon la théorie HSAB comme un cation de dureté intermédiaire ce qui lui permet de former des complexes stables avec des bases de Lewis intermédiaires (N, S, O) ^[1]. Selon l'environnement autour de la sphère de coordination du métal, les complexes formés peuvent adopter plusieurs géométries. Le Cu^{2+} , de rayon ionique compris entre 57 pm et 73 pm, forme des complexes de type ML_4 à ML_6 (M = métal, L = ligand) en fonction des ligands utilisés. Les géométries sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**).

Nombre de coordinance	Géométrie
4	Plan carré / Tétraédrique
5	Pyramide à base carrée / Bipyramide trigonale
6	Octaédrique / Octaédrique déformée

Tableau 3 : Corrélation entre la géométrie des complexes de Cu^{2+} et le nombre de coordinance

Avec un nombre de coordinance égal à quatre, les complexes ML_4 adoptent des structures de type plan carré ^[17] ou tétraédrique ^[18]. Pour des complexes de type ML_5 , les géométries possibles sont de type bipyramide trigonale ^[19] ou pyramide à base carrée ^[20], caractérisée par un cation métallique proche d'un plan basal et une élongation de la liaison en position apicale. Enfin, les complexes avec une sphère de coordination de type ML_6 adoptent des géométries octaédrique, prismatique ou octaédrique déformée ^[21]. D'après la théorie du champ cristallin, la coordination du Cu(II) entraîne une déstabilisation des orbitales $3d$ (eg et t_{2g}). Les orbitales d_{xy} et d_{yz} se retrouvent plus basses en énergie par rapport à l'orbitale d_{xy} . Les trois électrons des orbitales eg³

dégénérées sont réparties sur les orbitales d_{z^2} et $d_{x^2-y^2}$. Ces changements d'énergie de l'orbitale d_{z^2} se caractérisent par une élévation des liaisons selon l'axe z [22]. Cette déformation est plus communément appelée distorsion de Jahn-Teller [23].

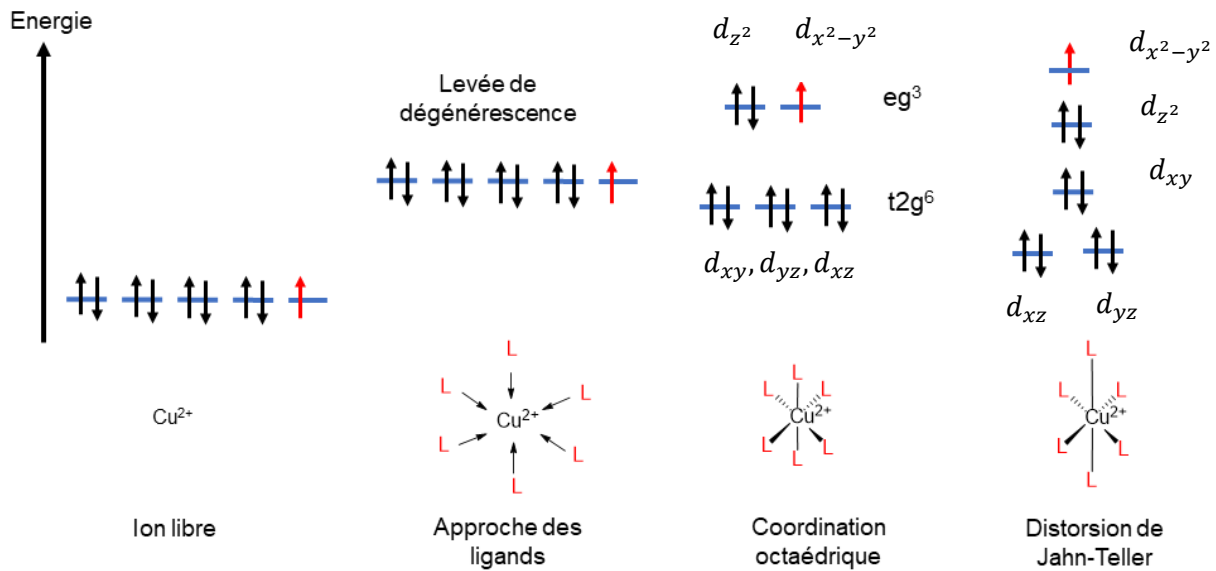


Figure 7 : Diagramme d'énergie d'un complexe CuL_6 selon la théorie du champ cristallin

II. Caractéristiques spectroscopiques

Les complexes de Cu^{2+} sont caractérisés en spectroscopie UV-visible par une bande d'absorption large et mal définie correspondant aux transitions d-d. Cette bande s'étend sur une échelle de 500 à 1000 nm. L'énergie de ces transitions est directement liée à la géométrie des complexes en solution [24]. La corrélation entre la structure des complexes en solution et les absorptions des complexes est présentée ci-après (**Figure 8**).

Les complexes ML_4 ont une signature UV-visible différente selon qu'ils présentent une géométrie plan carré ou tétraédrique. Les complexes dans une géométrie plan carré ont des absorbances comprises entre 500 et 555 nm contre 625 et 800 nm pour les complexes tétraédriques.

Les complexes pentacoordinés, avec une sphère de coordination de type pyramidale à base carrée, présentent des longueurs d'onde d'absorption comprises entre 600 et 1000 nm. Sur une gamme allant de 700 à 850 nm environ, les complexes ML_5 peuvent adopter une géométrie bipyramide trigonale.

Enfin, les complexes hexacoordinés de type ML_6 peuvent présenter une sphère de coordination dans un environnement octaédrique ou octaédrique déformé (distorsion de Jahn-Teller). Les

complexes octaédriques déformés possèdent une signature spectrale s'étendant sur environ 200 nm (500 à 700 nm). La géométrie octaédrique est caractérisée par des longueurs d'onde comprises entre 700 et 1000 nm.

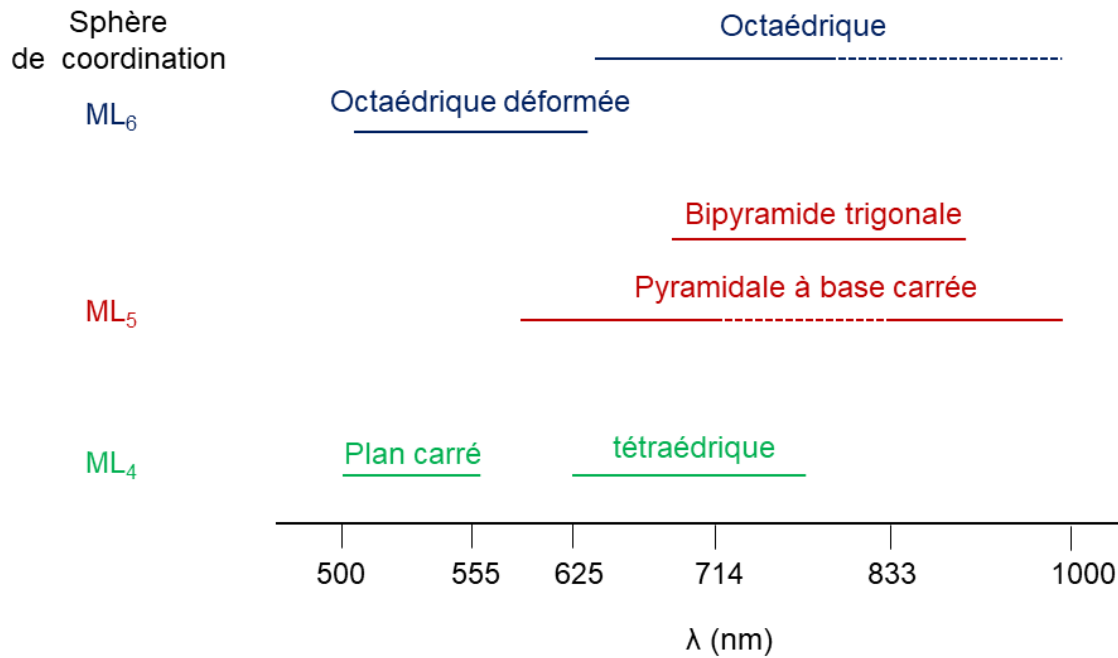


Figure 8 : Diagramme de corrélation structure et absorption des complexes ^[24] adapté de la littérature ^[25]

III. Effet chélate et effet macrocyclique des complexes de cuivre

De manière générale, les chélates bidentates de cuivre (II) sont plus stables que les complexes formés avec des ligands monodentates (i.e H₂O, NH₃). De plus, une préorganisation macrocyclique des ligands engendre une meilleure stabilité des complexes de cuivre formés par rapport à leurs analogues linéaires ^[26]. Dans les complexes macrocycliques, la taille du ligand a également un impact sur la stabilité des complexes. A. E. Martel *et al.* ont étudié l'influence de la stabilité de complexes de métaux de transitions en fonction de la taille du macrocycle ^[27]. Parmi tous les cycles chélates que peut former le Cu²⁺, les métallocycles à cinq et six chaînons formés avec des ligands polyazotés sont les plus stables (**Figure 9**).



Figure 9 : Géométrie idéale pour des métallocycles à cinq ou six chaînons [27]

Dans les métallocycles à six chaînons, le cation métallique est idéalement distant de 1,54 Å des atomes d'azote coordinants et forme un angle N-Cu-N de 109,5°. Un cycle chélate à cinq chaînons entraîne une élongation de la distance métal-azote, ce qui confère une moins bonne stabilité au complexe. Le Cu(II) formera ainsi des complexes plus stables s'il est engagé dans des métallocycles (cycles chélates) à six chaînons.

Les données de stabilité thermodynamique de quatre complexes de cuivre formés à partir de ligands azotés mono- ou poly-dentates, linéaires ou macrocycliques, dans lesquels la nature des cycles chélates varie entre cinq et six chaînons, illustrent les propos précédents (**Tableau 4**). On observe également que la stabilité thermodynamique augmente avec la denticité et la nature macrocyclique (effet macrocyclique [2]) du ligand.

ligand	-NH ₃	Ethylènediamine	232	cyclam
denticité	monodentate	bidentate	tétradentate	tétradentate
nature	linéaire	linéaire	linéaire	macrocyclique
logK _{CuL}	13,0	19,6	20,1	24,8

Tableau 4 : Constantes de complexation en fonction de la denticité et de la nature du ligand [26]

Les structures macrocycliques apparaissent ainsi comme des plateformes particulièrement bien adaptées à la complexation du cuivre (II), ce qui explique qu'ils aient pris une place considérable dans ce domaine.

2 Propriétés des polyazamacrocycles *N*-acétate

I. Introduction

Les polyazamacrocycles sont des macrocycles dotés de fonctions amine secondaires espacées par deux ou trois atomes de carbone pour les plus utilisés. Dans la famille des polyazamacrocycles, les plus connus sont des triazamacrocycles et tétraazamacrocycles dérivés du tacn, cyclen et cyclam (**Figure 10**) ainsi que leur analogue *N*-fonctionnalisé par des bras acétate.

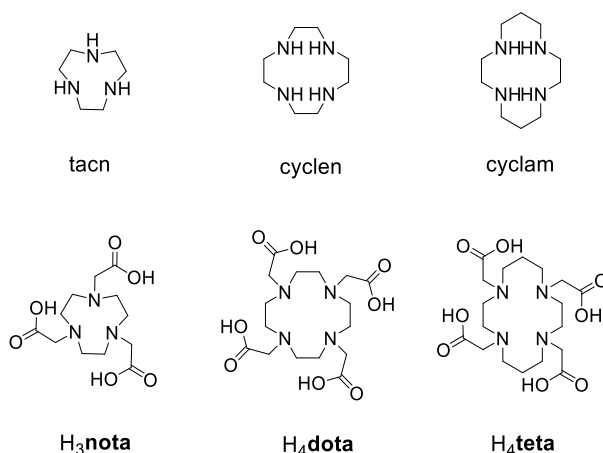


Figure 10 : Structure du tacn, cyclen et cyclam et de leurs dérivés *N*-fonctionnalisés par des bras acétate

Cette partie, portera sur la géométrie et la caractérisation à l'état solide et en solution des complexes de Cu(II) de ces polyazamacrocycles. Un rappel bibliographique concernant la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique des complexes permettra d'évaluer l'influence de la nature du macrocycle sur les propriétés des complexes.

II. Géométrie des complexes et propriétés spectroscopiques

1. Détermination de la sphère de coordination d'un complexe ML₆

Il est possible de déterminer la géométrie d'un complexe de type ML₆, possédant un axe de symétrie C₃, en étudiant l'angle de torsion, aussi dénommé l'angle dièdre. Il correspond à la différence d'alignement des plans inférieur et supérieur formés à partir des atomes coordinants

situés autour du cation métallique. Cet angle est présenté dans la figure ci-après pour des complexes de type MN_6 (**Figure 11**).



Figure 11 : Détermination de l'angle de torsion φ

K. Wieghardt *et al.* ont étudié différents complexes de métaux de transition à partir du ligand H_3nota [28] (**Figure 10**). Cette étude a permis d'énoncer une règle afin de déterminer la géométrie de ces complexes ML_6 . Si l'angle dièdre est proche de 0° , le complexe sera dans une géométrie prismatique. En revanche, si l'angle de torsion est proche de 30° , le complexe adoptera une géométrie octaédrique.

2. Isomérisie des complexes ML_6

Les complexes ML_6 formés avec des ligands macrocycliques peuvent exister sous différentes conformations. La détermination de la conformation des complexes cuivriques de polyazamacrocycliques se divise en deux parties (**Figure 12**). La première consiste à déterminer la conformation Δ ou Λ du macrocycle : le sens de rotation des bras coordinants, aussi nommé hélicité, permet d'obtenir une conformation (Δ) si elle est dans le sens horaire. Dans le cas contraire, une hélicité dans le sens antihoraire entraîne une conformation (Λ) (**Figure 12, A**). Ensuite, la détermination de la conformation des liaisons C-C est possible en positionnant le métal dans l'axe horizontal de deux atomes d'azote du macrocycle (**Figure 12, B**). Si la liaison C-C est ascendante elle sera de conformation δ , dans le cas contraire elle sera λ .

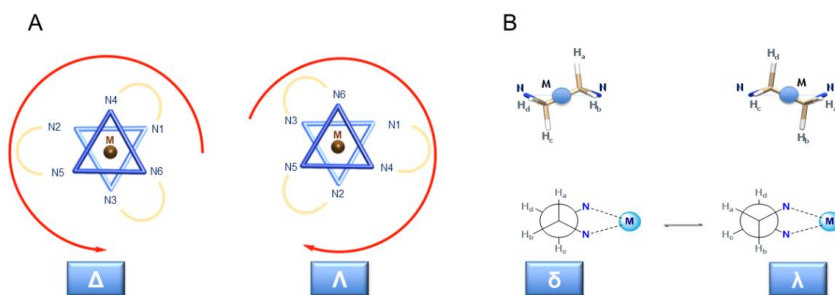


Figure 12 : Détermination de la stéréochimie des complexes ML_6

3. Structures cristallographiques des complexes $[\text{Cu}(\text{nota})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dota})]^{2-}$ et $[\text{Cu}(\text{teta})]^{2-}$

Les ligands H_3nota , H_4dota et H_4teta possèdent respectivement six et huit atomes coordinants pour la formation de complexe avec le Cu^{2+} , qui sont les atomes d'azote des azamacrocycles et les atomes d'oxygène des bras acétate. Les structures cristallographiques des complexes, extraites de la littérature ^[29], sont représentées ci-dessous (**Figure 13**).

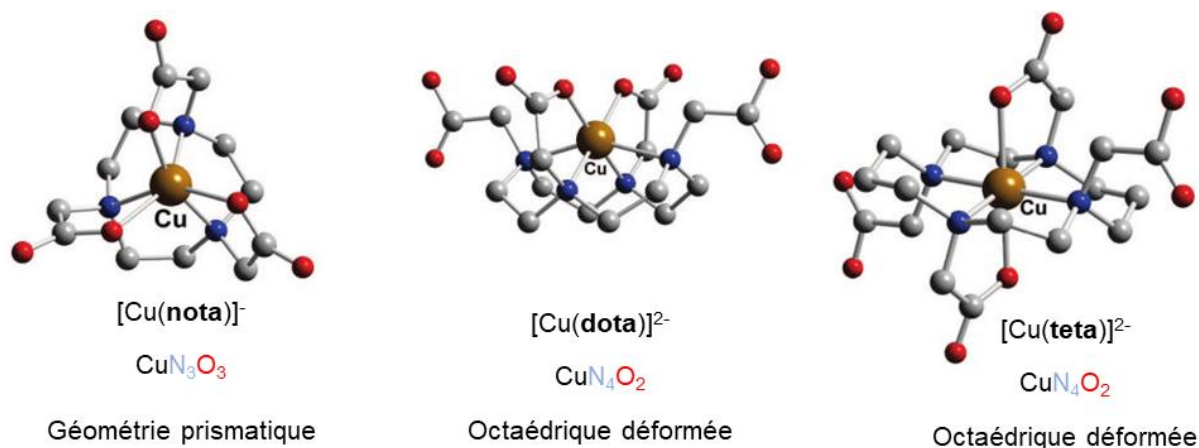


Figure 13 : Géométrie des complexes $[\text{Cu}(\text{nota})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dota})]^{2-}$ et $[\text{Cu}(\text{teta})]^{2-}$ issues de la littérature ^[29]

Lors de la complexation du Cu^{2+} avec le ligand H_3nota , le cation métallique est chélaté par les trois atomes d'azote du macrocycle et les trois atomes d'oxygène des bras acétate (**Figure 13**). La sphère de coordination du métal est de type N_3O_3 . Avec un angle de torsion de $13,3^\circ$, elle peut être considérée comme étant de type prismatique trigonale distordue ^[28].

Les analogues tétraazamacrocycliques H_4dota et H_4teta , forment tous les deux des complexes de type N_4O_2 présentant cependant des sphères de coordination différentes (**Figure 13**). La sphère de coordination du $[\text{Cu}(\text{dota})]^{2-}$ est, quant à elle, constituée des quatre atomes d'azote du macrocycle et de deux atomes d'oxygène des fonctions acétate positionnée en *trans*. Le cation métallique se retrouve au-dessus du plan moyen formé par les atomes d'azote du macrocycle. Dans le cas du $[\text{Cu}(\text{teta})]^{2-}$, le complexe adopte une géométrie octaédrique déformée de type *trans-III* ^[30]. Le cation métallique se retrouve dans la cavité macrocyclique et est complexé en positions apicales par deux atomes d'oxygène en *trans* distants de $2,269 \text{ \AA}$ du Cu^{2+} ^[31]. Cette structure est caractéristique d'un complexe CuL_6 dans une géométrie octaédrique avec une distorsion de Jahn-Teller et donc une élongation des liaisons selon l'axe z.

4. Caractéristiques spectroscopiques

En spectroscopie UV-visible les complexes de cuivre (II) formés à partir des ligands H₃**nota**, H₄**dota** et H₄**teta** sont caractérisés par une bande large, mal définie entre 600 et 800 nm correspondant au transition d-d du cation métallique. Les valeurs issues de la littérature sont répertoriées ci-dessous (**Tableau 5**) [28,32].

	[Cu(nota)] ²⁻ [28] a	[Cu(dota)] ²⁻ [32] b	[Cu(teta)] ²⁻ [32] b
λ _{max} (nm)	750	734	646

a H₂O, pH 7, 25°C. b H₂O, pH 9, 25°C

Tableau 5 : Longueurs d'ondes maximales d'absorption des complexes de Cu(II)

La géométrie des complexes en solution peut être corrélée avec les structures à l'état solide puisqu'avec des longueurs d'ondes maximales d'absorption comprises entre 646 et 750 nm, la sphère de coordination du cation métallique peut être décrite comme étant dans une géométrie octaédrique distordue.

III. Propriétés acido-basiques des polyazamacrocycles

Les polyazamacrocycles étant pourvus de fonctions amine et souvent *N*-fonctionnalisés par des groupements protonables, possèdent des propriétés acido-basiques. Ces propriétés peuvent être évaluées par des constantes de protonation (K_n) définies par différents équilibres successifs. Ces équilibres et les équations résultantes sont présentés ci-dessous (**Tableau 6**).

Constantes	Equilibres
$K_1 = \frac{[LH]}{[H][L]}$	$L + H \xrightleftharpoons{K_1} LH$
$K_2 = \frac{[LH_2]}{[H][LH]}$	$LH + H \xrightleftharpoons{K_2} LH_2$
$K_n = \frac{[LH_n]}{[H][LH_{(n-1)}}$	$LH_{(n-1)} + H \xrightleftharpoons{K_n} LH_n$
$\beta_n = K_1 \times K_2 \times \dots \times K_n$	$L + nH \xrightleftharpoons{\beta_n} LH_n$

Tableau 6 : Constantes de protonations associées aux équilibres de réaction

Les états de protonation des polyazamacrocycles peuvent être décrits par le logarithme de ces constantes. La somme des logarithmes ($\log\beta$) témoigne de la basicité globale d'un ligand. Ces constantes peuvent être déterminées par diverses méthodes analytiques telles que la spectroscopie UV-visible, la RMN, ou par titrage potentiométrique.

Les constantes de protonation (**Tableau 7**) des macrocycles tacn, cyclen et cyclam ont été reportées dans une revue de R. M. Izatt *et al.* [33]. Ces constantes ont été déterminées par titrage potentiométrique dans des conditions standards (0,1M KNO₃ à 298 K).

	tacn [33]	cyclen [33]	cyclam [33]
$\log K_1$	10,42	10,6	11,54
$\log K_2$	6,82	9,6	10,53
$\log K_3$	/	/	2,43
$\log K_4$	/	/	1,97
$\log\beta_n$	17,24	20,2	26,47

Tableau 7 : Constantes de protonation des macrocycles usuels

Les deux premières constantes de protonation ($\log K_1$ et $\log K_2$) sont attribuées à la protonation des amines secondaires des macrocycles. Les études réalisées sur le tacn et le cyclen ne permettent pas de déterminer une troisième constante de protonation [13] dans le domaine de sensibilité de la technique utilisée, en raison probablement de la taille de la cavité, plus petite que celle du cyclam, ce qui engendre des répulsions électrostatiques importantes. Le tacn possède une constante de protonation globale $\log\beta$ égale à 17,30 qui est inférieure à celle des analogues tétraazamacrocycliques (20,2 pour le cyclen et 26,47 pour le cyclam). De manière générale, la basicité globale des ligands augmente avec la taille de la cavité macrocyclique (nombre d'atomes de carbone) et le nombre de sites protonables.

L'introduction de fonctions acide carboxylique sur les ligands *N*-acétate augmente la basicité globale des ligands (**Tableau 8**). Les trois ligands H₃nota, H₄dota et H₄teta possèdent une première constante de protonation similaire ($\log K_1 \approx 11$). En revanche, la seconde constante est nettement plus basse pour le H₃nota ($\log K_2 = 5,59$) par rapport à ses analogues tétraazamacrocycliques ($\log K_2 \approx 9,7$) en accord avec la plus petite taille du macrocycle, comme déjà observé pour le tacn.

	H ₃ nota ^{[34] a}	H ₄ dota ^{[33] b}	H ₄ teta ^{[33] b}
logK ₁	11,3	11,36	11,07
logK ₂	5,59	9,73	9,75
logK ₃	2,88	4,54	4,31
logK ₄	/	4,41	3,46
logβ _n	19,77	28,59	30,04

^a I = 0,1 M NaNO₃ à 298 K. ^b I = 0,1 M KNO₃ à 298 K

Tableau 8 : Constante de protonation des ligands H₃nota H₄dota et H₄teta

Le mécanisme de protonation de ces ligands peut être déterminé par des études potentiométriques combinées à des études RMN ¹H en fonction du pH. La protonation directe de fonctions amine ou acide carboxylique entraîne une variation de déplacements chimiques des protons proches des fonctions protonées.

Une étude réalisée par D. Sherry *et al.*, a permis de déterminer avec précision le mécanisme de protonation du ligand H₃nota (**Schéma 1**)^[34]. Les première et deuxième protonations (logK₁ = 11,3 et logK₂ = 5,59) (**Tableau 8**) sont attribuées à deux fonctions amine tertiaire du macrocycle. L'introduction d'un second proton dans la cavité entraîne de fortes répulsions électrostatiques. Les deux fonctions acide carboxylique sont donc en interactions avec les fonctions amine tertiaire protonées et induisent par conséquent une troisième protonation (logK₃ = 2,88) sur l'acide carboxylique porté par l'amine non protonée symétrique aux deux autres.

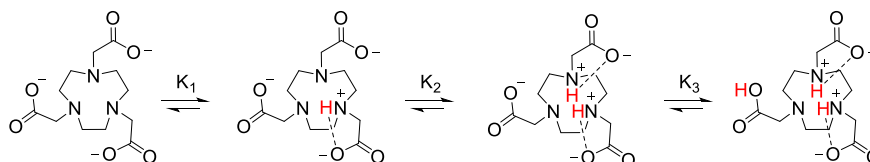


Schéma 1 : Mécanisme de protonation du H₃nota^[34]

IV. Stabilité thermodynamique des complexes

Lors de la réaction de complexation entre un métal et un ligand, plusieurs équilibres sont présents en solution en fonction du pH (**Tableau 9**). La stabilité thermodynamique d'un complexe est déterminée par sa constante de formation logK_{ML}. La première constante K_{ML} correspond à la constante d'équilibre de formation du complexe ML (M = métal) (L = ligand). En revanche, lors de la formation des complexes, plusieurs espèces coexistent en fonction du pH, comme les

complexes protonés MLH ou hydratés MLOH ce qui ne permet pas d'utiliser la constante $\log K_{ML}$ pour comparer les stabilités thermodynamiques des complexes entre eux. Il est plus réaliste d'utiliser la constante de formation globale, qui prend en compte la basicité des ligands pour étudier la stabilité des complexes. La seconde est la résultante de la protonation d'un complexe pour former l'espèce MLH. La constante β_{mlh} rend compte de l'interaction entre un ligand et un métal donné. Plus cette constante est grande, plus l'affinité métal-ligand est importante. Finalement, pour comparer complètement des ligands entre eux, possédant des basicités différentes, la détermination du pM est nécessaire. Le pM ($pM = -\log[M^{n+}_{libre}]$) est calculé pour 10 équivalents de ligand par rapport au métal à pH 7,4 et température ambiante [35]. Plus cette constante est élevée, meilleure est la stabilité thermodynamique du complexe formé [36].

Constantes	Equilibres
$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]}$	$L + M \xrightleftharpoons{K_{ML}} ML$
$K_{MLH} = \frac{[MLH]}{[H][ML]}$	$ML + H \xrightleftharpoons{K_{MLH}} MLH$
$K_{MLH_n} = \frac{[MLH_n]}{[H]^n[ML]}$	$ML + nH \xrightleftharpoons{K_{MLH_n}} MLH_n$
$\beta_{mlh} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h}$	$mM + lL + hH \xrightleftharpoons{\beta_n} M_m L_l H_h$

Tableau 9 : Principales constantes de formation de complexe et équilibres associés

Les valeurs des constantes de formation des complexes du cuivre formés à partir des ligands polyazotés tacn, cyclen et cyclam, déterminées par potentiométrie et issues de la littérature [33,37] sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 10**).

	tacn [37] a	cyclen [33] b	cyclam [33] c
$\log K_{CuL}$	17,50	23,3	26,51
a I = 0,5 M KNO ₃ à 298 K. b I = 0,1 M NaNO ₃ à 298 K. c I = 0,1 M KNO ₃ à 298 K			

Tableau 10 : Constante de formation $\log K_{CuL}$ des complexes $[Cu(tacn)]^{2+}$, $[Cu(cyclen)]^{2+}$ et $[Cu(cyclam)]^{2+}$

Le tacn possède une constante de formation $\log K_{CuL}$ égale à 17,50, contre 23,30 et 26,50 pour les dérivés tétraazamacrocycliques cyclen et cyclam respectivement. Ces valeurs démontrent l'influence de la cavité macrocyclique (taille et/ou nombre d'atomes d'azote) sur la stabilité thermodynamique des complexes. En accord avec les postulats de A. E. Martel *et al.* [36], on remarque que le tacn forme trois cycles chélates à cinq chaînons, ce qui est moins adapté pour

la complexation du Cu^{2+} (**Figure 14**). Le cyclam apparaît comme un ligand particulièrement adéquat pour la complexation du cuivre (II) du fait de la formation de deux cycles à cinq chaînons et de deux autres cycles à six chaînons, ce qui lui confère une meilleure stabilité.

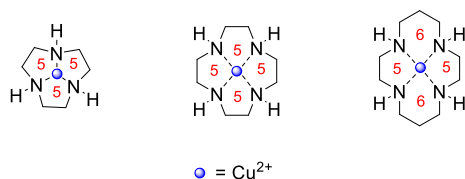


Figure 14 : Influence de la cavité macrocyclique

Les données de stabilité thermodynamique des ligands H_3nota , H_4dota et H_4teta vis-à-vis de la complexation du cuivre (II) issues de la littérature ^[29,38] sont réunies dans le tableau ci-dessous (**Tableau 11**).

	H_3nota ^[38]	H_4dota ^[29]	H_4teta ^[29]
$\log K_{\text{CuL}}$	21,63	22,21	21,60
$\log \beta_{\text{CuL}}$	22,02 ^a	32,71 ^b	28,20 ^b
$\text{pCu} = -\log[\text{Cu}]_{\text{libre}}$	17,61	15,20 ^[39]	14,20 ^[40]

^a I = 0,1 M KNO_3 à 298 K. ^b I = 0,1 M $(\text{CH}_3)_4\text{NNO}_3/\text{Cl}$ à 298 K

Tableau 11 : Constantes thermodynamiques des ligands H_3nota , H_4dota et H_4teta pour l'ion Cu^{2+}

Les ligands H_3nota , H_4dota et H_4teta avec des constantes de complexation $\log K_{\text{CuL}}$ comprises entre 21,60 et 22,21 forment, encore une fois, des complexes de cuivre avec des stabilités thermodynamiques similaires. La constante de formation globale du complexe de Cu(II) avec le ligand H_3nota ($\log \beta_{\text{CuL}} = 22,02$) est moins importante que celles des dérivés tétraazamacrocycliques (32,71 pour le H_4dota et 28,20 pour le H_4teta). La valeur plus faible obtenue pour le H_3nota est due au nombre de sites protonables inférieurs.

Pour finir, le pCu du H_3nota est égal à 17,61 contre 15,20 et 14,20 pour les ligands H_4dota et H_4teta respectivement (**Tableau 11**). Ceci montre que le complexe de cuivre formé avec le H_3nota est plus stable thermodynamiquement que ceux formés avec les analogues tétraazamacrocycliques à pH physiologique.

V. Inertie cinétique des complexes

La dissociation des complexes de cuivre (II) peut être la résultante d'une compétition avec divers ligands compétiteurs, aussi appelée transchélation. Elle peut également provenir d'une

compétition avec des anions (phosphates, etc...) ou des cations (Zn^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , etc...), plus communément appelée transmétallation. Généralement la transmétallation est déterminée expérimentalement par compétition avec différents cations relatifs au milieu ciblé pour une application donnée. La dissociation d'un complexe en milieu acide est une technique très utilisée pour évaluer l'inertie des complexes, l'excès de protons pouvant mimer la compétition avec d'autres cations. Pour ce faire dans le cas du Cu(II), le suivi cinétique de la dissociation des complexes est souvent étudié par spectroscopie UV-visible, en suivant la disparition de la bande d'absorption d-d du complexe, signature de la dissociation du complexe. Ce suivi permet de déterminer ainsi le temps, dit, de demi-vie du complexe.

Les groupes de K. Wieghardt et G. R. Weisman ont étudié la dissociation des complexes en milieu acide chlorhydrique 5M des complexes de Cu(II) avec les dérivés du $H_3\text{nota}$ $H_4\text{dota}$ et $H_4\text{teta}$ a été évaluée dans un milieu HCl 5M à différentes température ^[41,42] (**Tableau 12**).

	[Cu(nota)] ⁻ [41]	[Cu(dota)] ²⁻ [42]	[Cu(teta)] ²⁻ [42]
HCl 5M 90°C	/	< 1 min	4,5 min
HCl 5M 50°C	/	/	/
HCl 5M 30°C	< 1 min	/	3,5 j

Tableau 12 : temps de demi-vie des complexes Cu(II) en milieu acide

Le dissociation du complexe [Cu(**nota**)]⁻ et du [Cu(**dota**)]²⁻ est quasiment instantanée en milieu HCl 5M, à 30°C ou 90°C. Le complexe [Cu(**teta**)]²⁻ est plus inerte, avec des temps de demi-vie respectivement de 4,5 min et 3,5 jours dans de l'acide chlorhydrique 5M à 90°C et 30°C.

VI. Stabilité électrochimique

1. Principe de la voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique, aussi appelée voltampérométrie cyclique, est une technique électrochimique permettant d'étudier les propriétés d'oxydo-réduction d'un cation métallique. Elle repose sur la mesure de la variation de courant électrique induite par une variation continue de potentiel électrochimique appliquée par l'électrode de travail. Ces variations de courants sont dues aux réactions électrochimiques se produisant à la surface de l'électrode de mesure et sont liées à la charge des espèces en solution. En pratique, le montage est souvent composé d'une cellule électrochimique et de trois électrodes, une électrode de travail permettant de mesurer le courant,

une électrode de référence pour la calibration interne et une contre électrode. Dans le cas des complexes de Cu(II), l'étude est réalisée par balayage vers des valeurs négatives (réduction de Cu(II) en Cu(I)) puis un balayage retour est effectué afin de réoxyder le Cu(I) en Cu(II) et de juger de la réversibilité électrochimique du complexe.

Le tracé du voltamogramme $I = f(E)$ permet d'obtenir des informations relatives au potentiel de réduction et d'oxydation ainsi qu'au courant échangé mais également à la stabilité des complexes étudiés. Les complexes peuvent être classés selon trois différents comportements électrochimiques, ils peuvent être soit réversibles, quasi-réversibles ou irréversibles. Un exemple de voltamogramme pour un système réversible et irréversible est présenté ci-après (**Figure 15**). Un système est considéré comme réversible si la relation concernant les potentiels $\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = 60 \text{ mV}$ est respectée pour un échange mono-électronique et si le rapport des courants $\frac{I_{pc}}{I_{pa}}$ est égal à 1. Les systèmes pour lesquels ces paramètres sont proches de 60 mV et 1, sont considérés quasi-réversibles. Les systèmes irréversibles sont caractérisés par un décalage de potentiels supérieur à 100 mV ou alors par une absence de vague de réduction.

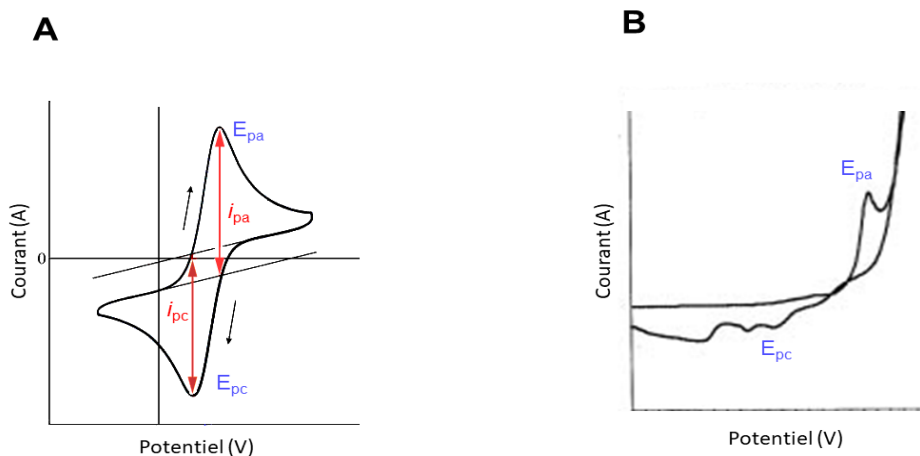


Figure 15 : Exemples de voltamogrammes cycliques de complexes de Cu(II) : système réversible (**A**) ; système irréversible (**B**)

2. Stabilité électrochimique des complexes $[\text{Cu}(\text{nota})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dota})]^{2-}$ et $[\text{Cu}(\text{teta})]^{2-}$

La stabilité électrochimique (**Tableau 13**) des complexes $[\text{Cu}(\text{nota})]^-$, $[\text{Cu}(\text{dota})]^{2-}$ et $[\text{Cu}(\text{teta})]^{2-}$ étudiée par G. R. Weisman *et al.* montrent que ces derniers sont réduits difficilement comme en témoignent les valeurs des potentiels de réduction compris entre -0,70 et -0,98V (vs ENH) [29,42].

Ils possèdent cependant une irréversibilité électrochimique ce qui peut se traduire par une dissociation des complexes après réduction du Cu(II) en Cu(I).

	[Cu(nota)] ⁻ [29]	[Cu(dota)] ²⁻ [42]	[Cu(teta)] ²⁻ [42]
E _{pc} (V) vs ENH	-0,70	-0,78	-0,98
Réversibilité	Irréversible	Irréversible	Irréversible

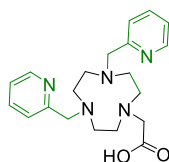
Tableau 13 : Caractéristiques électrochimiques des complexes [Cu(**nota**)]⁻, [Cu(**dota**)]²⁻ et [Cu(**teta**)]²⁻

VII. Conclusion sur les ligands acétate

Toutes les différentes études réalisées sur les polyazamacrocycles *N*-fonctionnalisés par des bras acétate montrent que le H₃**nota** forme un complexe de Cu(II) stable thermodynamiquement et plus inerte cinétiquement que ceux formés avec les ligands H₄**dota** et H₄**teta**. Ces études prouvent également que la plateforme macrocyclique de type tacn est adaptée une fois fonctionnalisée pour la complexation du Cu²⁺. Malgré de très bonnes propriétés thermodynamiques le H₃**nota** n'est pas assez inerte cinétiquement ni stable d'un point de vue électrochimique, justifiant l'engouement de nombreuses équipes de recherches pour élaborer de nouveaux chélates de cuivre (II) à partir d'une plateforme tacn.

VIII. Ligands dérivés du tacn étudiés au laboratoire

L. Spiccia *et al.* ont étudié en 2008, le ligand Hno**2py1a**, un analogue du H₃**nota**, où deux fonctions acétate sont remplacées par deux fonctions méthylpyridine (**Figure 16**). Couplé à un polypeptide et radiomarqué au cuivre-64, le complexe possède une inertie cinétique en milieu compétiteurs supérieure à celles du [Cu(**nota**)]⁻ [43].



Hno**2py1a**

Figure 16 : Structure du ligand Hno**2py1a**

Au laboratoire, le choix de la *N*-fonctionnalisation du tacn s'est, entre autres, axé sur l'emploi de bras méthylpyridine. Mélissa Roger, durant sa thèse a développé en particulier deux nouveaux ligands *N*-fonctionnalisés par trois groupements méthylpyridine (**no3py**) et deux groupements méthylpyridine et un groupement picolinate (**Hno2py1pa**) (**Figure 17**).

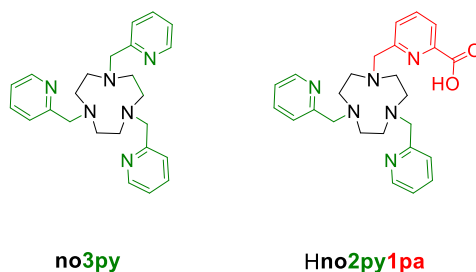


Figure 17 : Structure des ligands **no3py** et **Hno2py1pa**

Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons seulement aux propriétés thermodynamiques et à l'inertie cinétique des complexes formés avec ces ligands **no3py** et **Hno2py1pa**. Cette étude bibliographique sera comparée avec les propriétés du complexe de Cu(II) du H_3nota .

1. Structure à l'état solide et propriétés spectroscopiques

Les structures aux rayons X des deux complexes, issues de la littérature ^[10,44] sont représentées ci-après (**Figure 18**). La structure cristallographique du complexe $[Cu(\text{no3py})]^{2+}$ a été décrite en 2004 par P. Cheng *et al.* ^[44] Le cation métallique est complexé par trois atomes d'azote du macrocycle et trois atomes d'azote des bras méthylpyridine. La sphère de coordination est de type $CuN_3N'_3$ puisque trois liaisons sont proches de 2,0 Å alors que trois autres sont proches de 2,2 Å. L'angle dièdre moyen (φ) est égal à 27,24° ce qui confère au complexe un caractère octaédrique déformé. L'analyse de la structure à l'état solide permet de déterminer la stéréochimie du complexe qui est $\Delta(\delta\delta\delta)$.

Mélissa Roger a étudié le ligand **no2py1pa-ester** comme analogue bifonctionnel du **no3py** ^[11]. Il s'agit d'un tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine et un groupement picolinate sous sa forme ester méthylique. Le cation métallique est donc coordiné par les trois atomes d'azote du macrocycle et les trois atomes d'azote des bras coordinants, ce qui entraîne

une sphère de coordination de type $\text{CuN}_3\text{N}'_3$. L'angle de torsion moyen est égal à $42,4^\circ$, cette déformation est due à la gêne stérique engendrée par la présence de la fonction ester méthylique du picolinate. L'isomère $\Delta(\delta\delta\delta)$, présent à l'état solide, est dans une géométrie octaédrique déformée.

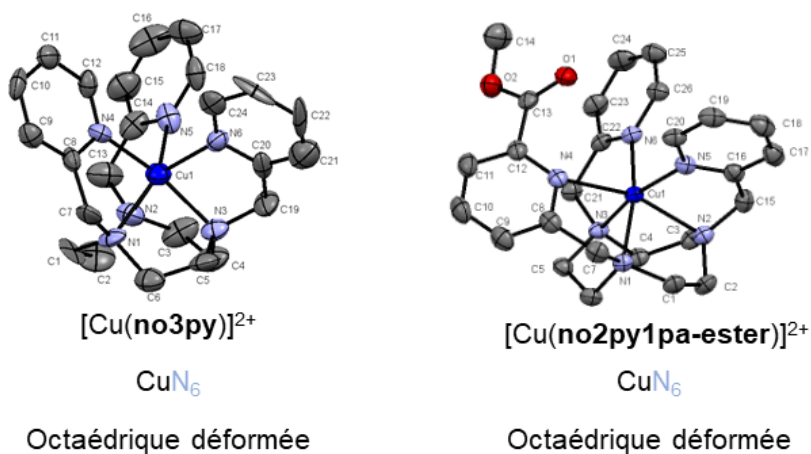


Figure 18 : Structures à l'état solide des complexes $[\text{Cu}(\text{no3py})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{no2py1pa-ester})]^{2+}$ issues de la littérature [10,44]

Les deux complexes présentent en spectroscopie UV-visible une bande large d'absorption centrée à 683 et 652 nm à pH neutre, pour $[\text{Cu}(\text{no3py})]^{2+}$ [9] et $[\text{Cu}(\text{no2py1pa})]^{2+}$ [10] ce qui témoigne également d'une géométrie pseudo-octaédrique en solution.

2. Propriétés thermodynamiques

L'étude par potentiométrie de la complexation du Cu^{2+} avec les ligands **no3py** et **Hno2py1pa**, a permis de déterminer les constantes de formation. Les propriétés thermodynamiques des complexes de Cu(II) sont répertoriées ci-dessous (**Tableau 14**).

	H₃nota [38]	no3py [9]	Hno2py1pa [10]
Log K_{CuL} ^a	21,63 ^a	27,40	20,96
Log β_{CuL}	22,02	-	20,96
pCu	17,61	23,7	17,75

^a I = 0,10 M KNO_3

Tableau 14 : Caractéristiques thermodynamiques des complexes de Cu(II) formés à partir des dérivés **H₃nota**, **no3py** et **Hno2py1pa** [8,9,38]

Le ligand **no3py**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par trois groupements méthylpyridine, possède une constante de formation avec le Cu²⁺ de l'ordre de 27,40 contre 21,63 pour le H₃**nota**. Ceci est la conséquence de la meilleure affinité du cuivre pour les atomes d'azote par rapport aux atomes d'oxygène [1]. L'introduction d'un groupement picolinate amoindrit cette très bonne stabilité thermodynamique puisque la constante de formation du complexe [Cu(**no2py1pa**)⁺] est égale à 20,96. La comparaison des pCu de ces deux complexes permet de rendre compte également de leur stabilité thermodynamique avec un pCu égal à 23,7 pour le ligand **no3py**, contre 17,61 pour le H₃**nota**. Le ligand **Hno2py1pa** reste un très bon chélatant du cuivre (II) puisqu'il affiche un pCu égal à 17,75, du même ordre de grandeur que celui du H₃**nota**.

3. Inertie cinétique

Une étude de l'inertie cinétique des complexes en milieu acide chlorhydrique 3M à 90°C a permis d'obtenir les valeurs de temps de demi-vie de ces complexes (**Tableau 15**).

	[Cu(nota)] ⁻ [38]	[Cu(no3py)] ²⁺ [9]	[Cu(no2py1pa)] ⁺ [10]
HCl 3M 90°C	< 1 min	34h	204 min

Tableau 15 : Temps de demi-vie des complexes [Cu(**nota**)]⁻, [Cu(**no3py**)]²⁺ et [Cu(**no2py1pa**)]⁺ en milieu HCl 3M à 90°C

Dans ces conditions, le complexe [Cu(**no3py**)]²⁺ présente la plus grande inertie cinétique avec un temps de demi-vie égal à 34h. Le complexe [Cu(**no2py1pa**)]⁺ possède un temps de demi-vie de 204 minutes, qui témoigne tout de même de son inertie en milieu compétiteur.

4. Stabilité électrochimique

La stabilité électrochimique des complexes a été évaluée afin d'étudier la réversibilité des systèmes électrochimiques. Les valeurs obtenues sont répertoriées ci-dessous (**Tableau 16**).

	[Cu(nota)] ⁻ [29]	[Cu(no3py)] ²⁺ [9]	[Cu(no2py1pa)] ⁺ [10]
E°(V) vs ENH	-0,70	-0,41	-0,38
Réversibilité	Irréversible	Quasi-réversible	Quasi-réversible

Tableau 16 : Caractéristiques électrochimiques des complexes de Cu(II) issues de la littérature

Les complexes de type CuN_6 formés avec les ligands **no3py** et **Hno2py1pa** sont plus facilement réductibles que le complexe $[\text{Cu}(\text{nota})]^-$ puisqu'ils possèdent des potentiels de réduction de -0,41 et -0,38V (vs. ENH) respectivement. En revanche, le caractère quasi-réversible de ces deux complexes en fait cependant des complexes inertes, stabilisant à la fois le Cu(II) et le Cu(I).

5. Conclusions

Ces premières études au laboratoire, réalisées par Mélissa Roger, sur ces deux dérivés du tacn tri-*N*-fonctionnalisé par trois groupements méthylpyridine (**no3py**) ou deux groupements méthylpyridine et un groupement picolinate (**Hno2py1pa**) ont montré la très forte stabilité thermodynamique ainsi que l'inertie cinétique et la stabilité électrochimique des complexes formés avec le Cu^{2+} .

Tous ces résultats témoignent de l'intérêt des ligands polyazotés à base de tacn pour l'élaboration de complexes de cuivre (II) stables. Nous avons vu également que l'habillage du macrocycle de façon contrôlée permet de modifier les propriétés de coordination des ligands. La prochaine partie de ce chapitre sera axée sur la chimie de synthèse et les méthodes de *N*-fonctionnalisation régiospécifique du tacn mises au point jusqu'à nos jours.

3 Synthèse et *N*-fonctionnalisation du tacn

Les ligands azamacrocycliques dérivés du tacn, font de plus en plus l'objet de recherches puisqu'ils sont aptes à former des complexes extrêmement stables avec les cations métalliques. Ce petit macrocyclique a fait l'objet de plusieurs revues sur le sujet, tant en chimie de coordination qu'en application pour le biomimétisme ou encore l'imagerie médicale [45–47]. Cette partie est dédiée aux voies de synthèse du tacn et aux méthodes de *N*-fonctionnalisation développées pour pouvoir contrôler l'habillage de ce macrocycle.

I. Rappels sur la synthèse du tacn

Une des premières synthèses rapportée du tacn repose sur la méthode de cyclisation décrite par J. E. Richman et T. J. Atkins [48]. Le schéma réactionnel proposé est présenté ci-dessous (**Schéma 2**).

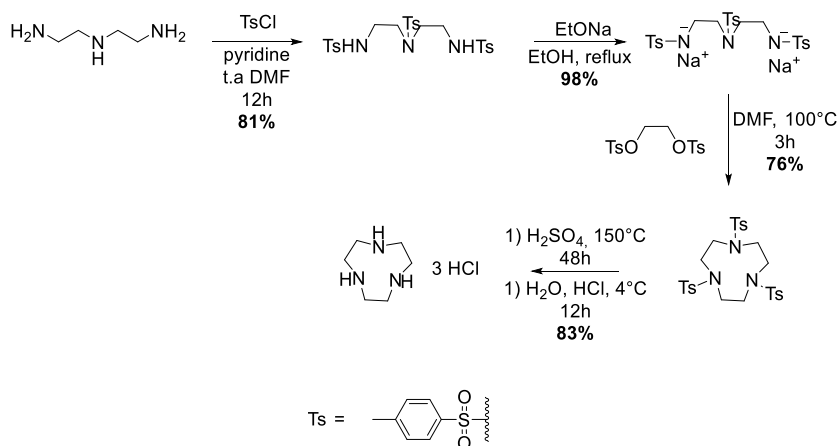


Schéma 2 : Voie de synthèse du tacn décrite par J. E. Richman et T. J. Atkins [48]

A partir de la diéthylènetriamine, une première étape de *N*-fonctionnalisation des fonctions amine par des groupements tosyle, permet de préorganiser la triamine en introduisant des groupements encombrants pour favoriser la cyclisation [49]. La déprotonation des fonctions amine secondaires est ensuite réalisée par action de l'éthanoate de sodium, afin d'obtenir un sel d'amidure plus réactif. L'étape de cyclisation avec un bis-tosylate permet d'obtenir le produit de cyclisation [1+1]. Enfin l'étape de déprotection des groupements tosyle est réalisée dans des conditions acides ce qui permet d'obtenir le tacn sous sa forme chlorhydrate avec un rendement global de 50% en 4

étapes. Bien que cette synthèse soit une des plus utilisées, elle reste peu économique en atome et les conditions expérimentales drastiques de déprotection des groupements tosylé représente un inconvénient majeur.

Récemment, l'équipe de F. Denat a travaillé sur l'élaboration du tacn selon un schéma réactionnel différent (**Schéma 3**) [50].

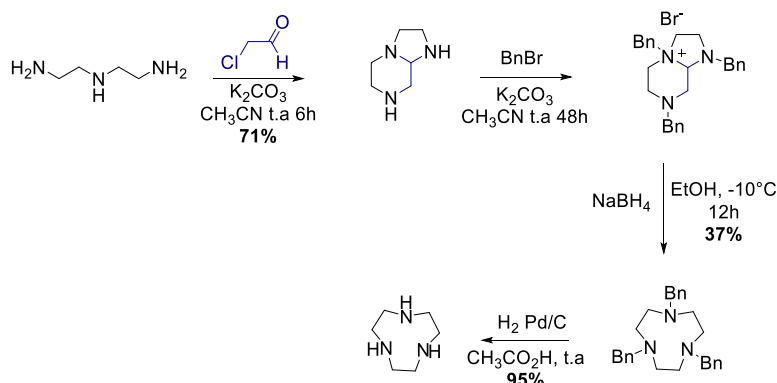


Schéma 3 : Voie de synthèse du tacn décrite par F. Denat *et al.* [50]

Une première étape fait intervenir une réaction de cyclisation entre la diéthylènetriamine et le chloroacétaldéhyde qui permet d'obtenir un macrobicyclic. Ce synthon est ensuite engagé dans une étape de tri-*N*-fonctionnalisation par du bromure de benzyle. L'ammonium ainsi formé peut être réduit avec du borohydrure de sodium, réduisant ainsi la liaison carbone aminal - ammonium et permettant de former le cycle tacn. Finalement, la déprotection des groupements benzyle effectuée par hydrogénolyse catalysée au palladium conduit au tacn avec un rendement global de 25% en 4 étapes. Les optimisations réalisées sur ces synthèses ont permis d'obtenir le tacn à hauteur de la trentaine de grammes en seulement quelques jours.

Dernièrement, Z. Wu *et al.* ont élaboré une nouvelle voie de synthèse (**Schéma 4**), plus rapide que les deux précédentes, qui permet d'obtenir le tacn en l'espace de quelques jours [51]. L'alkylation de la *N,N*-dibenzyléthane-1,2-diamine par du chlorure de 2-chloroacétyle conduit au composé di-*N*-fonctionnalisé avec un très bon rendement. La réaction avec de la benzylamine entraîne la formation du tacn portant deux fonctions amide et tri-*N*-fonctionnalisé par des groupements benzyle. A partir de ce dérivé, il est nécessaire de réaliser deux étapes de déprotection pour obtenir le tacn. La première consiste à réduire les fonctions amide du

macrocyclique par action du LiAlH_4 au reflux du THF. Enfin une hydrogénéolyse catalytique conduit au tacn avec un rendement global de 45% en 4 étapes.

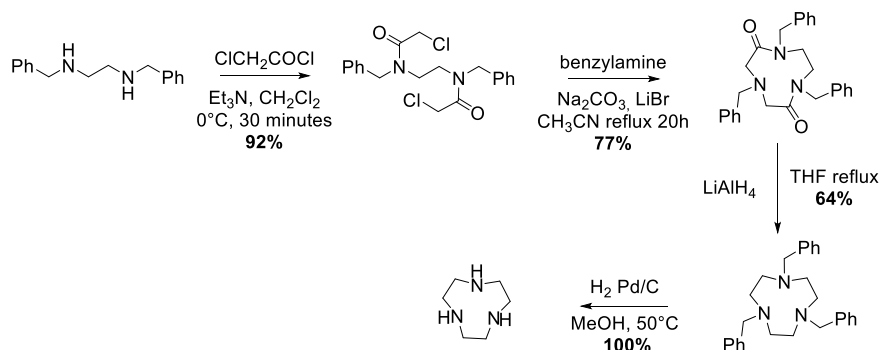


Schéma 4 : Voie de synthèse du tacn décrite par Z. Wu *et al.* [51]

Ces différentes méthodes d'obtention du tacn développées au cours de ces dernières décennies montrent l'intérêt porté par les chimistes pour ce petit macrocycle. De cette plateforme macrocyclique, un très grand nombre de ligands ont vu le jour pour la complexation de cations de métaux de transitions, de lanthanides et d'anions. Toutefois pour modifier les propriétés complexantes des ligands en fonction de l'application visée, il est nécessaire de savoir fonctionnaliser le ligand de manière contrôlée.

II. Méthodes de *N*-fonctionnalisation du tacn

1. *N*-fonctionnalisation statistique

La *N*-fonctionnalisation statistique est une technique d'alkylation dans laquelle l'électrophile est introduit dans les mêmes proportions que le nombre de fonctions amine secondaires à substituer sur le tacn. Ce genre de fonctionnalisation conduit systématiquement à un mélange de produits (tacn libre, mono-, di- et tri-*N*-fonctionnalisé). Dès lors, la purification des composés est souvent très complexe et aboutit à de faibles rendements.

X. Ma *et al.* ont étudié l'influence des conditions expérimentales (**Tableau 17**) pour la synthèse de tacn di-*N*-fonctionnalisé par des groupements acétate (**Schéma 5**) [52].

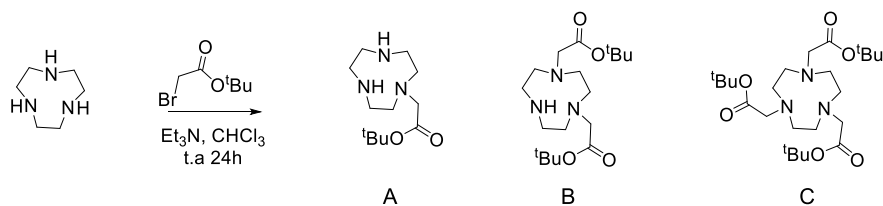


Schéma 5 : Voie de synthèse de dérivés *N*-fonctionnalisés par alkylation statistique décrite par X. Ma *et al.* [52]

Les chercheurs ont varié la quantité de base introduite et celle d'agent électrophile. Ils ont choisi d'utiliser un ratio 2,2 / 1 (agent électrophile / tacn) ou un ratio 1,8 / 1, afin de déterminer les conditions optimales pour l'obtention du dérivé di-*N*-fonctionnalisé (**B**) (**Tableau 17**).

Tests	tacn (ég)	Et ₃ N (ég)	BrCH ₂ CO ₂ ^t Bu (ég)	Produits
1	1	4	2,2	C >>>> B
2	1	1	1,8	A ≈ C ≥ B
3	1	0	1,8	B (26%), C (33%)

Tableau 17 : Conditions expérimentales étudiées pour la synthèse de dérivés di-*N*-substitués du tacn

Pour un ratio 2,2 / 1 (agent électrophile / tacn) et 4 équivalents de base (test 1), le dérivé tri-*N*-fonctionnalisé est largement majoritaire par rapport au composé (**B**) souhaité. Lorsqu'un léger défaut d'agent électrophile est utilisé par rapport au nombre de positions à substituer et en utilisant 1 équivalent de base (test 2), les composés mono- et tri-*N*-fonctionnalisés sont majoritaires par rapport au dérivé di-*N*-fonctionnalisé. Enfin le composé di-*N*-fonctionnalisé est obtenu avec un rendement de 26% seulement lorsqu'un léger défaut d'agent électrophile, sans présence de base (test 3).

Les résultats obtenus par la technique d'alkylation statistique ne sont vraiment pas optimaux pour la synthèse de composés mono- et di-*N*-fonctionnalisés de manière régiospécifique. Les chercheurs ont par conséquent développé des techniques de *N*-fonctionnalisation régiospécifique par l'intermédiaire d'étapes de protections sélectives des fonctions amine secondaires du tacn.

2. *N*-fonctionnalisation sélective par utilisation de groupements protecteurs

a. Utilisation de groupements tosylés

Comme vu précédemment (**Schéma 2**) la déprotection des groupements tosylés effectuée au reflux de l'acide sulfurique conduit au tacn totalement déprotégé. Une alternative permettant une

déprotection partielle des groupements tosylé (**Schéma 6**) peut être effectuée dans un mélange acide bromhydrique 33% / acide acétique, ce qui conduit de manière spécifique au tacn mono-protégé ^[53]. Il est possible d'obtenir des dérivés mono- ou di-*N*-fonctionnalisés à partir de cet intermédiaire. L'obtention de dérivés di-*N*-fonctionnalisés est possible, après *N*-fonctionnalisation du dérivé mono tosylé puis déprotection du groupement tosylé ^[54].

Dans le cas de l'élaboration de composé mono-*N*-fonctionnalisé, une première étape d'alkylation par du chlorure de tosylé en milieu basique, conduit au dérivé ditosylé. Après réaction avec un électrophile et déprotection des groupements protecteurs dans l'acide sulfurique, le composé mono-*N*-fonctionnalisé est obtenu ^[53].

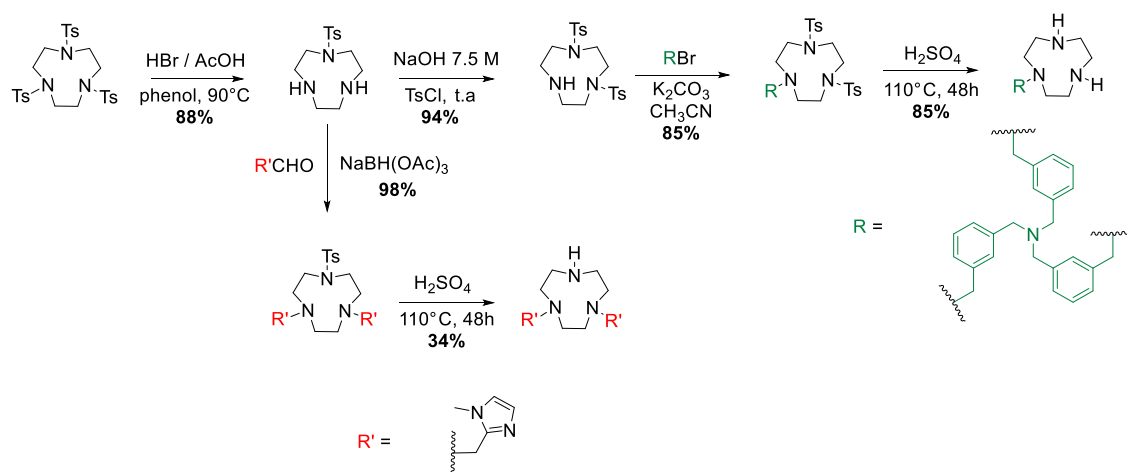


Schéma 6 : Synthèse de dérivés mono- ^[53] et di-*N*-fonctionnalisés ^[54] à partir du tacn tritosylé ^[53]

b. Utilisation de groupements Boc

D. Sherry *et al.*, ont mis au point une méthode directe de *N*-protection sélective de deux fonctions amine secondaires du macrocycle par des groupements Boc (tertiobutyloxycarbonyle) ^[55] (**Schéma 7**). La formation de composé tri-*N*-fonctionnalisé n'est pas observée à cause d'une gêne stérique induite par les groupement Boc.

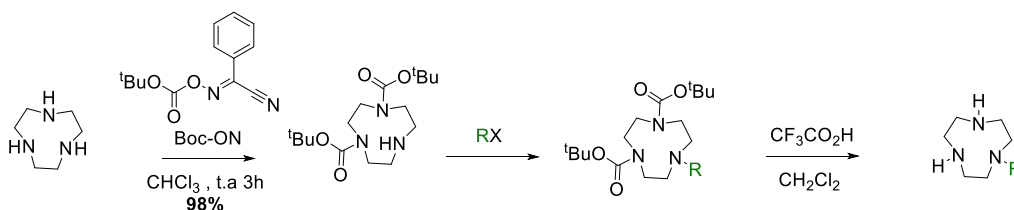


Schéma 7 : Di-*N*-protection du tacn par des groupements Boc ^[55]

Après protection des fonctions amine secondaires, il est possible d'introduire une variété de groupements par réaction de substitution nucléophile. Les groupements Boc peuvent ensuite être clivés par action de l'acide trifluoroacétique et conduire ainsi à des dérivés mono-*N*-fonctionnalisés.

Cette méthode a été utilisée par le groupe de C. J. Smith pour l'élaboration d'une nouvelle plateforme permettant la chélation du ^{99m}Tc , utilisée en médecine nucléaire (**Schéma 8**) [56].

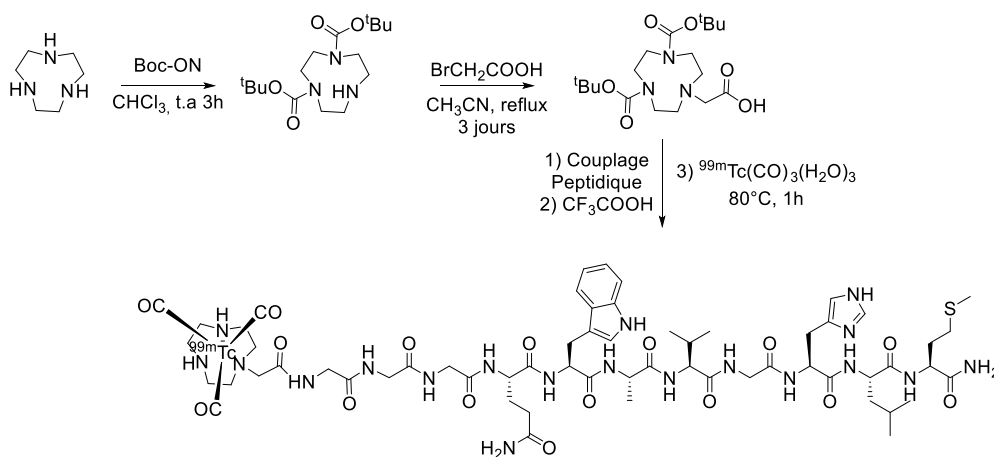


Schéma 8 : Voie de synthèse d'un radiopharmaceutique à base de tacn pour le diagnostic du cancer de la prostate [56]

3. *N*-fonctionnalisation sélective par reconstitution du cycle

En 2015, l'équipe de J. Hasserodt ont adapté la méthode décrite par F. Denat *et al.* [50] pour la synthèse de tacn substitué de façon « dissymétrique » de type $2R_1, R_2$ (**Schéma 9**) [57]. A partir de la diéthylènetriamine, une première étape d'amination réductrice en présence de deux équivalents d'aldéhyde, permet d'obtenir une triamine di-*N*-fonctionnalisée. L'intermédiaire cyclique est ensuite obtenu par réaction avec 1 équivalent de chloroacétaldéhyde. Il est par conséquent possible de former un ammonium avec un halogénure d'alkyle permettant ainsi d'obtenir après réduction du carbone aminal, un tacn tri-*N*-fonctionnalisé. Cette voie de synthèse permet ainsi d'élaborer en seulement quatre étapes des tacn tri-*N*-fonctionnalisé de manière dissymétrique et est applicable à l'échelle du gramme.

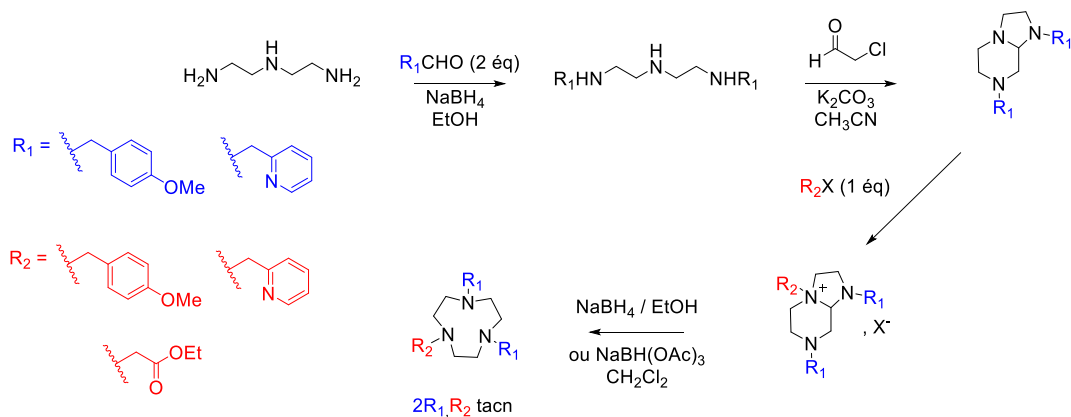


Schéma 9 : Synthèse de tacn dissymétrique décrite par J. Hasserodt *et al.* [57]

En 2018, C. C. Scarborough *et al.* ont adapté la méthode de synthèse mise au point par Z. Wu *et al.* [51] pour l'élaboration de tacn dissymétrique ($2\text{R}_1, \text{R}_2$ tacn) où les groupements R_1 sont des groupements alkyles secondaires et tertiaires [58]. La première étape de chloroacétylation d'une diamine di-*N*-fonctionnalisée permet d'obtenir un dérivé préorganisé qui, après réaction avec une seconde amine *N*-fonctionnalisée aboutit à un composé cyclique. La dernière étape consiste à réduire les fonctions amide par action du LiAlH_4 pour obtenir le tacn dissymétrique.

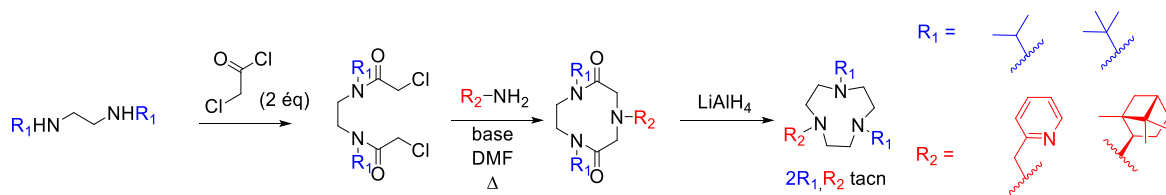


Schéma 10 : Méthode de synthèse dissymétrique décrite par C. C. Scarborough *et al.* [58]

Néanmoins cette méthode n'est pas adaptable à la synthèse de tacn comportant des groupements R_1 et R_2 sensibles aux conditions de réduction et limite par conséquent le domaine d'application de ces chélatants.

4. *N*-fonctionnalisation sélective par utilisation de la chimie des aminaux

Mélissa Roger, durant sa thèse au laboratoire, a mis au point une nouvelle stratégie de *N*-fonctionnalisation permettant d'obtenir des tacn mono- ou di-*N*-fonctionnalisés [59].

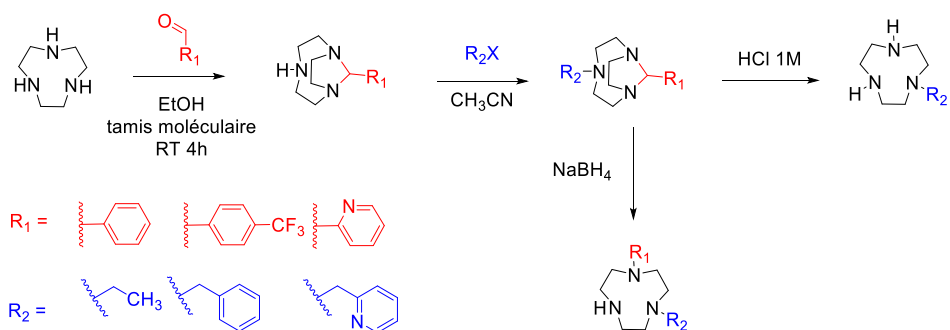


Schéma 11 : Voie de synthèse de tacn mono- et di-*N*-fonctionnalisés décrite par M. Roger *et al.* [59]

Cette méthode repose sur la protection simultanée de deux fonctions amine secondaires du macrocycle par réaction avec un aldéhyde aromatique donnant lieu à la formation d'un aminal cyclique. L'addition d'un halogénoalcane sur cet intermédiaire mène à la *N*-fonctionnalisation de l'autre amine secondaire. Un traitement acide clive l'aminal et donne le tacn mono-*N*-fonctionnalisé avec de très bons rendements en trois étapes. Une réduction directe de l'intermédiaire aminal par du NaBH₄ permet d'obtenir un tacn di-*N*-fonctionnalisé de façon dissymétrique.

5. *N*-fonctionnalisation sélective par l'intermédiaire d'un orthoamide

Une des méthodes de fonctionnalisation du tacn les plus utilisées, est une tri-*N*-protection des fonctions amine du tacn. Cette protection a été décrite en premier par T. J. Atkins en 1980 [60]. La réaction entre le tacn et le *N,N*-diméthylformamide diméthylacétal permet d'obtenir le tacn triprotégé de manière quantitative par formation d'un orthoamide (**Schéma 12**).

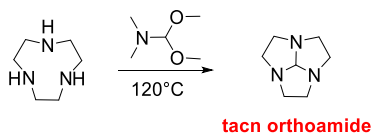


Schéma 12 : Première voie de synthèse du tacn orthoamide selon T. J. Atkins [60]

G. R. Weisman *et al.* ont repris cette synthèse pour l'élaboration d'analogues tri-*N*-fonctionnalisés du tacn (**Schéma 13**) [61]. Cette méthode consiste à protéger, *N*-fonctionnaliser et déprotéger sélectivement les atomes d'azote du macrocycle pour élaborer des dérivés tri-*N*-fonctionnalisés de manière régiospécifique.

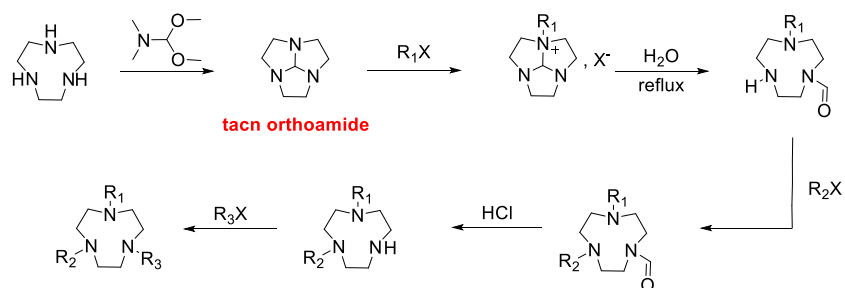


Schéma 13 : Voie de synthèse de tacn tri-*N*-fonctionnalisés selon G. R. Weisman *et al.* [61]

La première étape consiste à protéger les fonctions amine secondaires du tacn par action du *N,N*-diméthylformamide diméthylacétal. L'addition d'un halogénure d'alkyle conduit à la formation d'un ammonium qui précipite dans le milieu, ce qui permet d'isoler le produit et éviter la formation de dérivés di- ou tri-*N*-fonctionnalisés. L'hydrolyse de la fonction orthoamide à pH neutre conduit au dérivé possédant une amine secondaire protégée par une fonction amide, une autre tertiaire et une amine secondaire susceptible de réagir avec un second équivalent d'halogénure d'alkyle. Après hydrolyse de la fonction amide en présence d'acide chlorhydrique, il est possible d'introduire un troisième substituant sur l'amine secondaire alors obtenue.

M. Roger et L. Spiccia ont utilisé cette stratégie de synthèse pour l'élaboration des ligands **Hno2py1pa** [10] et **Hno2py1a** [43]. Cette méthode, très efficace, possède cependant deux inconvénients majeurs : le premier est lié à la formation d'un ammonium et est dépendant de la nature de l'électrophile utilisé. Le second levier à prendre en considération est l'étape d'hydrolyse de la fonction amide en milieu acide qui exclut l'introduction au préalable de groupements sensibles à ce milieu.

Conclusion du chapitre I

Au cours de ce chapitre bibliographique, nous avons rapidement présenté l'apport des ligands triazamacrocycles pour la complexation du cuivre (II). La première partie, dédiée à la chimie de coordination de ce métal de transition, a permis d'étudier les propriétés des complexes à l'état solide et en solution. Ensuite, les études réalisées par différents groupes sur les polyazamacrocycles H₃**nota**, H₄**dota** et H₄**teta** ont montré que le ligand H₃**nota**, possédait de très bonnes propriétés de complexation envers le Cu²⁺ (pCu = 17,33) par rapport à ses analogues tétraazamacrocycliques. Ces rappels ont permis d'apprécier le choix du tacn comme macrocycle de travail.

Des études sur des dérivés polypyridiniques du tacn (Hno**2py1a**, **no3py** et Hno**2py1pa**) développés par L. Spiccia d'une part et par M. Roger au cours de sa thèse au laboratoire d'autre part, ont permis de mettre en avant les excellentes propriétés de coordination de ces ligands, tant en matière de stabilité thermodynamique que d'inertie cinétique. Les ligands **no3py** et Hno**2py1pa** apparaissent comme des ligands de choix pour la complexation du Cu²⁺. Nous nous appuyerons sur ces résultats pour développer dans les chapitres II et IV des nouveaux chélatants à partir du Hno**2py1pa** et du **no3py** pour des applications en imagerie optique et dans l'élaboration d'un nouveau radiopharmaceutique pour l'imagerie TEP.

Enfin la troisième partie de ce chapitre était consacrée à un état de l'art sur la synthèse et les méthodes de *N*-fonctionnalisation mises au point par différents groupes, pour aboutir à un outil synthétique permettant l'habillage contrôlé du tacn. Les différentes méthodes décrites utilisent différents groupements protecteurs permettant de varier la nature des fonctions greffées sur le macrocycle selon l'application visée. Les chapitres II, III et IV feront référence à ces méthodes dans les parties décrivant l'obtention des ligands synthétisés durant ce travail.

Chapitre II : Synthèses de nouvelles plateformes
bimodales TEP-fluorescence et IRM-fluorescence à
base de ligands triazamacrocycliques

INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, les scientifiques ont étudié, par différents moyens et méthodes, comment visualiser et traiter les cancers. Un travail colossal a été effectué dans le domaine de l'imagerie, en utilisant des sondes moléculaires. Grâce à ces avancées, il est maintenant possible de localiser les cellules cancéreuses par différentes techniques, comme la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou encore l'imagerie optique de fluorescence (fluorescence) [62]. Ces différentes techniques d'imagerie sont actuellement très utilisées en médecine. Elles possèdent des résolutions spatiales et des sensibilités différentes qui les rendent complémentaires [63]. L'IRM et la fluorescence possèdent des résolutions spatiales allant du μm à la centaine de μm . La TEP, quant à elle, possède une résolution spatiale de l'ordre du millimètre et une sensibilité allant de 10^{-9} à 10^{-12} M (**Tableau 18**).

	TEP	IRM	fluorescence
Sensibilité	10^{-9} à 10^{-12} M	10^{-5} M	10^{-8} M
Résolution spatiale	> 1 mm	10-100 μm	100 nm

Tableau 18 : Caractéristiques de la TEP, l'IRM et de la fluorescence [63]

Afin de toujours chercher plus d'informations par l'image, les recherches s'orientent désormais vers l'élaboration de sondes multimodales, c'est-à-dire, combinant plusieurs modalités d'imagerie au sein de la même molécule. Cette quête du multimodal permet d'obtenir des informations de plus en plus précises en couplant les avantages de plusieurs techniques [64]. Les travaux réalisés dans ce domaine ont fait l'objet de plusieurs revues scientifiques ces dernières années [62,65,66].

Dans ce chapitre, nous verrons, dans un premier temps, les différentes imageries médicales qui ont attiré notre attention, à savoir la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'imagerie optique de fluorescence (fluorescence). Quelques exemples de sondes moléculaires issues de la littérature seront discutés. Après avoir présenté les deux familles de sondes bimodales TEP-fluorescence et IRM-fluorescence ciblées, nous nous intéresserons dans un second temps, à la synthèse et aux études réalisées sur une sonde de type TEP-fluorescence. Les travaux réalisés sur une potentielle sonde de type IRM-fluorescence feront l'objet de la fin de ce chapitre.

1 L'imagerie TEP

I. Principe

La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie utilisant des radioisotopes émetteurs de positons β^+ . Découverte durant le siècle dernier [67], la TEP a désormais pris une importance considérable dans le domaine de la médecine nucléaire du fait de sa forte sensibilité et de sa capacité à diagnostiquer des tumeurs à un stade précoce. Cette technique permet de mesurer la répartition d'une molécule marquée par un radionucléide émetteur de positons. Le principe de fonctionnement repose sur la rencontre entre un positon et un électron avoisinant (**Figure 19**). Lorsque ces deux particules se rencontrent, il se produit un phénomène d'annihilation. L'annihilation du positon par collision avec un électron entraîne l'émission de deux photons γ , d'énergie égale, à 511 keV et de directions opposées. Ces photons γ peuvent être détectés par des caméras gamma présentes autour du patient.

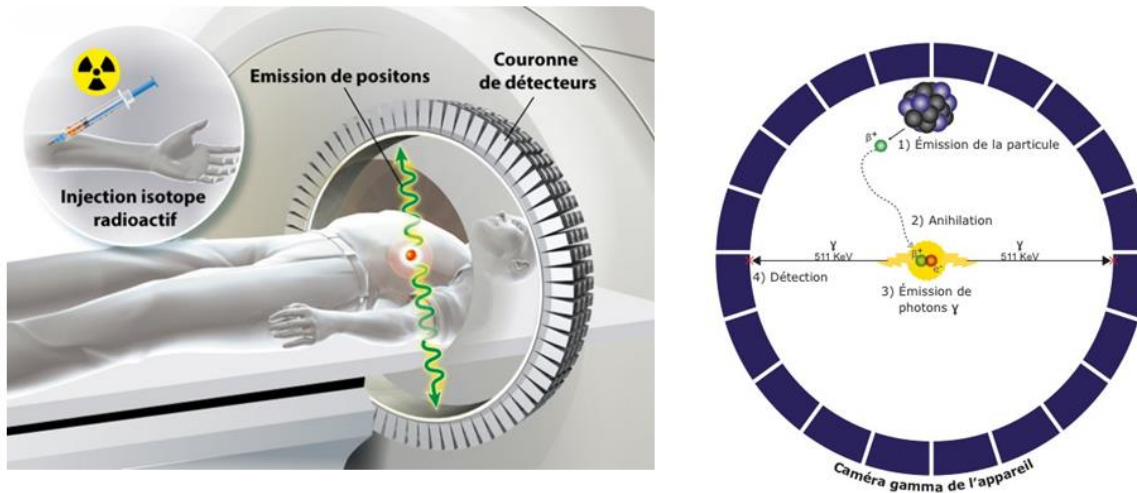


Figure 19 : Principe de fonctionnement de la TEP extraite de la littérature [68]

II. Radionucléides utilisés en TEP

Il existe de nos jours plusieurs radionucléides utilisés couramment en clinique ou en recherche pour l'imagerie médicale. Les premiers éléments utilisés pour le diagnostic du cancer ou l'étude de processus biologiques sont le ^{11}C , le ^{13}N et l' ^{15}O . Cependant, leur temps de demi-vie, respectivement de 20, 10 et 2 minutes sont très courts ce qui est un réel inconvénient pour une application biomédicale.

Le choix du radionucléide (dont certains exemples sont présentés dans le **Tableau 19**) pour un scanner TEP est un des paramètres les plus importants. L'introduction du radionucléide par liaison covalente, nécessite souvent une synthèse longue vis-à-vis du temps de demi-vie de l'élément radioactif et une purification complexe. La désintégration des radionucléides peut se faire par émission d'une particule β^+ , ou d'une capture électronique entraînant l'émission d'un positon, ou encore par l'émission d'une particule β^- .

Radionucléides	Temps de demi-vie ($t_{1/2}$)	Energies	Applications
^{11}C	20,3 min	β^+ 98% CE 2%	TEP
^{13}N	10 min	β^+ 100%	TEP
^{15}O	2,04 min	β^+ 100%	TEP
^{18}F	109 min	β^+ 97% CE 3%	TEP
^{64}Cu	12,7h	β^+ 19% CE 41% β^- 19%	TEP
^{68}Ga	68 min	β^+ 90% CE 10%	TEP
^{89}Zr	78,5 h	β^+ 33% CE 77%	TEP

Tableau 19 : Liste de quelques radionucléides utilisés en TEP. β^+ (positon), CE (capture électronique)

Le fluor-18 (^{18}F) est actuellement le radioisotope le plus utilisé en clinique. C'est un radioisotope émetteur β^+ à 97% qui possède un temps de demi-vie relativement court égal à 109 minutes. Le radiopharmaceutique à base de ^{18}F , le plus employé au quotidien ^[69], est le

2-[¹⁸F]fluoro-2-déoxy-D-glucose, communément appelé ¹⁸F-FDG (**Figure 20**). Le motif glucose joue le rôle de vecteur biologique et permet une plus grande accumulation du radiopharmaceutique dans les cellules très consommatrices en glucose comme le cerveau, le foie et aussi les cellules cancéreuses.

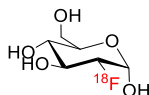


Figure 20 : Structure du ¹⁸F-FDG

Ce radiopharmaceutique peut être obtenu par fluorination électrophile à partir du 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal en présence de ¹⁸F-F₂ (**Schéma 14**) [70].

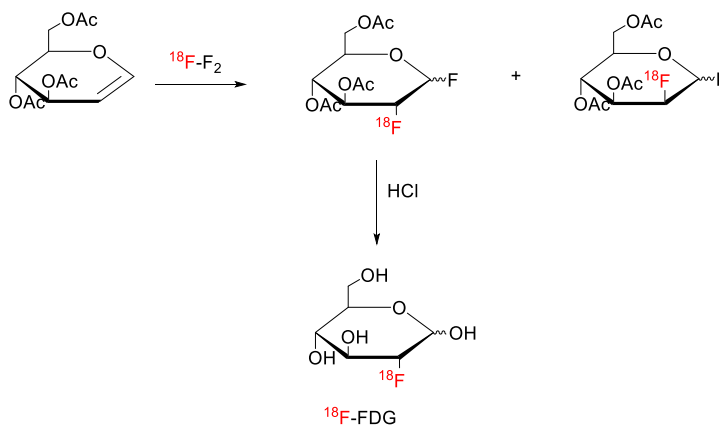


Schéma 14 : Synthèse du ¹⁸F-FDG par fluorination électrophile [70]

Cependant, cette stratégie de synthèse permet d'obtenir seulement 8% de composé radiomarqué en 2h. Elle n'est donc pas viable au vu du temps de demi-vie du radionucléide pour une application en clinique en raison du temps de demi-vie du ¹⁸F.

Hamacher *et al.* ont mis au point une synthèse bien plus efficace par fluorination nucléophile (**Schéma 15**), catalysée au kryptofix 222[®] [71]. Cette méthode permet d'obtenir le composé radiomarqué à 50% en seulement 50 minutes et est désormais utilisée en clinique.

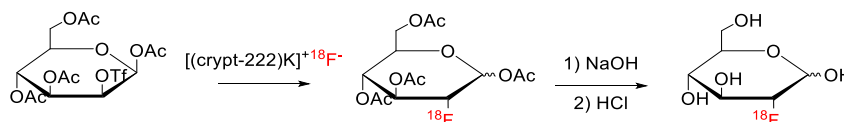


Schéma 15 : Synthèse du ¹⁸F-FDG par fluorination nucléophile [71]

De nos jours, l'utilisation d'isotopes métalliques radioactifs (**Tableau 19**) est reconnue comme une alternative très intéressante à celle de radioisotopes comme le ^{11}C et le ^{18}F . Le radiomarquage par chélation est considéré comme une technique souvent plus efficace car il permet une préparation plus rapide du radiocomplexe. De plus, certains radiométaux possèdent des temps de demi-vie relativement plus long et donc adaptés pour le diagnostic de pathologies nécessitant une biodistribution lente du radiopharmaceutique jusqu'à lors impossible avec le ^{18}F . Parmi eux, le cuivre-64 possède un temps de demi-vie relativement long, de 12,7h et est de plus en plus étudié, notamment pour l'immuno-TEP qui repose sur l'utilisation d'anticorps pour le ciblage spécifique de tumeurs [72]. Compte tenu de son temps de demi-vie très intéressant (plus long que le ^{68}Ga et plus court que celui du ^{89}Zr) et au regard des excellentes propriétés de coordination des azamacrocycles pour le Cu(II), nous nous focaliserons sur cet élément.

III. Le cuivre-64 : production et isotopes

Les radionucléides peuvent être produits via des générateurs [73] (i.e. ^{68}Ga), des cyclotrons [74] (i.e. ^{18}F , ^{64}Cu) ou encore par le biais de réacteur nucléaire.

1. Production du ^{64}Cu

Dans le cas de production du cuivre-64, il est nécessaire d'utiliser un cyclotron (accélérateur de particules). Le principe de fonctionnement (**Figure 21**) est représenté ci-dessous.

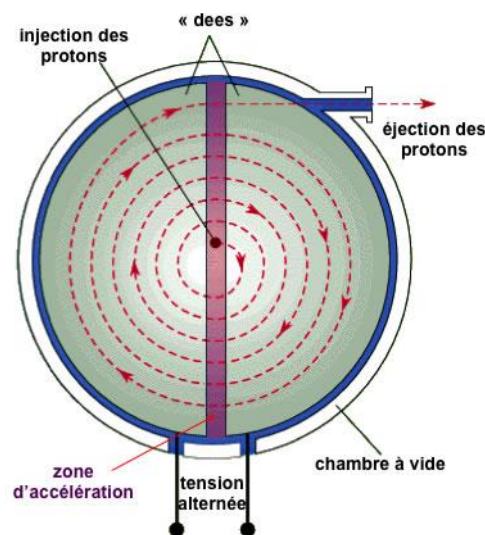


Figure 21 : Principe de fonctionnement d'un cyclotron

Des particules chargées, en l'occurrence des protons, sont injectées dans une chambre à vide constituée de deux « dees ». A champ magnétique constant, l'alternance de polarité du champ électrique permet aux particules de se mettre en mouvement. Une zone d'accélération leur permet d'augmenter ensuite leur vitesse et ainsi d'emmagasiner de plus en plus d'énergie. Une fois leur énergie suffisante atteinte, ces dernières sont éjectées du cyclotron et bombardées sur une plaque spécifique (cible) à la production du radionucléide souhaité.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour la production de ^{64}Cu [75], dont la voie de synthèse suit la réaction suivante : ${}^A_Z E(x, y) {}^{A'}_{Z'} E'$ où ${}^A_Z E$ représente l'élément cible, x la particule utilisée pour le bombardement, y la particule émise lors de la réaction et ${}^{A'}_{Z'} E'$ l'élément produit. Parmi toutes les voies de production, D. W. Mc Carthy *et al.* ont mis au point via un cyclotron, une méthode utilisant une cible enrichie en nickel-64 sur laquelle un bombardement de protons entraîne la formation de ^{64}Cu et de neutrons. La réaction mise en jeu est représentée de la manière suivante : ${}^{64}\text{Ni}(p, n) {}^{64}\text{Cu}$ [76]. Cette technique permet d'obtenir après purification sur résine échangeuse d'ions du $^{64}\text{CuCl}_2$ avec une activité spécifique intéressante [77].

Le ^{64}Cu possède deux mécanismes différents de désexcitation radiative mettant en jeu la production de particules β^+ et β^- [78]. La désintégration du ^{64}Cu en ^{64}Ni s'opère par l'émission d'un positon (19%) ou par capture électronique (42%). Le second mécanisme concerne la désintégration du ^{64}Cu en ^{64}Zn par émission d'une particule β^- . Les particules β^- émises par les radioisotopes peuvent être utilisées en radiothérapie des cancers.

2. Isotopes du cuivre

Le cuivre possède six isotopes radioactifs, parmi lesquels, seul le cuivre-67 possède une désintégration ionisante β^- [79]. Ce radioisotope apparaît ainsi comme un radiométal potentiel pour la radioimmunothérapie (RIT) [80]. Ce radionucléide est caractérisé par une voie unique de désintégration β^- (100%), une énergie de ionisation de 121 KeV et une pénétration dans les tissus de 0,61 mm [79].

Le couple ^{64}Cu (β^+) / ^{67}Cu (β^-) forme ce qu'on appelle une paire théranostique, c'est à dire une paire d'éléments couplant le diagnostic et la thérapie avec le ^{64}Cu pour une application en imagerie TEP et le ^{67}Cu pour la RIT (radioimmunothérapie). Avec des temps de demi-vie de 12,7 et 62 heures respectivement, ces deux radioisotopes sont compatibles avec l'élaboration de

radiopharmaceutiques. Le radiopharmaceutique (**Figure 22**) est constitué d'un radionucléide, émetteur de positons β^+ pour l'imagerie ou de particules α et β^- pour la thérapie, relié à un vecteur biologique (i.e biomolécule, anticorps etc...) spécifique de récepteurs présents sur les cellules tumorales. Lorsque le radionucléide est de nature métallique, comme le $^{64/67}\text{Cu}$, il doit être chélaté.

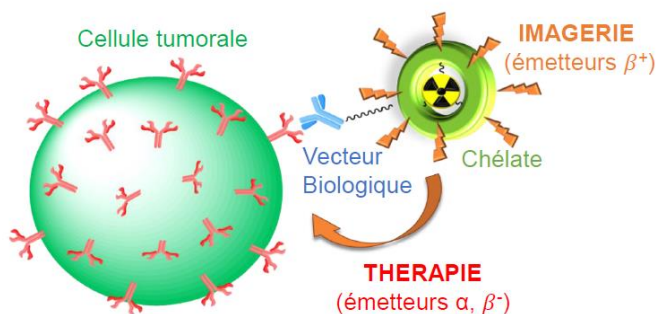


Figure 22 : Représentation d'un radiopharmaceutique

IV. Cahier des charges d'un chélatant du Cu^{2+} pour une application en médecine nucléaire

Pour une application en médecine nucléaire, tant en imagerie avec des complexes de ^{64}Cu qu'en thérapie avec l'utilisation de l'isotope radioactif ^{67}Cu , le chélatant doit répondre à un cahier des charges important. Il doit par conséquent posséder les caractéristiques suivantes :

- Une fonction de couplage permettant le greffage sur biomolécule doit être présente sur le chélatant.
- La vitesse de métallation doit être rapide vis-à-vis du temps de demi-vie du radionucléide.
- Il est nécessaire que le complexe soit stable thermodynamiquement, c'est-à-dire que l'interaction métal-ligand soit la plus forte possible.
- Le complexe ligand-métal doit *a fortiori* être inerte cinétiquement afin d'éviter toute démétallation et donc un relargage du radioisotope dans l'organisme. Cette dissociation peut être due à une transchélation en présence d'un ligand compétiteur, d'une transmétallation avec un métal compétiteur ou encore une dissociation en raison d'une variation importante du pH.

- Le complexe doit également être inerte vis-à-vis d'une potentielle réduction du Cu(II) en Cu(I). En effet, ce point précis du cahier des charges est crucial puisque certains systèmes biologiques sont connus pour avoir des propriétés réductrices ^[81] (**Figure 23**).

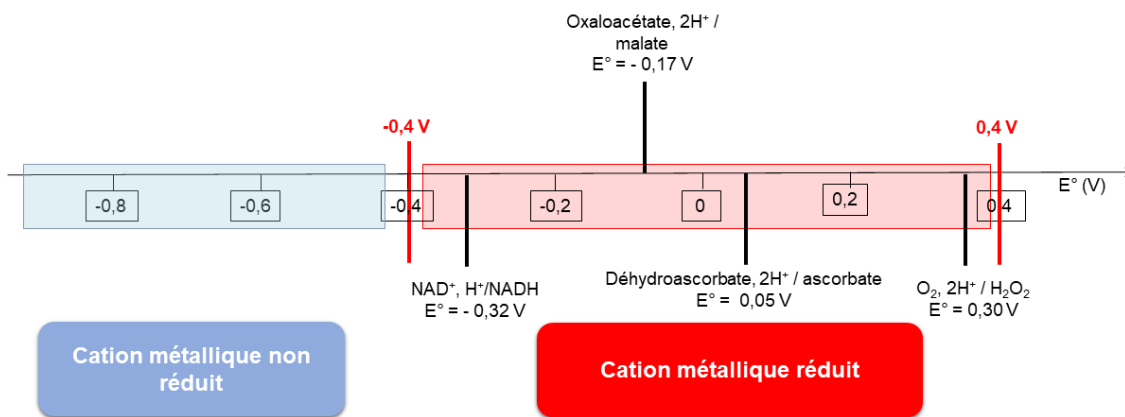


Figure 23 : Echelle de potentiel de réduction dans des conditions standards (pH 7,0, 25 °C) de certains systèmes biologiques par rapport à l'électrode normale à hydrogène (ENH)

Les espèces biologiques réductrices possèdent des potentiels de réduction situés dans la gamme (-0,4 à 0,4 V vs ENH) dans laquelle le complexe de Cu²⁺ est susceptible d'être réduit en Cu⁺. Il est ainsi préférable, pour une application in vivo, d'obtenir des complexes dont le potentiel de réduction se situe hors de cette gamme. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'obtenir des complexes stables sous les deux degrés d'oxydation. Le Cu⁺, base plus molle selon Pearson, est par conséquent plus labile que le Cu²⁺ et la réduction Cu(II) → Cu(I) peut entraîner la dissociation du complexe, ce qui se traduirait par la présence de ⁶⁴Cu libre dans l'organisme dans le cas de la réduction de complexes radiomarqués ^[82].

Ces caractéristiques nécessitent toutes d'être évaluées pour tout chélate susceptible d'être utilisé pour le radiomarquage au ⁶⁴Cu / ⁶⁷Cu et pour toute application potentielle en milieu biologique.

V. Chélates polyazotés étudiés pour la complexation du Cu²⁺

Il existe dans la littérature plusieurs classes de ligands, autres que les polyazamacrocycles, étudiés pour la complexation du Cu²⁺ (**Figure 24** et **Tableau 20**).

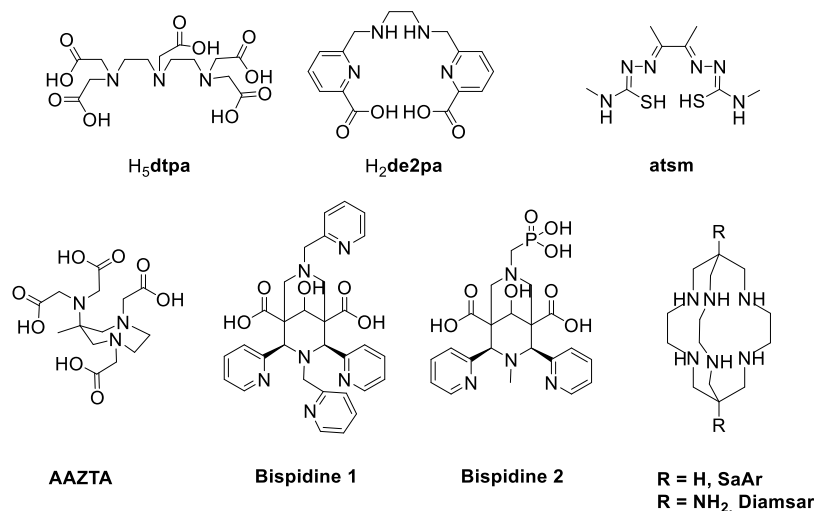


Figure 24 : Chélatés azotés pour la complexation du $^{64}Cu^{2+}$

	NC	$\log K_{CuL}$	E_{pc} (V)	radiomarquage	Références
H₅dtpa	6 (N ₃ O ₂)	21,4	-	40 °C, 5-30 min, pH 5,5	[38,83]
H₂de2pa	6 (N ₄ O ₂)	19,16	-0,9V Irréversible	25 °C, 5-10 min, pH 6,5	[84]
atsm	4 (N ₂ S ₂)	-	-0,4V réversible	25 °C, 5-10 min, pH 6,5	[85]
AAZTA	6 (N ₃ O ₃)	22,27	-	-	[86]
Bispidine 1	6 (N ₆)	16,28 (pCu)	-0,3V réversible	25 °C, 1 min, pH 6,5	[87]
Bispidine 2	6 (N ₅ O)	19,1 (pCu)	-0,6V réversible	25 °C, 1-15 min, pH 3-6,6	[88]
Diamsar	6 (N ₆)		-0,9V irréversible	25 °C, 5-30 min, pH 5,5	[29,30]

Tableau 20 : Propriétés de différents chélatants du cuivre (II) issus de la littérature

Dans la famille des ligands linéaires, le **H₅dtpa** a été un des premiers chélatants à être étudié [83]. Ce ligand possède une cinétique de complexation envers le Cu^{2+} très rapide mais l'inertie cinétique du complexe est trop faible pour une application en milieu biologique. E. Boros *et al.* ont tenté d'augmenter la stabilité des complexes formés avec des diamines linéaires en utilisant les propriétés de coordination des bras picolinate [84]. Le **H₂de2pa** (**Figure 24**) forme avec le Cu^{2+} un complexe stable traduit par une constante de complexation de l'ordre 19,16. Le complexe est caractérisé par un comportement irréversible avec un potentiel de réduction situé à -0,92 V, hors de la fenêtre d'action des enzymes réductases. Des études *in vitro* ont également montré que le complexe subit une transchélation avec des protéines sériques dans du sérum de souris, ce qui explique qu'il n'a pas été testé *in vivo*. Ensuite, le complexe de Cu^{2+} de l'atsm,

présente, quant à lui, un système réversible avec un potentiel de réduction situé à -0,4V, à la frontière de la fenêtre biologique précédemment citée, ce qui peut expliquer la démétallation observée en milieu réducteur ^[82].

Plusieurs groupes ont travaillé sur l'élaboration de ligands renforcés, comprenant des structures plus rigides dans le but d'augmenter l'inertie cinétique des complexes. M. Botta *et al.* ont développé des ligands cycliques rigides comme le AAZTA et montré que le complexe de Cu(II) possédait de très bonnes propriétés thermodynamiques, comparables au H₃nota ^[86]. P. Comba *et al.* ont élaboré une bispidine substituée par quatre groupements pyridine (**Bispidine 1, Figure 24**) pour la complexation du cuivre (II). Le complexe formé possède une très bonne stabilité thermodynamique (pCu = 16,28) et une réversibilité électrochimique avec une réduction à -0,3V (vs ENH). Ce composé a été couplé à un peptide pour le ciblage de récepteurs pour le cancer de la prostate, et la stabilité du radiocomplexe en milieu compétiteur et réducteur a été observée ^[87]. L. Charbonnière *et al.* ont également développé un dérivé bispidinique (**Bispidine 2, Figure 24**) fonctionnalisé par deux pyridines, et un groupement acide phosphonique. Ce macrocycle préorganisé possède également de très bonnes propriétés thermodynamiques (pCu = 19,1), une inertie cinétique en milieu HClO₄ 5M supérieure à 20 jours à température ambiante et une réversibilité électrochimique avec un pic de réduction à -0,6V (vs ENH) ^[88]. Finalement, A. M. Sargeson *et al.* ont élaboré des nouveaux ligands cages (DIamsar et SaAr) analogues renforcés du cyclam ^[89]. Le renforcement du macrocycle permet d'augmenter de façon significative l'inertie cinétique du complexe (t_{1/2} = 40h, HCl 5M à 90°C). C. J. Anderson a étudié la stabilité électrochimique du complexe qui possède une irréversibilité électrochimique avec un potentiel de réduction égal à -0,9V (vs. ENH) ^[90]. Ces exemples montrent qu'il existe déjà, dans la littérature, de nombreuses recherches pour la synthèse de divers chélates du Cu²⁺ pour une application en Imagerie TEP.

Au laboratoire, les dérivés du cyclam mono-picolinate (**Hte1pa** et **Hcbte1pa**) ainsi qu'un dérivé du tacn (**Hno2py1pa**) (**Figure 25**) ont démontré qu'ils possédaient d'excellentes propriétés de coordination envers le Cu(II), une inertie cinétique très intéressante et une stabilité électrochimique vis-à-vis de la réduction du Cu(II) en Cu(I) ^[6,7,91].

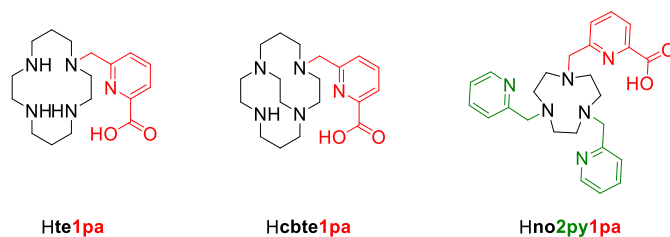


Figure 25 : Structures des ligands **Hte1pa**, **Hcbte1pa** et **Hno2py1pa**

Plus particulièrement, les résultats obtenus avec le ligand **Hno2py1pa**, présenté dans le chapitre I, nous ont motivés à l'étudier en tant que potentiel radiopharmaceutique. En effet, il répond au cahier des charges d'un bon complexant du cuivre (II). La fonction acide carboxylique du bras picolinate ne rentrant pas dans la coordination du Cu^{2+} peut permettre une bioconjugaison via un couplage peptidique sur une amine secondaire par exemple. Des tests de radiomarquage ont également démontré que le ligand était radiomarquable quantitativement à pH 5,5 et température ambiante ^[91]. Le ligand **Hno2py1pa** nous est apparu être un bon candidat pour l'élaboration d'une sonde bimodale de type TEP-fluorescence.

2 Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM)

I. Principe

L'Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRM) est une technique de diagnostic médical fournissant une information en trois dimensions. Découvert dans les années 1970, cette technique est désormais utilisée au quotidien dans le domaine de l'imagerie médicale. Lors d'un examen IRM le contraste obtenu est fonction de la concentration en eau présente dans les organes. L'eau a une abondance de 60% dans le corps humain, les protons sont aussi des cibles de choix pour une étude IRM. Le principe de l'IRM repose sur celui de la RMN.

En l'absence de champ magnétique B_0 , les moments magnétiques peuvent prendre n'importe quelle orientation dans l'espace (**Figure 26, A**). La génération d'un champ magnétique B_0 entraîne un alignement des moments magnétiques pouvant prendre $(2nI+1)$ orientations. Dans le cas du ^1H , la moyenne des moments magnétiques ont une orientation parallèle au champ magnétique B_0 et décrivent un mouvement de précession (**Figure 26, B**) ^[92].

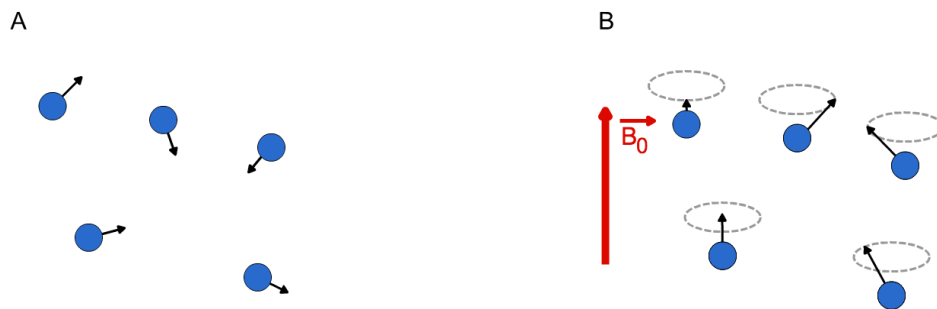


Figure 26 : Représentation des moments magnétiques sans perturbation extérieure (A), et après application d'un champ magnétique B_0 (B)

L'alignement des moments magnétiques de spin des protons peut être considéré comme la somme des moments magnétiques isolés parallèle à l'axe z (**Figure 27, A**). Cette somme des moments magnétiques représente la magnétisation globale résultante (M_0) parallèle à l'axe z.

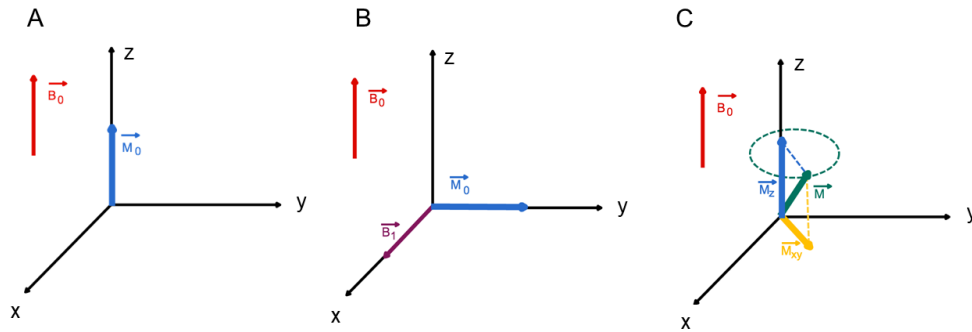


Figure 27 : Moment magnétique M_0 sous un champ magnétique B_0 (A), Moment magnétique résultant d'une impulsion B_1 (B) et retour à l'état fondamental M_0 (C)

L'application d'une impulsion radiofréquence B_1 sur l'axe x entraîne une rotation du moment M_0 selon y (**Figure 27, B**) qui engendre deux composantes M_z et M_{xy} (**Figure 27, C**). La précession de M et du retour à l'équilibre M_0 entraîne une diminution de la magnétisation M_{xy} et une augmentation de M_z . La relaxation des noyaux et le retour à l'équilibre (**Figure 28**) peuvent se calculer selon deux équations :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (1)$$

Équation 1 : Calcul des magnétisation M_z en fonction du temps

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (2)$$

Équation 2 : Calcul des magnétisation M_{xy} en fonction du temps

La relaxation longitudinale, aussi connue sous le nom de relaxation « spin-réseau » ou encore de relaxation T_1 correspond au retour à l'équilibre de la magnétisation selon l'axe z. La relaxation transversale quant à elle, aussi dénommée relaxation « spin-spin » ou encore relaxation T_2 correspond au retour à l'équilibre selon le plan xy.

En pratique lors d'un scanner IRM, ce sont ces deux grandeurs qui sont étudiées, grâce aux molécules d'eau présentes dans le corps humain. Néanmoins certaines lésions ne peuvent être détectées en utilisant seulement le contraste obtenu grâce aux molécules d'eau, c'est pourquoi l'usage d'agents de contrastes est nécessaire.

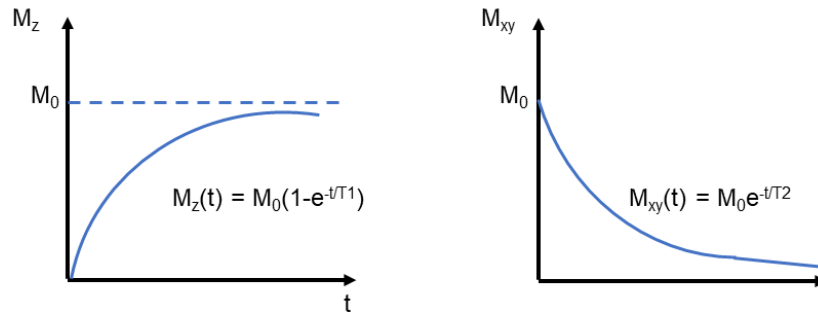


Figure 28 : Retour à l'équilibre M_0 selon l'axe z et le plan xy et détermination des temps T_1 et T_2

II. Agents de contraste

L'injection d'un agent de contraste permet de modifier localement les propriétés intrinsèques des tissus. Leur objectif est de modifier la vitesse de relaxation des molécules d'eau avoisinantes. Les agents de contraste sont classés en deux catégories, les agents de type T_1 , dit paramagnétiques, qui affecte le temps de relaxation longitudinal (T_1) et de type T_2 , super-paramagnétiques, lorsque le temps de relaxation transversal (T_2) est le plus modifié.

L'efficacité d'un agent de contraste est évaluée au travers de sa relaxivité r_i , qui est fonction de la concentration en espèce paramagnétique et également du temps de relaxation T_i ($i = 1,2$).

$$R_i(obs) = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{diamagnétique} + r_i[M] \quad (3)$$

Équation 3 : Calcul de la relaxivité $R_i(obs)$ en fonction de la concentration en métal avec $[M]$ exprimée en mM et r_i en $mM^{-1}.s^{-1}$

De manière plus générale, l'efficacité d'un agent de contraste est déterminée par sa valeur de r_i qui peut se calculer à partir de l'**Équation 4**.

$$r_i = \frac{\Delta\left(\frac{1}{T_i}\right)}{[M]} \quad (4)$$

Équation 4 : Calcul de la relaxivité r_i exprimée en $mM^{-1}.s^{-1}$

1. Agents de contraste T_1

Les agents de contraste T_1 sont les plus utilisés aujourd'hui. Ils sont constitués de complexes dont le cation métallique possède des électrons non appariés, ce qui permet de conférer des propriétés paramagnétiques au complexe. Ces cations métalliques sont pour la plupart des lanthanides ou des métaux de transitions ^[93,94]. Le principe de fonctionnement d'un agent de contraste paramagnétique est présenté ci-dessous (**Figure 29**).

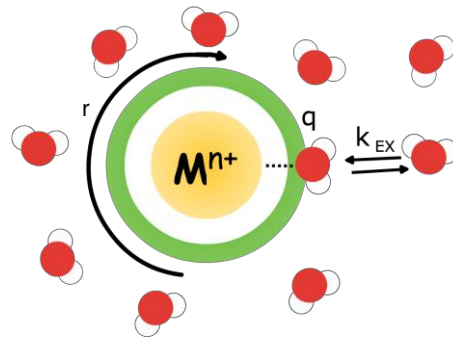


Figure 29 : Principe de fonctionnement d'un agent de contraste

Trois paramètres jouent sur l'efficacité de l'agent de contraste :

- Le complexe métallique doit posséder un nombre q de molécule d'eau coordonnée supérieur ou égal à zéro.
- La molécule d'eau coordonnée au métal (sphère interne) doit s'échanger avec d'autres molécules d'eau présentes sur la sphère externe du complexe le plus rapidement possible. Cette vitesse est caractérisée par une constante d'échange (k_{EX})
- Enfin le complexe doit également présenter une vitesse de rotation lente, définie par le temps de corrélation (τ_r).

2. Agents de contraste T_2

Les agents de contrastes T_2 sont souvent des nanoparticules super-paramagnétiques d'oxyde de fer divisées en deux classes selon leur taille. Les SPION (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) ont des diamètres supérieurs à quelques dizaines de nanomètres alors que les USPIO (Ultra small SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) ont des diamètres inférieurs

à 50nm. Ces agents de contraste sont essentiellement utilisés pour l'imagerie de lésions présentes dans le foie [95] en raison de leur grande taille.

III. Agents de Contraste à base de Gadolinium

Le gadolinium de configuration électronique $[\text{Xe}]4f^73d^16s^2$ appartient à la famille des lanthanides. Le Gd(III) possède un spin électronique élevé ($S = 7/2$) et un temps de relaxation lent ce qui en fait un élément de choix pour l'IRM. Le Gd(III) est toutefois toxique à l'état libre et doit donc être chélaté pour une utilisation en milieu biologique. Plusieurs ligands polyaminocarboxylate ont été développés [93,96] dans ce but. Parmi eux, trois ligands sont particulièrement adaptés à la complexation du gadolinium car ils possèdent 8 atomes coordinants, ce qui permet la coordination d'une molécule d'eau par l'ion Gd^{3+} (**Figure 30**). Cette condition est nécessaire pour obtenir des agents de contraste de type T_1 . L'utilisation de ces complexes en IRM a été approuvée par les autorités de santé internationales.

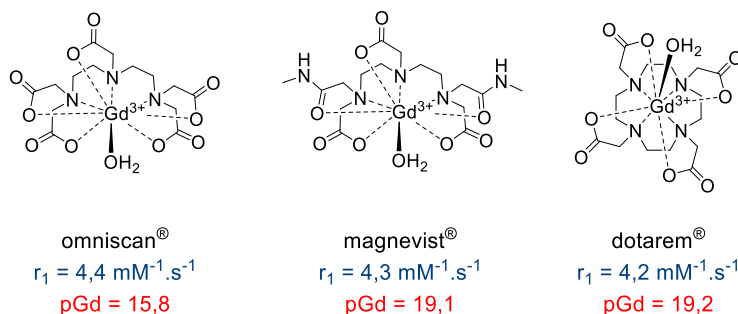


Figure 30 : Structure et valeurs de relaxivité de différents agents de contraste pour l'IRM [97,98]

Le dotarem®, complexe dérivé du H_4dota , est considéré comme le standard mondial pour l'IRM. Il possède une valeur de relaxivité du même ordre de grandeur que les dérivés acycliques (omniscan® et magnevist®) et possède une grande stabilité thermodynamique, comme en témoigne sa valeur d'affinité pour le gadolinium ($\text{pGd} = 19.2$) [97].

En pratique, le dotarem® est utilisé quotidiennement comme agent de contraste T_1 . Il permet un contraste positif et une image plus claire là où le complexe s'accumule. Ce principe est représenté sur la figure ci-après (**Figure 31**).

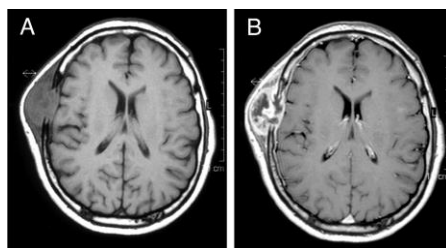


Figure 31 : Scanner IRM sans (A) et avec utilisation d'un agent de contraste (B)

Cependant, le manque de stabilité et d'inertie de certains agents de contraste seraient impliqués dans la Fibrose Systémique Néphrogénique (FSN) chez les patients souffrant d'une insuffisance rénale [99]. La FSN serait liée à une accumulation de gadolinium libre dans l'organisme entraînant une mort cellulaire [100].

IV. Agents de contraste à base de Métaux de transition

Une alternative au gadolinium repose sur l'utilisation de composés paramagnétiques à base de métaux de transitions moins nocifs. C'est dans ce champs d'applications que des dérivés triazamacrocycliques ont pris une importance énorme pour l'élaboration d'agents de contraste à base de Fe^{3+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} [101,102].

Gale *et al.* ont développé un complexe acyclique (**PyC3A**) pour la complexation du Mn^{2+} (**Figure 32**) remplissant tous les critères nécessaires pour une application in vivo [103]. Les caractéristiques du complexe sont toutes aussi bonnes que celles du $[\text{Gd}(\text{dtpa})]^{2-}$ (omniscan[®], **Figure 30**).

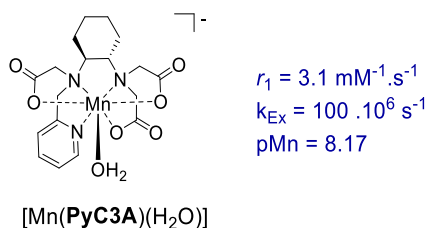


Figure 32 : Structure et caractéristiques du complexe [Mn(PyC3A)(H₂O)]

Contrairement à l'omniscan[®], 99% du complexe de manganèse (II) est excrété du corps par le foie et les reins en moins de 24h. Le complexe a une rétention dans les reins bien moindre et ce phénomène permet d'éviter une accumulation trop importante. Les chercheurs ont également développé une sonde IRM composé de cinq complexes de $[\text{Mn}(\text{PyC3A})(\text{H}_2\text{O})]^{+}$ liés de manière covalente à un peptide ciblant spécifiquement les fibrines (protéines polymériques insolubles)

présentes au niveau des thrombus (**Figure 33**) [104]. Les thrombus sont des amas de fibrines qui obturent les vaisseaux sanguins et peuvent causer à terme des caillots sanguins. Les études in vivo réalisées sur des rats ont permis de mettre en évidence l'efficacité de l'agent de contraste.

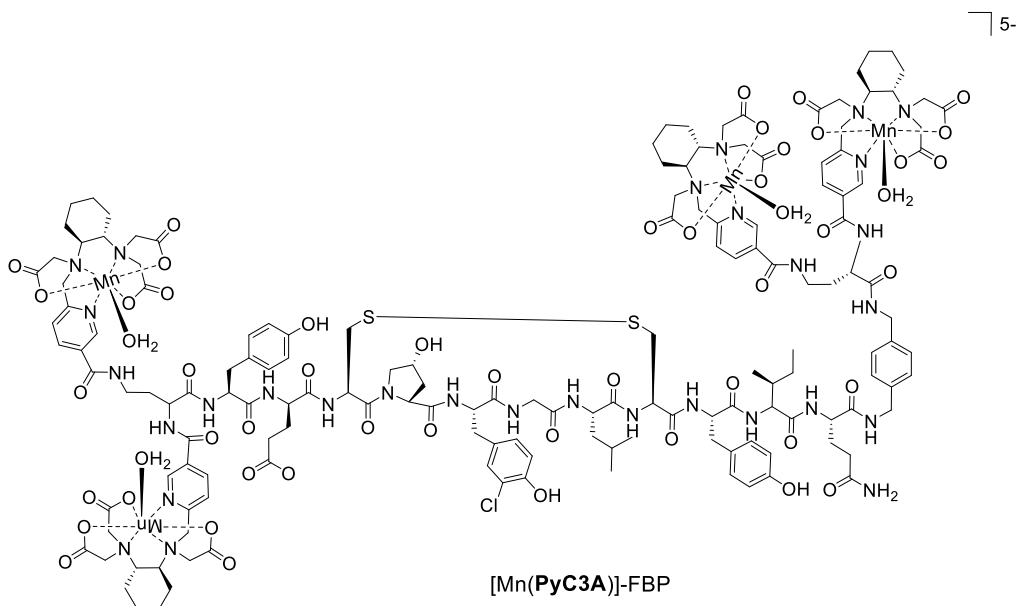


Figure 33 : Structure d'une sonde IRM pour le diagnostic du thrombus [104]

Plusieurs groupes ont également mis à profit les très bonnes propriétés de complexation des triazamacrocyces pour l'élaboration de potentiels agents de contraste à base de Mn(II) [12,13,105,106]. Parmi tous ces dérivés, les propriétés de seulement trois dérivés du tacn *N*-fonctionnalisés par des groupements acétate (**Meno2a** et **enota**) ou picolinate (**Hno1pa**) seront discutées dans la suite (**Figure 34**). Une attention particulière sera portée sur le **Hno1pa**, ligand élaboré au laboratoire.

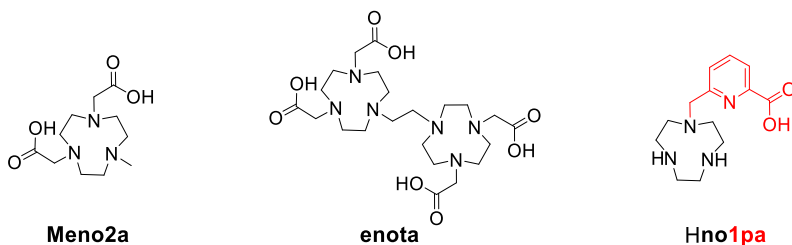


Figure 34 : Ligands triazamacrocycliques étudiés pour la complexation du Mn(II) [12,13,105,106]

Le **Meno2a**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements acétate et un groupement méthyl décrit par notre équipe, permet une pentacoordination de l'ion Mn²⁺ et laisse donc la possibilité à

une molécule d'eau de se coordiner au cation métallique. Les études en solution ont mis en évidence la présence d'une molécule d'eau coordonnée ($q = 1$) qui peut s'échanger avec le solvant avec une vitesse d'environ $6,3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$, supérieure à celle obtenue avec le **PyC3A** décrit par E. Bale *et al.* La valeur de relaxivité calculée à 20 MHz et 298 K est de $2,74 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est légèrement inférieure au **PyC3A** mais qui reste dans la gamme des valeurs de relaxivité pour les dérivés polyazamacrocycliques ^[107].

	PyC3A ^[103]	Meno2a ^[12]	enota ^[105]	Hno1pa ^[13]
r_1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 20 MHz)	3,1	2,74	3,4	3,32
q	1	1	1	1
k_{Ex} ($\times 10^6 \text{ s}^{-1}$)	100	626 ± 23	55	2789
ρ_{Mn}	8,17	/	/	7,08

Tableau 21 : Propriétés des ligands **PyC3A**, **Meno2a**, **enota** et **Hno1pa**

L'équipe de E. Tóth a également élaboré un dimère, analogue du **Meno2a**. Il s'agit du **enota**, un bismacrocycle formé de deux unités tacn reliées par un pont éthylène et porteurs chacun de deux bras acétate (**Figure 34**). L'objectif était de créer des molécules dimériques à poids moléculaire plus élevé afin d'augmenter le temps de corrélation rotationnel ainsi que les valeurs de relaxivité. Dans ce cas précis, le complexe dimérique formé avec le ligand **enota** a une meilleure relaxivité qui est de $3,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ contre $2,74 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le **Meno2a**. Les études à l'état solide témoignent également de la coordination d'une molécule d'eau afin de compléter la sphère de coordination du cation divalent ^[12]. Toutefois, la vitesse d'échange des molécules d'eau entre la sphère interne et le solvant est plus faible, ce qui est potentiellement dû à la nature du complexe bimétallique.

Dernièrement, l'équipe a développé une série de ligands polyazamacrocycliques dérivés du tacn, cyclen et cyclam mono-*N*-fonctionnalisés par un bras picolinate pour la complexation du Mn^{2+} . D'après leurs études, le complexe formé avec le ligand **Hno1pa** possède les meilleurs propriétés (**Tableau 21**). La structure à l'état solide, représentée ci-après (**Figure 35**) se compose de deux entités $[\text{Mn}(\text{no1pa})(\text{H}_2\text{O})]$ et montre qu'une molécule d'eau est coordonnée au centre métallique. Ces résultats ont également été démontrés par calcul DFT. Au vu des très bonnes propriétés de complexation du **Hno1pa**, d'une très bonne valeur de relaxivité et d'une vitesse d'échange des molécules d'eau avec la sphère externe, du complexe de Mn^{2+} , ce complexe peut être considéré comme une bonne alternative aux agents de contraste à base de Gd^{3+} pour une application en IRM.

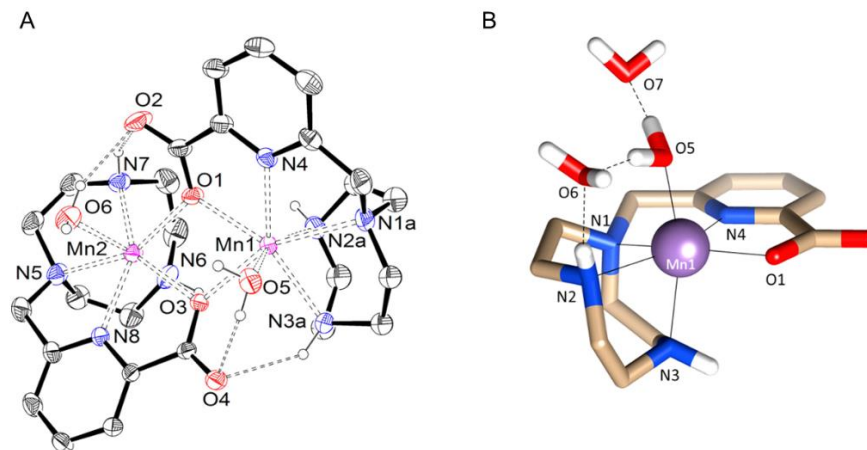


Figure 35 : Structure aux rayons X du complexe $[\text{Mn}(\text{no1pa})(\text{H}_2\text{O})]_2$ (A) structure obtenue par DFT (B)

V. Cahier des charges d'un agent de contraste pour une application en milieu biologique

Pour une application en milieu biologique, il est nécessaire que l'agent de contraste possède les critères suivants :

- Stabilité thermodynamique importante ($\log K_{ML}$ importante).
- Inertie cinétique importante pour éviter toute dissociation in vivo.
- Posséder une valeur de r_1 et r_2 les plus hautes possibles, pour éviter d'utiliser une trop grande concentration en agent de contraste.
- Présenter une molécule d'eau coordonnée au cation métallique ($q > 0$).

3 Imagerie Optique de fluorescence et sondes bimodales

I. Principe et applications en milieu biologique

Les premières descriptions de la fluorescence ont été faites par N. Monardes en 1565 en mettant en évidence une émission lumineuse bleue d'une infusion d'un bois mexicain appelé « *Lignum Nephriticum* »^[108]. Néanmoins, il faudra attendre 1852 et les travaux de G. G. Stokes pour définir le principe de fonctionnement de la fluorescence^[108]. Ce principe est représenté ci-dessous (Figure 36).

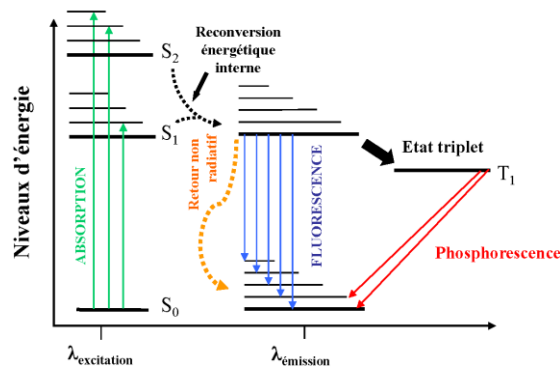


Figure 36 : Diagramme de Jablonski

Sous l'effet d'une excitation lumineuse, un fluorophore absorbe un photon et passe de son état fondamental (S_0) à un état virtuel excité (S_1). Le retour à l'état fondamental peut se faire de plusieurs façons et caractérise ainsi les phénomènes de luminescence. La fluorescence correspond au retour direct à l'état fondamental par émission d'un photon, qui est considéré comme processus rapide (10^{-12} s). La seconde méthode de désexcitation radiative, aussi connue sous le nom de phosphorescence fait intervenir le passage par un état triplet de plus basse énergie (T_1). L'émission d'un photon, plus longue, est caractérisée par un temps de désexcitation compris entre 10^{-6} et 10s.

L'imagerie par fluorescence est une technique qui est également plus facile à mettre en œuvre que l'imagerie TEP ou l'IRM. Cependant, plusieurs systèmes biologiques fluorescents absorbent dans la gamme du visible et du proche infrarouge (NIR) ce qui présente un inconvénient de sensibilité de cette technique. En revanche, il existe une fenêtre de transparence biologique allant

de 700 à 1000nm, dans laquelle, aucun système biologique n'absorbe (**Figure 37**) et il est donc intéressant d'obtenir des sondes émettant dans cette région.

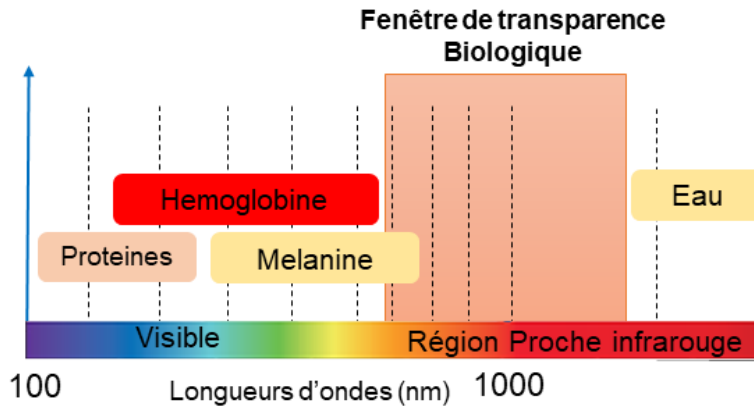


Figure 37 : Fenêtre de transparence biologique

II. Sondes fluorescentes à base de chromophores organiques

Depuis longtemps les chromophores organiques conjugués sont connus pour avoir des propriétés de fluorescence ^[109]. Ils possèdent les caractéristiques suivantes :

- Coefficient d'extinction molaire élevée ($> 10\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
- Rendement quantique de fluorescence important

Les fluorophores organiques sont très souvent des molécules insaturées ou des composés possédant des cycles aromatiques conjugués. Des exemples de sondes fluorescentes dérivées de la famille de la coumarine, de la fluorescéine et des bodipy sont présentés ci-dessous (**Figure 38**).

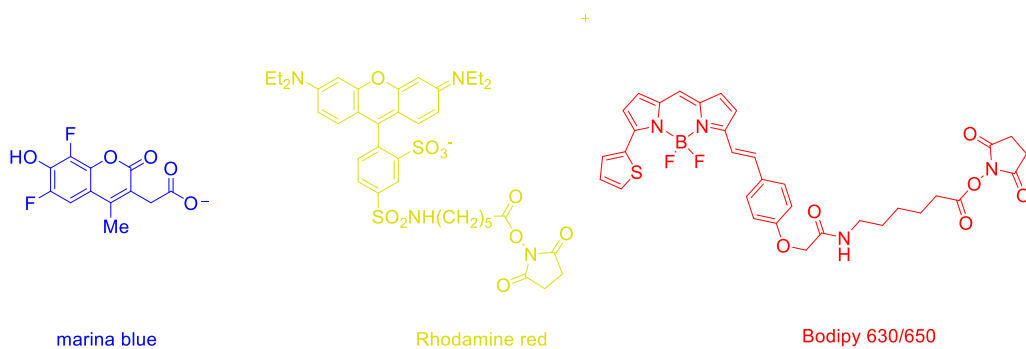


Figure 38 : Structures de divers fluorophores organiques

Ces fluorophores sont également caractérisés par des bandes d'émissions larges dans le visible (400 et 800 nm). Les spectres d'émissions de la marina blue, de la rhodamine red et du Bodipy 630/650 sont représentés ci-dessous (**Figure 39**) à titre d'exemple.

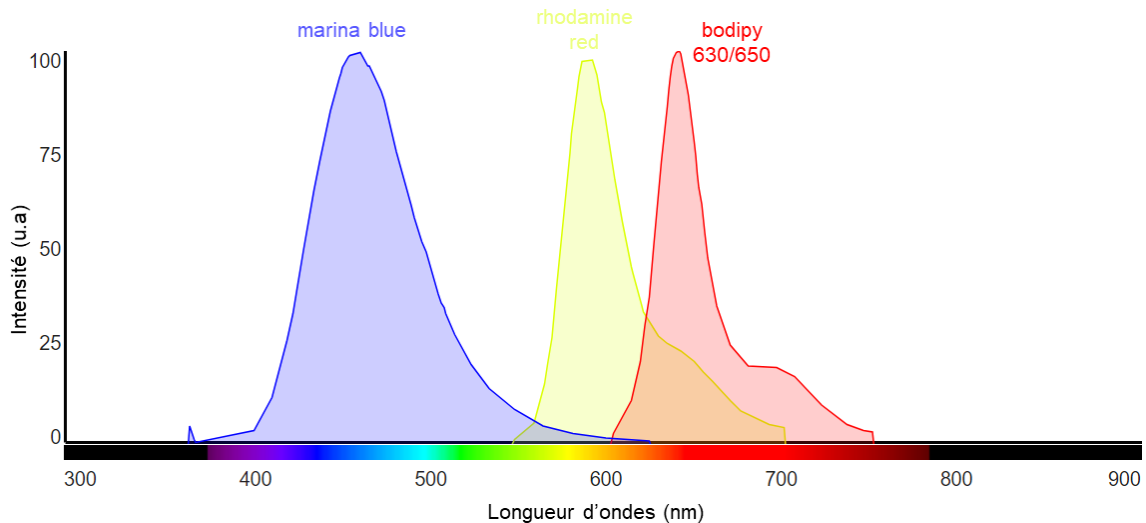


Figure 39 : Spectres d'émissions de la marina blue (bleu), de la rhodamine red (jaune) et du bodipy 630/650 (rouge)

Avec une émission dans le visible, l'utilisation de ces chromophores comme sondes luminescentes en milieu biologique est très limitée puisqu'ils émettent dans la fenêtre d'émission de certains systèmes biologiques. De plus, ces composés sont très peu stables en milieu biologique et se décomposent dans le temps (photo-blanchiment).

III. L'absorption biphotonique (TPA)

Afin d'obtenir des absorptions au-delà de 700 nm, une alternative à l'absorption monophotonique est l'absorption biphotonique. Ce phénomène, décrit en premier lieu par M. Göppert-Mayer en 1931 ^[110], appartient à l'optique non linéaire de second ordre. Contrairement à l'absorption monophotonique, ce phénomène repose sur l'absorption simultanée de deux photons de demi-énergie. Cette particularité entraîne alors une absorption à une double longueur d'onde soit un déplacement du bleu vers le NIR (fenêtre de transparence biologique). De fait, la pénétration dans les tissus est importante tout en évitant les phénomènes de photo-dommage des tissus. Finalement, l'excitation à deux photons du chromophore n'ayant lieu qu'au point focal du laser (**Figure 40**) une résolution tridimensionnelle est possible.

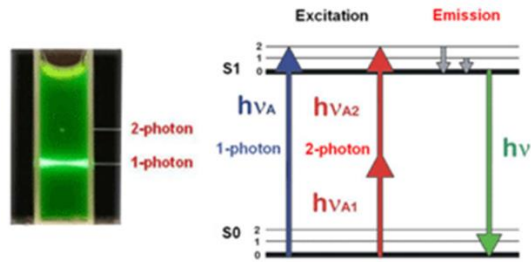


Figure 40 : différence entre l'absorption mono et biphotonique

IV. Sondes luminescentes à base de complexes de lanthanides

Du Lanthane La ($Z = 57$) au Lutécium Lu ($Z = 71$), les lanthanides sont des éléments appartenant au bloc f du tableau périodique et ont pour configuration électronique $[\text{Xe}]6s^24f^n$ ($n \leq 14$). A l'exception du La^{3+} et du Lu^{3+} , les ions lanthanides, au degré d'oxydation +III, ont la particularité de posséder une signature spectrale bien spécifique allant du visible au proche infrarouge (400 – 1550 nm). Les spectres d'émission des ions lanthanides sont présentés ci-dessous (Figure 41).

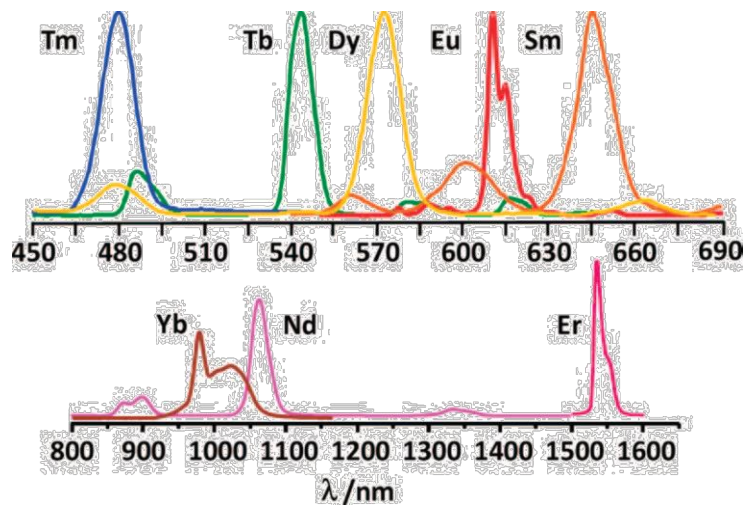


Figure 41 : Spectres d'émission des lanthanides

Contrairement aux chromophores organiques, les lanthanides possèdent des bandes d'émission fines avec des déplacements de Stokes élevés. Certaines de ces émissions sont dans la fenêtre de transparence biologique ce qui permet d'envisager de l'imagerie biologique. De plus, ils possèdent des durées de vie d'émission allant de la microseconde à la milliseconde, à température ambiante, permettant de mettre en œuvre la technique de fluorescence en temps résolu, non envisageable avec des sondes organiques. Cette technique permet de s'affranchir des artefacts lumineux (bandes Rayleigh et Raman) et de la fluorescence naturelle des milieux biologiques.

Du fait des transitions $4f-4f$ interdites par symétries, selon les règles de Laporte, les ions lanthanides ont un coefficient d'extinction molaire (ϵ) faible ($\epsilon < 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Afin d'exciter ces derniers, il est nécessaire d'introduire un ou plusieurs émetteurs possédant des bonnes propriétés d'absorption, capable d'exciter le lanthanide. Cette méthode est aussi connue sous le nom d'effet d'antenne.

En 2007, A. Nonat a étudié durant sa thèse l'influence de ligands triazamacrocycliques pour la complexation de lanthanides dans l'optique d'élaborer de nouvelles sondes magnétiques et/ou fluorescentes [111]. Ses recherches ont montré que le ligand $\text{H}_3\text{no3pa}$, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par des groupements picolinate, était un très bon ligand pour l'élaboration de complexes d' Eu^{3+} et de Tb^{3+} luminescents (**Figure 42**). En effet les groupements picolinate jouent le rôle d'antennes pour l'excitation monophotonique du lanthanide.

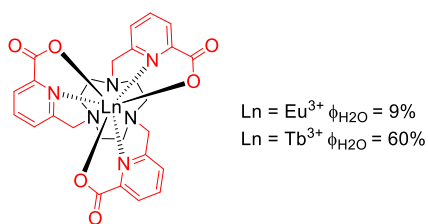


Figure 42 : Sondes luminescentes à base de complexes de lanthanides dérivés du $\text{H}_3\text{no3pa}$ [111]

Le complexe de $[\text{Tb}(\text{no3pa})]$ possède un rendement quantique intéressant de l'ordre de 60% ainsi qu'une stabilité importante dans l'eau, comme en atteste la valeur de $\log K_{\text{TbL}}$ égale à 17,4, qui est supérieure de 3,7 unités de log à celle du complexe $[\text{Tb}(\text{nota})]$. Toutes ces études mettent l'accent sur l'apport d'une plateforme triazamacrocyclique pour la formation de complexes de lanthanides stables luminescents. En revanche, avec une émission dans le visible, ces complexes ne sont pas adaptés pour une application en imagerie optique de fluorescence.

En 2008, O. Maury *et al.* ont développé une sonde luminescente biphotonique et biocompatible à base de lanthanide ^[112]. La sonde est composée d'un cation Eu^{3+} complexé par trois antennes π -conjuguées de type acide dipicolinique possédant des chaînes pégylés permettant d'augmenter l'hydrosolubilité du complexe (**Figure 43**).

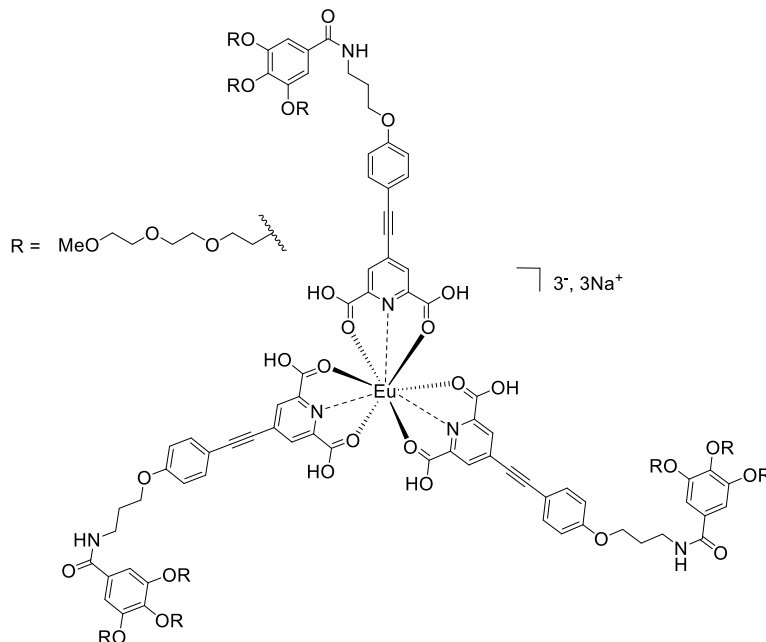


Figure 43 : Structure d'une sonde luminescente à base de lanthanide développée par O. Maury *et al.* ^[112]

Avec une absorption à 332 nm et une émission vers 720 nm ainsi qu'un rendement quantique de 15,7 % dans l'eau et un temps de vie de luminescence long (1,062 ms), le complexe possède toutes les caractéristiques nécessaires pour réaliser de l'imagerie optique en milieu biologique. Des études d'imagerie confocale *in vitro* réalisées sur des cellules du cancer T24 sont présentées ci-après (**Figure 44**). L'excitation biphotonique à 760 nm des cellules a permis de mettre en évidence la luminescence rouge du complexe d'Eu(III). En comparant les images de microscopie confocale (gauche) et celles du contraste de phase (droite) , il a été possible de montrer que le complexe était majoritairement localisé dans la région périnucléaire des cellules. Néanmoins, des études de stabilité en milieu aqueux ont permis de mettre en évidence une dissociation dans l'eau d'environ 30% du complexe. Cet exemple décrit la première sonde biocompatible à base d'un complexe de lanthanide pour une imagerie biphotonique. Il reste cependant nécessaire d'optimiser ces sondes, particulièrement au niveau de la stabilité du complexe.

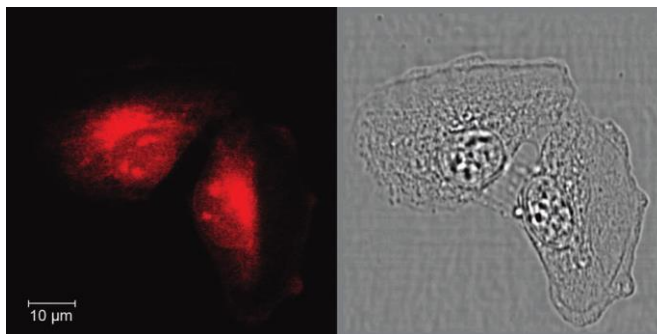


Figure 44 : Images de microscopie confocale de cellules cancéreuses T24 fixées dans l'éthanol et marquées avec le complexe ^[112]

Depuis ces travaux, de nombreuses études ont été développées autour de sondes de lanthanides, luminescentes par absorption biphotonique, à base de ligands triazamacrocycliques ^[113-117]. La plateforme tacn tri-*N*-fonctionnalisée par trois groupements picolinate apparaît comme une plateforme de choix pour la complexation d'ion Ln(III) puisqu'elle permet de former des complexes avec un nombre de coordinance de 9. En 2013, D. Parker *et al.* ont étudié de nouvelles sondes à absorption biphotonique à base de complexes d'Eu³⁺ de ligands dérivés du H₃no3pa pour l'imagerie in vitro ^[118]. Cinq complexes d'Eu³⁺ possédant diverses antennes biphotoniques ont été synthétisés (**Figure 45**) et les propriétés photophysiques ont été étudiées et sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 22**).

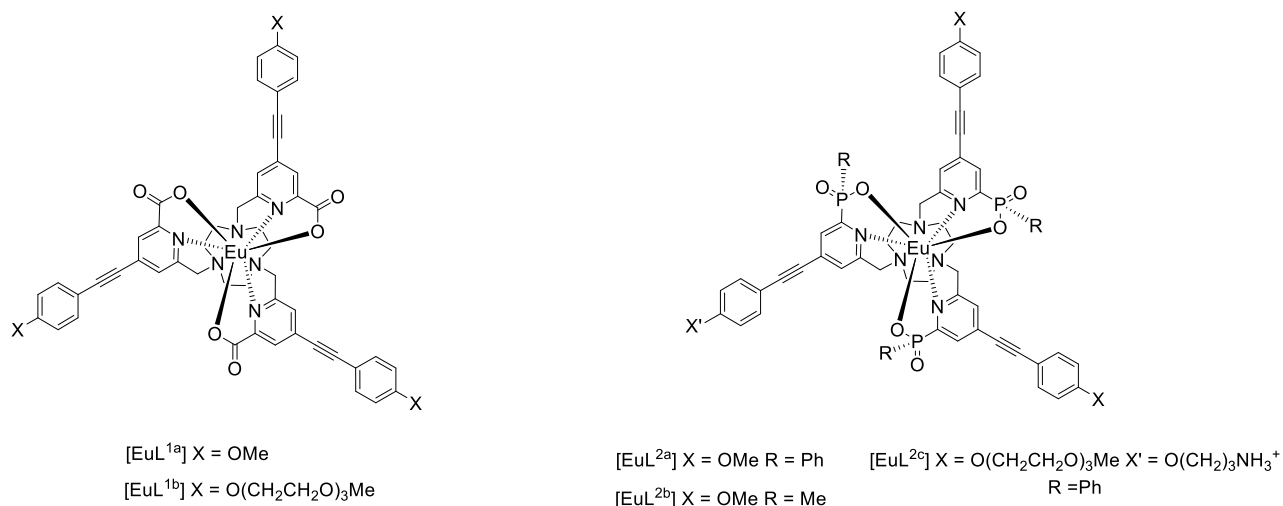


Figure 45 : Exemples de sondes luminescentes à base d'Eu(III) développées par D. Parker *et al.* ^[118]

complexes	λ_{\max} (nm)	ϕ_{em} (%)	τ (ms)
[EuL ^{1a}]	338	48	0,95
[EuL ^{1b}]	338	25	1,06
[EuL ^{2a}]	332	52	1,30
[EuL ^{2b}]	331	39	1,03
[EuL ^{2c}]	332	54	1,00

Tableau 22 : Propriétés photophysiques de quelques complexes d'Eu³⁺ décrit dans la littérature [118]

Les cinq complexes présentent des longueurs d'onde d'absorption proches de 330 nm dans le méthanol, mais également des rendements quantiques compris entre 25 et 54% et des temps de vie de luminescence proche de la milliseconde. Des études par microscopie confocale réalisées sur des cellules de type NIH 3T3 avec le complexe [EuL^{2b}], ont montré que le complexe est internalisé dans la cellule comme en témoigne la couleur rouge intense, caractéristique de l'ion Eu³⁺ sur la figure ci-dessous (**Figure 40**). L'internalisation du composé contrairement aux autres complexes serait due à la présence d'une charge positive, ce qui a déjà été observé auparavant sur différents complexes de lanthanides [119,120].

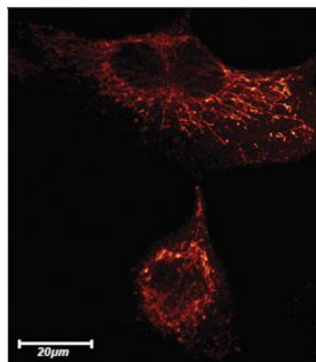


Figure 46 : Image obtenue par microscopie confocale bidirectionnelle d'une mitochondrie réalisée sur une cellule NIH 3T3 avec le complexe [EuL^{2b}] (10 mM, 15 min, λ_{exc} 355 nm, détection 600-720 nm)

Ces travaux montrent encore une fois l'efficacité des ligands triazamacrocycliques pour l'élaboration de sondes luminescentes à base de lanthanides. Ces complexes présentent une meilleure stabilité que leurs analogues linéaires, et permettent une très bonne imagerie in vitro à excitation mono- et biphotonique.

V. Cahier des charges d'une sonde fluorescente pour une application in vivo

Pour une application en milieu biologique, une sonde fluorescente doit avoir les caractéristiques suivantes :

- Une bande d'émission située dans les longueurs d'onde de la fenêtre de transparence biologique.
- Un rendement quantique de fluorescence élevé.
- La présence d'une charge positive peut *a priori* favoriser l'internalisation cellulaire.
- Une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique importantes pour éviter toute dissociation du complexe en milieu biologique.

VI. Exemples de sondes bimodales TEP-fluorescence et IRM-fluorescence

Il existe dans la littérature plusieurs exemples de sondes bimodales alliant les différentes techniques d'imagerie détaillées précédemment [65,66]. En revanche, la plupart des sondes multimodales sont des nano-objets comme des nanoparticules [62], quantum dots [121], ou des polymères [122] tandis que moins de recherches ont été réalisées sur des sondes moléculaires [123].

Par exemple, B. Guérin *et al.* ont développé une sonde bimodale TEP-fluorescence à partir d'une phtalocyanine de zinc relié de manière covalente à un dérivé du H₃nota pour la complexation du ⁶⁴Cu [124].

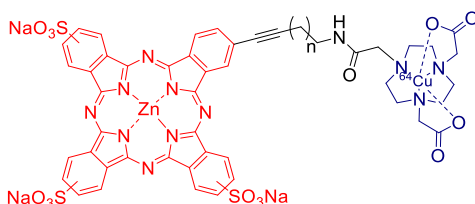


Figure 47 : Structure d'une sonde bimodale TEP-fluorescence décrite par B. Guérin *et al.* [124]

La combinaison des deux molécules ne change pas leurs propriétés respectives et permet donc un effet synergétique en termes d'imagerie pour étudier la biodistribution du composé par TEP ou imagerie optique. En revanche, l'utilisation de phtalocyanine présente deux inconvénients : la

synthèse du composé dissymétrique est difficile et il est obtenu avec un très faible rendement. Le second problème relevé est lié à la taille de la molécule puisqu'une grande accumulation dans le foie et les reins a été décelée lors d'étude *in vivo*.

Plusieurs exemples de sondes IRM-fluorescence ont vu le jour en utilisant les dérivés gadolinés déjà connus en clinique pour un diagnostic IRM. N. K. Logothetis *et al.* ont ainsi développé une sonde moléculaire à base d'un dérivé du Gd^{3+} lié à un fluorophore organique (**Figure 48**)^[125].

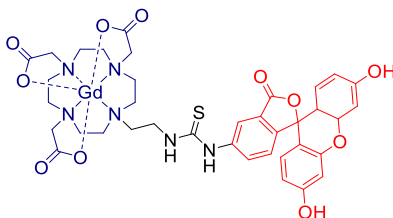


Figure 48 : Structure d'une sonde IRM-fluorescence développée par N. K. Logothetis *et al.*^[125]

L'introduction du motif fluorescent a été possible en sacrifiant l'un des bras acétate. Cela conduit à une perte de stabilité du complexe $[Gd(\mathbf{do3a})]$ par rapport au $[Gd(\mathbf{dota})]^-$. La sonde créée possède cependant des valeurs de r_1 et r_2 satisfaisantes ($r_1 = 5,36 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et $r_2 = 7,52 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) pour une application en IRM. Les études par imagerie optique ont également permis de suivre la localisation intracellulaire de la sonde.

Ces deux différents exemples montrent qu'il est très intéressant de combiner les techniques d'imageries telles que la TEP et l'IRM avec la fluorescence pour élaborer de sondes bimodales.

VII. Présentation des cibles

Dans le but de développer de nouvelles sondes moléculaires, notre équipe a obtenu un financement ANR en 2016 (ANR SaDAM), pour la synthèse et l'étude de sondes multimodales mais également de sondes théranostiques, alliant diagnostic et thérapie. Ce projet a ainsi eu pour but d'associer la complémentarité des recherches de notre groupe et de ses collaborateurs historiques, en chimie macrocyclique pour des applications en imagerie TEP ou IRM (avec l'équipe de Pr. Alain Faivre-Chauvet du CRCINA de l'Université de Nantes et l'équipe du Dr. Gyula Tirscó de l'Université de Debrecen) et l'expertise du groupe d'Olivier Maury à l'ENS de Lyon, spécialisé dans la conception et l'étude de sondes luminescentes comme vu dans cette partie

bibliographique. Certains des bras chélatants antennes développés précédemment sont en effet, de par leur longueur d'onde d'absorption, adaptables aux complexes de métaux de transition, ce qui nous a permis de cibler des sondes TEP-fluorescence et IRM-fluorescence (**Figure 49**).

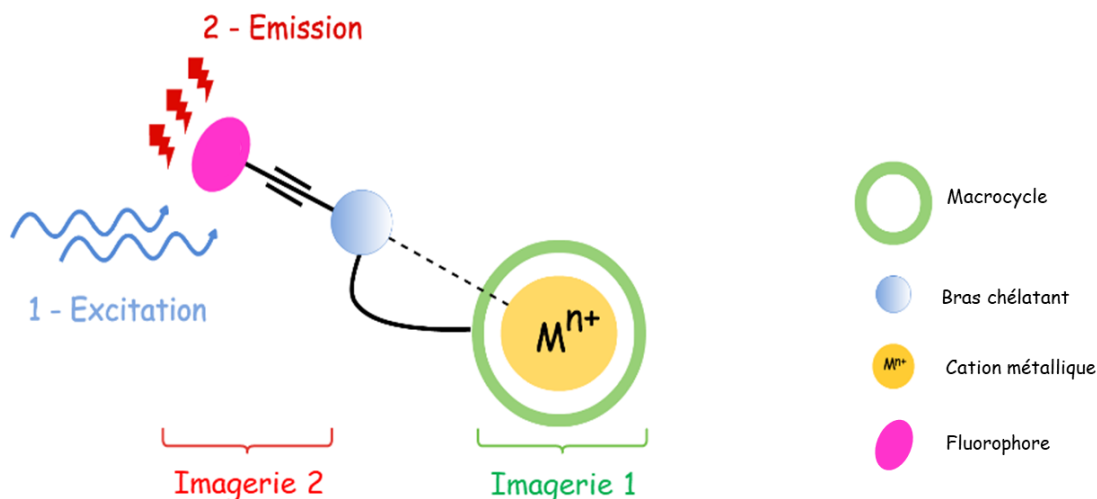


Figure 49 : Schéma représentatif des sondes bimodales

Nous avons ainsi étudié la possibilité d'association des ligands **Hno2py1pa** et **Hno1pa**, pour la complexation respective du Cu(II) et du Mn(II), avec les antennes fluorescentes développées par le groupe d'Oliver Maury. L'antenne fluorescente sera fixée sur un des bras coordonnants du macrocycle afin de ne pas impacter la stabilité thermodynamique des complexes. Les deux ligands ainsi ciblés sont le **Hno2py1fluo**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine et une antenne fluorescente et le **Hno1fluo**, tacn mono-*N*-fonctionnalisé par un bras coordonnant fluorescent (**Figure 50**).

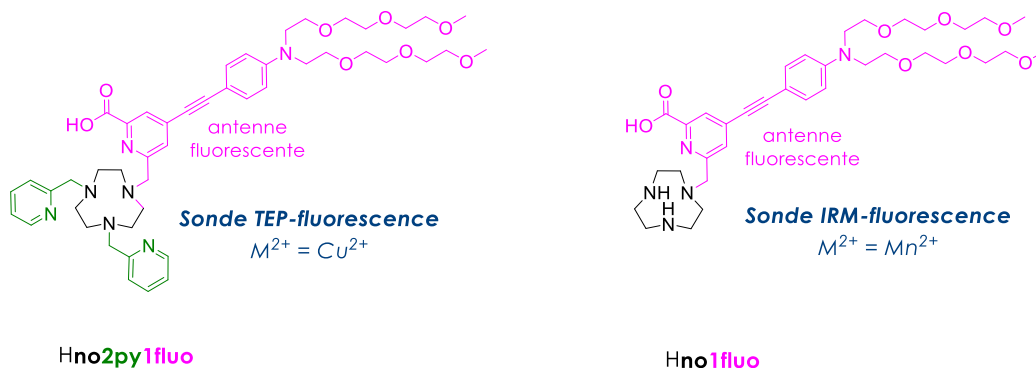


Figure 50 : Présentation des cibles **Hno2py1fluo** et **Hno1fluo**

Ce chapitre est divisé en deux parties. Une première partie concernera la synthèse et les études photophysiques du complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1flu})]^+$ afin d'étudier l'influence du Cu^{2+} sur les propriétés lumineuses de la sonde TEP-fluorescence. Ensuite, les études de radiomarquage au cuivre-64 seront abordées ainsi que les premières images in vitro obtenues par microscopie confocale. Dans un second temps, les différentes méthodes de synthèse développées pour l'élaboration du ligand Hno1flu dans le but de synthétiser une potentielle sonde bimodale IRM-fluorescence à base d'un complexe de Mn^{2+} seront détaillées. Les premières études en solution et les études de relaxométrie seront ensuite discutées.

4 Sonde bimodale TEP-fluorescence à motif tacn

I. Synthèse et caractérisation du ligand Hno2py1fluo

Une voie de synthèse a été envisagée pour l'obtention du ligand Hno2py1fluo, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine et une antenne fluorescente. L'approche rétrosynthétique est représentée ci-dessous (**Schéma 16**). La voie décrite consiste à introduire en dernier lieu l'antenne fluorescente sur le tacn di-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine. L'antenne fluorescente est préalablement synthétisée en dix étapes à partir de deux dérivés commerciaux, l'acide chélidamique et la *N*-phénylediethanolamine.

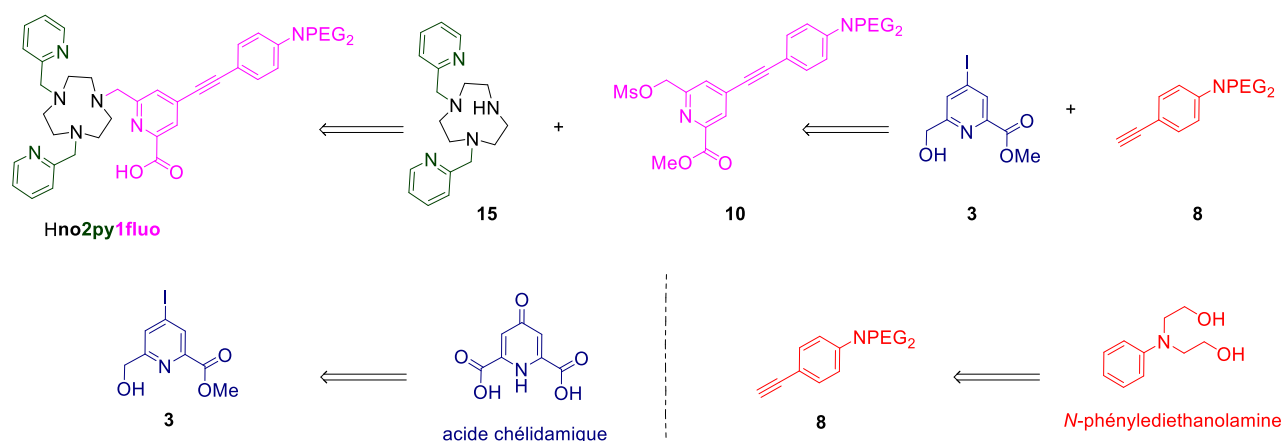


Schéma 16 : Approche rétrosynthétique du ligand Hno2py1fluo

1. Synthèse d'un dérivé du picolinate substitué en position *para* par un atome d'iode

Le dérivé du picolinate portant un atome d'iode en position *para* de l'atome d'azote (**3**), ce qui permet de réaliser des couplages organopalladés avec des alcynes vrais, sera le synthon de départ pour l'élaboration de l'antenne fluorescente. La synthèse s'effectue en trois étapes (**Schéma 17**) à partir de l'acide chélidamique commercial. Cette synthèse est adaptée d'une procédure déjà décrite dans la littérature ^[126].

La première étape consiste à réaliser la chloration de la fonction cétone du cycle aromatique par action du chlorure de thionyle catalysée au DMF. Cette étape permet également d'activer les fonctions acide carboxylique en fonctions chlorure d'acyle. Ensuite, l'ajout de méthanol conduit à une double estérification des fonctions chlorure d'acyle. Le composé **1** est obtenu avec un

rendement de 96%. Afin d'obtenir un halogène plus réactif pour un futur couplage de Sonogashira, une métathèse de l'atome de chlore par un atome d'iode est réalisée par action d'un excès d'iodure de sodium puis de chlorure d'acétyl, ce qui permet d'obtenir le diester iodé **2** avec un rendement de 96%. Enfin, la mono-réduction des fonctions ester méthylique est conduite par action de deux équivalents de NaBH₄. Le dérivé du picolinate fonctionnalisé en *para* par un atome d'iode **3** est obtenu avec un rendement de 67% après purification. Ces synthèses optimisées permettent d'obtenir le composé **3** à grande échelle (≈ 15 g).

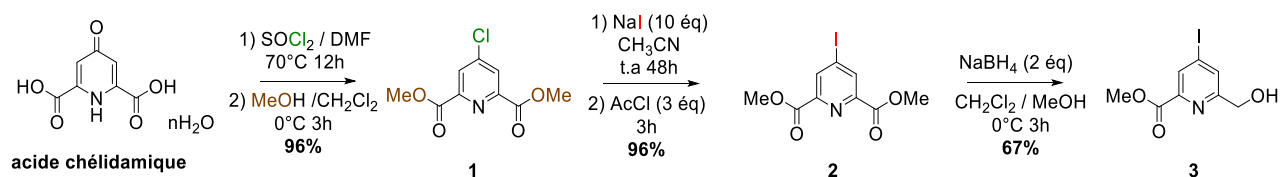


Schéma 17 : Voie de synthèse du composé **3**

2. Synthèse de l'antenne fluorescente à motif picolinate **10**

La synthèse de l'antenne fluorescente biphotonique est effectuée en sept étapes. La première étape (**Schéma 18**) consiste à former un dérivé électrophile **4** du 2,2-méthoxyéthoxyéthanol via une activation de la fonction alcool secondaire par action du chlorure de tosyle. Le composé **4** précurseur des chaînes hydrosolubilisantes (PEG), est obtenu avec un rendement de 75%.

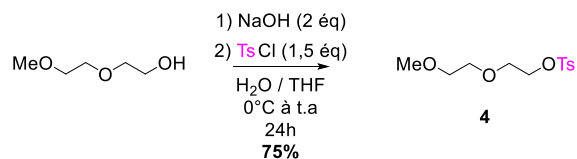


Schéma 18 : Synthèse du composé **4**

La suite de la synthèse de la sonde fluorescente se réalise en six étapes à partir d'un composé commercial, le *N,N*-bis(2-hydroxyéthyl)aniline. Le schéma réactionnel est représenté ci-après (**Schéma 19**). La formation du *N,N*-bis(2-hydroxyéthyl)-4-iodoaniline **5** est obtenue par réaction entre *N,N*-bis(2-hydroxyéthyl)aniline et le diiode à 0°C. Les premiers tests de synthèse nécessitent une purification par colonne chromatographique pour enlever l'excès de pyridine et de sous-produits. Néanmoins, une alternative à cette purification a été trouvée par lavage de la phase organique avec une solution aqueuse de CuSO₄ 10%, ce qui permet d'enlever les traces de

pyridine restantes ^[127]. Ensuite, une simple recristallisation dans l'acétate d'éthyle permet d'obtenir le composé **5** avec un rendement de 86%.

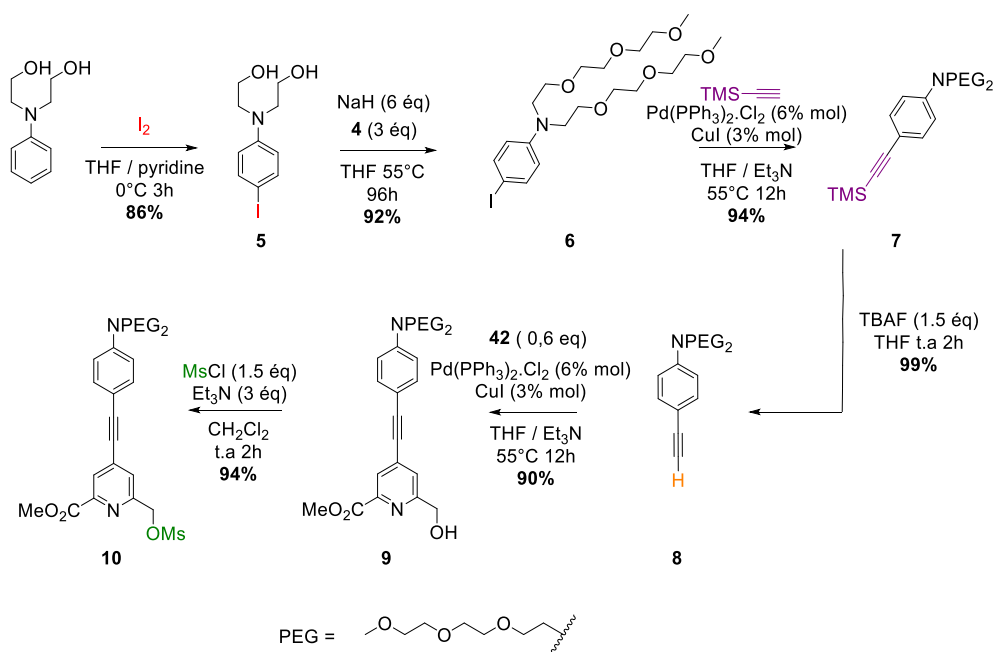


Schéma 19 : voie de synthèse de l'antenne fluorescente **10**

Une réaction de Williamson entre le composé **5** et l'électrophile tosylé **4** en présence d'hydruure de sodium permet d'obtenir l'aromatique **6** possédant deux chaînes PEG avec un rendement de 92%. Ensuite, un premier couplage de Sonogashira dans des conditions usuelles entre le triméthylsilylacétylène et le dérivé **3** conduit au produit **7** avec un rendement de 94% après purification par colonne chromatographique. L'alcyne protégé **7** est engagé dans une réaction de clivage du groupement silylé par action du fluorure de tétrabutylammonium dans du THF. Cette étape permet d'obtenir l'alcyne vrai **8** pouvant réagir dans un second couplage de Sonogashira avec un rendement de 99%. Le second couplage organopalladé avec un dérivé iodé du picolinate **3** aboutit à la formation de l'antenne fluorescente **9** avec un rendement de 90%. Enfin, l'activation de la fonction alcool secondaire du composé **9** est réalisée par action du chlorure de mésyle. L'antenne fluorescente **10** est obtenue avec un rendement global de 65% en six étapes. Toutes les optimisations effectuées nous permettent de réaliser la synthèse de l'antenne fluorescente **9** à hauteur de plusieurs grammes (≈ 5 g).

3. Synthèse et caractérisation du ligand Hno2py1fluo

La synthèse du ligand Hno2py1fluo s'effectue en 7 étapes à partir du tacn. Afin d'obtenir une *N*-fonctionnalisation régiospécifique du tacn, la méthode décrite par G. R. Weisman *et al.* a été choisie ^[61] (**Schéma 20**). Après formation du tacn orthoamide **11**, l'alkylation régiospécifique d'une amine tertiaire permet d'obtenir l'ammonium **12** avec un rendement de 69%. L'hydrolyse partielle du groupement orthoamide conduit au composé **13**, porteur d'une fonction amide, d'un bras picolyle et d'une fonction amine secondaire. L'introduction d'un second bras picolyle est effectuée sur cette dernière par réaction avec un second équivalent de chlorure de picolyle. Le composé **14** est obtenu après purification sur colonne de silice avec un rendement de 84%. Enfin, l'hydrolyse en milieu acide de l'amide permet d'obtenir le **no2py** (**15**), tacn di-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine, avec un rendement global de 44% en 5 étapes à partir du tacn.

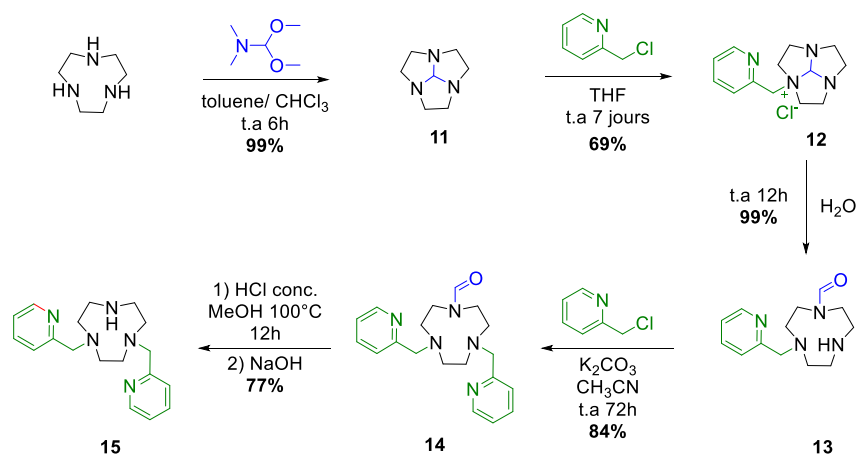


Schéma 20 : Voie de synthèse du composé **15** (**no2py**)

La synthèse du ligand final s'effectue en deux étapes (**Schéma 21**), à partir du composé **no2py**. La première étape consiste à introduire l'antenne biphotonique (**10**) par une réaction de S_N2 par addition du bras mésylé **10**. Après plusieurs étapes de purification, le tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupement méthylpyridine et une antenne fluorescente **16** est obtenu avec un rendement de 53%.

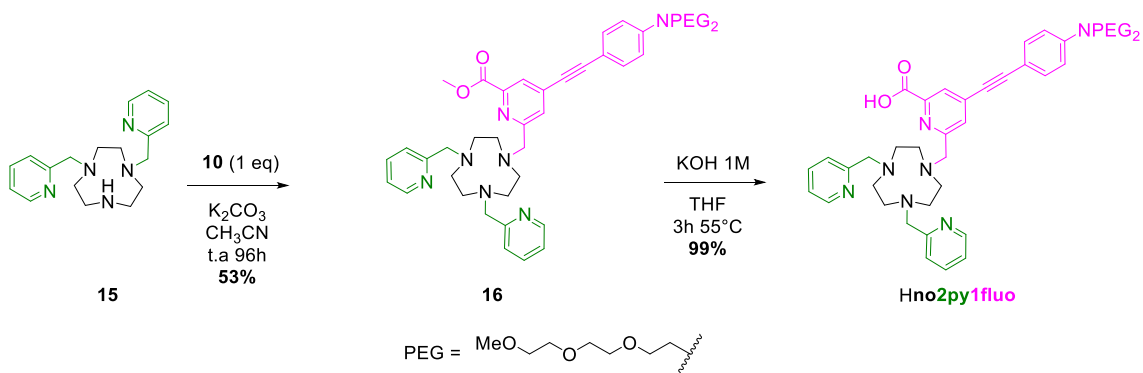
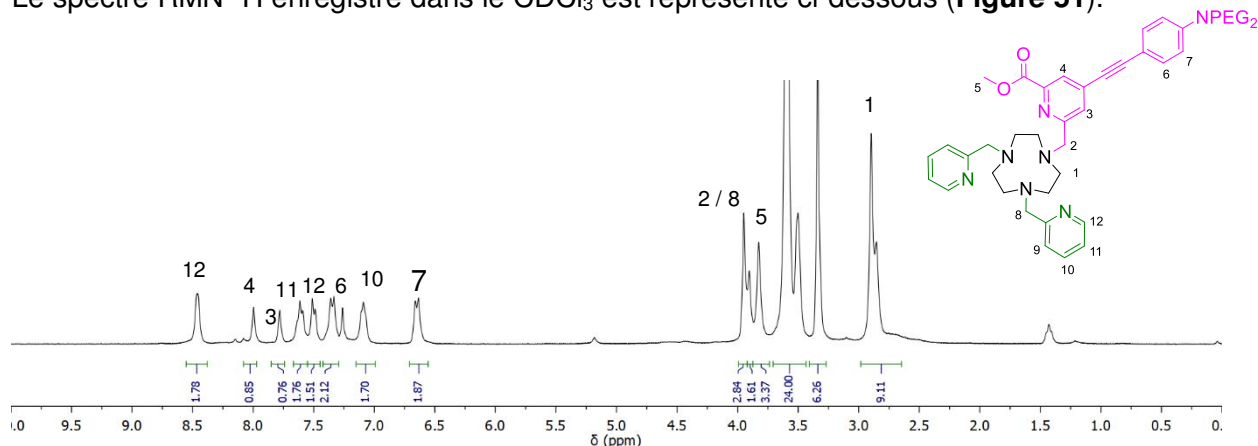


Schéma 21 : Voie de synthèse du ligand Hno2py1fluo

Le spectre RMN ¹H enregistré dans le CDCl₃ est représenté ci-dessous (**Figure 51**).



Une isochronie fortuite des protons du macrocycle est caractérisée par la présence d'un singulet à 2,89 ppm. Les groupements méthyl terminaux des fonctions PEG sont représentés sous la forme d'un singulet à 3,39 ppm intégrant pour six protons. Les groupements CH₂ des chaînes PEG ne sont pas différenciables et se retrouvent sous la forme d'un massif à 3,50 ppm intégrant pour vingt-quatre protons. Le singulet à 3,83 ppm intégrant pour trois protons est caractéristique du groupement méthyle de la fonction ester. Les CH₂ du groupement picolinate et des groupements méthylpyridine se retrouvent respectivement à 3,90 et 3,95 ppm. Enfin, dans la région des protons aromatiques, tous les groupes de protons des bras méthylpyridine et du bras picolinate sont différenciables. Les attributions de chaque groupe de protons sont représentées sur le spectre ¹H.

Sur le spectre RMN ^{13}C , en J-modulation représenté ci-dessous (**Figure 52**), le pic positif à 50,6 ppm est attribué aux groupements CH_2 des chaînes PEG en β de l'atome d'azote. Le pic négatif à 52,7 ppm est caractéristique du groupement CH_3 de la fonction ester méthylique tandis que celui à 58,8 ppm, plus déblindé, correspond aux groupements CH_3 des chaînes PEG. Le pic positif mal résolu à 55,6 ppm est la signature des CH_2 du cycle tacn. Ensuite, les pics positifs à 63,9 et 64,4 ppm représentent respectivement les groupements CH_2 des bras méthylpyridine et du bras picolinate. Les deux pics positifs à 85,0 et 96,7 ppm sont attribués aux atomes de carbone de la triple liaison. Dans la zone des atomes de carbone aromatique, les groupes d'atomes de carbone du groupement aryle de l'antenne fluorescente sont représentés par deux pics négatifs à 111,8 et 123,1 ppm tandis que les deux pics négatifs à 125,0 et 127,1 ppm correspondent aux atomes de carbone du cycle aromatique picolinate. Les pics négatifs à 121,7, 133,2, 136,1 et 148,6 ppm correspondent au groupements CH des bras méthylpyridine. Enfin, le pic positif à 165,4 ppm est la signature du groupement carbonyle présent sur le groupements picolinate. Une attribution précise des atomes de carbone du composé **16**, réalisée par RMN 2D (COSY, HMBC et HMQC) est représentée sur le spectre RMN ^{13}C (**Figure 52**).

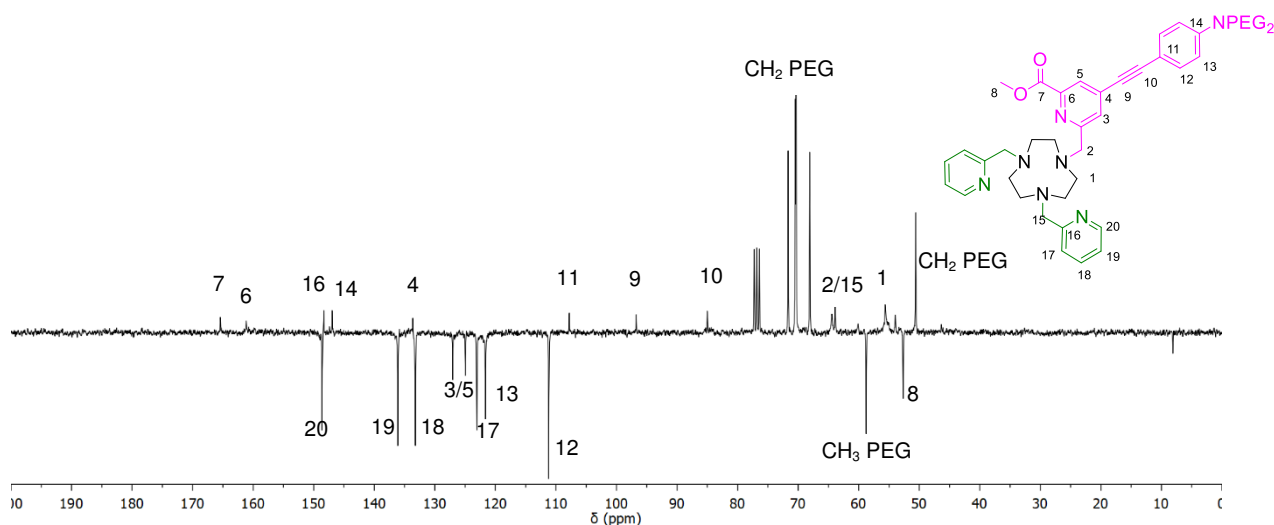


Figure 52 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **16**

L'hydrolyse du groupement ester méthylique est effectuée en condition basique en raison d'une faible stabilité de l'antenne fluorescente en milieu acide due à la présence de la triple liaison, et donne le ligand **Hno2py1flu** est obtenu avec rendement de 98%. Le rendement global est de 29% en sept étapes à partir du tacn.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C en J-modulation (**Figure 53**) permet de confirmer la structure du ligand **Hno2py1fluo**. La disparition du pic positif à 52,6 correspondant au groupement CH_3 de la fonction ester méthylique et le déplacement du carbonyle de 165,4 à 173,8 permet de confirmer la transformation de la fonction ester méthylique en fonction acide carboxylique. L'attribution de chaque carbone du ligand **Hno2py1fluo** est présentée sur le spectre ci-dessous (**Figure 53**).

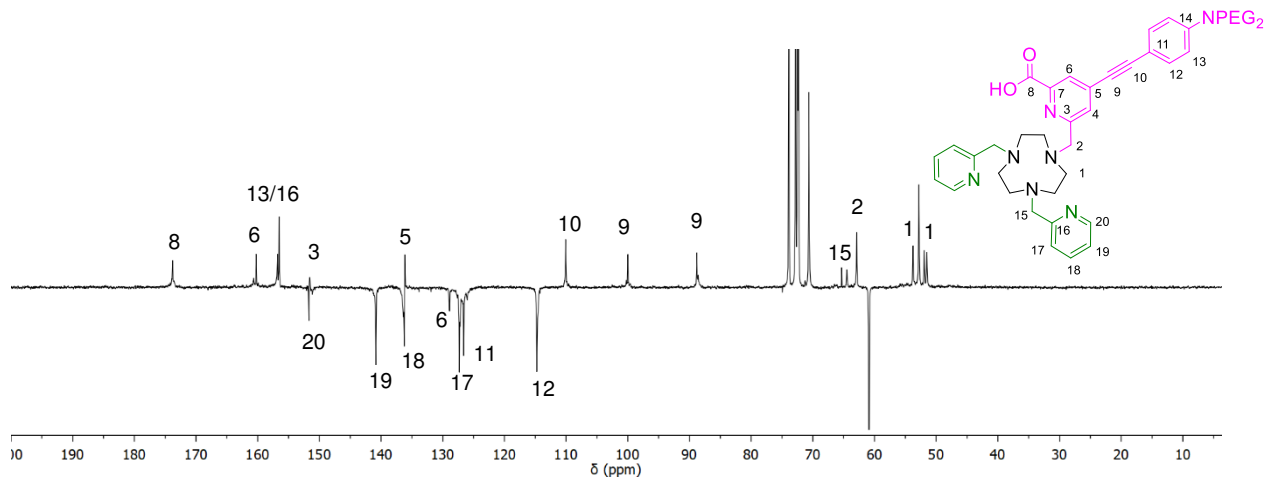


Figure 53 : Spectre RMN ^{13}C (75,4 MHz, 298 K, D_2O) du ligand **Hno2py1fluo**

4. Synthèse des complexes $[\text{M}^{\text{II}}(\text{no2py1fluo})]^+$ ($\text{M}^{\text{II}} = \text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$)

La réaction de complexation du Cu^{2+} et du Zn^{2+} par le ligand est effectuée dans l'eau à 60°C avec un pH ajusté à 6,6 en utilisant 1 équivalent de sel métallique hydraté (**Schéma 22**).

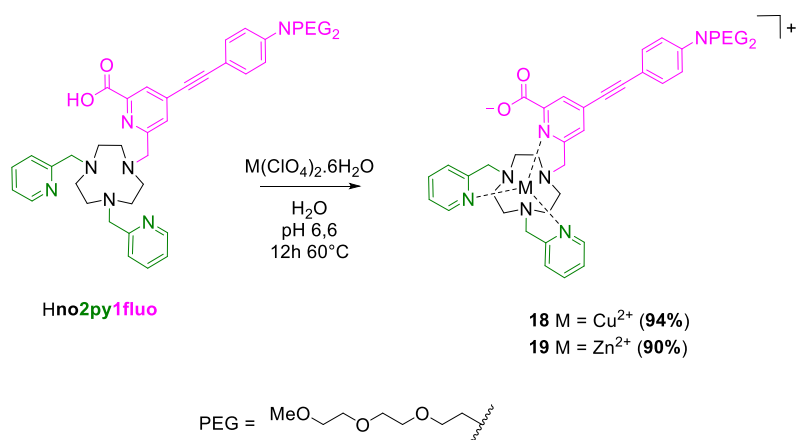


Schéma 22 : Voie de synthèse des complexes $[\text{M}^{\text{II}}(\text{no2py1fluo})]^+$ ($\text{M} = \text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$)

Le complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$ est obtenu sous la forme d'une huile verte avec un rendement de 94% tandis que le complexe $[\text{Zn}(\text{no2py1fluo})]^+$ est isolé sous la forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 90%. Les études de caractérisations et photophysiques des complexes seront discutées dans la prochaine partie.

II. Etudes électrochimiques du complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$

1. Etude par voltamétrie cyclique

Le comportement électrochimique du complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$ est étudié par voltamétrie cyclique dans l'eau à pH neutre, à une concentration de 1mM (**Figure 54**). L'enregistrement des spectres est effectué, avant et après électrolyse, en appliquant un potentiel de -0,6V, afin d'étudier la stabilité du complexe Cu(I) électrogénéré. Les valeurs des potentiels de réduction et d'oxydation sont répertoriées dans le **Tableau 23**.

Le complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$ adopte un comportement quasi-réversible. Ce dernier possède un pic de réduction à -0,54V par rapport à Ag/AgCl et un pic d'oxydation à -0,42V ce qui lui confère un potentiel standard de -0,48V.

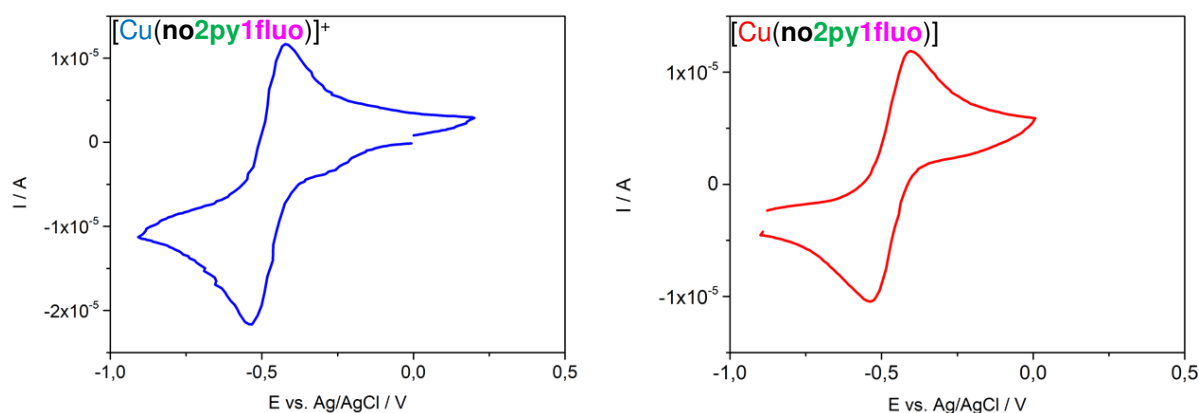


Figure 54 : Voltamogrammes cycliques avant électrolyse (bleu) et après électrolyse (rouge) à -0,6V enregistrés à 0,1 V.s⁻¹ dans H₂O/LiClO₄ (0,1M) à pH 6,7

Potentiel	$[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$	$[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]$
E_{pc} (V)	-0,54	-0,54
E_{pa} (V)	-0,42	-0,41

Tableau 23 : Caractéristiques électrochimiques du complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$ et de l'analogue réduit $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]$

L'espèce réduite *in situ*, en appliquant un potentiel de -0,6V pendant une heure, révèle également un comportement quasi-réversible. Les potentiels de réduction et d'oxydation sont également similaires au complexe Cu(II) (**Figure 54**).

Les résultats obtenus montrent que l'introduction de l'antenne biphotonique sur le picolinate du ligand Hno2py1pa n'entraîne pas de différence de stabilité du complexe [Cu(no2py1fluo)]⁺. Le complexe est néanmoins plus facilement réductible puisqu'il possède un potentiel -0,54 V contre -0,67 V ^[91] (vs Ag/AgCl).

2. Caractérisation du complexe [Cu(no2py1fluo)]⁺ par spectroélectrochimie

Les études par spectroélectrochimie permettent d'obtenir des informations spectrales lors de la réduction du cuivre. Ces études, réalisées par le Dr. Christophe Bucher de l'ENS Lyon, sont réalisées dans le DMF à température ambiante. L'objectif est de déterminer l'effet de la réduction du Cu²⁺ en Cu⁺ sur l'absorption du complexe. Les résultats obtenus sont représentés sur le graphe UV-visible ci-dessous (**Figure 55**). Le complexe [Cu(no2py1fluo)]⁺ possède une bande d'absorption large et mal définie centrée à 402 nm dans le DMF. Lors de l'électrolyse de la solution en appliquant un potentiel de -0,6 V, un déplacement hypsochrome est notable puisque le complexe de Cu⁺ électrogénéré a une absorbance à 377 nm ($\Delta\lambda_{\max} = 25$ nm). Après électrolyse, tout le complexe est réduit comme en témoigne le spectre d'absorbance du complexe réduit [Cu(no2py1fluo)] (**B**). Ces résultats préliminaires permettent de mettre en évidence encore une fois la stabilité du complexe sous sa forme réduite. Des études de spectrofluélectrochimie sont en cours pour permettre de déterminer le rendement quantique de l'espèce réduite [Cu(no2py1fluo)].

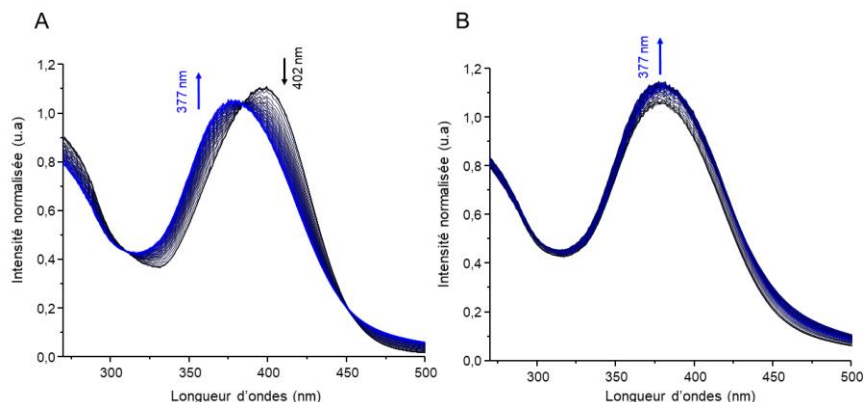


Figure 55: Spectres UV-visible d'absorption du complexe [Cu(no2py1fluo)]⁺ pendant l'électrolyse (**A**) et après électrolyse (**B**)

III. Etudes des propriétés physico-chimiques

1. Caractéristique UV-visible

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'effet du cuivre sur les propriétés optiques du ligand synthétisé. En effet de nombreux articles relatent du phénomène d'extinction de fluorescence de différents fluorophores en présence de cuivre ^[128–130]. L'étude sur le complexe $[\text{Zn}(\text{no2py1flu})]^+$ est également effectuée pour avoir un comparatif.

Les propriétés spectroscopiques du ligand Hno2py1flu sous sa forme ester méthylique (**16**), du ligand Hno2py1flu et des complexes $[\text{Cu}(\text{no2py1flu})]^+$ et $[\text{Zn}(\text{no2py1flu})]^+$ sont étudiées par spectroscopie UV-visible. Les spectres d'absorption, d'excitation et d'émission sont enregistrés dans le dichlorométhane à température ambiante et sont représentés ci-dessous (**Figure 56**). Les valeurs de longueurs d'ondes d'absorption, d'excitation et d'émission sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 24**).

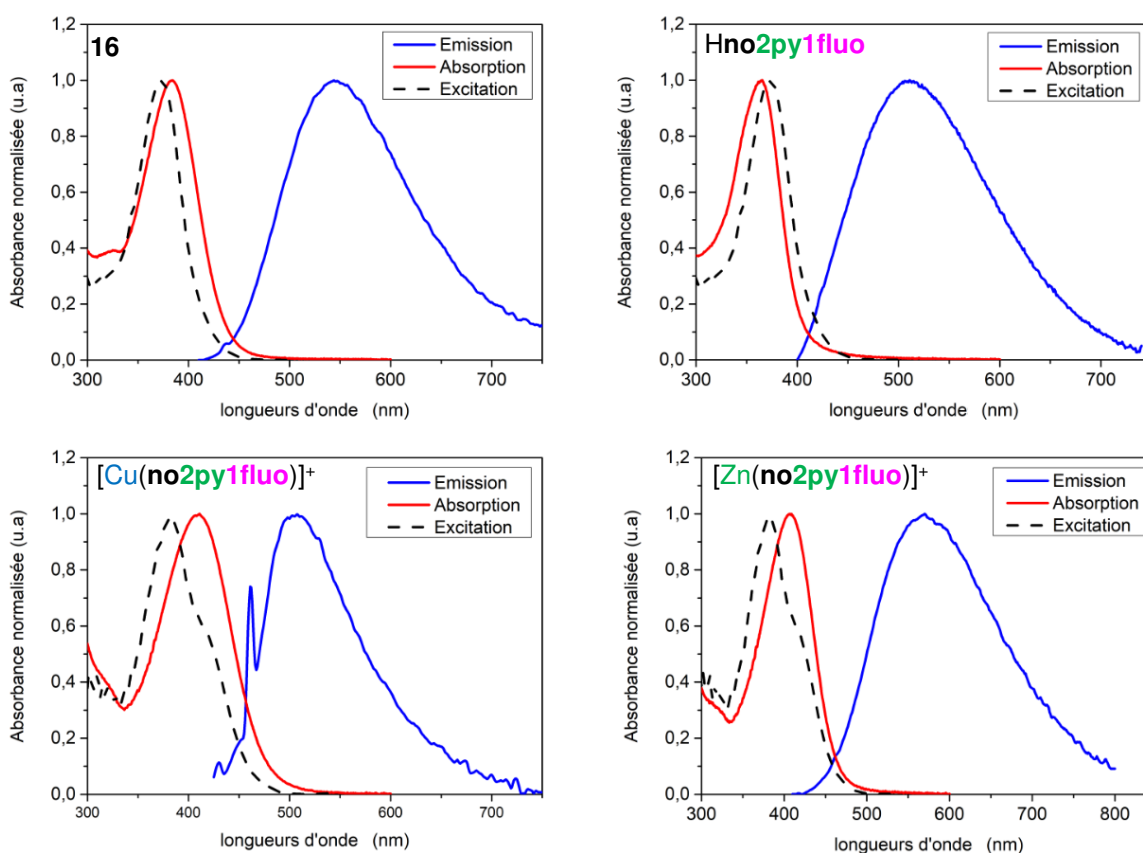


Figure 56 : Spectres d'absorption (—), d'émission (—) et d'excitation (- -) des composés **16**, Hno2py1flu , $[\text{Cu}(\text{no2py1flu})]^+$ et $[\text{Zn}(\text{no2py1flu})]^+$

	16	Hno2py1fluo	[Cu(no2py1fluo)]⁺	[Zn(no2py1fluo)]⁺
λ_{abs} (nm)	385	365	410	407
λ_{exc} (nm)	385	385	405	405
λ_{em} (nm)	545	510	507	570

Tableau 24 : Propriétés photophysiques des composés **16**, **Hno2py1fluo**, **[Cu(no2py1fluo)]⁺** et **[Zn(no2py1fluo)]⁺**

Le composé **16**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine et une antenne fluorescente sous la forme ester méthylique, possède une bande d'absorption large avec une longueur d'onde maximale à 385 nm, correspondant à un transfert de charge du donneur (groupement -N(PEG)₂) au groupement accepteur (groupement picolinate). Après excitation monophotonique à 385 nm, l'émission du composé **16** est caractérisée par une bande large et non structurée, caractéristique de la fluorescence de chromophore organique, à 545 nm. L'absorbance du ligand **Hno2py1fluo** est caractérisée par une bande large et non structurée comme pour le composé **16** avec un maximum d'absorption à 365 nm. À la suite d'une excitation à 385 nm, le ligand **Hno2py1fluo** possède un maximum d'émission à 510 nm.

Le complexe **[Cu(no2py1fluo)]⁺** est caractérisé par une bande large d'absorption centrée à 407 nm due au transfert de charge du donneur vers l'accepteur. Après excitation à 405 nm, le complexe possède une émission très faible avec une longueur d'onde maximale d'émission de 507 nm. Finalement, le complexe de **[Zn(no2py1fluo)]⁺** possède une absorbance similaire au complexe de Cu²⁺, centrée à 407 nm et une bande d'émission large centré à 507 nm après excitation à 405 nm.

2. Rendements Quantiques

Le rendement quantique correspond au rapport du nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés. Les rendements quantiques de fluorescence des composés **16**, **Hno2py1fluo** et des complexes de Cu²⁺ et Zn²⁺ sont déterminés par la méthode relative. Cette méthode consiste à comparer l'intensité de fluorescence d'un composé à analyser avec celle d'une référence. Expérimentalement, il faut travailler à une longueur d'onde d'excitation fixe et une densité optique inférieure à 0,1 afin de garder une linéarité des résultats.

Les rendements quantiques sont déterminés dans le CH₂Cl₂ en utilisant la coumarine comme référence interne et sont calculés grâce à l'équation suivante (**Équation 5**) :

$$\Phi = \Phi_r \frac{A_x DO_r(\lambda_r) (n)^2}{A_r DO_x(\lambda_x) (n_r)^2}$$

Équation 5 : Calcul du rendement quantique de fluorescence

Dans cette équation Φ représente le rendement quantique du composé étudié, Φ_r le rendement quantique de la référence, DO_x et DO_r la densité optique à la longueur d'onde d'excitation du composé et de la référence, A_x et A_r à l'intensité d'émission du composé et de la référence. Enfin, n et n_r représentent quant à eux, l'indice de réfraction du solvant de l'échantillon et celui de la référence. Les valeurs des rendements quantiques sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 25**) et sont déterminées avec une approximation de 15%.

	16	Hno2py1fluo	[Cu(no2py1fluo)]⁺	[Zn(no2py1fluo)]⁺
Φ (%)	5	6	<1	4

Tableau 25 : Rendements quantiques de fluorescence des composés **16**, **Hno2py1fluo**, **[Cu(no2py1fluo)]⁺** et **[Zn(no2py1fluo)]⁺** (référence = coumarine)

Le composé **16** possède un rendement quantique relativement faible de l'ordre de 5% dans le dichlorométhane. Le ligand **Hno2py1fluo** est caractérisé lui par un rendement quantique similaire égal à 6%. En revanche, pour le complexe **[Cu(no2py1fluo)]⁺** une diminution du rendement quantique est notable puisque le rendement quantique du complexe est inférieur à 1%. Enfin le complexe de Zn^{2+} possède un rendement quantique plus élevé de l'ordre de 4%.

Avec un rendement quantique de 6%, le ligand **Hno2py1fluo** est le plus fluorescent des composés étudiés. Si l'antenne biphotonique est un chromophore organique intéressant pour l'excitation de lanthanides par effet d'antenne, elle ne possède cependant qu'une fluorescence faible. La complexation du Cu^{2+} par le ligand entraîne comme attendu une extinction de la luminescence qui remet en question l'application potentielle comme sonde bimodale TEP-fluorescence.

3. Etude du phénomène d'extinction de fluorescence du complexe de cuivre

Une potentielle explication de l'extinction de fluorescence par le Cu^{2+} peut être évaluée à partir du comportement électrochimique et des propriétés photophysiques du complexe. Des études réalisées par G. Pilet *et al.* ont permis de proposer une explication de l'extinction de fluorescence

de chromophores organiques à base de bodipy après complexation du Cu^{2+} [131]. La formation du complexe entraîne un changement du rendement quantique du ligand de 97 à 0% après complexation et ils ont avancé que ce phénomène pouvait être dû à un transfert électronique photo-induit. D. Rehm et A. Weller, dans les années 1970, ont mis au point une équation semi-empirique (**Équation 6**) permettant de déterminer si le phénomène de transfert électronique photo-induit entraîne une extinction de luminescence [132].

$$\Delta G = E_{ox}(D) - E_{red}(A) - E^* + C$$

Équation 6 : Equation de Rehm-Weller

Dans cette équation, $E_{ox}(D)$ correspond au potentiel d'oxydation du donneur à savoir l'antenne fluorescente et $E_{red}(A)$ au potentiel de réduction de l'accepteur qui est le centre métallique. L'entité E^* correspond à l'intersection des spectres d'absorption et d'émission du complexe et enfin C est un terme coulombien qui, dans notre cas, a été fixé à 0. Si la valeur de ΔG prend des valeurs négatives alors le phénomène d'extinction de fluorescence peut être dû à un transfert électronique photo-induit.

L'analyse de l'extinction de fluorescence est donc possible à partir de l'équation de Rehm-Weller et des propriétés électrochimique et spectroscopiques du complexe. Le voltamogramme et les spectres sont représentés ci-dessous (**Figure 57**) et les valeurs des paramètres de l'équation de Rehm-Weller sont répertoriées dans le **Tableau 26**.

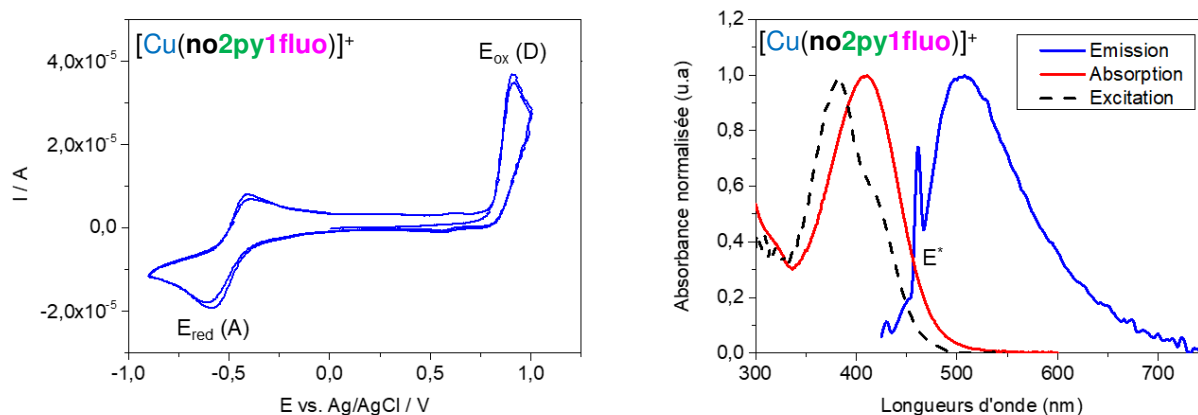


Figure 57 : Voltamogramme cyclique dans $\text{H}_2\text{O}/\text{LiClO}_4$ (0,1M) à pH 6.7 et spectres d'absorption (—), d'émission (—) et d'excitation (- -) du complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1flu})]^+$

	E_{ox} (D) (V)	E_{red} (A) (V)	E^* (eV)	ΔG (eV)
$[Cu(no2py1flu)]^+$	0,91	-0,57	2,72	-1,24

Tableau 26 : Caractéristiques électrochimique et photophysiques du complexe $[Cu(no2py1flu)]^+$

D'après le voltamogramme cyclique, le complexe possède un pic de réduction à -0,57 V (vs Ag/AgCl) qui correspond à la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ . Il possède également deux pic d'oxydation, un premier correspondant à l'oxydation quasi-réversible à -0,42 V comme vu précédemment. Le second pic d'oxydation correspond à l'oxydation du donneur N-aryle. Ce pic irréversible apparaît à un potentiel de 0,91 V. L'étude des spectres d'absorption et d'émission permet de déterminer l'intersection des deux courbes. Cette dernière prend la valeur de 456 nm soit 2,72 eV.

Toutes ces mesures ont permis de calculer la valeur de ΔG qui est égale à -1,24 eV ce qui permet d'émettre une hypothèse sur la nature du phénomène d'extinction de fluorescence, qui pourrait par conséquent être dû à un transfert électronique photo-induit entre le donneur $(N(PEG)_2)$ et le cation Cu^{2+} .

IV. Radiomarquage au ^{64}Cu et études in vitro

Les études de radiomarquage au cuivre-64 et les études d'imagerie sont réalisées en collaboration avec l'équipe nantaise du Pr. Alain Faivre Chauvet du CRCINA.

1. Radiomarquage du ligand $Hno2py1flu$ au ^{64}Cu

Le radiomarquage au ^{64}Cu est réalisé dans un tampon acétate d'ammonium (pH 5,5) avec une concentration en ligand $Hno2py1flu$ égale à 58 μM pendant 15 minutes à 100°C. Les résultats obtenus par radio-CCM sont présentés ci-après (**Figure 58**). La première radio-CCM correspond au complexe $[^{64}Cu(acétate)]$ qui sert de référence pour déterminer le radiomarquage du ligand. Le $[^{64}Cu(acétate)]$ possède un $R_f = 0,1$ et ne migre pas sur la CCM. La seconde radio-CCM correspond au test de radiomarquage du ligand. Sur cette dernière, deux entités radiomarquées sont présentes : le spot avec un $R_f = 0,3$ correspond au complexe radiomarqué $[^{64}Cu(no2py1flu)]^+$ alors que celui avec un R_f égal à 0,1 correspond au ^{64}Cu non complexé.

Après 15 minutes à 100 °C, le radiomarquage du ligand Hno2py1fluo est surprenant puisque seulement 40% du cuivre-64 est complexé par le ligand.

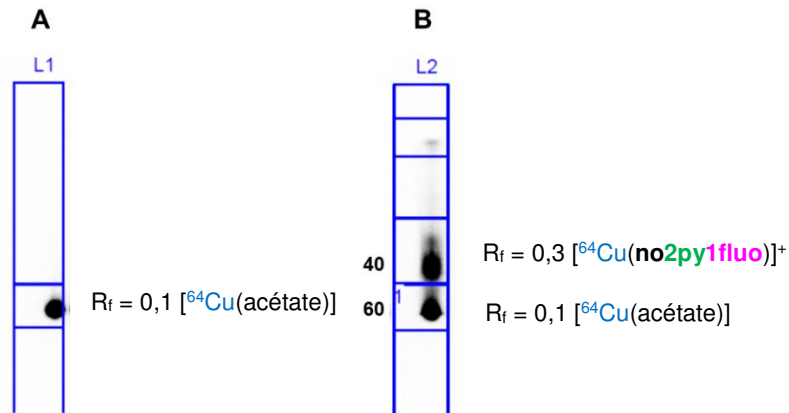


Figure 58 : Radio-CCM du composé $[^{64}\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$ (15 minutes, pH 5,5, 100 °C)

Ces premiers tests de radiomarquage ne sont pas concluants d'autant plus si on les compare au ligand non fluorescent Hno2py1pa qui est radiomarquable de façon quantitative à pH 5,5 et température ambiante ^[91]. Une hypothèse possible pour expliquer le faible rendement de radiomarquage porte sur la présence des chaînes PEG de l'antenne fluorescente, qui, à une concentration élevée, sont susceptibles de former des micelles gardant le macrocycle prisonnier à l'intérieur de la micelle et moins accessible. Afin d'évaluer cette hypothèse, des études de radiomarquage à différentes concentrations sont en cours de réalisation par nos collaborateurs.

2. Etudes in vitro : imagerie confocale

Des premières études in vitro d'imagerie confocale ont été réalisées sur des cellules cancéreuses humaines provenant de glandes mammaires (MDA-MB 468). Les études se sont uniquement portées sur le complexe de Zn^{2+} puisqu'il possède un rendement quantique de fluorescence acceptable de 4%.

Les tests d'imagerie sont effectués sur des cellules témoins, seulement marquées avec du Wheat Germ Agglutinin (WGA) qui permet de colorer la membrane cellulaire d'une couleur rose-rouge. Les tests sont réalisés sur des cellules fixées (cellules en apoptose) et sur des cellules vivantes après une incubation de 24h avec 10 μM du complexe $[\text{Zn}(\text{no2py1fluo})]^+$. Les cellules sont excitées à 385 nm et les images sont enregistrées sur une gamme spectrale de 500 à 600 nm. Les résultats obtenus sur cellules fixées sont représentés ci-après (**Figure 59**).

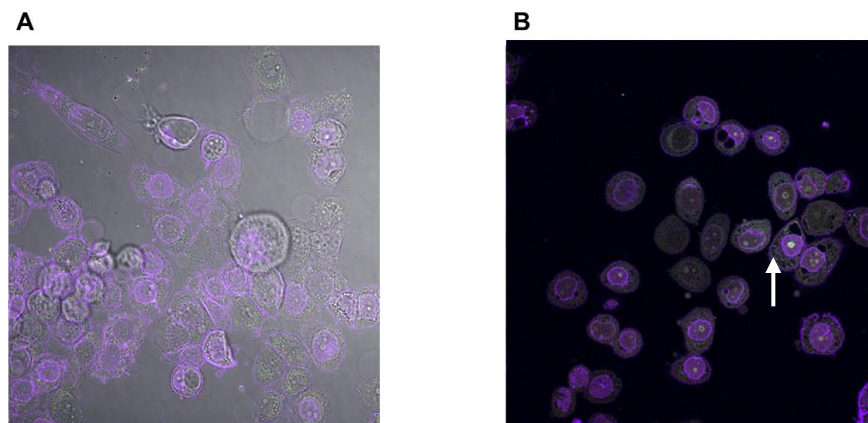


Figure 59 : Imagerie confocale sur cellules MDA-MD 468 fixées (A) ; Imagerie confocale sur cellules MDA-MD 468 fixées après 24h d'incubation avec 10 μM du complexe $[\text{Zn}(\text{no2py1flu})]^+$ (B)

Sur l'image confocale obtenue pour les cellules fixées, seule la fluorescence mauve due au marqueur WGA est notable (A). Après incubation pendant 24h avec le complexe de Zn^{2+} , une fluorescence verte est présente à l'intérieur des cellules ce qui permet de visualiser la fluorescence du complexe.

La même expérience est réalisée sur des cellules vivantes et les images obtenues sont représentées ci-dessous (Figure 60) : aucune différence de fluorescence n'est notable entre le témoin (A) et les cellules incubées pendant 24h (B). Ce résultat est contradictoire par rapport aux hypothèses faites sur l'internalisation plus aisée des complexes cationiques ^[119,120].

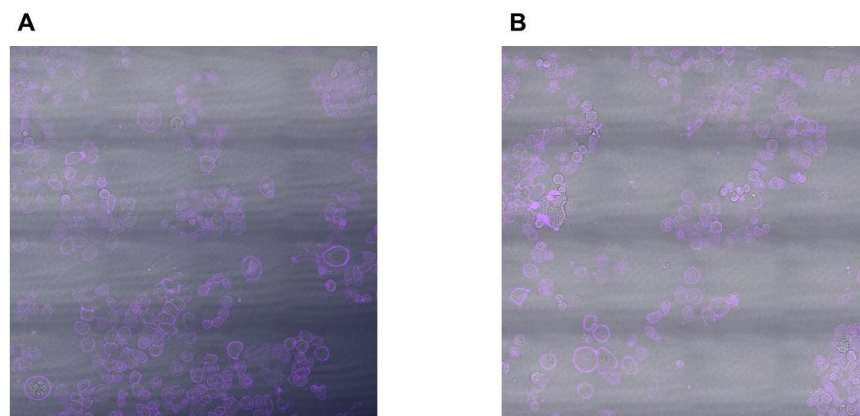


Figure 60 : Imagerie confocale sur cellules MDA-MD 468 vivantes (A) ; Imagerie confocale sur cellules MDA-MD 468 vivantes après 24h d'incubation avec 10 μM du complexe $[\text{Zn}(\text{no2py1flu})]^+$ (B)

Les résultats indiquent que dans le cas des cellules fixées, le composé peut pénétrer la membrane qui est perméable (cellules en apoptose). En revanche dans le cas de cellules vivantes, aucune internalisation du $[Zn(\text{no}2\text{py}1\text{fluo})]^+$ n'est observée malgré la charge positive présente sur le complexe. La vectorisation du composé s'avère nécessaire pour de prochaines études in vitro et in vivo. Au vu de la structure du ligand Hno2py1fluo, aucune fonctions amine n'est disponible pour introduire une fonction de greffage et nécessite d'introduire cette dernière sur un des atomes de carbone du macrocycle (C-fonctionnalisation). Cette méthode sera étudiée dans le chapitre V.

5 Synthèse et études d'une sonde bimodale IRM-fluorescence à motif tacn

Dans cette partie de chapitre, la synthèse d'une sonde bimodale IRM-fluorescence à base d'un complexe triazamacrocyclique de Mn^{2+} sera présentée. Les verrous et les leviers pour obtenir le composé désiré seront discutés. Finalement, les études potentiométrique et de relaxométrie réalisées en collaboration avec le Dr. Gyula Tirscó de l'université de Debrecen seront abordées.

I. Synthèse et caractérisation du ligand Hno1fluo

Le ligand Hno1fluo est un tacn mono-*N*-fonctionnalisé par la même antenne fluorescente que précédemment (Figure 61). C'est un dérivé du ligand Hno1pa déjà étudié au laboratoire pour la complexation du Mn^{2+} [13].

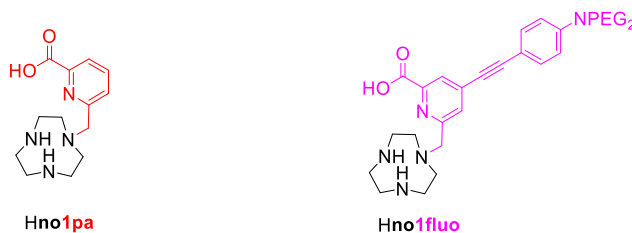


Figure 61 : Structures des ligands Hno1pa et Hno1fluo

Le ligand Hno1pa est synthétisé via la méthode de mono-*N*-alkylation régiospécifique du tacn orthoamide, décrite par G. R. Weisman [61], dans laquelle l'ammonium *N*-fonctionnalisé précipite dans le milieu ce qui permet d'éviter la di- et tri-*N*-fonctionnalisation.

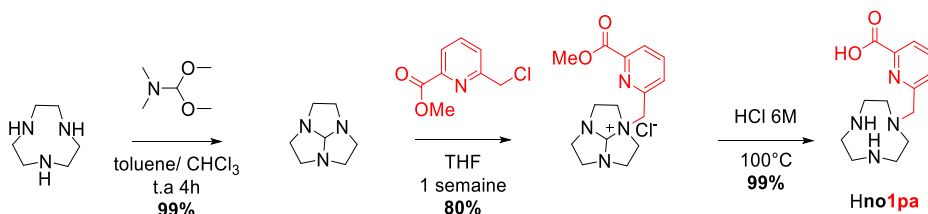


Schéma 23 : Voie de synthèse du Hno1pa

En raison de la non-précipitation de l'ammonium formé, la chaîne pegylée augmentant la solubilité du composé, il a été nécessaire de trouver une alternative à la mono-*N*-fonctionnalisation du tacn. Plusieurs voies de synthèse ont été entreprises afin d'obtenir le ligand désiré.

1. Méthode de synthèse par la voie d'une di-*N*-protection par des groupements Boc

La stratégie de synthèse choisie (**Schéma 24**) met en jeu la di-*N*-protection des fonctions amine secondaires du tacn en une étape par action du Boc-ON, décrite par D. Sherry *et al.* [55] puis une étape de di-*N*-fonctionnalisation avec le dérivé mésylé **10**. Une étape de déprotection finale de l'ester méthylique et des groupements Boc donnera le ligand Hno1fluo.

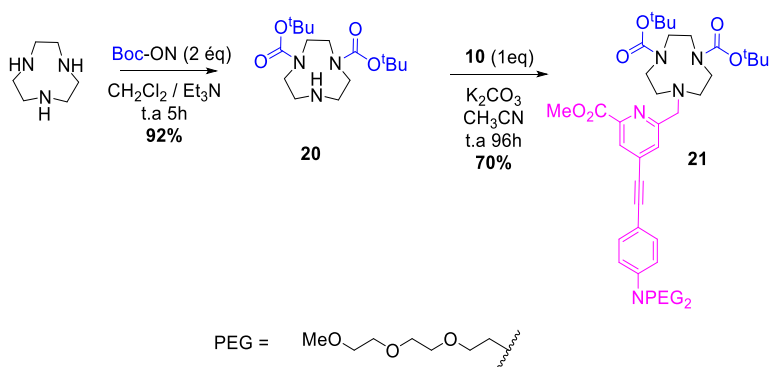


Schéma 24 : Voie de synthèse du composé **21**

La protection du tacn se fait en utilisant deux équivalents de Boc-ON pour un équivalent de tacn dans du dichlorométhane. Le composé **20**, obtenu avec un rendement de 92%, est ensuite engagé dans une étape de *N*-alkylation de la fonction amine secondaire vacante avec 1 équivalent du dérivé mésylé **10**. Après purification sur colonne chromatographique, le tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements Boc et une antenne fluorescente (**21**) est obtenu avec un rendement de 74%.

Sur le spectre RMN ¹H, la présence de groupements Boc entraîne la formation de rotamères et par conséquent un dédoublement des signaux. Les quatre singulets entre 1,38 et 1,46 ppm correspondent aux CH₃ des groupements tertio-butyle. Les protons du macrocycle sont difficilement observables sur le spectre et se retrouvent sous la forme de plusieurs signaux mal résolus entre 2,62 et 3,46 ppm. Le CH₂ du bras picolinate est représenté par deux singulets mal

résolu à 3,87 ppm et le CH₃ de la fonction ester méthylique est également représenté par deux singulets à 3,93 ppm. Les doublets à 6,60 et 7,30 ppm correspondent aux groupements CH du cycle aromatique portant la fonction (-N(PEG)₂). Enfin, les protons aromatiques du groupement picolinate se retrouvent sur le spectre sous la forme de deux singulets à 7,96 et 8,01 ppm. L'attribution de chaque déplacement est représentée sur le spectre ci-dessous (**Figure 62**).

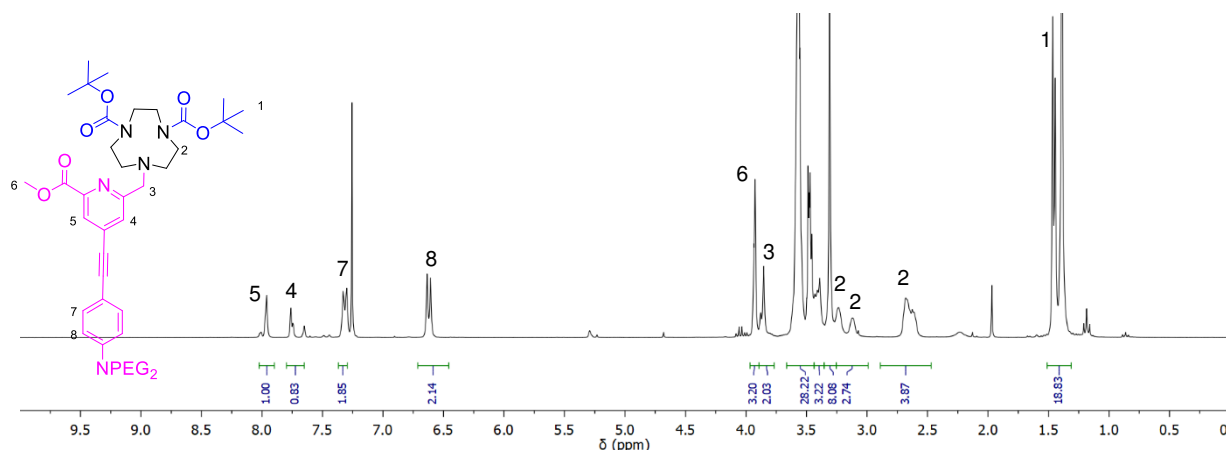


Figure 62 : Spectre RMN ¹H (300 MHz, 298 K, CDCl₃) du composé **21**

Les groupements Boc sont connus pour se cliver en milieu acide. La méthode classique est l'utilisation de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane. Par conséquent, le composé **21** est engagé dans une étape de déprotection des groupements Boc par action de l'acide trifluoroacétique (**Schéma 25**), et par la suite, directement engagé dans l'étape de saponification de l'ester méthylique. Après traitement, l'analyse par RMN indique que le composé a subi une rupture au niveau de la triple liaison. Les essais par hydrolyse avec du HCl 3M puis hydrolyse basique de la fonction ester ont conduit au même résultat.

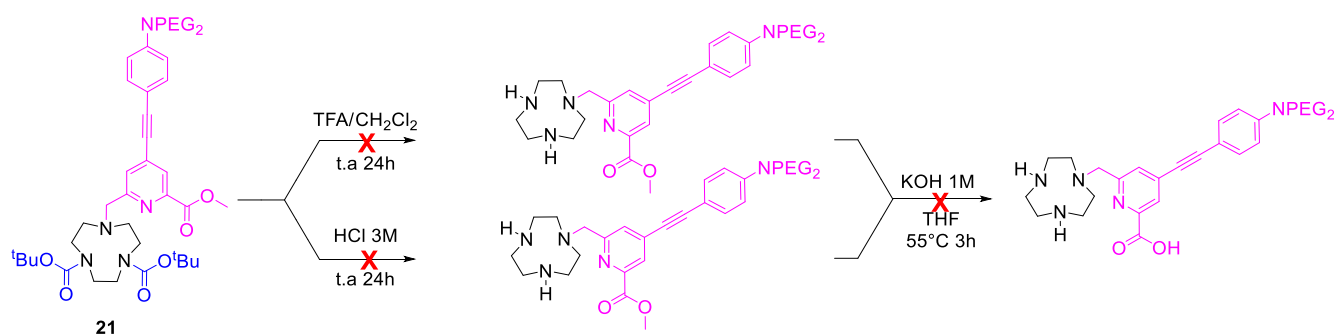


Schéma 25 : Voies de déprotection étudiées des groupements Boc

2. Voie de synthèse par la chimie des aminaux

Nous avons alors utilisé la méthode de di-*N*-protection mise au point au laboratoire par M. Roger durant sa thèse (**Schéma 11**, p 52) ^[59]. La première étape consiste à réaliser une di-*N*-protection du tacn en présence d'un équivalent de benzaldéhyde dans l'éthanol (**Schéma 26**), ce qui conduit à l'aminal cyclique **22** avec un rendement de 95%.

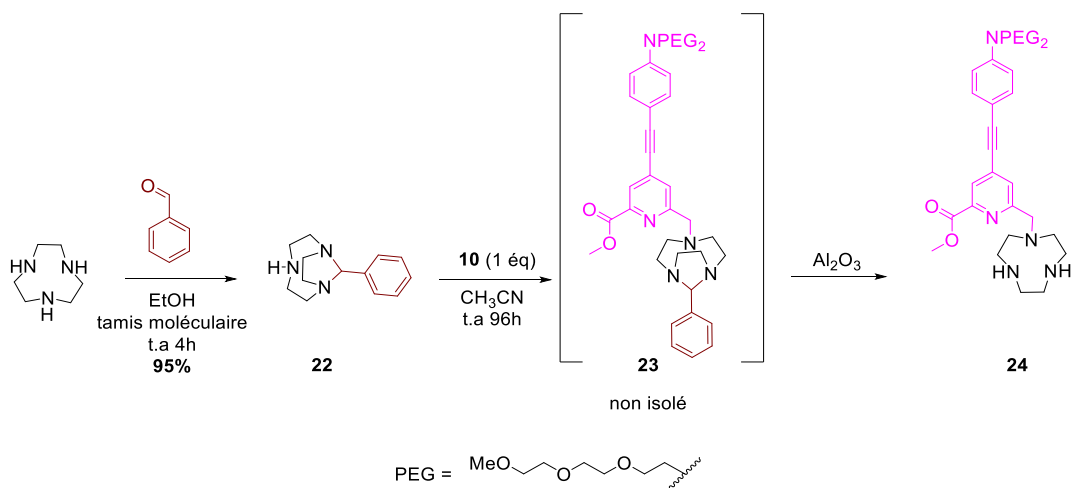


Schéma 26 : Voie de synthèse du composé **24**

Ce composé **22** est engagé dans une étape de mono-*N*-fonctionnalisation avec un équivalent du dérivé mésylé de l'antenne fluorescente **10**. La purification sur alumine activée provoque le clivage de la protection aminal ce qui permet d'obtenir directement le tacn mono-*N*-fonctionnalisé par une antenne fluorescente **24**, avec un rendement de 62% en 2 étapes.

Le spectre RMN ¹H enregistré dans le CDCl₃ est représenté ci-après (**Figure 63**). Le singulet à 2,74 ppm, intégrant pour huit protons, correspond au CH₂ du macrocycle en β et δ de l'atome d'azote *N*-fonctionnalisé par l'antenne fluorescente tandis que le singulet à 2,84 ppm, intégrant pour quatre protons correspond au CH₂ en α de l'atome d'azote *N*-alkylé. Le signal mal résolu à 2,94 ppm, intégrant pour deux protons, correspond aux atomes d'hydrogène labiles des fonctions amine secondaires du macrocycle. Les CH₃ terminaux des fonctions PEG sont caractérisés par un singulet intense à 3,53 ppm tandis que les CH₂ des mêmes chaînes se retrouvent sur le spectre entre 3,51 et 3,62 ppm. Le singulet à 3,92 ppm, intégrant pour deux protons correspond au groupement CH₂ du picolinate tandis que celui à 3,98 ppm, intégrant pour trois protons est

caractéristique du groupement méthyle de la fonction ester méthylique. Enfin dans la zone des protons aromatiques, les protons équivalents deux à deux du groupement aryle sont représentés par deux doublets à 6,42 et 7,34 ppm. Les deux singulets à 7,60 et 8,01 ppm sont attribués aux protons du groupement picolinat.

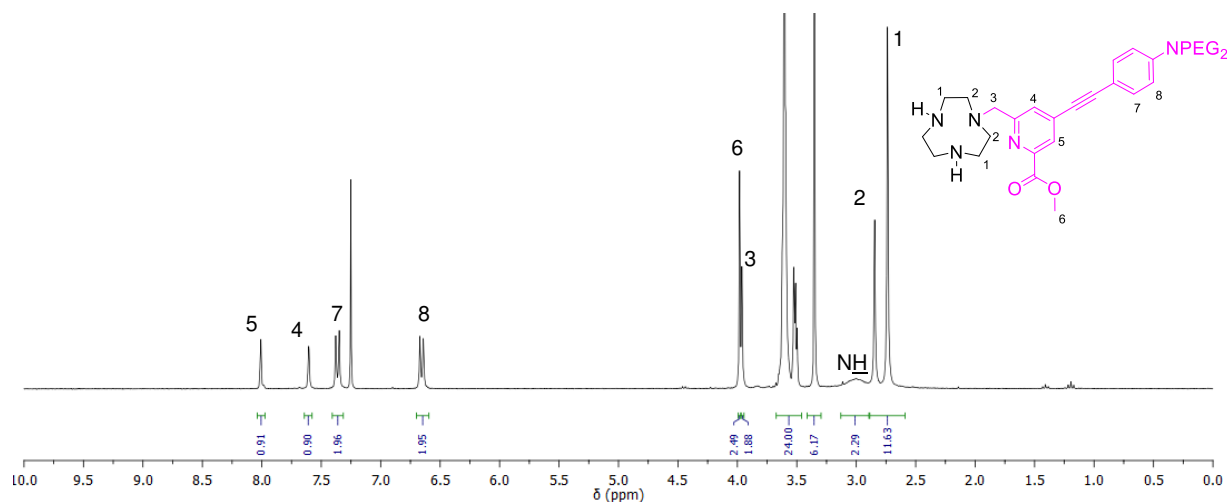


Figure 63 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **24**

le spectre RMN ^{13}C en J-modulation (**Figure 64**), affiche les différents signaux (46,2, et 46,4 ppm) pour les atomes de carbone du macrocycle, le CH_2 reliant l'antenne au tacn (52,7 ppm) les atomes de carbone de la chaîne pegylée, les atomes de carbone éthyléniques (85,0 et 97,5 ppm) et les atomes de carbone sp^2 (aromatiques et carbonyle). Ce spectre est en accord avec la structure du composé **24**.

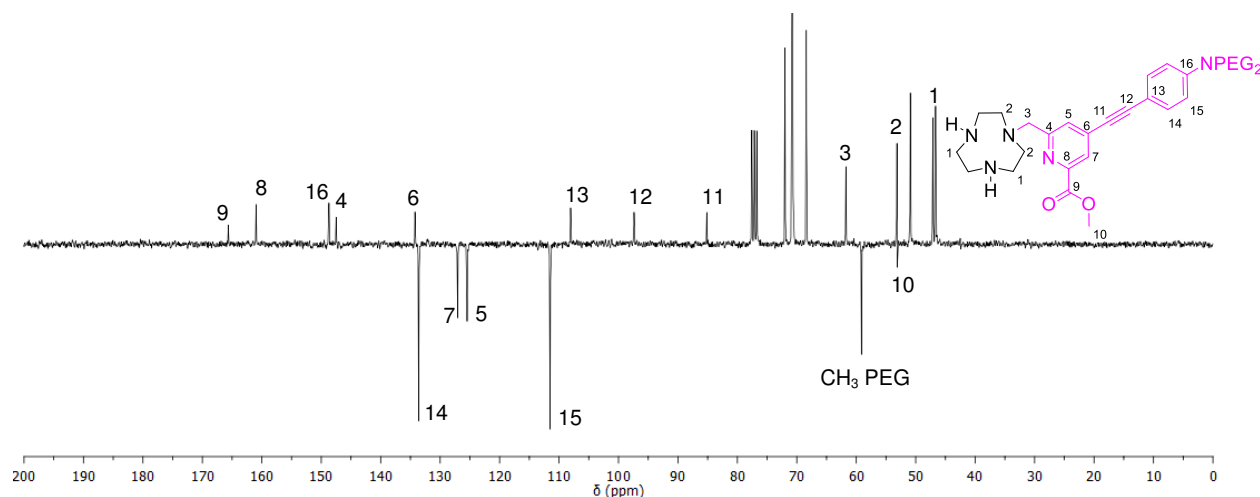


Figure 64 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **24**

Enfin l'étape de saponification (**Schéma 27**) est préférée à l'hydrolyse acide compte tenu de l'instabilité de l'antenne fluorescente en milieu acide.

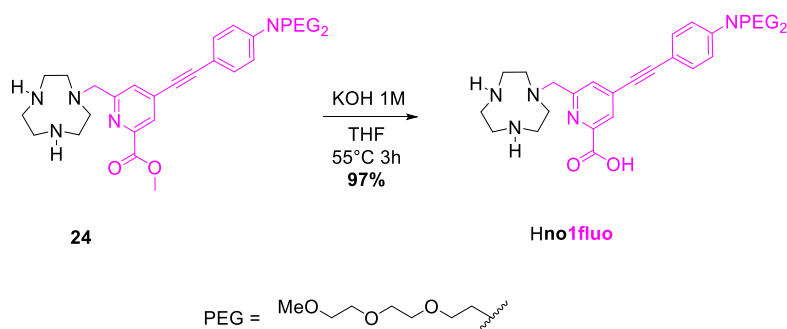


Schéma 27 : Synthèse du Hno1fluo à partir du composé 24

La saponification de l'ester méthylique en milieu KOH/THF puis la purification sur HPLC semi-préparative permettent d'obtenir le ligand final Hno1fluo avec un rendement de 97% soit un rendement global de 62% en quatre étapes à partir du tacn.

Sur le spectre RMN ^1H représenté ci-dessous (**Figure 65**) la disparition du singulet correspondant au groupement CH_3 de la fonction ester méthylique permet de confirmer la structure du ligand.

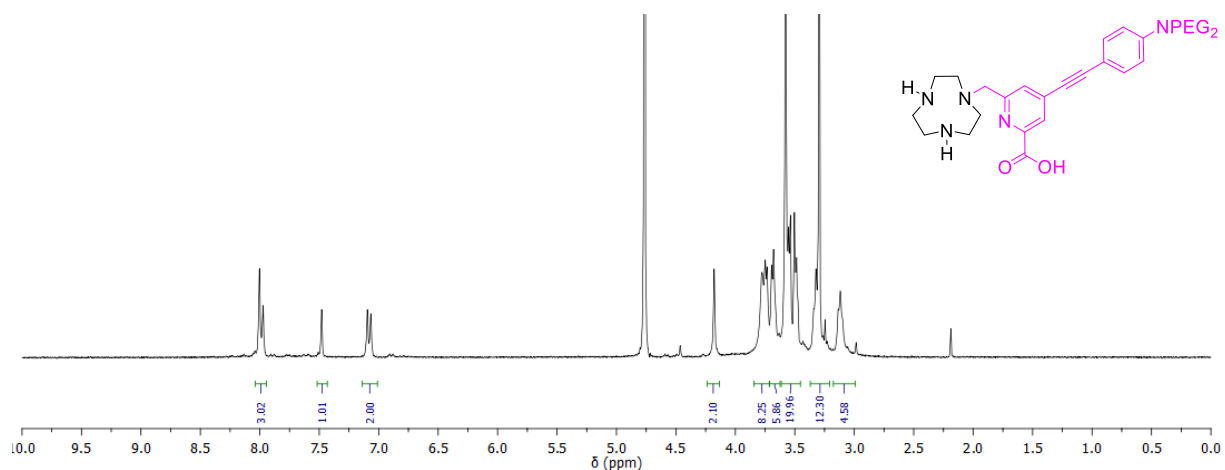


Figure 65 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O) du ligand Hno1fluo

Le spectre RMN ^{13}C enregistré en J-modulation dans le D_2O est représenté ci-après (**Figure 66**). La disparition du pic négatif à 53,1 ppm correspondant au groupement CH_3 de la fonction ester

méthylque ainsi que le déblindage du carbonyle vers 200 ppm témoignent de la transformation de la fonction ester méthylique en fonction acide carboxylique.

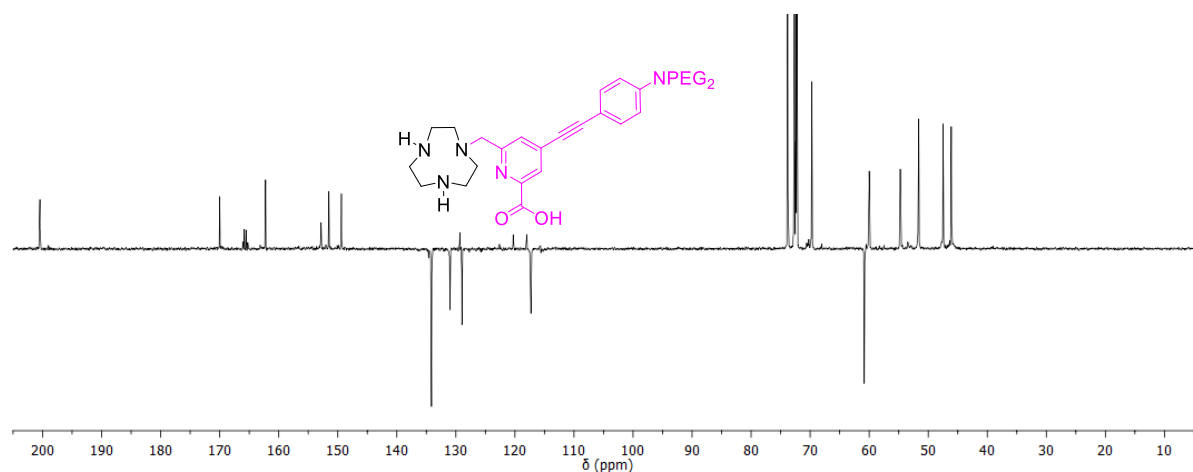


Figure 66 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, D_2O) du ligand **Hno1fluo**

Malgré des difficultés importantes lors de la synthèse du ligand **Hno1fluo**, tacn mono-*N*-fonctionnalisé par une antenne fluorescente, le composé désiré a finalement pu être obtenu via la méthode de protection du tacn décrite au laboratoire. Les verrous de synthèse étant levés, le ligand, avec nos collaborateurs de l'Université de Debrecen, a été étudié plus en détails afin d'évaluer ses propriétés de coordination avec le Mn^{2+} .

II. Etudes potentiométriques : propriétés acido-basiques du ligand **Hno1fluo**. Constantes de complexation

1. Propriétés acido-basiques du ligand

Les propriétés acido-basiques du ligand **Hno1fluo** sont étudiées par titrage potentiométrique en solution aqueuse et sont comparées à celles du **Hno1pa** et du tacn. Le ligand possède trois constantes de protonation qui peuvent être attribuées aux fonctions amine secondaire du macrocycle et à la fonction acide carboxylique du bras picolinate substitué en *para*. Les constantes de protonation globales ($\log\beta$) et successives ($\log K$) sont déterminées à 25°C en utilisant une force ionique $I = 0,15 \text{ M NaCl}$ et sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 27**). Celles du **Hno1pa** et du tacn y sont ajoutées pour comparaison.

Equilibres	Hno1fluo	Hno1pa ^[13]	tacn ^[133]
logβ			
L + H ⁺ ⇌ HL	11,41(1)	11,33(1)	10,50(1)
L + 2 H ⁺ ⇌ H ₂ L	18,87(1)	18,63(1)	17,30(1)
L + 3 H ⁺ ⇌ H ₃ L	22,12(1)	21,12(1)	-
logK			
L + H ⁺ ⇌ HL	11,41(1)	11,33	10,50
HL + H ⁺ ⇌ H ₂ L	7,46(3)	7,30	6,80
H ₂ L + H ⁺ ⇌ H ₃ L	3,25(3)	2,49	-

Tableau 27 : Constantes de protonation globales logβ et constantes de protonation successives logK des ligands Hno1fluo, Hno1pa et du tacn

a. Constantes de basicité

Avec une valeur de logβ₃ égale à 22,12, le ligand Hno1fluo possède une basicité globale du même ordre que le Hno1pa. Le ligand tacn possède une basicité plus forte de 17,30 qui s'explique par l'absence du bras picolinate, ce qui entraîne la perte d'un site protonable. Le ligand Hno1fluo possède trois constantes de protonations successives. La première constante logK₁ égale à 11,41 correspond comme dans le cas du Hno1pa (logK₁ = 11,33) à la protonation d'un atome d'azote d'une des fonctions amine secondaires du macrocycle. La seconde constante, logK₂ égale à 7,46, correspond à la protonation d'une seconde amine secondaire du macrocycle. Enfin la constante de protonation de la fonction acide carboxylique du picolinate substitué en *para* est de 3,25. Ces valeurs restent du même ordre de grandeur que celle déterminées pour le ligand Hno1pa et le ligand tacn.

b. Diagrammes de spéciation des espèces

Les diagrammes de spéciation des espèces en fonction du pH pour le ligand Hno1pa et le ligand Hno1fluo ont été tracés à partir des constantes de protonation et sont représentées ci-après (**Figure 67**). Le ligand Hno1fluo possède quatre états de protonation différents en fonction du pH. Entre pH 2 et 3, l'espèce prédominante est l'espèce tri-protonée LH₃²⁺ qui coexiste à partir de pH 3,5 avec l'espèce di-protonée LH₂⁺. Cette dernière a une abondance de 100% entre 5 et 6,5 avant de laisser place à l'espèce mono-protonée entre pH 8,5 et 10. A pH physiologique les espèces LH₂⁺ et LH sont présentes dans des proportions équivalentes. Ces résultats sont similaires et en accord avec ceux obtenus pour le ligand Hno1pa.

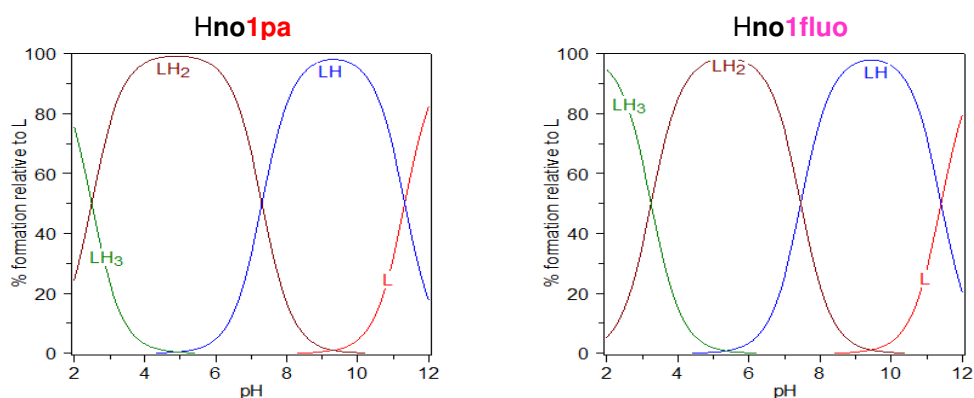


Figure 67 : Diagrammes de spéciation des ligands **Hno1pa** et **Hno1fluo** de pH 2 à 12. Les charges des espèces sont omises pour raison de clarté

2. Constantes de complexation

a. Constantes de formation des complexes

Les constantes de formation du complexe de Mn^{2+} , formé à partir du ligand **Hno1fluo**, sont déterminées par titrage potentiométrique en solution aqueuse sans utilisation de ligand compétiteur. Tout comme les constantes de protonation, les valeurs des constantes de formation sont déterminées à 25 °C en utilisant une force ionique $I = 0,15$ M NaCl, en utilisant 1,0 équivalent de cation métallique. Les valeurs obtenues sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 28**).

Le ligand **Hno1fluo** possède une constante de formation $\log K_{MnL}$ égale à 10,56 qui reste du même ordre de grandeur que le ligand **Hno1pa** ($\log K_{MnL} = 10,28$). Ce résultat démontre que l'introduction d'un bras picolinate permet une meilleure stabilité du complexe de Mn^{2+} si l'on compare au ligand parent, le tacn, qui possède une constante de formation de l'ordre de 8,33 unités de log. La substitution du groupement picolinate en *para* n'entraîne pas de grande modification vis-à-vis de la complexation du cation métallique. Une seconde constante de formation est notable pour le ligand **Hno1fluo** correspondant à la formation du complexe hydroxo $MnL(OH)$ ($\log K_{MnLOH} = 11,62$). A partir des constantes de protonation ainsi que celles de formation des complexes, il est possible de calculer les pMn afin de comparer les ligands entre eux. Avec un pMn égal à 7,21 le ligand **Hno1fluo** possède une affinité intéressante pour le Mn^{2+} , ce qui est en accord avec les résultats déjà obtenus pour le ligand **Hno1pa**.

Constantes	Hno1flu	Hno1pa ^[13]	tacn ^[133]
logK _{MnL}	10,56(4)	10,28	8,33
logK _{MnL^H}	-	-	-
logK _{MnL^{OH}}	11,62(5)	11,94	-
pMn	7,21	7,08	6,37

Tableau 28 : Valeurs des constantes de formation des complexes [Mn(no1flu)]⁺, [Mn(no1pa)]⁺ et [Mn(tacn)]²⁺. pM calculés à pH 7,4 et 25°C avec [L] = 10 μM, [Mn²⁺] = 1 μM

b. Diagramme de spéciation des espèces en fonction du pH

Le diagramme de spéciation des espèces en fonction du pH du complexe de Mn²⁺ a été tracé à partir des constantes de complexation et est représenté ci-dessous (**Figure 68**). D'après le diagramme de répartition des espèces, on n'observe pas de complexation du Mn²⁺ par le ligand Hno1flu à pH acide. Le diagramme de spéciation du ligand en fonction du pH, a montré que le ligand est tri- et di-protoné à pH acide, ce qui entraîne une compétition entre les protons et le Mn²⁺ compliquant ainsi la complexation. Le complexe commence à se former vers pH 4,5 et l'espèce MnL est prédominante sur une gamme de pH allant de 7,5 à 10, puis l'espèce MnLOH commence à se former. Ces études démontrent que le ligand Hno1flu possède des propriétés physico-chimiques intéressantes. Avec une valeur de pM égale à 7,21 il forme un complexe relativement stable avec le Mn²⁺, caractéristique primordiale pour une application en milieu biologique.

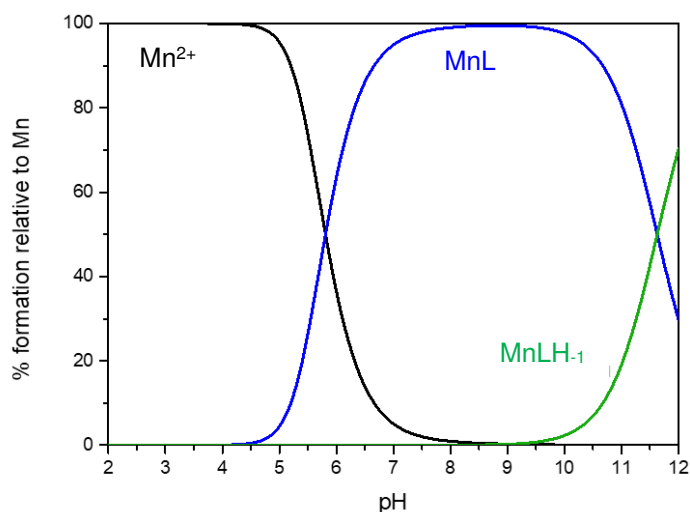


Figure 68 : Diagramme de spéciation du ligand Hno1flu de pH 2 à 12 en présence d'un équivalent de Mn²⁺. Les charges des complexes sont omises pour raison de clarté.

III. Etudes relaxométriques du complexe $[\text{Mn}(\text{no1flu})]^+$

Pour une application en IRM, il est nécessaire d'étudier le comportement du complexe de Mn^{2+} par relaxométrie. Un agent de contraste T_1 ou T_2 doit posséder une valeur de relaxivité r_1 la plus grande possible pour engendrer un contraste positif (blanc) ou une valeur de r_2 également importante pour obtenir un contraste négatif (noir).

Les études de relaxométrie du complexe $[\text{Mn}(\text{no1flu})]^+$ sont réalisées par mesure de la relaxivité des protons des molécules d'eau coordonnées au centre métallique. Ces valeurs sont déterminées à 60 MHz et 25°C. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous (**Figure 69**) et les valeurs de r_1 et r_2 correspondantes sont répertoriées dans le **Tableau 29** et seront comparées avec le complexe $[\text{Mn}(\text{no1pa})]^+$.

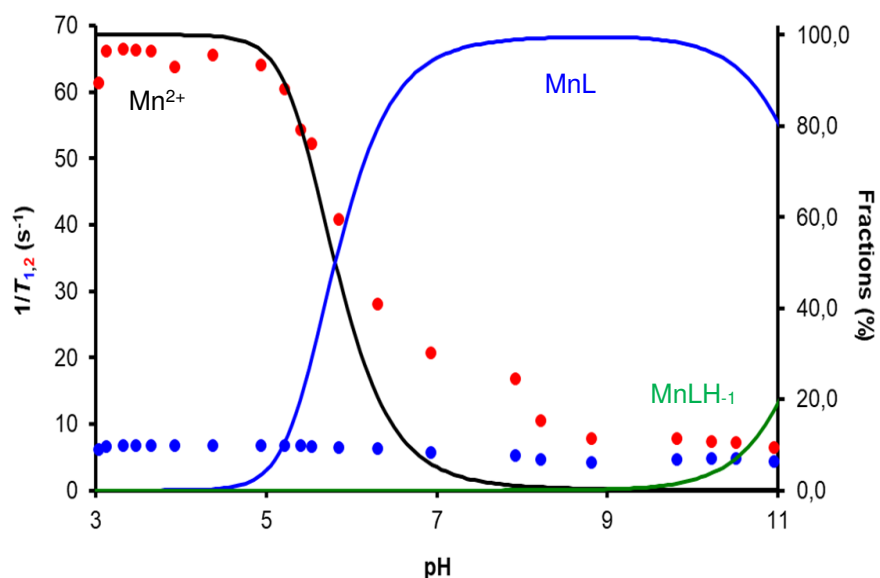


Figure 69 : Diagramme de spéciation du complexe $[\text{Mn}(\text{no1flu})]^+$ de pH 3 à 11 en présence d'un équivalent de Mn^{2+} et valeurs de T_1 et T_2 . Les charges des complexes sont omises pour raison de clarté.

	$[\text{Mn}(\text{no1flu})]^+$	$[\text{Mn}(\text{no1pa})]^+$ [13]
r_1 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	4,80(5)	3,32
r_2 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	8,72(8)	-

Tableau 29 : Valeurs des relaxivités r_1 et r_2 des complexes $[\text{Mn}(\text{no1flu})]^+$ et $[\text{Mn}(\text{no1pa})]^+$ calculées respectivement à 60 et 20 MHz avec une force ionique $I = 0,15$ M NaCl

les valeurs de $1/T_1$, correspondant à r_1 , décroissent de la même façon que la concentration en Mn^{2+} , ce qui est directement corrélé avec la formation du complexe $[Mn(\text{no1fluo})]^+$. L'exploitation de la courbe, donne une valeur de $4,80 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la relaxivité r_1 à 60 MHz pour le complexe $[Mn(\text{no1fluo})]^+$. Cette valeur est légèrement supérieure à celle déterminée pour le complexe $[Mn(\text{no1pa})]^+$ qui est de $3,32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 20 MHz.

Pour le complexe $[Mn(\text{no1pa})]^+$ aucune valeur de r_2 n'avait été déterminée puisque la molécule possédait un temps de rotation trop rapide. En revanche, il est possible de déterminer une valeur de r_2 pour le complexe $[Mn(\text{no1fluo})]^+$. La présence de l'antenne fluorescente et des chaînes PEG, augmente la masse moléculaire du complexe mais peut également induire la formation d'agrégats, ce qui engendre alors un temps rotationnel plus long et par conséquent une valeur de r_2 égale à $8,72 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce résultat est très intéressant puisqu'il serait ainsi possible d'utiliser ce complexe comme agent de contraste T_1 et T_2 pour une application en IRM.

Conclusion du Chapitre II

Après avoir décrit les différentes techniques d'imagerie que sont la TEP, l'IRM et l'imagerie optique de fluorescence, ce chapitre était consacré aux synthèses et aux études de potentielles sondes bimodales TEP-fluorescence et IRM-fluorescence à base de tacn.

La stratégie de synthèse mise au point pour l'élaboration d'une potentielle sonde TEP-fluorescence (**Hno2py1fluo**), est basée sur celle du ligand **Hno2py1pa**, décrit récemment au laboratoire sur lequel le bras picolinate d'origine est fonctionnalisé d'une antenne fluorescente. Les complexes de Cu^{2+} et Zn^{2+} ont été obtenus avec de très bons rendements.

Les propriétés du complexe **[Cu(no2py1fluo)]⁺** ont été investiguées par différentes méthodes spectroscopiques. Les études électrochimiques ont montré la très bonne stabilité électrochimique du système Cu(II)/Cu(I) préparé. Avec un potentiel de réduction de -0,32V par rapport à l'ENH, le complexe est susceptible d'être réduit en milieu biologique mais son caractère quasi-réversible avant et après électrolyse témoigne de sa grande stabilité même sous sa forme réduite. Les études photophysiques de la sonde **[Cu(no2py1fluo)]⁺** ont mis en évidence une extinction de fluorescence, avec un rendement quantique passant de 6% à un rendement quasi nul après complexation. De plus, en couplant les études électrochimiques et photophysiques, nous avons montré que le phénomène d'extinction de fluorescence pouvait être dû à un transfert électronique photo-induit de l'antenne biphotonique vers le cation métallique. Des premiers tests de radiomarquage au cuivre-64 ont été effectués et montrent que le ligand **Hno2py1fluo** est radiomarquable à pH 5,5 et 100 °C. Néanmoins, les rendements restent faibles puisque seulement 40% du composé est radiomarqué dans ces conditions. Une optimisation doit être effectuée afin d'augmenter ce rendement.

Les études réalisées sur le complexe de **[Zn(no2py1fluo)]⁺**, isoélectronique du Cu^+ , ont montré que ce dernier est fluorescent avec un rendement quantique de l'ordre de 4%. Il serait important d'étudier si le phénomène d'extinction observé pour le Cu(II) persiste lors de la réduction en Cu(I) . En effet, si l'annihilation de fluorescence lors de la réduction du cuivre n'est pas observée, il serait alors intéressant de cibler spécifiquement les zones hypoxiques connues pour leur caractère réducteur. Le complexe **[Cu(no2py1fluo)]⁺** agirait alors comme une sonde off-on capable de détecter les zones hypoxiques (**Figure 70**). Il faudra pour cela déterminer dans un premier temps, le rendement quantique du complexe sous sa forme Cu(I) .

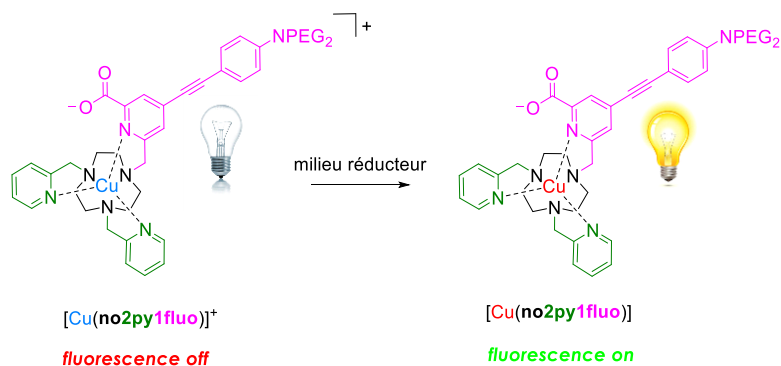


Figure 70 : Principe d'une sonde off-on

Pour la sonde IRM-fluorescence à base d'un complexe de Mn^{2+} , deux voies de synthèses ont été envisagées pour obtenir le ligand **Hno1fluo**. La première, reposant sur une di-*N*-protection de deux fonctions amine secondaires par des groupements Boc, a permis d'aboutir ensuite au tacn tri-*N*-fonctionnalisé par une antenne fluorescente et deux groupements Boc. Cependant, les diverses tentatives de déprotection des groupements Boc se sont soldées par des échecs et un clivage du composé au niveau de l'antenne. Finalement, le ligand **Hno1fluo** a pu être obtenu avec de bons rendements, via une méthode de *N*-fonctionnalisation régiospécifique utilisant un intermédiaire aminoré, mise au point au laboratoire il y a quelques années.

Les études potentiométriques ont montré que le ligand possède les mêmes caractéristiques en matière de stabilité thermodynamique que le ligand parent **Hno1pa**. Il est également apte à complexer le Mn^{2+} sur une gamme de pH relativement importante et forme un complexe plutôt stable, comme en témoigne la valeur de pMn égale à 7,21. En outre, les études de relaxométrie ont montré que le complexe possède une relaxivité longitudinale intéressante (r_1 égale à 4,80 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 60 MHz) mais également une valeur de r_2 égale à 8,72 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur de relaxivité r_2 , absente pour le complexe $[\text{Mn}(\text{no}1\text{pa})]^+$ est potentiellement due à la formation d'agrégat ou de micelles en solutions, ce qui expliquerait également le rendement de radiomarquage faible du ligand **Hno2py1fluo**. Néanmoins, ceci ouvre la voie à l'utilisation d'un tel composé comme potentiel agent de contraste T_1 et T_2 . Afin d'obtenir une sonde bimodale IRM-fluorescence, il reste à étudier les propriétés photophysiques du complexe avant de pouvoir réaliser des tests *in vitro*.

Une éventuelle application *in vivo* sera par la suite envisageable pour ces deux nouvelles sondes et nécessitera de vectoriser ces composés.

Chapitre III : Synthèses et études de nouveaux chélates pour la complexation du Cu^{2+}

1 Les ligands ambidents N/S pour la complexation du cuivre

I. Les ligands ambidents N/S

Il a été vu en introduction du chapitre II que les complexes du cuivre de type CuN_6 ou CuN_2S_2 présentent à la fois des propriétés thermodynamiques et cinétiques supérieures aux ligands H_3nota , H_4dota et H_4teta souvent pris comme références. Ces résultats laissent penser que les atomes d'azote et de soufre sont plus appropriés à la stabilisation des complexes de Cu(II) et de Cu(I) , afin d'éviter toute dissociation *in vivo*. Ceci confirme les règles établies selon la théorie HSAB qui considèrent le Cu^{2+} comme un acide intermédiaire ^[1], formant des complexes stables avec des bases de Lewis intermédiaires azotés et/ou soufrés ^[27] plutôt qu'avec des bases oxygénées, et le Cu^+ plutôt avec des ligands soufrés.

L'équipe du Pr. D. Deniaud, a étudié une famille de ligands tétradentates à base de bras aminothiazole proposant des modes de coordination de type N_2S_2 , N_3S ou N_4 en théorie adaptables à l'oxydation du métal (**Figure 71**) ^[134,135].

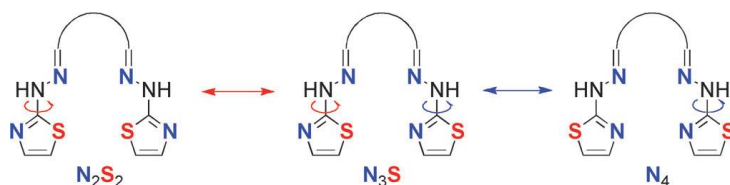


Figure 71 : Modes de coordination envisageables avec des ligands ambidents N/S ^[135]

Ces ligands (**Figure 72, A**) possèdent des fonctions aminothiazole pour la complexation du cuivre, substituées en position α de l'atome de soufre. Elles sont liées à une bis-imine aromatique qui peut être fonctionnalisée pour y introduire une fonction de couplage ^[134].

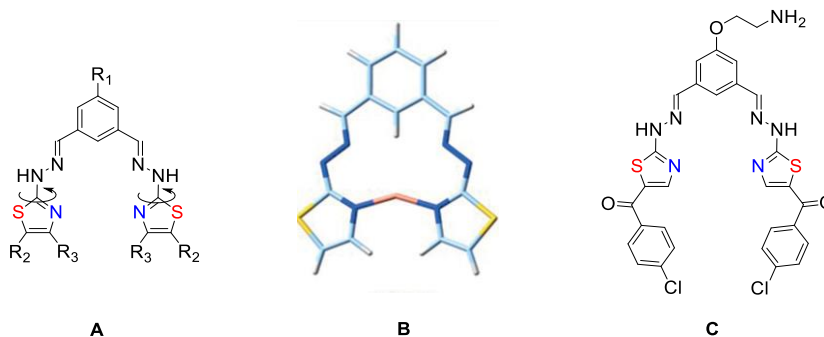


Figure 72 : A) Structure de ligands pour la complexation du Cu(I) ; B) géométrie optimisée d'un complexe de Cu(I) ; C) Chélatant bifonctionnel ^[135]

Cependant, des calculs DFT ont montré que, quel que soit le degré d'oxydation du métal, la coordination était assurée par les atomes d'azote des groupements thiazole (**B**). Néanmoins un complexe, présentant un système $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ réversible du point de vue électrochimique, a été obtenu avec le ligand (**C**) présenté ci-dessus (**Figure 72**) [135].

II. Ligands polyazamacrocycles ambidents N/S étudiés au laboratoire

A partir de ces résultats, notre équipe en collaboration avec celle du Pr. D. Deniaud a récemment développé et étudié des nouveaux ligands macrocycliques *N*-fonctionnalisés par des groupements méthylthiazole. L'étude s'est centrée sur un dérivé du tacn di-*N*-fonctionnalisé (**no2th**) et sur deux dérivés du cyclam, mono- (**te1th**) et di-*N*-fonctionnalisés (**te2th**) par un ou deux bras méthylthiazole (**Figure 73**) [136,137].

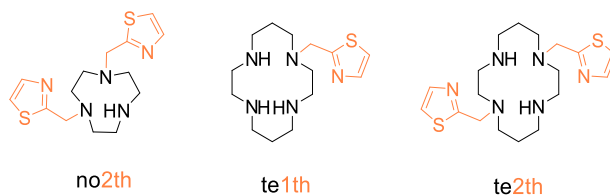


Figure 73 : Ligands *N*-fonctionnalisés par des bras méthylthiazole pour la complexation du Cu(II) et Cu(I) [136,137]

1. Géométrie des complexes

Les structures obtenues par diffraction des rayons X sont représentées ci-après (**Figure 74**). Le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th})]^{2+}$ possède une géométrie de type pyramidale à base carrée caractérisée par des distances Cu-N proches de 2,0 Å, le cation métallique se situant légèrement au-dessus du plan basal. La distance $\text{Cu-N}_{\text{apical}}$ est de 2,16 Å.

Dans la sphère de coordination de type CuN_5 du complexe $[\text{Cu}(\text{te1th})]^{2+}$, le cation métallique est dans un environnement pyramidal à base carrée. Les atomes d'azote formant le plan basal sont distants d'environ 2,0 Å tandis que la distance $\text{Cu-N}_{\text{apical}}$ est de 2,25 Å pour le bras méthylthiazole en position apicale.

Enfin, le complexe $[\text{Cu}(\text{te2th})]^{2+}$ adopte une géométrie octaédrique où le cation métallique est placé dans la cavité macrocyclique. Le complexe subit une distorsion de type Jahn-Teller qui entraîne une élongation des liaisons selon l'axe z, caractérisée par une distance Cu-N égale à 2,46 Å.

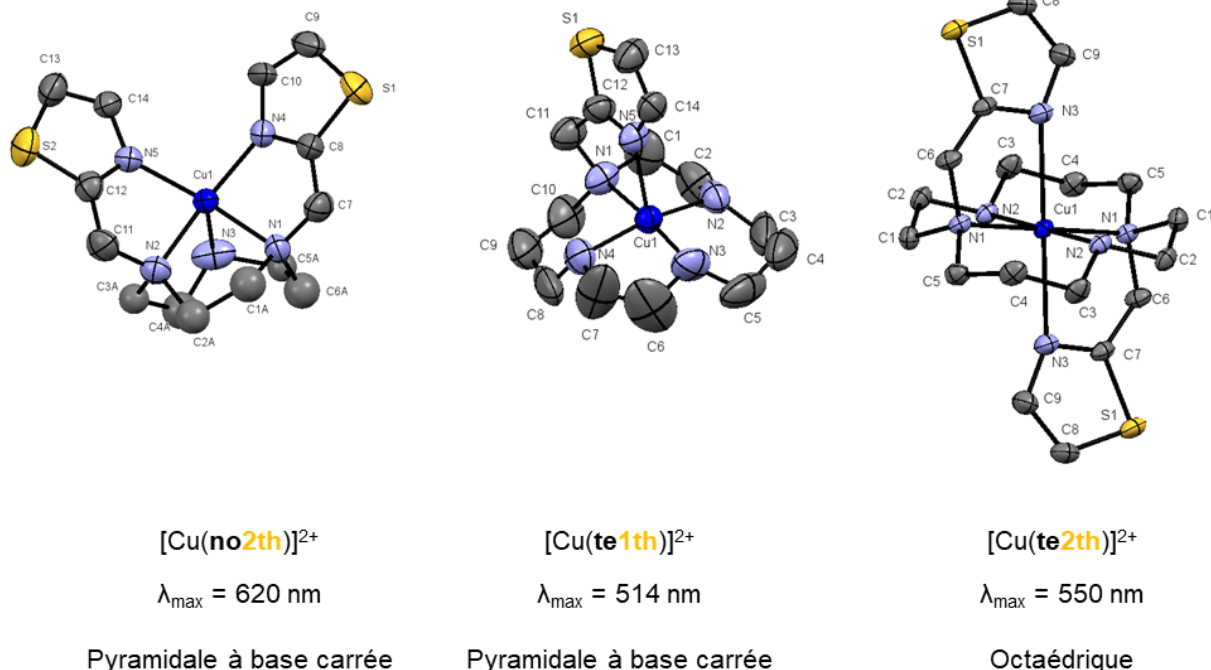


Figure 74 : Structures cristallographiques des complexes de Cu²⁺ et caractéristiques UV-visible [136,137]

2. Stabilité thermodynamique et inertie cinétique des complexes

La stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique et la stabilité électrochimique des trois dérivés ont été étudiées afin d'évaluer l'impact du macrocycle et des bras méthylthiazole sur la complexation du Cu²⁺. Le **Tableau 30** ci-après regroupe les résultats de ces études.

Les trois ligands forment des complexes stables avec le Cu²⁺ comme en témoignent les constantes de formation logK_{CuL}. D'une manière générale, les trois complexes possèdent des valeurs de logK_{CuL} proches, comprises entre 19,90 et 21,56. Les deux dérivés du cyclam ont une affinité similaire pour le cuivre avec des valeurs de pCu de 16,30 pour le **te1th** et 16,17 pour le **te2th**. Leur sélectivité respective pour le Cu²⁺ vis-à-vis du Zn²⁺ décroît légèrement avec l'augmentation du nombre de bras méthylthiazole mais leur sélectivité reste élevée. Le **no2th**, avec un $\Delta pM = pCu - pZn = 4,5$ a une grande affinité pour le Cu²⁺ par rapport au Zn²⁺ et présente des propriétés comparables à celles du H₃nota, référence triazamacrocyclique pour la complexation du Cu²⁺ dans le domaine.

Les complexes présentent des inerties cinétiques en milieu acide chlorhydrique intéressantes. Le complexe [Cu(**no2th**)]²⁺ possède une stabilité importante puisqu'il se dissocie totalement seulement après 15 jours dans un milieu HCl 2M à 90 °C.

Les études par voltamétrie cyclique ont permis de montrer que les complexes $[\text{Cu}(\text{te1th})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{te2th})]^{2+}$ présentent un caractère quasi-réversible avec des potentiels de réductions de -0,41 et -0,65 V (solvant = acétonitrile, référence = Fc/Fc⁺). Le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th})]^{2+}$, soluble dans l'eau, présente un comportement quasi-réversible avec un potentiel de réduction égal à -0,25V (vs. ENH), situé dans la zone de réduction (-0,4 - 0,4 V / ENH) des systèmes biologiques. Afin d'obtenir plus d'informations quant à la stabilité des complexes de Cu(I), chaque complexe a également été étudié par voltamétrie cyclique après électrolyse. L'électrolyse a pour but de générer électrochimiquement le complexe cuivreux et ainsi de pouvoir vérifier la réversibilité des systèmes après réduction. Après électrolyse, la signature électrochimique du complexe $[\text{Cu}(\text{te1th})]^{2+}$ n'affiche aucun pic d'oxydation ni de réduction, ce qui signifie que le complexe se dissocie après réduction. En revanche, le complexe formé à partir du **no2th** est plus stable, ce qui peut s'expliquer par la taille de la cavité macrocyclique, qui, étant plus petite, stabilise plus le cation Cu⁺.

Ces résultats montrent que le macrocycle tacn di-*N*-fonctionnalisé par des bras méthylthiazole (**no2th**) permet une meilleure stabilité des complexes Cu²⁺/Cu⁺ par rapport aux dérivés du cyclam. Par conséquent, nous avons décidé de poursuivre l'étude en développant de nouveaux ligands à partir de la base macrocyclique de type tacn.

	te1th ^[136]	te2th ^[136]	no2th ^[137]	H ₃ nota ^[38]
Stabilité thermodynamique				
Log K _{CuL}	21,56	19,90	20,77	21,63
pCu = -log[Cu] _{libre}	16,30	16,17	17,15	17,61
Sélectivité				
pCu-pZn	6,1	5,5	4,5	3,3
Inertie cinétique (t _{1/2})				
HCl 2M, 90 °C	-	-	7,5 jours	-
HCl 5M, 50 °C	3,4h	5,8 min	-	< 3 min
Propriétés électrochimiques				
E _{pc} (V)	-0,41 ^a	-0,65 ^a	-0,25 ^b	-0,7 ^b
Réversibilité	quasi-réversible	quasi-réversible	quasi-réversible	irréversible
^a E vs Fc/Fc ⁺ , CH ₃ CN, NBu ₄ PF ₆ 1M. ^b E vs ENH H ₂ O, LiClO ₄ 1M				

Tableau 30 : Stabilité thermodynamique et inertie cinétique des complexes formés avec les ligands **te1th**, **te2th**, **no2th** et H₃nota.

III. Objectifs

A partir des bons résultats précédemment obtenus avec le ligand **no2th**, l'idée a été d'étudier l'influence d'une nouvelle *N*-fonctionnalisation par un bras méthylthiazole sur les propriétés des complexes. Notre étude s'est également étendue à des ligands *N*-fonctionnalisés par des bras méthylthiazole substitués en α de l'atome d'azote par une fonction acide carboxylique. Cette fonction acide carboxylique, placée sur le carbone adjacent à l'atome d'azote a un double objectif. Comme démontré au laboratoire par l'utilisation de fonction picolinate, ce dernier offre un atome coordinant supplémentaire susceptible d'assister la coordination, mais aussi d'avoir un effet non négligeable sur les propriétés acido-basique des ligands [6]. En effet, nous avons démontré que ce groupement abaissait les constantes de protonation des ligands, par rapport à des dérivés méthylpyridine, à l'origine de meilleurs propriétés cinétiques des complexes métalliques [6,7]. En revanche, il a également été montré que sur des dérivés du tacn, un nombre trop important de fonctions picolinate entraînait la formation de complexes polynucléaires et abaissait par conséquent la stabilité thermodynamique des espèces mononucléaires [11].

Cette fonctionnalisation sur les bras méthylthiazole devrait permettre d'impacter favorablement les propriétés acido-basiques des ligands. En plus d'apporter un autre mode de coordination, les bras méthylthiazole acide permettront d'améliorer la solubilité des ligands en solution aqueuse, jusqu'ici difficile pour les ligands utilisés. En outre, ces bras coordinants, devraient permettre une future bioconjugaison pour des applications *in vivo* par couplage peptidique et formation d'une liaison amide. Quatre nouveaux ligands ont ainsi été ciblés et sont représentés ci-dessous (**Figure 75**).

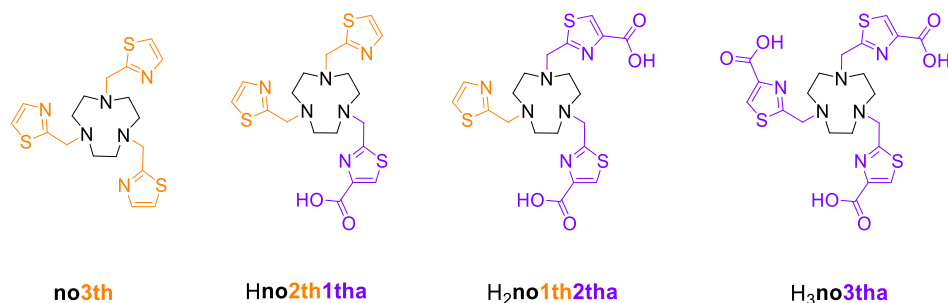


Figure 75 : Présentation des ligands ciblés

Ces dérivés du tacn déclinent les différentes possibilités de substitutions des atomes d'azote du macrocycle par des bras méthylthiazole (**th**) et méthylthiazole acide (**tha**).

L'équipe du Dr. M. Bartholomä s'est intéressée, à la même période, à l'étude de composés similaires (**Figure 76**) dont le **no3th** [138], pour la complexation du ^{64}Cu . Ils ont démontré que le complexe formé à partir du **no3th** était plus stable que ceux formés avec des bras méthylimidazole. Cette nouvelle nous a confortés dans le choix de ce substituant pour l'élaboration de nouveaux chélatant du cuivre (II). Les résultats majeurs obtenus seront intégrés dans l'étude comparative de ce chapitre.

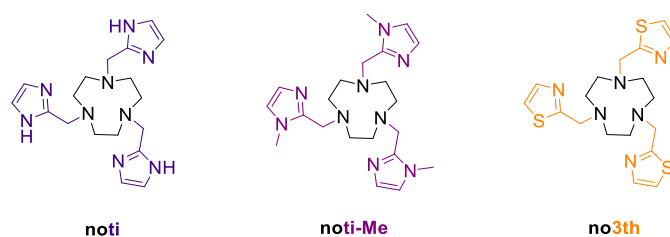


Figure 76 : Structures des ligands étudiés par l'équipe du Dr. Mark Bartholomä [138]

Afin de pouvoir valider l'utilisation de ses chélatants pour une application en imagerie TEP au ^{64}Cu , les études de complexation seront effectuées. Ainsi, après avoir détaillé la synthèse des ligands et leur caractérisation, l'étude s'orientera vers leurs propriétés de coordination. Dans un premier temps les études thermodynamiques seront commentées avant de décrire la synthèse des complexes de Cu(II) et Zn(II). Une étude à l'état solide et en solution viendra compléter nos investigations pour comprendre le mode de complexation des chélatants. Ensuite une étude d'inertie cinétique en milieu acide sera exposée afin d'évaluer la stabilité des complexes en milieu compétiteur. Enfin, une étude électrochimique terminera le travail pour évaluer la stabilité des complexes de cuivre sous leur forme réduite Cu(I).

Il sera finalement possible de conclure sur l'importance de la présence d'un ou plusieurs groupements méthylthiazole acide sur les chélatants.

2 Synthèses et études de nouveaux chélates du Cu(II)

I. Synthèses et caractérisations des ligands

1. Synthèse et caractérisation du **no3th**

La synthèse du **no3th**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par trois groupements méthylthiazole (**th**) s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à préparer le 2-bromométhylthiazole à partir de l'alcool primaire commercial par action d'un léger excès de tribromure de phosphore.



Schéma 28 : Synthèse du 2-bromométhylthiazole **26**

L'électrophile bromé **26** est ensuite engagé dans une étape de tri-*N*-fonctionnalisation du tacn en utilisant un léger excès par rapport au nombre de sites fonctionnalisables. Le ligand **no3th** est obtenu avec un rendement de 81% après purification par colonne chromatographique.

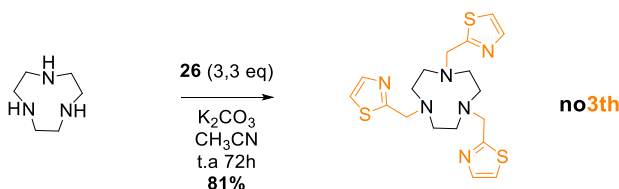


Schéma 29 : Synthèse du **no3th**

Le ligand **no3th** possède un axe de symétrie C₃, ce qui rend chaque atome de carbone du macrocycle isochrone. Les groupements CH₂ ainsi que les groupements CH des bras méthylthiazole se retrouvent équivalents respectivement. Ces isochronies se traduisent sur le spectre ¹H (**Figure 77**) par quatre signaux distinctifs. Le singulet à 2,98 ppm, intégrant pour douze protons isochrones correspond au signal des protons du macrocycle. A 4,04 ppm, le singulet qui intègre pour quatre protons est caractéristique de groupements méthylène en α de fonctions amine et correspond au CH₂ des bras méthylthiazole. Les deux doublets à 7,26 ppm et 7,66 ppm correspondent aux protons aromatiques des groupements méthylthiazole. Le premier doublet correspond aux protons positionnés en β par rapport à l'atome d'azote des hétérocycles alors que le second présent à 7,66 ppm correspond aux protons en β des atomes de soufre. Les deux protons couplent entre eux avec une constante ³J_{HH} de l'ordre de 3 Hz.

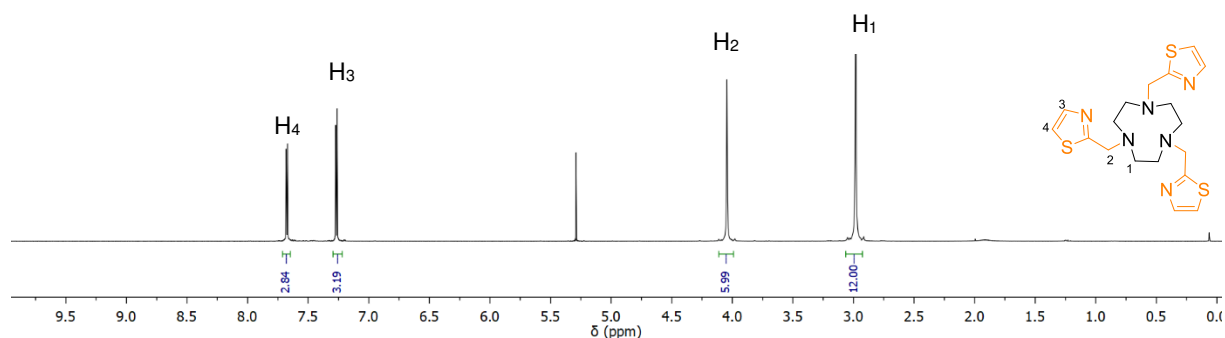


Figure 77 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, CDCl_3) du **no3th**

Les cinq groupes de carbone différents sont attribuables sur le spectre ^{13}C en J-modulation (**Figure 78**). Les pics positifs présents à 55,9 et 60,0 ppm correspondent respectivement aux groupements CH_2 du polyazamacrocycle et à ceux des bras méthylthiazole. Les pics négatifs à 119,3 et 142,1 ppm correspondent aux atomes de carbone CH en α des atomes d'azote et à ceux en α des atomes de soufre des groupements méthylthiazole. Enfin, le pic positif à 172,1 ppm correspond aux atomes de carbone quaternaire de l'hétérocycle.

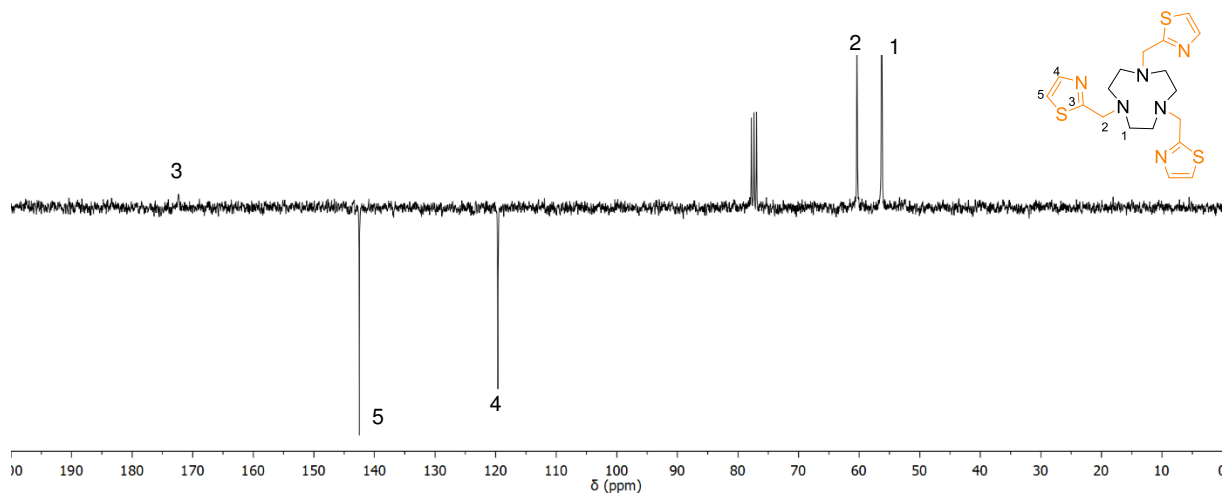


Figure 78 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du **no3th**

2. Synthèse et caractérisation du **Hno2th1tha**

La synthèse du précurseur du bras méthylthiazole portant une fonction acide carboxylique en α de l'atome d'azote est réalisée en adaptant une méthode décrite par T. Kodadek *et al.* [139] (**Schéma 30**).

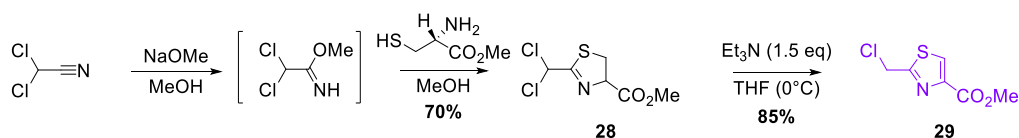


Schéma 30 : Synthèse du composé **29**

La première étape consiste à synthétiser l'iminoester à partir du dichloroacétonitrile et du méthanolate de sodium. Ensuite, 1,5 équivalents d'un dérivé ester méthylique de la L-cystéine sont additionnés afin de réaliser une cyclisation intermoléculaire et d'obtenir l'intermédiaire cyclique **28**. Enfin une réaction d'élimination en présence de triéthylamine permet d'obtenir le dérivé **29** avec un rendement global de 59% en trois étapes.

La synthèse du Hno**2th1tha**, tacn *N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylthiazole (**th**) et un groupement méthylthiazole acide (**tha**) s'effectue en sept étapes à partir du tacn (**Schéma 31** et **Schéma 32**). La synthèse de ce ligand est effectuée via une *N*-fonctionnalisation sélective des fonctions amine secondaires en se basant sur la méthode décrite par G. R. Weisman *et al.* ^[61].

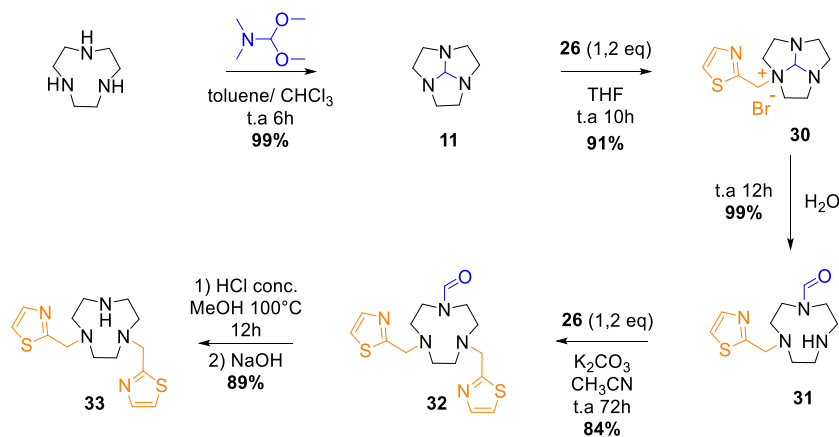


Schéma 31 : Synthèse du **no2th (33)**

La première étape consiste à protéger les fonctions amine secondaires du tacn, par réaction avec un équivalent de *N,N*-diméthylformamide diméthylacétal pour pouvoir introduire de manière sélective par la suite les bras méthylthiazole et méthylthiazole acide. Le tacn présentant une fonction orthoamide **11** ainsi obtenu est ensuite engagé dans une étape de mono-*N*-fonctionnalisation en utilisant 1,2 équivalents de 2-bromométhylthiazole dans le THF ce qui permet d'isoler par précipitation, l'ammonium **30** avec un rendement de 91%.

L'hydrolyse partielle de la fonction orthoamide en milieu aqueux conduit à la formation du triazamacrocycle *N*-fonctionnalisé par un bras méthylthiazole et portant également une fonction amide **30** avec un rendement de 99%. Cette étape permet de garder une fonction amine secondaire vacante pour l'introduction d'un nouveau bras coordinant tout en conservant la troisième fonction amine secondaire protégée sous la forme d'une fonction amide. L'introduction d'un second groupement méthylthiazole est effectuée via une *N*-fonctionnalisation de la fonction amine secondaire présente sur le macrocycle par 1,2 équivalents du composé **26**. Le macrocycle tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylthiazole et une fonction amide **32** est obtenu avec un rendement de 84% après purification sur colonne de silice. Enfin le **no2th** (**33**), tacn di-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylthiazole est obtenu après hydrolyse de la fonction amide en milieu acide chlorhydrique 12M dans du méthanol puis traitement basique pour récupérer le composé **32** sous sa forme base libre. La *N*-fonctionnalisation du **no2th** (**Schéma 32**) avec 1,2 équivalents du dérivé méthylthiazole portant une fonction ester méthylique **29** conduit au macrocycle **34** avec un rendement de 92% après purification sur colonne de silice.

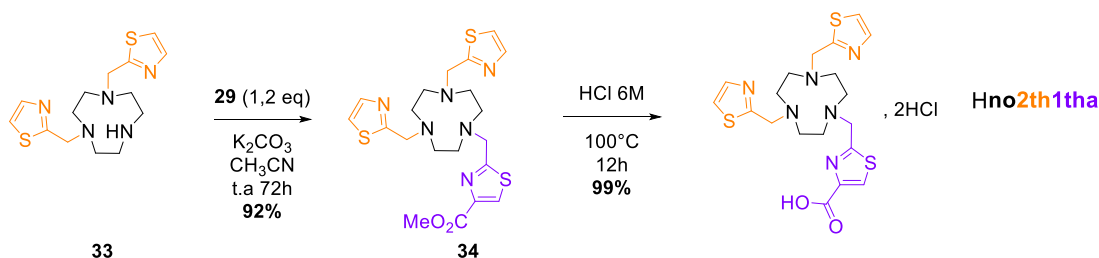


Schéma 32 : Synthèse du Hno2th1tha, 2HCl

Finalement, le Hno2th1tha, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylthiazole et un groupement méthylthiazole acide, est obtenu quantitativement après hydrolyse acide de la fonction ester méthylique. Le Hno2th1tha sous sa forme chlorhydrate est obtenu avec un rendement global de 60% en 7 étapes à partir du tacn.

L'introduction d'un groupement méthylthiazole acide engendre la perte de l'axe C₃ de la molécule par rapport au **no3th**. Par conséquent sur le spectre RMN ¹H (**Figure 79**), les CH₂ du macrocycle se retrouvent sous la forme de trois signaux à 2,7, 2,9 et 3,4 ppm intégrant chacun pour quatre protons.

Les groupements CH₂ des bras méthylthiazole et méthylthiazole acide sont également différenciables par la présence de deux singulets à 4,4 et 4,8 ppm intégrant respectivement pour quatre et deux protons.

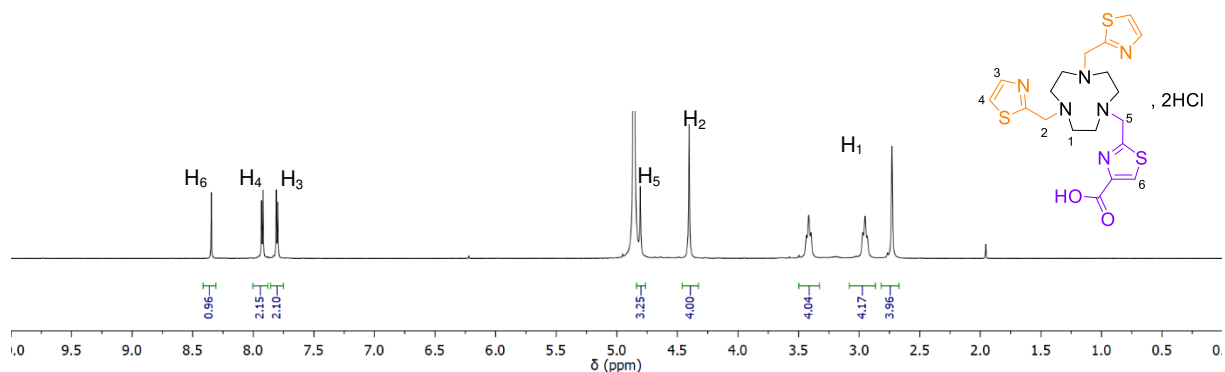


Figure 79 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O) du Hno2th1tha, 2HCl

Les protons aromatiques des groupements méthylthiazole et méthylthiazole acide sont également représentés par deux doublets ayant une constante de couplage de 3 Hz à 7,8, 7,9 ppm et un singulet à 8,3 ppm. Le premier doublet correspond aux protons positionnés en β de l'atome d'azote de l'hétérocycle alors que le second présent à 7,9 ppm correspond à ceux positionnés en β de l'atome de soufre. La présence de la fonction acide carboxylique présente sur le bras méthylthiazole acide entraîne un déblindage du proton en β de l'atome de soufre.

Sur le spectre RMN ^{13}C ci-après (**Figure 80**), les pics positifs à 49,2, 52,1 et 54,8 correspondent aux trois groupes de CH_2 du cycle tacn. Ensuite, le pic positif d'intensité double à 55,5 ppm par rapport à celui présent à 57,3 ppm correspond au CH_2 des bras méthylthiazole alors que le second est la signature du CH_2 du bras méthylthiazole acide. Les pics négatifs à 127,3 et 137,1 correspondent aux atomes de carbone des groupements CH aromatiques des bras méthylthiazole. Le pic négatif à 135,3 ppm correspond, quant à lui, à l'atome de carbone du groupement CH aromatique du bras méthylthiazole acide. Dans la zone des atomes de carbone quaternaire, quatre pics positifs sont présents. Le premier à 149,2 correspond à l'atome de carbone en α de la fonction acide carboxylique du groupement méthylthiazole acide. Le second à 162,9 ppm peut être attribué à l'atome de carbone quaternaire du groupement méthylthiazole en α de l'atome d'azote et du soufre. Enfin le carbonyle est représenté sur le spectre RMN par un pic positif à 166,7 ppm et l'atome de carbone quaternaire des groupements méthylthiazole acide se retrouve à 174,2 ppm.

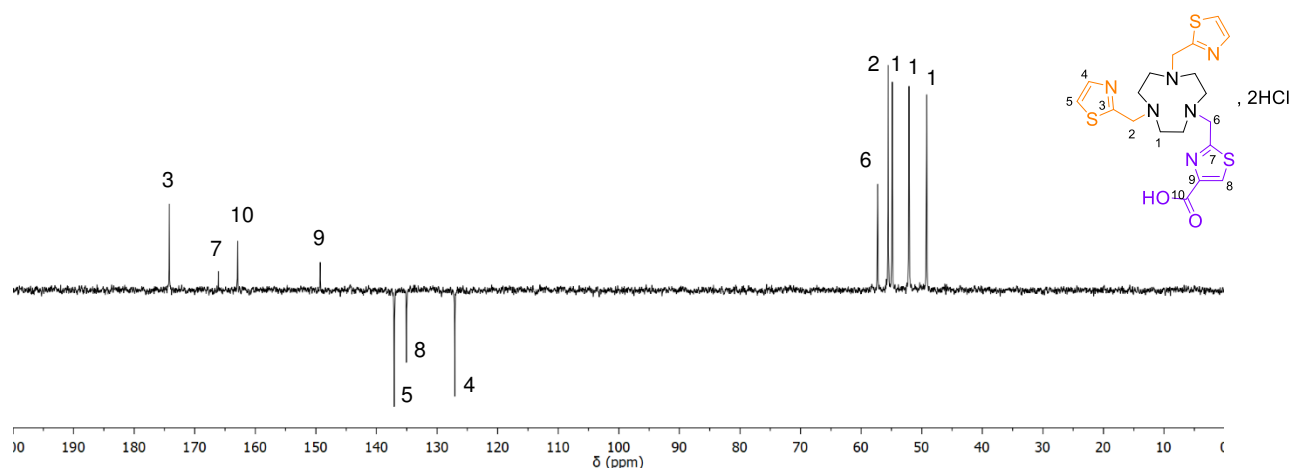


Figure 80 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, D_2O) du $\text{Hno2th1tha}, 2\text{HCl}$

3. Synthèse et caractérisation du $\text{H}_2\text{no1th2tha}$

La synthèse du $\text{H}_2\text{no1th2tha}$, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par un groupement méthylthiazole et deux groupements méthylthiazole acide, est effectuée en cinq étapes à partir du tacn (**Schéma 33** et **Schéma 34**). Comme précédemment, l'ammonium **30** est obtenu après protection des fonctions amine secondaires du macrocycle et mono-*N*-fonctionnalisation régiospécifique. Une hydrolyse en milieu acide chlorhydrique 6M à température ambiante permet d'obtenir le synthon **36**, tacn mono-*N*-fonctionnalisé par un bras méthylthiazole avec un rendement de 89% en trois étapes.

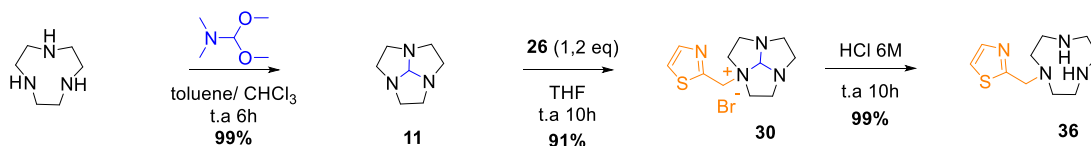


Schéma 33 : Synthèse du no1th (**36**)

Le no1th (**36**) est ensuite engagé dans une étape de di-*N*-fonctionnalisation des fonctions amine secondaires en utilisant 2,2 équivalents du composé **29** afin d'obtenir le ligand $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ sous sa forme ester méthylique **37** avec un rendement de 72% après purification. Enfin, une hydrolyse des fonctions ester méthylique au reflux de l'acide chlorhydrique 6M permet d'obtenir le $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ sous sa forme chlorhydrate avec un rendement global de 64% en 5 étapes à partir du tacn.

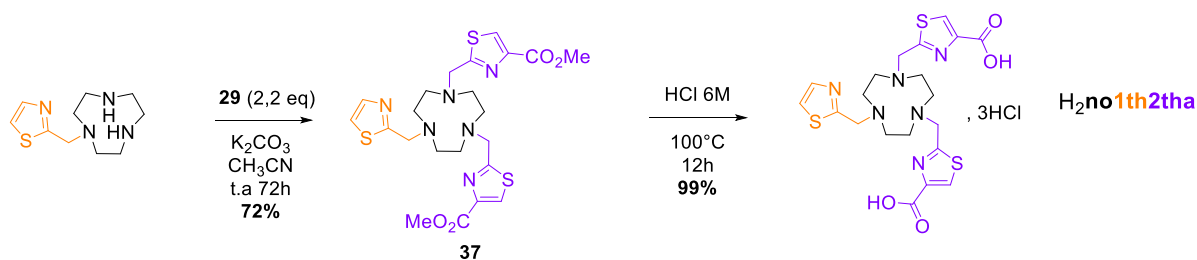


Schéma 34 : Synthèse du H₂no1th2tha,3HCl

Le spectre RMN ¹H représenté ci-dessous (**Figure 81**) possède huit pics correspondant aux différents groupes de protons présents sur la molécule. Les trois pics mal résolus à 3,0, 3,3 et 3,4 ppm, qui intègrent chacun pour quatre protons correspondent aux signaux des atomes d'hydrogène des CH₂ du macrocycle. Les deux singulets à 4,5 et 4,6 ppm, d'intensité 1:2 dont l'intégration est de deux et quatre protons correspondent respectivement aux groupements CH₂ du groupement méthylthiazole et des groupements méthylthiazole acide. Les deux signaux mal résolus à 7,7 et 7,8 ppm, d'intégration 1 chacun, représentent les protons aromatiques du bras méthylthiazole. Enfin, le singulet d'intensité 2 à 8,2 ppm correspond aux atomes d'hydrogène des deux groupements méthylthiazole acide.

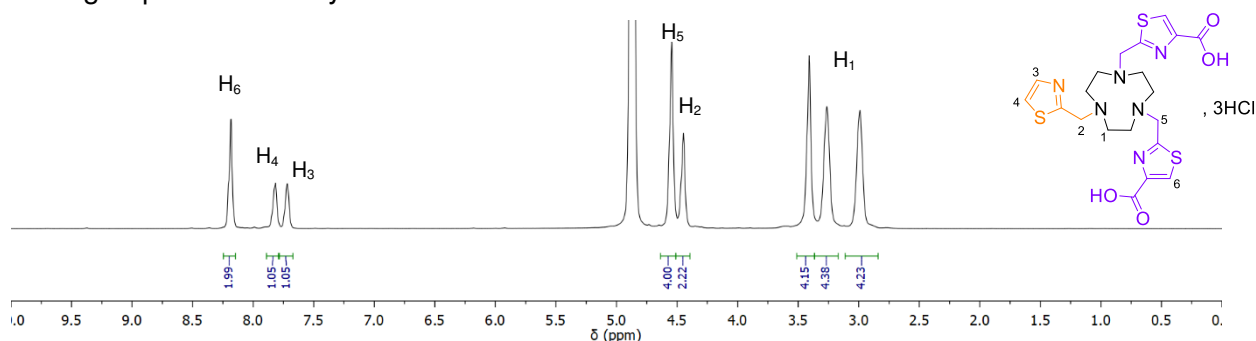


Figure 81 : Spectre RMN ¹H (300 MHz, 298 K, D₂O) du H₂no1th2tha,3HCl

Le spectre RMN ¹³C en J-modulation représenté est ci-après (**Figure 82**). Les trois premiers pics positifs à respectivement 51,1, 53,0 et 53,9 ppm correspondent aux atomes de carbone du tacn. Les deux pics positifs d'intensité 1:2 à 55,4 et 58,3 ppm correspondent au groupement CH₂ du bras méthylthiazole et aux deux groupements CH₂ des bras méthylthiazole acide. Dans la zone des atomes de carbone aromatique, les pics négatifs présents à 127,2 et 138,6 ppm correspondent aux atomes de carbone aromatiques respectivement en α de l'atome d'azote et de l'atome du soufre des bras méthylthiazole. Le pic d'intensité double à 134,6 ppm correspond quant

à lui au groupement CH du bras méthylthiazole acide. Enfin dans la zone des atomes de carbone quaternaire, le pic positif à 148,3 ppm correspond aux atomes de carbone en α des fonctions carbonyle des bras méthylthiazole acide et le pic à 165,7 ppm aux atomes de carbone des groupements carbonyle. Finalement le pic positif à 170,6 ppm correspond aux atomes de carbone quaternaire C=N.

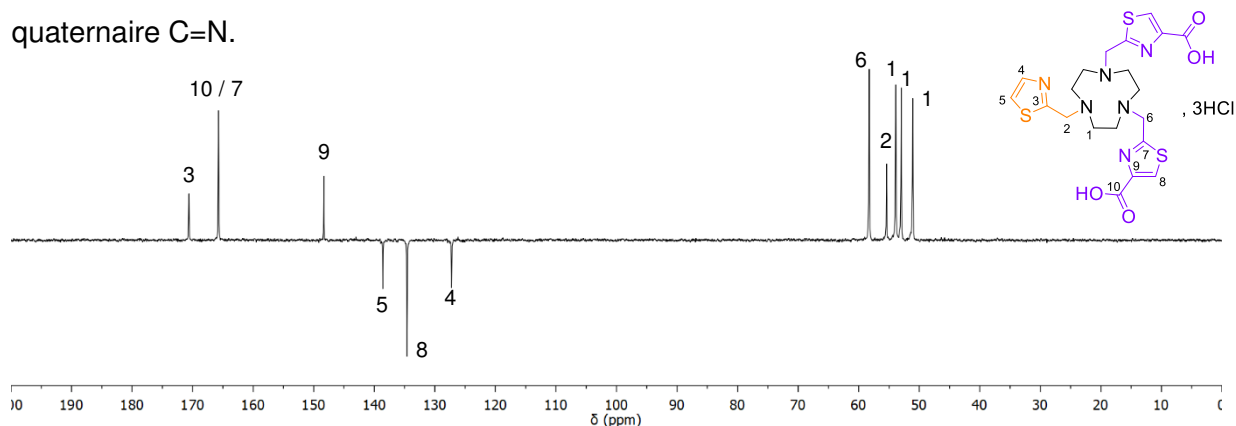


Figure 82 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, D_2O) du $\text{H}_2\text{no1th2tha}, 3\text{HCl}$

4. Synthèse et caractérisation du $\text{H}_3\text{no3tha}$

La synthèse du $\text{H}_3\text{no3tha}$, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par trois groupements méthylthiazole acide s'effectue en deux étapes à partir du tacn (**Schéma 35**).

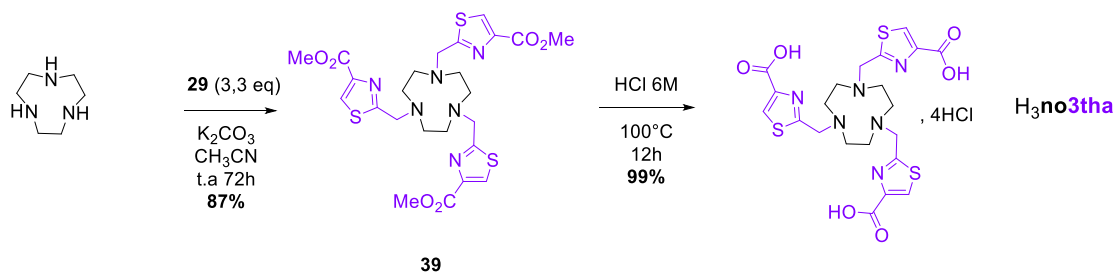


Schéma 35 : Synthèse du $\text{H}_3\text{no3tha}, 4\text{HCl}$

La première étape consiste à réaliser la tri-*N*-fonctionnalisation du tacn en employant 3,3 équivalents de l'électrophile **29**, afin d'obtenir le dérivé **39** avec un rendement de 87% après purification par colonne chromatographique. Ensuite l'hydrolyse des fonctions ester méthylique est effectuée dans l'acide chlorhydrique 6M au reflux et conduit au ligand $\text{H}_3\text{no3tha}$ sous sa forme chlorhydrate avec un rendement global de 86%.

Tout comme le **no3th**, le ligand possède un axe de symétrie C_3 ce qui conduit à des spectres RMN simples. Le spectre RMN 1H , représenté ci-dessous (**Figure 83**), est composé de trois singulets correspondant aux atomes d'hydrogène du macrocycle (3,5 ppm, 12H), aux atomes d'hydrogène des groupements méthylène des bras méthylthiazole acide (4,6 ppm, 6H) et aux atomes d'hydrogène aromatiques des bras méthylthiazole acide (8,3 ppm, 3H).

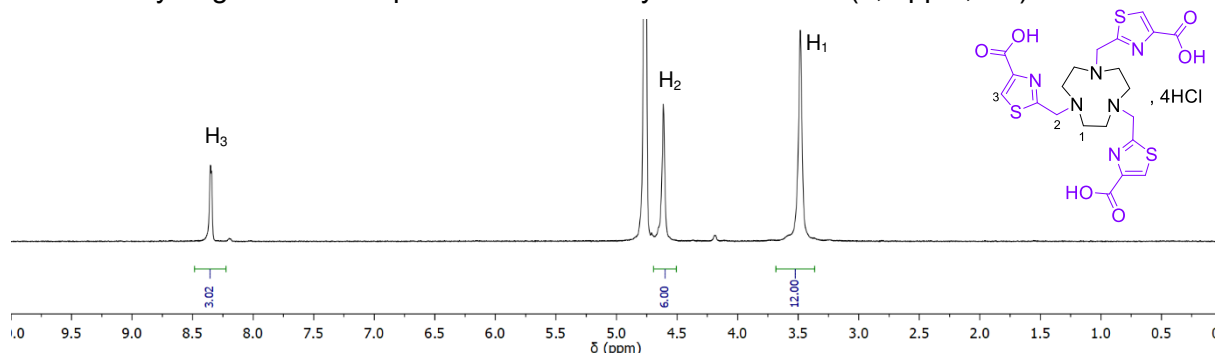


Figure 83 : Spectre RMN 1H (300 MHz, 298 K, D_2O) du $H_3no3tha,4HCl$

Sur le spectre RMN ^{13}C en J-modulation représenté ci-dessous (**Figure 84**), la symétrie C_3 se traduit par la présence de seulement six pics. Les pics positifs à 53,5 et 58,5 ppm correspondent respectivement aux atomes de carbone du macrocycle et des groupements CH_2 des bras méthylthiazole acide.

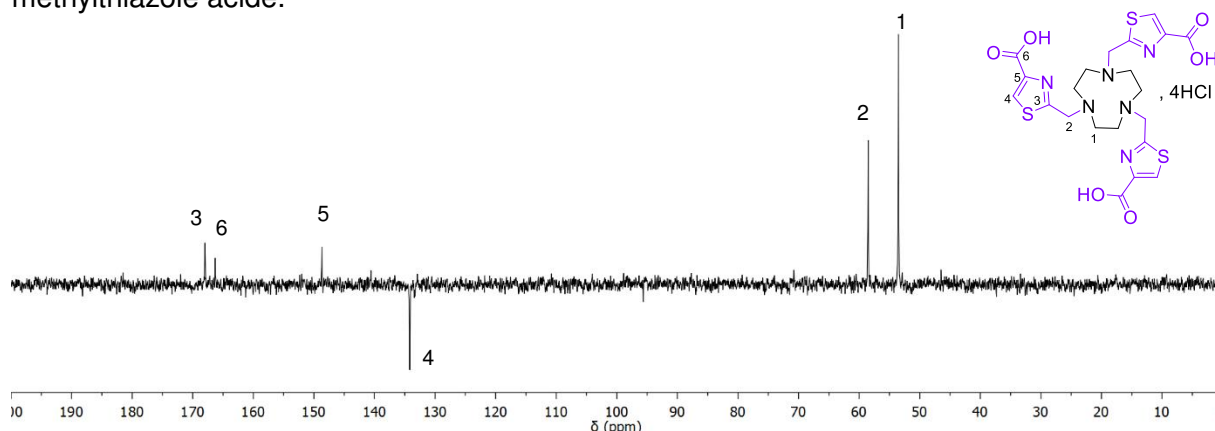


Figure 84 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, D_2O) du $H_3no3tha,4HCl$

Le pic négatif à 134,8 ppm correspond aux trois atomes de carbone aromatiques des bras méthylthiazole acide. Le pic positif à 148,6 ppm peut être attribué aux atomes de carbone en α des fonctions carbonyle. Enfin le pic à 166,3 ppm est caractéristique des trois groupements

carbonyle alors que le pic à 168,0 ppm correspond aux atomes de carbone quaternaire en position α des atomes d'azote et de soufre.

II. Etudes potentiométriques : propriétés acido-basiques des ligands. Constantes de complexation

1. Propriétés acido-basiques

Les propriétés acido-basiques des ligands **Hno2th1tha**, **H₂no1th2tha** et **H₃no3tha** sont étudiées par titrage potentiométrique en solution aqueuse. En revanche, le ligand **no3th**, insoluble dans l'eau, n'a pu être étudié. Les constantes sont déterminées à 25°C en utilisant une force ionique $I = 0,10 \pm 0,01$ M KNO_3 .

Ces ligands possèdent entre quatre et neuf entités protonables qui font référence aux fonctions amine tertiaire du macrocycle, aux fonctions imine des bras méthylthiazole et méthylthiazole acide ainsi que les fonctions acide carboxylique des bras méthylthiazole acide. Parmi toutes les constantes possibles, seules trois à cinq constantes sont mesurées par potentiométrie pour ces trois ligands et sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 31**). Les constantes de protonation des ligands **H₃nota** et du **no2th** sont également répertoriées pour une comparaison plus détaillée.

Equilibres	no3th	Hno2th1tha	H₂no1th2tha	H₃no3tha	H₃nota ^[34]	no2th ^[137]
log β						
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	-	9,47(1)	9,63(1)	9,58(1)	11,3	11,03
$L + 2 H^+ \rightleftharpoons H_2L$	-	12,65(2)	13,38(2)	13,48(1)	16,88	13,48
$L + 3 H^+ \rightleftharpoons H_3L$	-	14,47(2)	16,18(2)	16,74(1)	19,77	-
$L + 4 H^+ \rightleftharpoons H_4L$	-	-	18,14(3)	18,96(1)	-	-
$L + 5 H^+ \rightleftharpoons H_5L$	-	-	-	20,88(2)	-	-
logK						
$L + H^+ \rightleftharpoons HL$	-	9,47	9,63	9,58	11,3	11,03
$HL + H^+ \rightleftharpoons H_2L$	-	3,18	3,75	3,90	5,59	2,45
$H_2L + H^+ \rightleftharpoons H_3L$	-	1,82	2,80	3,26	2,88	-
$H_3L + H^+ \rightleftharpoons H_4L$	-	-	1,96	2,22	-	-
$H_4L + H^+ \rightleftharpoons H_5L$	-	-	-	1,92	-	-

Tableau 31 : Constantes de protonation globales log β et constantes de protonation successives logK obtenues par potentiométrie

a. Constantes de protonation

Le nombre de constantes de protonation augmente avec le nombre de fonctions acide carboxylique présentes sur les bras méthylthiazole ce qui augmente la basicité globale des ligands comme en témoignent les valeurs de $\log\beta$ comprise entre $14,47 < \log\beta < 20,88$. Les premières constantes de protonation sont du même ordre de grandeur pour les trois ligands ($\log K_1 \approx 9,5$). Ces constantes sont nettement moins basiques que celles déterminées pour les dérivés **H₃nota** et **no2th** qui sont deux unités de log plus grande ($\log K_1 \approx 11,2$). Cette différence notable s'explique par la présence de fonctions acide carboxylique sur les bras méthylthiazole par rapport au bras méthylthiazole. La première constante peut être attribuée à la protonation d'un des atomes d'azote du macrocycle.

Les secondes constantes de protonation $\log K_2$ comprise entre $3,18 < \log K_2 < 3,9$ sont moins basiques que celle du **H₃nota** mais restent clairement moins acides que celle déterminée pour le **no2th** ($\Delta\log K_2 = 0,73$ à $1,45$ unités de log). Ces constantes, relativement faibles, peuvent correspondre à la protonation d'un second atome d'azote du macrocycle. La répulsion électrostatique générée par la protonation d'une seconde amine du cycle tacn augmente l'acidité des ligands et par conséquent entraîne une diminution des constantes de protonation.

Les troisièmes constantes, pouvant être attribuées à la protonation de la fonction acide carboxylique du bras méthylthiazole sont de 1,82 pour le **Hno2th1tha**, 2,8 pour le **H₂no1th2tha** et 3,26 pour le **no3tha**. Pour le ligand **H₂no1th2tha**, une quatrième constante est mesurée à 1,96 et correspond à la protonation de la seconde fonction acide carboxylique. Enfin, pour le ligand **H₃no3tha**, les constantes de protonation des deux dernières fonctions acide carboxylique sont mesurées à $\log K_4 = 2,22$ et $\log K_5 = 1,92$.

Les hypothèses émises concernant le mécanisme de protonation des ligands pourraient être confirmées par une étude RMN du ¹H.

b. Diagrammes de spéciation

Les diagrammes de spéciation des espèces en fonction du pH des quatre ligands ainsi que du **no2th** ont été tracés à partir des constantes de protonation déterminées par potentiométrie et sont représentés ci-après (**Figure 85**).

Pour le ligand **Hno2th1tha**, quatre espèces sont présentes sur une échelle de pH allant de 2 à 12. Pour un pH compris entre 2 et 4, les espèces LH, LH₂⁺ et LH₃²⁺ coexistent. L'espèce

prédominante est l'espèce LH qui a une abondance de 100% pour des pH compris entre 5 et 8. Après pH 11, seule l'espèce déprotonée est présente.

Le ligand $H_2no1th2tha$ est présent sous cinq états de protonation différents sur la gamme de pH étudiée. Les espèces mono-, di-, tri-, et tétra-protonées coexistent pour des pH compris entre 3 et 5. L'espèce LH^- est présente à 100% à partir de pH 6 et son abondance commence à diminuer à partir de pH 8, ce qui entraîne l'apparition de l'espèce déprotonée.

Enfin, pour le ligand $H_3no3tha$, six espèces coexistent sur toute la gamme de pH étudiée. On retrouve plusieurs espèces protonées pour des pH acides, tandis que l'espèce mono-protonée LH^{2-} existe entre pH 6 et 8.

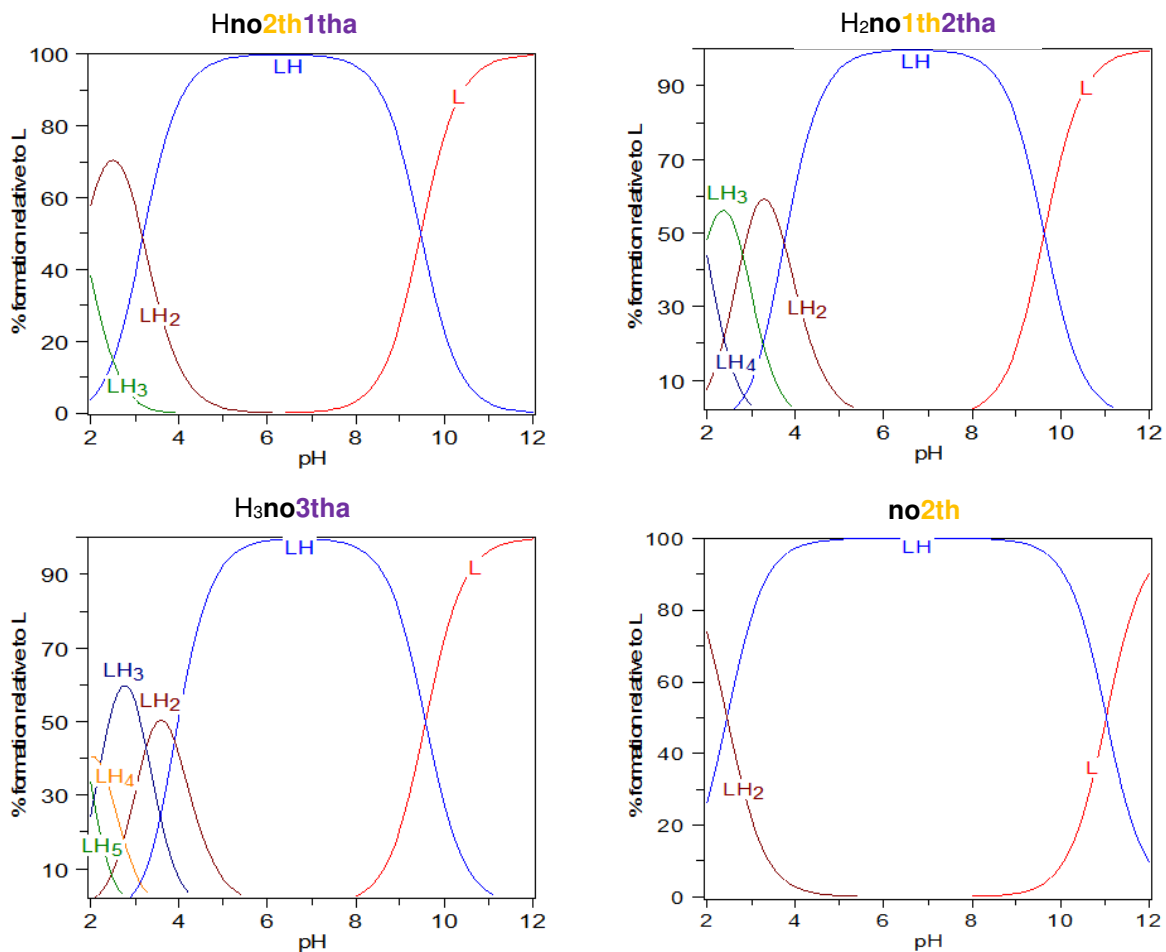


Figure 85 : Diagrammes de spéciation des ligands $Hno2th1tha$, $H_2no1th2tha$, $H_3no3tha$ et $no2th$ de pH 2 à 12. Les charges des espèces sont omises pour raison de clarté.

En conclusion, pour tous ces ligands, il est notable qu'à pH 5,5 et 7,4, souvent utilisés pour le radiomarquage au cuivre-64, seule l'espèce mono-protonée est présente en solution ce qui

permet une complexation plus aisée puisque la compétition avec les protons est beaucoup moins forte qu'à pH plus acide.

2. Constantes de complexation

Les constantes de formation des complexes ML ($M = \text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$) sont mesurées par titrages potentiométriques. Comme précédemment, les constantes sont déterminées à 25°C en utilisant une force ionique $I = 0,10 \pm 0,01 \text{ M KNO}_3$. Les titrages sont réalisés en utilisant 0,9 équivalent de cation métallique par rapport à la quantité en ligand.

a. Constantes de complexation avec le Cu^{2+}

La complexation du Cu^{2+} par les trois ligands étant quantitative même à pH acide, les valeurs des constantes de formation pour les espèces ML sont déterminées par compétition avec le ligand $\text{K}_2\text{H}_2\text{edta}$. Les valeurs de constantes de formation des complexes ML et M_3L_2 sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 32**). Les valeurs des constantes de formation des complexes ML avec les ligands H_3nota et **no2th** y sont ajoutées pour comparaison.

Equilibres	Hno2th1tha	H2no1th2tha	H3no3tha	H3nota ^[140]	no2th ^[137]
$\log\beta_{\text{CuL}}$					
$\text{Cu}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	19,8(1)	18,0(1)	16,6(1)	21,63	20,77
$\text{Cu}^{2+} + \text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CuHL}$	22,76(1)	21,65(4)	20,98(4)	24,37	23,60
$\text{Cu}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuLH}_{-1} + \text{H}^+$	8,86(2)	7,65(5)	6,79(3)	-	11,59
$3 \text{Cu}^{2+} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}_2$	46,53(4)	44,17(9)	42,48(9)	-	-
$3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_{-1} + \text{H}^+$	-	37,2(1)	36,8(1)	-	-
$3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}_2\text{H}_{-2} + 2\text{H}^+$	33,24(3)	28,9(1)	28,8(1)	-	-
$\text{pCu} = -\log[\text{Cu}^{2+}]_{\text{libre}}$					
pCu	17,74	15,40	14,04	17,6	17,15

Tableau 32 : Valeurs des constantes de formation $\log\beta_{\text{CuL}}$ et des pCu des complexes CuL déterminées par potentiométrie

De manière générale, la constante de métallation décroît avec le nombre de bras méthylthiazole acide présents sur la molécule. La constante de métallation du Cu^{2+} est la plus élevée pour le ligand Hno2th1tha avec $\log K_{\text{CuL}} = 19,8$ ($\Delta\log K_{\text{CuL}} = 1,8$ par rapport au ligand H2no1th2tha; $\Delta\log K_{\text{CuL}} = 3,2$ par rapport au ligand H3no3tha). L'introduction de bras méthylthiazole acide décroît la stabilité des complexes comparés au complexe formé avec le **no2th** qui a une constante de

formation de l'ordre de 20,77. Les bras méthylthiazole ont un moins bon pouvoir complexant pour le Cu^{2+} , que les bras acétates, comme en témoignent les valeurs de constantes d'affinité du H_3nota ($\log K_{\text{CuL}} = 21,63$).

Les diagrammes de spéciation des espèces en fonction du pH avec 0,9 équivalent de sel métallique ainsi que celui du $\text{no}2\text{th}$ sont représentés ci-dessous (**Figure 87**).

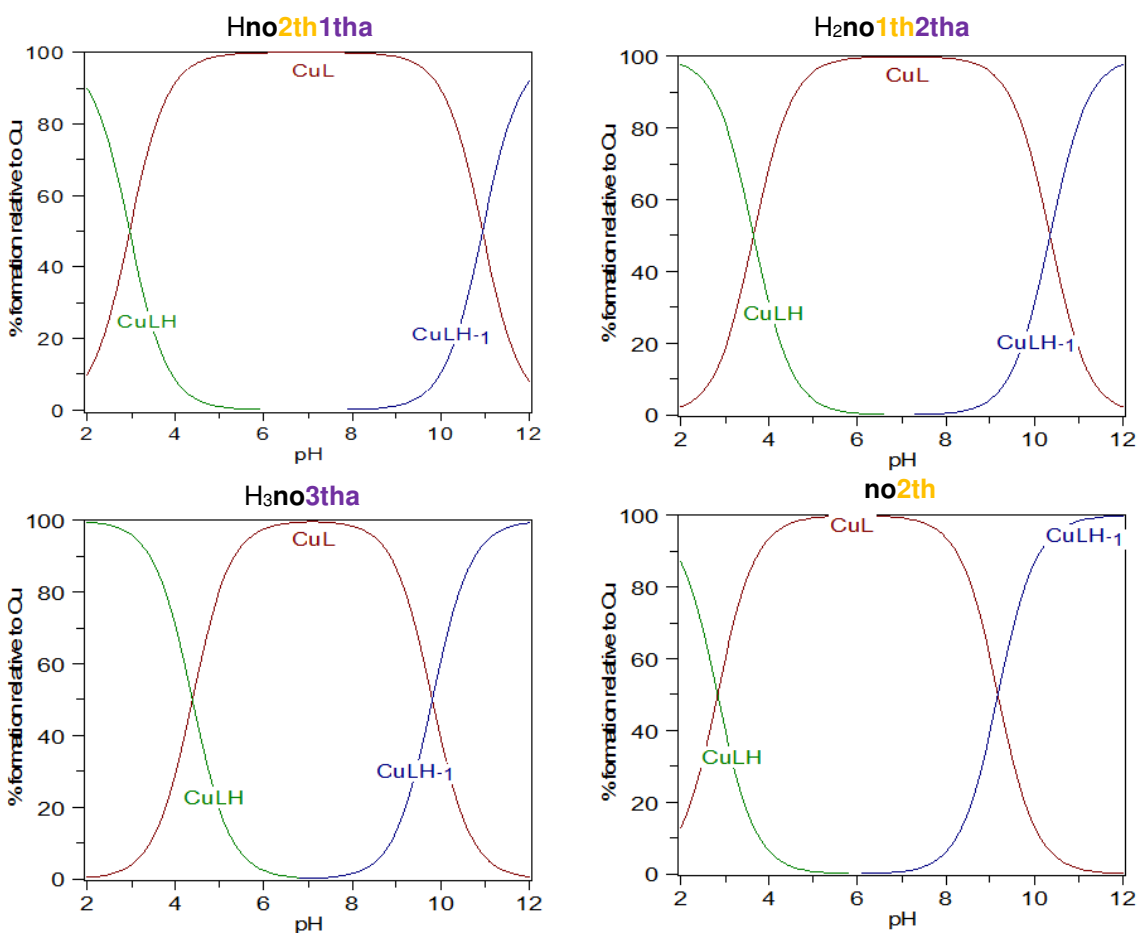


Figure 86 : Diagrammes de spéciation des ligands $\text{Hno}2\text{th}1\text{tha}$, $\text{H}_2\text{no}1\text{th}2\text{tha}$, $\text{H}_3\text{no}3\text{tha}$ et $\text{no}2\text{th}$ de pH 2 à 12 en présence de 0,9 équivalent de Cu^{2+} . Les charges des espèces sont omises pour raison de clarté.

Les ligands forment avec l'ion Cu^{2+} trois espèces sur une échelle de pH de 2 à 12 : l'espèce mononucléaire CuL , mais également le complexe sous sa forme protonée CuLH et à pH basique l'espèce hydroxo $\text{CuL}(\text{OH})$. Le complexe $[\text{Cu}(\text{no}2\text{th}1\text{tha})]^+$ est prédominant sur la gamme de pH allant de 4 à 10. A pH physiologique, seule l'espèce CuL est présente en solution pour les trois

ligands. De plus, à pH acide, aucune trace de Cu^{2+} non complexé n'est notable, ni la formation d'hydroxyde de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ à pH basique. Les trois ligands complexent donc de façon efficace l'ion Cu^{2+} sur une très grande gamme de pH, ce qui témoigne d'une stabilité thermodynamique importante.

Avec un pCu égal à 17,74, le ligand **Hno2th1tha** possède une stabilité thermodynamique nettement supérieure que le **H₂no1th2tha** ($\Delta\text{pCu} = 17,74 - 15,40 = 2,34$) ainsi que le **H₃no3tha** ($\Delta\text{pCu} = 17,74 - 14,04 = 3,74$). Les valeurs obtenues pour les ligands **H₂no1th2tha** et **H₃no3tha** sont faibles mais du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les analogues tétraazamacrocycliques **H₄dota** ($\text{pCu} = 15,20$) [39] et **H₄teta** ($\text{pCu} = 14,20$) [40]. Enfin, le pCu du ligand **Hno2th1tha** est du même ordre de grandeur que celui du **H₃nota** et même légèrement supérieur à celle du **no2th** ($\Delta\text{pCu} = 0,59$).

Il est à noter également, que l'augmentation d'atomes coordinant impacte de façon néfaste la stabilité thermodynamique des complexes mais également le domaine de prédominance de l'espèce CuL et favorise la formation d'entités trinuéclaires, ce qui n'avait pas été observé avec le ligand **no2th**. De fait, les études de titrages potentiométriques sont également effectuées en présence de 1,5 équivalents de Cu^{2+} afin de mettre en évidence la formation de complexes trinuéclaires de type Cu_3L_2 . Les constantes de formation étagées (**Tableau 32**) des complexes trinuéclaires sont respectivement de 46,53, 44,17 et 42,48 pour les ligands **Hno2th1tha**, **H₂no1th2tha** et **H₃no3tha**. Ces valeurs correspondent à des constantes $\log K_{\text{Cu}_3\text{L}_2}$ égales à 26,73, 26,17 et 24,38.

D'après les diagrammes de répartition des espèces (**Figure 87**), on peut remarquer que même en présence de 1,5 équivalents de Cu^{2+} , l'espèce mononucléaire CuL est présente sur toute la gamme de pH d'étude. Néanmoins, plus le nombre de bras méthylthiazole acide augmente, plus la formation du complexe mononucléaire est amoindrie par rapport à celles d'entités trinuéclaires. Sur la gamme de pH de 3 à 6, le ligand **Hno2th1tha** forme environ 50% d'espèces trinuéclaires Cu_3L_2 , 30% d'espèces mononucléaires CuL et 20% de Cu^{2+} reste non complexé. En revanche, pour des pH plus basiques ($\text{pH} > 7$), seule l'espèce trinuéclaire $\text{Cu}_3\text{L}_2(\text{OH})_2$ est présente en solution.

Le diagramme de prédominance des espèces pour le ligand **H₂no1th2tha** montre la coexistence de neuf espèces en fonction du pH. L'espèce prédominante est le complexe trinuéclaire Cu_3L_2

présent à 80% pour $4 < \text{pH} < 7$. L'espèce mononucléaire, est quant à elle, également présente sur l'ensemble de la gamme d'étude avec une abondance d'environ 10%. A partir de pH 8, trois espèces hydroxo trinuéclaires coexistent.

Enfin, pour le ligand $\text{H}_3\text{no3tha}$, six espèces sont présentes en solution. Pour ce ligand, l'espèce CuL a une abondance inférieure à 5% pour des pH compris entre 4 et 6. L'espèce Cu_3L_2 est présente majoritairement sur une gamme de pH entre 3 et 5. Lorsque le pH augmente, la déprotonation successive des fonctions acide carboxylique donne lieu à la coexistence de plusieurs espèces déprotonées.

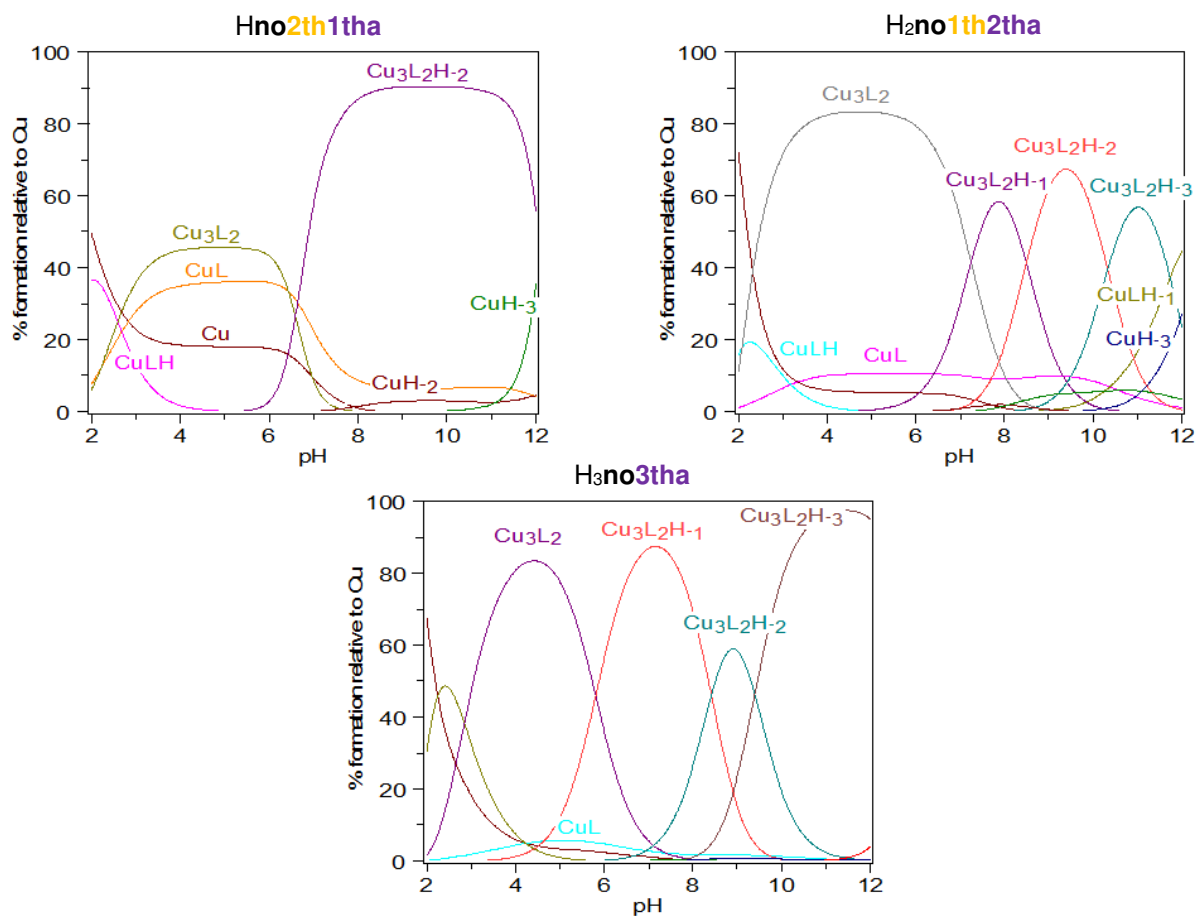


Figure 87 : Diagrammes de spéciation des ligands Hno2th1tha , $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ et $\text{H}_3\text{no3tha}$ de pH 2 à 12 en présence de 1,5 équivalents de Cu^{2+} . Les charges des espèces sont omises pour raison de clarté.

b. Constantes de formation avec le Zn²⁺

Avec 0,9 ou 1,5 équivalents de sel métallique aucune espèce trinuéaire n'est détectée. Pour les trois ligands, il est possible de mesurer les constantes de trois à quatre équilibres différents. Les valeurs de constantes de formation globale (logβ) et de pZn sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 33**). Celles du H₃nota et du no2th y sont également ajoutées.

Equilibres	Hno2th1tha	H ₂ no1th2tha	H ₃ no3tha	H ₃ nota ^[41]	no2th ^[137]
	logβ _{ZnL}				
Zn ²⁺ + L ⇌ ZnL	16,0(1)	11,52(1)	9,85(6)	18,30	16,28
Zn ²⁺ + L + H ⁺ ⇌ ZnHL	18,56(2)	15,05(1)	17,23(6)	-	18,30
Zn ²⁺ + L + 2 H ⁺ ⇌ ZnH ₂ L	-	-	19,34(7)	-	-
Zn ²⁺ + L ⇌ ZnLH ₋₁ + H ⁺	4,85(7)	0,45(2)	-1,19(9)	-	5,75
	pZn = -log[Zn ²⁺] _{libre}				
pZn	13,89	8,89	7,80	14,28	12,65

Tableau 33 : Valeurs des constantes de formation globale logβ et pZn des complexes de Zn²⁺

Comme observé avec les complexes de Cu²⁺, les constantes de formation de l'espèce mononucléaire ZnL diminuent en fonction du nombre de bras méthylthiazole acide présent sur chaque molécule. Le ligand Hno2th1tha possède une valeur de constante de formation logK_{ZnL} égale à 16,0, ce qui lui confère une stabilité thermodynamique similaire au ligand no2th. Avec des constantes de formation logK_{ZnL} égale à 11,52 et 9,85, les ligands H₂no1th2tha et H₃no3tha possèdent des constantes nettement plus faibles que celles obtenues avec les dérivés H₃nota et no2th.

L'affinité des ligands pour le Zn²⁺ se dégrade là encore avec l'augmentation du nombre de bras méthylthiazole acide. Avec un pZn de 13,89, le ligand Hno2th1tha complexe aussi efficacement le cation métallique que les ligands H₃nota et no2th. Les deux autres ligands possèdent des pZn respectivement de 8,89 et 7,80 pour le H₂no1th2tha et le H₃no3tha qui sont beaucoup plus faibles. Ces ligands sont par conséquent des mauvais complexant du Zn²⁺.

Les diagrammes de spéciation des espèces en fonction du pH ont été tracés à partir de ces constantes et sont représentés ci-après (**Figure 88**). Les ligands forment en fonction du pH trois à quatre espèces différentes. Le ligand Hno2th1tha présente trois espèces en fonction du pH, une espèce mono-protonée formée à pH acide (pH < 2) présente à 60% et une seconde

correspondant au complexe ZnL avec une abondance de 40%. Cette espèce est par la suite prédominante sur une très large échelle de pH comprise entre 4 et 10. La dernière espèce prédominante à partir de pH 11 correspond au complexe déprotoné. Le ligand $H_2no1th2tha$ présente également les espèces ZnLH, ZnL et ZnL(OH) sur la gamme de pH étudiée. La seule différence notable avec le ligand $Hno2th1tha$ est la zone de prédominance de l'espèce ZnL puisque l'espèce mononucléaire a une abondance de 100%, dans la gamme de pH 5 à 9. Le ligand $H_3no3tha$ possède, quant à lui, des caractéristiques différentes puisque l'espèce prédominante est le complexe mono-protoné ZnLH présent entre pH 2 et 7,5. Ce résultat est en accord avec la constante $\log\beta$ calculée qui est supérieure de deux unités de log pour la formation du complexe protoné par rapport aux deux premiers ligands. Ce dernier est donc plus facilement protonable et ceci se traduit par une plus grande zone de prédominance. Entre pH 7 et 12 on retrouve un mélange d'espèces mono-protonées, neutres ou déprotonées.

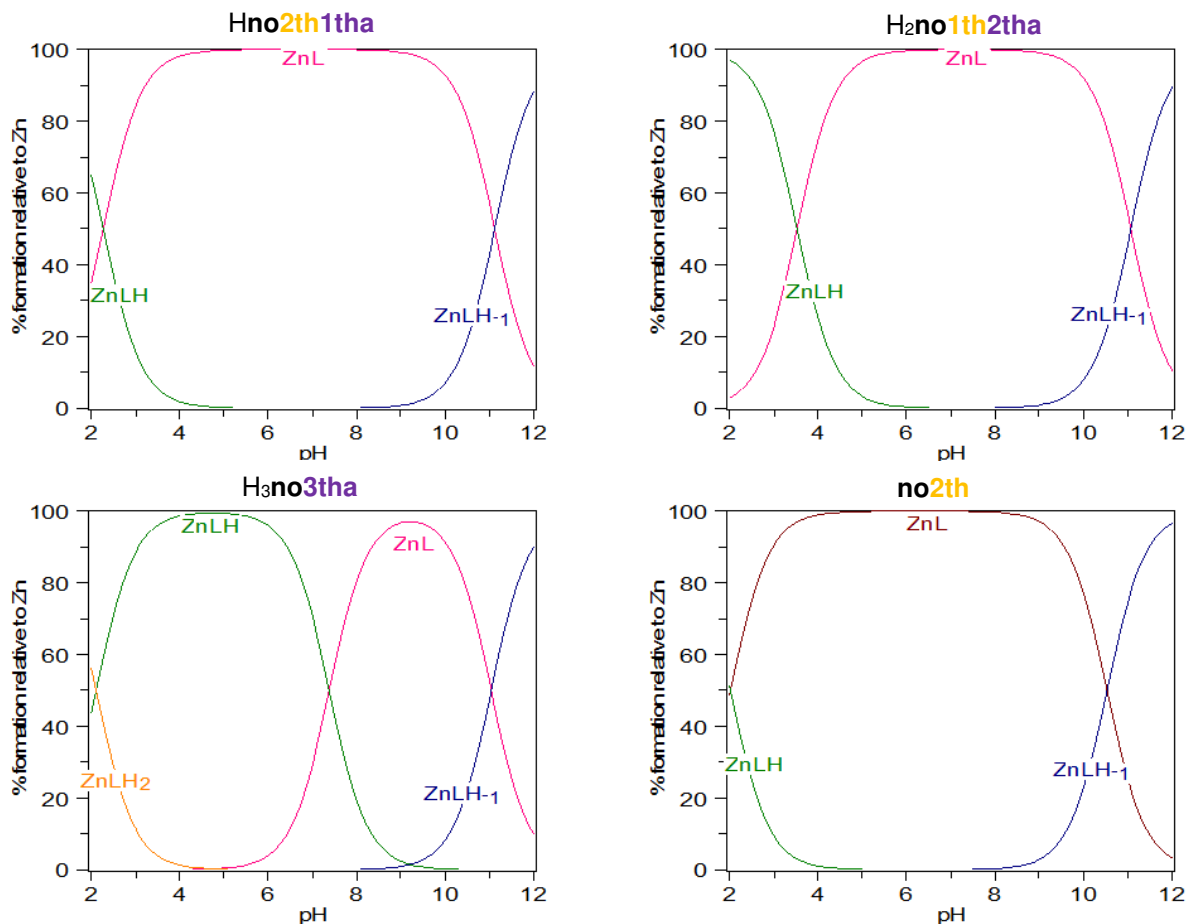


Figure 88 : Diagrammes de spéciation des ligands $Hno2th1tha$, $H_2no1th2tha$, $H_3no3tha$ et $no2th$ de pH 2 à 12 en présence de 0,9 équivalent de Zn^{2+} . Les charges des espèces sont omises pour raison de clarté.

3. Sélectivité du Cu²⁺ vis-à-vis du Zn²⁺

Les pM (M = Cu²⁺/Zn²⁺) sont calculés en solution aqueuse à 25,0 °C en utilisant une concentration en ligand 2 fois supérieure à celle du métal étudié, [L] = 2,0.10⁻⁵M et [M²⁺]_{tot} = 1,0.10⁻⁵M et sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 34**), tout comme ceux des ligands références H₃nota et no2th.

	Hno2th1tha	H ₂ no1th2tha	H ₃ no3tha	H ₃ nota ^[137]	no2th ^[137]
pCu	17,74	15,40	14,04	17,6	17,15
pZn	13,89	8,89	7,80	14,28	12,65
pCu-pZn	3,85	6,51	6,24	3,33	4,50

Tableau 34 : Valeurs des pM calculés à pH 7,4 et 25 °C

Les valeurs de pCu et pZn des trois ligands diminuent, en accord avec les constantes obtenues précédemment, avec l'augmentation du nombre de fonctions acide carboxylique présentes sur les bras méthylthiazole. La différence de 3,85 unités de log des pM ($\Delta pM = pCu - pZn$) du ligand Hno2th1tha, témoigne de la grande sélectivité pour le Cu²⁺ vis-à-vis du Zn²⁺. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles déterminées pour le no2th et le H₃nota^[137]. Les ligands H₂no1th2tha et H₃no3tha possèdent des sélectivités similaires, comme l'attestent les différences de pM ($\Delta pM = pCu - pZn$) qui sont respectivement de 6,51 et 6,24. Mais restent malgré tous des chélatants du Cu²⁺ aux propriétés de complexation modestes, d'autant plus qu'ils vont facilement vers la formation de complexes polynucléaires.

4. Conclusions des études potentiométriques

Les études par potentiométrie ont permis d'obtenir des informations sur les propriétés acido-basiques, ainsi que la stabilité des complexes de Cu²⁺ et Zn²⁺ par détermination des constantes de formation. D'une manière générale, ces dernières diminuent avec l'augmentation du nombre de groupements méthylthiazole acide. Nous avons pu montrer que ces groupements coordinants, pouvaient former des complexes mono et trinucéaires avec 0,9 et 1,5 équivalents de Cu²⁺. La formation d'entités trinucéaires est un inconvénient majeur pour une application en milieu biologique. Néanmoins, lors du radiomarquage de radiopharmaceutique, le ligand est très souvent introduit en excès par rapport au radionucléide ce qui permettrait de s'affranchir de la formation de complexes trinucéaires. Cette propriété devra être confirmée à l'état solide et constitue une caractéristique remarquable de ces ligands qu'il sera intéressant de valoriser.

Au vu de ces résultats le ligand **Hno2th1tha** possède les meilleures caractéristiques des trois ligands étudiés, en termes de stabilité thermodynamique et de sélectivité ($\log K_{CuL} = 19,8$, $pCu = 17,74$ et $\Delta pM = 3,85$) et est également un aussi bon chélatant du Cu^{2+} que le H_3nota et le **no2th**.

III. Synthèses et caractérisations des complexes de $M^{II}L$ ($M = Cu^{2+} / Zn^{2+}$)

Dans cette partie, la synthèse et la caractérisation des complexes à l'état solide et en solution par RMN, UV-visible et RPE seront détaillées.

1. Synthèses des complexes

La synthèse des complexes de M^{2+} ($M = Cu^{2+} / Zn^{2+}$) avec le ligand **no3th**, est effectuée dans l'acétonitrile en utilisant 1,5 équivalents de sel métallique. Les complexes sont sous la forme de solides verts $[Cu(\text{no3th})](ClO_4)_2$ et incolores $[Zn(\text{no3th})](ClO_4)_2$ avec des rendements de 97 et 95% respectivement.

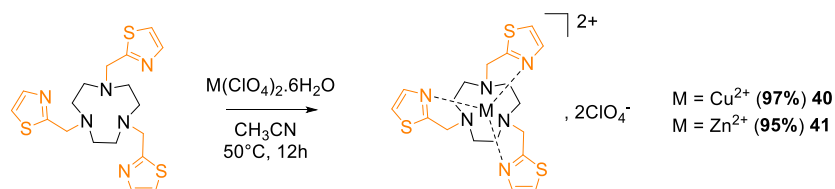


Schéma 36 : Voie de synthèse des complexes $[M^{II}(\text{no3th})](ClO_4)_2$ ($M = Cu^{2+}/Zn^{2+}$)

Pour s'affranchir de la formation d'espèces trinuécléaires, détectées en potentiométrie, les synthèses des complexes à partir des ligands **Hno2th1tha**, $H_2\text{no1th2tha}$ et $H_3\text{no3tha}$ s'effectuent avec 0,9 équivalent de sel métallique dans l'eau à un pH ajusté entre 6 et 7. Les complexes sont ensuite purifiés par HPLC semi-préparative.

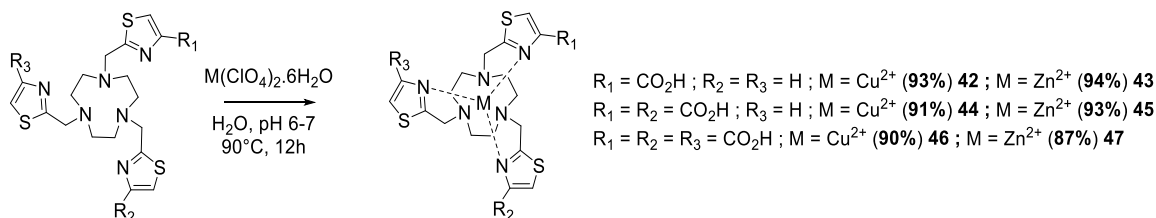


Schéma 37 : Voie de synthèse des complexes $M^{II}L$ ($M = Cu^{2+}/Zn^{2+}$)

2. Caractérisations des complexes $[M^{II}(\text{no3th})]^{2+}$

a. Structures cristallographiques des complexes $[M^{II}(\text{no3th})]^{2+}$ obtenues par diffraction des rayons X

Des monocristaux de qualité suffisante, ont été obtenus par évaporation lente d'une solution d'acétonitrile, pour une analyse par diffraction des rayons X. Les deux complexes cristallisent dans un groupe d'espace centro-symétrique de type P21/c. Pour les deux complexes, l'unité asymétrique est composée du complexe $[M(\text{no3th})]^{2+}$ et de deux contre-ions perchlorate. Les structures aux rayons X des complexes sont représentées ci-dessous (**Figure 89**). Seul l'isomère $\Delta(\delta\delta\delta)$ cristallise à l'état solide. Les valeurs de liaisons et d'angles sont répertoriées dans le **Tableau 35** pour le complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ et dans le **Tableau 36** pour le complexe de $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$.

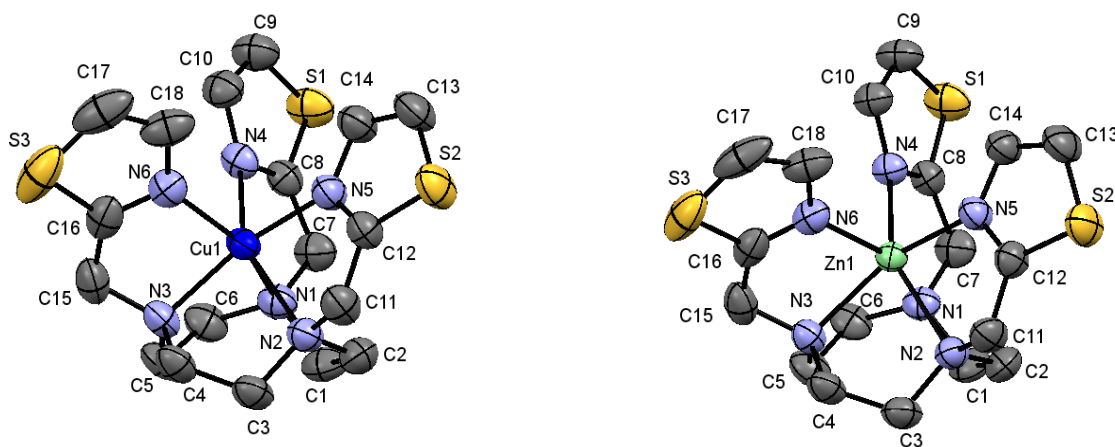


Figure 89 : Structure cristallographique des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ et $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$ obtenues par DRX. Les atomes d'hydrogène et les contre-ions perchlorates sont omis pour des raisons de clarté

$[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$			
Distances (Å)			
N(1)-Cu(1)	2,210(3)	N(4)-Cu(1)	2,263(3)
N(2)-Cu(1)	2,228(3)	N(5)-Cu(1)	2,048(3)
N(3)-Cu(1)	2,065(3)	N(6)-Cu(1)	2,061(3)
Angles (°)			
N(5)-Cu(1)-N(6)	94,05(14)	N(6)-Cu(1)-N(1)	151,60(13)
N(5)-Cu(1)-N(3)	154,00(13)	N(3)-Cu(1)-N(1)	82,37(13)
N(6)-Cu(1)-N(3)	81,49(14)	N(6)-Cu(1)-N(4)	91,19(12)
N(5)-Cu(1)-N(1)	110,35(13)	N(3)-Cu(1)-N(4)	115,60(12)
N(6)-Cu(1)-N(2)	121,52(13)	N(1)-Cu(1)-N(4)	75,04(11)
N(3)-Cu(1)-N(2)	82,66(13)	N(2)-Cu(1)-N(4)	145,48(12)
N(1)-Cu(1)-N(2)	79,11(12)	N(5)-Cu(1)-N(4)	89,99(13)

Tableau 35 : Données structurales du complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ obtenues expérimentalement

Le Cu(II) est coordonné par les six atomes d'azote, les atomes de soufre, quant à eux, ne rentrent pas dans la sphère de coordination du métal. Le complexe est ainsi dans une géométrie pseudo-octaédrique, dans laquelle les atomes N1, N2, N3 du macrocycle forment le plan inférieur de l'octaèdre et les trois atomes N4, N5 et N6 des bras méthylthiazole forment le plan supérieur. Le cation métallique est situé au-dessus de la cavité macrocyclique et est distant de 1,422 Å du plan composé des atomes N1, N2 et N3 et 1,183 Å du plan formé par les atomes N4, N5 et N6. La géométrie pseudo-octaédrique est caractérisée par une élongation des liaisons axiales Cu-N2 et Cu-N4 qui sont respectivement de 2,228 et 2,263 Å. Cette géométrie déformée est également caractérisée par un angle N2-Cu-N4 de 145,48° soit une différence $\Delta\alpha = 34,52^\circ$ par rapport à un angle théorique $\alpha = 180^\circ$ pour une géométrie octaédrique. La structure obtenue par diffraction des rayons X est similaire à celle décrite dans la littérature ^[138].

Le complexe de Zn²⁺ est isostructural de son analogue [Cu(no3th)]²⁺. Le cation métallique est hexacoordiné, par les six atomes d'azote du ligand. Les atomes d'azote N1, N2, et N3 du tacn forment le plan inférieur de l'octaèdre dont le cation métallique est distant de 1,150 Å alors que les atomes d'azote N4, N5, et N6 des bras méthylthiazole forment le plan supérieur qui se trouve à 1,500 Å du zinc. Les atomes N2, N3, N4 et N5 forment le plan équatorial de l'octaèdre alors que les atomes N1 et N6 se retrouvent sur les positions apicales du polyèdre avec des distances respectives de 2,243 et 2,135 Å. L'angle formé à partir de ces atomes et du cation métallique est de 148,73° soit une différence de 32,37° par rapport à un octaèdre régulier. Avec un angle de torsion moyen φ égal à 20,3° et toutes les autres données cristallographiques déterminées, la sphère de coordination du cation métallique peut être considérée comme un octaèdre déformé.

[Zn(no3th)] ²⁺			
Distances (Å)			
N(1)-Zn(1)	2,243(3)	N(4)-Zn(1)	2,124(3)
N(2)-Zn(1)	2,248(3)	N(5)-Zn(1)	2,131(3)
N(3)-Zn(1)	2,193(3)	N(6)-Zn(1)	2,135(3)
Angles (°)			
N(4)-Zn(1)-N(6)	94,61(12)	N(4)-Zn(1)-N(5)	92,35(12)
N(5)-Zn(1)-N(6)	93,88(13)	N(5)-Zn(1)-N(3)	148,22(12)
N(4)-Zn(1)-N(2)	145,31(12)	N(6)-Zn(1)-N(3)	77,82(13)
N(5)-Zn(1)-N(2)	77,30(12)	N(4)-Zn(1)-N(1)	76,78(11)
N(6)-Zn(1)-N(2)	118,80(12)	N(5)-Zn(1)-N(1)	116,20(12)
N(3)-Zn(1)-N(2)	80,08(12)	N(6)-Zn(1)-N(1)	148,73(13)
N(1)-Zn(1)-N(2)	78,45(12)	N(3)-Zn(1)-N(1)	80,23(12)

Tableau 36 : Données structurales du complexe [Zn(no3th)]²⁺ obtenues expérimentalement

b. Caractérisation RMN du complexe $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$

La caractérisation RMN ^1H (**Figure 90**) du complexe $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$ est effectuée dans le $\text{dms}\text{-d}^6$, le complexe n'étant pas soluble dans les solvants aqueux et organiques.

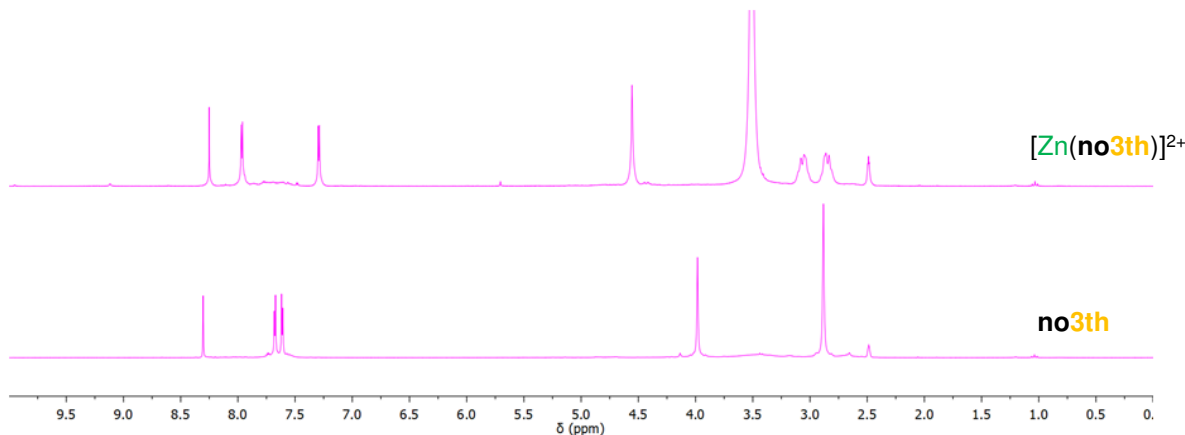


Figure 90 : Spectres RMN ^1H (300 MHz, 298 K, $\text{dms}\text{-d}^6$) du complexe $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$ (en haut) et du ligand **no3th** (en bas)

Le ligand libre présente un singulet à 2,8 ppm comptant pour les douze protons des CH_2 du macrocycle, un singulet à 4 ppm intégrant pour six protons correspondant au CH_2 des bras méthylthiazole et de deux doublets vers 7,5 ppm pour les 2H éthyléniques des bras méthylthiazole. Les atomes d'hydrogène des CH_2 du macrocycle engagés dans des métallocycles internes par coordination au $\text{Zn}(\text{II})$ deviennent non isochrones. Sur le spectre RMN du complexe $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$, cela se traduit par deux massifs comptant pour six protons chacun à 2,8 et 3,2 ppm correspondant aux protons axiaux et équatoriaux. Le signal des CH_2 des bras méthylthiazole est déblindé d'environ 0,5 ppm. Une différence importante est notable concernant les protons éthyléniques des bras méthylthiazole. Les protons portés par les atomes de carbone positionnés en α des atomes de soufre connaissent un blindage important ($\Delta\delta = 0,5$ ppm), tandis que les protons éthyléniques positionnés en α des atomes d'azote sont déblindés vers 8,20 ppm du fait de la forte proximité de l'atome de Zn^{2+} .

c. Caractérisations UV-visible et RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$

La coordination du cation métallique entraîne une levée de dégénérescence des orbitales 3d du métal qui se caractérise par une bande d'absorption large et de faible intensité entre 500 et 1000

nm. Le complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ est caractérisé en UV-visible par une bande large avec un maximum d'absorption à 674 nm dans l'eau à pH 5,5 (**Figure 91**).

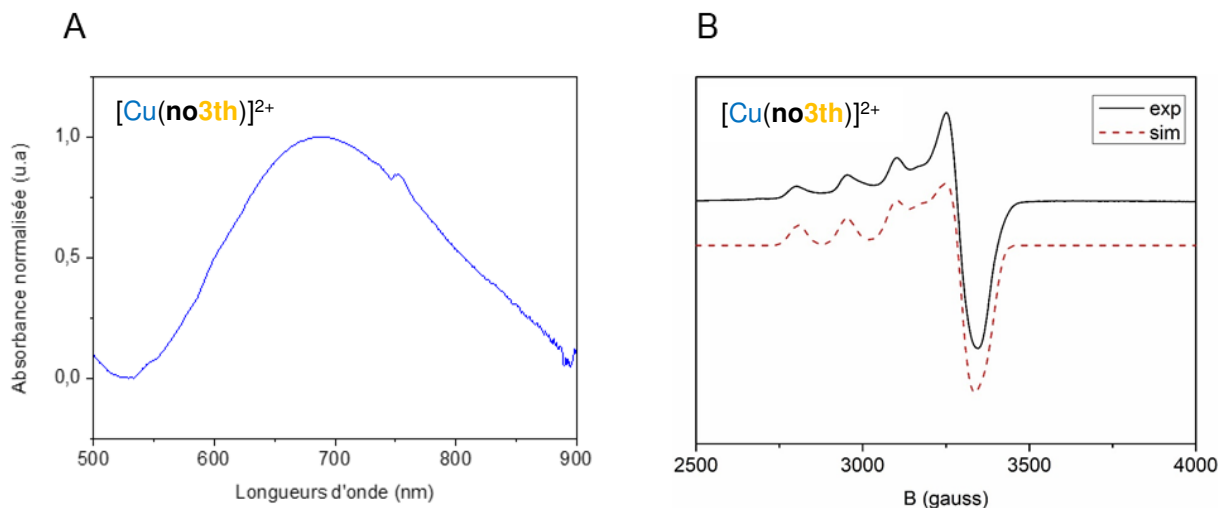


Figure 91 : Spectre d'absorption UV-visible du complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ à pH 5,5 et température ambiante (A) et spectre RPE enregistré dans un mélange DMF/eau (1:1) à 130K (B)

Le spectre RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ enregistré dans un mélange DMF/eau (1:1) est caractéristique d'un complexe de cuivre (II) anisotrope (**Figure 91**). Il est composé de trois des quatre raies attendues pour g_z , alors que les interactions superhyperfines ne sont pas observées à cause de la présence des atomes d'azote. Les valeurs de g et des constantes de couplage hyperfin A sont simulées et sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 37**).

Complexes	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
$[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$	2,06	2,06	2,15	60	10	175

Tableau 37 : Paramètres RPE obtenus après simulation. A_i donnés en 10^{-4} cm^{-1}

Les valeurs de g_x et g_y sont égales à 2,06 tandis que g_z prend la valeur de 2,15 ce qui entraîne $g_z > (g_x + g_y)/2$ caractéristique d'un complexe de cuivre mononucléaire. Les valeurs de $g > 2,03$ témoignent également d'une symétrie à caractère rhombique du complexe avec une élongation des liaisons axiales et d'un état fondamental de type dx^2-y^2 .

Ces valeurs sont en accord avec une géométrie octaédrique déformée du complexe, ce qui a également été démontré par les études UV-visible en solution et l'étude par rayons X du complexe à l'état solide.

3. Caractérisations des complexes $[M^{II}(\text{no2th1tha})]^+$
- a. Caractérisation RMN du complexe $[\text{Zn}(\text{no2th1tha})]^+$

L'analyse par RMN ^1H du complexe dans le D_2O est présentée ci-dessous (**Figure 92**). Comme précédemment, on note l'anisochronie des deux protons des groupements CH_2 du macrocycle. Les signaux sont moins bien résolus du fait de la possible interconversion rapide $\delta \rightarrow \lambda$ du macrocycle. Le doublet vers 4,5 ppm est caractéristique de la non isochronie des groupements CH_2 des bras méthylthiazole.

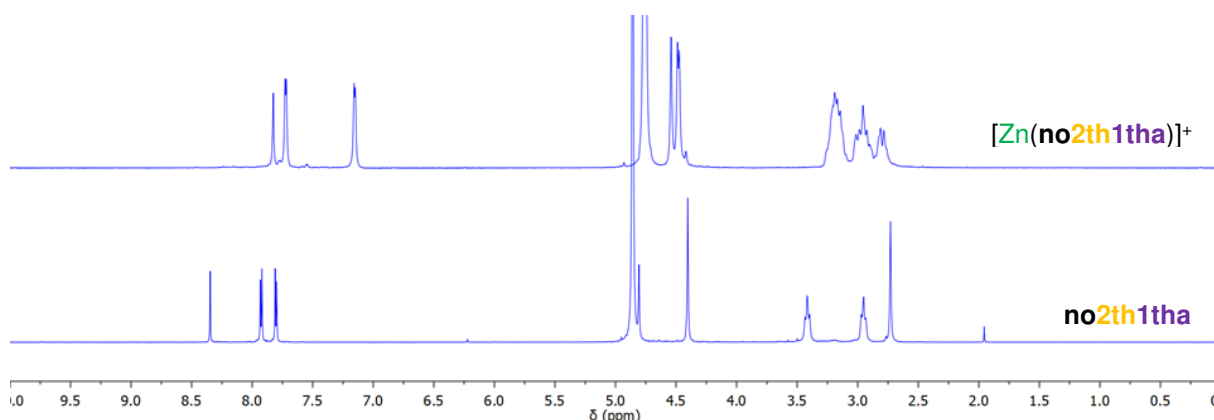


Figure 92 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O , pD 7,1) du complexe $[\text{Zn}(\text{no2th1tha})]^+$ (en haut) et du ligand Hno2th1tha (en bas)

- b. Caractérisations UV-visible et RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$

En spectroscopie UV-visible, le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ est caractérisé par une bande large et non structurée centrée à 653 nm (**Figure 93**) dans un tampon acétate à pH 5,5. Le spectre RPE enregistré dans un mélange DMF/ eau (1:1), se compose, quant à lui, de trois raies bien résolues à bas champ et d'une quatrième recouverte par la bande intense vers 3400 G. Tout comme le spectre RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, ce dernier est caractéristique d'un complexe de Cu^{2+} mononucléaire.

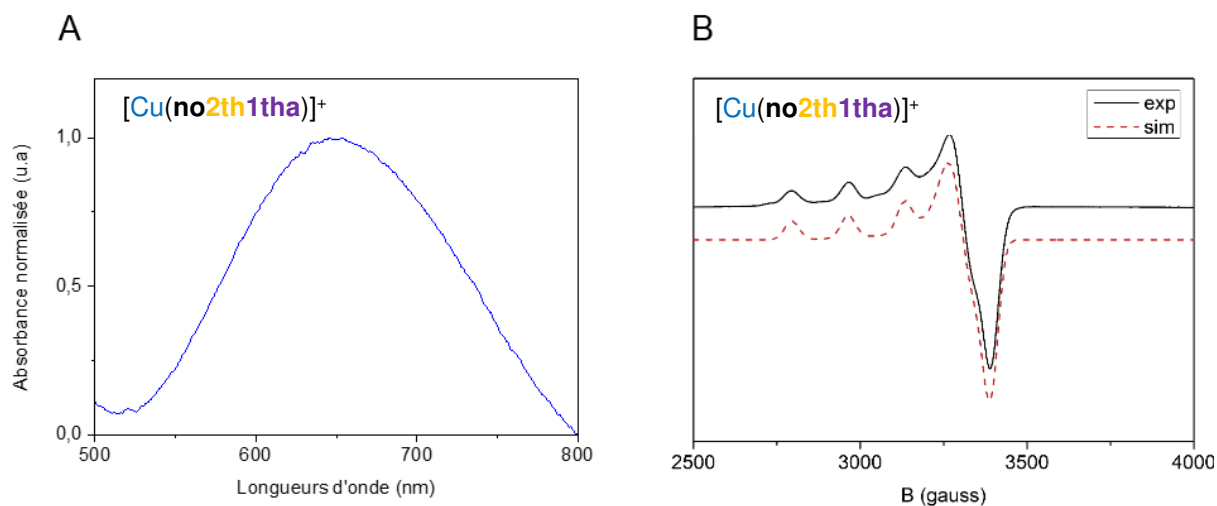


Figure 93 : Spectre d'absorption UV-visible du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ à pH 5,5 et température ambiante (A) et spectre RPE enregistré dans un mélange DMF/eau (1:1) à 130K (B)

Les valeurs des paramètres RPE obtenus après simulation d'une espèce mononucléaire sont représentés ci-dessous (**Tableau 38**).

Complexe	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
$[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$	2,04	2,071	2,208	1	27	183

Tableau 38 : Paramètres RPE obtenus après simulation (A_i donnés en 10^{-4} cm^{-1})

Les paramètres g_x , g_y et g_z prennent des valeurs de 2,04 et 2,071 et 2,208 respectivement. L'inégalité $g_z > (g_x + g_y)/2$ est encore validée pour ce complexe et avec des valeurs de $g > 2,03$, le complexe mononucléaire adopte une symétrie axiale à caractère rhombique.

Les valeurs obtenues en spectroscopie UV-visible et en RPE tendent à confirmer que le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ est dans une géométrie pseudo-octaédrique en solution.

c. Caractérisation du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ par DFT

Nos tentatives d'obtention de cristaux du $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ s'étant soldées par des échecs, des calculs DFT ont été réalisés en collaboration avec le groupe du Pr. Carlos Platas-Iglesias de l'Université de la Corogne en Espagne, afin de mieux comprendre le mode de coordination du complexe.

Ces calculs mettent en évidence la présence de deux géométries optimisées avec des modes de coordination de type CuN₅ ou CuN₆ (**Figure 94**).

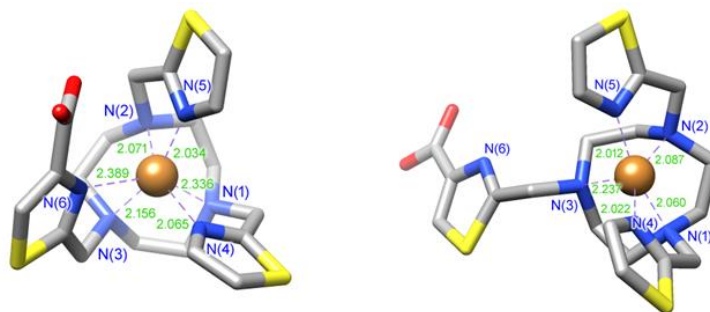


Figure 94 : Géométrie optimisées d'énergie minimale déterminées par calcul DFT

Dans le complexe de type CuN₅ le cation métallique est dans une géométrie de type pyramidale à base carrée. Les atomes N1, N4, N2 et N5 représentent le plan basal de la pyramide et sont distants d'environ 2,0 Å du Cu²⁺. L'atome N3 distant de 2,237 Å est en position apicale. Pour le complexe de type CuN₆, le métal est coordonné par les trois atomes d'azote du macrocycle et ceux des bras méthylthiazole et méthylthiazole acide. La distance Cu-N6 égale à 2,389 Å, incluant l'atome d'azote du bras méthylthiazole acide est relativement plus longue que celles comprenant les bras méthylthiazole. Par conséquent, la fonction acide carboxylique, présente sur le groupement méthylthiazole, entraîne un encombrement stérique non négligeable, qui se traduit par une élongation significative de la liaison Cu-N. Les énergies libres de Gibbs obtenues par calcul DFT favorisent la formation du complexe CuN₆ de seulement 0,047 Kcal.mol⁻¹ ce qui suggère que les deux formes peuvent être présentes en solution. Finalement, dans les deux géométries, la fonction acide carboxylique n'entre pas dans la sphère de coordination du métal.

4. Caractérisations des complexes de [M^{II}(no1th2tha)]

Pour ce complexe, la caractérisation à l'état solide ne sera pas présentée puisqu'aucun monocristal des complexes [M^{II}(no1th2tha)] n'a été obtenu. Seules les études en solutions seront discutées. Des études DFT sont en court de réalisation mais ne sont, à ce jours de la rédaction de ce manuscrit, pas terminées.

a. Caractérisation RMN du complexe $[\text{Zn}(\text{no1th2tha})]$

Les spectres RMN ^1H enregistrés dans le D_2O , du ligand $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ et du complexe sont présentés ci-dessous (**Figure 95**).

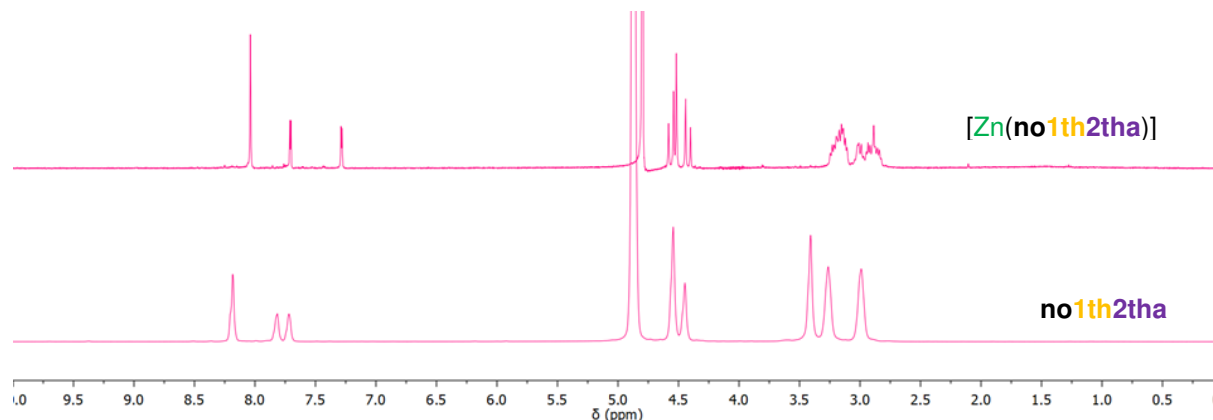


Figure 95 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O , pD 6,9) du complexe $[\text{Zn}(\text{no1th2tha})]$ (en haut) et du ligand $[\text{Zn}(\text{no1th2tha})]$ (en bas)

Sur le spectre, une différence est notable par rapport aux spectres des complexes $[\text{Zn}(\text{no3th})]^{2+}$ et $[\text{Zn}(\text{no2th1tha})]^+$. En effet, les doublets à 4,40 et 4,54 ppm sur le spectre RMN ^1H du complexe $[\text{Zn}(\text{no1th2tha})]$, sont caractéristiques des protons des CH_2 des bras méthylthiazole acide qui après complexation deviennent diastéréotopiques. La constante de couplage de 16 Hz, confirme également cette diastéréotopie puisqu'elle correspond à une constante géminale entre deux protons non isochrones portés par un même atome de carbone.

b. Caractérisations UV-visible et RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$

Le complexe possède également une longueur d'onde maximale égale à 673 nm qui est très proche de celle obtenue pour le complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$. Le spectre RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$, enregistré dans un mélange DMF/eau à 130K, est représenté ci-après (**Figure 96**) et les valeurs obtenues après simulation sont répertoriées dans le **Tableau 39**.

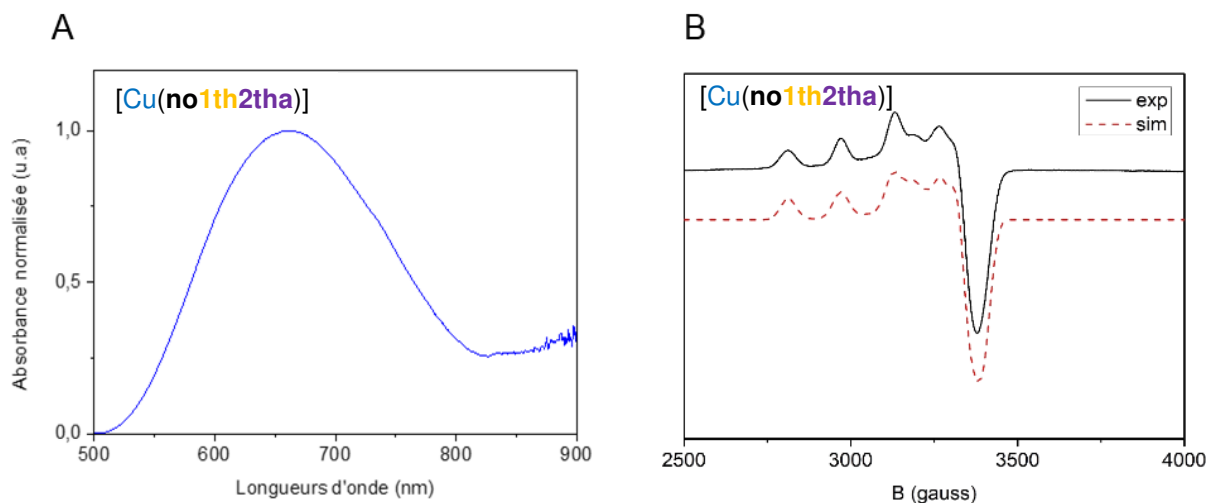


Figure 96 : Spectre d'absorption UV-visible du complexe [Cu(no1th2tha)] à pH 5,5 et température ambiante (A) et spectre RPE enregistré dans un mélange DMF/eau (1:1) à 130K (B)

Le spectre est composé de quatre raies à bas champs et d'une raie centrale à haut champ vers 3400 G. Les valeurs de g_x et g_y sont égales à 2,036 et 2,084 tandis que g_z prend la valeur de 2,228.

Complexe	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
[Cu(no1th2tha)]	2,036	2,084	2,228	24	35	164

Tableau 39 : Paramètres RPE obtenus après simulation (A_i donnés en 10^{-4} cm^{-1})

Aux vues des résultats obtenus par UV-visible et RPE, il est possible d'émettre l'hypothèse que le complexe [Cu(no1th2tha)] est dans une géométrie similaire à celle du complexe [Cu(no3th)]²⁺ en solution, c'est-à-dire une géométrie octaédrique.

5. Caractérisations des complexes [M^{II}(no3tha)]⁻

- a. Structures cristallographiques des complexes [M^{II}(Hno3tha)] obtenues par diffraction des rayons X

Des monocristaux analysables par diffraction des rayons X des complexes mononucléaires sont obtenus après évaporation lente d'une solution aqueuse. Les structures cristallographiques des

deux complexes ($M = \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$) sont représentées ci-dessous (**Figure 97**) et les données expérimentales sont répertoriées dans les **Tableau 40** et **Tableau 41**.

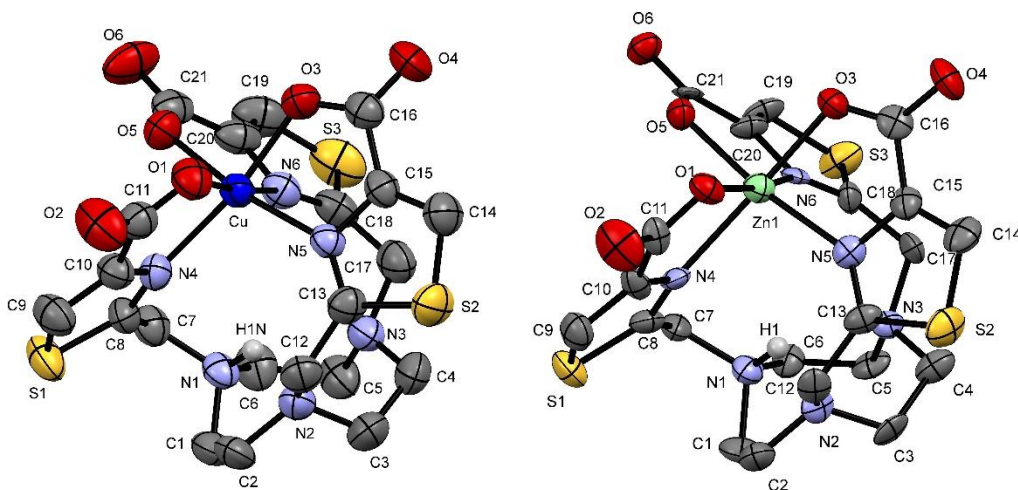


Figure 97 : Structure cristallographique des complexes $[\text{M}(\text{Hno3tha})]$ obtenue par DRX. Les atomes d'hydrogène (hormis celui positionné sur l'atome N1) et les contre-ions perchlorate sont omis pour des raisons de clarté

[Cu(Hno3tha)]			
Distances (Å)			
N(4)-Cu(1)	2,087(2)	O(1)-Cu(1)	2,309(2)
N(5)-Cu(1)	2,066(2)	O(3)-Cu(1)	1,984(2)
N(6)-Cu(1)	2,430(2)	O(5)-Cu(1)	1,981(2)
Angles (°)			
O(5)-Cu(1)-O(3)	89,36(9)	O(3)-Cu(1)-O(1)	92,92(8)
O(5)-Cu(1)-N(5)	170,40(9)	N(5)-Cu(1)-O(1)	85,88(9)
O(3)-Cu(1)-N(5)	82,16(9)	N(4)-Cu(1)-O(1)	76,67(9)
O(5)-Cu(1)-N(4)	86,15(9)	O(5)-Cu(1)-N(6)	76,33(9)
O(3)-Cu(1)-N(4)	167,83(9)	O(3)-Cu(1)-N(6)	83,89(9)
N(5)-Cu(1)-N(4)	103,04(9)	N(5)-Cu(1)-N(6)	98,21(9)
O(5)-Cu(1)-O(1)	99,08(9)	N(4)-Cu(1)-N(6)	105,95(9)
O(1)-Cu(1)-N(6)	174,39(8)		

Tableau 40 : Données structurales du complexe $[\text{Cu}(\text{Hno3tha})]$ obtenues expérimentalement

Le complexe $[\text{Cu}(\text{Hno3tha})]$ cristallise dans le groupe d'espace P-1 et est présent sous la forme de l'énantiomère $\Delta(\delta\delta\delta)$ à l'état solide. La sphère de coordination du métal est de type $\text{CuN}_2\text{O}_2\text{N}'_1\text{O}'_1$ dans laquelle les atomes N4, N5, O3 et O5 ont des distances par rapport au cation métallique proches de 2,0 Å et les atomes N6 et O1 positionnés en *trans*, sont distants d'environ 2,4 Å du métal mettent en évidence la distorsion de type Jahn-Teller. Les atomes N4, N5, O3 et O5 définissent un plan équatorial dont le Cu^{2+} est situé à 0,067 Å. Les atomes O1 et N6 positionnés en positions apicales, forment avec le Cu^{2+} un angle de 174,39° qui est très proche

de 180° pour une géométrie octaédrique. L'environnement géométrique autour du centre métallique peut donc être défini comme un octaèdre déformé.

Le complexe [Zn(Hno3tha)] est isostructural au complexe [Cu(Hno3tha)] et cristallise sous le groupe d'espace centro-symétrique P21/n. L'introduction de trois bras méthylthiazole acide entraîne également avec le Zn²⁺ la formation d'un complexe exo-cyclique où le cation métallique n'est pas complexé par le macrocycle. La sphère de coordination du cation Zn²⁺ peut également être décrite comme un octaèdre déformé. En effet, les atomes N4, N6, O1 et O3 décrivent un plan de l'octaèdre où le cation métallique est distant de 0,057 Å. Les angles N(6)-Zn-O(3) et O(1)-Zn(1)-O(3) présentent des valeurs de 89,42 et 91,59°, tandis qu'une légère déformation est présente autour des angles N(6)-Zn(1)-N(4) et N(4)-Zn(1)-O(1) qui ont respectivement des valeurs de 101,52 et 77,76°. Les atomes O5 et N5 positionnés en position apicale affichent des distances respectives de 2,069 et 2,233 Å par rapport au cation métallique et l'angle N(5)-Zn(1)-O(5) avec une valeur de 175,0° est quasiment parfait. Tous ces facteurs permettent d'affirmer que le centre métallique est bien dans une géométrie octaédrique légèrement déformée.

[Zn(Hno3tha)]			
Distances (Å)			
N(4)-Zn(1)	2,284(7)	O(1)-Zn(1)	2,062(6)
N(5)-Zn(1)	2,233(7)	O(3)-Zn(1)	2,057(7)
N(6)-Zn(1)	2,190(7)	O(5)-Zn(1)	2,069(6)
Angles (°)			
O(3)-Zn(1)-O(1)	91,6(3)	O(5)-Zn(1)-N(5)	175,0(3)
O(3)-Zn(1)-O(5)	96,2(3)	N(6)-Zn(1)-N(5)	100,3(3)
O(1)-Zn(1)-O(5)	92,5(3)	O(3)-Zn(1)-N(4)	169,0(3)
O(3)-Zn(1)-N(6)	89,4(3)	O(1)-Zn(1)-N(4)	77,8(3)
O(1)-Zn(1)-N(6)	171,8(3)	O(5)-Zn(1)-N(4)	87,1(3)
O(5)-Zn(1)-N(6)	79,3(3)	N(6)-Zn(1)-N(4)	101,5(3)
O(3)-Zn(1)-N(5)	78,9(3)	N(5)-Zn(1)-N(4)	97,8(3)
O(1)-Zn(1)-N(5)	87,8(3)		

Tableau 41 : Données structurales du complexe [Zn(Hno3tha)] obtenues expérimentalement

b. Caractérisation RMN du complexe [Zn(no3tha)]⁻

L'analyse RMN du complexe [Zn(no3tha)]⁻ est effectuée dans le D₂O à pD = 7,3 et à température ambiante et est représentée ci-après (**Figure 98**).

Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec les trois autres ligands. Lors de la complexation les protons des CH₂ du macrocycle deviennent diastéréotopiques, ce qui se traduit par un

éclatement du signal vers 3,0 ppm. On note un léger blindage de 0,3 ppm des protons portés par les atomes de carbone en position α du soufre.

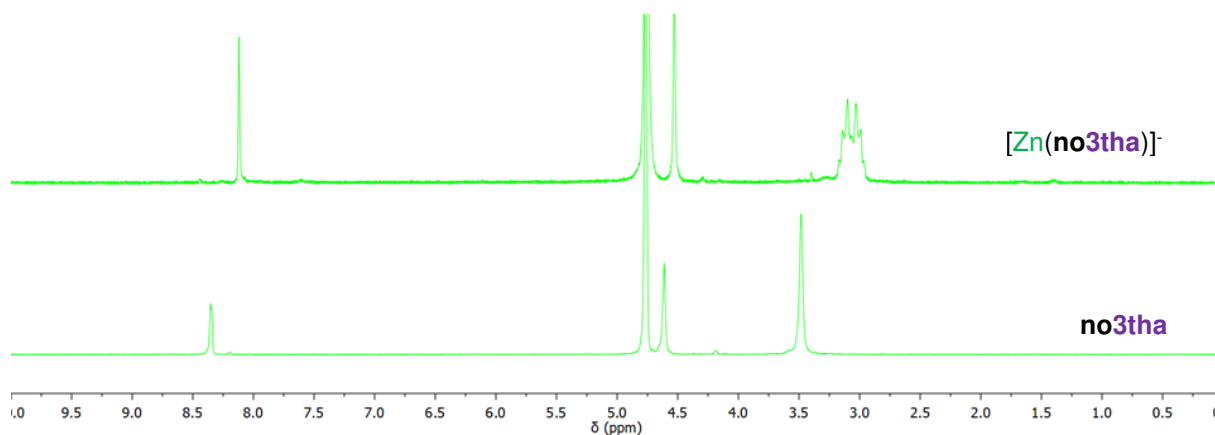


Figure 98 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O , pD 7,3) du complexe $[\text{Zn}(\text{no3tha})]^-$ (en haut) et du ligand **no3tha** (en bas)

c. Caractérisations UV-visible et RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$

Le complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ possède une bande large d'absorption comprise entre 500 et 900nm avec un λ_{max} égal à 700 nm dans l'eau à pH 5,5 (**Figure 99**). Cet effet bathochrome, par rapport aux autres complexes, s'explique par le mode de coordination du complexe. En effet, la sphère de coordination du cation métallique est composée de trois atomes d'azote et trois atomes d'oxygène, ce qui entraîne une augmentation du champ de ligand et donc un déplacement de la longueur d'onde vers des valeurs supérieures.

Le spectre RPE du complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$, enregistré dans une solution de NaClO_4 1M à 130K, est représenté (**Figure 99**) et les valeurs des paramètres g et A_i obtenues après simulation sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 42**). Seules trois des quatre raies sont observables à bas champ et un léger épaulement est distinguable à haut champ pour la quatrième raie appartenant au cation métallique. L'inégalité $g_z > (g_x + g_y)/2$ est encore une fois respectée ce qui est le résultat d'une géométrie octaédrale-rhombique avec une élongation des liaisons axiales. Ce type de géométrie est en accord avec les résultats obtenus en solution par UV-visible et à l'état solide par diffraction des rayons X.

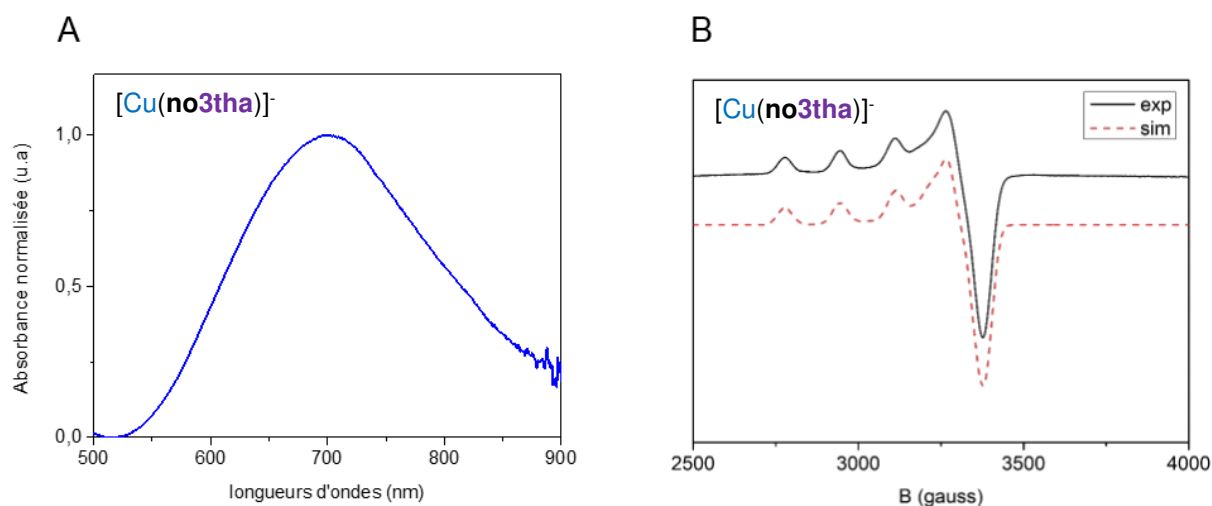


Figure 99 : Spectre d'absorption UV-visible du complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ à pH 5,5 et température ambiante (A) et spectre RPE enregistré dans H_2O , NaClO_4 1M à 130K (B)

Complexe	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
$[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$	2,043	2,078	2,244	8	23	175

Tableau 42 : Paramètres RPE obtenus après simulation. A_i donnés en 10^{-4} cm^{-1}

IV. Synthèses et caractérisations structurales de complexes Cu_2L_3 (L = Hno2th1tha et $\text{H}_3\text{no3tha}$)

Afin de comprendre le mode de coordination des ligands lors de la formation de complexes trinocléaires, des tentatives de synthèse des complexes du Cu^{2+} avec les ligands Hno2th1tha , $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ et $\text{H}_3\text{no3tha}$ en utilisant 1,5 équivalents ont été réalisées. Cependant les purifications réalisées par HPLC n'ont pas permis d'isoler les complexes du fait de leur faible stabilité dans les conditions de l'analyse. Par chance, des monocristaux analysables par diffraction des rayons X ont pu être obtenus avec les ligands Hno2th1tha et $\text{H}_3\text{no3tha}$ par simple évaporation lente d'une solution aqueuse. Les résultats obtenus sont présentés dans cette partie.

a. Structure cristallographique du complexe $[\text{Cu}_3(\text{no2th1tha})_2]$ obtenue par diffraction des rayons X

Des monocristaux bleus du complexe formé avec le ligand Hno2th1tha ont été obtenus après évaporation lente d'une solution aqueuse. La structure par diffraction aux rayons X révèle une espèce trinuéclaire composée de deux ligands et de trois atomes de cuivre situés dans deux environnements géométriques différents (**Figure 100**). Les atomes de cuivre contenus dans la cavité macrocyclique sont pentacoordinés par les trois atomes azote du macrocycle et deux des bras méthylthiazole. Le polyèdre de coordination autour du cuivre est de type pyramidal à base carrée. Les atomes N1, N2, N4 et N5 représentent la base de la pyramide et l'atome N3 du macrocyclique en position apicale représente le sommet de la pyramide. Les distances N(n)-Cu(1) (avec n = 1,2,4 et 5) sont comprises entre 1,933 et 2,057 Å (**Tableau 43**). Le métal est situé à 0,218 Å au-dessus du plan de la pyramide à base carrée et la distance Cu-N(3) est plus grande que les autres avec une valeur de 2,223 Å. Les angles N(3)-N(1)-Cu(1) et N(3)-N(2)-Cu(1) sont respectivement 50,08 et 50,01° alors que les angles N(3)-N(4)-Cu(1) et N(3)-N(5)-Cu(1) sont plus faibles avec des valeurs de 35,93 et 40,77°. La somme des angles est de 176,79° et les différences d'angles et de liaisons permettent de confirmer la géométrie déformée autour du cuivre.

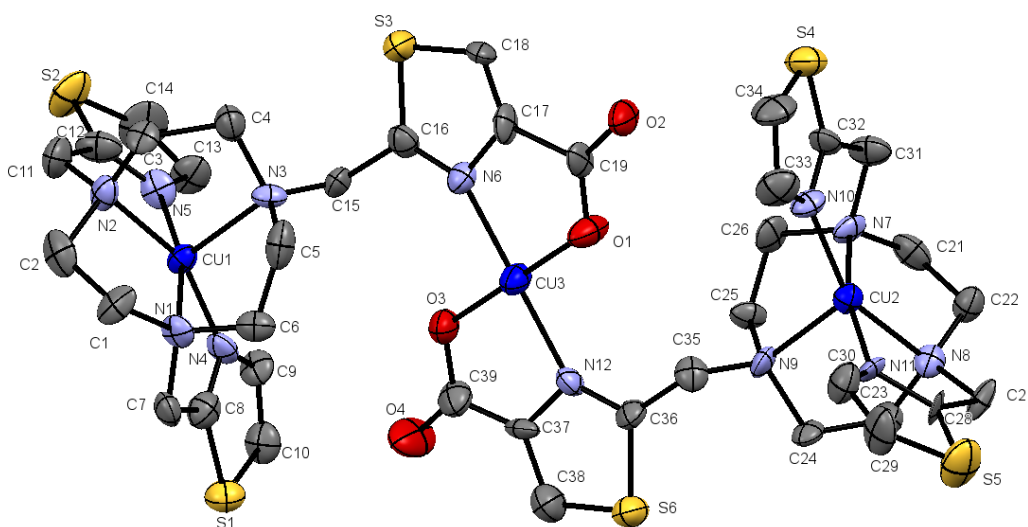


Figure 100 : Structure cristallographique du complexe $[\text{Cu}_3(\text{no2th1tha})_2]$ obtenue par DRX. Les atomes d'hydrogène et les contre-ions perchlorate sont omis pour des raisons de clarté

Le troisième atome de cuivre est dans une géométrie pseudo-octaédrique hexacoordiné par les deux atomes d'azote ainsi que deux oxygène des fonctions acide carboxylique et deux oxygène

des anions perchlorate positionnés en *trans* par rapport au métal. La nature des groupements coordinants induit un mode de coordination de type $\text{CuN}_2\text{O}_2\text{O}_2'$. Les atomes N6, O1, N12 et O3 représentent le plan de l'octaèdre qui contient le cation métallique. Les distances N(6)-Cu(2) et N(12)-Cu(2) sont de l'ordre de 2,0 Å et sont donc relativement plus élevées que celles entre les atomes d'oxygène O1 et O3 avec le cuivre qui sont inférieures à 2,0 Å. Les deux anions perchlorate qui sont positionnés en *trans* du cuivre coordinent le cation métallique avec un atome d'oxygène situés à 2,702 Å du cation métallique. Cette élongation de liaison autour de l'axe z est une fois de plus la signature d'un complexe octaédrique possédant une distorsion de Jahn-Teller.

[Cu ₃ (no2th1tha) ₂]			
Distances (Å)			
N(1)-Cu(1)	2,054(6)	N(4)-Cu(1)	1,933(6)
N(2)-Cu(1)	2,057(6)	N(5)-Cu(1)	1,966(6)
N(3)-Cu(1)	2,223(7)	N(6)-Cu(2)	1,963(6)
N(12)-Cu(2)	1,963(6)	O(1)-Cu(2)	1,914(5)
O(3)-Cu(2)	1,934(5)	O(13)-Cu(2)	2,702(5)
O(17)-Cu(6)	2,702(5)		

Tableau 43 : Données structurales du complexe [Cu₃(no2th1tha)₂] obtenues expérimentalement

- b. Structure cristallographique du complexe [Cu₃(no3tha)₂(H₂O)₂] obtenue par diffraction des rayons X

Une évaporation lente d'une solution aqueuse du complexe formé à partir du ligand H₃no3tha en utilisant 1,5 équivalents de sel de perchlorate de cuivre, conduit à la formation de cristaux bleus de qualité suffisante pour une analyse par diffraction des rayons X (**Figure 101**). L'espèce qui cristallise est une espèce trinuéclaire légèrement différente de celle obtenue précédemment avec le ligand Hno2th1tha.

Dans ce complexe, les atomes de cuivre présents dans la cavité macrocyclique sont hexacoordinés ainsi que celui ponté par deux bras méthylthiazole acide. Le premier cation métallique est coordiné par les trois atomes d'azote du macrocycle, deux des bras méthylthiazole acide et une molécule d'eau est également coordonnée au cation. Ici, les fonctions acide carboxylique des bras méthylthiazole acide ne rentrent pas dans la coordination de l'atome de cuivre présent dans la cavité macrocyclique. Les distances correspondant au plan de l'octaèdre O(7)-Cu et N(n)-Cu(1) (avec n = 1,2,3 et 5) sont comprises entre 1,951 et 2,060 Å. Les deux positions apicales sont occupées par l'atome d'azote N5 d'un bras méthylthiazole acide distant de 2,692 Å et d'un atome d'azote N3 du macrocycle distant de 2,329 Å du cation métallique.

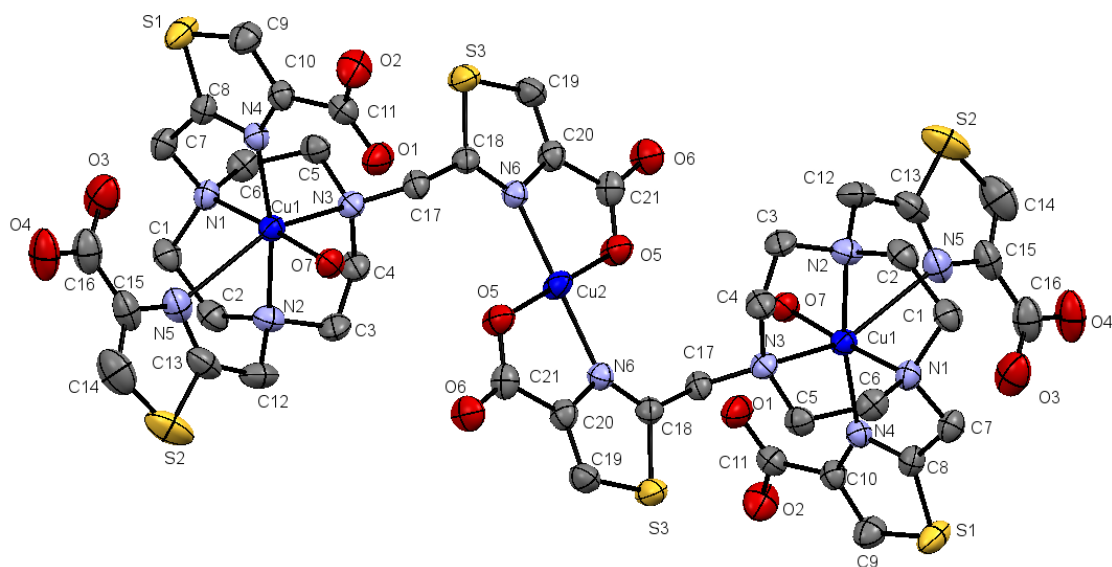


Figure 101 : Structure cristallographique du complexe $[\text{Cu}_3(\text{no3tha})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ obtenue par DRX. Les atomes d'hydrogène et les contre-ions perchlorate sont omis pour des raisons de clarté

Le second centre métallique est également hexacoordiné, avec une coordination par deux atomes d'azote et deux atomes d'oxygène des bras méthylthiazole acide et deux atomes d'oxygène de deux anions perchlorate. Les atomes N6, O5 sont équivalents par symétrie pour les deux bras méthylthiazole acide et représentent le plan de l'octaèdre. Les anions perchlorate coordinants sont placés en *trans* par rapport au cation métallique avec un angle parfait de 180° et sont distant de 2,745 Å.

$[\text{Cu}_3(\text{no3tha})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$			
Distances (Å)			
N(1)-Cu(1)	2,026(4)	N(4)-Cu(1)	2,042(4)
N(2)-Cu(1)	2,060(4)	O(7)-Cu(1)	1,952(3)
N(3)-Cu(1)	2,330(4)	N(5)-Cu(1)	2,692(4)
N(6)-Cu(2)	2,015(4)	O(5)-Cu(2)	1,915(4)

Tableau 44 : Données structurales du complexe $[\text{Cu}_3(\text{no3tha})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ obtenues expérimentalement

Ces études à l'état solide nous ont permis de comprendre le mode de coordination des espèces trinuécléaires décelées en potentiométries et mettent en avant le pouvoir complexant des fonctions acide présentes sur les bras méthylthiazole.

V. Cinétique de métallation et de dissociation des complexes

1. Vitesse de formation des complexes

Les cinétiques de métallation sont étudiées à pH 5,5 et température ambiante, qui sont des conditions classiques de radiomarquage. Les cinétiques de métallation des ligands **no3th**, **Hno2th1tha**, **H₂no1th2tha** et **H₃no3tha** sont étudiées par spectroscopie UV-visible en se plaçant au λ_{\max} des complexes mesurés lors de leur caractérisation dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous (**Figure 102**).

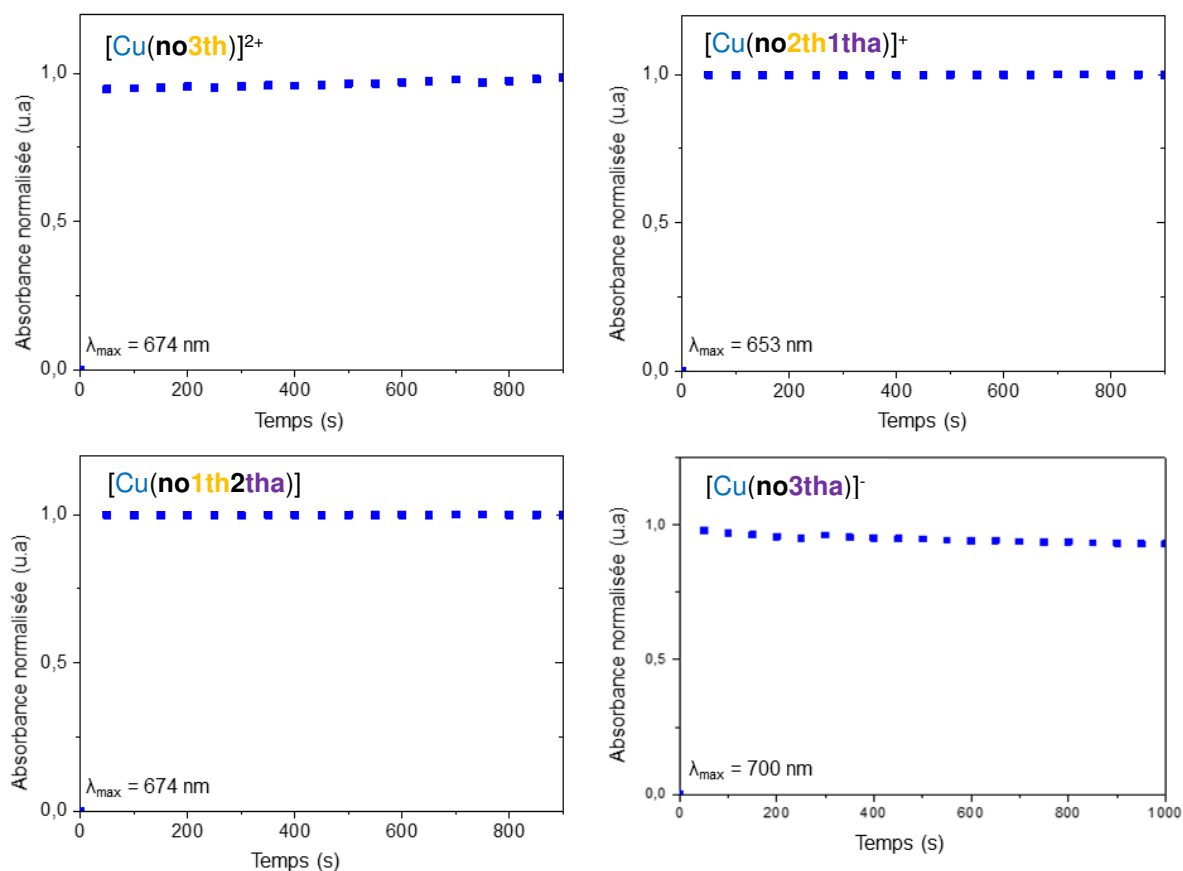


Figure 102 : Cinétique de formation des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ étudiée à pH 5,5 et température ambiante, $[\text{L}] = [\text{Cu}^{2+}] = 2,5 \text{ mM}$

Les graphes montrent que les ligands complexent de façon efficace le cation Cu^{2+} dans les conditions usuelles de radiomarquage (pH 5,5, 25°C) puisque dès l'ajout d'un équivalent de cuivre l'absorbance maximale du complexe est atteinte et ne varie pas avec le temps. Ceci confirme la tendance déjà observée lors de la mise en œuvre des études potentiométriques.

2. Cinétique de dissociation des complexes en milieu HCl

Les cinétiques de dissociation des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ en milieu acide chlorhydrique 1M et 5M sont étudiées dans des conditions de pseudo-premier ordre en solution aqueuse à 25,0°C et 95°C en suivant l'abaissement de l'intensité de la bande d-d des complexes. La cinétique de démétallation du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ dans un milieu HCl 5M à 95°C est présentée ci-dessous à titre d'exemple (**Figure 103**). Les valeurs de $t_{1/2}$ obtenues pour tous les complexes sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 45**).

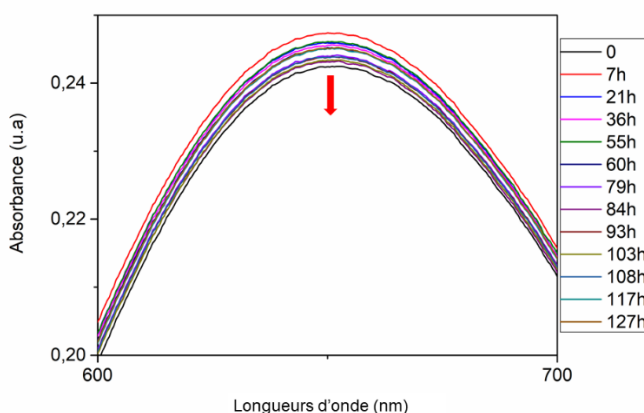


Figure 103 : Suivi de la cinétique de dissociation du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ dans un mélange HCl 5M à 95°C

La cinétique de dissociation du complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$, en milieu HCl est très rapide (< 1 min), quel que soit la concentration utilisée. Le complexe formé à partir du ligand $\text{H}_3\text{no3tha}$ n'est pas stable en milieu compétiteur. Les études réalisées sur les complexes $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ montrent qu'à température ambiante et pour une concentration en acide chlorhydrique 1M le complexe reste stable au cours du temps. En revanche, pour des concentrations en acide chlorhydrique 5M, une dissociation totale et immédiate du complexe est observée.

Les cinétiques de dissociation du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ dans des milieux HCl 1M et 5M démontrent que le complexe est inerte à température ambiante puisqu'aucunes différences dans

les spectres UV ne sont notables au cours du temps. En milieu acide chlorhydrique 5M et à 95 °C, le complexe se dissocie avec un temps de demi-vie de 50h.

Complexes	[Cu(no3th)] ²⁺	[Cu(no2th1tha)] ⁺	[Cu(no1th2tha)]	[Cu(no3tha)] ⁻	[Cu(no2th)] ²⁺
λ _{max} (nm)	674	653	674	700	620 ^[137]
1M HCl, 25°C	inerte	inerte	inerte	< 1 min	-
5M HCl, 25°C	inerte	inerte	< 1 min	< 1 min	< 1 min ^[137]
5M HCl, 95 °C	55h ^[138]	50h	< 1 min	< 1 min	-

Tableau 45 : Temps de demi-vie des complexes en milieu acide

Le complexe [Cu(no2th1tha)]⁺ conduit, après évaporation lente d'une solution du complexe en milieu acide (HCl 1M, pH < 1), à la formation de monocristaux de qualité suffisante pour une analyse par diffraction des rayons X. La structure obtenue (**Figure 104**) révèle un complexe de cuivre pentacoordiné par quatre atome d'azote N1, N2, N3 et N5, et un ion chlorure Cl1. Les distances des liaisons sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 46**).

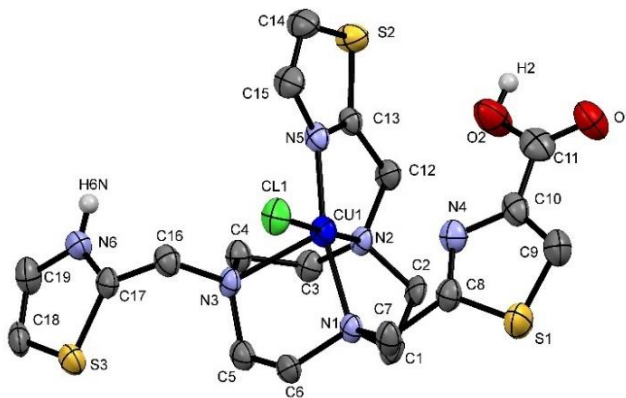


Figure 104 : Structure cristallographique du complexe [Cu(H₂no2th1tha)(Cl)] obtenue par DRX. Les atomes d'hydrogène, les contre-ions chlorure ainsi que les molécules d'eau sont omis pour des raisons de clarté

Cette structure de type *endo*, montre qu'un atome d'azote d'un bras méthylthiazole est protoné à pH acide et par conséquent n'entre pas dans la coordination du métal. Le cation métallique adopte une géométrie pyramidale à base carrée distordue. Les atomes N1, N2, N5 et Cl1 forment le plan basal de la pyramide dont le Cu²⁺ est situé à une distance de 0,048 Å. L'atome N4 du bras méthylthiazole acide, situé à 2,819 Å du cation métallique, n'entre également pas dans la coordination du métal à l'état solide mais peut être impliqué dans la sphère de coordination du métal en solution. L'atome d'azote du macrocycle N3 qui est placé sur le sommet de la pyramide à base carrée est distant de 2,356 Å du cation Cu²⁺. Cette structure permet d'expliquer un

mécanisme plausible de la cinétique de dissociation du complexe. Elle montre sans aucun doute que même à pH très acide et malgré la protonation d'un bras méthylthiazole acide, le cation métallique est toujours complexé par le macrocyclique et il n'y a donc pas de dissociation du complexe. Ce résultat témoigne d'une grande inertie du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$.

$[\text{Cu}(\text{no2th1tha})(\text{Cl})(\text{H})]$		
Distance (Å)		
N(1)-Cu(1)		2,038(3)
N(2)-Cu(1)		2,088(3)
N(3)-Cu(1)		2,356(3)
N(5)-Cu(1)		1,966(3)
Cl(1)-Cu(1)		2,2668(11)

Tableau 46 : Distance des liaisons engagées dans le polyèdre de coordination du complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})(\text{Cl})(\text{H})]$ obtenues expérimentalement

Enfin, le complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ est le plus stable des quatre étudiés. Les études réalisées dans des conditions HCl 1M et 5M à température ambiante ne permettent pas de déterminer de temps de demi-vie car aucun changement n'est notable au niveau de l'abaissement de la bande d'absorption du complexe à 650nm après 15 jours. Des résultats similaires ont été obtenus par M. Le Fur au laboratoire sur le complexe formé avec le **no2th** pour une concentration en HCl de 2M. En revanche, les études réalisées dans un milieu HCl 5M à température ambiante ont montré que le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th})]^{2+}$ se démetallait instantanément ^[137].

En conclusion, une *N*-fonctionnalisation supplémentaire par un groupement méthylthiazole (**no3th**) ou méthylthiazole acide (**Hno2th1tha**) permet d'augmenter l'inertie cinétique des complexes de Cu^{2+} par rapport au **no2th**. En revanche, plus le nombre de fonctions méthylthiazole acide sont présentes sur le macrocycle, plus l'inertie cinétique des complexes est affectée. Ce constat peut être corrélé aux calculs DFT et aux structures des complexes $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]$, qui présentent deux modes de coordination différents. Lorsque le cation métallique n'est pas complexé par les atomes d'azote du macrocycle, ce dernier perd en stabilité. De plus, généralement les complexes présentant un mode de coordination de type CuN_6 possèdent de meilleurs inerties cinétiques que leurs analogues de type CuN_3O_3 , ce qui avait déjà été montré dans le chapitre I.

VI. Stabilité Electrochimique

L'étude par voltamétrie cyclique des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ est réalisée afin d'évaluer le comportement des complexes sous l'effet d'une réduction du Cu(II) en Cu(I). Si le complexe possède un comportement réversible, l'électrolyse est effectuée et l'étude de la stabilité du complexe sous sa forme réduite est évaluée. Lors de l'électro-génération de l'espèce réduite Cu(I) par électrolyse, le complexe peut perdre en stabilité et se dissocier, comme vu précédemment avec le complexe $[\text{Cu}(\text{te1th})]^{2+}$ par exemple ^[136]. Cette mesure permet de s'assurer que le complexe de Cu(I) est stable sur une échelle de temps plus longue.

1. Voltamétrie cyclique avant électrolyse

Les voltamogrammes des quatre complexes sont enregistrés dans l'eau à pH 6,8, en utilisant LiClO_4 1M comme sel de fond. Les études sont effectuées à une concentration de 1mM pour les complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$. Le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, est quant à lui étudié à une concentration de 3mM. Les voltamogrammes sont représentés ci-après (**Figure 105**) et les valeurs des potentiels sont répertoriées dans le **Tableau 47**.

Le voltamogramme de l'espèce $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ est caractéristique d'un système quasi-réversible avec des pics espacés de 0,07V. Le pic de réduction est situé à un potentiel de -0,43V (vs. Ag/AgCl) et un second pic d'oxydation lors du balayage retour est placé à -0,36V ce qui confère au complexe un potentiel de demi-vague $E_{1/2} = -0,40\text{V}$. Ces valeurs diffèrent de celles obtenues pour le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th})]^{2+}$ qui présente un potentiel de réduction à -0,51V (vs. Ag/AgCl) ^[137]. Cette différence s'explique par l'environnement différent autour du cation métallique des deux complexes. Les complexes $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ et $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ adoptent également un comportement quasi-réversible électrochimiquement. Les deux complexes présentent des pics de réduction à respectivement -0,32 et -0,31V. Les pics d'oxydation des deux complexes se situent à -0,24 et -0,20V, soit un écart de pic de 0,08 et 0,11V. Le complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$, dont le mode de coordination est de type $\text{CuN}_2\text{O}_2\text{N}'_1\text{O}'_1$ possède un pic de réduction bien plus bas que les trois autres complexes avec une valeur de -0,47V. Le complexe possède un pic de faible intensité d'oxydation de l'espèce cuivreuse générée à -0,27V soit un écart de pic de -0,20V. Cette signature électrochimique est caractéristique d'un système irréversible.

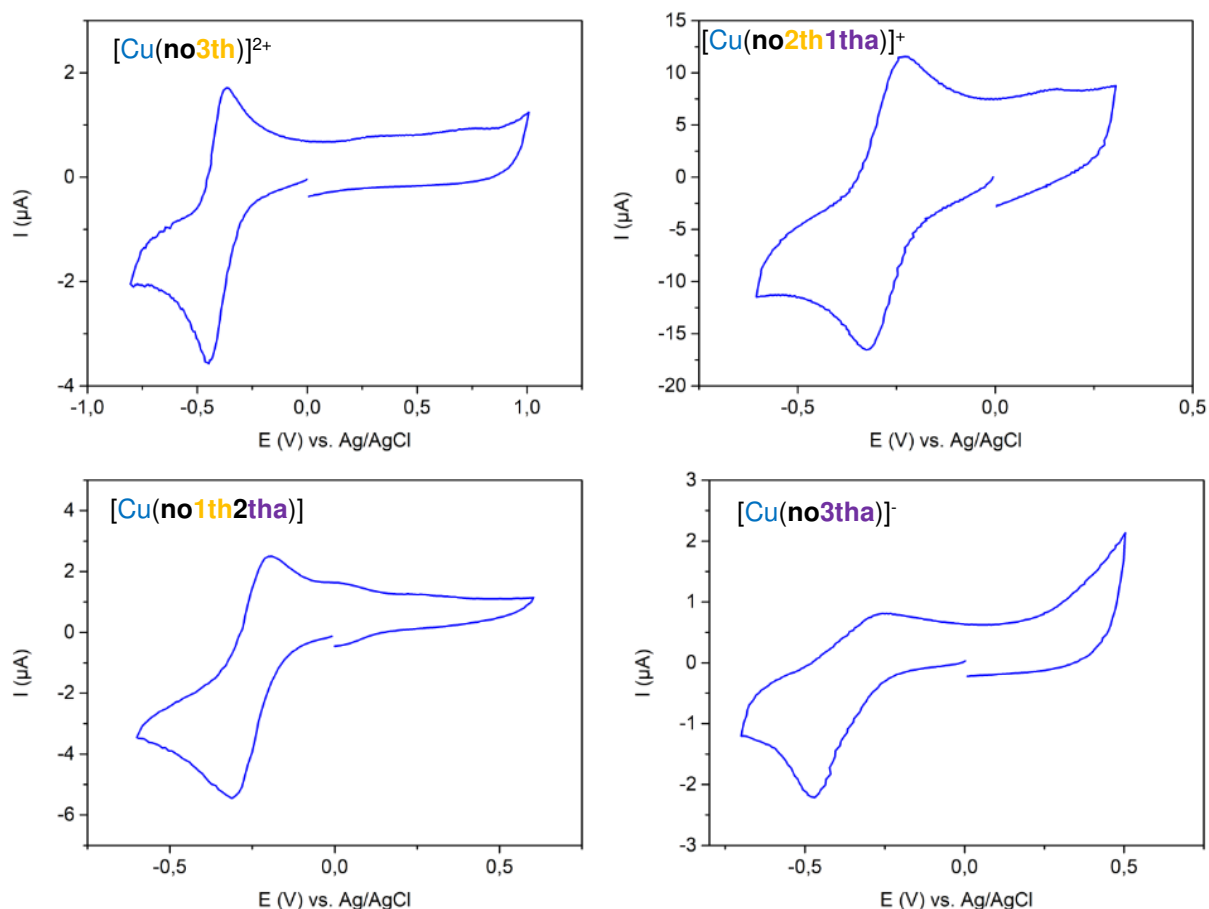


Figure 105 : Voltamogrammes cycliques des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ enregistrés dans l'eau à pH 6,8 et LiClO_4 1M vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

	$[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$	$[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$	$[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$	$[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$
E_{pc} (V)	-0,43	-0,32	-0,31	-0,47
E_{pa} (V)	-0,36	-0,23	-0,20	-0,27
$E_{1/2}$ (V)	-0,40	-0,27	-0,26	-0,26
ΔE (V)	0,07	0,09	0,11	0,20
réversibilité	Quasi-réversible	Quasi-réversible	Quasi-réversible	irréversible

Tableau 47 : Caractéristiques électrochimiques des complexes complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$

2. Voltamétrie cyclique après électrolyse

Comme les complexes possèdent des potentiels de réduction supérieurs à $-0,4\text{V}$ ils sont potentiellement réductibles lors d'études in vivo. L'électrolyse des quatre complexes est par

conséquent effectuée afin d'évaluer la stabilité des complexes de Cu(I) générés. Cette étude permet de mimer une éventuelle réduction de futurs radiopharmaceutiques en milieu biologique. L'électrolyse est réalisée en appliquant des potentiels respectifs de -0,6V pour les complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$, et de -0,5V pour les complexes $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ et $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]^-$. Les voltamogrammes sont représentés ci-dessous (**Figure 106**) et les valeurs des potentiels sont répertoriées dans **Tableau 48**.

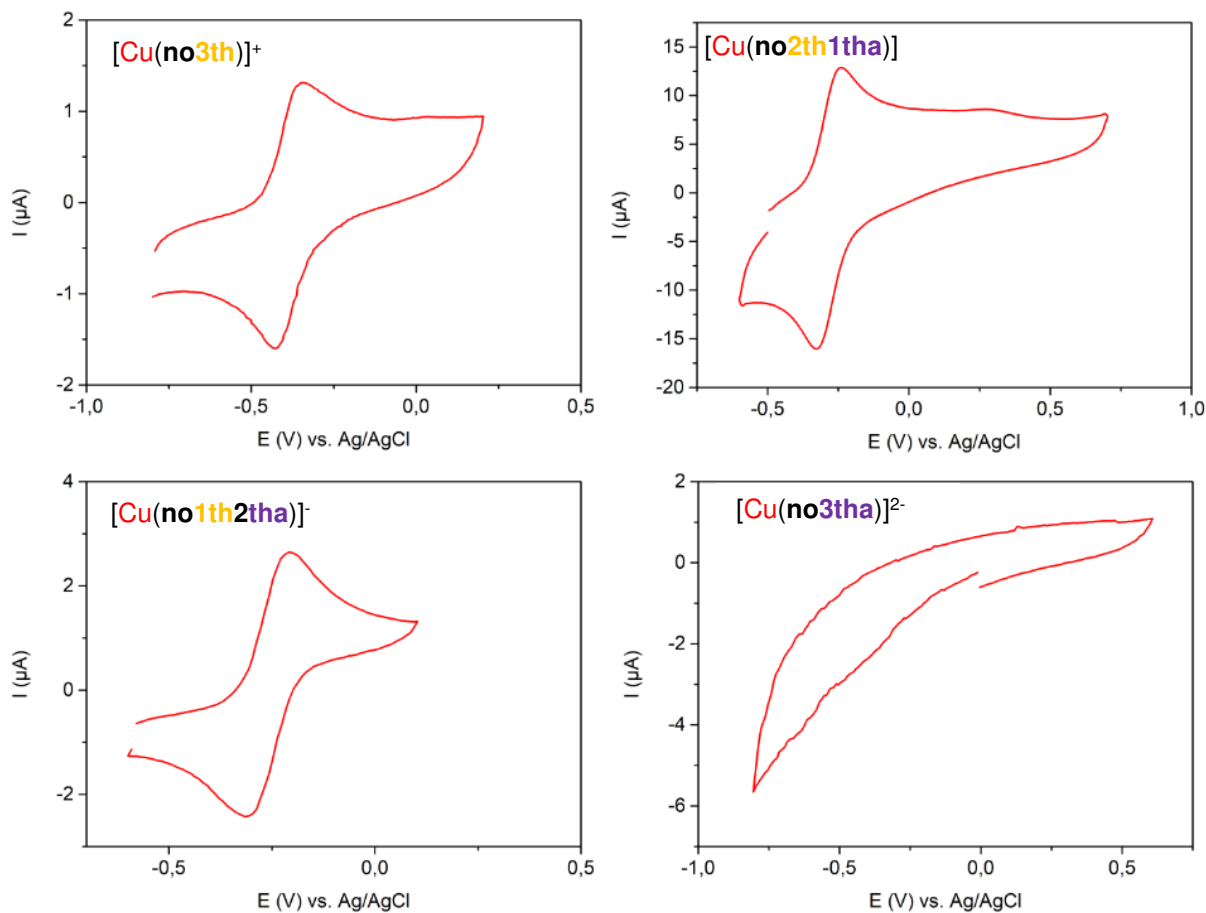


Figure 106 : Voltamogrammes cycliques des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]^-$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^{2-}$ enregistrés dans l'eau à pH 6,8 et LiClO_4 1M vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

Après électrolyse du complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$, aucun signal correspondant à la réoxydation du Cu(I) en Cu(II) n'est observé sur le voltamogramme. Ce phénomène s'explique par une dissociation complète du complexe lors du processus d'électrolyse.

Les complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]^-$ présentent toujours un comportement quasi-réversible électrochimiquement.

	$[\text{Cu}(\text{no3th})]^+$	$[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]$	$[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]^-$	$[\text{Cu}(\text{no3tha})]^{2-}$
E_{pc} (V)	-0,43	-0,33	-0,32	-
E_{pa} (V)	-0,34	-0,24	-0,21	-
$E_{1/2}$ (V)	-0,40	-0,28	-0,26	-
ΔE (V)	0,08	0,09	0,11	-
réversibilité	Quasi-réversible	Quasi-réversible	Quasi-réversible	irréversible

Tableau 48 : Caractéristiques électrochimiques des complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^+$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]$, $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]^-$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^{2-}$

3. Conclusion de l'étude par voltamétrie cyclique

Les études par voltamétrie cyclique mettent en avant la stabilité électrochimique des complexes formés avec les ligands **no3th**, **Hno2th1tha** et **H₂no1th2tha**.

En outre, l'étude réalisée sur le complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ démontrent l'importance de la coordination du cation par le macrocycle pour l'élaboration de complexes stables.

Enfin, lors d'application en milieu biologique, même avec des potentiels de réduction dans la fenêtre d'action des systèmes biologiques réducteurs, il est probable que les complexes formés avec les ligands **no3th**, **Hno2th1tha** et **H₂no1th2tha** restent stables au cours du temps si l'on s'appuie sur les voltamogrammes obtenus.

Conclusion du chapitre III

Pour donner suite à des premiers travaux prometteurs obtenus sur un tacn di-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylthiazole (**no2th**), nous avons décidé d'étudier l'influence d'une nouvelle fonctionnalisation par un bras méthylthiazole mais aussi en introduisant des bras méthylthiazole comprenant une fonction acide carboxylique positionnée sur un atome de carbone en α de l'atome d'azote. Quatre nouveaux ligands ont ainsi été ciblés afin de vérifier leur potentielle utilisation pour une application in vivo en médecine nucléaire pour le radiomarquage au ^{64}Cu . Nous avons donc étudié les propriétés thermodynamiques, l'inertie cinétique ainsi que la stabilité électrochimique des complexes de cuivre.

Les ligands **no3th** et $\text{H}_3\text{no3tha}$, tacn tri-*N*-fonctionnalisés par trois bras méthylthiazole ou trois groupements méthylthiazole acide, ont été obtenus avec de très bon rendements. La voie de synthèse à partir du tacn orthoamide a permis d'obtenir les ligands **Hno2th1tha** et $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ avec de très bons rendements globaux malgré un nombre d'étapes important.

Les études potentiométriques ont montré qu'un nombre trop important de bras méthylthiazole acide avait un effet néfaste sur la stabilité thermodynamique des complexes de Cu^{2+} et entraînait la formation de complexes trinucéaires. Ce constat a également pu être prouvé par la caractérisation des complexes trinucéaires à l'état solide. Avec une valeur de pCu égale à 17,34 le **Hno2th1tha** est un meilleur chélatant du Cu^{2+} par rapport au $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ ($\text{pCu} = 15,40$) et au $\text{H}_3\text{no3tha}$ ($\text{pCu} = 14,04$). Ce dernier possède également une affinité similaire pour le cation que les ligands **no2th** ($\text{pCu} = 17,15$) et H_3nota ($\text{pCu} = 17,6$). De manière générale, les trois ligands possèdent une sélectivité intéressante pour le Cu^{2+} vis-à-vis du Zn^{2+} . Le ligand **Hno2th1tha** avec un $\Delta\text{pM} = 3,85$ possède des propriétés complexantes du même ordre de grandeur que les ligands **no2th** et H_3nota .

Les cinétiques de formation et de dissociation des complexes ont été étudiées par UV-visible. Il a ainsi été montré que la complexation du cation Cu^{2+} était très rapide à pH 5,5 et à température ambiante pour les quatre ligands. Ce résultat est très intéressant pour un futur radiomarquage au ^{64}Cu . Ensuite, les études des cinétiques de dissociation des complexes en milieu acide ont montré que le complexe $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$ et le complexe $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ sont très inertes car ils possèdent des temps de demi-vie de 55 et 50h respectivement dans un milieu HCl 5M à 90°C. En revanche, les complexes $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ et $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ ne sont pas stables dans les mêmes conditions.

Enfin, la stabilité des complexes vis-à-vis de la réduction a été déterminée par voltamétrie cyclique. Les complexes $[\text{Cu}(\text{no3th})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{no2th1tha})]^+$ et $[\text{Cu}(\text{no1th2tha})]$ possèdent un caractère quasi-réversible avec des potentiels de réduction de -0,43, - 0,32 et -0,31 V (vs Ag/AgCl). Ces potentiels ramenés vs. ENH se trouvent dans la fenêtre d'action des systèmes biologiques. Les études réalisées après électrolyse ont permis de montrer la stabilité des espèces réduites électrogénérées et témoignent de la stabilité des complexes. Seul le complexe $[\text{Cu}(\text{no3tha})]^-$ présente un caractère irréversible, après réduction par électrolyse montrant la démétallation.

Toutes ces études ont permis d'évaluer les potentialités des ligands pour la complexation du Cu^{2+} . Aux vues de tous les résultats il est possible de classer les ligands de la manière suivante pour une éventuelle utilisation pour une application en imagerie TEP :



Nous avons également montré que lors de la complexation du Cu^{2+} par le ligand **Hno2th1tha**, la fonction acide carboxylique n'était pas engagée dans la coordination du métal ce qui permettrait de l'utiliser pour réaliser une bioconjugaison sur une biomolécule d'intérêt pour une potentielle future application en imagerie TEP. En revanche le **no3th** ne possédant aucune amine libre sur le macrocycle, il est nécessaire de trouver comment rendre ce composé vectorisable.

Finalement, les résultats prometteurs obtenus par l'équipe du Dr. M. Bartholomä et notre équipe sur ces deux ligands, nous ont encouragés à poursuivre les études sur ces dérivés et à entamer une nouvelle collaboration en développant de nouveaux radiopharmaceutiques bioconjugués à base de tacn *N*-fonctionnalisés qui seront détaillés dans le prochain chapitre.

Chapitre IV : Synthèses et études de nouveaux
radiopharmaceutiques à base de tacn
bifonctionnels : Application pour le diagnostic des
cancers du sein et de la prostate

1 Les radiopharmaceutiques pour le diagnostic et la thérapie des cancers

Le nombre de nouveaux cas de cancers en 2017 s'élève à 399 500, dont 210 882 chez l'homme et 173 560 chez la femme, ce qui mène à environ 150 000 décès liés à cette maladie ^[141]. Chez l'homme, le cancer de la prostate (CaP) est le cancer masculin le plus abondant après le cancer des poumons. Chez la femme, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein (CaS) est de 59 968 en 2017 qui ont conduit à 11 883 décès. Le CaS représente, à lui seul, 18,2% des décès liés au cancer chez la femme et 8% de l'ensemble des décès tous sexes confondus. Très souvent, le décès des personnes atteintes du cancer est lié à un diagnostic trop tardif qui ne permet pas de mettre en place de traitement efficace. De fait, la très forte incidence et le haut taux de mortalité associés au cancer exhortent fortement les chercheurs à développer de nouvelles approches pour le diagnostic et la thérapie des cancers. Un diagnostic précoce de cette maladie par TEP rend possible une localisation très précise des métastases et une information moléculaire, ce qui peut permettre d'envisager une thérapie ciblée, une intervention chirurgicale ou encore un suivi de l'évolution du cancer après une thérapie.

Une cible très prometteuse pour le diagnostic ou la thérapie ciblée de ces cancers est la famille des récepteurs de la bombésine (BB). Il existe trois classes de récepteurs présents dans différents types de cancers (BB1, BB2 et BB3). Parmi ces trois types de récepteurs, le récepteur BB2 est surexprimé sur les cellules cancéreuses du cancer de la prostate, et est également présent dans 72 à 74% des cancers du sein ^[142]. Ce récepteur est par conséquent considéré comme une cible de choix pour le développement de radiopharmaceutiques pour le diagnostic et la thérapie de ces deux cancers.

I. La Bombésine et le récepteur BB2

La bombésine est un polypeptide constitué de 14 acides aminés. Ce peptide fut isolé pour la première fois en 1971 d'un amphibien, le sonneur à ventre de feu *Bombina bombina*, par A. Anastasi *et al.* ^[143]. Quelques années plus tard, T. J. Mc Donalds *et al.* ^[144] ont découvert le premier analogue de la bombésine, appelé GRP « gastrin releasing peptide » chez le mammifère, provenant des tissus de l'estomac du porc. Ces deux peptides représentés

ci-dessous, (**Figure 107**), bien que de tailles différentes, ont une grande similarité dans l'enchaînement des acides aminés de la partie C-terminale.

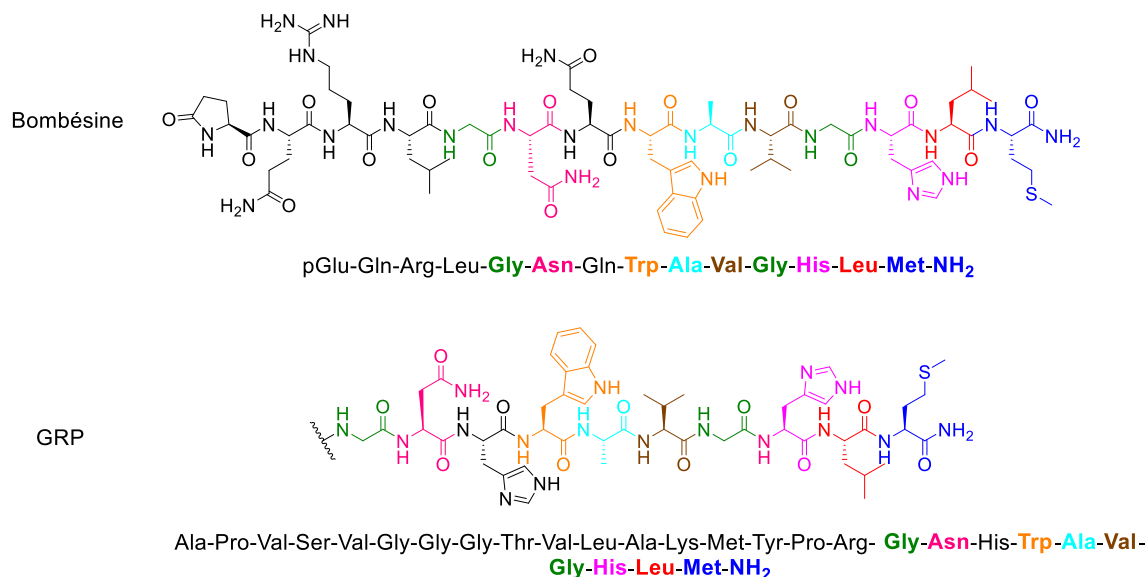


Figure 107: Structure de la Bombésine et de la GRP ^[144]

Cette similarité structurale a permis de mettre en évidence une affinité biologique comparable de ces dérivés pour les récepteurs de la GRP, aussi appelé GRPr « Gastrin Releasing Peptide receptor » ou récepteur BB2 ^[145]. Les récepteurs de la GRP sont principalement situés dans l'intestin grêle et le système nerveux central. Ils sont également surexprimés dans plusieurs tumeurs malignes. Leurs surexpressions dans les cancers du sein et de la prostate contrairement aux tissus sains environnants ont permis de les considérer comme cible de choix pour l'imagerie de ces cancers.

Du fait de leur très bonne biocompatibilité, mais également de leur excellente propriété de reconnaissance biologique et de leur grande stabilité en milieu biologique, les radiopharmaceutiques utilisant des peptides tels que des dérivés de la bombésine comme vecteurs ont fait l'objet de plusieurs études pour l'imagerie ou la thérapie des cancers ^[146].

II. Facteurs influençant l'affinité biologique et la pharmacocinétique des radiopharmaceutiques dérivés de la bombésine

La conception d'analogues de la bombésine, porteurs de chélatants divers sur la partie *N*-terminale du peptide, a permis le développement d'un grand nombre de radiopharmaceutiques. Le chélatant est introduit soit par couplage direct soit via un espaceur modulable. La disponibilité d'un panel de ligands favorise le radiomarquage par un grand nombre de radiométaux, pour l'imagerie TEP (i.e. ^{68}Ga , ^{64}Cu), TEMP ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In) mais aussi pour la thérapie (^{90}Y , ^{177}Lu) [38].

Chaque radioconjugué est caractérisé par son affinité pour une cible spécifique (i.e récepteurs). L'affinité biologique se détermine par la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}). Elle représente la concentration pour laquelle 50% des récepteurs ciblés sont occupés par le bioconjugué et se calcule grâce à la relation définie par C. Yung-Chi et W. H. Prusoff [147] :

$$IC_{50} = \frac{1 + \frac{[S]}{K_m}}{K_i} \quad (1)$$

Équation 7 : Concentration inhibitrice médiane

K_i représente l'affinité de liaison du bioconjugué étudié, $[S]$ correspond à la concentration en substrat (récepteurs) et K_m est la constante correspondant à la concentration en substrat nécessaire pour avoir une activité enzymatique égale à la moitié de l'activité maximale.

Des études ont démontré que l'affinité d'un radiopharmaceutique pour sa cible n'était pas uniquement dépendante du vecteur biologique. L'hydrophilie, la nature de l'espaceur [148] ainsi que la charge globale [149] du radiopharmaceutique ont un impact considérable sur la reconnaissance biologique et la biodistribution.

1. Influence de la séquence peptidique

Les radiopharmaceutiques formés à partir de peptides utilisés pour le diagnostic et la thérapie des cancers du sein et de la prostate sont divisés en deux familles : la famille des agonistes et celle des antagonistes. Les peptides agonistes ont la faculté d'être internalisés au sein des cellules une

fois liés aux récepteurs GRP. Cette internalisation permet une très grande accumulation du radiopharmaceutique à l'intérieur de la cellule ciblée (**Figure 108**).

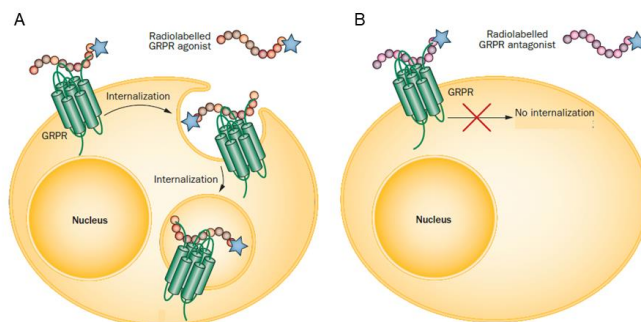


Figure 108 : Principe de fonctionnement des séquences agonistes (A) et antagonistes (B) [150]

Malgré une très mauvaise internalisation, les peptides antagonistes sont de plus en plus étudiés, car ils ciblent de façon remarquable les récepteurs présents à la surface des cellules malades (**Figure 108**). Les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus sont très encourageants et même dans plusieurs cas, meilleurs que ceux obtenus avec des analogues agonistes en termes de rétention et de biodistribution du radiopharmaceutique dans les tumeurs.

J. C. Reubi *et al.* ont étudié cette influence liée à la séquence peptidique sur deux radiopharmaceutiques (**Figure 109**), le [^{99m}Tc]Debombésine 1 (antagoniste) et le [^{99m}Tc]Debombésine 4 (agoniste), sur une lignée cellulaire humaine du cancer de la prostate (PC3) [151].

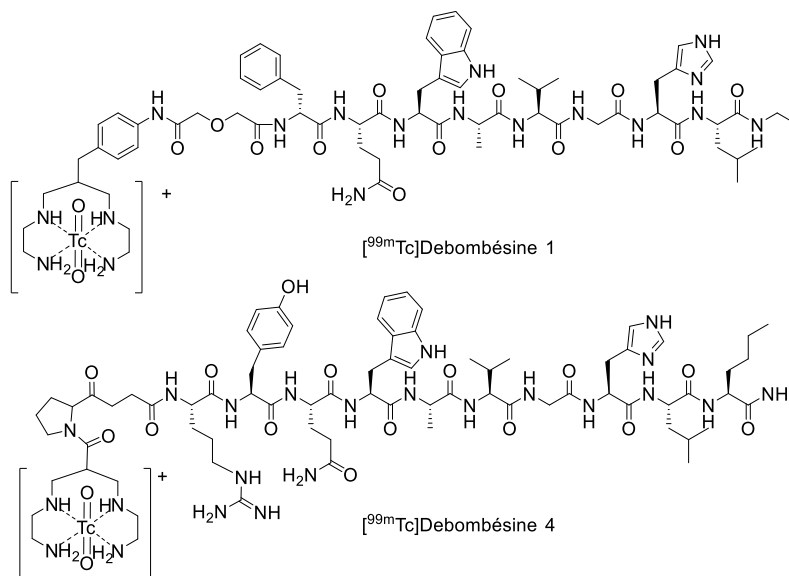


Figure 109 : Représentation des radiopeptides [^{99m}Tc]Debombésine 1 et 4 [151]

Le **Debombésine 1** présente un IC₅₀ égal à 2,01 nM et son homologue agoniste a une affinité biologique de 0,8 nM. Ces résultats résumés dans le **Tableau 49** montrent que la séquence agoniste permet de diminuer la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀).

	IC ₅₀ (nM)	Séquence	Internalisation
Debombésine 1	2,01 ± 0,5	Antagoniste	Pas d'internalisation
Debombésine 4	0,8 ± 0,1	Agoniste	Internalisation

Tableau 49 : Valeurs d'IC₅₀ en fonction de la séquence peptidique sur différentes lignées cellulaires

L'internalisation cellulaire du **Debombésine** agoniste est rapide avec un taux supérieur à 40% en 30 minutes contrairement à la séquence antagoniste pour laquelle une internalisation d'environ 3% est observée après une même période d'incubation. La biodistribution chez la souris xénotransgénée avec des tumeurs humaines du cancer de la prostate (PC3) a montré que l'analogue antagoniste présente une sélectivité différente vis-à-vis des différents organes. L'incorporation tumorale est 4 fois plus importante pour le **Debombésine 1** que pour le **Debombésine 4**, 4 heures après injection du radiopharmaceutique, et reste 2 fois plus importante après 24h. L'accumulation dans les reins est comparable pour les deux radioconjugués, ce qui entraîne un rapport tumeur/rein 4 fois supérieur pour le dérivé antagoniste. Ces résultats s'expliquent par un meilleur ciblage des récepteurs GRP par le **Debombésine 1**, ce qui entraîne une plus grande accumulation contrairement à l'internalisation du **Debombésine 4**.

H. R. Maecke *et al.* ont synthétisé un chélatant conjugué à un antagoniste, le **RM1** (dota-4-Abz-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-Hist-Sta-Leu-NH₂) (Abz = aminobenzyle), pour la complexation du ⁶⁸Ga et de l'¹¹¹In [152], afin de comparer ces nouveaux radiopharmaceutiques au très utilisé bioconjugué agoniste **AMBA** (dota-4-Abz-Gly-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-Hist-Leu-Met-NH₂) [153]. Les mesures de biodistribution du [¹¹¹In(**RM1**)] démontrent une accumulation (24h post injection) de 6,58 ± 1,14 (% Dose Injectée/g tissu ± Déviation Standard) contre 2,95 ± 0,55 dans les tumeurs ainsi qu'un ratio tumeur/reins 3 fois supérieur au [¹¹¹In(**AMBA**)].

Ces résultats, en accord avec ceux de l'étude de J. C. Reubi, tendent à affirmer que la séquence peptidique a une réelle importance sur l'affinité biologique des bioconjugués. En dépit d'une internalisation quasi inexistante, une accumulation plus importante du radiopeptide antagoniste au niveau des cellules ciblées conduit à de meilleurs ratio tumeur/organe, et en fait un meilleur candidat pour l'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques.

2. Influence de l'espaceur

Il est possible de greffer un chélatant à la biomolécule de manière covalente via un lien amide par l'intermédiaire d'une fonction acétate présente sur certains chélates. Ils peuvent toutefois être introduits sur le peptide par le biais d'un espaceur. Ce paramètre structural influe également sur l'affinité du radiopharmaceutique. L'introduction directe du chélate sur le peptide décroît l'affinité biologique du bioconjugué pour les récepteurs GRP ^[154], comme l'ont montré les travaux de E. Garcia *et al.*, dans lesquels l'introduction d'un espaceur, constitué de deux motifs β -alanine entre l'unité chélatante et le biovecteur, améliore l'affinité d'un facteur 5 par rapport au radioconjugué dépourvu d'espaceur ^[155].

Les travaux rapportés par W. A. Volkert *et al.* démontrent encore une fois l'influence de l'espaceur sur les valeurs d' IC_{50} de différents peptides radiomarqués à l'¹¹¹In ^[156]. Lors de cette étude les auteurs se sont intéressés à la combinaison d'un complexe [¹¹¹In(**dota**)]⁻ et d'un analogue de la bombésine soit par couplage direct à une fonction acétate du H₄**dota** soit grâce à des espaceurs de type alkyle comprenant respectivement des enchaînements en C₂ / C₄ / C₇ et C₁₀ (**Figure 110**).

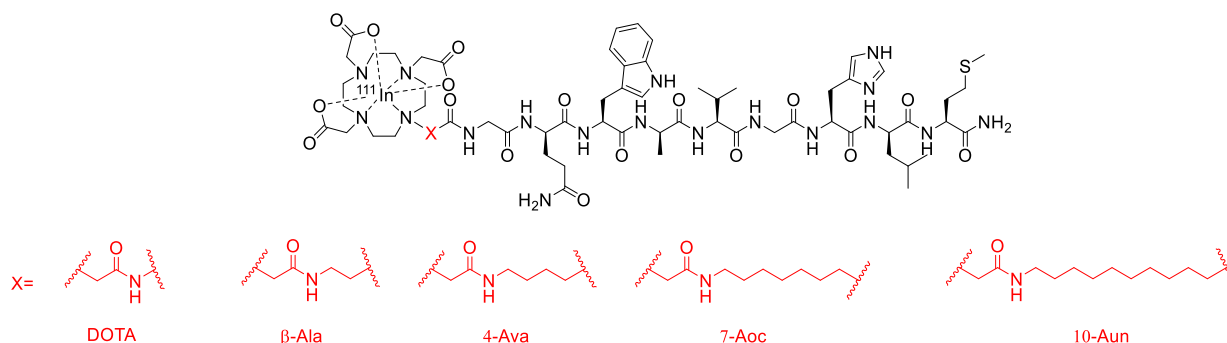


Figure 110 : Structure des métallopeptides étudiés par Hoffman *et al.* ^[156]

Pour les dérivés possédant une chaîne carbonée de 3 à 8 groupements méthyléniques, les valeurs d' IC_{50} sont relativement faibles puisque inférieures à 2,5 nM (**Tableau 50**). Il semblerait qu'un espaceur avec une chaîne carbonée en C₇ soit le plus bénéfique pour réduire l' IC_{50} . En revanche, lorsque le complexe métallique est relié directement au peptide, ou qu'il se retrouve trop éloigné, la reconnaissance biologique du métallopeptide est drastiquement réduite.

Métallopeptides	IC ₅₀ (nM)
In- dota -BBN[7-14]NH ₂	110,6 ± 32,3
In- dota-β-Ala -BBN[7-14]NH ₂	2,1 ± 0,3
In- dota-4-Ava -BBN[7-14]NH ₂	1,7 ± 0,4
In- dota-7-Aoc -BBN[7-14]NH ₂	0,6 ± 0,1
In- dota-10-Aun -BBN[7-14]NH ₂	64,0 ± 11,2

Tableau 50 : Valeurs d'IC₅₀ (nM) issues de l'étude de W. A. Vokert *et al.* [156]

Ces différentes études rendent compte de l'importance de l'espaceur quant à la reconnaissance du radiopharmaceutique envers sa cible.

3. Influence de la charge

Le dernier facteur influençant non seulement la reconnaissance biologique des récepteurs GRP mais également la pharmacocinétique des radiopharmaceutiques est la charge globale du métallopeptide. Il est possible d'induire une charge sur le radioconjugué par l'utilisation d'un radioisotope cationique, et/ou en développant un espaceur portant une (ou des) fonction(s) acidobasique(s) (amine, carboxylate etc...).

L'équipe de H. R. Maecke *et al.* s'est intéressée à l'impact d'une modification de la charge au niveau *N*-terminal d'un bioconjugué antagoniste sur la pharmacocinétique des radiopeptides et la reconnaissance biologique [149]. Les auteurs ont synthétisé de nouveaux bioconjugués avec un motif de type H₃**nota** ou H₃**nodaga** pour la complexation du ⁶⁸Ga et du ⁶⁴Cu (**Figure 111**). Les complexes formés en fonction du métal divalent ou trivalent permettent d'obtenir des peptides de charges positive, neutre ou négative.

D'après les valeurs d'IC₅₀ (**Tableau 51**), l'augmentation de la charge du métallopeptide induit une meilleure affinité envers les récepteurs GRP par rapport à leurs homologues possédant une charge globale inférieure. L'introduction d'une charge positive sur le [^{nat}Cu(**nota-MJ9**)] réduit d'un facteur 5 la valeur de l'IC₅₀ par rapport au dérivé du **nodaga**. Pour un même métal, ou pour un ligand donné, plus la charge positive est importante, plus l'affinité est importante.

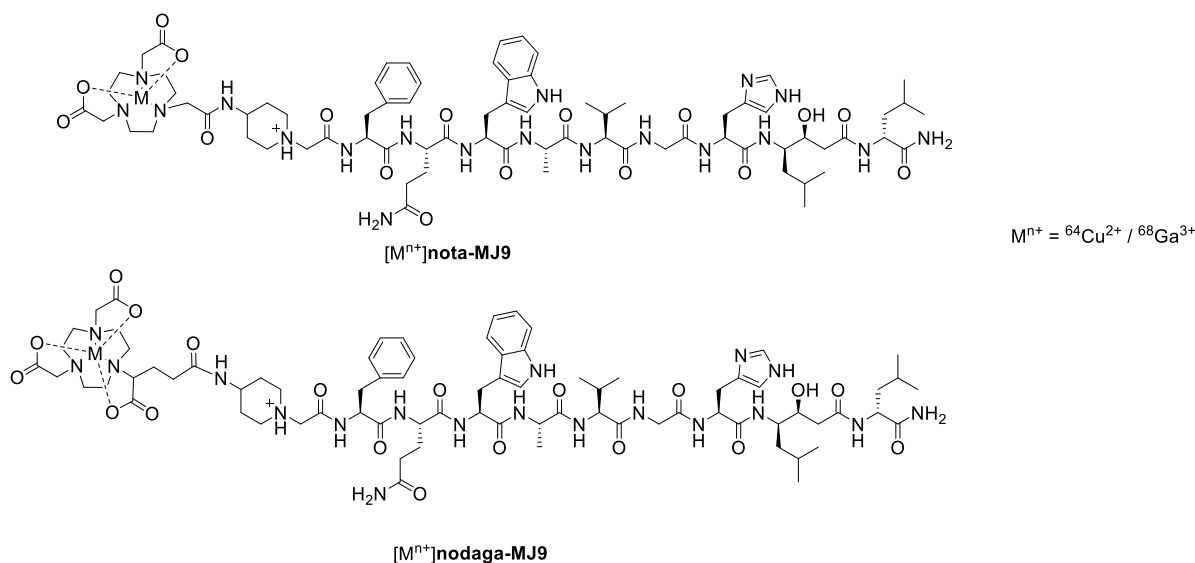


Figure 111 : Structures des radiopeptides $[M^{n+}]nota-MJ9$ et $[M^{n+}]nodaga-MJ9$ étudiés par H. R. Maecke *et al.* [149]

Métallopeptides	IC ₅₀ (nM)	Charge
$[{}^{nat}Ga(nota-MJ9)]$	0,5 ± 0,1	+2
$[{}^{nat}Ga(nodaga-MJ9)]$	2,1 ± 0,3	+1
$[{}^{nat}Cu(nota-MJ9)]$	1,0 ± 0,1	+1
$[{}^{nat}Cu(nodaga-MJ9)]$	5,3 ± 2,5	0

Tableau 51 : Affinité des métallopeptides pour les récepteurs GRP en fonction de la charge

De plus, la pharmacocinétique des métallopeptides est également affectée par la charge globale des composés. Les résultats de biodistribution des composés radiomarqués au ${}^{68}Ga$ et au ${}^{64}Cu$ sont référencés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 52**).

Métallopeptides	Tumeur/Reins (1h)	Tumeur/ Reins (24h)
$[{}^{68}Ga(nota-MJ9)]$	6,5 ± 0,8	/
$[{}^{68}Ga(nodaga-MJ9)]$	4,7 ± 0,1	/
$[{}^{64}Cu(nota-MJ9)]$	/	12 ± 1
$[{}^{64}Cu(nodaga-MJ9)]$	/	5 ± 1

Tableau 52 : Rapport tumeur / reins exprimé en %ID/g

Encore une fois, les résultats obtenus concordent avec l'hypothèse d'une meilleure biodistribution des peptides chargés positivement par rapport à leurs analogues non chargés ou chargés négativement. Le peptide di-cationique, $[{}^{68}Ga(nota-MJ9)]$, donne un rapport tumeur / reins environ

1,5 fois supérieur à son homologue mono-chargé. Comparé au [$^{64}\text{Cu}(\text{nodaga-MJ9})$], le [$^{64}\text{Cu}(\text{nota-MJ9})$] est deux fois plus sélectif pour le ciblage des tumeurs.

En parallèle à ces résultats, B. Guérin *et al.* ont travaillé sur trois radiopharmaceutiques potentiels (**Figure 112**) constitués d'une séquence antagoniste reliée à un complexe neutre [$\text{Cu}(\text{nota})$] via un espaceur neutre pégylé (PEG), di-cationique de type pipérazine (APCA) ou di-anionique, de type acide aminohexanedioïque (AHDA). Ces espaceurs permettent de moduler la charge globale des bioconjugués, ce qui rend possible la rationalisation de l'importance de la charge ^[157].

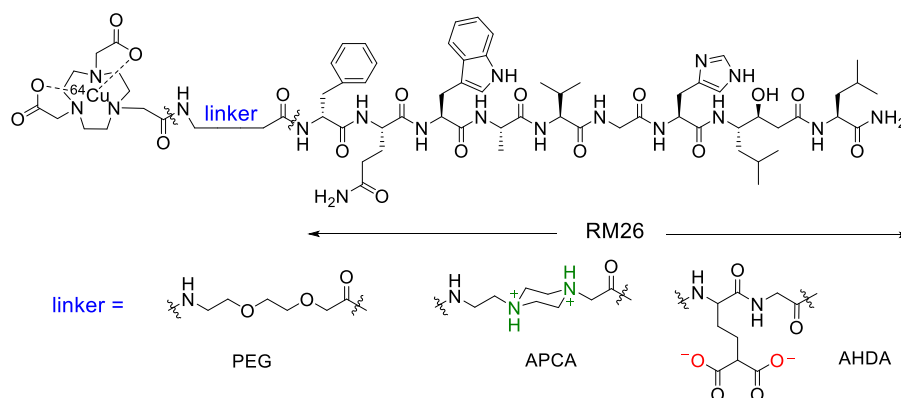


Figure 112 : Structure des métallopeptides étudiés par B. Guérin *et al.* ^[157]

Dans cette étude, les chercheurs ont montré l'importance de la charge positive pour une meilleure affinité envers les récepteurs GRP. Les valeurs de constante d'affinité (K_i) issues de la littérature sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 53**).

Métallopeptides	K_i (nM) ^a	Charge
nota-PEG-RM26	0,39 ± 0,21	0
[$^{nat}\text{Cu}(\text{nota-PEG-RM26})$]	0,98 ± 0,48	0
nota-APCA-RM26	0,33 ± 0,18	+2
[$^{nat}\text{Cu}(\text{nota-APCA-RM26})$]	0,95 ± 0,21	+2
nota-AHDA-RM26	15,29 ± 4,08	-2
[$^{nat}\text{Cu}(\text{nota-AHDA-RM26})$]	17,97 ± 2,79	-2

^a K_i : Constante d'affinité calculée grâce à l'équation (1) (page 5)

Tableau 53 : Constante d'affinité en fonction de la charge

La présence du cation métallique augmente légèrement les valeurs d'affinité par rapport au peptide non complexé. En revanche, une affinité nettement moindre est à noter pour les dérivés fonctionnalisés avec l'espaceur di-anionique (AHDA), contrairement aux dérivés neutres et ceux

chargés positivement. Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenus par H. R. Maecke *et al* [149].

Retenons que, pour le ciblage des GRP, plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour l'élaboration de nouveaux radiopharmaceutiques. Le bioconjugué doit préférentiellement posséder :

- Une séquence antagoniste,
- un espaceur constitué d'un enchainement de 3 à 8 unités méthyléniques,
- une charge positive sur la partie N-terminale.

De fait, plusieurs groupes se sont intéressés à élaborer de nouveaux radiopharmaceutiques, de plus en plus performants pour une translation en tests cliniques.

III. Radiopharmaceutiques en essais cliniques

Les récepteurs GRP sont surexprimés dans les cellules néoplastiques de la plupart des cancers de la prostate, du rein ou du sein, c'est pourquoi pour le ciblage par des radiopharmaceutiques analogues de la bombésine est intéressant pour une application en Médecine Nucléaire [148,150,158,159]. L'élaboration d'analogues modèles des GRP possédant la capacité de complexer une vaste gamme de métaux radioactifs a permis le diagnostic et la thérapie de tumeurs. Actuellement, plusieurs métallopeptides dérivés de la bombésine (**Figure 113**) sont aussi en phase I et II en tests cliniques (**Tableau 54**) sur l'homme.

Peptides	Radio-isotope	Imagerie	Cohorte	Résultats	Références
RP527	^{99m} Tc	TEMP	9 patients	8 tumeurs sur 9 clairement visibles	[160–162]
BZH3	⁶⁸ Ga	TEP	17 patients porteurs de tumeurs gastrointestinales	meilleure accumulation dans les tumeurs pour 7 patients	[163]
cb-te2a-AR06	⁶⁴ Cu	TEP	4 patients avec un cancer de la prostate primaire	meilleure incorporation dans les tumeurs pour 3 patients	[164]
AMBA	¹⁷⁷ Lu	TEMP	7 patients porteurs d'un cancer de la prostate résistant après castration	meilleure incorporation dans la tumeur pour 5 patients	[146]

Tableau 54 : Métallopeptides en essais cliniques et résultats obtenus

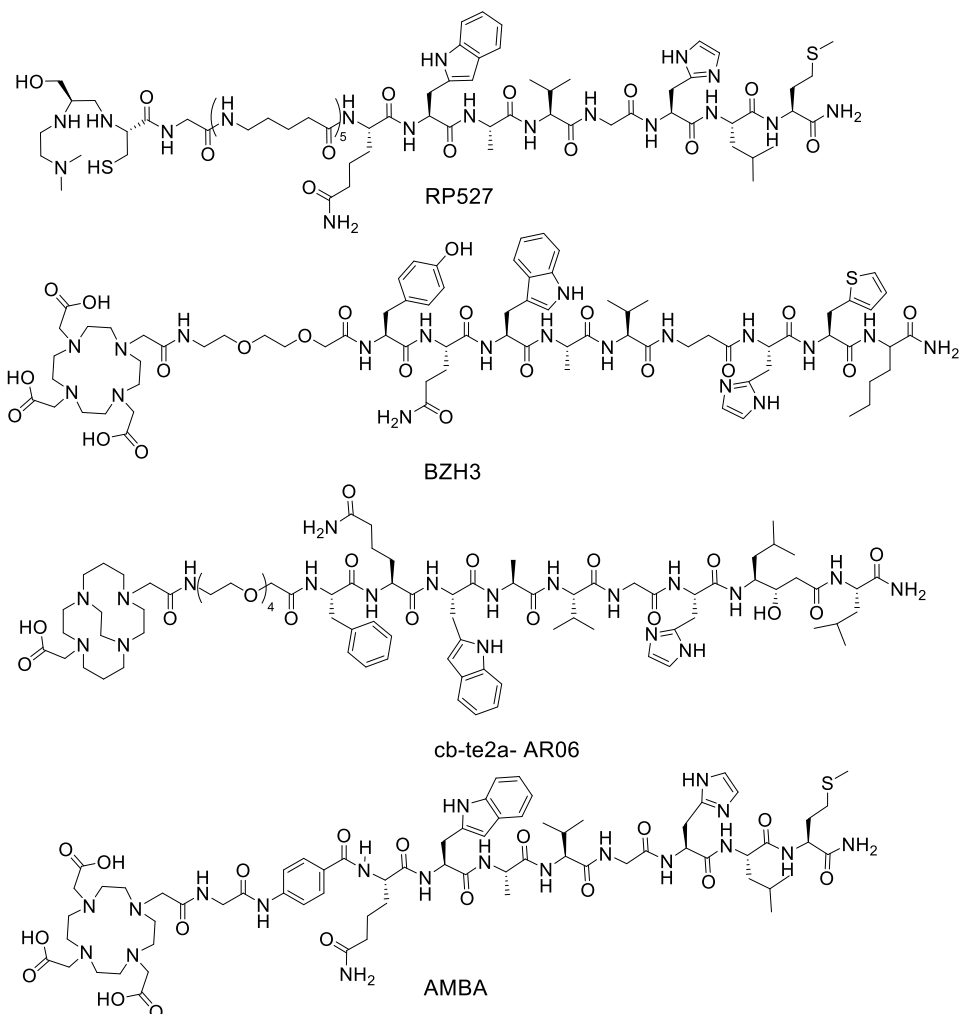


Figure 113 : Structure des bioconjugués en tests cliniques

Le **RP527**, constitué d'un peptide antagoniste et d'un chélatant acyclique espacé par cinq unités acide aminohexinoïque (Ahx) a été étudié pour le diagnostic du cancer de la prostate par tomographie d'émission monophotonique avec du ^{99m}Tc . L'étude réalisée sur une cohorte de 9 individus a mis en évidence une amélioration de la visualisation des tumeurs pour la majeure partie des individus [160–162]. Des résultats similaires ont été obtenus avec le **AMBA**, peptide antagoniste sur lequel est lié un H_4dota via un espaceur 4-aminobenzyle, radiomarqué au ^{177}Lu [146]. Pour une étude par TEP, le **BZH3** et le **cb-te2a-AR06** radiomarqué respectivement au ^{68}Ga et au ^{64}Cu ont montré que dans la majeure partie des cas, une meilleure incorporation dans les tumeurs était notable pour des CaP primaire ou des CaP résistant après castration [157, 158].

Tous ces tests cliniques de phase I et II réalisés sur des cohortes de patients atteints du CaP témoignent de l'importance d'utiliser des radiopharmaceutiques à base de dérivés de la bombésine pour le ciblage des récepteurs GRP.

Récemment, le [^{68}Ga]BAY86-7548, aussi connu sous le nom de [^{68}Ga]dota-RM2, est devenu la référence utilisée en clinique pour le ciblage des récepteurs GRP. Ce composé, élaboré en premier par l'équipe de H. R. Maecke ^[165], possède d'excellentes propriétés d'affinité biologique et de biodistribution.

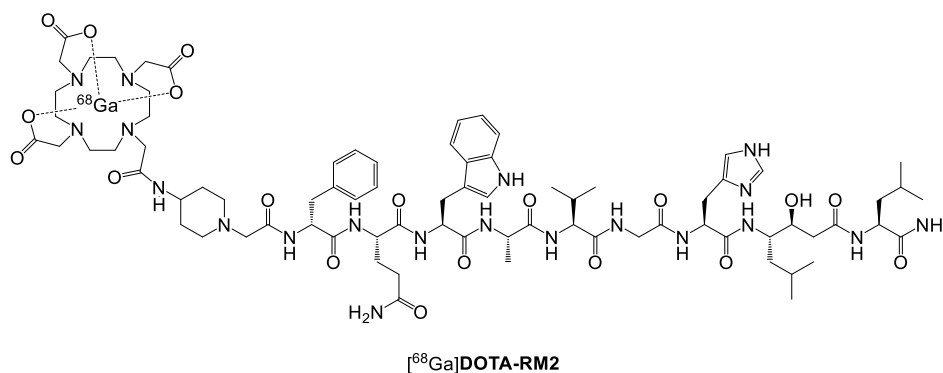


Figure 114 : Structure du [^{68}Ga]dota-RM2 ^[165]

En 2013, des études sur une cohorte de 14 personnes atteintes du cancer de la prostate ont été réalisées par H. Minn *et al.* ^[166]. L'imagerie des tumeurs prostatiques a montré que le radiotracer avait une bonne précision avec 83% de tumeurs ciblées.

En 2016 P. T. Meyer *et al.* ont étendu le champ d'application de ce radiopharmaceutique en l'étudiant dans l'imagerie du cancer du sein. Dans un cohorte de 15 patients, le [^{68}Ga]dota-RM2 s'est montré apte à imager l'expression de récepteurs BB2 présents dans les tumeurs, avec un grand rapport tumeur/organe dans 73% des cas ^[167].

IV. Objectifs

L'objectif de ce travail est d'élaborer de nouveaux radiopharmaceutiques potentiels (**Figure 115**) en se basant sur les différents faits présentés précédemment. L'idée est d'utiliser la même séquence peptidique que celle du **dota-RM2** sur laquelle est lié un espaceur acide aminohexanoïque (Ahx) composé d'un enchainement de cinq unités méthyliques.

L'incorporation d'une charge positive sur la partie *N*-terminale du peptide est faite après introduction de complexes triazamacrocycliques du Cu(II). L'utilisation de ces complexes permet d'induire une charge globale +2 sur l'extrémité du peptide.

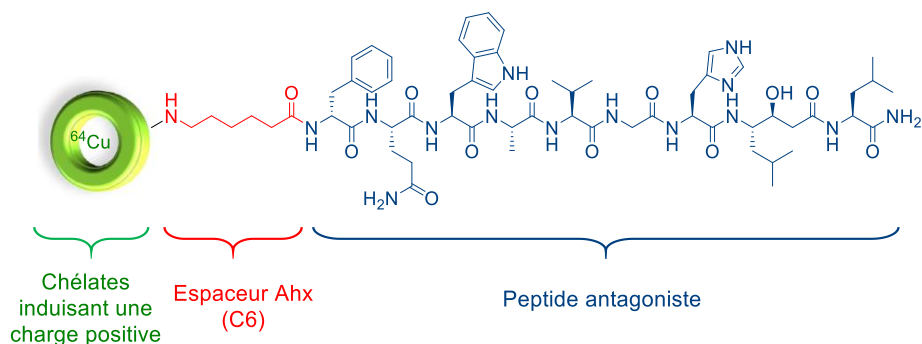


Figure 115 : Présentation de la structure des radiopharmaceutiques

Au cours des chapitres I et III nous avons montré la capacité des ligands **no2th** ^[137], **no3th** ^[138], **Hno2th1tha** et **no3py** ^[9] à former des complexes stables avec le Cu²⁺. De fait, nous avons proposé, en collaboration avec l'équipe du Dr. Mark. Bartholomä, de mettre à profit ces ligands et d'étudier l'impact non seulement de l'introduction d'une charge positive sur le peptide mais également d'étudier l'influence du polyazamacrocycle sur l'affinité biologique, afin de les comparer avec le **dota-RM2**.

2 Synthèse des Agents Chélatants Bifonctionnels

Après un rappel sur les différentes méthodes de conjugaison de chélatants sur vecteurs biologiques, les différentes classes d'Agents Chélatants Bifonctionnels dérivés du tacn utilisés dans la littérature seront développées. Enfin, la synthèse et la caractérisation d'analogues bifonctionnels dérivés du **no2th** et du **no3py** seront détaillées.

I. Stratégies de synthèse et de bioconjugaison des ACB

1. Méthode de bioconjugaison

Lors de la synthèse d'ACB, le type de fonction de couplage et la position de cette dernière sont deux paramètres importants. Le premier est dépendant de la nature de la fonction présente sur le vecteur biologique ^[168] qui peut être:

- une fonction amine secondaire présente sur la chaîne latérale d'un résidu lysine,
- une fonction thiol présente sur la chaîne latérale d'un résidu cystéine,
- une fonction azoture présente sur des peptides modifiés.

Dans la plupart des cas, les vecteurs sur lesquels les ACB sont greffés sont des biomolécules de type peptide ou anticorps, qui sont sensibles au pH et à la température. Il faut donc procéder au couplage dans des conditions douces, à savoir, à pH neutre ou légèrement basique, de préférence dans un solvant aqueux et à température ambiante.

Actuellement, il existe 4 voies principales de couplage remplissant ces conditions (**Figure 116**), représentées ci-après. Le couplage peptidique (**A**) s'opère entre un acide carboxylique ou un ester activé (**B**) et une amine secondaire. Dans le cas d'un acide carboxylique il est souvent nécessaire d'utiliser un agent de couplage (i.e HOBt, DCC, HATU) afin d'activer la fonction acide carboxylique. Ce type de réaction conduit aux composés attendus avec de bons rendements.

Une autre méthode de bioconjugaison consiste à former une liaison thiourée, robuste en milieu biologique, (**C**) entre un isothiocyanate et une amine primaire dans des conditions douces (pH > 8 et température ambiante). Ces réactions sont très utilisées pour l'introduction de molécules chélatantes telles que les polyazamacrocycles ^[169].

La réaction de type Michael entre un ester α,β -insaturé (de type maléimide) avec un dérivé thiol conduit à la formation d'une liaison thioéther (**D**). Cette réaction découle de la famille des couplages de type « thiol-ène ». Tout comme la bioconjugaison (**C**) vue précédemment, cette réaction se réalise dans des conditions classiques et ne nécessite ni chauffage, ni l'utilisation d'agents de couplage.

Le dernier type de couplage (**E**) est connu sous le nom de réaction de « chimie-click ». Contrairement à la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen, qui nécessite du chauffage à haute température^[170], cette variante, catalysée au cuivre(I), est la résultante de la cycloaddition entre un alcyne vrai et un azoture, en conditions douces, souvent en utilisant l'eau comme solvant (pH neutre, température ambiante). Ces conditions conduisent de façon régiosélective exclusivement à l'isomère 1,4 avec de très bons rendements. Néanmoins, avec ce type de couplage, la complexation du catalyseur de Cu(I) par le macrocycle est possible. Ceci rend la purification du composé difficile ou nécessite de devoir, avant la réaction click, effectuer une réaction de complexation avec le cation d'intérêt^[171].

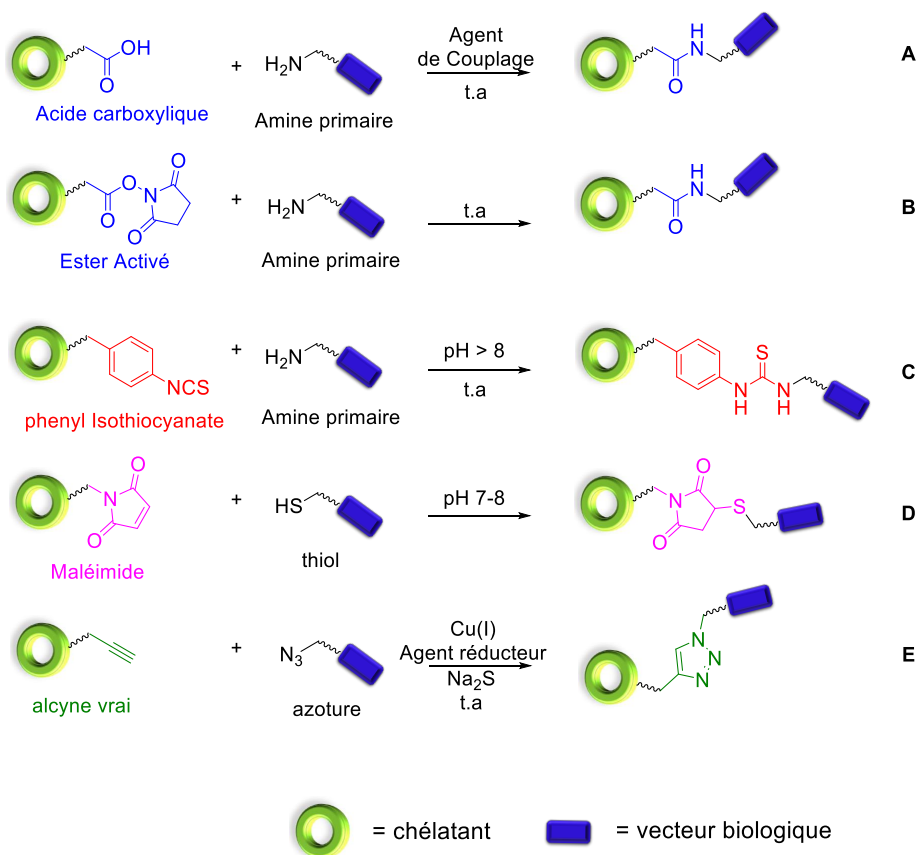


Figure 116 : Méthodes usuelles de bioconjugaison

2. Stratégies d'obtention d'ACB à base de tacn

Les Agents Chélatants Bifonctionnels (ACB) sont des agents complexants fonctionnalisés de façon à être liés de manière covalente à une biomolécule. L'introduction d'une fonction d'ancrage sur l'entité est obtenue par *N*- ou *C*-fonctionnalisation du macrocycle. Dans le cas du tacn, trois situations sont envisageables pour l'élaboration d'analogues bifonctionnels (**Figure 117**) :

- Introduire la fonction de couplage sur une amine libre du macrocycle via une *N*-fonctionnalisation (ACB 1^{ère} génération) pour des dérivés mono- ou di-*N*-fonctionnalisés ou alors sacrifier une fonction coordinante des dérivés tri-*N*-fonctionnalisés,
- Introduire la fonction de greffage sur le bras coordinant (2^{ème} génération), néanmoins cette méthode nécessite de réaliser des *N*-fonctionnalisations stéréospécifiques des fonctions amine secondaire.
- Enfin, il est possible d'introduire la fonction d'ancrage sur un atome de carbone du macrocycle, ce qui peut se nommer *C*-fonctionnalisation (3^{ème} génération).

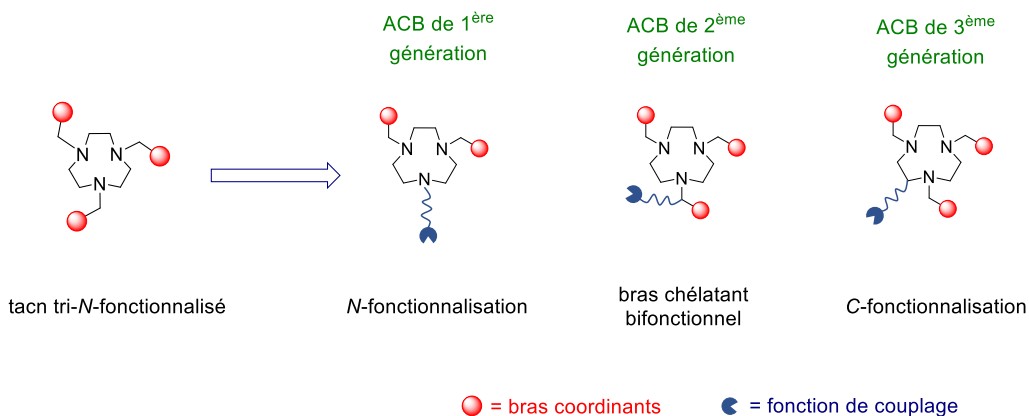


Figure 117 : Présentation des familles d'ACB dérivés du tacn

Pour les ACB de 1^{ère} génération, comme les dérivés tri-acétate du tacn (**H₃nota** et **nodaga**), l'ancrage du macrocycle implique la formation d'une liaison amide via un des bras acétate du macrocycle. Dans le cas du **H₃nota**, cette fonctionnalisation est réalisée en sacrifiant une des fonctions coordinantes, ce qui induit un changement sur la coordination du cation métallique.

E. Tóth *et al.* ont étudié l'influence d'une telle modification sur des dérivés du H₄**dota** pour la complexation du Ga³⁺ en remplaçant un bras acétate par une fonction amide (**do3am^{Bu}**) (**Figure 118**) mimant ainsi une bioconjugaison. En milieu acide (pH < 1), la cinétique de dissociation est augmentée par un facteur 5 pour le complexe du [Ga(**do3am^{Bu}**)] par rapport au [Ga(**dota**)]. Une telle modification a donc un impact négatif en terme d'inertie cinétique du complexe formé [172].

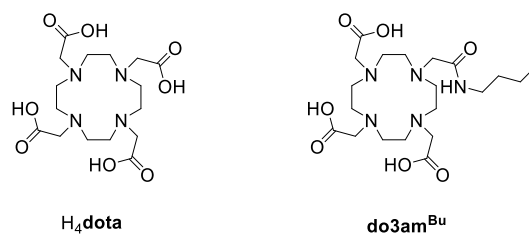


Figure 118 : Structure du H₄**dota** et du **do3am^{Bu}** [172]

Afin de pallier ce problème, il est possible de créer des ACB de 2^{ème} génération (**Figure 119**) en introduisant la fonction de couplage sur le bras coordinant [173,174] et en n'affectant pas, *a priori*, la sphère de coordination du métal et par conséquent la stabilité du complexe.

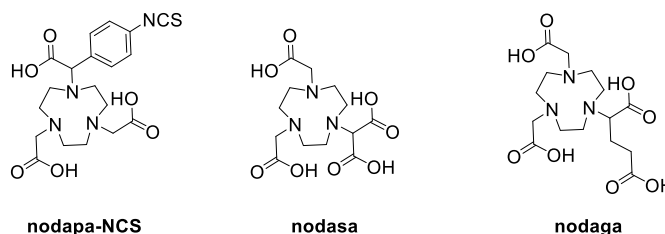


Figure 119 : Analogues bifonctionnels de 2^{ème} génération du H₃**nota** [173,174]

Cependant, comme décrit précédemment, les études réalisées par H. R Maecke *et al.* (**Tableau 51** et **Tableau 52**) montrent que les métallopeptides formés avec le H₃**nota** sont plus sélectifs pour les récepteurs GRP que ceux formés avec le **nodaga** et qu'ils ont une meilleure biodistribution.

Une autre approche pour pallier ces problèmes consiste à introduire la fonction d'ancrage sur le squelette carboné du macrocycle [50,175,176] (**Figure 120**). Cette méthode, aussi appelée C-fonctionnalisation du macrocycle, permet de s'affranchir d'une synthèse complexe de bras bifonctionnels et de laisser les fonctions acide carboxylique libres pour la complexation des métaux d'intérêt. Cependant, la difficulté se situe dans la synthèse du macrocycle

C-fonctionnalisé avant toute N-fonctionnalisation, mais une fois la plateforme macrocyclique obtenue, l'élaboration d'une grande variété de composés bioconjuguables est envisageable.

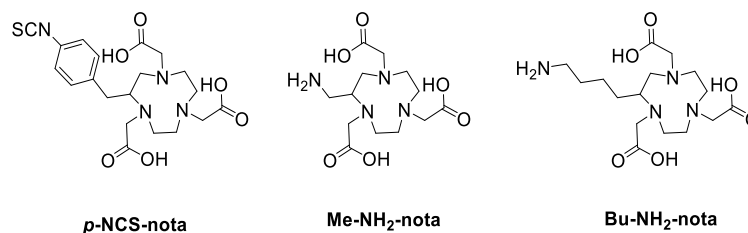


Figure 120 : Ligands bifonctionnels de 3^{ème} génération dérivés du H₃nota [50,175,176]

3. Présentation des cibles

Puisque l'élaboration d'ACB de 3^{ème} génération du tacn reste un challenge et est très peu développée, nos efforts se sont tout d'abord portés sur la synthèse d'ACB de 1^{ère} et 2^{ème} génération, dérivés des ligands **no2th**, **no3th** et **no3py** (**Figure 121**). Nous verrons dans le prochain chapitre que la C-fonctionnalisation reste cependant l'un de nos objectifs.

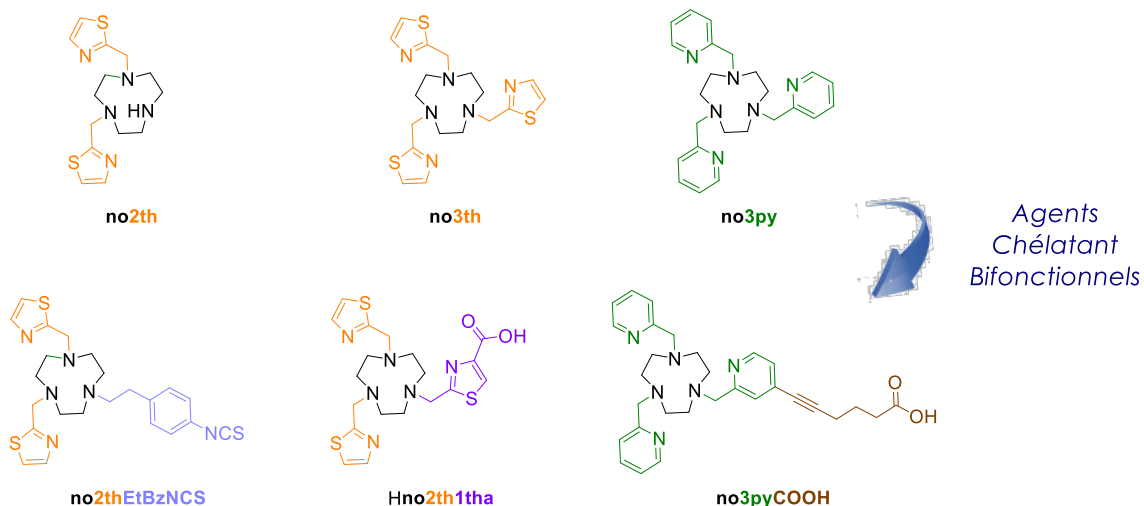


Figure 121 : Présentation des ligands bifonctionnels ciblés

L'introduction de la bifonctionnalité sur ces trois ligands a été étudiée selon deux voies de synthèse différentes. Nous avons choisi de synthétiser un analogue bifonctionnel du **no2th** en introduisant une fonction de type phénylisothiocyanate (**no2thEtBzNCS**), qui permettra un couplage de type thiourée avec une lysine présente sur le vecteur biologique.

Concernant les dérivés **no3th** et **no3py**, l'incorporation d'une fonction de couplage a été effectuée sur un groupement méthylthiazole ou méthylpyridine car aucune amine secondaire n'est disponible sur le macrocycle. Aux vues de ces excellentes propriétés physicochimiques, nous avons ainsi choisi d'utiliser le ligand **Hno2th1tha** (Chapitre III) comme analogue bifonctionnel du **no3th**, la fonction acide présente sur un bras méthylthiazole, n'entrant pas dans la coordination du Cu^{2+} , peut par conséquent permettre des réactions de bioconjugaison. Enfin, la synthèse d'un ACB du **no3py** a été envisagée en introduisant une fonction acide carboxylique sur un des bras méthylpyridine (**no3pyCOOH**).

II. Synthèse et caractérisation du **no2thEtBzNCS**

La synthèse du ligand **no2thEtBzNCS** (**Schéma 38**), triazacyclononane tri-*N*-fonctionnalisé par deux bras méthylthiazole et un bras possédant une fonction de type phénylthiocyanate s'effectue en trois étapes à partir du synthon **no2th** (**33**) préalablement synthétisé dans le Chapitre III.

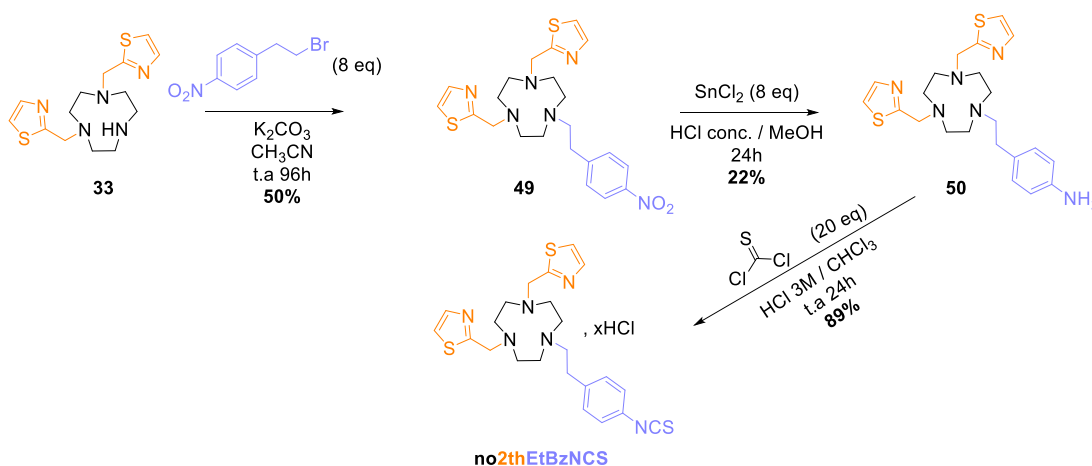


Schéma 38 : Synthèse du ligand **L5**

Le composé nitrobenzyle **49** est obtenu avec un rendement de 50% après *N*-fonctionnalisation du **no2th** (**33**) avec 8 équivalents de bromure de 4-nitrophényléthane. Le composé **49** est ensuite engagé dans une étape de réduction de la fonction nitrophényl en fonction aniline en employant un excès de chlorure d'étain en milieu acide. Le produit obtenu est purifié par HPLC semi-préparative. Cette purification est délicate et le **no2th** porteur d'une fonction aniline (**50**) est isolé avec un rendement de 22%.

L'agrandissement du spectre RMN ^1H du composé nitrophényle **49** (spectre bleu) est représenté en incrustation de celui du dérivé réduit **50** (**Figure 122**). Un blindage des protons du noyau aromatique après réduction est observable par rapport au composé **49**, lié au caractère donneur du groupement NH_2 tandis que le groupement nitro possède un caractère électroattracteur. En effet les protons H_7 et H_8 subissent un phénomène de blindage après la réduction du groupement nitro et se retrouve respectivement à 6,58 (H_4) et 6,97 (H_3) ppm au lieu de 7,27 et 8,16 ppm.

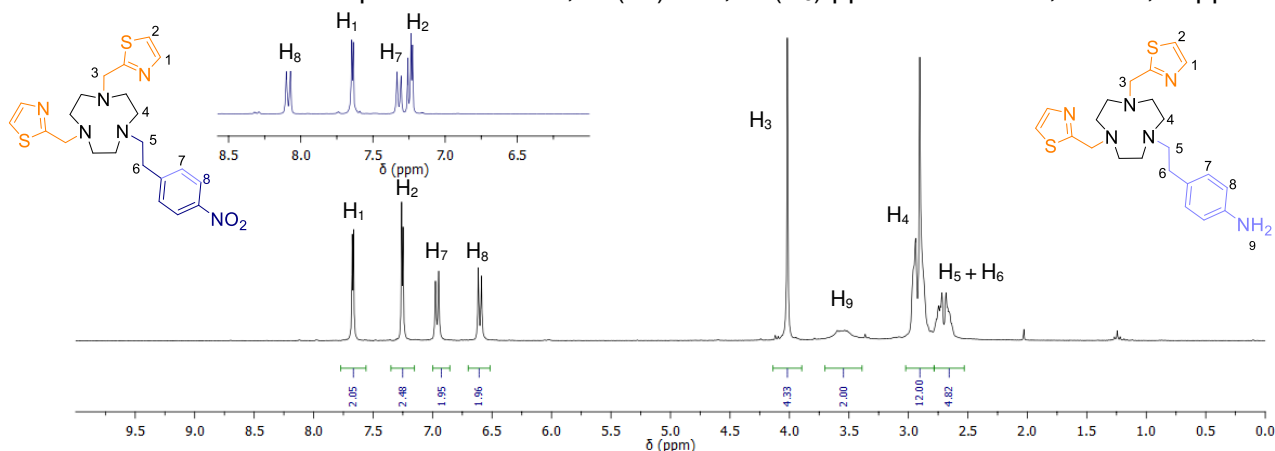


Figure 122 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **49** et de **50**

Les protons des fonctions thiazole sont représentés par des doublets à respectivement 7,25 (H_2) et 7,66 (H_1) ppm avec une constante de couplage 3J égale à 6 Hz. Le signal large et mal résolu à 3,5 ppm correspond aux protons (H_9) labiles du groupement NH_2 , ce qui permet de confirmer la structure du composé **50**.

Le spectre RMN ^{13}C en J-modulation représenté ci-après (**Figure 123**) est composé de onze pics. Le pic positif présent à 33,6 ppm correspond à l'atome de carbone (C_7) du bras portant le groupement aniline, positionné en β de l'atome d'azote. Les pics positifs à 55,9, 60,0 et 60,9 correspondent respectivement aux groupements $-\text{CH}_2$ du macrocycle (C_5), des bras méthylthiazole (C_4) et du groupement (C_6) positionné en α de l'atome d'azote du macrocycle. Les atomes de carbone aromatiques (C_{10}) en β du groupement aniline sont caractérisés par un pic négatif à 115 ppm et ceux positionnés en α sont attribués au pic positif à 130,4 ppm.

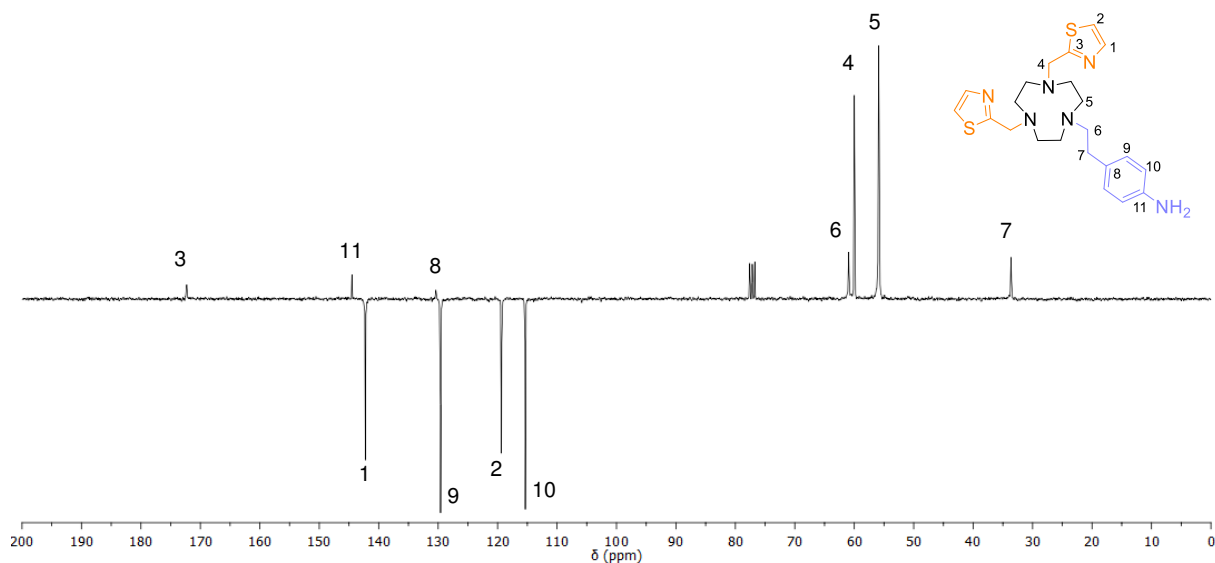


Figure 123 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **50**

Enfin, l'activation de la fonction aniline du dérivé **50** en isothiocyanate est effectuée par réaction avec du thiophosgène dans un mélange biphasique chloroforme/HCl 3M.

Sur le spectre RMN ^1H (Figure 124) les protons H_3 et H_4 du groupement phénylisothiocyanate sortent de manière fortuite sous la forme d'un singulet à 7,36 ppm intégrant pour 4 protons. Les protons aromatiques des groupements thiazole (H_2 et H_1) se retrouvent sur le spectre respectivement à 7,77 et 7,97 ppm.

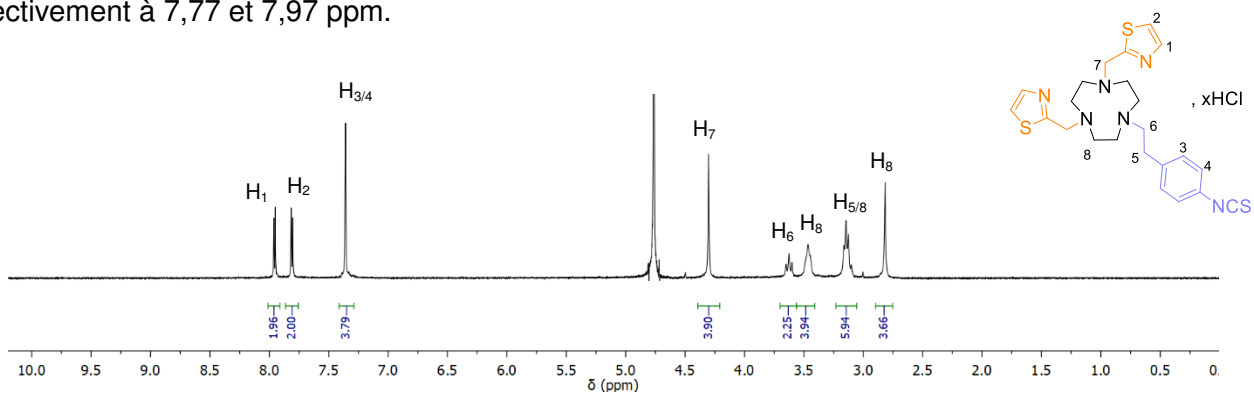


Figure 124 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O) du ligand **no2thEtBzNCS**, $x\text{HCl}$

Le ligand **no2thEtBzNCS** sous sa forme chlorhydrate est obtenu avec un rendement de 89%, soit un rendement global de 7% en 8 étapes, à partir du tacn.

III. Synthèse et caractérisation du **no3pyCOOH**

Le ligand **no3pyCOOH**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylpyridine et un groupement méthylpyridine substitué en para par une fonction de type acide pent-4-ynoïque est obtenu en 7 étapes à partir du tacn (**Schéma 39**). Dans un premier temps la synthèse du bras bifonctionnel sera présentée avant de développer la synthèse et la caractérisation du ligand **no3pyCOOH**.

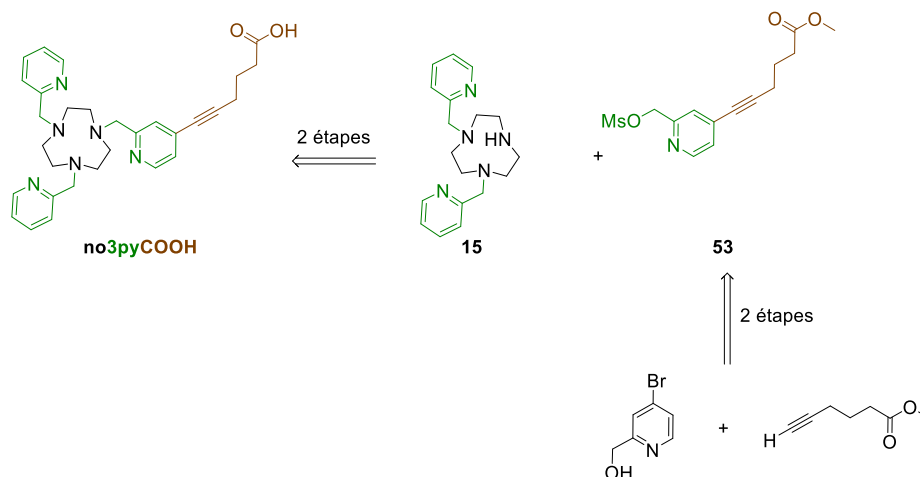


Schéma 39 : Approche rétrosynthétique du ligand **no3pyCOOH**

1. Synthèse du bras méthylpyridine bifonctionnalisé

La fonctionnalisation du noyau pyridine d'un des bras du **no3py** apparaît comme une voie idéale pour l'obtention de l'analogue bifonctionnel. Il est possible de substituer un noyau aromatique à partir de couplages organopalladés, faisant intervenir des aromatiques halogénés et un alcyne vrai, tel que le couplage de Sonogashira ^[177].

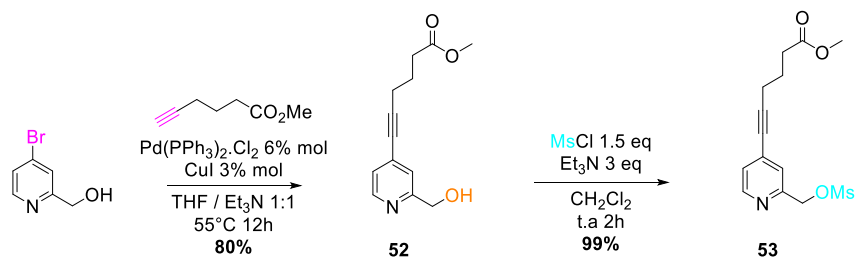


Schéma 40 : Voie de synthèse du composé 53

Nous avons utilisé le 2-méthylpyridineméthanol, réactif dérivé de la pyridine qui porte un atome de brome en position *para* et de l'hex-5-ynoate de méthyle pour réaliser un couplage de Sonogashira. Lors de ce couplage, un produit secondaire d'oxyde de triphénylphosphine impossible à séparer du composé couplé **52** est obtenu si la synthèse n'est pas réalisée en conditions strictes sans oxygène. Le dérivé **52** est isolé avec un rendement de 80% après purification. Enfin, après activation de la fonction alcool primaire par du chlorure de mésyle, le bras bifonctionnel activé sous forme de mésylate (**53**) est obtenu de manière quantitative.

2. Synthèse et caractérisation du ligand **no3pyCOO⁻K⁺**

La synthèse du **no3pyCOO⁻K⁺** est effectuée en deux étapes (**Schéma 41**) à partir du synthon **no2py** (**15**), dont la synthèse a été décrite dans le chapitre II.

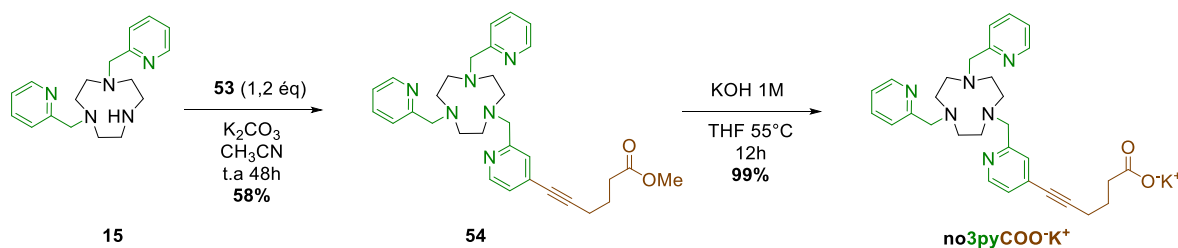


Schéma 41 : Voie de synthèse du ligand **no3pyCOO⁻K⁺**

Une mono-*N*-fonctionnalisation de l'amine secondaire du **no2py** (**15**) avec l'électrophile **53** dans l'acétonitrile conduit au macrocycle **54**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux bras méthylpyridine et le bras portant la future fonction de couplage, avec un rendement de 58% après purification par chromatographie.

Le spectre RMN ¹H enregistré dans l'acétonitrile-*d*³ est représenté ci-après (**Figure 125**). Un singulet à 2,77 ppm, intégrant pour 12 protons isochrones, correspond aux CH₂ du macrocycle. Les CH₂ des bras méthylpyridine sont également différenciables par la présence de deux singulets à 3,72 ppm (CH₂ du bras méthylpyridine portant la future fonction d'ancrage) et 3,75 ppm pour les deux autres groupes de protons des bras méthylpyridine. Le singulet à 3,58 ppm, intégrant pour trois protons, correspond aux atomes d'hydrogène du groupement CH₃ de la fonction ester méthylique.

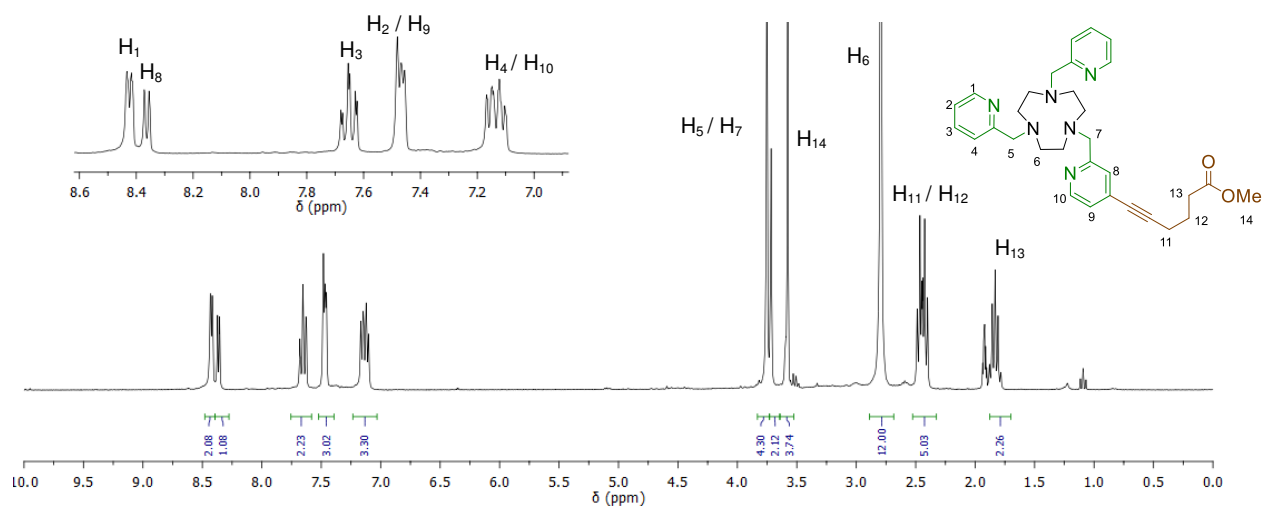


Figure 125 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298K, CD_3CN) et du composé **54**

Sur le spectre RMN ^{13}C en J-modulation, enregistré dans l'acétonitrile- d_3 (**Figure 126**), les groupements CH_2 de la chaîne aliphatique (C_{16} , C_{17} , C_{18}) sont attribués respectivement aux pics positifs à 19,2, 24,5 et 33,4 ppm. Le pic négatif à 52 ppm correspond au groupement CH_3 de la future fonction d'ancrage (C_{20}). Le pic positif à 56,6 ppm correspond au CH_2 du macrocycle (C_7). Les deux pics positifs d'intensité 1:2 à respectivement 65 et 65,3 ppm correspondent au CH_2 des trois groupements méthylpyridine (C_8 et C_6). Les atomes de carbone quaternaires caractéristiques d'une fonction alcyne sont également visibles sur le spectre ^{13}C à respectivement 80,1 et 95 ppm (C_{14} et C_{15}). Les atomes de carbone des groupements méthylpyridine sont présents dans la zone des atomes carbone sp^2 aromatiques et sont indexés sur le spectre (**Figure 126**).

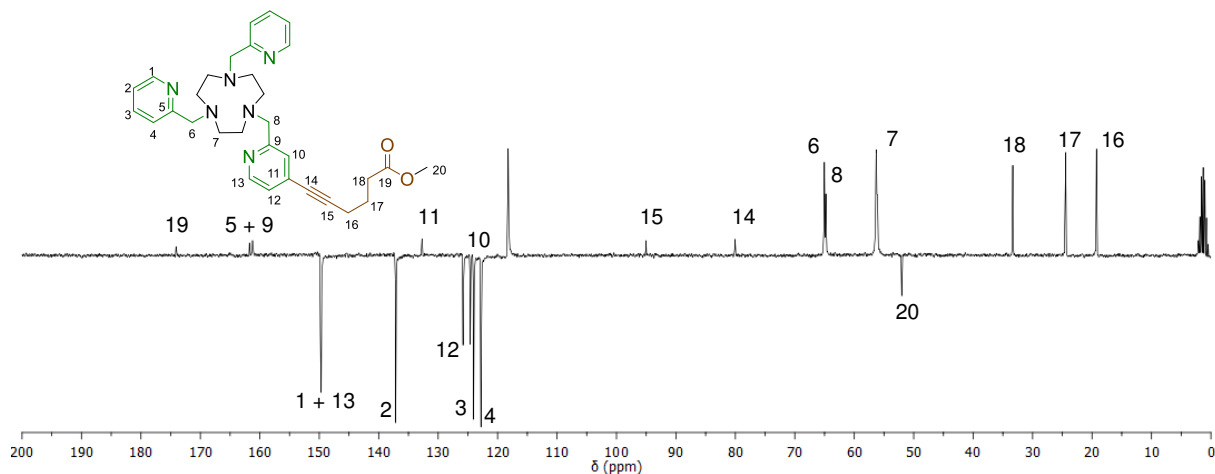


Figure 126 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CD_3CN) du composé **54**

L'étape de saponification permet d'obtenir finalement le ligand **no3pyCOO⁻K⁺** sous sa forme carboxylate avec un rendement global de 25% en 7 étapes à partir du tacn. La déprotection de la fonction ester méthylique en milieu basique a été préférée à l'hydrolyse acide du fait de la faible stabilité de l'alcyne dans ces conditions.

Sur le spectre ¹H (**Figure 127**), la disparition du singulet représentant le groupement CH₃ permet de confirmer la structure du ligand **no3pyCOO⁻K⁺**. Les différents groupes d'atomes d'hydrogène sont indexés sur le spectre ci-après.

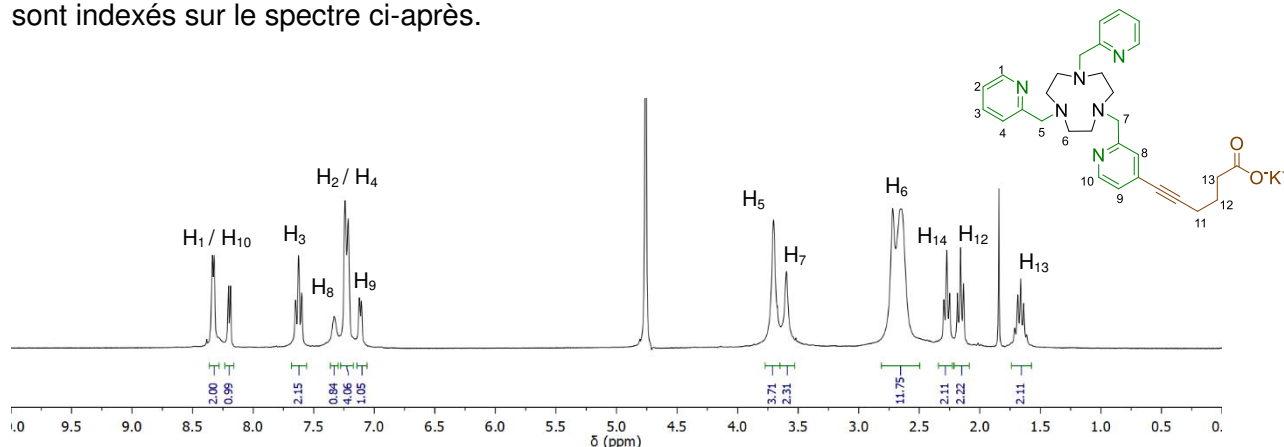


Figure 127 : Spectre RMN ¹H (300 MHz, 298 K, D₂O) du ligand **no3pyCOO⁻K⁺**

Sur le spectre RMN ¹³C en J-modulation, enregistré dans le D₂O (**Figure 128**), la disparition du pic négatif à 52 ppm correspondant au CH₃ ainsi que le déplacement du carbonyle de 174 à 184 ppm permet de confirmer l'obtention du ligand **no3pyCOO⁻K⁺**. Les atomes de carbone sont indexés sur le spectre ci-dessous.

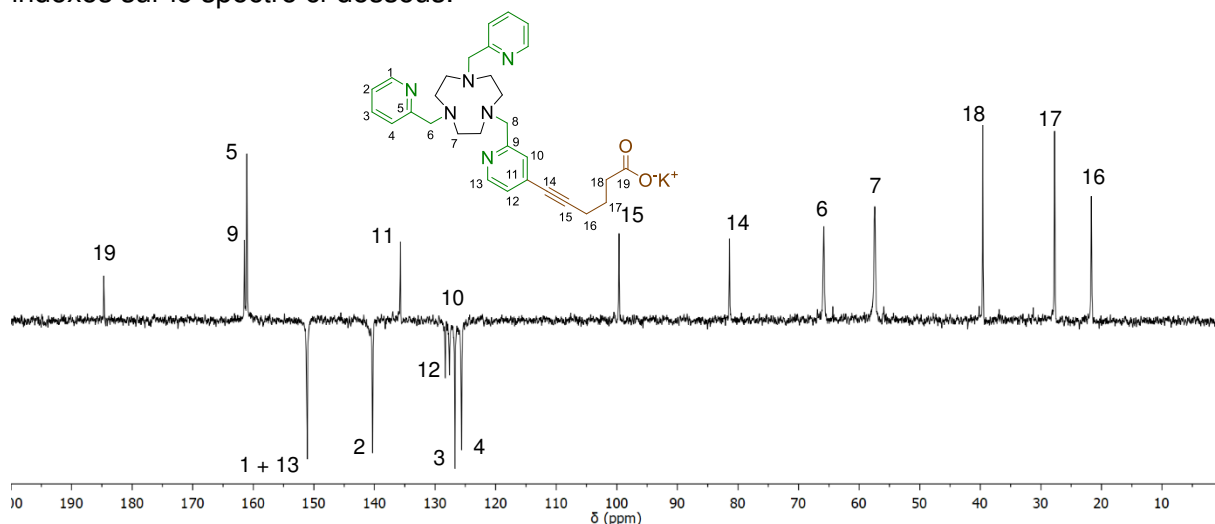


Figure 128 : Spectre RMN ¹³C (75,47 MHz, 298 K, D₂O) du ligand **no3pyCOO⁻K⁺**

3 Synthèse, caractérisation et études in vitro de nouveaux radiopharmaceutiques

Les ligands Hno^{2th1tha}, no^{2thEtBzNCS} et no^{3pyCOO·K⁺} ont été greffés sur un peptide dérivé de la bombésine afin d'élaborer trois nouveaux radiopharmaceutiques potentiels.

Dans un premier temps, l'élaboration des métallopeptides sera détaillée via deux méthodes de synthèse différentes. La première est réalisée par couplage du macrocycle sur support solide et la seconde via un couplage sur un peptide en solution. Le choix des méthodes sera développé un peu plus tard. Les études de radiomarquage des bioconjugués au cuivre-64 seront exposées, en s'intéressant à l'optimisation du radiomarquage dans des conditions douces. La stabilité des radiocomplexes en milieux compétiteurs sera également étudiée. Enfin, les études in vitro de reconnaissance biologique envers les récepteurs GRP seront présentées.

I. Synthèse des métallopeptides d'intérêt

1. Synthèse et caractérisation d'un bioconjugué à partir du no^{2thEtBzNCS}

La synthèse du bioconjugué **56**, constitué du tacn porteur de deux bras méthylthiazole, d'un linker avec une fonction isothiocyanate et du peptide dérivé de la bombésine est effectuée en 3 étapes (**Schéma 42**). Dans un premier temps, le peptide est synthétisé sur support solide (SPPS) en utilisant des acides aminés *N*-protégés par un groupement Fmoc, qui, pour réagir avec la fonction acide carboxylique de l'acide aminé suivant, est déprotégé par la pipéridine. Après synthèse du peptide sur support solide, le macrocycle est greffé sur la partie *N*-terminale. Pour cela, un couplage thiourée est réalisé entre l'amine terminale du groupement acide aminohexanoïque (Ahx) et la fonction isothiocyanate du ligand no^{2thEtBzNCS}. L'hydrolyse des groupements protecteurs Trityl et Boc présents respectivement sur les parties glutamine, histidine et tryptophane du peptide, ainsi que le clivage du peptide sont réalisés avec un mélange acide trifluoroacétique / triisopropylsilyle / H₂O (95 : 2,5 : 2,5 (v :v)). Le bioconjugué est obtenu avec un rendement de 3%, ce qui est usuel pour ce type de composé, après purification par HPLC semi-préparative. Ce faible rendement s'explique par le nombre de purifications nécessaires pour obtenir un produit avec une pureté supérieure à 90%. La complexation par le Cu(II) est réalisée en tampon acétate (pH 5,5) à 45°C pendant 20 minutes en utilisant 1,5 équivalents de chlorure

de cuivre. Le métallopeptide $[\text{natCu}(\mathbf{56})]^{2+}$ est obtenu avec un rendement de 95% après purification sur filtre C_{18} .

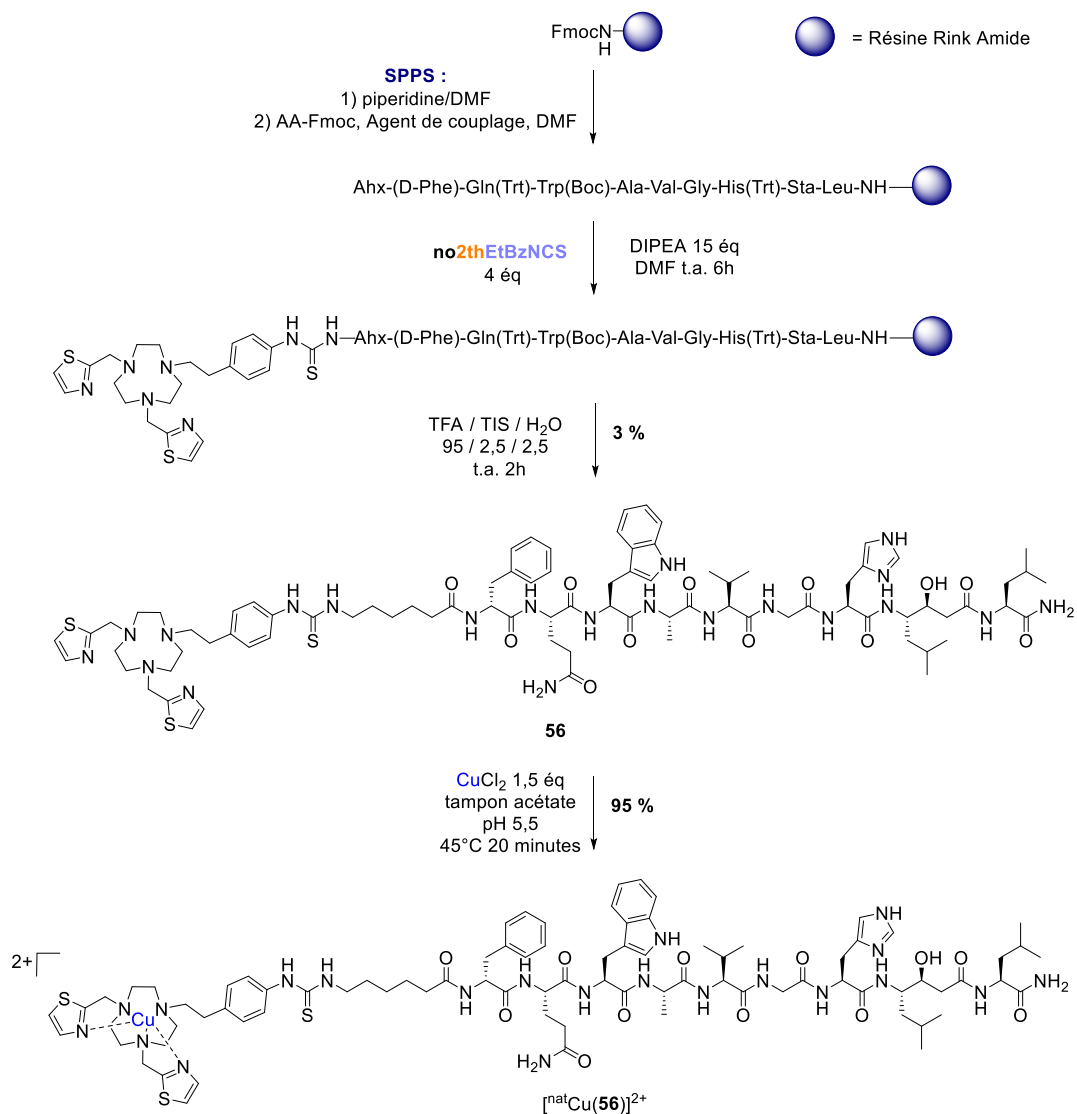


Schéma 42 : Voie de synthèse du $[\text{natCu}(\mathbf{56})]^{2+}$

Sur le chromatogramme HPLC du bioconjugué (**Figure 129**), le peptide **56** est présent en majeure partie (98,1%) avec un temps de rétention de 24,06 minutes. Le métallopeptide $[\text{Cu}(\mathbf{56})]^{2+}$ possède un temps de rétention de 21,40 minutes et une pureté de 91,3%. Les deux composés sont également caractérisés par spectrométrie de masse Haute Résolution et les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 55**).

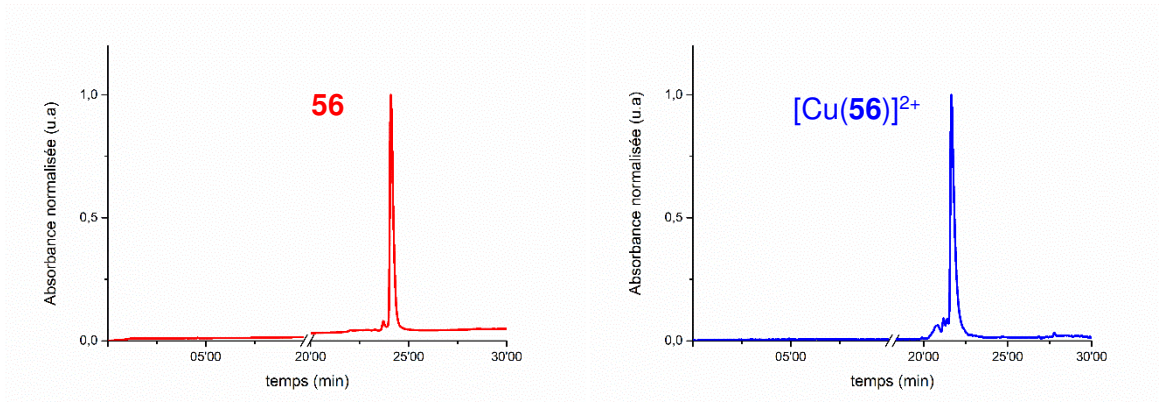


Figure 129 : Chromatogrammes HPLC du composé **56** (rouge) et du complexe de cuivre $[\text{Cu}(\mathbf{56})]^{2+}$ (bleu)

	Formule brute	t_R (min)	Pureté (%)	m/z expérimentale	m/z théorique
56	$\text{C}_{84}\text{H}_{120}\text{N}_{21}\text{O}_{12}\text{S}_3$	24,06	98,1	1710,8581	1710,8582
$[\text{natCu}(\mathbf{56})]^{2+}$	$[\text{CuC}_{84}\text{H}_{119}\text{N}_{21}\text{O}_{12}\text{S}_3]^{2+}$	21,40	91,3	886,3824	886,3897

Tableau 55 : Pureté HPLC des bioconjugués et résultats de l'analyse HRMS

2. Synthèse et caractérisation d'un bioconjugué à partir du Hno2th1tha

La synthèse du second bioconjugué à base du tacn porteur de deux bras méthylthiazole et d'un bras méthylthiazole acide est effectuée sur support solide comme précédemment. Après activation par de l'hexafluorophosphate *N*-diméthylméthaniminium (HATU) de la fonction acide carboxylique du bras méthylthiazole pour accroître sa réactivité, l'ester activé est engagé dans un couplage peptidique sur la fonction NH_2 de la partie *N*-terminale du peptide (**Schéma 43**). Le bioconjugué est isolé avec un rendement de 5% après plusieurs purifications et une pureté de 92,6% déterminée par HPLC (**Figure 130**). La complexation est réalisée en tampon acétate (pH 5,5) à 45°C pendant 20 minutes en utilisant 1,5 équivalents de chlorure de cuivre. Le métallopeptide $[\text{natCu}(\mathbf{58})]^{2+}$ est obtenu avec une pureté de 91,3% (**Figure 130**). Les analyses des bioconjugués et des métallopeptides correspondant par HRMS sont répertoriées dans le tableau ci-après (**Tableau 56**).

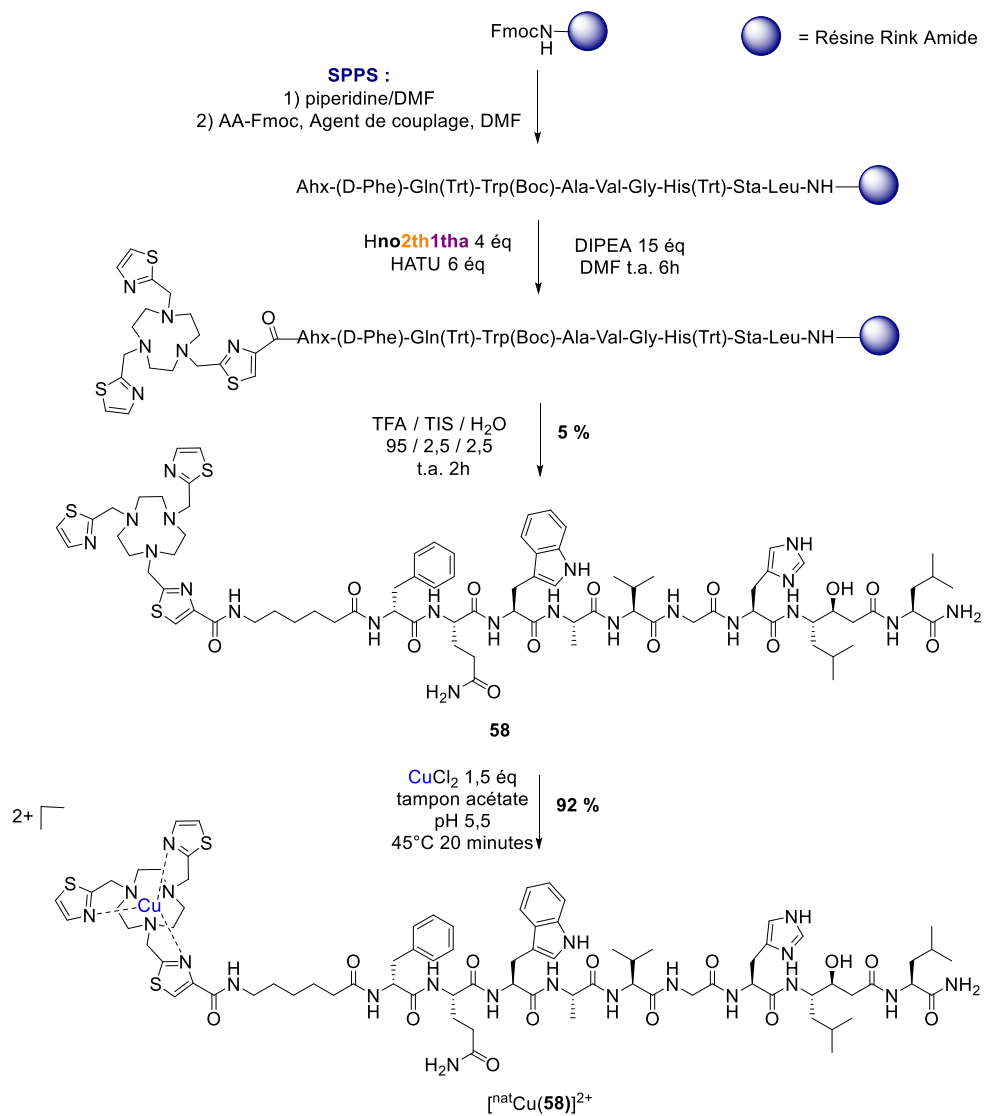


Schéma 43 : Voie de synthèse du dérivé [^{nat}Cu(58)]²⁺

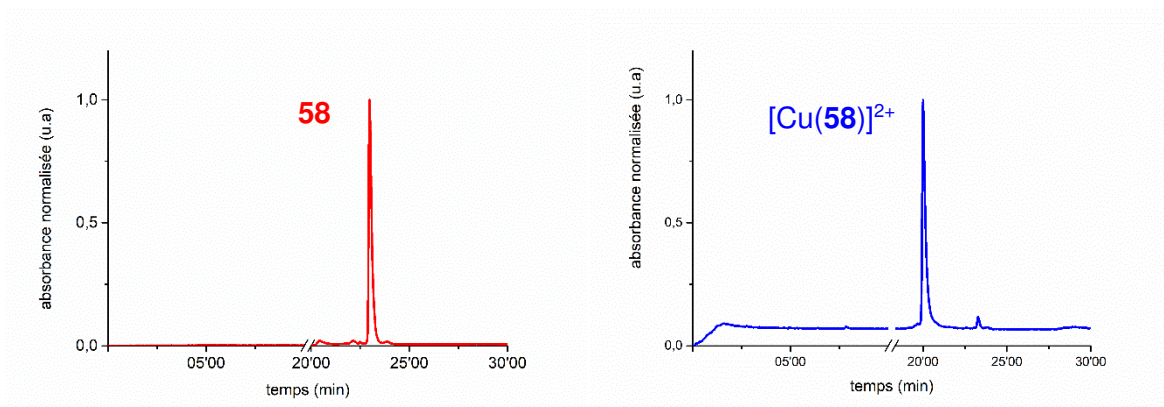


Figure 130 : Chromatogrammes HPLC du composé 58 (rouge) et du complexe [Cu(58)]²⁺ (bleu)

	Formule brute	t _R (min)	Pureté (%)	m/z expérimentale	m/z théorique
58	C ₈₀ H ₁₁₅ N ₂₁ O ₁₃ S ₃	22,6	92,6	1672,8067	1672,8061
[^{nat} Cu(58)] ²⁺	[CuC ₈₀ H ₁₁₅ N ₂₁ O ₁₃ S ₃] ²⁺	20,0	91,3	867,3624	867,3637

Tableau 56 : Pureté HPLC des bioconjugués et résultats de l'analyse HRMS

3. Synthèse et caractérisation d'un bioconjugué à partir du ligand **no3pyCOO·K⁺**

La synthèse du troisième bioconjugué à partir du ligand **no3pyCOO·K⁺** est effectuée par couplage direct sur peptide en solution, en raison de la présence de la triple liaison susceptible de s'hydrolyser lors de la séquence de clivage du peptide du support solide par action du TFA. Cette méthode est cependant beaucoup plus onéreuse que celle utilisée précédemment. La fonction acide carboxylique du ligand **no3pyCOO·K⁺** est dans un premier temps transformée en ester activé par action du hydroxybenzotriazole (HOBt) et du hexafluorophosphate de (1H-benzotriazol-1-yloxy)(tri-1-pyrrolidiny)phosphonium (PyBOP). Le couplage peptidique est effectué à température ambiante dans du diméthylformamide en présence de DIPEA qui joue le rôle de base organique. Le bioconjugué est ensuite purifié par HPLC semi-préparative et isolé avec un rendement de 25% avec une pureté de 99%. La complexation au Cu(II), également réalisée en tampon acétate (pH 5.5) à 45 °C pendant 20 minutes en utilisant 1,5 équivalents de sel métallique, permet après purification d'isoler le métallopeptide [^{nat}Cu(**60**)]²⁺ avec une pureté HPLC supérieure à 99%. L'analyse des chromatogrammes HPLC (**Figure 131**) montre seulement la présence d'un seul produit correspondant au bioconjugué avec un temps de rétention de 20,39 minutes et 21,33 minutes pour le métallopeptide [^{nat}Cu(**60**)]²⁺. Ces résultats corroborent l'analyse par HRMS (**Tableau 57**).

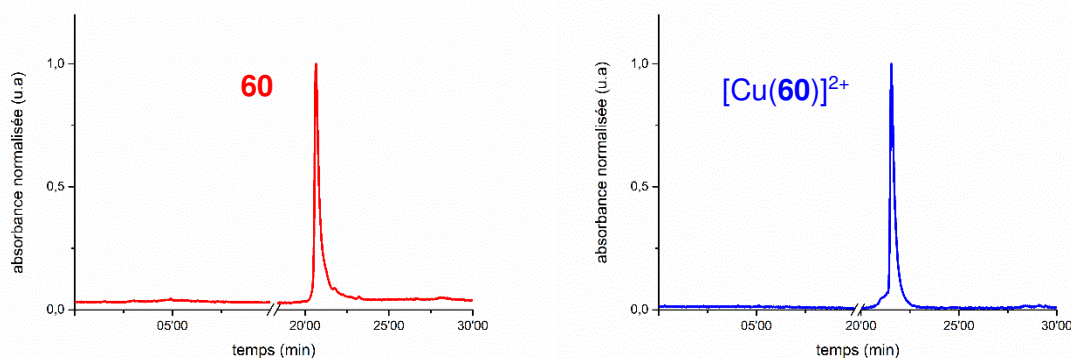


Figure 131 : Chromatogrammes HPLC du composé **60** (rouge) et du complexe [Cu(**60**)]²⁺ (bleu)

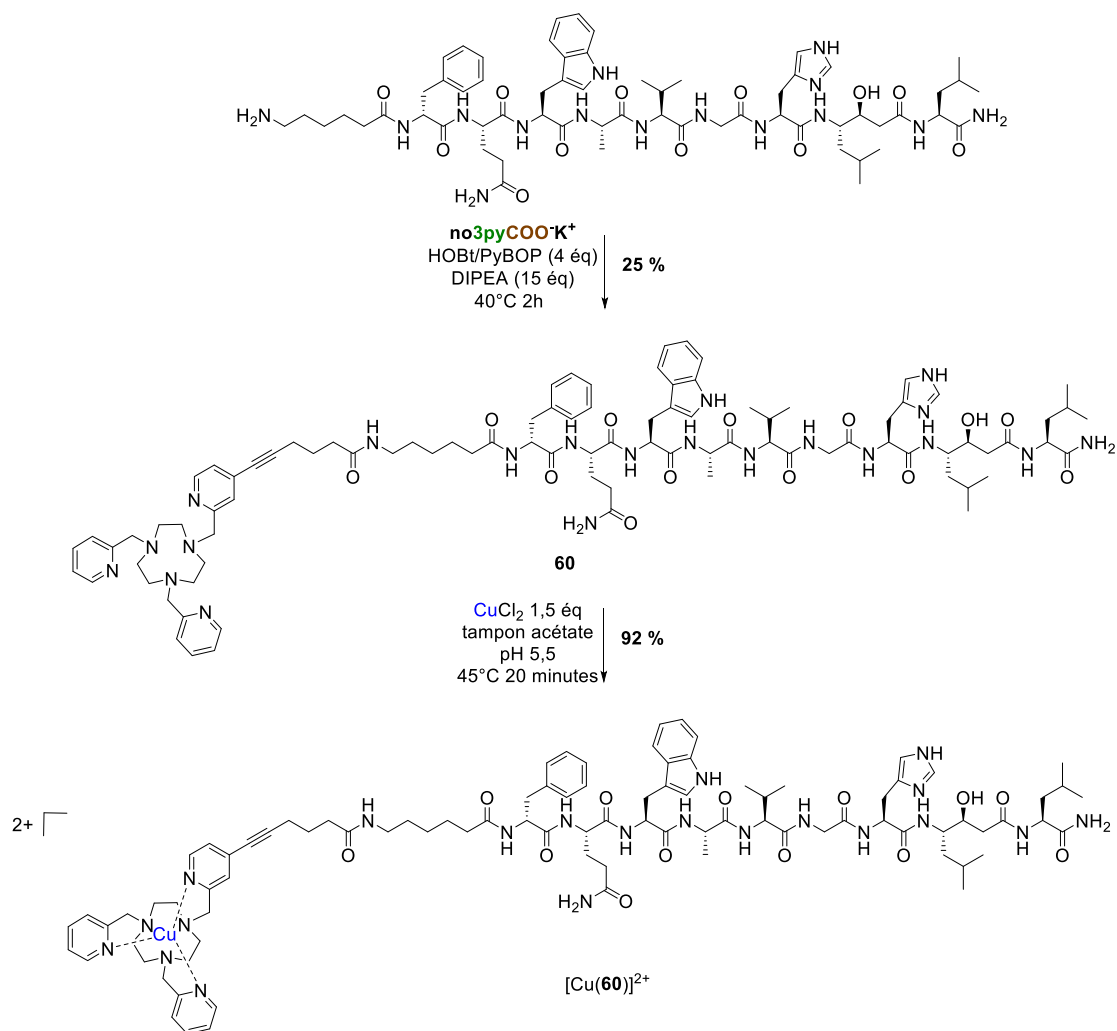


Schéma 44 : Voie de synthèse du composé $[\text{natCu}(\mathbf{60})]^{2+}$

	Formule brute	t_R (min)	Pureté (%)	m/z expérimentale	m/z théorique
60	$\text{C}_{91}\text{H}_{125}\text{N}_{21}\text{O}_{13}$	20,39	99,8	1672,8067	1672,8061
$[\text{natCu}(\mathbf{60})]^{2+}$	$[\text{CuC}_{91}\text{H}_{125}\text{N}_{21}\text{O}_{13}]^{2+}$	21,33	99,9	891,4510	891,4525

Tableau 57 : Pureté HPLC des bioconjugués et résultats de l'analyse HRMS

II. Radiomarquage au ^{64}Cu et stabilité in vitro

Les études préliminaires présentées (**Chapitre I et III**) sur les ligands modèles tels que le **no3py**, **no2th**, et le **Hno2th1tha**, ont montré la capacité de ces ligands à former des complexes stables

avec des cinétiques de métallation rapides avec le Cu(II) [9,11,137]. Ceci laisse envisager que les analogues bioconjugués soient aptes à être radiomarqués dans des conditions similaires. Par conséquent, des études de radiomarquage au cuivre-64 ont été effectuées à la Clinique Universitaire de Fribourg et la stabilité des radioconjugués avec différents compétiteurs a été évaluée.

1. Radiomarquage au ^{64}Cu

Un bioconjugué est considéré comme efficace s'il est apte à être radiomarqué avec une pureté radiochimique (PRC) supérieure à 95% dans des conditions standards (radiomarquage rapide, large gamme de pH, température ambiante). Après radiomarquage au cuivre-64, la pureté radiochimique (PRC) est évaluée par radio-CCM et HPLC. L'influence du pH et de la température sont également étudiées pour jauger des performances des trois bioconjugués.

Pour évaluer la PRC par radio-CCM, un prélèvement de 1 μL de solution après radiomarquage est ajouté à une solution de **dtpa** (1mM) qui complexera le ^{64}Cu libre. Les deux complexes possédant des rapports frontaux différents sur radio-CCM, sont distinguables et leurs proportions respectives sont évaluées par mesure de l'intensité de radiation par compteur gamma.

Un exemple radio-CCM est représenté ci-dessous (**Figure 132**). Sur la radio-CCM du composé **56**, deux espèces radiomarquées sont présentes lors du radiomarquage à pH 7.4 à température ambiante avec une abondance de 37% ($R_f = 1,0$) et 63% ($R_f = 0,1$). La première espèce, migrant jusqu'au front de solvant correspond au complexe $^{64}\text{Cu}(\text{dtpa})$ alors que la seconde correspond au radiocomplexe $^{64}\text{Cu}(\text{56})$.

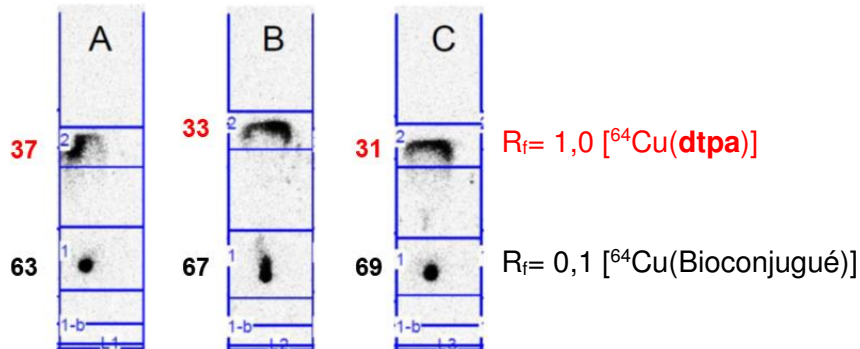


Figure 132 : Radio-CCM des composés $^{64}\text{Cu}(\text{56})$ (A), $^{64}\text{Cu}(\text{58})$ (B) et $^{64}\text{Cu}(\text{60})$ (C) (15 minutes, pH 7,4, 25 °C)

Pour les différents radioconjugués, trois pH ont été testés à 25 et 95 °C. Les résultats obtenus sont représentés dans l'histogramme (**Figure 133**) ci-dessous en fonction du pH et de la température et référencés dans le **Tableau 58**.

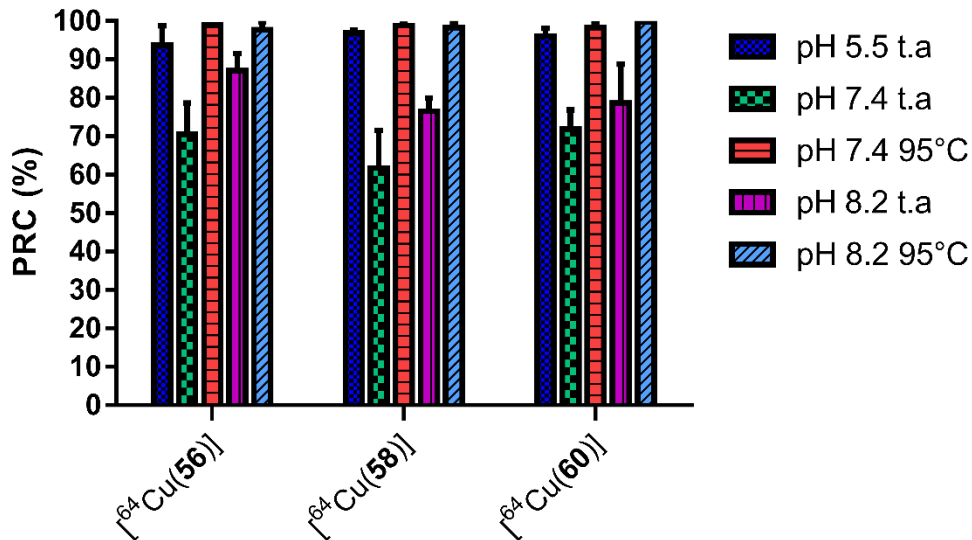


Figure 133 : Pourcentage de pureté radiochimique (PRC) en fonction du pH et de la température

Les études de radiomarquage montrent que les trois bioconjugués ont des comportements similaires en fonction du pH. En effet, à pH 5,5 et température ambiante, le radiomarquage est efficace avec une PRC > 93%. En revanche, à un pH plus élevé (7,4 et 8,2) une décroissance de la PRC est notable, signifiant un radiomarquage moins bon. A ces pH, le radioconjugué [⁶⁴Cu(58)] présente une pureté radiochimique légèrement meilleure que les radioconjugués [⁶⁴Cu(56)] et [⁶⁴Cu(60)]. Néanmoins dès lors qu'un apport thermodynamique est ajouté, on remarque un radiomarquage quantitatif pour chaque dérivé à 95 °C, à pH 7,4 et 8,2.

	pH 5,5 25°C	pH 7,4 25°C	pH 7,4 95°C	pH 8,2 25°C	pH 8,2 95°C
[⁶⁴ Cu(56)]	97 ± 0,71	62 ± 9,79	99 ± 0,35	77 ± 3,44	98 ± 1,23
[⁶⁴ Cu(58)]	94 ± 5,1	71 ± 8,16	99 ± 0,12	87 ± 4,48	98 ± 2,07
[⁶⁴ Cu(60)]	96 ± 2,08	72 ± 5	98 ± 0,87	79 ± 10,21	100 ± 0,01

Tableau 58 : Pureté radiochimique en fonction du pH et de la température

Ces études ont permis de déterminer les conditions optimales de radiomarquage à utiliser pour les trois bioconjugués synthétisés : pH de 5,5 à une température de 45°C pendant 15 minutes, et ainsi éviter un chauffage excessif.

Les radiochromatogrammes HPLC obtenus à partir d'une solution de ligand de concentration 1 mM après 15 minutes d'incubation à 45 °C dans un tampon acétate ont permis de déterminer la conversion radiochimique des bioconjugués (**Figure 134**).

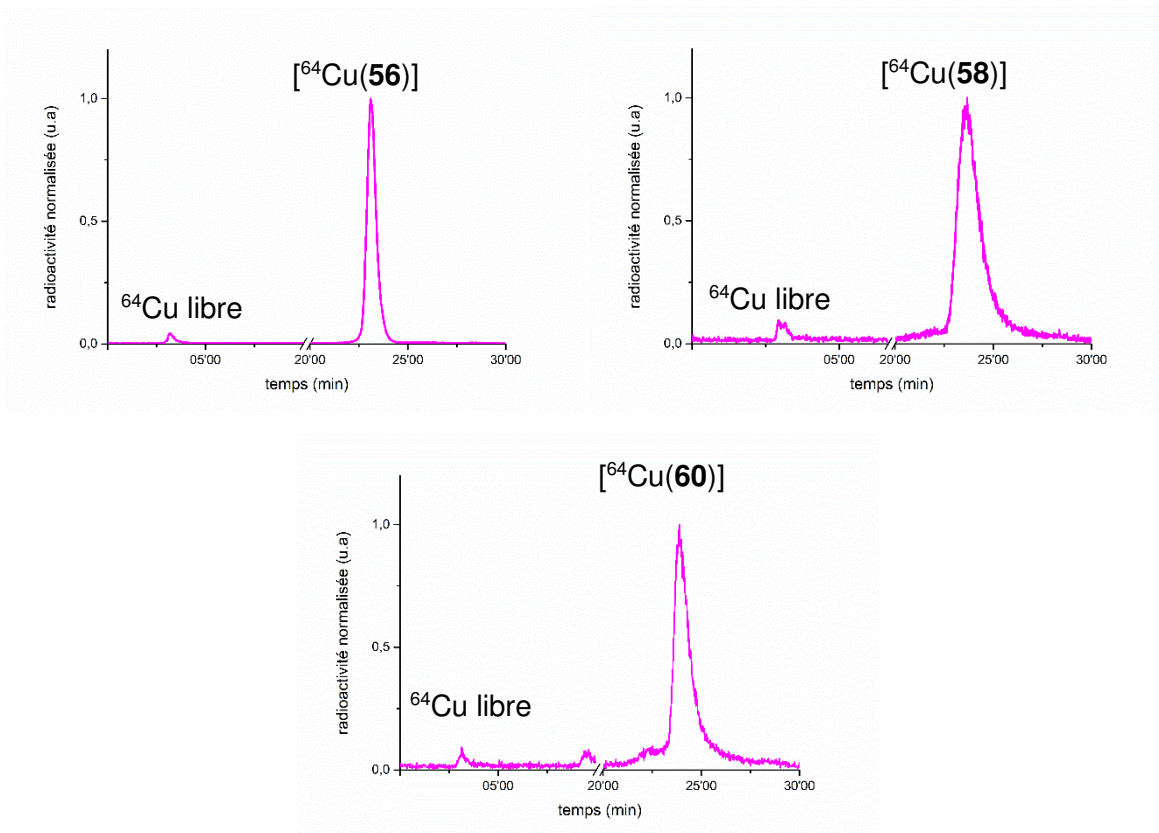


Figure 134 : Radiochromatogrammes HPLC des composés [$^{64}\text{Cu}(\mathbf{56})$], [$^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})$] et [$^{64}\text{Cu}(\mathbf{60})$] après un temps d'incubation de 15 minutes à 45 °C (tampon acétate, pH 5,5)

Sur chaque radiochromatogramme, la présence d'une seule espèce radiomarquée est mise en évidence par celle d'un seul pic intense à des temps de rétention de l'ordre de 23 minutes. Le pic à un temps de rétention de 3,12 minutes correspond au ^{64}Cu libre (non complexé).

	t_R (min)	PRC (%)
[$^{64}\text{Cu}(\mathbf{56})$]	23,07	97
[$^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})$]	23,03	96
[$^{64}\text{Cu}(\mathbf{60})$]	23,57	98

Tableau 59 : Temps de rétention (t_R) et pureté radiochimique (PRC) des radiocomplexes

Pour chaque bioconjugué, les conditions utilisées pour le radiomarquage sont optimales et permettent d'obtenir une PRC de 97% pour le [$^{64}\text{Cu}(\mathbf{56})$], 96% pour le [$^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})$] et 98% pour le

[⁶⁴Cu(**60**)]. Ces résultats quasi-quantitatifs corroborent les études précédentes de complexation des ligands **no2th**, **Hno2th1tha** et **no3py** avec le cuivre « froid ».

2. Lipophilie des radiocomplexes

Les études de mesure du coefficient de dispersion (logD) permettent d'obtenir des informations quant à la lipophilie des composés, qui est un des facteurs influençant la biodistribution lors d'études in vivo. Les composés hydrophobes s'accumulent de manière plus importante dans le foie ou les reins.

La lipophilie des radiocomplexes est mesurée en calculant le coefficient de dispersion des composés entre une phase hydrophobe, l'octan-1-ol, et une phase hydrophile, l'eau. Après un radiomarquage des composés dans les conditions optimales, les complexes (1nM) sont dilués dans 250 µL de tampon phosphate salin (PBS) puis 250 µL de octan-1-ol est ajouté. Les solutions sont agitées pendant 30 minutes à température ambiante, puis séparées. La radioactivité de chaque phase est mesurée en utilisant un compteur gamma. Les valeurs de coefficient de dispersion (log D) sont déterminées en utilisant l'équation suivante :

$$\log D = \frac{[{}^{64}\text{CuX}]_{\text{octanol}}}{[{}^{64}\text{CuX}]_{\text{PBS}}} \quad (2)$$

Équation 8 : Calcul du coefficient de dispersion

[⁶⁴CuX]_{octanol} correspond à la concentration en radiocomplexe présent dans la phase hydrophobe et le [⁶⁴CuX]_{PBS} à la concentration en radiocomplexe restant dans la phase aqueuse. Les valeurs obtenues sont réunies dans le tableau ci-après (**Tableau 60**).

	[⁶⁴ Cu(56)]	[⁶⁴ Cu(58)]	[⁶⁴ Cu(60)]	[⁶⁴ Cu(dota-RM2)]
logD	-0,83 ± 0,00	-1,64 ± 0,03	-1,28 ± 0,03	-2,27 ± 0,02

Tableau 60 : Valeurs des coefficients de dispersion des radiocomplexes

Il est à noter que les valeurs de coefficient de dispersion diffèrent en fonction du macrocycle introduit sur le peptide. Le dérivé [⁶⁴Cu(**56**)] a un caractère significativement plus hydrophobe que

les deux autres radiocomplexes, ce qui est probablement dû à la présence d'un groupement benzyle sur la molécule.

D'une manière générale, pour les composés $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})]$ et $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{60})]$ les bras méthylthiazole ont un caractère moins hydrophobe que les méthylpyridine, ce qui se traduit par une meilleure hydrophilie du composé $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})]$. Ces deux radiocomplexes ont des coefficients de dispersion légèrement supérieurs à celui du $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{dota-RM2})]$.

3. Stabilité in vitro avec un ligand compétiteur

Des tests de stabilité des dérivés $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{56})]$, $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})]$ et $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{60})]$ sont réalisés en présence de $\text{H}_5\mathbf{dtpa}$ afin d'évaluer la stabilité des radiocomplexes en présence d'un ligand compétiteur. Après l'étape de radiomarquage des bioconjugués, un excès de \mathbf{dtpa} (75 000 équivalents) jouant le rôle de compétiteur est ajouté aux solutions contenant les espèces radiomarquées. La stabilité est testée à température ambiante à pH physiologique, après 24h, et suivie par radio-CCM (**Figure 135**).

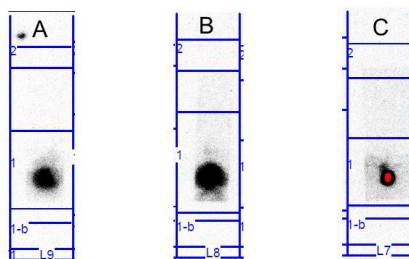


Figure 135 : Radio-CCM des radiocomplexes $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{56})]$ (A) $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})]$ (B) $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{60})]$ (C) après 24h d'incubation dans une solution contenant un excès de $75 \cdot 10^3$ de \mathbf{dtpa} (25°C, pH 7,4)

Les radio-CCM présentées ci-dessus (**Figure 135**) mettent en évidence la stabilité des complexes formés car on n'observe aucune tache présentant un R_f de 1,0 correspondant au complexe $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{dtpa})]$. Les PRC, mesurées après l'étude de compétition à température ambiante sont présentées dans le **Tableau 61** ci-après. Les résultats obtenus montrent que les trois radiocomplexes sont inertes après 24h d'incubation à température ambiante. La stabilité des complexes $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{58})]$ et $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{60})]$, possédant une sphère de coordination de type CuN_6 , est légèrement supérieure à celle du complexe pentacoordiné $[^{64}\text{Cu}(\mathbf{56})]$ (perte de 3% après 24h).

Pureté radiochimique (PRC) en %	
[⁶⁴ Cu(56)]	97± 3,45
[⁶⁴ Cu(58)]	99± 0,10
[⁶⁴ Cu(60)]	99± 0,15

Tableau 61 : Pureté radiochimique après 24h de compétition en présence de H₅dtpa

H. S. Chong *et al.* ont réalisé une étude sur des composés similaires comme le ligand H₂no2aEtBzNO₂, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupements acétate et un groupement 4-nitrophénéthyle et le ligand H₂no2a1py, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux bras acétate et un groupement méthylpyridine (**Figure 136**) vis-à-vis de la stabilité des complexes radiomarqués au cuivre-64 en présence de 100 équivalents d'H₄edta [178].

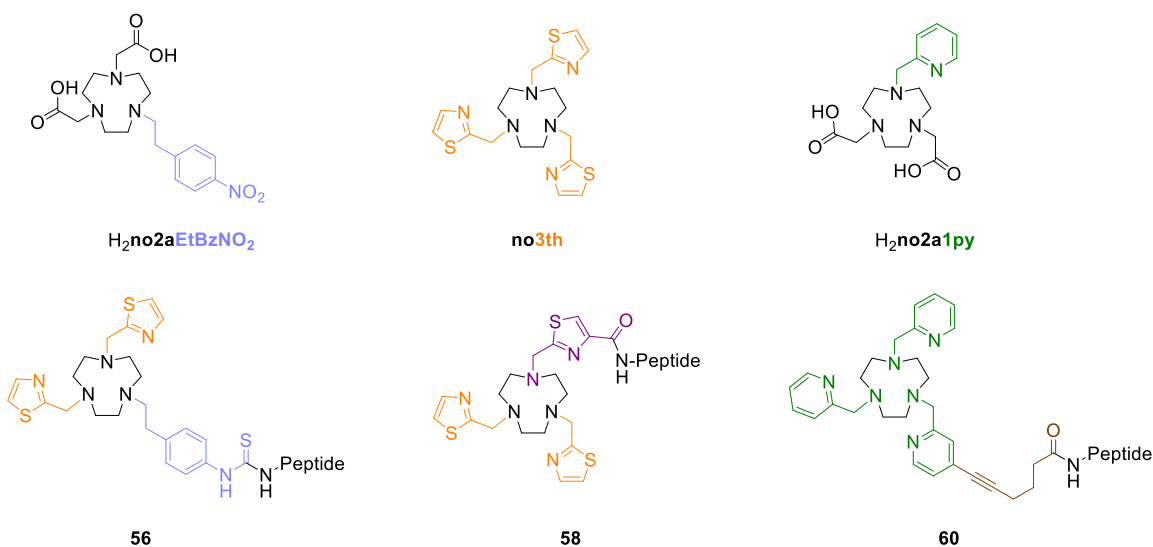


Figure 136 : Structure des ligands discutés dans cette partie [138,178]

Comparé au [⁶⁴Cu(**56**)] dont la dissociation du complexe est de 3%, la dissociation du complexe formé avec le H₂no2aEtBzNO₂ de 19,4% après une incubation à 37°C pendant 24h est beaucoup plus importante. En outre, le complexe [⁶⁴Cu(**no2a1py**)] a une stabilité très faible en milieu compétiteur puisque 94,3% du complexe se dissocie en 24h [178], contrairement au [⁶⁴Cu(**60**)].

Cette étude met en évidence la faible stabilité des complexes de cuivre-64 formés avec des ligands possédant des groupements acétate. Ces résultats témoignent de nouveau, de l'importance d'une fonctionnalisation par des bras méthylthiazole ou méthylpyridine pour la stabilité des radiocomplexes de cuivre-64.

4. Stabilité in vitro avec un métal compétiteur

Une des voies possibles de dissociation de complexes en milieu biologique est la transmétallation par des métaux endogènes. La stabilité des composés a également été étudiée en présence d'un métal compétiteur. Afin d'évaluer la stabilité des complexes formés, les radioconjugués (0,01 nM) sont incubés à 25 °C pendant 24h dans un tampon HEPES (pH 7,4) en présence de 40 équivalents de cuivre non radioactif. L'étude de la stabilité des dérivés [⁶⁴Cu(**56**)], [⁶⁴Cu(**58**)] et [⁶⁴Cu(**60**)] est suivie par radio-CCM (**Figure 137**). Les résultats obtenus (**Tableau 62**) témoignent de la grande inertie cinétique des complexes puisqu' aucune trace de ⁶⁴Cu libre n'apparaît sur les radio-CCM.

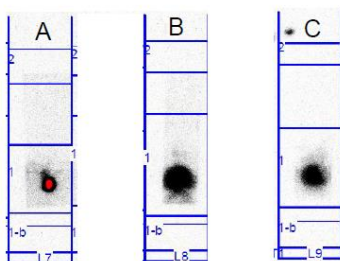


Figure 137 : Radio-CCM des radiocomplexes [⁶⁴Cu(**56**)] (A) [⁶⁴Cu(**58**)] (B) [⁶⁴Cu(**60**)] (C) après 24h d'incubation dans une solution contenant 40 équivalents de ^{nat}Cu(II) (25 °C, pH 7,4)

	Pureté radiochimique (PRC) en %
[⁶⁴ Cu(56)]	100
[⁶⁴ Cu(58)]	100
[⁶⁴ Cu(60)]	100

Tableau 62 : Pureté radiochimique après 24h de compétition en présence de ^{nat}Cu(II)

Ces études ont été réalisées en se basant sur les travaux de Maheshwari *et al.*^[179] sur des complexes dérivés du **H₄dota**, **H₄teta** et **H₃nota**. La très faible stabilité des complexes de [⁶⁴Cu(**dota**)]²⁻ a été mise en évidence par une compétition avec 5 équivalents de ^{nat}Cu(II), qui entraîne une dissociation de 95% du radiocomplexe en seulement 6h à pH physiologique et température ambiante.

Les valeurs obtenues sont en accord avec les études réalisées par M. D. Bartholomä *et al.* sur le du **no3th** complexe radiomarqué au cuivre-64 (**Figure 136**) qui fait part d'une très faible dissociation (0,5% en 24h) ^[138]. Ces résultats montrent à nouveau l'intérêt de l'utilisation de bras méthylthiazole et méthylpyridine pour la synthèse de complexes de Cu(II) stables.

III. Etudes in vitro : Affinité Biologique (IC₅₀)

L'affinité des bioconjugués ainsi que des métallopeptides de cuivre (II), pour les récepteurs GRP a été déterminée sur une lignée cellulaire du cancer de la prostate humain (PC3). Le **dota-RM2**, peptide fonctionnalisé par un espaceur de type pipérazine comportant un cyclen fonctionnalisé par quatre groupements acétate est chargé (+2) à pH physiologique. L'objectif de cette étude a pour but d'étudier, à charge égale sur la partie *N*-terminale du peptide, l'influence du macrocycle sur l'affinité biologique des bioconjugués.

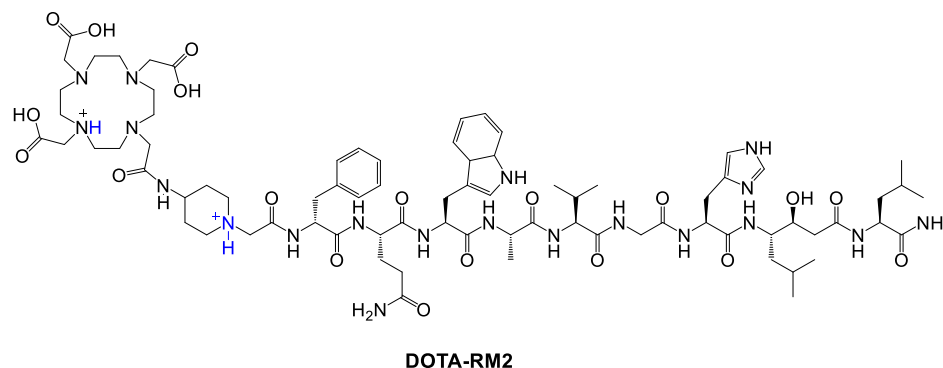


Figure 138 : Structure possible du **DOTA-RM2** à pH physiologique

1. Affinité Biologique des bioconjugués **56**, **58** et **60**

D'après les études potentiométriques réalisées sur les dérivés **no2th**, **Hno2th1tha**, et **no3py** seule l'espèce mono-protonée LH⁺ est présente en solution à pH physiologique [9,137]. Comme vu précédemment, l'introduction d'une charge positive sur la partie *N*-terminale d'un peptide a tendance à diminuer les valeurs d'IC₅₀ et, par conséquent, à augmenter l'affinité biologique d'un radiopharmaceutique. Nous avons, dans un premier temps, entrepris l'étude de l'affinité biologique des peptides non métallés afin de la comparer dans un second temps avec les métallopeptides correspondants.

Expérimentalement, un test de compétition est effectué entre le peptide radiomarqué à l'iode-125, le [¹²⁵I]-Tyr⁴-bombésine et le peptide d'intérêt. La concentration du peptide radiomarqué reste fixe alors que la quantité du bioconjugué étudié varie du pM au μM. L'IC₅₀ correspond à la concentration à laquelle 50% des récepteurs sont occupés par les peptides d'intérêts. Chaque expérience est réalisée deux fois avec huit concentrations différentes en

peptide d'intérêt. Ces études sont également exécutées en triplicat. Les courbes d'intensité de radioactivité en fonction de la concentration en bioconjugués sont représentées ci-dessous (**Figure 139**).

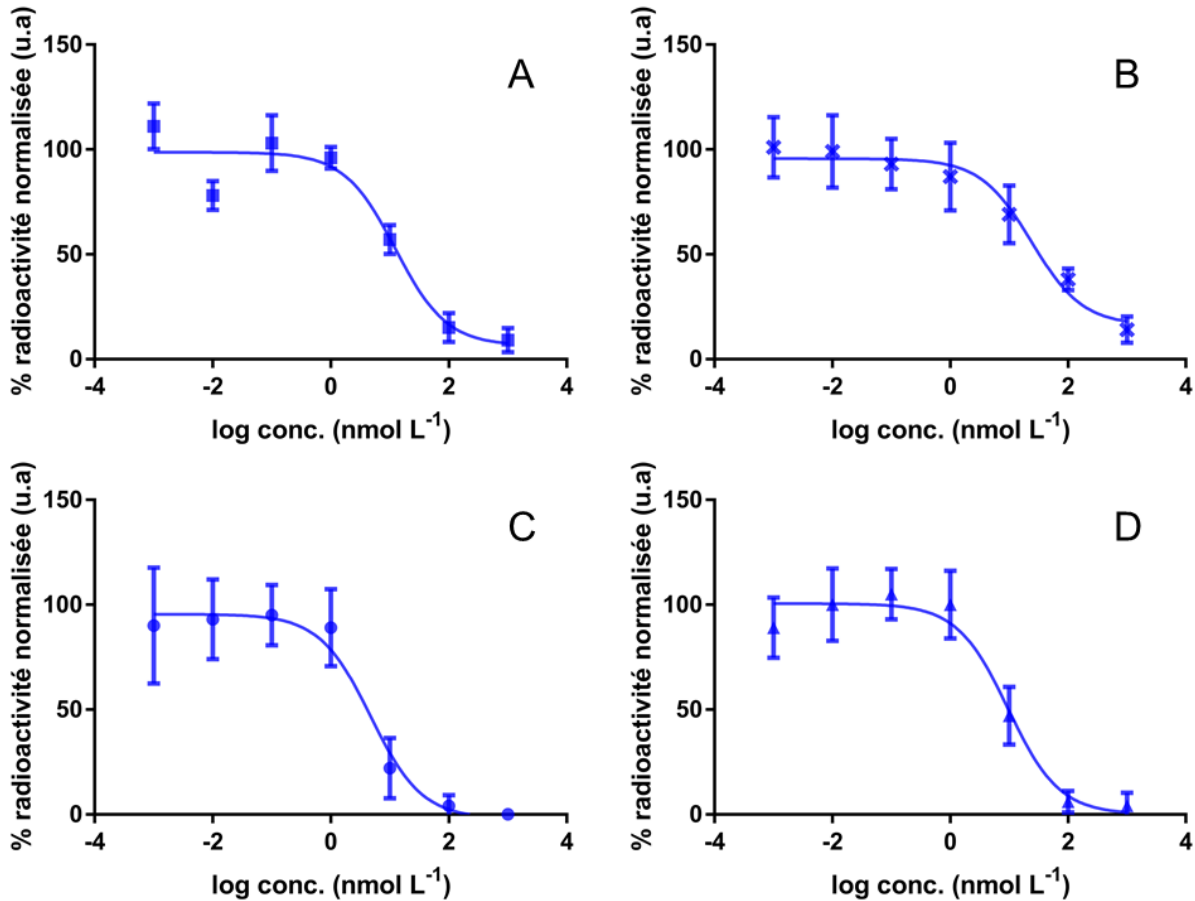


Figure 139 : Courbes d'affinité biologique en fonction de la concentration du **dota-RM2** (A), **56** (B), **58** (C) et de **60** (D)

Comme le montrent les courbes d'affinité biologique ci-dessus (**Figure 139**), la réaction de compétition a pour but de déplacer l'équilibre entre la [¹²⁵I]-Tyr⁴-bombésine et les composés **56**, **58** et **60**. Pour des concentrations en peptides de l'ordre du picomolaire, 100% des récepteurs GRP sont initialement occupés par la [¹²⁵I]-Tyr⁴-bombésine. Plus la concentration en bioconjugué d'intérêt augmente, plus le pourcentage de radioactivité décroît. Pour des concentrations de l'ordre du µM, il n'y a plus de radioligand lié aux récepteurs. Un traitement mathématique des données en utilisant le logiciel GraphPad Prism permet d'obtenir les valeurs d'IC₅₀ réunies dans le tableau ci-après (**Tableau 63**).

	dota-RM2	56	58	60
IC ₅₀ (nM)	12,5	24,1	4,5	11,6

Tableau 63 : Valeurs d'IC₅₀ des composés **56**, **58**, **60** et de la référence **dota-RM2**

Les résultats obtenus démontrent que chaque bioconjugué adopte un caractère différent vis-à-vis du ciblage des récepteurs GRP. La valeur d'IC₅₀ du **dota-RM2** (utilisé comme référence) a été remesurée dans les conditions utilisées avec les bioconjugués **56**, **58** et **60** et est de 12,5 nM. Cette valeur diffère un peu de celle reportée dans la littérature qui est de 7,7 nM ^[165].

Le composé **56**, peptide intégrant un tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux groupement méthylthiazole et un espaceur benzylé, possède un IC₅₀ de l'ordre de 24 nM, et cible nettement moins les récepteurs GRP. Le composé **60** a un IC₅₀ égal à 11,6 nM, qui est du même ordre de grandeur que le **dota-RM2**. La valeur d'IC₅₀ de 4,5 nM témoigne de la très bonne affinité du dérivé **58**, peptide fonctionnalisé par un tacn tri-*N*-fonctionnalisé par deux bras méthylthiazole et un groupement méthylthiazole acide, pour les récepteurs GRP.

H. R. Maecke *et al.* ont étudié également l'affinité biologique du **cb-te2a-AR06** (**Figure 113**, p188) utilisé en clinique pour la complexation du ⁶⁴Cu et le diagnostic du CaP. L'IC₅₀ du bioconjugué reporté dans cette étude est de 5,5 nM ^[180]. Le composé **58** apparait donc comme un potentiel candidat pour des études in vivo puisqu'il possède a priori un meilleur IC₅₀ que deux des radiopharmaceutiques utilisés en clinique.

2. Affinité Biologique des métallopeptides [^{nat}Cu(**56**)], [^{nat}Cu(**58**)] et [^{nat}Cu(**60**)]

Les mêmes expériences ont été réalisées (**Figure 140**) sur les métallopeptides afin de déterminer, à charge égale, l'influence du macrocycle par rapport au **dota-RM2**. Une diminution de l'IC₅₀ est attendue en accord avec l'introduction d'une nouvelle charge positive via l'utilisation des complexes de cuivre (II). D'après les valeurs déterminées expérimentalement, l'affinité des métallopeptides est du même ordre de grandeur que celle de leurs analogues non métallés (**Tableau 64**).

Les dérivés [^{nat}Cu(**58**)] et [^{nat}Cu(**60**)] ont respectivement un IC₅₀ de 3,0 et 9,7 nM. Ces valeurs montrent que l'introduction d'une nouvelle charge positive en utilisant des complexes de cuivre(II) entraîne par conséquent une amélioration du ciblage des récepteurs GRP. Ce constat n'est pas

vérifié pour le composé [^{nat}Cu(**56**)] puisqu'il possède un IC₅₀ de 46,6 nM qui est deux fois plus élevé que le dérivé non métallé.

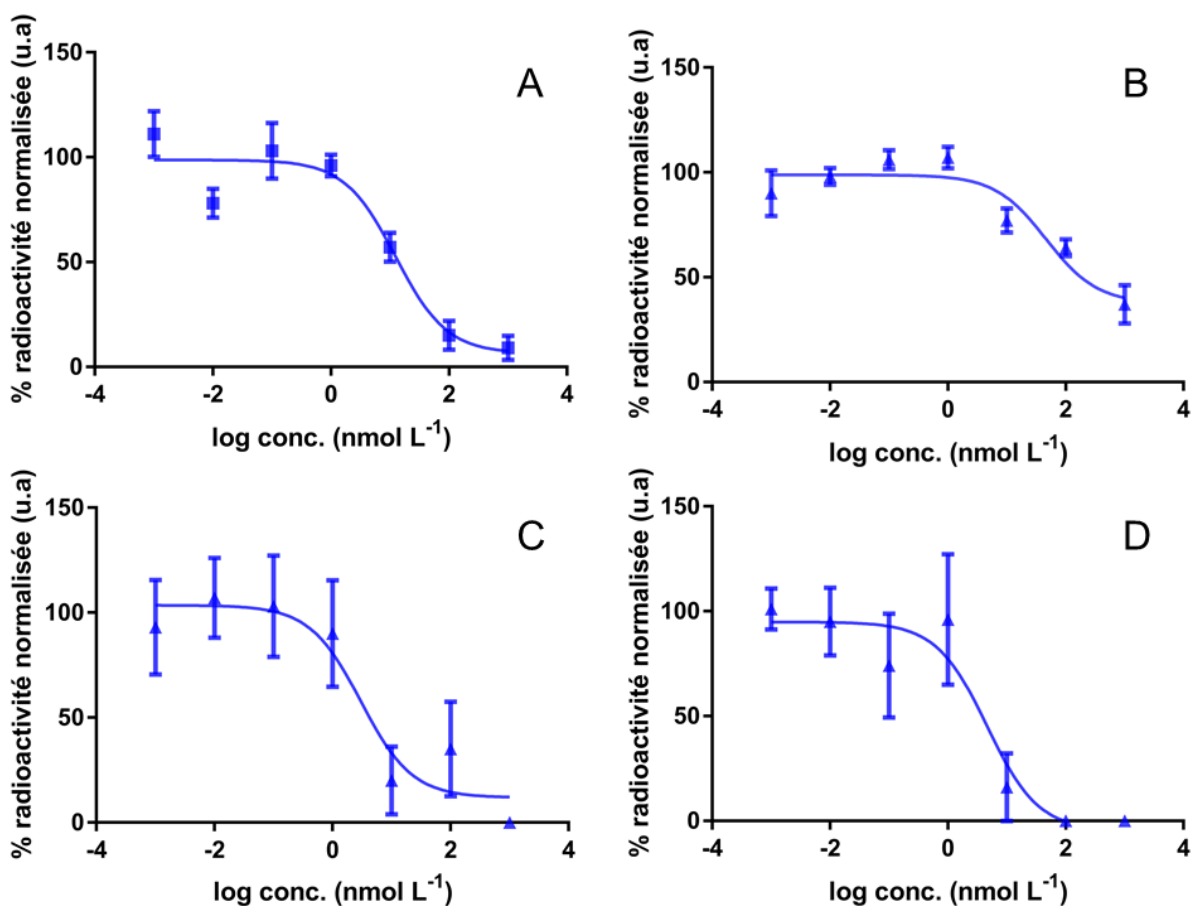


Figure 140 : Courbes d'affinité biologique en fonction de la concentration du **dota-RM2** (A), [^{nat}Cu(**56**)]²⁺ (B), [^{nat}Cu(**58**)]²⁺ (C) et du [^{nat}Cu(**60**)]²⁺ (D).

	dota-RM2	[^{nat} Cu(56)]	[^{nat} Cu(58)]	[^{nat} Cu(60)]
IC ₅₀ (nM)	12,5	46,6	3,0	9,7

Tableau 64 : Valeurs d'IC₅₀ (nM) des métallopeptides [^{nat}Cu(**56**)], [^{nat}Cu(**58**)], [^{nat}Cu(**60**)] et de la référence **dota-RM2**

Finalement, l'hypothèse faite vis-à-vis de l'importance de la présence d'une charge positive en partie N-terminale du bioconjugué est bien vérifiée pour deux des composés. Le complexe [^{nat}Cu(**60**)] cible tout aussi bien les récepteurs GRP que le **dota-RM2**. Le composé [^{nat}Cu(**58**)] avec un IC₅₀ de 3,0 nM les cible quant à lui de manière plus efficace.

Conclusion du chapitre IV

Pour donner suite aux études physicochimiques des complexes de Cu(II) des dérivés tacn *N*-substitués par des groupements méthylthiazole ou méthylpyridine (**no2th**, **no3th** et **no3py**), la synthèse d'Agents Chélatants Bifonctionnels de 1^{ère} et 2^{nde} génération pour un couplage sur vecteur biologique a été effectuée. La stratégie de synthèse mise au point pour la synthèse des dérivés **no2thEtBzNCS** et **no3pyCOOH**, a permis d'obtenir ces deux dérivés bifonctionnels avec des rendements acceptables malgré les difficultés de purification rencontrées. Le **Hno2th1tha**, quant à lui, développé dans le chapitre III, a été utilisé comme ACB du **no3th**.

Nous avons ainsi pu étudier deux méthodes de bioconjugaison via un couplage peptidique ou un couplage de type thiouré. Les macrocycles bifonctionnels ont pu être greffés sur un peptide dérivé de la bombésine et les bioconjugués ont été obtenus avec des rendements faibles, mais usuels dans ce domaine et qui s'expliquent simplement par les purifications délicates réalisées par HPLC.

Des tests de radiomarquage au cuivre-64 ont également permis de démontrer que le radionucléide était totalement complexé, sur une grande gamme de pH à température ambiante, 45 °C ou encore 95 °C. Les études de stabilité vis-à-vis de la transchélation (**dtpa**) ou de transmétallation (^{nat}Cu(II)) ont mis en évidence les excellentes inerties des trois radioconjugués puisqu'aucune dissociation des complexes n'a été observée après 24h.

Enfin, les études d'affinité biologique réalisées sur les bioconjugués et les métallopeptides ont permis de montrer que la charge et la nature du ligand avaient une influence sur les valeurs d'IC₅₀. Avec des IC₅₀ de 9,7 et 3,0 nM pour les métallopeptides [Cu(**60**)]²⁺ et [Cu(**58**)]²⁺, ces deux dérivés ciblent de manière efficace les récepteurs GRP, et sont aussi bons que le **dota-RM2** (IC₅₀ = 12,5 nM), référence actuelle utilisée en test clinique. En revanche, le métallopeptide formé à partir du dérivé bifonctionnel du **no2th** ([Cu(**56**)]²⁺), permet un moins bon ciblage avec un IC₅₀ de 46,6 nM.

Ces résultats prometteurs, montrent une nouvelle fois l'intérêt de fonctionnaliser le tacn par des bras méthylthiazole et méthylpyridine. En revanche, l'élaboration d'ACB de 1^{ère} et 2^{ème} génération reste complexe à mettre en œuvre et nécessite au préalable de synthétiser le bras bifonctionnel. Il est possible de faire encore mieux en s'intéressant à l'élaboration d'une plateforme C-fonctionnalisée adaptable à n'importe quel ligand.

Chapitre V : Elaboration d'une nouvelle plateforme
à base de triazacycloalcanes C-fonctionnalisés

INTRODUCTION

Les résultats encourageants obtenus dans les chapitres précédents avec les dérivés bioconjugués des dérivés **no3th** et **no3py** nous ont conduits à nous interroger sur la position de la fonction de conjugaison dans nos composés. Le fait de la placer sur un des bras coordinants entraîne probablement une variation des propriétés chélatantes du bras impliqué. Nous avons alors considéré la possibilité de greffer le peptide ou l'anticorps potentiel sur le macrocycle lui-même via un atome de carbone du cycle.

Cette possibilité nous permettrait de disposer d'une plateforme bioconjuguable, facile à transformer en greffant, à souhait, les bras coordinants nécessaires selon l'application visée. Cet objectif implique cependant de contrôler la synthèse du tacn *C*-fonctionnalisé, ce qui a déjà fait l'objet de quelques recherches par différents groupes.

1 Rappels sur la C-fonctionnalisation du tacn

I. Synthèse de tacn C-fonctionnalisés selon une méthode dérivée de celle de Richman et Atkins

Comme présenté dans le chapitre I, une des méthodes les plus connues pour l'élaboration du tacn reste celle développée par J. E. Richman et T. J. Atkins [48]. Plusieurs groupes ont adapté cette synthèse pour l'élaboration de triazacyclononanes C-fonctionnalisés [176,181–183]. En 1989, D. Parker, par exemple, a synthétisé un dérivé du H₃nota porteur d'une chaîne butylamine utilisée ultérieurement pour une conjugaison à un anticorps [181]. La voie de synthèse de la plateforme macrocyclique est présentée ci-dessous (**Schéma 45**).

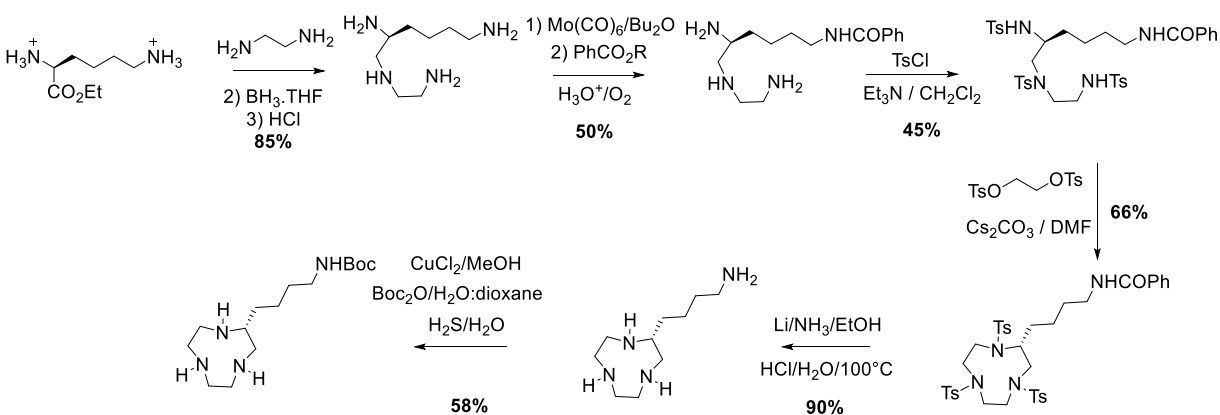


Schéma 45 : Voie de synthèse d'une plateforme C-fonctionnée du tacn décrite par D. Parker *et al.* [115]

La première étape est une condensation de l'éthylènediamine sur la (S)-lysine, suivie d'une réduction de la fonction amide par action du BH₃.THF. L'ajout de molybdène hexacarbonyle permet de protéger trois fonctions amine par formation d'un complexe [Mo(L)(CO)₃], ce qui laisse la quatrième amine disponible pour être N-fonctionnée par un groupement de type benzoyle. Une première étape de tosylation permet de préorganiser la polyamine linéaire afin d'effectuer une cyclisation [1+1] par ajout d'éthylèneglycol ditosylate. Le macrocycle obtenu peut ensuite être déprotégé afin d'obtenir un tacn C-fonctionné par un groupement butylamine avec un rendement total de 6% en six étapes.

C. F. Meares *et al.* ont mis au point, en 1992, une méthode de synthèse du H₃nota C-fonctionné par une fonction de type aniline [184] au départ de la 4-nitrophénylalanine

N-protégée par un groupement Boc (**Schéma 46**). La première étape consiste à introduire un composé bis-glycinique sur la fonction acide carboxylique du dérivé de la 4-nitrophénylalanine afin d'obtenir le futur squelette carboné et azoté macrocyclique. Après réduction des fonctions acide carboxylique et amide, protection des fonctions amine par des groupements tosylo et activation de la fonction alcool, le composé est engagé dans une étape de cyclisation intramoléculaire. Le macrocycle est déprotégé en présence d'acide sulfurique concentré puis une tri-*N*-fonctionnalisation des fonctions amine secondaires est possible en milieu basique en présence d'acide bromoacétique. Enfin, la fonction nitrobenzyle est réduite en fonction aniline afin d'obtenir un analogue *C*-fonctionnalisé greffable. Cette synthèse intéressante, en huit étapes, présente cependant quelques rendements moyens, notamment les étapes de tosylation de la triamine et celle de cyclisation, ce qui conduit à un rendement global de 3%.

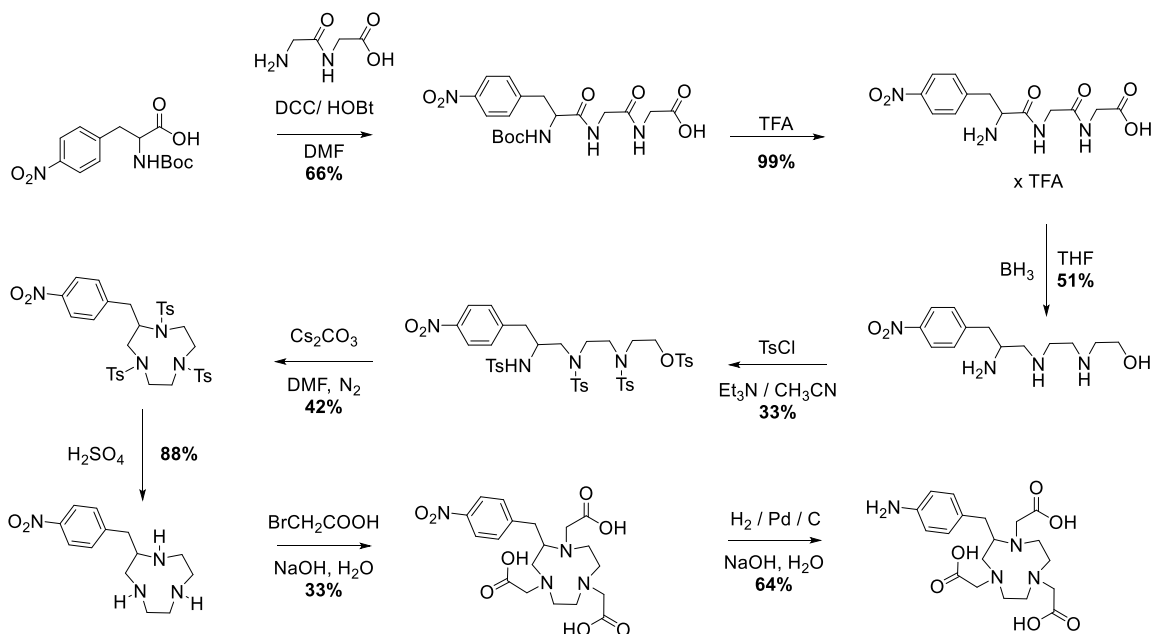


Schéma 46 : Voie de synthèse d'un dérivé du H₃nota *C*-fonctionnalisé selon C. F. Meares *et al.* [184]

En 2003, C. L. Gibson a, quant à lui, synthétisé le 2-(isopropyl)-1,4,7-triazacyclononane (**Schéma 46**). Il souligne la nécessité de développer un protocole d'alkylation et de cyclisation *in situ* pour favoriser la cyclisation et éviter les réactions de polymérisation observées avec les conditions classiques de Richmann et Atkins, celles-ci étant dues, selon les auteurs, à la présence du groupement isopropyle sur la chaîne carbonée [182]. L'amine linéaire tritosylée est ainsi traitée avec un équivalent d'hydruure de sodium dans le DMF à basse température, suivi de l'addition de l'éthylèneglycol ditosylate, donnant probablement l'intermédiaire mono-*N*-fonctionnalisé. L'addition lente du second équivalent d'hydruure de sodium conduit au macrocycle souhaité avec

78% de rendement. La déprotection est effectuée par réduction avec du lithium dans l'ammoniac, puis traitement acide pour aboutir au tacn *C*-fonctionnalisé sous sa forme chlorhydrate.

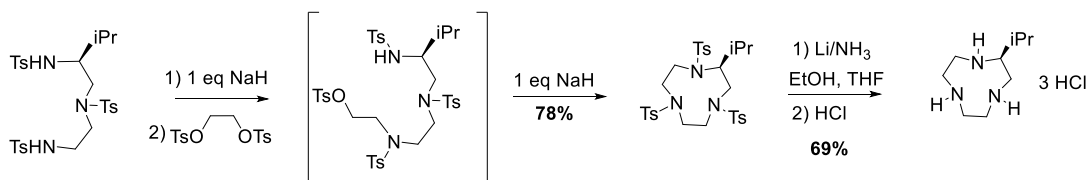


Schéma 3 : Voie de synthèse du 2-(isopropyl)-1,4,7-triazacyclononane selon C. L. Gibson ^[182]

II. Synthèse de tacn *C*-fonctionnalisés via la chimie des aminal

De nouvelles voies de synthèse de dérivés *C*-fonctionnalisés du tacn ont été développées dans l'objectif d'obtenir des méthodes plus directes et plus productives que celles décrites précédemment.

J. H. Koek *et al.* ont ainsi décrit en 2006, la *C*-fonctionnalisation du 1,4,7-triméthyl-1,4,7-triazacyclononane (Me_3tacn) à partir du macrocycle lui-même en trois étapes (**Schéma 47**) ^[185]. L'addition de *N*-bromosuccinimide sur le 1,4,7-triméthyltacn (Me_3tacn) entraîne la formation d'un iminium qui se réarrange en composé bicyclique ammonium/aminal par attaque nucléophile intramoléculaire. L'ajout de cyanure de potassium conduit à une attaque du CN^- sur le carbone aminal. Après purification, un composé *C*-fonctionnalisé est obtenu avec un rendement de 40%. Finalement, une étape de réduction de la fonction cyanure en fonction amine est réalisée par du LiAlH_4 . Cette méthode a permis de mettre au point la synthèse d'un analogue *C*-fonctionnalisé nécessitant peu d'étapes et applicable à grande échelle (0,1 à 0,2 mol) avec un rendement global de 25%. Elle reste cependant limitée au Me_3tacn .

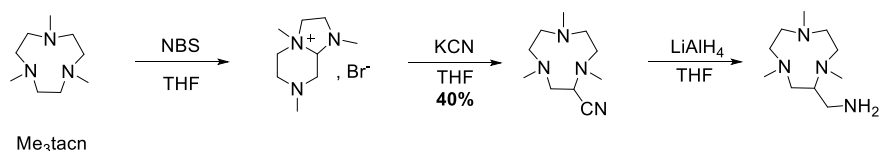


Schéma 47 : *C*-fonctionnalisation du Me_3tacn selon J.H. Koek *et al.* ^[185]

En 2014, F. Denat *et al.* ont tiré profit de cette méthode pour mettre au point la synthèse de dérivés du tacn *C*-fonctionnalisé en utilisant la diéthylènetriamine comme réactif initial ^[50] (**Schéma 48**). L'addition du chloroacétaldéhyde sur la triamine linéaire conduit facilement à l'intermédiaire aminal bicyclique. L'alkylation des trois atomes d'azote est obtenue par réaction

avec le bromure de benzyle donnant l'intermédiaire ammonium-aminal analogue à celui de J.H. Koek. L'addition de cyanure de sodium conduit comme précédemment à l'addition du nucléophile CN⁻ sur le carbone aminal provoquant l'ouverture du cycle et donnant le 1,4,7-tribenzyl-2-(cyano)-1,4,7-triazacyclononane. La réduction du bras CN par du LiAlH₄ et l'élimination des groupements benzyle par hydrogénolyse donnent accès au 2-(aminométhyle)-1,4,7-triazacyclononane. Cette méthode a permis de décrire la synthèse du H₃nota C-fonctionnalisé par le même bras et celle du **MANOTA**, dérivé bifonctionnel du H₃nota, qui a été greffé sur anticorps et utilisé en imagerie TEP avec le cuivre-64 ^[186]. Ces auteurs ont également démontré que la réduction directe de l'intermédiaire ammonium-aminal bicyclique par le borohydrure de sodium menait au tacn porteur de trois bras benzyle par ouverture du bicyclic lors d'addition d'hydruure, comme évoqué dans le chapitre I.

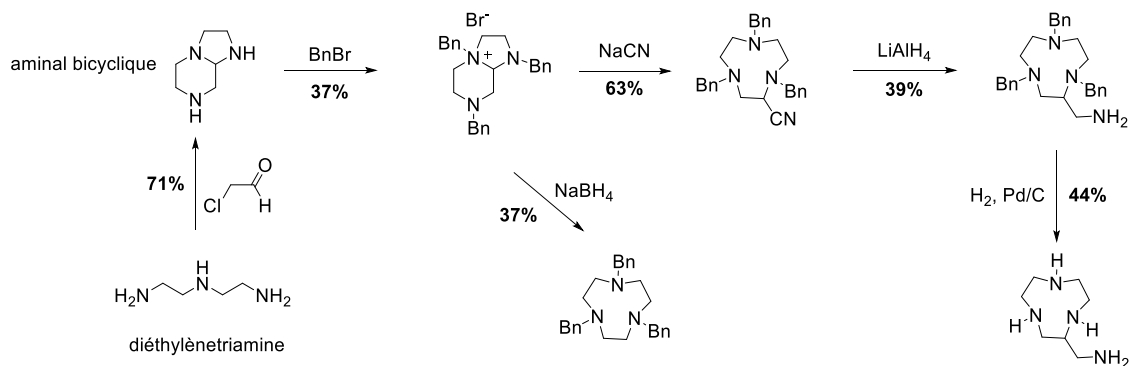


Schéma 48 : Voie de synthèse du tacn C-fonctionnalisé par un bras aminométhyle selon F. Denat *et al.* ^[50]

Cette étude bibliographique a montré que l'accès aux dérivés C-fonctionnalisés du tacn est possible par deux voies générales :

- la première voie, basée sur la méthode de synthèse du tacn, est caractérisée par un nombre d'étapes important, des rendements souvent moyens ou faibles, nécessitant de reconsidérer toute la synthèse pour tout nouveau macrocycle C-fonctionnalisé souhaité
- la seconde voie, récente, passe par un intermédiaire-clé ammonium-aminal bicyclique et compte un nombre d'étapes moins important. Si les rendements sont également moyens, elle permet cependant d'obtenir une plateforme tacn C-fonctionnalisée par un bras – CH₂NH₂.

2 Etude de la synthèse de triazacycloalcanes C-nitrobenzylés

I. Etude de la C-fonctionnalisation du tacn

En étudiant les travaux de C. F. Meares et F. Denat, nous avons élaboré un projet de synthèse visant à mettre au point la synthèse du 2-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane, plateforme voisine de celle décrite par le groupe de F. Denat. Le bras 4-nitrobenzyle a été choisi pour être ensuite utilisé pour la vectorisation après transformation en fonction phénylisothiocyanate. Le projet est basé sur l'utilisation de l'ester méthylique de la 4-nitrophénylalanine qui, par réaction avec l'éthylènediamine, conduirait à la triamine linéaire C-fonctionnée par le groupement nitrobenzyle (BnNO₂). La synthèse repose ensuite sur le passage par un ou plusieurs intermédiaires-clés ammonium-aminal bicycliques C-nitrobenzylés par action du chloroacétaldéhyde, puis N-fonctionnalisation des trois atomes d'azote. Une dernière étape de réduction permettrait d'aboutir au macrocycle visé (**Schéma 49**).

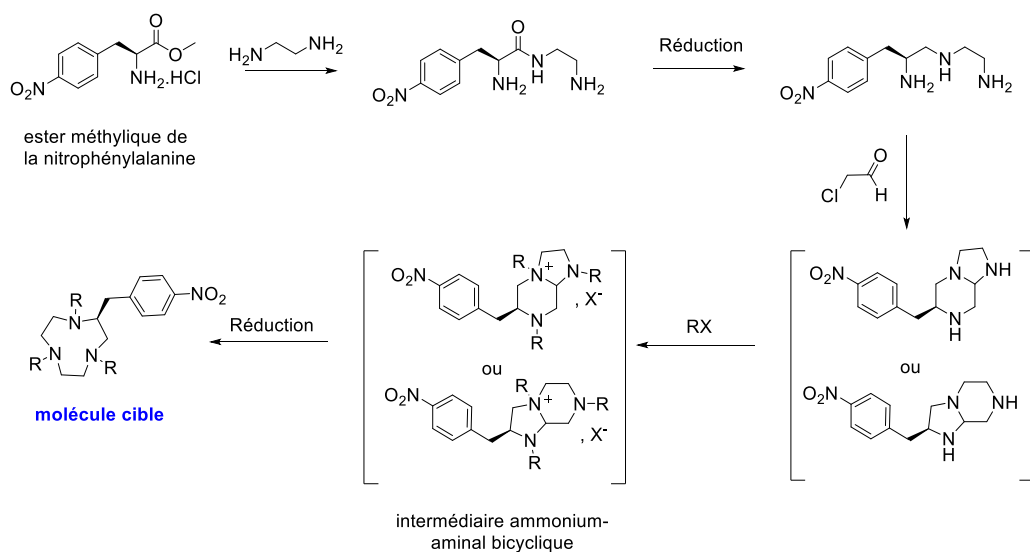


Schéma 49 : Voie de synthèse envisagée pour les dérivés du 2-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane

1. Synthèse de la N-(2-amino)-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,2-éthanediamine

La triamine linéaire portant un fragment BnNO₂ est obtenue en deux étapes à partir du dérivé ester méthylique de la (S)-4-nitrophénylalanine (**Schéma 50**). Cette synthèse est adaptée des travaux réalisés par H. Ansari *et al.* [175].

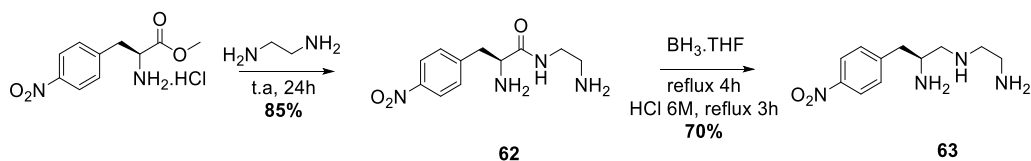


Schéma 50 : Voie de synthèse du composé **63**

La synthèse du composé **62** s'effectue par action de l'éthylènediamine sur le dérivé ester méthylique de la 4-nitrophénylalanine. L'éthylène diamine est utilisée en très large excès et le composé est ajouté par petites portions pour éviter la formation de dimère. Cette technique permet d'obtenir le composé **62** porteur d'une fonction amide avec un rendement de 85%.

Sur le spectre RMN ^1H (**Figure 141**), on observe les protons labiles des fonctions amine secondaires sous la forme d'un singulet intense à 1,33 ppm. Le triplet intégrant pour deux protons à 2,66 ppm correspond aux protons H_8 tandis que celui à 3,16 ppm correspond aux protons H_7 . Les protons H_3 positionnés en β d'un atome de carbone asymétrique sont diastéréotopiques et sont caractérisés par deux doublet de doublets à 2,83 et 3,18 ppm. Le proton H_4 porté par l'atome de carbone asymétrique est caractérisé par un doublet de doublet à 3,57 ppm. Les groupes de protons aromatiques sont représentés sur le spectre par deux doublets à 7,27 et 8,01 ppm. Le signal mal résolu à 7,50 ppm correspond au proton H_6 de la fonction amide.

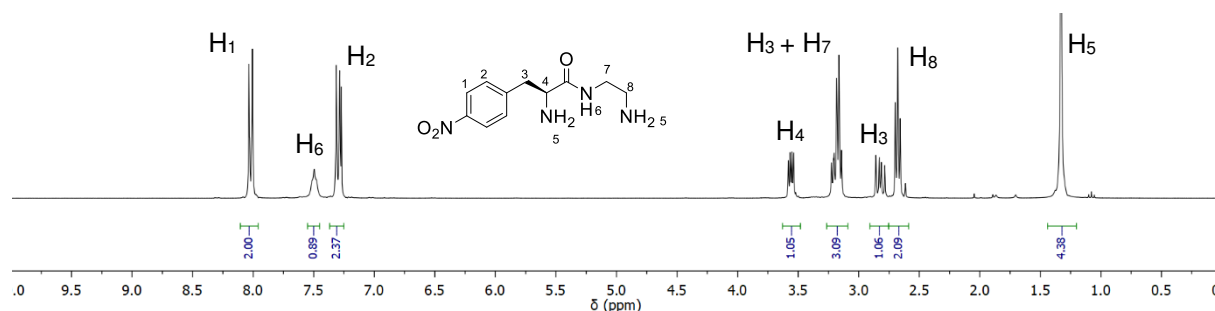


Figure 141 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **62**

Le spectre RMN ^{13}C est en accord avec la structure et affiche trois pics vers 35-40 ppm pour les trois groupements CH_2 de la molécule, un signal négatif à 56 ppm en accord avec le CH sp^3 , deux pics à 123 et 130 ppm pour les CH aromatiques. On distingue également les pics des atomes de carbone quaternaires aromatiques à 145,9 et 146,0 ppm et du carbonyle à 173 ppm.

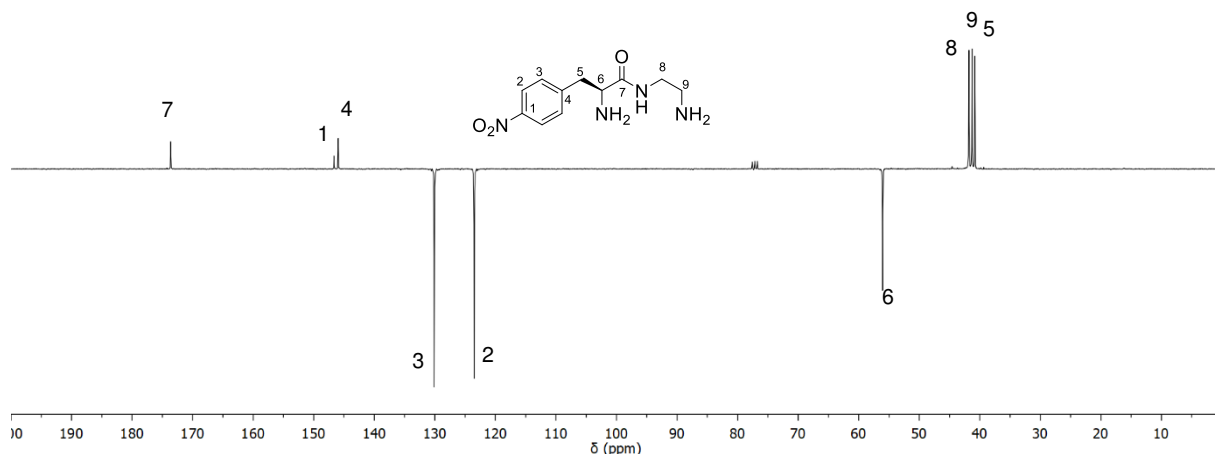


Figure 142 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **62**

La réduction de la fonction amide est ensuite effectuée par action du $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (1M) (**Schéma 51**). Les premiers tests ont été réalisés dans des conditions décrites dans la littérature ^[175] en portant le milieu réactionnel au reflux du THF (24h), puis hydrolyse dans HCl 6M (1h). L'optimisation de cette réaction a permis d'affiner les conditions opératoires (4h au reflux, puis hydrolyse 3h) et d'obtenir le composé **63** avec un rendement de 70% en évitant la réduction du groupement nitro en groupement amino.

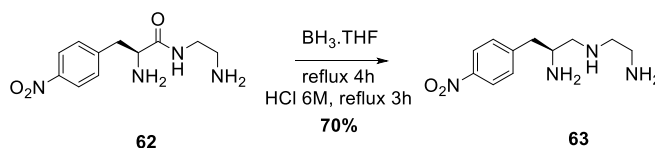


Schéma 51 : Voie de synthèse du composé **63**

Le spectre RMN ^1H enregistré dans le D_2O du composé **63** est représenté ci-après (**Figure 143**). Les protons des fonctions amine primaire et secondaire ne sont pas visibles du fait de leur labilité dans D_2O . Entre 2,5 et 3,1 ppm, les signaux mal définis correspondent au CH_2 de la molécule. L'atome d'hydrogène porté par le carbone asymétrique est représenté sur le spectre par un signal mal résolu à 3,34 ppm. Enfin, la disparition du pic à 7,50 ppm, caractéristique du proton de la fonction amide est en accord avec la structure du composé **63**.

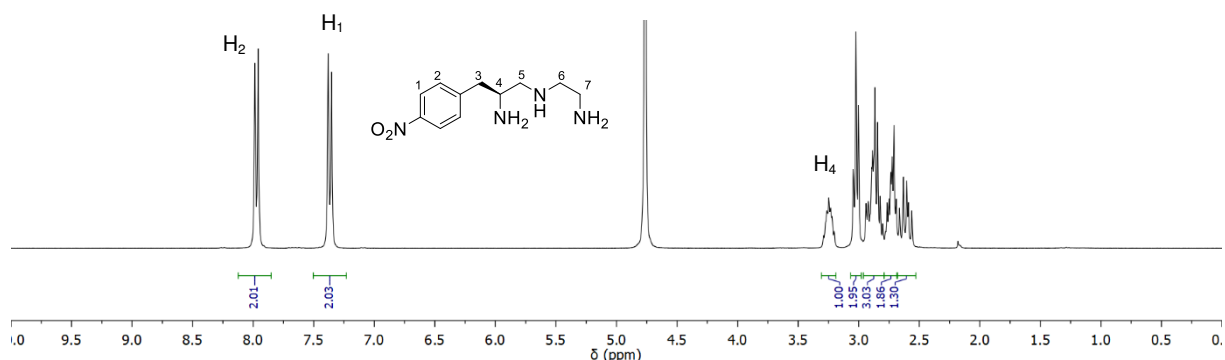


Figure 143 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, D_2O) du composé **63**

Sur le spectre RMN ^{13}C en J-modulation représenté ci-dessous (**Figure 144**), l'apparition d'un nouveau pic positif au niveau des groupements CH_2 entre 41,7 et 56,0 ppm ainsi que la disparition du pic positif correspondant au groupement carbonyle sont en accord avec la structure du composé **63**.

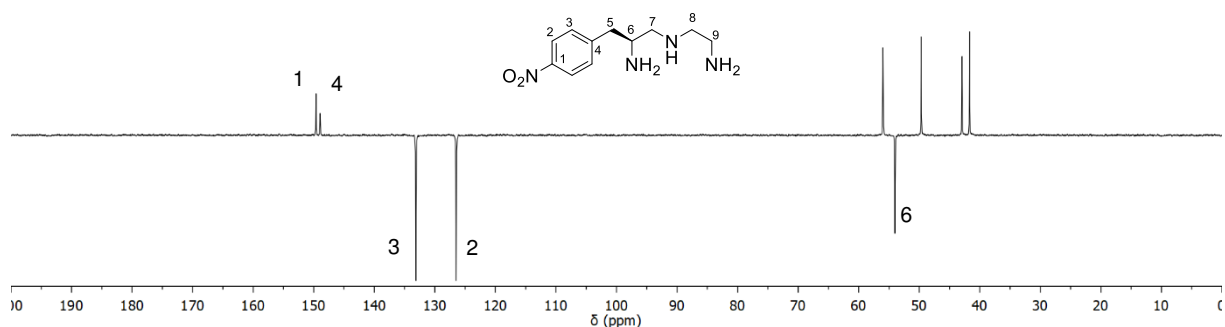


Figure 144 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, D_2O) du composé **63**

2. Cyclisation de la *N*-(2-amino)-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,2-éthanediamine par action du chloroacétaldéhyde

L'étape de cyclisation de la triamine *C*-nitrobenzylée est effectuée selon le protocole décrit par l'équipe de F. Denat, c'est-à-dire par ajout lent d'un équivalent de chloroacétaldéhyde sur la triamine linéaire en solution dans l'acétonitrile à température ambiante en présence de K_2CO_3 (**Schéma 52**).

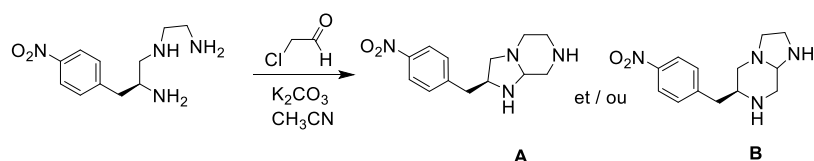


Schéma 52 : Voie de synthèse de l'intermédiaire bismacrocyclique

Contrairement à la diéthylènetriamine utilisée par l'équipe de F. Denat, notre triamine *C*-nitrobenzylée n'est pas symétrique et deux bicycles sont susceptibles de se former lors de la réaction avec le chloroacétaldéhyde : le carbone nitro-benzylé peut se retrouver engagé dans le cycle à 5 chaînons (**Schéma 52, A**), suite à la formation de l'aminal entre l'amine secondaire et l'amine primaire proche du carbone nitrobenzylé ou dans le cycle à 6 chaînons si l'aminal se forme avec l'autre amine primaire (**Schéma 52, B**).

A ces isomères de position s'ajoute la possibilité de former différents diastéréoisomères : la formation de l'aminal engendre la création d'un carbone asymétrique (carbone aminal) en plus de celui initialement présent sur la molécule. De plus, l'hydrogène présent sur ce centre stéréogénique peut se situer dans le cycle en position syn ou anti du bras nitrobenzylé. Ces différents facteurs entraînent la formation potentielle de huit diastéréoisomères (**Figure 145**).

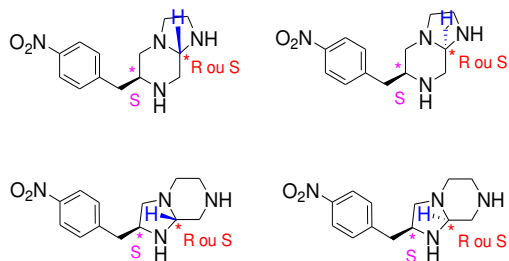


Figure 145 : Structures des stéréoisomères possibles

L'analyse par RMN ¹³C de l'huile brute obtenue a conduit à un spectre complexe mal résolu difficile à exploiter (**Figure 146**). La présence de plusieurs diastéréoisomères peut expliquer le nombre de pics importants. Les tentatives de purification par colonne chromatographique sont restées sans succès.

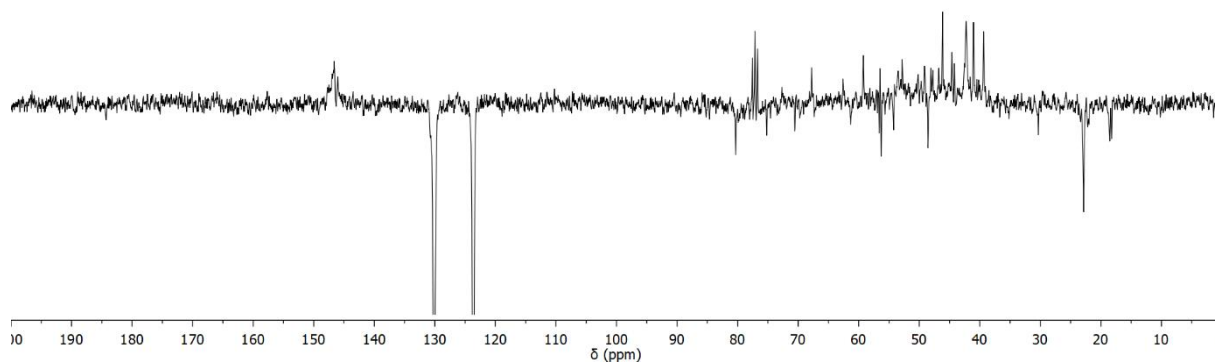


Figure 146 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé bicyclique

Une analyse par spectroscopie de masse (**Figure 147**) à basse résolution a permis de confirmer que le produit attendu est présent ($M= 263$).

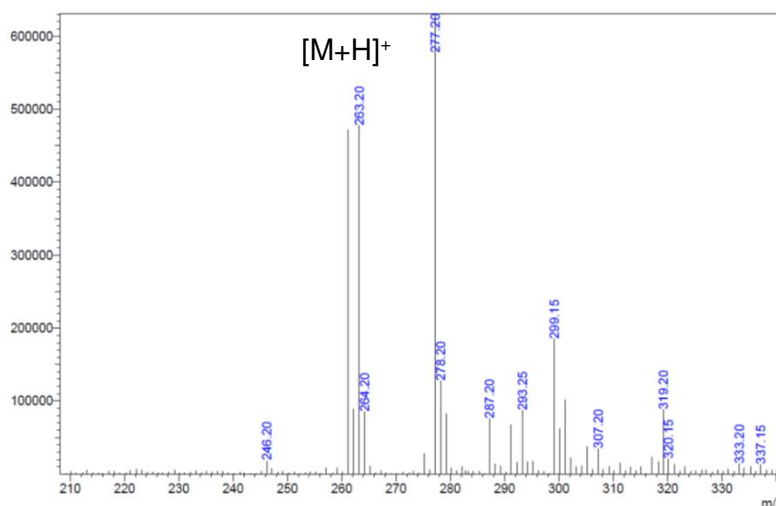


Figure 147 : Spectre de masse basse résolution du composé bicyclique

Cependant, un produit secondaire affichant une masse égale à 277 (pic majoritaire) est également présent. Ce produit pourrait correspondre au(x) composé(s) obtenu(s) par réaction de SN_2 d'une des fonctions amine sur le carbone positionné en α du chlore du chloroacétaldéhyde (**Figure 148**), qui peuvent être considérés comme des intermédiaires réactionnels n'ayant pas encore conduit au(x) produit(s) attendu(s) par formation d'aminal. La masse de ces composés étant égale à 280, le pic à 277 pourrait correspondre à $[\text{M}-3\text{H}]^+$.

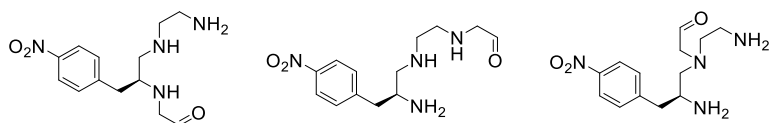


Figure 148 : Structures possibles des composés secondaires

Nous n'avons cependant pas pu continuer cette étude par manque de temps. Des travaux restent à faire pour confirmer cette hypothèse et aller plus loin dans la synthèse du 2-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane.

II. Etude de la C-fonctionnalisation du triazacyclodécane (tacd)

En parallèle des travaux précédents, nous avons développé des recherches sur la synthèse du 1,4,7-triazacyclodécane C-fonctionnalisé. L'idée est d'allonger la chaîne carbonée entre deux fonctions amine de la triamine linéaire C-fonctionnalisée par le bras 4-nitrobenzyle : dans ces conditions, il se formera, lors de la construction du bicyclic aminal, soit deux cycles à six chaînons accolés, soit un cycle à cinq et un cycle à sept chaînons, ce dernier cas étant très défavorisé (**Schéma 53**). Le macrocycle final ne sera certes pas basé sur un motif tacn mais on peut espérer que ses propriétés soient proches.

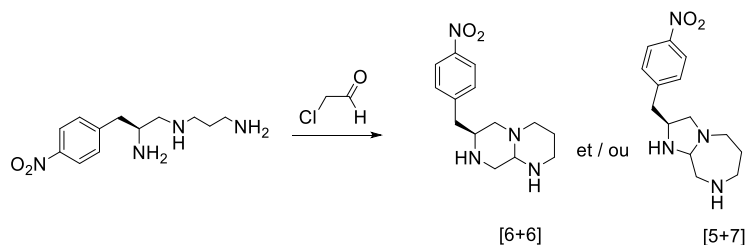


Schéma 53 : Hypothèse de cyclisation [6+6] et [5+7]

Une fois cette synthèse mise au point, on peut aussi espérer mettre à profit le travail pour déverrouiller les leviers connus dans l'exemple précédent.

1. Synthèse de la N-(2-amino-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,3-propanediamine

La première étape, qui donne lieu à la formation du composé **64**, consiste à synthétiser l'amide par condensation entre la fonction ester de la 4-nitrophénylalanine et l'une des fonctions amine secondaires du 1,3-diaminopropane introduit en large excès. Comme précédemment, cette

première étape permet l'obtention du squelette triazoté linéaire C-fonctionnalisé (**64**) avec un rendement de 80%. L'étape de réduction de la fonction amide est effectuée par action du $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ qui permet d'obtenir la triamine **65**, après hydrolyse acide des dérivés aminoborane et traitement, avec un rendement de 60% (**Schéma 54**).

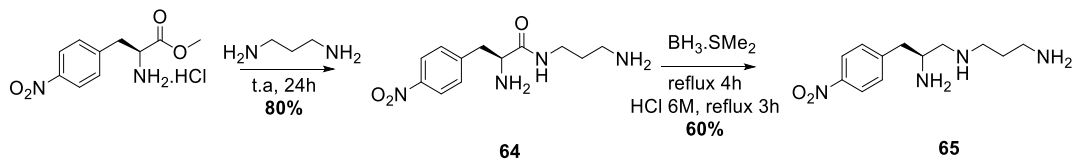


Schéma 54 : Voie de synthèse du composé **65**

Sur le spectre RMN ^1H représenté ci-dessous (**Figure 149**), le singulet à 1,32 ppm correspond aux protons des fonctions amine primaire et secondaires de la molécule. Ensuite le quintuplet à 1,59 ppm correspond aux atomes d'hydrogène positionnés en β de l'atome d'azote de la fonction amine secondaire. On retrouve entre 2,41 et 2,88 ppm les différents signaux attribués aux atomes d'hydrogène des groupements CH_2 de la molécule. Le multiplet à 3,11 ppm est attribué, quant à lui, à l'atome d'hydrogène porté par le centre stéréogène. Finalement, dans la zone des protons aromatiques, on retrouve les deux doublets à 7,32 et 8,11 ppm correspondants aux deux groupes de protons.

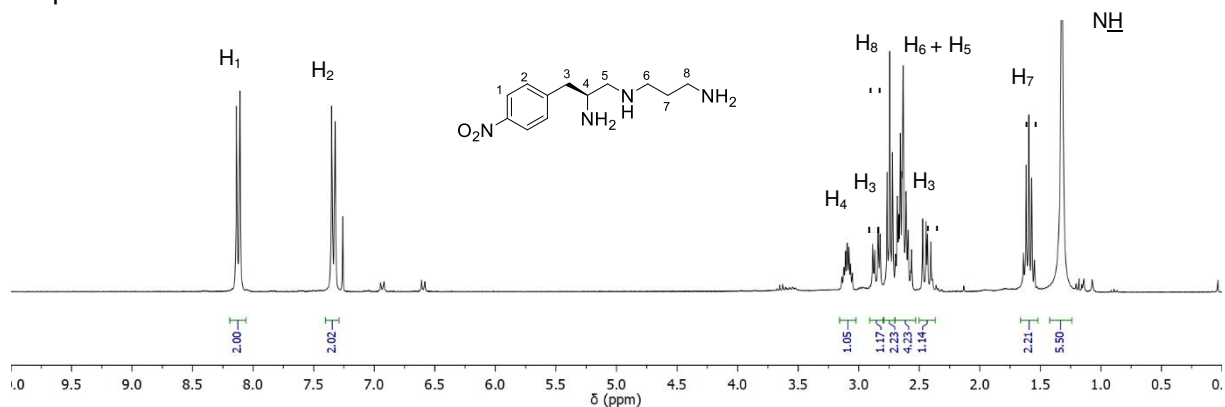


Figure 149 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **65**

Le spectre RMN ^{13}C , en J-modulation représenté ci-après (**Figure 150**) est composé de cinq pics attendus pour les groupements CH_2 de la triamine linéaire entre 32,1 et 57,4 ppm et d'un pic négatif à 52,3 ppm pour le groupement CH . On observe également les quatre pics attendus pour les atomes de carbone aromatiques.

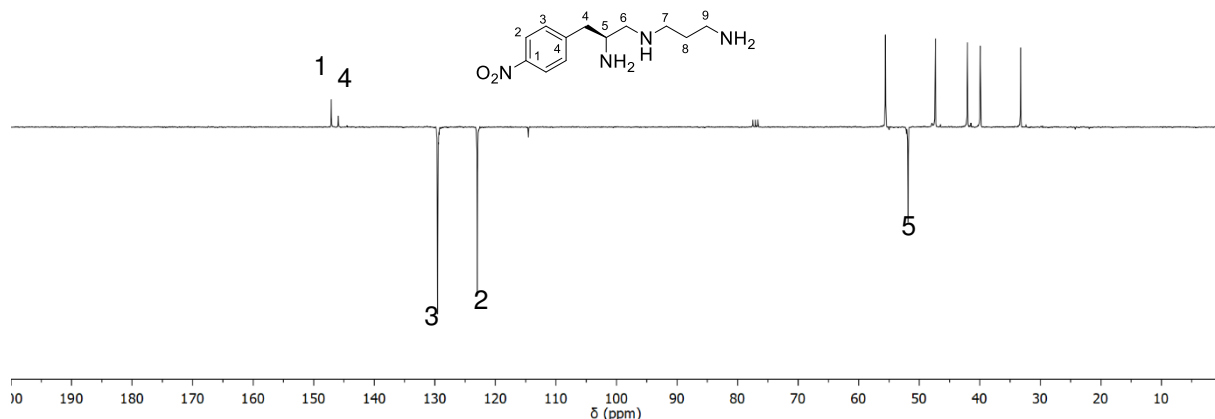


Figure 150 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **65**

2. Cyclisation de la *N*-(2-amino-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,3-propanediamine par action du chloroacétaldéhyde

L'action du chloroacétaldéhyde sur la *N*-(2-amino-(4-nitrobenzyl)éthyl)-1,3-propanediamine (**65**) peut conduire, selon l'hypothèse avancée précédemment, à la formation de deux intermédiaires aminal bicycliques contenant deux cycles intramoléculaires à 6 chaînons (**66a**) ou à 5 et 7 chaînons (**66b**). Ces deux composés sont représentés ci-dessous (**Schéma 53**).

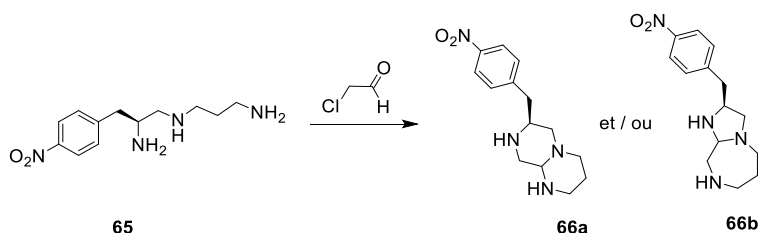


Schéma 55 : Etape de cyclisation à partir du composé **65**

La réaction est effectuée dans les conditions utilisées précédemment, à savoir en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile et à température ambiante. Le spectre RMN ^{13}C en J-modulation (**Figure 151**) obtenu après traitement affiche une série de six signaux positifs et de deux pics négatifs pour les carbones sp^3 , en accord avec les six CH_2 et les deux CH de la molécule attendue, ainsi que les signaux dans la zone des atomes de carbone aromatiques pour le groupement nitrobenzyle. La simplicité du spectre RMN ^{13}C conforte l'hypothèse que nous avons émise concernant la formation favorisée d'un des deux bicycles possibles, en l'occurrence celui composé de deux cycles à 6 chaînons (**66a**).

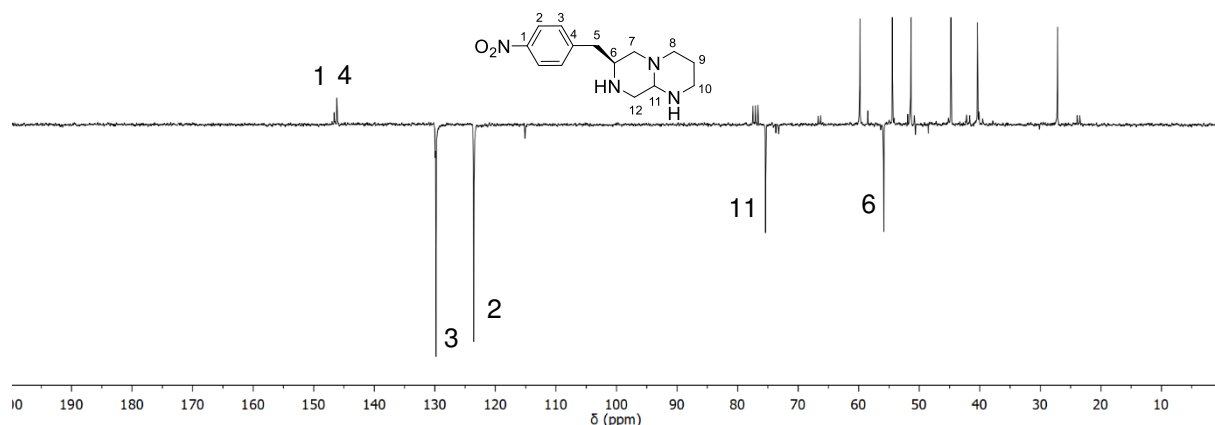


Figure 151 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **66a**

Une sous-série d'intensité faible est également présente sur le spectre, correspondant probablement à un (ou des) diastéréoisomère (s) puisque la molécule possède deux centres stéréogéniques et que l'hydrogène du carbone aminal peut, comme précédemment, se retrouver en configuration syn ou anti du bras nitrobenzyle. Ces différents stéréoisomères sont représentés ci-dessous (**Figure 152**).

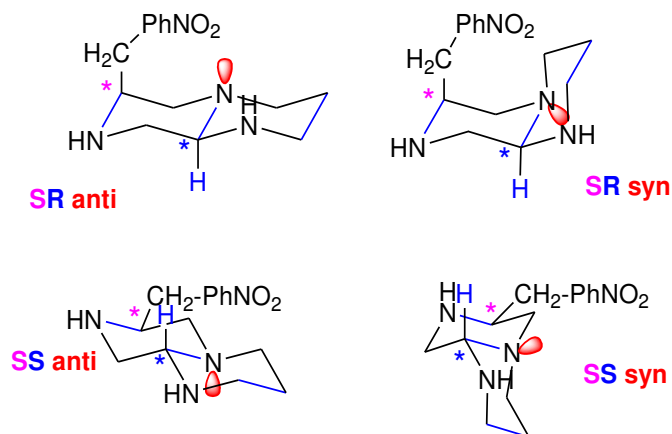


Figure 152 : Structure des différents stéréoisomères possibles

A ce jour, nous n'avons pas encore approfondi cette étude pour identifier les diastéréoisomères dont la formation pourrait être favorisée.

3. Synthèse du 1,4,7-tribenzyl-3-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclodécane

Le composé **66** est soumis à une réaction de *N*-fonctionnalisation des atomes d'azote par du bromure de benzyle (3 équivalents) afin de synthétiser le ou les intermédiaires-clés ammonium-aminal bicycliques. La réaction est effectuée dans les conditions habituelles, c'est-à-dire dans l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium à température ambiante. Après 24 heures, le solvant est évaporé et le solide récupéré, sans être isolé, est engagé dans une réaction de réduction par NaBH₄ (1 équivalent) dans l'éthanol absolu.

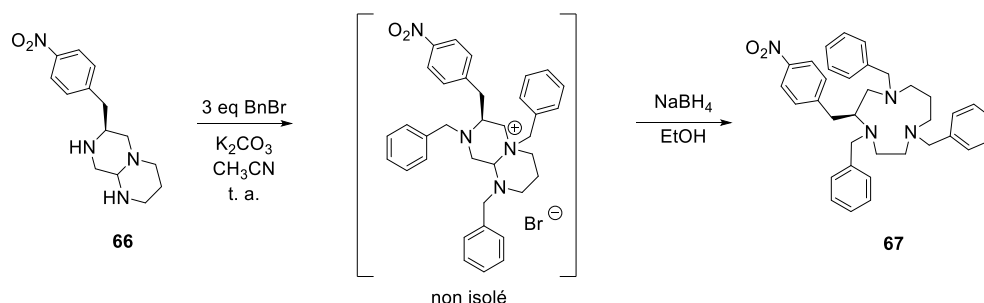


Schéma 56 : Voie de synthèse du 1,4,7-tribenzyl-3-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclodécane **67**

Après traitement, l'huile brute obtenue conduit à un spectre RMN ¹³C, relativement simple, sur lequel on observe les 10 pics attendus pour les CH₂ entre 26,0 et 61,1 ppm et un signal négatif à 57,3 ppm pour le CH dans la région des atomes de carbone sp³ pour le triazacyclodécane *C*-fonctionnalisé par un bras nitrobenzyle et *N*-fonctionnalisé par trois fonctions benzyle sur chaque amine du cycle. On observe également les pics attendus pour les atomes de carbone aromatiques, en particulier les cinq signaux positifs à 139,9, 140,1, 140,4 145,8 et 149,1 ppm pour les atomes de carbone quaternaires des cycles aromatiques.

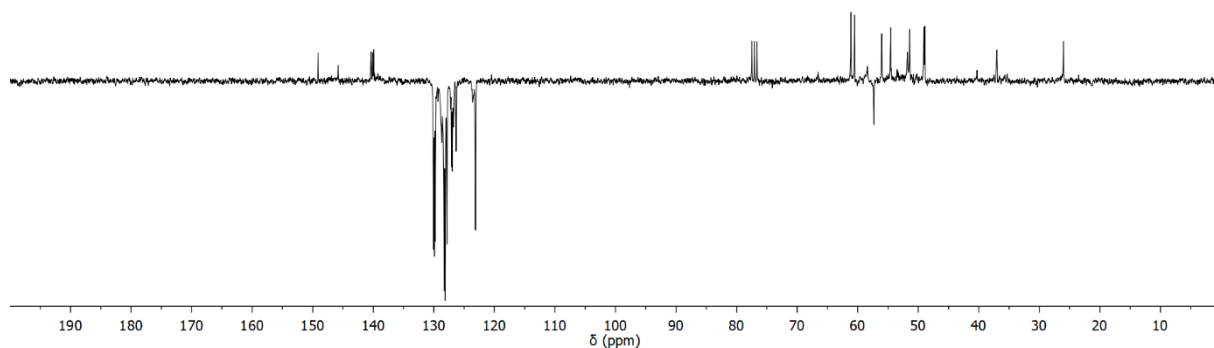


Figure 153 : Spectre RMN ^{13}C (75,47 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **67**

La résolution du spectre RMN ^1H (**Figure 154**), représenté ci-après, n'est pas optimale mais semble également en accord avec la structure proposée pour le composé **67**.

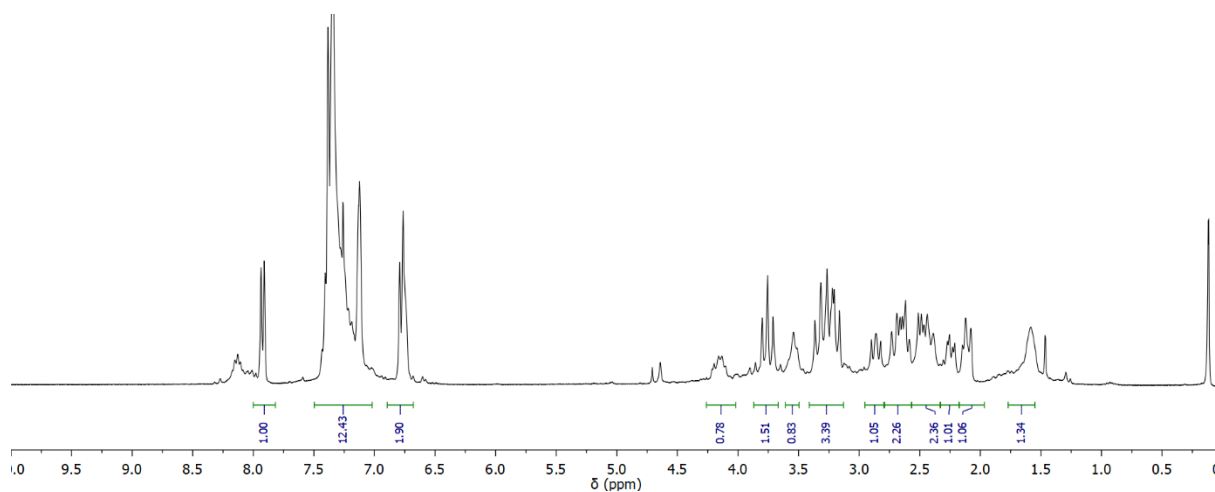


Figure 154 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, 298 K, CDCl_3) du composé **67**

Un spectre de masse (**Figure 155**) basse résolution a confirmé l'obtention du composé **67** avec la présence d'un pic à $m/z = 549$, correspond à $[\text{M}+\text{H}]^+$. Ces premiers résultats nous permettent de valider la méthode qui reste, bien sûr, à approfondir.

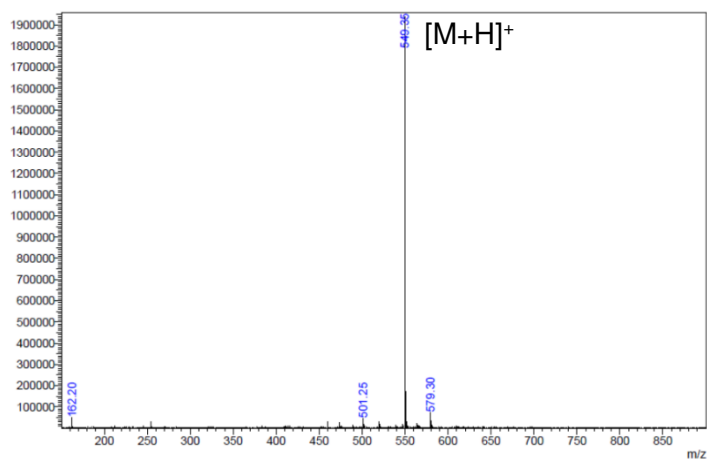


Figure 155 : Spectre de masse basse résolution du composé **67**

Ces résultats très récents sont toujours étudiés au laboratoire, notamment l'étape d'hydrogénolyse des groupements benzyl afin de pouvoir obtenir le macrocycle déprotégé et essayer des premiers tests de *N*-fonctionnalisation des fonctions amine secondaires.

Conclusion du chapitre V

La première partie de ce chapitre rappelle les différentes méthodes de C-fonctionnalisation du tacn décrites dans la littérature. Elle met en avant une méthode récente permettant l'obtention d'une plateforme triazamacrocyclique C-aminométhyle. Cette méthode est basée sur la cyclisation de la diéthylènetriamine linéaire par le chloroacétaldéhyde en passant par la formation d'un composé bicyclique à 5 et 6 chaînons. Nous avons adapté cette méthode, en synthétisant dans un premier temps, la diéthylènetriamine C-nitrobenzylée pour l'engager dans l'étape de cyclisation similaire à celle décrite par F. Denat. Les essais ont cependant montré que l'addition du groupement nitrobenzyle sur le squelette carboné rend plus difficile l'obtention du bicyclic à 5 et 6 chaînons visé.

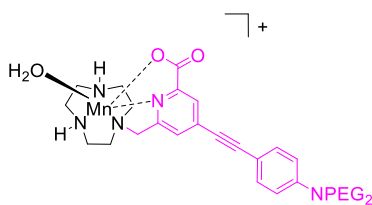
Nous avons, dans un second temps, utilisé une triamine linéaire C-fonctionnalisée possédant une chaîne carbonée allongée d'un atome de carbone dans l'optique de favoriser la formation du bicyclic [6+6] par rapport au [5+7]. Cette option nous a permis de caractériser l'intermédiaire attendu. Ensuite, l'étude de sa réactivité a conduit à l'obtention du composé 1,4,7-tribenzyl-3-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclodécane qui constitue un nouveau dérivé C-fonctionnalisé du tacd. Ces résultats préliminaires sont encourageants et constituent une preuve de concept. Ils nécessitent d'être approfondis pour être en mesure de synthétiser à échelle intéressante le dérivé 3-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclodécane, future plateforme bifonctionnelle pour des applications en imagerie. Les améliorations apportées pourront alors probablement nous permettre de considérer la transposition de la méthode à la synthèse du 2-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane (tacn C-nitrobenzylé) dont les essais de synthèse sont à ce jour restés infructueux.

CONCLUSION GENERALE

Ces travaux de thèse ont consisté en la synthèse et les études de nouveaux ligands dérivés du 1,4,7-triazacyclonane (tacn) ainsi que de leurs analogues bifonctionnels, pour la complexation de métaux de transition et leur valorisation dans différents domaines d'applications liés à l'imagerie médicale.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à développer de nouvelles sondes bimodales à partir de ligands *N*-fonctionnalisés par des groupements méthylpyridine et picolinate substitué par un chromophore, pour la complexation de cations comme le Cu^{2+} , le Zn^{2+} et le Mn^{2+} . Le défi résidait dans l'effet de la complexation du Cu^{2+} sur les propriétés photophysiques de la sonde, qui peut se traduire par une extinction de fluorescence. Si, le ligand **Hno2py1fluo** ne possède pas un rendement quantique très intéressant (6%) il reste suffisant pour valider la preuve de concept de ce type de sonde. Nous avons également démontré que l'efficacité de luminescence de la sonde était très impactée par la complexation du Cu^{2+} , comme attendue, mais, que lors de la complexation du Zn^{2+} (mimant le Cu^+), la fluorescence était retrouvée. De plus, au vue de sa très bonne stabilité électrochimique, le complexe $[\text{Cu}(\text{no2py1fluo})]^+$ pourrait trouver une application en tant que sonde off-on pour l'imagerie de zones à fort caractère réducteur.

Les études réalisées sur la sonde IRM-fluorescence (**Figure 156**) à base d'un complexe de Mn(II) ont permis de mettre en avant les bonnes propriétés de relaxivité de ce composé qui sont comparables au complexe $[\text{Mn}(\text{no1pa})]^+$. Une valeur de r_2 , généralement obtenue pour des composés à haut poids moléculaire, absente pour le complexe $[\text{Mn}(\text{no1pa})]^+$, a également été obtenue, qui est potentiellement due à la formation d'agrégats ou de micelles en solution due à la présence de chaînes PEG sur le bras antenne. Néanmoins, ceci ouvre la voie à une potentielle application comme sonde T_1 et T_2 .



Potentiel agent de contraste T_1 et T_2

Figure 156 : Structure de la potentielle sonde IRM-fluorescence

Le deuxième axe de recherche de ces travaux concernait le développement de nouveaux chélates du $\text{Cu}(\text{II})$ à base de tacn *N*-fonctionnalisés par des groupements méthylthiazole et méthylthiazole acide pour des applications potentielles en imagerie TEP, qui remplissent entièrement le cahier des charges imposé par le milieu biologique. En nous référant aux premiers résultats prometteurs

obtenus sur un dérivé du tacn di-*N*-fonctionnalisé par deux groupements méthylthiazole (**no2th**), il semblait très intéressant d'utiliser ce genre de groupements pour la complexation de Cu(II) tout en stabilisant également le Cu(I). Nous avons décidé d'étudier l'influence d'une nouvelle *N*-fonctionnalisation du **no2th** mais également d'étendre l'étude aux groupements méthylthiazole acide, pouvant offrir un nouveau mode de coordination via la fonction acide carboxylique présente sur l'hétérocycle. La méthode de *N*-fonctionnalisation régiospécifique, faisant appel à un intermédiaire orthoamide, nous a permis de décliner le nombre de fonctions méthylthiazole acide sur le macrocycle. Après avoir décrit la synthèse des ligands, leurs propriétés physico-chimiques ainsi que des celles de leurs complexes ont été étudiées par différentes techniques analytiques (potentiométrie, UV, RPE, RX, voltamétrie cyclique). Nous avons ainsi pu montrer que l'introduction d'un nombre trop important de fonctions méthylthiazole acide avait un effet néfaste sur la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique des complexes. Ceci, résulte notamment de la formation d'entités polynucléaires. Les ligands **no3th** et **Hno2th1tha** (**Figure 157**) possèdent des propriétés de complexation et d'inertie cinétique en milieu acide et vis-à-vis de la réduction très intéressantes comparé au **no2th** et H₃**nota**, tacn tri-*N*-fonctionnalisé par trois groupements acétate, utilisé comme référence triazamacrocyclique pour la complexation du Cu(II). Des études par DFT ont mis en évidence que la fonction acide présente sur un bras méthylthiazole acide du **Hno2th1tha**, n'entrait pas dans la coordination du Cu(II) et peut donc être utilisée pour une bioconjugaison.

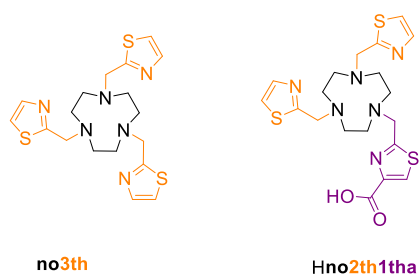


Figure 157 : Structure des ligands **no3th** et **Hno2th1tha**

Au cours de ce manuscrit, nous avons montré l'intérêt des groupements méthylpyridine et des groupements méthylthiazole pour l'élaboration de complexes de Cu(II) robustes pour une application en TEP. Les résultats plus que prometteurs obtenus avec les dérivés **no3py**, **no2th** et **no3th**, nous ont poussés à aller plus loin et à les incorporer dans des radiopharmaceutiques. Nous avons pour cela développé de nouveaux analogues bifonctionnels, possédant une fonction de couplage, judicieusement placée pour ne pas impacter les propriétés de coordination de ces ligands. Les analogues bifonctionnels ont été couplés à un peptide, dérivé de la bombésine,

ciblant les récepteurs GRP surexprimés sur les cellules du cancer de la prostate. Le radiomarquage au ^{64}Cu a donné des résultats très intéressants, puisque le radionucléide est totalement complexé en 15 minutes à température ambiante et pH 5,5. Les tests de stabilité des radiocomplexes en milieux compétiteurs ont mis en avant la très grande inertie des radioconjugués. Des premiers tests *in vitro* ont permis d'étudier l'affinité biologique des métallopeptides et nous avons pu montrer qu'à charge égale, le rôle de l'entité chélatante envers le ciblage des récepteurs GRP est à considérer. De ces études, les métallopeptides basés sur les dérivés du **no3th** et du **no3py** (**Figure 158**) apparaissent comme de sérieux candidats pour une application *in vivo*. Il est toutefois nécessaire de faire mieux en méthodes de vectorisation et d'obtenir leurs analogues C-fonctionnalisés.

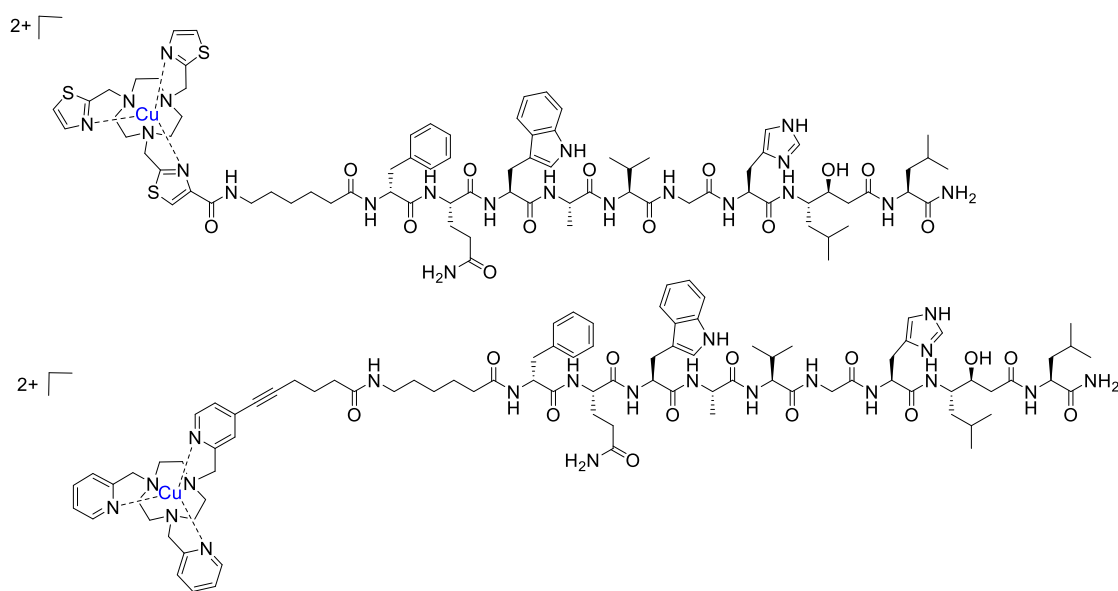


Figure 158 : Structures de métallopeptides dérivés du **no3th** et du **no3py**

Finalement dans le dernier chapitre, nous avons mis au point une nouvelle méthode de synthèse de dérivés bifonctionnels, généralisable à divers groupements coordinants, via une C-fonctionnalisation du macrocycle. Nous avons montré la preuve de concept sur un analogue du tacn, le 1,4,7-triazacyclodécane (tacd), en synthétisant le 1,4,7-tribenzyl-3-(4-nitrobenzyl)-1,4,7-triazacyclodécane. Ces résultats prometteurs nécessitent d'être poursuivis afin d'obtenir des nouvelles plateformes C-fonctionnalisées et permettre de synthétiser, par exemple, deux analogues C-fonctionnalisés du **no3th** et du **no3py** pour des applications en imagerie TEP ou en RIT via l'utilisation de ^{67}Cu (**Figure 159**).

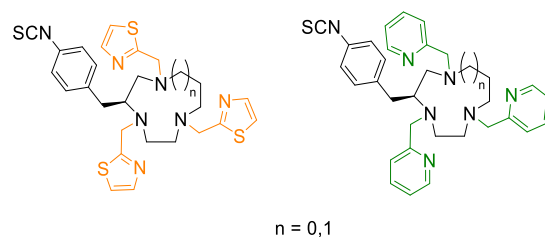


Figure 159 : Analogues C-fonctionnalisés du **no3th** et du **no3py**

Ces travaux de thèse ont finalement permis de développer de nouveaux chélates de métaux de transition pour des applications en imageries médicales. Tous les résultats obtenus démontrent l'intérêt d'utiliser cette plateforme macrocyclique pour différentes applications. La synthèse de dérivés bifonctionnels est cependant complexe et nécessite de savoir contrôler la *N*-fonctionnalisation du macrocycle. Nous avons ainsi réussi à habiller le macrocycle de manière adéquate en fonction de l'application recherchée. Enfin, ces premiers résultats ont mis en lumière l'importance des groupements méthylpyridine et méthylthiazole pour la complexation du Cu(II) et ouvrent la voie à l'élaboration de nouveaux composés vectorisables via une *C*-fonctionnalisation.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagent and solvents.

All the reagents used for the synthesis were purchased from SIGMA-ALDRICH[®], TCI chemicals[®], ACROS ORGANICS[®] and FLUOROCHEM[®]. 1,4,7-triazacyclononane was purchased from Chematec[®]. Water was distilled before used and the organic solvents were obtained from a purification system.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 (500 MHz for ¹H), Bruker Avance III HD 500 (500.25 MHz for ¹H and 125.79 MHz for ¹³C) or a Bruker DRX 300 (300.13 MHz for ¹H and 74.47 MHz for ¹³C) spectrometers. The δ scales are relative to TMS and chemical shifts are reported in ppm. Splitting patterns are designated as follow: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), br (broad).

Mass Spectrometry.

High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) analyses were performed by Cyril Colas from the Institute of Organic and Analytic Chemistry (ICOA Orléans) on a HRMS Q-ToF MaXis, sources ESI, APCI, APPI, nano-ESI.

Low-resolution mass Spectrometry (LRMS) measurements were recorded using ESI on a Shimadzu LCMC 2020 (Brest).

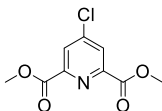
High Performance Liquid Chromatography

The analytic HPLC were performed on a Prominence Shimadzu HPLC/LCMS-2020 equipped with a UV SPD-20 A detector. The chromatographic system employs semi-preparative HPLC (VisionHT C18 HL 5 μ m 250 \times 10 mm) with either H₂O- CH₃CN (v/v) or H₂O – CH₃CN (0.1% TFA) as eluents at a flow rate of 5 mL/min and UV detection at 254 and 350 nm. The following method was used: 100% H₂O for 5 minutes, up to 95% CH₃CN in 20 minutes and 95% CH₃CN for 5 minutes.

X-ray Diffraction

Crystallographic studies were performed on a circular diffractometer X-Calibur-2 CCD 4 (OXFORD DIFFRACTION), including a four-circle goniometer (KM4) and a two dimensional CCD detector (SAPPHIRE 2). The structures were collected using a wavelength of 0.71073 Å (monochromatic

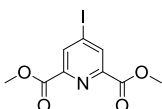
radiation $M_oK\alpha$). Data reduction, including inter-frame scaling, Lorentz, polarization, empirical absorption and detector sensitivity corrections, were carried out using attached programs of Crysalis software⁴² (Oxford Diffraction). Complex scattering factors were taken from the program SHELX9743 running under the WinGX program system. The structure was solved by direct methods with SIR-9745 and refined by full-matrix least-squares on F^2 . All hydrogen atoms were included in calculated positions and refined in riding mode

Compound 1.

$$M = 229.62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Chelidamic acid (10.0 g, 55 mmol) was dissolved in thionyl chloride (80 mL) and 3 mL of DMF was added dropwise to solubilize the compound. The reaction mixture was gradually brought to 70 °C and let to stir overnight. After cooling down to r.t. the excess of thionyl chloride was removed under vacuum and then the residue was retaken in CH₂Cl₂ (100 mL). The mixture was cooled down to 0 °C with an ice bath and MeOH (50 mL) was added dropwise over a period of 30 minutes. Then the reaction was warmed to r.t. and the mixture was stirred for 3 hours. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (150 mL) and the organic layer was washed with sat. NaHCO₃ (3 × 50 mL) to get rid of traces of acid. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporation of the solvent gave compound **1** as a off-white solid (12 g, 96%).

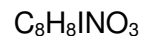
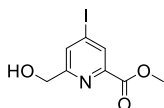
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 4.02 (s, 3H) 8.29 (s, 2H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 53.6 (CH₃) 128.4 (CH) 146.9 (Cqt) 149.5 (Cqt) 164.2 (C=O).

Compound 2.

$$M = 321.07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a solution of the chlorinated compound **1** (10.2 g, 44 mmol) in acetonitrile (500 mL) sodium iodide was added (40.1 g, 266 mmol) and the reaction mixture was stirred at r.t. for 4 days. After that, acetyl chloride (10,3 mL, 133 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 hours. The reaction was quenched with sat. NaHCO₃ (300 mL), and the layers were separated. The organic layer was washed with sat. Na₂S₂O₃ (2 × 150 mL) and dried over MgSO₄. Evaporation of the acetonitrile gave the iodinated compound as yellow solid (13.3 g, 94%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.99 (s, 3H) 8.68 (s, 2H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 53.4 (CH₃) 106.9 (Cqt α I) 137.0 (CH) 148.2 (Cqt) 149.5 (Cqt) 163.8 (CO).

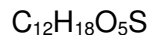
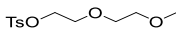
Compound 3.

M = 293.06 g.mol⁻¹

The iodinated compound **2** (13.3 g, 41.4 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (200 mL) and MeOH (50 mL) and the solution was cooled to 0°C. NaBH₄ (3.13 g, 82.8 mmol) was added in small fractions and the reaction was monitored by TLC. After 2h, the reaction was quenched with HCl 1M (100 mL) and the solvent was removed under reduced pressure. The pH of the aqueous layer was raised to 7 with NaHCO₃ (s) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). Organic layers were combined, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, Hexane /CHCl₃ 1/1 to CHCl₃) yielding compound **3** as a white solid (8.01 g, 66%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.99 (s, 3H) 4.81 (s, 2H) 7.96 (s, 1H) 8.36 (s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 53.1 (CH₃) 64.0 (CH₂) 107.2 (Cqt al) 132.7, 133.3 (CH) 146.8 (Cqt) 164.1 (C=O).

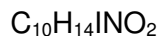
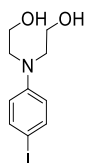
Compound 4.

M = 274.33 g.mol⁻¹

The commercial alcohol (25.0 mL, 208 mmol) was dissolved in THF (300 mL) and an aqueous solution of NaOH (15 g, 375 mmol) in 100 mL was added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at this temperature for 30 minutes before the dropwise addition of tosyl chloride (49 g, 416 mmol) in THF (100 mL). The mixture was stirred at r.t. overnight and the organic solvent was evaporated. The aqueous layer was extracted with Et₂O (3 x 150 mL) and the organic layers were combined, washed with brine (3 x 100 mL) and dried over MgSO₄. Evaporation of the solvent gave compound **4** as a colorless oil (45 g, 80%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.47 (s, 3H) 3.34 (s, 3H) 3.44-3.48 (m, 2H) 3.54-3.57 (m, 2H) 3.65-3.68 (m, 2H) 4.14-4.17 (m, 2H) 7.26 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H) 7.79 (d, ³J = 8.1 Hz, 2H).

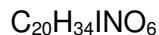
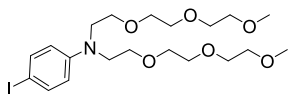
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 21.7 (CH₃) 59.1 (CH₃) 68.8 (CH₂) 69.3 (CH₂) 70.8 (CH₂) 71.9 (CH₂) 127.1 (CH) 130.3 (CH) 133.1 (Cqt) 144.9 (Cqt).

Compound 5.

$$M = 293.06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

A solution of *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)aniline (25 g, 138 mmol) in THF/pyridine (300/300 mL) was cooled down to 0°C and two equivalents of I₂ (62.5 g, 262 mmol) were added. The solution was stirred for an hour at 0°C and then warmed to r.t. Another equivalent of I₂ (35 g, 138 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for an hour. The solvent was then evaporated, and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (300 mL). The solution was first washed with saturated sodium thiosulfate solution (3 × 100 mL) and then with a solution of CuSO₄ 10% to remove the excess pyridine (5 × 100 mL). After recrystallization in AcOEt compound **5** was obtained as an off-white powder (34 g, 86%).

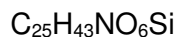
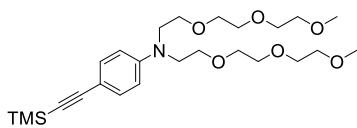
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.47 (t, 4H, ³J= 3.6 Hz, CH₂αN) 3.75 (s, 4H, CH₂αOH) 4.10 (s, 2H, OH) 6.42 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz) 7.42 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz)

Compound 6.

$$M = 511.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a solution of **5** (15 g, 51 mmol) in THF under N₂, NaH (7.3 g, 306 mmol) was added over a period of half an hour. The mixture was refluxed for one hour before the dropwise addition of a solution of the tosylated compound **4** (42 g, 153 mmol) in THF. The reaction was stirred for 3 days until consumption of the starting material. Iced water was then added (200 mL) and the organic solvent was evaporated under reduced pressure. The aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 100 mL), dried over MgSO₄ and evaporated. The crude oil was purified by flash chromatography (SiO₂, Hexane/AcOEt 7/3 to AcOEt) yielding compound **6** as a yellow oil (23 g, 92%).

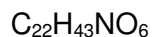
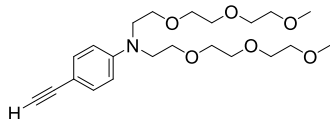
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.36 (s, 3H, CH₃) 3.50-3.64 (m, 24H, CH₂ PEG) 6.46 (d, 2H, ³J= 6.9 Hz, CH) 7.38 (d, 2H, ³J= 6.9 Hz, CH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 51.0 (CH₂βN) 59.1 (CH₃) 68.4, 70.7, 70.7, 70.8, 72.6 (CH₂ PEG) 76.6 (Cqt αI) 114.2 (CH) 137.8 (CH) 147.5 (Cqt αN).

Compound 7.

$$M = 481.71 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

A solution of compound **6** (16.49 g, 32.24 mmol) and trimethylsilylacetylene (6.33 g, 64.4 mmol) in THF/ Et_3N 1:1 (1000 mL) was degassed under Ar for 1 hour. CuI (368 mg, 1.93 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\cdot\text{Cl}_2$ (678 mg, 0.97 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at 55°C. The dark solution was filtered, the solvent was reduced under reduced pressure and the residue was redissolved in CH_2Cl_2 (ca. 250 mL). The organic layer was washed with water (3 × 50mL) and brine (3 × 50mL) and dried over MgSO_4 . After evaporation of the solvent, the residue was purified by flash chromatography (SiO_2 , Hexane/ AcOEt 50:50) yielding compound **7** as a brown oil (14.5 g, 84%).

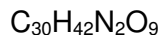
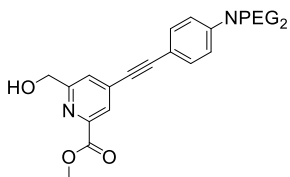
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 0.17 (s, 9H, CH_3) 3.31 (s, 6H, CH_3) 3.46-3.60 (m, 24H, CH_2 PEG) 6.52 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz) 7.21 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz). **$^{13}\text{C NMR}$** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 0.1 (CH_3) 50.6 ($\text{CH}_2 \beta\text{N}$) 58.8 (CH_3) 68.2, 70.4, 70.4, 70.5, 71.7 (CH_2 PEG) 90.9 (Cqt αSi) 106.29 (Cqt βSi) 109.5 (Cqt γSi) 111.0 (CH) 133.0 (CH) 147.6 (Cqt αN).

Compound 8.

$$M = 409.52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **7** (3.0 g, 6.23 mmol) was dissolved in THF (70 mL) and tetrabutylammonium fluoride (1M in THF) (2.7 mL, 9.34 mmol) was added. The mixture was stirred for 2h before evaporation of the solvent. The residue was taken in water (30mL) and the aqueous layer was extracted with Et_2O (3 × 30 mL). Organic layers were combined, washed with brine and dried over MgSO_4 and evaporated until dryness. The compound **8** was obtained as a yellow oil (2.52 g, 99%).

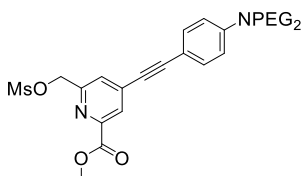
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.91 (s, 1H) 3.29 (s, 6H) 3.44-3.56 (m, 24H) 6.53 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz) 7.22 (d, 2H, $^3J = 6.9$ Hz). **$^{13}\text{C NMR}$** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 50.6 ($\text{CH}_2 \beta\text{N}$) 58.8 (CH_3) 68.2, 70.4, 70.5, 70.5, 71.7 (CH_2 PEG) 74.8 (CH) 84.6 (Cqt αCH) 108.5 (Cqt βCH) 111.1 (CH) 133.1 (CH) 147.8 (Cqt αN).

Compound 9.

$$M = 574.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **8** (250 mg, 0.61 mmol) and 2-pyridinecarboxylic acid, 6-(hydroxymethyl)-4-iodomethylester **3** (128 mg, 0.43 mmol) were dissolved in a mixture of THF/Et₃N 1:1 (10 mL) and the solution was degassed under Ar for 1 hour. CuI (4.9 mg, 0.026 mmol) and Pd(PPh₃)₂.Cl₂ (9.11 mg, 0.013 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at 55 °C. The dark solution was filtered, the solvent was reduced under reduced pressure and the residue was redissolved in CH₂Cl₂ (ca. 50 mL). The organic layer was washed with water (3 × 50 mL) and brine (3 × 50 mL) and dried over MgSO₄. After evaporation of the solvent, the residue was purified by flash chromatography, (SiO₂, AcOEt 100% to AcOEt/MeOH 98:2) yielding compound **9** as a yellow oil (222 mg, 90%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.36 (s, 6H, CH₃) 3.50-3.63 (m, 24H, CH₂) 3.98 (s, 3H, CH₃) 4.82 (s, 2H, CH₂ αOH) 6.53 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz, CH) 7.35 (d, 2H, ³J = 6.9 Hz, CH) 7.54 (s, 1H, CH) 8.03 (s, 1H, CH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 50.9 (CH₂ βN) 53.0 (CH₃) 59.1 (CH₃) 64.6 (CH₂ αOH) 68.4, 70.7, 70.8, 70.8, 72.0 (CH₂ PEG) 85.1 (Cqt) 97.8 (Cqt) 108.0 (Cqt) 111.6 (CH) 125.0 (CH) 125.6 (CH) 133.6 (CH) 134.5 (Cqt) 147.0 (Cqt) 148.8 (Cqt) 160.6 (Cqt) 165.4 (C=O).

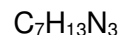
Compound 10.

$$M = 652.76 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **9** (232 mg, 0.4 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and Et₃N (163 μL, 1.21 mmol). A solution of mesyl chloride (46 μL, 0.6 mmol) in THF (2 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature. When all the starting material was consumed (ca. 1h) (monitored by TLC), the solvent was removed under reduced pressure. The residue was retaken in CH₂Cl₂ (30 mL) and washed with saturated NH₄Cl_(aq) (3 × 10 mL) and brine (2 × 10 mL). The desired compound was obtained without any further purification (232 mg, 94%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.10 (s, 3H, CH₃) 3.30 (s, 6H, CH₃) 3.45-3.56 (m, 24H, CH₂) 3.93 (s, 3H, CH₃) 5.32 (s, 2H, CH₂ αOMs) 6.51 (d, 2H, ³J= 6.9 Hz, CH) 7.31 (d, 2H, ³J= 6.9 Hz, CH) 7.59 (s, 1H, CH) 8.03 (s, 1H, CH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 37.9 (CH₃) 50.7 (CH₂ βN) 53.0 (CH₃) 58.9 (CH₃) 68.2 (CH₂ αOMs) 70.5, 70.6, 70.6, 71.8 (CH₂ PEG) 84.6 (Cqt) 98.8 (Cqt) 107.4 (Cqt) 111.4 (CH) 125.9 (CH) 126.3 (CH) 133.6 (CH) 135.1 (Cqt) 147.8 (Cqt) 154.3 (Cqt) 164.9 (C=O).

Compound 11.

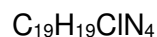
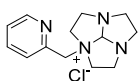


M = 139.20 g.mol⁻¹

N-Dimethoxymethyl-*N,N*-dimethylamine (1.1 g, 9.28 mmol) was added to a solution of tacn (1.2 g, 9.28 mmol) in a mixture of CHCl₃/toluene 2/8 v/v (10 mL). The reaction mixture was stirred at r.t. for 4 h, and then the solvent was evaporated under reduced pressure yielding **11** as a clear oil in quantitative yield (1.28 g, 99%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.64-2.69 (m, 6H) 2.93-2.99 (m, 6H) 4.90 (s, 1H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298K) δ (ppm) 51.8 (CH₂ tacn) 104.0 (CH).

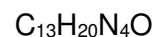
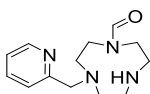
Compound 12.



M = 266.77 g.mol⁻¹

The crude product **11** (1.1 g, 7.90 mmol) was dissolved in THF (20 mL), and a solution of 2-(chloromethyl)pyridine (950 mg, 7.48 mmol, 1.1 equiv.) in THF (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 week. Compound **12** precipitated from the reaction mixture and was isolated by vacuum filtration (1.3 g, 69%).

Compound 13.

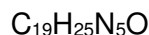
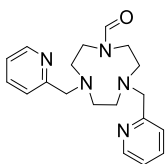


M = 248.33 g.mol⁻¹

The ammonium salt **12** (1.3 g, 4.87 mmol) was dissolved in water (20 mL) and stirred for 12 hours. After evaporation of the solvent compound **9** was obtained as a yellow oil (1.21 g, 100%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) (*NMR spectrum shown the presence of 2 rotamers*) δ (ppm) 2.85-3.17 (m, 14H, CH₂ tacn) 3.24-3.66 (m, 4H CH₂ tacn) 3.69-3.74 (m, 4H, CH₂ tacn) 3.86 (s, 2H, CH₂) 4.02 (s, 2H, CH₂) 7.37-7.42 (m, 2H, CH) 7.57-7.86 (m, 4H, CH) 8.48 (m, 2H, CH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) (*NMR spectrum shown the presence of 2 rotamers*) δ (ppm) 44.1, 45.8, 46.4, 47.0, 47.4, 49.2, 50.2, 51.7, 52.6, 53.7, 53.9 (CH₂ tacn) 62.5, 62.8 (CH₂) 126.9, 127.1 (CH) 141.2 (CH) 151.2 (CH) 169.1, 170.2 (C=O).

Compound 14.

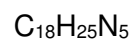
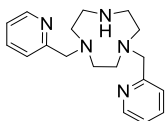


$$M = 339.44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a solution of **13** (1.21 g, 4.87 mmol) in acetonitrile (30 mL) was added potassium carbonate (1.35 g, 9.74 mmol) and 2-(chloromethyl)pyridine (680 mg, 5.35 mmol). The mixture was stirred for 3 days, filtered over Celite[®] and dried under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ 100% to CH₂Cl₂/MeOH 90/10) yielding compound **14** as a brown oil (1.35 g, 84%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) (*NMR spectrum shown the presence of 2 rotamers*) δ (ppm) 2.46-2.48 (m, 2H, CH₂ tacn) 2.69-2.73 (m, 2H, CH₂ tacn) 3.16 (s, 4H, CH₂ tacn) 3.19-3.50 (m, 2H, CH₂ tacn) 3.76 (s, 2H, CH₂) 3.79 (s, 2H, CH₂) 7.06 (m, 2H, CH) 7.26 (d, 2H, 3J= 6 Hz, CH) 7.34 (d, 2H, ³J= 7 Hz, CH) 7.54 (m, 2H, CH) 7.97 (s, 1H, CH) 8.42 (m, 2H, CH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) (*NMR spectrum shown the presence of 2 rotamers*) δ (ppm) 47.4, 50.5, 53.3, 54.3, 54.5, 58.0 (CH₂ tacn) 63.2, 63.9 (CH₂) 122.0, 122.1 (CH) 122.8, 123.0 (CH) 136.3, 136.6 (CH), 149.0, 149.2 (CH) 159.6, 159.8 (Cqt) 163.7 (C=O).

Compound 15.



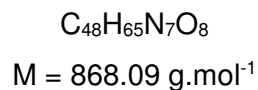
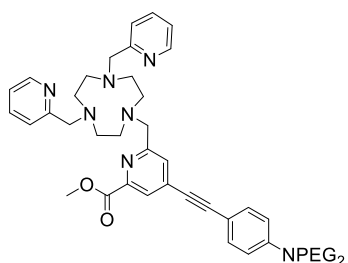
$$M = 311.43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **14** (408 mg, 1.20 mmol) was dissolved in a mixture of conc. HCl/MeOH 1/1 (40 mL) and stirred at 100 °C for 12 hours. After evaporation of the solvent, the residue was redissolved in

H₂O (100 mL) and the pH was adjusted to pH = 14 by adding NaOH pellets at 0 °C. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure, yielding **11** as a yellow oil (359 mg, 77%).

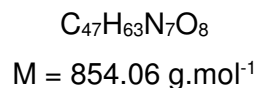
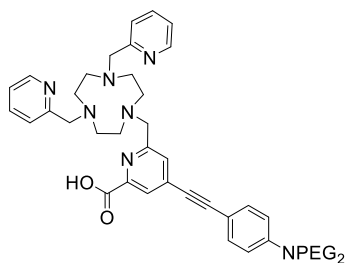
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.66 (s, 4H, CH₂ tacn) 2.93 (m, 4H, CH₂ tacn) 3.04 (m, 4H, CH₂ tacn), 4.06 (s, 4H, CH₂) 7.62 (t, 2H, ³J= 6.9 Hz, CH) 7.34 (d, 2H, ³J= 7.8 Hz, CH) 8.17 (t, 2H, ³J= 6.9 Hz, CH) 8.37 (d, 2H, ³J= 7.8 Hz, CH). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 45.6, 51.0, 52.4 (CH₂ tacn) 58.6 (CH₂) 129.8 (CH) 131.3 (CH) 144.7 (CH) 150.3 (CH) 151.2 (Cqt).

Compound 16.



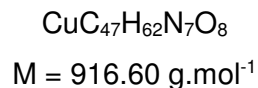
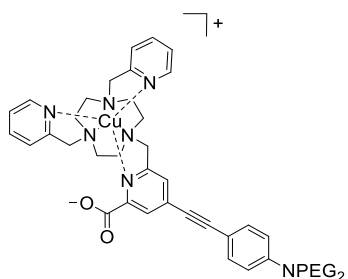
A solution of **10** (600 mg, 0.92 mmol) in acetonitrile (30 mL) was added dropwise to a solution of compound **15** (288 mg, 0.92 mmol). The solution was let to stir at r.t. for 5 days, then filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on neutral Alumina (CHCl₃ to CHCl₃/MeOH 85/15). The purified compound was then dialyzed to yield compound **16** as a yellow oil (439 mg, 55 %).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.88-2.91 (m, 12H, CH₂ tacn) 3.36 (s, 6H, CH₃) 3.37-3.62 (m, 24H, CH₂) 3.86 (s, 4H, CH₂) 3.92 (s, 2H, CH₂) 3.98 (s, 3H, CH₃) 6.65 (d, 2H, ³J= 9 Hz) 7.10 (t, 2H, ³J= 5 Hz) 7.35 (d, 2H, ³J= 9 Hz) 7.51 (d, 2H, ³J= 8 Hz) 7.62 (t, 2H, ³J= 3 Hz) 7.64 (s, 1H) 8.01 (s, 1H) 8.49 (d, 2H, ³J= 4 Hz). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 50.8 (CH₂ βN) 52.9 (CH₃) 55.3, 55.7 (CH₂ tacn) 59.0 (CH₃) 64.1 (CH₂) 64.5 (CH₂) 68.3, 70.6, 70.6, 70.7, 71.9 (CH₂) 85.2 (Cqt) 97.0 (Cqt) 108.0 (Cqt) 111.4 (CH) 122.4 (CH) 123.4 (CH) 125.2 (CH) 127.3 (CH) 133.5 (CH) 133.9 (Cqt) 136.4 (CH) 147.2 (Cqt) 148.6 (Cqt) 148.9 (Cqt) 166.7 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for [C₄₈H₆₆N₇O₈+H]⁺ 868.4967, found 868.4962.

Compound 17.


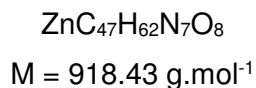
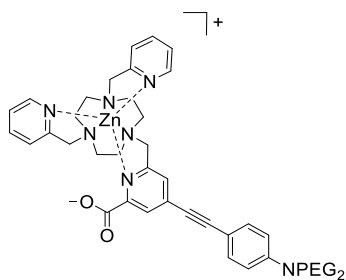
The previous compound **16** (100 mg, 0.11 mmol) was dissolved in THF (4 mL) and 1M KOH_(aq) (2 mL) was added. The mixture was stirred at 50°C for 3 hours and concentrated under reduced pressure. The crude was dissolved in H₂O (3 mL) and the pH was brought to 3 with HCl 1M and the product was dialyzed yielding compound **17** (97 mg, 99%).

¹H NMR (D₂O, 500 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.73 – 2.95 (m, 8H, CH₂ tacn) 3.26 – 3.30 (m, 9H, CH₃ PEG) 3.45 – 3.51 (m, 28H, CH₂ tacn + CH₂ PEG) 3.79 (s, 2H) 3.88 (s, 2H) 6.61 (m, 2H) 7.15 – 7.17 (m, 3H) 7.19 – 7.25 (m, 2H) 7.35 (m, 2H) 7.73 (m, 1H) 7.80 (m, 1H) 8.41 (s, 1H). **¹³C NMR** (D₂O, 126 MHz, 298 K) δ (ppm) 51.5, 51.9 (CH₂ tacn) 52.8 (CH₂ β N) 53.8 (CH₂ tacn) 60.9 (CH₃) 62.9 (CH₂) 64.5 (CH₂) 65.3 (CH₂) 70.6, 71.2, 72.3, 72.5, 72.8, 73.9, 74.9 (CH₂) 88.8 (Cqt) 99.9 (Cqt) 110.1 (Cqt) 114.8 (CH) 125.7 (CH) 126.6 (CH) 127.3 (CH) 128.9 (CH) 136.1 (Cqt) 136.4 (CH) 140.8 (CH) 151.7 (CH) 156.5 (Cqt) 156.8 (Cqt) 160.7 (Cqt) 173.8 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for [C₄₇H₆₅N₇O₈+H]²⁺ 427.7441, found 427.7446.

Compound 18.


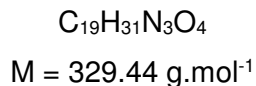
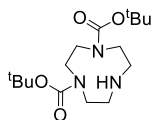
Ligand **Hno2py1fluo (17)** (10 mg, 0.01 mmol) was dissolved in ultra pure deionized H₂O (5 mL), and the pH of the solution was adjusted to pH = 5. Cu(ClO₄)₂·6H₂O (4 mg, 0.01 mmol) was added and the pH was adjusted to 6.6. The mixture was stirred for 24 hours at 60°C. The resulting compound was purified by semi-preparative HPLC and lyophilized (10 mg, 94%).

ESI-HRMS m/z calcd. for [C₄₇H₆₃N₇O₈Cu]²⁺ 458.2011, found 458.2015.

Compound 19.


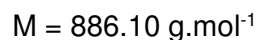
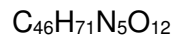
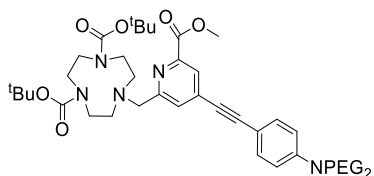
Ligand **Hno2py1fluo (17)** (10 mg, 0.01 mmol) was dissolved in 5 mL ultra pure H₂O, and the pH of the solution was adjusted to pH = 6.6. Zn(ClO₄)₂·6H₂O (4 mg, 0.01 mmol) was added and the pH was adjusted to 6.6. The mixture was stirred for 24 hours at 60 °C. The resulting compound was purified by semi-preparative HPLC and lyophilized (9.8 mg, 90%).

ESI-HRMS m/z calcd. for [C₄₇H₆₃N₇O₈Zn]²⁺ 459.7014, found 459.7009

Compound 20.


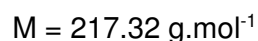
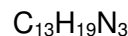
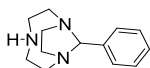
1,4,7-triazacyclononane (550 mg, 4.26 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL) and triethylamine (1.6 mL, 9.37 mmol) was added. The mixture was cooled to 0 °C before dropwise addition of a solution of Boc-ON (2.20 g, 8.51 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL). The reaction was let to stir for an additional 6 hours, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was retaken in AcOEt (30 mL) and the organic layer was washed with a solution of 4% NaHCO_{3(aq)} (2 × 15 mL), Brine (2 × 15 mL), and 10% citric acid (3 × 20 mL). The pH of the resulting citric acid layer was adjusted to pH = 10 with NaOH pellets and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to dryness, yielding compound **15** as a colorless oil (1.26 g, 92%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.32 (s, 18H, CH₃ ^tBu) 1.77 (s, 1H, NH) 2.76 (s, 4H, CH₂ tacn) 3.07-3.12 (m, 4H, CH₂ tacn) 3.27-3.33 (m, 4H, CH₂ tacn). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 28.30 (CH₃ ^tBu) 47.1, 47.5, 47.9, 48.0, 49.3, 49.6, 50.2, 51.4, 52.1, 52.2, 52.8 (CH₂ tacn) 79.3, 79.3 (Cqt) 155.4, 155.6 (C=O).

Compound 21.


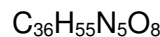
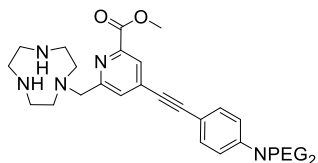
To a suspension of compound **20** (443 mg, 1.34 mmol) and K_2CO_3 (370 mg, 2.68 mmol) in acetonitrile (40 mL) was added dropwise to a solution of **10** (790 mg, 1.34 mmol). The reaction was let to stir for 4 days before filtration through Celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography (SiO_2 AcOEt) yielding compound **17** as an orange oil (700 mg, 65%).

¹H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 323 K) δ (ppm) 1.45 (s, 18H, CH_3 tBu) 1.77 (s, 1H, NH) 2.76 (s, 4H, CH_2 tacn) 3.28 (s, 9H, CH_3) 3.27-3.63 (m, 36H, CH_2 tacn + CH_2 PEG) 6.65 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, CH) 7.32 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz) 7.66 (m, 1H, CH) 7.95-8.04 (m, 1H, CH). **¹³C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 323 K) δ (ppm) 28.6, 28.7 (CH_3 tBu) 49.5, 54.6 (CH_2 tacn) 51.1 (CH_2 N) 53.7 (CH_3) 58.7 (CH_3) 62.4 (CH_2) 67.5, 68.7, 70.7, 70.8, 70.9, 72.1 (CH_2), 79.6, 80.1 (Cqt) 85.3 (Cqt) 108.6 (Cqt) 111.8 (CH) 125.5 (CH) 126.4 (CH) 127.3 (CH) 133.5 (CH) 148.9 (Cqt) 155.8 (Cqt) 165.7 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{46}\text{H}_{71}\text{N}_5\text{O}_{12} + \text{H}]^+$ 886.5171, found 886.5176.

Compound 22.


To a solution of 1,4,7-triazacyclononane (450 mg, 3.48 mmol) in distilled ethanol (70 mL) containing molecular sieve was added benzaldehyde (369 mg, 3.48 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours, then filtered through a pad of Celite[®] and the solvent was removed under reduced pressure, yielding **20** as a white solid (750 mg; 95%).

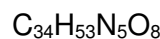
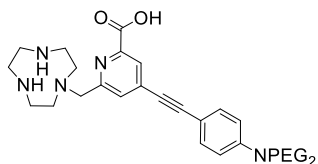
¹H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.89-2.93 (4H, m, CH_2 tacn); 2.99-3.03 (2H, m, CH_2 tacn); 3.07-3.17 (4H, m, CH_2 tacn); 3.32-3.39 (2H, m, CH_2 tacn); 5.66 (1H, s, CH aminal); 7.18 (1H, t, $^3J = 7.3$ Hz, CH_{Ar}); 7.29 (2H, t, $^3J = 7.3$ Hz, CH_{Ar}); 7.50 (2H, d, $^3J = 7.3$ Hz, CH_{Ar}). **¹³C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 49.3, 49.6, 58.8 (CH_2 tacn) 88.3 (CH) 126.6, 126.7, 128.2 (CH_{Ar}) 145.8 (Cqt).

Compound 24.


$$M = 685.86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **22** (400 mg, 1.84 mmol) was dissolved in acetonitrile (100 mL) and K_2CO_3 (508 mg, 3.68 mmol) was added before the addition of a solution containing **10** (1.2 g, 1.84 mmol) in acetonitrile (50 mL) over a period of 30 minutes. The reaction was then let to stir for 2 days. Filtration through Celite® and evaporation of the solvent gave a crude yellow oil that was purified by column chromatography (Al_2O_3 , CH_2Cl_2 100% to CH_2Cl_2 / MeOH / isopropylamine 90:7: 3) to yield the deprotected compound **24** as a yellow oil (781 mg, 62 % over two steps).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.74 (s, 8H, CH_2 tacn) 2.85 (s, 4H, CH_2 tacn) 3.00 (s, 2H, NH) 3.35 (s, 6H, CH_3) 3.51 – 3.62 (m, 24H, CH_2) 3.96 (s, 2H, CH_2) 3.98 (s, 3H, CH_3) 6.94 - 6.98 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.9$ Hz, 2H, CH) 7.35 - 7.38 (s, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 2H, CH) 7.61 (s, 1H, CH) 8.01 (s, 1H, CH). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 46.7, 47.1, 50.9 (CH_2 tacn) 53.1 (CH_3) 53.2 (CH_2) 59.1 (CH_3) 61.7 (CH_2) 68.4, 70.7, 70.7, 70.8, 72.0 (CH_2 PEG) 85.1 (Cqt) 97.4 (Cqt) 108.1 (Cqt) 111.5 (CH) 125.5 (CH) 127.1 (CH) 133.6 (CH) 134.2 (Cqt) 147.5 (Cqt) 148.7 (Cqt) 161.0 (Cqt) 165.6 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_8]^+$ 686.4123, found 686.4124.

Compound 25.


$$M = 671.39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

The previous compound **24** (200 mg, 0.29 mmol) was dissolved in THF and 1M KOH (2 mL) was added. The mixture was stirred at 50 °C for 3 hours and then concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by semi-preparative HPLC yielding compound **25** as a yellow oil (188 mg, 97%).

^1H NMR (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.12 (m, 4H), 3.25-3.34 (m, 12H) 3.47-3.58 (m, 19H) 3.68-3.78 (m, 13H) 4.18 (s, 2H, CH_2 αN) 7.07-7.10 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H) 7.48 (s, 1H) 7.97-8.00 (d, $^3J = 9$ Hz, 3H). **^{13}C NMR** (D_2O , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 46.1, 47.5, 51.6, 54.7, 60.0 (CH_2) 60.8 (CH) 69.7, 72.3, 72.7, 73.8 (CH_2 PEG) 117.3 (CH_{Ar}) 121.1 (Cqt) 129.0 (CH_{Ar}) 129.3 (Cqt) 131.0

(CH_{Ar}) 134.1 (CH_{Ar}) 149.4, 151.5, 152.8, 162.2 (Cqt) 198.0 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for [C₃₅H₅₄N₅O₈]⁺ 672.3966, found 672.3966.

Spectroscopic experiments (ENS Lyon)

Absorption spectra were recorded in diluted solution *ca.* 10⁻² or 10⁻³ mM in CH₂Cl₂ (spectrophotometric grade) on a JASCO V-650 spectrophotometer. Emission and Excitation spectra were recorded using a Horiba-Jobin-Yvon Fluorolog-3 fluorimeter. The steady state luminescence was excited by unpolarized light from a 450 W xenon continuous wave lamp and detected at an angle of 90° for measurements of dilute solutions (10 mm quartz cuvette) either by a Hamamatsu R928 or Peltier cooled R2658 photomultiplier tube. Luminescence quantum yield Φ were measured in diluted solutions with an absorbance lower than, 0.1, and were determined using coumarin as reference.

Radiolabelling with ⁶⁴Cu (CRCINA, Univ. Nantes)

⁶⁴CuCl₂ in HCl 0.1 N was added in a ratio 1:1 molar equivalent into acetate 0.1 M pH = 5.5 buffered Ligand solution. The reaction mixture was incubated at 100 °C for 15 min. Then, the radiolabeling reaction was quenched through adding a calculated volume of 1 mM EDTA pH and stirred at room temperature for 10 min. 2 μ L of this solution was taken out and deposited on an ITLC-SG plate (Agilent Technologies). The thin layer chromatography was developed for 10 cm using 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5). The plate was then removed from the solvent and exposed for 5 min on a storage phosphor plate, and this was revealed using a radiometric phosphor imager Cyclone® Plus (PerkinElmer) and analyzed with the Optiquant® software to obtain a radiochromatogram.

Potentiometric measurements (Univ. Debrecen)

The protonation constants of the ligands were determined by pH-potentiometric titrations carried out with a Metrohm 888 Titrando titration workstation using a Metrohm 6.0233.100 combined electrode. The titrated solutions (6.00 mL) were thermostated at 25 °C and the ionic strength in the samples was set to 0.15 M NaCl. The samples were stirred and kept under inert gas atmosphere (N₂) to avoid the effect of CO₂. For the pH-calibration of the electrode standard buffers (KH-phthalate (pH=4.005) and borax (pH=9.177)) were used. The calculation of [H⁺] from the measured pH values was performed with the use of the method proposed by Irving *et al.* [187] by titrating a 0.01 M HCl solution (I=0.15 M NaCl) with a standardized NaOH solution (from the data collected in the pH range of 1.75-2-2). The differences between the measured and calculated pH

values were used to obtain the $[H^+]$ concentrations from the pH-data obtained in the titrations. The ion product of water was determined from the same experiment in the pH range 11.2-11.9.

The concentration of the ligand stock solution was determined by pH-potentiometric titration from the titration data obtained in the presence and absence of large Mn^{2+} excess. In the pH-potentiometric titrations of the ligand 186 data pairs were recorded in the pH range of 2.77-11.85, while the sample containing the Mn^{2+} ion (one equivalent) was titrated in the pH range of 3.46-11.86 when 126 data pairs were collected and fitted. The protonation and stability constants were calculated from the titration data with the PSEQUAD program ^[188].

r_{1p} and r_{2p} relaxivities of the Mn^{2+} complex (Univ Debrecen)

The relaxation times of water protons were measured at 60 MHz with a Bruker Minispec MQ-60 NMR Analyzer. The temperature of the sample holder was set (25.0 ± 0.2 °C) and controlled with the use of a circulating water bath. The longitudinal relaxation times (T_1) were measured by using the inversion recovery method ($180^\circ - t - 90^\circ$) by averaging 5-6 identical data points obtained at 14 different t values. The transverse relaxation times (T_2) were measured by using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence (CPMG) sequence again by averaging 5-6 identical data points.

The r_{1p} and r_{2p} relaxivity of the complex was determined by using batch samples which were prepared under argon atmosphere having the ligand present at 1.5 mM concentration (the pH in these samples was kept constant at pH = 8.12 with the use of HEPES buffer (I=0.15 M NaCl, 25 °C). Various amounts of $MnCl_2$ were added to these solutions and the relaxation times of the solutions were measured. By relying on the species distribution curves under these conditions only one Mn^{2+} ion containing species is present in solution which is the $[Mn(L)]$ complex. The curve obtained by plotting $1/T_{1,2p}$ for the samples with $[L] > [Mn^{2+}]$ as a function of Mn^{2+} concentration gives a straight line, with a slope that is equal to the r_{1p} and r_{2p} relaxivities, respectively. To confirm the complex formation and its pH range a sample containing 1 mM of the ligand and Mn^{2+} ion ($V_{tot} = 10$ mL) was titrated with NaOH and the $1/T_{1,2p}$ data was collected in the pH range of 3.0-11.0. The given data co-plotted with the species distribution curve calculated based on the stability constants determined by pH-potentiometric method were in excellent agreement.

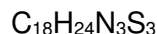
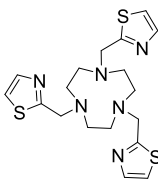
Compound 26.



$$M = 178.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a stirred solution of thiazol-2-ylmethanol (1.15 g, 10 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) under N_2 , was added phosphorus tribromide (1 mL, 11.5 mmol). The mixture was then refluxed for 5 hours. 40 mL of distilled water were added, and the pH of the aqueous layer was adjusted to 6-7 by addition of K_2CO_3 . Extraction with CHCl_3 (3 × 30 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum and gave **1** as a yellow oil (1.42g, 89%).

Compound 27.

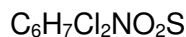
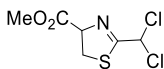


$$M = 420.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **26** (1.36g, 7.6 mmol) was added to a solution of tacn (300 mg, 2.3 mmol) in 100 mL of acetonitrile, K_2CO_3 (6.30 g, 45.6 mmol). The reaction was stirred for 2 days. Filtration and evaporation of the solvent gave a brown oil. **no3th** was purified by flash chromatography (SiO_2 , CH_2Cl_2 100% to $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10) (851 mg, 87%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.98 (s, 12H, CH_2 tacn) 4.04 (s, 6H, CH_2 αN) 7.27 (d, $^3\text{J} = 4\text{Hz}$, 1H, CH αS) 7.67 (d, $^3\text{J} = 4\text{Hz}$, 1H, CH αN). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 56.2 (CH_2 tacn) 60.3 (CH_2) 119.6 (CH αS) 142.5 (CH αN). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{S}_3$, 421.1297 ; found 421.1299.

Compound 28.



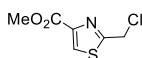
$$M = 228.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a solution of NaOMe (0.13 g, 2.6 mmol, 0.1 eq.) in a mixture 8:2 of DCM/MeOH (100 mL), at -10°C and under N_2 atmosphere, was added dropwise dichloroacetonitrile (4.0 mL, 26.5 mmol). The mixture was kept below 0°C and stirred during 30 min. Then L-cysteine methyl ester hydrochloride (8.58 g, 50.0 mmol) was added to the solution and the mixture was warmed up to

room temperature. The solution was stirred for 18 hours. To the resulting yellowish solution, CH₂Cl₂ (30mL) and water (40mL) were added, the organic layer was extracted, and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20mL). The organic fractions were combined, dried over MgSO₄ and concentrated to give the crude compound **28** as a yellow oil which was used as crude product without further purification (4.99 g).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.61-3.69 (m, 2H, CH₂) 3.77 (s, 3H, CH₃) 5.14 (t, ³J= 9.6Hz, 1H, CH αC=O) 6.46 (1H, CH αCl). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 35.8 (CH₂ αS) 53.0 (CH₃) 66.3 (CH αCl) 77.4 (CH αC=O) 169.9 (C=O) 172.3 (Cqt αN).

Compound 29.

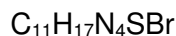
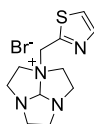


$$M = 191.63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a solution of **28** (4.99 g, 25.0 mmol) in THF (140 mL), Et₃N (3.67 mL, 37.5 mmol) was added dropwise over a period of 15 min. The solution was then stirred for 2 hours until consumption of the starting material. The reaction was filtered and the THF was evaporated. The residue is diluted in CH₂Cl₂ (50mL) and washed twice with water (2 x 50mL). The organic phase is dried with MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting crude is then filtrated to remove the trace of residual Et₃N.HCl (SiO₂, Hex/CHCl₃ 50:50). The white yellowish solid is obtained (3.43 g, 71% in two steps).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.92 (s, 3H) 4.85 (s, 2H) 8.19 (s, 1H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 41.6 (CH₂) 52.7 (CH₃) 129.3 (CH αS) 146.8 (Cq αS) 161.4 (C=O) 167.6 (Cqt αC=O).

Compound 30.

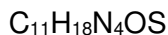
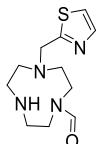


$$M = 317.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

The protected tacn **11** (1.10 g, 7.90 mmol) was dissolved in the minimum amount of THF (10 mL) and then a solution of 2-(bromomethyl)thiazole (1.90 g, 10.2 mmol) in THF (3 mL) was added. The reaction mixture was stirred at r.t. for 20 hours. The precipitate was filtered to yield **30** as yellow powder (2.20 g, 89%).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.35–3.17 (m, 5H, CH₂ tacn) 3.66–3.50 (m, 5H, CH₂ tacn) 4.10–4.03 (m, 2H, CH₂ tacn) 5.07 (s, 2H, CH₂) 6.06 (s, 1H, CH) 7.85 (d, 1H, =CH, ³J = 3 Hz), 8.02 (d, 1 H, =CH, ³J = 3 Hz). **¹³C NMR** (D₂O, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 54.3, 57.6, 59.6 (2 C; CH₂ tacn) 61.3 (CH₂) 123.3 (CH) 127.4, 146.9 (=CH) traces of hydrolysis appear in the spectra due to the solvent.

Compound 31.

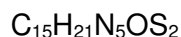
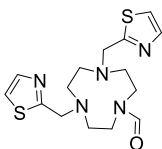


$$M = 254.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

The ammonium salt **30** (2.20 g, 6.93 mmol) was dissolved in water (100 mL) and stirred at r.t. for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure yielding **31** as a brown oil (1.75 g, 99%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.17– 2.96 (m, CH₂ tacn), 3.47–3.17 (m, CH₂ tacn), 3.59–3.50 (m, CH₂ tacn), 3.70–3.59 (m, CH₂ tacn), 3.85–3.70 (m, CH₂ tacn), 4.17 (s, CH₂-N, minor rotamer), 4.29 (s, CH₂-N, major rotamer), 7.63 (d, CH, ³J = 3 Hz), 7.83 (d, CH, ³J = 3 Hz), 8.05 (s, CHO major rotamer), 8.19 (s, =CHO minor rotamer). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) major rotamer 44.3, 47.1, 47.2, 51.7 (CH₂ tacn), 53.4 (2 C), 57.9 (CH₂-N), 124.0, 144.6 (CH), 170.2 (C=O), 171.5 (C=N); minor rotamer 46.7, 49.5, 50.9, 53.2 (CH₂ tacn) 58.5 (CH₂-N) 124.0, 144.6 (=CH) 169.4 (C=O) 171.8 (C=N).

Compound 32.

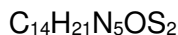
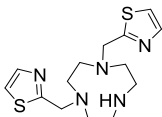


$$M = 351.49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

A solution of 2-(bromomethyl)thiazole **26** (800 mg, 3.97 mmol) in acetonitrile (20 mL) and potassium carbonate (1.09 g, 7.94 mmol) were added to **31** (842 mg, 3.31 mmol) dissolved in acetonitrile (50 mL). The mixture was stirred at r.t. during 3 d, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield a brown oil. The crude was purified on flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 90/10) yielding compound **32** as a yellow oil (1.03 g, 89%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.64 (m, 2 H, CH₂ tacn) 2.83 (m, 2 H, CH₂ tacn) 2.99 (m, 2 H, CH₂ tacn) 3.33 (s, 4 H, CH₂ tacn) 3.49 (m, 2 H, CH₂-N) 4.04 (s, 4 H, CH₂-N) 7.26 (s, =CH, ³J = 3Hz) 7.67 (d, =CH, ³J = 3Hz) 8.11 (s, =CHO). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 47.2, 50.5, 53.1, 54.4, 54.8, 58.2 (CH₂ tacn) 58.4, 59.2 (CH₂-N) 119.1, 142.2 (=CH) 163.6 (C=O) 170.2, 171.4 (C=N).

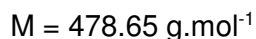
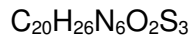
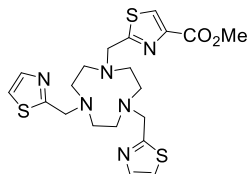
Compound 33.



The resulting product was dissolved in methanol (15 mL) and conc. HCl (15 mL) was added. The mixture was refluxed with stirring for 20 hours. The aqueous layer was extracted with chloroform (3 × 30 mL). Organic layers were discarded. The pH of the aqueous layer was adjusted to ca. pH = 12 with NaOH pellets, then extracted with chloroform (3 × 30 mL). Organic layers were recombined, dried under MgSO₄ and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure yielding a brown oil. The residue was purified by column chromatography (Al₂O₃, CHCl₃/CH₃OH 95:5) to yield **33** as a brown oil (1.413 g, 77%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.74 (m, 8 H, CH₂ tacn) 2.84 (m, 4 H, CH₂ tacn) 4.07 (s, 4 H, CH₂-N) 7.26 (d, 2 H, ³J = 3Hz) 7.67 (d, 2 H, ³J = 3Hz). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 46.9, 52.8, 53.0 (CH₂ tacn) 58.3 (CH₂-N) 119.2, 142.0 (=CH) 170.9 (C=N). **ESI-HRMS** m/z calcd. for C₁₄H₂₂N₅S₂, 324.1311; found, 324.1310.

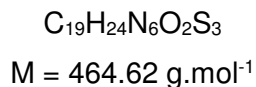
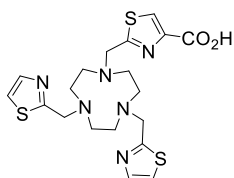
Compound 34.



A solution of **29** (218 mg, 1.14 mmol) in acetonitrile (60 mL) and potassium carbonate (315 mg, 2.28 mmol) were added to **33** (350 mg, 1.08 mmol) dissolved in acetonitrile (20 mL). The reaction was stirred at r.t. for 3 days, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield a brown oil. The residue was purified by flash chromatography (SiO₂, CHCl₃/MeOH 100:0 to 90:10) yielding **34** as a yellow oil (458 mg, 91%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.99-2.94 (m, 12H, CH₂ tacn) 3.91 (s, 3H, CH₃) 4.03 (s, 6H, CH₂-N) 7.25 (d, 2H, ³J = 3 Hz) 7.65 (d, 2H, ³J = 3 Hz) 8.13 (s, 1H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 52.5 (CH₃) 55.9, 56.1, 56.2 (CH₂ tacn) 60.1 (CH₂) 119.5, 128.4, 142.0 (CH) 146.4 (Cqt) 162.0 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for C₂₀H₂₇N₆O₂S₃, 479.1355; found, 324.1310.

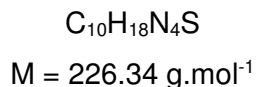
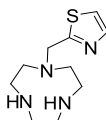
Compound 35.



Compound **34** (2.0 g, 3.3 mmol) was dissolved in 6M HCl (50 mL) and stirred at 100°C for 24 hours. Evaporation of the solvent gave **Hno2th1tha** as a white off solid (2.2 g, 99%, calcd. for 2 HCl, number of HCl has been determined by potentiometric titration).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.78 (s, 4H, CH₂ tacn) 2.97 (m, 4H, CH₂ tacn) 3.43 (m, 4H, CH₂ tacn) 4.47 (s, 4H, CH₂ th) 4.79 (s, 2H, CH₂ tha) 7.78 (d, ³J = 3 Hz, 2H) 7.92 (d, ³J = 3 Hz, 2H) 8.35 (s, 1H). **¹³C NMR** (D₂O, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 49.2, 52.1, 54.9 (CH₂ tacn) 55.5 (CH₂ th) 57.3 (CH₂ tha) 127.1, 135.1, 137.1 (CH) 149.3, 162.9, 166.1, 174.2 (Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. m/z calcd. for C₁₉H₂₅N₆O₂S₃, 465.1195 ; found, 465.1195.

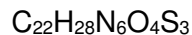
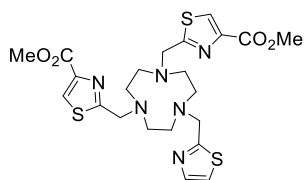
Compound 36.



Compound **30** (887 mg, 3.49 mmol) was dissolved in conc. HCl /MeOH 1/1 v/v (20 mL) and stirred at reflux for 24 hours. After evaporation of the solvent, the crude product was dissolved in water and the pH of the aqueous solution was adjusted to pH = 14 with NaOH pellets. Then the aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 30 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄, and evaporated to yield **36** as a brown oil (791 mg, 99%).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.68 (m, 4H) 2.98 (m, 4 H) 3.24 (s, 4H, CH₂-N) 4.15 (s, 2H) 7.70 (d, 1H, ³J = 3 Hz) 7.80 (d, 1H, ³J = 3 Hz). **¹³C NMR** (D₂O, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 44.7, 46.1, 49.7 (CH₂ tacn) 53.7 (CH₂-N) 127.9 (CH) 136.4 (CH) 171.4 (Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. for C₁₀H₁₉N₄S, 227.1324 ; found, 227.1325.

Compound 37.

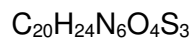
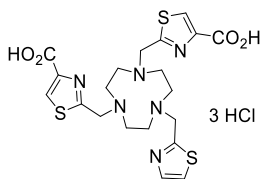


$$M = 536.68 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

A solution of **29** (1.35 g, 7.32 mmol) in acetonitrile (60 mL) and potassium carbonate (4.05 g, 29.3 mmol) were added to **36** (791 mg, 3.49 mmol) dissolved in acetonitrile (20 mL). The mixture was stirred at r.t. for 3 days, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield a brown oil. The residue was purified by flash chromatography on (Al_2O_3 , Hexane/ CHCl_3 70:30 to 30/70) yielding **37** as a yellow oil (1.35 g, 72%).

^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K) δ (ppm) 2.92-2.98 (m, 12H, CH_2 tacn) 3.91 (s, 6H, CH_3) 4.02 (s, 6H) 7.25 (d, 1H, $^3J = 3$ Hz) 7.64 (d, 1H, $^3J = 3$ Hz) 8.12 (s, 1H). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 52.5 (CH_3) 56.1, 56.2, 56.4 (CH_2 tacn) 60.2 (CH_2) 119.4 ($\text{CH } \alpha\text{S}$) 128.4 ($\text{CH } \alpha\text{S}$) 142.3 ($\text{CH } \alpha\text{N}$) 146.4 (Cqt) 162.0 ($\text{C}=\text{O}$) 171.5 (Cqt) 174.0 (Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_3$, 537.1406 ; found, 537.1408.

Compound 38.

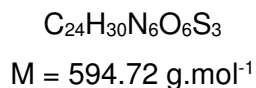
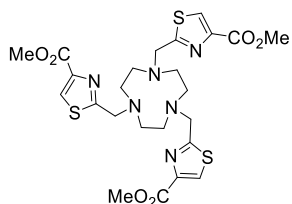


$$M = 508.63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **37** (148 mg ; 0.27 mmol) was dissolved in 6 M HCl (10 mL) and stirred at 100°C for 24 hours. Evaporation of the solvent gave $\text{H}_2\text{no1th2tha}$ as a white off solid (166 mg, 99%, calcd. for 3 HCl, number of HCl has been determined by potentiometric titration).

^1H NMR (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.99 (s, 4H, CH_2 tacn), 3.26 (s, 4H, CH_2 tacn), 3.41 (s, 4H, CH_2 tacn) 4.45 (s, 2H, CH_2) 4.54 (s, 4H, CH_2) 7.72 (s, 1H, CH) 7.82 (s, 1H, CH) 8.18 (s, 1H, CH). **^{13}C NMR** (D_2O , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 51.1, 53.0, 54.0 (CH_2 tacn) 55.4 (CH_2) 58.3 (CH_2) 127.2 ($\text{CH } \alpha\text{S}$) 134.6 ($\text{CH } \alpha\text{S}$) 138.6 ($\text{CH } \alpha\text{N}$) 148.3 (Cqt) 165.7 ($\text{C}=\text{O}$) 170.4 (Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_3$, 509.1093 ; found, 509.1093.

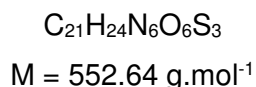
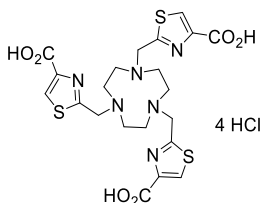
Compound 39.



To a solution of tacn (500 mg, 3.80 mmol) in acetonitrile (50 mL) and K_2CO_3 (3.15 g, 22.8 mmol) was added **29** (1.71 g, 12.7 mmol) and the mixture was stirred for 2 days. After completion of the reaction the mixture was filtered over a pad of Celite® and the solution was evaporated under reduced pressure. The oily residue was purified by flash chromatography (SiO_2 , $CHCl_3$ 100% to $CHCl_3/MeOH$ 90:10) yielding **39** as a yellow oil (2.0 g, 87%).

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.96 (s, 12H, CH_2 tacn) 3.91 (s, 9H, CH_3) 4.03 (s, 6H, CH_2 α N) 8.13 (s, 3H, CH). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 52.0 (CH_3) 56.3 (CH_2 tacn) 60.3 (CH_2) 128.4 (CH α S) 146.5 (Cqt α N) 161.9 (C=O) 173.7 (Cqt α C=O).

Compound 40.



Compound **39** (2.0 g, 3.3 mmol) was dissolved in 6 M HCl (50 mL) and stirred at 100°C for 24 hours. Evaporation of the solvent gave H_3 **no3th** as a white off solid (2.29 g, 99%, calcd. for 4 HCl, number of HCl has been determined by potentiometric titration).

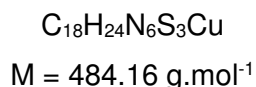
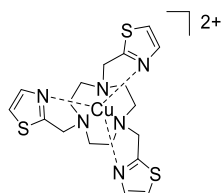
1H NMR (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 3,48 (s, 12H, CH_2 tacn) ; 4,61 (s, 6H, CH_2 α N) ; 8,34 (s, 3H, CH). **^{13}C NMR** (D_2O , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 53.5 (CH_2 tacn) 58.5 (CH_2) 134.2 (CH α S) 148.7 (Cqt α N) 166.3 (C=O) 168.0 (Cqt α C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[C_{21}H_{25}N_6O_6S_3+H]^+$, 553.099 ; found : 553.099.

General method for the synthesis $[M^{II}(\text{no3th})]^{2+}$ complexes ($M = Cu^{2+} / Zn^{2+}$)

The ligand **no3th** (0.1 mmol) was dissolved in acetonitrile (50 mL) and then 1.2 eq of the M(II) perchlorate salts were added. The mixture were stirred for 12 hours under reflux. The solvent was

removed and the residue was resuspended in MeOH. The desired compound remained insoluble in MeOH while the excess of M(II) perchlorate salts were soluble. The solid was filtered and the process repeated with MeOH (2 × 3 mL), then redissolved in acetonitrile and dried under reduced pressure.

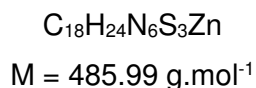
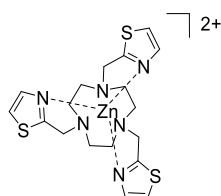
Compound 41.



The compound was obtained as a green powder (55 mg, 96%)

ESI-HRMS m/z calcd. for $[\text{CuC}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{S}_3]^{2+}$ 241.5255 found 241.5260.

Compound 42.



The compound was obtained as a white powder (55 mg, 96%)

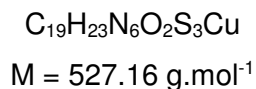
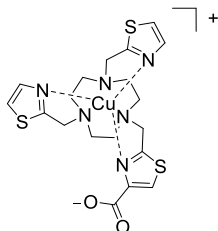
¹H NMR (dms_o-d₆, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.83-2.88 (m, 6H, CH₂ tacn) 3.03-3.08 (m, 6H, CH₂ tacn) 4.56 (s, 6H, CH₂ th) 7.29 (s, 3H, CH th) 7.96 (s, 3H, CH th). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{S}_3\text{Zn}]^{2+}$, 242.0252 ; found, 242.0256.

General method for the synthesis M^{II}L complexes (M = Cu²⁺ / Zn²⁺ ; L = Hno2th1tha / H₂no1th2tha / H₃no3tha)

The ligands (0.1 mmol) were dissolved in 10 mL of water. The pH of the solution was adjusted, ca. pH = 6, before the addition of 0.9 eq of the M(II) perchlorate salts. The pH was checked again and stabilized to pH 6.4 to 6.7 by addition of 0.1 M KOH. The mixture were stired for 12 hours under relfux. After cooling the solution to r.t. the solvent was removed and the residue was resuspended in MeOH. The desired compound remained insoluble in MeOH while the excess of M(II) perchlorate salts were soluble. The solid was filtered and the process repeated with MeOH

(2 × 3 mL), then redissolved in acetonitrile and dried under reduced pressure.

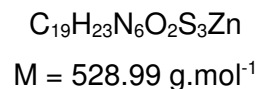
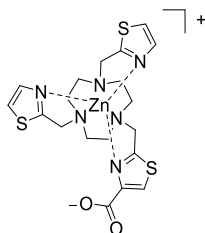
Compound 43.



The compound was obtained as a green powder (49 mg, 93%)

ESI-HRMS m/z calcd. for $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_3\text{Cu}]^{2+}$ 263.5203 ; found 263.5207.

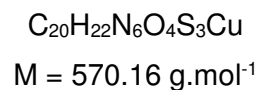
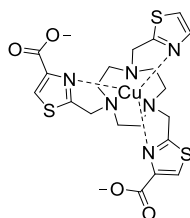
Compound 44.



The compound was obtained as a white powder (50 mg, 94%)

¹H NMR (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.78-2.81 (m, 2H, CH_2 tacn) 2.90-3.01 (m, 4H, CH_2 tacn) 3.14-3.19 (m, 6H, CH_2 tacn) 4.42, 4.47 (s, 4H, CH_2 th) 4.54 (s, 2H, CH_2 tha) 7.15 (d, 2H, $^3J = 4$ Hz, CH th) 7.72 (d, 2H, $^3J = 4$ Hz, CH th) 7.83 (s, 1H, CH tha). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_3\text{Zn}]^{2+}$ 264.0201 ; found 264.0198.

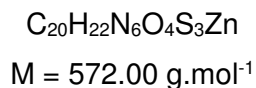
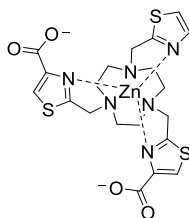
Compound 45.



The compound was obtained as a green powder (51 mg, 91%)

ESI-HRMS m/z calcd. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_3\text{Cu}]^{2+}$ 285.5153 ; found 285.5157.

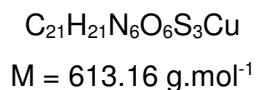
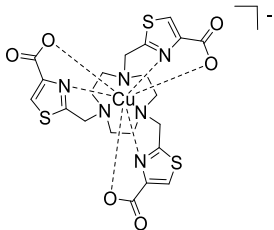
Compound 46.



The compound was obtained as a white powder (53 mg, 93%)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.84-2.95 (m, 4H, CH_2 tacn) 2.99-3.02 (m, 2H, CH_2 tacn) 3.11-3.24 (m, 6H, CH_2 , tacn) 4.40-4.44 (d, 2H, $^3J = 16 \text{ Hz}$, CH_2 tha) 4.52 (s, 2H, CH_2 th) 4.54-4.58 (d, 2H, $^3J = 16 \text{ Hz}$, CH_2 tha) 7.28 (d, 1H, $^3J = 4 \text{ Hz}$, CH th) 7.70 (d, 1H, $^3J = 4 \text{ Hz}$, CH th) 8.04 (s, 2H, CH tha). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[C_{20}H_{24}N_6O_4S_3Zn]^{2+}$ 286.0151 ; found 286.0150.

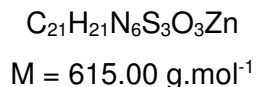
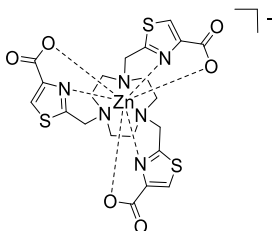
Compound 47.



The compound was obtained as a green powder (55 mg, 90%)

ESI-HRMS m/z calcd. for $[C_{21}H_{24}N_6O_6S_3Cu]^{2+}$, 307.5102 ; found, 307.5102.

Compound 48.



The compound was obtained as a white powder (53 mg, 87%)

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.99-3.14 (m, 12H, CH_2 tacn) 4.58 (s, 6H, CH_2 tha) 8.12 (s, 3H, CH tha). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[C_{21}H_{24}N_6O_6S_3Zn]^{2+}$, 308.0099 ; found, 308.0098.

Potentiometric Titration (ITQB, Lisbon)

The potentiometric setup consisted of a 50 mL glass-jacketed titration cell sealed from the atmosphere and connected to a separate glass-jacketed reference electrode cell by a Wilhelm

type salt bridge filled with 0.1 M KNO_3 electrolyte. An Orion 720A+ measuring instruments fitted with a Metrohm 6.0123.100 glass electrode and a Metrohm 6.0733.100 Ag/AgCl reference electrode was used for the measurements. The ionic strength of the experimental solutions was maintained at 0.10 ± 0.01 M with KNO_3 ; temperature was controlled at 298.2 ± 0.1 K using a Huber CC3-K6 compact cooling and heating bath thermostat and a previously calibrated Orion 91-70-06 ATC-probe. Atmospheric CO_2 was excluded from the titration cell during experiments by slightly bubbling purified nitrogen on the experimental solution. Titrant solutions were added through capillary tips at the surface of the experimental solution by a Metrohm Dosimat 665 automatic buret. Titration procedure is automatically controlled by software after selection of suitable parameters, allowing for long unattended experimental runs.

Titrations were performed in aqueous solutions at 0.10 ± 0.01 M of KNO_3 and 25.0 ± 0.1 °C. The titrants were a KOH solution prepared at *ca.* 0.1 M from a commercial ampoule and standardized by application of the Gran method ^[189], and also a standard HNO_3 solution at 0.100 M used on back titrations as prepared from a commercial ampoule. A standard solution of ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium salt ($\text{K}_2\text{H}_2\text{edta}$) was prepared at 0.050 M from a commercial ampoule. Ligand (commonly designated as L) solutions were prepared at *ca.* 2.0×10^{-3} M in water acidified with HNO_3 to $\text{pH} \approx 2$. The Cu^{2+} and Zn^{2+} solutions were prepared at *ca.* 0.05 M from analytical grade nitrate salts and standardized by complexometric titrations ^[190] with the standard $\text{K}_2\text{H}_2\text{edta}$ solution. Sample solutions for titration contained approximately 0.03–0.05 mmol of ligand in a 30 mL starting volume, and in complexation titrations metal cations were added at *ca.* 0.9 and 1.5 equiv. of the ligand amount.

The electromotive force during titrations was measured after calibration of the electrode by titration of a standard HNO_3 solution at 2.0×10^{-3} . The $[\text{H}^+]$ of the solutions was determined by measurement of the electromotive force of the cell, $E = E^0 + Q \log [\text{H}^+] + E_j$, and the term pH is defined as $-\log [\text{H}^+]$. E^0 and Q were determined from the acidic pH region of the calibration titrations. The liquid-junction potential, E_j , was found to be negligible under the experimental conditions used. The value of $K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$ was found to be equal to $10^{-13.78}$ by titrating a solution of known hydrogen-ion concentration at the same ionic strength in the alkaline pH region, considering E^0 and Q valid for the entire pH range. The protonation constants of H_4edta and the thermodynamic stability constants of its copper(II) complex used in competition titration refinements were taken from the literature. Each in-cell titration consisted of 120–150 equilibrium points in the range of pH 2.5–11.0, and at least two replicate titrations were performed for each particular system. Back titrations were always performed at the end of each direct complexation titration in order to check if equilibrium was attained throughout the entire pH range. An out-of-cell

titration of H₃no3tha with copper(II) in the pH range 3.5–5.0 (where equilibrium was not reached during in-cell titrations) was prepared in 10 separate individual points (each at 1/10 the volume of the corresponding analytical solution for the in-cell titration) closed in vials under nitrogen atmosphere. These points were measured after 4 weeks of stabilization (found by repeated measurement over time of one test vial) and used together with the respective in-cell titration. Competition titrations with H₄edta were performed for each studied ligand and copper(II) to determine the stability constants of the CuL complex species, at a 1:1:1 (Cu:L:edta) ratio using 0.03–0.05 mmol of ligand. The refinements of the stability constants of the copper(II) and zinc(II) complexes were done using titrations with both metal ratios simultaneously, and in case of the copper(II) complexes by using the stability constant for the CuL species previously determined by competition as a fixed value in the speciation model.

The potentiometric data were refined with the HYPERQUAD software ^[191], while species distribution diagrams and pM values were calculated using the HySS software ^[192]. The overall equilibrium constants $\beta_i^H_L$ and β_{MmHhLI} are defined by $\beta_i^H_L = [H_hL_i]/[H]^h[L]^i$ and $\beta_{MmHhLI} = [M_mH_hL_i]/[M]^m[H]^h[L]^i$. Differences, in log units, between the values of protonated (or hydrolysed) and non-protonated constants provide the stepwise (log *K*) reaction constants (being $K_{MmHhLI} = [M_mH_hL_i]/[M_mH_{h-1}L_i][H]$). The errors quoted are the standard deviations calculated by the fitting program for the experimental data in each system.

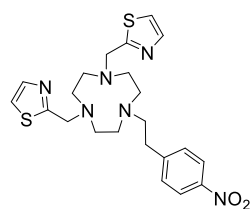
UV-visible and EPR Experiments

Solutions of the copper(II) complexes of the 4 ligands were prepared at ca. 1.0 mM concentration by dissolution of the previously isolated complexes in DMF/water, and these were used as samples for both the Vis and EPR studies. Vis spectra were acquired at 25 °C on a PerkinElmer lambda 650 spectrophotometer. EPR spectra of the frozen sample solutions were acquired at 130 K on a Bruker EMX 300 spectrometer operating in the X-band and equipped with a continuous-flow cryostat for liquid nitrogen, at a microwave power of 2.0 mW and a frequency of 9.5 GHz. All spectra were simulated using a single paramagnetic species, as no additional species with different structures are distinguishable. Simulations of the experimental spectra were performed with the SpinCount software ^[193].

Electrochemical Experiments

The electrochemical studies were performed in a glovebox (Jacomex) (O₂ < 1 ppm, H₂O < 1 ppm) with a home-designed 3-electrode cell (WE: glassy carbon, RE: Ag/AgCl/NaCl (3 M), CE: graphite rod). The potential of the cell was controlled by using an

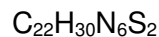
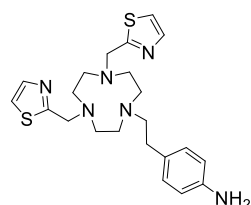
AUTOLAB PGSTAT 302 (Ecochemie) potentiostat monitored by using a computer. The glassy carbon electrode was carefully polished before each voltammetry experiment with a 1 μm alumina aqueous suspension and ultrasonically rinsed in water and then with acetone. Exhaustive electrolysis was performed with a graphite rod working electrode. The ultrapure (18 $\text{M}\Omega$) deoxygenated water was used as received and kept under argon in the glovebox after degassing. Lithium perchlorate (Sigma-Aldrich, 99.99%) was used as a supporting electrolyte in 0.1 M concentration without purification. Experimental redox potential values were recalculated against E° (NHE) by considering that E° (Ag/AgCl/NaCl (3 M)) = 0.22 V vs. NHE.

Compound 49.

$$M = 472.63 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

To a solution of 1,4-bis(thiazolyl-2-ylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane **33** (500 mg, 1.54 mmol) and potassium carbonate (425 mg, 3.08 mmol) in acetonitrile (150 mL), 4-nitrobenzylethynyl bromide (2.83 g, 12.32 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 3 days and filtered through a pad of Celite® before evaporation of the solvent under reduced pressure. The crude mixture was purified by column chromatography (Al_2O_3 , Hexane 100% to CHCl_3 100%). The desired compound **49** was obtained as a yellow oil (363 mg, 50%).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.85 (s, 12H, CH_2 tacn) 2.90 (s, 4H, CH_2 Et) 3.98 (s, 4H, CH_2) 7.23-7.25 (d, 2H, $^3J = 6$ Hz, CH αN) 7.31-7.34 (d, 2H, $^3J = 9$ Hz, CH_{Ar}) 7.64-7.66 (d, 2H, $^3J = 6$ Hz, CH αS) 8.08-8.11 (d, 2H, $^3J = 9$ Hz, CH_{Ar}). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 34.5 (CH_2 βN) 56.9 (CH_2 tacn) 56.1 (CH_2 αN) 59.9 (CH_2 th) 119.3 (CH) 123.6 (CH_{Ar}) 129.6 (CH) 142.3 (CH_{Ar}) 146.5 (Cqt) 148.8 (Cqt) 172.1 (Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2+\text{H}]^+$ 473.1788 found 473.1783.

Compound 50.

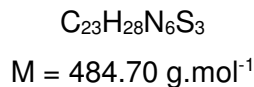
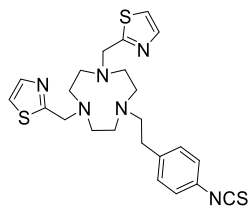
$$M = 442.64 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound **49** (256 mg, 0.54 mmol) was dissolved in methanol (7 mL) and conc. HCl (23 mL). Tin(II) chloride (819 mg, 4.34 mmol) was added and the reaction stirred at r.t. for 24 hours. After consumption of the starting material, monitored by LRMS, H_2O (100 mL) was added and the pH was adjusted to ca. 7/8 with K_2CO_3 . The aqueous layer was extracted with CHCl_3 (4 \times 20 mL), dried over MgSO_4 and the solvent was evaporated. The titled compound was obtained as a yellow oil after purification by RP-semipreparative HPLC (C_{18} , H_2O / CH_3CN 95 : 5 to 5 : 95, 53 mg, 22%).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.66-2.75 (m, 4H, CH_2) 2.90-2.94 (m, 12H, CH_2 tacn) 3.57 (brs, 2H, NH_2) 4.02 (s, 4H, CH_2 th) 6.59-6.62 (d, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, CH_{Ar}) 6.95-6.98 (d, 2H, $^3J = 8.1$ Hz, CH_{Ar}) 7.25-7.26 (d, 2H, $^3J = 3.3$ Hz, CH) 7.31-7.34 7.67-7.68 (d, 2H, $^3J = 3.3$ Hz, CH). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 33.6 (CH_2 βN) 55.9 (CH_2 tacn) 59.9 (CH_2 th) 60.9 (CH_2 αN) 115.2 (CH_{Ar} βNH_2) 119.3 (CH th) 129.6 (CH th) 130.4 (CH_{Ar}) 142.3

(Cqt) 144.5 (Cqt) 172.43(Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[C_{22}H_{30}N_6S_2+H]^+$ 443.2046 found 443.2043.

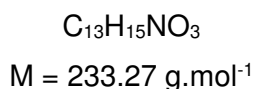
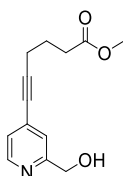
Compound 51.



Compound 50 (53 mg, 0.12 mmol) was dissolved in 3 M HCl (2 mL) and added to a solution of thiophosgene (488 mg, 2.39 mmol) in $CHCl_3$ (3 mL). The mixture was stirred vigorously at r.t. for 18 hours before separation of the two layers. The aqueous layer was washed with $CHCl_3$ (5x1 mL) and evaporated to dryness, then lyophilized yielding the titled compound as a yellow solid (51 mg, 89%).

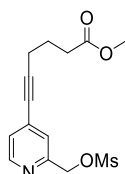
1H NMR (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.82 (s, 4H, CH_2 tacn) 3.10-3.16 (m, 6H, CH_2 tacn + CH_2 αN) 3.46 (s, 4H, CH_2 tacn) 3.69 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, CH βN) 4.39 (s, 4H, CH_2) 7.36 (s, 4H, CH_{Ar}) 7.80-7.82 (d, 2H, $^3J = 6$ Hz, CH αN) 7.97-7.99 (d, 2H, $^3J = 6$ Hz, CH αS). **^{13}C NMR** (D_2O , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 29.6 (CH_2 Et βN) 46.5, 48.9, 51.5 (CH_2 tacn) 53.1 (CH_2) 56.2 (CH_2 Et αN) 127.0 (CH α NCS) 126.4 (CH αS) 130.0 (CH αN) 135.1 (Cqt α NCS) 136.4 (CH β NCS) 169.8 (Cqt). **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[C_{23}H_{29}N_6S_3+H]^+$ 485.1610 found 485.1606.

Compound 52.



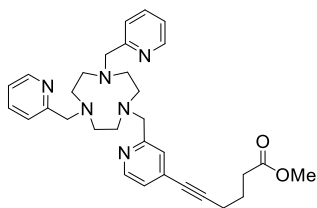
(4-bromo-2-pyridine)methanol (1.05 g, 5.6 mmol) and methyl-5-hexynoate (986 mg, 7.8 mmol) were dissolved in a mixture of THF/ Et_3N 1:1 (20 mL) and the solvent were freeze-pump-thaw degassed ($\times 3$) and backfilled with argon. After cooling to r.t. $Pd(PPh_3)_2.Cl_2$ (117 mg, 0.16 mmol) and CuI (63 mg, 0.33 mmol) were added and the mixture was stirred at 55°C for 18 hours. The mixture was filtered, evaporated, and the residue was redissolved in CH_2Cl_2 (50mL). The organic layer was first washed twice with sat. $NH_4Cl_{(aq)}$ (30 mL) and brine (30 mL), dried over $MgSO_4$ and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified on flash chromatography (SiO_2 , Hexane/ $AcOEt$ 80/20 to 0/100) affording the compound as a darkish oil (890 mg, 70%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.88-1.96 (q, 2H, ³J = 5 Hz, CH₂) 2.45-2.51 (m, 4H, CH₂) 3.66 (s, 3H, CH₃) 4.70 (s, 2H, CH₂) 7.12-7.14 (d, 1H, ³J = 5 Hz, CH_{Ar}) 7.23 (s, 1H, CH_{Ar}) 8.42-8.44 (d, 1H, ³J = 5 Hz, CH_{Ar}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 18.8, 23.4, 32.7 (CH₂) 51.6 (CH₃) 64.1 (CH₂) 79.2, 94.3 (Cqt) 122.7, 132.6, 148.2 (CH_{Ar}) 159.8 (Cqt) 173.3 (C=O).

Compound 53.C₁₄H₁₇NO₅SM = 311.35 g.mol⁻¹

Compound **3** (131 mg, 0.4 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and Et₃N (170 mg, 1.68 mmol). A solution of mesyl chloride (97 mg, 0.84 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) was added and the mixture was stirred at r.t. for 2 hours. When all the starting material was consumed (monitored by TLC), the organic layer was washed with sat. NaHCO_{3(aq)} (3 × 10 mL) and brine (2 × 10 mL). The desired compound was obtained without any purification (174 mg, 99%).

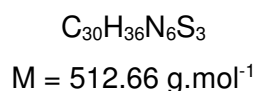
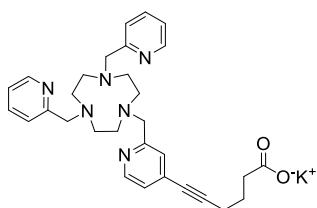
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.91 (m, 2H, CH₂) 2.47 (q, ³J = 7.0 Hz, 4H, CH₂) 3.08 (s, Hz, 3H, CH₃) 3.65 (s, 3H, CH₃) 5.24 (s, 2H, CH₂) 7.15-7.25 (m, 1H, CH_{Ar}) 7.38 (s, 1H, CH_{Ar}) 8.48 (d, ³J = 5.1 Hz, 1H, CH_{Ar}). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 18.9, 23.5, 32.8 (CH₂) 38.1, 51.7 (CH₃) 71.1 (CH₂) 78.9, 95.5 (Cqt) 123.6, 125.4 (CH_{Ar}) 133.3 (Cqt) 149.4 (CH_{Ar}) 153.7 (Cqt) 173.4 (C=O).

Compound 54.C₃₁H₃₈N₆O₂M = 526.69 g.mol⁻¹

Compound **15** (545 mg, 1.75 mmol) was dissolved in acetonitrile (80 mL) and K₂CO₃ (484 mg, 3.50 mmol) was added. After a few minutes of stirring, a solution of the mesylated compound **53** (545 mg, 1.75 mmol) in acetonitrile (25 mL) was added dropwise over a period of 15 minutes. The reaction mixture was stirred at r.t. for 2 days. After filtration through a pad of Celite® the solvent was evaporated to dryness and the residue purified by column chromatography (Al₂O₃, CHCl₃ / CHCl₃-MeOH 97-3) yielding **54** as a brown oil (480 mg, 52%).

¹H NMR (CD₃CN, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.78 (q, 2H, ³J = 9 Hz, CH₂) 2.40-2.49 (m, 4H, CH₂) 2.77 (s, 12H, CH₂ tacn) 3.58 (s, 3H, CH₃) 3.72 (s, 2H, CH₂ py) 3.75 (s, 4H, CH₂ py) 7.10-7.17 (m, 3H, CH_{Ar}) 7.46-7.48 (m, 3H, CH_{Ar}) 7.62 (t, 2H, ³J = 9 Hz, CH_{Ar}) 8.37 (d, 1H, ³J = 6 Hz, CH_{Ar}) 8.42 (d, 2H, ³J = 6 Hz, CH_{Ar}). **¹³C NMR** (CD₃CN, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 19.3, 24.5, 33.3 (CH₂) 52.0 (CH₃) 56.30 (CH₂ tacn) 64.8, 65.0 (CH₂ py) 80.1, 95.1 (Cqt) 122.8, 124.1, 124.6, 125.8 (CH_{Ar}) 132.7 (Cqt) 137.2, 149.8 (CH_{Ar}) 161.2, 161.8 (Cqt) 174.1 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for [C₃₁H₃₈N₆O₂+H]⁺ 527.3129 found 527.3127.

Compound 55.



Compound **54** (100 mg, 0.19 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and 1M KOH (1 mL) was added. The reaction was stirred at reflux for 12 hours before evaporation to dryness. The desired compound **35** was obtained as a brown solid after purification on a sephadex G10 column eluted with water (96 mg, 99%).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.71 (m, 2H, CH₂) 2.23 (t, 2H, CH₂) 2.36 (m, 2H, CH₂) 2.78-2.86 (m, 12H, CH₂ tacn) 3.75 (s, 2H, CH₂ py) 3.87 (s, 4H, CH₂ py) 7.23 (d, 1H, ³J = 6 Hz, CH_{Ar}) 7.25-7.36 (m, 4H, CH_{Ar}) 7.50 (s, 1H, CH_{Ar}) 7.72 (t, 2H, ³J = 9 Hz, CH_{Ar}) 8.28 (d, 1H, ³J = 6 Hz, CH_{Ar}) 8.42 (d, 1H, ³J = 6 Hz, CH_{Ar}). **¹³C NMR** (D₂O, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 21.6, 27.6, 39.5 (CH₂) 56.2 (CH₂ tacn) 63.2 (CH₂ py) 81.4 (Cqt) 100.3 (Cqt) 126.8, 127.4, 128.5, 128.9 (CH_{Ar}) 136.3 (Cqt) 141.2, 151.2 (CH_{Ar}) 156.6, 156.8 (Cqt) 184.1 (C=O). **ESI-HRMS** m/z calcd. for [C₃₀H₃₆N₆O₂+H]⁺ 513.2972 found 513.2966.

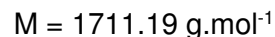
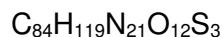
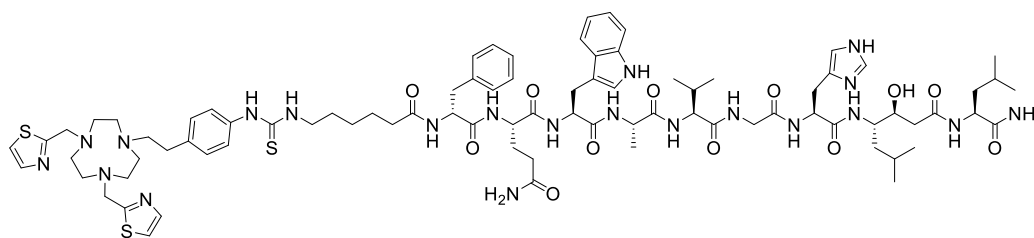
Synthesis of the peptide based conjugates and the ^{nat}Cu metallopeptides

The bombesin peptide Ahx-[D-Phe⁶,Statine¹³]Bombesin(6-14) = Ahx-JMV594 (Ahx = 6-aminohexanoic acid, Sta = statine) was prepared by standard Fmoc chemistry using Rink amide resin on a CS Bio CS336X peptide synthesizer according to the manufacturer's protocol. A 4-fold excess of coupling reagent (HATU = 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium-3-oxid hexafluorophosphate) and corresponding Fmoc protected amino acids (Iris Biotech GmbH, Germany) was used in each coupling step. Purification of the peptide conjugates were done by semi-preparative RP-HPLC using a Knauer Smartline 1000 HPLC system in combination with a Macherey Nagel VP 250/21 Nucleosil 120-5 C18 column. The solvent system was A = H₂O (0.1% TFA) and B = acetonitrile (0.1% TFA). Semi-

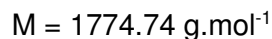
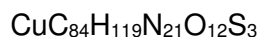
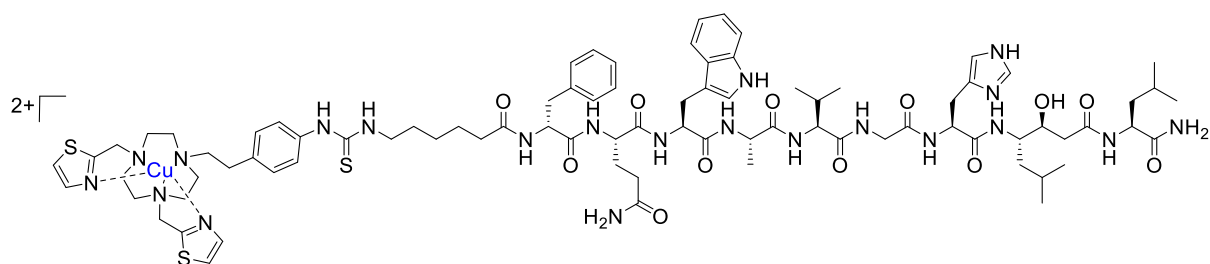
preparative HPLC gradient was 0–40 min 5–60% B at a flow rate of 12 mL min⁻¹. Analytical HPLC was performed on an Agilent 1260 Infinity System equipped with an Agilent 1200 DAD UV detector (UV detection at 220 nm) and a Raytest Ramona radiation detector (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany) in series. A Phenomenex Jupiter Proteo (250 × 4.60 mm) column was used for analytical HPLC. The gradient was 0–1 min 5% B, 1–25 min 50% B at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

The ^{nat}Cu metallopeptides were synthesized using 1.5-fold excess of ^{nat}CuCl₂ · 2 H₂O (0.1 mM in ammonium acetate buffer). For each compound, the bioconjugates **56**, **57** and **58** (500 μg, 0.29 μmol) in 250 μL H₂O was mixed with 250 μL of ^{nat}Cu stock solution containing 1.5 eq of the corresponding metal salt (CuCl₂ · 2 H₂O) and heated at 45 °C for 15 min. After cooling to r.t., the complexes were purified using C₁₈ Sep Pak cartridges, which were preconditioned with EtOH and H₂O (5 mL each). After loading, the cartridge was washed with H₂O (2 mL) and the product was eluted using EtOH:H₂O (50:50 v/v; 2 mL). After evaporation of EtOH at ambient temperature, samples were lyophilized to give the final metallated bioconjugates.

Compound 56.

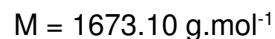
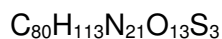
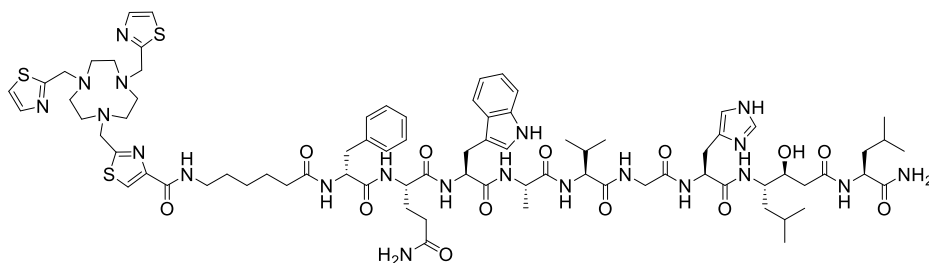


Resin loaded with 0.2 mmol/g of peptide (18.11 mg, 0.014 mmol) was dissolved in 3 mL of dry DMF. Then **no2th-EtBzNCS** (28.56 mg, 0.059 mmol) and DIPEA (10.5 μL, 0.059 mmol) were added and the mixture was stirred for 2 hours at rt. The resin was washed with DMF (3 × 2 mL) and then CH₂Cl₂ (3 × 2 mL). After deprotection and cleavage with TFA/H₂O/TIS (95/2.5/2.5; v/v), the crude peptide conjugates were precipitated in ice-cold diethyl ether, centrifuged and finally purified by semi-preparative RP-HPLC Yield: 1.03 mg, 4%. RP-HPLC (analytical, 220 nm): $t_R = 24.06$ min; **ESI-HRMS** m/z calcd. for [C₈₄H₁₁₉N₂₁O₁₂S₃+H]⁺ 1710.8581, found 1710.8581.

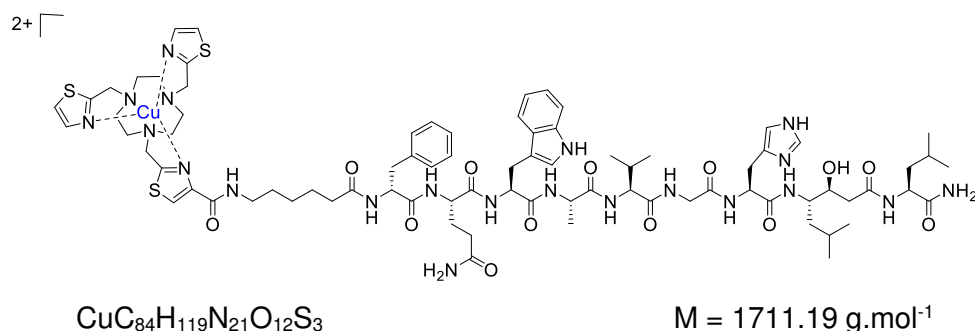
Compound 57.


Yield: 488 μg , 0.27 μmol , 95%. RP-HPLC (analytical, 220 nm): $t_{\text{R}} = 21.40$ min.

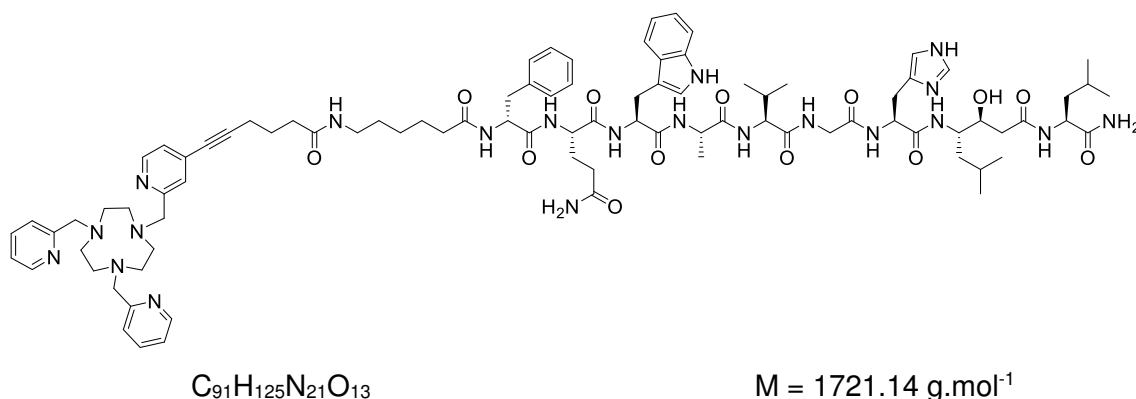
ESI-HRMS m/z calcd. for $[\text{CuC}_{84}\text{H}_{119}\text{N}_{21}\text{O}_{12}\text{S}_3]^{2+}$ 886.3897, found 886.3824.

Compound 58.


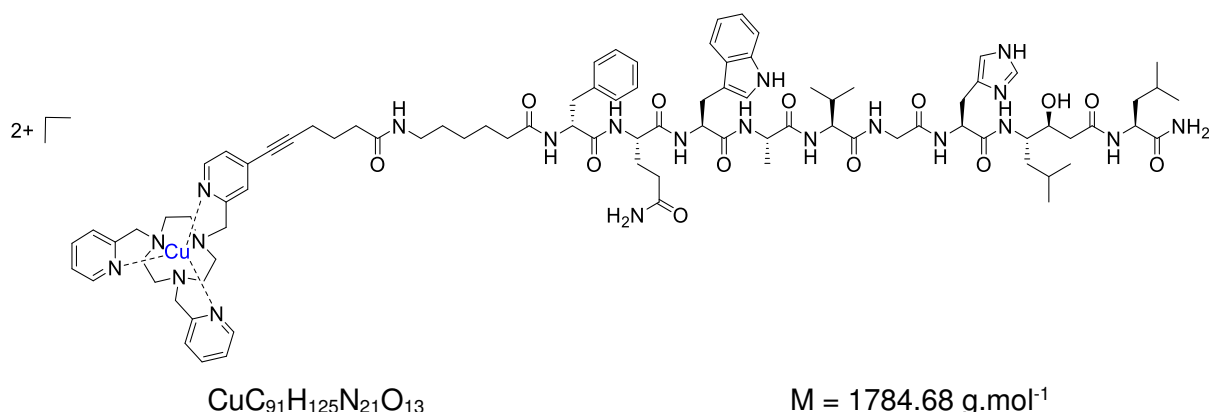
Resin loaded with 0.2 mmol/g of peptide (83 mg, 0.024 mmol) was dissolved in 3 mL of dry DMF. Then **Hno2th1tha** (46 mg, 0.099 mmol), HATU (37 mg, 0.099 mmol) and DIPEA (17 μL , 0.099 mmol) were added and the mixture was stirred for 2 hours at rt. The resin was washed with DMF (3 \times 2 mL) then CH_2Cl_2 (3 \times 2 mL). After deprotection and cleavage with TFA/ H_2O /TIS (95/2.5/2.5; v/v), the crude peptide conjugates were precipitated in ice-cold diethyl ether, centrifuged and finally purified by semi-preparative RP-HPLC Yield: 1.71 mg, 4%. RP-HPLC (analytical, 220 nm): $t_{\text{R}} = 22.6$ min. **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{80}\text{H}_{113}\text{N}_{21}\text{O}_{13}\text{S}_3+\text{H}]^+$ 1672.8061, found 1672.8087.

Compound 59.


Yield: 463 μg , 0.26 μmol , 92%. RP-HPLC (analytical, 220 nm): $t_R = 20.0$ min. **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{CuC}_{80}\text{H}_{115}\text{N}_{21}\text{O}_{13}\text{S}_3]^{2+}$ 867.3637, found 867.3624.

Compound 60.


The compound **no3pyCOO \cdot K $^+$** (3.3 mg, 0.007 mmol), PyBOP (5.08 mg, 0.01 mmol) and HOBt (1.32 mg, 0.01 mmol) were dissolved in 50 μL of DMF. DIPEA (1.25 mg, 0.01 mmol) was added to raise the pH and finally the mixture was poured in an Eppendorf containing the free peptide Ahx-JMV594 (2.0 mg, 0.002 mmol). The mixture was stirred at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 2h then 2 mL of water was added and the crude was purified by semi-preparative RP-HPLC Yield: 750 μg , 25%. RP-HPLC (analytical, 220 nm): $t_R = 20.4$ min. **ESI-HRMS** m/z calcd. for $[\text{C}_{91}\text{H}_{125}\text{N}_{21}\text{O}_{13}+\text{H}]^+$ 1720.9878, found 1720.9848.

Compound 61.

Yield: 488 μg , 0.27 μmol , 95%. RP-HPLC (analytical, 220 nm): $t_{\text{R}} = 21.33 \text{ min}$.

ESI-HRMS m/z calcd. for $[\text{CuC}_{91}\text{H}_{115}\text{N}_{21}\text{O}_{13}]^{2+}$ 891.4525, found 891.4510.

 ^{64}Cu Labelling experiments

Radiolabelling was performed in 0.1 M buffered media (pH 5.5 NaOAc, pH 7.4 HEPES, pH 8.2 HEPES). Stock solutions of **56**, **58** and **60** were prepared in H_2O (1 nmol μL^{-1}). For labelling experiments, 5 μL of bioconjugate (1:100 dilution of stock solution in corresponding labelling buffer) were mixed with 119 μL of corresponding buffer. To this solution, 1 μL of ^{64}Cu]CuCl₂ in 0.1 M HCl (^{64}Cu stock diluted to an activity concentration of $\sim 1\text{-}2 \text{ MBq}/\mu\text{L}$) was added to give a final volume of 125 μL and a chelator concentration of 0.4 μM . After brief mixing, samples were either incubated at r.t. or 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes. Analysis was initially performed by analytical RP-HPLC. The radiochemical conversion (RCC) was also checked by TLC using silica gel microfiber strips (Agilent, iTLC-SG glass microfiber) and DTPA solution (50 mM, pH 7.4). No differences between the HPLC and TLC analyzed samples were observed so that determination was continued by TLC. While ^{64}Cu -**56**, ^{64}Cu -**58** and ^{64}Cu -**60** remained at the origin ($R_{\text{f}} = 0$), uncomplexed ^{64}Cu (in the form of the corresponding DTPA complex) moved with the solvent front ($R_{\text{f}} = 1$). TLC Strips were analyzed by phosphorimaging and RCC was calculated. Each experiment was repeated 3 times. The identity of the ^{64}Cu complexes was confirmed by the UV trace of the corresponding non-radioactive Cu^{2+} complexes.

For H_5dtpa challenge experiments and copper exchange experiments, $\sim 20 \text{ MBq}$ ^{64}Cu]CuCl₂ were added to 1 nmol of **56**, **58** and **60**, respectively, in 0.1 M NaOAc pH 5.5 and heated at 45 $^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes.

dtpa stability measurements

Experiments were performed according to a previously described protocol [138]. For each experiment, 1–2 MBq (1 μL) of ^{64}Cu]Cu-**56**, ^{64}Cu]Cu-**58** or ^{64}Cu]Cu-**60** were mixed with

75×10^3 fold excess of **dtpa** as competitive ligand. The samples were incubated for 24 h at r.t. The dissociation of the radiopeptide was monitored by radio-TLC. Each experiment was repeated 3 times

^{nat}Cu exchange experiments

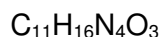
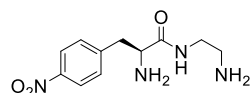
Experimental conditions were based on a previously described procedure [138]. Copper exchange was measured at pH 7.4 in 0.1 M HEPES buffer. Non-radioactive Cu^{2+} solution was prepared as a stock solution of $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. For each experiment 1–2 MBq (1 μL) [^{64}Cu]Cu-**56**, [^{64}Cu]Cu-**58** or [^{64}Cu]Cu-**60** were mixed with 40-fold excess of ^{nat}Cu as competitive cation. The mixture was incubated for 24 h at rt. The exchange rate between ^{nat}Cu/ ^{64}Cu was monitored by radio-TLC. Each experiment was repeated 3 times.

Lipophilicity (log $D_{\text{Oct/PBS}}$) measurements

For log $D_{\text{Oct/PBS}}$ measurements, 1–2 MBq of [^{64}Cu]Cu-**56**, [^{64}Cu]Cu-**58** and [^{64}Cu]Cu-**60** or [^{64}Cu]RM2 (20 μL) were added to a pre-saturated mixture of phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) (480 μL) and octanol (500 μL). Samples were shaken for 30 min at rt, centrifuged at 21,100 g for 5 min and 100 μL of each phase were counted for 1 min on a calibrated Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) 2480 Automatic Wizard Gamma Counter by using a dynamic energy window of 400–600 keV for copper-64 (511 keV emission). Each experiment was repeated 3 times

Determination of the Binding Affinity

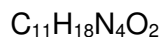
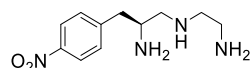
The binding affinity profiles (IC_{50} values) of the metal-free peptides and the corresponding metalloptides were determined using a cell-based competitive assay with ^{125}I [Tyr⁴]-Bombesin as radioligand. **RM2** was used as reference. Experiments were performed using Merck Multiscreen® filter plates and punch kit. Briefly, each compound in different concentrations (1000 to 0 nM) was incubated in the presence of 0.15 nM of ^{125}I [Tyr⁴]-Bombesin (Perkin Elmer, Waltham, USA) at 37 °C for 1.5 h in 96-well plates seeded with 2×10^5 PC3 cells per well. The total well volume was 150 μL . After incubation, the supernatant was removed by vacuum and wells were washed two-times with 200 μL of cold PBS. Using the punch kit, the cell-associated radioactivity was transferred into counting tubes and radioactivity was measured using Perkin Elmer 2480 Automatic Wizard Gamma Counter. Data were fitted using non-linear regression (GraphPad Prism). Experiments were performed at least in two independent experiments in triplicate.

Compound 62.

M = 252.12 g.mol⁻¹

(S)-4-nitrophenylalanine methyl ester hydrochloride (5 g, 19.18 mmol) was added in small portions over a period of one hour to avoid formation of polymers, under an atmosphere of N₂ to stirring ethylenediamine (25 mL) at room temperature. The reaction mixture took rapidly a brown red coloration and kept stirring at r.t. overnight. Excess of ethylenediamine was removed under reduced pressure and the residue was redissolved in 5 M NH₄OH (20 mL). The aqueous layer was extracted with CHCl₃ (5 × 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and solvent was evaporated under reduce pressure to afford **62** as an orange oil (4.68 g, 97%).

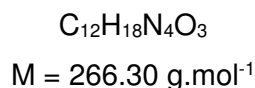
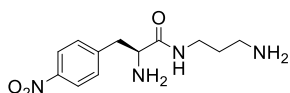
¹H NMR (CDCl₃, 300MHz, 298 K) δ (ppm) 1.24 (s, 4H), 2.63 (t, ³J= 6Hz) 2.81 (dd ³J= 6Hz, 1H) 3.13 (m, 3H) 3.54 (dd ³J= 6Hz, 1H) 7.25 (d, ³J= 4.2 Hz, 2H) 7.47 (s, 1H) 7.98 (d, ³J= 4.2 Hz, 2H). **¹³C NMR** (CDCl₃, 75MHz, , 298 K) δ (ppm) 40.7, 41.2, 41.2, 56.0 (CH₂), 123.4, 130.0 (CH_{Ar}) 145.9 (Cqt) 146.5 (Cqt) 173.5 (C=O).

Compound 63.

M = 238.29 g.mol⁻¹

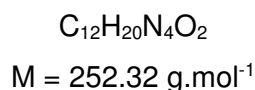
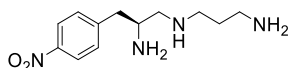
To a solution of compound **62** (475 mg, 1.88 mmol) in THF (25 mL) under an atmosphere of N₂ was slowly added BH₃.THF (10 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at this temperature for 1 hour before refluxed for 4 hours. Excess of BH₃ was quenched by slow addition of MeOH (25 mL) at r.t. The solvent was removed under reduced pressure to give a slurry which was resuspended in 6 M HCl (20 mL) and refluxed for 3 hours. NaOH pellets were added to adjust to pH = 12 and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (5 × 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and solvent was removed under reduced pressure to yield compound **63** as a yellow oil (307 mg, 70%).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 2.56-2.66 (m, 1H) 2.69-2.77 (m, 2H) 2.82-2.94 (m, 3H) 3.00-3.05 (m, 2H) 3.22-3.27 (m, 1H) 7.35 (d, ³J= 4.2 Hz, 2H) 7.98 (d, ³J= 4.2 Hz, 2H). **¹³C NMR** (D₂O, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 41.7 (CH₂) 42.9 (CH₂) 49.7 (CH₂) 54.0 (CH) 126.5 (CH_{Ar}) 133.1 (CH_{Ar}) 148.9 (Cqt α NO₂) 149.6 (Cqt).

Compound 64.

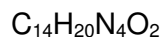
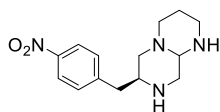
(S)-4-nitrophenylalanine methyl ester hydrochloride (2.5 g, 9.6 mmol) was added gradually to freshly distilled 1,3-diaminopropane (11.35 g, 153.4 mmol), at 0 °C for one hour. The mixture was stirred at 40 °C during 24h, and the solvent was removed under vacuum. NH_4OH (5M) was added to reach pH = 12, and the aqueous layer was extracted with CHCl_3 (5 × 20 mL). The combined organic layers were dried with MgSO_4 , filtered, and evaporated. Compound **64** was obtained as a reddish solid (2.02 g, 79%).

^1H NMR (D_2O , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.34 (s, 5H) 1.58 (m, 2H) 2.72 (t, $^3J = 4.2$ Hz, 2H) 2.90 (dd, $^3J = 4.2$ Hz, 2H), 3.28-3.36 (m, 3H), 3.62 (dd, $^3J = 4.2$ Hz, 1H), 7.37-7.40 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H) 7.55 (m, 1H) 8.18-8.21 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 32.8, 37.4, 40.0, 41.2, 42.7 (CH_2), 56.3 (CH), 123.9 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 146.0 (Cqt α NO_2), 147.1 (Cqt) 173.1 (C=O).

Compound 65.

Compound **64** (2.02g, 7.6 mmol) was dissolved in 20 mL dry THF and cooled to 0 °C. Then, $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ was added (15 mL, 30.2 mmol). The mixture was stirred under nitrogen overnight, heated at reflux. MeOH (50 mL) was added to quench reaction, and solvents were removed in vacuo, then HCl 6M was added (20 mL), and the reaction was stirred at reflux during 1h30. The pH of the aqueous layer was then raised to pH = 12 with NaOH pellets. Aqueous layer was extracted with CHCl_3 (5 × 20 mL), the combined organic layers were dried with MgSO_4 , filtered and the solvent was removed under reduced pressure, yielding **65** as a yellow oil (1.15 g, 60%).

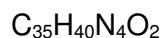
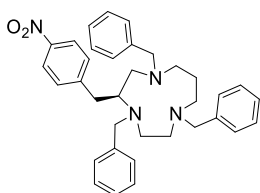
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 1.34 (s, 5H, NH_2) 1.51 (m, 2H) 2.37 (dd, $^3J = 4.2$ Hz, 1H) 2.56 (m, 4H), 2.77 (dd, $^3J = 4.2$ Hz, 1H), 3.02 (m, 1H), 7.27 (d, $^3J = 9$ Hz, 2H) 8.02 (d, $^3J = 49$ Hz, 2H). **^{13}C NMR** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 38.3, 39.9, 42.1, 47.4 (CH_2) 51.8 (CH) 55.6 (CH_2) 123.0 (CH_{Ar}) 129.5 (CH_{Ar}) 146.0 (Cqt α NO_2) 147.1 (Cqt).

Compound 66.

$$M = 276.34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound 65 (1.15 g, 4.56 mmol) was dissolved in 60 mL of acetonitrile, with an excess of K_2CO_3 (3.78 g, 27.36 mmol). Then, chloroacetaldehyde (50% in H_2O , 4.33 mmol), solubilized in 60 mL of acetonitrile was added dropwise, under strong stirring, at 0°C during 1h30. This mixture is left at r.t. for 4 days. The reaction medium was filtered through Celite[®], and the solvent was removed. The solution was washed with NaOH 4M until pH = 12 and extracted with CHCl_3 (3 × 20 mL) and dried over MgSO_4 . Organic solvent was removed under reduced pressure, yielding compound **66** as an orange oil (1.08g, 86%).

¹³C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 27.2, 40.4, 44.8, 50.7, 54.4 (CH_2), 55.9 (CH), 59.8 (CH_2), 75.4 (CH), 123.6 (CH_{Ar}), 129.92 (CH_{Ar}), 146.2 (Cqt α NO_2), 146.7 (Cqt).

Compound 67.

$$M = 548.73 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Compound 66 (1.08 g, 3.91 mmol), was solubilized in 60 mL of acetonitrile, with an excess of K_2CO_3 (2.16 g, 15.6 mmol). Benzyl bromide was added with 30 mL of acetonitrile in the flask and left to react during 3 days at room temperature. The mixture is filtered through Celite[®], and the solvent is removed. The crude was solubilized in 100 mL of ethanol, with a large excess of sodium borohydride (0.84 g, 22.3 mmol), and left for 2 days at room temperature, under strong stirring. The solvent was removed, and the orange oil obtained is taken up in chloroform and filtered through Celite[®]. The solvent was removed under vacuo, and the resulting oil was stirred in diethyl ether overnight. Then, insoluble impurities are removed via filtration through Celite[®], and the solvent is removed in vacuo, giving yellowish oil (0.65 g).

¹³C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 26.0, 37.0, 48.9, 49.1, 51.4, 51.8, 54.6, 56.0 (CH_2), 57.3 (CH) 60.5, 61.1 (CH_2), 123.1, 126.84, 127.0, 127.2, 128.0, 128.2, 128.6, 129.2, 129.4, 129.8, 130.0 (CH_{Ar}), 139.9, 140.1, 140.4 (Cqt Bn), 145.8 (Cqt α NO_2), 149.1 (Cqt).

X-RAY DATA

	[Cu(no3th)]	[Zn(no3th)]	[Cu(no3tha)]	[Zn(no3tha)]
Formula	C ₁₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₆ O ₈ S ₃ Cu	C ₁₈ H ₂₄ Cl ₂ N ₆ O ₈ S ₃ Zn	C ₂₁ H ₃₀ CuN ₆ O ₁₀ S ₃	C ₂₄ H ₃₄ Cl _{0.50} N ₇ O _{11.25} S ₃ Zn
MW (g.mol ⁻¹)	683.05	684.88	686.23	779.86
Crystal system	monoclinic	monoclinic	triclinic	monoclinic
Space group	P21/c	P21/c	P-1	P21/n
T/K	296(2)	296(2)	296(2)	170(2)
λ / Å (MoK)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
a / Å	9.1936(3)	9.1467(2)	8.9546(4)	9.1563(8)
b / Å	15.9890(5)	16.1147(4)	10.9939(5)	40.419(3)
c / Å	18.1224(4)	18.1862(5)	14.0477(6)	17.2257(18)
α	90	90	85.134(4)	90
β	98.856(2)	99.110(3)	86.799(3)	100.485(10)
γ	90	90	81.534(4)	90
V(Å ³)	2632.17(13)	2646.77(11)	1361.62(10)	6268.6(10)
Z	4	4	2	8
D _{calc} (Mg.m ⁻³)	1.724	1.719	1.674	1.653
μ mm ⁻¹	1.327	1.422	1.099	1.097
F(000)	1200	1400	710	3228
θ range (°)	3.67 to 26.865	3.586 to 26.105	3.72 to 27.468	3.895 to 23.678
R(int)	0.1067	0.0491	0.1273	0.1771
Reflns measd	15720	16297	16901	29022
Unique Reflns	5364	5411	5560	12795
Refl obsd > 2σ (I)	4317	4199	4356	5009
GOF on F ²	1.067	1.053	1.03	0.938
R ₁	0.0736	0.0663	0.0468	0.0904
wR ₂	0.1859	0.1509	0.1143	0.1225
Largest diff.peak and hole (e. Å ⁻³)	0.827 -0.791	0.542 -0.554	0.403 -0.508	0.679 -0.853

	[Cu(no2th1tha)]	[Cu ₃ (no2th1tha) ₂]	[Cu ₃ (no3tha) ₂]
Formula	C ₁₉ H ₃₁ Cl ₃ CuN ₆ O ₆ S ₃	C ₃₈ H ₅₀ Cl ₄ Cu ₃ N ₁₂ O ₂₂ S ₆	C ₄₂ H ₅₄ Cl ₂ Cu ₃ N ₁₂ O ₂₆ S ₆
MW (g.mol ⁻¹)	705.58	1551.68	1596.85
Crystal system	triclinic	triclinic	monoclinic
Space group	P-1	P-1	-P2ybc
T/K	170(2)	296(2)	296(2)
λ / Å (MoK)	0.71073	0.71073	0.71073
a / Å	8.1124(3)	9.7341(6)	14.9658(6)
b / Å	10.6463(4)	10.4174(7)	13.3025(5)
c / Å	17.8145(7)	14.3026(8)	15.8016(6)
α	100.576(3)	87.718(5)	90
β	95.080(3)	89.646(5)	103.766(4)
γ	106.730(4)	80.050(5)	90
V(Å ³)	1432.00(9)	1427.39(15)	3055.5(2)
Z	2	1	2
D _{calc} (Mg.m ⁻³)	1.641	1.805	1.736
μ mm ⁻¹	1.307	1.602	1.419
F(000)	730	789	1630
θ range (°)	3.668 to 28.517	3.41 to 26.37	3.625 to 24.895
R(int)	0.1067	0.153	0.1865
Reflns measd	17382	17173	18817
Unique Reflns	5838	5817	6226
Refl obsd > 2σ (I)	4614	4621	4132
GOF on F ²	1.053	1.071	1.035
R ₁	0.0785	0.0558	0.0633
wR ₂	0.1688	0.1406	0.1621
Largest diff.peak and hole (e. Å ⁻³)	0.137 -0.969	0.734 -0.685	0.861 -0.533

$${}^a R_1 = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|} \quad {}^b wR_2 = \left\{ \frac{\sum [w(|F_o|^2 - |F_c|^2)]^2}{\sum [w(F_o^4)]} \right\}^{1/2}$$

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- [2] R. D. Hancock, A. E. Martell, *Comments Inorg. Chem.* **1988**, *6*, 237–284.
- [3] C. B. Johnbeck, U. Knigge, A. Loft, A. K. Berthelsen, J. Mortensen, P. Oturai, S. W. Langer, D. R. Elema, A. Kjaer, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 451–457.
- [4] <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm504524.html>
- [5] M. Frindel, P. L. Saëc, M. Beyler, A.-S. Navarro, C. Sai-Maurel, C. Alliot, M. Chérel, J.-F. Gestin, A. Faivre-Chauvet, R. Tripier, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9272–9283.
- [6] L. M. P. Lima, D. Esteban-Gómez, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6916–6927.
- [7] L. M. P. Lima, Z. Halime, R. Marion, N. Camus, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 5269–5279.
- [8] T. L. Bihan, A.-S. Navarro, N. L. Bris, P. L. Saëc, S. Gouard, F. Haddad, J.-F. Gestin, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, R. Tripier, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4261–4271.
- [9] A. Guillou, L. M. P. Lima, M. Roger, D. Esteban-Gómez, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, V. Patinec, R. Tripier, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 2435–2443.
- [10] M. Roger, L. M. P. Lima, M. Frindel, C. Platas-Iglesias, J.-F. Gestin, R. Delgado, V. Patinec, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5246–5259.
- [11] M. ROGER, Nouveaux chélates [triazacyclononane-métaux de transition] : Synthèse, complexation et premières applications, Université de Bretagne Occidentale, **n.d.**
- [12] V. Patinec, G. A. Rolla, M. Botta, R. Tripier, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 11173–11184.
- [13] E. Molnár, N. Camus, V. Patinec, G. A. Rolla, M. Botta, G. Tirscó, F. K. Kálmán, T. Fodor, R. Tripier, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 5136–5149.
- [14] A. T. Bui, M. Beyler, Y.-Y. Liao, A. Grichine, A. Duperray, J.-C. Mulatier, B. L. Guennic, C. Andraud, O. Maury, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 7020–7025.
- [15] A. T. Bui, M. Beyler, A. Grichine, A. Duperray, J.-C. Mulatier, Y. Guyot, C. Andraud, R. Tripier, S. Brasselet, O. Maury, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6005–6008.
- [16] <http://goldbook.iupac.org/html/T/T06456.html>
- [17] A. R. Cowley, J. R. Dilworth, P. S. Donnelly, A. D. Gee, J. M. Heslop, *Dalton Trans.* **2004**, *0*, 2404–2412.
- [18] N. Nanjundan, R. Narayanasamy, S. Geib, K. Velmurugan, R. Nandhakumar, M. D. Balakumaran, P. T. Kalaichelvan, *Polyhedron* **2016**, *110*, 203–220.
- [19] A. M. Dittler-Klingemann, F. E. Hahn, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1996–1999.
- [20] D. Reinen, C. Friebel, *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 791–798.
- [21] E. B. Fleischer, A. E. Gebala, D. R. Swift, P. A. Tasker, *Inorg. Chem.* **1972**, *11*, 2775–2784.
- [22] J. E. House, in *Inorg. Chem.*, Elsevier, **2013**, pp. 591–616.
- [23] H. A. Jahn, E. Teller, *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **1937**, *161*, 220–235.
- [24] *Coord. Chem. Rev.* **1970**, *5*, 143–207.
- [25] R. Gillet, Synthèse et Caractérisation de Bispidines, Chélatants Du ⁶⁴Cu, En Vue d'applications Pour La Tomographie à Émission de Positrons, thesis, Strasbourg, **2017**.

- [26] R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, R. L. Bruening, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2529–2586.
- [27] R. D. Hancock, A. E. Martell, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1875–1914.
- [28] K. Wieghardt, U. Bossek, P. Chaudhuri, W. Herrmann, B. C. Menke, J. Weiss, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 4308–4314.
- [29] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858–2902.
- [30] B. Bosnich, C. K. Poon, M. L. Tobe, *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1102–1108.
- [31] J. D. Silversides, C. C. Allan, S. J. Archibald, *Dalton Trans.* **2007**, *0*, 971–978.
- [32] R. Delgado, J. J. R. F. da Silva, M. C. T. A. Vaz, *Talanta* **1986**, *33*, 285–287.
- [33] R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, R. L. Bruening, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1721–2085.
- [34] C. F. G. C. Geraldes, M. C. Alpoim, M. P. M. Marques, A. D. Sherry, M. Singh, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3876–3881.
- [35] W. R. Harris, K. N. Raymond, F. L. Weitzl, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2667–2675.
- [36] A. E. Martell, R. J. Motekaitis, E. T. Clarke, R. Delgado, Y. Sun, R. Ma, *Supramol. Chem.* **1996**, *6*, 353–363.
- [37] T. J. Riedo, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 1089–1096.
- [38] E. W. Price, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *43*, 260–290.
- [39] L. M. P. Lima, C. V. Esteves, R. Delgado, P. Hermann, J. Kotek, R. Ševčíková, P. Lubal, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 2533–2547.
- [40] L. M. P. Lima, R. Delgado, M. G. B. Drew, P. Brandão, V. Félix, *Dalton Trans.* **2008**, *0*, 6593–6608.
- [41] P. Chaudhuri, K. Wieghardt, in *Prog. Inorg. Chem.* (Ed.: S.J. Lippard), John Wiley & Sons, Inc., **1987**, pp. 329–436.
- [42] K. S. Woodin, K. J. Heroux, C. A. Boswell, E. H. Wong, G. R. Weisman, W. Niu, S. A. Tomellini, C. J. Anderson, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 4829–4833.
- [43] G. Gasser, L. Tjioe, B. Graham, M. J. Belousoff, S. Juran, M. Walther, J.-U. Künstler, R. Bergmann, H. Stephan, L. Spiccia, *Bioconj. Chem.* **2008**, *19*, 719–730.
- [44] W. Han, Z.-D. Wang, C.-Z. Xie, Z.-Q. Liu, S.-P. Yan, D.-Z. Liao, Z.-H. Jiang, P. Cheng, *J. Chem. Crystallogr.* **2004**, *34*, 495–500.
- [45] P. V. Bernhardt, G. A. Lawrance, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *104*, 297–343.
- [46] K. P. Wainwright, *Coord. Chem. Rev.* **1997**, *166*, 35–90.
- [47] H. Stephan, T. Joshi, M. Kubeil, A. Nsubuga, G. Singh, G. Gasser, *ChemPlusChem* **2018**, DOI 10.1002/cplu.201800103.
- [48] J. E. Richman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268–2270.
- [49] In *Chem. Heterocycl. Compd.*, Wiley-Blackwell, **2008**, pp. 1–29.
- [50] P. Désogère, Y. Rousselin, S. Poty, C. Bernhard, C. Goze, F. Boschetti, F. Denat, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7831–7838.
- [51] Y. Huang, Y. Liu, S. Liu, R. Wu, Z. Wu, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 1546–1551.
- [52] H.-S. Chong, H. A. Song, N. Birch, T. Le, S. Lim, X. Ma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3436–3439.

- [53] R. Cao, P. Müller, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17366–17369.
- [54] C. Weinmann, J. P. Holland, T. Läppchen, H. Scherer, S. Maus, T. Stemler, H. Bohnenberger, S. Ezziddin, P. Kurz, M. D. Bartholomä, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 7503–7512.
- [55] Z. Kovacs, A. D. Sherry, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9269–9272.
- [56] B. Veerendra, G. L. Sieckman, T. J. Hoffman, T. Rold, L. Retzloff, J. McCrate, A. Prasanphanich, C. J. Smith, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem.* **2006**, *36*, 481–491.
- [57] G. Gros, J. Hasserodt, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 183–187.
- [58] T. C. Pickel, G. J. Karahalios, C. T. Buru, J. Bacsá, C. C. Scarborough, *Eur. J. Org. Chem.* **n.d.**, *0*, DOI 10.1002/ejoc.201801323.
- [59] M. Roger, V. Patinec, M. Bourgeois, R. Tripier, S. Triki, H. Handel, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 5637–5643.
- [60] T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6364–6365.
- [61] G. R. Weisman, D. J. Vachon, V. B. Johnson, D. A. Gronbeck, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 886–887.
- [62] D.-E. Lee, H. Koo, I.-C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2656–2672.
- [63] J. Condeelis, R. Weissleder, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a003848.
- [64] L. E. Jennings, N. J. Long, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 3511–3524.
- [65] L. Frullano, T. J. Meade, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 939–949.
- [66] A. Louie, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3146–3195.
- [67] D. A. Rich, *J. Nucl. Med. Technol.* **1997**, *25*, 4–11.
- [68] <https://medecinucleaire-tep-sarcelles.fr/fr/specialites/tomographie-par-emission-de-positons-tep-scanner/>
- [69] P. J. Kim, R. J. Hicks, A. Wirth, G. Ryan, J. F. Seymour, H. M. Prince, M. P. M. Manus, *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* **2009**, *74*, 740–746.
- [70] S. Yu, *Biomed. Imaging Interv. J.* **2006**, *2*, DOI 10.2349/biij.2.4.e57.
- [71] K. Hamacher, H. H. Coenen, G. Stöcklin, *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 235–238.
- [72] F. Kraeber-Bodéré, C. Rousseau, A. Oudoux, C. Bodet-Milin, F. Davodeau, J. Barbet, A. Faivre-Chauvet, M. Chereh, </data/revues/09281258/v34i5/S0928125810000860/> **2010**.
- [73] F. Rösch (auth.), R. P. Baum, F. Rösch (eds.), *Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides: A Pathway to Personalized Diagnosis and Treatment*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2013**.
- [74] M. C. Lagunas-Solar, O. F. Carvacho, R. R. Cima, *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [A]* **1988**, *39*, 41–47.
- [75] C. J. Anderson, M. A. Green, Y. Fujibayashi, in *Handb. Radiopharm.*, Wiley-Blackwell, **2005**, pp. 401–422.
- [76] D. W. McCarthy, R. E. Shefer, R. E. Klinkowstein, L. A. Bass, W. H. Margeneau, C. S. Cutler, C. J. Anderson, M. J. Welch, *Nucl. Med. Biol.* **1997**, *24*, 35–43.

- [77] L. P. Szajek, W. Meyer, P. Plascjak, W. C. Eckelman, *Radiochim. Acta* **2009**, *93*, 239–244.
- [78] P. Christmas, S. M. Judge, T. B. Ryves, D. Smith, G. Winkler, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* **1983**, *215*, 397–408.
- [79] S. V. Smith, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1874–1901.
- [80] I. Novak-Hofer, P. A. Schubiger, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2002**, *29*, 821–830.
- [81] H. A. Krebs, H. L. Kornberg, *Energy Transformations in Living Matter: A Survey*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1957**.
- [82] M. Colombié, S. Gouard, M. Frindel, A. Vidal, M. Chérel, F. Kraeber-Bodéré, C. Rousseau, M. Bourgeois, *Nucl. Med.* **2015**, 58.
- [83] E. W. Baumann, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1974**, *36*, 1827–1832.
- [84] E. Boros, J. F. Cawthray, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6279–6284.
- [85] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858–2902.
- [86] Z. Baranyai, F. Uggeri, A. Maiocchi, G. B. Giovenzana, C. Cavallotti, A. Takács, I. Tóth, I. Bányai, A. Bényei, E. Brucher, et al., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013*, 147–162.
- [87] S. Juran, M. Walther, H. Stephan, R. Bergmann, J. Steinbach, W. Kraus, F. Emmerling, P. Comba, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 347–359.
- [88] R. Gillet, A. Roux, J. Brandel, S. Huclier-Markai, F. Camerel, O. Jeannin, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 11738–11752.
- [89] N. M. D. Bartolo, A. M. Sargeson, T. M. Donlevy, S. V. Smith, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, *0*, 2303–2309.
- [90] C. J. Anderson, T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Of* **2008**, *52*, 185–192.
- [91] M. Roger, L. M. P. Lima, M. Frindel, C. Platas-Iglesias, J.-F. Gustin, R. Delgado, V. Patinec, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 5246–5259.
- [92] C. Westbrook, *MRI at a Glance*, **2015**.
- [93] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352.
- [94] E. M. Gale, I. P. Atanasova, F. Blasi, I. Ay, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15548–15557.
- [95] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- [96] E. Boros, E. M. Gale, P. Caravan, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 4804–4818.
- [97] S. Laus, R. Ruloff, É. Tóth, A. E. Merbach, *Chem. – Eur. J.* **2003**, *9*, 3555–3566.
- [98] C. Paul-Roth, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1408–1412.
- [99] E. Brücher, G. Tircsó, Z. Baranyai, Z. Kovács, A. D. Sherry, in *Chem. Contrast Agents Med. Magn. Reson. Imaging*, Wiley-Blackwell, **2013**, pp. 157–208.
- [100] R. Kaewlai, H. Abujudeh, *AJR Am. J. Roentgenol.* **2012**, *199*, W17–23.
- [101] J. R. Morrow, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 6029–6034.

- [102] S. J. Dorazio, A. O. Olatunde, P. B. Tsitovich, J. R. Morrow, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 191–205.
- [103] E. M. Gale, I. P. Atanasova, F. Blasi, I. Ay, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15548–15557.
- [104] K. Overoye-Chan, S. Koerner, R. J. Looby, A. F. Kolodziej, S. G. Zech, Q. Deng, J. M. Chasse, T. J. McMurry, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6025–6039.
- [105] E. Balogh, Z. He, W. Hsieh, S. Liu, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 238–250.
- [106] A. de Sá, C. S. Bonnet, C. F. G. C. Geraldés, É. Tóth, P. M. T. Ferreira, J. P. André, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 4522–4532.
- [107] G. A. Rolla, C. Platas-Iglesias, M. Botta, L. Tei, L. Helm, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3268–3279.
- [108] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, **2012**.
- [109] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- [110] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [111] A. Nonat, *Complexes de Lanthanides (III) Pour Le Développement de Nouvelles Sondes Magnétiques et Luminescentes*, Grenoble 1, **2007**.
- [112] A. Picot, A. D'Aléo, P. L. Baldeck, A. Grichine, A. Duperray, C. Andraud, O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1532–1533.
- [113] A. T. Bui, A. Grichine, A. Duperray, P. Lidon, F. Riobé, C. Andraud, O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, DOI 10.1021/jacs.7b02951.
- [114] A. D'Aléo, A. Bourdolle, S. Brustlein, T. Fauquier, A. Grichine, A. Duperray, P. L. Baldeck, C. Andraud, S. Brasselet, O. Maury, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6622–6625.
- [115] M. Delbianco, V. Sadovnikova, E. Bourrier, G. Mathis, L. Lamarque, J. M. Zwier, D. Parker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10718–10722.
- [116] A. T. Frawley, R. Pal, D. Parker, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13349–13352.
- [117] S. J. Butler, M. Delbianco, L. Lamarque, B. K. McMahon, E. R. Neil, R. Pal, D. Parker, J. W. Walton, J. M. Zwier, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 4791–4803.
- [118] N. A. T. Bui, *Luminescence de Complexes de Lanthanide Par Effet d'antenne à Deux Photons : Vers l'imagerie Fonctionnelle*, Lyon, **2016**.
- [119] S. J. Butler, B. K. McMahon, R. Pal, D. Parker, J. W. Walton, *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 9511–9517.
- [120] Z. Liang, C.-F. Chan, Y. Liu, W.-T. Wong, C.-S. Lee, G.-L. Law, K.-L. Wong, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 13347–13356.
- [121] S. K. Tripathi, G. Kaur, R. K. Khurana, S. Kapoor, B. Singh, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2015**, *32*.
- [122] Y. Ma, Q. Mou, D. Wang, X. Zhu, D. Yan, *Theranostics* **2016**, *6*, 930–947.
- [123] A. Louie, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3146–3195.
- [124] E. Ranyuk, R. Lebel, Y. Bérubé-Lauzière, K. Klarskov, R. Lecomte, J. E. van Lier, B. Guérin, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1624–1633.
- [125] A. Mishra, J. Pfeuffer, R. Mishra, J. Engelmann, A. K. Mishra, K. Ugurbil, N. K. Logothetis, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 773–780.

- [126] E. R. Neil, M. A. Fox, R. Pal, L.-O. Pålsson, B. A. O'Sullivan, D. Parker, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 14937–14951.
- [127] C. Bensoussan, N. Rival, G. Hanquet, F. Colobert, S. Reymond, J. Cossy, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7759–7770.
- [128] Z. Liu, Z. Yang, T. Li, B. Wang, Y. Li, D. Qin, M. Wang, M. Yan, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9370–9373.
- [129] L. Sun, D. Hao, W. Shen, Z. Qian, C. Zhu, *Microchim. Acta* **2012**, *177*, 357–364.
- [130] Y. Rahimi, A. Goulding, S. Shrestha, S. Mirpuri, S. K. Deo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *370*, 57–61.
- [131] N. Chopin, M. Médebielle, O. Maury, G. Novitchi, G. Pilet, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, *2014*, 6185–6195.
- [132] D. Rehm, A. Weller, *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259–271.
- [133] A. A. Belal, L. H. Abdel-Rahman, A. H. Amrallah, *J. Chem. Eng. Data* **1997**, *42*, 1075–1077.
- [134] E. Bodio, K. Julienne, S. G. Gouin, A. Faivre-Chauvet, D. Deniaud, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 924–927.
- [135] E. Bodio, M. Boujtita, K. Julienne, P. Le Saec, S. G. Gouin, J. Hamon, E. Renault, D. Deniaud, *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 1284–1293.
- [136] A. Rodríguez-Rodríguez, Z. Halime, L. M. P. Lima, M. Beyler, D. Deniaud, N. Le Poul, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, V. Patinec, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 619–632.
- [137] M. L. Fur, M. Beyler, N. L. Poul, L. M. P. Lima, Y. L. Mest, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, V. Patinec, R. Tripier, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 7406–7420.
- [138] C. Gotzmann, F. Braun, M. D. Bartholomä, *RSC Adv.* **2015**, *6*, 119–131.
- [139] A. Aditya, T. Kodadek, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 164–169.
- [140] A. Bevilacqua, R. I. Gelb, W. B. Hebard, L. J. Zompa, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 2699–2706.
- [141] <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales>
- [142] J. C. Reubi, S. Wenger, J. Schmuckli-Maurer, J.-C. Schaer, M. Gugger, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 1139–1146.
- [143] A. Anastasi, V. Erspamer, M. Bucci, *Experientia* **1971**, *27*, 166–167.
- [144] T. J. McDonald, H. Jörnvall, G. Nilsson, M. Vagne, M. Ghatei, S. R. Bloom, V. Mutt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *90*, 227–233.
- [145] Broccardo M., Erspamer G. Falconieri, Melchiorri P., Negri L., Castiglione R., *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *55*, 221–227.
- [146] I. M. Jackson, P. J. H. Scott, S. Thompson, *Semin. Nucl. Med.* **2017**, *47*, 493–523.
- [147] C. Yung-Chi, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [148] G. Fischer, S. Lindner, S. Litau, R. Schirmacher, B. Wängler, C. Wängler, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1479–1483.
- [149] E. Gourni, R. Mansi, M. Jamous, B. Waser, C. Smerling, A. Burian, F. Buchegger, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1719–1725.
- [150] R. Mansi, A. Fleischmann, H. R. Mäcke, J. C. Reubi, *Nat. Rev. Urol.* **2013**, *10*, 235–244.

- [151] R. Cescato, T. Maina, B. Nock, A. Nikolopoulou, D. Charalambidis, V. Piccand, J. C. Reubi, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 318–326.
- [152] R. Mansi, X. Wang, F. Forrer, S. Kneifel, M.-L. Tamma, B. Waser, R. Cescato, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5240–5249.
- [153] L. E. Lantry, E. Cappelletti, M. E. Maddalena, J. S. Fox, W. Feng, J. Chen, R. Thomas, S. M. Eaton, N. J. Bogdan, T. Arunachalam, et al., *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1144–1152.
- [154] Breeman Wout A.P., Hofland Leo J., de Jong Marion, Bernard Bert F., Sinivasan Ananth, Kwekkeboom Dik J., Visser Theo J., Krenning Eric P., *Int. J. Cancer* **1999**, *81*, 658–665.
- [155] <https://www.minervamedica.it/en/journals/nuclear-med-molecular-imaging/article.php?cod=R39Y2007N01A0042>, **n.d.**
- [156] T. J. Hoffman, H. Gali, C. J. Smith, G. L. Sieckman, D. L. Hayes, N. K. Owen, W. A. Volkert, *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 823–831.
- [157] N. Mansour, V. Dumulon-Perreault, S. Ait-Mohand, M. Paquette, R. Lecomte, B. Guérin, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2017**, *60*, 200–212.
- [158] <http://www.eurekaselect.com/109078/article>
- [159] J. C. Reubi, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389–427.
- [160] C. V. de Wiele, F. Dumont, R. V. Broecke, W. Oosterlinck, V. Cocquyt, R. Serreyn, S. Peers, J. Thornback, G. Slegers, R. A. Dierckx, *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, *27*, 1694–1699.
- [161] C. V. de Wiele, F. Dumont, R. A. Dierckx, S. H. Peers, J. R. Thornback, G. Slegers, H. Thierens, *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 1722–1727.
- [162] C. V. de Wiele, P. Phonteyne, P. Pauwels, I. Goethals, R. V. den Broecke, V. Cocquyt, R. A. Dierckx, *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 260–264.
- [163] A. Dimitrakopoulou-Strauss, P. Hohenberger, U. Haberkorn, H. R. Mäcke, M. Eisenhut, L. G. Strauss, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1245–1250.
- [164] G. Gornik, R. Mansi, K. Abiraj, S. Knippen, A. Grosu, H. Maecke, W. Weber, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 22–22.
- [165] R. Mansi, X. Wang, F. Forrer, B. Waser, R. Cescato, K. Graham, S. Borkowski, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38*, 97–107.
- [166] A. Roivainen, E. Kähkönen, P. Luoto, S. Borkowski, B. Hofmann, I. Jambor, K. Lehtiö, T. Rantala, A. Rottmann, H. Sipilä, et al., *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 867–872.
- [167] C. Stoykow, T. Erbes, H. R. Maecke, S. Bulla, M. Bartholomä, S. Mayer, V. Drendel, P. Bronsert, M. Werner, G. Gitsch, et al., *Theranostics* **2016**, *6*, 1641–1650.
- [168] C. F. Ramogida, C. Orvig, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4720–4739.
- [169] <http://www.eurekaselect.com/71170/article>
- [170] Huisgen Rolf, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *2*, 565–598.
- [171] L. M. De León-Rodríguez, Z. Kovacs, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 391–402.
- [172] V. Kubíček, J. Havlíčková, J. Kotek, G. Tircsó, P. Hermann, É. Tóth, I. Lukeš, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10960–10969.
- [173] P. J. Riss, C. Kroll, V. Nagel, F. Rösch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5364–5367.
- [174] G. Máté, J. Šimeček, M. Pniok, I. Kertész, J. Notni, H.-J. Wester, L. Galuska, P. Hermann, *Molecules* **2015**, *20*, 13112–13126.

- [175] M. H. Ansari, M. Ahmada, K. A. Dicke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1067–1070.
- [176] A. S. Craig, I. M. Helps, K. J. Jankowski, D. Parker, N. R. A. Beeley, B. A. Boyce, M. A. W. Eaton, A. T. Millican, K. Millar, A. Phipps, et al., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *0*, 794–796.
- [177] A. R. Katritzky, C. A. Ramsden, J. A. Joule, V. V. Zhdankin, in *Handb. Heterocycl. Chem. Third Ed.*, Elsevier, Amsterdam, **2010**, pp. 242–382.
- [178] I. Sin, C. S. Kang, N. Bandara, X. Sun, Y. Zhong, B. E. Rogers, H.-S. Chong, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2553–2562.
- [179] V. Maheshwari, J. L. J. Dearling, S. T. Treves, A. B. Packard, *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *393*, 318–323.
- [180] K. Abiraj, R. Mansi, M.-L. Tamma, M. Fani, F. Forrer, G. Nicolas, R. Cescato, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1970–1978.
- [181] C. J. Broan, K. J. Jankowski, R. Katakya, D. Parker, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, *0*, 1738–1739.
- [182] G. Stones, G. Argouarch, A. R. Kennedy, D. C. Sherrington, C. L. Gibson, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2357–2363.
- [183] J. E. W. Scheuermann, F. Ronketti, M. Motevalli, D. V. Griffiths, M. Watkinson, *New J. Chem.* **2002**, *26*, 1054–1059.
- [184] M. Studer, C. F. Meares, *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 337–341.
- [185] J. H. Koek, E. W. J. M. Kohlen, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3673–3675.
- [186] M. Moreau, S. Poty, J.-M. Vrigneaud, P. Walker, M. Guillemin, O. Raguin, A. Oudot, C. Bernhard, C. Goze, F. Boschetti, et al., *Dalton Trans.* **2017**, DOI 10.1039/C7DT01772C.
- [187] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta* **1967**, *38*, 475–488.
- [188] L. Zekany, I. Nagypal, in *Comput. Methods Determ. Form. Constants* (Ed.: D.J. Leggett), Springer US, Boston, MA, **1985**, pp. 291–353.
- [189] F. J. C. Rossotti, H. Rossotti, *J. Chem. Educ.* **1965**, *42*, 375.
- [190] G. Schwarzenbach, H. A. Flaschka, *Complexometric Titrations [by] G. Schwarzenbach & H. Flaschka.*, Methuen, London, **1969**.
- [191] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- [192] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318.
- [193] D. T. Petasis, M. P. Hendrich, *Methods Enzymol.* **2015**, *563*, 171–208.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications relatives à cette thèse:

« 1,4,7-Triazacyclononane-Based Bifunctional Picolinate Ligands for Efficient Copper Complexation », **A. Guillou**, L. M. P. Lima, M. Roger, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, R. Delgado, V. Patinec, R. Tripier, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017 (18), 2435–2443

« Methylthiazolyl tacn for copper complexation and their BCA derivatives for bioconjugation and ⁶⁴Cu radiolabeling : an example with bombesin », **A. Guillou**, L. M. P. Lima, D. Esteban-Gómez, M. D. Bartholomä, C. Platas-Iglesias, R. Delgado, V. Patinec, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2019**, DOI : 10.1021/acs.inorgchem.8b03280 (just accepted)

Autre publication :

« Final Step Gallium-68 Radiolabelling of Silica-Coated Iron Oxide Nanorods as Potential PET/MR Multimodal Imaging Agents », B. P. Burke, N. Baghdadi, G. S. Clemente, N. Camus, **A. Guillou**, A. E. Kownacka, J. Domarkas, Z. Halime, R. Tripier, S. J. Archibald, *Faraday Discuss.* **2015**, 175 (0), 59–71

Communications Orales :

Bifunctional Cu(II) Azamacrocyclic Chelates based on Tacn. Biological Application in Prostate Cancer
GECOM CONCOORD 2018, 21-25 Avril **2018**, Longeville sur Mer (France)

Tacn-based Bifunctional Picolinate Ligands for an Efficient Copper Complexation
Journées SCF-BPL, 2-4 Mai **2017**, Le Mans (France)

Tacn-based Thiazolyl Ligand for an Efficient Copper (II) chelation
New chemical and biological tools for targeting in cancer imaging and therapy,
21-24 Septembre **2016**, Le Bono (France) (*Prix de la meilleur communication*)

Communications par affiche :

On the Road of a new class of PET/PDT theranostic probe based on a tacn framework
Journée de Chimie de Coordination, 8-9 Février **2017**, Brest (France)

Tacn-based thiazolyl Ligand for an Efficient Copper (II) chelation
GPOL2017, 10-12 Juillet **2017**, Roscoff (France)

Tacn-based thiazolyl Ligand for an Efficient Copper (II) chelation
Congrès annuel de l'IBSAM, 7 juin **2017**, Brest (France)

Chelators based on Nitrogen/Sulphur Ligands for Efficient Cu(II) complexation
ICCC, 3-8 Juillet **2016**, Brest (France)

Tacn-based thiazolyl Ligand for an Efficient Copper (II) chelation
Congrès annuel de l'IBSAM, 7 juin **2016**, Brest (France)

New Cu(II) chelators based on Nitrogen/Sulfur ligands for medical applications Medicinal Flavor of Metal Complexes: Diagnostic and Therapeutic Applications, 7-9 Décembre **2015**, Orléans (France)

Titre : Synthèse et coordination de triazacyclononanes et de dérivés bifonctionnels : vers des applications en imageries médicales.

Mots clés : tacn, complexes de coordination, *N*-fonctionnalisation régiospécifique, sondes bimodales, agents chélatants bifonctionnels, imagerie TEP

Résumé : Le 1,4,7-triazacyclononane (tacn) fait partie de la famille des polyazamacrocycles et a la faculté, lorsqu'il est *N*-fonctionnalisé par des groupements coordinants adéquats, de former des complexes de coordination stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement avec les métaux de transition. C'est pourquoi les dérivés du tacn trouvent de nombreuses applications dans de nombreux domaines, par exemple celui de l'imagerie médicale. Notre équipe a développé des ligands *N*-fonctionnalisés par des groupements picolinate et méthylpyridine pour des applications en imagerie TEP et IRM.

Le premier travail de cette thèse porte sur l'élaboration de nouvelles sondes bimodales TEP-imagerie optique et IRM-imagerie optique à motifs issus de tacn-picolinate décrits au laboratoire.

Une seconde partie est axée sur la synthèse de nouveaux chélates du Cu(II) à base de tacn portant des bras méthylthiazole pour une potentielle application en imagerie TEP. Les complexes de Cu(II) correspondant ont été étudiés par différentes méthodes analytiques et spectroscopiques afin de juger leurs stabilités thermodynamiques et leurs inerties cinétiques.

Les chélatants répondant aux critères imposés par le milieu biologique ont été sélectionnés pour une application en imagerie TEP dans le cadre du cancer de la prostate. Des analogues bifonctionnels ont ainsi été élaborés afin de les incorporer dans des radiopharmaceutiques radiomarqués au cuivre-64.

Title : Synthesis and coordination of triazacyclononanes and bifunctional derivatives : toward applications in medical imaging.

Keywords : tacn, coordination complexes, regiospecific *N*-functionalization, bimodal probes, bifunctional chelating agents, PET imaging.

Abstract : The 1,4,7-triazacyclononane (tacn) is part of the family of polyazamacrocycles, and has the faculty, when appropriately *N*-functionalized with coordination pendants, to form thermodynamically stable and kinetically inert coordination complexes with transition metals. Thanks to their properties tacn derivatives can be found in numerous applications such as medical imaging. Our group has developed some ligands *N*-functionalized with picolinate and picolyl pendants for an application in PET imaging and MRI.

The first part of this thesis is focused on the development of a new class of bimodal PET-optical imaging and MRI-optical imaging probes based on tacn-picolinate units described in the laboratory.

The second part deals with the synthesis of new Cu(II) chelators based on tacn-methylthiazolyl units for a potential application in PET imaging. The corresponding Cu(II) complexes were studied by different analytical and spectroscopic methods in order to evaluate their thermodynamic stabilities and kinetic inertness.

The chelators that fulfilled all the criterias imposed by the biological media were selected for an application PET imaging of prostate cancer. Some bifunctional analogues were elaborated so as to incorporate them in radiopharmaceuticals radiolabeled with copper-64.