



HAL
open science

Dérivés du cyclam pour le ciblage du récepteur CXCR4 et la médecine nucléaire : synthèse, complexation et études biologiques

Marie Le Roy

► **To cite this version:**

Marie Le Roy. Dérivés du cyclam pour le ciblage du récepteur CXCR4 et la médecine nucléaire : synthèse, complexation et études biologiques. Chimie de coordination. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0111 . tel-04416334

HAL Id: tel-04416334

<https://theses.hal.science/tel-04416334>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

Par

MARIE LE ROY

Dérivés du cyclam pour le ciblage du récepteur CXCR4 et la médecine nucléaire

Synthèse, complexation et études biologiques

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 16 Décembre 2022
Unité de recherche : UMR CNRS 6521 CEMCA

Rapporteurs avant soutenance :

Florence POPOWYCZ, Professeur des Universités, Université de Lyon 1

Loïc CHARBONNIÈRE, Directeur de Recherche CNRS, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg

Composition du Jury :

Florence POPOWYCZ, Professeur des Universités, Université de Lyon 1 (Présidente de jury et rapporteur)

Loïc CHARBONNIÈRE, Directeur de Recherche CNRS, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg
(Rapporteur)

Cécile BOURDEAU, Directrice Adjointe, GIP ARRONAX, Saint-Herblain (Examinatrice)

Muriel HISSLER, Professeur des Universités, Université de Rennes 1 (Examinatrice)

Raphaël TRIPIER, Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale (Directeur de thèse)

Thibault TROADEC, Chargé de Recherche CNRS, Université de Bretagne Occidentale (Co-encadrant de thèse)

Remerciements

Cette thèse intitulée « Dérivés du cyclam pour le ciblage du récepteur CXCR4 et la médecine nucléaire : synthèse, complexation et études biologiques » a été réalisée au sein de l'UMR CNRS 6521 CEMCA « Chimie Électrochimie Moléculaire et Chimie Analytique » dans le groupe thématique MAC « Macrocycle Azotés et Coordination » de l'équipe COSM « Chimie Organique Santé et Matériaux ». Ces travaux de thèse ont été financés par la Région Bretagne et la Ligue contre le Cancer du Finistère.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Loïc Charbonnière, Directeur de Recherche à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien de Strasbourg et Madame Florence Popowycz, Professeur des Universités à Lyon 1 d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs et présidente de jury respectivement. J'adresse également mes remerciements à Madame Cécile Bourdeau, Directrice Adjointe du GIP ARRONAX de Saint-Herblain et à Madame Muriel Hissler, Professeur des Universités à Rennes 1 pour avoir accepté d'être examinatrices de cette thèse. Merci de l'intérêt porté à mes travaux et pour la discussion enrichissante ayant suivie la soutenance.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement le Professeur Raphaël Tripiet pour m'avoir donné l'opportunité et la chance d'effectuer cette thèse au sein de son groupe. La liste de mes remerciements te concernant pourrait être longue mais je vais essayer d'être succincte. Dans un premier temps merci pour toutes ces années d'enseignements qui ont débuté dès ma première année de licence jusqu'à aujourd'hui. Merci pour le temps que tu prends pour chacun de tes étudiants et surtout pour le mail que tu m'as écrit lors de mon M1 qui m'a permis de me remotiver pour en arriver à cette thèse. Merci également pour ta disponibilité, tes conseils pour les manips, ta gentillesse, ton écoute et tous nos fous rires. Alors voilà mes 8 années au sein de l'Université de Bretagne Occidentale s'achèvent mais tu peux être certain que tu auras toujours de mes nouvelles car je pense que je ne serais pas arrivée à ce stade sans avoir croisé tes salles de cours, merci pour tout.

Cette thèse a également été co-encadrée par le Docteur Thibault Troadec. Merci à toi Thibault de m'avoir fait confiance pour être ta première doctorante et je suis contente d'avoir effectuée ces trois années à tes côtés. Tu m'as appris à manipuler en milieu inerte dès mon M2 avec ce fameux couplage de Sonogashira qui a fonctionné car tu as touché le Schlenk ! Tout au long de ces trois années tu m'as toujours soutenue même quand les manips ne fonctionnaient pas ou que mes purifications étaient fastidieuses et également lorsque j'ai eu des problèmes familiaux. Merci également pour toutes ces questions que tu as pu me poser pour préparer chaque oral et surtout pour la soutenance. Je dois également te remercier pour toutes tes

astuces sur powerpoint surtout pour faire de jolis zigouigoui. Merci pour tout le temps que tu auras pu m'accorder pendant ces trois années. J'espère que les habitudes que nous avons pu mettre en place serviront pour tes futurs thésards.

Je poursuivrai en remerciant tous les collaborateurs qui ont rendu possibles ces travaux. Tout d'abord l'équipe du Professeur Michel Chérel du CRCINA de Nantes. Merci à Hela Bouhsine et Patricia Le Saëc pour leur accueil au sein de leur laboratoire pour que je puisse participer aux manipulations cellulaires et aux études de radiomarquage. Je tiens également à remercier Cassandra Métivier et le Docteur Latifa Rbah-Vidal pour toutes les études de FACS. Je souhaite également remercier l'équipe du Professeur Dominique Schols de Leuven en Belgique pour les études biologiques réalisées sur le composé bis-cyclam. Mes remerciements s'adressent également aux membres de mon CSI, le Professeur Françoise Chuburu de l'Université de Reims et le Professeur Sylvain Collet de l'Université de Nantes, pour leurs suivis et leurs conseils.

Ces trois années de thèse ont été un réel bonheur car j'ai pu les partager avec tous les membres de l'équipe MAC que je remercie sincèrement pour leur accueil, leur écoute, leur soutien ainsi que pour leurs conseils. Avant d'être mes collègues que j'appelle maintenant toutes par leurs prénoms, vous avez été pour moi Madame Bernard, Madame Beyler, Madame Le Bris et Madame Patinec. Je voudrais vous remercier pour toutes ces années en tant qu'enseignantes où vous avez su me transmettre cet amour pour la chimie au travers de CM, de TD ou encore de TP. Mais maintenant je tiens vraiment à te remercier Hélène pour le grand soutien que tu as pu me donner lors de mes épreuves personnelles que j'ai pu traverser et surtout pour nos discussions sur les stéréoisomères de mes bis-cyclams. Merci à toi Maryline de m'avoir donné l'occasion de réaliser du montage vidéo pour les TP mais également pour nos discussions personnelles échangées. J'étais également ravie de te partager quelques commérages. Un grand merci à toi Nathalie de m'avoir prise sous ton aile lors de mon master 2 et d'avoir toujours veillé sur moi depuis. Merci à toi Véronique de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage de M1 à Reims et de participer à la nuit des chercheurs à tes côtés, en mode disco ! J'ai également apprécié discuter avec toi le matin avant d'attaquer les manip. Merci à toi Nadège d'avoir toujours été disponible lorsque j'avais des questions pour mes manip, mes mécanismes ou juste pour discuter. J'ai adoré notre congrès à Grenoble et je te souhaite de t'épanouir professionnellement mais également personnellement.

Je souhaiterais remercier les doctorants qui sont maintenant des Docteurs et qui m'ont intégré à cette équipe, le Docteur Laura Grenier, le Docteur Evan Lelong et le Docteur Gwladys Nizou. Vient ensuite le temps de remercier plus particulièrement le Docteur Axia Marlin. Merci pour ta joie de vivre et ton langage bien à toi qui demande parfois de vraiment réfléchir pour te

comprendre. J'ai adoré partager le bureau avec toi, venir danser dans ton labo ou encore discuter de nos CCM pour nos nombreuses colonnes. Merci pour ton soutien lors de la rédaction mais également pour le temps que tu as su m'accorder jusqu'à la soutenance. Quel bonheur j'ai eu de te revoir à New-York.

Merci à toi Docteur Julie Pineau. Nous nous connaissons maintenant depuis 4 ans, finalement nous sommes arrivées en même temps au sein de cette équipe ! Merci pour tes conseils et pour tous nos échanges sur nos manip ou nos problèmes. Grâce à ça nous avons pu avancer sur nos projets. Merci également pour tous les fous rires partagés surtout quand ton ordi te joue des tours. Un immense merci pour m'avoir largement soutenue lors de la rédaction !

Je tiens également à remercier les doctorants qui me suivront. Tout d'abord, merci à toi Alexandra (loobs pour les intimes) d'avoir partagé mon laboratoire pendant ton M2. On aura bien rit et j'espère que j'aurai pu t'aider pour acquérir des compétences au labo, mais je suis sûre tout ira bien pour toi ! Merci également d'être mon amie et de me faire rire au quotidien avec tes aventures uniques et improbables. Merci à toi Charline, j'ai adoré partager le laboratoire avec toi et discuter de chimie ou pas. Bonne chance pour la suite ! Merci à toi Cédric de nous divertir avec des explosions. A force de persévérance ne t'en fais pas ça va cliquer ! Merci à toi Maël d'avoir su entendre ce que je pouvais avoir à dire, j'espère que le reste de ta thèse se déroulera sans encombre. Merci à la petite nouvelle, Loëza pour ce sourire quotidien et ta bienveillance, trois belles années débutent pour toi et seront source de succès j'en suis sûre.

Je tiens à finir ces remerciements en m'adressant à ma famille qui a su être présente au quotidien tout au long de mes études. Je remercierai dans un premier temps ma maman qui malheureusement n'est plus présente pour assister à la fin de ce chapitre de ma vie mais qui je sais serai fière de moi. Un grand merci à toi Jean-Yves de m'avoir toujours encouragée pour persévérer. Merci à toi papa de croire en moi et de me pousser à me dépasser. Je remercie également ma fratrie Carole, Adeline et Mathieu pour vos encouragements et ceux de vos enfants. Je remercie également ma belle-famille pour leur intérêt porté pour l'avancement de mes travaux et d'avoir été présents lors de ma soutenance.

Je terminerai cette longue liste de remerciements par te remercier toi Gautier. Merci d'être à mes côtés depuis le début de mon master et de m'avoir poussée à continuer en thèse. Je te remercie pour tes mots d'encouragements surtout pendant cette période de rédaction où mon stress prenait très souvent le dessus. Merci d'être mon pilier au quotidien.

LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	13
CHAPITRE 1.....	23
LES POLYAZAMACROCYCLES ET LEURS COMPLEXES DE CUIVRE POUR DES APPLICATIONS EN MEDECINE NUCLEAIRE	23
I. Propriétés de coordination du cuivre	25
1. Classification selon Pearson	25
2. Caractérisation spectroscopique des complexes de cuivre (II)	26
2.1. Spectroscopie UV-visible	26
2.2. Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)	28
3. Influence des ligands macrocycliques sur la coordination du cuivre (II)	30
II. Propriétés physico-chimiques des polyazamacrocycles	32
1. Propriétés acide-base	32
2. Propriétés thermodynamiques	34
3. Propriétés cinétiques.....	36
3.1. Cinétique de complexation.....	36
3.2. Cinétique de dissociation	36
3.3. Influence du degré d'oxydation du cuivre sur les propriétés de coordination.....	39
4. Géométrie et isomérisation des complexes de cyclam	40
III. Influence des groupements coordinants et synthèse de macrocycles fonctionnalisés	41
1. Complexes du cuivre (II) avec des chélateurs non macrocycliques.....	41
2. Macrocycles <i>N</i> -fonctionnalisés par le groupement acétate	42
3. Macrocycles <i>N</i> -fonctionnalisés par le groupement méthylphosphonate	46
4. Macrocycles <i>N</i> -fonctionnalisés par le groupement picolyle.....	50
5. Macrocycles <i>N</i> -fonctionnalisés par le groupement picolinate.....	52
IV. Médecine nucléaire et bioconjugaison des chélateurs	55
1. Imagerie nucléaire.....	55
1.1. Fonctionnement de l'imagerie par émission de positons (TEP)	55
1.2. Radioisotopes utilisés pour l'imagerie TEP.....	56
2. Thérapie nucléaire.....	58
2.1. Propriétés de désintégration de radionucléides pour la thérapie	59
2.2. Radioisotopes utilisés pour la thérapie nucléaire	59

3. Ouverture au concept de théranostique.....	60
4. Bioconjugaison et bifonctionnalisation	62
4.1. Stratégies de bioconjugaison	62
4.2. Stratégies de bifonctionnalisation	63
5. TE1PA : Bioconjugaison et études biologiques	69
V. CXCR4, un récepteur de chimiokine à imager	74
1. CXCR4 et son unique ligand CXCL12	74
2. Implication du récepteur CXCR4 dans l'organisme	75
2.1. Rôle de CXCR4 dans l'organisme sain.....	75
2.2. Rôle de CXCR4 dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)	75
2.3. Rôle du récepteur CXCR4 dans les cancers	76
3. Ciblage de CXCR4	77
3.1. Anticorps en tant qu'antagonistes	77
3.2. Dérivés de peptides en tant qu'antagonistes	78
3.3. Des molécules organiques en tant qu'antagonistes	79
Conclusion	80
 CHAPITRE 2.....	83
 SYNTHESE DE NOUVEAUX RADIOPHARMACEUTIQUES ORGANIQUES POUR L'IMAGERIE VECTORISEE DE CXCR4.....	83
Introduction.....	85
I. Contexte bibliographique.....	86
1. Imagerie du récepteur CXCR4.....	86
1.1. Anticorps radiomarqués	86
1.2. Peptides radiomarqués	87
2. Ouverture à la radiothérapie par le ciblage de CXCR4	89
3. Ciblage de CXCR4 par des petites molécules pour l'imagerie et la thérapie	90
II. Synthèse des molécules organiques inhibitrices	96
1. Synthèse de l'AMD070.....	96
2. Synthèse de l'AMD070- <i>p</i> -BnCO-eda	98
3. Conjugaison des dérivés AMD070 au chélateur.....	103
3.1. Synthèse de l'AMD070- <i>p</i> -SCN-Bn-TE1PA (AMD070-TE1PA).....	105
3.2. Synthèse de l'AMD070- <i>p</i> -BnCO-eda- <i>p</i> -SCN-Bn-TE1PA (AMD070*-TE1PA).....	107
4. Conjugaison à la fluorescéine isothiocyanate.....	109
4.1. Synthèse de l'AMD070-FITC	109

4.2. Synthèse de l'AMD070- <i>p</i> -BnCO-eda-FITC (AMD070*-FITC)	110
III. Études biologiques	112
1. Radiomarquage	112
1.1. Radiomarquage du composé AMD070-TE1PA	112
1.2. Radiomarquage du composé AMD070*-TE1PA.....	116
2. Études cellulaires des composés fluorescents	116
Conclusion	120
 CHAPITRE 3.....	 123
 SYNTHESE DE BIS-CYCLAM PAR C-FONCTIONNALISATION ET RECONNAISSANCE DU RECEPTEUR CXCR4	 123
Introduction.....	125
I. Contexte bibliographique.....	126
1. Découverte du premier macrocycle ayant une activité anti-VIH	126
2. Imagerie du récepteur CXCR4 par des composés bis-macrocyclique	129
3. Stratégies de synthèse des dérivés bis-cyclam	130
3.1. Synthèse de l'AMD3100.....	130
3.2. Synthèse du CB-bis-cyclam	131
4. Conception de bis-cyclam C-fonctionnalisés	132
II. Synthèse du <i>m</i>-xylyl-bis-C-cyclam.....	133
1. Cyclisation <i>via</i> l'utilisation d'esters α, β -insaturés.....	133
1.1. Synthèse du cyclisant	133
1.2. Réaction de cyclisation	134
2. Cyclisation <i>via</i> un bis(électrophile).....	138
2.1. Synthèse du cyclisant tétrabromé	138
2.2. Réaction de cyclisation	141
2.3. Étude de coordination avec le cuivre (II).....	144
III. Études biologiques	147
1. Inhibition de la reconnaissance du ligand CXCL12	147
2. Inhibition du signal calcique	148
3. Inhibition de l'infection au VIH.....	149
Conclusion	150

CHAPITRE 4.....	153
DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE LIGANDS SPECIFIQUES DU CUIVRE (II).....	153
Introduction.....	155
I. Synthèse de dérivés de cyclam à base d'oxyde de phosphine	157
1. Synthèse du ligand TE1PoPh ₂	159
2. Synthèse du ligand TE2PoPh ₂	162
II. Chimie de coordination des ligands TEXPoPh₂.....	166
1. Synthèse et caractérisation des complexes de cuivre (II)	166
1.1. Synthèses des complexes [Cu(TE1PoPh ₂)] ²⁺ et [Cu(TE2PoPh ₂)] ²⁺	166
1.2. Étude à l'état solide des complexes [Cu(TE1PoPh ₂)] ²⁺ et [Cu(TE2PoPh ₂)] ²⁺	167
1.3. Caractérisation par analyses RPE	169
1.4. Études potentiométriques et cinétiques du complexe [Cu(TE1PoPh ₂)] ²⁺	170
2. Étude de la spécificité du ligand TE1PoPh ₂ envers le Cu (II).....	173
III. Étude de radiomarquage avec le cuivre-64	177
Conclusion	180
CONCLUSION GÉNÉRALE	183
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	191
General methods	193
Experimental section of chapter 2.....	195
Experimental section of chapter 3.....	216
Experimental section of chapter 4.....	229
RÉFÉRENCES	241
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	253

Liste des abréviations

Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
CB	cross-bridged
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CPNPC	cancer du poumon non à petites cellules
CSTN	cancer du sein triple négatif
cyclam	1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane
cyclen	1,4,7,10-tétraazacyclododécane
DFO	Desferrioxamine B
DRX	Diffraction des Rayons X
EA	Électron Auger
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ENH	Électrode Normale à Hydrogène
ESC	Électrode Normale au Calomel
ESI	Electrospray Ionisation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
[¹⁸ F]-FDG	[¹⁸ F]-fluoro-2-désoxyglucose
FITC	Fluorescéine Isothiocyanate
Glu	Acide Glutamique
His	Histidine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane

IgG	Immunoglobuline G
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MAC	Macrocycle Azotés et Coordination
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
MM	Myélome Multiple
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Électronique
SDF-1	Stromal cell Derived Factor 1
SOD	SuperOxyde Dismutase
tacn	1,4,7-triazacyclononane
TEMP	Tomographie par Émission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Émission de Positons
TFA	Trifluoroacétyle
TLE	Transfert linéaire d'énergie
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En 2020, plus de 19 millions de nouveaux cas de cancers étaient dénombrés dans le monde.^[1] Face à ce problème de santé publique, de nombreux réseaux collaboratifs ont vu le jour, alliant médecins, biologistes, chimistes ainsi que des physiciens et visent à élaborer et étudier de nouvelles molécules d'intérêts tant pour le diagnostic que la thérapie de diverses pathologies liées aux cancers.

Une détection et une identification précoce des maladies permet une augmentation de l'espérance de guérison des patients en adoptant le soin et le suivi thérapeutique le plus adapté. Ainsi, des campagnes de dépistages en fonction de la nature des cancers sont mis en place (cancer du côlon, cancer de la prostate, cancer du col de l'utérus ou encore le cancer du sein), et sont réalisées soit par prélèvements, palpations ou encore par examens utilisant l'imagerie médicale.^[2]

Actuellement, les techniques d'imagerie non-invasives, comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM),^[3] la Tomographie par Émission de Positons (TEP)^[4] ou encore la Tomographie par Émission Monophotonique (TEMP)^[5] sont bien établies en clinique, et nécessitent l'administration d'un composé pour imager l'organisme des patients.

L'IRM utilise les propriétés paramagnétiques de certains éléments (classiquement du gadolinium) pour améliorer le contraste des images.^[3] La TEP et la TEMP sont deux techniques appartenant au domaine de la médecine nucléaire du fait de l'utilisation de radioéléments. En effet, ces examens reposent sur la détection de particules émises par les noyaux radioactifs, et permet l'acquisition d'images avec une excellente sensibilité de détection. Chaque technique utilise les propriétés d'un type d'émission, l'imagerie TEMP est réalisée grâce à des radioéléments émetteurs de particules γ tandis que l'imagerie TEP utilise des émetteurs de particules β^+ .^[6] À l'exception de quelques cas particuliers, les radioéléments ne peuvent être injectés sous leur forme libre, et doivent être liés à des molécules (souvent organiques) qui, en plus de permettre leur vectorisation vers le site d'intérêt, assurent également leur élimination de l'organisme après qu'ils aient effectué leur action. Lorsque ces émetteurs sont des cations métalliques, des chélateurs aux propriétés de coordination alliant stabilité thermodynamique et inertie cinétique ont été élaborés pour réduire leur toxicité *in vivo*.^[7]

La région Bretagne et la Ligue contre le cancer du Finistère, qui ont financé ces travaux, sont très investies dans le développement de nouvelles technologies applicables en médecine nucléaire. Par ailleurs, la construction du cyclotron ARRONAX à Saint-Herblain a été un moteur essentiel à la recherche de nouveaux radiopharmaceutiques dans le Grand Ouest, notamment grâce à la production contrôlée de nombreux radioéléments émetteurs α , β^- , β^+ ou γ . Ainsi, de nombreuses synergies sont nées entre divers laboratoires tant en amont qu'en

aval de l'application. C'est dans ce cadre que ce projet de recherche, axé sur des molécules organiques de type tétraazamacrocyclique a vu le jour.

Les dérivés polyazacycloalcanes tels que le **tacn**, le **cyclen**, le **pyclen** et le **cyclam** possèdent une place importante dans le domaine de la chimie de coordination grâce à la préorganisation et la nature de bases de Lewis de leurs atomes d'azote, qui permettent une complexation forte de divers cations, suivant le modèle des interactions acide/base de la théorie HSAB établie par Pearson.^[8] De plus, une fonctionnalisation de ces amines permet d'ajouter des groupements coordinants pour satisfaire le nombre de coordination de différents cations et d'ainsi former des complexes stables et inertes **[Figure 1]**.^[9]

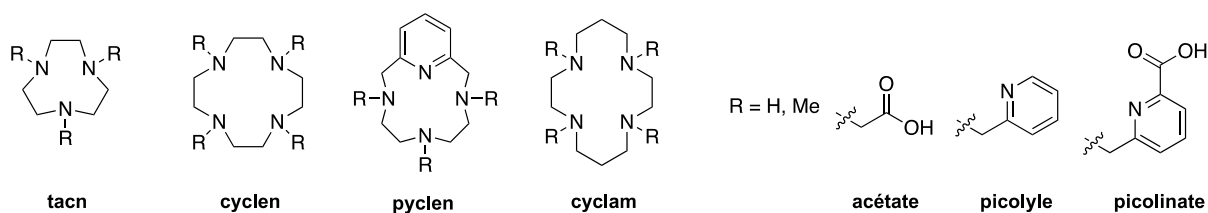


Figure 1 : Représentations des polyazacycloalcanes **tacn**, **cyclen**, **pyclen** et **cyclam** ainsi que de possibles groupements coordinants pouvant être introduits par N-fonctionnalisation

C'est donc naturellement que l'on retrouve ces dérivés macrocycliques dans les études pré-cliniques ou en développement clinique dans le domaine. Par exemple, lors d'examens IRM pour imager le corps entier, l'exaltation du signal est bien souvent réalisée par l'administration d'agents de contraste à base de gadolinium. Le complexe le plus utilisé en clinique au niveau mondial est le $[Gd(\mathbf{DOTA})(H_2O)]^-$, commercialisé sous le nom de DOTAREM[®] par l'entreprise française Guerbet **[Figure 2]**.^[10] Le ligand est un dérivé du **cyclen** N-fonctionnalisé par quatre groupements acétate ($H_4\mathbf{DOTA}$) permettant de coordiner de façon optimale l'ion gadolinium (III). Ce cation est considéré comme un acide dur selon la théorie établie par Pearson pouvant former des complexes stables avec les bases dures telles que les fonctions acides des groupements acétate, donnant lieu à un complexe extrêmement stable thermodynamiquement et inerte cinétiquement.^[11,12]

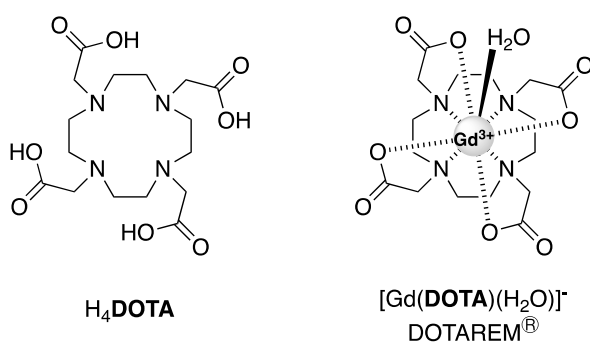


Figure 2 : Représentations du $H_4\mathbf{DOTA}$ (gauche) et du $[Gd(\mathbf{DOTA})(H_2O)]^-$ (DOTAREM[®]) (droite)

À l'opposé de l'IRM corps entier, l'imagerie nucléaire utilise des radioéléments d'intérêts demandant à être vectorisés pour imager spécifiquement les cellules tumorales. Dans le cas d'utilisation de radioéléments métalliques, les composés sont injectés sous la forme de radiopharmaceutiques, composés d'une unité de ciblage (tels que des anticorps ou des peptides) présentant une forte affinité pour les pathologies ciblées, reliée par un espaceur à un chélateur permettant la coordination robuste du cation [Figure 3].^[13]

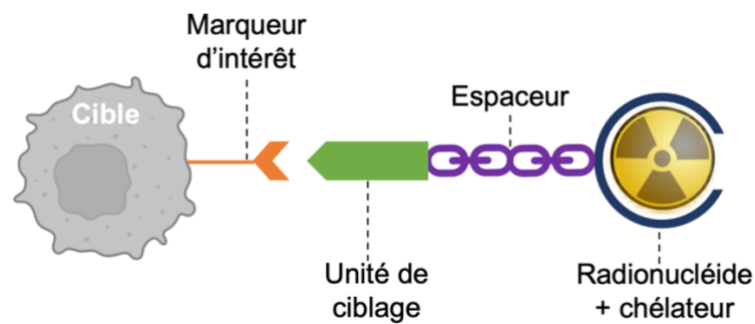


Figure 3 : Représentation schématique d'un radiopharmaceutique

Par exemple, l'imagerie des tumeurs neuroendocrines par imagerie TEMP est réalisée par l'Octreoscan[®], qui contient un chélateur linéaire porteur de fonctions acétate pour la coordination de l'indium-111, relié à un peptide analogue de la somatostatine (l'octreotide) [Figure 4, gauche].^[14] L'imagerie TEP présente une meilleure résolution ainsi qu'une meilleure sensibilité que l'imagerie TEMP, aussi, l'imagerie des tumeurs neuroendocrines peut également être réalisée par l'acquisition d'images TEP avec le radiopharmaceutique Somakit[®] [Figure 4, droite].^[15] Dans ce cas, le chélateur est un analogue du H₄DOTA, piégeant le gallium-68, et greffé sur l'octreotide pour le ciblage des tumeurs.

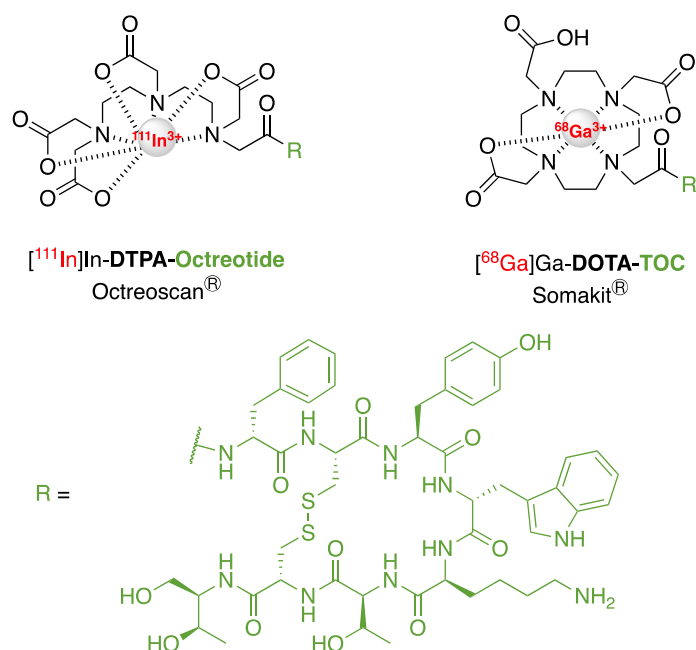


Figure 4 : Structures des radiopharmaceutiques $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-Octreotide}$ (Octreoscan[®]) et $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TOC}$ (Somakit[®])

Le ligand H_4DOTA , du fait de son approbation par les agences de régulation des médicaments est donc un ligand incontournable pour les cations trivalents (comme le gadolinium ou le gallium) pour différentes applications en imagerie IRM ou TEP. Néanmoins, les complexes formés avec des cations divalents (comme le cuivre (II)) sont moins inertes, conduisant à une dissociation *in vivo*.^[16] La coordination du cuivre pour des applications en imagerie est particulièrement intéressante compte tenu de l'émission β^+ générée par l'isotope cuivre-64 qui possède un temps de demi-vie de 12,7h et une énergie d'émission faible menant à une excellente résolution.^[13] Compte-tenu de ces propriétés très attractives, l'élaboration de chélateurs du cuivre (II) pouvant répondre au cahier des charges des applications en médecine nucléaire a concentré l'attention de nombreux groupes de recherche. Tout d'abord, la taille du cation cuivre (II) étant inférieure à celle des cations trivalents précités (Ga^{3+} et Gd^{3+}), d'autres plateformes macrocycliques d'intérêts ayant une cavité plus adaptée pour ce cation que celle du **cyclen** ont été ciblées. Les études réalisées notamment par R. D. Hancock et A. E. Martell mettent en évidence que le **cyclam** est plus approprié pour la complexation du cuivre (II) d'un point de vue tant thermodynamique que cinétique.^[17,18] Ainsi, la synthèse du H_4TETA , analogue du H_4DOTA basé sur une unité cyclam, a été réalisée en 1991 par E. T. Clarke et A. E. Martell en fonctionnalisant le macrocycle avec quatre groupements acétate.^[19] Cependant le complexe $[\text{Cu}(\text{TETA})]^{2-}$ formé n'a pas montré de propriétés de stabilité thermodynamique et d'inertie cinétique meilleures que le complexe de **cyclam** non-fonctionnalisé, démontrant que si la *N*-fonctionnalisation du macrocycle était nécessaire

à une application, elle devait être maîtrisée tant dans la nature que dans le nombre de fonctions chélatantes.^[20,21]

Le groupe thématique « Macrocycle Azotés et Coordination » (MAC) de l'UMR CNRS 6521 CEMCA de Brest est spécialisé dans la synthèse de nouveaux chélates polyazamacrocycliques pour la coordination de différents métaux de transition, de métaux lourds et de lanthanides et s'intéresse particulièrement à la chélation du cuivre (II) notamment pour des applications en imagerie TEP avec le cuivre-64. En ce sens, l'équipe a publié en 2012 la synthèse du cyclam monopicolinate (**HTE1PA**), qui a montré d'excellentes propriétés de coordination du cuivre avec une stabilité thermodynamique élevée et une inertie cinétique adéquates à son utilisation *in vivo* [**Figure 5**, gauche].^[22] En collaboration avec l'équipe « Oncologie Nucléaire » du CRCI²NA (INSERM U1232) de Nantes, la version bifonctionnelle du **HTE1PA** [**Figure 5**, milieu], le **p-SCN-Bn-TE1PA**, obtenue au laboratoire par C-fonctionnalisation du macrocycle, a pu être conjuguée sur un anticorps (**9E7.4**) et a permis de visualiser les tumeurs du myélome multiple sur modèle murin [**Figure 5**, droite].^[23] Ce radiopharmaceutique s'est avéré nettement plus performant que son analogue présentant un dérivé conjugué du H₄**DOTA**, notamment grâce à une plus grande résistance au phénomène de transchélation *in vivo* en milieu hépatique.^[24] Cette preuve de concept a permis d'envisager la bioconjugaison du ligand **TE1PA** C-fonctionnel sur diverses biomolécules (anticorps, peptides) ou encore sur des molécules organiques d'intérêts dans le cadre de l'imagerie TEP au cuivre-64 de différentes pathologies.

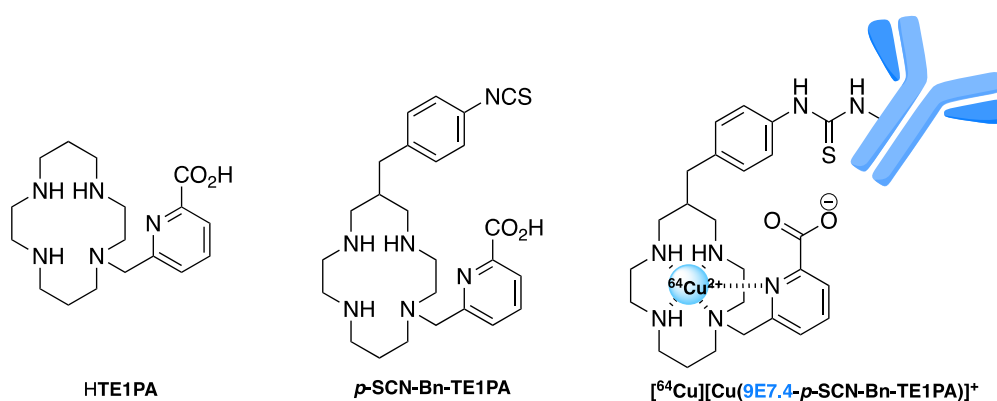


Figure 5 : Structures du ligand **HTE1PA** (gauche), **p-SCN-Bn-TE1PA** (milieu) et du radiopharmaceutique [⁶⁴Cu][Cu-**9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA**] (droite)

Le ciblage des cellules cancéreuses repose sur leur nature anormale pouvant conduire à des niveaux d'expression des marqueurs biologiques altérés. Plus particulièrement, certains récepteurs cellulaires peuvent se retrouver surexprimés, comme le récepteur de chimiokine CXCR4 qui présente une expression intensifiée dans au moins 23 types de cancers.^[25,26] Ce

récepteur, avec son unique ligand naturel la chimiokine CXCL12, joue un rôle clé dans la croissance tumorale, en faisant donc une cible d'intérêt.^[27] De nombreux antagonistes synthétiques peuvent se fixer sur CXCR4 et bloquer l'interaction avec CXCL12, pouvant ainsi être mis à profit soit comme traitement thérapeutique direct, soit par couplage à une sonde d'imagerie, de cartographier l'expression du récepteur au sein de l'organisme.

Ces antagonistes de CXCR4 peuvent être des biomolécules comme des peptides (**T140**)^[28] ou des anticorps (**Ulocuplumab**)^[29], qui sont très performants, mais dont la synthèse et le stockage présentent des difficultés et un coût important. En revanche, des petites molécules organiques synthétiques (**AMD3100** et **AMD070** par exemple)^[30,31] ont également démontré des propriétés d'inhibition remarquables et leur utilisation s'est ainsi présentée comme une alternative intéressante aux biomolécules [Figure 6].

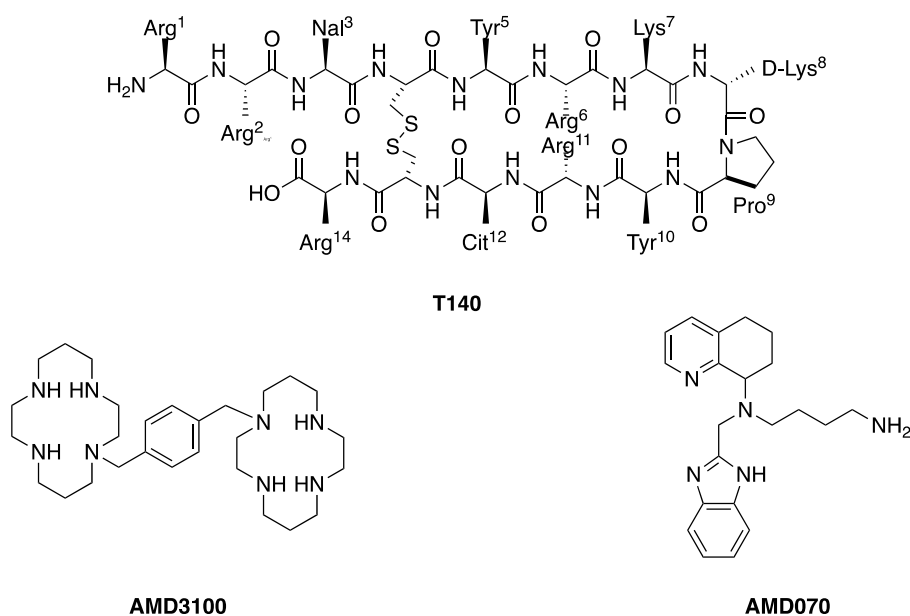


Figure 6 : Structures des antagonistes de CXCR4, le peptide **T140** et les molécules organiques **AMD3100** et **AMD070**

Ainsi, les travaux entrepris au cours de cette thèse de doctorat visent à développer de nouveaux radiopharmaceutiques pour l'imagerie TEP au cuivre-64 en ciblant le récepteur de chimiokine CXCR4.

Dans un premier temps, ce manuscrit présentera les propriétés de coordination du cuivre (II) et l'état de l'art en matière de design et de synthèse de ligands à forte affinité pour ce cation d'intérêt. Les différents chélateurs, en particulier macrocycliques, développés pour former des complexes stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement seront présentés en portant l'accent sur ceux permettant une utilisation dans des applications médicales. Une attention particulière sera aussi portée sur les diverses stratégies de bioconjugaison existantes

sur molécules vectrices et couramment employées pour le greffage des chélateurs, notamment pour des applications en imagerie TEP ciblée. Enfin, le portrait du récepteur de chimiokine CXCR4 sera dressé afin de mieux comprendre son implication dans les pathologies.

Le premier objectif de ces travaux était de développer un nouveau radiopharmaceutique totalement synthétique ciblant le récepteur CXCR4. Dans ce but, nous avons souhaité combiner deux briques moléculaires connues, citées précédemment : l'**AMD070** en tant que vecteur et le **p-SCN-Bn-TE1PA** comme chélateur bifonctionnel du cuivre. En parallèle, nous avons retenu un analogue de l'**AMD070** qui a présenté défi de le rendre bifonctionnel pour pouvoir le conjuguer au chélatant [Figure 7]. Le chapitre 2 présentera ainsi, tant la synthèse du **p-SCN-Bn-TE1PA** que celles de l'**AMD070** et de son analogue bifonctionnel que nous avons optimisées. Suite au couplage des entités ciblantes et chélatantes, les études de radiomarquage au cuivre-64 pour la conception du nouveau radiopharmaceutique potentiel seront entreprises. Cette seconde partie des travaux a été réalisée en collaboration avec l'équipe « Oncologie nucléaire » du CRCI²NA de Nantes du Professeur Michel Chérel où j'ai pu séjourner pour participer aux manipulations.

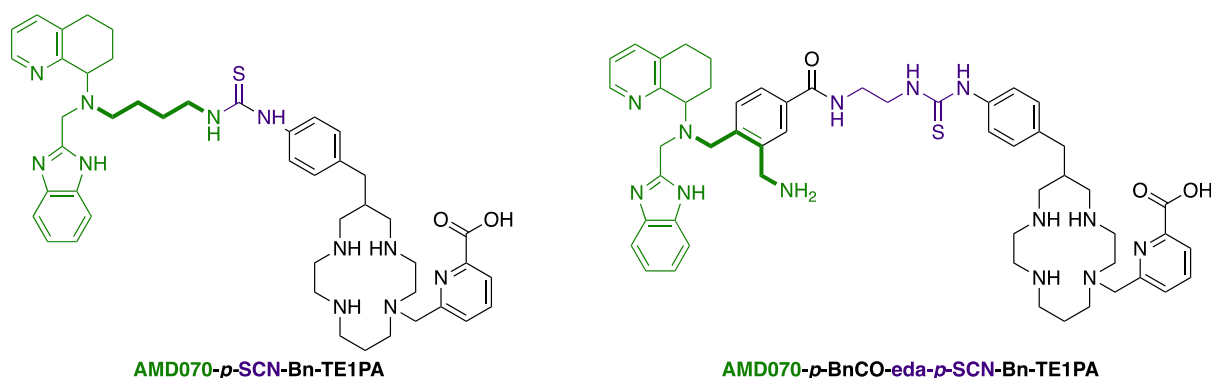
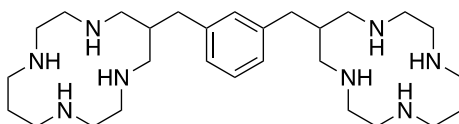


Figure 7 : Structures des molécules ciblées du deuxième chapitre

En parallèle, nous nous sommes intéressés au développement de nouveaux antagonistes du récepteur CXCR4, pouvant être utilisés en imagerie TEP vectorisée au cuivre-64. La famille des **bis-cyclam**, dont fait partie l'**AMD3100**, présentant une très forte affinité pour le récepteur induisant son inhibition, nous avons souhaité mettre à profit le savoir-faire du laboratoire pour la synthèse de **cyclam** fonctionnels pour développer une nouvelle classe d'antagonistes. Le troisième chapitre de ce manuscrit traitera donc de l'élaboration d'un nouveau **bis-cyclam** C-fonctionnel pour étudier ses propriétés d'inhibition de CXCR4 [Figure 8], avec l'objectif de libérer toutes les amines secondaires de chaque unité **cyclam** pour permettre une meilleure reconnaissance. Pour augmenter nos chances de réussite, les stratégies de synthèse

envisagées s'appuieront sur les récentes avancées du laboratoire en termes de C-fonctionnalisation du **cyclam** ainsi que sur des voies rapportées dans la littérature.^[32] Les études de reconnaissance du composé bis-macrocyclique ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Professeur Dominique Schols de l'Université de Leuven en Belgique avec qui nous avons débuté une collaboration grâce à ces travaux.



***m*-xylyl-bis-C-cyclam**

Figure 8 : Structure du nouveau bis-cyclam C-fonctionnalisé étudié dans le troisième chapitre

Enfin, nous nous sommes également intéressés à la partie chélatrice de ces radiopharmaceutiques. En effet, le développement de nouveaux chélateurs du cuivre reste d'un grand intérêt compte tenu du développement de l'imagerie TEP au cuivre-64 et de la production du cuivre-67 pour des applications en thérapie. Même si de nombreux ligands ont été étudiés dans la littérature, peu répondent totalement au cahier des charge des applications *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à des fonctions coordinantes dérivées du phosphore, les fonctions oxyde de phosphine. En effet, ces dernières ont déjà été étudiées pour la formation de complexes du cuivre (II) et ont démontré une certaine affinité pour ce cation. De plus, l'interaction de ce groupement avec les autres métaux est moindre ce qui peut permettre de gagner en sélectivité vis-à-vis d'autres cations.

Ainsi, nous proposons dans le dernier chapitre de synthétiser une nouvelle famille de dérivés de **cyclam**, porteurs de fonctions oxyde de phosphine pour la coordination du cuivre (II) et de ses radioisotopes. Pour ce faire, la synthèse des ligands met en œuvre les méthodes développées dans la littérature pour les mono- ou di-*N*-fonctionnalisations de la plateforme macrocyclique [**Figure 9**]. L'évaluation des propriétés de coordination de ces nouveaux ligands sera étudiée par différentes techniques tant en solution qu'à l'état solide. Enfin une investigation préliminaire de radiomarquage au cuivre-64 sera entreprise.

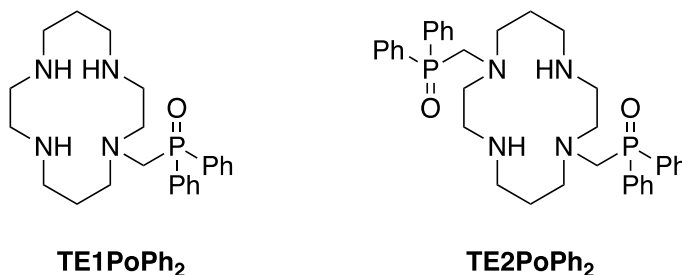


Figure 9 : Structures des ligands **TE1PoPh₂** et **TE2PoPh₂** étudiés dans le quatrième chapitre

CHAPITRE 1

Les polyazamacrocycles et leurs complexes de
cuivre pour des applications en médecine
nucléaire

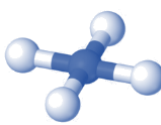
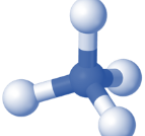
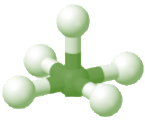
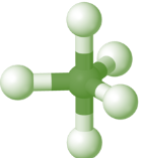

I. Propriétés de coordination du cuivre

Le cuivre est un métal de transition faisant partie de la 4^{ème} période et du 11^{ème} groupe du tableau périodique, il se caractérise par son numéro atomique de 29 et par une configuration électronique de type $[Ar] 3d^{10}4s^1$ (exception à la règle de Klechkowski). La sous couche d se trouvant incomplète, le cuivre peut exister sous différents degrés d'oxydation allant de 0 à +III. En solution aqueuse, le cuivre est majoritairement retrouvé sous le degré +II.

1. Classification selon Pearson

La théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) établie en 1963 par R. G. Pearson indique que le cation Cu^{2+} de configuration $[Ar] 3d^9$ appartient à la classe des acides de Lewis intermédiaires. Toujours selon cette théorie, des complexes stables peuvent être formés avec des bases de Lewis intermédiaires (N, S, O).^[33] La géométrie adoptée par les complexes dépend directement de leur coordinence, c'est-à-dire, le nombre de ligands liés à l'atome central. Concernant le cuivre (II), le nombre de coordinence est généralement compris entre 4 et 6. Lorsque le nombre de coordinence est de 4, les géométries plan carré ou tétraédrique sont adoptées. Pour une coordinence de 5, deux géométries sont également retrouvées, la pyramide à base carrée et la bipyramide à base trigonale. Enfin, une coordinence complète de 6, conduit à une géométrie octaédrique. Chacune de ces géométries se caractérise par des angles de liaison $\widehat{LM\bar{L}}$ (L : ligand adjacent, M : métal) théoriques : pour les géométries plan carré, pyramide à base carrée et octaédrique cette angle vaut 90° ; pour la géométrie tétraédrique, une valeur de $109,5^\circ$ est observée. Pour finir, dans le cas d'une géométrie bipyramide à base trigonale, trois valeurs sont observées, à savoir 90° , 120° et 180° [Tableau 1].^[34]

Tableau 1 : Géométrie moléculaire des complexes de cuivre (II) en fonction de leur nombre de coordinence

Nombre de coordinence	4	4	5	5	6
Géométrie moléculaire					
	Plan carré	Tétraédrique	Pyramide à base carrée	Bipyramide à base trigonale	Bipyramide à base carrée (octaédrique)
Angle de liaison	90°	$109,5^\circ$	90°	$90^\circ, 120^\circ, 180^\circ$	90°

Selon la théorie du champ cristallin, la coordination de l'ion Cu (II) conduit à une déstabilisation des orbitales 3d. En effet, une molécule non linéaire ne peut-être stable dans un état électronique dégénéré, et elle doit se déformer de manière à briser sa dégénérescence : c'est la distorsion de Jahn-Teller.^[35] Dans le cas du cuivre, les orbitales d_{xz} et d_{yz} se retrouvent avec une énergie inférieure à celle de l'orbitale d_{xy} . La distorsion de Jahn-Teller entraîne une diminution de l'énergie électronique du complexe. De plus, une élongation des liaisons selon l'axe z est observée et induit une augmentation des longueurs de liaisons métal-ligand en position apicales [Figure 10].

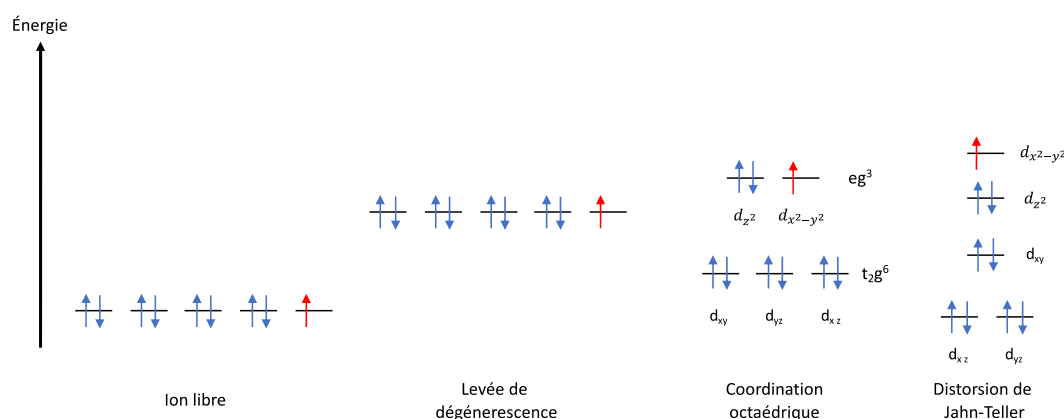


Figure 10 : Diagramme d'énergie d'un complexe de cuivre (II) de coordination 6 selon la théorie du champ cristallin

2. Caractérisation spectroscopique des complexes de cuivre (II)

2.1. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible permet d'étudier les transitions impliquées dans le réarrangement des électrons de valence après excitation de ces derniers par des photons. Les complexes formés avec les métaux de transitions sont généralement colorés. La coloration dépend directement de la nature de l'élément métallique, du degré d'oxydation du cation et du nombre d'électrons d du métal. La caractérisation d'un complexe par spectroscopie UV-visible peut être effectuée grâce à différentes transitions : (i) transitions avec un transfert de charge du ligand vers le métal et inversement, (ii) transitions entre niveaux localisés sur le métal. Les transitions de transfert de charge peuvent avoir lieu entre les orbitales moléculaires du cation métallique et de celles du ligand. Ces transitions conduisent à une signature spectroscopique particulière, avec une absorption importante provoquant un décalage de la longueur d'onde d'absorption maximale du ligand. Les transitions électroniques entre les sous couches d du cation métallique, sont interdites selon les règles de sélection de Laporte.^[36] Néanmoins, les

métaux de transition ayant une sous couche d incomplète (d^1 - d^9) peuvent présenter cette transition qui se traduit par une bande d'absorption large et mal définie caractéristique, entre 500 et 1000 nm.

L'énergie de ces transitions d-d est liée à la différence d'énergie entre les orbitales, qui dépend de la géométrie des complexes.^[37]

Ainsi, pour les complexes ayant un nombre de coordinence de 4, deux signatures spectroscopiques sont possibles, une comprise entre 500 et 555 nm pour la géométrie plan carré, et la seconde est retrouvée dans l'intervalle 625-800 nm pour la géométrie tétraédrique. La géométrie pyramidale à base carrée recouvre une grande partie du spectre en s'étendant de 600 à 1000 nm. Les valeurs allant de 700 à 850 nm sont attribuées à la géométrie bipyramidale trigonale. Enfin, la géométrie octaédrique donne une signature comprise entre 700 et 850 nm, tandis qu'après distorsion de Jahn-Teller, la géométrie octaédrique déformée est comprise entre 500 et 700 nm **[Figure 11]**.^[38]

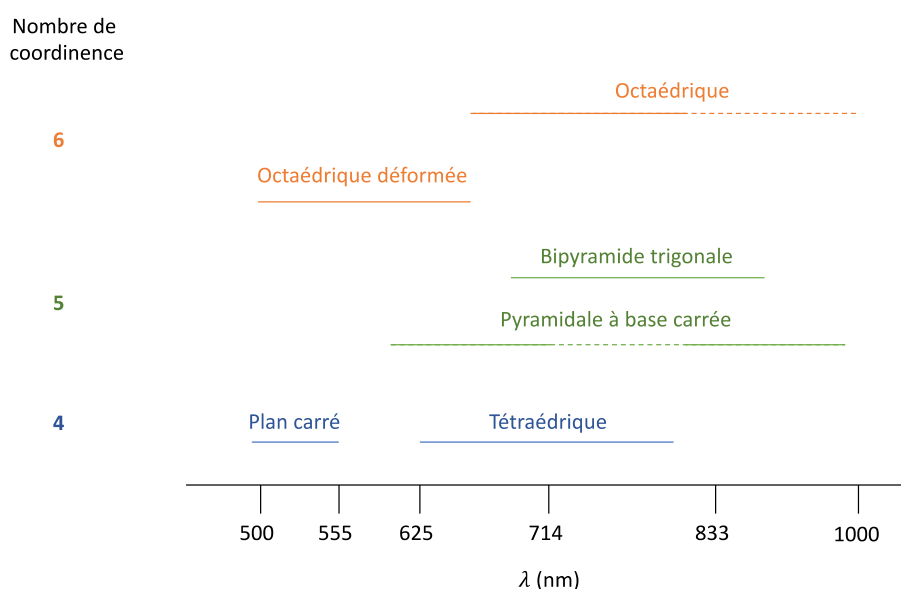


Figure 11 : Corrélation entre la longueur d'onde des transitions d-d et la géométrie des complexes de cuivre (II)

L'analyse par spectroscopie UV-visible permet d'extraire des données caractéristiques d'un système étudié d'après la relation de Beer-Lambert **[Équation 1]**.

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times l \times c$$

Équation 1 : Relation de Beer-Lambert

D'après cette relation, l'absorbance (A) d'un échantillon à une longueur d'onde (λ en nm) donnée dépend directement de sa concentration (c en mol.L⁻¹), de son coefficient d'absorption molaire (ε en L.mol⁻¹.cm⁻¹) à cette même longueur d'onde ainsi que le trajet optique parcouru (l en cm).^[39]

2.2. Résonance Paramagnétique Électronique (RPE)

La RPE repose sur la propriété qu'ont les électrons célibataires placés dans un champ magnétique à absorber l'énergie d'un rayonnement électromagnétique puis de la réémettre. Après application d'un champ magnétique extérieur, les niveaux d'énergie d'un spin (S) se séparent en $(2S + 1)$ états, caractérisés par un nombre quantique de spin m_s . L'écart entre les niveaux d'énergie dépend directement du champ appliqué comme le montre l'expression pour le calcul de ΔE détaillé ci-après. Dans le cas d'un ion paramagnétique ayant un seul électron célibataire ($S = 1/2$), la présence d'un champ extérieur conduit à $(2S + 1) = 2$ états avec un nombre quantique de spin de $\pm 1/2$ [Figure 12].^[40]

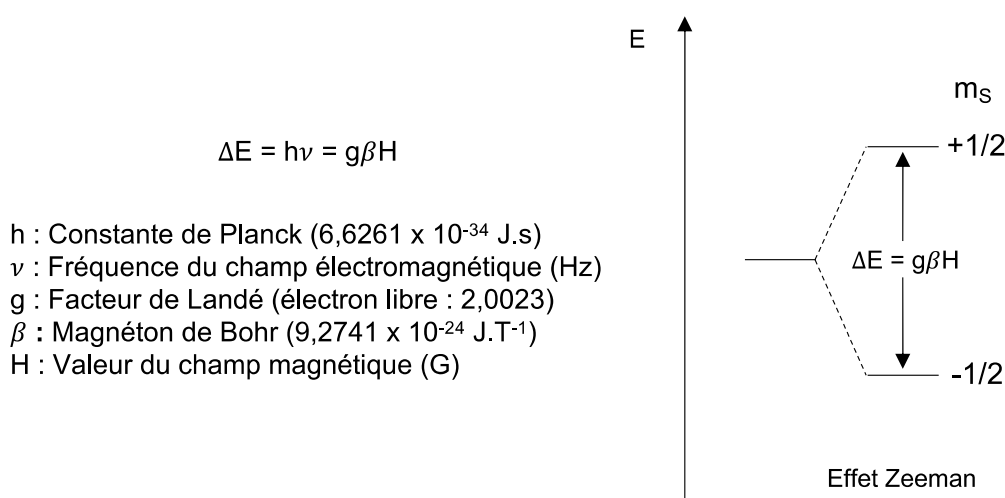


Figure 12 : Expression de l'écart des niveaux d'énergie d'un spin (ΔE) après l'application d'un champ magnétique extérieur (gauche). Effet Zeeman pour une espèce de spin $S = 1/2$. Les sous-niveaux de spin $m_s = \pm 1/2$ se divisent en fonction de l'intensité du champ magnétique

L'acquisition des données permettant d'obtenir le spectre RPE se fait selon une valeur fixe de fréquence de l'onde électromagnétique (ex : bande X, $\nu = 9388,2$ MHz), mais en faisant varier le champ magnétique (H) exercé sur l'échantillon. Ainsi, le spectre montre l'absorbance de l'échantillon en fonction du champ magnétique et son traitement permet de déterminer le facteur de Landé g , caractérisé par trois composantes dépendantes des 3 directions de l'espace, g_x , g_y et g_z . L'environnement des électrons célibataires peut également donner lieu à des interactions hyperfines. En effet, la présence d'un noyau de spin nucléaire (I) non nul conduit à une interaction entre le spin électronique et le spin nucléaire. Cela se traduit par un couplage hyperfin caractérisé par une multiplicité du signal égale à $2I + 1$. Comme dans le cas du facteur de Landé, la constante de couplage hyperfin A est caractérisée par trois composantes dépendantes des directions de l'espace, à savoir A_x , A_y et A_z . À partir d'un spectre RPE, les différentes valeurs des paramètres A et g permettent ainsi d'obtenir des informations sur la géométrie du système étudié.^[40,41]

Tableau 2 : Corrélation entre les valeurs de g et A obtenues en analyse RPE et la symétrie des systèmes étudiés

Système	Paramètre g	Paramètre A
Rhombique	$g_x \neq g_y \neq g_z$	$A_x \neq A_y \neq A_z$
Axial	$g_x = g_y \neq g_z$	$A_x = A_y \neq A_z$
Isotrope	$g_x = g_y = g_z$	$A_x = A_y = A_z$

Comme le montre le **Tableau 2** lorsqu'une molécule ne possède pas d'axe de symétrie, les trois valeurs de g sont différentes et la matrice est dite rhombique. Lorsqu'un axe de symétrie est présent, le plus souvent selon l'axe z , les valeurs g_x et g_y sont égales (g_{\perp}) et sont orthogonales à g_z (g_{\parallel}), le système est dit axial. Pour finir, lorsque la molécule possède 3 directions équivalentes, les 3 valeurs de g vont être égales et le système est isotrope.

L'ion cuivre (II) possède un seul électron célibataire, et la présence d'un champ externe donne ainsi lieu à deux niveaux d'énergie avec pour nombre quantique $m_S = -1/2$ et $m_S = +1/2$.^[42]

De plus, le cuivre (II) possède deux isotopes naturels stables, le ^{63}Cu et le ^{65}Cu (abondance naturelle de 69 et 31% respectivement) qui ont un spin nucléaire I de $3/2$, donnant lieu à un motif caractéristique de quatre raies dues aux interactions hyperfines. Dans le cas d'une symétrie axiale (selon l'axe z) telle que la pyramide à base carrée ou l'octaèdre déformé, le spectre RPE attendu pour un complexe de cuivre (II) doit présenter 4 raies espacées entre elles de la valeur de A_{\parallel} (A_z) ou A_{\perp} ($A_x = A_y$). En pratique, lorsque des complexes présentent une symétrie axiale, la valeur de A_{\parallel} est nettement supérieure à celle de A_{\perp} , rendant cette dernière négligeable sur le spectre obtenu. L'allure du spectre attendu pour un complexe de cuivre (II) est représentée ci-après **[Figure 13]**.^[40]

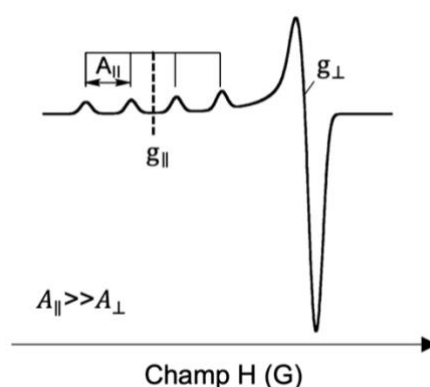
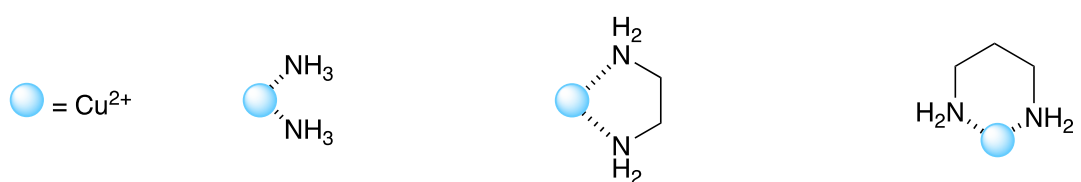


Figure 13 : Allure du spectre RPE attendu pour un complexe de cuivre (II) possédant une symétrie axiale

3. Influence des ligands macrocycliques sur la coordination du cuivre (II)

L'environnement de coordination du cuivre (II) influence les propriétés physico-chimiques des complexes. En effet, les complexes formés avec des ligands multidentates sont thermodynamiquement plus stables que ceux formés avec les monodentates avec le même nombre d'atomes coordinants. Ceci s'explique par l'effet chélate, étant un effet de stabilisation thermodynamique des complexes. Les ligands multidentates permettent une préorganisation qui augmente la stabilité thermodynamique du système en formant des métallacycles dans la sphère de coordination du métal.

Tableau 3 : Constantes de formation de complexes de cuivre (II) en fonction de la denticité du ligand



The diagram illustrates the coordination of a copper(II) ion (represented by a blue sphere) with three different ligands: ammonia (NH₃), ethylenediamine, and propylenediamine. The ammonia ligand is shown as a blue sphere coordinated to two NH₃ groups. The ethylenediamine ligand is shown as a blue sphere coordinated to two nitrogen atoms of an ethylenediamine molecule. The propylenediamine ligand is shown as a blue sphere coordinated to two nitrogen atoms of a propylenediamine molecule.

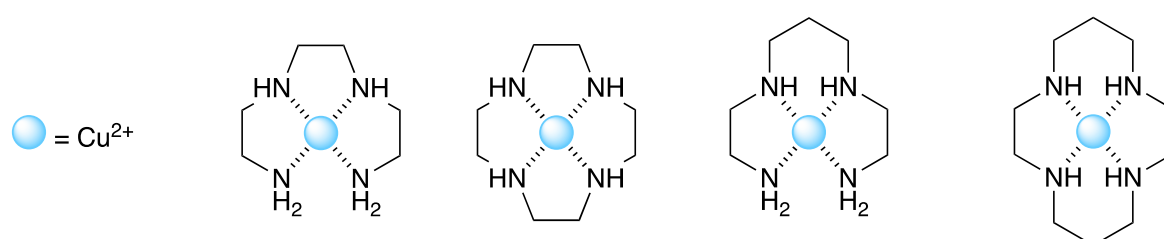
Ligand	NH ₃	Éthylènediamine	Propylènediamine
Denticité	Monodentate	Bidentate (5 chaînons)	Bidentate (6 chaînons)
log K _{CuL}	7,6	10,5	9,8

Le **Tableau 3** indique les différentes constantes de formations (log K_{CuL}) du cuivre (II) en fonction de différents ligands. L'effet chélate est bien mis en valeur par l'affinité plus élevée du cuivre (II) avec un ligand bidentate comme l'éthylènediamine contre deux ligands monodentates de type -NH₃ (log K_{CuL} = 10,5 et 7,6 respectivement). En 1988, R. D. Hancock et A. E. Martell ont attribué ce gain de stabilité à une contribution entropique, la présence d'un ligand bidentate réduisant le désordre présent sur le complexe comparé à un complexe avec deux ligands monodentates.^[43] En revanche, pour deux ligands bidentates comme l'éthylènediamine et la propylènediamine, une baisse d'affinité est observée avec des log K_{CuL} de 10,5 et 9,8 respectivement.

La combinaison de l'effet chélate avec un second effet stabilisateur permet d'obtenir des ligands avec une grande affinité pour le cuivre (II). Ce second effet est connu sous le nom d'effet macrocyclique. Pour le même nombre d'atomes coordinants, le complexe formé sera plus stable thermodynamiquement avec un ligand macrocyclique qu'avec son analogue linéaire. Par exemple, la comparaison d'affinité entre la tétraamine linéaire **222** et le **cyclen** révèle un gain en affinité avec le cuivre (II) grâce à l'effet macrocyclique (log K_{CuL} = 20,1 et 23,3 respectivement). Le même constat est réalisé entre la tétraamine linéaire **232** et son analogue macrocyclique (**cyclam**) avec des valeurs de log K_{CuL} de 23,2 et 26,5 respectivement

[Tableau 4].^[9,43] D'après les principes de la thermodynamique, les réactions sont spontanées lorsque le changement d'énergie libre de Gibbs (ΔG), d'après la relation $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, est négatif ; ceci est vrai lorsque la variation d'enthalpie est négative ($\Delta H < 0$) et/ou lorsque la variation de l'entropie est positive ($\Delta S > 0$).^[44] R. D. Hancock et A. E. Martell se sont intéressés à cet effet macrocyclique en comparant l'enthalpie de formation (ΔH) du complexe de cuivre (II) avec la tétramine **232** et le **cyclam** qui ont pour valeur -27,7 et -32,4 kcal.mol⁻¹ respectivement.^[43] La valeur plus négative pour le **cyclam** témoigne d'un gain de stabilité. D'après ces valeurs, contrairement à l'effet chélate, la contribution induisant ce gain d'affinité par l'effet macrocyclique est attribuée à une contribution enthalpique.

Tableau 4 : Constantes de formation de complexes de cuivre (II) en fonction de la nature du ligand tétradentate^[37,38]



Ligand	222	cyclen	232	cyclam
log K_{CuL}	20,1	23,3	23,2	26,5

Les composés **cyclen** et **cyclam** qui présentent une interaction forte avec le cuivre (II) sont composés de cycles à 5 et 6 chaînons **[Figure 14]**.

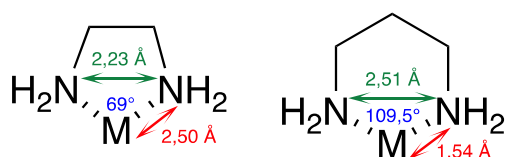


Figure 14 : Caractéristiques géométriques idéales des métallacycles à 5 et 6 chaînons^[45]

Les métallacycles à 5 chaînons se caractérisent par une longueur de liaison entre l'atome donneur et le cation de 2,50 Å, la distance séparant les deux atomes donneurs est de 2,23 Å, ce qui conduit à un angle \widehat{NMN} de 69°. Au contraire, les métallacycles à 6 chaînons ont une distance entre les deux atomes donneurs ainsi qu'un angle \widehat{NMN} plus importants (2,51 Å et 109,5° respectivement). En revanche, la distance entre le cation et l'atome donneur est plus courte (1,54 Å).^[45] Ainsi, un petit ion métallique sera plus stable s'il est coordonné dans un cycle à 6 chaînons et adoptera une conformation chaise tandis qu'un ion de taille importante sera déstabilisé et préférera les cycles à 5 chaînons.^[43]

Le **cyclam** présente une meilleure affinité pour le cuivre (II) que le **cyclen** grâce aux métallacycles à 5 et 6 chaînons, se traduisant par une constante de formation élevée de 27,2. Ces deux ligands appartiennent à la famille des polyazamacrocycles et présentent une bonne affinité avec le cuivre (II). Il est donc pertinent de s'intéresser aux propriétés physico-chimiques des composés azamacrocycliques.

II. Propriétés physico-chimiques des polyazamacrocycles

Les dérivés polyazamacrocycliques sont des molécules cycliques contenant des fonctions amine séparées par des chaînes carbonées de deux atomes de carbone au minimum. Parmi cette famille de composés, les plus étudiés sont le **tacn**, le **cyclen** et le **cyclam** représentés ci-dessous [Figure 15].

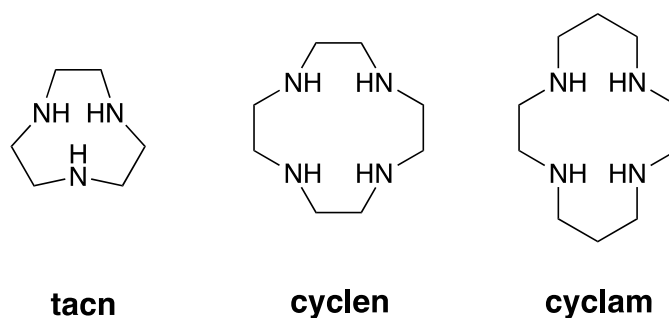


Figure 15 : Représentation du tacn, cyclen et cyclam

Les atomes d'azote présents dans les structures polyazamacrocycliques sont de nature intermédiaire selon la théorie HSAB de Pearson, ce qui leur permet de coordonner différents cations, dont le cuivre. De plus, la combinaison des deux effets stabilisateurs chélate et macrocyclique présentés auparavant font des polyazamacrocycles d'excellents candidats pour la coordination du cuivre (II).

1. Propriétés acide-base

Le **tacn**, le **cyclen** et le **cyclam** sont des bases de Lewis de par la nature des amines qui les composent. Les protonations successives d'un ligand sont décrites par les constantes d'équilibre des réactions de protonation K_n et la constante de protonation globale β_n permet également de décrire le système [Tableau 5].

Tableau 5 : Réactions d'équilibre de protonation et calculs des constantes de protonation associées

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

^a Les charges sont omises pour plus de clarté.

En pratique, les grandeurs utilisées pour décrire un système sont les constantes de protonation successives $\log K_n$ qui correspondent aux potentiels d'acidité de chaque fonction (pK_{a_n}). Plus la valeur de la constante $\log K_n$ est faible, plus la protonation est difficile ce qui témoigne d'une amine au caractère moins basique.

Les constantes de protonation des polyazamacrocycles **tacn**, **cyclen** et **cyclam** ont été déterminées par étude potentiométrique et sont référencées dans le **Tableau 6**. La première protonation a lieu sur le même type d'amine secondaire pour les trois macrocycles et se traduit par une valeur similaire de leur $\log K_1$, proche de 11.^[46]

En revanche, le **tacn** ayant une cavité macrocyclique plus étroite que celles du **cyclen** et du **cyclam**, les répulsions électrostatiques rendent plus difficile la seconde protonation, expliquant la différence importante entre les valeurs de $\log K_2$, de 6,7 pour le **tacn** et 9,9 et 10,6 pour le **cyclen** et le **cyclam** respectivement.^[46] Pour ces mêmes raisons de répulsions électrostatiques, la troisième protonation est difficile dans le cas des trois macrocycles, ce qui résulte en des valeurs de $\log K_3$ faibles, autour de 2, à la limite de la fenêtre de mesure permise par les techniques de potentiométrie usuelles.

Enfin, la cavité du **cyclam** est plus grande que celle du **cyclen** avec la succession de ponts propylène et éthylène entre les fonctions amines. La répulsion entre les groupements ammonium générés par les protonations successives s'en trouve minimisée dans le cas du **cyclam** d'où une plus forte constante de basicité globale $\log \beta_4$ (26,2 contre 22,9 pour le **cyclen**).^[46]

Tableau 6 : Constantes de protonation du **tacn**, du **cyclen** et du **cyclam**^[46]

	tacn ^a	cyclen ^b	cyclam ^b
log K ₁	10,7	11,0	11,6
log K ₂	6,7	9,9	10,6
log K ₃	2,1	<2	1,61
log K ₄	-	-	2,41
log β	19,5	22,9	26,2

^aI = 0,1 M KNO₃, 25 °C, ^bI = 0,5M KNO₃, 25 °C

Tout comme les ligands polyazamacrocycliques, le cuivre (II) peut également former différentes espèces en solution en fonction du pH. En milieu aqueux, le cuivre (II) peut former des complexes avec des groupements hydroxydes et cela à partir d'un pH aux alentours de 6 pour l'espèce [Cu(OH)]⁺, comme le montre le diagramme de spéciation du cuivre [Figure 16]. Lors de réaction de complexation, il est donc primordial de tenir compte du pH du milieu réactionnel pour s'affranchir de la formation d'espèces hydroxydées.^[47]

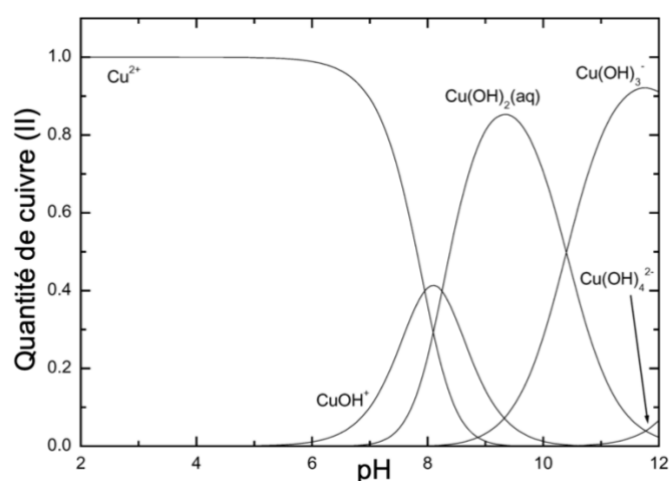


Figure 16 : Diagramme de spéciation du cuivre (II) en fonction du pH à 25 °C^[47]

2. Propriétés thermodynamiques

Pour déterminer l'affinité d'un ligand pour un cation d'un point de vue thermodynamique, la constante de formation log K_{ML} qui correspond à l'équilibre (A) doit être déterminée. Plusieurs équilibres peuvent alors exister et être pris en considération, comme dans le cas général représenté dans le **Tableau 7** d'un ligand formant un complexe puis pouvant se protoner. Plus la valeur de log K_{ML} est élevée, plus l'interaction métal/ligand est forte.

Tableau 7 : Réactions d'équilibre de protonation et calculs des constantes de formation associées

Équilibres	Constantes
$(A) \quad M + L \xrightleftharpoons{K_{ML}} ML$	$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]}$
$ML + nH \xrightleftharpoons{K_{MLH_n}} MLH_n$	$K_{MLH_n} = \frac{[MLH_n]}{[ML][H]^n}$
$lL + hH + mM \xrightleftharpoons{\beta_{mlh}} M_mL_lH_h$	$\beta_{mlh} = \frac{[M_mL_lH_h]}{[M]^m[L]^l[H]^h}$

L'étude des constantes de formation des complexes de cuivre (II) avec le **tacn**, le **cyclen** et le **cyclam** révèle une meilleure affinité du cuivre (II) pour le **cyclam**. En effet, le $\log K_{CuL}$ est de 26,5 avec le **cyclam** contre 15,5 et 23,3 avec le **tacn** et le **cyclen** respectivement [Tableau 8].^[9]

Tableau 8 : Constantes de formation de complexes de cuivre (II) avec le **tacn**, le **cyclen** et le **cyclam**

	tacn	cyclen	cyclam
$\log K_{CuL}$ ^[9]	15,5 ^a	23,3 ^b	26,5 ^b
pCu ^[22]	-	18,0 ^c	21,4 ^c

^a $I = 0,1 \text{ M KNO}_3, 25 \text{ }^\circ\text{C}$, ^b $I = 0,5 \text{ M HNO}_3/\text{NaNO}_3, 25 \text{ }^\circ\text{C}$, ^c $pH = 7,4 [L] = 2[Cu^{2+}]_{tot} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Même si la valeur de $\log K_{ML}$ permet de comparer des ligands entre eux d'un point de vue théorique, cette grandeur ne tient pas compte des propriétés acide-base des ligands et du métal, qui peuvent intervenir dans les réactions d'équilibre selon le pH. C'est pourquoi la constante pM a été introduite. Cette valeur est particulièrement utile dans le contexte d'applications biologiques, pour comparer le comportement de différents chélateurs à pH physiologique. Elle est directement liée à la concentration de métal libre en solution dans des conditions données, et s'exprime selon la formule suivante : $pM = -\log [M^{n+}]_{libre}$ à pH fixe (7,4) en présence d'excès de ligand ($[L] = 2[Cu^{2+}]_{tot} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$).^[48] Plus la concentration en métal libre est faible, plus le pM est élevé, ce qui met en valeur une grande affinité du ligand envers le métal. Ainsi, le **cyclam** est le macrocycle avec lequel le cuivre (II) forme un complexe présentant la meilleure stabilité dans ces conditions avec un pM de 21,4 contre 18,0 pour le **cyclen**.^[22]

3. Propriétés cinétiques

3.1. Cinétique de complexation

La cinétique de complexation définit la vitesse à laquelle le complexe va se former dans des conditions données. Cette vitesse dépend directement de la nature du ligand. En effet, à structure comparable, un ligand linéaire sera par exemple plus flexible que son analogue macrocyclique et pourra donc coordonner plus rapidement un cation métallique. De plus, en milieu aqueux (pH physiologique ou légèrement acide), les polyazamacrocycles ont certaines de leurs amines protonées, freinant l'étape de coordination et induisant ainsi un mécanisme de complexation en différentes étapes. Aussi, la présence de groupements coordinants additionnels sur un macrocycle permet, dans certains cas et dans un premier temps, de former un complexe externe ; on parle de « complexe cinétique » (situé en dehors de la cavité macrocyclique). Dans un second temps, l'insertion du cation au sein de la cavité macrocyclique permet de former le complexe thermodynamique. Cette étape est cependant lente, car il est nécessaire de déplacer des protons présents sur les fonctions amine du macrocycle.

Tableau 9 : Données cinétiques de formation des complexes de cuivre (II) avec le **cyclen** et le **cyclam**, à 25 °C^[49]

	[Cu(cyclen)] ²⁺	[Cu(cyclam)] ²⁺
k_{LHCu} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	2,9.10 ⁶	1,8.10 ⁶

La cavité macrocyclique du **cyclen** est plus large permettant ainsi au cation cuivre (II) de s'y insérer de façon plus aisée comme en témoigne la valeur de constante de vitesse k_{LHCu} de 2,9.10⁶ M⁻¹.s⁻¹ contre 1,8.10⁶ M⁻¹.s⁻¹ pour le **cyclam** [Tableau 9].^[49]

3.2. Cinétique de dissociation

L'étude de l'inertie des complexes métalliques est fondamentale pour anticiper leur comportement selon le milieu dans lequel ils seront utilisés. La cinétique de dissociation des complexes est ainsi un paramètre à prendre en compte et à étudier en amont de toute application. Deux phénomènes particuliers, dues à des compétitions externes, peuvent donner lieu à la dissociation d'un complexe : la transmétallation et la transchélation.

La transmétallation correspond à l'échange du cation métallique du complexe par un autre métal, libérant ainsi le cation initial [Figure 17 A)]. La transchélation, implique un second ligand, qui présente une meilleure affinité pour le cation que celui du complexe, formant alors un nouveau chélate en laissant le ligand initial libre [Figure 17 B)]. Lors d'applications biomédicales, le milieu biologique peut conduire à ces deux phénomènes notamment avec la présence de métaux endogènes ainsi que de protéines et enzymes pouvant jouer le rôle de ligand.

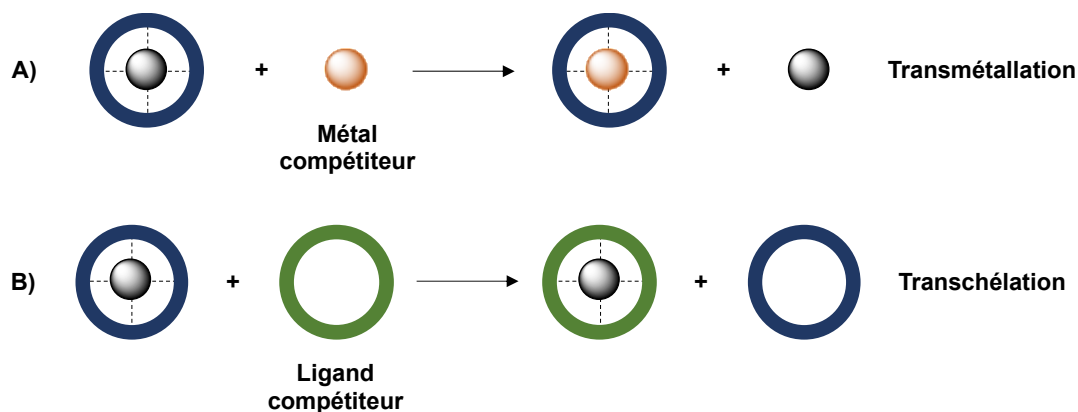


Figure 17 : Phénomènes de dissociation des complexes métalliques (A) Transmétallation (B) Transchélation

Pour évaluer cette cinétique de dissociation et mettre en évidence une éventuelle instabilité, des études de dissociation en milieu acide sont très souvent mises en œuvre dans la littérature.^[21] L'idée n'est pas de modéliser un éventuel milieu biologique acide, mais d'étudier le comportement du complexe en milieu extrêmement compétiteur et d'avoir un moyen de comparaison avec d'autres chélates de la littérature. Le cation compétiteur est ainsi le proton (H^+) qui est susceptible de protoner les amines présentes sur le macrocyle et d'ainsi affaiblir la coordination du métal, donnant lieu à la dissociation du complexe. D'un point de vue expérimental, ces manipulations sont simples à exécuter pour les complexes de cuivre (II). En effet, grâce à leurs propriétés spectroscopiques, il est possible de suivre, par spectroscopie UV-Vis, la décroissance de la bande d-d caractéristique du complexe au cours du temps [Figure 18].

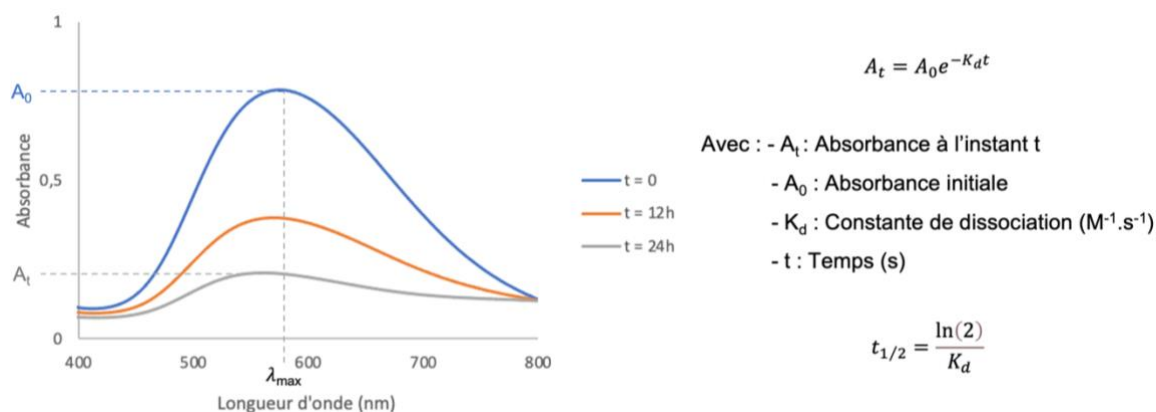


Figure 18 : Exemple de spectres UV-visible obtenus lors d'une dissociation en milieu acide (gauche). Cinétique de dissociation des complexes de pseudo-ordre 1 transposée à la loi de Beer-Lambert (droite)

La dissociation en milieu acide suit une réaction de pseudo ordre 1 en présence d'un large excès de protons. Elle est en général réalisée avec HCl et/ou HClO₄ pour évaluer aussi l'effet du contre anion.^[50] Ainsi, la loi de Beer-Lambert a pu être adaptée pour déterminer la constante de dissociation K_d du complexe [Figure 18, droite]. Cette constante permet de remonter au temps de demi-vie ($t_{1/2}$) du complexe, c'est-à-dire le temps nécessaire pour observer 50% de sa dissociation.

Plus le $t_{1/2}$ d'un complexe est élevé, plus son K_d sera faible ce qui indique une inertie plus importante d'un point de vue cinétique. Le **Tableau 10** rend compte des temps de demi-vie des complexes de cuivre (II) en milieu acide, HClO₄ (5 M) et HCl (5 M) avec le **cyclen** et le **cyclam** respectivement. Le complexe de cuivre formé avec le **cyclam** ([Cu(**cyclam**)]²⁺) démontre la meilleure inertie en milieu compétiteur avec un $t_{1/2}$ de 2,7 jours.^[22,51]

Tableau 10 : Temps de demi-vie des complexes [Cu(**cyclen**)]²⁺ et [Cu(**cyclam**)]²⁺ en milieu acide^[22,51]

	[Cu(cyclen)] ²⁺	[Cu(cyclam)] ²⁺
$t_{1/2}$	54,2 min ^a	2,7 jours ^b

^a I = HClO₄ (5,0 M), [H⁺] = 1 M, T = 25 °C, ^b HCl (5M), T = 30 °C

Malgré une cinétique de complexation plus rapide, le complexe [Cu(**cyclen**)]²⁺ présente une faible inertie cinétique comparé à celui formé avec le **cyclam**. Or, pour des applications en milieu biologique, il est primordial d'avoir des complexes robustes, faisant du **cyclam** une plateforme plus adaptée pour la coordination du cuivre (II).

3.3. Influence du degré d'oxydation du cuivre sur les propriétés de coordination

Pour rappel, le cuivre peut exister sous trois différents degrés d'oxydation : +III, +II et +I. Cependant, le cuivre (III) est rarement retrouvé en solution. La nature des cations cuivre (II) et (I) diffère selon la théorie HSAB de Pearson. Pour un complexe hexacoordiné, le rayon ionique effectif est de 73 pm pour le cuivre (II), tandis que ce paramètre est plus élevé pour le cuivre (I), avec une valeur de 77 pm.^[52] Cette différence de charge et de rayon ionique confère un caractère d'acide de Lewis mou au cuivre (I), d'après la théorie HSAB de Pearson. Ainsi, le cuivre (I) présente une affinité plus importante pour des ligands de nature base molle, tels que les fonctions phosphine, thioéther ou encore thiol.

Le milieu biologique est composé de protéines et d'enzymes aux potentiels réducteurs compris entre -0,4 V et +0,4 V *in vivo*. Plus particulièrement, la superoxyde dismutase (SOD) est connue pour réduire le cuivre (II) en cuivre (I). Cette réduction du cuivre au sein des complexes peut conduire à une démétallation, premièrement dû à la taille du cation qui est plus importante et deuxièmement en raison de l'affinité différentes des deux cations pour les ligands. Pour étudier la stabilité des complexes de cuivre (II) face au phénomène de réduction, les techniques d'électrochimie, notamment de voltammétrie cyclique sont utilisées. Cette dernière permet d'étudier les propriétés d'oxydo-réduction d'un système. Après application d'un potentiel à l'électrode de travail en fonction de l'électrode de référence, le tracé de l'intensité du courant (i) en fonction du potentiel à l'électrode (E) conduit à un cyclovoltammogramme. L'allure du cyclovoltammogramme obtenu permet de conclure sur la réversibilité du système à l'échelle de cette technique [Figure 19].^[53]

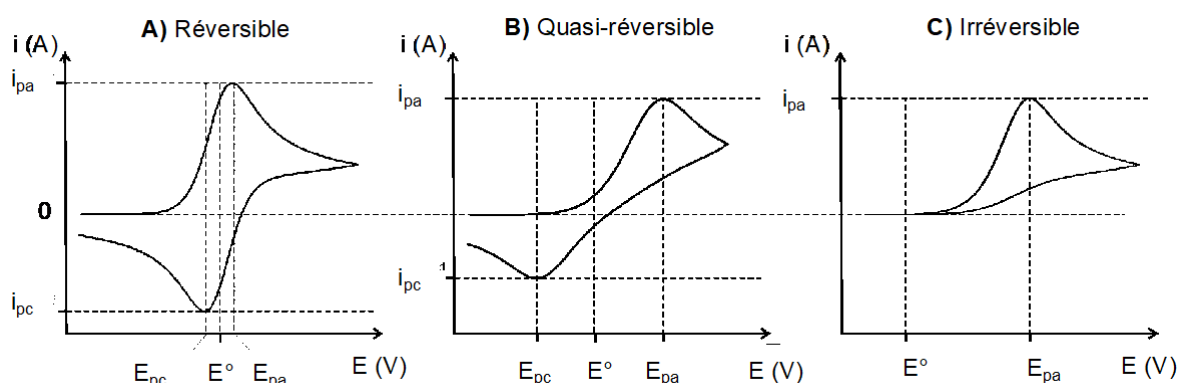


Figure 19 : Exemples de cyclovoltammogrammes (A) système réversible, (B) système quasi-réversible et (C) système irréversible^[53]

Un système est considéré comme réversible lorsque l'écart entre les potentiels cathodiques et anodiques vérifie la relation $\Delta E = E_{pc} - E_{pa} = 60$ mV (dans le cas d'un échange mono-électronique) et que le rapport i_{pc}/i_{pa} vaut 1, comme dans le cas de la Figure 19 (A). Lorsque le paramètre ΔE et le rapport des courants de réduction et d'oxydation sont relativement

proches des valeurs attendues, le système est défini comme quasi-réversible [Figure 19 (B)]. En revanche lorsque le système présente un décalage important ou encore l'absence d'une vague d'oxydation ou de réduction, le système est irréversible [Figure 19 (C)].^[53]

Pour des applications en milieu biologique, le potentiel de réduction d'un complexe doit soit présenter un système réversible au sein de la fenêtre de réduction biologique soit dans le cas d'un système irréversible le potentiel de réduction doit être situé en dehors de cette fenêtre.

4. Géométrie et isomérisie des complexes de cyclam

La stabilité thermodynamique et l'inertie d'un complexe sont généralement liées à la géométrie adoptée par ce dernier. Le **cyclam**, peut par exemple adopter 6 configurations différentes qui ont d'abord été rapportées par B. Bosnich *et al.* en 1965 [Figure 20].^[54] La nomenclature est réalisée en fonction de la position des substituants des atomes d'azote par rapport au plan moyen de la cavité macrocyclique.

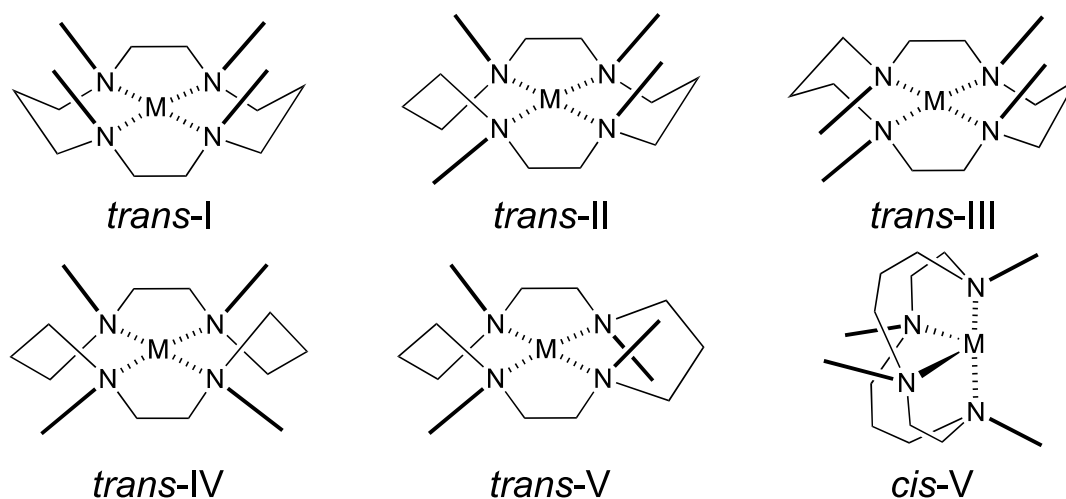


Figure 20 : Représentations des 6 configurations adoptées par le **cyclam** au sein des complexes

Trois configurations permettent de minimiser les répulsions électroniques présentes au sein du macrocycle : *trans-I*, *trans-III* et *cis-V*. La configuration *trans-I* est principalement retrouvée dans le cas de coordination d'ions de taille importante, impliquant une coordination hors de la cavité macrocyclique ou encore dans le cas de géométries de type pyramide à base carrée. La configuration la plus stable thermodynamiquement est la configuration *trans-III* où les unités chélatées à 5 et 6 chaînons adoptent les conformations stables gauche et chaise. La géométrie du cation métallique associée à cette configuration est la géométrie octaédrique (coordinnence 6) ou pyramide à base carrée (coordinnence 5). La configuration *cis-V* quant à elle est notamment retrouvée dans le cas des composés de **cyclam** dits « renforcés », comme les cross-bridged. Ces dérivés présentent un pont éthylénique joignant deux atomes d'azote non

adjacents. Cette structure contraint les doublets des atomes d'azote à pointer vers l'intérieur de la cavité et confère aux complexes (essentiellement de métaux de transition et principalement du cuivre) des propriétés d'inertie cinétique remarquables.^[21,55]

III. Influence des groupements coordinants et synthèse de macrocycles fonctionnalisés

1. Complexes du cuivre (II) avec des chélateurs non macrocycliques

Les ligands azotés linéaires porteurs de fonctions carboxylates ont été largement étudiés pour la coordination du cuivre (II). Sans être exhaustif, citons entre autres, trois exemples bien distincts et caractéristiques de l'évolution des recherches dans le domaine : l'**H₄EDTA**, **H₂DEDPA** et le **bispidol** [Figure 21].

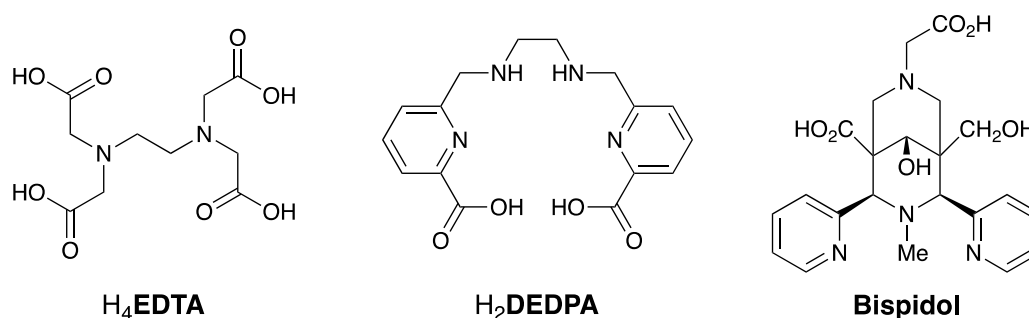


Figure 21 : Représentations du **H₄EDTA**, **H₂DEDPA** et **Bispidol**

L'**H₄EDTA** est un ligand linéaire bien connu étudié et utilisé depuis de nombreuses années en chimie de coordination qui présente une certaine flexibilité permettant une complexation rapide avec le cuivre (II). L'affinité du ligand envers le cuivre est élevée avec un $\log K_{\text{Cu-EDTA}}$ de 19,2. En revanche, le complexe ne présente pas une inertie cinétique considérable.^[56] Un ligand présentant plus de rigidité et de préorganisation, le **H₂DEDPA**, développé beaucoup plus tard, en 2010,^[57] présente une affinité avec le cuivre (II) identique que l'**H₄EDTA** avec une constante $\log K_{\text{Cu-DEDPA}}$ de 19,2. Ce composé est porteur d'unités chélatantes formées d'un noyau pyridinique et d'une fonction acide : le groupement picolinate. Ce groupement est bidentate grâce à l'atome d'azote de la pyridine et l'atome d'oxygène de la fonction acide. La rigidité apportée permet de conserver la stabilité thermodynamique mais n'améliore pas de façon considérable l'inertie cinétique du complexe formé. Le temps de demi-vie du complexe [Cu(**DEDPA**)] en milieu acide (HCl 6 M, 90 °C) est inférieur à 5 minutes.^[58]

Enfin, le **bispidol**, étudié pour la première fois en 2015,^[59] peut être classé dans les chélateurs du cuivre à « chaîne ouverte » mais présente des propriétés structurales particulières. La structure bicyclique du ligand apporte une rigidité très importante due à la conformation adoptée par les cycles. Cette dernière induit une forte interaction métal/ligand comme en attestent ses constantes thermodynamiques : $\log K_{\text{Cu-bispidol}} = 19,2$ et $p\text{Cu} = 17,0$. Contrairement aux deux ligands précédents, le complexe $[\text{Cu}(\text{bispidol})]$ est stable face à la dissociation en milieu acide (HClO_4 5 M, 25 °C) avec un temps de demi-vie remarquable de 110 jours. Ce complexe est également robuste face à la réduction du cuivre (II) avec un potentiel de réduction de -0,56 V (vs ENH) en adoptant un caractère quasi-réversible.^[59] L'étude de ces trois composés met en avant l'effet de la préorganisation et de la rigidité sur les propriétés de coordination des ligands linéaires.

2. Macrocycles N-fonctionnalisés par le groupement acétate

Les dérivés macrocycliques **tacn**, **cyclen** et **cyclam** présentent une bonne affinité pour le cuivre (II) mais, à la manière des dérivés linéaires, leur N-fonctionnalisation, notamment par des groupements acétate pour compléter la sphère de coordination du métal a été réalisée pour conduire aux dérivés H_3NOTA , H_4DOTA et H_4TETA [Figure 22].

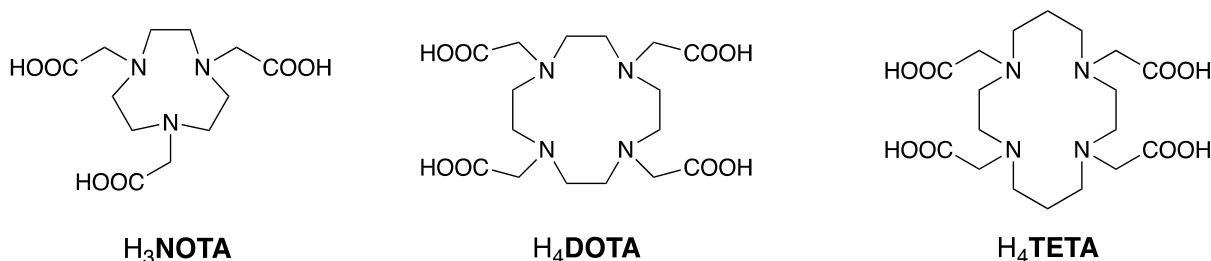


Figure 22 : Représentations des ligands H_3NOTA , H_4DOTA et H_4TETA

D'un point de vue stratégie de synthèse, la tétra-fonctionnalisation des amines secondaires des macrocycles paraît aisée à mettre en œuvre car elle ne demande pas de discrimination d'un atome d'azote par rapport aux autres. Dans le cas des dérivés polyacétates précités, la réaction du macrocycle de base avec l'acide bromoacétique conduit aux composés tri- et tétra-fonctionnalisés avec des rendements élevés.^[19,60] Le passage du **tacn** au H_3NOTA permet de gagner trois atomes coordinants et d'accroître ainsi la stabilité thermodynamique par rapport à la plateforme azotée seule ($\log K_{\text{CuL}} = 19,8$ et 15,5 pour $[\text{Cu}(\text{NOTA})]^-$ et $[\text{Cu}(\text{tacn})]^{2+}$ respectivement).^[20] En revanche, la tétra-fonctionnalisation du **cyclen** par les groupements acétate conduit à une perte d'affinité pour le cuivre (II) avec un $p\text{Cu}$ de 16,60 pour $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ contre 18,0 avec $[\text{Cu}(\text{cyclen})]^{2+}$.^[20]

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) du complexe $[\text{Cu}(\text{NOTA})]^-$ permet de visualiser que l'ion cuivre (II) ne peut se situer au sein de la cavité compte tenu de la taille étroite de cette dernière. C'est pourquoi, la géométrie adoptée autour du cuivre est de type prisme trigonal déformé. En revanche, la sphère de coordination du cuivre (II) est parfaitement satisfaite avec les trois atomes d'azote du macrocycle et les trois atomes d'oxygène des groupements acétate [**Figure 23(A)**].^[61] La cavité du **cyclen** est quant à elle plus large, conduisant également à une coordination située à l'extérieur de la cavité comme le montre la structure RX du complexe $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ dans laquelle le **cyclen** adopte une configuration de type *trans-I*. De plus, la structure RX révèle que ce sont les groupements en position N1 qui coordinent laissant les groupements en position N2 libres [**Figure 23(B)**].^[62]

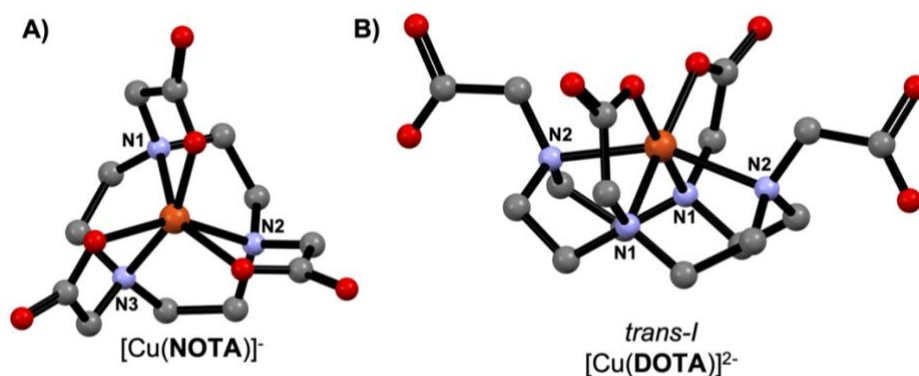


Figure 23 : Structures cristallographiques de A) $[\text{Cu}(\text{NOTA})]^-$ et B) $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ en configuration *trans-I*. Les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté^[61,62]

De la même manière que la tétra-fonctionnalisation du **cyclen**, celle du **cyclam** par les groupements acétate pour obtenir le composé H_4TETA conduit à une perte d'affinité se traduisant par une valeur de pCu de 16,2 contre 21,4 pour le $[\text{Cu}(\text{cyclam})]^{2+}$.^[63] Cette perte d'affinité peut s'expliquer par l'ajout des quatre groupements acétate, qui impacte directement les longueurs de liaison Cu-N au sein du complexe. En effet, dans le cas du $[\text{Cu}(\text{cyclam})(\text{ClO}_4)_2]$, les longueurs Cu-N1 et Cu-N2 sont du même ordre de grandeur (2,02 Å) tandis que pour le $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{TETA})]$ ces liaisons ne sont pas équivalentes (Cu-N1 = 2,06 Å et Cu-N2 = 2,16 Å) induisant une légère déformation du plan formé par les quatre atomes d'azote [**Figure 24**].^[64,65]

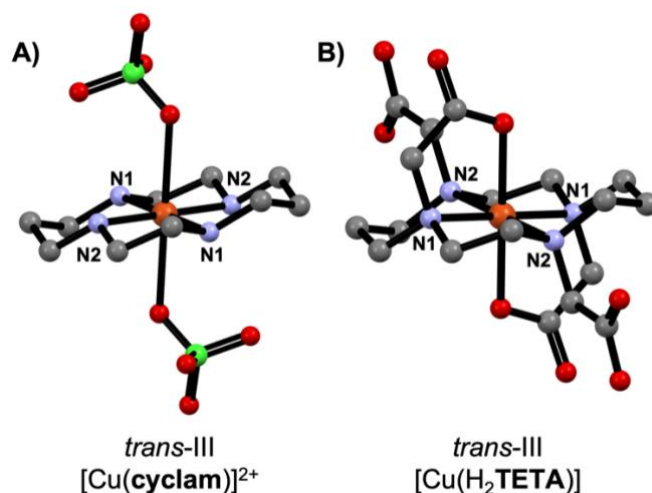


Figure 24 : Structures cristallographiques de **A)** $[\text{Cu}(\text{cyclam})(\text{ClO}_4)_2]$ et **B)** $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{TETA})]$ en configuration $trans\text{-III}$. Les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté^[64,65]

L'affinité thermodynamique des trois ligands pour le zinc (II) a également été étudiée pour anticiper le phénomène de transmétallation comme évoqué précédemment. Ainsi les trois ligands sont sélectifs du cuivre (II) par rapport au zinc (II) au regard des $p\text{Zn}$ calculés, tous inférieurs à 14.^[20]

La résistance au phénomène de démétallation a également été étudié. Le temps de demi-vie du complexe de cuivre $[\text{Cu}(\text{TETA})]^{2-}$ en milieu acide (HCl 5 M, 90 °C) est bien supérieur à celui des complexes $[\text{Cu}(\text{NOTA})]^-$ et $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ témoignant d'une meilleure résistance à la démétallation.^[21] L'étude de la stabilité électrochimique des trois complexes révèle que leurs potentiels de réduction sont compris entre -0,70 V et -0,98 V (vs ENH), se situant ainsi en dehors de la fenêtre de réduction biologique [**Tableau 11**].^[66]

Tableau 11 : Récapitulatif des propriétés des complexes de cuivre (II) avec H_3NOTA , H_4DOTA et H_4TETA ^[20,21,66]

	H_3NOTA	H_4DOTA	H_4TETA
Nature et nombre des atomes coordinants	N_3O_3 (6)	N_4O_4 (8)	N_4O_8 (8)
log K_{CuL}	19,8 ^a	22,72 ^b	21,87 ^b
pCu^c	15,2	16,60	16,2
E_{red} (V vs ENH)	-0,70	-0,78	-0,98
Inertie cinétique (min) HCl 5 M	< 3 min ^d	< 1 min ^e	4,5 min ^e
log K_{ZnL}^b	18,30	18,7	17,6
pZn^c	13,7	12,6	12,0

^a I = 0,10 M (KCl), 25 °C, ^b I = 0,1 M KNO_3 , 25 °C, ^c pH = 7,4, [L] = 2 [M²⁺] = 2.10⁻⁵ M, ^d 30 °C, ^e 90 °C

La tétra-*N*-fonctionnalisation du **cyclam** par le groupement acétate conduit à une baisse d'affinité thermodynamique pour le cuivre (II), comparé au **cyclam**. En tenant compte que deux groupements acétate ne sont pas impliqués dans la coordination du cation, la synthèse du cyclam di-*N*-fonctionnalisé par ces groupements (H_2TE2A) a été élaborée [Figure 25 (A)]. Les études effectuées sur le complexe $[Cu(TE2A)]$ ont montré une augmentation de l'inertie cinétique avec un temps de demi-vie en milieu acide (HCl 5 M, 90 °C) de 46 minutes contre 4,5 min pour le complexe $[Cu(TETA)]^{2-}$.^[66] La structure par diffraction au rayon X obtenue pour le complexe $[Cu(TE2A)]$ montre que les quatre atomes d'azote du macrocycle occupent le plan équatoriale du cuivre avec des longueurs de liaisons Cu-N1 et Cu-N2 relativement proches (Cu-N1 = 2,09 Å et Cu-N2 = 2,01 Å) et que la sphère de coordination du cuivre (II) est parfaitement complétée par les atomes d'oxygène des groupements acétate qui occupent les positions apicales [Figure 25 (B)].^[67] Il en ressort donc que le ligand H_2TE2A est plus approprié pour le cuivre (II) que le H_4TETA en revanche sa synthèse est moins aisée.

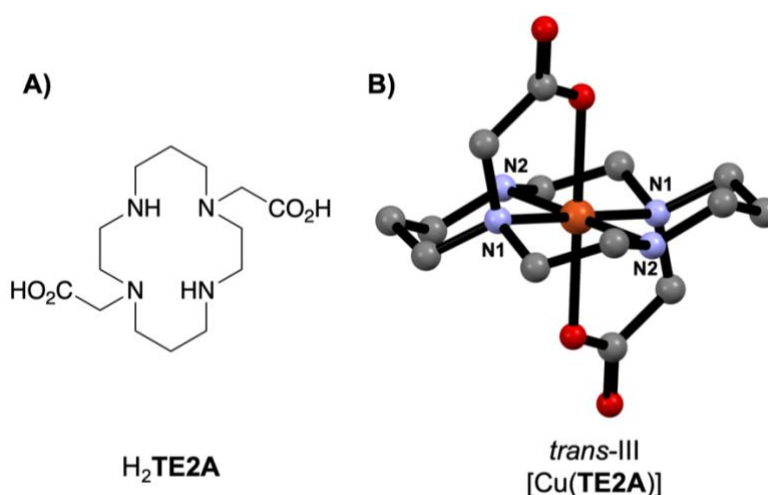


Figure 25 : Structure du ligand H_2TE2A (A), Structure cristallographique du $[Cu(TE2A)]$ en configuration *trans*-III. Les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté^[67]

Contrairement à la synthèse des composés tétra-fonctionnalisés comme le H_4TETA , qui s'effectue sans régiospécificité, l'introduction de deux groupements en position N1 et N8 sur le macrocycle demande l'élaboration « d'outils » de synthèse permettant de discriminer les deux autres positions *N*-substituables du **cyclam**. Pour cela, l'outil bisaminal peut être utilisé et permet d'obtenir des dérivés de **cyclam** di-substitués, comme publié en 1998 par G. Royal.^[68]

En 2010, D. N. Pandya et ses collaborateurs ont rapporté la synthèse du composé H_2TE2A au travers de trois étapes en utilisant le **cyclam-bisformyle**. La première étape consiste à faire réagir le formaldéhyde avec le **cyclam** pour conduire au **cyclam-bisformyle**. La réactivité du composé obtenu est particulière, puisqu'un échange de conformation rend deux

atomes d'azote en position N1 et N8 moins nucléophiles par leur inaccessibilité. Dès qu'un de ces atomes d'azote est alkylé, l'échange est bloqué rendant uniquement l'atome restant réactif, permettant de réaliser des réactions de *trans*-disubstitution. Ainsi, l'ajout de bromoacétate de *tert*-butyle sur le **cyclam bisformyle** conduit au diammonium correspondant et la déprotection du bisaminal est ensuite réalisée en milieu basique pour obtenir le cyclam N1,N8-disubstitué, H₂TE2A avec un rendement global de 84% en trois étapes [Figure 26].^[66]

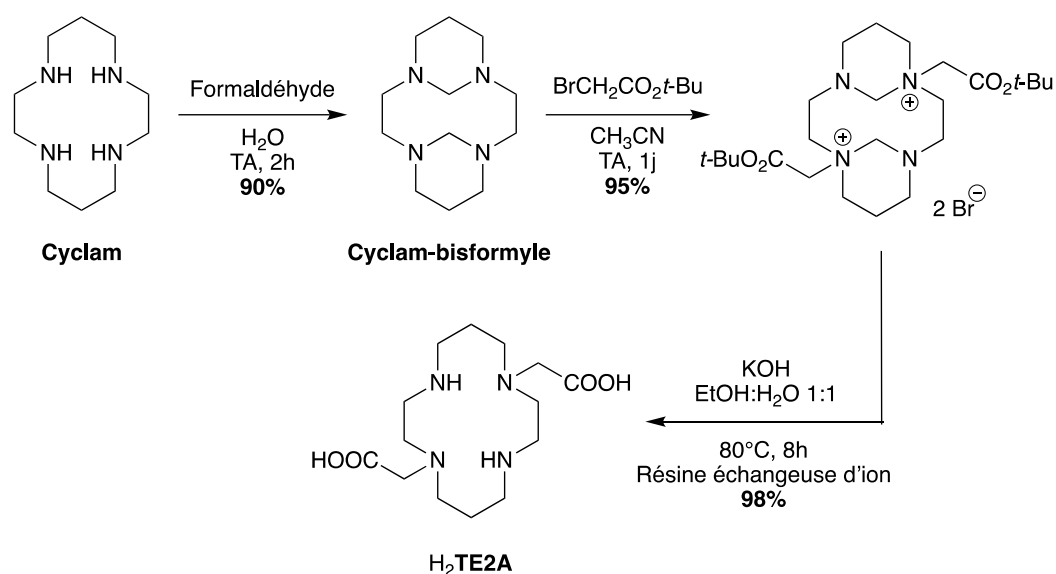


Figure 26 : Synthèse du H₂TE2A à partir du **cyclam** en utilisant la chimie bisaminal pour fonctionnaliser en positions N1 et N8

Les chélateurs porteurs de fonctions acétate ont démontré leur excellente capacité à former avec le cuivre un environnement de coordination très stable. Il reste néanmoins possible d'améliorer les propriétés des complexes formés en modifiant les groupements coordinants.

3. Macrocyclus N-fonctionnalisés par le groupement méthylphosphonate

Les données de la partie précédente mettent en valeur que l'introduction excessive d'atomes coordinants vient diminuer l'inertie des complexes formés comme observé avec le H₄TETA et le H₂TE2A. Dans ce sens, les ligands synthétisés ont en général un nombre maximal d'atomes coordinants de 6 pour complexer le cuivre (II). Le groupement méthylphosphonate permet d'augmenter la basicité globale du ligand et peut améliorer les propriétés thermodynamiques et cinétiques des complexes formés. Ainsi, ce groupement a été introduit sur le **tacn**, le **cyclen** et le **cyclam** afin d'étudier le potentiel des chélateurs obtenus dans la coordination du cuivre (II) [Figure 27].

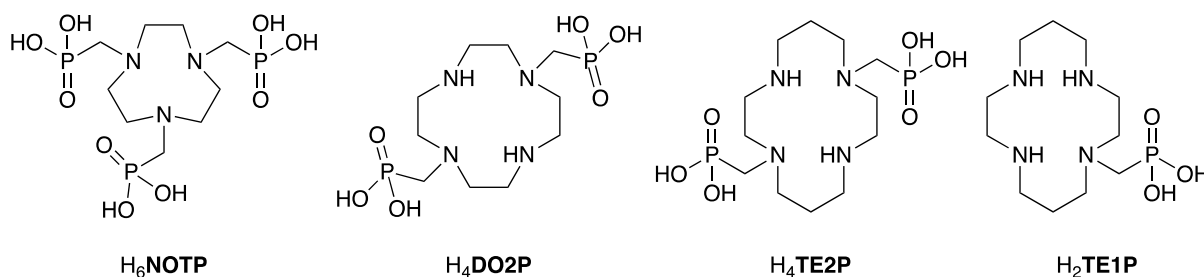


Figure 27 : Représentations des H_6NOTP , H_4DO_2P , H_4TE_2P et H_2TE_1P

Le complexe formé entre le ligand H_6NOTP et le cuivre (II) présente une constante de stabilité thermodynamique élevée de 21,3. Néanmoins, le ligand possède une affinité plus marquée pour le zinc (II) ($\log K_{ZnL}$ de 24,9) et n'est donc pas sélectif du cuivre (II).^[69] La di-*N*-fonctionnalisation du **cyclen** en position N^1 et N^7 par le groupement méthylphosphonate conduit au H_4DO_2P qui présente une plus forte affinité pour le cuivre (II) ($\log K_{CuL} = 25,4$), que celle trouvée pour le H_4DOTA . En revanche, comme pour le H_6NOTP , le ligand n'est pas sélectif du cuivre (II) vis-à-vis du zinc (II) ($\log K_{ZnL}$ de 24,8) [Tableau 12].^[70]

En 2003, l'équipe de P. Hermann s'est intéressée au groupement méthylphosphonate sur les dérivés du **cyclam** pour la coordination du cuivre (II). L'étude du ligand di-*N*-méthylphosphonate H_4TE_2P présente deux constantes thermodynamiques $\log K_{CuL}$ de 25,40 et 26,50, attribuées à deux espèces de complexes de coordination différentes, penta- et hexa-coordinés (ML_5 et ML_6) respectivement [Figure 28]. En effet, le complexe ML_5 se forme à température ambiante et lorsque ce complexe est chauffé en solution, le produit thermodynamique est formé, à savoir le chélate ML_6 . La détermination de la constante du complexe hexacoordiné a été estimée après formation du complexe à 90°C et la mesure du pH a permis de l'estimer à 26,5. D'après les structures RX, le **cyclam** dans le complexe pentacoordiné est en configuration *trans*-I et la géométrie est de type bipyramide trigonale. En revanche, dans le complexe hexacoordiné le **cyclam** est en configuration *trans*-III et la géométrie correspond à un octaèdre déformé. La longueur de liaison Cu-O de 2,369 Å traduit une élongation selon l'axe z [Figure 28].^[71]

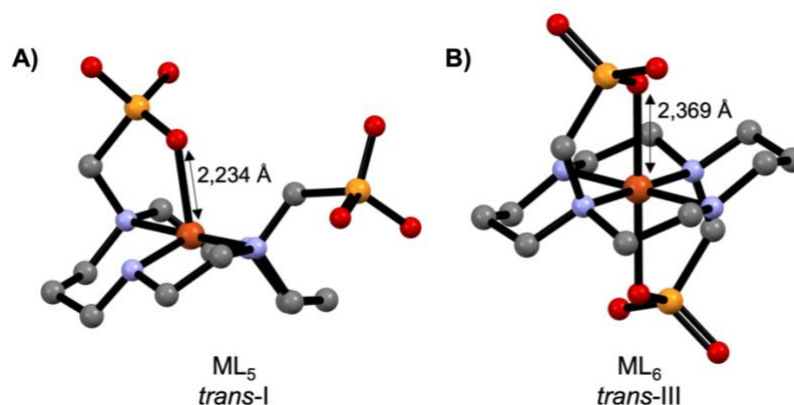


Figure 28 : Structures cristallographiques du complexe $[Cu(TE2P)]$ **A)** ML_5 , *trans-I* et **B)** ML_6 *trans-III*, les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté

La différence de schéma de coordination influence directement la résistance à la démétallation des complexes formés. De façon logique, le complexe ML_5 possède une inertie cinétique plus faible que celle du complexe ML_6 , soit 19,7 min et 6,7 mois respectivement en milieu acide ($HClO_4$, 5 M) à 25 °C [Tableau 12].

Tableau 12 : Récapitulatif des propriétés des complexes de cuivre (II) avec H_6NOTP , H_4DO2P , H_4TE2P et H_2TE1P

	H_6NOTP	H_4DO2P	H_4TE2P	H_2TE1P
Nature et nombre des atomes coordinants	N_3O_3 (6)	N_4O_2 (6)	N_4O_2 (6)	N_4O (5)
log K_{CuL}^a	21,30	25,40	25,40 26,50	27,34
pCu^b	-	-	8,1 8,6	10,1
Inertie cinétique 25 °C, 5 M $HClO_4$	-	-	19,7 min 6,7 mois	-
log K_{ZnL}^a	24,9	24,8	20,35	21,03

^a $I = 1$ M KNO_3 , $T = 25^\circ C$, ^b $pH = 7,4$, $[L] = [M^{2+}] = 0,004$ M

En 2005, l'équipe de P. Hermann s'est également intéressée au **cyclam** mono-*N*-méthylphosphonate H_2TE1P . Ce ligand présente une constante de stabilité thermodynamique de 27,34 témoignant d'une très bonne affinité avec le cuivre (II), qui est même supérieure à celle obtenue avec le **cyclam**. De plus, le composé H_2TE1P a démontré une bonne sélectivité pour le cuivre (II) vis-à-vis du zinc (II) avec un $\log K_{ML}$ de 21,03.^[72]

À l'image de la synthèse des composés di-*N*-fonctionnalisés qui s'appuie sur l'outil bisformyle développé précédemment, la synthèse de composés mono-*N*-fonctionnalisés demande la

« discrimination » d'un atome d'azote vis-à-vis des trois autres. La synthèse de dérivés de **cyclam** mono-*N*-fonctionnalisés par voie « statistique » (mélange équimolaire de ligand et du réactif alkylant) donne lieu à un mélange de composés, tandis que sa tri-*N*-fonctionnalisation « statistique » est mieux maîtrisée. Ainsi, les composés mono-*N*-fonctionnalisés peuvent être obtenus en trois étapes en suivant la séquence : (i) tri-protection du macrocycle, (ii) substitution nucléophile de la dernière amine libre et (iii) déprotection du macrocycle.

La stratégie de protection est souvent basée sur l'encombrement stérique autour du macrocycle qui rend difficile l'entrée du quatrième groupement sur la structure macrocyclique. Cette tri-fonctionnalisation peut ainsi être facilement étendue à des groupes protecteurs encombrants. L. Fabrizzi a notamment suivi cette méthode pour la tri-tosylation du **cyclam** en 1987 ;^[73] cependant, la déprotection des amines demandant, dans ce cas, des conditions drastiques, d'autres groupements lui ont par la suite été préférés. Le groupement *tert*-Butoxycarbonyle (noté Boc pour plus de clarté) est bien connu pour protéger les amines et se retire aisément en milieu acide, (acide trifluoroacétique ou acide chlorhydrique) à température ambiante. La synthèse du **cyclam tri-Boc**, a été proposée en 1996 par R. Guillard et coll.,^[74] puis optimisée par C. Herrero et coll. en 2014, permettant d'isoler ce composé avec un rendement de 86%.^[75] Pour réaliser de façon préférentielle la tri-*N*-protection souhaitée, le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc₂O) est ajouté en deux temps, d'abord 1,7 équivalents à température ambiante puis 1,3 équivalents à -15 °C dans le but de limiter la formation du composé tétra-*N*-protégé. Le mélange réactionnel est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/méthanol) [Figure 29].^[76] Une fois le **cyclam tri-boc** obtenu, une mono-*N*-fonctionnalisation spécifique de l'amine secondaire disponible est possible notamment par substitution nucléophile à l'aide de composés halogénés.

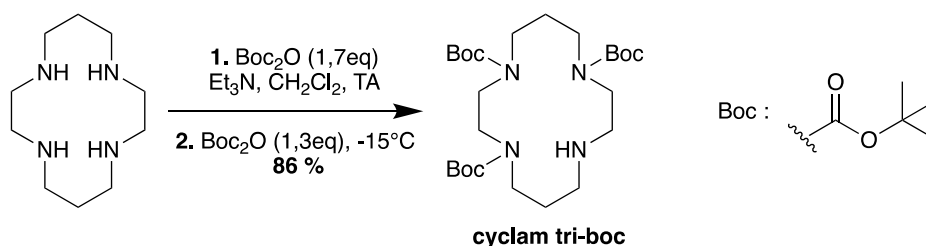


Figure 29 : Tri-*N*-protection du **cyclam** par le groupement Boc conduisant au **cyclam tri-Boc**

Si le groupement à introduire sur l'amine libre est sensible au milieu acide, les groupements trifluoroacétyle (notés TFA pour plus de clarté) sont une bonne alternative au groupement Boc ou tosylo car ils sont éliminés en milieu basique (NaOH, TA). En 2003, A. Moore et coll. rapportent la synthèse du **cyclam tri-TFA** après réaction de 4 équivalents de trifluoroacétate

d'éthyle sur le **cyclam** en présence de base (triéthylamine) dans le méthanol à température ambiante [Figure 30]. Une séparation sur colonne de gel de silice permet d'isoler le **cyclam tri-TFA** avec un très bon rendement (> 92 %).^[77]

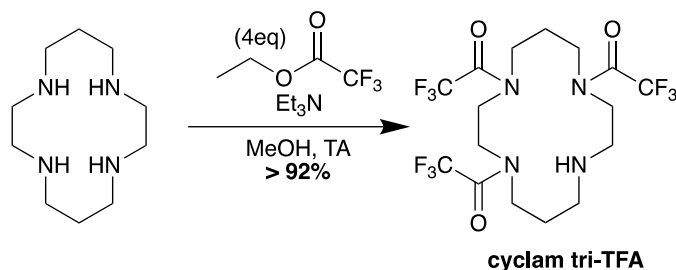


Figure 30 : Tri-N-protection du **cyclam** par le groupement TFA conduisant au **cyclam tri-TFA**

Pour revenir à la synthèse du composé H₂TE1P, dans un premier temps le groupe de P. Hermann a envisagé d'utiliser le **cyclam tri-Boc** pour réaliser la mono-N-fonctionnalisation avec le groupement méthylphosphonate. En raison de contraintes stériques générées par la présence des groupements Boc, la réaction de Mannich pour introduire le groupement phosphorylé n'a pas pu être réalisée. C'est pourquoi, les auteurs ont décidé d'utiliser un groupement moins encombrant, le TFA, permettant d'obtenir le composé H₂TE1P avec un rendement de 80% à partir du **cyclam tri-TFA**.^[72]

4. Macrocyclus N-fonctionnalisés par le groupement picolyle

La nature acide de Lewis intermédiaire du cuivre (II) selon la théorie HSAB de Pearson, a motivé de nombreuses investigations pour évaluer l'affinité de ligands porteurs de groupes méthylpyridine à former des complexes cuivriques. En effet, l'atome d'azote du noyau pyridinique présentant un caractère de base intermédiaire, l'association de ces bras pendants aromatiques s'est avérée d'un grand intérêt. Ainsi, le groupement picolyle a été diversement introduit sur le **tacn**, le **cyclen** ainsi que le **cyclam** pour étudier la coordination avec le cuivre (II) ; citons entre-autre les ligands **NO3Py**, **DO2Py** et **TE1Py** [Figure 31].

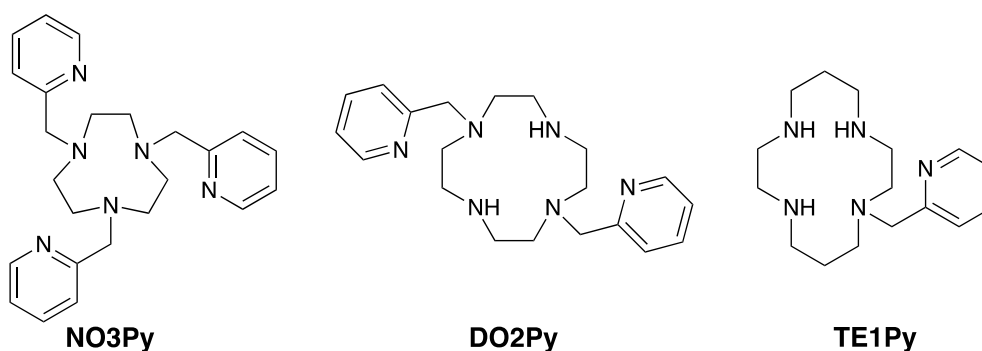


Figure 31 : Représentation du **NO3Py**, **DO2Py** et **TE1Py**

De façon logique, le **NO3Py** présente une affinité plus marquée pour le cuivre (II) que le **tacn** avec un $\log K_{CuL}$ de 27,4 contre 15,5 respectivement.^[78] De plus, le **NO3Py** présente une sélectivité pour le cuivre (II) vis-à-vis du zinc (II) : $pZn = 13,58$, vs $pCu = 23,70$. La présence de deux groupements picolyle sur le **DO2Py** abaisse légèrement l'affinité du ligand pour le cuivre (II) par rapport au **cyclen**, avec un pCu diminuant à 14 pour le **DO2Py** contre 18 pour la plateforme macrocyclique seule.^[79] Le **cyclam** mono-*N*-fonctionnalisé par un groupement picolyle, le **TE1Py**, présente une stabilité thermodynamique plus importante que celle du H_2TE1P : $pCu = 16,0$ vs 10,1 respectivement [**Tableau 13**].^[22,80]

Tableau 13 : Récapitulatif des propriétés des complexes de cuivre (II) avec **NO3Py**, **DO2Py** et **TE1Py**^[78-80]

	NO3Py	DO2Py	TE1Py
Nature et nombre des atomes coordinants	N ₆ (6)	N ₆ (6)	N ₅ (5)
log K_{CuL}^a	27,40	20,3	23,0
pCu^b	23,70	14,0	16,0
pZn^b	13,58	-	-

^a I = 1 M KNO₃, T = 25 °C, ^b pH = 7,4, [L] = 2 [M²⁺] = 2.10⁻⁵ M

Le **NO3Py** apparait comme le meilleur ligand de la famille méthylpyridine pour la coordination du cuivre (II). L'analyse par diffraction des rayons X du chélate formé avec le cuivre (II) montre que la géométrie du complexe est de type octaédrique déformée avec un angle de torsion de 27°. L'angle de torsion est défini par l'angle présent entre le cation métallique et les plans formés par les atomes d'azote du triazacyclononane et celui des atomes d'azote des groupements picolyle [**Figure 32**].^[81]



Figure 32 : Structure cristallographique du $[\text{Cu}(\text{NO3Py})]^{2+}$. Les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté.

Le groupement méthylpyridine complète de façon satisfaisante la sphère de coordination du cuivre (II) avec une forte constante de stabilité thermodynamique et également un pCu élevé, principalement quand il est associé au **tacn** dans le ligand **NO3Py**. En revanche, les données cinétiques de ces composés (**NO3Py**, **DO2Py** et **TE1Py**) ne sont pas rapportées.

5. Macrocyclus N-fonctionnalisés par le groupement picolinate

À l'image du ligand linéaire H_2DEDPA , l'insertion du groupement picolinate sur les macrocycles permet d'envisager un effet chélate plus important induisant ainsi une meilleure inertie cinétique des complexes. L'étude de ce groupement introduit dans la structure des **tacn**, **cyclen** et **cyclam** pour mener aux dérivés **HNO1PA**, **HDO1PA** et **HTE1PA** respectivement a apporté de nombreuses informations [**Figure 33**].

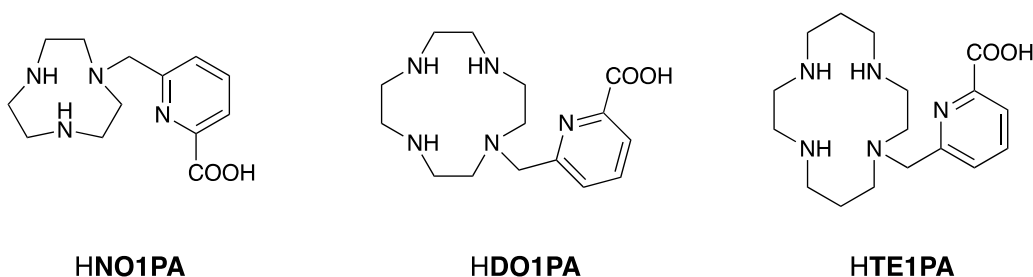


Figure 33 : Représentation du **HNO1PA**, **HDO1PA** et **HTE1PA**

Tout comme les précédents exemples de fonctionnalisation du **tacn**, l'insertion du groupement picolinate permet d'augmenter l'affinité de la plateforme azotée pour le cuivre (II), la constante $\log K_{\text{CuL}}$ atteignant 21,0 (contre 15,5 pour le **tacn**). En revanche les autres propriétés de complexation du cuivre (II) avec le ligand **HNO1PA** n'ont pas encore été rapportées.^[82]

HDO1PA et **HTE1PA**, présentent tous deux le même nombre d'atomes coordinants ainsi qu'une affinité marquée pour le cuivre (II), caractérisée par des pCu respectifs de 19,08 et

18,64. L'étude électrochimique des complexes [Cu(**DO1PA**)]⁺ et [Cu(**TE1PA**)]⁺ a permis de déterminer le potentiel de réduction de chaque système (-0,93 V et -1,05 V (vs Fc/Fc⁺) respectivement). Lorsque l'on rapporte ces valeurs par rapport à la fenêtre de réduction biologique, les valeurs en sont proches mais les systèmes de réduction sont quasi-réversible signifiant une inertie électrochimique des deux complexes.

La cinétique de dissociation du complexe [Cu(**TE1PA**)]⁺ est 72 fois plus longue que celle du complexe [Cu(**DO1PA**)]⁺ ($t_{1/2}$ = 114 et 1,8 min respectivement en milieu acide (HClO₄ (5 M) à 25°C)). En plus de son inertie intéressante, le ligand **HTE1PA** est sélectif du cuivre (II) vis-à-vis du zinc (II) avec un log K_{ZnL} de 18,86 contre un log K_{CuL} de 25,5 [Tableau 14].^[22]

Tableau 14 : Récapitulatif des propriétés des complexes de cuivre (II) avec **HNO1PA**, **HDO1PA** et **HTE1PA**^[22]

	HNO1PA	HDO1PA	HTE1PA
Nature et nombre des atomes coordinants	N ₄ O (5)	N ₅ O ₁ (6)	N ₅ O ₁ (6)
log K_{CuL}^a	21,07	24,0	25,5
pCu^b	-	19,08	18,64
E_{red} (V vs Fc/Fc⁺)	-	-0,93	-1,05
Inertie cinétique (min)	-	1,8 min ^c	144 min ^c
log K_{ZnL}^a	-	20,39	18,86

^a I = 1 M KNO₃, ^b pH = 7,4, [L] = 2 [M²⁺] = 2.10⁻⁵ M, ^c HClO₄ 5 M, 25 °C

La structure cristallographique du complexe [Cu(**TE1PA**)]⁺ révèle que la fonction carboxylate n'est en réalité pas impliquée directement dans la coordination du cation métallique. En effet, le cuivre (II) est coordonné selon le plan équatorial formé par les quatre atomes d'azote du macrocyclique et la position apicale est occupée par l'atome d'azote du picolinate. Comme attendu pour un complexe pentacoordiné, la géométrie du complexe est de type pyramide à base carrée avec une déformation dans laquelle le **cyclam** adopte la configuration *trans-l* [Figure 34].

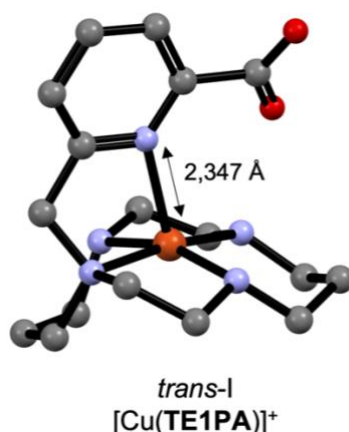


Figure 34 : Structure cristallographique du complexe [Cu(TE1PA)]⁺ en configuration *trans-I*, les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté

La synthèse du composé HTE1PA rapportée en 2012 par le laboratoire utilise une tri-protection du **cyclam** par un groupement trivalent, le groupement phosphoryle (PO), développée en 1991 par H. Handel et coll.^[83] Le composé **cyclam** issu de la protection par le groupement phosphoryle, souvent appelé « **cyclam-PO** » est obtenu après réaction du macrocycle avec la tris(diméthylamino)phosphine oxydée par CCl₄ puis hydrolysé par la soude. Le composé obtenu peut permettre la mono-*N*-fonctionnalisation régiospécifique du macrocycle par réaction de l'amine secondaire restant libre sur un électrophile par exemple. Cette stratégie est celle suivie lors de la première synthèse du HTE1PA [Figure 35, haut].^[22] Bien que cette synthèse soit atome économique et que la déprotection du groupement phosphoryle se fasse dans des conditions plutôt douces (HCl, 0,5 M), les réactifs utilisés sont relativement toxiques.

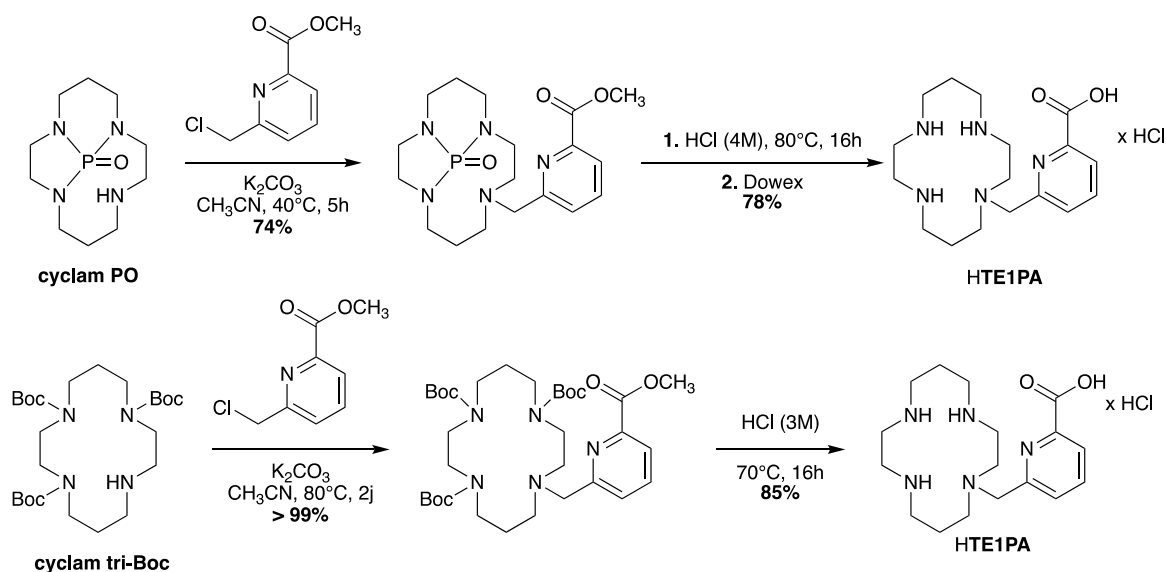


Figure 35 : Voie de synthèse du HTE1PA (en haut) à partir du **cyclam-PO**, (en bas) à partir du **cyclam tri-Boc**

Le **HTE1PA** a ainsi également été obtenu à partir du **cyclam tri-Boc** avec un rendement global de 84%, supérieur à celui obtenu par la voie « **cyclam-PO** » (58%) [Figure 35, bas]. De plus, cette nouvelle voie de synthèse utilise moins de composés toxiques.

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, les ligands polyazamacrocycliques dont notamment le dérivé monopicolinate du cyclam (**HTE1PA**) représentent des plateformes idéales pour la coordination du cuivre (II) avec des constantes thermodynamiques et cinétiques remarquables. Ainsi, la robustesse des complexes de cuivre formés avec des dérivés de **cyclam** peut permettre l'élaboration de traceurs d'imagerie en médecine nucléaire.

IV. Médecine nucléaire et bioconjugaison des chélateurs

1. Imagerie nucléaire

L'imagerie médicale utilise différentes techniques afin de permettre l'exploration du corps humain de façon complète. L'utilisation de rayons X comme dans le cas des scanners permet de déceler des anomalies de petites tailles. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) repose sur le même principe que la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques et permet d'obtenir des informations sur les tissus mous de l'organisme. Les défauts morphologiques observés au travers de ces deux techniques (scanner et IRM) ne sont pas spécifiques des cancers et peuvent manquer de sensibilité pour certaines lésions ou pathologies. Tout en permettant un gain net de sensibilité et de spécificité, l'imagerie nucléaire permet également d'imager l'activité métabolique d'un organe grâce à l'utilisation de radioéléments. La Tomographie par Émission MonoPhotonique (TEMP) et la Tomographie par Émission de Positons (TEP) sont les deux imageries principales utilisées en médecine nucléaire. Nous nous intéresserons ici spécifiquement à l'imagerie TEP.

1.1. Fonctionnement de l'imagerie par émission de positons (TEP)

L'examen TEP repose sur l'utilisation d'un radioélément émettant une particule β^+ (positron) qui parcourt une distance (dépendante de son énergie d'émission) avant de rencontrer dans le milieu son antiparticule, un électron (β^-). Il en résulte une réaction d'annihilation, produisant deux photons gamma antiparallèles de même énergie (511 keV), qui seront détectés par les γ -caméras [Figure 36]. Un traitement informatique permet ensuite d'obtenir la cartographie des organes ciblés au sein des patients. Plus l'énergie des positrons est élevée, plus leur distance parcourue avant annihilation sera importante, entraînant ainsi une baisse de résolution.

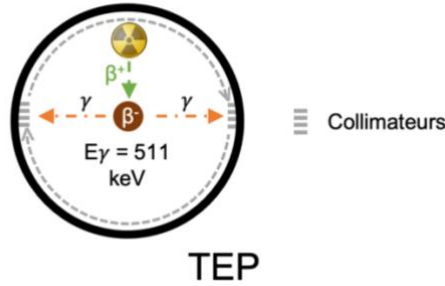


Figure 36 : Principe de fonctionnement de la TEP

1.2. Radioisotopes utilisés pour l'imagerie TEP

Pour réaliser des images TEP, les radionucléides sont dans la majorité fixés sur des molécules d'intérêt, ciblant spécifiquement certaines cellules, pour imager des organes ou des processus liés à des pathologies particulières. Les premières images TEP ont été réalisées avec des radionucléides du carbone ou d'hétéroatome comme le carbone-11, le fluor-18, l'azote-13 et l'oxygène-15. La liaison de ces radionucléides aux molécules d'intérêt est de nature covalente et se fait généralement par substitution d'un élément présent sur molécule. La FDA a actuellement approuvé l'utilisation de 19 composés marqués par des radionucléides non métalliques.^[84] Parmi eux, la choline (nutriment essentiel de l'organisme) marquée au carbone-11 (**[¹¹C]-choline**) permet d'imager le cancer de la prostate.^[85,86] Un second exemple repose sur le marquage de l'ammoniac par l'azote 13 (**[¹³N]-ammoniac**) pour imager le myocarde [**Figure 37**]. En revanche, le temps de demi-vie des éléments carbone-11 et azote-13 est très court (inférieur à 30 minutes), ainsi, le fluor-18 se distingue avec un temps de demi-vie supérieur de 110 minutes. De plus, son énergie d'émission est la plus faible, ce qui conduit à la meilleure résolution comparée à celle des isotopes précités. C'est pourquoi, le fluor-18 est actuellement l'élément le plus utilisé en clinique en imagerie TEP, notamment avec le traceur 2-désoxy-2-(¹⁸F)fluoro-D-glucose (**[¹⁸F]-FDG**). Ce composé est un analogue du glucose dont un des groupements hydroxyle a été substitué par le fluor-18. Son utilisation en clinique permet ainsi d'effectuer l'imagerie de certains cancers, profitant de la consommation anormalement élevée en glucose des cellules tumorales par rapport à la majorité des cellules saines [**Figure 37**].

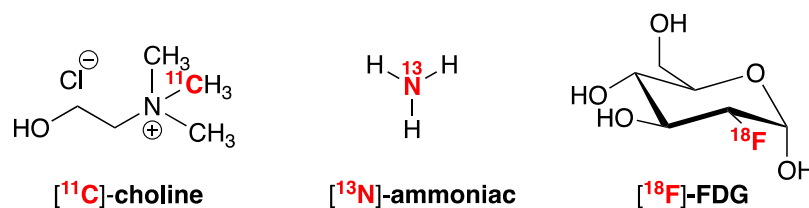


Figure 37 : Exemple de molécules radiomarquées par des radionucléides non métalliques acceptées par la FDA

Les temps de demi-vie de ces radionucléides restent relativement courts pour une utilisation avec des biomolécules ayant une biodistribution longue pour cibler les cellules tumorales. Dans ce sens, des radionucléides d'éléments métalliques sont intéressants car ils ont des temps de demi-vie nettement plus longs. Parmi les exemples proposés dans le **Tableau 15**, le cuivre-64 se révèle être un bon radionucléide avec un temps de demi-vie relativement long (12,7 h) et une énergie de 656 keV, faisant de lui le troisième meilleur élément de manière générale en terme de résolution.

Tableau 15 : Propriétés et mode de production de certains radioisotopes utilisés en imagerie TEP^[87,88]

	Isotope	t _{1/2} (h)	Particules émises	Énergie d'émission (keV)	Production
TEP	¹¹ C	0,34	β ⁺ (>99%)	β ⁺ 961	Cyclotron, ¹⁴ N(p,α) ¹¹ C
	¹³ N	0,17	β ⁺ (>99%)	β ⁺ 1199	Cyclotron, ¹⁶ O(p,α) ¹³ N
	¹⁵ O	0,04	β ⁺ (>99%)	β ⁺ 1732	Cyclotron, ¹⁵ N(p,n) ¹⁵ O
	¹⁸ F	1,8	β ⁺ (97%), CE (3%)	β ⁺ 634	Cyclotron, ¹⁸ F (F ⁻) : ¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F
	⁴⁴ Sc	3,9	β ⁺ (94%), CE (6%)	β ⁺ 1474	Cyclotron, ⁴⁴ Ca(p,n) ⁴⁴ Sc
	⁶⁴ Cu	12,7	β ⁺ (19%), β ⁻ (40%), CE (41%)	β ⁺ 656	Cyclotron, ⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu
	⁶⁸ Ga	1,1	β ⁺ (90%), CE (10%)	β ⁺ 1880	Générateur, ⁶⁸ Ge
	⁸⁶ Y	14,7	β ⁺ (33%), CE (66%)	β ⁺ 1221	Cyclotron, ⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y
	⁸⁹ Zr	78,4	β ⁺ (23%), CE (77%)	β ⁺ 396	Cyclotron, ⁸⁹ Y(p,n) ⁸⁹ Zr

CE : Capture électronique, TI : Transition isomérique

À l'inverse des éléments du groupe principal (C, N, O, F), ces cations métalliques ne sont pas présents dans la structure des biomolécules et ne peuvent être liés de façon covalente, il faut

donc trouver un moyen de les lier et c'est ici qu'intervient la chélation par des ligands, comme ceux décrits précédemment pour le cuivre.

Ces cations sont donc généralement formulés sous la forme de médicaments radiopharmaceutiques, composés de quatre parties : i) le **radionucléide**, ii) le chélateur, iii) un **espaceur** et iv) une **unité de ciblage** (ou vecteur) [Figure 38].

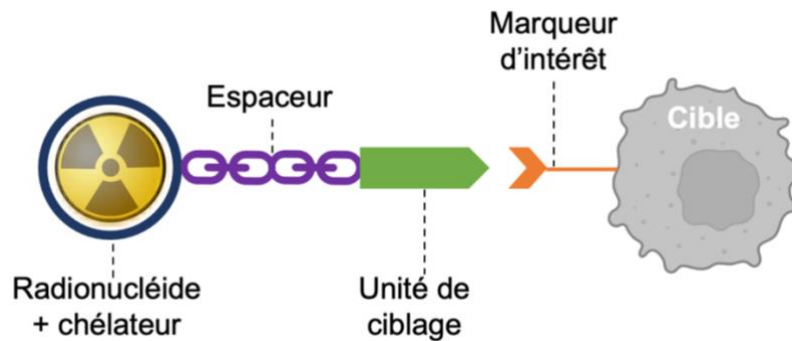


Figure 38 : Représentation schématique d'un radiopharmaceutique

Le chélateur doit donc remplir une première fonction de coordination du radionucléide pour former un complexe, et une seconde fonction de liaison (*via* l'espaceur) à la molécule vectrice qui permettra de cibler spécifiquement les pathologies d'intérêts : on parlera donc ici de « ligand bifonctionnel ». Le complexe formé avec le radionucléide doit être robuste face aux phénomènes de transmétallation, transchélation et démétallation pouvant avoir lieu en milieu biologique. Outre ces phénomènes, il est également nécessaire que la complexation, appelée ici radiomarquage, s'effectue rapidement avec le meilleur rendement possible ; on parle de rendement ou d'efficacité de radiomarquage. Enfin, le temps de demi-vie du radiopharmaceutique doit être adapté au mode de ciblage visé, lui-même adapté à la pathologie.

2. Thérapie nucléaire

Actuellement, les traitements ciblant les cancers sont une combinaison de plusieurs techniques telles que la chimiothérapie, la radiothérapie ou encore l'immunothérapie. Ces méthodes s'attaquent non seulement aux cellules cancéreuses mais également aux cellules saines provoquant ainsi des effets secondaires. Il est donc important de pouvoir concevoir de nouvelles techniques de thérapie ciblant uniquement les zones malades. Dans ce sens, la thérapie nucléaire ciblée (par opposition à la thérapie par radiation externe) ouvre les portes à un nouveau type de médecine personnalisée.

2.1. Propriétés de désintégration de radionucléides pour la thérapie

Certains radionucléides ont des propriétés de désintégration permettant une application en thérapie. En effet, les particules α (alpha), β^- (beta) et EA (électron Auger) sont capables d'endommager les tissus en fonction de leur type de désintégration, leur portée, l'énergie déposée ainsi que le transfert linéaire d'énergie (TLE). Le TLE correspond à l'énergie transférée par une particule ionisante traversant les tissus par unité de distance. Plus cette valeur est élevée, plus le rayonnement se verra atténué rapidement. Les propriétés des différentes particules sont les suivantes :

- Particules α

Une particule α est un noyau d'hélium (^4He) avec une charge +2, émise par certains radionucléides lorsqu'ils subissent une désintégration radioactive. La portée de ces particules est de l'ordre de 50 à 100 μm et le TLE a une valeur élevée aux environs de $80 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.^[6,88]

- Particules β^-

L'émission de particules β^- (ou électron) résulte de la désintégration d'un noyau possédant un excès de neutrons. Un neutron est alors converti en proton accompagné de l'émission d'un électron de haute énergie. La portée de ces particules est comprise entre 1 et 5 mm avec un TLE proche de $0,2 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Les particules β^- ont été les émetteurs le plus souvent utilisés dans le cadre de la radiothérapie.^[6,88]

- Électron Auger

Les électrons Auger sont des électrons éjectés des noyaux radioactifs à partir de transitions suborbitales en raison de l'effet Auger.^[88] Leur émission a une courte portée (1 à 1000 nm) et un TLE intermédiaire comprise entre 4 et $26 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$.^[6,88]

2.2. Radioisotopes utilisés pour la thérapie nucléaire

Le **Tableau 16** met en valeur la possibilité de sélectionner un radionucléide en fonction de la taille des tumeurs ciblées, en tenant compte de l'énergie de l'élément et donc de la pénétration dans les tissus.

Ainsi, pour cibler une tumeur de taille importante, un émetteur de particule β^- comme ^{90}Y est plus adapté avec son énergie élevée de 2280 keV et sa fenêtre de pénétration de 12 mm.

Les émetteurs α eux permettent de cibler des tumeurs de tailles intermédiaires avec une pénétration inférieure à 0,1 mm, le choix du radionucléide dépendra également du temps de demi-vie en fonction du mode de ciblage utilisé.

Les électrons Auger, eux, possèdent une fenêtre de pénétration très faible (10 nm) permettant ainsi de cibler de petites tumeurs, en particulier lorsqu'ils sont délivrés de manière intracellulaire au noyau pour maximiser l'effet cytotoxique.^[88]

Tableau 16 : Propriétés générales des radionucléides utilisés en thérapie^[88,89]

	Radionucléide	t _{1/2} (h)	Energie max (keV)	Emission	Pénétration
Particules β⁻	⁴⁷ Sc	80	600	β ⁻	0,2 mm
	⁶⁷ Cu	62	577	β ⁻	1,8 mm
	⁹⁰ Y	64	2280	β ⁻	12,0 mm
	¹⁷⁷ Lu	160,8	500	β ⁻	1,5 mm
Particules α	¹⁴⁹ Tb	4,2	400	α	<0,1mm
	²¹¹ At	7,2	6000	α	0,08 mm
	²¹² Bi	1,0	6000	α, β ⁻	0,09 mm
	²¹³ Bi	0,77	6000	α, β ⁻	<0,1 mm
Électrons Auger	⁶⁷ Ga	78,3	300	EA, γ	10 nm
	¹²³ I	13,3	159	EA, γ	10 nm
	¹²⁵ I	1452	27	EA, γ	10 nm

Pour obtenir l'effet cytotoxique souhaité, il est nécessaire de vectoriser le radionucléide pour cibler les cellules tumorales, comme dans le cas de l'imagerie TEP en utilisant des radiopharmaceutiques.

3. Ouverture au concept de théranostique

En 1998, John Funkhouser, directeur général d'un groupe pharmaceutique (PharmaNetics), a introduit le terme théranostique pour décrire l'activité de son entreprise, qui développe des composés pour le diagnostic, liés à des applications thérapeutiques. Ainsi, J. Funkhouser définit le théranostique comme « le moyen d'agir sur le stade de la pathologie ».^[90] Il existe différents groupes de théranostique :

- 1) « Vrai théranostique », où un seul radioisotope possède des propriétés d'émission pour l'imagerie (particules β⁺ ou γ) et pour la thérapie (particules β⁻ ou α). La dose de radiopharmaceutique injectée au patient sera différente en fonction de l'application souhaitée (plus concentrée pour la thérapie). L'avantage de ce groupe est d'avoir un seul médicament pour le traitement et le suivi en imagerie. Le radionucléide ¹⁷⁷Lu, qui est émetteur de particules γ et β⁻ rentre dans cette catégorie et permet une application

en imagerie TEMP et en thérapie. En revanche, ce groupe est à considérer avec prudence car la quantité de photons ou positrons émis est souvent trop faible nécessitant l'utilisation d'une grande quantité de radiopharmaceutique, en désaccord avec l'aspect thérapeutique du radioélément.

- 2) Les paires mixtes, mettent en jeu des radionucléides différents pour chaque application. Il est donc essentiel que les deux radiopharmaceutiques aient une pharmacocinétique similaire, des radioéléments de même charge et donc que l'agent chélateur soit adapté aux deux substances radioactives. Dans le cadre d'applications en imagerie TEP et en thérapie, la paire la plus utilisée en pré-clinique et clinique est : $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ et pour la combinaison TEMP et thérapie, on retrouve la paire $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$.
- 3) Un élément peut avoir deux isotopes aux propriétés d'émission différentes, l'un utilisable pour l'imagerie et le second pour la thérapie. Pour les éléments métalliques, c'est le cas du cuivre, avec la paire ^{64}Cu (β^+)/ ^{67}Cu (β^-), ainsi que l'yttrium avec ^{86}Y (β^+)/ ^{90}Y (β^-) et également le scandium avec ^{44}Sc (β^+)/ ^{47}Sc (β^-). Étant donné que les deux isotopes utilisés pour l'imagerie et la thérapie proviennent du même élément chimique, les deux radiopharmaceutiques posséderont le même comportement chimique et biologique.

Comme discuté en introduction générale, dans le cadre de ce travail de thèse, seul le couple $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ sera visé. L'utilisation d'une telle paire de radioisotopes présente l'intérêt d'utiliser un unique ligand qui présentera les mêmes propriétés de coordination avec chaque isotope. La production du cuivre-64 est bien maîtrisée en cyclotron et celle du cuivre-67 devient de plus en plus fréquente (en Suisse à l'institut Paul Scherrer et aux États-Unis au laboratoire national d'Argonne) et sera par exemple disponible en France courant 2022-23 sur le site d'Arronax à St Herblain en France. Le cyclotron Arronax, qui signifie « Accélérateur pour la recherche en radiochimie et oncologie à Nantes Atlantique » a pour objectif la conception, la production et l'utilisation de radioisotopes pour la recherche en médecine nucléaire. Le cuivre-64 utilisé dans l'ensemble des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit est issu de ce cyclotron. De plus, les propriétés d'émission du cuivre-64 donnent lieu à une très bonne résolution grâce à son énergie de 656 keV. Le cuivre-67 étant émetteur de particule β^- est indiqué pour le ciblage de tumeurs de tailles intermédiaire avec sa pénétration de 1,8 mm.

4. Bioconjugaison et bifonctionnalisation

Comme mentionné précédemment, les chélateurs de cations métalliques doivent être bifonctionnels pour pouvoir chélater le cation et cibler des molécules d'intérêt. L'unité de ciblage (ou vecteur) peut être un anticorps (ou des fragments d'anticorps), une protéine, des unités glucose (comme pour le fonctionnement du [¹⁸F]-FDG) ou encore des molécules organiques ayant une reconnaissance spécifique des cellules visées.

Cette conjugaison entre la partie chélatante et l'unité de ciblage repose sur la nature des fonctions chimiques disponibles tant sur le chélate que sur la biomolécule.

4.1. Stratégies de bioconjugaison

Il existe plusieurs réactions de bioconjugaison standards utilisées couramment avec les chélateurs bifonctionnels, qui permettent une conjugaison sélective, au travers de liens covalents stables en milieu biologique.

Par exemple, les amines des résidus lysine présentes sur les anticorps peuvent réagir avec des acides carboxyliques pour former un lien amide ; on parle de lien peptidique [**Figure 39 A**].^[91] Cette stratégie est largement utilisée avec de nombreux chélateurs comme le **DOTA** et évidemment étendu à de nombreuses autres modifications (**EDTA**, **DTPA** par exemple).^[14,15] Néanmoins, le couplage peptidique nécessite souvent l'ajout d'agents de couplage.

Les fonctions amine aliphatiques précédentes peuvent également réagir avec la fonction isothiocyanate pour former un lien thiourée [**Figure 39 B**].^[91] Bien que l'introduction de la fonction isothiocyanate sur les chélateurs utilise du thiophosgène, cette stratégie est simple à mettre en œuvre et est très efficace.^[92] De plus, la réaction entre une amine aliphatique et la fonction isothiocyanate ne nécessite pas l'utilisation de réactif supplémentaire contrairement à la liaison peptidique.

Les fonctions thiol des résidus cystéine des biomolécules peuvent quant à elles réagir facilement avec des fonctions maléimide par addition de Michael pour former un lien thioéther [**Figure 39 C**].^[91] Cette technique présente l'avantage d'avoir une réaction rapide et efficace. Néanmoins, les résidus cystéines sont présents sous la forme de dimère sur les biomolécules, demandant une étape de réduction au préalable. De plus, la position des résidus cystéine est proche des sites de reconnaissance, pouvant donc altérer la liaison aux cellules cibles. Enfin, les composés maléimide précurseurs du lien thioéther sont sensibles au pH.

Pour finir, la fonctionnalisation des amines primaires d'une biomolécule par un azoture permet une réaction de Huisgen avec une fonction alcyne pour former un lien triazole [Figure 39 D].^[91] Cette dernière méthode nécessite cependant de dénaturer la biomolécule pour générer la fonction azoture et utilise du cuivre (I) pouvant être un frein lorsqu'on utilise des ligands pour le cuivre (II).

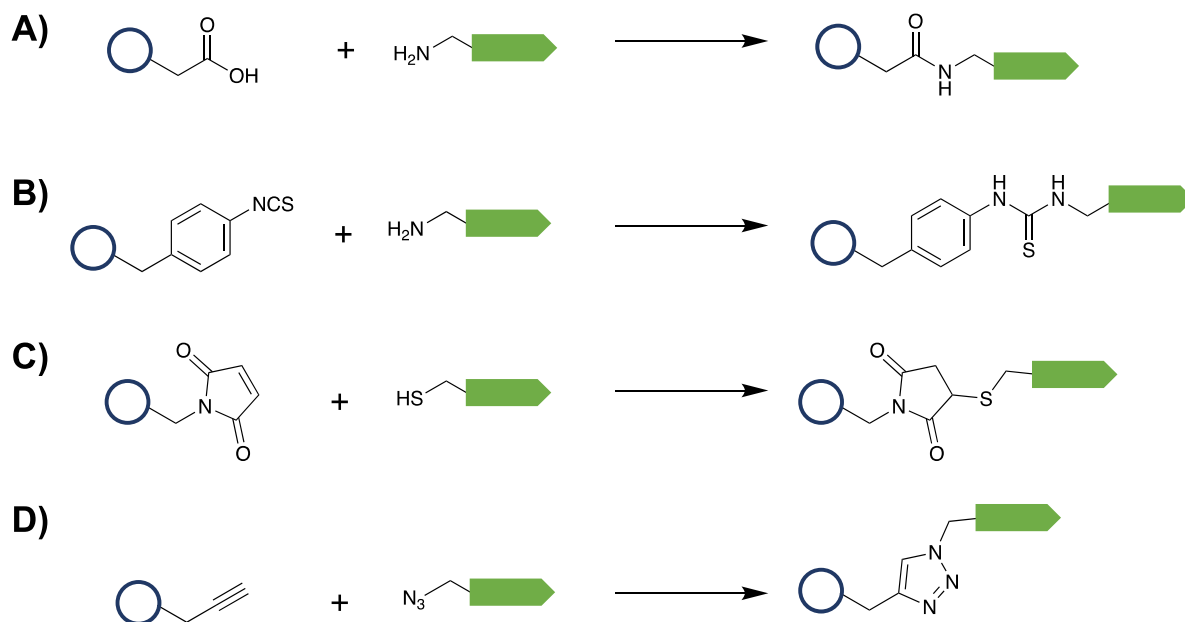


Figure 39 : Stratégies pour relier le chélateur à l'unité de ciblage^[91]

4.2. Stratégies de bifonctionnalisation

L'introduction de la fonction dédiée à la bioconjugaison sur le ligand polyazoté comme le **cyclam** (ou le **cyclen**) peut se faire selon différentes stratégies : (1) la dénaturation d'un des bras coordonnant ou d'une amine secondaire du macrocycle, (2) l'introduction d'une fonction supplémentaire sur un bras coordonnant, ou (3) la modification du macrocycle par une C-fonctionnalisation [Figure 40].

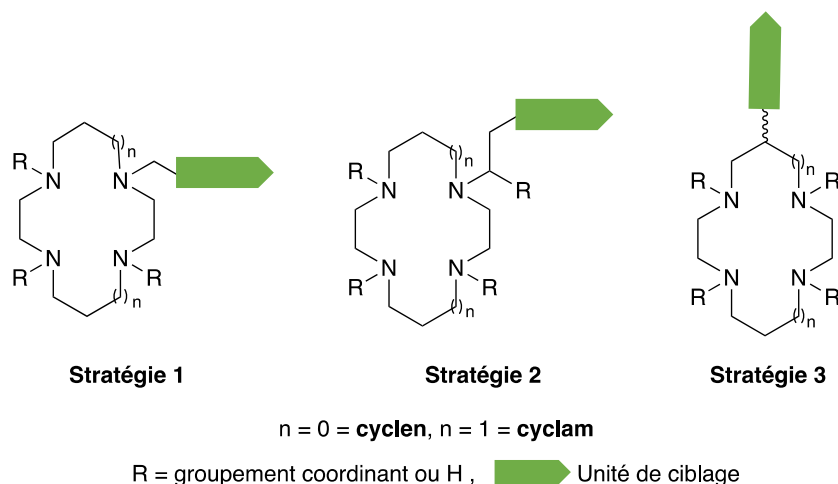


Figure 40 : Représentation des trois voies de bifonctionnalisation d'un **cyclen** ou d'un **cyclam**

La première stratégie modifie la nature chimique du ligand d'origine. En effet, quand les ligands sont porteurs de fonctions acétate par exemple, l'une d'entre elle est utilisée après activation (*N*-hydroxysuccinimide par exemple) pour la conjugaison et devient alors une fonction amide, aux propriétés de coordination différentes. Cette évolution peut être à moindre effet, par exemple dans le cas du **DOTA** pour la complexation du cuivre où deux fonctions acétate ne sont pas impliquées dans la coordination (seule la charge du complexe changeant), mais peut avoir plus de conséquences dans le cas du **TE2A** et du **NOTA** par exemple [Figure 41].^[93,94] D'autres exemples relatent la mise à profit d'une amine restée libre du macrocycle pour la fonctionnaliser par le bras destiné au greffage. Dans ce cas l'évolution d'une amine secondaire en amine tertiaire a bien souvent pour conséquence la baisse des performances de coordination du chélate.^[95]

La seconde stratégie conduit à la modification d'un groupement coordinant par ramification permettant de conserver intacte la fonction dédiée à la coordination et ainsi les propriétés de complexation du ligand. Le **NODAGA** et le **DOTAGA**, macrocycles porteurs d'une fonction glutarate ont été conçus dans cette idée.^[96,97] Leur réaction sur une fonction amine, mène facilement aux liaisons peptidiques souhaitées [Figure 41]. Dans ces cas, la fonction ajoutée se situe suffisamment loin du centre métallique pour ne pas influencer le schéma de coordination.

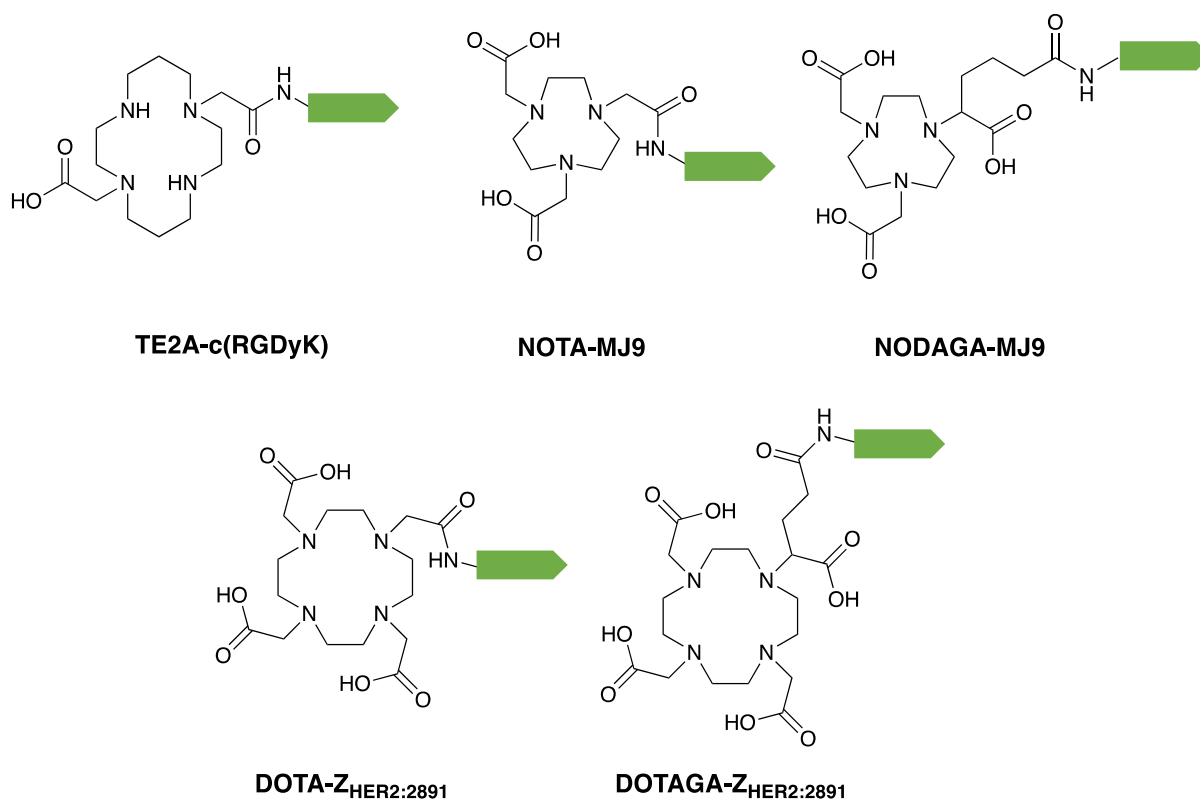


Figure 41 : Exemple de stratégie de bioconjugaison sur le **cyclam**, le **tacn** et le **cyclen**

H. R. Maecte et coll. ont confirmé l'influence de la stratégie de bioconjugaison en étudiant le radiomarquage avec le gallium-68 entre les chélates **NOTA** et **NODAGA** en 2014. Pour ce faire, les ligands ont été greffés sur un peptide synthétique, le **MJ9** par liaison peptidique à l'aide d'HATU (hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium) comme agent de couplage. L'étude de radiomarquage révèle que le composé **NODAGA-MJ9**, préservant les trois groupements carboxylate, possède la meilleure activité spécifique.^[98] Le sacrifice d'un groupement carboxylate conduit donc à un rendement de radiomarquage plus faible signe d'une affinité de coordination réduite.

V. Tolmachev et coll. ont réalisé le même constat en 2016 lors de l'étude comparative entre les chélates **DOTA** et **DOTAGA** greffés au peptide Z_{HER2:2891}, **DOTA-Z_{HER2:2891}** et **DOTAGA-Z_{HER2:2891}**. Ici, le composé **DOTAGA-Z_{HER2:2891}** démontre une accumulation plus importante au niveau des tumeurs à imager, cette différence de comportement est corrélée avec la différence de charge entre les complexes. L'utilisation d'un groupement acétate pour la liaison peptidique conduit à un complexe neutre avec l'ion Ga³⁺ tandis que le complexe formé avec le **DOTAGA-Z_{HER2:2891}** conduit à un complexe chargé négativement.^[99]

Les composés issus des stratégies 1 et 2 sont donc d'efficacité inégale et la seconde apparaît clairement comme plus adaptée à une application en médecine nucléaire. Les 2 types de composés sont d'ailleurs commerciaux et largement utilisés. Toutefois, leur synthèse reste délicate puisqu'elle nécessite une régio-*N*-fonctionnalisation du macrocycle qui doit être effectuée pour chaque chélate souhaité. De plus, la seconde stratégie génère un carbone asymétrique donnant lieu à des problèmes de synthèse et de caractérisation des énantiomères.

Ainsi, la troisième stratégie peut être perçue comme une alternative intéressante aux problèmes rencontrés par les 2 précédentes. Elle fait intervenir la modification du squelette carboné d'un macrocycle de type **tacn**, **cyclen** ou **cyclam** pour conserver la structure du ligand original. Elle a pour avantage, pour les ligands tétra-fonctionnalisés par exemple, d'utiliser la même base macrocyclique qui peut être diversement *N*-substituée. Ainsi, la synthèse des composés *C*-fonctionnalisés des dérivés **NOTA**, **DOTA** et **TETA** ont été réalisées pour conduire aux ***p*-SCN-Bn-NOTA**, ***p*-SCN-Bn-DOTA** et ***p*-SCN-Bn-TETA** [Figure 42].^[100,101]

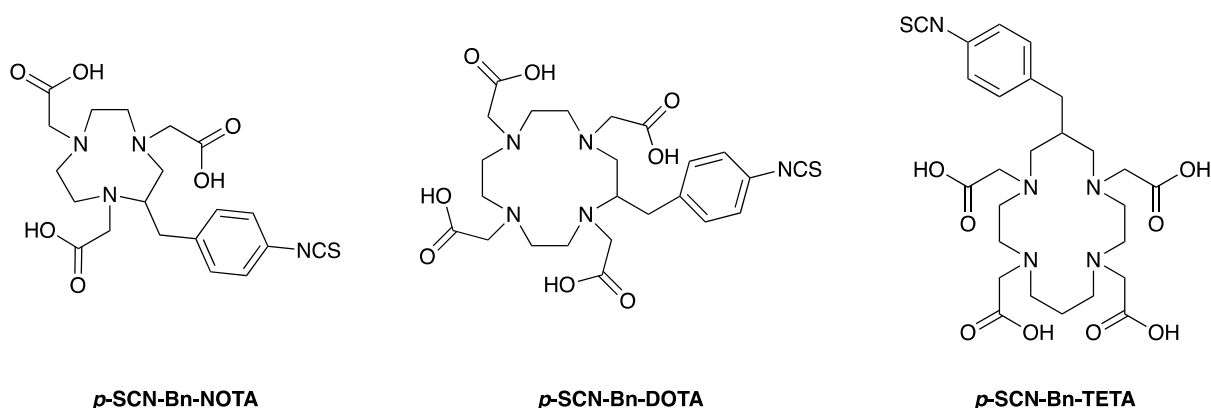


Figure 42 : Représentations des ligands *C*-fonctionnalisés ***p*-SCN-Bn-NOTA**, ***p*-SCN-Bn-DOTA** et ***p*-SCN-Bn-TETA**

Les études de coordination discutées dans le paragraphe II. de ce chapitre mettent en avant que le **cyclam** est le macrocycle le plus adapté pour la coordination du cation Cu^{2+} , c'est pourquoi nous l'avons retenu pour ce travail de thèse. Des travaux du laboratoire ont porté sur l'étude de l'influence de la *C*-fonctionnalisation sur les propriétés de coordination du ligand pour le cuivre (II) en le comparant au ligand parent. Ainsi, le **cyclam** a été comparé au **cyclam-hydroxyéthyle (cyclam-EtOH)** et le **tétraméthyle-cyclam (TMC)** au **tétraméthyle-cyclam-hydroxyéthyle (TMC-E)**.^[102] La fonction hydroxyéthyle a été choisie pour sa passivité dans tout phénomène de coordination du chélate, de même pour les substituants méthyle.

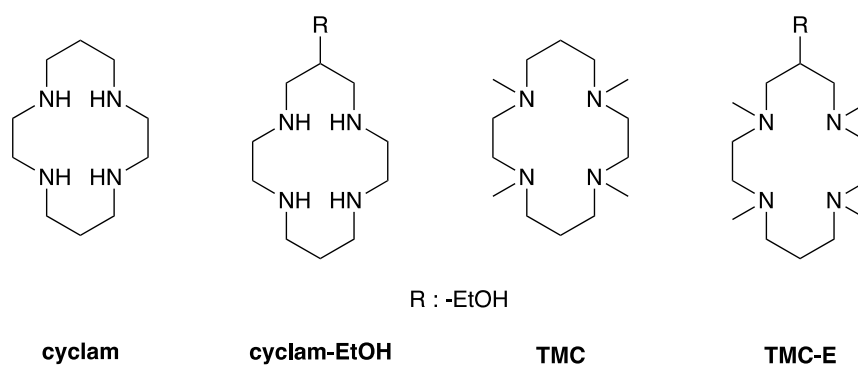


Figure 43 : Représentations du **cyclam**, **cyclam-EtOH**, **tétraméthyle-cyclam** et **tétraméthyle-cyclam-EtOH**

La C-fonctionnalisation du **cyclam** par le groupement hydroxyéthylène n'altère pas les propriétés de coordination du cuivre (II). En effet, les constantes thermodynamiques pCu ne sont que très légèrement modifiées, le **cyclam-hydroxyéthyle** ayant un pCu de 19,5 contre 20,4 pour le **cyclam**. La différence est même moindre concernant les dérivés tétraméthylés avec une diminution du pCu d'uniquement 0,5 lorsque l'on passe à la version C-fonctionnalisée du ligand. Le comportement électrochimique des complexes de cuivre (II) formés avec les dérivés tétraméthylés est identique avec un potentiel de réduction à -0,87 V (vs Ag^+/Ag). En revanche, la résistance à la dissociation en milieu acide (HCl 5 M, 50 °C) est même meilleure en présence de la C-fonctionnalisation, le temps de demi-vie du complexe $[Cu(\mathbf{TMC-E})]^{2+}$ atteignant 699 min contre 374 min pour le complexe $[Cu(\mathbf{TMC})]^{2+}$. De même pour $[Cu(\mathbf{cyclam})]^{2+}$ qui présente un $t_{1/2}$ de 384 min, tandis que le complexe $[Cu(\mathbf{Cyclam-EtOH})]^{2+}$ atteint 579 min [Tableau 17].

Tableau 17 : Récapitulatif des propriétés du **cyclam**, **cyclam-EtOH**, **TMC** et **TMC-E** avec le cuivre (II) [102–105]

	cyclam	cyclam-EtOH	TMC	TMC-E
log K_{CuL}^a	26,51	23,6	17,5	17,3
pCu^b	20,4	19,5	14,7	14,2
E_{red} (V vs Ag^+/Ag)	-1,50	-1,72	-0,87	-0,87
Inertie cinétique (min)^c	384	579	374	699

^a : I = 1 M KNO_3 T = 25 °C, ^b pH = 7,4, [L] = 2 [M²⁺] = 2.10⁻⁵ M, ^c HCl 5 M, 50 °C

Ainsi, la C-fonctionnalisation des macrocycles se présente comme une option intéressante en vue de la bioconjugaison. En effet, les propriétés de coordination des ligands sont conservées et l'inertie du complexe formé semble même améliorée. Néanmoins, cette stratégie demande de développer la synthèse du macrocycle porteur de cette fonction additionnelle, toute en introduisant les groupements coordinants souhaités de manière régiospécifique.

En 1977, I. Tabushi et al. rapportent les premiers dérivés de cyclam C-fonctionnalisés sur un atome de carbone en position β des atomes d'azote.^[106] La stratégie suivie est la condensation de la tétraamine linéaire, *N,N'*-bis-(2-aminoéthyl)-1,3-propane diamine (également appelée « **232** » en fonction du nombre d'atomes de carbone séparant les fonctions amines successives) avec des composés diester éthylique. Les composés C-fonctionnalisés ont été obtenus avec de faibles rendements globaux en deux étapes (< 25%).^[106] La préorganisation de la tétraamine permet d'obtenir de meilleurs rendements, en diminuant la formation de potentiel polymères. Pour cela, l'utilisation d'un effet de matrice organique, de type bisaminal, est réalisée par l'action d'un composé α -dicarbonylé avec la **232**. En 1998, le laboratoire a réalisé la condensation de la **232** avec la butanedione afin de générer le « *template* » **cis-232-butanedione** qui réagit ensuite sélectivement avec le bisélectrophile 1,3-dibromopropane pour conduire à la formation du **cyclam**.^[107] Cette stratégie, qui présente une préorganisation idéale obtenue avec un excellent rendement de synthèse (95%) a donc également pu être mise à profit pour la synthèse de plateformes **cyclam** C-fonctionnels. [Figure 44].

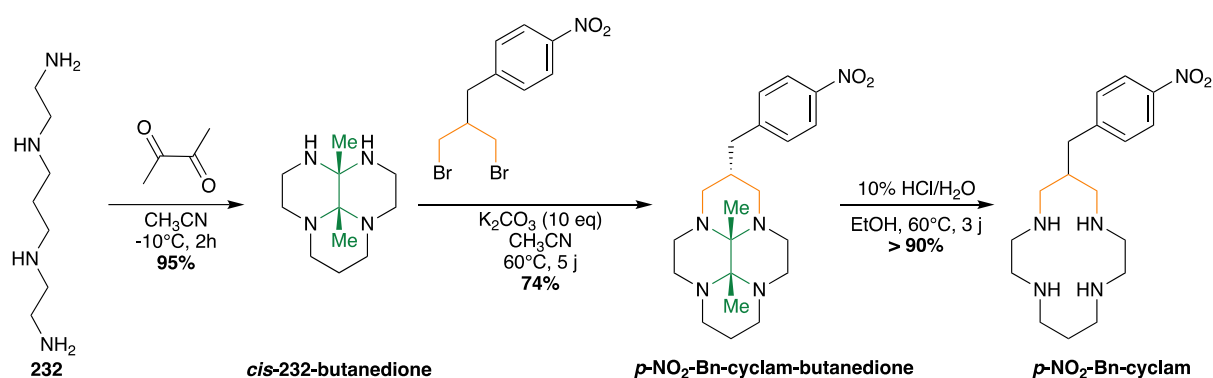


Figure 44 : Synthèse du *p*-NO₂-Bn-cyclam à partir de la *cis*-232-butanedione avec le bisélectrophile porteur d'un groupement nitrobenzyle^[108]

Ainsi, en 2004, l'équipe de S. J. Archibald a réalisé cette réaction de cyclisation avec un bisélectrophile de type 1,3-dibromopropane porteur d'un groupement fonctionnel *p*-nitrobenzyle, pour accéder au **cyclam** C-fonctionnalisé *p*-NO₂-Bn-cyclam. Cette modification du squelette carboné peut conduire à la formation de deux diastéréoisomères du composé intermédiaire *p*-NO₂-Bn-cyclam-butanedione, en fonction de l'orientation du groupement nitrobenzyle par rapport au pont bisaminal. Dans cette synthèse, seul le composé *anti* (pont bisaminal et groupement nitrobenzyle pointant vers les faces opposées du macrocycle) a été isolé, témoignant d'une réaction diastéréosélective. Néanmoins, la présence potentielle d'un mélange de diastéréoisomères à cette étape n'engendre pas de problème supplémentaire car la déprotection du composé élimine la chiralité induite par le pont bisaminal

sur les atomes d'azote conduisant à un seul produit présent en mélange racémique. L'hydrolyse acide du pont bisaminal conduit au composé **p-NO₂-Bn-cyclam** avec un rendement global de 70% en deux étapes [Figure 44].^[108]

Le **cyclam-hydroxyéthyle** présenté précédemment a été obtenu selon la même stratégie de synthèse, mais en utilisant un type de réactif différent pour la réaction de cyclisation à partir de la **cis-232-butanedione**. En effet, une lactone telle que la α -méthylène- γ -butyrolactone réalise dans un premier temps une addition de Michael entre l'alcène et l'amine secondaire du macrocycle qui est suivie d'une réaction d'addition et d'élimination entre la fonction ester et la seconde amine secondaire, conduisant au composé « oxo » du cyclam, C-fonctionnalisé par une chaîne hydroxyéthyle. Comme dans la synthèse précédente pour obtenir le **p-NO₂-Bn-cyclam**, la modification du squelette carboné induit la formation de diastéréoisomères *syn* et *anti*, le composé majoritaire étant de configuration *syn* avec un ratio de 95/5. La réduction de la fonction amide est réalisée par le BH₃·THF, suivie d'une hydrolyse acide permettant la déprotection du pont bisaminal pour obtenir le **cyclam-hydroxyéthyle** avec un rendement global de 54% en deux étapes [Figure 45].^[105]

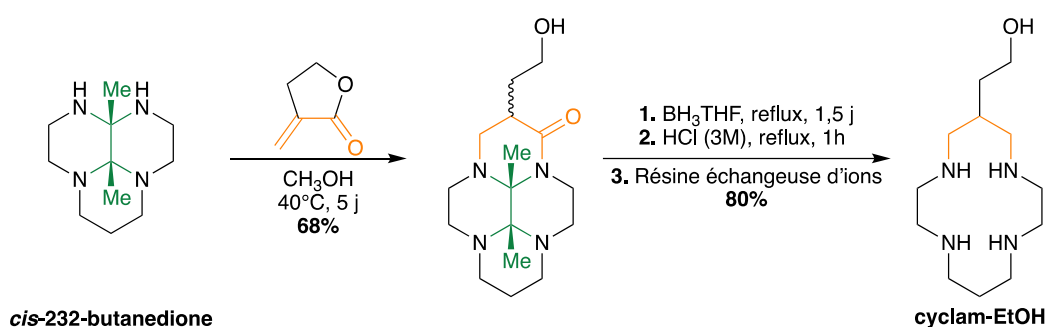


Figure 45 : Synthèse du **cyclam-EtOH** à partir de la **cis-232-butanedione** et de la lactone α -méthylène- γ -butyrolactone

Le laboratoire a étendu cette stratégie de synthèse en modifiant le cyclisant mais également en changeant la nature du bisaminal permettant d'obtenir un panel de **cyclam** C-fonctionnalisés, notamment pour une application en imagerie médicale.^[32]

5. TE1PA : Bioconjugaison et études biologiques

Suite aux études effectuées sur le ligand **TE1PA** montrant d'excellentes propriétés de coordination pour le cuivre (II), notamment en répondant au cahier des charges d'une application en médecine nucléaire, des études de radiomarquage avec le cuivre-64 ont été réalisées. Un rendement de radiomarquage quantitatif est obtenu à température ambiante au bout de 15 minutes, tandis que pour le **DOTA** il est nécessaire de chauffer à 80°C pendant 30 minutes pour obtenir un rendement similaire. La stabilité *in vitro* en milieu sérique est totale pendant 24h que ce soit à 4°C ou à 37°C. Les études de biodistribution *in vivo* du

radiocomplexe simple chez la souris saine ont montré une accumulation notable du complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ dans le foie et les reins 2h après injection, sans doute due à la charge positive du complexe et à une certaine lipophilie. Cependant, au bout de 24h, une excellente clairance est observée. De plus, l'étude du métabolisme hépatique révèle que le cuivre accumulé dans le foie est bien sous la forme du complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ intact, contrairement au cas du complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$, pour lequel une accumulation importante dans le foie a pu être attribuée à un relargage important de cuivre libre.^[109] Ces résultats témoignent du potentiel prometteur du **TE1PA** pour une application en imagerie TEP (ou en thérapie) à condition toutefois de pouvoir préparer un modèle bifonctionnel pour des applications vectorisées.

Les études réalisées sur le complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ mettant en évidence l'absence de coordination de la fonction acide du picolinate envers le cuivre (II), la première stratégie de bioconjugaison du **TE1PA** a été l'utilisation de cette fonction du « bras » partiellement coordinant. Dans un premier temps le **TE1PA** a ainsi été conjugué à un vecteur biologique, l'anticorps **F6** (une IgG1a murine) pour cibler les cancers colorectaux. La bioconjugaison de l'anticorps a été réalisée entre la fonction acide activée en hydroxysulfosuccinimide et les résidus lysine de l'anticorps pour former la liaison peptidique. Lors de cette étude, **F6-TE1PA** a été comparé au **DOTA** C-fonctionnalisé greffé sur le même anticorps par un lien thiourée, le **F6-p-SCN-Bn-DOTA** [Figure 46].^[110]

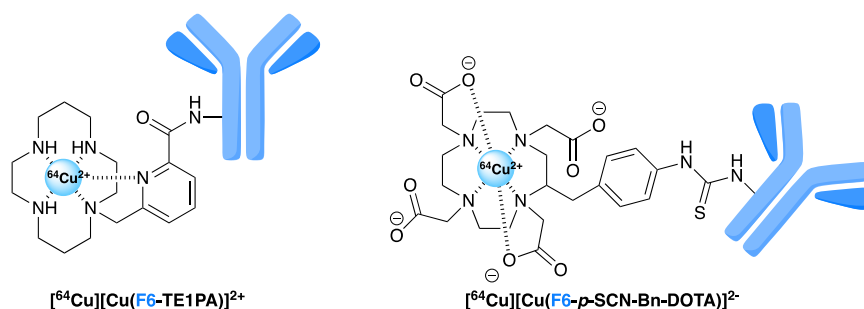


Figure 46 : Structures des radioconjugués $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-TE1PA})]^{2+}$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-p-SCN-Bn-DOTA})]^{2-}$ comparés lors d'une étude *in vivo* sur petit animal

Les rendements de bioconjugaison du **TE1PA** et du **p-SCN-Bn-DOTA** à l'anticorps relatent la difficulté à activer la fonction carboxylate aromatique avec un rendement de 37% tandis que le lien thiourée a été obtenu avec 90% de rendement. Pour chaque radioconjugué, le nombre de chélate par anticorps est de un, taux suffisant pour réaliser une étude.

Bien que la fonction acide carboxylique n'intervienne pas dans la coordination du cuivre (II), son utilisation dans la conjugaison avec l'anticorps engendre une modification de la cinétique de complexation du **F6-TE1PA** avec le cuivre-64. En effet, la réaction de complexation du cuivre (II) est plus lente que pour le **TE1PA** « seul », où il faut 45 minutes à température

ambiante pour obtenir un rendement similaire à celui du **TE1PA**, réalisé en 15 minutes à la même température.

La résistance au phénomène de transchélation des radioimmunoconjugués a été évaluée *in vitro* par des mesures de compétition avec le ligand **EDTA**. En présence d'un large excès du ligand compétiteur (50 000 équivalents), une très faible transchélation a été observée pour les deux radioimmunoconjugués $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-}p\text{-SCN-Bn-DOTA})]^{2-}$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-TE1PA})]^{2+}$ (5 et 4% respectivement).

Les deux radioconjugués ont ensuite été étudiés *in vivo* sur modèle murin xéno greffé avec des cellules LS174T (cancer colorectal). Le principal ligand endogène compétiteur pouvant induire une transchélation du cuivre (II) est l'enzyme SuperOxydeDismutase (SOD), fortement présente dans le foie, organe dans lequel les chélates présentent une certaine rétention, à l'image de la biodistribution du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$. Les analyses du métabolisme hépatique révèlent que le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-TE1PA})]^{2+}$ résiste mieux à la transchélation par la SOD que le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-}p\text{-SCN-Bn-DOTA})]^{2-}$ (22% et 52% de transchélation 24h après injection respectivement). Les images TEP/Scan obtenues 24h après injection ne montrent pas de grande différence au niveau de l'accumulation des radiopharmaceutiques au sein de la tumeur.

Cette étude n'a pas permis de démontrer un réel gain en termes d'imagerie entre le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-TE1PA})]^{2+}$ et le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{F6-}p\text{-SCN-Bn-DOTA})]^{2-}$, en particulier car les qualités de chélation du **TE1PA** semblent altérées par cette stratégie de greffage. La fonction acide du picolinate, bien que n'intervenant pas dans la coordination du cuivre (II), participe vraisemblablement à l'inertie du complexe ainsi qu'au processus de complexation, démontré par une cinétique de formation plus lente lorsque cet acide est modifié, qui laisse penser que la fonction acide assiste la formation du complexe au travers d'un effet de « canne à pêche ». De plus, la liaison amide formée vient changer la charge finale du complexe (+2 au lieu de +1), ce qui peut altérer là encore le comportement du radiocomplexe. Afin de conserver la fonction acide du picolinate intacte, il a ainsi été envisagé de synthétiser un analogue C-fonctionnalisé du **TE1PA**, comme vu dans les différentes stratégies de bifonctionnalisation.

Les travaux de thèse du Dr Thomas Le Bihan au sein de notre laboratoire se sont portés sur la synthèse d'un dérivé de **TE1PA** C-fonctionnalisé par un groupement benzylisothiocyanate, le **p-SCN-Bn-TE1PA** et de son étude pour l'imagerie TEP au cuivre-64 du myélome multiple après greffage sur l'anticorps **9E7.4** (une IgG_{2a} murine anti CD138).^[23] Les propriétés de ce radiopharmaceutique ont été comparées avec les analogues **NHS-DOTA** et **p-SCN-Bn-NOTA**, tous deux étant greffés sur l'anticorps **9E7.4** via une liaison peptidique et un lien thiourée respectivement [Figure 47].

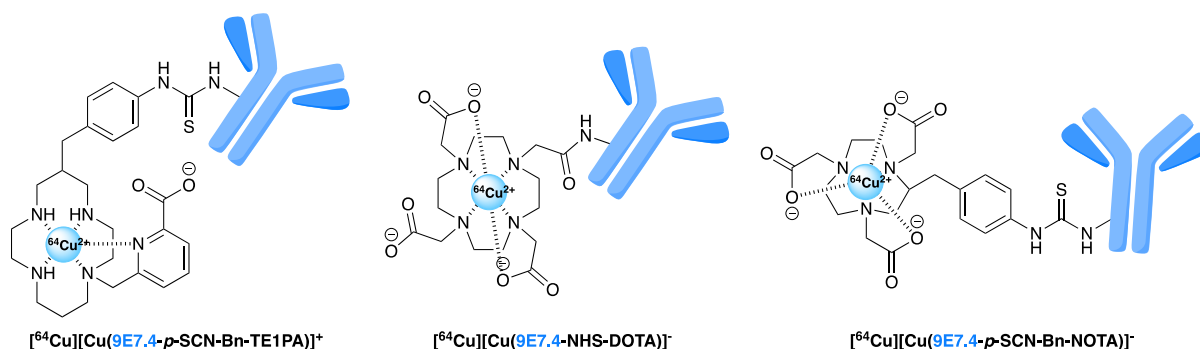


Figure 47 : Bioconjugués radiomarqués $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$, $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-NHS-DOTA})]^-$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-NOTA})]^-$

À la différence du greffage *via* la fonction picolinate, le couplage *via* la fonction isothiocyanate du dérivé **p-SCN-Bn-TE1PA** conduit à un taux de greffage de 5 ligands par anticorps. En revanche, le **p-SCN-Bn-NOTA** conduit à un taux de greffage d'un seul ligand par anticorps. Malgré les 5 ligands **TE1PA** greffés sur l'anticorps, l'immunoréactivité reste satisfaisante pour le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et atteint 84,2%, tandis que le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-NHS-DOTA})]^-$ présente une immunoréactivité plus faible (76,5%). Le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-NOTA})]^-$ lui, conduit à une immunoréactivité de 58,3%. L'efficacité de radiomarquage avec le cuivre-64 est remarquable avec plus de 99% de rendement pour les dérivés $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-NHS-DOTA})]^-$ et légèrement plus de 95% pour le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-NOTA})]^-$ [Tableau 18].^[24]

Tableau 18 : Caractérisation des radioimmunoconjugués $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$, $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-NHS-DOTA})]^-$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-NOTA})]^-$ après radiomarquage au cuivre-64^[24]

$[^{64}\text{Cu}]9\text{E}7.4\text{-}$	p-SCN-Bn-TE1PA	NHS-DOTA	p-SCN-Bn-NOTA
Ratio ligand/anticorps	5 ± 1	4,5 ± 1	1,2 ± 0,2
Immunoréactivité (%)	84,2 ± 1,3	76,5 ± 2,5	58,3 ± 4,5
Rendement de radiomarquage	99,3 ± 0,4	99,7 ± 0,6	95,7 ± 3,6

Compte tenu du faible nombre de ligands par anticorps ainsi que la baisse d'immunoréactivité du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-NOTA})]^-$, la suite de l'étude ne s'est portée que sur la comparaison de biodistribution, du métabolisme et de l'imagerie TEP entre le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-NHS-DOTA})]^-$ sur modèle murin xéno greffé par des cellules 5T33 (myélome multiple). Deux heures après injection, la majorité de l'activité est retrouvée dans le sang et les organes vascularisés comme le cœur, les poumons et le foie. Au bout de 24h après injection, l'activité mesurée dans le foie a diminué d'un facteur 1,9 avec l'injection du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(9\text{E}7.4\text{-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ tandis que l'activité

mesurée après injection du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-NHS-DOTA})]^-$ est restée la même, ces résultats témoignent d'une bonne clairance pour le dérivé **TE1PA**. La transchélation du cuivre par l'enzyme SOD est minimisée dans le cas du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ tandis que pour le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-NHS-DOTA})]^-$, une importante transchélation est observée.

Les images TEP/Scan obtenues 2h après injection confirment les études de biodistribution par une accumulation des radiopharmaceutiques au niveau du cœur. Pour les deux radiopharmaceutiques, malgré la pharmacocinétique lente des anticorps, les tumeurs sont visibles 2h après injection. L'excellente clairance du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ par rapport au $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-NHS-DOTA})]^-$, a été mise en valeur par la diminution de l'activité dans le foie et le contraste de la tumeur amélioré 24h après injection [**Figure 48**].

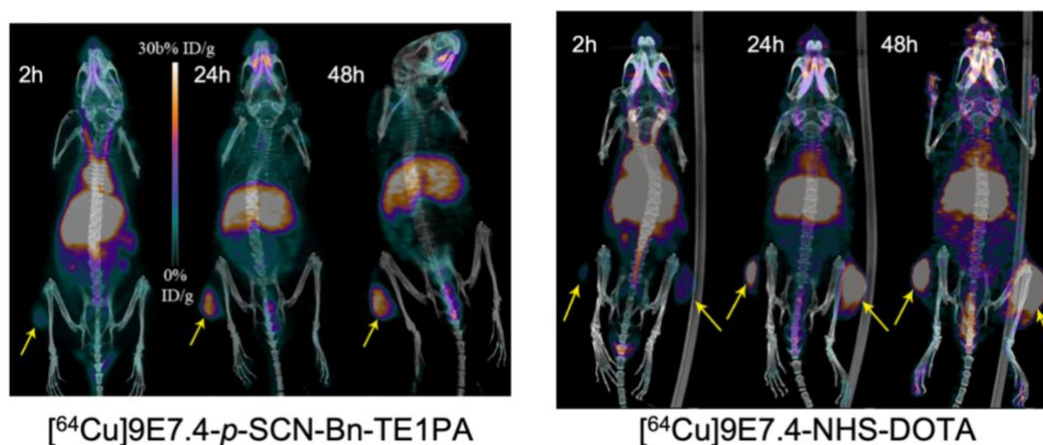


Figure 48 : Images TEP/Scan de souris xéno greffées par les cellules 5T33 à 2h, 24h et 48h après injection du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ (gauche) et du $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-NHS-DOTA})]^-$ (droite). Les flèches jaunes indiquent les tumeurs.^[24]

Le **TE1PA** présente des propriétés de coordination du cuivre excellentes et la C-fonctionnalisation introduite a permis le greffage sur anticorps 9E7.4 et la conception d'un nouveau radiopharmaceutique, le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$. Ce dernier a montré un très bon ciblage tumoral accompagné d'une clairance importante et adéquate pour de futures applications. De plus, ce nouveau radiopharmaceutique est meilleur en termes de stabilité *in vivo* et de résistance à la transchélation que ses analogues $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-NHS-DOTA})]^-$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\mathbf{9E7.4-p-SCN-Bn-NOTA})]^-$.

V. CXCR4, un récepteur de chimiokine à imager

L'imagerie nucléaire vectorisée nécessite de cibler des marqueurs spécifiques des pathologies. Les cellules cancéreuses possèdent des entités intéressantes permettant de les cibler, comme des récepteurs ou des antigènes spécifiques.

1. CXCR4 et son unique ligand CXCL12

Les chimiokines représentent une famille de petites protéines (cytokines) composées de 70 à 100 acides aminés (AA) dont le poids moléculaire est de l'ordre de 8 à 10 kDa. Pour les distinguer, les cytokines sont classées en quatre groupes en fonction de l'espacement compris entre deux résidus cystéines N-N terminales [Figure 49].^[111]

- C ou gamma : uniquement deux cystéines
- CC : deux premières cystéines adjacentes
- CXC : un AA entre les deux premières cystéines
- CX3C : trois AA entre les deux premières cystéines

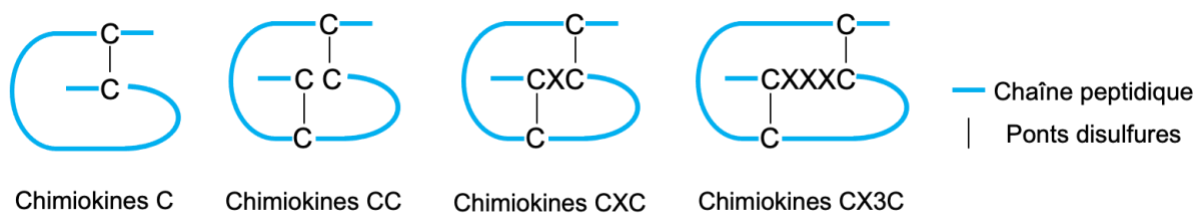


Figure 49 : Représentation schématique des 4 sous-familles de chimiokines

À ce jour, plus de 50 chimiokines et environ 20 récepteurs ont été identifiés. La chimiokine CXCL12 (aussi appelée SDF-1) est exprimée dans les poumons, le foie, la peau ainsi que la moelle osseuse. CXCL12 a la particularité d'être l'unique ligand naturel du récepteur de chimiokine CXCR4, un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales et hématopoïétiques. Ce récepteur est composé de 352 acides aminés et a un poids moléculaire de 48 kDa. CXCL12 se distingue des autres chimiokines CXC en ayant son gène sur le chromosome 10 tandis que toutes les autres sont retrouvées sur le chromosome 4.^[112] L'axe CXCL12/CXCR4 est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques allant du développement embryonnaire à la régulation homéostatique de différents organes.

2. Implication du récepteur CXCR4 dans l'organisme

2.1. Rôle de CXCR4 dans l'organisme sain

Le rôle principal des chimiokines est le chimiotactisme (mobilité des cellules en fonction des espèces chimiques présentes), notamment avec le recrutement des leucocytes dans le flux circulant pour les placer sur leurs sites d'action.^[113-115] Ce phénomène est primordial pour le développement physiologique de l'organisme. La sécrétion localisée du ligand CXCL12 par l'organisme induit un signal recrutant des cellules CXCR4-positives (CXCR4⁺) qui vont conduire à la croissance des vaisseaux sanguins (angiogenèse), la formation des cellules sanguines (hématopoïèse) ainsi que la formation des différents lymphocytes (lymphopoïèse) [Figure 50].

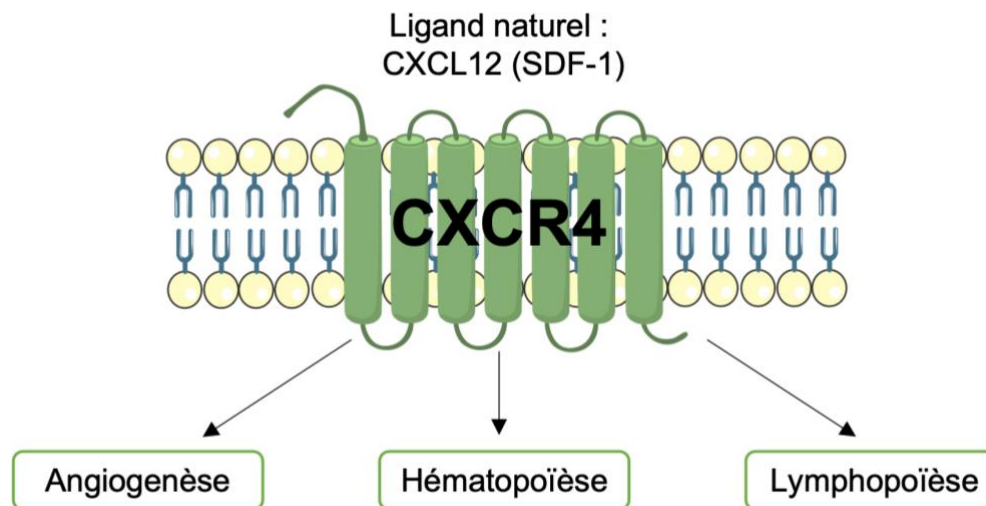


Figure 50 : Schéma de l'implication de l'axe CXCL12/CXCR4 dans l'organisme sain

En 1998, T. Nagasawa et al. rapportent l'étude d'embryons sur modèle murin en absence soit du récepteur CXCR4, soit de la chimiokine CXCL12. Les résultats obtenus montrent qu'en l'absence d'une de ces protéines, la moitié des embryons est décédée avant la fin du développement embryonnaire, tandis que les autres embryons ont présenté une croissance normale. Malgré tout, les embryons arrivés à la fin du développement sont morts quelques heures après leurs naissances en présentant des anomalies, comme une taille réduite ou encore des œdèmes, liés à l'absence du récepteur CXCR4.^[116-119]

2.2. Rôle de CXCR4 dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

Le VIH fait partie de la famille des rétrovirus, dont le matériel génétique est constitué d'ARN. L'enzyme virale contenue induit la rétro-transcription du génome de l'ARN en ADN au sein de

la cellule hôte, utilisant ainsi la machinerie cellulaire de notre organisme pour l'infecter. Le VIH contamine l'humain en affaiblissant le système immunitaire favorisant ainsi les infections. Face à cette maladie, les investigations sur le mécanisme d'entrée du virus au sein de l'organisme ont débuté à la fin du 20^{ème} siècle. Deux types de virus ont été identifiés, le VIH-1 et le VIH-2, la similarité des deux virus est de 42% mais le VIH-1 est le plus fréquent. Neuf souches du virus existent et sont corrélées à des zones géographiques. Le mécanisme de pénétration du virus au sein des cellules se fait par fusion membranaire. Pour cela, la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 se lie au récepteur CD4 présent à la surface des cellules. ^[120] Pour permettre l'internalisation du virus, deux récepteurs de chimiokines interviennent en tant que co-récepteurs : CCR5 et CXCR4 **[Figure 51]**.^[121]

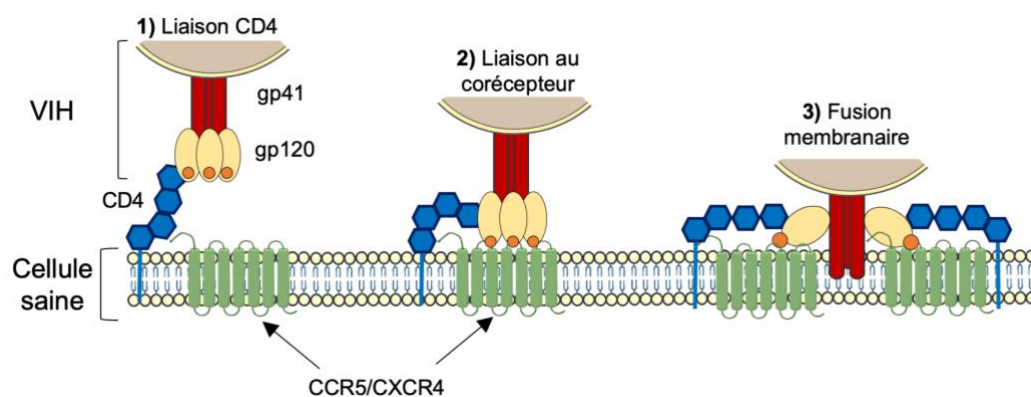


Figure 51 : Schéma du mécanisme d'entrée du VIH au sein des cellules

2.3. Rôle du récepteur CXCR4 dans les cancers

En plus du rôle de CXCR4 dans l'infection par le VIH, des études ont montré son implication dans les cancers. Ce récepteur, avec son ligand CXCL12 est exprimé par les cellules malignes de 23 types de cancers.^[25,122-126] CXCR4 étant un récepteur de chimiokines responsable du chimiotactisme, il vient déréguler les processus physiologiques afin de favoriser la croissance tumorale, l'invasion, la survie ainsi que la localisation des tumeurs. De ce fait, une croissance tumorale agressive est liée au recrutement des cellules inflammatoires positives à CXCR4 par CXCL12.^[127]

Le myélome multiple (MM) est la seconde forme la plus courante des hémopathies malignes après le lymphome non-Hodgkinien. Ce cancer est caractérisé par une accumulation de plasmocytes anormaux au niveau de la moelle osseuse. Les plasmocytes étant responsables de la production des anticorps, une production excessive de protéines immunoglobulines monoclonales dans la moelle osseuse est également un marqueur de cette pathologie.^[128] Il est important de noter que l'accumulation des plasmocytes peut également avoir lieu dans des

tissus extramédullaires (en dehors de la moelle osseuse) entraînant des complications comme des lésions de la moelle osseuse, des maladies rénales, une hypercalcémie ou encore une anémie. La localisation des plasmocytes étant contrôlée par la chimiotaxie induite par les chimiokines au sein de l'organisme, il est probable que des chimiokines soient impliquées dans ces dérèglements. En effet, l'axe CXCR4/CXCL12 joue un rôle important dans la progression du myélome multiple, étant donné son implication dans le développement des cellules normales. Cet axe régule la localisation, l'adhésion, l'invasion, la migration ainsi que la mobilisation des cellules du MM en dehors de la moelle osseuse.^[129]

3. Ciblage de CXCR4

Considérant l'implication de l'axe CXCR4/CXCL12 dans différentes pathologies (VIH et cancers), son inhibition d'un point de vue thérapeutique a été étudiée. L'utilisation d'antagonistes de CXCR4 permet de bloquer la liaison du ligand CXCL12, qui va pouvoir limiter le mode d'action de certaines pathologies. D'autre part, il est possible d'utiliser les antagonistes du récepteur en tant que vecteur dans le développement de radiopharmaceutiques.

3.1. Anticorps en tant qu'antagonistes

Actuellement, le nombre d'anticorps monoclonaux (anticorps fabriqués spécifiquement pour traiter une maladie) approuvés par l'agence européenne de médecine est aux alentours de 40 dans le cadre d'indications en oncologie.^[130] Les anticorps sont des immunoglobulines dont la structure est composée de 4 chaînes polypeptidiques, deux lourdes et deux légères, reliées entre elles à l'aide de ponts disulfures. La structure des anticorps adopte une forme dite en Y avec un poids moléculaire approximatif de 150 kDa [Figure 52]. Les anticorps possèdent un temps de demi-vie dans le flux sanguin long, pouvant aller de quelques heures jusqu'à plusieurs semaines pour certains.

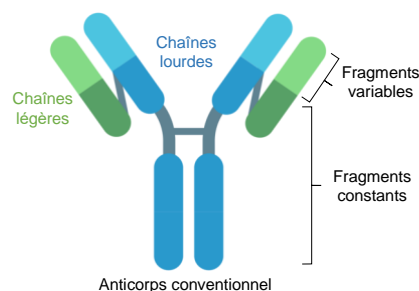


Figure 52 : Structure d'un anticorps conventionnel

Le ciblage de CXCR4 a été étudié pour une dizaine d'anticorps, mais actuellement aucun n'est approuvé en clinique. L'Ulocuplumab (aussi connu sous les noms : MDX-1338 et BMS936564) est le premier anticorps synthétique totalement humain anti-CXCR4 de la classe IgG4. Cet anticorps présente une affinité nanomolaire envers CXCR4 et bloque la liaison de CXCL12, inhibant ainsi la migration cellulaire. La liaison de Ulocuplumab avec CXCR4 semble induire un signal provoquant l'apoptose sur un panel de lignées cellulaires tumorales et réduit de façon significative la croissance tumorale *in vivo* sur plusieurs modèles de xénogreffes. Son étude en phase clinique est en cours. ^[29,131] L'anticorps monoclonal 12G5 a été décrit en 1996 par M. J. Endres et al. comme étant spécifique du récepteur CXCR4. ^[132,133] La majorité des études cellulaires pour l'inhibition de CXCR4 utilise cet anticorps disponible commercialement comme référence.

3.2. Dérivés de peptides en tant qu'antagonistes

Un dérivé de peptide composé de 14 acides aminés et d'un pont disulfure, le **T140** a été identifié comme antagoniste de CXCR4. ^[28] L'affinité d'une molécule pour un récepteur est exprimée par son IC₅₀ (concentration pour laquelle 50% du récepteur est inhibé). L'affinité du peptide **T140** a été mesurée en fonction de sa capacité à empêcher la liaison du récepteur CXCR4 avec son anticorps spécifique, le 12G5 et l'IC₅₀ obtenue est remarquable, avec une valeur de 2,5 nM. Les expériences ont permis de mettre en valeur 4 acides aminés indispensables sur le peptide pour avoir une reconnaissance auprès de CXCR4 : Arg2, L-3-(2-naphtyl)alanine 3 (Nal 3), Tyr5 et Arg14. La structure 3D de **T140** a montré que ces AA sont proches et qu'ils se situent en dehors du pont disulfure.

À partir de ces informations, un dérivé pentapeptide cyclique regroupant ces 4 AA a été identifié comme un antagoniste de CXCR4, c'est le **FC131**. ^[134] Le remplacement d'un résidu arginine par l'épimère *N*-méthyl-*D*-arginine a conduit à l'identification du nouvel antagoniste **FC122** possédant une meilleure activité inhibitrice (37 nM contre 126 nM pour **FC131**) [Figure 53]. ^[135]

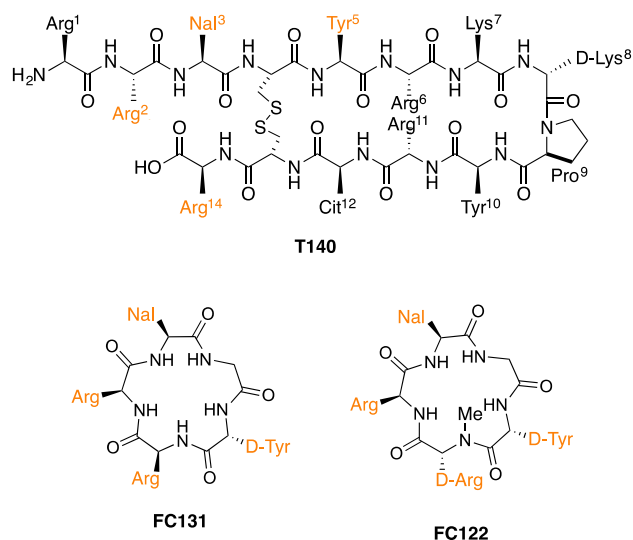


Figure 53 : Structures de **T140** et ses dérivés **FC131** et **FC122**. Sont représentés en orange les résidus indispensables à l'activité potentielle de **T140** à l'inhibition de CXCR4. Nal = L-3-(2naphtyl)alanine, Cit = L-citrulline

3.3. Des molécules organiques en tant qu'antagonistes

Un bis-cyclam dont les deux macrocycles sont reliés par un pont benzylique, l'**AMD3100** présente une excellente affinité pour le récepteur CXCR4. Dans le cadre du myélome multiple, ce composé permet par exemple d'augmenter la sensibilité des cellules de MM face au traitement en perturbant leur liaison avec les cellules de la moelle osseuse. Les études cliniques ont également montré que l'**AMD3100** est un mobilisateur efficace des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Cela permet de stimuler la croissance de ces cellules notamment avant une greffe par exemple. C'est en 2008 que la FDA a approuvé l'utilisation de l'**AMD3100** sous le nom de Mozobil™ pour cette application.^[136] En revanche, certains développements cliniques sont limités par le manque de biodisponibilité orale (proportion du médicament intact dans la circulation sanguine par rapport à la dose ingérée) due à la charge hautement positive (+4) à pH physiologique de l'**AMD3100**. Cette charge est liée à la protonation de quatre amines secondaires sur les macrocycles de l'**AMD3100**. Pour améliorer cette propriété, des dérivés monocyclam porteurs d'hétérocycles ont été synthétisés. Parmi ces différentes molécules, l'**AMD3465**, basée sur un monocyclam porteur d'une fonction méthylène-pyridine, qui à pH physiologique présente une charge positive de +3 (deux amines du macrocycle et l'amine secondaire sont protonées), se démarque des autres [Figure 54]. En effet, elle présente une meilleure affinité envers CXCR4 que le bis-cyclam **AMD3100**. L'IC₅₀ d'inhibition de la liaison avec l'anticorps 12G5 est de 0,75 nM contre 37,5 nM respectivement.^[137]

Plusieurs dérivés non macrocycliques comprenant des motifs imidazole, benzimidazole, pyridine ou guanidine fonctionnalisés, ont également été étudiés. Parmi eux, l'**AMD070** (aussi appelé **AMD11070**) est la première « petite molécule » inhibitrice de CXCR4 présentant une biodisponibilité orale.^[31]

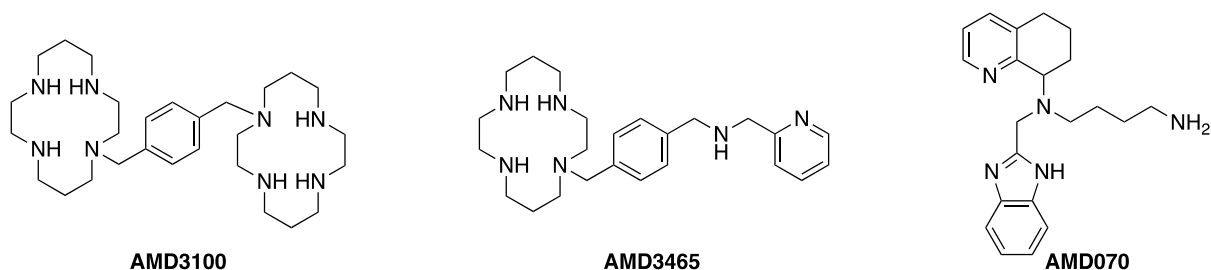


Figure 54 : Structures de plusieurs « petites molécules » synthétiques antagonistes de CXCR4

Dans un premier temps, ces antagonistes ont été envisagés en tant que traitement pur par inhibition de CXCR4. Dans un second temps, leur utilisation à des fins d'imagerie a également été étudiée et sera discutée dans les chapitre 2 et 3 de ce manuscrit.

Conclusion

Au cours de ces rappels bibliographiques, les propriétés de coordination du cuivre (II) ont été présentées ainsi que les méthodes de caractérisations des complexes formés. Dans le but de former des complexes stables, différentes classes de ligands ont été étudiées. Parmi celles-ci, il a été montré que les composés azamacrocycliques présentent une affinité très marquée pour la coordination de cations métalliques grâce aux effets chélate et macrocyclique, et de façon très notable pour les métaux de transition dont le cuivre (II).

Dans le but d'amplifier les propriétés tant thermodynamiques que cinétiques et électrochimiques des plateformes macrocycliques de base vis-à-vis du cuivre (II) pour permettre d'éventuelles applications en imagerie et thérapie, différents groupements coordinants ont été ajoutés aux macrocycles les plus performants, comme le **tacn**, le **cyclen** et le **cyclam**. Des fonctions acétate, méthylphosphonate, picolyle et picolinate ont par exemple été envisagées et ont permis de mener progressivement à des combinaisons des plus pertinentes. Le design de ces composés a été permis grâce à l'élaboration au fil des années de différents outils de synthèse macrocyclique permettant la *N*-fonctionnalisation régiosélective des macrocycles, en particulier du **cyclen** et du **cyclam**. Les études structurales en solution et à l'état solide complètent les études analytiques de stabilité et d'inertie et ont permis de mettre en exergue plusieurs tendances. Ainsi, par exemple, il apparait clairement

que la taille de la cavité macrocyclique du **cyclam** et son enchainement d'atomes sont parfaitement adaptés au rayon ionique du cuivre (II). De plus, l'apport du groupement picolinate dans la sphère de coordination conduit à un complexe très stable, comme en témoigne la valeur de pCu de 18,64 obtenue avec le ligand **HTE1PA**. Le complexe formé est aussi inerte avec un temps de demi-vie de 144 min en milieu acide ($HClO_4$ (5 M), 25 °C) et à un caractère quasi-réversible vis-à-vis de la réduction.

Le cuivre est aujourd'hui au cœur de la recherche en médecine nucléaire grâce à ses deux isotopes, le cuivre-64 et le cuivre-67 qui permettent le diagnostic par la tomographie par émission de positons ainsi que la thérapie grâce aux rayonnements β^- . L'importance de développer de très forts chélateurs du cuivre est donc primordiale pour le développement des techniques ciblées d'imagerie et de thérapie ; c'est pourquoi, le **HTE1PA** est apparu comme un ligand de choix pour porter ces radioisotopes du cuivre vers une application *in vivo*.

Cependant, les radiopharmaceutiques basés sur des métaux radioactifs possèdent une unité de ciblage sur laquelle le chélate doit être conjugué ; le ligand utilisé doit ainsi exister sous sa version bifonctionnelle, c'est à dire présenter une fonction additionnelle permettant son ancrage sur le vecteur biologique. Plusieurs stratégies de bifonctionnalisation ont été envisagées pour différents chélateurs décrits dans la littérature. La plus pertinente est celle impliquant une modification du squelette carboné conduisant à l'introduction de la C-fonctionnalisation. Ainsi la version C-fonctionnalisée du ligand prometteur **HTE1PA**, le **p-SCN-Bn-TE1PA** a été synthétisée au laboratoire et étudiée en milieu biologique, permettant l'imagerie de tumeurs sur modèle murin. Ces résultats ont justifié le choix de ce ligand pour la coordination du cuivre-64 lors de ce travail de thèse.

Enfin, le portrait de CXCR4 démontre que ce récepteur cellulaire est une cible attrayante dans le cadre du diagnostic des cancers du fait de son implication dans au moins 23 types de cancers ainsi que dans le VIH. CXCR4, avec son ligand naturel CXCL12 joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. À ce jour, différents inhibiteurs de ce récepteur ont été identifiés, que ce soient des dérivés d'anticorps, de peptides ou encore de petites molécules organiques. Nous avons fait une présentation non exhaustive de ces inhibiteurs en ne retenant que les plus pertinents. Il nous est apparu que l'utilisation de petites molécules organiques comme unité de ciblage présente un intérêt majeur d'un point de vue de coût et de synthèse. Ainsi, les dérivés de l'**AMD070** et de l'**AMD3100** se sont révélés être une classe pertinente de composés pouvant mener à des radiopharmaceutiques innovants.

Chapitre 2

Synthèse de nouveaux radiopharmaceutiques organiques pour l'imagerie vectorisée de CXCR4

Introduction

Le récepteur de chimiokine CXCR4 est surexprimé dans au moins 23 types de cancers. L'implication de ce récepteur et de son ligand naturel (la chimiokine CXCL12) dans la croissance et la métastase tumorale font de CXCR4 un marqueur biologique particulièrement intéressant. C'est pourquoi les travaux sélectionnés et présentés dans ce chapitre visent à visualiser l'expression de ce récepteur cellulaire par imagerie TEP au cuivre-64.

Concernant le ciblage de CXCR4, différentes natures d'inhibiteur ont été découverts que ce soient des anticorps, des peptides ou encore des petites molécules organiques. Bien que le ciblage avec des biomolécules de type anticorps ou peptide soit efficace, nous proposons ici de synthétiser des composés organiques, appelés communément « petites molécules » pour l'imagerie de CXCR4. L'utilisation de ce type de composés permet une synthèse complète du conjugué [chélateur-vecteur] au laboratoire (sans recours à une synthèse peptidique ou manipulation d'anticorps ou de leurs fragments) avec un coût réduit et un stockage plus aisé. Pour cela, deux petites molécules aux propriétés inhibitrices connues ont été sélectionnées puis conjuguées à un chélateur du cuivre.

Le groupe Macrocycles Azotés et Coordination est spécialisé dans la synthèse de ligands pour la coordination de cations métalliques comme le cuivre (II) pour des applications en imagerie TEP ou en thérapie. Il y a maintenant 10 ans, le groupe a rapporté la synthèse du ligand **HTE1PA** et a montré son efficacité pour la coordination du cuivre (II). La version bifonctionnelle du ligand a été élaborée plus tard par modification du squelette carboné du macrocycle et a notamment permis sa bioconjugaison à l'anticorps 9E7.4 pour l'imagerie du myélome multiple par imagerie TEP au cuivre-64 afin d'établir une première preuve de concept.

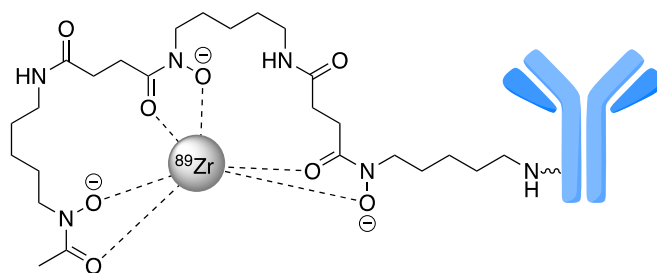
Ce chapitre présentera le développement de radiopharmaceutiques organiques pour le ciblage de CXCR4. La première partie présentera un état de l'art des radiopharmaceutiques déjà décrits pour l'imagerie de CXCR4. Dans un second temps, la synthèse des ligands que nous avons ciblé sera exposée. Enfin, les études de radiomarquage et de reconnaissance réalisées en collaboration avec les radiopharmaciens et biologistes du CRCI²NA (INSERM U1232, Nantes) seront décrites.

I. Contexte bibliographique

1. Imagerie du récepteur CXCR4

1.1. Anticorps radiomarqués

Les anticorps monoclonaux suscitent un grand intérêt dans la conception de composés de diagnostic ou encore de thérapie. Ils ont l'avantage d'avoir une spécificité et une affinité antigénique tout en limitant les effets secondaires. Dans ce sens, en 2016 l'équipe de S. Nimmagadda a synthétisé et étudié un anticorps monoclonal radiomarqué au zirconium-89 pour imager l'expression de CXCR4 dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) ainsi que pour le cancer du sein triple négatif (CSTN). L'anticorps retenu dans cette étude est l'Ulocuplumab qui a été greffé par un chélateur linéaire desferrioxamine (DFO) pour la chélation du ^{89}Zr [Figure 55].^[138]



^{89}Zr -DFO-Ulocuplumab

Figure 55 : Représentation du radiopharmaceutique ^{89}Zr -DFO-Ulocuplumab

Pour imager le CPNPC, deux lignées cellulaires ; la H1155 exprimant fortement CXCR4 (CXCR4⁺) et la A549 qui l'exprime faiblement (CXCR4⁻) ont été injectées sur modèle murin et étudiées *in vivo* par imagerie TEP. Les clichés obtenus dès 24h montrent la différence d'accumulation du radiopharmaceutique sur les deux lignées. Comme attendu, l'accumulation est plus importante sur la lignée cellulaire exprimant fortement CXCR4 (H1155) témoignant de l'affinité de l'anticorps Ulocuplumab avec le récepteur. Après 72h, l'activité mesurée au sein de la tumeur est encore plus élevée en raison du temps de biodistribution long de l'anticorps au sein de l'organisme [Figure 56 A].

Les métastases étant la principale cause de mauvais pronostic pour les patients atteints de CSTN, cette étude s'est attachée à évaluer le potentiel du ^{89}Zr -DFO-Ulocuplumab pour l'imagerie des métastases de ganglions lymphatiques générées par la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les images TEP obtenues à 24h post injection révèlent une accumulation au niveau des métastases qui est toujours présente après 96h [Figure 56 B]. Ainsi, l'anticorps

radiomarqué au ^{89}Zr est capable d'identifier les tumeurs et les métastases surexprimant CXCR4.^[138]

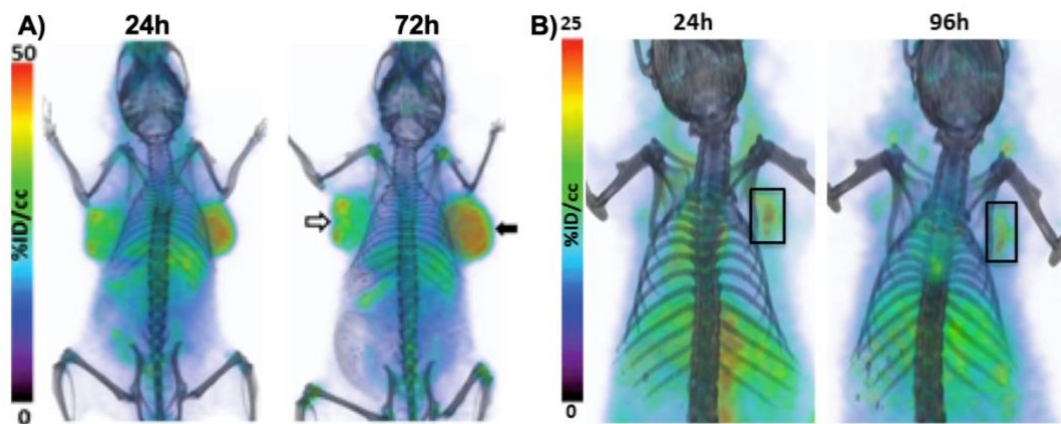


Figure 56 : Images TEP sur modèle murin du ^{89}Zr -DFO-Ulocuplumab **A)** Visualisation des tumeurs de CNPC, la flèche blanche représente la lignée A549 (CXCR4⁺) et la flèche noire la lignée H1155 (CXCR4⁺) **B)** Visualisation de la métastase des ganglions lymphatiques dans le CSTN (carré noir) sur la lignée MDA-MB-231

1.2. Peptides radiomarqués

Le peptide **T140** discuté dans le chapitre 1 (**V.3.2**) présente un manque de stabilité sérique compte tenu du clivage de l'arginine **C-terminale**. Dans un premier temps, l'amidation de l'arginine **C-terminale** a permis de gagner en stabilité. Ensuite, pour pouvoir imager le récepteur, une fonctionnalisation **N-terminale** par un groupement 4-fluorobenzyle a permis d'obtenir le précurseur **4F-T140**.^[139] La présence de l'atome de fluor ouvre la possibilité d'utiliser l'imagerie TEP grâce au radiomarquage du peptide avec le fluor-18 menant au **4- ^{18}F -T140** [Figure 57].

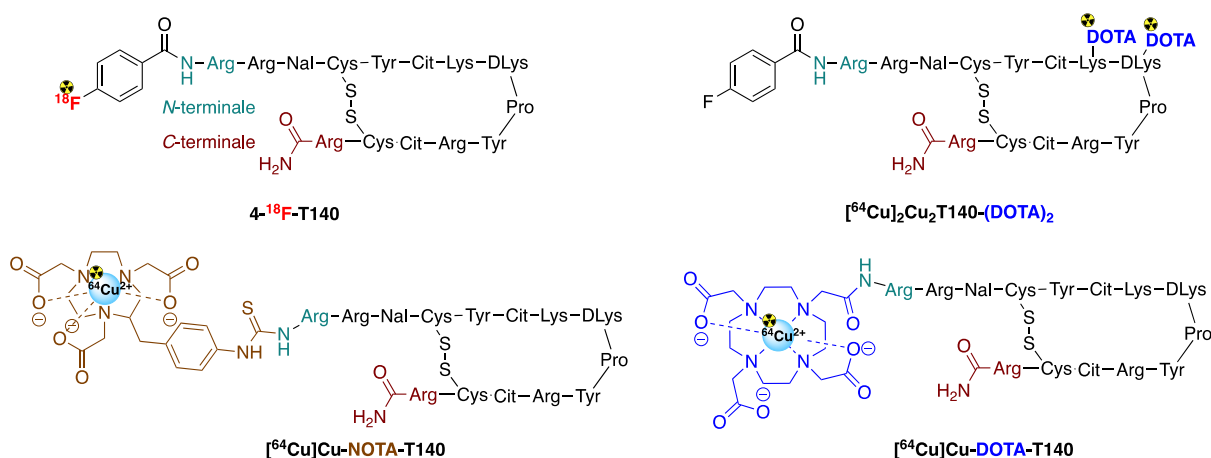


Figure 57 : Représentation schématique des dérivés du peptide **T140** utilisés en imagerie TEP

Une étude sur modèle murin porteur de tumeurs ovariennes d'hamster chinois et de tumeurs transfectées exprimant fortement CXCR4 n'a pas montré de différence de ciblage entre les tumeurs CXCR4⁺ et CXCR4⁻ par le **4-¹⁸F-T140**, signifiant que la circulation sanguine est similaire dans les deux cas de tumeurs et que le peptide ne semble pas démontrer une affinité plus accrue pour le récepteur CXCR4. Finalement, il a été montré que ce peptide se lie aux globules rouges, selon un mécanisme d'interaction n'étant pas encore bien connu. En revanche, le ciblage des cellules cancéreuses exprimant CXCR4 a été favorisé par une co-injection du peptide non radiomarqué. Ce peptide « froid » va d'abord se lier aux globules rouges tandis que le radiopharmaceutique va dans un second temps être injecté et pourra cibler les tumeurs.^[140] L'étape de radiomarquage étant coûteuse en temps vis-à-vis de la demi-vie du fluor-18 (110 min), O. Jacobson *et al.* ont modifié la fonctionnalisation du peptide **T140** pour pouvoir le radiomarquer au cuivre-64 à l'aide du **DOTA** formant ainsi le **[⁶⁴Cu]₂Cu₂T140-(DOTA)₂** [Figure 57]. Le chélateur **DOTA** a été introduit par liaison peptidique sur les deux résidus lysines du peptide **4-F-T140**, qui ne sont pas impliqués dans la reconnaissance avec CXCR4. Tout comme le dérivé marqué au fluor-18, une liaison aux globules rouge a été observée.^[141] En 2012, la même équipe a fonctionnalisé le peptide au niveau du résidu **arginine N-terminale** par différents chélateurs, le **NOTA** ou le **DOTA**, pour conduire respectivement aux composés **[⁶⁴Cu]Cu-NOTA-T140** et **[⁶⁴Cu]Cu-DOTA-T140** représentés sur la **Figure 57**. Ces deux composés ont montré une affinité significative envers CXCR4, sans se lier aux globules rouges.^[142] En revanche, une accumulation de radioactivité au niveau du foie a démontré une transchélation du cuivre-64 *in vivo*, l'activité mesurée correspondant au complexe cuivre-SOD formé *in situ*. Pour limiter ce phénomène, un autre chélateur pour le cuivre doit être utilisé pour substituer les dérivés **NOTA** et **DOTA**.

En 2011, l'équipe de H.-J. Wester s'est intéressée à l'imagerie du récepteur CXCR4 en utilisant un pentapeptide (5 acides aminés) cyclique présentant une IC₅₀ de 2 nM. Comme pour le peptide **T140**, pour pouvoir imager le récepteur à l'aide de cation métallique, il est nécessaire d'introduire un chélateur. Ici, le **DOTA** a une nouvelle fois été retenu et a été greffé sur le peptide cyclique *via* une de ces fonctions acétate pour former le bioconjugué **pentixafor** qui présente une IC₅₀ de 150 nM envers CXCR4 [Figure 58].

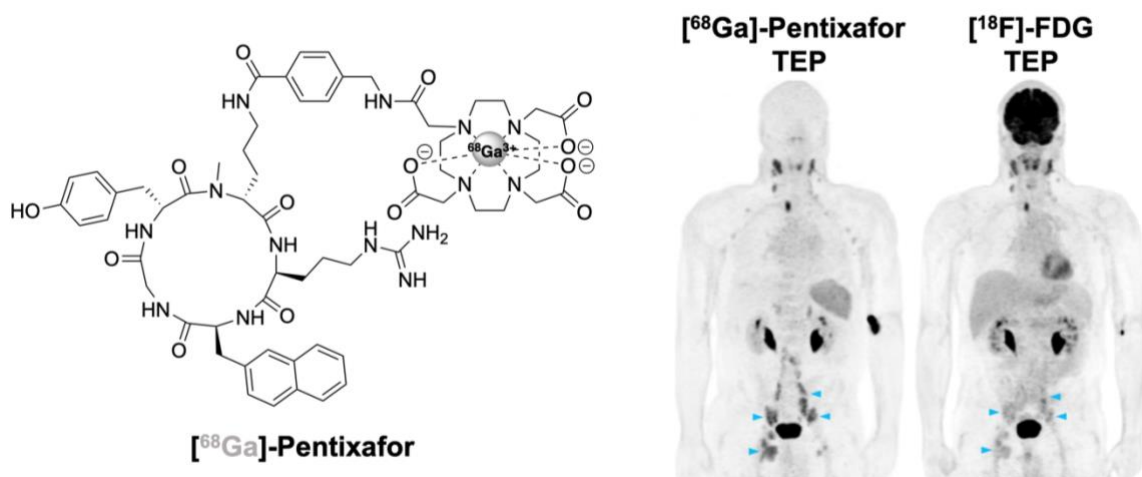


Figure 58 : Représentation du $[^{68}\text{Ga}]\text{-Pentixafor}$ (gauche). Imageries TEP d'un patient atteint d'un lymphome des cellules du manteau obtenues après injection du $[^{68}\text{Ga}]\text{-Pentixafor}$ et du $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$. Les flèches bleues montrent la forte accumulation du traceur au niveau des nodules (droite)^[143]

La coordination de cations métalliques comme l'indium (III) ou le gallium (III) par le motif **DOTA** conduit à une augmentation de l'affinité avec des IC_{50} de 44 nM et 5 nM respectivement.^[144] Suite à ces résultats encourageants avec la coordination du gallium « froid », le radiomarquage du **pentixafor** avec le gallium-68 ainsi que son étude biologique ont été réalisés. Cette étude a mis en avant le potentiel du $[^{68}\text{Ga}]\text{-pentixafor}$ comme radiotracer avec la visualisation efficace des tumeurs.^[145] Les images obtenues après examen TEP montrent que le composé $[^{68}\text{Ga}]\text{-pentixafor}$ présente une meilleure détection des cellules tumorales du manteau, et moins de signaux résiduels que le $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$, notamment dans le cerveau et le système digestif, permettant ainsi d'obtenir un bon contraste des nodules présents chez le patient atteint d'un lymphome des cellules du manteau **[Figure 58]**.^[143] Actuellement, un essai clinique dédié au diagnostic de sous-typage de l'aldostéronisme primaire, trouble hormonal responsable d'hypertension artérielle (NCT05131061) par le $[^{68}\text{Ga}]\text{-pentixafor}$ est en cours.^[146]

2. Ouverture à la radiothérapie par le ciblage de CXCR4

Dans le but de traiter la surexpression de CXCR4 et donc les pathologies associées, la coordination d'ions lutécium-177 et yttrium-90 (émetteurs β^-) par le **pentixafor** a été étudiée. Cependant, dans les deux cas, l'affinité du **pentixafor** envers CXCR4 est affaiblie et démontrée par des IC_{50} de l'ordre de 40 nM contre 24,8 nM avec le gallium (III).^[147] Une modification de la partie peptidique a donc été accomplie, par une iodation en position *ortho* du groupement aromatique de la tyrosine¹ permettant d'obtenir le **pentixather**. Après coordination avec le lutécium (III) le complexe formé présente une excellente affinité pour

CXCR4 avec une IC_{50} de 14,6 nM [Figure 59]. Compte tenu de l'affinité remarquable lors de la coordination des cations « froids », notamment avec le lutécium, l'étude de radiomarquage avec le lutécium-177 a été mise en œuvre. L'accumulation du [^{177}Lu]-pentixather est similaire à celle du [^{68}Ga]-pentixafor, et il est important de noter que la cinétique d'élimination du radiopharmaceutique au sein de la tumeur est lente. Une rétention de l'activité est persistante au niveau des tumeurs jusqu'à 7 jours après injection. Ceci est encourageant pour une utilisation ultérieure en clinique puisque cette condition est indispensable pour l'administration de doses de rayonnement suffisantes pour irradier la tumeur pendant la thérapie.^[148]

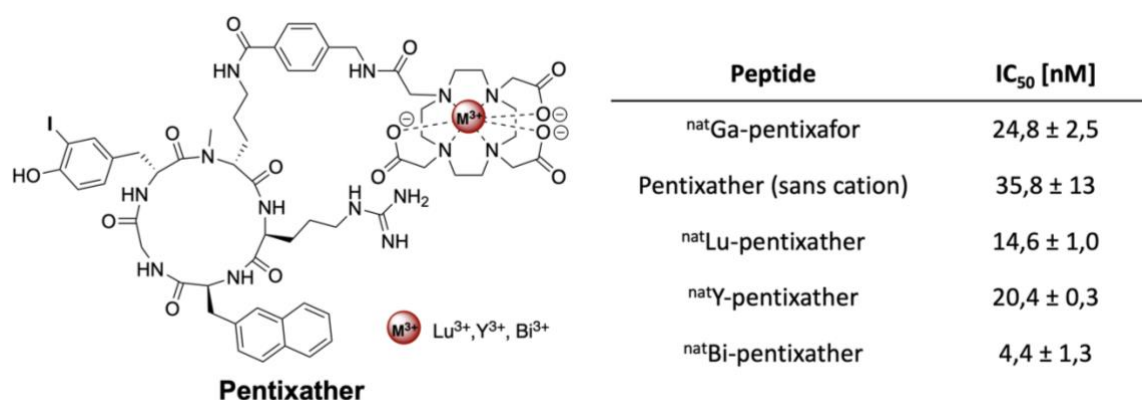


Figure 59 : Représentation du **pentixather** (gauche). Affinités de liaison (IC_{50} en nM) du **pentixather** et de ses complexes de ^{nat}Lu , ^{nat}Y et ^{nat}Bi avec CXCR4 (droite)^[148]

Actuellement, le [^{68}Ga]-pentixafor est utilisé pour l'imagerie TEP de CXCR4 tandis que le [^{177}Lu]-pentixather est indiqué pour le traitement des tumeurs surexprimant le récepteur CXCR4 (comme les lymphomes). En revanche, comme nous l'avons vu précédemment, le gallium-68 et le lutécium-177 forment à eux deux une paire théranostique mixte, il paraît donc judicieux d'utiliser un seul et même ligand pour la chélation de ces cations. Dans ce sens, un essai clinique avec le [^{68}Ga]-pentixather est actuellement en cours sur le myélome multiple en comparaison avec le [^{68}Ga]-pentixafor (NCT05364177).^[149]

3. Ciblage de CXCR4 par des petites molécules pour l'imagerie et la thérapie

Bien que le ciblage du récepteur par anticorps ou peptides soit efficace, l'utilisation de petites molécules organique présente d'autres intérêts. En effet, leur utilisation permet de minimiser le risque de déclenchement de réactions immunitaires qui peuvent se produire avec les anticorps. De plus, le développement de composés organiques permet de minimiser le coût de formulation tout en facilitant le stockage des composés. Grâce à de nombreuses recherches sur une large gamme de groupements organiques, la famille des composés

présentant un motif tétrahydroquinoline-benzimidazole s'est avérée efficace pour inhiber CXCR4. Cette famille de composés a été particulièrement étudiée car elle présente une excellente biodisponibilité orale, pouvant être un facteur clé pour certaines applications comme le traitement du VIH. Parmi les différentes molécules, l'**AMD070** est la première molécule disponible, utilisée par voie orale, présentant une bonne activité envers CXCR4 avec une IC_{50} de 13 nM. L'étude des interactions de cette molécule avec le récepteur CXCR4 démontre que la reconnaissance s'effectue au travers de liaisons hydrogène entre le motif benzimidazole de **AMD070** et le résidu Tyr⁴⁵ du domaine transmembranaire I du récepteur. R. S. Y. Wong *et al* ont également proposés que l'amine primaire, protonée à pH physiologique, pouvait former des liaisons hydrogène avec le résidu Asp⁹⁷ et interagir avec le Trp⁹⁴ du domaine transmembranaire II du récepteur par des interactions π [Figure 60].^[150]

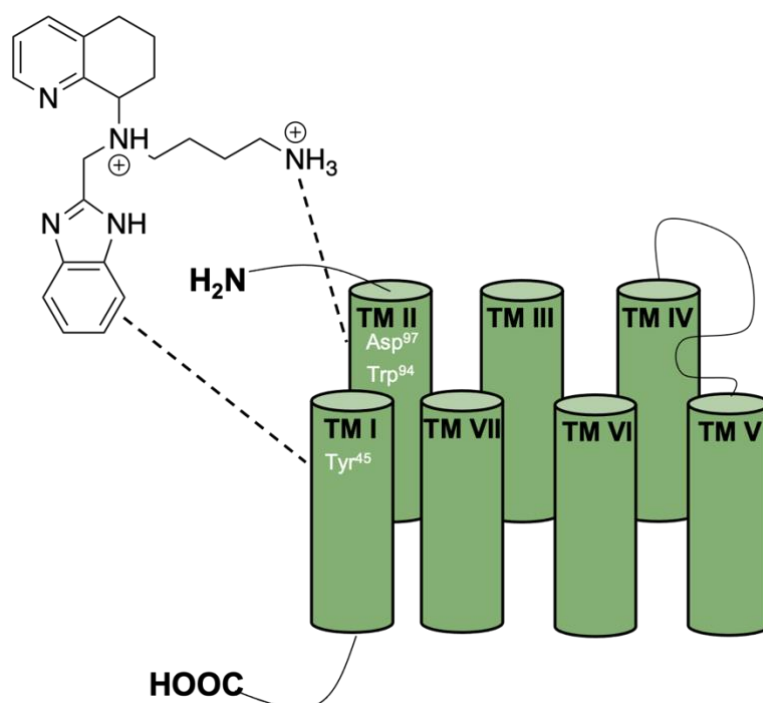


Figure 60 : Interaction de l'**AMD070** sous sa forme diprotonée avec le récepteur CXCR4

Compte tenu des bonnes propriétés d'inhibition de l'**AMD070** envers CXCR4, nous avons envisagé de l'utiliser pour le diagnostic de pathologies liées à l'expression de ce récepteur, tels que les cancers où le récepteur est impliqué dans la croissance tumorale.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'imagerie nucléaire utilise des radiopharmaceutiques composés d'une partie vectrice reliée à un chélateur. En utilisant l'**AMD070** comme vecteur, la seule fonction disponible pour le greffage est son amine primaire qui peut réagir avec des fonctions acide carboxylique ou isothiocyanate pour former un lien amide ou thiourée respectivement [Figure 61].

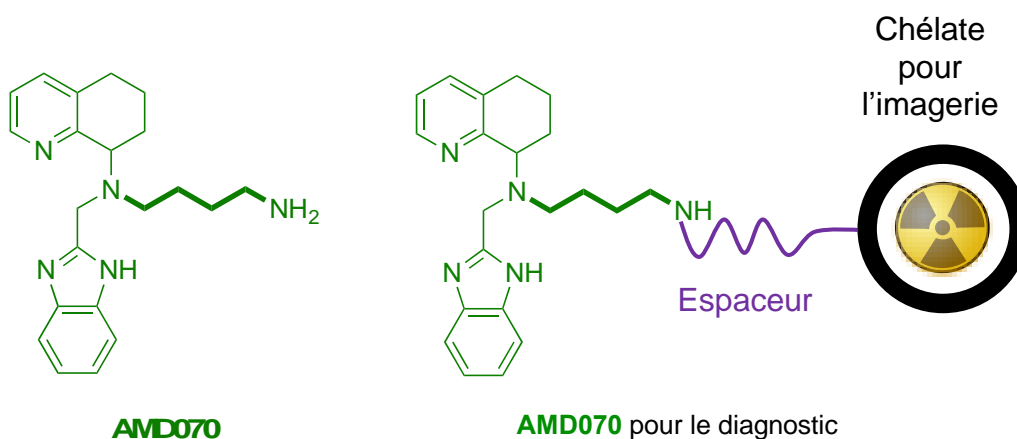


Figure 61 : Structures de l'**AMD070** et de sa version bifonctionnelle pour le diagnostic par imagerie nucléaire

En revanche, cette stratégie de synthèse entraîne le sacrifice de l'amine primaire qui participe à la reconnaissance du récepteur. En 2011, R. Skerlj *et al* se sont intéressés à la modification de la structure de l'**AMD070** et ont étudié les propriétés inhibitrices des composés envers CXCR4. Ainsi, une famille de 25 analogues de l'**AMD070** a été synthétisée, en conservant la structure tétrahydroquinoline-benzimidazole et l'amine primaire essentielle pour la reconnaissance mais insérant des espaceurs aromatiques. La modification du squelette carboné des molécules leurs confèrent des IC_{50} inférieures à 110 nM. Si l'on souhaite rendre ces molécules bifonctionnelles, il est intéressant d'avoir sur le noyau aromatique une fonction pouvant être impliquée dans des réactions de bioconjugaison. Parmi toutes les molécules, l'**AMD070-p-BnCO₂Me** présente l'avantage d'avoir une fonction ester qui peut réagir facilement avec une fonction amine pour former un lien amide [**Figure 62**].

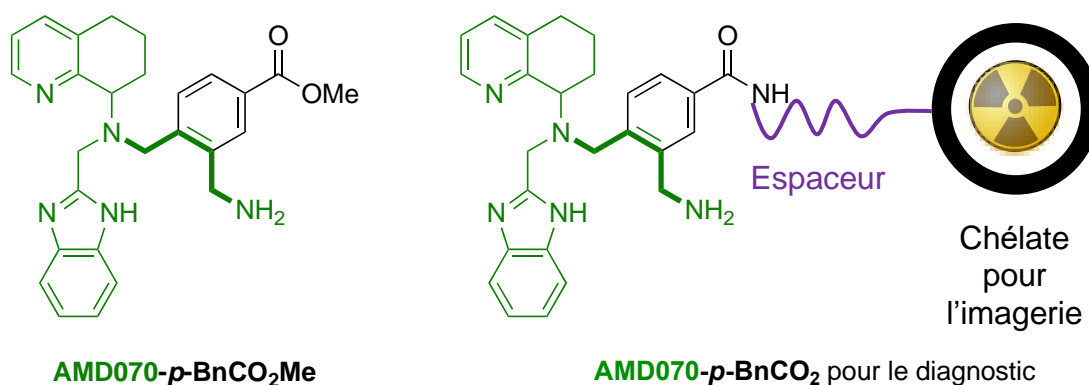


Figure 62 : Structures de l'**AMD070-p-BnCO₂Me** et de sa version bifonctionnelle pour le diagnostic

Dans ce projet, l'**AMD070** et son analogue **AMD070-p-BnCO₂Me** seront utilisés comme vecteurs pour le ciblage de CXCR4 en étant chacun greffés sur le chélateur **p-SCN-Bn-TE1PA** qui a été retenu du fait de ses propriétés de coordination remarquables pour le cuivre-64.

Le chélateur **p-SCN-Bn-TE1PA** est synthétisé en 10 étapes [Figure 63].^[23] La première étape est la préorganisation de la tétramine linéaire (**232**) par le glyoxal à froid permettant d'obtenir le *cis*-232-glyoxal (**a**), composé cinétique. La température de -15°C permet d'éviter la formation du composé thermodynamique de configuration *trans*. Cette configuration n'est pas souhaitée car après cyclisation, le pont bisaminal ne peut alors plus être clivé pour déprotéger les fonctions amine.

L'étape de cyclisation avec un ester α,β -insaturé porteur d'un groupement nitrobenzyle est réalisée dans l'acétate d'éthyle et permet d'isoler le composé **b** avec la configuration *cis/syn* par précipitation.

La troisième étape est la *N*-fonctionnalisation régiospécifique du composé **b** avec le bromure de benzyle. Cette régiospécificité est induite par la structure de l'oxocyclam bisaminal **b**, rendant uniquement l'atome d'azote adjacent à la fonction amide en position N1 suffisamment nucléophile pour être engagé dans une réaction de substitution. La fonctionnalisation directe par un groupement picolinate n'est pas possible à cette étape, en raison d'un manque de réactivité de cet électrophile. Le groupement benzyle est ainsi généralement introduit pour permettre la séquence réactionnelle, en donnant le composé **c**. Puis, un enchaînement d'étapes de déprotections puis de protections a ensuite été entrepris.

L'élimination du pont bisaminal ainsi que la réduction de la fonction nitrobenzyle en aniline correspondante sont tout d'abord effectuées au reflux de l'hydrate d'hydrazine et conduisent au composé **d**. La fonction amide est ensuite réduite par BH₃·THF pour former le composé monoprotégé **e**. Ensuite, les amines primaires et secondaires du macrocycle sont protégées par le groupement Boc donnant lieu au composé **f**. L'hydrogénolyse du groupement benzyle par le dihydrogène catalysée par Pd/C conduit au composé **g** qui ne possède alors qu'une seule amine secondaire libre pour réagir avec le chlorure de picolinate et ainsi former le composé **h**. Le composé **i** est obtenu par déprotection de la fonction acide et des fonctions amine, par hydrolyse acide de la fonction ester et des groupements Boc respectivement. Pour finir, la fonction aniline est activée grâce au thiophosgène pour former la fonction isothiocyanate correspondante et donner le **p-SCN-Bn-TE1PA**.

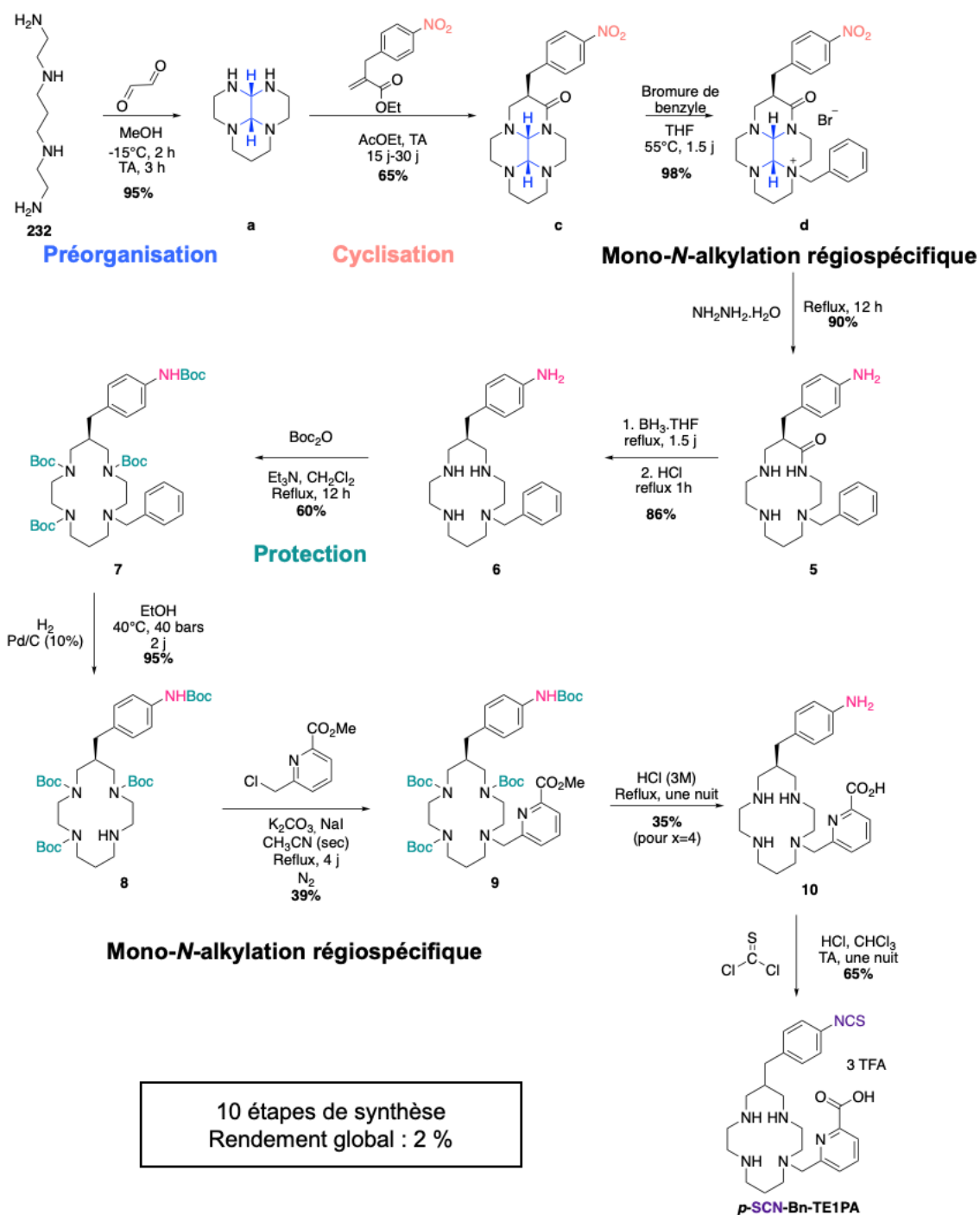


Figure 63 : Voie de synthèse du **p-SCN-Bn-TE1PA** à partir de la tétramine linéaire (**232**)

La stratégie de greffage choisie implique la formation d'un lien thiourée par réaction de l'amine primaire de l'**AMD070** avec la fonction isothiocyanate du macrocycle bifonctionnel conduisant au composé **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** [Figure 65].

L'analogue de l'**AMD070** (**AMD070-p-BnCO₂Me**) nécessite quant à lui d'être modifié pour pouvoir être greffer sur le chélateur. En effet, le but est de ne pas utiliser la fonction amine primaire compte tenu de son implication dans la reconnaissance. Pour cela, une nouvelle

fonction amine pour le greffage doit être insérée au niveau de la fonction ester. L'espaceur **éthylènediamine** semble être le bon compromis puisqu'une des fonctions amine peut former un lien amide après réaction avec la fonction ester et ainsi l'amine restante pourra réagir avec la fonction isothiocyanate du chélateur **p-SCN-Bn-TE1PA**. En revanche, sans protection préalable de l'amine primaire de l'**AMD070-p-BnCO₂Me**, deux fonctions amine seront susceptibles de réagir avec la fonction isothiocyanate. Par conséquent, il est indispensable de protéger l'amine primaire de l'**AMD070-p-BnCO₂Me** avant d'introduire l'espaceur **éthylènediamine** [Figure 64].

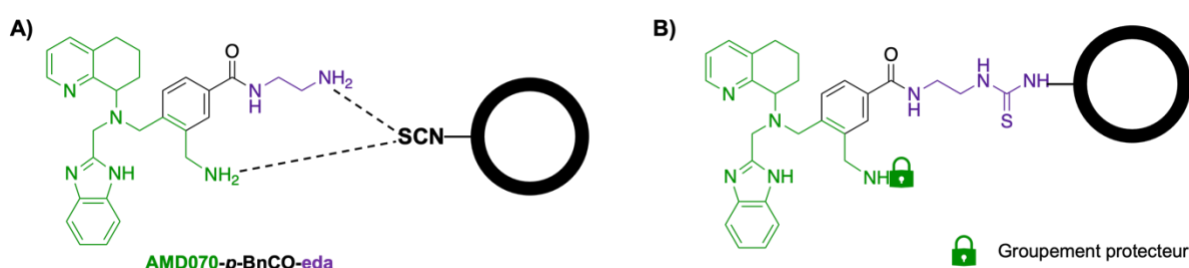


Figure 64 : Stratégies de greffage de l'**AMD070-p-BnCO-eda** sur le chélateur macrocyclique (A) sans protection de l'amine primaire (B) avec protection

La stratégie de protection mise en œuvre sera présentée dans la partie II. de ce chapitre, dédiée à la synthèse des molécules inhibitrices. La structure des molécules ciblées est composée de trois parties (i) **unité vectrice, inhibitrice de CXCR4** (ii) **espaceur** (iii) chélateur macrocyclique. La présence de deux atomes de carbone asymétriques sur nos molécules cibles peut conduire à un mélange de diastéréoisomères. Dans un premier temps pour démontrer la preuve de concept, la synthèse des composés a été effectuée sur les mélanges racémiques.

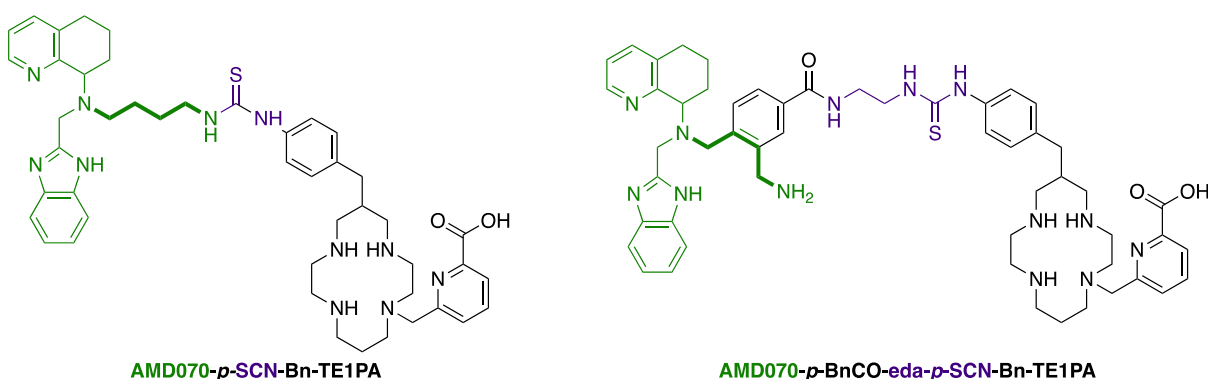


Figure 65 : Structures des composés cibles : **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** et **AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA**

La modification structurale de composés ayant des activités envers une entité biologique peut altérer leurs propriétés. En effet, le greffage des anticorps peut conduire à une baisse d'immunoréactivité et le greffage de peptides sur un chélateur peut également faire varier leur affinité comme nous l'avons vu avec le peptide **T140**. Afin d'étudier en amont l'influence du greffage des unités macrocycliques sur la reconnaissance des dérivés **AMD070** envers le récepteur CXCR4, nous avons synthétisé des analogues fluorescents pour les étudier au niveau cellulaire. L'utilisation de composés fluorescents permet de s'affranchir des contraintes de manipulation de molécules radioactives, réduisant également le coût des études. La fluorescéine est largement étudiée dans le domaine cellulaire pour ses longueurs d'ondes d'absorption de 490 nm et d'émission de 514 nm adaptées aux équipements analytiques. De plus, son dérivé bifonctionnel fluorescéine isothiocyanate (**FITC**) étant commercial, il nous a été possible d'envisager la réaction de couplage avec les petites molécules organiques *via* le même lien thiourée. Ainsi, la structure des deux conjugués fluorescents est composée de trois parties (i) unités vectrices, inhibitrices de CXCR4, (ii) espaceur et (iii) la fluorescéine [Figure 66].

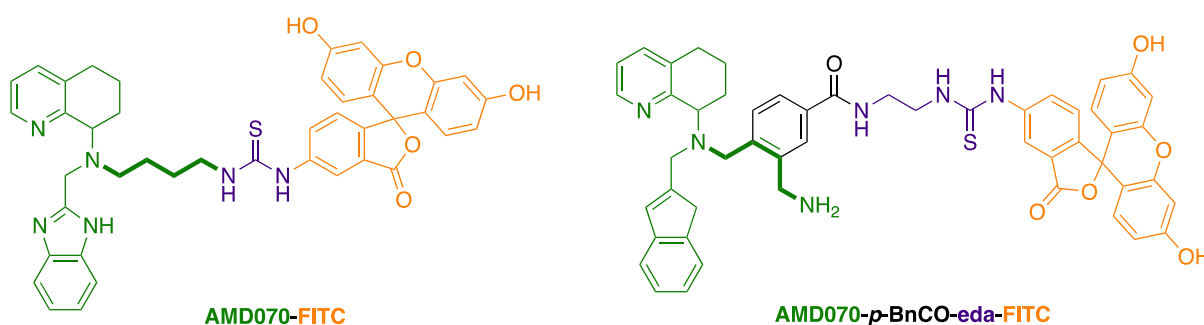


Figure 66 : Structures des composés fluorescents, **AMD070-FITC** et **AMD070-p-BnCO-eda-FITC**

II. Synthèse des molécules organiques inhibitrices

Pour obtenir les quatre composés ciblés, la synthèse a débuté par l'obtention des unités vectrices **AMD070** et **AMD070-p-BnCO-eda**. En parallèle, la synthèse de l'unité macrocyclique a été optimisée par rapport à la méthode originale développée au laboratoire. Enfin, les réactions de couplage avec le macrocycle et avec la fluorescéine ont pu être mises au point.

1. Synthèse de l'**AMD070**

La synthèse de l'**AMD070** est décrite dans la littérature selon plusieurs voies, parmi lesquelles une seule a été retenue dans ces travaux et est représentée ci-après [Figure 67].^[151] L'amine

centrale de l'**AMD070** est fonctionnalisée deux fois successivement à partir du *N*-boc-1,4-diaminobutane commercial.

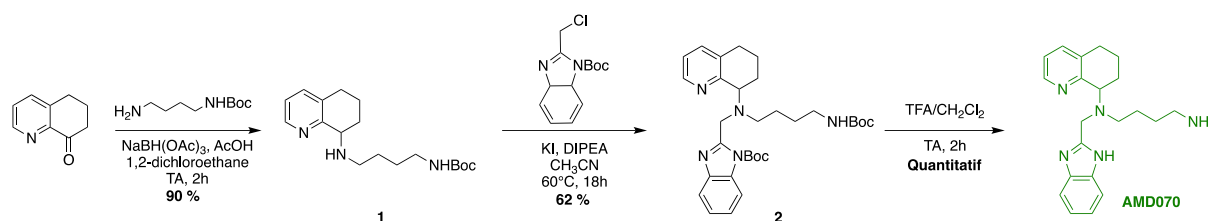


Figure 67 : Voie de synthèse de l'**AMD070**

L'amination réductrice entre la *N*-boc-1,4-diaminobutane et la 6,7-dihydro-8(5H)-quinolinone permet après purification sur colonne de gel de silice (DCM/MeOH) d'isoler le composé **1**. Une substitution nucléophile de ce dernier sur le chlorure de benzimidazole protégé par un groupement Boc (préalablement synthétisé, voir paragraphe **II.2.** de ce chapitre) permet d'obtenir l'**AMD070** protégé (**2**). La déprotection des amines par l'acide trifluoroacétique permet d'obtenir de façon quantitative l'**AMD070**. Au travers de ces trois étapes de synthèse, le composé a été obtenu à l'échelle du gramme, avec un rendement global de 55%. Le spectre RMN du carbone confirme la structure de l'**AMD070** avec le signal caractéristique du CH du motif quinoline qui présente un déplacement chimique de 61,4 ppm. De plus, les signaux correspondant aux CH₂ présents en position α de l'amine tertiaire et de l'amine primaire ont un déplacement chimique de 50,2 ; 49,1 et 40,9 ppm respectivement [**Figure 68**]. La RMN est conforme à l'obtention d'un mélange racémique dû à la présence du carbone asymétrique sur le composé **AMD070**.

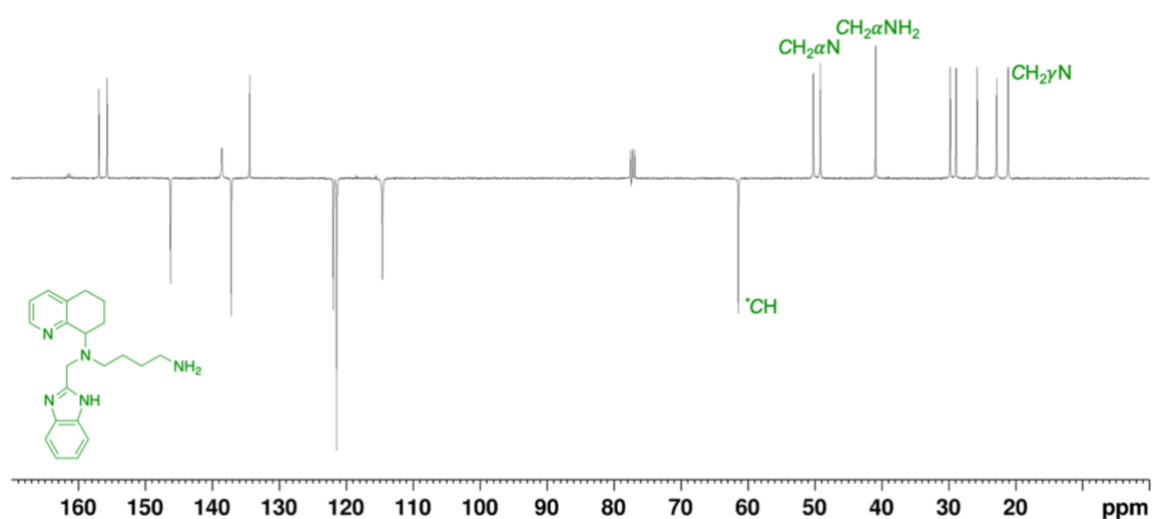


Figure 68 : Spectre RMN ¹³C Jmod de **AMD070** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K)

2. Synthèse de l'AMD070-*p*-BnCO-eda

Le composé AMD070-*p*-BnCO₂Me protégé peut être obtenu après quatre étapes de synthèse d'après la littérature [Figure 69].^[152]

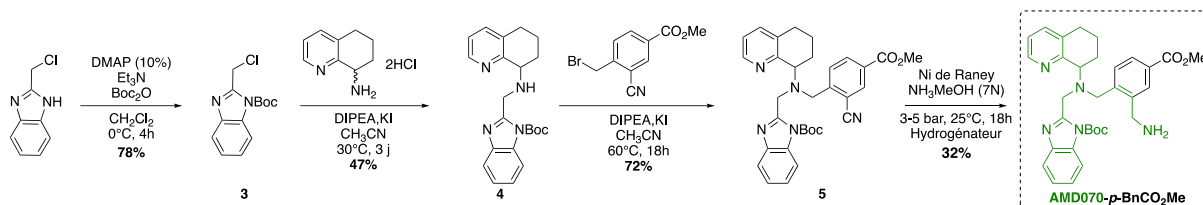


Figure 69 : Voie de synthèse pour l'AMD070-*p*-BnCO₂Me protégé

La première étape consiste à protéger l'amine secondaire du 2-chlorométhylbenzimidazole commercial par un groupement Boc. Cette protection se fait en présence de DMAP et de triéthylamine comme base pour conduire au composé 3.^[153] Lors de la *N*-fonctionnalisation sélective de ce dernier sur la 5,6,7,8-tétrahydroquinolin-8-amine, des problèmes de purification ont été rencontrés. En effet, la réaction mise en jeu manque de sélectivité, conduisant à un mélange de produits : i) le composé 4 et ii) le composé 4 dialkylé par le composé 3 (4') [Figure 70]. Ces mêmes difficultés de purification ont probablement été rencontrées par les auteurs comme en témoigne le rendement modeste de 34% pour cette étape.

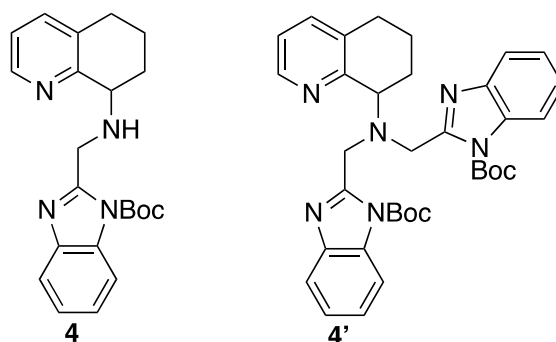


Figure 70 : Structures du composé 4 et du sous-produit 4'

Dans notre cas, le composé 4 faisant partie de nos molécules initiales, nous avons donc adapté et optimisé les conditions de réaction et de purification. Selon la littérature, la réaction est conduite à 60°C pendant une nuit.^[154] Des conditions plus douces (30°C pendant 3 jours) permettent de limiter la formation du sous-produit 4'. De plus, le système d'éluants utilisé lors de la purification sur colonne chromatographique a été modifié. En effet, le système dichlorométhane/méthanol utilisé dans la littérature ne permet pas d'obtenir une séparation nette des composés, l'ajout d'ammoniac a permis d'améliorer la purification. Avec ces

modifications, le produit a été préparé avec un rendement de 47% contre 34% dans la littérature.

L'obtention du composé **4** a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C . Sur le spectre RMN du proton, les 7 sept protons aromatiques (H_{a-c} et H_{i-k}) sont situés entre 8,33 et 7,00 ppm. La présence du carbone asymétrique sur la quinoline induit la diastéréotopie des protons du groupement méthylène en position α de l'amine secondaire (H_h), avec la signature de ces protons sous la forme de deux doublets à 4,60 et 4,43 ppm avec une constante de couplage géminée $^2J = 16$ Hz. Le proton de la quinoline H_g est présent sous la forme d'un multiplet avec un déplacement chimique de 3,84 ppm. Enfin, les six protons des CH_2 de la quinoline (H_{d-f}) sont présents de 2,89 à 1,90 ppm et les neuf protons du groupement Boc (H_i) résonnent sous la forme d'un singulet à 1,78 ppm [Figure 71].

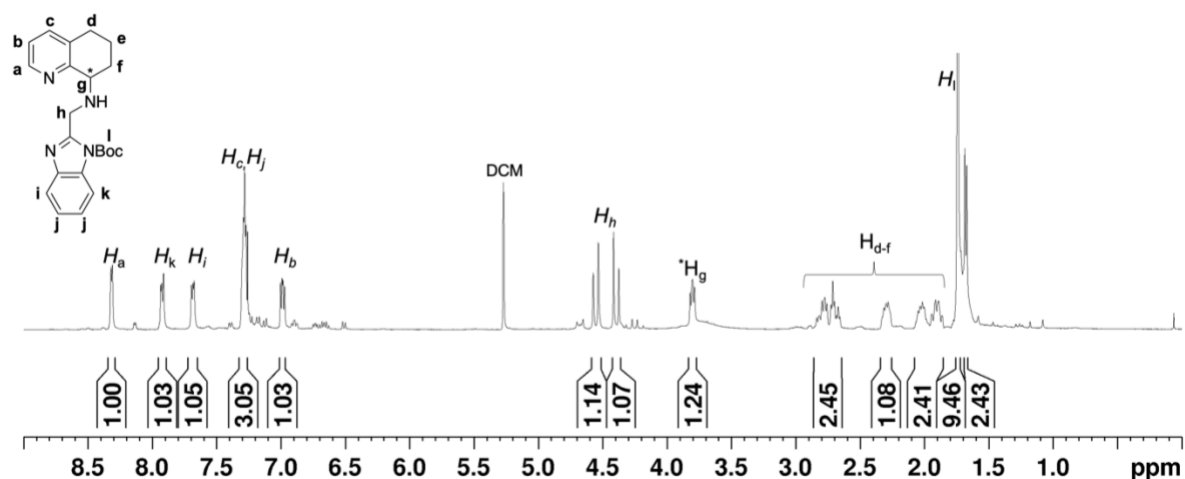


Figure 71 : Spectre RMN ^1H du composé **4** (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K)

Une seconde substitution nucléophile par le 4-bromométhyl-3-cyano-benzoate de méthyle conduit au composé **5** isolé avec un rendement de 72% après séparation sur gel de silice ($\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$). Ce composé peut être préparé à l'échelle du gramme. La RMN du carbone permet de confirmer rapidement la formation du composé avec les signaux caractéristiques de la fonction ester situés à 165,3 et 52,3 ppm. De plus, le carbone hybridé sp de la fonction nitrile présente un déplacement chimique de 117,1 ppm. Les signaux caractéristiques des méthylènes de la quinoline sont présents entre 29,3 et 23,2 ppm. Le groupement Boc est également identifié par son carbonyle qui présente un déplacement de 157,9 ppm, et le carbone quaternaire, qui résonne à 85,4 ppm tandis que les groupements méthyle sont identifiés au travers d'un unique signal à 28,2 ppm [Figure 72].

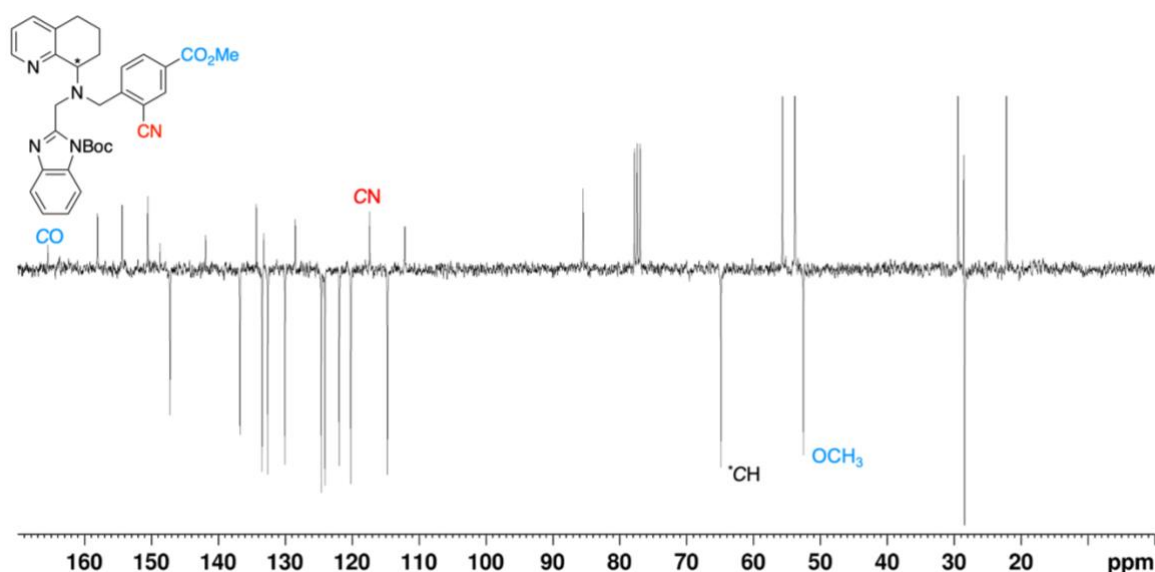


Figure 72 : Spectre RMN 13C Jmod du composé **5** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K)

L'étape suivante permettant d'obtenir la version protégée de l'**AMD070-p-BnCO₂Me** est la réduction de la fonction nitrile pour obtenir l'amine primaire correspondante [Figure 73].

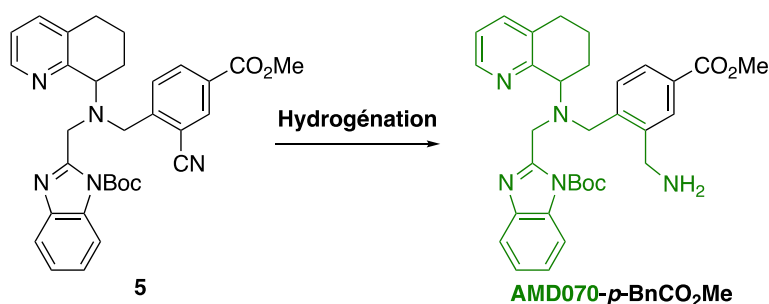


Figure 73 : Réaction d'hydrogénation du composé **5**

La littérature rapporte cette réduction par l'utilisation de nickel de Raney, sous pression d'hydrogène dans un appareil dédié (Parr Shaker).^[152] Dans le but d'utiliser des réactifs plus doux, moins toxiques et avec un montage expérimental plus aisé, nous avons étudié et comparé différents agents réducteurs. M. Beller *et coll.* ont mis au point l'hydrogénation de dérivés nitrile aromatiques en présence de Pd/C avec un mélange d'acide formique et de triéthylamine. Ces conditions de réaction sont simples à accomplir et ne demandent pas l'utilisation de pression de dihydrogène.^[155] Toutefois, la réaction ne conduit pas dans notre cas à l'hydrogénation de la fonction nitrile, mais uniquement à la déprotection du benzimidazole après 6h de réaction malgré la faible quantité d'acide dans le milieu réactionnel [Tableau 19 (1)].

L'utilisation de diméthylsulfure de borane dans du THF pour l'hydrogénation de nitrile a également été rapportée mais dans notre cas, aucun résultat concluant n'a pu être observé, après une nuit de réaction au reflux du THF.^[156] En effet, l'identification du composé formé est rendue difficile en raison de la formation de liaisons amine-borane (adduits de Lewis de type N-BH₃), et ce malgré le traitement en milieu acide [Tableau 19 (2)]. L'utilisation de l'alliage de Raney a été réalisée en présence de soude (2M) pour générer *in situ* le dihydrogène. Ces conditions ont mené non pas à la réduction du groupement nitrile mais à la saponification de l'ester ainsi que la déprotection de l'amine [Tableau 19 (3)]. Au vu de ces différents essais infructueux, l'hydrogénation avec le Nickel de Raney en présence d'ammoniac dans du méthanol a finalement été conduite à l'aide d'un hydrogénateur sous une pression de H₂ de 5 bars pendant 24h. Ainsi, après purification sur colonne chromatographique, le composé **AMD070-*p*-BnCO₂Me** a pu être isolé avec un rendement modéré de 32% [Tableau 19 (4)].

Tableau 19 : Récapitulatif des différents essais d'hydrogénation de la fonction nitrile

	Réactif	Solvant	T/durée	Résultat
(1)	Pd/C	HCOOH/NEt ₃ (10 :1), THF	40°C 6h	Déprotection amine (DA)
(2)	BH ₃ SMe ₂	THF	Reflux Une nuit	Inexploitable
(3)	Alliage de Raney	NaOH(2M)/EtOH	25°C 6h	DA et saponification
(4)	Nickel de Raney H ₂ 3-5 bars	NH ₃ MeOH (7N)	25°C 24h	Réduction du nitrile

La structure de l'**AMD070-*p*-BnCO₂Me** a été confirmée par RMN ¹H et ¹³C. Tout d'abord, sur le spectre du carbone la disparition du signal de la fonction nitrile à 117,2 ppm révèle bien que l'hydrogénation a eu lieu. En complément, le signal correspondant au nouveau groupement méthylène en position α de l'amine primaire est clairement identifié (grâce aux RMN 2D) avec un déplacement chimique à 42,1 ppm. Le reste des signaux caractéristiques des carbones du composé **5** sont également présents [Figure 74].

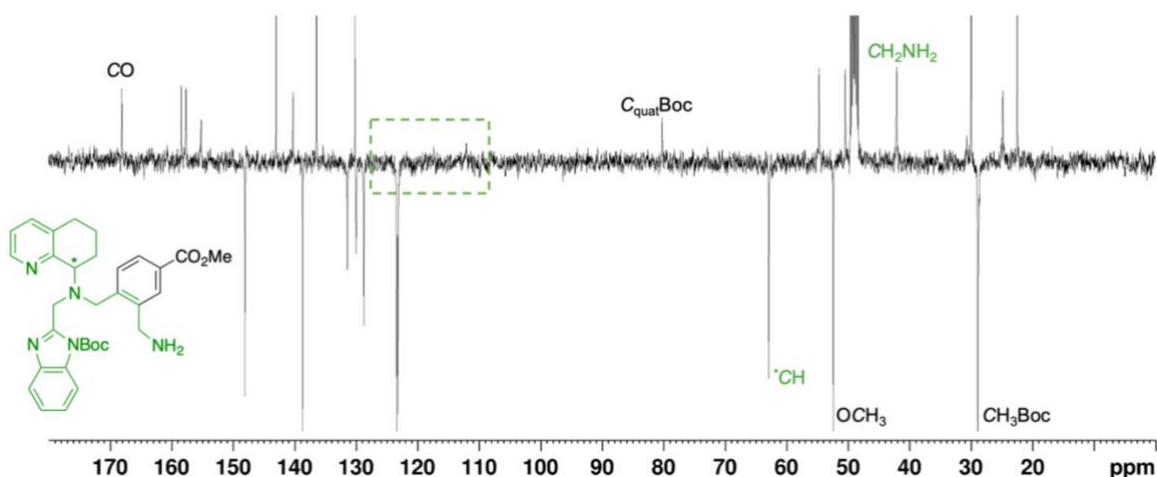


Figure 74 : Spectre RMN ^{13}C Jmod de l'**AMD070-p-BnCO₂Me** (MeOD, 75 MHz, 298 K)

L'amine primaire générée est impliquée dans la reconnaissance du récepteur CXCR4. Comme nous l'avons mentionné auparavant, il est nécessaire de protéger cette amine primaire avant d'introduire l'espaceur **éthylènediamine** [Figure 64]. L'amine du motif benzimidazole étant déjà protégé par un groupement Boc, nous avons décidé de protéger l'amine primaire avec le même groupement pour avoir une seule étape de déprotection finale. Pour cela, l'**AMD070-p-BnCO₂Me** a été mis en présence de Boc₂O au reflux du THF pendant une nuit et a conduit au composé **6** avec un rendement de 94%, après purification sur colonne chromatographique (DCM/MeOH). L'introduction de l'espaceur **éthylènediamine** sur le composé **6** a été réalisée au travers d'une réaction d'aminolyse. Pour mener à bien cette réaction, l'**éthylènediamine** est introduite en large excès (> 1500 équivalents) tout en se plaçant en conditions diluées pour favoriser la réaction [1+1] et éviter la formation d'un lien amide de chaque côté de l'**éthylènediamine** par réaction avec deux équivalents du composé **6**.^[157] Ainsi, le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 5 jours, puis le composé **AMD070-p-BnCO-eda** est isolé après traitement avec 86% de rendement [Figure 75].

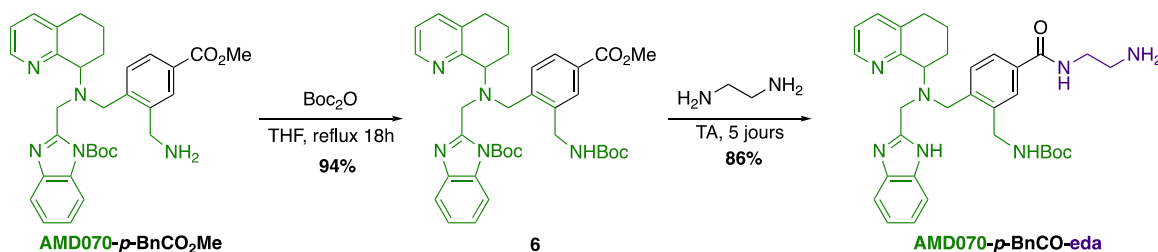


Figure 75 : Voie de synthèse du composé **AMD070-p-BnCO-eda**

L'obtention du composé **AMD070-p-BnCO-eda** a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C . La conjugaison de l'**éthylènediamine** sur le composé **6** est démontrée par le signal ^{13}C correspondant à la fonction amide à 170,1 ppm. Les deux CH_2 de l'**éthylènediamine** présentent des déplacements chimiques de 43,4 et 42,3 ppm. Étonnamment, lors de cette dernière étape, une liaison amine-Boc a été clivée. En effet le spectre RMN du carbone met en évidence un seul signal correspondant à un carbone quaternaire du groupement Boc avec un déplacement de 80,3 ppm. De plus, en RMN du proton, l'intégration des méthyles ne correspond pas à la présence de deux groupements Boc. Les RMN 2D ont permis de conclure que le groupement Boc clivé est celui du motif benzimidazole, grâce à la présence du couplage en ^3J entre les protons du groupement méthylène en position α de la fonction NHBoc et l'atome de carbone du Boc attestant du maintien de l'enchaînement $\text{CH}_2\text{-NH-Boc}$ sur le noyau benzyle [Figure 76].

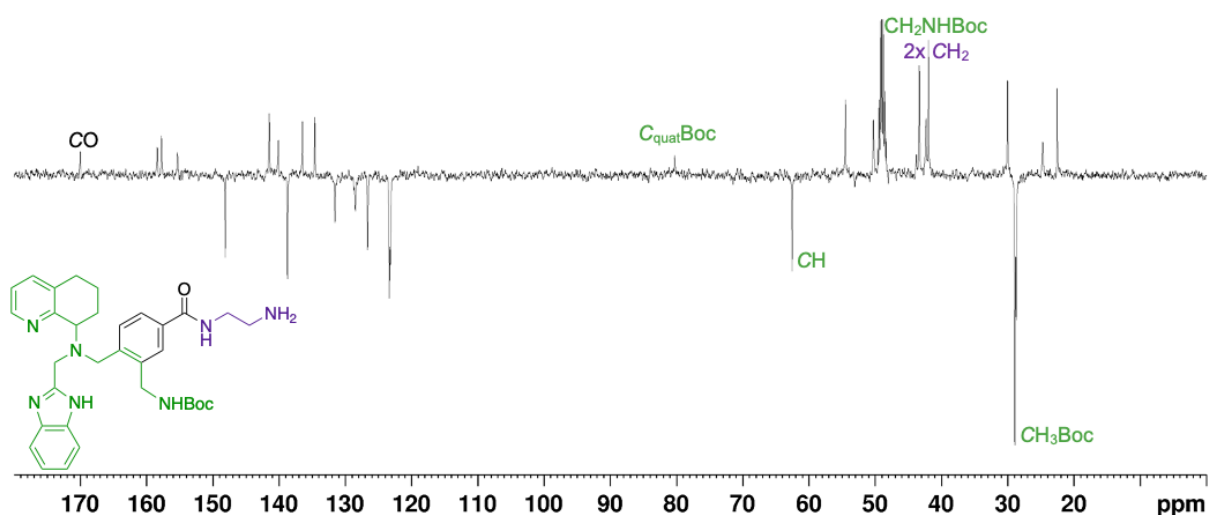


Figure 76 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du **AMD070-p-BnCO-eda** (MeOD, 75 MHz, 298 K)

L'amine déprotégée étant une amine secondaire impliquée dans un système aromatique, cela n'a pas d'impact sur la suite de la voie de synthèse. L'amine primaire de l'**éthylènediamine** reste la seule fonction susceptible de réagir avec la fonction isothiocyanate lors de la réaction de couplage avec le macrocycle **p-SCN-Bn-TE1PA** pour former un lien thiourée.

3. Conjugaison des dérivés **AMD070** au chélateur

La stratégie de greffage des petites molécules **AMD** sur la plateforme macrocyclique repose sur la formation d'un lien thiourée entre l'amine primaire des molécules inhibitrices et la fonction isothiocyanate du **p-SCN-Bn-TE1PA**.

Lors de ces travaux de thèse, certaines étapes de la voie de synthèse initiale [Figure 63] du macrocycle **p-SCN-Bn-TE1PA** ont été optimisées [Figure 77]. En effet, la protection des amines par le groupement Boc a été effectuée sans présence de base dans du THF et a permis d'obtenir le composé **f** avec un rendement de 81% contre 60% précédemment (dans CH₂Cl₂/Et₃N). Contrairement à la voie de synthèse décrite initialement par le laboratoire, l'obtention du composé **h** s'effectue ici sans purification sur colonne d'alumine car lors de l'hydrolyse acide, le composé **i** est isolé par précipitation dans le méthanol, l'excès du nucléophile restant dans le filtrat. L'activation de l'aniline par le thiophosgène est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir en milieu hétérogène (CHCl₃/HCl (3 M)), mais une purification sur colonne en phase inverse a tout de même été réalisée car une faible quantité d'aniline n'ayant pas réagi restait présente. Dans notre cas, le composé final a été obtenu à l'échelle de 120 mg. Les essais d'activation de la fonction aniline n'ont pas été réalisés sur plus grande quantité compte tenu des traitements fastidieux qu'engendre l'émulsion formée par la réaction en milieu biphasique. Le **p-SCN-Bn-TE1PA** a été obtenu avec un rendement global de 6% en 10 étapes de synthèse, ce qui est ainsi un rendement trois fois meilleur que les conditions précédentes (même nombre d'étapes, rendement global de 2%).

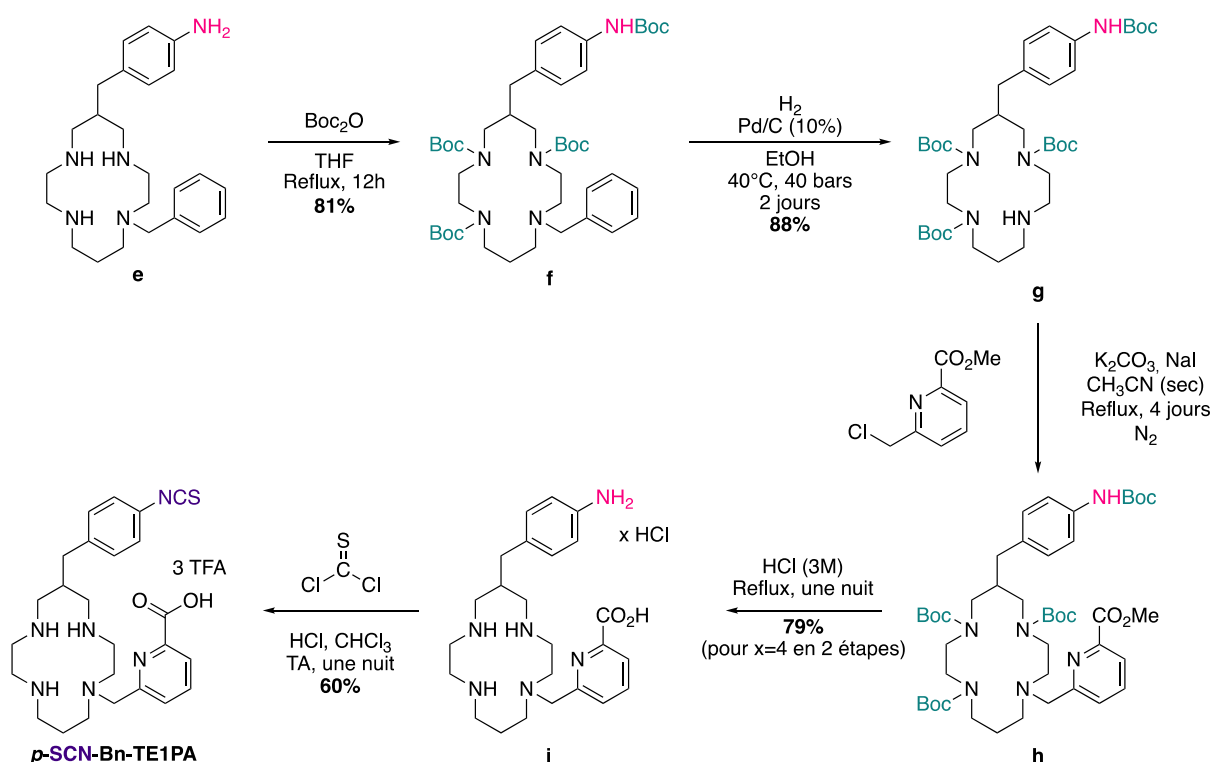


Figure 77 : Étapes de synthèse optimisées menant à l'obtention du **p-SCN-Bn-TE1PA**

3.1. Synthèse de l'AMD070-*p*-SCN-Bn-TE1PA (AMD070-TE1PA)

L'AMD070 présentant une synthèse plus aisée que son analogue AMD070-*p*-BnCO-eda il a été retenu pour mettre au point la réaction de couplage avec le *p*-SCN-Bn-TE1PA [Figure 78].

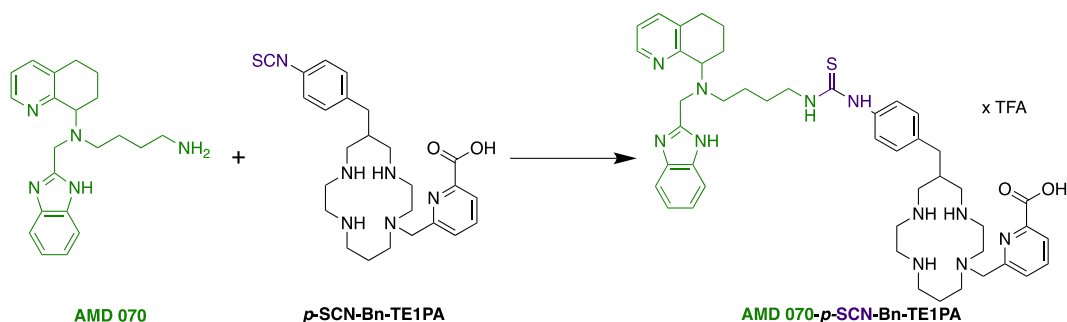


Figure 78 : Voie de synthèse pour obtenir l'AMD070-*p*-SCN-Bn-TE1PA

Le premier frein à la réaction de couplage a été la solubilité des réactifs : l'AMD070 sous sa forme déprotonée neutre est soluble en milieu organique tandis que le macrocycle sous sa forme trifluoroacétate est soluble en milieu aqueux. La mise au point de la réaction a donc débuté par le choix du système de solvant et de base en se plaçant à température ambiante dans des proportions stœchiométriques. Une réaction en milieu hétérogène (CHCl₃/H₂O) a été entreprise mais n'a pas conduit à la formation du composé souhaité [Tableau 20 (1)]. En se plaçant en milieu organique (CHCl₃) avec un excès de base (DIPEA) pour déprotoner le macrocycle, le problème de solubilité des réactifs a été résolu mais n'a pas conduit à la conversion vers le produit [Tableau 20 (2)]. L'utilisation de DMF comme solvant et de triéthylamine comme base a permis pour la première fois d'observer la formation du produit de couplage, et a été retenu pour la suite des essais [Tableau 20 (3)].

Tableau 20 : Récapitulatif des conditions de réaction utilisées pour le couplage de l'AMD070 avec le *p*-SCN-Bn-TE1PA en proportion stœchiométrique

	Solvant	Base	T	t	Résultat
(1)	CHCl ₃ /H ₂ O	K ₂ CO ₃	25°C	18 h	Pas de conversion
(2)	CHCl ₃	DIPEA	25°C	48 h	Pas de conversion
(3)	DMF	Et ₃ N	25°C	6 j	Produit observé

Une fois le système de solvant et de base défini, la température de réaction a été modifiée. En se plaçant à 80°C, la formation du composé est observée au bout de 2h de réaction

[Tableau 21 (2)]. En revanche, la conversion n'est pas totale et il n'est pas aisé de séparer le produit du **p-SCN-Bn-TE1PA**. Pour faciliter la purification, la réaction a donc été effectuée en présence d'excès d'**AMD070** afin de consommer tout le **p-SCN-Bn-TE1PA**, ce qui est réalisé après plus de deux jours [Tableau 21 (3)].

Tableau 21 : Récapitulatif des conditions de réaction utilisées pour le couplage de l'**AMD070** avec le **p-SCN-Bn-TE1PA** dans le DMF en présence de triéthylamine

	AMD 070	p-SCN-Bn-TE1PA	T	t	Résultat
1	1 eq	1 eq	25°C	6 j	Réaction incomplète
2	1 eq	1 eq	80°C	2 h	Réaction incomplète
3	1,5 eq	1 eq	80°C	54 h	Produit isolé

La purification du composé a été réalisée sur colonne chromatographique en phase inverse et a permis d'isoler l'**AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** avec un rendement de 8%. Ce faible rendement s'explique par le fait que les manipulations ont été effectuées à partir de 20 mg de composé macrocyclique. La synthèse à plus grande échelle n'a pas été essayée compte tenu de la haute valeur ajoutée du composé **p-SCN-Bn-TE1PA**, de plus, le composé a été obtenu en quantité suffisantes pour la suite des études.

Malgré la faible masse de composé obtenue (1,98 mg), sa caractérisation par RMN ¹H et ¹³C a été réalisée. Le signal correspondant à la fonction thiourée est présent avec un déplacement chimique de 182,4 ppm. Les 8 signaux caractéristiques des groupements méthylène du macrocycle sont retrouvés de 55 à 44 ppm ainsi que les signaux caractéristiques du motif **AMD070**. En effet, les signaux correspondant aux groupements de la quinoline sont identifiés en dessous de 30 ppm avec le signal du CH₂βN du macrocycle. Le *CH asymétrique de l'**AMD070** présente un déplacement chimique de 61,2 ppm [Figure 79].

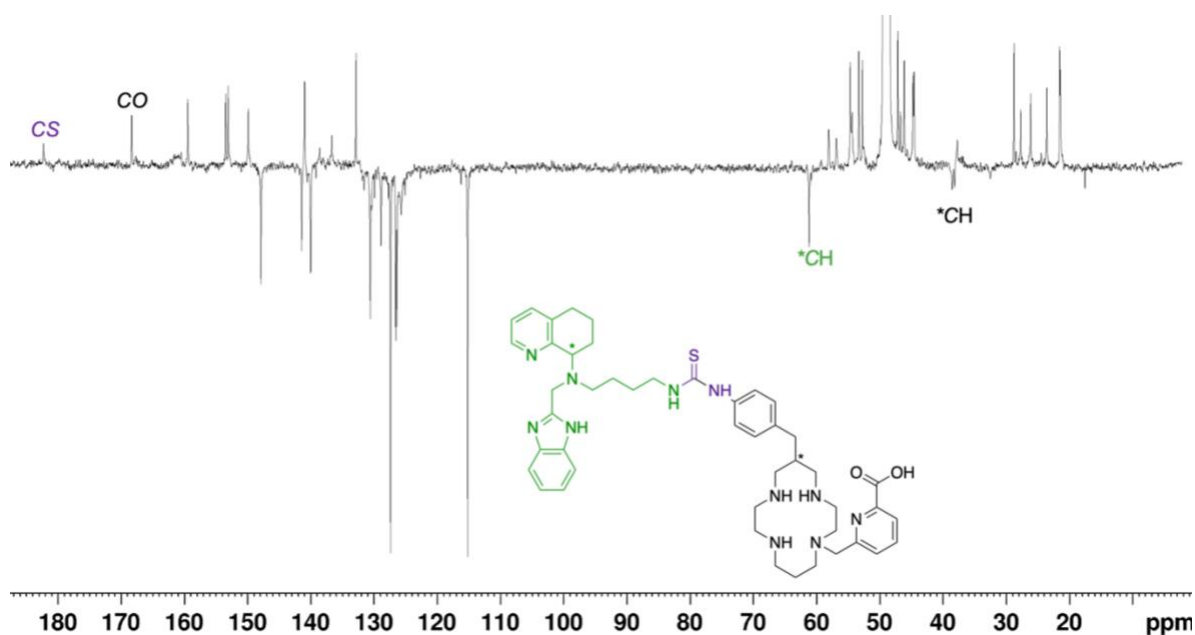


Figure 79 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** (MeOD, 125 MHz, 298 K)

La pureté de l'**AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** a pu être déterminée par HPLC-Analytique grâce à la haute sensibilité de cette technique demandant ici uniquement 0,01 mg de composé. L'analyse de ce composé démontre une pureté de 95%, valeur très élevée permettant d'envisager les études de radiomarquage et cellulaires. Pour plus de clarté, le composé **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** sera nommé **AMD070-TE1PA** lors des études biologiques.

3.2. Synthèse de l'**AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA (AMD070*-TE1PA)**

La réaction de couplage ayant été mise au point avec l'**AMD070**, les conditions ont pu être adaptées au couplage entre l'**AMD070-p-BnCO-eda** et le **p-SCN-Bn-TE1PA**. La présence du groupement protecteur Boc sur l'amine primaire induit une étape d'hydrolyse supplémentaire à la suite du couplage. En raison des faibles quantités de composés utilisées pour les réactions de couplage, l'étape d'hydrolyse (HCl (1 M)) a été conduite à la suite de la réaction de couplage sans purification intermédiaire. Le composé **AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA** a été isolé par précipitation (eau/acétone) avec 17% de rendement en 2 étapes [Figure 80].

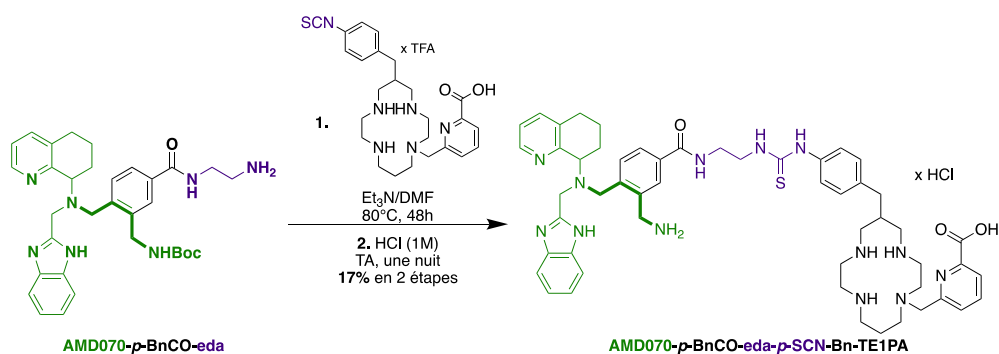


Figure 80 : Voie de synthèse de l'AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA

Le composé a été caractérisé à l'aide des RMN ^1H et ^{13}C . Le spectre RMN ^{13}C confirme la formation du composé avec la présence des signaux caractéristiques pour les CH asymétriques (*CH) de la partie inhibitrice et du macrocycle avec des déplacements chimiques de 65,5 et 39,3 ppm respectivement [Figure 81]. L'atome de carbone de la fonction thiourée ne résonne pas suffisamment pour être visible sur ce spectre mais les signaux caractéristiques des groupements méthylène en position α des fonctions amine du macrocycle (9 CH_2) et du motif tétrahydroquinoline (5 CH_2) sont bien présents de 59,6 à 40,0 ppm. La pureté déterminée par HPLC-analytique est supérieure à 99%.

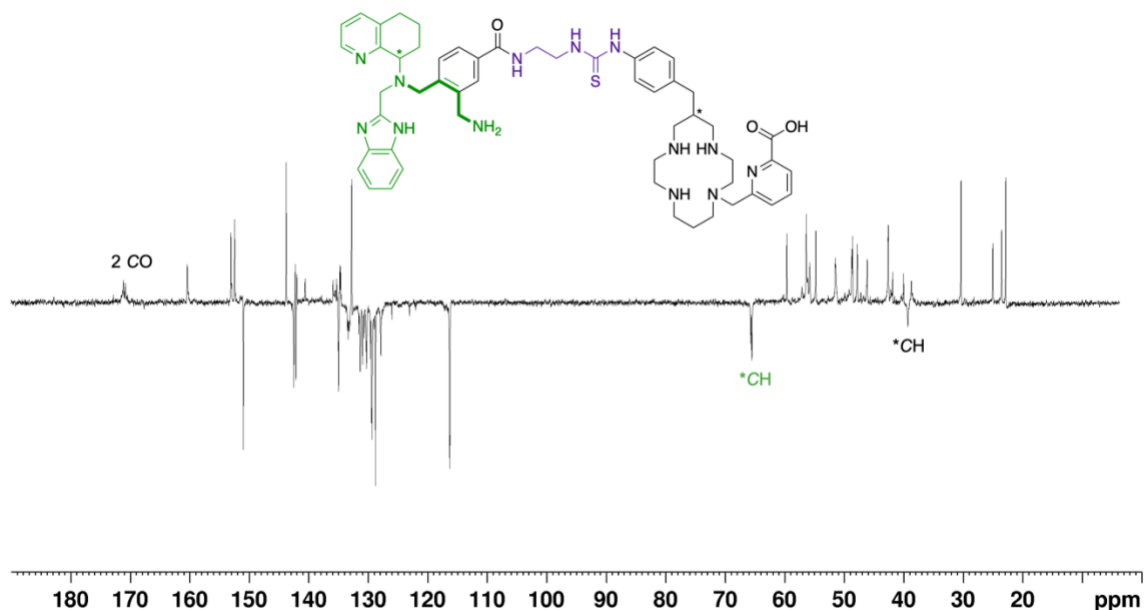


Figure 81 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA (D_2O , 125 MHz, 298 K)

Pour plus de clarté, le composé AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA sera nommé AMD070*-TE1PA lors des études biologiques.

4. Conjugaison à la fluorescéine isothiocyanate

Afin de vérifier que le greffage des dérivés **AMD070** par nos chélateurs n'altère pas leurs propriétés de reconnaissance, nous avons synthétisé des analogues fluorescents. Pour ce type d'étude, le fluorophore fluorescéine qui présente une longueur d'onde d'absorption maximale à 490 nm est fréquemment utilisé. Nous avons donc naturellement choisi la fluorescéine isothiocyanate (**FITC**) pour réaliser les réactions de couplage avec les dérivés **AMD070**, permettant d'obtenir également un lien thiourée entre les deux synthons, comme pour les molécules **AMD070-TE1PA** et **AMD070*-TE1PA**.

4.1. Synthèse de l'**AMD070-FITC**

Comme précédemment, le greffage de la **FITC** sur l'**AMD070** est réalisé dans le système de solvant et de base DMF/Et₃N. En revanche, la réaction en quantité stœchiométrique conduit à une séparation difficile des composés. En effet, le produit issu de la réaction possède le même temps de rétention en chromatographie flash en phase inverse que la fluorescéine, ne permettant pas la séparation. Cependant, l'**AMD070** étant facilement séparable du produit formé, l'introduction d'un excès d'**AMD070** permet de consommer la **FITC** en 3 jours à 25°C. La séparation sur colonne chromatographique en phase inverse permet d'isoler l'**AMD070-FITC** avec un rendement de 5% [Figure 82].

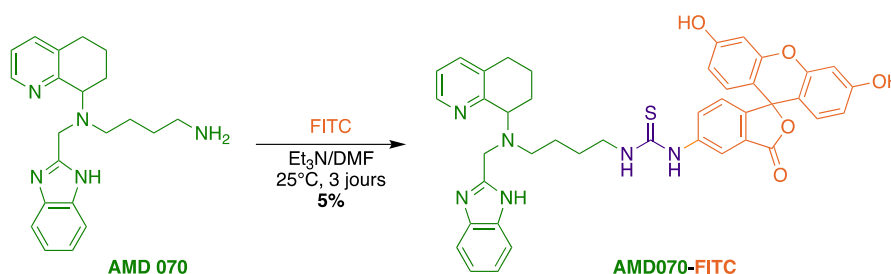


Figure 82 : Voie de synthèse de l'**AMD070-FITC**

La structure de l'**AMD070-FITC** a été confirmée par RMN ¹H et ¹³C. Plus particulièrement, quelques signaux présents en RMN du carbone sont caractéristiques, comme celui du carbone de la fonction thiourée qui présente un déplacement à 181,2 ppm et le groupement méthylène adjacent de la thiourée à un déplacement chimique de 44,0 ppm. De plus, les signaux caractéristiques de l'**AMD070** sont bien présents, tout d'abord les CH₂ de la quinoline et ceux du milieu de la chaîne butane résonnent à des déplacements chimiques compris entre 31,8 et 21,5 ppm, tandis que les CH₂ adjacents à des atomes d'azote présentent un déplacement chimique plus déblindé vers 50 ppm. Les signaux des atomes de carbone *ipso* et aromatiques

de la fluorescéine et de l'**AMD070** sont également présents de 160,1 à 102,4 ppm [Figure 83]. La pureté a été déterminée par HPLC-Analytique à hauteur de 96%.

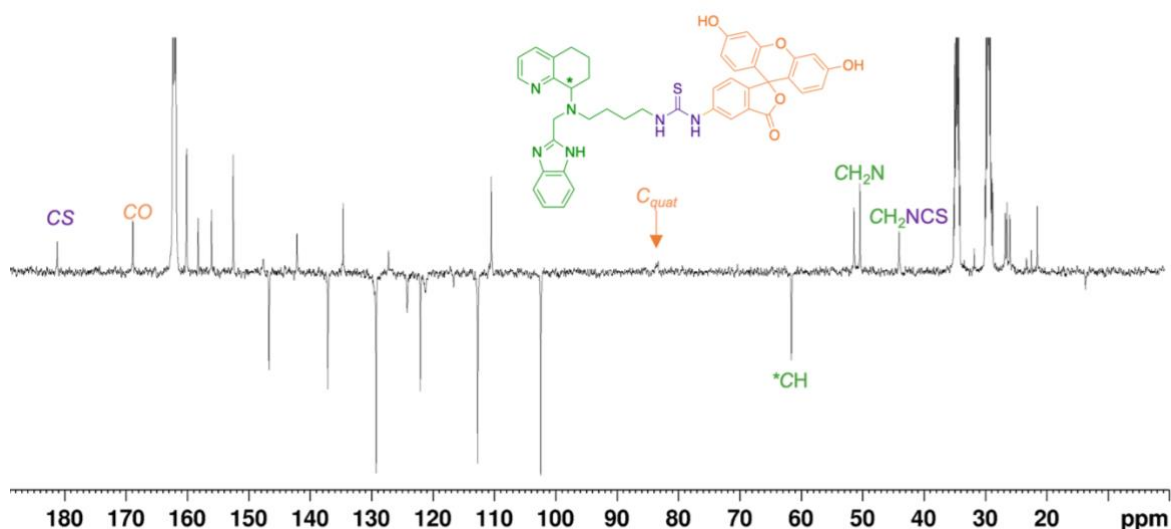


Figure 83 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du **AMD070-FITC** (DMF-d₇, 125 MHz, 298 K)

4.2. Synthèse de l'**AMD070-p-BnCO-eda-FITC** (**AMD070*-FITC**)

La mise au point de la réaction de couplage pour obtenir l'**AMD070-FITC** ayant demandé des ajustements, les modifications apportées ont été transposées au second modèle pour obtenir le composé **AMD070-p-BnCO-eda-FITC**. Il est important de noter la différence de réactivité entre les deux dérivés **AMD070**. La réactivité de l'**AMD070-p-BnCO-eda** semble meilleure que l'analogue linéaire (**AMD070**), comme le montre le rendement de la réaction de couplage de 78%, contre 5% précédemment. Cette différence de réactivité peut s'expliquer par la longueur de la chaîne carbonée (C4) de l'amine primaire. Le composé issu de la réaction de couplage a ensuite été engagé dans une étape d'hydrolyse acide pour déprotéger l'amine primaire de son groupement Boc. Le composé n'étant pas soluble en milieu acide (HCl (3 M)), du THF a été ajouté. Après trois heures à 40°C, une purification par colonne chromatographique en phase inverse permet d'isoler l'**AMD070-p-BnCO-eda-FITC** avec un rendement de 24% en 2 étapes [Figure 84].

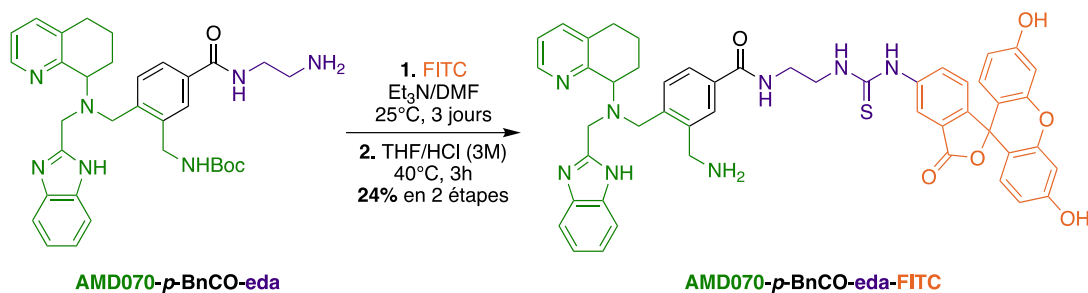


Figure 84 : Voie de synthèse de l'AMD070-p-BnCO-eda-FITC

Le spectre RMN ^{13}C de l'AMD070-p-BnCO-eda-FITC confirme la structure du composé avec le signal caractéristique du carbone du lien thiourée à un déplacement chimique de 181,4 ppm. Les signaux correspondants aux groupements méthylène adjacents à des fonctions amine du motif AMD070-p-BnCO-eda résonnent de 54,0 à 38,9 ppm. De plus, les CH_2 de la quinoline eux ont un déplacement chimique plus blindé compris entre 23,7 et 20,8 ppm. Enfin, le carbonyle de la fonction amide présente un déplacement chimique de 169,5 ppm. Les signaux de la FITC sont également présents de 156 à 102 ppm avec les signaux aromatiques de l'AMD070-p-BnCO-eda [Figure 85]. En revanche, un second signal est observé aux alentours de 75 ppm, qui pourrait être attribué à de la fluorescéine libre mais l'analyse HPLC révèle une pureté de 98%. Enfin, l'analyse HRMS confirme également la formation du composé AMD070-p-BnCO-eda-FITC. Pour plus de clarté, ce composé sera nommé AMD070*-FITC pour les études biologiques à suivre.

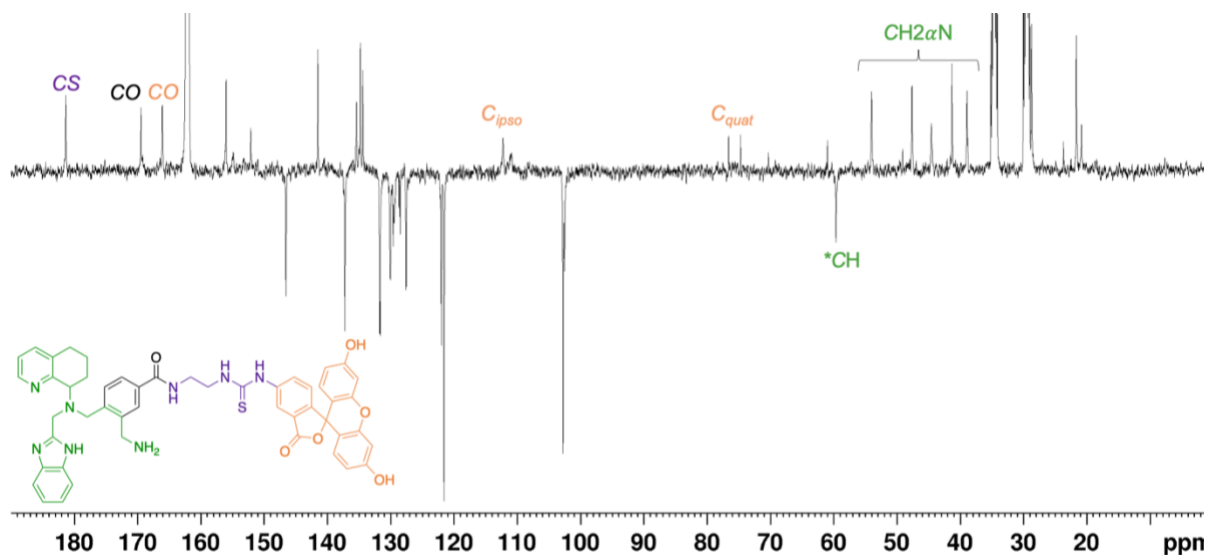


Figure 85 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du AMD070-p-BnCO-eda-FITC (DMF-d₇, 125 MHz, 298 K)

Bien que les rendements de réactions pour obtenir les deux composés fluorescents soient faibles, la pureté des composés est très élevée, permettant de réaliser les études cellulaires. De plus, la concentration utilisée pour les manipulations *in vitro* est de l'ordre du picomolaire.

III. Études biologiques

Dans le but d'étudier la reconnaissance de CXCR4 par nos composés, nous avons collaboré avec l'équipe 2 du Professeur Michel Chérel du CRCI²NA, unité INSERM 1232-CNRS 6299 de Nantes. Cette équipe est spécialisée dans l'immunologie ainsi que l'oncologie nucléaire. Au cours de ma thèse, j'ai pu me rendre à Nantes pour assister aux manipulations de radiomarquage et cellulaires réalisées par Patricia Le Saëc sous la direction du Professeur Alain Faivre-Chauvet.

Dans un premier temps, les conditions de radiomarquage des composés **AMD070-TE1PA** et **AMD070*-TE1PA** par le cuivre-64 ont été mises au point. Dans un second temps, l'influence de la conjugaison sur les molécules inhibitrices a été étudiée *in vitro* avec les composés fluorescents sur une lignée cellulaire de myélome multiple.

1. Radiomarquage

1.1. Radiomarquage du composé **AMD070-TE1PA**

Compte tenu de la structure du composé **AMD070-TE1PA**, les conditions utilisées lors de précédentes études impliquant le **TE1PA** C-fonctionnel greffé sur anticorps ont été de nouveau appliquées.^[23] Pour cela, le composé **AMD070-TE1PA** a été radiomarquée par une solution de $[^{64}\text{Cu}][\text{CuCl}_2]$ d'activité connue, dans un tampon acétate de sodium (2,5 M) à pH 5-6. Le milieu est agité pendant 10 minutes à 42°C, puis analysé par radio-HPLC. Le radiochromatogramme obtenu [**Figure 86 gauche**] révèle la présence de 24% de cuivre libre avec un temps de rétention de 3 min 06 (intégration en blanc), tandis que notre composé présente une complexation de 76% du cuivre avec un temps de rétention de 12 min 08 (intégration en jaune). Pour complexer et séparer le cuivre libre, le chélateur **EDTA** est introduit en excès pendant une nuit à 42°C, puis le milieu réactionnel est à nouveau contrôlé par radio-HPLC. Contre toute attente, 77% de l'activité observée correspond alors au complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$, avec un temps de rétention connu de 2 min 14 (intégration en blanc), et seulement 23% restant pour le radioconjugué $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-TE1PA})]^+$ (intégration en jaune) [**Figure 86 droite**].

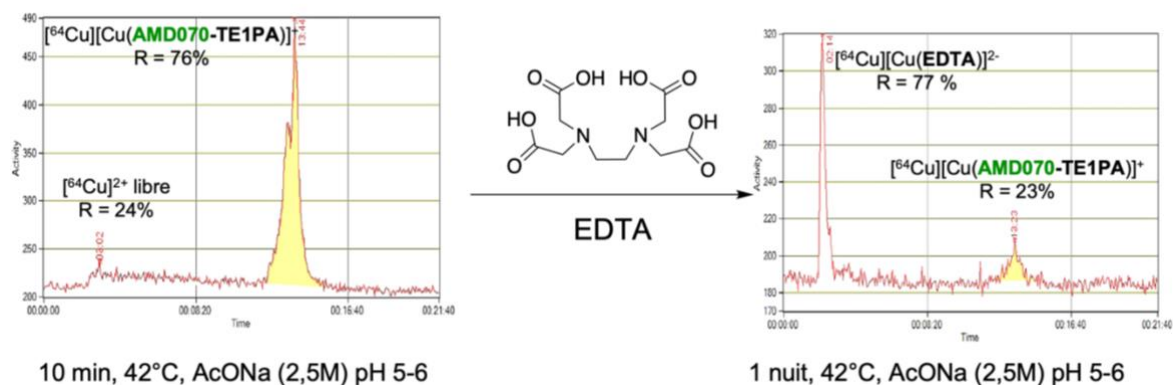


Figure 86 : Radiochromatogramme HPLC obtenu après radiomarquage de l'**AMD070-TE1PA** à 42°C pendant 10 minutes (gauche). Radiochromatogramme HPLC obtenu après ajout d'**EDTA** pendant une nuit à 42°C

Ce résultat démontre que l'**EDTA** a chélaté 50% du cuivre-64 assigné au complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-TE1PA})]^{2+}$ lors de la première analyse radio-HPLC. Or, les études précédentes avec le chélateur **TE1PA C-fonctionnel** greffé ont démontré la robustesse du complexe formé avec le cuivre, en particulier en présence d'un large excès d'**EDTA**, où aucune transchélation n'est observée. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une coordination non-spécifique faible du cuivre par le motif tétrahydroquinoline-benzimidazole [**Figure 87**]. Lors de la réaction de complexation, plusieurs complexes peuvent donc se former (i) le cuivre est piégé par le macrocycle, (ii) le cuivre est coordonné par le motif **AMD070** (iii) le cuivre est coordonné par les deux motifs. Mais après ajout d'**EDTA**, seulement 23% de l'activité reste associée au conjugué (cuivre piégé par le macrocycle), ce qui signifie que 53% de l'activité associée après 10 minutes concernait finalement la coordination non-spécifique non souhaitée (par le motif tétrahydroquinoline-benzimidazole).

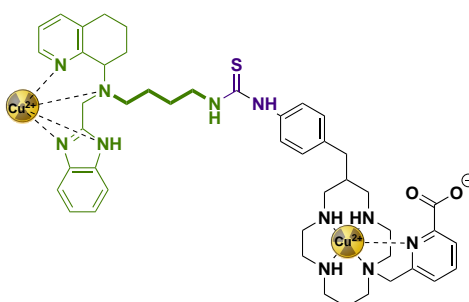


Figure 87 : Schéma hypothétique du complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-TE1PA})]^{+}$ avec possibilité de coordination du cuivre avec le motif tétrahydroquinoline-benzimidazole

Pour vérifier cette hypothèse, le radiomarquage de l'**AMD070** seul par le cuivre-64 a été réalisée dans les mêmes conditions [**Figure 88**].

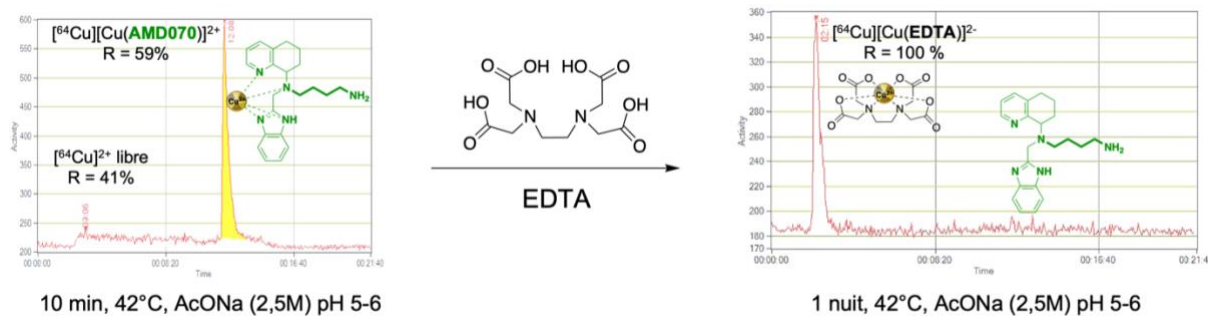


Figure 88 : Radiochromatogrammes HPLC obtenus après radiomarquage de l'**AMD070** par le cuivre-64

Le radiochromatogramme obtenu avant l'ajout d'**EDTA** montre sans ambiguïté la formation d'un complexe entre le cuivre (II) et l'**AMD070**. En revanche, après ajout d'**EDTA**, uniquement le complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ est identifié. Notre hypothèse est donc vérifiée, il y a bien un second site de coordination sur notre molécule au niveau du motif tétrahydroquinoline-benzimidazole. Le complexe formé n'est cependant pas suffisamment robuste vis-à-vis de la compétition avec l'**EDTA**.

L'étude de cette coordination non-spécifique a également été réalisée par suivi de complexation en proportion stœchiométrique avec du cuivre « froid » à l'aide de la spectroscopie UV-visible. Comme présenté précédemment (cf Chapitre 1 I. 2. 1.), la formation d'un complexe de cuivre en solution peut être suivie grâce aux bandes d'absorption d-d. Pour cela, 16 échantillons ont été préparés avec une concentration constante de ligand **AMD070** ($c = 1,33 \text{ mM}$) et des concentrations croissantes de cuivre (de 0 à 2 équivalents) afin d'étudier l'équilibre de la formation du complexe en solution. La complexation du cuivre (II) par l'**AMD070** est bien visible par l'augmentation de l'absorbance à 645 nm en fonction du nombre d'équivalent de cuivre (II) ajouté [Figure 89].

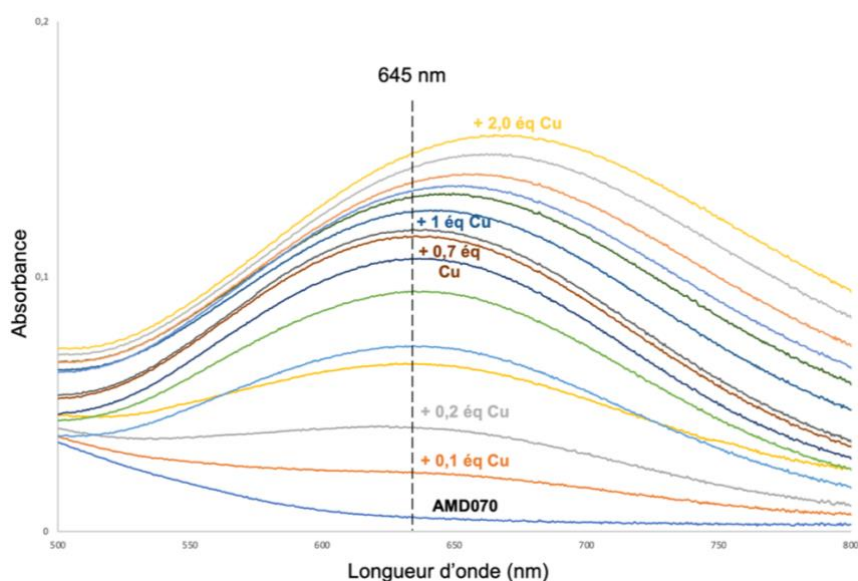


Figure 89 : Spectres UV-visible du suivi de complexation du cuivre (II) par l'**AMD070** en tampon acétate pH = 3,8 à 25°C avec $[\text{AMD070}] = 1,33 \text{ mM}$

La valeur d'absorbance à 645 nm a été tracée en fonction du nombre d'équivalents de cuivre (II) ajouté aux échantillons. Deux droites sont visibles et le point d'intersection de ces deux droites correspond à 0,7 équivalent [Figure 90]. Cette valeur suggère qu'un complexe ayant une structure de type trois ligands pour deux ions cuivrique est formé. Au-delà de 0,7 équivalents, un décalage de longueur d'onde est observé, laissant penser qu'en présence d'un excès de cuivre (II), un ou plusieurs autres complexes se forment.

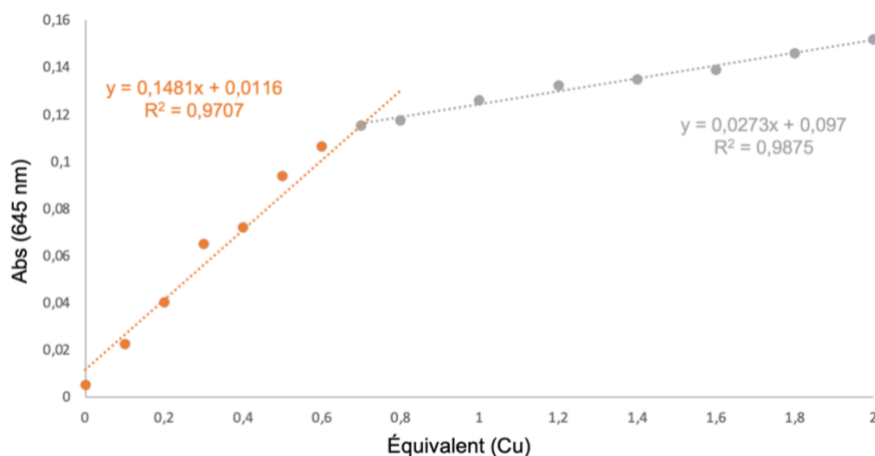


Figure 90 : Absorbance à 645 nm en fonction du nombre d'équivalent de cuivre (II) ajouté à l'**AMD070**

Ainsi, les études de coordination sur la molécule **AMD070** ont permis de mettre en valeur l'affinité de cette molécule pour le cuivre (II). Afin de s'affranchir de cette coordination parasite, et favoriser la coordination au niveau de la cavité macrocyclique, les conditions de radiomarquage ont été modifiées. Un excès de cuivre-64 est introduit (2 équivalents) et le milieu réactionnel est chauffé à 95°C pendant 10 minutes. L'**EDTA** est ensuite ajouté pour éliminer le cuivre libre restant et la fixation non-spécifique et cela pendant 10 min à 95°C également.

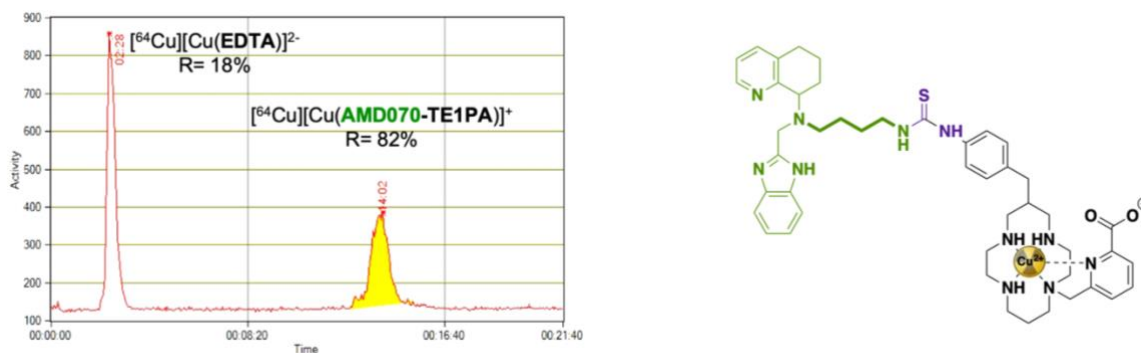


Figure 91 : Radiochromatogramme HPLC obtenu après radiomarquage de l'**AMD070-TE1PA** par le cuivre-64 (2,5 M acétate de sodium, pH = 5-6, 10 min, 95°C) (gauche) Représentation du radiocomplexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-TE1PA})]^+$ (droite)

Avec ces conditions, le composé a pu être radiomarqué avec un rendement de 82%. On peut noter que les chromatogrammes enregistrés montrent des pics d'élution assez larges pour notre conjugué, ce qui est probablement dû à la présence d'un mélange de diastéréoisomères après coordination du cuivre. Pour séparer les deux complexes, une purification sur colonne C₁₈ « SepPak » est réalisée. Le complexe [sup>64Cu][Cu(EDTA)]²⁻ est élué en premier grâce à une solution de chlorure de sodium et une seconde élution avec un mélange NaCl/EtOH (1 :1) permet d'isoler le radiocomplexe [sup>64Cu][Cu(AMD070-TE1PA)]⁺. L'évaporation de l'éthanol permet d'obtenir une solution injectable pour les études cellulaires à suivre.

1.2. Radiomarquage du composé AMD070*-TE1PA

Le radiomarquage du composé AMD070*-TE1PA par le cuivre-64 a été réalisées dans les mêmes conditions que le composé AMD070-TE1PA afin d'éviter une coordination parasite au niveau du motif reconnaissant CXCR4. Une nouvelle fois, les pics d'élution obtenus sont larges, à cause de la présence potentielle de diastéréoisomères du complexe [Figure 92].

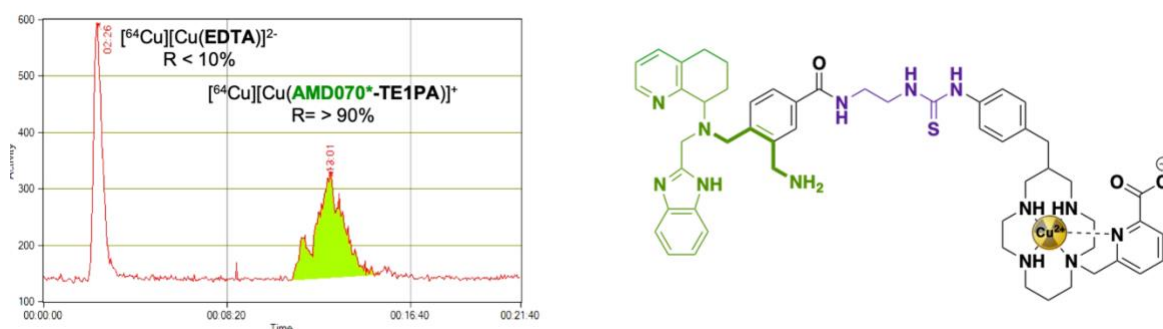


Figure 92 : Radiochromatogramme HPLC obtenu après radiomarquage de l'AMD070*-TE1PA (2,5 M acétate de sodium, pH = 5-6, 10 min, 95°C) (gauche) Représentation du complexe [sup>64Cu][Cu(AMD070*-TE1PA)]⁺ (droite)

Le radiocomposé [sup>64Cu][Cu(AMD070*-TE1PA)]⁺ a ainsi été obtenu avec un rendement de radiomarquage supérieur à 90%. De la même façon, la purification sur colonne C₁₈ SepPak permet d'obtenir une solution injectable du radiocomposé après évaporation de l'éthanol.

2. Études cellulaires des composés fluorescents

Pour étudier l'influence de la conjugaison des petites molécules reconnaissant CXCR4, des études cellulaires en cytométrie en flux ont été réalisées avec les composés fluorescents AMD070-FITC et AMD070*-FITC. La cytométrie en flux permet l'analyse de cellules en suspension colorées par un fluorochrome en passant devant un laser. L'interaction des

cellules avec la lumière donne accès à certaines de leurs caractéristiques telles que leur taille, leur granulosité ainsi que leur fluorescence [Figure 93].

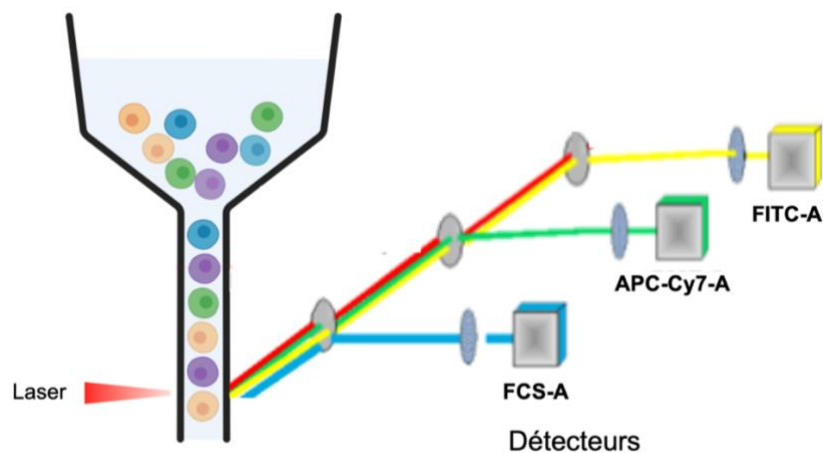


Figure 93 : Représentation schématique du principe de cytométrie en flux

Le but de ces études est de vérifier qu'après greffages, les dérivés de l'**AMD070** obtenus présentent toujours une activité d'inhibition du récepteur CXCR4. Pour cela, nos composés ont été étudiés sur une lignée cellulaire de myélome multiple, U266.B1 exprimant CXCR4.

D'un point de vue expérimental, sur une plaque de 96 puits, des échantillons de cellules (200 000 cellules/puits) ont été incubées à 4°C pendant 45 minutes avec une concentration croissante en **AMD070-FITC** et **AMD070*-FITC** (de 0,10 à 0,66 pmol/mL) et les expériences sont réalisées en triplicat pour chaque concentration. Après 45 minutes d'incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du milieu de culture (PBS 5%) puis incubées 15 minutes à température ambiante avec un colorant fluorescent (APC-Cy7-A) qui permet d'évaluer leur viabilité. Ce composé n'est pas perméable aux cellules vivantes mais l'est aux cellules mortes, qui présentent des membranes altérées. Avant l'analyse par cytométrie de flux, les cellules sont de nouveau lavées deux fois avec le milieu de culture. L'analyse FACS (Fluorescence Assisted Cell Sorting) a été enregistrée par le module BD FACS Canto II™ (BD Sciences) et l'interprétation des résultats est effectuée par le logiciel FlowJo™ (BD Sciences).

Pour chaque cellule, deux paramètres sont tout d'abord pris en compte, correspondant à leurs coordonnées sur le premier graphique (appelé Dot Plot) : leur taille (FCS-A) en ordonnée et leur viabilité (intensité de fluorescence APC-Cy-A) en abscisse [Figure 94, 1]. Les cellules mortes (cadran Q2), de petite taille (cadran Q4) ou combinant ces deux propriétés (cadran Q3) sont ainsi éliminées pour la suite de l'analyse. Seules les cellules dont les coordonnées

sont localisées dans le cadran Q1 (soit ici 85,6% des cellules) sont prises en compte pour l'étude de fixation cellulaire.

Dans le second dot plot [Figure 94, 2], la taille des cellules est toujours utilisée en ordonnée, mais l'abscisse correspond maintenant à l'intensité de fluorescence (FITC-A) à la longueur d'onde d'émission de la fluorescéine ($\lambda_{em} = 514 \text{ nm}$). Les cellules présentent une autofluorescence non négligeable, qui doit être prise en compte lors de l'étude de la liaison avec nos composés. Ainsi, ce dot plot réalisé à partir de cellules de contrôle (non incubées avec les conjugués fluorescents) permet de définir les cadrans et montre que sans composé fluorescent incubé, 2 % des cellules étudiées présentent déjà une légère intensité de fluorescence à cette longueur d'onde (cadran Q2') [Figure 94, 2].

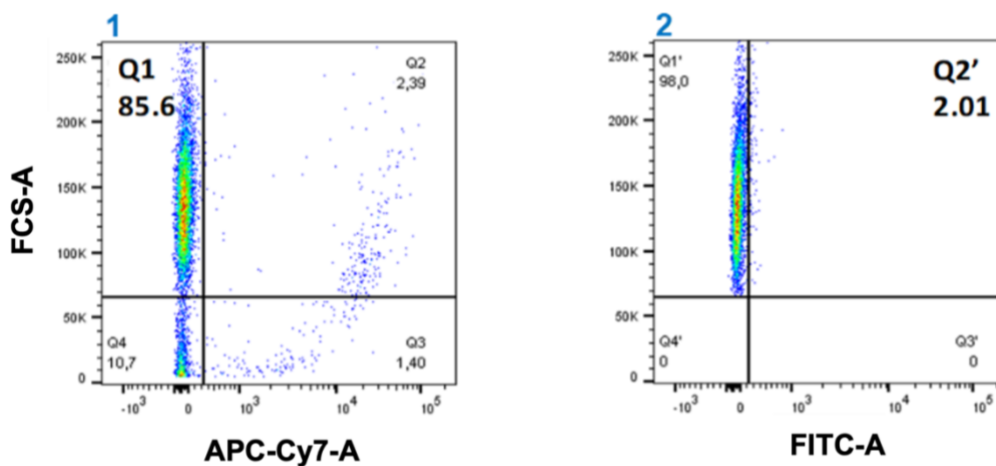


Figure 94 : Dots plots représentant les cellules U266.B1 non marquées utilisées pour sélectionner la porte Q1 (1) et Q2' pour la liaison FITC (2)

L'analyse des cellules incubées avec le composé **AMD070-FITC** reportées sur le dot plot [Figure 95, 1] met en évidence qu'une infime partie des cellules présente une augmentation d'intensité de fluorescence avec une valeur de Q2' de 2,72%. Cette valeur est très proche de celle retrouvée avec la manipulation de contrôle sur les cellules seules (Q2' = 2,01%) signifiant que le composé ne semble pas être fixé à leur surface. Pour une comparaison plus aisée des différentes expériences entre elles et avec l'expérience de contrôle, ces graphiques peuvent être transposés en histogrammes en prenant en ordonnée le nombre de cellules pour chaque valeur de fluorescence en abscisse [Figure 95, 2 et 3]. Ainsi, on constate ici la superposition des histogrammes de l'expérience de contrôle avec les cellules ayant été incubées avec le composé **AMD070-FITC**, et ceux pour toutes les concentrations étudiées. D'après ces résultats, l'**AMD070-FITC** ne présente donc pas d'affinité pour le récepteur CXCR4.

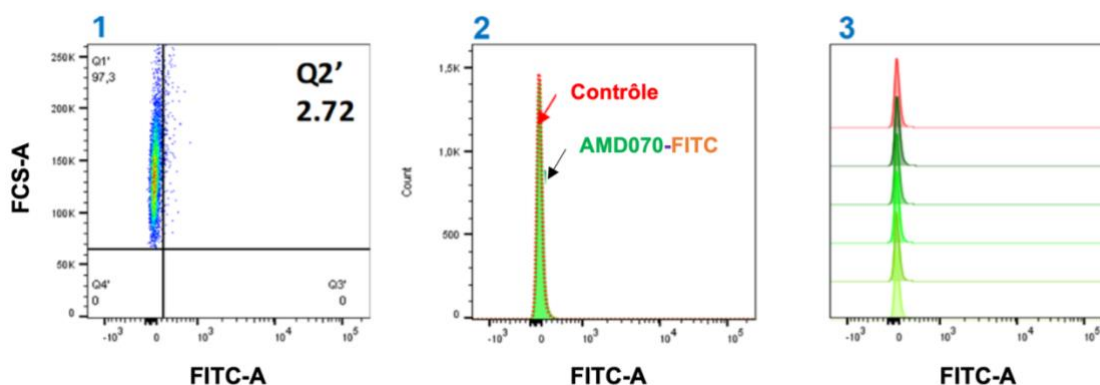


Figure 95 : (1) Dot plot des cellules marquées avec 66,6 pmol/mL d'**AMD070-FITC**, le cadran Q2' représente les cellules ayant fixé le composé (2) Histogramme du contrôle en rouge et des cellules incubées avec l'**AMD070-FITC** en vert (3) Histogramme de la gamme de concentration d'**AMD070-FITC** de 0,10 à 66,6 pmol/mL

Pour le second conjugué **AMD070*-FITC**, l'analyse par FACS montre ici 21% des cellules dans le cadran Q2' correspondant à une fixation notable du conjugué, ce qui est mis en évidence par un léger décalage des histogrammes pour une concentration de 66,6 pmol/mL, témoignant d'une fixation au récepteur [Figure 96, 2. et 3.].

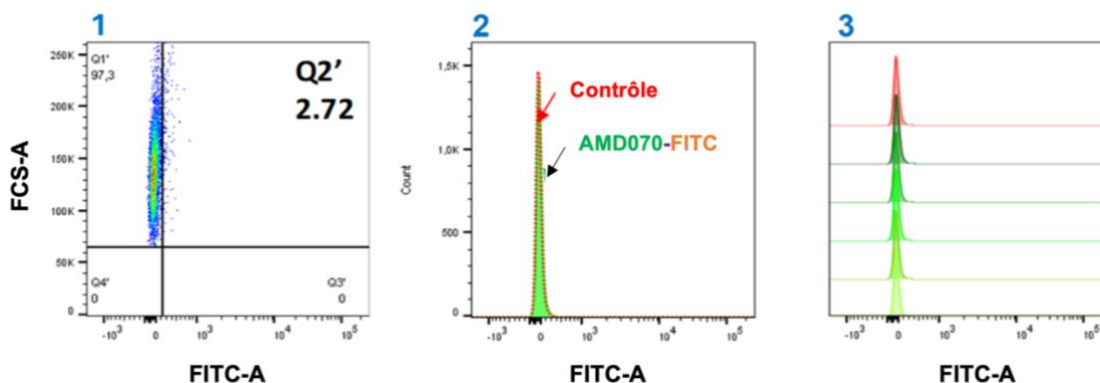


Figure 96 : (1) Dot plot des cellules marquées avec 66,6 pmol/mL d'**AMD070*-FITC**, le cadran Q2' représente les cellules ayant fixé le composé (2) Histogramme du contrôle en rouge et des cellules incubées avec l'**AMD070*-FITC** en vert (3) Histogramme de la gamme de concentration d'**AMD070*-FITC** de 0,10 à 66,6 pmol/mL

Ces études cellulaires sur les composés fluorescents confirment notre hypothèse de départ sur l'importance de la présence de l'amine primaire dans la reconnaissance du récepteur. Ainsi, le composé **AMD070-FITC** n'a pas conservé ses propriétés d'inhibition tandis que le composé **AMD070*-FITC** présente une fixation au récepteur à une concentration de 66,6 pmol/mL.

Les études cellulaires sur les radiocomposés $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-TE1PA})]^+$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070*-TE1PA})]^+$ sont toujours en cours afin de confirmer si le comportement de reconnaissance est similaire à celui observé avec les dérivés fluorescents.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre visaient à synthétiser deux nouveaux radiopharmaceutiques pour imager l'expression du récepteur CXCR4 par imagerie TEP au cuivre-64. Ce récepteur cellulaire est un marqueur biologique intéressant, étant donné son implication dans la croissance et la métastase tumorale. Parmi les différents inhibiteurs connus à ce jour, l'**AMD070** est une petite molécule organique qui présente une IC_{50} de 13 nM pour le récepteur. Cette affinité est 5,2 fois plus importante par rapport aux biomolécules concurrentes comme le peptide **T140**. En plus d'être facile d'accès, cette petite molécule présente également un faible coût de synthèse ainsi qu'un stockage aisé. Elle présente donc un grand intérêt pour une utilisation en tant que partie vectrice de nouveaux radiopharmaceutiques. Cependant, sous sa forme native, la seule position disponible pour la conjugaison d'un chélateur est l'amine primaire participant à l'interaction avec le récepteur, ce qui représente un risque de perte des propriétés de reconnaissance. Pour contourner ce risque, et étudier l'influence du greffage sur ces propriétés, un analogue de l'**AMD070** a également été retenu. Les défis de ces travaux étaient de préserver l'affinité des molécules inhibitrices tout en modifiant leurs squelettes pour accueillir une modalité d'imagerie.

Le composé **AMD070**, a été obtenu avec un rendement global de 32% après trois étapes de synthèse et peut être synthétisé à l'échelle du gramme. Concernant son analogue, l'**AMD070-BnCO₂Me**, sa synthèse a demandé l'optimisation de la première étape de substitution nucléophile. Après quatre étapes, le rendement global de synthèse est de 8%. Une fois ce composé obtenu, la protection de l'amine primaire a été réalisée avant l'introduction d'un espaceur **éthylènediamine**. Ainsi, le composé **AMD070-BnCO-eda** a été obtenu avec un rendement global de 70% à partir de l'**AMD070-BnCO₂Me**. Concernant l'autre composant du radiopharmaceutique ciblé, le macrocycle bifonctionnel **p-SCN-Bn-TE1PA**, la synthèse a été optimisée avec un rendement global de 6% en 10 étapes contre 2% obtenus précédemment au laboratoire. Ce résultat est à souligner compte tenu de la haute valeur ajoutée de ce type de produit. Pour information, les analogues **p-SCN-Bn-DOTA** (2,5 HCl et 2,5 H₂O) et **p-SCN-Bn-NOTA** (3 HCl) commercialisés par la société MacroCyclics™ sont vendus aux tarifs de 4 639 et 6060 \$ pour 1 gramme de composé.

La nature du lien choisi pour relier la partie inhibitrice au chélateur du cuivre est une liaison thiourée. Cette liaison est obtenue après réaction d'une amine primaire avec une fonction isothiocyanate. Cette réaction est très utilisée par exemple pour fonctionnaliser des anticorps, et la stabilité de ce type de lien, bien que mise en cause par le passé reste un gage d'inertie. Dans notre cas, la réaction entre l'amine primaire et la fonction isothiocyanate n'est

curieusement pas observée à température ambiante et un chauffage à 80°C pendant 2 jours a été nécessaire pour observer la formation des composés souhaités. Après purification, les molécules **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** et **AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA** ont été isolées avec une pureté supérieure à 95%, et en quantité suffisante pour les analyses de radiomarquage et cellulaires. En parallèle du greffage au chélateur macrocyclique **p-SCN-Bn-TE1PA**, l'**AMD070** et son analogue **AMD070-p-BnCO-eda** ont été fonctionnalisés par la fluorescéine pour réaliser des études cellulaires par fluorescence.

Une fois les quatre composés obtenus, leurs études biologiques ont été réalisées au sein de l'équipe 2 du CRCl²NA de Nantes. L'étape de radiomarquage au cuivre-64 a révélé la présence d'un second site de coordination sur la partie inhibitrice des molécules **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** et **AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA**. Cette coordination a été confirmée par des études de coordination du cuivre (II) froid avec l'**AMD070** par spectroscopie UV-Visible, mais également par des études de radiomarquage au cuivre-64 de l'**AMD070** seul. En introduisant un excès de cuivre-64 (2 équivalents.), le chauffage du milieu réactionnel à 95°C pendant 10 minutes et l'ajout d'**EDTA** pendant 10 minutes à 95°C également ont finalement permis de s'affranchir de cette coordination non-spécifique. Ainsi l'**AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** et l'**AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA** ont été radiomarqués de façon efficace (82 et 90% de rendement respectivement), et une purification simple (SepPak C18) des radiocomposés permet d'obtenir des solutions injectables de chaque molécule pour les études biologiques à venir.

L'étude cellulaire des composés fluorescents a été réalisée sur la lignée cellulaire de myélome multiple U266.B1. La présence du fluorophore **FITC** sur les composés **AMD070-FITC** et **AMD070-BnCO-eda-FITC** a permis leur analyse par cytométrie de flux, plus particulièrement en FACS. L'analyse après incubation du composé **AMD070-FITC** à différentes concentrations révèle que le composé ne semble pas se fixer aux récepteurs CXCR4 de ces cellules de myélome comme en témoigne la superposition des histogrammes avec la manipulation de contrôle. À l'inverse, le composé **AMD070-BnCO-eda-FITC** avec une concentration de 66,6 pmol/mL entraîne une augmentation d'intensité de fluorescence pour 21% des cellules, qui se traduit par un décalage des histogrammes révélant ainsi une certaine fixation du composé au récepteur. Cette différence d'affinité entre les deux composés peut être reliée, comme anticipé au début de ce projet, à la présence de la fonction amine primaire libre sur l'**AMD070-BnCO-eda-FITC** qui peut interagir avec le récepteur.

Pour confirmer ces résultats, des études cellulaires avec les radioconjugués $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-}p\text{-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-}p\text{-BnCO-eda-}p\text{-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ sont en cours et pourront par la suite aboutir à des études *in vivo* dans le but d'évaluer la biodistribution des radioconjugués et obtenir des premières images TEP sur modèle murin.

Chapitre 3

Synthèse de bis-cyclam par C-fonctionnalisation et reconnaissance du récepteur CXCR4

Introduction

En 2021, le virus de l'immunodéficience humaine a infecté 1,5 millions de personnes dans le monde diminuant ainsi leur système immunitaire.^[158] Les traitements actuels reposent sur l'administration d'un mélange de médicaments antirétroviraux (3 ou plus), qui ne conduit pas à la guérison mais limite simplement la réplication du virus et induit un renforcement du système immunitaire. L'organisation mondiale de la santé (OMS) recommande l'administration à vie du traitement antirétroviral pour toutes les personnes infectées par le VIH. Cette action a pour nom « un traitement pour tous » et a vu le jour en 2016.^[159]

Le mécanisme d'entrée du VIH au sein des cellules hôtes implique deux corécepteurs, CCR5 et CXCR4, qui sont des récepteurs de chimiokines.^[121] Il paraît donc intéressant de pouvoir inhiber ces corécepteurs pour empêcher l'entrée du virus au sein des cellules. C'est dans ce sens que le bis-cyclam, nommé **AMD3100** dans la littérature, a été au centre de nombreuses investigations pour son potentiel anti-VIH et a montré une activité intéressante.^[160]

En parallèle, il a aussi été démontré que le récepteur CXCR4 est impliqué dans la croissance tumorale.^[27] Ainsi, la coordination du cuivre-64 par le chélateur **AMD3100** peut agir comme une sonde et permettre, par ses propriétés de reconnaissance, le diagnostic de ces cancers.

Notre équipe brestoise s'intéresse depuis de nombreuses années à la synthèse de bis-macrocycles à base de tétraazacycloalcanes. Elle est notamment à l'origine en 2000 de synthèses originales donnant accès à des **bis-cyclam** ou **bis-cyclen** tenus à distance par un espaceur xylyle (position *ortho*, *meta*, *para*, voir même un noyau pyridine) en mettant à profit la voie bisaminal. Cette voie a par la suite permis l'étude de coordination de nombreux composés puis mené à d'autres dérivés diversement modifiés : fonctionnalisés ou encore renforcés, par notre équipe ou d'autres groupes de recherche.^[161–164]

Au regard des propriétés reconnues du bis-cyclam **AMD3100** et de la maîtrise au laboratoire des synthèses de cyclam C-fonctionnels, nous avons souhaité étudier la faisabilité de la synthèse d'un bis-cyclam relié par voie C-fonctionnelle pour permettre de conserver les structures des unités cyclam intactes comparées à celle de l'**AMD3100** où une fonction amine secondaire est dénaturée en tertiaire.

Le potentiel anti-VIH du nouveau bis-cyclam C-fonctionnel obtenu sera étudié par le « Laboratoire de virologie et de chimiothérapie » dirigé par le Professeur Dominique Schols à l'université de Leuven en Belgique. Ce groupe est spécialisé dans l'étude de composés pour l'inhibition du récepteur CXCR4 et de leur potentiel anti-VIH. Il a, par exemple, réalisé les premières études biologiques pour déterminer l'activité anti-VIH du composé **AMD3100** dans les années 2000.^[165]

Ainsi, ce chapitre présentera tout d'abord un contexte bibliographique reprenant les diverses utilisations de composés bis-cyclam pour leur potentiel anti-VIH ainsi que pour l'imagerie des cancers. Dans un second temps, la synthèse d'un nouveau bis-cyclam sera discutée puis ses études biologiques d'interaction avec CXCR4 seront présentées.

I. Contexte bibliographique

1. Découverte du premier macrocycle ayant une activité anti-VIH

Quelques années après la découverte du VIH en 1992, les premiers composés présentant des activités anti-VIH étaient des macromolécules contenant des ions métalliques. En effet, le premier agent rapporté comme pouvant réduire l'infection par le VIH est un polyoxométalate (Antimoniotungstate, également appelé HPA23).^[166] Compte tenu de la nature chélatante des structures de bases de ces molécules impliquées dans l'inhibition du VIH, les chercheurs se sont notamment penchés sur le **cyclam** au regard de ses propriétés de coordination et de son affinité marquée pour les cations métalliques (voir chapitre 1). Les tests d'activité réalisés sur le **cyclam** ont révélé que seulement certains lots commerciaux de la molécule possédaient une activité anti-VIH. Après des études plus poussées, il a finalement été montré que les lots présentant l'activité contenaient une impureté, elle-même responsable de ces propriétés anti-VIH. Cette dernière, nommée **JM1657**, a pu être caractérisée comme étant un bis-cyclam relié par une liaison directe entre deux atomes de carbone en position α d'un atome d'azote. La concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) du **JM1657** nécessaire pour diminuer de 50% la réplication virale du VIH-1 a été déterminée à une valeur exceptionnelle de $0,144 \mu\text{M}$.^[167] Face à cette découverte d'intérêt, E. De Clercq *et al.* ont souhaité synthétiser le **JM1657** de manière contrôlée, mais sans succès, l'introduction de la liaison carbone-carbone entre les deux macrocycles étant extrêmement difficile à maîtriser dans les diverses séquences réactionnelles proposées. Pour pallier ce problème, les deux unités **cyclam** ont été réunies par un atome d'azote de chaque unité à l'aide d'un espaceur en lieu et place de la liaison carbone-carbone du **JM1657**. Le premier lien introduit est une chaîne propane permettant d'obtenir le composé **JM2763**, qui présente une IC_{50} de $0,248 \mu\text{M}$, soit une inhibition deux fois inférieure à celle de l'impureté présente dans le **cyclam**.^[167] Par la suite, le passage d'une chaîne aliphatique à un système aromatique a montré un gain considérable sur l'inhibition de la réplication virale. En effet, l'**AMD3100** présente une IC_{50} de $0,003 \mu\text{M}$, soit une valeur environ cinquante fois meilleure que celle obtenue pour le premier bis-macrocycle présentant une activité anti-VIH [**Figure 97**].^[168]

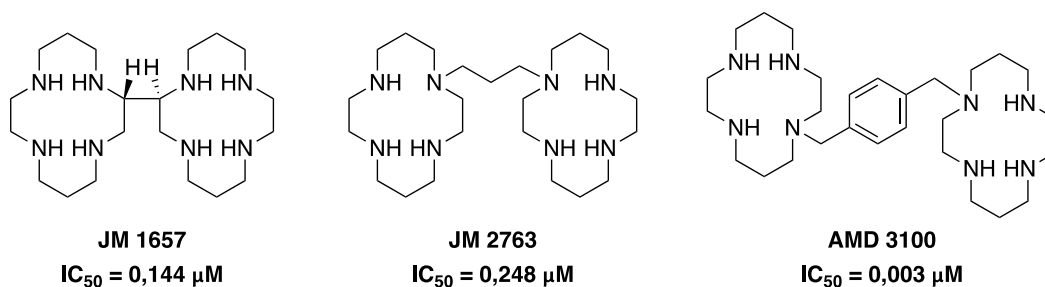


Figure 97 : Structures des *bis-cyclam* ayant une activité inhibitrice anti-VIH

Pour rappel, le récepteur CXCR4 est impliqué dans la fusion membranaire du virus VIH au sein des cellules hôtes. Ainsi, l'interaction de l'**AMD3100** a été précisément mise en évidence par des manipulations de mutation.^[169] L'affinité de l'**AMD3100** avec le récepteur dépend d'interactions électrostatiques entre les atomes d'azote basiques (et donc sous forme d'ammonium à pH physiologique) des unités cyclam et les fonctions acide carboxylique (chargées négativement) des résidus d'acide aspartique en position 171, 182, 193 et 262 sur CXCR4.^[169,170] À pH physiologique, l'**AMD3100** est chargé 4 fois, avec chaque unité cyclam sous forme diprotonée. Parmi les différents résidus acide aspartique, ceux en position 171 et 262, situés à la jonction des segments transmembranaires des boucles extracellulaires de CXCR4 sont essentiels dans la reconnaissance par le macrocycle. En effet, une unité cyclam interagit avec Asp¹⁷¹ du domaine transmembranaire IV, pendant que la seconde unité est prise en « sandwich » entre les fonctions acide carboxylique de Asp²⁶² et Glu²⁸⁸ des domaines transmembranaires VI et VII respectivement [Figure 98].^[171]

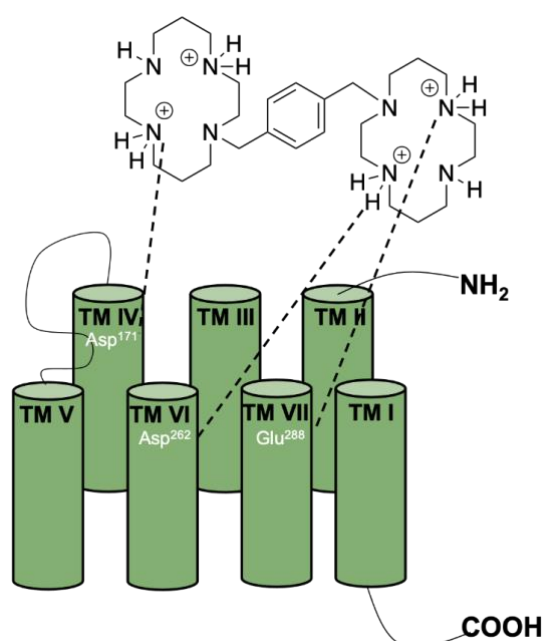


Figure 98 : Représentation schématique des domaines transmembranaires de CXCR4 avec les résidus d'acides aminés impliqués dans la reconnaissance avec **AMD3100**

Compte tenu de la nature chélatante du **cyclam**, l'influence de la métallation du bismacrocycle sur les propriétés de reconnaissance a été étudiée, par divers complexes métalliques formés à partir de l'**AMD3100**, qui ont dans un premier temps été bien caractérisés par des études de chimie de coordination.^[172] La chélation d'un cation zinc (II) par l'**AMD3100** montre une coordination dans le plan des quatre atomes d'azote du cyclam. Couramment, la géométrie adoptée par ces complexes de zinc (II) n'est pas plan carré mais plutôt de type pyramide à base carrée ou encore octaédrique avec un ou deux sites de coordination vacants. Dans un second temps, les modélisations menées par L. O. Gerlach *et al.* ont mis en avant que l'incorporation d'un ion Zn^{2+} au sein d'une unité cyclam de l'**AMD3100** ne génère pas de modification des acides aminés impliqués dans la reconnaissance avec le récepteur CXCR4. Au contraire, l'affinité pour le même résidu Asp²⁶² est même renforcée (d'un facteur 10) à la suite de la coordination en position axiale de la fonction acide carboxylique sur le cation métallique. En revanche, il n'est pas nécessaire d'incorporer deux ions zinc (II) au sein du composé (un dans chaque unité chélatante), car dans le cas du complexe bimétallique, l'interaction avec le second résidu aspartate (Asp¹⁷¹) est affaiblie. Ce gain d'affinité avec la coordination de cation a également été constaté avec le cuivre (II) et le nickel (II).^[172]

À la suite de la mise en évidence de l'influence des cations métalliques sur l'affinité du récepteur, la configuration adoptée par l'unité cyclam a été étudiée. Comme vu dans le chapitre bibliographique, le **cyclam** peut adopter 6 configurations différentes dans un complexe. En fonction de la configuration adoptée, le résidu Asp²⁶² peut plus ou moins venir compléter la coordination du cation métallique.^[172]

Pour s'assurer d'avoir une seule configuration possible, le **CB-bis-cyclam**, le dérivé « cross-bridged » de l'**AMD3100** a été synthétisé et étudié. Chaque unité cyclam est renforcée par un pont éthylénique entre deux atomes d'azote non adjacents. Sous cette forme, le complexe formé avec le cuivre (II) peut adopter uniquement la configuration *cis-V* [Figure 99]. Cette dernière permet au résidu Asp²⁶² de venir aisément compléter la sphère de coordination du cation. Le renforcement de l'unité cyclam par le pont éthylène conduit également à une meilleure inertie cinétique du complexe de cuivre (II), augmentant ainsi l'affinité du composé avec le récepteur CXCR4 et se traduisant par un temps de résidence sur le récepteur plus long que le complexe $[Cu(\text{AMD3100})]^{2+}$. En effet, le complexe $[Cu(\text{CB-bis-cyclam})]^{2+}$ présente toujours une activité d'inhibition 48h après fixation du composé tandis que l'**AMD3100** n'en présente plus aucune.^[173]

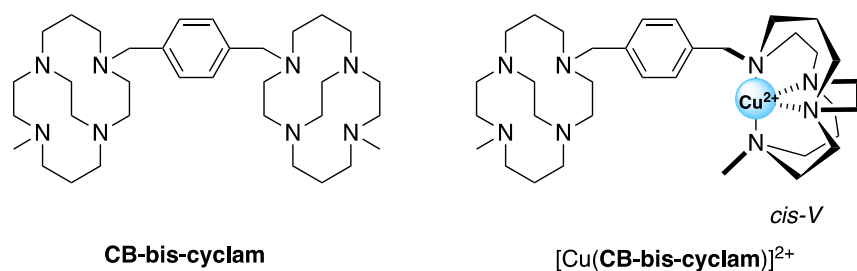


Figure 99 : Représentations du **CB-bis-cyclam** et du complexe $[Cu(CB-bis-cyclam)]^{2+}$ avec la configuration *cis-V* adoptée par le **cyclam**

En revanche, le ligand **CB-bis-cyclam** seul présente une affinité plus faible que l'**AMD3100** avec le récepteur CXCR4. En effet, son IC_{50} est supérieure à $5 \mu M$; cette baisse d'affinité peut être corrélée à la fonctionnalisation des amines secondaires, transformées ici en amines tertiaires, qui vient perturber les interactions dans le cas de l'utilisation du bis-macrocycle seul (sans cation dans la cavité macrocyclique). Pour ce type d'utilisation, il semble donc nécessaire de préserver les amines secondaires afin de conserver une bonne affinité avec le récepteur.

2. Imagerie du récepteur CXCR4 par des composés bis-macrocyclique

Compte tenu du gain d'affinité constaté dans le cas des bis-cyclam complexés, en 2009, O. Jacobson et *al.* ont procédé au radiomarquage d'une unité cyclam de l'**AMD3100** par le cuivre-64 ce qui a permis de réaliser une étude de biodistribution *in vivo* sur souris saines.^[174] Les images TEP obtenues ainsi que les études *ex vivo* ont mis en évidence une accumulation du radiotracer dans le foie, les reins et d'autres organes ayant une expression importante du récepteur CXCR4.^[174] Face à ces résultats encourageants pour le ciblage de CXCR4, une étude sur lignées cancéreuses de glioblastome et du sein a été réalisée. Pour chaque cancer, deux lignées cellulaires ont été comparées, une exprimant fortement CXCR4 (CXCR4⁺) et une faiblement (CXCR4⁻). Dans le cas du glioblastome, une liaison spécifique aux tumeurs CXCR4⁺ a été observée. Le même constat a été fait pour le cancer du sein, avec également une bonne visualisation des métastases pulmonaires [**Figure 100**].^[175] La visualisation de cellules tumorales ovarienne de hamsters a également été permise avec une bonne pénétration du radiopharmaceutique dans les tumeurs exprimant fortement CXCR4.^[176]

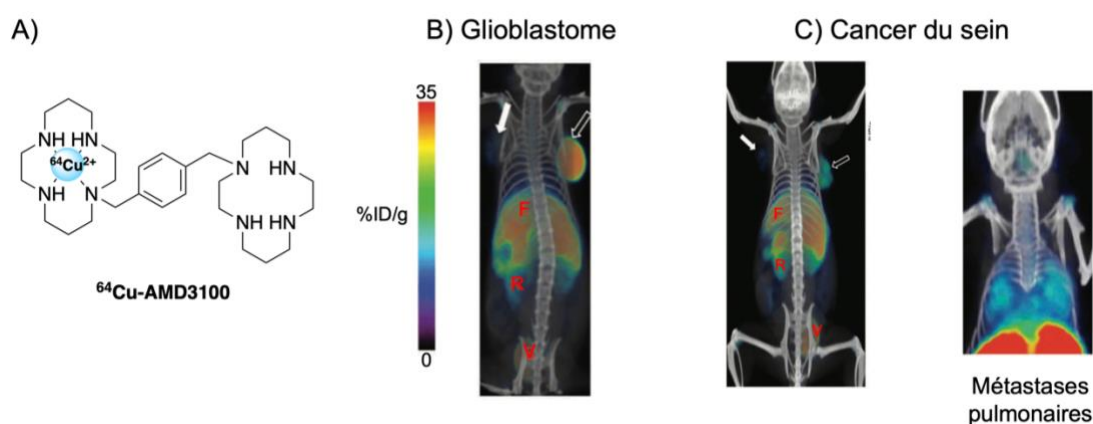


Figure 100 : **A)** Structure du radiopharmaceutique $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD3100})]^{2+}$. Images TEP-scan sur modèle murin à l'aide de $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD3100})]^{2+}$ **B)** sur lignée de glioblastome et **C)** sur lignée de cancer du sein. La flèche blanche représente la lignée cellulaire exprimant faiblement CXCR4 et la seconde la lignée exprimant fortement CXCR4. F : Foie, R : Reins et V : vessie.

L'**AMD3100** pourrait donc être employé dans le cadre d'une stratégie d'imagerie non invasive pour évaluer l'expression de CXCR4 dans les tumeurs et les sites métastatiques. Malgré ces résultats prometteurs, une certaine rétention d'activité du cuivre-64 au niveau du foie a été constatée et attribuée à une transchélation *in vivo* par l'enzyme SOD.^[174]

Ainsi, l'étude de radiomarquage sur le composé renforcé (**CB-bis-cyclam**), employé pour apporter une inertie cinétique supérieure, a été conduite avec succès permettant de réaliser des études sur modèle animal. Pour cela, une lignée cellulaire de glioblastome (U87) a été retenue et une excellente visualisation des tumeurs a été obtenue. Néanmoins, tout comme pour le $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD3100})]^{2+}$, une rétention d'activité au niveau du foie a pu être observée avec cet analogue cross-bridged.^[177]

Ces différentes études démontrent l'intérêt des composés **bis-cyclam** pour cibler le récepteur CXCR4 dans le cadre d'applications en imagerie TEP. En revanche, les complexes formés doivent présenter une meilleure résistance au phénomène de transchélation pour envisager à l'avenir une utilisation en clinique.

3. Stratégies de synthèse des dérivés bis-cyclam

3.1. Synthèse de l'AMD3100

La synthèse de l'**AMD3100** fait intervenir l'utilisation d'outils de synthèse régiospécifique comme ceux présentés dans le chapitre bibliographique. La tri-protection statistique du **cyclam** par les groupements trifluoroacétyles permet de conserver une amine secondaire disponible. Cette dernière peut alors être engagée dans une réaction de di-fonctionnalisation/dimérisation avec le composé commercial α, α' -dibromoxylène pour conduire à l'**AMD3100** protégé. Les amines secondaires sont ensuite déprotégées en milieu

basique permettant d'isoler l'**AMD3100** avec un rendement global de 37% en trois étapes [Figure 101].^[174]

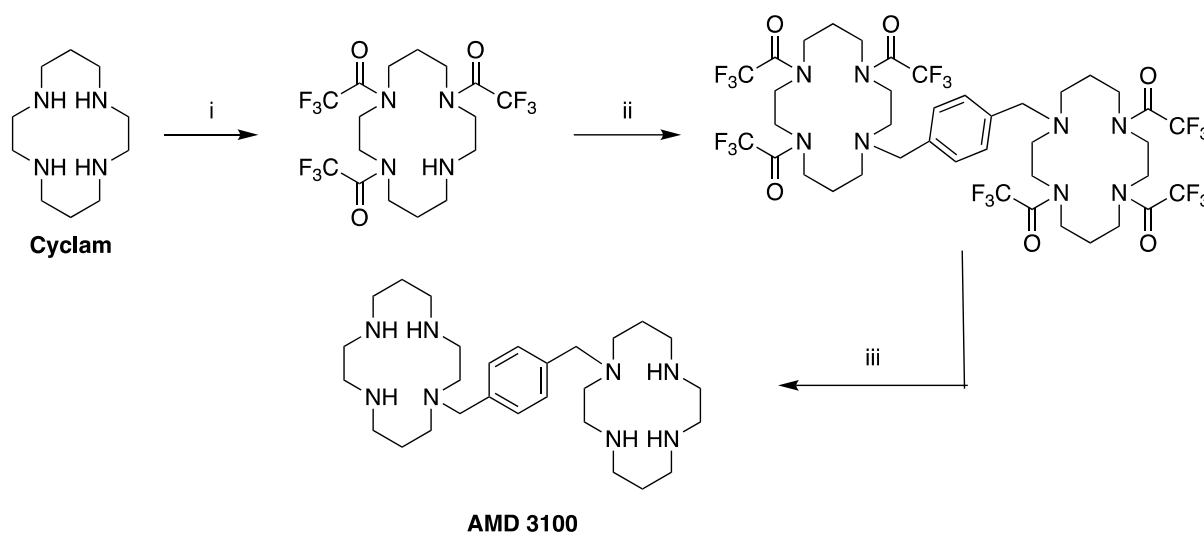


Figure 101 : Schéma de synthèse de l'**AMD3100** (i) Trifluoroacétate d'éthyle, Et₃N, MeOH, TA, 5h, **86%** (ii) α, α' -dibromoxylène, K₂CO₃, CH₃CN, reflux, une nuit, **66%** (iii) K₂CO₃, MeOH, reflux, 3h, **66%**^[174]

3.2. Synthèse du CB-bis-cyclam

La synthèse des dérivés renforcés de type cross-bridged est effectuée en s'appuyant sur l'efficacité de la chimie bisaminal. Ainsi, à partir du **cyclam-glyoxal**, la réaction avec le composé commercial α, α' -dibromoxylène conduit sélectivement au sel de diammonium correspondant, isolé facilement par précipitation. Seuls les composés **cyclam-glyoxal** di-ammonium en position N1-N8 permettent d'obtenir sélectivement, après réduction du pont bisaminal, le composé renforcé « cross-bridged » correspondant. Ainsi, une seconde fonctionnalisation sélective de chaque unité **cyclam** est réalisée grâce à l'iodométhane et le sel tétraammonium est isolé. Enfin, l'action du borohydrure de sodium sur le pont bisaminal conduit au composé **CB-bis-cyclam** avec un rendement global de 54%. Malgré l'apparente simplicité et le faible nombre d'étapes, cette synthèse est tout de même longue (30 jours) car les étapes de méthylation et de réduction du pont glyoxal sont relativement lentes et doivent être réalisées à température ambiante, ce qui contraint fortement l'efficacité de la méthode [Figure 102].^[173]

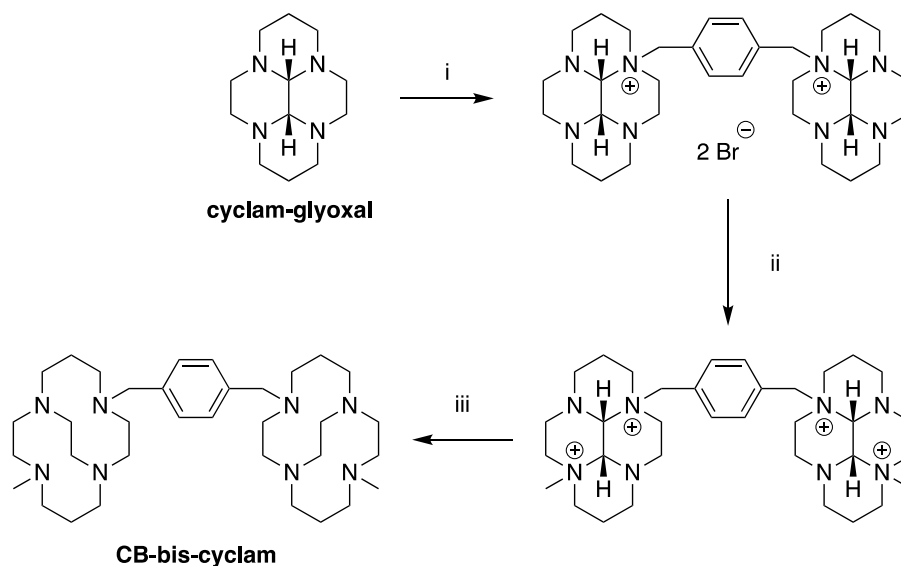


Figure 102 : Schéma de synthèse du **CB-bis-cyclam** (i) α, α' -dibromoxylène, CH_3CN , TA, 24h, **89%** (ii) iodométhane, CH_3CN , TA, 15j **87%** (iii) $\text{NaBH}_4/\text{EtOH}$, TA, 14j, **71%**^[173]

4. Conception de bis-cyclam C-fonctionnalisés

Les études précédentes ont mis en avant l'importance de la nature des amines du macrocycle dans l'affinité des composés **bis-cyclam** pour le récepteur CXCR4. Le sacrifice des amines secondaires due à leur alkylation dans les composés renforcés comme le **CB-bis-cyclam** induit une baisse d'affinité du ligand seul (sans coordination de cation) pour CXCR4. L'introduction d'une C-fonctionnalisation pour former un nouveau **bis-cyclam** permettrait ainsi de conserver 8 amines secondaires disponibles pour la reconnaissance. Pour vérifier cette hypothèse, nous proposons dans ce chapitre la synthèse d'un nouveau **bis-cyclam** C-fonctionnalisé porteur d'un noyau aromatique comme dans le cas de l'**AMD3100**. En revanche, dans notre cas la substitution du noyau aromatique est en position *meta* pour conserver un espacement similaire entre les unités macrocycliques. Pour rappel, la C-fonctionnalisation de dérivés **cyclam** peut se faire à partir de tétraamines préorganisées par un template organique (bisaminal) selon deux types de réaction de cyclisation : (i) avec un ester α, β -insaturé ou (ii) avec un composé bis(électrophile) **[Figure 103]**. Nous proposons donc ici d'adapter ces deux voies pour la préparation des bis-cyclam visés, *via* l'utilisation d'agents permettant une double cyclisation, par deux esters α, β -insaturés ou deux groupements bis(électrophile) placés en position *meta* d'un noyau aryle.

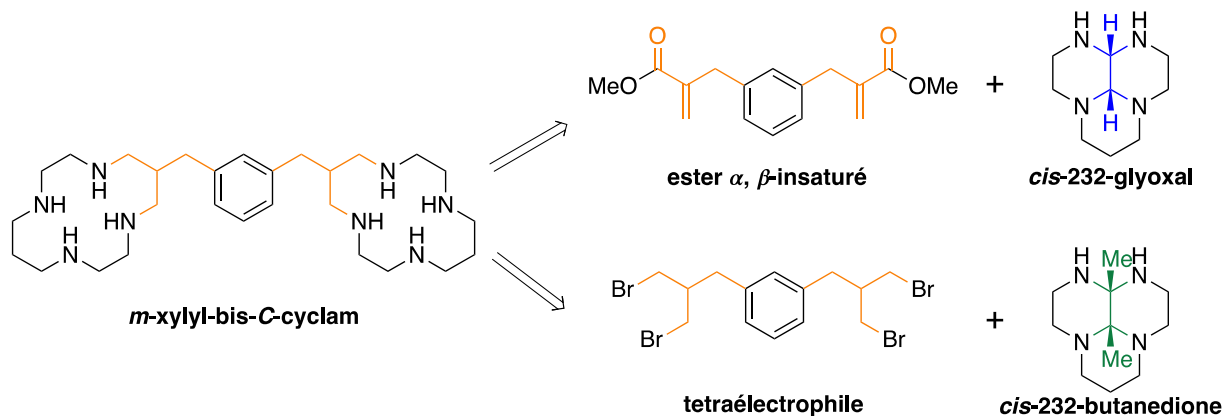


Figure 103 : Schéma de rétrosynthèse pour obtenir le **m-xylyl-bis-C-cyclam** selon deux stratégies

II. Synthèse du **m-xylyl-bis-C-cyclam**

1. Cyclisation *via* l'utilisation d'esters α, β -insaturés

Tout comme la synthèse élaborée au laboratoire pour obtenir le **p-SCN-Bn-TE1PA**, cette stratégie met en œuvre la réaction d'un ester α, β -insaturé avec la **cis-232-glyoxal**.

1.1. Synthèse du cyclisant

Le diester α, β -insaturé (**8**) retenu comme agent de cyclisation est également composé d'un noyau aromatique, comme dans le composé **AMD3100** [Figure 104]. Sa synthèse est décrite dans la littérature en une seule étape avec un rendement de 52%.^[178] Dans notre cas, une étape de purification a été mise en œuvre à la suite de la condensation de Knoevenagel entre l'isophtaldéhyde et l'acide de Meldrum pour conduire au composé **7** avec un rendement de 85%. Une réaction de Mannich entre le composé **7** et le sel d'Eschenmoser (iodure de diméthylméthylènammonium) conduit au cyclisant **8** avec un rendement de 97%. Ainsi, le diester α, β -insaturé a pu être obtenu avec un rendement global de 82% en deux étapes [Figure 104].

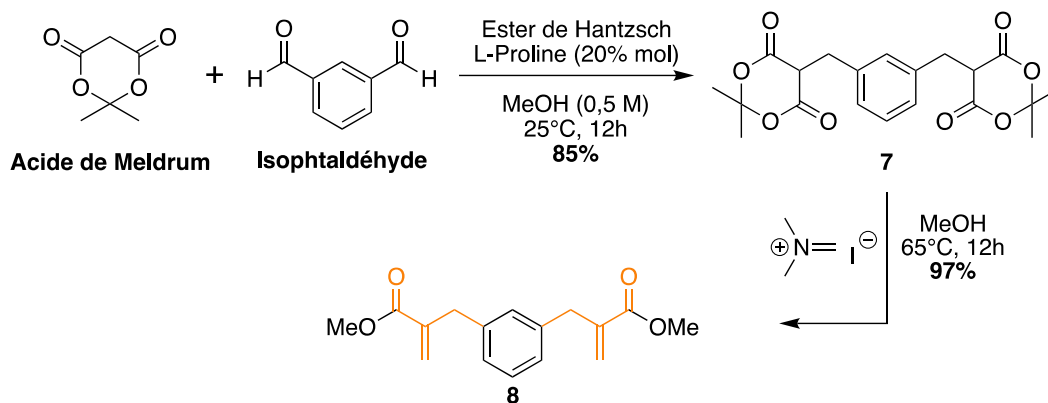


Figure 104 : Voie de synthèse du cyclisant **8**

La structure du composé **8** a été confirmée par RMN ^1H et ^{13}C . Le spectre RMN du carbone présente bien les signaux caractéristiques de l'ester α,β -insaturé avec la résonance de l'atome de carbone hybridé sp^2 ($=\text{CH}_2$) à 126,2 ppm. De plus, la fonction ester est caractérisée par le signal du carbonyle à 167,3 ppm ainsi que le signal du groupement méthyle de la fonction ester présent à 51,8 ppm. Les signaux des atomes de carbone du noyau aromatique présentent eux des déplacements chimiques classiques compris entre 140,1 et 127,1 ppm. Enfin, les groupements méthylène résonnent à 37,9 ppm [Figure 105].

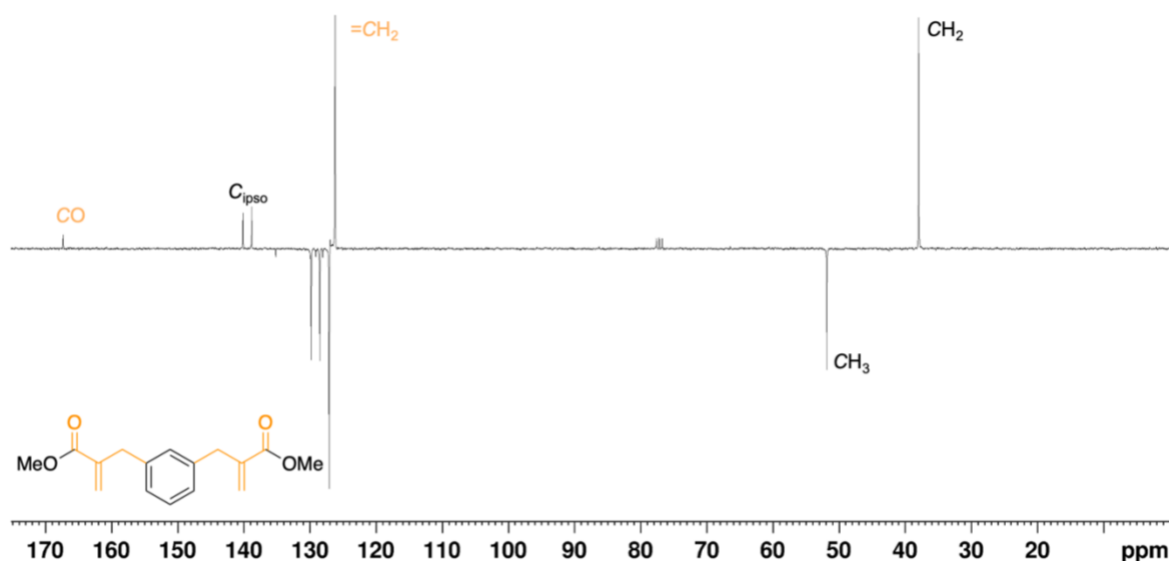


Figure 105 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du composé **8** (CDCl_3 , 100 MHz, 298 K)

1.2. Réaction de cyclisation

La réaction de cyclisation entre la tétraamine préorganisée par le glyoxal (*cis*-232-glyoxal), et l'ester α,β -insaturé (**8**) est lente d'un point de vue cinétique. De plus, il n'est pas envisageable de chauffer le milieu réactionnel pour accélérer la réaction, le composé

cis-232-glyoxal s'isomérisant en **trans-232-glyoxal** (les deux protons du pont bisaminal d'orientations opposées), bloquant ensuite toute possibilité de déprotection du pont bisaminal. Pour rappel, dans le cas de la synthèse du cyclam C-fonctionnalisé (**p-SCN-Bn-TE1PA**), la réaction de cyclisation à température ambiante est lente (de 2 semaines à 2 mois). Ici, pour obtenir un rendement raisonnable de 30%, la réaction de cyclisation a été maintenue 4 mois sous agitation à température ambiante. Après plusieurs essais avec des solvants utilisés usuellement pour ce type de réaction, seul l'acétate d'éthyle a permis d'obtenir le composé souhaité, l'acétonitrile ou le tétrahydrofur ne montrant aucune conversion. Cependant, contrairement à la synthèse du **cyclam** C-fonctionnalisé, aucune précipitation du dérivé poly-aminal n'est observée au cours du temps. Le composé **m-xylyl-bis-C-oxocyclam-glyoxal** a pu néanmoins être isolé par précipitation dans le THF [Figure 106].

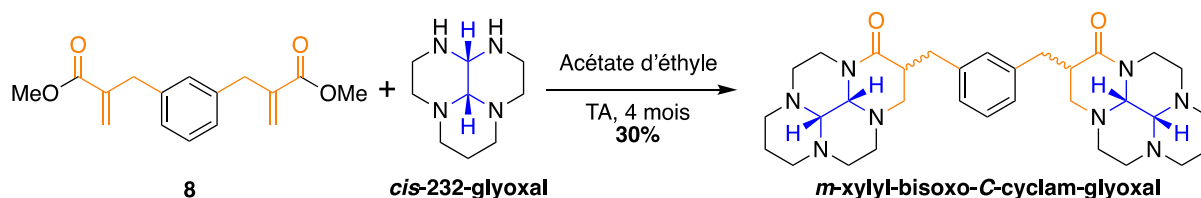


Figure 106 : Voie de synthèse pour obtenir le **m-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal**

D'un point de vue de stéréochimie, cette réaction de cyclisation peut conduire à la formation de diastéréoisomères en fonction de l'orientation de la C-fonctionnalisation par rapport au pont bisaminal. Le pont bisaminal est uniquement présent en configuration *cis* de par la façon dont il a été synthétisé. En revanche, selon l'orientation du méthylène de la C-fonctionnalisation par rapport au pont bisaminal, deux configurations sont possibles : *syn* lorsqu'il est orienté vers la même face du macrocycle et *anti* dans le cas contraire. La caractérisation du composé par RMN ¹³C témoigne de la formation d'un seul des diastéréoisomères en mélange racémique, les signaux correspondants aux CH du pont bisaminal présents à 76,0 et 70,6 ppm ne présentant aucun dédoublement. La résonance du CH porteur de la C-fonctionnalisation est observée à 37,0 ppm sous la forme d'un singulet. La formation de la fonction amide est elle mise en évidence par le déplacement chimique de son carbonyle à 171,2 ppm (contre 167,3 ppm dans le cas de la fonction ester du réactif). Enfin, les signaux caractéristiques des CH₂ constituant les unités macrocycliques et les groupements méthylène adjacents au noyau aromatique résonnent entre 54,1 et 19,5 ppm [Figure 107].

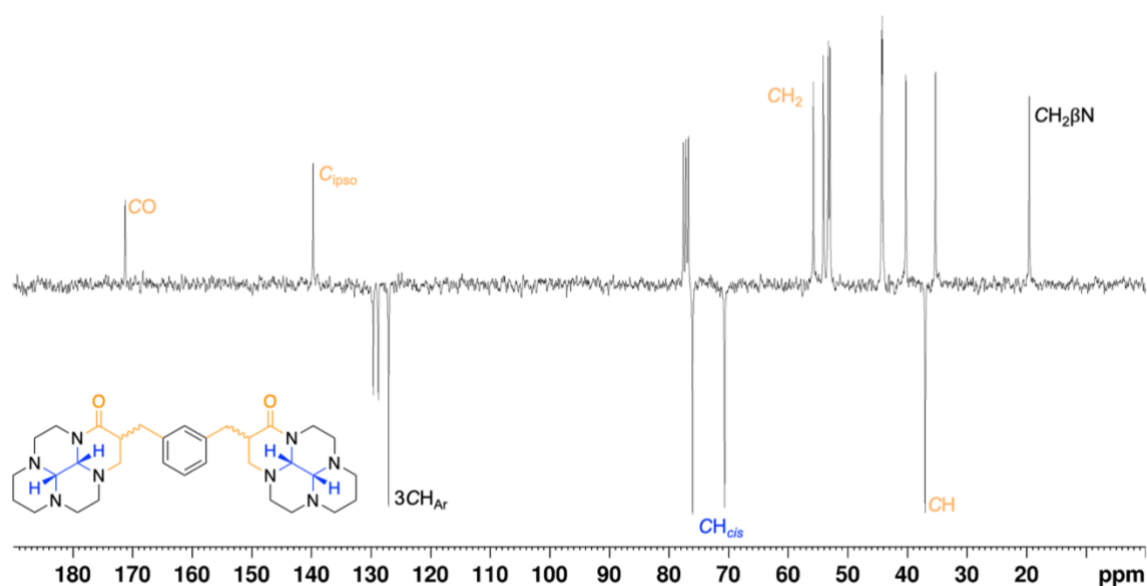


Figure 107 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du *m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal (75 MHz, CDCl_3 , 298 K)

L'obtention de monocristaux du *m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal par évaporation lente d'une solution dans l'acétate d'éthyle a permis d'obtenir une structure par diffraction des rayons X. Cette analyse révèle la présence d'un seul composé dans la maille cristalline, ce qui indique que le composé isolé est présent sous une seule forme. Ici, la C-fonctionnalisation introduite est orientée dans la même direction que les protons du pont bisaminal [Figure 108]. Ainsi, seul le composé de configuration *cis/syn,cis/syn* a été formé. L'étude par RMN des cristaux obtenus montre un spectre identique à celui observé en Figure 107, confirmant la formation de ce seul diastéréoisomère. De façon similaire, dans le cas de la cyclisation du mono-cyclam-C-fonctionnalisé réalisée dans l'acétate d'éthyle, seul le composé de configuration *cis/syn* avait été isolé.^[32]

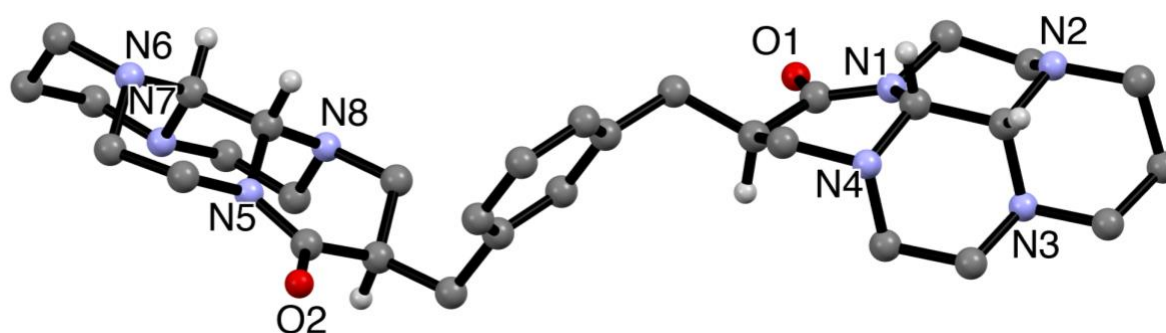


Figure 108 : Structure cristallographique du composé *m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal obtenue par DRX. Les atomes d'hydrogène exceptés ceux du pont bisaminal et de la C-fonctionnalisation sont omis pour plus de clarté

À ce stade, trois étapes sont encore nécessaires pour obtenir le composé ***m*-xylyl-bis-C-cyclam**. La déprotection du pont bisaminal nécessite au préalable la formation d'un ammonium, comme vu précédemment (Chapitre 2 I.3.) et la présence de la fonction amide rend uniquement les doublets des amines en position N2 et N6 (voir **Figure 108**) suffisamment dégagés pour une attaque nucléophile. Le bromure de benzyle, suffisamment réactif, peut alors être de nouveau mis à profit pour alkyler une amine de chaque macrocycle et fragiliser les ponts bisaminal. Ces groupements benzyle pourront être retirés aisément plus tard. En effet, une fois le sel de diammonium obtenu, l'action de l'hydrate d'hydrazine sur le composé permet d'éliminer le pont glyoxal. Ensuite, la fonction amide peut quant à elle être réduite par le BH₃-THF. Pour finir, la déprotection des amines par hydrogénolyse permet d'obtenir le ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** [Figure 109].

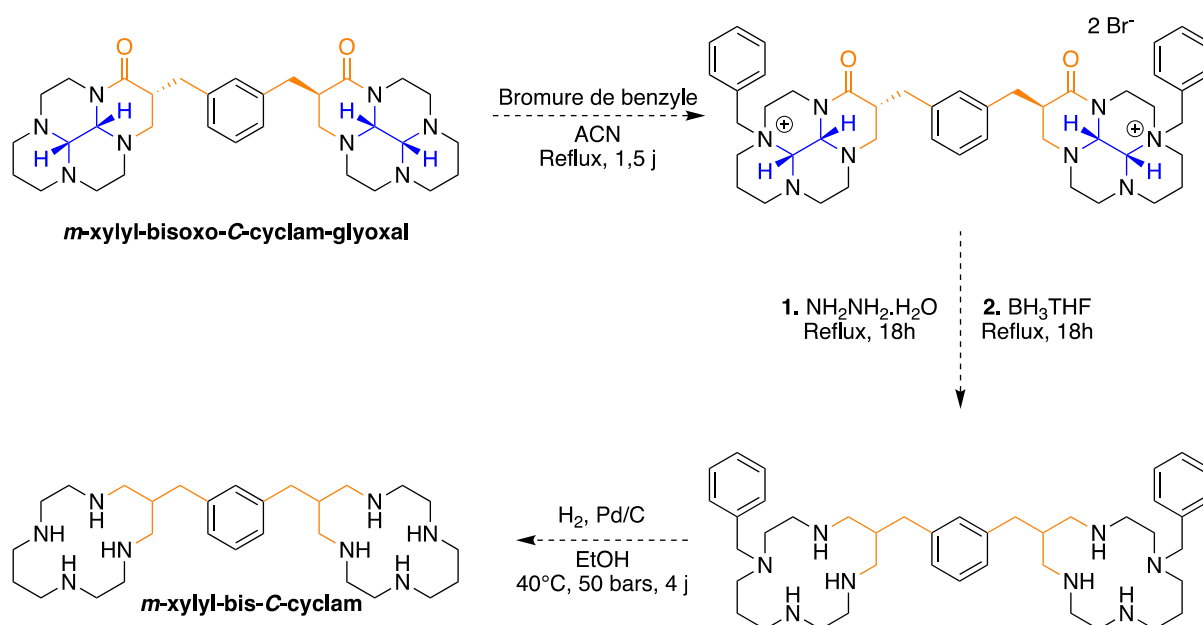


Figure 109 : Schéma réactionnel pour conduire au ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** à partir du ***m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal**

Malheureusement, les différents essais d'alkylation avec le bromure de benzyle n'ont pas été concluants. Que ce soit au reflux de l'acétonitrile ou dans le diméthylformamide à 70°C, le composé disubstitué par action du bromure de benzyle n'a pas été isolé. Compte tenu de la faible quantité de ***m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal** obtenue ainsi que des difficultés rencontrées lors de cette étape d'alkylation, nous avons décidé de mettre cette voie de synthèse de côté et de nous concentrer sur la seconde stratégie.

2. Cyclisation *via* un bis(électrophile)

La seconde stratégie de C-fonctionnalisation qui implique la réaction d'un composé tétrabromé avec la *cis*-232-butanedione [Figure 103], est une extension de la procédure d'obtention du cyclam C-fonctionnalisé développé par S. J. Archibald en 2004.^[108]

2.1. Synthèse du cyclisant tétrabromé

Dans le but d'obtenir le cyclisant tétrabromé, le réactif de départ employé est le *m*-dibromoxylène [Figure 110]. Le malonate de diéthyle est déprotoné à l'aide d'hydrure de sodium pour former le carbanion correspondant qui est ensuite engagé dans une réaction de substitution nucléophile (SN2) avec le *m*-dibromoxylène pour obtenir le composé **9** après purification sur colonne de gel de silice (Hexane/Acétate d'éthyle) avec un rendement de 54%.

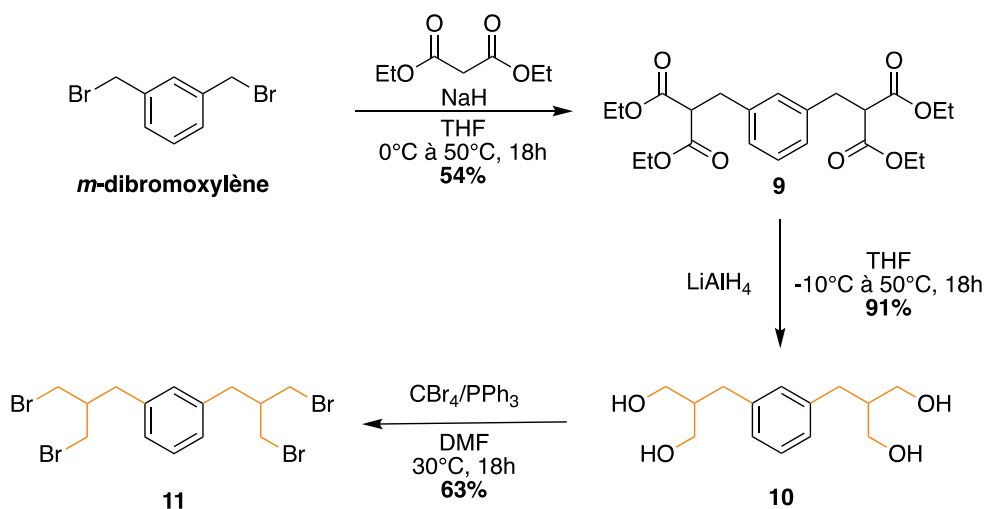


Figure 110 : Voie de synthèse du composé de cyclisation tétrabromé **11**

La structure du composé **9** a été confirmée par analyse RMN du carbone par la présence du signal des CH aliphatiques à 53,9 ppm. De plus, les fonctions ester présentent un déplacement chimique caractéristique des carbonyles à 168,9 ppm et des résonnances des atomes de carbone des chaînes éthyle à 61,5 et 14,1 ppm. Le groupement méthylène adjacent au noyau aromatique est identifié à 34,6 ppm. Enfin, les quatre signaux du cycle aromatique sont compris entre 138,3 et 127,3 ppm [Figure 111]. Ce composé a également été caractérisé par RMN du proton et HRMS.

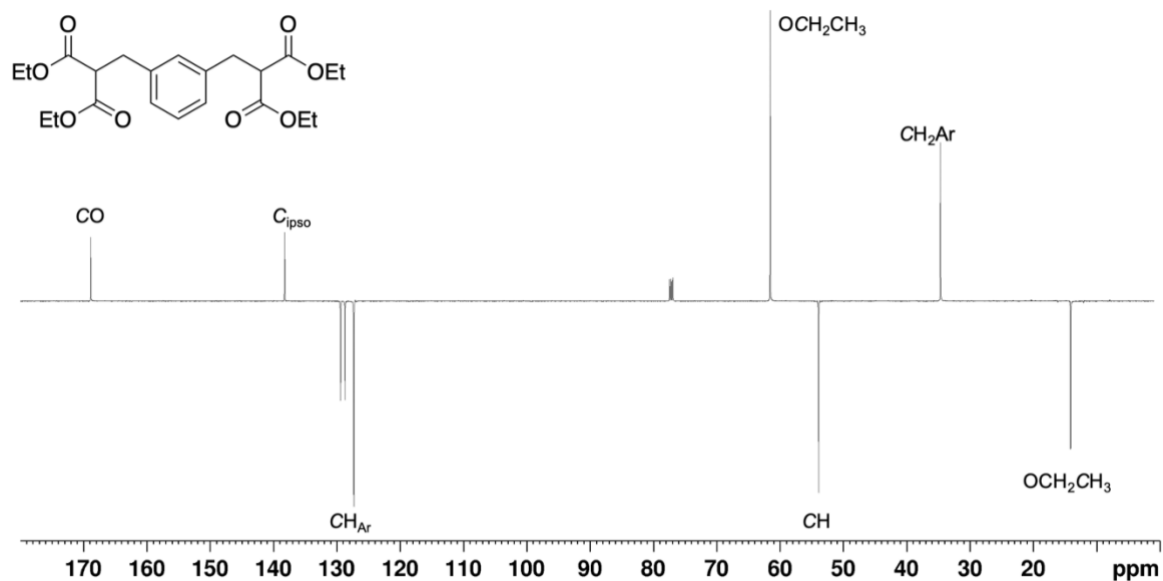


Figure 111 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du composé **9** (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K)

La réduction des quatre fonctions ester du composé **9** a ensuite été réalisée par action du tétrahydroaluminat de lithium (LiAlH_4) pour former le composé **10**, isolé avec 91% de rendement. La température à laquelle s'effectue l'ajout de l'ester à cette étape est très importante. En effet, un premier essai à 0°C a mené à la formation d'une gomme insoluble difficile à traiter, limitant ainsi le rendement de synthèse. En se plaçant à -10°C , le milieu réactionnel reste homogène et le tétraalcool **10** est obtenu avec un rendement quasi quantitatif après une simple filtration sur Célite[®].

La structure du composé **10** a été confirmée par l'absence des signaux RMN ^{13}C caractéristiques des fonctions ester du précurseur **9** à 168,9 ppm pour le carbonyle et 34,6 et 14,1 ppm pour la chaîne éthyle. Au contraire, le nouveau spectre présente bien les signaux correspondant aux nouveaux groupements méthylène des fonctions alcool primaire (CH_2OH) à 63,1 ppm. La signature des atomes de carbone aromatiques est identifiée entre 141,8 et 127,8 ppm. Enfin, le CH aliphatique résonne à 46,6 ppm et le groupement méthylène adjacent au noyau aromatique à 35,1 ppm [Figure 112]. Le composé **10** a également été caractérisé par RMN ^1H et HRMS.

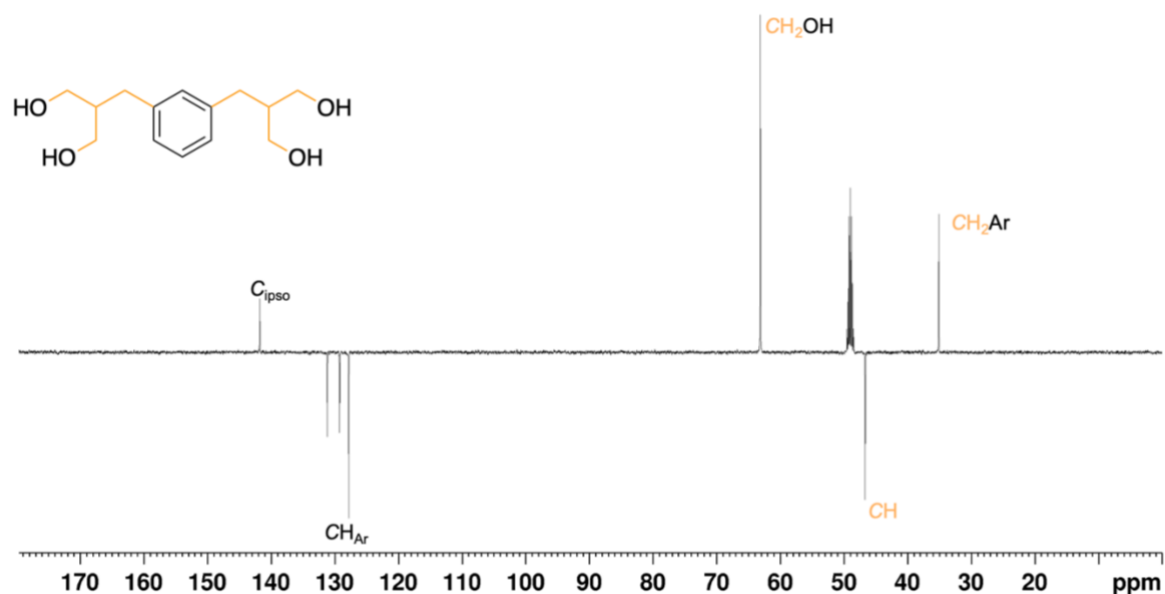


Figure 112: Spectre RMN ^{13}C Jmod du composé **10** (MeOD, 125 MHz, 298 K)

La bromation des fonctions alcool a été effectuée selon la réaction d'Appel. En raison de la présence des quatre groupements hydroxyle, le composé **10** est soluble dans des solvants polaires comme le méthanol. En revanche, ce solvant ne pouvant pas être engagé dans une réaction de bromation des fonctions alcool, le diméthylformamide a été utilisé. Après 18 heures à 30°C, le composé **11** a été isolé avec 63% de rendement à l'issu d'une purification sur colonne chromatographique (SiO_2 , hexane/dichlorométhane).

Le composé **11** a été totalement caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF, RMN ^1H et ^{13}C . La formation du composé bromé est confirmée par l'absence du signal provenant des CH_2OH vers 60 ppm du précurseur **10** et la présence du signal correspondant aux CH_2Br à 35,8 ppm. Les autres signaux correspondant à la molécule sont également bien identifiés : ceux des noyaux aromatiques entre 138,9 et 127,6 ppm, celui du CH aliphatique à 43,8 ppm et du groupement méthylène adjacent au noyau aromatique à 37,5 ppm [**Figure 113**].

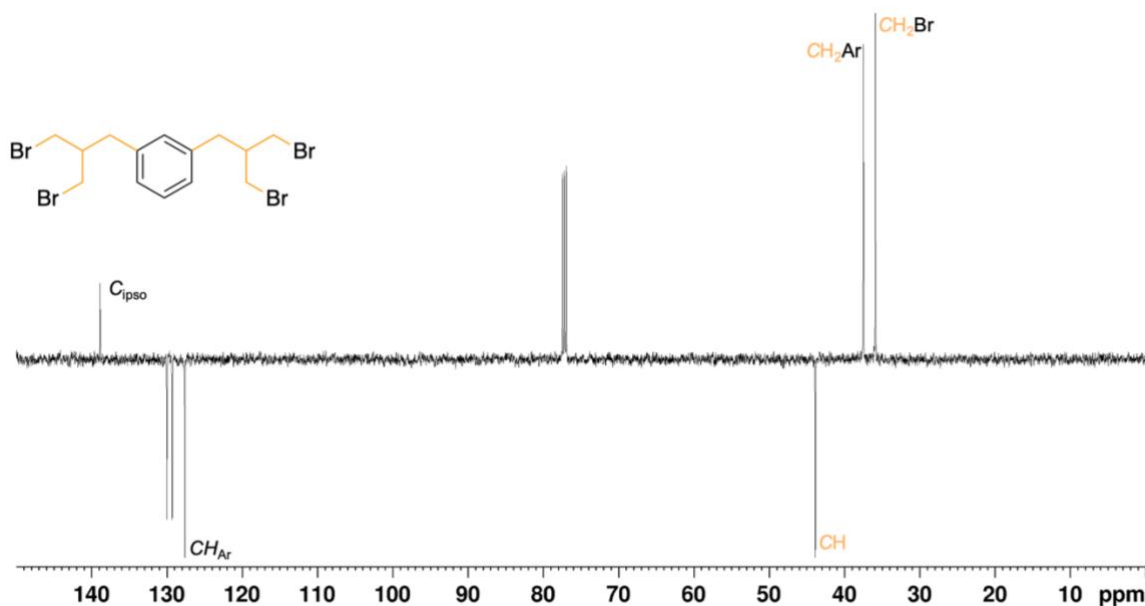


Figure 113 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du composé **11** (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K)

Le cyclisant tétrabromé **11** a donc été obtenu en trois étapes avec un rendement global de 31%.

2.2. Réaction de cyclisation

La cyclisation entre le composé **11** et la **cis-232-butanedione** a été réalisée dans l'acétonitrile en présence d'une base (K_2CO_3) comme décrit par S. J. Archibald en 2014 pour la synthèse du **p-NO₂-Bn-cyclam**. Contrairement au cas de la protection bisaminal obtenue à partir du glyoxal, le bisaminal provenant de la butanedione supporte le chauffage du milieu réactionnel sans *trans*-isomérisation. Ainsi, la réaction a été portée à 60°C pendant 10 jours, puis le composé **m-xylyl-bis-C-cyclam-butanedione** a pu être isolé après purification sur colonne chromatographique (SiO_2 , $\text{DCM}/\text{Et}_3\text{N}/\text{MeOH}$) avec 16% de rendement.

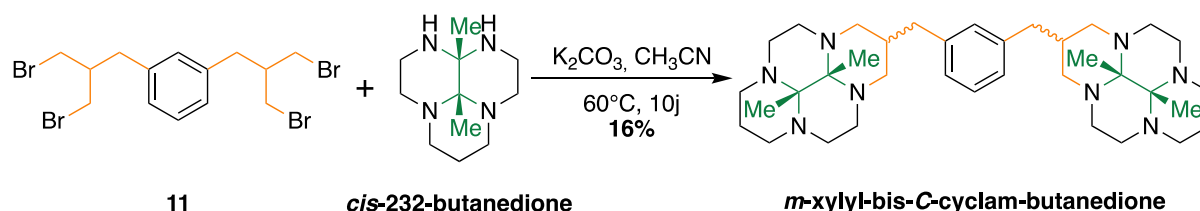


Figure 114 : Synthèse du **m-xylyl-bis-C-cyclam-butanedione** par réaction du composé **11** sur la **cis-232-butanedione**

Comparé au rendement publié par l'équipe d'Archibald sur le « monomère » **cyclam** C-fonctionnalisé (74%), notre cyclisation présente une faible conversion. Dans un premier temps, nous avons préféré mener la synthèse multi-étape à son terme pour s'assurer de la

validité de cette voie et nous ne sommes pas revenus sur cette étape à l'heure de l'écriture de ce manuscrit. Une optimisation semble néanmoins possible, en particulier en jouant sur le système solvant/base.

Tout comme pour la première stratégie de synthèse, la modification du squelette carboné des unités cyclam induit la formation de diastéréoisomères. Le spectre RMN ^{13}C met en avant la formation d'un mélange d'espèces [Figure 115]. Les groupements méthyle du pont bisaminal présentent au moins deux signatures spectrales différentes entre 10,0 et 11,3 ppm, de même que pour le CH de la C-fonctionnalisation ainsi que les CH aromatiques. Les signaux caractéristiques du noyau aromatique sont bien identifiés et sont également multipliés entre 142 et 126,3 ppm. Les signaux correspondants aux groupements méthylène des macrocycles résonnent entre 55,6 et 44,9 ppm, tandis que ceux en position β des atomes d'azote sont identifiés à 18 ppm.

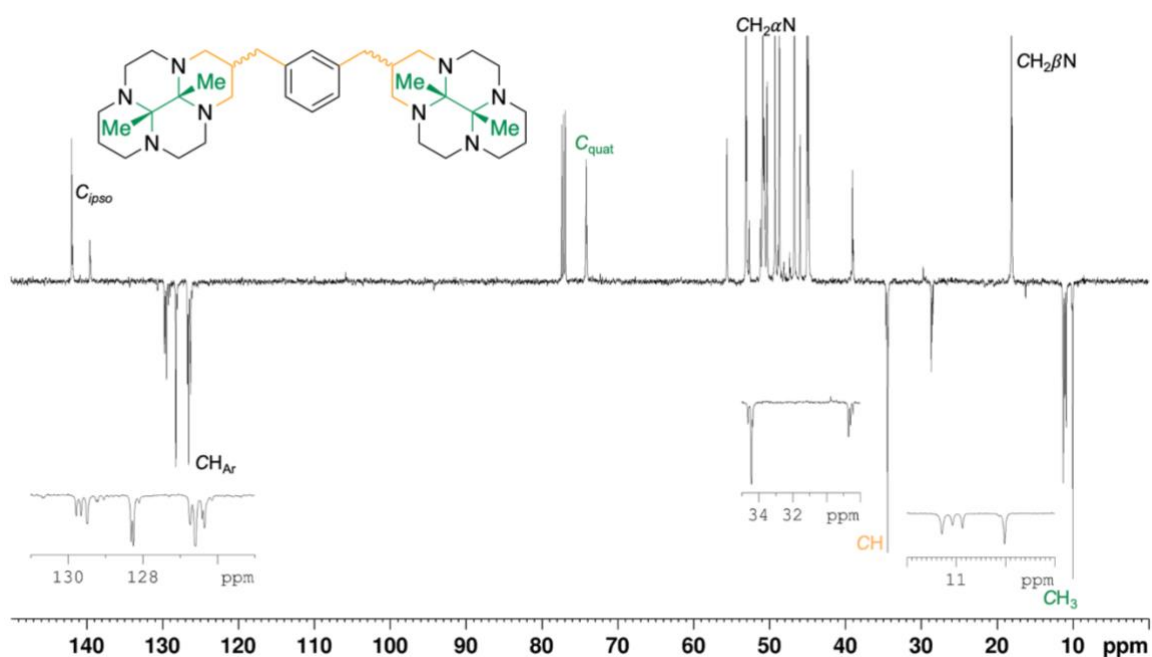


Figure 115 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du *m*-xylyl-bis-C-cyclam-butanedione (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K)

Ici, le composé peut exister sous la forme de 3 différents diastéréoisomères [Figure 116]. Cette stéréoisomérisation est une nouvelle fois due à la position de la C-fonctionnalisation par rapport au pont bisaminal. Lorsque les deux éléments sont orientés du même côté du plan du macrocycle, la configuration est dite *syn* ou *anti* dans le cas contraire.

La présence d'un plan de symétrie au sein des deux isomères **A** et **B**, de configurations *syn/syn* et *anti/anti* respectivement induit une achiralité. À l'inverse, le diastéréoisomère **C**, de configuration *syn/anti* ne présente pas d'élément de symétrie et est donc chiral, présent en mélange racémique.

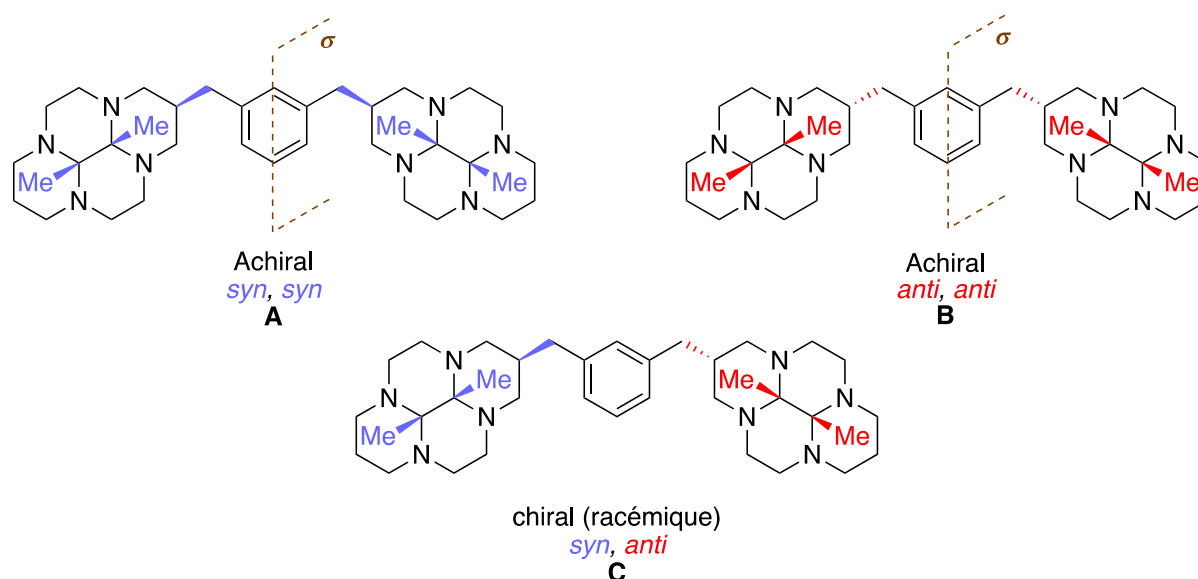


Figure 116 : Représentations des différents diastéréoisomères formés à l'issue de la réaction de cyclisation

Bien que 3 diastéréoisomères soient envisageables, la RMN du carbone démontre que la solution contient un nombre d'espèces plus important. Ceci peut s'expliquer par les différentes conformations possibles des cycles à 6 chaînons formés par la présence du pont bisaminal, en forme « chaise » ou « bateau ». Ces conformations peuvent s'échanger en solution, mais le passage d'une conformation à l'autre est coûteux en énergie et probablement bloqué à température ambiante, permettant la détection de différentes combinaisons des conformations en RMN. Une analyse RMN à plus haute température pourrait confirmer cette observation mais n'a pas encore été effectuée à ce jour.

Contrairement au composé ***m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal**, nous ne sommes pas parvenus à obtenir de cristaux pouvant nous confirmer la structure des différents composés présents à l'issue de la réaction. Cela ne pose pas de problème pour la suite de la synthèse car une fois la protection du pont bisaminal éliminée, le composé ne présente plus d'élément de chiralité.

À l'inverse de la déprotection du pont glyoxal qui demande plusieurs étapes de synthèse (*N*-benzylation puis déprotection de l'amine), le pont bisaminal issu de la butanedione peut être éliminé par simple hydrolyse acide. L'action de l'acide chlorhydrique (3 M) à température ambiante pendant 24h permet ainsi d'obtenir le composé ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** après purification sur colonne chromatographique en phase inverse (H₂O + 0,1% acide formique/ACN) avec un rendement de 59% [**Figure 117**].

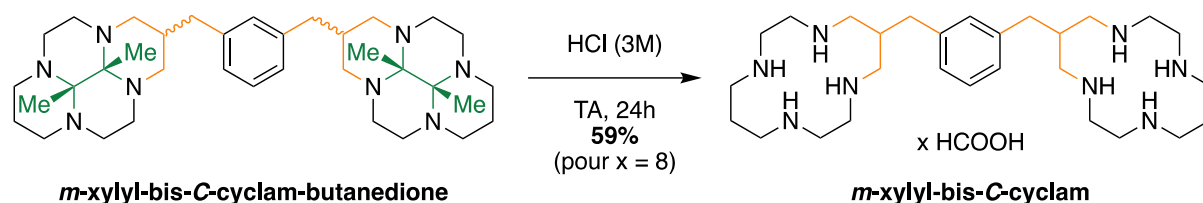


Figure 117 : Voie de synthèse du ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** par hydrolyse acide

La structure du composé ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** a été confirmée par RMN ^{13}C . L'élimination du pont bisaminal butanedione est mis en évidence par l'absence des signaux des groupements méthyle vers 10 ppm et ceux du carbone quaternaire les portant vers 80 ppm. La signature des groupements méthylène en position α des atomes d'azote apparaît entre 50,5 et 43,5 ppm, tandis que les CH_2 en position β résonnent à un déplacement chimique de 22,6 ppm. Pour finir, les signaux aromatiques sont identifiés entre 140,3 et 131,0 ppm [Figure 118]. Le composé ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** a également été caractérisé par RMN ^1H et HRMS.

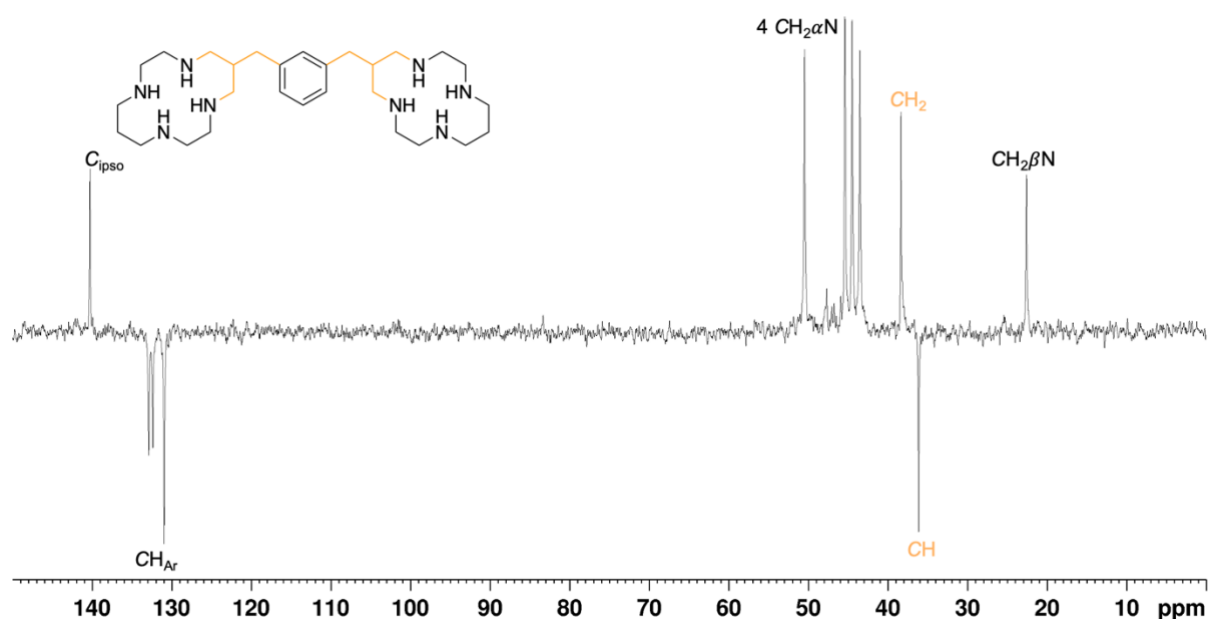


Figure 118 : Spectre RMN ^{13}C Jmod du ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** (D_2O , 125 MHz, 298 K)

2.3. Étude de coordination avec le cuivre (II)

Compte tenu de l'influence de la métallation des unités cyclam sur l'affinité des ligands pour le récepteur CXCR4, nous avons étudié la complexation du cuivre (II) par le ***m*-xylyl-bis-C-cyclam**. Dans un premier temps, la coordination avec deux cations a été mise en œuvre. La réaction de complexation du cuivre (II) avec le ligand ditopique ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** sous forme de sel d'acide formique a été effectuée avec $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ en

milieu aqueux. Le pH du milieu réactionnel a été ajusté à 6 par ajout d'une solution de KOH. La solution a été chauffée au reflux de l'eau pendant 4h pour conduire au composé thermodynamique. Le complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$ a été isolé après purification sur colonne chromatographique en phase inverse (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$) avec un rendement de **61%** [Figure 119].

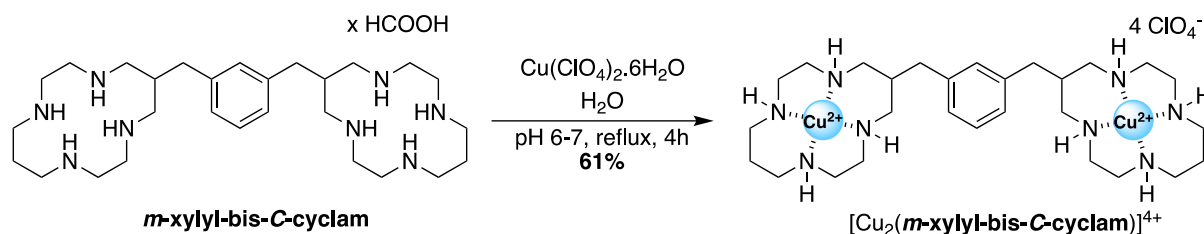


Figure 119 : Synthèse du complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$

Grâce aux propriétés spectroscopiques du cuivre (II), la formation du complexe a été identifiée par spectroscopie UV-visible par la présence de la bande d'absorption correspondant aux transitions d-d. Le complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$ présente une longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) à 507 nm et un coefficient d'absorption molaire (ϵ) de $167 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [Figure 120]. La valeur de λ_{max} est comprise entre celles de la géométrie plan carré et octaédrique déformée comme présenté dans le chapitre 1 (1.2.1.). Bien que le **cyclam** possède 4 atomes coordinants, il est possible d'observer la géométrie octaédrique déformée dans le cas où les contre-ions ou des molécules de solvant viennent compléter la sphère de coordination en position apicale. Cela a par exemple été observé à l'état solide avec le complexe $[\text{Cu}(\textit{cyclam})](\text{ClO}_4)_2$.^[64] Il est également probable que le complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})](\text{ClO}_4)_4$ adopte la même géométrie pour chaque unité **cyclam**.

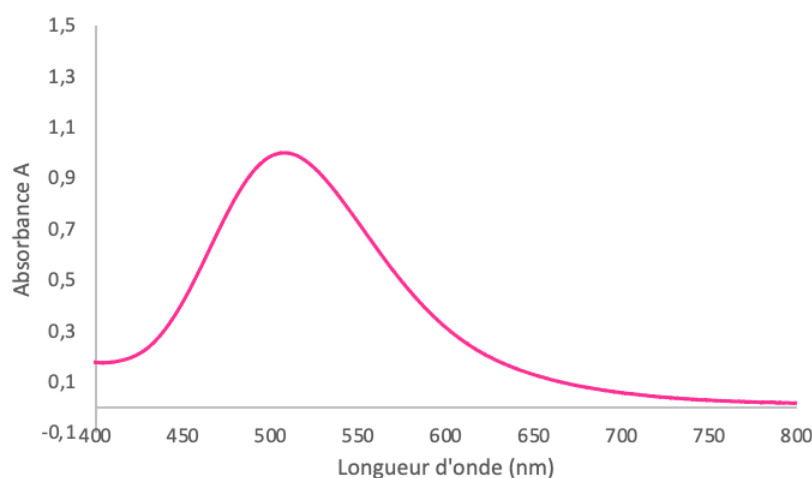


Figure 120 : Spectre d'absorption UV-visible du complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})](\text{ClO}_4)_4$, à 6,0 mM dans H_2O à 25°C

Compte-tenu du caractère paramagnétique du cuivre (II), l'analyse du complexe est possible par spectroscopie RPE. Le spectre RPE du complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{2+}$ a été enregistré dans un mélange $\text{H}_2\text{O} : \text{DMF} (1 : 1)$ en solution gelée (150 K, 1 mM) et répond aux caractéristiques d'un complexe de cuivre (II), les quatre raies étant présentes avec un épaulement de deux d'entre elles [Figure 121].

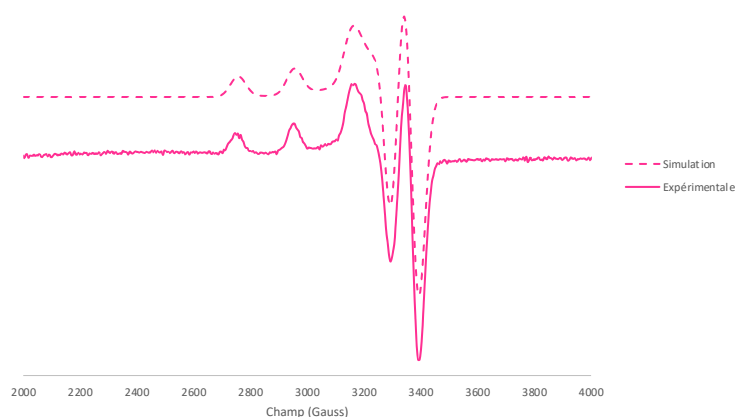


Figure 121 : Spectres RPE simulé (pointillés) et expérimental (trait plein) du complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$

La simulation du spectre à l'aide des logiciels MatLab et Simultispin permet d'obtenir les valeurs des paramètres g et A . Les paramètres du complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$, révèlent une symétrie axiale avec $g_x = g_y \neq g_z$ et $A_x = A_y \neq A_z$, avec g_x et g_y égaux (2,039 et 2,040) et g_z bien supérieur (2,184). Ces valeurs sont très proches de celles décrites dans la littérature pour le complexe de **cyclam**,^[102] confirmant que malgré la C-fonctionnalisation, chaque unité coordinante se comporte de façon similaire au cyclam libre [Tableau 22].

Tableau 22 : Paramètres RPE, g_i et A_i (10^{-4} cm^{-1}), des complexes $[\text{Cu}(\textit{cyclam})]^{2+}$ et $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$

Complexe	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
$[\text{Cu}(\textit{cyclam})]^{2+}$	2,035	2,035	2,184	23	23	203
$[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$	2,039	2,040	2,184	3	39	203

III. Études biologiques

Les études biologiques ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de virologie et chimiothérapie du Professeur Dominique Schols à l'université de Leuven (Belgique). Leur recherche est axée sur le développement de médicaments antirétroviraux qui interfèrent avec l'entrée du VIH dans les cellules cibles. Plus particulièrement, l'équipe s'intéresse à l'étude de nouveaux agents reconnaissant spécifiquement les récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du VIH au sein des cellules. Ces récepteurs sont le CD4 et les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5. C'est en particulier au sein de cette équipe que l'activité prometteuse de l'**AMD3100** a été découverte au début des années 2000.

1. Inhibition de la reconnaissance du ligand CXCL12

L'activité inhibitrice des composés sur le récepteur CXCR4 est évaluée par des expériences de déplacement par le ligand naturel, la chimiokine CXCL12, à l'aide d'un dérivé greffé par un marqueur fluorescent (CXCL12-AF647). L'étude comparative s'est portée sur une lignée cellulaire de lymphocytes T exprimant fortement CXCR4 (Jurkat). D'un point de vue pratique, la saturation des récepteurs cellulaires est réalisée avec une concentration croissante du composé à évaluer, jusqu'à 20 μ M. Après l'incubation des composés avec les cellules (15 minutes à température ambiante), le ligand CXCL12 marqué par le fluorophore AF647 a été ajouté et incubé (30 minutes à température ambiante) afin de pouvoir déplacer l'inhibiteur testé du récepteur. Les composés non fixés (excès de CXCL12-AF647 et/ou inhibiteurs déplacés par celle-ci) sont ensuite éliminés par des lavages du milieu de culture. Enfin, les cellules sont analysées par cytométrie de flux, afin d'évaluer la fixation de CXCL12-AF647 et d'en déduire la quantité d'inhibiteur toujours lié au récepteur après cette compétition avec la chimiokine. Cette mesure permet donc, après traitement des données, de calculer des IC_{50} qui correspondent à la concentration de composé nécessaire pour bloquer 50% de la fixation de CXCL12-AF647.

L'analyse cellulaire montre une IC_{50} de 195,50 nM pour le ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** [Tableau 23]. Cette valeur est certes inférieure à celle de l'**AMD3100** ($IC_{50} = 35,55$ nM) mais elle montre toutefois une affinité marquée du ligand ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** pour le récepteur CXCR4 ce qui représente une première preuve de concept que l'utilisation de composé bis-macrocyclique C-fonctionnels peut être viable.

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des IC₅₀ calculées pour l'**AMD3100** et le **m-xylyl-bis-C-cyclam** sur lignée cellulaire de lymphocyte T (étude comparative par compétition avec le ligand CXCL12)

Composé	IC ₅₀ (nM)
AMD 3100	35,55
m-xylyl-bis-C-cyclam	195,50

2. Inhibition du signal calcique

La liaison de CXCL12 au récepteur a pour effet, entre autres, de déclencher un flux calcique (ions Ca²⁺) intracellulaire. En revanche, ce flux calcique n'est pas observé lors de la liaison de petites molécules à CXCR4. Une mesure du flux calcique est un second point de mesure des IC₅₀ d'inhibition. La concentration intracellulaire en calcium a été mesurée grâce à un marqueur fluorescent, permettant d'utiliser le système d'identification Penta (Molecular Devices) à l'aide d'un lecteur de plaques à imagerie fluorescente et luminescente (FLIPR). Cette méthode a été mise au point par l'équipe du Pr D. Schols en 2003.^[179] Les études cellulaires ont été réalisées, à l'image des expériences de reconnaissance, par compétition avec CXCL12, sur une lignée de glioblastome (U.87) préalablement transfectée pour surexprimer CXCR4. Les cellules ont été chargées par l'indicateur de calcium fluorescent (Fluo-2-acetoxyméthyle ester) dans le milieu de culture pendant 45 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Pendant cette période d'incubation, une plaque de 96 puits, avec différentes concentrations de **m-xylyl-bis-C-cyclam** diluées dans un tampon, a été préparée. En parallèle, dans une seconde plaque, 50 ng/mL de chimiokine CXCL12 ont été ajoutés par puit.

À l'issue du temps d'incubation, les cellules ont été lavées par le tampon de dosage puis pré-incubées pendant 1 minute à 37°C dans le système d'identification FLIPR. Le composé à tester est ensuite ajouté à différentes concentrations, le tout est ensuite mis 10 minutes en incubation, temps pendant lequel le niveau de calcium intracellulaire est mesuré en continu. Suite à l'incubation, la chimiokine CXCL12 est ajoutée et les changements de la concentration de calcium des cellules sont mesurés simultanément par le système FLIPR pour pouvoir déterminer l'effet antagoniste du composé étudié.

À l'image de l'étude compétitive menée avec le ligand spécifique de CXCR4, le **m-xylyl-bis-C-cyclam** présente de nouveau une efficacité plus faible que la référence **AMD3100** comme en témoigne sa valeur d'IC₅₀ plus élevée (3,58 vs 0,140 μM respectivement) [Tableau 24].

Tableau 24 : Tableau récapitulatif des IC_{50} calculées pour l'**AMD3100** et le **m-xylyl-bis-C-cyclam** sur lignée cellulaire U.87, CD4⁺, CXCR4⁺ par inhibition du flux calcique

Composé	IC_{50} (μ M)
AMD 3100	0,140
m-xylyl-bis-C-cyclam	3,58

Il a été démontré que le récepteur CCR5 est également impliqué dans la fusion membranaire du VIH avec les cellules saines, et la même étude a ainsi été réalisée sur une lignée cellulaire U.87 préalablement transfectée par CCR5.^[121] La mesure d' IC_{50} révèle que le **m-xylyl-bis-C-cyclam** présente une activité antagoniste pour ce récepteur à hauteur de 26,02 μ M tandis que l'**AMD3100** n'en présente aucune [Tableau 25]. Actuellement, au niveau clinique le composé **Maraviroc** (Celsentri[®] commercialisé par Pfizer[®]) est administré aux patients en tant qu'antagoniste du récepteur CCR5 (IC_{50} = 12 nM). L'activité du **m-xylyl-bis-C-cyclam** développé au cours de ce travail est moindre mais se distingue de celle de l'**AMD3100** puisqu'il présente une propriété antagoniste pour les deux récepteurs CXCR4 et CCR5.

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des IC_{50} calculées pour le **Maraviroc** et le **m-xylyl-bis-C-cyclam** sur la lignée cellulaire U.87, CD4⁺, CCR5⁺ par inhibition du flux calcique

Composé	IC_{50} (μ M)
Maraviroc	0,0012
m-xylyl-bis-C-cyclam	26,02

3. Inhibition de l'infection au VIH

Les mesures de l'activité anti-VIH ont été réalisées sur les cellules MT-4 en se basant sur la viabilité des cellules, exposées à diverses concentrations de **m-xylyl-bis-C-cyclam**, une fois infectées par la souche VIH-1 NL4.3. Cette dernière utilisant CXCR4 dans son mécanisme d'entrée au sein des cellules hôtes, une affinité du ligand testé pour CXCR4 sera caractérisée par un nombre important de cellules viables après incubation. Ainsi, après avoir laissé les cellules MT-4 proliférer pendant 5 jours, le nombre de cellules viables est quantifié par une méthode colorimétrique à base de tétrazolium (indicateur rédox couramment utilisé en biochimie et en biologie cellulaire pour mesurer la respiration cellulaire et donc mettre en évidence la survie des cellules), comme décrit par Pauwels et al..^[180,181]

L'étude avec le **m-xylyl-bis-C-cyclam** montre son activité contre l'infection cellulaire par le VIH-1, par inhibition de CXCR4 avec une IC_{50} de 110 nM. Cette valeur est largement supérieure à celle de l'**AMD3100** (IC_{50} = 0,43 nM), signe d'une activité inférieure mais reste

intéressante car elle est du même ordre de grandeur que celle mesurée par exemple pour la petite molécule **AMD070-p-BnCO₂Me** présentée et retenue comme vecteur dans notre étude proposée dans le chapitre 2 [Tableau 26].

Tableau 26 : Tableau récapitulatif des IC₅₀ calculées pour évaluer l'activité anti-VIH de l'**AMD3100**, le *m*-xylyl-bis-**C-cyclam** et l'**AMD070-p-BnCO₂Me** sur lignée cellulaire MT-4 après infection avec la souche VIH-1 NL4.3

Composé	IC ₅₀ (nM)
AMD 3100	0,43
<i>m</i> -xylyl-bis- C-cyclam	110
AMD070-p-BnCO₂Me	105

Dans le cas du **CB-bis-cyclam**, l'affinité sans cation est moindre comparé à l'**AMD3100** mais cette dernière se voit nettement améliorée une fois le ligand complexé. Pour aller plus loin que cette validation de la preuve de concept, il est donc envisageable d'étudier les complexes métalliques du *m*-xylyl-bis-**C-cyclam**. Ceci n'a pas pu être réalisé au cours de cette thèse, mais est une piste de travail importante pour notre équipe dans un futur proche.

Conclusion

Historiquement, la découverte d'une impureté dans des lots de **cyclam** commercial a permis de mettre en avant l'activité des composés **bis-cyclam** pour la reconnaissance du récepteur cellulaire CXCR4 dans le cadre de l'infection au VIH. Le potentiel de l'**AMD3100**, un bis-cyclam doté d'un espaceur méthylxylyl, a ensuite été investigué en imagerie TEP, après radiomarquage du ligand au cuivre-64, pour caractériser l'expression du récepteur. Bien qu'une bonne visualisation des tumeurs de glioblastome et du sein ait été obtenue, un phénomène de transchélation néfaste a été mis en évidence par une rétention de radioactivité dans le foie. Ainsi, les chercheurs se sont intéressés au dérivé renforcé de l'**AMD3100**, le **CB-bis-cyclam**, dans le but d'acquérir une meilleure inertie des complexes de métaux de transition. Une nouvelle fois, la stabilité des complexes s'est avérée insuffisante, et en l'absence de cation métallique, le ligand présente une affinité plus faible pour le récepteur. Cette perte d'activité est probablement liée au sacrifice des amines secondaires du macrocycle qui sont responsables des interactions avec les résidus aspartate de CXCR4. Ainsi, afin de conserver les huit amines secondaires des deux unités **cyclam** intactes, pour notre part et dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons proposé la synthèse de l'analogue C-fonctionnalisé de l'**AMD3100**, en mettant à profit les synthèses de cyclam C-fonctionnels développées au laboratoire ou dans la littérature. Ces dernières sont basées

sur la réaction d'un synthon α,β -insaturé ou d'un dérivé dihalogéné sur une tétraamine préorganisée par effet template. Le projet avait ainsi pour but d'utiliser un « double cyclisant » pouvant donc réagir sur deux tétraamines et précurseur de l'espaceur inter-macrocyclique.

La première stratégie de synthèse proposée a consisté en l'utilisation d'un **bis-ester α,β -insaturé** comme « double cyclisant » et de la tétraamine linéaire 232 préorganisée par effet template bisaminal. La synthèse du diester a pu être réalisée en deux étapes avec un rendement global de 82%. La réaction de cyclisation avec la tétraamine préorganisée par un pont glyoxal (**cis-232-glyoxal**) s'est cependant révélée très lente (4 mois de réaction) pour un rendement modeste de 30%. Outre le nombre d'étapes restantes encore très élevé, le frein de cette réaction est la présence du « pont glyoxal » qui ne permet pas le chauffage du milieu réactionnel et donc d'accélérer la réaction. Pour rappel, le chauffage peut conduire à l'isomère *trans* qui ne peut être déprotégé ensuite. Cette étape de cyclisation s'est en revanche avérée diastéréosélective, et seul le composé de configuration *cis/syn, cis/syn* a été isolé. Cette configuration a pu être déterminée à l'aide de la structure RX. Malheureusement, la suite de la voie de synthèse n'a pu aboutir, la quantité de produit obtenu n'étant pas suffisante pour nos investigations. Toutefois, le composé **m-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal** isolé peut être un point de départ pour envisager le développement de nouveaux composés bis-cyclam reliés par C-alkylation, en particulier car il pourrait, à l'image de son analogue simple du cyclam, permettre une N-fonctionnalisation régiosélective.

La seconde stratégie de synthèse utilise un composé tétra-électrophile (donc bis-di-électrophile) comme cyclisant. Nous avons ciblé un composé tétrabromé obtenu en trois étapes à partir du **m-dibromoxylène** avec un rendement global de 31%. La réaction de cyclisation a cette fois-ci été conduite avec la tétraamine préorganisée par la butanedione (**cis-232-butanedione**). Ce type de composé bisaminal lui permet le chauffage de la réaction sans isomérisation et a pour autre avantage d'être éliminé beaucoup plus facilement que son équivalent issu du glyoxal. La réaction de cyclisation a ainsi été effectuée avec succès en 10 jours à 60°C. Contrairement à la première stratégie de synthèse, le composé issu de la réaction de cyclisation est présent sous la forme d'un mélange de 3 diastéréoisomères. Ce mélange de stéréoisomères, observé par étude RMN, ne pose cependant pas de problèmes de synthèse puisque qu'à la suite de l'hydrolyse des ponts bisaminal le composé final perd tout élément de chiralité. Ainsi, le composé **m-xylyl-bis-C-cyclam** a été obtenu en cinq étapes de synthèse à partir du **m-dibromoxylène** commercial avec un rendement global de 3%, mais à l'échelle de 71 mg.

La complexation du cuivre (II) par ce ligand ditopique a permis de former le complexe dinucléaire $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$ qui présente en solution une géométrie de type octaédrique déformée avec une longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) de 507 nm. La présence d'ions cuivriques a permis l'analyse par RPE du complexe $[\text{Cu}_2(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{4+}$ en solution gelée (1 mM à 150 K) dans un mélange H₂O/DMF. La comparaison du spectre obtenu avec la simulation donne accès aux valeurs des paramètres g qui révèlent bien une symétrie axiale avec $g_x = g_y \neq g_z$, comme dans le cas du complexe de référence $[\text{Cu}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2$.

Le nouveau **bis-cyclam** développé, analogue C-ponté du célèbre **AMD3100**, a ensuite été étudié en collaboration avec l'équipe belge du Pr D. Schols pour évaluer sa reconnaissance potentielle du récepteur CXCR4. Bien que les résultats ne témoignent pas d'une meilleure activité que l'**AMD3100**, la reconnaissance pour le récepteur est nette et encourageante pour un premier modèle de bis-cyclam C-fonctionnel : une inhibition de la liaison du ligand CXCL12 a été mesurée avec une IC₅₀ de 195,5 μM , valeur qui est cinq fois plus élevée que celle avec l'**AMD3100** ; néanmoins, le ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** nouvellement obtenu inhibe le flux calcique *via* les deux récepteurs CXCR4 et CCR5 (IC₅₀ de 3,58 et 26,02 μM respectivement) à la différence de l'**AMD3100** qui présente des propriétés antagoniste uniquement pour CXCR4. Ceci nous conforte encore dans l'utilisation de ce type de bis-macrocycle dans ce champ d'applications. Enfin, le composé possède également une activité anti-VIH sur lignées cellulaires, avec une valeur d'IC₅₀ de 110 nM, du même ordre de grandeur, par exemple, que le composé **AMD070-p-BnCO₂Me** utilisé comme vecteur dans le chapitre 2.

Outre l'évolution du design du bismacrocycle, qui pourrait permettre d'améliorer ses propriétés d'inhibition de CXCR4, la formation de complexe mononucléaire, à l'image de ce qui a été développé dans la littérature pour l'**AMD3100**, est à présent envisagée. Il a en effet été montré que la présence de cation au sein d'une unité cyclam améliore de façon considérable l'activité des composés. Ainsi, il serait également intéressant de radiomarquer une unité **cyclam** avec le cuivre-64 pour évaluer le potentiel du radiopharmaceutique pour l'imagerie TEP du récepteur CXCR4. Une chimie de coordination préalable du composé au cuivre (II) « froid » est donc déjà à envisager pour maîtriser la formation du complexe monométallique. Compte tenu des faibles concentration nécessaires en radioactivité, une étude de radiomarquage peut être aussi prochainement envisagée.

Chapitre 4

Développement d'une nouvelle famille de ligands
spécifiques du cuivre (II)

Introduction

La chélation du cuivre (II) est largement étudiée dans divers domaines d'applications allant de la catalyse à la médecine,^[87,182-186] notamment en scintigraphie comme nous l'avons vu dans le paragraphe IV du chapitre bibliographique.

L'application de ces complexes dans le domaine médical requiert une forte affinité de liaison entre le cuivre (II) et le chélateur utilisé. Parmi de nombreux ligands étudiés, les tétraazacycloalcanes et particulièrement le **cyclam**, ont démontré leur forte affinité pour le cuivre (II) avec des constantes de stabilité thermodynamiques élevées ($\log K_{\text{Cu-cyclam}} = 27,2$, $I = 0,2 \text{ M NaClO}_4$ à 25°C).^[20] La fonctionnalisation des amines secondaires par des groupements coordinants permet de moduler les propriétés de coordination des ligands vis-à-vis du cuivre (II), que ce soit sur les paramètres d'inertie, de cinétique de complexation, les propriétés redox ou encore sur la sélectivité des cations. Les paramètres qui régissent ces propriétés restent cependant compliqués à maîtriser. Les groupements coordinants le plus souvent ajoutés sur les dérivés azamacrocycliques sont certainement les fonctions acétate. Leur introduction sur le **cyclam** par di- ou tétra-*N*-fonctionnalisation conduit respectivement aux $\text{H}_2\text{TE2A}$ et H_4TETA , et induit une perte notable de stabilité thermodynamique avec le cuivre (II) ($p\text{Cu} = 16,2$ pour H_4TETA vs. $21,4$ pour le **cyclam**). Cependant, une nette amélioration de l'inertie cinétique est à souligner pour le composé $\text{H}_2\text{TE2A}$ au regard de son temps de demi-vie en milieu compétiteur comparé à celui du H_4TETA ($t_{1/2} = 46$ minutes vs. $4,5$ minutes respectivement en milieu HCl (5 M) à 90°C).^[63,64,66] L'étude de ces composés a également mis en valeur que l'introduction de fonctions coordinantes en excès conduit à une baisse d'inertie des ligands. Ainsi, les ligands développés pour le cuivre (II) sont généralement plus efficaces avec 5 ou 6 fonctions coordinantes, comme dans le cas du $\text{H}_2\text{TE2A}$, qu'avec 8 fonctions comme dans le cas du H_4TETA .

Le groupe de P. Hermann a par exemple développé de nouveaux ligands pour le cuivre (II) comprenant ce nombre idéal d'atomes coordinants. La mono- et di-*N*-fonctionnalisation du **cyclam** par le groupement méthylphosphonate ($\text{H}_2\text{TE1P}$ et $\text{H}_4\text{TE2P}$) permet d'égaliser les valeurs de stabilité thermodynamique du complexe de cuivre (II) avec le **cyclam** ($\log K_{\text{CuL}} = 27,3$, $26,5$ et $27,2$ pour $\text{H}_2\text{TE1P}$, $\text{H}_4\text{TE2P}$ et le **cyclam** respectivement) tout en préservant une bonne inertie cinétique ($6,7$ mois en milieu acide HClO_4 (5 M) à 25°C pour $\text{H}_4\text{TE2P}$).^[71,72]

Le laboratoire a contribué pour sa part au développement de nouveaux dérivés du **cyclam** pour la coordination du cuivre (II), en mono- ou di-*N*-fonctionnalisant la plateforme macrocyclique avec le groupement picolinate pour conduire aux composés **HTE1PA** et **H₂TE2PA**. Le ligand **HTE1PA** a démontré de meilleures propriétés de coordination pour le cuivre que **H₂TE2PA** en améliorant la stabilité rédox des complexes ($E_{pc} = -0,88$ V vs. ESC pour **HTE1PA** avec un système réversible contre $-0,76$ V vs. ESC pour **H₂TE2PA** avec un système irréversible), tout en conservant une bonne inertie pouvant permettre d'envisager des applications *in vivo*.^[22,187]

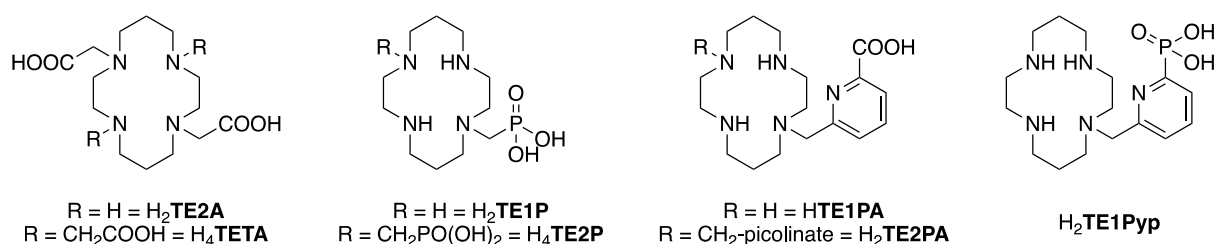


Figure 122 : Représentations des chélateurs du cuivre (II) discutés dans cette partie, **H₂TE2A**, **H₄TETA**, **H₂TE1P**, **H₄TE2P**, **HTE1PA**, **H₂TE2PA** et **H₂TE1Pyp**

Récemment, en 2021, le laboratoire a démontré que le remplacement de la fonction acide carboxylique du groupement picolinate par une fonction acide phosphonique (**H₂TE1Pyp**) permet de former un complexe neutre avec le cuivre (II) (contre une charge +1 avec le **HTE1PA**) conduisant à une amélioration du comportement *in vivo* des chélates de cuivre (II) résultants, avec une fixation non spécifique plus faible et une meilleure clairance.^[188]

Cependant, tout en atteignant une haute affinité pour le cuivre (II), cette série de chélateurs démontre également d'excellentes propriétés de coordination pour d'autres métaux de transition, tels que le zinc (II), le nickel (II) et le cobalt (II). En effet, le **H₄TETA** présente une très faible sélectivité entre ces cations avec des constantes d'association se situant dans une fourchette de quatre unités logarithmiques (de $\log K_{ML} = 16,7$ pour Ni²⁺ à $21,9$ pour Cu²⁺).^[20] Lorsque l'on augmente l'affinité pour le cuivre (II), comme dans le cas de **H₂TE1P** ou **HTE1PA** ($\log K_{CuL} = 27,3$ et $25,5$ respectivement), la sélectivité est légèrement améliorée mais l'affinité pour les autres cations reste élevée ($\log K_{ZnL} = 21,0$ et $18,6$ respectivement).^[22,72] Cette caractéristique peut être préjudiciable pour certaines applications, comme la thérapie par chélation du cuivre, ou encore la purification de l'eau, où la sélectivité pour le cuivre (II) peut-être un facteur clé.^[189,190]

La littérature rapporte l'utilisation des oxydes de phosphines comme ligands donneurs et leur implication dans des interactions électrostatiques principalement avec les premiers métaux de transitions,^[191,192] et les lanthanides.^[193] Cependant, quelques ligands chélatants porteurs de fonctions oxyde de phosphine ont été décrits pour le cuivre (II), démontrant une certaine affinité de cette fonction chimique pour ce cation métallique.^[194–197] En ce qui concerne les polyazacycloalcanes, à notre connaissance, seuls quatre exemples de ligands ont été jusqu'à présent rapportés dans la littérature, à savoir le **cyclen** tétrasubstitué par le groupement éthyl- ou méthyl-diphényloxyde de phosphine et de même avec le **cyclam**.^[198–200] Les données de coordination avec des cations divalents des groupes 9 à 12 (Co, Ni, Cu et Zn) du tableau périodique rapportées avec les dérivés de **cyclen** ne montrent aucune sélectivité mais les dérivés du **cyclam** n'ont pas été investigués avec ces métaux.

Dans ce chapitre, nous avons donc cherché à combiner les propriétés de coordination du cuivre (II) du **cyclam** et celles des oxydes de phosphine. Ainsi, nous présentons ici la synthèse et les études de chimie de coordination d'un nouveau ligand spécifique du cuivre (II), le **TE1PoPh₂** (cyclam mono-*N*-fonctionnalisé par un groupement oxyde de diphénylphosphine) ainsi que son analogue di-*N*-fonctionnalisé, le **TE2PoPh₂** [Figure 123]. Pour finir, l'étude de radiomarquage avec le cuivre-64 pour de potentielles applications en imagerie médicale sera présentée.

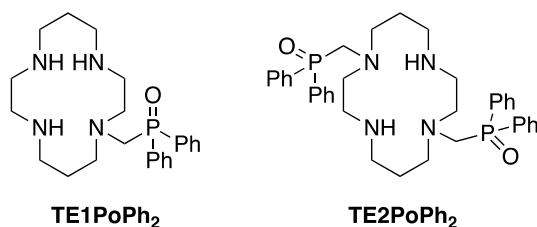


Figure 123 : Structures des ligands présentés dans ce chapitre : **TE1PoPh₂** et **TE2PoPh₂**

I. Synthèse de dérivés de cyclam à base d'oxyde de phosphine

Le **cyclam** a été largement étudié au cours des vingt dernières années pour la coordination de divers cations métalliques et le développement d'outils de synthèse a permis d'introduire de façon régiospécifique des groupements coordinants. L'insertion d'un seul groupement peut se faire de manière statistique ou en utilisant les techniques de tri-protection présentées dans le chapitre 1.^[73,75] La di-*N*-fonctionnalisation du **cyclam** est quant à elle généralement réalisée grâce à l'outil bisformyle (voir Chapitre 1 III. 2.).^[68]

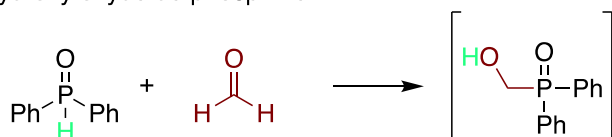
L'introduction du groupement oxyde de diphénylphosphine sur le **cyclam** peut être réalisée grâce à la réaction de Kabachnik-Fields. Cette réaction permet de former une fonction α -amino oxyde de phosphine à partir d'une amine, d'un composé carbonylé et d'une oxyde de phosphine secondaire.^[201,202]

Le mécanisme de cette réaction est controversé est peut-être effectué selon deux ordres de séquences réactionnelles en fonction de la nature des réactifs (encombrement stérique de l'oxyde phosphine ou du composé carbonylé ainsi que la basicité de l'amine).

La première séquence fait intervenir la formation d'une fonction α -hydroxy oxyde de phosphine après réaction du dérivé phosphorylé avec le composé carbonylé, puis l'amine est additionnée sur cette fonction pour former le composé souhaité avec élimination d'une molécule d'eau.

La seconde séquence quant à elle débute par une réaction entre la fonction amine et le dérivé carbonylé formant ainsi une fonction α -amino alcool. Le dérivé obtenu peut ensuite réagir avec le dérivé phosphorylé afin d'obtenir le composé souhaité avec encore une fois l'élimination d'une molécule d'eau **[Figure 124]**.^[203]

A) α -hydroxy oxyde de phosphine



B) α -amino alcool

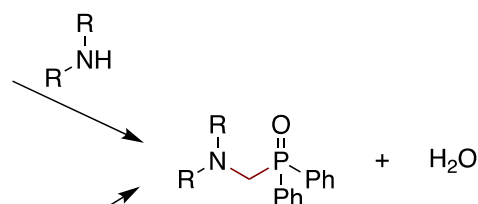
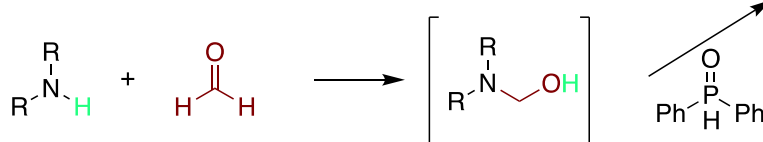


Figure 124 : Séquences réactionnelles de Kabachnik-Fields

Lorsque la fonction amine impliquée dans la réaction possède un pKa supérieur à 6, la séquence réactionnelle impliquant une fonction α -hydroxy oxyde de phosphine est cependant plus probable d'après les observations de la littérature.^[204]

En revanche, cette réaction ne peut être conduite que sur des amines primaires ou secondaires, rendant la voie bis-formyle inenvisageable pour la di-*N*-fonctionnalisation du cyclam. Nous présenterons donc dans le paragraphe **I.1.2.** de ce chapitre une alternative pour mener à bien la formation du dérivé **TE2PoPh₂**.

1. Synthèse du ligand TE1PoPh₂

Le ligand **TE1PoPh₂** a donc été synthétisé à partir du **cyclam tri-Boc** en deux étapes comme le montre la **Figure 125**.

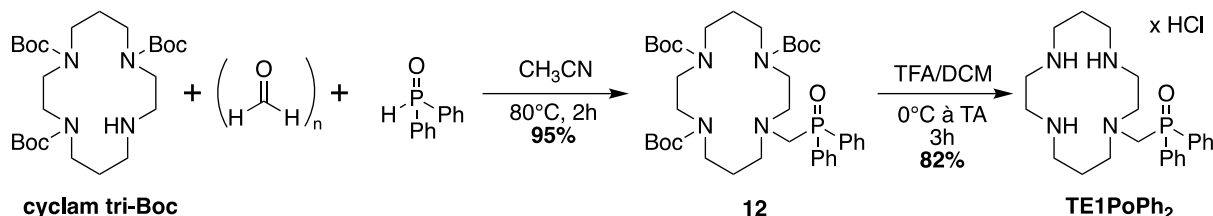


Figure 125 : Synthèse du ligand **TE1PoPh₂**·xHCl à partir du **cyclam tri-Boc**

Le **cyclam tri-Boc** a été synthétisé selon les conditions de la littérature avec un rendement de 85%.^[75] La réaction de Kabachnik-Fields a pu être mise en œuvre entre ce **cyclam tri-Boc**, l'oxyde de diphenylphosphine et le paraformaldéhyde dans l'acétonitrile. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant 2 heures et le composé **12** a été isolé après purification sur colonne chromatographique de gel de silice (dichlorométhane/méthanol) avec un rendement de 95%.

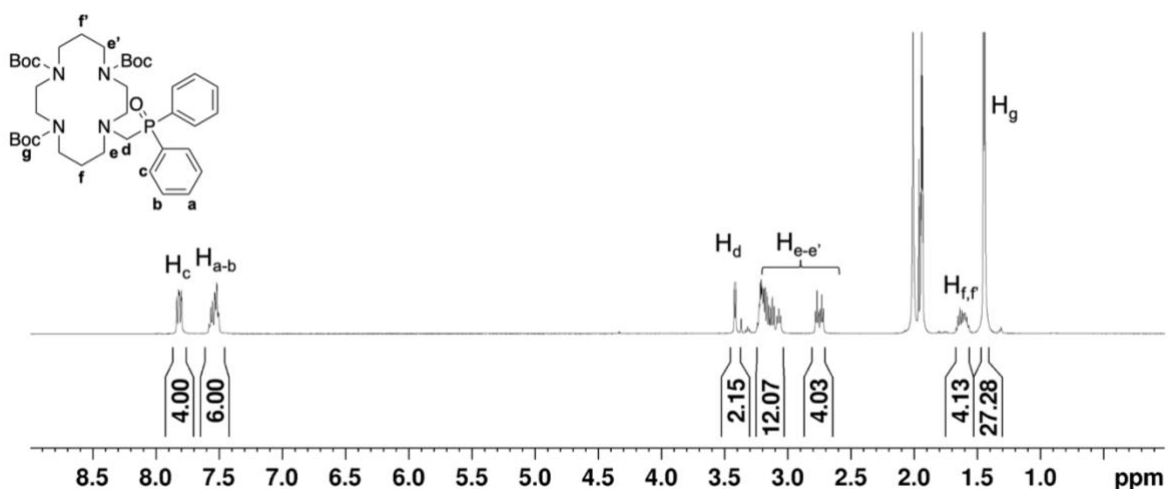


Figure 126 : Spectre RMN ¹H du composé **12** (CD₃CN, 500 MHz, 343 K)

En raison de l'encombrement stérique causé par les trois groupements Boc, les spectres RMN enregistrés à température ambiante présentent des signaux très larges. Les analyses RMN du composé **12** ont donc été réalisées à 70 °C. Le spectre RMN ¹H démontre la formation du composé avec la signature des protons des cycles aromatiques H_c à 7,82 ppm et ceux des protons H_a et H_b à 7,54 ppm. Les protons du groupement méthylène portés par le groupement oxyde de phosphine (H_d) sont identifiés à 3,42 ppm avec une intégration de deux protons. La signature des protons de la chaîne macrocyclique se caractérise par les signaux représentés

par deux massifs présents à 3,24-3,05 et 2,79-2,71 ppm correspondant aux groupements méthylène adjacents aux amines. Pour finir, les protons portés par les atomes de carbone en positions β des amines ($H_{f,r}$) ont un déplacement chimique de 1,62 ppm et les protons des groupements *tert*-butyle du Boc sont identifiés à 1,44 ppm sous la forme d'un singulet correspondant à 27 protons [Figure 126]. Le spectre ^{31}P confirme la formation du composé avec la présence d'un seul signal avec un déplacement chimique de 27,0 ppm, valeur comprise dans la zone caractéristique d'un atome de phosphore d'une fonction oxyde de phosphine tri-substituée [Figure 127].

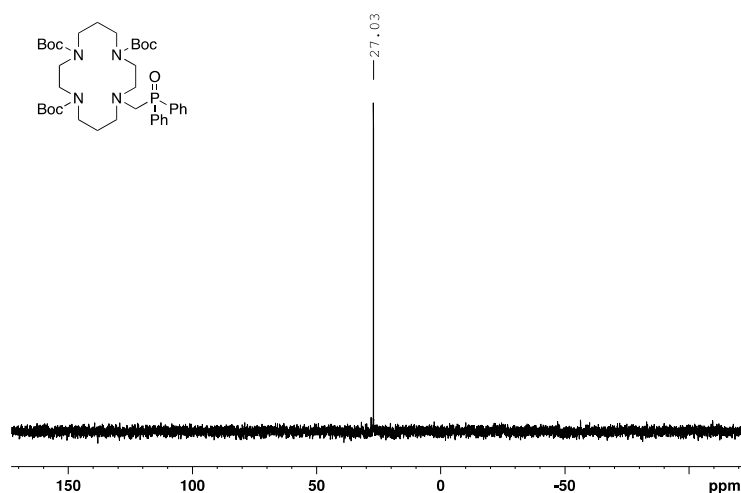


Figure 127 : Spectre RMN ^{31}P du composé **12** (CD_3CN , 202 MHz, 343 K)

Le composé cible **TE1PoPh₂** est obtenu après hydrolyse acide des groupements Boc par l'action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane sur le composé **12**. Après trois heures de réaction et un traitement en milieu basique, le composé est extrait en phase organique, puis une précipitation en milieu acide chlorhydrique permet de l'isoler sous forme **TE1PoPh₂.xHCl** avec un rendement de 82% (calculé pour $x = 3 \text{ HCl}$).

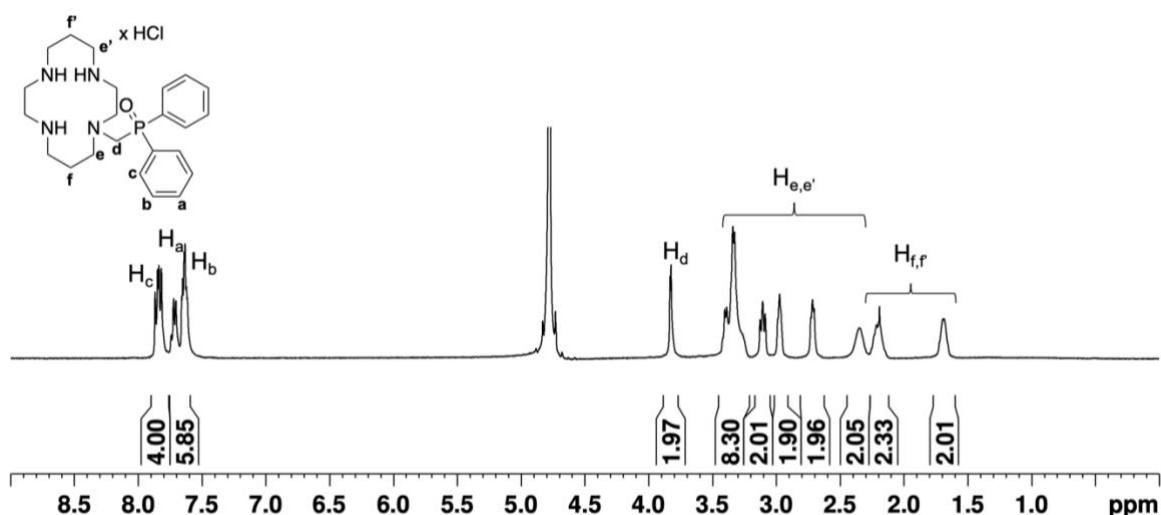


Figure 128 : Spectre RMN ^1H de TE1PoPh_2 (D_2O , 500 MHz, 298 K)

Le composé $\text{TE1PoPh}_2 \cdot x\text{HCl}$ a été totalement caractérisé par RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P . Le spectre RMN du proton confirme l'hydrolyse par l'absence des signaux vers 1,50 ppm des protons des groupements Boc. La signature des groupements phényle portés par l'oxyde de phosphine est bien présente : les protons H_c ont un déplacement chimique de 7,84 ppm et les protons H_a et H_b résonnent à 7,60 ppm. Les protons du groupement méthylène de la fonction oxyde de phosphine (H_d) eux résonnent à un déplacement chimique de 3,83 ppm. Les groupements méthylène du macrocycle ($\text{H}_{e,e'}$) ont des signaux caractéristiques présents de 3,44 à 2,27 ppm avec une intégration totale de 16 protons. Les protons portés par les atomes de carbone en positions β des amines ($\text{H}_{f,f'}$) ont une signature spectrale correspondant à deux signaux à 2,20 et 1,65 ppm [Figure 128]. Le spectre RMN ^{31}P confirme également l'obtention du composé avec un singulet présent à 36,46 ppm [Figure 129].

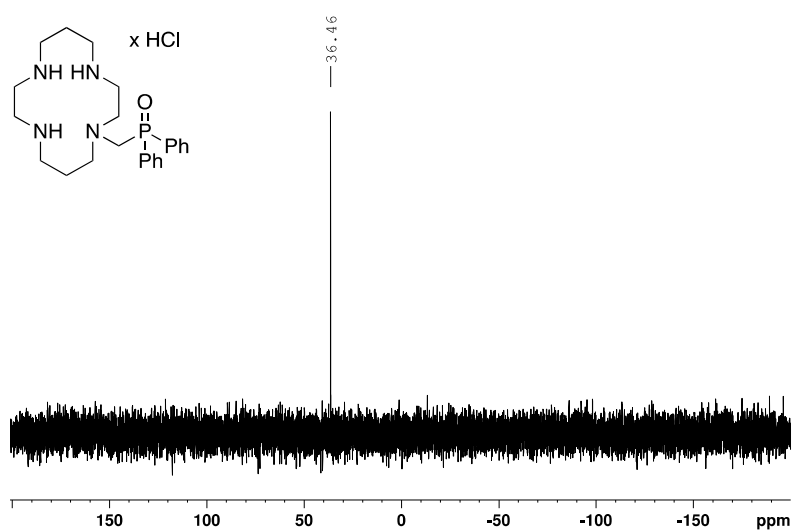


Figure 129 : RMN ^{31}P de TE1PoPh_2 (D_2O , 202 MHz, 298 K)

2. Synthèse du ligand TE2PoPh₂

La synthèse de dérivés du cyclam di-*N*-fonctionnalisés fait intervenir la chimie bisaminal avec l'outil bisformyle. Pour rappel, le ligand H₂TE2A a été obtenu après réaction du bromoacétate de *tert*-butyle sur le **cyclam bisformyle**.^[66] En revanche, la réaction de Kabachnik-Fields ne peut être effectuée sur des amines tertiaires. Nous avons donc utilisé la voie bisformyle pour pouvoir synthétiser le **cyclam** di-protégé en position N1-N8 par deux groupements Boc d'après les conditions décrites dans la littérature. Ainsi, le **cyclam di-Boc** est obtenu après 4 étapes de synthèse à partir du **cyclam** commercial [Figure 130].^[205]

La formation des deux ponts aminal est réalisée par action du formaldéhyde sur le **cyclam**, permettant d'isoler le composé **cyclam-bisformyle** avec un rendement de 85%. Le bromure de benzyle est un bon électrophile qui peut réagir sur le **cyclam bisformyle** à température ambiante dans l'acétonitrile et alkyler les fonctions amine par formation d'ammoniums. La déprotection des amines se fait ensuite de façon orthogonale à celle des groupements Boc. Le solvant utilisé, permet d'isoler le sel de diammonium formé par précipitation *in situ* et simple filtration. Un traitement basique permet ensuite de déprotéger les amines de leurs groupements formyle et d'isoler le composé **13** avec un rendement de 95%. Les deux amines secondaires libérées sont alors protégées par des groupements Boc pour obtenir le composé **14** avec un rendement de 78%. Enfin, l'hydrogénolyse des groupements benzyle, catalysée par le palladium sur charbon (Pd/C), en présence de dihydrogène permet d'obtenir le **cyclam di-Boc** avec 88% de rendement. Le rendement global après ces 4 étapes est de 55%.^[68,205]

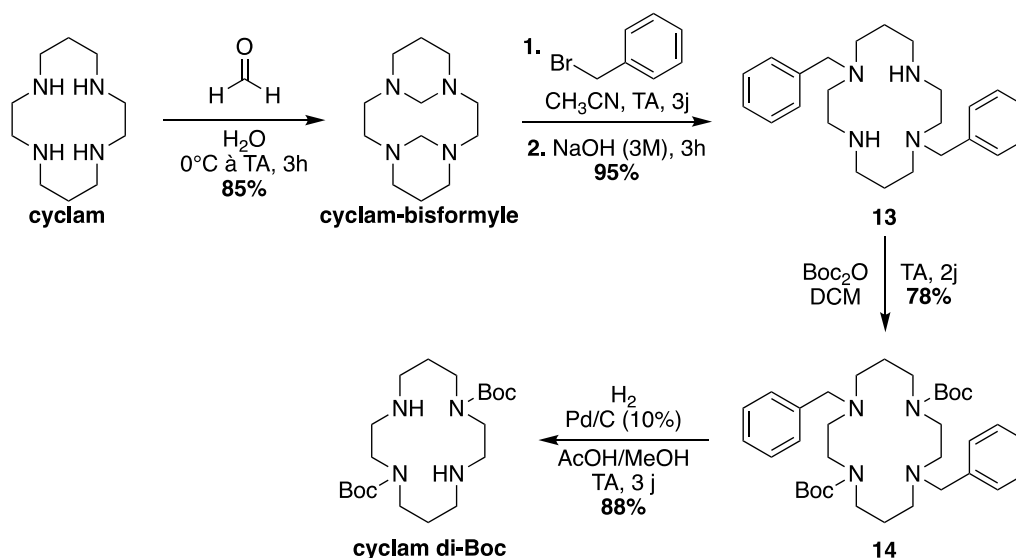


Figure 130 : Schéma de synthèse du **cyclam di-Boc** à partir du **cyclam** commercial

La suite de la séquence, comme dans le cas du composé **12**, consiste en une réaction de Kabachnik-Fields entre le **cyclam di-Boc** et l'oxyde de diphenylphosphine en présence de

paraformaldéhyde dans l'acétonitrile [Figure 131]. Le milieu réactionnel est chauffé au reflux pendant 1h30 (réaction suivie par CCM) et le composé **15** est isolé après purification sur colonne chromatographique de gel de silice (acétate d'éthyle/méthanol) avec un rendement de 58%.

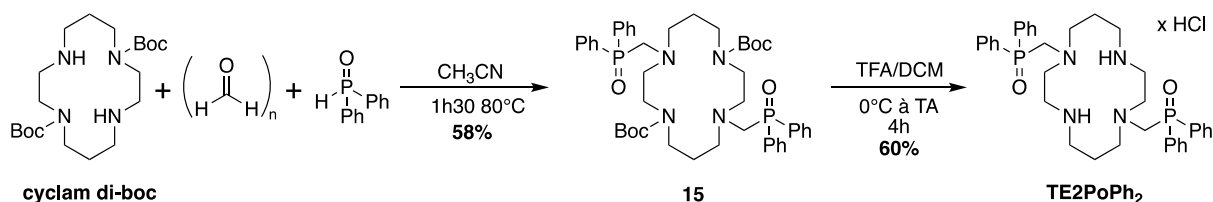


Figure 131 : Synthèse du **TE2PoPh₂** à partir du **cyclam di-Boc**

La présence de deux groupements Boc sur le composé **15**, parfois néfaste à cause de leur encombrement stérique sur ce type de composé, ne nuit pas à la bonne acquisition des spectres RMN à température ambiante. Ainsi, le spectre RMN du proton confirme la formation du composé grâce à la signature des protons H_c à 7,75 ppm et ceux des protons H_a et H_b à 7,47 ppm. Les protons du groupement méthylène de l'oxyde de phosphine (H_d) sont présents sous la forme d'un singulet à 3,34 ppm avec une intégration de quatre protons. La signature des protons de la chaîne macrocyclique est représentée par les deux massifs présents à 3,08-2,87 et 2,84-2,41 ppm correspondant aux groupements méthylène adjacents aux amines. Pour finir, les protons portés par les atomes de carbone en positions β des amines (H_f) ont un déplacement chimique de 1,52 ppm et les protons des groupements *tert*-butyle du Boc sont retrouvés à 1,42 ppm sous la forme d'un singulet intégrant pour 18 protons [Figure 132].

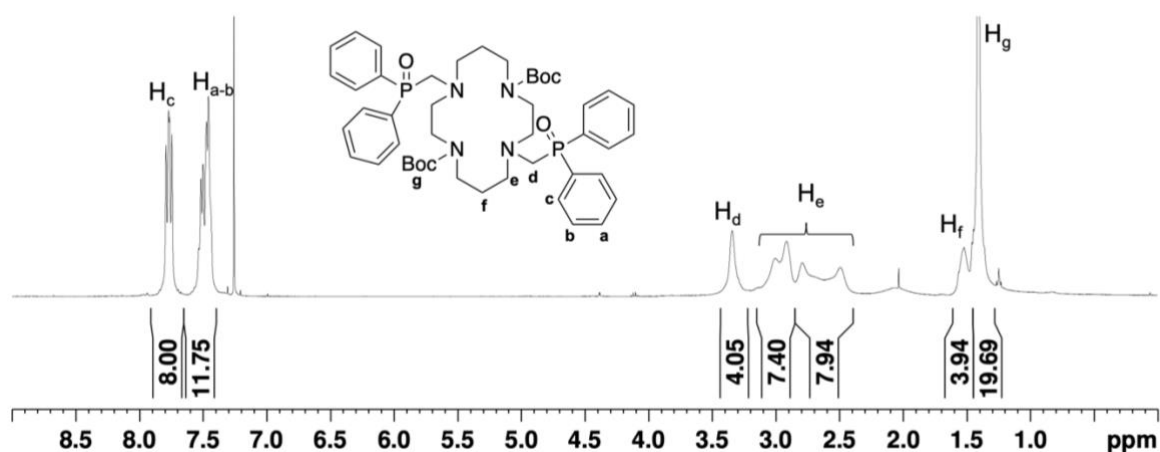


Figure 132 : Spectre RMN ¹H du composé **15** (CDCl₃, 400 MHz, 298 K)

Le spectre ^{31}P montre un seul signal à un déplacement chimique de 29,1 ppm, proche de celui obtenu pour le composé **12**, confirmant l'obtention d'une fonction oxyde de phosphine tri-substituée [Figure 133].

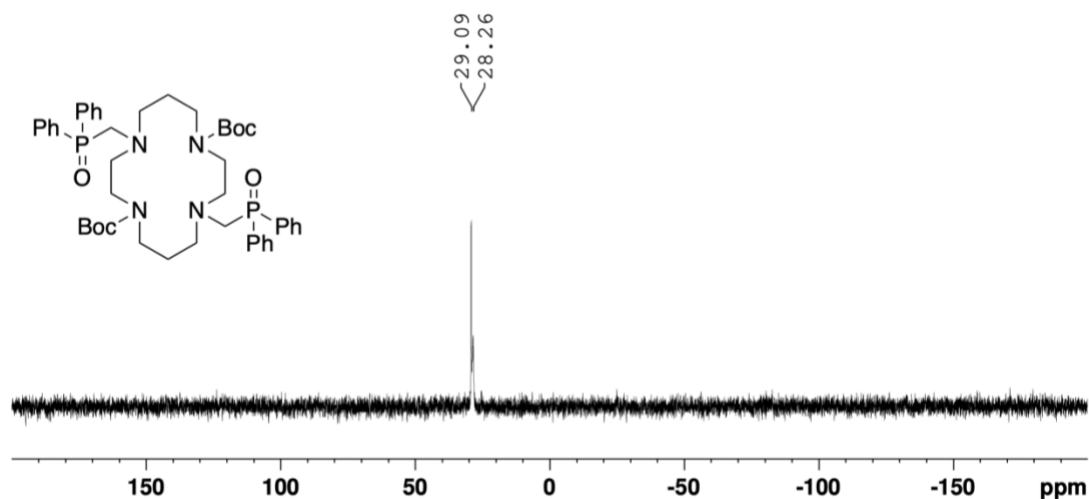


Figure 133 : Spectre RMN ^{31}P du composé **15** (CDCl_3 , 162 MHz, 298 K)

Comme précédemment, l'hydrolyse des groupements Boc du composé **15** est effectuée par action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pendant 4h. Après traitement, le composé **TE2PoPh₂** est isolé sous sa forme chlorhydrate par précipitation dans un mélange HCl/acétone avec un rendement global de 35% sur deux étapes (calculé pour $x = 2$ HCl).

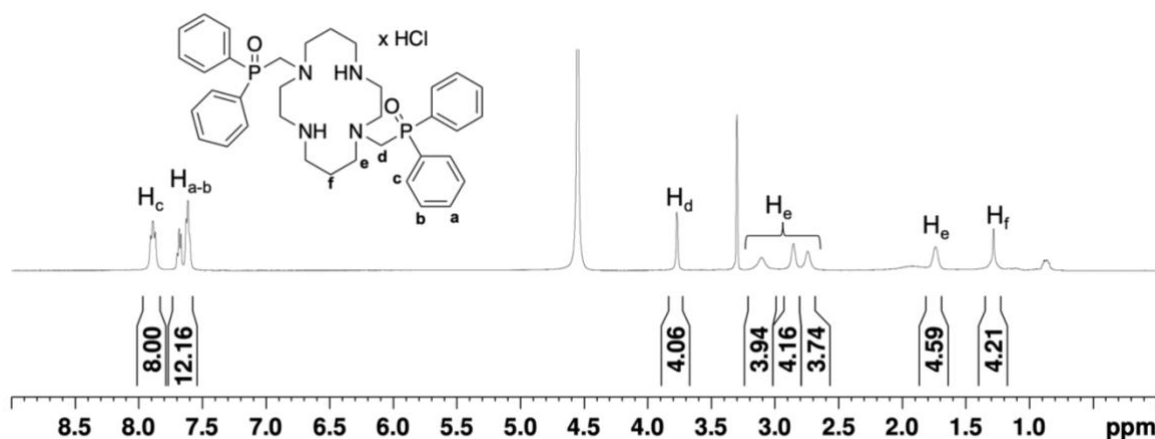


Figure 134 : Spectre RMN ^1H du **TE2PoPh₂.xHCl** (MeOD , 400 MHz, 298 K)

Le composé **TE2PoPh₂.xHCl** a été totalement caractérisé par RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P . En revanche, le composé obtenu sous forme chlorhydrate n'est pas très soluble en milieu aqueux à température ambiante, et les spectres RMN ont donc été réalisés dans le méthanol deutéré (CD_3OD). Le spectre RMN du proton révèle l'absence des signaux des protons des

groupements Boc vers 1,50 ppm. La signature des groupements phényle est bien identifiable avec les protons H_c qui ont un déplacement chimique de 7,89 ppm, les protons H_a et H_b eux sont retrouvés à 7,64 ppm. Les protons du groupement méthylène des fonctions oxyde de phosphine (H_d) présentent un déplacement chimique de 2,85 ppm. Les groupements méthylène du macrocycle (H_e) résonnent sous la forme de trois signaux mal définis à 3,10 ; 2,85 et 1,74 ppm. Les protons portés par les atomes de carbone en positions β des amines (H_f) sont présents sous la forme d'un singulet à 1,28 ppm [Figure 134]. Le spectre RMN ^{31}P confirme également l'obtention du composé avec un singulet présent à 34,4 ppm [Figure 135].

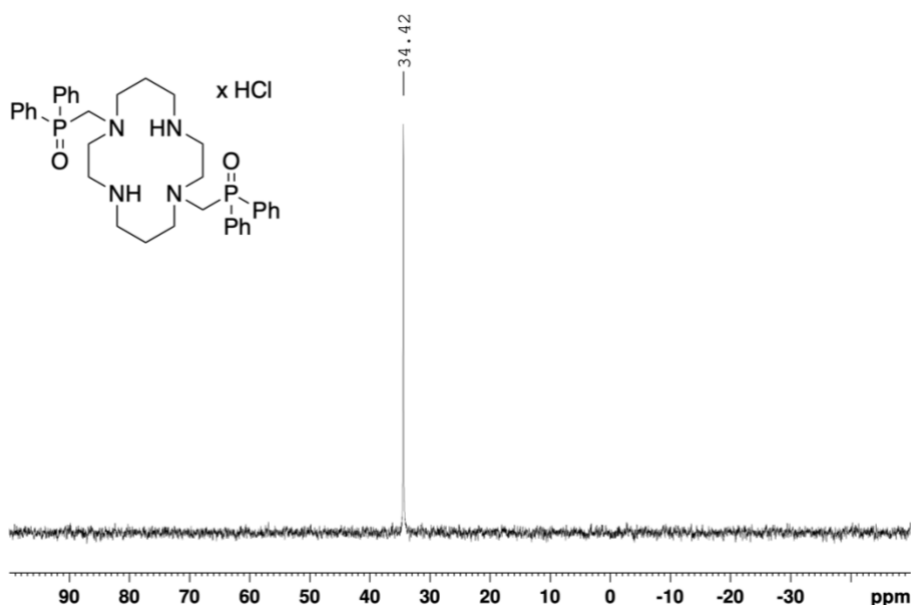


Figure 135 : Spectre RMN ^{31}P du $\text{TE2PoPh}_2 \cdot x\text{HCl}$ (MeOD, 162 MHz, 298 K)

La synthèse des ligands TE1PoPh_2 et TE2PoPh_2 a donc été mise en œuvre en deux étapes à partir des **cyclam** tri- et di-protégés avec des rendements globaux de 78 et 35% respectivement. L'étape clé consiste en l'introduction du groupement oxyde de diphenylphosphine par réaction de Kabachnik-Fields, obtenue avec un excellent rendement pour le composé **12** (95%) et un rendement modéré pour le composé **15** (58%). Ces deux ligands isolés et caractérisés, leurs propriétés de coordination ont alors pu être étudiées.

II. Chimie de coordination des ligands TEXPoPh₂

1. Synthèse et caractérisation des complexes de cuivre (II)

1.1. Synthèses des complexes [Cu(TE1PoPh₂)]²⁺ et [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺

La synthèse des complexes de cuivre (II) a été réalisée par réaction des ligands avec le perchlorate de cuivre Cu(ClO₄)₂·6H₂O. Le ligand **TE1PoPh₂** étant soluble en milieu aqueux sous sa forme chlorhydrate, la réaction de complexation a pu être menée, en ajustant le pH (pH = 6) avec une solution de KOH. Pour rappel, il est important de ne pas se placer en milieu plus basique au risque de former des hydroxydes de cuivre.^[47] Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit afin de s'assurer d'une réaction de complexation totale. Une purification sur colonne chromatographique en phase inverse (C18, H₂O/MeOH) permet d'isoler le complexe [Cu(**TE1PoPh₂**)]²⁺ sous la forme d'une poudre violette avec un rendement de 82% [Figure 136, haut].

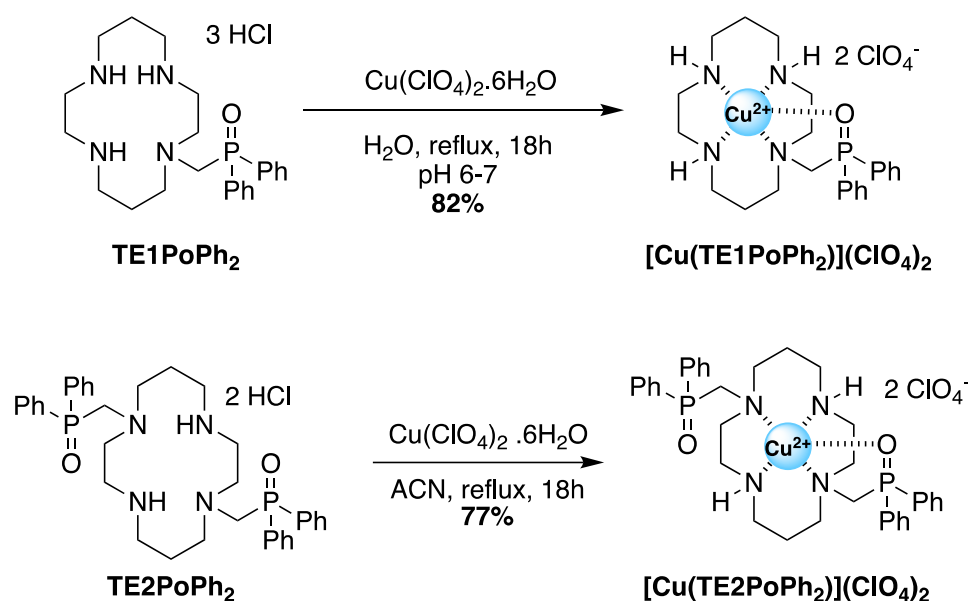


Figure 136 : Réactions de complexation conduisant aux complexes [Cu(TE1PoPh₂)]²⁺ (haut) et [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺ (bas)

Le ligand **TE2PoPh₂**, même sous sa forme chlorhydrate, n'est que faiblement soluble en milieu aqueux. Le composé a alors été extrait en milieu organique puis la réaction de complexation a été effectuée dans l'acétonitrile. Comme pour le complexe précédent, afin d'assurer une complexation quantitative, la solution est chauffée au reflux du solvant pendant une nuit. À la fin de la réaction, un précipité blanc est observé, et une simple filtration à l'aide d'une canule permet d'isoler le filtrat. Après évaporation du solvant, le complexe [Cu(**TE2PoPh₂**)]²⁺ est isolé sous la forme d'une poudre bleue avec un rendement de 77%. La caractérisation complète

des complexes a été réalisée par HRMS, RPE et diffraction des rayons X. Les structures cristallines sont présentées dans la partie suivante.

1.2. Étude à l'état solide des complexes $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$

L'évaporation lente d'une solution dans le méthanol a permis d'obtenir des monocristaux de bonne qualité du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. Les cristaux du complexe $[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$ ont quant à eux été obtenus par évaporation lente d'une solution dans l'éthanol [Figure 137].

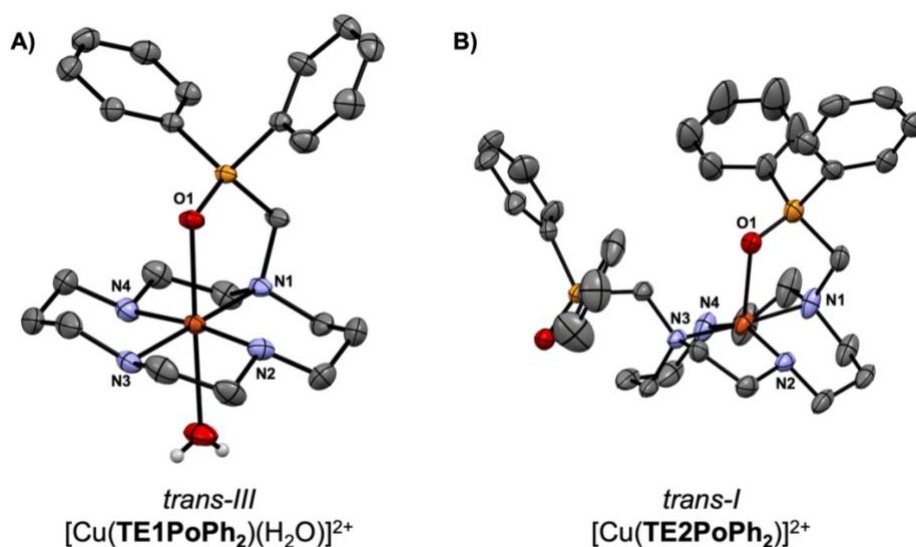


Figure 137 : Structures cristallographiques des complexes $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$ obtenues par DRX. Les ellipsoïdes sont tracés avec 50% de probabilité. Les contre-ions ClO_4^- et les atomes d'hydrogène sont omis pour plus de clarté, excepté pour la molécule d'eau

La structure obtenue pour $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ révèle une géométrie octaédrique déformée autour du cuivre (II), les quatre atomes d'azote du macrocycle occupant le plan équatorial, et les atomes d'oxygène du fragment phosphoryle ainsi qu'une molécule d'eau étant en positions apicales. Parmi ses six conformations possibles, le macrocycle adopte ici la géométrie *trans-III*, qui est la plus stable avec de tels cations divalents et qui a été précédemment rencontrée avec les ligands pentadentates $\text{H}_2\text{TE1P}$ et HTE1PA discutés dans le chapitre bibliographique.^[22,72]

Les longueurs de liaison et la valeur des angles d'intérêts sont regroupées dans le **Tableau 27**. La disposition des quatre atomes d'azote autour du métal est proche de la géométrie idéale, avec la liaison Cu-N1 de l'amine tertiaire à peine plus longue que les trois autres (2,081 Å contre 2,006-2,027 Å pour N2-N4), et une déviation de seulement 0,07 Å entre le cuivre (II) et le centre de gravité calculé pour les quatre atomes d'azote (N1-N2-N3-N4).

Les angles de liaison N1-Cu-N2 et N3-Cu-N4 pour les métallacycle à 6 chaînons présentent des angles supérieurs à 90° (95,6 et 91,7° respectivement). Comme attendu, ces angles sont plus grand que ceux formés par N2-Cu-N3 et N1-Cu-N4 correspondant aux métallacycles à 5 chaînons qui ont des valeurs de 86,2°.

La distance Cu-O1 (2,364 Å) se situe dans la gamme de celles des complexes [Cu(TE1P)Br] et [Cu(TE2P)] où le cuivre (II) est de géométrie octaédrique coordiné en position apicale par des fragments anioniques de phosphonate.^[72,206] Cette similitude avec les phosphonates peut être expliquée par la situation particulière de la liaison phosphore-oxygène dans les oxydes de phosphine, qui est loin du formalisme habituel de la double liaison neutre P=O, mais possède une composante de liaison σ hautement polarisée et une densité électronique élevée sur l'atome d'oxygène.^[207,208]

Cependant, la caractéristique inhabituelle observée dans cette structure est l'angle très étroit P-O1-Cu (109,3°), imposé par la contrainte de la structure chélatante. Cette valeur contraste fortement avec l'orientation linéaire habituelle des fragments d'oxyde de phosphine dans les composés de coordination (angle P-O-M tendant vers 180°) qui permet de minimiser la répulsion électrostatique entre le cation et l'atome de phosphore tous deux électropositifs.^[193]

Tableau 27 : Longueurs des liaisons (Å) et tailles des angles (°) d'intérêt pour les complexes [Cu(TE1PoPh₂)(H₂O)]²⁺ et [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺

		[Cu(TE1PoPh ₂)(H ₂ O)] ²⁺	[Cu(TE2PoPh ₂)] ²⁺
Longueurs des liaisons (Å)	Cu-N1	2,081(4)	2,053(5)
	Cu-N2	2,006(9)	2,002(5)
	Cu-N3	2,027(7)	2,055(5)
	Cu-N4	2,023(7)	2,006(6)
	Cu-O1	2,364(4)	2,263(4)
	Cu-O (H ₂ O)	2,523(0)	-
Angles de liaisons (°)	N1-Cu-N2	95,6(3)	94,1(2)
	N2-Cu-N3	86,2(5)	86,9(2)
	N3-Cu-N4	91,7(1)	94,0(2)
	N4-Cu-N1	86,2(6)	86,8(2)
	P-O1-Cu	109,3(0)	111,0(2)

La structure cristallographique de [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺ révèle que le cuivre (II) est également pentacoordiné malgré la présence d'un groupement de coordination oxyde de phosphine supplémentaire mais que le complexe adopte ici une géométrie de type pyramide à base

carrée. Cette observation a déjà été réalisée avec le ligand hexadentate H₄TE2P et peut être expliquée par la différenciation de la classe des quatre atomes d'azote (deux amines secondaires et deux amines tertiaires).^[206] Ceci induit une contrainte stérique et des propriétés « donneur-accepteur » différentes conduisant à des longueurs de liaison azote-cuivre différentes (2,053 et 2,055 Å pour les amines tertiaires contre 2,002 et 2,006 Å pour les amines secondaires). Il en résulte une conformation *trans-I* du **cyclam**, avec les deux cycles chélates à 6 chaînons pointant dans la même direction, et l'ion cuivre (II) nettement au-dessus du plan basal formé par les quatre atomes d'azote (distance de 0,23 Å entre l'ion Cu²⁺ et le centre de gravité calculé pour les atomes N1-N2-N3-N4). La liaison Cu-O1 se voit ainsi raccourcie (2,263 Å contre 2,364 Å dans le [Cu(TE1PoPh₂)(H₂O)]²⁺, avec l'angle P-O1-Cu maintenu à une valeur similaire (111,0° contre 109,3°).

L'analyse aux rayons X des structures des complexes révèle dans les deux cas que le cuivre est pentacoordiné, l'unité macrocyclique adoptant une conformation *trans-III* dans le complexe [Cu(TE1PoPh₂)(H₂O)]²⁺, et la conformation *trans-I* avec le complexe [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺. Ces deux complexes ont également été étudiés en solution par spectroscopie RPE.

1.3. Caractérisation par analyses RPE

Pour mieux comprendre le comportement en solution des complexes paramagnétiques [Cu(TE1PoPh₂)(H₂O)]²⁺ et [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺, des mesures de RPE ont été enregistrées en solution gelée à 150 K dans un mélange H₂O/DMF (1 : 1) à une concentration de 1,0 mM [Figure 138].

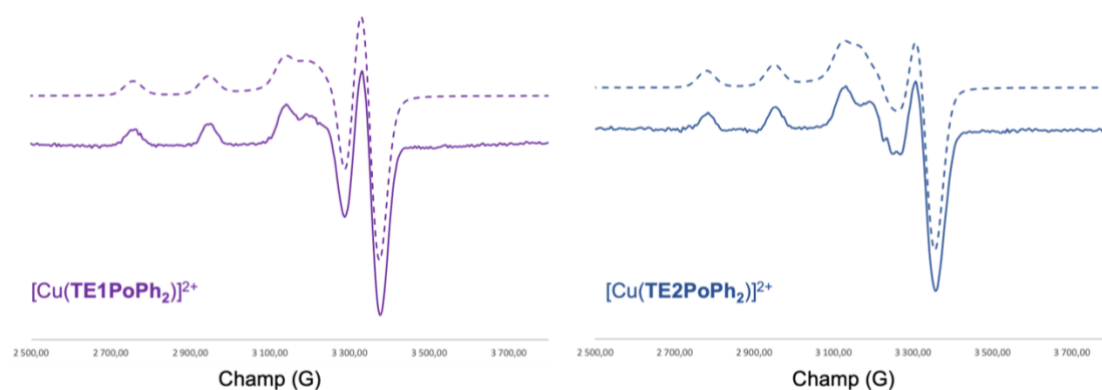


Figure 138 : Spectres RPE en bande-X ($\nu = 9,31$ GHz) simulés (lignes pointillées) et expérimentaux (lignes pleines) des complexes [Cu(TE1PoPh₂)]²⁺ et [Cu(TE2PoPh₂)]²⁺ à 1,0 mM dans une solution H₂O/DMF (1/1) gelée à 150 K

Les paramètres géométriques des systèmes étudiés ont pu être obtenus après la simulation des spectres à l'aide des logiciels Easyspin et Simultispin.^[209,210] Les deux complexes présentent des valeurs de paramètre g ($g_x \approx g_y < g_z$) correspondant à un état fondamental dx_2-dy_2 , ce qui corrèle avec la symétrie axiale des géométries octaédrique déformée et pyramide à base carrée observées dans les structures à l'état solide de $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$ respectivement [Tableau 28].

Tableau 28 : Paramètres RPE, g_i et A_i (10^{-4} cm^{-1}) des complexes $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ et $[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$

Complexes	g_x	g_y	g_z	A_x	A_y	A_z
$[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	2,045	2,038	2,195	1,23	39,14	194,08
$[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$	2,062	2,047	2,203	1,70	52,74	174,67

1.4. Études potentiométriques et cinétiques du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$

En raison de la faible solubilité du ligand **TE2PoPh₂** en milieu aqueux, toutes les expériences potentiométriques ont été réalisées uniquement avec le ligand **TE1PoPh₂**.

Tout d'abord, la détermination des constantes de protonation a été menée à 25 °C, dans une solution aqueuse de KNO_3 (0,1 M). Le ligand possède quatre positions protonables, correspondant à chaque atome d'azote du cyclam ; parmi ces quatre valeurs, uniquement les trois premières ont pu être déterminées avec précision, la quatrième se situant hors de la gamme de pH autorisée pour la mesure ($1,5 < \text{pH} < 11,5$). Comme nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, pour les ligands à base de **cyclam**, les deux premières constantes de protonation correspondent généralement à deux amines fortement basiques positionnées sur les atomes d'azote N1 et N8, avec des valeurs de pK_{a1} et pK_{a2} supérieures à 9. La troisième protonation est plus difficile en raison de la répulsion électrostatique générée par la présence d'un troisième groupement ammonium dans la cavité. Le ligand **TE1PoPh₂** suit cette tendance, bien que ses deux premières constantes ($\text{pK}_{a1} = 10,68$ et $\text{pK}_{a2} = 8,98$) soient sensiblement inférieures à celles des analogues monosubstitués du **cyclam** [Tableau 29]. Cette basicité globalement plus faible du **TE1PoPh₂** est mise en évidence par la somme de ces deux premières constantes ($\log \beta_2 = 19,66$), qui est inférieure de plus de deux unités logarithmiques à celles des ligands $\text{H}_2\text{TE1P}$ et HTE1PA par exemple ($\log \beta_2 = 24,25$ et $21,66$ respectivement). Cette différence peut être rationalisée par le fait que les bras coordinants ioniques aux propriétés acido-basiques, tels que les acétates ou phosphonates, jouent le rôle de contre anion intramoléculaire (zwitterion), rendant ces deux premières protonations plus favorables (et donc les positions plus basiques) qu'avec des bras coordinants neutres, qui nécessitent la formation d'une paire d'ion en solution. ^[22,72] Ceci peut également être observé

par exemple dans le cas du ligand **TE1EtOH** ($\log \beta_2 = 20,68$) qui correspond au cyclam mono-*N*-fonctionnalisé par un groupement hydroxyéthylène neutre.^[211]

Tableau 29 : Constantes de protonation ($\log K_n$) du ligand **TE1PoPh₂** comparées à celles du **TE1EtOH**, **H₂TE1P**, **HTE1PA** et **cyclam**^[46,211,212]

Réaction d'équilibre ^a	TE1PoPh ₂ ^b	TE1EtOH ^c	H ₂ TE1P	HTE1PA	cyclam ^d
$L + H \rightleftharpoons LH$	10,68(6)	10,93(9)	12,49	11,55	11,6
$LH + H \rightleftharpoons LH_2$	8,98(8)	9,75(4)	11,76	10,11	10,6
$\log \beta_2$ (= $\log K_{a1} + \log K_{a2}$)	19,66	20,68	24,25	21,66	22,2
$LH_2 + H \rightleftharpoons LH_3$	1,63(8)	1,66(2)	(6,05)	(2,71)	1,61
$LH_3 + H \rightleftharpoons LH_4$	< 1,5	2,6(2)	(2,42)	1,7	2,41
$LH_4 + H \rightleftharpoons LH_5$	-	-	< 1,5	-	-

^a Les charges sont omises pour plus de clarté. ^b $I = 0,1 \text{ M KNO}_3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, ^c $I = 0,1 \text{ M NEt}_4\text{ClO}_4$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. ^d $I = 0,5 \text{ M KNO}_3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Le diagramme de répartition des espèces en fonction du pH a été tracé pour le ligand **TE1PoPh₂** à partir des constantes mesurées par potentiométrie [**Figure 139**]. L'espèce **LH₂** est majoritaire entre pH 4 et 7.

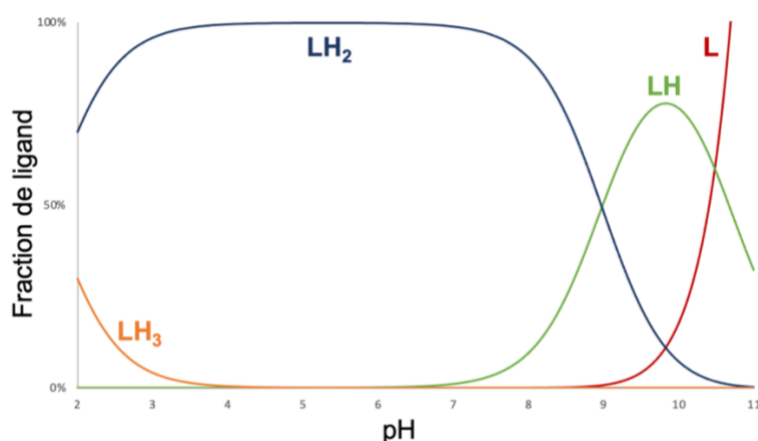


Figure 139 : Diagramme de spéciation des espèces en fonction du pH pour le ligand **TE1PoPh₂**. Les courbes sont tracées à partir des valeurs obtenues par potentiométrie à une concentration $C_L = 1,61 \text{ mM}$

La basicité globale de ces ligands étant étroitement liée à leur capacité de coordination vis-à-vis des cations métalliques, des titrages potentiométriques en présence de cations Cu^{2+} ont été réalisés. Malheureusement, lors de l'étude à 25 °C en solution aqueuse (KNO_3 (0,1 M)) avec une concentration de **TE1PoPh₂** de 1,61 mM, la précipitation d'espèces hydroxo (du cuivre ou du complexe avec **TE1PoPh₂**) s'est produite dès pH 7,5, empêchant la collecte de données précises sur toute la gamme de pH. Néanmoins, la constante d'association a pu être estimée en utilisant les données obtenues sur la gamme de pH allant de 1,5 à 7,5, donnant une valeur de $\log K_{\text{CuL}}$ de 17,8. Pour confirmer cette valeur, un titrage UV-Vis à pH fixe (3,0) a été effectué, avec 10 points de mesure (méthode des « batchs »), correspondant à des concentrations croissantes en ions cuivre (II) (de 0,2 à 2,0 équivalents) et a permis de confirmer l'ordre de grandeur de la valeur estimée de $\log K_{\text{CuL}}$ avec une constante de 18,5.

Tableau 30 : Constantes de stabilité ($\log K_{\text{ML}}$) du ligand **TE1PoPh₂** avec le cuivre (II) et le zinc (II) comparées à celles du **TE1EtOH**, **H₂TE1P**, **HTE1PA** et **cyclam**

Constante	TE1PoPh₂ ^a	TE1EtOH ^{b[211]}	H₂TE1P ^{a[72]}	HTE1PA ^{a[22]}	cyclam ^{c[9]}
$\log K_{\text{CuL}}$	17,8 ^d 18,5 ^e	16,6	27,3	25,5	27,2
$\log K_{\text{ZnL}}$	-	10,3	21,0	18,9	15,0

^a I = 0,1 M KNO_3 , T = 25 °C. ^b I = 0,1 M NEt_4ClO_4 , T = 25 °C. ^c I = 0,2 M NaClO_4 , T = 25 °C. ^d déterminée par potentiométrie. ^e déterminée par titrage UV-Vis (pH = 3)

À l'image de la basicité plus faible du ligand **TE1PoPh₂**, la constante d'affinité du ligand envers le cuivre (II) est beaucoup plus faible que celle du **cyclam** parent et des analogues monosubstitués ($\log K_{\text{CuL}} > 25$ pour le **cyclam**, le **H₂TE1P** et le **HTE1PA**), mais dans la gamme du **TE1EtOH** ($\log K_{\text{CuL}} = 16,6$) [Tableau 30]. Dans les mêmes conditions, et à l'inverse des autres ligands mentionnés, aucune coordination n'est cependant observée avec le zinc (II).

La cinétique de dissociation du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ a été déterminée par spectroscopie UV-visible dans de l'acide chlorhydrique (1 M) à 25°C en suivant la diminution d'absorbance de la bande d'absorption correspondant à la transition d-d du cuivre (II) au cours du temps. À la fin de l'expérience, cette absorbance atteint un plateau ou tend vers 0.

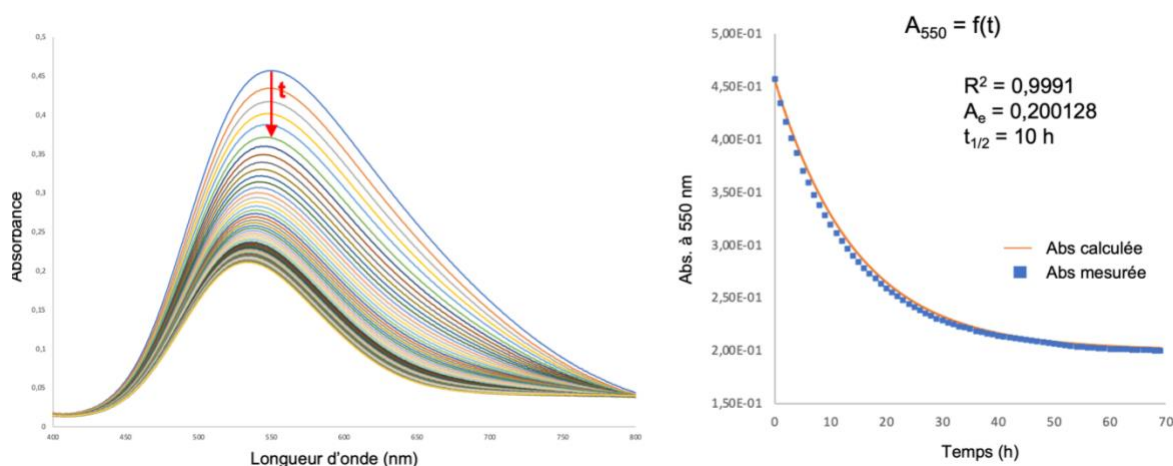


Figure 140 : Spectres UV-Visible du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ à 4 mM à 25 °C, avec 1h d'intervalle (gauche) La courbe exponentielle correspond à la superposition expérimentale/modélisation de la fonction $A = f(t)$. Le paramètre R^2 correspond au paramètre d'ajustement et A_e à l'asymptote de la fonction modélisée (droite)

Les courbes obtenues mettent bien en avant la dissociation progressive du complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ avec la diminution de l'absorbance à 550 nm au fil des heures [Figure 140, gauche]. Après 72h, la dissociation semble avoir atteint un plateau, signifiant qu'une dissociation totale n'est pas observée mais qu'un équilibre est atteint. La décroissance de l'absorbance à 550 nm en fonction du temps a été modélisée par une fonction exponentielle décroissante, nous permettant ainsi de remonter au temps de demi-vie et à la constante de dissociation du complexe (d'après la relation $A_t = A_0 e^{-K_d t}$ présentée dans le chapitre 1, II.3.2) [Figure 140, droite]. Ainsi, le complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ avec un temps de demi-vie de 10,0 h en milieu acide chlorhydrique 1 M à 25°C, présente une meilleure inertie que le complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PA})]^+$ qui dans les mêmes conditions possède un temps de demi-vie de 32 minutes, indiquant que notre nouveau complexe est suffisamment inerte pour être mis à profit dans de nombreuses applications.^[22]

2. Étude de la spécificité du ligand TE1PoPh₂ envers le cuivre (II)

La complexation d'autres cations d'intérêt pour des applications biologiques a été investiguée. Pour cela, nous avons réalisé des réactions de complexation avec le gallium (III), le manganèse (II) et le scandium (III). Malgré différents essais de conditions opératoires, que ce soit en variant la température ou en se plaçant en milieu organique, aucune formation d'un de ces complexes n'a été observée. Nous nous sommes donc intéressés à la sélectivité de notre ligand envers le cuivre (II), comparé à des cations divalents. Pour cela, nous avons utilisé la spectroscopie UV-visible pour effectuer des études en milieu compétiteurs.

Les cations divalents étudiés dans cette étude sont le cobalt (II), le nickel (II) et le zinc (II) qui ont été mis en compétition avec le cuivre (II). Dans un premier temps, la complexation de

chaque cation par le ligand **TE1PoPh₂** a été étudiée. Pour ce faire, les réactions ont été conduites en mélange équimolaire et en milieu tampon pour s'affranchir des variations de pH.

D'un point de vue pratique, tous les échantillons ont été préparés avec une concentration en ligand de 2 mM dans un tampon acétate (pH = 3,8), et pour éviter l'effet des différentes cinétiques de complexation éventuelles, tous les échantillons ont été incubés pendant 72h à 25 °C. Enfin, l'acquisition des données a été réalisée entre 800 et 200 nm à 25 °C.

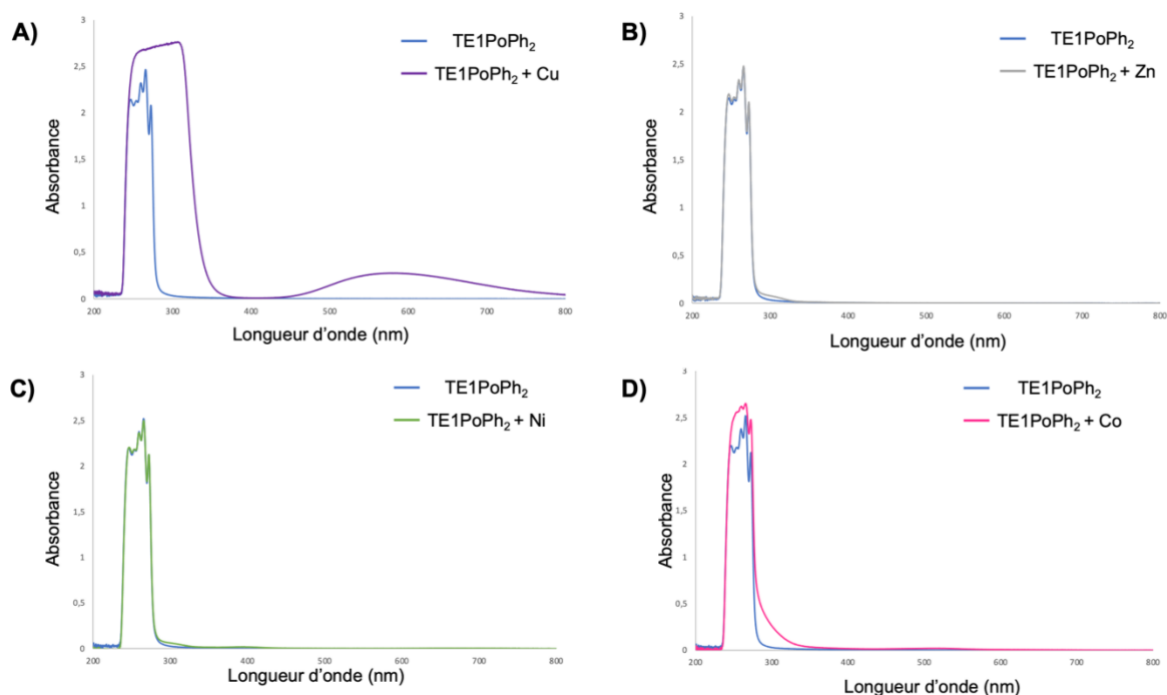


Figure 141 : Spectres UV-visible de l'étude de complexation du **TE1PoPh₂** avec le cuivre (II), le zinc (II), le nickel (II) et le cobalt (II) à 25°C avec une concentration de ligand et de métaux de 2 mM dans du tampon acétate (pH = 3,8), (A) Spectre du ligand seul superposé avec le ligand en présence de cuivre (II). (B) Spectre du ligand seul superposé avec le ligand en présence de zinc (II). (C) Spectre du ligand seul superposé avec le ligand en présence de nickel (II). (D) Spectre du ligand seul superposé avec le ligand en présence de cobalt (II).

Les spectres obtenus pour les mélanges équimolaires individuels de **TE1PoPh₂** avec chacun des quatre cations révèlent bien que le complexe de cuivre (II) est formé, grâce à la bande caractéristique à 579 nm, correspondant à la transition d-d de l'ion Cu²⁺. La réaction de complexation avec les trois autres cations ne montre en revanche pas de différence notable des spectres obtenus comparés à celui du ligand seul [Figure 141]. Seuls des faibles épaulements ou bandes larges sont observées vers 300 nm (pour les 3 cations), à 400 nm pour le nickel (II) et 500 nm pour le cobalt (II). Cependant, celles-ci ont pu être attribuées à l'interaction des cations avec le tampon acétate, comme le montrent les spectres obtenus lors des expériences réalisées avec les cations seuls en solution dans le tampon [Figure 142].

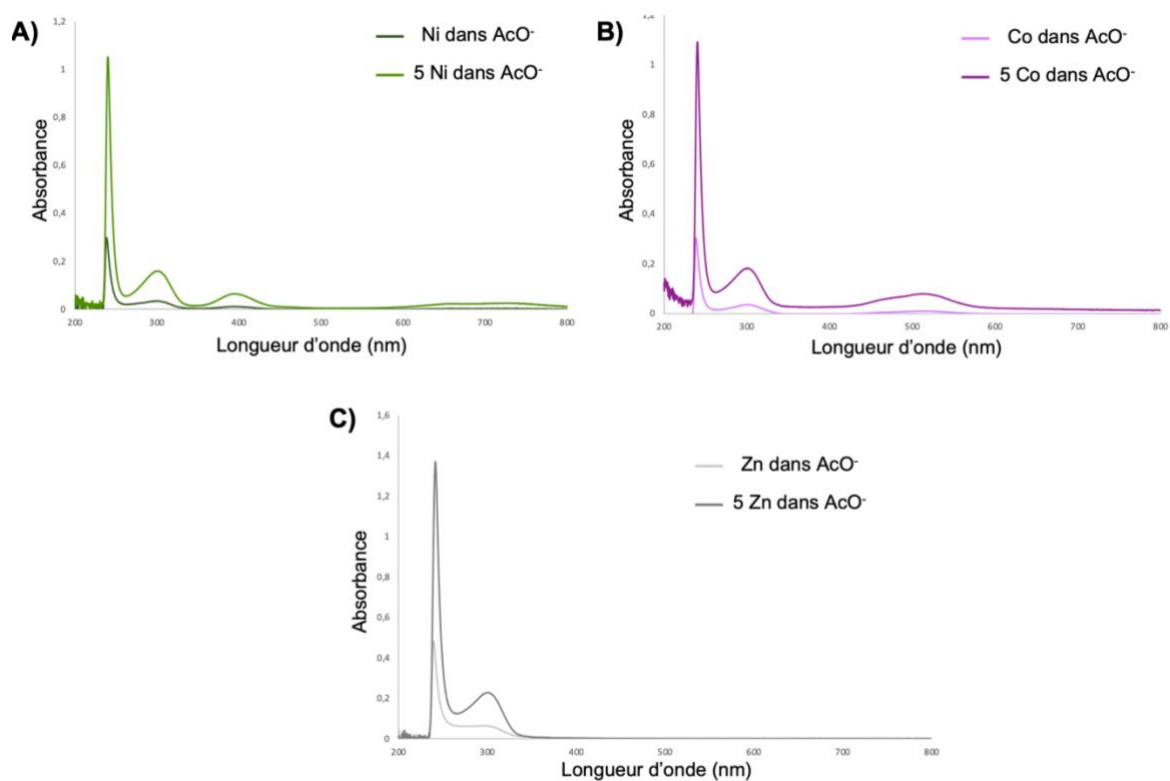


Figure 142 : Spectres UV-visible de nickel (II), de cobalt (II) et de zinc (II) à 25°C avec une concentration de métaux de 2 mM et 10 mM dans du tampon acétate (pH = 3,8), (A) Spectres du nickel (II), (B) Spectre du cobalt (II), (C) Spectre du zinc (II).

Pour confirmer la spécificité du ligand pour le cuivre (II), des expériences de compétition ont été réalisées. Tout d'abord, le **TE1PoPh₂** a été incubé avec une quantité équimolaire de cuivre (II) et de chacun des cations compétiteurs dans des expériences séparées, puis dans un second temps avec un excès de cation compétiteur (5 équiv.). Sans ambiguïté, dans chaque expérience, le spectre obtenu se superpose parfaitement à celui enregistré pour le cuivre (II) seul. Les spectres sont présentés ici après correction avec soustraction de l'absorbance des cations libres en milieu tampon [Figure 143].

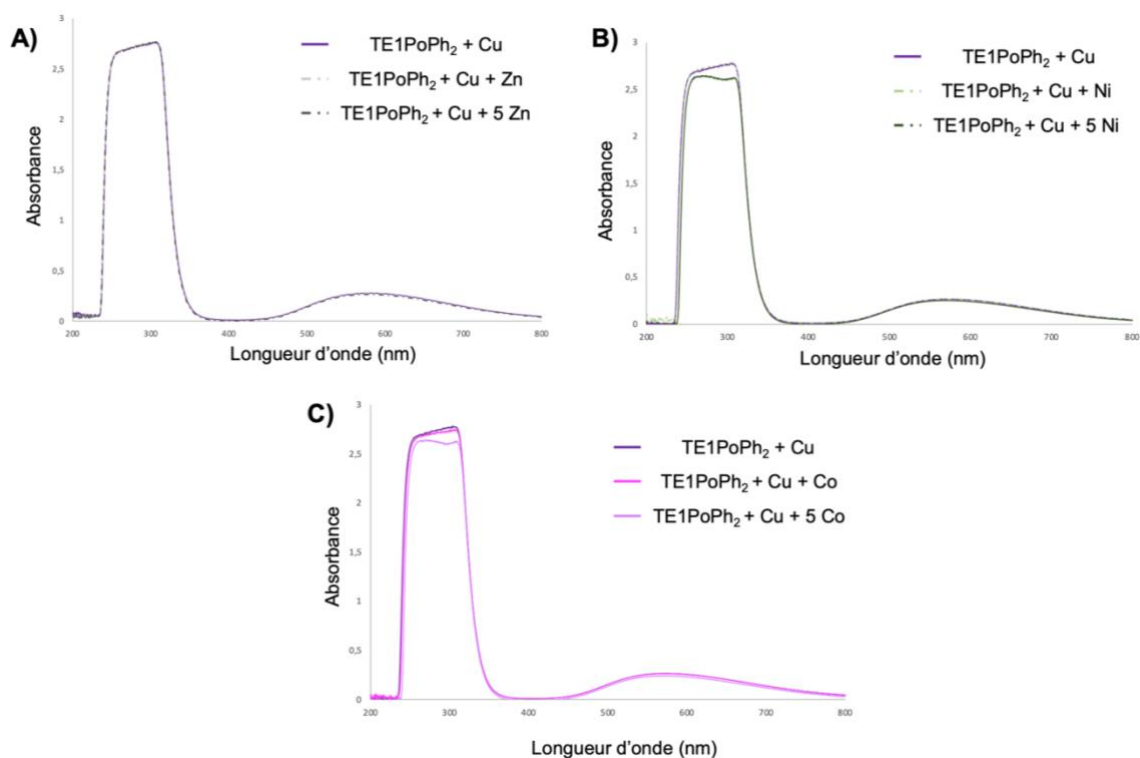


Figure 143 : Spectres UV-visible de l'étude de complexation du **TE1PoPh₂** en milieu compétiteur individuel à 25 °C dans du tampon acétate (pH = 3,8) [**TE1PoPh₂**] = [**Cu²⁺**] = 2 mM, les cations zinc (II), nickel (II) et cobalt (II) ont été introduits en quantité stœchiométrique puis en excès (5 équiv. [**M²⁺**] = 10 mM) (A) Étude avec le zinc (II). (B) Étude avec le nickel (II). (C) Étude avec le cobalt (II).

La spécificité du **TE1PoPh₂** pour le cuivre a finalement été confirmée par une expérience de compétition mixte où le ligand a été incubé avec des quantités équimolaires de chaque cation dans le même échantillon. Une fois encore, seule la signature du complexe de cuivre (II) est observée, comme le montre le chevauchement parfait du spectre de l'échantillon avec celui du complexe [**Cu(TE1PoPh₂)**]²⁺ généré *in situ* [Figure 144].

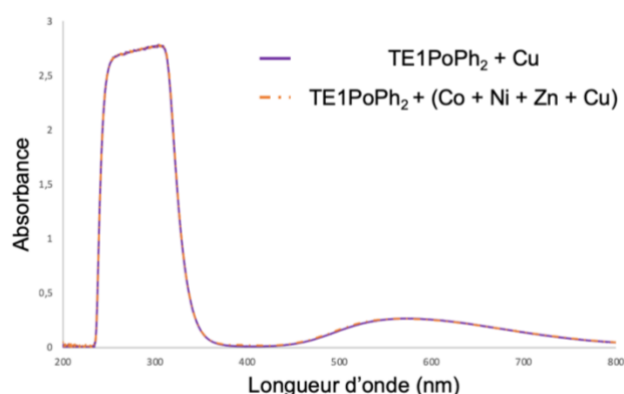


Figure 144 : Spectres UV-visible de l'étude de complexation du cuivre (II) en compétition avec le cobalt (II), le nickel (II) et le zinc (II) à 25 °C, avec une concentration de ligand de 2 mM dans du tampon acétate (pH = 3,8). Superposition des spectres du ligand **TE1PoPh₂** avec 1 équiv. de Cu (II) et de ligand en présence d'un mélange équimolaire de cations (cobalt (II), nickel (II) et zinc (II))

III. Étude de radiomarquage avec le cuivre-64

Au sein du cyclotron ARRONAX de Saint Herblain, le cuivre-64 est obtenu après le bombardement d'une cible de nickel-64 par des deutons (noyaux du deutérium, contenant un proton et un neutron). À l'issue de la production et après purification, des cations contaminants sont tout de même présents dans les solutions utilisées pour le radiomarquage au cuivre-64, comme le zinc (II) et le nickel (II) qui sont produits lors de la désintégration du cuivre-64. De plus, lors de l'irradiation de la cible, du cobalt (II) est également généré. Enfin, le fer (III) est un métal présent dans l'environnement du cyclotron.^[213] Compte-tenu de la spécificité du ligand **TE1PoPh₂** pour le cuivre (II), la réaction de radiomarquage devrait conduire à la formation unique du complexe de cuivre-64, malgré la présence de ces divers cations compétiteurs.

L'efficacité de radiomarquage (ou rendement de radiomarquage) peut être déterminée par analyse HPLC comme nous l'avons réalisé dans le chapitre 2 de ce manuscrit. Il est également possible d'effectuer des radio-CCM, sur lesquelles les différentes tâches d'éluion peuvent être intégrées par comptage radioactif afin de déterminer les ratios correspondants. Pour ce faire, le milieu réactionnel à étudier est déposé sur des plaques de silice de type : iTLC-SG (Agilent technologies) puis l'éluion est réalisée avec le système chlorure d'ammonium (20%)/méthanol (1 : 1). Après migration, les CCM sont exposées sur des plaques au phosphore photostimulables pendant 5 minutes puis elles sont révélées par un imageur radiométrique Cyclone Plus (Perkin Elmer). Le traitement des données par le logiciel d'analyse Optiquant permet d'obtenir les radio-CCM et de mesurer l'activité radioactive présente à chaque tâche.

L'étude de radiomarquage avec le composé **TE1PoPh₂** [Figure 145] a dans un premier temps été conduite à 42°C pendant 30 minutes, mais dans ces conditions le radiomarquage n'est pas total comme en atteste l'analyse par radio-CCM (15 % de cuivre-64 libre au Rf = 0) [Figure 146, gauche].

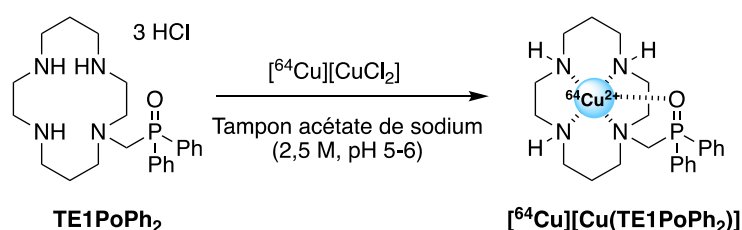


Figure 145 : Réaction de radiomarquage du ligand **TE1PoPh₂** avec le cuivre-64 en milieu tamponné

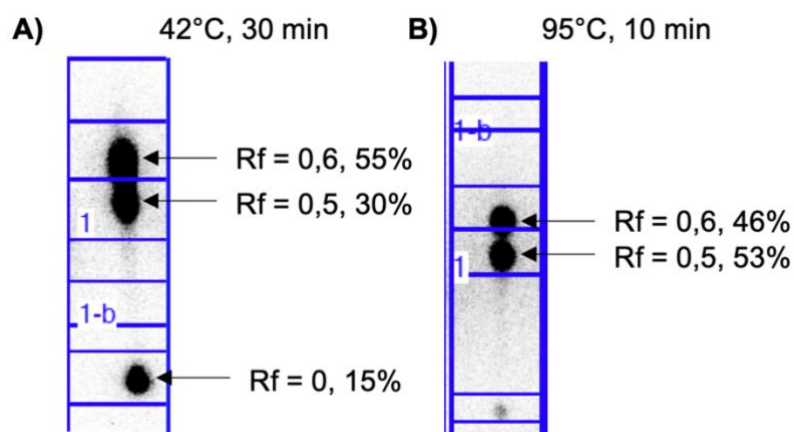


Figure 146 : Radiochromatogrammes CCM des solutions de marquage du **TE1PoPh₂** avec le cuivre-64 **A)** à 42 °C pendant 30 min. **B)** à 95 °C pendant 10 min.

En se plaçant à 95°C pendant 10 minutes, le radiomarquage est alors quantitatif (cuivre-64 libre < 1 %). En revanche, dans les deux cas, deux tâches sont observées (R_f = 0,5 et 0,6) dans la zone du complexe de cuivre potentiel ($[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$). Ceci peut être lié à la présence de deux conformations différentes du complexe, une pouvant être attribuée au complexe thermodynamique et la seconde au complexe cinétique dans lesquels l'unité cyclam adopterait deux conformations différentes (*trans*-III et *trans*-I par exemple) [Figure 146, droite]. Des études en solution sont en cours pour confirmer cette hypothèse à l'aide de la spectroscopie visible ainsi que la RPE.

Des études de compétition ont été effectuées en présence d'un excès d'un second cation pour évaluer la résistance du radiocomplexe face au phénomène de transmétallation. Pour cela, la solution de radiomarquage réalisée à 95°C a été divisée en 5 échantillons, puis 1000 équivalents d'un cation compétiteur ont été ajoutés par échantillon puis agités 10 min à 95°C. Les cations retenus pour cette étude de compétition sont ceux dont la présence est connue en tant qu'impuretés dans la solution de cuivre-64 à sa livraison, à savoir, le cobalt (II), le fer (III), le nickel (II) et le zinc (II). Si le phénomène de transmétallation a lieu, du cuivre-64 libre doit être visible sur les radio-CCM avec un R_f de 0. Pour tous les cations étudiés, l'activité mesurée au R_f = 0 est inférieure à 7%, signifiant que le cuivre n'a pas été relargué de la cavité macrocyclique, même dans ces conditions de température drastiques. En revanche, lors d'ajout de 1000 équivalents de cuivre (II) non radioactif, un échange de cations est observé, ce qui est démontré par la présence de cuivre-64 libre à un R_f de 0 concentrant 55% de l'activité mesurée. Cet échange de cation s'apparente à un échange isotopique entre le cuivre-64 et le cuivre naturel, qui possède les mêmes propriétés de coordination et donnent donc lieu à un équilibre avec le ligand en solution. Cette expérience utilisant un excès de cuivre (II) confirme donc de nouveau la spécificité du ligand pour ce cation.

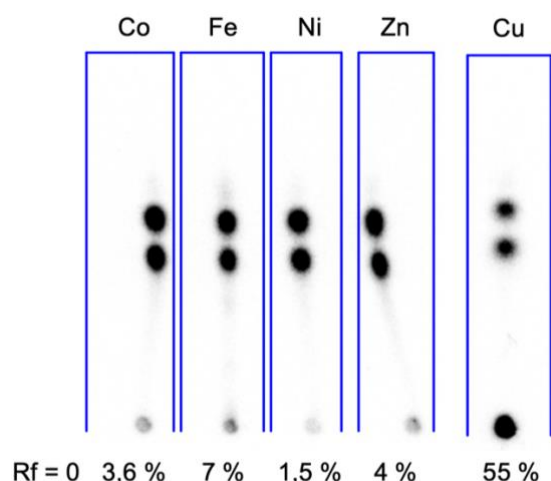


Figure 147 : Radiochromatogrammes-CCM de l'étude en milieu compétitif en présence d'un excès de cations cobalt (II), fer (III), nickel (II), zinc (II) et cuivre (II) après 10 min à 95 °C

L'influence de la cinétique sur le phénomène de transmétallation a également été contrôlée en réalisant des radios-CCM après 24h de compétition. L'activité mesurée pour le Rf = 0 reste toujours inférieure à 10%, ce qui signifie qu'aucune transmétallation n'est observée même après 24h.

Enfin, la résistance du complexe au phénomène de transchélation a été évaluée en ajoutant un excès d'EDTA à la solution de $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ réalisée à 95°C pendant 10 min. Si le complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ subit une transchélation, la signature du complexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ sera visible avec un Rf supérieur à celui du complexe comme le montre la radio-CCM témoin. Dans notre cas, aucun phénomène de transchélation n'a été observé, signe de la bonne stabilité du radiocomplexe $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ face à ce ligand compétiteur [Figure 148].

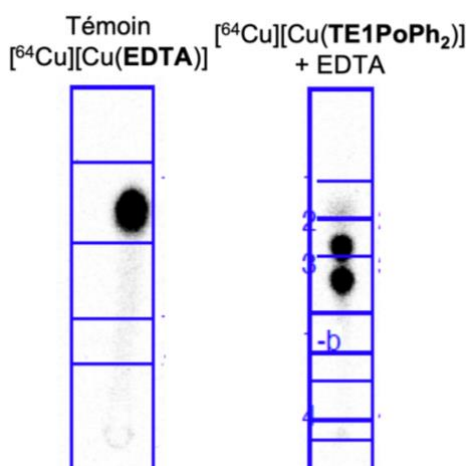


Figure 148 : Radiochromatogrammes-CCM de l'étude en milieu compétitif en présence d'un excès d'EDTA après 10 min à 95 °C

Conclusion

Dans le but de développer de nouveaux ligands présentant une très forte affinité pour le cuivre (II), l'objectif des travaux relatés dans ce chapitre a été de synthétiser et d'étudier de nouveaux dérivés de **cyclam** *N*-fonctionnalisés par un ou deux groupements oxyde de phosphine (**TE1PoPh₂** et **TE2PoPh₂** respectivement) afin d'étudier l'influence de cette fonction sur la coordination du cuivre (II). Ce choix de groupement coordinant s'est porté sur la fonction oxyde de phosphine car la littérature rapporte essentiellement des complexes de cuivre (II) ou de lanthanides avec cette fonction, laissant penser qu'elle ne présente pas une affinité prononcée envers les autres métaux de transitions.

La synthèse régiospécifique des deux ligands a été réalisée à partir des dérivés di- et tri-protégés **cyclam-triBoc** et **-diBoc**, précédemment décrits dans la littérature. L'introduction de la fonction oxyde de phosphine a été réalisée grâce à une réaction de type Kabachnik-Fields, suivie de l'hydrolyse acide des groupements Boc, permettant d'isoler les composés ciblés **TE1PoPh₂** et **TE2PoPh₂** avec des rendements globaux de 78 et 35% respectivement en deux étapes. Une fois ces deux composés obtenus, la coordination avec le cuivre (II) a pu être étudiée. Pour cela, les complexes de cuivre ont été synthétisés en milieu aqueux pour le complexe [Cu(**TE1PoPh₂**)]²⁺ et en milieu organique pour le complexe [Cu(**TE2PoPh₂**)]²⁺, compte tenu de la solubilité différente des deux ligands. Des monocristaux des deux complexes ont été obtenus et analysés par DRX, permettant de connaître la géométrie à l'état solide de chaque système. Le complexe [Cu(**TE1PoPh₂**)]²⁺ présente une géométrie octaédrique déformée caractéristique de la distorsion par effet Jahn-Teller,^[35] avec le cyclam présentant sa conformation la plus stable, *trans-III*. La structure obtenue pour le complexe [Cu(**TE2PoPh₂**)]²⁺ révèle qu'un seul groupement oxyde de phosphine participe à la coordination du cuivre (II) générant une géométrie de type pyramide à base carrée dans laquelle le cyclam se présente sous une conformation *trans-I*. Ces deux géométries ont également été observées en solution d'après les paramètres g obtenus ($g_x \approx g_y < g_z$) par analyse RPE.

Les études potentiométriques ont uniquement été réalisées avec le ligand **TE1PoPh₂** compte tenu de la faible solubilité du ligand **TE2PoPh₂** en milieu aqueux. La détermination des constantes de protonation révèle que le ligand **TE1PoPh₂** présente une basicité plus faible que le **cyclam** et son dérivé H₂**TE1P** ($\log \beta_2 = 19,66, 21,48$ et $24,2$ respectivement). Cette différence de basicité s'explique par la présence d'une amine tertiaire due à la mono-fonctionnalisation du macrocycle comparé au **cyclam** « libre » et probablement également par le fait que la fonction coordinante neutre introduite ne permet pas la formation

de zwitterion comme ses analogues précités. La constante de stabilité avec le cuivre (II) a été estimée par potentiométrie (précipitation au-delà de pH = 7,5) et confirmée par suivi UV-Visible (méthode des « batchs »). Ainsi une valeur de log K_{CuL} autour de 18 a pu être déterminée et les propriétés comparées à celles d'analogues de structures très proches. La valeur de log K_{CuL} est nettement plus faible que celle du **HTE1PA** mais du même ordre de grandeur que le composé **TE1EtOH** (25,5 et 16,6 respectivement). En revanche, l'inertie du complexe formé en milieu acide est meilleure que celle du **HTE1PA** avec un $t_{1/2}$ de 10 h dans HCl (1 M) à 25 °C contre 32 minutes.

La sélectivité du ligand **TE1PoPh₂** pour le cuivre (II) vis-à-vis des cations cobalt (II), nickel (II) et zinc (II) a été étudiée par spectroscopie UV-visible. Dans un premier temps, aucune complexation n'est observée avec ces autres cations. Nous nous sommes donc intéressés à la spécificité de complexation du ligand, en effectuant les études avec un mélange de cations. Encore une fois, que ce soit en quantité stœchiométrique ou en présence d'un excès de cations compétiteurs, seule la formation du complexe de cuivre est observée, mettant en exergue la spécificité du ligand pour le cuivre (II). Les études de radiomarquage au cuivre-64 ont également permis de démontrer la stabilité et l'inertie du complexe $[^{64}Cu][Cu(TE1PoPh_2)]^{2+}$ face aux phénomènes de transmétallation et de transchélation.

Pour conclure, nous avons synthétisé deux nouveaux ligands dérivés de cyclam porteurs de fonction oxyde de phosphine, et le composé **TE1PoPh₂** en particulier a démontré une spécificité exceptionnelle pour le cuivre (II). Ce type de spécificité, tout en préservant une stabilité thermodynamique et une inertie cinétique du complexe de cuivre (II) relativement bonne peut en faire un chélateur de choix pour certaines applications. Ses propriétés dans le domaine de la thérapie par chélation du cuivre (II) seront d'ailleurs étudiées dans un futur proche.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La dynamique de la région Bretagne Pays de Loire autour du cyclotron Arronax associée au soutien politique d'associations comme la Ligue contre le cancer du Finistère dans le développement de nouveaux moyens de diagnostic a encouragé ces travaux de thèse portant sur la synthèse de nouveaux radiopharmaceutiques synthétiques pour l'imagerie TEP au cuivre-64 ciblant le récepteur de chimiokine CXCR4.

La médecine nucléaire utilise des radioisotopes le diagnostic et le traitement de certaines pathologies, et des cancers en particulier. L'application en imagerie nécessite des émissions non ionisantes : rayonnements γ pour la TEMP, ou rayonnements β^+ pour la TEP. La thérapie nucléaire, quant à elle, requiert des émissions ionisantes de nature α , β^- ou encore électron Auger. Le cuivre possède la particularité de pouvoir être utilisé tant pour l'imagerie que pour le traitement en médecine nucléaire avec ses isotopes cuivre-64 et cuivre-67 (émetteurs β^+ et β^- respectivement).

Afin d'accéder à des applications cliniques performantes, le ciblage efficace des cellules par ces radioisotopes est nécessaire. C'est pourquoi ceux-ci sont généralement formulés sous la forme de radiopharmaceutiques, composés d'un site accueillant spécifiquement l'élément radioactif, et d'une entité de ciblage présentant une affinité particulière pour des marqueurs d'intérêt présents à la surface de ces cellules. Dans ce contexte, la surexpression du récepteur CXCR4 dans au moins 23 types de cancers ainsi que son implication dans l'entrée du virus VIH au sein de l'organisme font de ce récepteur cellulaire une cible d'intérêt.

L'étude bibliographique réalisée dans le premier chapitre de ce manuscrit a mis en exergue la place considérable occupée par les dérivés polyazacycloalcanes en médecine, d'une part en tant que chélateurs du cuivre dans des radiopharmaceutiques pour la médecine nucléaire, et d'autre part en tant qu'unité de ciblage du récepteur CXCR4 sous la forme de composés bis-cyclam (**AMD3100**). Les travaux rapportés dans ce manuscrit, centrés sur la chimie de synthèse et de coordination des polyazamacrocycles sont donc consacrés à : (i) la synthèse de nouveaux radiopharmaceutiques totalement organiques où le **cyclam** est utilisé pour ses qualités de chélateur ; (ii) l'élaboration d'un nouvel inhibiteur de CXCR4 de type bis-cyclam et (iii) le développement de nouveaux chélateurs pour accéder à de nouvelles propriétés vis-à-vis de la coordination du cuivre.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit décrit la synthèse des nouveaux radiopharmaceutiques synthétiques pour imager l'expression du récepteur CXCR4 par imagerie TEP au cuivre-64. Le caractère novateur des molécules ciblées est lié à l'utilisation, en tant qu'unité de ciblage de petites molécules organiques présentant d'excellentes propriétés de reconnaissance pour le récepteur. En effet, nous avons envisagé d'assembler l'inhibiteur bien connu **AMD070** avec

le chélateur bifonctionnel **p-SCN-Bn-TE1PA**. Ce ligand a été retenu pour notre étude pour ses remarquables propriétés de coordination du cuivre qui ont déjà permis des applications *in vivo* en imagerie TEP vectorisée. La synthèse de chaque brique existante a été conduite avec succès et a permis d'obtenir une quantité suffisante de composé pour mettre au point la réaction de couplage entre la fonction amine primaire de l'**AMD070** et la fonction isothiocyanate du macrocycle bifonctionnel. Bien que cette réaction soit largement utilisée et généralement conduite aisément, la formation du produit souhaité a demandé une adaptation des conditions de réaction. Nous sommes cependant parvenus à isoler le composé **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** avec un rendement faible, mais en quantité suffisante pour mener les premières études biologiques.

En revanche, cette première stratégie de greffage présente le risque de sacrifier la fonction amine primaire de l'**AMD070**, impliquée dans le mécanisme de reconnaissance avec le récepteur CXCR4. Afin d'étudier l'influence de cette modification sur l'activité inhibitrice des composés, nous avons retenus un analogue de l'**AMD070** (**AMD070-Bn-CO₂Me**), présentant une amine primaire libre avec la même longueur de chaîne que l'**AMD070**, et une fonction ester permettant le greffage sur le chélateur bifonctionnel. Cette stratégie a représenté un important défi, de par la nécessité de protéger cette amine primaire au cours de la synthèse, afin de la préserver lors des transformations impliquant les autres fonctions réactives utilisées pour le greffage. Malgré ces difficultés de synthèse, le couplage de cette molécule au macrocycle **p-SCN-Bn-TE1PA** via un lien thiourée a également été réalisé grâce à l'utilisation d'un espaceur **éthylènediamine**, et la seconde molécule ciblée **AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA**, a été isolée avec un rendement de 17% en deux étapes et en quantité suffisante pour les expériences à suivre.

L'étude de radiomarquage au cuivre-64 des composés **AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA** et **AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA** a ensuite été réalisée par nos collaborateurs radiopharmaciens de l'équipe « Oncologie nucléaire » du CRCI²NA de Nantes où j'ai pu me rendre pour participer aux manipulations. Bien qu'un second site de coordination non-spécifique ait été observé sur la partie inhibitrice des composés, nous sommes parvenus à radiomarquer et purifier de manière efficace les deux molécules permettant ainsi de synthétiser les deux nouveaux radiopharmaceutiques, qui ont pu être formulés en solutions injectables en milieu salin : $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ [Figure 149].

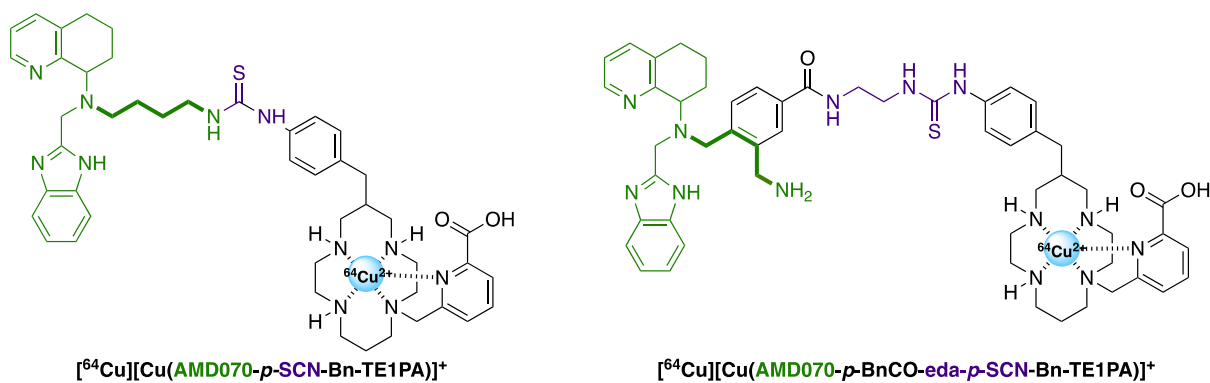


Figure 149 : Représentations des deux nouveaux radiopharmaceutiques synthétiques $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$

Lors de ces travaux, les petites molécules inhibitrices du récepteur CXCR4 ont également été couplées à la fluorescéine afin d'étudier l'influence du greffage sur les propriétés de reconnaissance par des mesures de fluorescence au niveau cellulaire. Les deux composés fluorescents **AMD070-FITC** et **AMD070-BnCO-eda-FITC** ont été étudiés sur la lignée cellulaire U266.B1 du myélome multiple. Les résultats obtenus après analyse par cytométrie de flux révèlent qu'uniquement le composé **AMD070-BnCO-eda-FITC** conserve une propriété de reconnaissance du récepteur à une concentration de 66,6 pmol/mL. La différence d'affinité observée entre les deux composés peut être corrélée, comme anticipé, à la présence de la fonction amine primaire libre.

Ces premiers résultats d'études cellulaires doivent être complétés par les études *in vitro* actuellement en cours sur nos radioconjugués $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$ et $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{AMD070-p-BnCO-eda-p-SCN-Bn-TE1PA})]^+$. Selon les résultats obtenus, l'efficacité des composés pourrait être modifiée à l'avenir, par exemple en faisant varier la longueur de l'espaceur introduit. En effet, une chaîne carbonée plus longue pourrait induire plus de flexibilité et favoriser le maintien de l'interaction avec le récepteur.

Le troisième chapitre présenté dans ce manuscrit décrit l'élaboration d'une nouvelle molécule inhibitrice du récepteur CXCR4, inspirée du bis-cyclam **AMD3100**.

En s'appuyant sur les propriétés d'inhibition que possède l'**AMD3100** grâce aux fonctions amine secondaire des macrocycles, il était pertinent d'envisager la synthèse de son analogue C-fonctionnel en mettant à profit le savoir-faire de notre laboratoire dans ce domaine. La première voie de synthèse envisagée, composée de 4 étapes pour obtenir le composé **m-xylyl-bis-C-cyclam** par condensation d'un ester α,β -insaturé avec la tétraamine préorganisée (*cis*-232-glyoxal) n'a pu aboutir au composé final. Néanmoins, l'intermédiaire de cyclisation **m-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal**, isolé au cours de ces travaux, peut-être un

composé clé pour le développement de futurs composés bis-cyclam reliés par C-alkylation. En effet, ce composé pourrait permettre une *N*-fonctionnalisation régiospécifique, à l'image de son analogue monomérique qui permet d'accéder au dérivé du TE1PA C-fonctionnel.

Une seconde voie de synthèse utilisant un tétra-électrophile en tant que cyclisant a alors été conduite avec la tétraamine préorganisée par la butanedione (**cis-232-butanedione**) et a permis d'isoler le composé ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** souhaité avec succès.

Des études biologiques de ce nouvel inhibiteur ont été réalisées par nos collaborateurs belges de l'équipe du Pr D. Schols pour évaluer la reconnaissance potentielle du récepteur CXCR4. Le composé démontre une très bonne activité, que ce soit pour l'inhibition de la liaison avec CXCL12 et du flux calcique qui en découle, ainsi que sur la liaison du VIH avec ses cellules hôtes. Même si les résultats obtenus ne démontrent pas une meilleure activité que l'**AMD3100**, l'activité du composé ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** est prometteuse et pourrait être améliorée dans un futur proche, notamment par la coordination de cations cuivre (II) ou zinc (II) au sein d'une des deux unités macrocycliques comme cela a déjà été observé avec l'**AMD3100**. Cette étude pourrait également mener au radiomarquage au cuivre-64 qui permettrait une utilisation en tant que radiopharmaceutique pour l'imagerie TEP du récepteur CXCR4 [Figure 150, gauche].

Enfin, la synthèse de l'analogue renforcé (***m*-xylyl-CB-bis-C-cyclam**) mériterait d'être élaborée car la coordination d'un cation cuivre (II) par une des unités macrocycliques donnerait lieu à une seule conformation du cyclam (*cis*-V) ce qui favorise l'interaction avec le récepteur d'après les études réalisées sur le **CB-bis-cyclam** [Figure 150, droite].

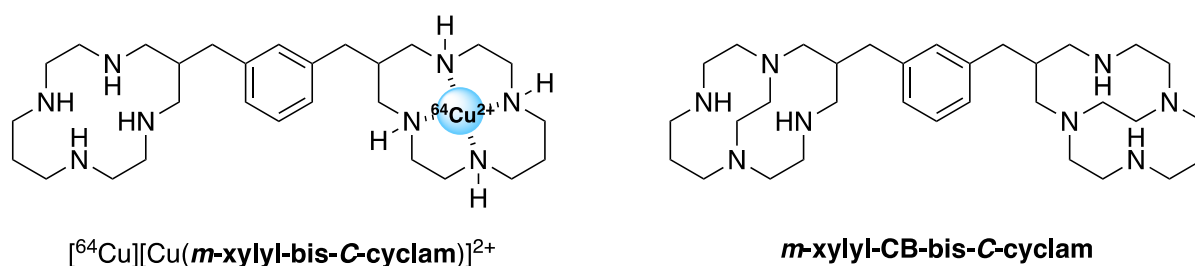


Figure 150 : Perspectives envisagées avec le radiocomposé $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\textit{m}\text{-xylyl-bis-C-cyclam})]^{2+}$ et le ***m*-xylyl-CB-bis-C-cyclam**

Enfin, le quatrième chapitre de cette thèse s'est quant à lui porté sur le développement d'une nouvelle famille de chélateurs du cuivre (II) basée sur l'unité cyclam, et *N*-fonctionnalisée par des groupements oxyde de diphenylphosphine.

Les deux nouveaux ligands **TE1PoPh₂** et **TE2PoPh₂** ont été obtenus facilement à partir des dérivés tri- et di- protégés **cyclam-triBoc** et **-diBoc** respectivement. Le groupement oxyde de

diphénylphosphine a pu être introduit avec succès grâce à une réaction de type Kabachnik-Fields suivie d'une simple hydrolyse acide qui permet de déprotéger les amines de l'unité macrocyclique de leurs groupements protecteurs Boc.

Les propriétés de coordination de ces ligands avec le cuivre (II) ont tout d'abord été étudiées en solution (RPE ainsi qu'à l'état solide (DRX)). Le complexe $[\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ présente une géométrie octaédrique déformée dans laquelle le macrocycle adopte sa conformation la plus stable, à savoir *trans*-III. En revanche, le complexe $[\text{Cu}(\text{TE2PoPh}_2)]^{2+}$ est lui dans une géométrie pyramide à base carrée avec le cation Cu^{2+} pentacoordiné malgré la présence de deux groupements oxyde de diphénylphosphine, et légèrement hors de la cavité du cyclam en conformation *trans*-I. Ce type de géométrie mène généralement à des complexes peu stables, et ce composé est en outre peu soluble en milieu aqueux. C'est pourquoi seul le ligand **TE1PoPh₂** a pu être engagé dans des études supplémentaires de chimie de coordination en solution (potentiométrie, dosages et suivis par spectroscopie UV-visible). Ce ligand a démontré une sélectivité particulière pour le cation cuivre (II) en ne formant aucun complexe avec d'autres cations divalents (Co^{2+} , Ni^{2+} et Zn^{2+}) : on peut donc parler de spécificité pour le cuivre (II). L'étude de radiomarquage au cuivre-64 réalisée par nos collaborateurs nantais a également permis de mettre en évidence la résistance du complexe $[\text{}^{64}\text{Cu}][\text{Cu}(\text{TE1PoPh}_2)]^{2+}$ aux phénomènes de transmétallation et de transchélation, même si la présence apparente de deux conformères de ce complexe doit encore être élucidée.

Ainsi, cette spécificité envers le cuivre (II) et la robustesse du complexe formé permettent d'envisager des utilisations thérapeutiques, par exemple en tant que traitement par chélation, pour des pathologies liées à une dérégulation de l'homéostasie du cuivre et à des accumulations pathologiques dans certains compartiments de l'organisme. On peut citer la maladie de Wilson, qui correspond à une accumulation de cuivre liée à un dysfonctionnement de l'excrétion du cation hors de l'organisme,^[214] ou la maladie d'Alzheimer, dans laquelle le cuivre participe à l'aggrégation pathologique de peptides amyloïdes dans le cerveau.^[215] Parmi les traitements envisagés pour ces deux maladies, l'utilisation de chélateurs du cuivre permettant l'extraction sélective du cation et son élimination par voie rénale est une option prometteuse, déjà étudiée par certains groupes de recherche en France et dans le monde. Le chélateur utilisé doit alors démontrer une spécificité remarquable pour le cuivre (II) afin de ne pas chélater d'autres cations endogènes comme le zinc par exemple.

Le complexe de cuivre formé avec **TE1PoPh₂** présentant des groupements aromatiques lipophiles et une charge globale (+2) différente des complexes usuels basés sur des bras coordinants anioniques, il serait également pertinent de le radiomarquer et évaluer son comportement *in vivo*, ainsi que d'en synthétiser la version C-fonctionnelle afin de pouvoir le greffer sur des vecteurs et de le comparer au **p-SCN-Bn-TE1PA** [Figure 151].

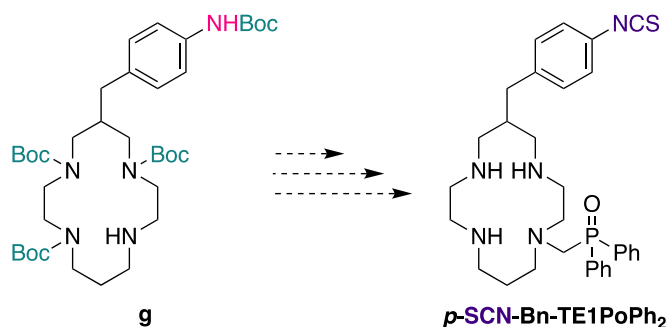


Figure 151 : Voie d'obtention du composé **p-SCN-Bn-TE1PoPh₂** à partir du composé **g**

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis d'élaborer deux nouveaux radiopharmaceutiques ciblant CXCR4 étant actuellement en études cellulaires et qui pourront par la suite conduire à des études *in vivo* sur petit animal pour évaluer leurs biodistribution et obtenir des images TEP.

Dans un second temps, le développement d'un nouveau vecteur ciblant CXCR4 a permis d'obtenir un bis-cyclam C-fonctionnel présentant des activités de reconnaissance intéressantes avec le récepteur CXCR4. Il reste maintenant à élargir cette famille pour développer un composé présentant une affinité encore plus marquée.

Enfin, un nouveau chélateur du cuivre (II) a été synthétisé et démontre une spécificité remarquable envers ce cation permettant d'envisager diverses applications dans le domaine médical.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

General methods

Reagents and solvents

Reagent used for synthesis were purchased from SIGMA-ALDRICH[®], TCI chemicals[®], ACROS ORGANICS[®] and Ambeed[®] and used without further purification. **Cyclam** was purchased from Chematec[®]. Triboc cyclam was synthesized as previously described.^[75] Solvents for synthesis were obtained from a MBraun MB-SPS 800 purification system. Ultrapure water was freshly obtained from a Milli-Q dispenser.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

NMR data were recorded at the “service commun” of the Université de Bretagne Occidentale. ¹H, ¹³C and 2D NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III HD 500 (500.25 MHz for ¹H and 125.79 MHz for ¹³C) or Jeol JNM-LA400 (400.13 MHz for ¹H, 100.62 MHz for ¹³C and 161.86 MHz for ³¹P) or Bruker AMX-3 300 (300.13 MHz for ¹H and 75.47 MHz for ¹³C) spectrometers. Deuterated solvents from Eurisotop[®] are used to reference spectra, ¹H and ¹³C shifts are reported in ppm and the δ scales are relative to TMS.

The signals are indicated as follows: chemical shift, multiplicity (s for singlet; br for broad singlet, d for doublet; t for triplet; q for quadruplet; m for multiplet), coupling constants J in Hertz (Hz), assignment: CH₂ α N, CH₂ β N or CH₂ γ N correspond to CH₂ located in alpha, beta or gamma position of considered nitrogen atom, type of nuclei is indicated in italic. Ar is a generic term used in subscript for all H or C aromatic atoms.

Mass Spectrometry

High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS) analyses were performed at the Institute of Organic and Analytic Chemistry (ICOA Orléans) on a HRMS Q-ToF MaXis, sources ESI, APCI, APPI and nano-ESI.

MALDI TOF were recorded at the “service commun” of the Université de Bretagne Occidentale using MALDI TOF-TOF AuTOFLEX III from Bruker Daltonics.

High Performance Liquid Chromatography

The analytic HPLC analyses were performed on a Prominence Shimadzu HPLC/LCMS-2020 instrument equipped with an UV SPD-20 A detector. The chromatographic system employs

C18AQ 5 μ M 250 \times 4.6 mm columns with H₂O (0.1% TFA) – MeCN or MeOH (v/v) as eluents at a flow rate of 1 mL/min and UV detection at 254 and 350 nm.

X-ray Diffraction

Crystallographic data were collected at the Service RX of the Institut de Chimie de Toulouse, Université Paul Sabatier, on an Oxford Diffraction Xcalibur Sapphire2 diffractometer using MoK $_{\alpha}$ radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) at 193(2) K. Space groups were determined based on systematic absences and intensity statistics. Semi-empirical absorption correction was employed. The structures were solved using an intrinsic phasing method (SHELXT)^[216] and refined using the least-squares method on F^2 .^[217] All non-H atoms were refined with anisotropic displacement parameters. Hydrogen atoms were refined isotropically at calculated positions using a riding model with their isotropic displacement parameters constrained to be equal to 1.5 times the equivalent isotropic displacement parameters of their pivot atoms for terminal sp³ carbon and 1.2 times for all other carbon atoms. All non-solvent H atoms were located by difference Fourier map and some restraints were applied on bond lengths and angles: SADI, DFIX, DANG.

Electronic Paramagnetic Resonance

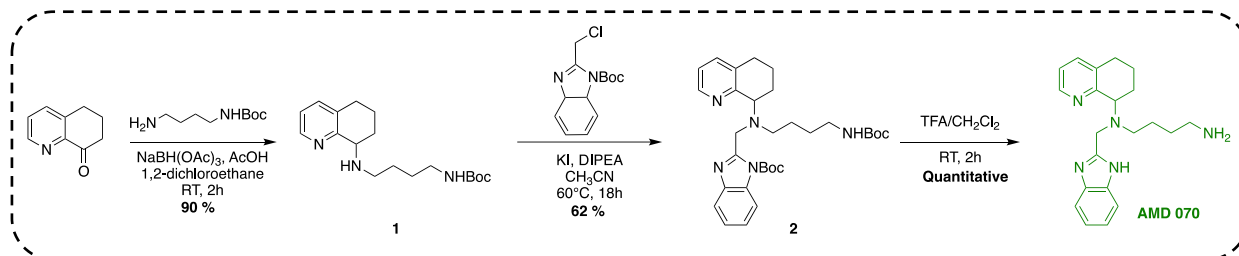
Spectra were recorded at the “Service Commun de RMN-RPE” at the Université de Bretagne Occidentale (UBO) on a Bruker Eleksys 500 instrument, in a 0.5 mm capillary within a quartz tube, at 9.34 GHz (band X) using a complex concentration of ca. 1.0 mM. Simulations of the experimental spectra were performed using Easyspin^[209] and Simultispin^[210] programs with Matlab software.

UV-Vis and Kinetic Inertness Studies

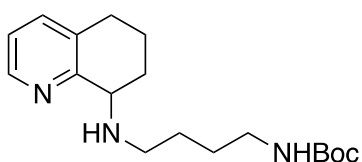
UV-Vis spectra were recorded at 25°C on a JASCO V-760 spectrometer equipped with a PAC-743R Peltier temperature control device in 700 μ L cuvettes with 1 cm optical path, and a baseline correction was applied. Acid-assisted dissociation experiments were carried out with a complex concentration of 4mM.

Experimental section of chapter 2

Synthesis of AMD070



Compound 1



Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$

Molecular weight: $319.45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Description: brown oil

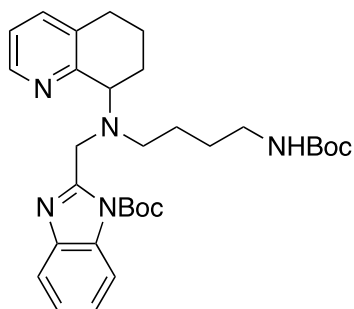
Yield: 90 %

6,7-dihydro-8(5H)-quinolinone (0.500 g, 3.40 mmol) was dissolved in dichloroethane (17 mL), then *tert*-butyl-*N*-(4-aminobutyl)carbamate (0.651 mL, 3.40 mmol), acetic acid (0.195 mL, 3.40 mmol), and sodium triacetoxyborohydride (2.162 g, 10.2 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours and then filtered through a silica plug and rinsed with a 2 M ammonia solution in methanol/ethyl acetate (10:90) mixture. The solvent was removed, and the residue purified by flash chromatography on silica gel (0-10% 2 M NH_3MeOH -EtOAc) to afford compound **1** as a brown oil (0.983 g, 90%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.37 (d, 1H, CH_{Ar} , $J = 4.7$ Hz), 7.37 (d, 1H, CH_{Ar} , $J = 7.8$ Hz), 7.06 (dd, 1H, CH_{Ar} , $J = 7.8, 4.7$ Hz), 3.89-3.77 (m, 3H, CH_2 , CH), 3.17-3.06 (m, 2H, CH_2), 2.84-2.67 (m, 4H, CH_2), 2.23-2.12 (m, 1H, CH_2 quinoline), 2.00-1.95 (m, 1H, CH_2 quinoline), 1.85-1.72 (m, 1H, CH_2 quinoline), 1.67-1.50 (m, 4H, CH_2), 1.41 (s, 10H, CH_3 , CH_2 quinoline)

$^{13}\text{C Jmod NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 156.2 (CO_{Boc}), 147.0 (CH_{Ar}), 137.1 (CH_{Ar}), 132.7 (C_{ipso}), 122.2 (CH_{Ar}), 79.1 ($\text{C}_{\text{quat Boc}}$), 58.2 (N-CH), 47.0 (CH_2 -NH), 40.5 (CH_2 -NHBoc), 28.3 (CH_3Boc), [28.9, 27.9, 27.4, 19.9] (CH_2)

Compound 2



Formula: $C_{31}H_{43}N_5O_4$

Molecular weight: 549.72 $g \cdot mol^{-1}$

Description: yellow foam

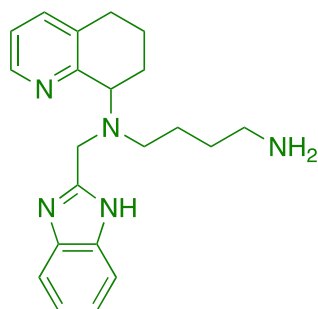
Yield: 62 %

Compound 1 (0.566 g, 1.78 mmol) was dissolved in dry CH_3CN (36 mL) and 1-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-2-chloromethylbenzimidazole (0.478 g, 1.78 mmol) was added. Distilled DIPEA (0.461 mL, 2.67 mmol, 1.5 eq) and KI (0.018 g, 0.18 mmol) were added, and the reaction was stirred at 60°C for 18 hours. The reaction was quenched with $NaHCO_3$ (sat) (30 mL), and the aqueous layer was extracted with $CHCl_3$ (3 x 30 mL). Organic layers were combined and dried over $MgSO_4$, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (EtOAc/ NH_3 MeOH (2 M), 100:0 to 90:10) to afford compound **2** as a yellow foam (0.605 g, 62%).

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.39 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.84-7.77 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.75-7.68 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.31-7.26 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.99 (s, 1H, CH_{Ar}), 4.94 (bs, 1H, NH), 4.66 (d, 1H, CH_2 , $J = 15.9$ Hz), 4.55 (d, 1H, CH_2 , $J = 15.9$ Hz), 4.30 (s, 1H, CH), 3.00 (s, 2H, CH_2), 2.91-2.71 (m, 2H, CH_2), 2.71-2.58 (m, 1H, CH_2), 2.19 (s, 1H, CH_2), 2.09-1.85 (m, 2H, CH_2), 1.69 (s, 10H, CH_3 , CH_2), 1.39 (s, 14H, CH_3 , CH_2)

^{13}C Jmod NMR ($CDCl_3$, 100 MHz, 298 K) δ (ppm) 158.3 ($C_{quat\alpha N}$), 155.8 (CONHBoc), 155.3 (C_{ipso}), 148.4 (CONBoc), 146.3 (CH_{Ar}), 141.7 (C_{ipso}), 135.8 (CH_{Ar}), 133.6 (C_{ipso}), 132.9 (C_{ipso}), [123.9, 123.4, 120.8, 119.6, 114.1] (CH_{Ar}), [84.7, 78.1] (C_{sp}), 62.1 (CH), [52.7, 51.9] ($CH_2\alpha N$), 39.9 ($CH_2\beta N$), [28.2, 27.8] (CH_3), [28.9, 27.8, 27.2, 25.6, 21.5] (CH_2)

Compound AMD070



Formula: C₂₁H₂₇N₅

Molecular weight: 349.48 g.mol⁻¹

Description: brown powder

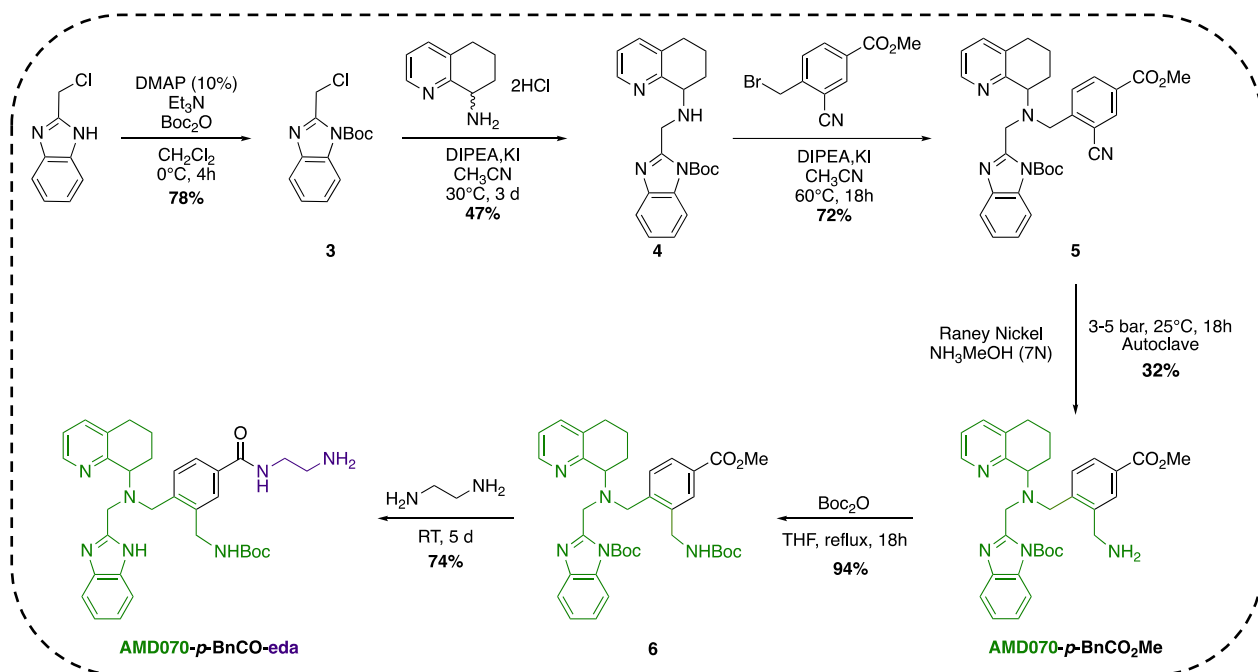
Yield: quantitative

Compound 2 (0.605 g, 1.10 mmol) was dissolved in dichloromethane (5 mL) and trifluoroacetic acid (5 mL) was added at 0°C. The resulting mixture was stirred for 2 h at 0°C. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*, and the crude product was dissolved in NaOH (4 M) and extracted with CHCl₃ (3 x 15 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum to give compound **AMD070** (0.380 g, quantitative) as a brown powder.

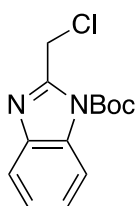
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.51 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 3.7 Hz), 7.54 (dd, 2H, CH_{Ar}, *J* = 5.9, 3.2 Hz), 7.36 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 7.6 Hz), 7.14 (dd, 2H, CH_{Ar}, *J* = 5.9, 3.2 Hz), 7.07 (dd, 1H, CH_{Ar}, *J* = 7.6, 3.7 Hz), 4.02 (d, 1H, CH₂, *J* = 16.2 Hz), 3.99 (m, 1H, CH), 3.91 (d, 1H, CH₂, *J* = 16.2 Hz), 2.86-2.42 (m, 6H, CH₂), 2.22-2.10 (m, 1H, CH₂), 2.05-1.92 (m, 1H, CH₂), 1.91-1.74 (m, 1H, CH₂), 1.72-1.53 (m, 1H, CH₂), 1.40 (s, 4H, CH₂)

¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K) δ (ppm) [156.9, 155.7] (C_{ipso}), 146.2 (CH_{Ar}), 138.6 (C_{ipso}), 137.2 (CH_{Ar}), 134.4 (C_{ipso}), [121.9, 121.4, 114.6] (CH_{Ar}), 61.4 (CH), [50.2, 49.1] (CH₂αN), 40.9 (CH₂αNH₂), [31.1, 29.7, 28.9, 25.7, 22.8, 21.1] (CH₂)

Synthesis of compound AMD070-*p*-BnCO-eda



Compound 3: 1-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-2-chloromethylbenzimidazole



Formula: C₁₃H₅ClN₂O₂

Molecular Weight: 266.73 g.mol⁻¹

Description: colorless oil

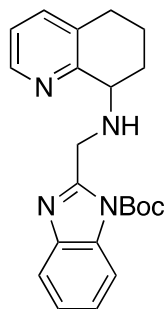
Yield: 78%

2-chloromethylbenzimidazole (1.498 g, 8.99 mmol) was solubilized in dichloromethane (100 mL). Di-*tert*-butyl dicarbonate (3.732 g, 17.1 mmol, 1.9 eq) and triethylamine (2.5 mL) were added to the solution and the reaction was cooled to 0°C. Then DMAP (0.114 g, 0.9 mmol) was added, and the reaction was stirred at 0°C. After 4h, 30 mL of ethyl acetate were added. The organic layer was washed with NaHCO₃ (3 x 90 mL) and brine (2 x 90 mL), dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by chromatography on silica gel (Hexane/Ethyl acetate 90/10) to give 1-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-2-chloromethylbenzimidazole **3** as a colorless oil (1.867 g, 78%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.98 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.75 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.38 (m, 2H, CH_{Ar}), 5.07 (s, 2H, CH₂-Cl), 1.74 (s, 9H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K) δ (ppm) 150.2 (CO), 148.1 (C_{sp2}-CH₂Cl), 141.7 (C_{ipso}-N), 133.3 (C_{ipso}-N-Boc), [125.7, 124.6, 120.4, 115.1] (CH_{Ar}), 86.5 (C_{quat}-Boc), 39.7 (N-CH₂-Cl), 27.9 (CH₃Boc)

Compound 4



Formula: C₂₂H₂₆N₄O₂

Molecular weight: 378.48 g.mol⁻¹

Description: brown oil

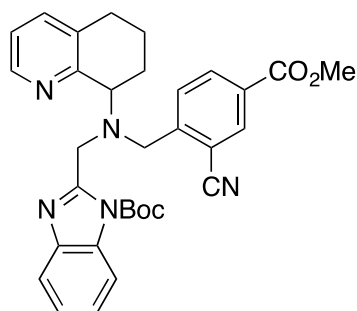
Yield: 47%

5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-amine dihydrochloride (0.977 g, 4.4 mmol) was suspended in dry acetonitrile (44 mL). Distilled DIPEA (2.1 mL, 12.24 mmol, 3.8 eq), 1-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-2-chloromethylbenzimidazole **3** (1.176 g, 4.4 mmol) and KI (0.110 g, 0.66 mmol) were added, and the reaction was stirred at 30°C for 3 days. The reaction mixture was concentrated *in vacuo* (RT). The crude product was purified by chromatography on silica gel (DCM/NH₃MeOH 7N/MeOH 98.9/0.7/0.4) to give 1-*tert*-butoxycarbonyl-1*H*-Benzimidazol-2-ylmethyl)-(5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-yl)-amine **4** as a brown oil (0.777 g, 47%).

¹H NMR (CDCl₃, 400MHz, 298 K) δ (ppm) 8.33 (d, 1H, CH_{Ar} *J* = 4.7 Hz), 7.95-7.93 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.71-7.68 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.33-7.28 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.00 (dd, 1H, CH_{Ar}, *J* = 4.7, 7.8 Hz), 4.60 (d, 1H, CH₂, *J* = 16.3 Hz), 4.43 (d, 1H, CH₂, *J* = 16.3 Hz), 3.84 (m, 1H, CH), 2.89-2.70 (m, 3H, CH₂), 2.39-2.31 (m, 1H, CH₂), 2.11-1.90 (m, 2H, CH₂), 1.78 (s, 9H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 75MHz, 298 K) δ (ppm) 157.4 (CO), 146.8 (CH_{Ar}), 142.1 (C_{sp2}CH₂-NH), 136.8 (CH_{Ar}), [133.9, 132.4] (C_{ipso}), [124.6, 124.2, 121.9, 120.0, 115.0] (CH_{Ar}), 86.0 (C_{quat}-Boc), 56.6 (CH), 46.7 (CH₂), [28.8, 28.2] (N-CH₂), 28.5 (CH₃Boc), 19.9 (CH₂ γ N)

Compound 5



Formula: C₃₂H₃₃N₅O₄

Molecular weight: 551.65 g.mol⁻¹

Description: yellow foam

Yield: 72%

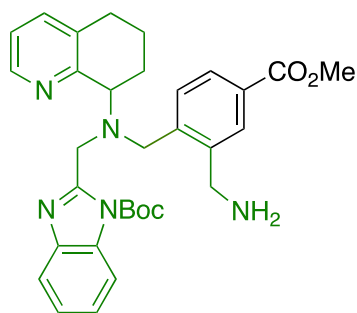
1-*tert*-butoxycarbonyl-1*H*-Benzimidazol-2-ylmethyl)-(5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-yl)-amine **4** (0.252 g, 0.66 mmol), 4-bromomethyl-3-cyanobenzoic acid methyl ester (0.168 g, 0.66 mmol) and KI (0.006 g, 0.04 mmol) were added in dry CH₃CN (14 mL). DIPEA (0.171 mL, 0.99 mmol) was added, and the solution was stirred at 60°C overnight. The reaction was quenched with NaHCO₃(sat) (30 mL), and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Organic layers were combined and dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 500:5:1) to give compound **5** as a yellow foam (260 mg, 72%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.43 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.87 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.77 (s, 2H, CH_{Ar}), 7.58 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.29 (d, 1H, CH_{Ar}), 7.17 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.0 (dd, 1H, CH_{Ar}), 4.68 (d, 1H, CH₂, *J* = 14.5 Hz), 4.58 (d, 1H, CH₂, *J* = 14.5 Hz), 4.36 (m, 1H, CH), 4.29 (d, 1H, CH₂, *J* = 15.5 Hz), 4.16 (d, 1H, CH₂, *J* = 15.5 Hz), 3.85 (s, 3H, O-CH₃), 2.87-2.63 (m, 2H, CH₂), 2.43-2.32 (m, 1H, CH₂), 2.11-1.92 (m, 2H, CH₂), 1.72 (s, 11H, CH₂, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 165.3 (CO), [157.9, 154.2, 150.4, 148.5] (C_{ipso}), 147.0 (CH_{Ar}), 141.7 (C_{ipso}), [136.6, 133.2, 132.4, 129.8] (CH_{Ar}), [134.0, 132.9, 128.3] (C_{ipso}), [124.4, 123.8, 121.7, 120.0, 114.4] (CH_{Ar}), 117.1 (CN), 111.9 (C_{ipso}-CN), 85.4 (C_{quat}Boc), 64.8 (CH_αN), [55.5, 53.7] (N-CH₂), 52.3 (O-CH₃), [29.3, 28.5] (CH₂), 28.2 (CH₃Boc), 23.2 (CH₂γN)

IR ν (cm⁻¹): 2226 (C≡N), 1745 (C=O Boc), 1723 (C=O ester)

Compound **AMD070-p-BnCO₂Me**



Formula: C₃₂H₃₇N₅O₄

Molecular weight: 555.28 g.mol⁻¹

Description: yellow powder

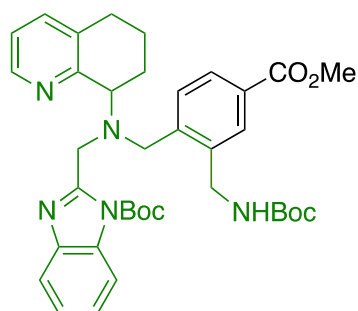
Yield: 32%

Compound 5 (0.286 g, 0.52 mmol) in NH₃MeOH (7N, 25 mL), was treated with Raney Ni (~10 g) and placed under 5 bars of H₂ in an autoclave for 18h at 25°C. The mixture was diluted with MeOH, filtered through Celite® 521, washed with MeOH and the combined filtrate was concentrated. The crude was purified by column chromatography on activated neutral alumina (100:0 to 90:10 CH₂Cl₂/MeOH) to afford **AMD070-p-BnCO₂Me** as a yellow powder (0.090 g, 32%).

¹H NMR (MeOD, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.58 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.82 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.64 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 7.6 Hz), 7.48 (d, 2H, CH_{Ar}, *J* = 7.6 Hz), 7.42 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.17 (q, 1H, CH_{Ar} *J* = 4.8, 7.7 Hz), 7.12 (m, 2H, CH_{Ar}), 4.38 (d, 1H, CH₂-NH₂, *J* = 15.6 Hz), 4.28 (d, 1H, CH₂-NH₂, *J* = 15.6 Hz), 4.08 (m, 1H, CH), 4.01-3.85 (m, 4H, CH₂), 3.80 (s, 3H, O-CH₃), 2.90-2.79 (m, 1H, CH₂), 2.75-2.67 (m, 1H, CH₂), 2.29 (m, 1H, CH₂), 2.06 (m, 2H, CH₂), 1.67 (m, 1H, CH₂), 1.48 (s, 9H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (MeOD, 100 MHz, 298 K) δ (ppm) 168.1 (CO-CH₃), [158.4, 157.7] (C_{ipso}), 155.2 (CO_{Boc}), 148.1 (CH_{Ar}), [143.0, 140.3] (C_{ipso}), 138.7 (CH_{Ar}), 136.4 (C_{ipso}), 130.2 (C_{ipso}), [131.4, 130.0, 128.7, 123.4, 123.2] (CH_{Ar}), 80.2 (C_{quat}Boc), 62.9 (CH), 54.7 (N-CH₂-Ar), 52.4 (O-CH₃), 50.4 (N-CH₂-benzimidazole), 42.1 (CH₂ α NH₂), 28.9 (CH₃Boc), [30.0, 24.8] (CH₂), 22.5 (CH₂ γ N)

Compound 6



Formula: C₃₇H₄₅N₅O₆

Molecular weight: 655.34 g.mol⁻¹

Description: white foam

Yield: 94%

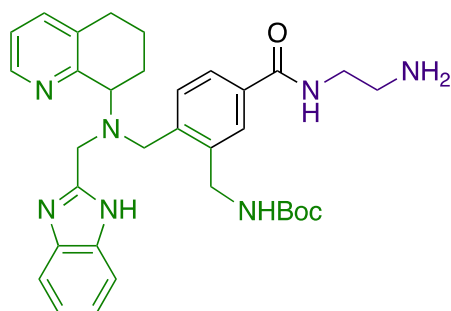
AMD070-p-BnCO₂Me (0.090 g, 0.16 mmol) was dissolved in THF (8 mL). Di-*tert*-butyl dicarbonate (0.053 g, 0.24 mmol, 1.5 eq) was added to the solution and the reaction was stirred under reflux for 18h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (100:0 to 98:2 CH₂Cl₂/MeOH) to afford **6** as a white foam (0.099 g, 94%).

¹H NMR (MeOD, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.21 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.90 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.73-7.65 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.45-7.37 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.26-7.15 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.12 (d, 1H, CH_{Ar}), 6.75 (m, 1H, CH_{Ar}), 4.55-4.24 (m, 6H, CH₂), 3.92 (m, 1H, CH), 3.81 (s, 3H, O-CH₃), 2.84-2.67 (m, 1H, CH₂), 2.61-2.48 (m, 1H, CH₂), 2.25-2.08 (m, 2H, CH₂), 2.00 (m, 1H, CH₂), 1.70 (s, 9H, CH₃Boc), 1.39 (s, 9H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (MeOD, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 168.1 (CO), [158.5, 158.2] (C_{ipso}), 155.3 (COBoc), 149.6 (COBoc), 147.4 (CH_{Ar}), [143.8, 142.1, 141.2] (C_{ipso}), 137.5 (CH_{Ar}), [135.5, 133.9] (C_{ipso}), [131.7, 131.4] (CH_{Ar}), 130.4 (C_{ipso}), [128.8, 125.7, 125.0, 122.0, 120.1, 115.9] (CH_{Ar}), [86.8, 79.8] (C_{quat}Boc), 61.7 (N-CH), 56.6 (N-CH₂-Ar), 52.4 (CH₃), 52.3 (N-CH₂-benzimidazole), 42.2 (CH₂-NHBoc), 30.0 (CH₂), [28.9, 28.4] (CH₃Boc), 25.2 (CH₂), 22.8 (CH₂ γ N)

ESI (positive, H₂O) m/z calcd. for [C₃₇H₄₆N₅O₆]⁺ 656.344; found [M+H]⁺ 656.350

Compound AMD070-p-BnCO-eda



Formula: C₃₈H₄₉N₇O₅

Molecular weight: 583.74 g.mol⁻¹

Description: brown powder

Yield: 86%

Compound 6 (0.099 g, 0.15 mmol) was dissolved in an excess of ethylenediamine (16 mL), and the reaction was stirred at room temperature for 5 days. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was redissolved in CHCl₃, and the organic layer was washed with H₂O, dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to afford compound **AMD070-p-BnCO-eda** as a brown powder (0.076 g, 86%).

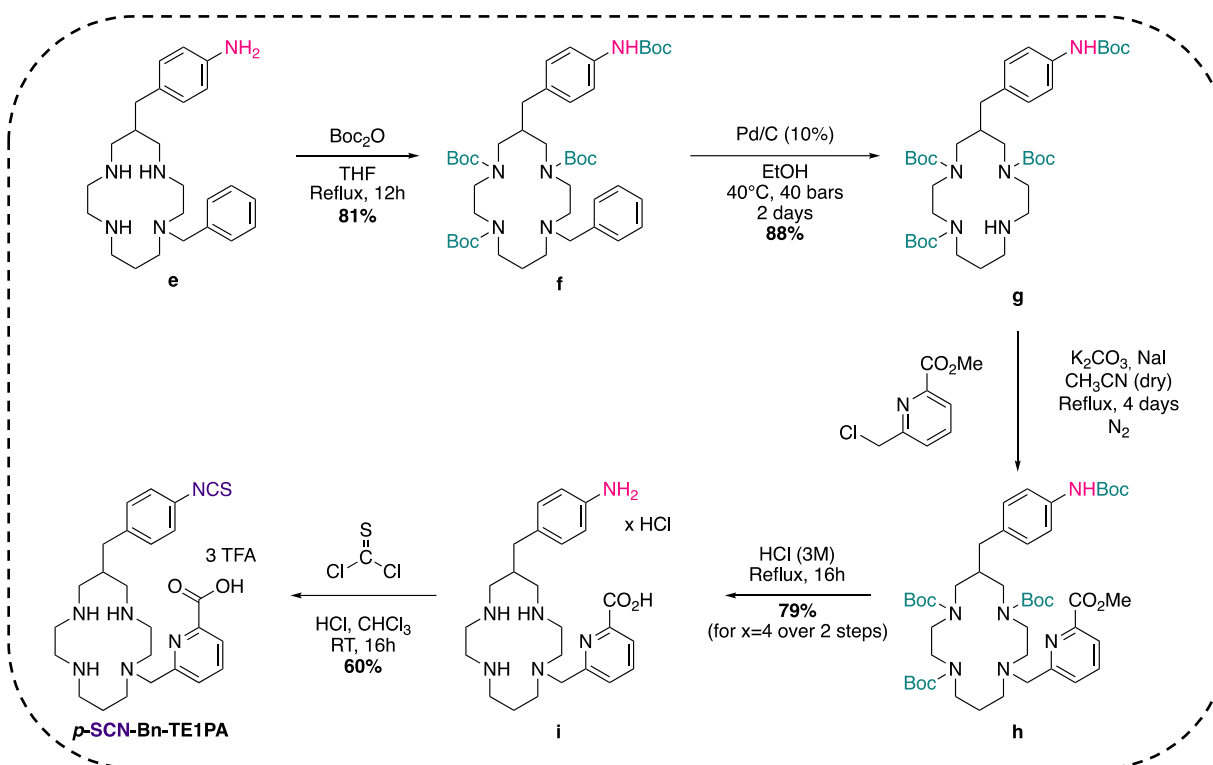
¹H NMR (MeOD, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.56 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.66 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.56-7.39 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.17-7.09 (m, 3H, CH_{Ar}), 4.36 (d, 1H, CH₂, *J* = 14.0 Hz), 4.24 (d, 1H, CH₂, *J* = 14.0 Hz), 4.04-3.97 (m, 1H, CH), 3.97-3.84 (m, 4H, CH₂), 3.38 (t, 2H, CH₂, *J* = 6.32 Hz), 3.10 (t, eda), 2.86-2.76 (t, 3H, CH₂, *J* = 6.32 Hz), 2.71-2.61 (m, 2H, CH₂), 2.23 (m, 1H, CH₂), 2.07-1.95 (m, 2H, CH₂), 1.66-1.56 (m, 1H, CH₂), 1.49-1.39 (m, 9H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (MeOD, 100 MHz, 298 K) δ (ppm) 170.1 (CO), [158.4, 157.7, 155.3] (C_{ipso}), 148.1 (CH_{Ar}), [141.5, 140.1] (C_{ipso}), 138.7 (CH_{Ar}), [136.5 134.6] (C_{ipso}), [131.6, 128.5, 126.6, 123.4, 123.2] (CH_{Ar}), 80.3 (C_{quat}Boc), 62.6 (CH), 54.5 (N-CH₂-Ar), 49.8 (N-CH₂-benzimidazole), [43.4, 42.3, 42.0] (NH-CH₂), 30.0 (CH₂), 28.8 (CH₃Boc), 24.7 (CH₂), 22.5 (CH₂N)

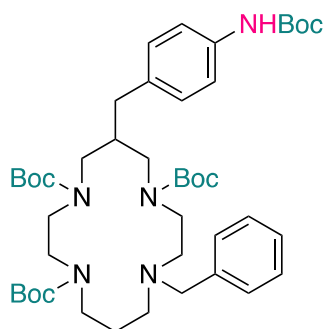
HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₃₃H₄₂N₇O₃]⁺ 584.3344 found [M+H]⁺ 584.3338, calcd. for [C₃₃H₄₁N₇NaO₃]⁺ 606.3163 found [M+Na]⁺ 606.3158, calcd. for [C₃₃H₄₃N₇O₃]²⁺ 292.6708 found [M+2H]²⁺ 292.6709

Melting point: 84°C

Synthesis of *p*-SCN-Bn-TE1PA from compound **e**



Compound **f**



Formula: $C_{44}H_{69}N_5O_8$

Molecular weight: $796.06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Description: white solid

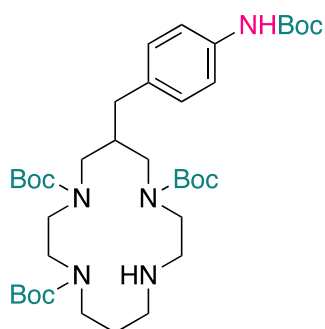
Yield: 81 %

Compound **e** (2.023 g, 5.11 mmol) was dissolved in THF (51 mL) and di-*tert*-butyl dicarbonate (5.592 g, 25.6 mmol) was added. The solution was heated to reflux overnight. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified using column chromatography on silica gel (Hexane/EtOAc from 100:0 to 60:40) to afford compound **f** as a white solid (3.299 g, 81 %).

^1H NMR (CD_3CN , 400 MHz, 343 K) δ (ppm) 7.38-7.10 (m, 9H, CH_{Ar}), 3.68-3.21 (m, 10H, CH_2), 3.20-2.88 (m, 3H, CH_2), 2.78-2.24 (m, 6H, CH_2), 1.79-1.59 (m, 2H, CH_2), 1.50-1.40 (m, 36H, CH_3Boc)

¹³C Jmod NMR (CD₃CN, 100 MHz, 343 K, TMS) δ (ppm) [157.2, 157.1, 156.6, 154.2] (CO), [140.3, 138.5, 135.8] (C_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}PhNHBoc), [130.3, 129.3, 128.0] (CH_{Ar}Ph), 119.8 (CH_{Ar}PhNHBoc), [80.6, 80.2, 80.4, 80.0] (C_{quat}Boc), 60.8 (CH₂Ph), [53.9, 52.8, 52.3, 52.1, 48.5 (x2), 47.9, 47.5] (CH₂-α-N), 40.2 (CH), 37.0 (CH₂PhNHBoc), [29.1 (x2), 29.0, 28.9] (CH₃Boc), 28.3(CH₂-β-N),

Compound g



Formula: C₃₇H₆₃N₅O₈

Molecular weight: 705.94 g.mol⁻¹

Description: yellowish solid

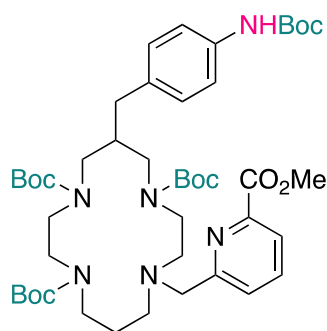
Yield: 88 %

Compound **f** (1.582 g, 1.99 mmol) was dissolved in EtOH (15 mL), and palladium on activated charcoal (Pd/C, 10%) (0.961 g) was added to this solution. The mixture was stirred under 40 bars of hydrogen atmosphere at 40°C for 2 days. The mixture was filtered through Celite® and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **g** as a yellowish solid (1.234 g, 88 %).

¹H NMR (CD₃CN, 500 MHz, 343 K) δ (ppm) 7.37 (s, 1H, NHBoc), 7.31 (d, 2H, CH_{Ar}PhNHBoc, *J* = 8.1 Hz), 7.17 (d, 2H, CH_{Ar}PhNHBoc, *J* = 8.1 Hz), 3.71-3.63 (m, 1H), 3.62-3.51 (m, 3H), 3.40-3.31 (m, 3H), 3.30-3.23 (m, 1H), 3.18-3.11 (m, 1H), 3.07-2.95 (m, 5H), 2.93-2.80 (m, 2H), 2.74-2.67 (m, 1H), 2.48-2.39 (m, 1H), 2.38-2.31 (m, 1H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.51-1.41 (m, 36H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (CD₃CN, 125 MHz, 343 K) δ (ppm) [158.1, 157.1, 156.8, 154.4] (CO), [138.5, 135.7] (C_{Ar}PhNHBoc), 130.6 (CH_{Ar}PhNHBoc), 120.1 (CH_{Ar}PhNHBoc), [81.4, 80.7, 80.5 (x2)] (C_{quat}Boc), [53.3, 50.8, 49.2, 49.0, 47.9, 46.5, 46.3, 46.1] (CH₂-α-N), 40.2 (CH), 37.3 (CH₂PhNHBoc), [29.1 (x2), 29.0, 28.9] (CH₃Boc), 27.7 (CH₂-β-N)

Compound h



Formula: C₄₅H₇₀N₆O₁₀

Molecular weight: 854.52 g.mol⁻¹

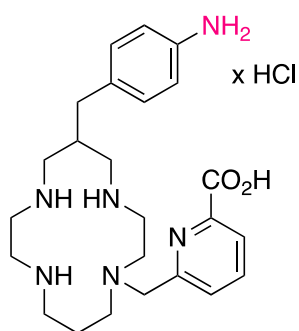
Description: yellowish foam

A solution of 6-chloromethylpyridine-2-carboxylic acid methyl ester (0.232 g, 1.25 mmol) in dry CH₃CN (5 mL) was added to a solution of compound **g** (0.800 g, 1.13 mmol) in dry CH₃CN (25 mmol). K₂CO₃ (0.629 g, 4.53 mmol) and NaI (0.187 g, 1.25 mmol) were added, and the mixture was heated to reflux for 4 days. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was dissolved in CHCl₃ then filtered, concentrated *in vacuo*, to afford compound **h** as a yellowish foam. The product was used without purification in the next step.

¹H NMR (CD₃CN, 500 MHz, 343 K) δ (ppm) 7.92 (d, 1H, CH_{Ar} pico, *J* = 7.7 Hz), 7.85 (t, 1H, CH_{Ar} pico, *J* = 7.7 Hz), 7.59 (s, 1H, NHBoc), 7.57 (m, 1H, CH_{Ar} pico), 7.30 (d, 2H, CH_{Ar}PhNHBoc, *J* = 8.30 Hz), 7.15 (d, 2H, CH_{Ar}NHBoc, *J* = 8.3 Hz), 3.90 (s, 3H, O-CH₃), 3.81 (d, 1H, CH₂ pico, *J* = 14.3 Hz), 3.65 (d, 1H, CH₂ pico, *J* = 14.3 Hz), 3.54-3.24 (m, 9H, CH₂), 3.18-3.11 (m, 1H, CH₂), 3.07-3.00 (m, 1H, CH₂), 2.98-2.91 (m, 1H, CH₂), 2.80-2.73 (m, 1H, CH₂), 2.63-2.56 (m, 1H, CH₂), 2.55-2.47 (m, 3H, CH₂), 2.45-2.38 (m, 1H, CH₂), 2.38-2.31 (m, 1H, CH₂), 1.76-1.60 (m, 2H, CH₂ α N), 1.49 (s, 9H, CH₃Boc), 1.45 (s, 9H, CH₃Boc), 1.41 (s, 9H, CH₃Boc), 1.37 (s, 9H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (CD₃CN, 125 MHz, 343 K) δ (ppm) 166.9 (CO pico), 161.4 (C_{Ar} pico), [157.2, 157.1, 156.6, 154.3] (CO Boc), 148.8 (C_{Ar} pico), 138.5 (C_{Ar} PhNHBoc), 138.4 (CH_{Ar} pico), 135.9 (C_{Ar}PhNHBoc), 130.5 (CH_{Ar}PhNHBoc), [127.7, 124.4] (CH_{Ar}pico), 119.9 (CH_{Ar}PhNHBoc), [80.6, 80.4, 80.3, 80.1] (C_{quat}Boc), 62.4 (CH₂pico), [54.5, 53.2] (CH₂ α N), 53.1 (CH₃pico), [52.4, 52.1, 48.5 (x2), 47.9, 47.5] (CH₂ α N), 40.3 (CH β N), 37.1 (CH₂PhNHBoc), [29.1, 29.0 (x2), 28.9] (CH₃Boc), 28.4 (CH₂ β N)

Compound i



Formula: C₂₄H₃₆N₆O₂

Molecular weight: 440.66 g.mol⁻¹ ($x = 0$)

586.42 g.mol⁻¹ ($x = 4$)

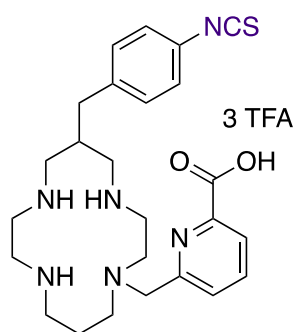
Description: white powder

Yield: 79 % over 2 steps (for x estimated at 4)

Compound **h** (0.992 g, 1.16 mmol) was dissolved in hydrochloric acid (3 M, 30 mL) and the solution was refluxed for 16 h. The solvent was removed and the minimum of dry MeOH was added. The mixture was filtered by cannula to afford compound **i** as a white powder (0.535 g, 79 % over 2 steps for x estimated at 4).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.16 (d, 1H, CH_{Ar} pico, $J = 8.1$ Hz), 8.06 (t, 1H, CH_{Ar} pico, $J = 8.1$ Hz), 7.68 (d, 1H, CH_{Ar} pico, $J = 8.1$ Hz), 7.40 (d, 2H, CH_{Ar} PhNH₂, $J = 8.7$ Hz), 7.35 (d, 2H, CH_{Ar} PhNH₂, $J = 8.7$ Hz), 4.12 (d, 1H, CH₂ pico, $J = 16.1$ Hz), 3.91 (d, 1H, CH₂ pico, $J = 16.1$ Hz), 3.43-3.31 (m, 2H), 3.26-3.10 (m, 9H), 3.09-2.99 (m, 2H), 2.98-2.84 (m, 4H), 2.78 (d, 2H, 7.47 Hz), 2.52 (s, 1H), 2.15-1.97 (m, 2H, CH₂ β N)

Compound **p-SCN-Bn-TE1PA**



Formula: C₂₅H₃₄N₆O₂S

Molecular weight: 824.23 g.mol⁻¹

Description: off-white cotton

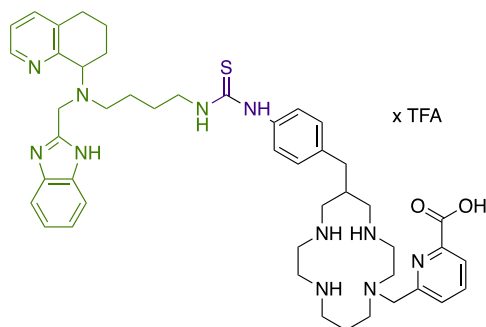
Yield: 60 %

Compound **i** (0.116 g, 0.19 mmol) was dissolved in hydrochloric acid (3 M, 4 mL) and 4 mL of chloroform, then thiophosgene (0.300 mL, 3.95 mmol) were added without stirring. The mixture was vigorously stirred (1300 tr/min) at room temperature overnight. The excess of thiophosgene was removed and the aqueous phase was washed with chloroform (3 x 2 mL). The aqueous layer was dried under reduced pressure. The crude product was purified by reversed-phase C₁₈ flash chromatography (H₂O + 0.1 % TFA / ACN 5% to 90%) to afford **p-SCN-Bn-TE1PA.3TFA** as an off-white cotton (0.094 g, 60 %).

¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.13 (d, 1H, CH_{Ar} pico, J = 7.8 Hz), 7.99 (t, 1H, CH_{Ar}pico, J = 7.8 Hz), 7.59 (d, 1H, CH_{Ar} pico, J = 7.8 Hz), 7.26 (s, 4H, CH_{Ar}PhNCS), 4.08 (d, 1H, CH₂pico, J = 15.7 Hz), 3.67 (d, 1H, CH₂pico, J = 15.7 Hz), 3.40-3.25 (m, 3H, CH₂), 3.23-3.04 (m, 6H, CH₂), 3.03-2.91 (m, 6H, CH₂), 2.78-2.61 (m, 6H, CH₂), 2.32-2.20 (m, 1H, CH), 2.19-1.98 (m, 2H, CH₂ β N)

¹³C Jmod NMR (D₂O, 100 MHz, 298 K) δ (ppm) 170.2 (CO pico), 165.5 (CO TFA), 160.1 (C_{ipso}pico), 150.3 (C_{ipso}pico), 142.3 (CH_{Ar}pico), 140.6 (C_{ipso}PhNCS), 136.9 (NCS), 133.1 (CH_{Ar}PhNCS), 131.8 (C_{ipso}PhNCS), 131.0 (CH_{Ar}pico), 128.7 (CH_{Ar}PhNCS), 128.0 (CH_{Ar}pico), 117.7 (C_{sp}TFA), 59.7 (CH₂pico), [56.1 (x2), 54.4 (x2), 48.2, 47.9, 47.6, 45.8] (CH₂ α N), 38.7 (CH₂PhNCS), 38.4 (CH), 24.9 (CH₂ β N)

Synthesis of AMD070-*p*-SCN-Bn-TE1PA



Formula: C₄₆H₆₁N₁₁O₂S

Molecular weight: 832.13 g.mol⁻¹ (x = 0)

1288.22 g.mol⁻¹ (x = 4)

Description: off-white foam

Yield: 8 % (for x = 4)

To a solution of **AMD070** (10.5 mg, 0.03 mmol) and ***p*-SCN-Bn-TE1PA.3TFA** (20.0 mg, 0.02 mmol) in distilled DMF (0.5 mL) triethylamine (0.011 mL, 0.08 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 80°C for 2.5 days. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on C18 reversed-phase (TFA/MeOH 100:0 to 0:100 H₂O + 0.1%) to afford **AMD070-*p*-SCN-Bn-TE1PA.4TFA** as an off-white foam after lyophilization (1.98 mg, 8%).

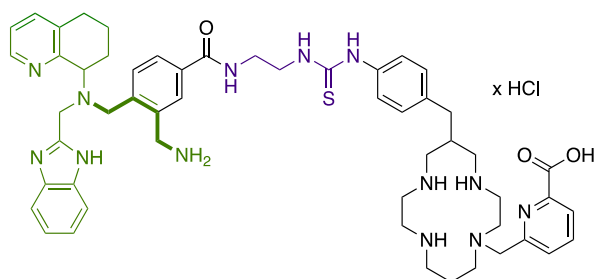
¹H NMR (MeOD, 500 MHz, 298K) δ (ppm) 8.83 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.31 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.16 (br, 1H, CH_{Ar}), 7.99 (br, 1H, CH_{Ar}), 7.86-7.80 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.61-7.54 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.25 (br, 2H, CH_{Ar}), 4.54-4.39 (m, 4H), 4.27 (br, 1H), 3.48 (br, 5H), 3.20-2.16 (br, 33H), 2.04 (br, 2H), 1.57 (br, 3H)

¹³C Jmod NMR (MeOD, 125 MHz, 298K) δ (ppm) 182.3 (CS), 168.4 (CO), [159.5, 153.5, 153.1, 149.9] (C_{ipso}), [147.9, 141.5] (CH_{Ar}), 141.0 (C_{ipso}), 140.0 (CH_{Ar}), [136.7, 132.9] (C_{ipso}), [130.6, 129.9, 128.9, 127.4, 126.6, 126.4, 125.7, 125.1, 115.2] (CH_{Ar}), 61.2 (CH), [58.1, 56.9, 54.7, 54.4, 53.3, 52.7, 47.2, 46.8, 46.1, 44.8, 44.6] (CH₂ α N), 38.6 (CH), [28.8, 27.7, 26.1, 23.6, 21.5, 21.4] (CH₂)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₄₆H₆₂N₁₁O₂S]⁺ 832.4803 found [M+H]⁺ 832.4817, calcd. for [C₄₆H₆₁N₁₁NaO₂S]⁺ 854.4623 found [M+Na]⁺ 854.4625, calcd. for [C₄₆H₆₃N₁₁O₂S]²⁺ 416.7438 found [M+2H]²⁺ 416.7458

Analytical HPLC, reversed-phase, (C-18 silica, H₂O 0.1% Formic acid/ MeOH 95:5 to 10:90): t_R=19.43 min, 95% purity

Synthesis of AMD070-*p*-BnCO-eda-*p*-SCN-Bn-TE1PA



Formula: C₅₃H₆₇N₁₃O₃S

Molecular weight: 966.27 g.mol⁻¹ (x = 0)

1148.56 g.mol⁻¹ (x = 5)

Description: off-white foam

Yield: 17% over 2 steps

To a solution of AMD070-*p*-BnCO-eda (20 mg, 0.03 mmol) and *p*-SCN-Bn-TE1PA.3TFA (20 mg, 0.02 mmol) in distilled DMF (0.5 mL), triethylamine (0.011 mL, 0.08 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 80°C for 2.5 days. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in 1 mL of HCl (1 M) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by precipitation (water/acetone) to afford compound AMD070-*p*-BnCO-eda-*p*-SCN-Bn-TE1PA.5HCl as an off-white foam after lyophilization (4.0 mg, 17% over 2 steps).

¹H NMR (D₂O, 500 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.82 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.45 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.25-7.92 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.64-7.11 (m, 11H, CH_{Ar}), 4.61-4.46 (m, 2H, CH₂), 4.40-4.23 (m, 3H, CH₂), 4.09 (br, 1H, CH), 4.04-3.51 (br, 6H, CH₂), 3.51-3.29 (br, 4H, CH₂), 3.27-2.89 (br, 11H, CH₂), 2.82-2.42 (m, 6H, CH₂), 2.37-2.21 (br, 3H, CH₂), 2.21-1.86 (m, 4H, CH₂)

¹³C Jmod NMR (D₂O, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 182.6 (CS), [171.1, 170.8] (CO), [160.4, 153.1, 152.4] (C_{ipso}), 151.0 (CH_{Ar}), 143.8 (C_{ipso}), [142.5, 142.2] (CH_{Ar}), [142.1, 142.0, 140.6, 135.9, 135.3] (C_{ipso}), [135.0, 134.9] (CH_{Ar}), [134.7, 134.6] (C_{ipso}), [133.5, 133.2] (CH_{Ar}), 132.7 (C_{ipso}), [131.6, 131.4, 131.3, 130.9, 130.6, 130.2, 129.6, 129.4, 129.3, 128.7, 127.9, 126.0, 123.0, 116.3, 116.3] (CH_{Ar}), 65.5 (CH), [59.6, 57.1, 56.3, 55.7, 54.7, 51.4, 48.7, 48.5, 47.7, 47.2, 46.1, 42.5, 42.1, 41.8, 40.0] (CH₂αN), 39.3 (CH), [38.7, 30.3] (CH₂), 25.0 (CH₂βN), 23.5 (CH₂)

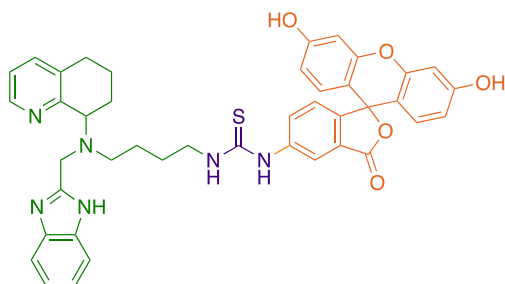
HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₅₃H₆₈N₁₃O₃S]⁺ 966.5283 found [M+H]⁺ 966.5264, calcd. for [C₅₃H₆₉N₁₃O₃S]²⁺ 483.7678 found [M+2H]²⁺ 483.7700

Analytical HPLC, reversed-phase, (C-18 silica, H₂O 0.1% Formic acid/ MeOH 95:5 to 10:90): t_R=8.31, > 99 % purity

Radiolabeling studies (CRCl²NA, Nantes)

[⁶⁴Cu]CuCl₂ in 0.1 M HCl obtained from the ARRONAX cyclotron (Saint-Herblain, France) was added to 2.5 M sodium acetate buffer to neutralize hydrochloride ions and maintaining a pH close to 6. **AMD070-*p*-SCN-Bn-TE1PA** and **AMD070-*p*-BnCO-eda-*p*-SCN-Bn-TE1PA** (225 pmol) radiolabeling were radiolabeled by addition of [⁶⁴Cu]CuCl₂ (450 pmol) and incubation at 95°C during 10 min. Then, a calculated volume of 1 mM EDTA was added to the radiolabeling solution to complex free ⁶⁴Cu. The mixture was stirred at 95°C during 10 min. Purification on SepPak C18 (NaCl/EtOH) allows the separation of the radiocomplex [⁶⁴Cu][Cu(EDTA)]²⁻ from our radiocomplexes [⁶⁴Cu][Cu(**AMD070-*p*-SCN-Bn-TE1PA**)] and [⁶⁴Cu][Cu(**AMD070-*p*-BnCO-eda-*p*-SCN-Bn-TE1PA**)]. The radiochemical purity was evaluated by injection of the radiolabeled solution into a radio-HPLC system (ACE C18 column) and the integration of the corresponding peak areas allowed calculation of the radiolabeling yields.

Synthesis of AMD070-FITC



Formula: C₂₁H₂₇N₅

Molecular weight: 738.86 g.mol⁻¹

Description: orange powder

Yield: 5%

To a solution of **AMD070** (20 mg, 0.06 mmol) and **FITC** (15 mg, 0.04 mmol) in distilled DMF (1.9 mL) triethylamine (0.006 mL, 0.05 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on C18 reversed-phase (H₂O/MeOH 100:0 to 0:100) to afford **AMD070-FITC** as an orange powder (1.30 mg, 5 %).

¹H NMR (DMF-d₇, 500 MHz, 298K) δ (ppm) 8.58 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.46 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.23 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.85 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.60-7.50 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.29-7.09 (m, 4H, CH_{Ar}), 6.74 (s, 2H, CH_{Ar}), 6.71-6.62 (m, 4H, CH_{Ar}), 4.23 (d, 1H, CH₂, J = 14.71 Hz), 4.14 (m, 1H, CH), 4.96 (d, 1H, CH₂, J = 14.71 Hz), 2.19 (m, 1H, CH₂), 2.02-1.93 (m, 3H, CH₂), 1.75-1.49 (m, 6H, CH₂), 0.86 (m, 3H, CH₂)

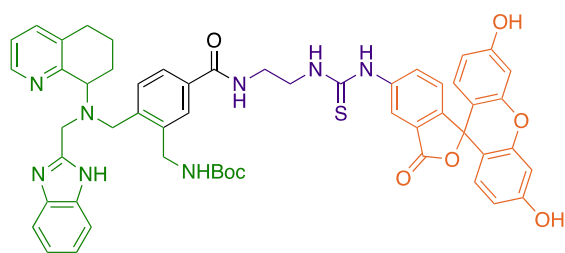
¹³C Jmod NMR (DMF-d₇, 125 MHz, 298K) δ (ppm) 181.2 (CS), 168.9 (CO), [160.1, 158.2, 156.1, 152.5] (C_{ipso}), 146.7 (CH_{Ar}), 142.1 (C_{ipso}), 137.1 (CH_{Ar}), 134.6 (C_{ipso}), 129.2 (CH_{Ar}), 127.2 (C_{ipso}), [124.2, 122.0, 121.3, 116.6, 112.7] (CH_{Ar}), 110.5 (C_{ipso}), 102.4 (CH_{Ar}), 82.8 (C_{quat}FITC), 61.6 (CH), [51.4, 50.4, 44.0, 31.8, 26.7, 26.4, 26.0, 21.5] (CH₂)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₄₂H₃₉N₆O₅S]⁺ 739.2697 found [M+H]⁺ 739.2690, calcd. for [C₂₁H₁₂NO₅S]⁺ 390.0431 found [M+H-AMD070]⁺ 390.0430, calcd. for [C₄₂H₄₀N₆O₅S]²⁺ 370.1385 found [M+2H]²⁺ 370.1389, calcd. for [C₃₃H₃₁N₆O₅S]²⁺ 304.6017 found [M+2H-tetrahydroquinoline]²⁺ 304.6022, calcd. for [C₄₂H₄₁N₆O₅S]³⁺ 247.0948 found [M+3H]³⁺ 247.0954, calcd. for [C₂₁H₂₈N₅]⁺ 350.2339 found [M+H-FITC]⁺ 350.2340

Analytical HPLC-MS, reversed-phase, (C-18 silica, H₂O 0.1% Formic acid/ MeOH 95:5 to 10:90): t_R = 8.95 min, m/z calcd. for [C₄₂H₃₉N₆O₅S]⁺ 739, found [M+H]⁺ 739, calcd. for [C₄₂H₄₀N₆O₅S]²⁺ 370, found [M+2H]²⁺ 370, purity : 96%

Synthesis of AMD070-*p*-BnCO-eda-FITC

Boc-protected AMD070-*p*-BnCO-eda-FITC



Formula: C₅₄H₅₂N₈O₈S

Molecular weight: 973.12 g.mol⁻¹

Description: orange powder

Yield: 76 %

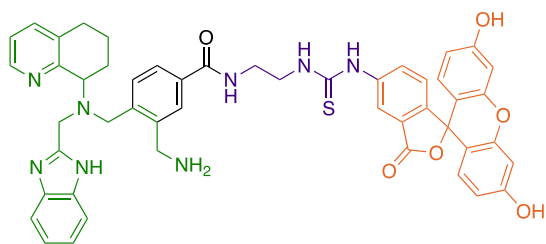
To a solution of AMD070-*p*-BnCO-eda (20 mg, 0.03 mmol) and FITC (8 mg, 0.02 mmol) in distilled DMF (1.7 mL) triethylamine (0.006 mL, 0.05 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 days. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on C18 reversed-phase (H₂O/MeOH 100:0 to 0:100) to afford AMD070-*p*-BnCO-eda-FITC protected as an orange powder (14.8 mg, 76%).

¹H NMR (DMF-d₇, 500 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.78 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.66 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.13 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.07 (br, 2H, CH_{Ar}), 7.91 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.74-7.65 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.41-7.35 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.32-7.26 (m, 2H, CH_{Ar}), 6.88 (s, 2H, CH_{Ar}), 6.84-6.75 (m, 4H, CH_{Ar}), 4.60 (d, 1H, CH₂, J = 15.03 Hz), 4.49 (d, 1H, CH₂, J = 15.03 Hz), 4.42-4.35 (m, 1H, CH), 4.23-4.06 (m, 4H, CH₂), 3.94 (br, 1H, CH₂), 3.85 (br, 1H, CH₂), 3.77-3.72 (m, 1H, CH₂), 3.48-3.41 (m, 1H, CH₂), 2.38 (br, 1H, CH₂), 2.21-2.05 (m, 2H, CH₂), 1.73 (br, 1H, CH₂), 1.58-1.50 (m, 12H, CH₃Boc+CH₂)

¹³C Jmod NMR (DMF-d₇, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 181.7 (CS), 168.9 (NCO), [167.1, 166.9] (C_{ipso}-OH, CO), [160.1, 157.2, 156.5, 154.4, 152.5, 147.7] (C_{ipso}), 146.7 (CH_{Ar}), [142.1, 140.7, 140.3, 139.8] (C_{ipso}), 137.6 (CH_{Ar}), [135.0, 133.9, 133.4] (C_{ipso}), [130.2, 129.5, 129.3, 128.3, 128.1] (CH_{Ar}), 127.3 (C_{ipso}), [125.6, 125.5, 124.2, 122.1, 121.8, 116.7, 112.7, 112.5] (CH_{Ar}), 110.5 (C_{ipso}), 102.4 (CH_{Ar}), 83.3 (C_{quat}FITC), 78.0 (C_{quat}Boc), 60.1 (CH), 53.1 (N-CH₂-Ar), 48.8 (N-CH₂-benzimidazole), [44.2, 44.1, 41.3, 40.1, 39.6, 39.0, 37.7] (N-CH₂), 28.8 (CH₂), [28.1, 27.9] (CH₃Boc), [25.2, 21.6] (CH₂)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₅₄H₅₃N₈O₈S]⁺ 973.3702 found [M+H]⁺ 973.3684, calcd. for [C₅₄H₅₄N₈O₈S]²⁺ 487.1887 found [M+2H]²⁺ 487.1883, calcd. for [C₄₉H₄₆N₈O₆S]²⁺ 437.1625 found [M+2H-Boc]²⁺ 437.1621, calcd. for [C₄₉H₄₇N₈O₆S]³⁺ 291.7788 found [M+3H-Boc]³⁺ 291.7776, calcd. for [C₂₈H₃₅N₇O]²⁺ 242.6446. found [M+2H-FITC]²⁺ 242.6447

Compound AMD070-*p*-BnCO-eda-FITC



Formula: C₄₉H₄₄N₈O₆S

Molecular weight: 873.00 g.mol⁻¹

Description: orange powder

Yield: 31 %

Compound **AMD070-*p*-BnCO-eda-FITC protected** (14,8 mg, 0.015 mmol) was solubilized in dry THF (0.5 mL) and HCl (3 M, 0.5 mL) was added dropwise. Then, the solution was heated at 40°C for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on C18 reversed-phase (H₂O/MeOH 100:0 to 0:100) to afford **AMD070-*p*-BnCO-eda-FITC** as an orange powder (4.0 mg, 31%).

¹H NMR (DMF-d₇, 500 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.82 (br, 1H, NHCO), 8.49 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.91 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 8.01 Hz), 7.74 (br, 1H, CH_{Ar}), 7.55 (br, 1H, CH_{Ar}), 7.47-7.40 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.25 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 8.01 Hz), 7.15-7.05 (br, 2H, CH_{Ar}), 7.07-6.99 (br, 1H, CH_{Ar}), 6.90 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 9.24 Hz), 6.79 (d, 1H, CH_{Ar}, *J* = 9.24 Hz), 6.76-6.69 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.68-6.43 (m, 4H, CH_{Ar}), 4.36 (d, 1H, CH₂, *J* = 11.81 Hz), 4.24 (d, 1H, CH₂, *J* = 11.81 Hz), 4.11 (d, 1H, CH₂, *J* = 12.86 Hz), 4.00-3.86 (m, 4H, CH₂), 3.86-3.72 (m, 4H, CH₂), 3.71-3.62 (m, 3H, CH₂, CH), 2.83 (br, 1H, CH₂), 2.66 (br, 1H, CH₂), 2.40 (br, 1H, CH₂), 2.19-1.99 (m, 2H, CH₂), 1.59 (br, 1H, CH₂), 1.29 (s, 2H, CH₂)

¹³C Jmod NMR (DMF-d₇, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 181.4 (CS), 169.5 (CO), 166.1 (NHCO), 156.0 (C_{ipso}), 152.1 (C_{ipso}), 146.6 (CH_{Ar}), 141.5 (C_{ipso}), 137.2 (CH_{Ar}), [135.4, 134.8, 134.4] (C_{ipso}), [131.7, 131.7, 130.0, 129.6, 129.5, 128.7, 128.5, 127.6, 122.0, 121.6] (CH_{Ar}), 112.3 (C_{ipso}), [102.8, 102.5] (CH_{Ar}), 76.6 (C_{quat}-FITC), 59.6 (CH), 54.0 (N-CH₂-Ar), 47.6 (N-CH₂-benzimidazole), [44.6, 41.3, 38.9] (N-CH₂), [23.7, 21.6, 20.8] (CH₂)

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₄₉H₄₅N₈O₆S]⁺ 873.3177 found [M+H]⁺ 873.3178, calcd. for [C₄₉H₄₄N₈NaO₆S]⁺ 895.2997 found [M+Na]⁺ 895.2992, calcd. for [C₄₉H₄₆N₈O₆S]²⁺ 437.1625 found [M+2H]²⁺ 437.1637, calcd. for [C₄₉H₄₇N₈O₆S]³⁺ 291.7774 found [M+3H]³⁺ 291.7781

Analytical HPLC-MS, reversed-phase, (C-18 silica, H₂O 0.1% Formic acid/ MeOH 95:5 to 10:90): *t_R*=8.97 min *m/z* calcd.for [C₄₉H₄₅N₈O₆S]⁺ 873, found [M+H]⁺ 873, calcd. for [C₄₉H₄₆N₈O₆S]²⁺ 437 found [M+2H]²⁺ 437, purity : 98%

Biological studies (Nantes, CRCI²NA)

Cells culture:

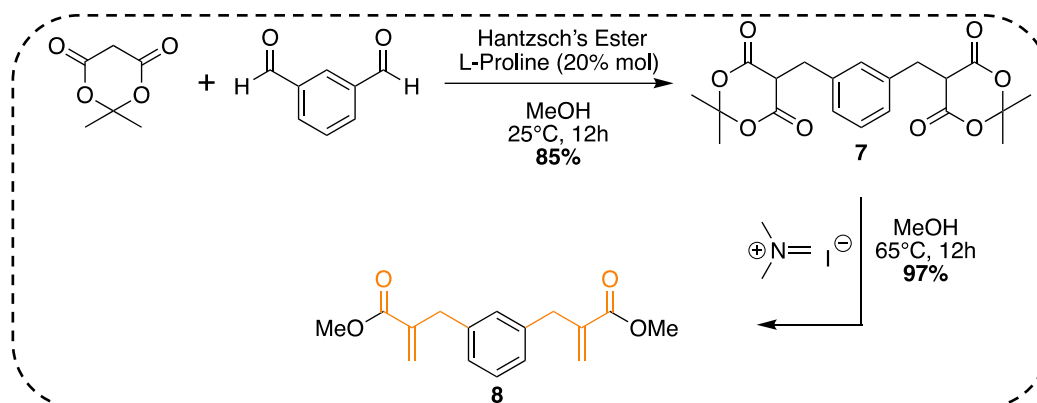
The U266.B1 human multiple myeloma cell line (ATCC) was cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies) containing 2 mM l-glutamine, 100 U/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Corning). Cells were placed in a humidified incubator and maintained at 37°C under 5% CO₂ and 95% humidity. Cell passage was performed when cells were approximately 80% confluent. For cellular experiments, cells were used at a cell passage under 12.

Flow cytometry:

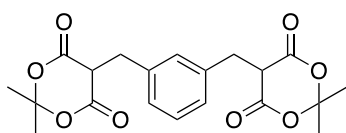
U266.B1 cells (200 000 cells/well) were incubated at 4°C for 45 minutes, with increasing concentrations of **AMD070-FITC** or **AMD070-*p*-BnCO-*eda*-FITC** (5 datapoints: 0.10, 0.53, 2.66, 13.32 and 66.6 pmol/mL). After 3 washings with PSB/5% of FCS, cells were incubated at room temperature for 15 minutes with an amine-reactive fluorescent dye APC-Cy7-A, which is non-permeant to live cells (Zombie NIRT^M, BioLegend) to evaluate cell viability. Cells were washed twice with PSB/5% FCS before flow cytometry analysis. Experiments were performed on a BD FACS Canto IITM Flow Cytometry System and analysed using FlowJoTM software (BD Sciences).

Experimental section of chapter 3

Synthesis of the cyclizing agent 8



Compound 7:



Formula: $C_{20}H_{22}O_8$

Molecular Weight: 390.39 $g \cdot mol^{-1}$

Description: white powder

Yield: 85%

Isophthalaldehyde (1.000 g, 7.46 mmol), Meldrum Acid (2.146 g, 14.9 mmol, 2 eq) and Hantzsch ester (3.777 g, 14.9 mmol, 2 eq) were solubilized in MeOH (26 mL). Then, *L*-proline (0.172 g, 1.49 mmol, 20%) was added and the reaction mixture was stirred at 25°C for 12 h. The precipitate was filtered and washed with diethyl ether. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Hexane/Ethyl acetate/Methanol 50:50:0 to 0:90:10) to afford compound 7 as a white powder (2.460 g, 85%).

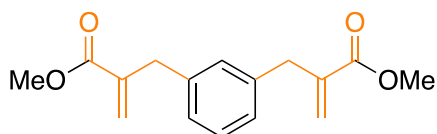
1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.24-7.17 (m, 4H, CH_{Ar}), 3.77 (t, 2H, CH, $J = 5.21$ Hz), 3.44 (d, 4H, CH_2 , $J = 5.21$ Hz), 1.52 (s, 6H, CH_3), 1.55 (s, 6H, CH_3)

^{13}C Jmod NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 165.3 (CO), 137.8 (C_{ipso}), [130.7, 129.0, 128.6 (x2)] (CH_{Ar}), 105.4 (C_{sp}), 48.2 (CH), 31.9 (CH_2), [28.6, 27.2] (CH_3)

HRMS (ESI, positive, H_2O) m/z calcd. for $[C_{20}H_{26}NO_8]^+$ 408.1653 found $[M+NH_4]^+$ 408.1651, calcd. for $[C_{20}H_{22}NaO_8]^+$ 413.1207 found $[M+Na]^+$ 413.1207

Melting point: 180°C

Compound 8:



Formula: C₁₆H₁₈O₄

Molecular Weight: 274.32 g.mol⁻¹

Description: orange oil

Yield: 97%

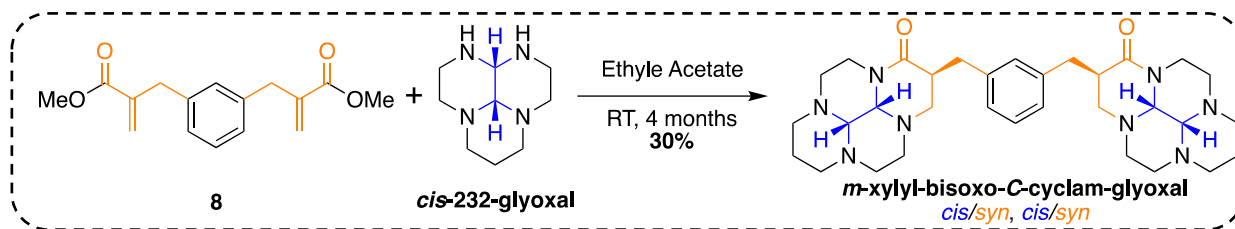
Compound **7** (2.460 g, 6.30 mmol) and Eschenmoser's salt (5.831 g, 31.5 mmol) were solubilized in MeOH (25 mL), and the reaction was stirred at 65°C for 12 h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in CHCl₃ (100 mL) and washed with NaHCO_{3(sat)} (50 mL), KHSO_{4(10% weight)} (50 mL) and NaCl_(sat) (50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to afford compound **8** as an orange oil (1.674 g, 97%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.22-7.19 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.06-7.03 (m, 3H, CH_{Ar}), 6.22 (s, 2H, =CH), 5.43 (s, 2H, =CH), 3.73 (s, 6H, CH₃), 3.60 (s, 4H, CH₂)

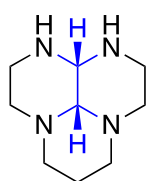
¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 167.3 (CO), [140.1, 138.8] (C_{ipso}), [129.8, 128.5, 127.1 (x2)] (CH_{Ar}), 126.2 (=CH₂), 51.8 (CH₃), 37.9 (CH₂Ar)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₁₆H₁₉O₄]⁺ 275.1278 found [M+H]⁺ 275.1281, calcd. for [C₁₂H₂₂NO₄]⁺ 292.1543 found [M+NH₄]⁺ 292.1546, calcd. for [C₁₆H₁₈NaO₄]⁺ 297.1097 found [M+Na]⁺ 297.1099

Synthesis of *m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal



Compound *cis*-232-glyoxal



Formula: C₉H₁₈N₄

Molecular weight: 182.27 g.mol⁻¹

Description: white solid

Yield: 77 %

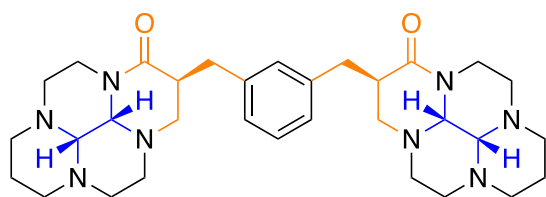
N,N'-bis(aminoethyl)-1,3-propanediamine (15.6 g, 96.7 mmol) was solubilized in MeOH (450 mL). The solution was cooled to -15°C and glyoxal (40% in water, 14.08g, 96.7 mmol) was added dropwise in 2 h. After the addition, the reaction was stirred at room temperature for 3 h. Solvent was removed under reduced pressure at room temperature to give a yellowish oil. The residue was solubilized in ethyl acetate (4 x 80 mL) to precipitate polymers. The supernatant was removed and concentrated *in vacuo* to afford compound ***cis*-232-glyoxal** as a white solid (13.64 g, 77%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 3.69 (d, 1H, N-CH-N, *J* = 2.5 Hz), 3.16 (d, 1H, N-CH-N, *J* = 2.5 Hz), 3.18-3.12 (m, 2H, CH₂), 2.96-2.72 (m, 8H, CH₂), 2.30-2.17 (m, 3H, CH₂), 2.12-1.98 (m, 2H, CH₂), 1.24 (d, 1H, CH₂-β-N, *J* = 13.29 Hz)

¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298K) δ (ppm) [77.2, 67.1] (N-CH-N), 19.6 (CH₂-β-N)

Coalescence phenomenon in the range of CH₂-α-N signals.

Compound *m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal



Formula: C₃₂H₄₆N₈O₂

Molecular Weight: 574.77 g.mol⁻¹

Description: white solid

Yield: 30 %

A solution of compound **8** (0.387 g, 1.41 mmol) in AcOEt (2 mL) was added dropwise to a solution of **cis-232-glyoxal** (0.514 g, 2.82 mmol) in AcOEt (5mL). The reaction was stirred at 25°C for 4 months. The solvent was removed under reduced pressure at room temperature and the crude product was precipitated with THF. The solid was filtered off and washed by THF and dried under reduced pressure to afford compound ***m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam-glyoxal** as a white solid (0.243 g, 30%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.19-7.12 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.01-6.93 (m, 3H, CH_{Ar}), 4.50 (d, 2H, CH, J = 13.1 Hz), 4.32 (d, 2H, N-CH-N, J = 2.5 Hz), 3.54-3.41 (m, 4H, CH₂-Ar), 3.22 (d, 2H, N-CH-N, J = 2.5 Hz), 3.19-2.09 (m, 30H, CH₂αN), 1.37-1.23 (m, 2H, CH₂βN)

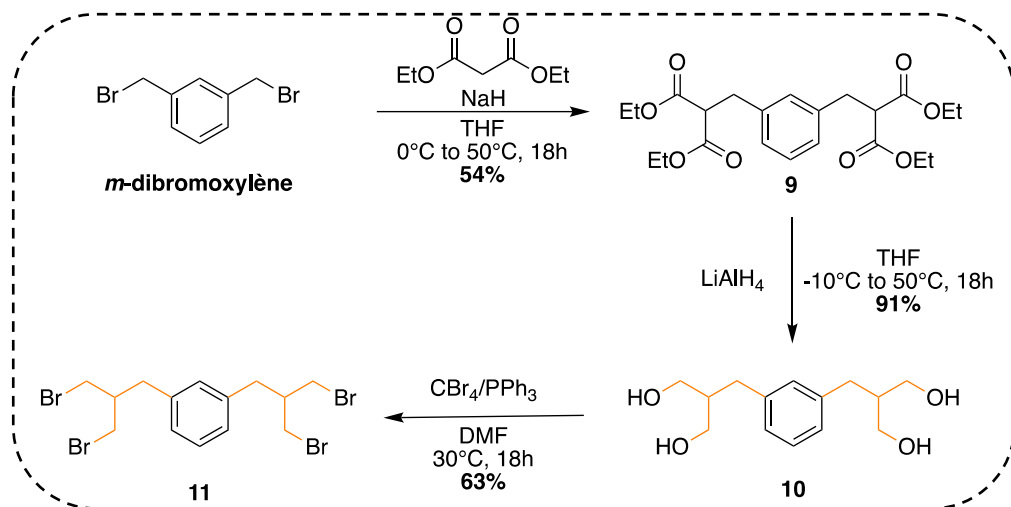
¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K) δ (ppm) 171.2 (CO), 139.7 (C_{ipso}), [129.6, 128.7, 127.0] (CH_{Ar}), [76.0, 70.6] (CH_{cis}), 55.7 (CH₂Ar), [54.1, 53.2, 52.9, 44.3, 44.2, 40.2] (CH₂αN), 37.0 (CH), 35.3 (CH₂αN), 19.5 (CH₂βN)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₃₂H₄₇N₈O₂]⁺ 575.3816 found [M+H]⁺ 575.3819, calcd. for [C₃₂H₄₆N₈NaO₂]⁺ 597.3636 found [M+Na]⁺ 597.3640, calcd. for [C₃₂H₄₈N₈O₂]²⁺ 288.1945 found [M+2H]²⁺ 288.1949

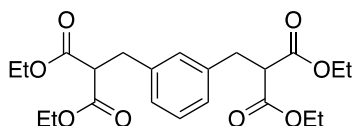
X-ray data of *m*-xylyl-bisoxo-C-cyclam glyoxal

Empirical formula	C ₃₆ H ₅₄ N ₈ O ₄
Formula weight	662.87
Temperature	193(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 10.1829(8) Å α = 63.913(2)° b = 13.8753(10) Å β = 89.426(2)° c = 14.2627(10) Å γ = 73.285(2)°
Volume	1717.5(2) Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.282 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.086 mm ⁻¹
F(000)	716
Crystal size	0.200 x 0.180 x 0.100 mm ³
Theta range for data collection	1.604 to 29.155°
Index ranges	-13<=h<=13, -17<=k<=18, -14<=l<=19
Reflections collected	53091
Independent reflections	9117 [R(int) = 0.0568]
Completeness to theta = 25.242°	99.5 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.7458 and 0.6737
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	9117 / 0 / 435
Goodness-of-fit on F ²	1.032
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0797, wR2 = 0.2293
R indices (all data)	R1 = 0.1323, wR2 = 0.2686
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	0.780 and -0.578 e.Å ⁻³

Synthesis of cyclizing agent 11



Compound 9:



Formula: C₂₂H₃₀O₉

Molecular Weight: 422.47 g.mol⁻¹

Description: colorless oil

Yield: 54 %

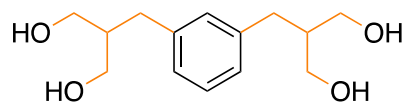
A suspension of NaH (0.502 g, 20.91 mmol, 4.1 eq) in THF (10 mL) was cooled to 0°C and **diethyl malonate** (3.257 g, 20.4 mmol, 4 eq) was added dropwise and stirring was continued until the solution became clear. Then **m-dibromoxylène** (1.500 g, 5.10 mmol, 1 eq) was added. After complete addition of alkylhalide, the solution was allowed to room temperature and after 1 hour to 50°C. After 18 hours the reaction mixture was quenched with NH₄Cl_(sat) and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Hexane/EtOAc, 100:0 to 0:100) to afford compound **9** as a colorless oil (1.167 g, 54%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.20-7.15 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.06-7.03 (m, 3H, CH_{Ar}), 4.20-4.10 (m, 8H, O-CH₂-CH₃), 3.59 (t, 2H, CH, J = 7.8 Hz), 3.16 (d, 4H, CH₂Ar, J = 7.8 Hz), 1.20 (t, 12H, O-CH₂-CH₃, J = 7.2 Hz)

¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 168.9 (CO), 138.3 (C_{ipso}), [129.4, 128.7, 127.3] (CH_{Ar}), 61.5 (O-CH₂-CH₃), 53.9 (CH), 34.6 (CH₂Ar), 14.1 (O-CH₂-CH₃)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₂₂H₃₁O₈]⁺ 423.2013 found [M+H]⁺ 423.2015, calcd. for [C₂₂H₃₀NaO₈]⁺ 445.1832 found [M+Na]⁺ 445.1837, calcd. for [C₂₂H₃₀KO₈]⁺ 461.1572 found [M+K]⁺ 461.1573

Compound 10:



Formula: C₁₄H₂₂O₄

Molecular Weight: 254.33 g.mol⁻¹

Description: colorless oil

Yield: 91%

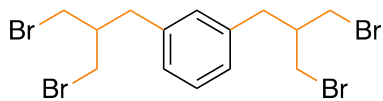
A suspension of LiAlH₄ (0.733 g, 19.4 mmol, 6 eq) in THF (25 mL) was cooled to -10°C and a solution of compound **9** (1.363 g, 3.23 mmol) in THF (7 mL) was added dropwise. The mixture reaction was warmed slowly to room temperature (~2h) and to 50°C for 18h. Celite[®] and Et₂O were added before the addition of H₂O (1 mL), HCl (3M, 1 mL), H₂O (1 mL) and the mixture was filtered off. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford compound **10** as a colorless oil (0.744 g, 91%).

¹H NMR (MeOD, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.21-7.16 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.09-7.01 (m, 3H, CH_{Ar}), 3.54 (d, 8H, CH₂-OH, J = 5.7 Hz), 2.62 (d, 4H, CH₂-Ar, J = 7.3 Hz), 1.94-1.86 (q, 2H, CH, J = 7.3, 5.7 Hz)

¹³C Jmod NMR (MeOD, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 141.8 (C_{ipso}), [131.1, 129.2, 127.8] (CH_{Ar}), 63.1 (CH₂-OH), 46.6 (CH), 35.1 (CH₂-Ar)

HRMS (ESI, positive, H₂O) m/z calcd. for [C₁₄H₂₃O₄]⁺ 255.1591 found [M+H]⁺ 255.1594, calcd. for [C₁₄H₂₂NaO₄]⁺ 277.1410 found 277.1415

Compound 11:



Formula: C₁₄H₁₈Br₄

Molecular Weight: 505.91 g.mol⁻¹

Description: colorless oil

Yield: 63 %

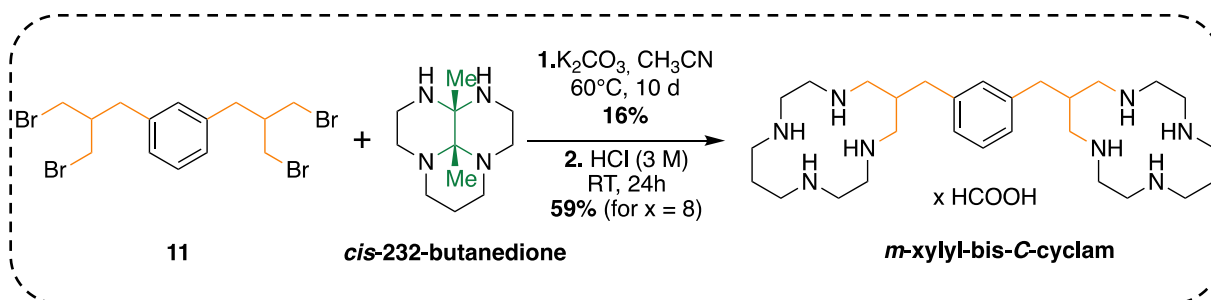
Compound **10** (0.350 g, 1.38 mmol) and triphenylphosphine (7.208 g, 27.5 mmol, 20 eq) were solubilized in DMF (60 mL) and carbon tetrabromide (9.128 g, 27.5 mmol, 20 eq) was added. The reaction was stirred at 30°C for 18 h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in H₂O (40 mL) and extracted with DCM (2 x 100 mL). Then, purification on silica gel was performed (Hexane/DCM 100:0 to 80:20) to afford compound **11** as a colorless oil (0.436 g, 63%).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.30 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.14-7.08 (m, 3H, CH_{Ar}), 3.59 (dd, 4H, CH₂-OH, J = CH₂-Br, J = 10.5, 4.6 Hz), 3.43 (dd, 4H, CH₂-Br, J = 10.5, 6.3 Hz), 2.18 (d, 4H, CH₂-Ar, J = 7.5 Hz), 2.32-2.22 (m, 2H, CH)

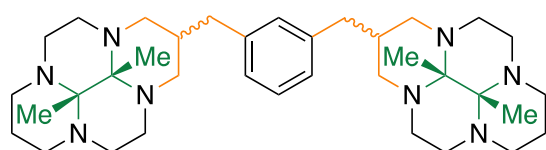
¹³C Jmod NMR (CDCl₃, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 138.9 (C_{ipso}), [130.0, 129.3, 127.6] (CH_{Ar}), 43.8 (CH), 37.5 (CH₂-Ar), 35.8 (CH₂-Br)

MALDI-TOF (matrix: dithranol): 506.254 [M+H]⁺

Synthesis of *m*-xylyl-bis-*C*-cyclam



Compound *m*-xylyl-bis-*C*-cyclam-butanedione



Formula: $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_8$

Molecular Weight: $602.92\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Description: white foam

Yield: 16 %

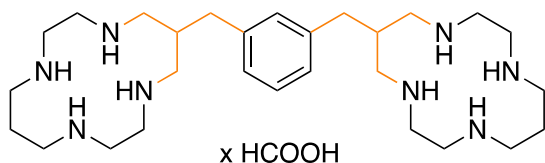
To a solution of compound **11** (0.4362 g, 0.86 mmol) in dry acetonitrile (7.5 mL), a solution of ***cis*-232-butanedione** (0.372 g, 1.77 mmol, 2.05 eq) in dry acetonitrile (7.5 mL) was added dropwise. Then, K_2CO_3 (2.3770 g, 17.2 mmol, 20 eq) was added and the reaction was stirred at 60°C for 10 days. K_2CO_3 was removed through filtration with cannula, filtrate was concentrated under reduced pressure. Crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/ Et_3N / MeOH 97:3:0 to 87:3:10) to afford compound ***m*-xylyl-bis-*C*-cyclam-butanedione** as a white foam (0.0836 g, 16 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.15-7.07 (m, 1H, CH_{Ar}), 6.99-6.81 (m, 3H, CH_{Ar}), 3.98 (br, 1H), 3.82-3.58 (m, 3H), 3.44-3.02 (m, 5H), 2.90-2.11 (m, 31H, $\text{CH}_2\alpha\text{N}$), 1.75 (br, 1H), 1.27 (s, 6H, CH_3), 1.22 (s, 6H, CH_3), 1.17-1.07 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta\text{N}$)

^{13}C Jmod NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K) δ (ppm) [142.0 (x2), 141.9, 139.6 (x2)] (C_{ipso}), [129.8, 129.7, 129.5, 128.3, 128.2, 126.7, 126.6, 126.4, 126.3] (CH_{Ar}), 74.1 (N-C(CH_3)-N), [55.6, 53.1, 53.0, 50.9, 50.9, 50.8, 50.7, 49.3, 46.7, 46.0, 45.0, 45.0, 44.9] ($\text{CH}_2\alpha\text{N}$), 39.1 ($\text{CH}_2\gamma\text{N}$), [34.4, 28.7] (CH), [18.1, 18.0] ($\text{CH}_2\beta\text{N}$), [11.3, 11.1, 10.9, 10.0] (CH_3)

HRMS (ESI, positive, H_2O) m/z calcd. for $[\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{N}_8]^+$ 603.4857 found $[\text{M}+\text{H}]^+$ 603.4853, calcd. for $[\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_8]^{2+}$ 302.2465 found $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 302.2466, calcd. for $[\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{N}_8]^{3+}$ 201.8334, found $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 201.8336

Compound *m*-xylyl-bis-**C**-cyclam



Formula: $C_{28}H_{54}N_8$

Molecular Weight: $871.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (for $x = 8$)

Description: brown film

Yield: 59 %

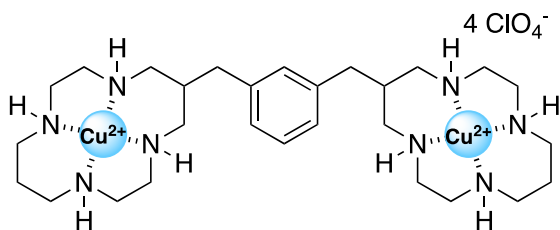
Compound ***m*-xylyl-bis-**C**-cyclam-butanedione** (0.0836 g, 0.139 mmol) was solubilized in HCl (3 M, 14 mL) and the reaction was stirred at room temperature for 24 hours. An extraction with CHCl_3 (3x20 mL) was performed to remove organic impurities. Then the aqueous layer was concentrated under reduced pressure and the product was purified by flash chromatography on reversed-phase C18 silica (H_2O (0.1% formic acid)/ CH_3CN 100:0 to 0:100) to afford compound ***m*-xylyl-bis-**C**-cyclam** as a brown film (0.071 g, 59 %).

^1H NMR (D_2O , 500 MHz, 298 K) δ (ppm) 8.18 (s, 0.3H, HCOOH), 7.38 (m, 1H, CH_{Ar}), 7.31-7.22 (m, 3H, CH_{Ar}), 3.70-3.54 (m, 13H), 3.53-3.33 (m, 20H), 3.28-3.18 (m, 6H), 3.00-2.85 (m, 6H), 2.28 (br, 4H, $\text{CH}_2\beta\text{N}$)

^{13}C Jmod NMR (D_2O , 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 140.3 (C_{ipso}), [132.9, 132.4, 131.0] (CH_{Ar}), [50.5, 45.4, 44.5, 43.5] ($\text{CH}_2\alpha\text{N}$), 38.4 ($\text{CH}_2\gamma\text{N}$), 36.1 (CH), 22.6 ($\text{CH}_2\beta\text{N}$)

HRMS (ESI, positive, H_2O) m/z calcd. for $[\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{N}_8]^+$ 252.2308 found $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 252.2309, calcd. for $[\text{C}_{28}\text{H}_{57}\text{N}_8]^{3+}$ 168.4897 found $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 168.4902, calcd. for $[\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{N}_8]^{4+}$ 126.6191 found $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 126.6192

Complex $[\text{Cu}_2(m\text{-xylyl-bis-C-cyclam})](\text{ClO}_4)_4$



Formula: $\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{Cl}_4\text{Cu}_2\text{N}_8\text{O}_{16}$

Molecular Weight: 1027,67 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Description: Pink powder

Yield: 61 %

The ligand ***m*-xylyl-bis-C-cyclam** (19.2 mg, 0.022 mmol) was dissolved in H_2O (0.50 mL) and the pH was adjusted to 6 using few drops of KOH (0.10 or 0.50 M). Then $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (17.1 mg, 0.046 mmol) was added to the reaction and pH dropped to 1. The pH was adjusted again to 6 with few drops of KOH (0.1 or 0.5 M). The reaction was stirred under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the complex was purified by flash chromatography on C18 reversed-phase ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 100:0 to 0:100) to afford complex $[\text{Cu}_2(m\text{-xylyl-bis-C-cyclam})](\text{ClO}_4)_4$ as a pink powder (13.7 mg, 61%).

HRMS (ESI, positive, H_2O) m/z calcd. for $[\text{C}_{28}\text{H}_{54}\text{Cu}_2\text{N}_8]^{4+}$ 157.0760 found $[\text{M}]^{4+}$ 157.0760, calcd. for $[\text{C}_{28}\text{H}_{53}\text{Cu}_2\text{N}_8]^{3+}$ 209.0989 found $[\text{M}-\text{H}]^{3+}$ 209.0989 calcd. for $[\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{Cu}_2\text{N}_8]^{2+}$ 313.1448 found $[\text{M}-2\text{H}]^{2+}$ 313.1448

CAUTION! Perchlorate salts combined with organic ligands are potentially explosive and should be handled in small quantities and with the adequate precautions.

Biological studies (Leuven, Belgique)

Protocol binding assay Jurkat

The compounds to be tested were diluted in assay buffer (1X Hank's Balanced Salt Solution HBSS + 20 mM HEPES + 0,5% Fetal Bovine Serum, pH 7,4) to obtain the desired concentration for the dilution series.

In a 96-well plate 100 μ L of compound solution were added per well with 50 μ L of a Jurkat cells suspension (4×10^6 cells/mL) in assay buffer and the cells were incubated for 15 min at RT in the dark. Then, 50 μ L of 100 ng/mL of fluorescent CXCL12 (h-SDF-1 α (AF647) from ALMAC) in assay buffer and the cells were incubated for 30 min at RT in the dark. After centrifugation at 400 x g for 5 min at RT, the supernatant was removed. At this step, cells were washed with 200 μ L of fresh assay buffer and centrifuged again (5 min at 400 s g at RT). Supernatant was removed and the cell were resuspended in 200 μ L of 1% paraformaldehyde dissolved in PBs to fix the cells.

The binding assay was determined by the quantification of the fluorescence by flow cytometry. The percentage inhibition of the fluorescent binding signal is obtained with the following formula : $\left(1 - \frac{MFI_{Exp} - MFI_{NC}}{MFI_{PC} - MFI_{NC}}\right) * 100$; where MFI_{Exp} = the MFI of the experimental (= compound-treated) sample MFI_{PC} = the MFI of the positive control MFI_{NC} = the MFI of the negative control. The IC_{50} value of the compound is obtained with the formula bellow :

$$10^{(Log_{conc.2} - Log_{conc.1})} * \left(MFI_{conc.1} - \frac{MFI_{PC} - MFI_{NC} + MFI_{NC}}{2} \right) + Log_{conc.1}$$

Where: $Log_{conc.2}$ = the log of a concentration of compound that results in less than 50% inhibition of the difference between the MFI value of the PC and NC $Log_{conc.1}$ = the log of a concentration of compound that results in more than 50% inhibition of the difference between the MFI value of the PC and NC

Protocol calcium signaling assay

Intracellular calcium fluxes were measured with the fluorescent and luminescent imaging plate reader (FLIPR) Penta system (Molecular Devices). Briefly, U87.CXCR4 and U87.CCR5-transfected were loaded with the fluorescent calcium indicator Fluo-2 acetoxymethyl ester (Abcam) dissolved (1:1) in pluronic acid solution (final concentration 2 μ M Fluo-2 in assay buffer) for 45 minutes at room temperature in the dark. During this incubation period, a 96-well plate with varying concentrations of compounds, diluted in assay buffer [Hanks' balanced salt solution (HBSS, Thermo Fisher Scientific), 40 mM HEPES buffer (Thermo Fisher Scientific), 0.5% FCS (Thermo Fisher Scientific), pH 7.4], and a 96-well plate with the ligand CXCL12 (50

ng/mL) were prepared. After washing with assay buffer, the cells were preincubated for 1 min at 37°C in the FLIPR Tetra system. At the start of the measurement, compounds were added to the cell plate by the FLIPR system followed by an incubation period of 10 minutes during which the intracellular calcium level was continuously measured. Following this incubation, CXCL12 was added and changes in cytosolic calcium concentration of the cells were simultaneously measured by the FLIPR Tetra system to determine the antagonistic effect of the compounds to be tested.

Protocol screening HIV activity compounds in MT-4 cells (MTS/PES method)

Preparation:

- Culture MT-4 cells at 0,5 million cells/ml 2 days before experiment (RPMI, 10% FCS, 1% glutamine)

Infection protocol:

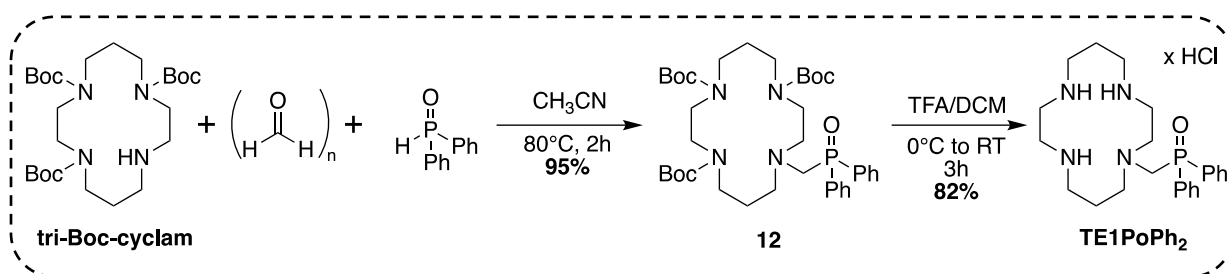
- Dilute compounds to be tested in 96-well-plates (1/5 dilutions), final volume of 100 µl per well (2x concentrated)
- Add 100 µl of medium to cell control wells (CC) and virus control wells (VC)
- Count cells, centrifuge, resuspend at 1 million cells/ml
- Add 50 µl cells/well (50.000 cells/well)
- Incubate plates for 30 minutes at 37°C, 5% CO₂
- Add 50 µl of diluted virus stock (5 pg/ml final concentration of NL4.3 stock, determined by titration); add 50 µl of medium to cell control wells (CC)
- Incubate plates for 5 days in an incubator at 37°C, 5% CO₂

Determination antiviral activity:

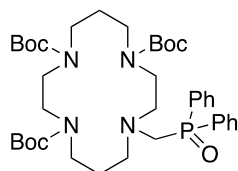
- Determine HIV-activity of compounds microscopically (by CPE) on day 5 after infection
- Remove 100 µl of supernatans
- Add 50 µl of MTS/PES solution
- Incubate for 2 hours at 37°C
- Add 50 µl Triton-X-100 (0.5%) per well
- Readout at 490/700 nm (Versamax reader)

Experimental section of chapter 4

Synthesis of TE1PoPh₂



Compound 12:



Formula: C₃₈H₅₉N₄O₇P

Molecular weight: 714.89 g.mol⁻¹

Description: white foam

Yield: 95 %

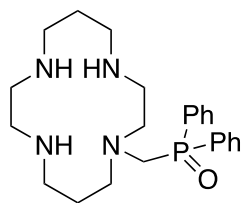
Under nitrogen, tri-Boc-cyclam (0.604 g, 1.21 mmol), diphenylphosphine oxide (0.245 g, 1.21 mmol) and paraformaldehyde (0.036 g, 1.21 mmol) were solubilized in dry CH₃CN (2 mL). The reaction was stirred at 80°C for 2h. Solvents were removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 96:4) to give **12** as a white foam (0.824 g, 95%).

¹H NMR (CD₃CN, 500 MHz, 343 K) δ (ppm) 7.85-7.79 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.59-7.50 (m, 6H, CH_{Ar}), 3.42 (d, 2H, CH₂ αN, ²J_{H-P} = 5.3 Hz), 3.24-3.05 (m, 12H, CH₂ αN), 2.79-2.71 (m, 4H, CH₂ αN), 1.68-1.55 (br, 4H, CH₂ βN), 1.44 (s, 28H, CH₃Boc)

¹³C Jmod NMR (CD₃CN, 125 MHz, 343 K) δ (ppm) [156.8, 156.6, 156.5] (CO-Boc), 135.1 (d, C_{ipso}, ¹J_{C-P} = 94.8 Hz), 132.9 (CH_{Ar}), 132.3 (d, CH_{Ar}, ²J_{C-P} = 8.8 Hz), 129.8 (d, CH_{Ar}, ³J_{C-P} = 13.2 Hz), [80.2 (x2), 80.1] (C_{sp}-Boc), 57.0, 56.9, 56.8, 56.3, 55.3, 55.2, [48.3, 48.0, 47.8, 47.6, 47.0] (CH₂ αN), 29.9 (CH₂ βN), 29.1 (CH₃-Boc), 27.7 (CH₂ βN)

³¹P NMR (CD₃CN, 202 MHz, 343 K, TMS) δ (ppm) 27.0 (P=O)

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₃₈H₆₀N₄O₇P]⁺, 715.4194 found [M+H]⁺ 715.4198, calcd. for [C₃₈H₅₉N₄NaO₇P]⁺ 737.4014, found [M+Na]⁺ 737.4010, calcd. for [C₂₆H₄₉N₄O₆]⁺ 513.3647 found [M+H-POPh₂]⁺

Compound TE1PoPh₂:

3 HCl

Formula: C₂₃H₃₅N₄OPMolecular weight: 414.53 g.mol⁻¹ (x = 0)523.91 g.mol⁻¹ (x = 3)

Description: white powder

Yield: 82 %

12 (0.824 g, 1.15 mmol) was dissolved in dichloromethane (7 mL) and trifluoroacetic acid (7 mL) was added at 0°C. The resulting mixture was stirred for 3 h at room temperature. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in NaOH (4M) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The product was dissolved with minimal HCl (3M), then acetone was added, and the mixture was filtered by cannula to afford **TE1PoPh₂.3HCl** as a white powder (0.493 g, 82 %).

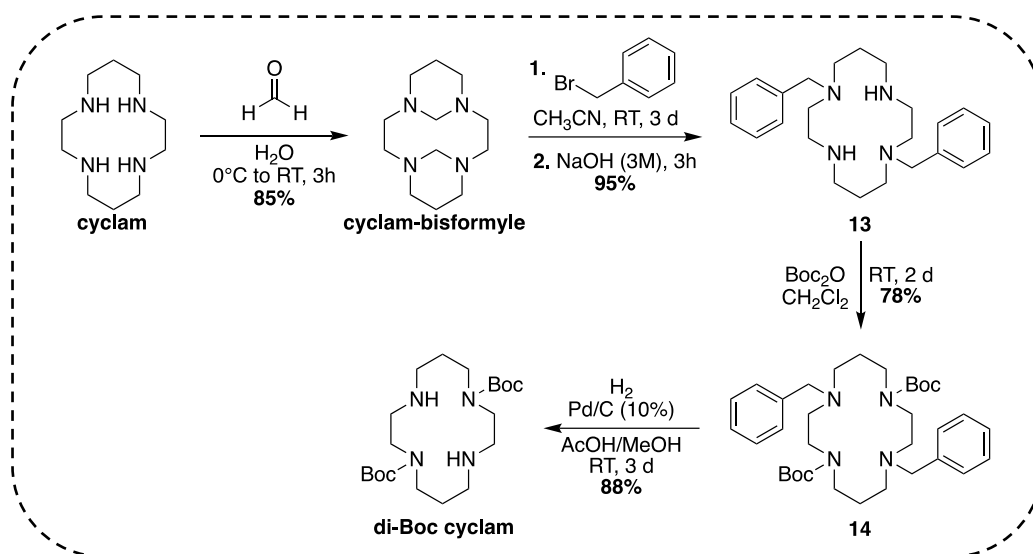
¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 298 K) δ (ppm) 7.88-7.80 (m, 4H, CH_{Ar}), 7.75-7.59 (m, 6H, CH_{Ar}), 3.83 (d, 2H, CH₂, ²J_{H-P} = 3.4 Hz), 3.44-3.21 (m, 8H, CH₂ αN), 3.14-3.07 (m, 2H, CH₂ αN), 3.00-2.95 (m, 2H, CH₂ αN), 2.75-2.68 (br, 2H, CH₂ αN), 2.43-2.27 (br, 2H, CH₂ αN), 2.27-2.13 (br, 2H, CH₂ βN), 1.77-1.61 (br, 2H, CH₂ βN)

¹³C Jmod NMR (D₂O, 125 MHz, 298 K) δ (ppm) 136.3 (CH_{Ar}), 133.6 (d, CH_{Ar}, ²J_{C-P} = 9.6 Hz), 132.2 (d, CH_{Ar}, ²J_{C-P} = 11.5 Hz), 131.4 (d, C_{ipso}, ¹J_{C-P} = 98.7 Hz), 57.7 (CH₂ αN), 55.0 (d, NCH₂P, J = 88.7 Hz), 52.3 (d, CH₂ αN, J = 6.6 Hz), [45.8, 44.9, 44.2, 44.1, 42.9, 40.6] (CH₂ αN), [25.1, 23.4] (CH₂ βN)

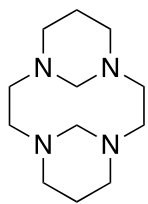
³¹P NMR (D₂O, 162 MHz, 298 K, TMS) δ (ppm) 36.5 (P=O)

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₂₃H₃₆N₄OP]⁺ 415.2621 found [M+H]⁺ 415.2626, calcd. for [C₂₃H₃₅N₄NaOP]⁺ 437.2441 found [M+Na]⁺ 437.2447, calcd for [C₁₁H₂₅N₄]⁺ 213.2074 found [M+H-HPOPh₂]⁺ 213.2079

Synthesis of cyclam di-Boc



Compound cyclam-bisformyl:



Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_4$

Molecular weight: $224.35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

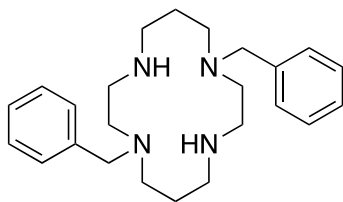
Description: white solid

Yield: 85 %

Two equivalents of formaldehyde (1.8 mL, 37% in water) were added dropwise to an aqueous solution (110 mL) of **cyclam** (2.000 g, 10.00 mmol) at 0°C . The mixture was stirred for 3h at room temperature and the white precipitate was then filtered, washed with water, and dried under reduced pressure to afford compound **cyclam-bisformyle** as a white solid (1.903 g, 85%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K) δ (ppm): 5.43 (dt, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-N}$, $J = 2.28\text{-}10.86$ Hz), 3.15 (d, 4H, $\text{CH}_2\alpha\text{N}$, $J = 10.07$ Hz), 2.90 (d, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-N}$, $J = 10.81$ Hz), 2.87-2.80 (m, 4H, $\text{CH}_2\alpha\text{N}$), 2.62 (td, 4H, $\text{CH}_2\alpha\text{N}$, $J = 3.50\text{-}12.50$ Hz), 2.38 (d, 4H, $\text{CH}_2\alpha\text{N}$, $J = 10.07$ Hz), 2.31-2.18 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta\text{N}$), 1.22-1.14 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta\text{N}$)

Compound 13:



Formula: C₂₄H₃₆N₄

Molecular weight: 380.58 g.mol⁻¹

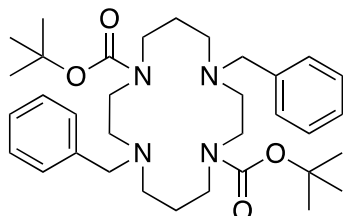
Description: white solid

Yield: 95 %

Cyclam-bisformyle (1.903 g, 8.49 mmol) was dissolved in distilled acetonitrile (50 mL) and benzyle bromide (2,117 mL, 17,8 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature for 3 days and the white precipitate formed was then filtered. The residue was dissolved in NaOH (3M, 100 mL). After stirring for 3h, the solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). The organic phases were collected, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum to afford compound **13** (3,070 g, 95%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm): 7.94-7.73 (m, 10H, CH_{Ar}), 4.26 (s, 4H, N-CH₂-Ph), 3.40-3.01 (m, 18H, CH₂αN and NH), 2.45 (m, 4H, CH₂βN)

Compound 14:



Formula: C₃₄H₅₂N₄O₄

Molecular weight: 580.81 g.mol⁻¹

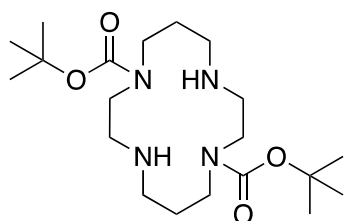
Description: white foam

Yield: 78 %

To a solution of **compound 13** (2.350 g, 6.17 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL) di-*tert*-butyl dicarbonate (3.48 g, 15.9mmol) was added at room temperature and the solution was stirred for 2 days. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 97:3) to give compound **14** (2.780 g, 78%) as a white foam.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm): 7.33-7.20 (m, 10H, CH_{Ar}), 3.54 (s, 4H, N-CH₂-Ph), 3.42-3.24 (m, 8H, CH₂αN), 2.67-2.52 (m, 4H, CH₂αN), 2.49-2.35 (m, 4H, CH₂αN), 1.78 (br, 4H, CH₂βN), 1.36 (m, 18H, CH₃Boc)

Compound di-Boc cyclam



Formula: C₂₀H₄₀N₄O₄

Molecular weight: 400.56 g.mol⁻¹

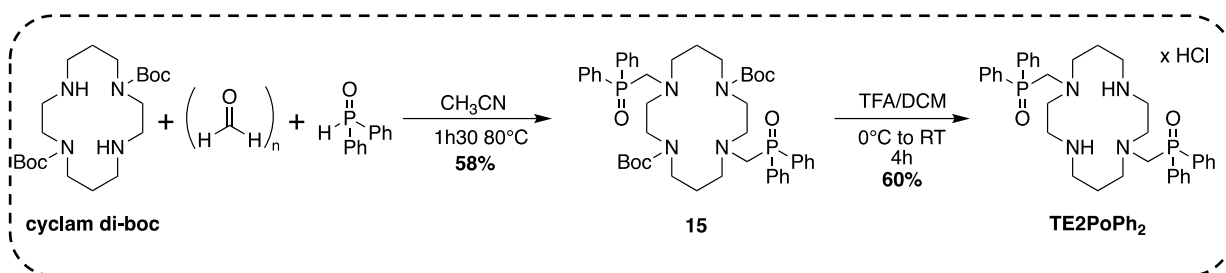
Description: orange oil

Yield: 88 %

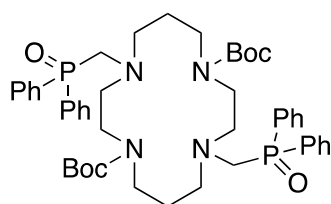
Compound **14** (2.780 g, 4.70 mmol) was dissolved in AcOH (24 mL) and CH₃OH (6 mL) and 0.201 g of 10% Pd/C was added in an autoclave. The reaction mixture was stirred under 30 bars H₂ at 50°C for 3 days. After filtration on a Celite[®] pad and evaporation of solvents, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL) and neutralized with NaOH (1M). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated under vacuum to give **cyclam di-boc** (1.649 g, 88 %) as an orange oil.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm): 3.46 (br, 4H, CH₂αN-Boc), 3.34 (m, 4H, CH₂αN-Boc), 2.94 (m, 4H, CH₂αNH), 2.86 (m, 4H, CH₂αNH), 2.03 (br, 4H, CH₂βN), 1.44 (s, 18H, CH₃Boc)

Synthesis of TE2PoPh₂



Compound 15:



Formula: C₄₆H₆₂N₄O₆P₂

Molecular weight: 828.97 g.mol⁻¹

Description: white foam

Yield: 58 %

Under nitrogen, **cyclam di-boc** (1.000 g, 2.50 mmol), diphenylphosphine oxide (1.009 g, 4.99 mmol) and paraformaldehyde (0.150 g, 4.99 mmol) were solubilized in dry CH₃CN (5 mL). The reaction was stirred at 80°C for 1h30. Solvents were removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 100:0 to 90:10) to give **15** as a white foam (1.199 g, 58%).

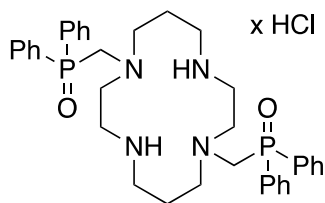
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K) δ (ppm): 7.85-7.65 (m, 8H, CH_{Ar}), 7.55-7.39 (m, 12H, CH_{Ar}), 3.34 (s, 4H, N-CH₂-PO), 3.08-2.87 (m, 8H, CH₂αN), 2.84-2.41 (m, 8H, CH₂αN), 1.52 (s, 4H, CH₂βN), 1.42 (s, 18H, CH₃-Boc)

¹³C Jmod NMR (CD₃CN, 125 MHz, 343 K) δ (ppm) 156.7 (CO-Boc), 134.9 (d, C_{ipso}, ¹J_{C-P} = 94.4 Hz), 132.2 (d, CH_{Ar}, ²J_{C-P} = 8.8 Hz), 129.8 (d, CH_{Ar}, ³J_{C-P} = 11.3 Hz), 80.0 (C_{sp}-Boc), [57.2, 56.5, 55.7, 55.6, 55.0, 55.0, 47.1, 46.9] (CH₂αN), 29.0 (CH₃-Boc), 27.6 (CH₂βN)

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz, 298 K) δ (ppm) 29.1 (P=O)

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₄₆H₆₃N₄O₆P₂]⁺ 829.4217 found [M+H]⁺ 829.4212, calcd. for [C₄₆H₆₂N₄NaO₆P₂]⁺ 851.4037 found [M+Na]⁺ 851.4034, calcd. for [C₃₆H₄₈N₄O₂P₂]²⁺ 315.1621 found [M+2H-2Boc]²⁺ 315.1620

Compound TE2PoPh₂:



Formula: C₃₆H₄₆N₄O₂P₂

Molecular weight: 628.74 g.mol⁻¹ (for x = 0)

701.65 g.mol⁻¹ (for x = 2)

Description: white powder

Yield: 60 %

Compound 15 (0.427 g, 0.51 mmol) was dissolved in dichloromethane (3.5 mL) and trifluoroacetic acid (3.5 mL) was added at 0°C. The resulting mixture was stirred for 4 h at 0°C. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in NaOH (4M) and extracted with CH₂Cl₂ (4 x 30 mL). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The product was dissolved with minimal HCl (3M), then acetone was added, and the mixture was filtered by cannula to afford compound **TE2PoPh₂.2HCl** as a white powder (0.215 g, 60 %).

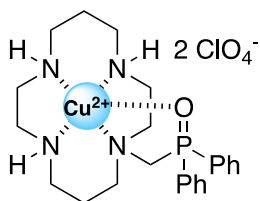
¹H NMR (MeOD, 500 MHz, 328 K) δ (ppm) 7.89 (t, 8H, CH_{Ar}), 7.70-7.58 (m, 12H, CH_{Ar}), 3.76 (s, 4H, N-CH₂-PO), 3.10 (br, 4H, CH₂ α N), 2.85 (br, 4H, CH₂ α N), 2.74 (br, 4H, CH₂ α N), 1.74 (br, 4H, CH₂ α N), 1.28 (s, 4H, CH₂ β N)

¹³C Jmod NMR (MeOD, 125 MHz, 328 K) δ (ppm) 134.4 (CH_{Ar}), 132.4 (d, CH_{Ar}, ²J_{C-P} = 9.0 Hz), 131.5 (d, C_{ipso}, ¹J_{C-P} = 95.3 Hz), 130.5 (d, CH_{Ar}, J = 12.6 Hz), 57.3 (CH₂ α N), 53.9 (d, CH₂ α N, ¹J_{C-P} = 88.9 Hz), 43.7 (CH₂ α N), 25.7 (CH₂ β N)

³¹P NMR (MeOD, 202 MHz, 328 K) δ (ppm) 34.9 (P=O)

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. For [C₃₆H₄₇N₄O₂P₂] 629.3169 found [M+H]⁺ 629.3169, calcd. for [C₃₆H₄₈N₄O₂P₂]²⁺ 315.1620 found [M+2H]²⁺ 315.1625

[Cu(TE1PoPh₂)](ClO₄)₂



Formula: C₂₃H₃₅Cl₂CuN₄O₉P

Molecular weight: 675.08 g.mol⁻¹

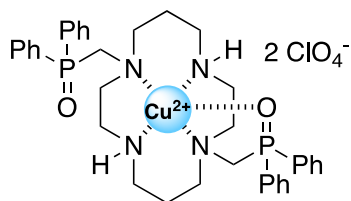
Description: Purple powder

Yield: 60 %

The ligand **TE1PoPh₂** (25.0 mg, 0.045 mmol) was dissolved in H₂O (1.80 mL) and the pH was adjusted to 6 using few drops of KOH (0.10 or 0.50 M). Then Cu(ClO₄)₂·6H₂O (17.4 mg, 0.047 mmol) was added to the reaction and pH dropped to 1. The pH was adjusted again to 6 with few drops of KOH (0.10 or 0.5 M). The reaction was stirred under reflux for 18 h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the complex was purified by flash chromatography on C18 reversed-phase (H₂O/MeOH 100:0 to 0:100) to afford complex [Cu(**TE1PoPh₂**)](ClO₄)₂ as a purple powder (18.4 mg, 60%).

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₂₃H₃₅CuN₄OP]²⁺ 238.5917 found [M]²⁺ 238.5917, calcd. for [C₂₃H₃₄CuN₄OP]⁺ 476.1760 found [M-H]⁺ 476.1749, calcd. for [C₂₃H₃₅ClCuN₄OP]⁺ 512.1527 found [M+Cl]⁺ 512.1520.

[Cu(TE2PoPh₂)](ClO₄)₂



Formula: C₃₆H₄₆Cl₂CuN₄O₁₀P₂

Molecular weight: 891.18 g.mol⁻¹

Description: Blue powder

Yield: 77 %

TE2PoPh₂ (31.2 mg, 0.049 mmol) was dissolved in CH₃CN (2 mL) and Cu(ClO₄)₂·6H₂O (19.3 mg, 0.052 mmol) was added to the reaction. The mixture was stirred under reflux for 18 h. The filtrate was isolated by cannula and the solvent was removed under reduced pressure. Complex [Cu(**TE2PoPh₂**)](ClO₄)₂ was isolated as a blue powder (33.4 mg, 77%).

HRMS (ESI, positive, H₂O) *m/z* calcd. for [C₃₆H₄₆CuN₄O₂P₂]²⁺ 345.6191 found [M]²⁺ 345.6197, calcd. for [C₃₆H₄₅CuN₄O₂P₂]⁺ 690.2308 found [M-H]⁺ 690.2308, calcd. for [C₃₆H₄₆ClCuN₄O₂P₂]⁺ 726.2075 found [M+Cl]⁺ 726.2073

CAUTION! Perchlorate salts combined with organic ligands are potentially explosive and should be handled in small quantities and with the adequate precautions.

Potentiometric studies (Brest)

All solutions were prepared in ultrapure H₂O. The carbonate-free solutions of the KOH titrant and the HNO₃ titrant were prepared from a Fluka[®] Analytical ampoule diluted until 1L with ultrapure H₂O (freshly boiled for ca. 2h and allowed to cool down at room temperature under Ar_(g)). The titrant solutions were standardized using the Gran method upon titration of a standard HNO₃ solution.

The protonation constants of the ligands were determined by pH-potentiometric titrations carried out with a Metrohm 888 Titrando titration workstation using a Metrohm-6.0262.100 combined electrode. The ionic strength of the experimental solutions was kept at 0.10 ± 0.01 M with KNO₃ and the temperature was controlled at 25.0 ± 0.1 °C with a Lauda ecoline 003 circulating water bath. Atmospheric CO₂ was excluded from the titration cell during experiments by slightly bubbling purified nitrogen on the experimental solution. Titrant solutions were added through capillary tips by a Metrohm Dosimat 888 automatic burette. Titration procedure is automatically controlled by software after selection of suitable parameters.

Ligand solution was prepared at ca. 2.0 mM (1.93 mM after correction by titration), and the stock solution of Cu (II) was prepared at ca. 0.05 M from analytical grade nitrate salts and standardized by complexometric titrations with H₄EDTA following standard methods.^[218] Sample solutions for titrations contained approximately 0.05 mmol of ligand (**TE1PoPh₂**) in a volume of 30 mL. In complexation titrations, copper (II) was added at 1 equiv. of the ligand amount.

The electromotive force of the sample solutions was measured after calibration of the electrode by titration of a standard HNO₃ solution at 2.0 mM in the work conditions. The [H⁺] of the solutions was determined through the measurements of the electromotive force of the cell, $E = E^{o'} + Q \log[H^+] + E_j$. The pH is defined as $-\log[H^+]$. The terms $E^{o'}$ and Q were determined from the acidic pH region of the calibration curves. The liquid-junction potential, E_j , was negligible under the experimental conditions used and a value of $K_w = [H^+][OH^-]$ was found to be $10^{-13.78}$ through the titration of a solution of known [H⁺] at the same ionic strength in the alkaline pH region, and $E^{o'}$ and Q were considered to be valid for the entire pH range. Each titration consisted of 80-150 equilibrium points in the range pH 1.5-11.5, and at least two replicate titrations were performed for each particular system.

The potentiometric data were refined with the HYPERQUAD software^[219] and speciation diagrams were plotted using the HySS software.^[220]

During the titration with Cu (II), a precipitate was observed at pH > 7.5 so batch conditions were employed to confirm the range for the value of log K_{ML} . For that, 10 samples with 0.2 to

2.0 equiv. (by 0.2 equiv.) of Cu(II) at pH 3.0 were incubated during 24h at 25°C with 1 equiv. of **TE1PoPh₂**. After the incubation, each sample was measured by UV-Vis spectroscopy and treatment of the data by HypSpec software allows to have a value of log K_{ML} .

UV-Visible spectra for kinetic inertness studies (Brest)

UV-Visible spectra were recorded on a JASCO V-650 spectrometer using 1 cm cells of 700 μ L. The acid-assisted dissociation of [Cu(**TE1PoPh₂**)](ClO₄)₂ was studied under pseudo-first order conditions without control of ionic strength by addition of an ultrapure aqueous solution of HCl 1M (0.960 mL) with 2.6 mg of complex ($c = 4$ mM). Dissociation was followed by the decreasing intensity of the absorption band of the d-d transition (measure each hour). The data were fitted to a first order decreasing exponential equation on Excel of the form $A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty)e^{-kt}$, where A_t , A_∞ , and A_0 are the absorbance at time t , at the end of the reaction, and at the start of the reaction, with $k = \ln(2)/t_{1/2}$.

Study of the specificity of TE1PoPh₂ with copper (II) against other cations (Brest)

In order to study the specificity of **TE1PoPh₂** with copper(II), competition with other cations was carried out. Batch conditions were employed to have the same concentration in each experiment. The concentration of ligand was 2 mM in a total volume of 1.500 mL in acetate buffer (pH = 3.8). For each cation we studied the complexation only with **TE1PoPh₂**, in competition with copper(II) (stoichiometric amount), and with an excess of 5eq of the cation compared to copper(II). An experiment with a mixture of copper(II), zinc(II), nickel(II) and cobalt (II) was carried out. Spectra were recorded after incubation of batch at 25°C for 3 days.

Crystallographic data of [Cu(TE1PoPh₂)(H₂O)](ClO₄)₂

Empirical formula	C ₂₃ H ₃₇ Cl ₂ CuN ₄ O ₁₀ P
Formula weight	694.97
Temperature	193(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 _{1/c}
Unit cell dimensions	a = 10.7448(5) Å α = 90° b = 10.8926(5) Å β = 95.0270(19)° c = 24.6271(11) Å γ = 90°
Volume	2871.2(2) Å ³
Z	4
Density (calculated)	1.608 Mg/m ³
Absorption coefficient	1.064 mm ⁻¹
F(000)	1444
Crystal size	0.250 x 0.250 x 0.200 mm ³
θ range for data collection	2.668 to 30.578°
Index ranges	-15 ≤ h ≤ 15, -15 ≤ k ≤ 15, -34 ≤ l ≤ 35
Reflections collected	152267
Independent reflections	8777 [R(int) = 0.0452]
Completeness to θ = 30.578°	99.4 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.7395 and 0.7098
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	8777 / 0 / 390
Goodness-of-fit on F ²	1.089
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0377, wR2 = 0.0911
R indices (all data)	R1 = 0.0413, wR2 = 0.0929
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	0.521 and -0.437 e. Å ⁻³

Crystallographic data of [Cu(TE2PoPh2)](ClO4)2

Empirical formula	C ₃₆ H ₄₆ Cl ₂ CuN ₄ O ₁₀ P ₂	
Formula weight	891.15	
Temperature	193(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 14.285(2) Å	α = 83.977(4)°
	b = 20.713(3) Å	β = 79.927(4)°
	c = 25.129(4) Å	γ = 72.576(4)°
Volume	6974.0(19) Å ³	
Z	6	
Density (calculated)	1.273 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.706 mm ⁻¹	
F(000)	2778	
Crystal size	0.350 x 0.080 x 0.030 mm ³	
θ range for data collection	1.356 to 24.406°	
Index ranges	-16<=h<=16, -24<=k<=24, -29<=l<=29	
Reflections collected	162832	
Independent reflections	22862 [R(int) = 0.1744]	
Completeness to θ = 30.578°	99.6 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7452 and 0.6300	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data/restraints/parameters	22862 / 2180 / 1898	
Goodness-of-fit on F ²	1.020	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0716, wR2 = 0.1783	
R indices (all data)	R1 = 0.1489, wR2 = 0.2190	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.946 and -0.723 e. Å ⁻³	

RÉFÉRENCES

- [1] “Cancer today,” can be found under <http://gco.iarc.fr/today/home>, **2022**.
- [2] Fondation ARC, “Le cancer,” can be found under https://www.fondation-arc.org/sites/default/files/2021-12/Brochure_cancer_2021.pdf, **2021**.
- [3] T. Yousaf, G. Dervenoulas, M. Politis, in *International Review of Neurobiology* (Ed.: M. Politis), Academic Press, **2018**, pp. 31–76.
- [4] M. Unterrainer, C. Eze, H. Ilhan, S. Marschner, O. Roengvoraphoj, N. S. Schmidt-Hegemann, F. Walter, W. G. Kunz, P. M. af Rosenschöld, R. Jeraj, N. L. Albert, A. L. Grosu, M. Niyazi, P. Bartenstein, C. Belka, *Radiat Oncol* **2020**, *15*, 88.
- [5] P. J. Slomka, T. Pan, D. S. Berman, G. Germano, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *57*, 566–578.
- [6] C. F. Ramogida, C. Orvig, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4720.
- [7] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858–2902.
- [8] R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 581.
- [9] R. M. Izatt, Krystyna. Pawlak, J. S. Bradshaw, R. L. Bruening, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1721–2085.
- [10] E. de Kerviler, K. Maravilla, J.-F. Meder, O. Naggara, C. Dubourdieu, V. Jullien, P. Desché, *Invest Radiol* **2016**, *51*, 544–551.
- [11] W. P. Cacheris, S. K. Nickle, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 958–960.
- [12] K. Kumar, C. A. Chang, L. C. Francesconi, D. D. Dischino, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, M. F. Tweedle, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 3567–3575.
- [13] T. I. Kostelnik, C. Orvig, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 902–956.
- [14] C. B. Johnbeck, U. Knigge, A. Kjær, *Future Oncol.* **2014**, *10*, 2259–2277.
- [15] U. Hennrich, M. Benešová, *Pharmaceuticals (Basel)* **2020**, *13*, 38.
- [16] T. M. Jones-Wilson, K. A. Deal, C. J. Anderson, D. W. McCarthy, Z. Kovacs, R. J. Motekaitis, A. D. Sherry, A. E. Martell, M. J. Welch, *Nucl. Med. Bio.* **1998**, *25*, 523–530.
- [17] R. D. Hancock, A. E. Martell, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1875–1914.
- [18] R. D. Hancock, P. W. Wade, M. P. Ngwenya, A. S. De Sousa, K. V. Damu, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1968–1974.
- [19] E. T. Clarke, A. E. Martell, *Inorg. Chim. Acta* **1991**, *190*, 27–36.
- [20] A. E. Martell, R. J. Motekaitis, E. T. Clarke, R. Delgado, Y. Sun, R. Ma, *Supramol. Chem.* **1996**, *6*, 353–363.
- [21] 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**, *23*, 4829–4833.
- [22] L. M. P. Lima, D. Esteban-Gómez, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6916–6927.
- [23] T. Le Bihan, A.-S. Navarro, N. Le Bris, P. Le Saëc, S. Gouard, F. Haddad, J.-F. Gestin, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, R. Tripier, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4261–4271.
- [24] A.-S. Navarro, T. Le Bihan, P. Le Saëc, N. L. Bris, C. Bailly, C. Saï-Maurel, M. Bourgeois, M.

- Chérel, R. Tripier, A. Faivre-Chauvet, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 2393–2403.
- [25] S. Chatterjee, B. Behnam Azad, S. Nimmagadda, in *Advances in Cancer Research* (Eds.: M.G. Pomper, P.B. Fisher), Academic Press, **2014**, pp. 31–82.
- [26] H. Zhao, L. Guo, H. Zhao, J. Zhao, H. Weng, B. Zhao, *Oncotarget* **2014**, *6*, 5022–5040.
- [27] B. A. Teicher, S. P. Fricker, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2927–2931.
- [28] H. Tamamura, Y. Xu, T. Hattori, X. Zhang, R. Arakaki, K. Kanbara, A. Omagari, A. Otaka, T. Ibuka, N. Yamamoto, H. Nakashima, N. Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 877–882.
- [29] M. K. Kashyap, D. Kumar, H. Jones, C. I. Amaya-Chanaga, M. Y. Choi, J. Melo-Cardenas, A. Ale-Ali, M. R. Kuhne, P. Sabbatini, L. J. Cohen, S. G. Shelat, L. Z. Rassenti, T. J. Kipps, P. M. Cardarelli, J. E. Castro, *Oncotarget* **2015**, *7*, 2809–2822.
- [30] E. De Clercq, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1655–1664.
- [31] D. Uchida, N. Kuribayashi, M. Kinouchi, Y. Sawatani, M. Shimura, T. Mori, T. Hasegawa, Y. Miyamoto, H. Kawamata, *Oncology Reports* **2018**, *40*, 303–308.
- [32] N. Camus, Z. Halime, N. Le Bris, H. Bernard, C. Platas-Iglesias, R. Tripier, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1885–1899.
- [33] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 7.
- [34] M. Shokeen, C. J. Anderson, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 832–841.
- [35] H. A. Jahn, E. Teller, F. G. Donnan, *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.* **1937**, *161*, 220–235.
- [36] O. Laporte, W. F. Meggers, *J. Opt. Soc. Am.* **1925**, *11*, 459.
- [37] B. J. Hathaway, D. E. Billing, *Coord. Chem. Rev.* **1970**, *5*, 143–207.
- [38] R. Gillet, Synthèse et Caractérisation de Bispidines, Chélatants Du ^{64}Cu , En Vue d'applications Pour La Tomographie à Émission de Positrons, thesis, Strasbourg, **2017**.
- [39] D. F. Swinehart, *J. Chem. Educ.* **1962**, *39*, 333–335.
- [40] L. Quintanar, L. Rivillas-Acevedo, in *Protein-Ligand Interactions* (Eds.: M.A. Williams, T. Daviter), Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, pp. 267–297.
- [41] E. Garribba, G. Micera, *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 1229.
- [42] J. E. Wertz, J. R. Bolton, *Electron Spin Resonance*, Springer Netherlands, Dordrecht, **1986**.
- [43] R. D. Hancock, A. E. Martell, *Comments Inorg. Chem.* **1988**, *6*, 237–284.
- [44] R. A. Cottis, L. L. Shreir, G. T. Burstein, in *Shreir's Corrosion*, Elsevier, **2010**, pp. 1–12.
- [45] R. D. Hancock, *J. Chem. Educ.* **1992**, *69*, 615.
- [46] A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, *Coord. Chem. Rev.* **1991**, *110*, 17–113.
- [47] K. J. Powell, P. L. Brown, R. H. Byrne, T. Gajda, G. Hefter, S. Sjöberg, H. Wanner, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 895–950.
- [48] W. R. Harris, K. N. Raymond, F. L. Weigl, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2667–2675.
- [49] S. P. Kasprzyk, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 3349–3352.
- [50] M. G. Basallote, C. E. Castillo, M. A. Máñez, P. Lubal, M. Martínez, C. Rodríguez, J. Vaněk, *Inorg. Chem. Commun.* **2010**, *13*, 1272–1274.

- [51] M. Studer, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 2081–2086.
- [52] R. D. Shannon, *Acta Cryst.* **1976**, *A32*, 751–767.
- [53] L. E. Barrosse-Antle, A. M. Bond, R. G. Compton, A. M. O'Mahony, E. I. Rogers, D. S. Silvester, *Asian J. Chem.* **2010**, *5*, 202–230.
- [54] B. Bosnich, C. K. Poon, M. L. Tobe, *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1102–1108.
- [55] G. R. Weisman, E. H. Wong, D. C. Hill, M. E. Rogers, D. P. Reed, J. C. Calabrese, *Chem. Commun.* **1996**, 947.
- [56] E. W. Baumann, *J. Inorg. Nucl.* **1974**, *36*, 1827–1832.
- [57] E. Boros, C. L. Ferreira, J. F. Cawthray, E. W. Price, B. O. Patrick, D. W. Wester, M. J. Adam, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15726–15733.
- [58] E. Boros, J. F. Cawthray, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6279–6284.
- [59] A. Roux, A. M. Nonat, J. Brandel, V. Hubscher-Bruder, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 4431–4444.
- [60] C. F. G. C. Geraldes, M. C. Alpoim, M. P. M. Marques, A. D. Sherry, M. Singh, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3876–3881.
- [61] K. Wiegardt, U. Bossek, P. Chaudhuri, W. Herrmann, B. C. Menke, J. Weiss, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 4308–4314.
- [62] A. Riesen, M. Zehnder, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 2067–2073.
- [63] L. M. P. Lima, R. Delgado, M. G. B. Drew, P. Brandão, V. Félix, *Dalton Trans.* **2008**, 6593.
- [64] P. A. Tasker, L. Sklar, *J. Cryst. Mol. Struct.* **1975**, *5*, 329–344.
- [65] J. D. Silversides, C. C. Allan, S. J. Archibald, *Dalton Trans.* **2007**, 971.
- [66] D. N. Pandya, J. Y. Kim, J. C. Park, H. Lee, P. B. Phapale, W. Kwak, T. H. Choi, G. J. Cheon, Y.-R. Yoon, J. Yoo, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3517.
- [67] J. Chapman, D. Parker, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1992**, 9.
- [68] G. Royal, V. Dahaoui-Gindrey, S. Dahaoui, A. Tabard, R. Guillard, P. Pullumbi, C. Lecomte, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1971–1075.
- [69] M. I. Kabachnik, T. Y. Medved', Y. M. Polikarpov, B. K. Shcherbakov, F. I. Bel'skii, M. P. Pasechnik, *Russ Chem Bull* **1984**, *4*, 835–843.
- [70] I. M. Kabachnik, T. Ya. Medved', F. I. Bel'skii, S. A. Pisareva, *Russ Chem Bull* **1984**, *33*, 777–782.
- [71] I. Svobodová, P. Lubal, J. Plutnar, J. Havlíčková, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2006**, 5184–5197.
- [72] S. Füzarová, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, K. Binnemans, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2005**, 2908.
- [73] M. Ciampolini, L. Fabbrizzi, A. Perotti, A. Poggi, B. Seghi, F. Zanobini, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 3527–3533.

- [74] S. Brandès, C. Gros, F. Denat, P. Pullumbi, R. Guillard, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, *133*, 65–73.
- [75] C. Herrero, A. Quaranta, S. El Ghachtouli, B. Vauzeilles, W. Leibl, A. Aukauloo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 12067.
- [76] L. Fabbrizzi, F. Foti, M. Licchelli, P. M. Maccarini, D. Sacchi, M. Zema, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4965–4972.
- [77] W. Yang, C. M. Giandomenico, M. Sartori, D. A. Moore, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2481–2483.
- [78] 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.
- [79] N. Bernier, J. Costa, R. Delgado, V. Félix, G. Royal, R. Tripier, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 4514.
- [80] S. El Ghachtouli, C. Cadiou, I. Déchamps-Olivier, F. Chuburu, M. Aplincourt, T. Roisnel, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 3472–3481.
- [81] 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.
- [82] E. Molnár, N. Camus, V. Patinec, G. A. Rolla, M. Botta, G. Tircsó, F. K. Kálmán, T. Fodor, R. Tripier, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 5136–5149.
- [83] A. Filali, J.-J. Yaouanc, H. Handel, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 560–561.
- [84] cardinalhealth, “FDA-approved radiopharmaceuticals,” can be found under <https://www.cardinalhealth.com/>, **2022**.
- [85] M. A. Rosen, R. M. Jones, Y. Yano, T. F. Budinger, *J. Nucl. Med.* **1985**, *26*, 1424–1427.
- [86] M. Picchio, P. Castellucci, *Theranostics* **2012**, *2*, 313–317.
- [87] E. Boros, A. B. Packard, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 870–901.
- [88] J. Pellico, P. J. Gawne, R. T. M. de Rosales, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 3355–3423.
- [89] W.-T. K. Tsai, A. M. Wu, *J Labelled Comp Radiopharm* **2018**, *61*, 693–714.
- [90] F. Pene, E. Courtine, A. Cariou, J.-P. Mira, *Crit. care Med.* **2009**, *37*, S50–S58.
- [91] B. P. Burke, J. Seemann, S. J. Archibald, in *Advances in Inorganic Chemistry*, Elsevier, **2016**, pp. 301–339.
- [92] E. A. Lewis, R. W. Boyle, S. J. Archibald, *Chem. Commun.* **2004**, 2212.
- [93] D. N. Pandya, J. Y. Kim, W. Kwak, J. C. Park, M. B. Gawande, G. I. An, E. K. Ryu, J. Yoo, *Nucl Med Mol Imaging* **2010**, *44*, 185–192.
- [94] A. F. Prasanphanich, L. Retzlöff, S. R. Lane, P. K. Nanda, G. L. Sieckman, T. L. Rold, L. Ma, S. D. Figueroa, S. V. Sublett, T. J. Hoffman, C. J. Smith, *Nucl Med Biol* **2009**, *36*, 171–181.
- [95] D. N. Pandya, N. Bhatt, A. V. Dale, J. Y. Kim, H. Lee, Y. S. Ha, J.-E. Lee, G. I. An, J. Yoo, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1356–1366.
- [96] P. J. Riss, C. Kroll, V. Nagel, F. Rösch, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2008**, *18*, 5364–5367.
- [97] K.-P. Eisenwiener, P. Powell, H. R. Mäcke, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2000**, *10*, 2133–2135.
- [98] 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.

[99] K. Westerlund, H. Honarvar, E. Norrström, J. Strand, B. Mitran, A. Orlova, A. Eriksson Karlström, V. Tolmachev, *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1668–1678.

[100] T. J. McMurry, M. Brechbiel, K. Kumar, O. A. Gansow, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 108–117.

[101] B. E. Rogers, C. J. Anderson, J. M. Connett, L. W. Guo, W. B. Edwards, E. L. C. Sherman, K. R. Zinn, M. J. Welch, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 511–522.

[102] E. Lelong, J.-M. Suh, G. Kim, D. Esteban-Gómez, M. Cordier, M. H. Lim, R. Delgado, G. Royal, C. Platas-Iglesias, H. Bernard, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 10857–10872.

[103] E. Lelong, Modulation des peptides amyloïde- β par des chélates azotés pour la thérapie de la maladie d'Alzheimer, Université de Bretagne Occidentale, **2021**.

[104] G. Kim, E. Lelong, J. Kang, J.-M. Suh, N. L. Bris, H. Bernard, D. Kim, R. Tripier, M. H. Lim, *Inorg. Chem. Front.* **2020**, *7*, 4222–4238.

[105] N. Camus, Z. Halime, N. le Bris, H. Bernard, M. Beyler, C. Platas-Iglesias, R. Tripier, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 85898–85910.

[106] I. Tabushi, Y. Taniguchi, H. Kato, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1049–1052.

[107] G. Hervé, H. Bernard, N. Le Bris, J.-J. Yaouanc, H. Handel, L. Toupet, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6861–6864.

[108] E. A. Lewis, C. C. Allan, R. W. Boyle, S. J. Archibald, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3059–3062.

[109] M. Frindel, N. Camus, A. Rauscher, M. Bourgeois, C. Alliot, L. Barré, J.-F. Gestin, R. Tripier, A. Faivre-Chauvet, *Nucl. Med. Bio.* **2014**, *41*, e49–e57.

[110] M. Frindel, P. Le Saëc, M. Beyler, A.-S. Navarro, C. Saï-Maurel, C. Alliot, M. Chérel, J.-F. Gestin, A. Faivre-Chauvet, R. Tripier, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9272–9283.

[111] K. Bacon, M. Baggiolini, H. Broxmeyer, R. Horuk, I. Lindley, A. Mantovani, K. Maysushima, P. Murphy, H. Nomiyama, J. Oppenheim, A. Rot, T. Schall, M. Tsang, R. Thorpe, J. Van Damme, M. Wadhwa, O. Yoshie, A. Zlotnik, K. Zoon, *J. Interferon Cytokine Res.* **2002**, *22*, 1067–1068.

[112] M. Shirozu, T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara, T. Honjo, *Genomics* **1995**, *28*, 495–500.

[113] B. Combadière, C. Combadière, P. Deterre, *Med Sci* **2007**, *23*, 173–179.

[114] C. Laudanna, J. Y. Kim, G. Constantin, E. C. Butcher, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 37–46.

[115] J. J. Campbell, J. Hedrick, A. Zlotnik, M. A. Siani, D. A. Thompson, E. C. Butcher, *Science* **1998**, *279*, 381–384.

[116] T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, T. Kishimoto, *Nature* **1996**, *382*, 635–638.

[117] F. Balkwill, *Semin. Cancer Biol.* **2004**, *14*, 171–179.

[118] Y.-R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D. R. Littman, *Nature* **1998**, *393*, 595–599.

[119] K. Tachibana, S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K.

- Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, T. Nagasawa, *Nature* **1998**, *393*, 591–594.
- [120] Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy, E. A. Berger, *Science* **1996**, *272*, 872–877.
- [121] P. J. Klasse, *Cell. Microbiol.* **2012**, *14*, 1183–1192.
- [122] S. Lv, Y. Yang, S. Kwon, M. Han, F. Zhao, H. Kang, C. Dai, R. Wang, *Histopathology* **2014**, *64*, 701–712.
- [123] H. Hirata, Y. Hinoda, N. Kikuno, K. Kawamoto, A. V. Dahiya, Y. Suehiro, Y. Tanaka, R. Dahiya, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5056–5062.
- [124] F. Liu, R. Lang, J. Wei, Y. Fan, L. Cui, F. Gu, X. Guo, G. A. Pringle, X. Zhang, L. Fu, *Histopathology* **2009**, *54*, 741–750.
- [125] B. Rogister, *Transl. Cancer Res* **2017**, *6*, S388–S390.
- [126] S. Konoplev, G. Z. Rassidakis, E. Estey, H. Kantarjian, C. I. Liakou, X. Huang, L. Xiao, M. Andreeff, M. Konopleva, L. J. Medeiros, *Cancer* **2007**, *109*, 1152–1156.
- [127] F. Guo, Y. Wang, J. Liu, S. C. Mok, F. Xue, W. Zhang, *Oncogene* **2016**, *35*, 816–826.
- [128] S. K. Kumar, V. Rajkumar, R. A. Kyle, M. van Duin, P. Sonneveld, M.-V. Mateos, F. Gay, K. C. Anderson, *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*, 17046.
- [129] Y. Alsayed, H. Ngo, J. Runnels, X. Leleu, U. K. Singha, C. M. Pitsillides, J. A. Spencer, T. Kimlinger, J. M. Ghobrial, X. Jia, G. Lu, M. Timm, A. Kumar, D. Côté, I. Veilleux, K. E. Hedin, G. D. Roodman, T. E. Witzig, A. L. Kung, T. Hideshima, K. C. Anderson, C. P. Lin, I. M. Ghobrial, *Blood* **2007**, *109*, 2708–2717.
- [130] EMA, “Antibodies approved by European Medicines Agency,” can be found under <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/download-medicine-data>, **2022**.
- [131] M. R. Kuhne, T. Mulvey, B. Belanger, S. Chen, C. Pan, C. Chong, F. Cao, W. Niekro, T. Kempe, K. A. Henning, L. J. Cohen, A. J. Korman, P. M. Cardarelli, *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 357–366.
- [132] J. M. Strizki, J. D. Turner, R. G. Collman, J. Hoxie, F. González-Scarano, *J Virol* **1997**, *71*, 5678–5683.
- [133] M. J. Endres, P. R. Clapham, M. Marsh, M. Ahuja, J. D. Turner, A. McKnight, J. F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. N. C. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, J. A. Hoxie, *Cell* **1996**, *87*, 745–756.
- [134] T. Tanaka, H. Tsutsumi, W. Nomura, Y. Tanabe, N. Ohashi, A. Esaka, C. Ochiai, J. Sato, K. Itotani, T. Murakami, K. Ohba, N. Yamamoto, N. Fujii, H. Tamamura, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4374.
- [135] E. Inokuchi, S. Oishi, T. Kubo, H. Ohno, K. Shimura, M. Matsuoka, N. Fujii, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 477–480.
- [136] “Drug Approval Package: Mozobil (plerixa) Injection NDA 22311,” can be found under https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/022311s000TOC.cfm, **2022**.
- [137] A. R. Lam, S. Bhattacharya, K. Patel, S. E. Hall, A. Mao, N. Vaidehi, *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 139–147.

- [138] B. B. Azad, S. Chatterjee, W. G. Lesniak, A. Lisok, M. Pullambhatla, Z. M. Bhujwalla, M. G. Pomper, S. Nimmagadda, *Oncotarget* **2016**, *7*, 12344–12358.
- [139] H. Tamamura, K. Hiramatsu, M. Mizumoto, S. Ueda, S. Kusano, S. Terakubo, M. Akamatsu, N. Yamamoto, J. O. Trent, Z. Wang, S. C. Peiper, H. Nakashima, A. Otaka, N. Fujii, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3663–3669.
- [140] O. Jacobson, I. D. Weiss, D. O. Kiesewetter, J. M. Farber, X. Chen, *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1796–1804.
- [141] O. Jacobson, I. D. Weiss, L. P. Szajek, G. Niu, Y. Ma, D. O. Kiesewetter, J. M. Farber, X. Chen, *Theranostics* **2011**, *1*, 251–262.
- [142] O. Jacobson, I. D. Weiss, L. P. Szajek, G. Niu, Y. Ma, D. O. Kiesewetter, A. Peled, H. S. Eden, J. M. Farber, X. Chen, *J. Control. Release* **2012**, *157*, 216–223.
- [143] M. E. Mayerhoefer, M. Raderer, W. Lamm, V. Pichler, S. Pfaff, M. Weber, B. Kiesewetter, M. Hacker, L. Kazianka, P. B. Staber, H.-J. Wester, J. Rohrbeck, I. Simonitsch-Klupp, A. Haug, *Theranostics* **2021**, *11*, 567–578.
- [144] O. Demmer, E. Gourni, U. Schumacher, H. Kessler, H.-J. Wester, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1789–1791.
- [145] E. Gourni, O. Demmer, M. Schottelius, C. D’Alessandria, S. Schulz, I. Dijkgraaf, U. Schumacher, M. Schwaiger, H. Kessler, H.-J. Wester, *J Nucl Med* **2011**, *52*, 1803–1810.
- [146] Q. Li, *68Ga-Pentixafor PET/CT for the Subtyping Diagnosis of Primary Aldosteronism: A Prospective Diagnostic Accuracy Study*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.
- [147] A. Poschenrieder, M. Schottelius, M. Schwaiger, H. Kessler, H.-J. Wester, *EJNMMI Res* **2016**, *6*, 36.
- [148] M. Schottelius, T. Osl, A. Poschenrieder, F. Hoffmann, S. Beykan, H. Hänscheid, A. Schirbel, A. K. Buck, S. Kropf, M. Schwaiger, U. Keller, M. Lassmann, H.-J. Wester, *Theranostics* **2017**, *7*, 2350–2362.
- [149] Peking Union Medical College Hospital, *Comparison of 68Ga-Pentixather and 68Ga-Pentixafor PET/CT in Patients With Multiple Myeloma*, Clinicaltrials.Gov, **2022**.
- [150] R. S. Y. Wong, V. Bodart, M. Metz, J. Labrecque, G. Bridger, S. P. Fricker, *Mol Pharmacol* **2008**, *74*, 1485–1495.
- [151] K. S. Gudmundsson, D. Boggs, *Chemical Compounds*, **2008**, US20080171740.
- [152] R. Skerlj, G. Bridger, E. McEachern, C. Harwig, C. Smith, T. Wilson, D. Veale, H. Yee, J. Crawford, K. Skupinska, R. Wauthy, W. Yang, Y. Zhu, D. Bogucki, M. Di Fluri, J. Langille, D. Huskens, E. De Clercq, D. Schols, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2011**, *21*, 262–266.
- [153] H. An, T. Wang, V. Mohan, R. H. Griffey, P. Dan Cook, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3999–4012.
- [154] G. Bridger, R. Skerlj, A. Kaller, C. Harwig, D. Bogucki, T. Wilson, E. J. McEachern, B. Atsman, S. Nan, Y. Zhou, D. Schols, C. D. Smith, R. Di Fluri Maria, *Chemokine Receptor Binding Heterocyclic Compounds*, **2002**, WO 02/34745.

- [155] M. Vilches-Herrera, S. Werkmeister, K. Junge, A. Börner, M. Beller, *Catal. Sci. Technol.* **2014**, 4.
- [156] G. J. Pernía, J. D. Kilburn, J. W. Essex, R. J. Mortishire-Smith, M. Rowley, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10220–10227.
- [157] J. P. André, C. F. G. C. Geraldés, J. A. Martins, A. E. Merbach, M. I. M. Prata, A. C. Santos, J. J. P. de Lima, É. Tóth, *Eur. J. Chem.* **2004**, *10*, 5804–5816.
- [158] ONUSIDA, “Statistiques mondiales sur le VIH-Fiche d’information 2022,” can be found under https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_fr.pdf, **2022**.
- [159] OMS, “Principaux repères sur le VIH/sida,” can be found under <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>, **n.d.**
- [160] E. De Clercq, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 581–587.
- [161] C. Anda, A. Bencini, E. Berni, S. Ciattini, F. Chuburu, A. Danesi, C. Giorgi, H. Handel, M. Le Baccon, P. Paoletti, R. Tripier, V. Turcry, B. Valtancoli, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 2044–2053.
- [162] S. Develay, R. Tripier, M. Le Baccon, V. Patinec, G. Serratrice, H. Handel, *Dalton Trans.* **2005**, 3016–3024.
- [163] N. Bernier, M. Allali, R. Tripier, F. Conan, V. Patinec, S. Develay, M. Le Baccon, H. Handel, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 435–441.
- [164] S. El Ghachtouli, C. Cadiou, I. Déchamps-Olivier, F. Chuburu, M. Aplincourt, T. Roisnel, V. Turcry, V. Patinec, M. Le Baccon, H. Handel, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, *2008*, 4735–4744.
- [165] D. Schols, S. Struyf, J. V. Damme, J. A. Esté, G. Henson, E. D. Clercq, *J Exp Med* **1997**, *186*, 1383–1388.
- [166] E. K. Nichols, Institute of Medicine (U.S.), *Mobilizing against AIDS*, Cambridge, Mass. : Harvard University Press, **1989**.
- [167] E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, M. Baba, D. Schols, H. Nakashima, J. Balzarini, Z. Debyser, B. A. Murrer, D. Schwartz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 5286–5290.
- [168] E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, J. Balzarini, M. Witvrouw, K. De Vreese, Z. Debyser, B. Rosenwirth, P. Peichl, R. Datema, *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, *38*, 668–674.
- [169] L. O. Gerlach, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, T. W. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14153–14160.
- [170] S. Hatse, K. Princen, L.-O. Gerlach, G. Bridger, G. Henson, E. D. Clercq, T. W. Schwartz, D. Schols, *Mol Pharmacol* **2001**, *60*, 164–173.
- [171] M. M. Rosenkilde, L.-O. Gerlach, S. Hatse, R. T. Skerlj, D. Schols, G. J. Bridger, T. W. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 27354–27365.
- [172] L. O. Gerlach, J. S. Jakobsen, K. P. Jensen, M. R. Rosenkilde, R. T. Skerlj, U. Ryde, G. J. Bridger, T. W. Schwartz, *Biochemistry* **2003**, *42*, 710–717.
- [173] A. Khan, G. Nicholson, J. Greenman, L. Madden, G. McRobbie, C. Pannecouque, E. De Clercq, R. Ullom, D. L. Maples, R. D. Maples, J. D. Silversides, T. J. Hubin, S. J. Archibald, *J. Am. Chem. Soc.*

2009, *131*, 3416–3417.

- [174] O. Jacobson, I. D. Weiss, L. Szajek, J. M. Farber, D. O. Kiesewetter, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1486–1493.
- [175] S. Nimmagadda, M. Pullambhatla, K. Stone, G. Green, Z. M. Bhujwalla, M. G. Pomper, *Cancer Res* **2010**, *70*, 3935–3944.
- [176] I. D. Weiss, O. Jacobson, D. O. Kiesewetter, J. P. Jacobus, L. P. Szajek, X. Chen, J. M. Farber, *Mol Imaging Biol* **2012**, *14*, 106–114.
- [177] B. Burke, C. Miranda, R. Lee, I. Renard, S. Nigam, G. Clemente, T. D’huys, T. Ruest, J. Domarkas, J. Thompson, D. Schols, T. Hubin, C. Cawthorne, S. Archibald, *J Nucl Med* **2019**, 123–128.
- [178] D. B. Ramachary, C. Venkaiah, Y. V. Reddy, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5400–5406.
- [179] K. Princen, S. Hatse, K. Vermeire, E. De Clercq, D. Schols, *Cytometry* **2003**, *51A*, 35–45.
- [180] C. Pannecouque, D. Daelemans, E. De Clercq, *Nat Protoc* **2008**, *3*, 427–434.
- [181] R. Pauwels, J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter, E. De Clercq, *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309–321.
- [182] T. Chopra, S. Sasan, L. Devi, R. Parkesh, K. K. Kapoor, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *470*, 214704.
- [183] H. Lee, X. Wu, L. Sun, *Nanoscale* **2020**, *12*, 4187–4218.
- [184] S. D. McCann, S. S. Stahl, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1756–1766.
- [185] D. Denoyer, S. A. S. Clatworthy, M. A. Cater, in *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, E. Freisinger, R.K.O. Sigel), De Gruyter, Berlin, Boston, **2018**, pp. 469–506.
- [186] E. Atrián-Blasco, A. Conte-Daban, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 12750–12759.
- [187] A. Conte-Daban, M. Beyler, R. Tripier, C. Hureau, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8447–8452.
- [188] R. C. Knighton, T. Troadec, V. Mazan, P. Le Saëc, S. Marionneau-Lambot, T. Le Bihan, N. Saffon-Merceron, N. Le Bris, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, M. Elhabiri, L. J. Charbonnière, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 2634–2648.
- [189] C. Esmieu, D. Guettas, A. Conte-Daban, L. Sabater, P. Faller, C. Hureau, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 13509–13527.
- [190] A. Rakshit, K. Khatua, V. Shanbhag, P. Comba, A. Datta, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7916–7930.
- [191] R. C. J. Atkinson, V. C. Gibson, N. J. Long, A. J. P. White, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 7540–7546.
- [192] J. Fawcett, A. W. G. Platt, D. R. Russell, *Polyhedron* **2002**, *21*, 287–293.
- [193] A. W. G. Platt, *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *340*, 62–78.
- [194] W. Tsai, Y.-H. Liu, S.-M. Peng, S.-T. Liu, *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 415–421.
- [195] F. Hung-Low, K. K. Klausmeyer, *Polyhedron* **2010**, *29*, 1676–1686.
- [196] A. Kochel, *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 1379–1382.
- [197] D. V. Aleksanyan, Y. V. Nelyubina, A. O. Dmitrienko, I. S. Bushmarinov, Z. S. Klemenkova, V. A. Kozlov, *Polyhedron* **2015**, *85*, 295–301.
- [198] É. I. Sinyavskaya, L. V. Tsymbal, K. B. Yatsimirskii, S. A. Pisareva, T. Ya. Medved, M. I.

Kabachnik, *Russ Chem Bull* **1986**, 35, 160–165.

- [199] G. S. Tsebrikova, I. N. Polyakova, V. P. Solov'ev, I. S. Ivanova, I. P. Kalashnikova, G. E. Kodina, V. E. Baulin, A. Yu. Tsivadze, *Inorg. Chim. Acta* **2018**, 478, 250–259.
- [200] K. B. Yatsimirskii, M. I. Kabachnik, É. I. Sinyavskaya, L. V. Tsymbal, S. A. Pisareva, T. Ya. Medved', *Russ Chem Bull* **1988**, 37, 1874–1879.
- [201] M. I. Kabachnik, T. Y. Medved, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1952**, 83, 689–692.
- [202] E. K. Fields, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1528–1531.
- [203] G. Keglevich, E. Bálint, *Molecules* **2012**, 17, 12821–12835.
- [204] R. A. Cherkasov, V. I. Galkin, *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 857–882.
- [205] M. Meyer, L. Frémond, E. Espinosa, S. Brandès, G. Yves Vollmer, R. Guillard, *New J. Chem.* **2005**, 29, 1121.
- [206] J. Kotek, P. Lubal, P. Hermann, I. Císařová, I. Lukeš, T. Godula, I. Svobodová, P. Táborský, J. Havel, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 233–248.
- [207] D. G. Gilheany, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 1339–1374.
- [208] J. A. Dobado, H. Martínez-García, Molina, M. R. Sundberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8461–8471.
- [209] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, 178, 42–55.
- [210] F. Molton, *Magn Reson Chem* **2020**, 58, 718–726.
- [211] S. B. Rahardjo, K. P. Wainwright, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 255, 29–34.
- [212] A. P. Leugger, L. Hertli, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2296–2306.
- [213] A.-S. Navarro, Développement de Nouveaux Radiopharmaceutiques à Base de Cuivre-64 Pour Application Théranostique En Cancérologie, These de doctorat, Nantes, **2020**.
- [214] K. I. Rodriguez-Castro, F. J. Hevia-Urrutia, G. C. Sturniolo, *World J Hepatol* **2015**, 7, 2859–2870.
- [215] P. Faller, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2009**, 1080–1094.
- [216] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst A* **2015**, 71, 3–8.
- [217] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst C* **2015**, 71, 3–8.
- [218] G. Schwarzenbach, *Complexometric Titrations*, London, Methuen, **1969**.
- [219] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, 43, 1739–1753.
- [220] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311–318.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications

“Highly inert Cu(II) complexes of C-aryl bifunctional cyclam-picolinates with remarkable ^{64}Cu -labelling and biodistribution” in Chemical Communication (***Chem. Commun.***, 2023, **59**, 888-891) Julie Pineau, Luís M. P. Lima, Marie M. Le Roy, Séverine Marionneau-Lambot, Marie Cordier, Patricia Le Saëc, Jan Rijn Zeevaart, Cathryn H. S. Driver, Alain Faivre-Chauvet, Nathalie Le Bris and Raphaël Tripier

“Can small synthetic organic AMD070 analogues be efficient for targeted imaging of CXCR4 receptor overexpression in cancer cells ?” M. M. Le Roy, C. Métivier, H. Bouhsine, L. Rbah-Vidal, P. Le Saëc, M. Chérel, A. Faivre-Chauvet, T. Troadec and R. Tripier (submitted in Organic & Biomolecular Chemistry)

“C-aryl bifunctional cyclam-picolinate derivatives: improvement of biological uses without affecting Cu(II) coordination” J. Pineau, L. M. P. Lima, M. M. Le Roy, S. Marionnaud-Lambot, M. Cordier, P. Le Saëc, J. R. Zeevaart, C. H. S. Driver, A. Faivre-Chauvet, N. Le Bris and R. Tripier (submitted in Chemical Communications)

“Phosphine Oxide Fonctionnalized Cyclam as a Specific Copper(II) Chelator: Synthesis and Competition Coordination Studies” M. M. Le Roy, S. Héry, N. Saffon-Merceron, C. Platas Iglesias, T. Troadec and R. Tripier (Manuscript in writing)

Communication orale :

« « IMAGE'IN » Imagerie TEP *in vivo* des cancers, vectorisée par un antagoniste des récepteurs CXCR4 radiomarqués au cuivre-64 »

17^{ème} journée scientifique du réseau Vectorisation, Imagerie, Radiothérapies, Distanciel,
25 Mai 2021

“IMAGE'IN” *In vivo* PET imaging of cancers, targeted by an innovative ^{64}Cu -radiolabeled CXCR4 antagonist

Journée de l'école doctorale, Nantes, **4 Novembre 2021**

Imagerie ^{64}Cu -TEP ciblée de CXCR4 par des radiopharmaceutiques synthétiques combinant chélateur du cuivre et petites molécules

Colloque annuel de l'IBSAM, Brest, **9 Juin 2022**

Tracking CXCR4 with a small synthetic organic vector: chelator conjugation, ^{64}Cu radiolabeling and *in vivo* targeted-PET imaging

New Modalities in Cancer Imaging and Therapy, Erquy (France), **5-8 Octobre 2022**

Communication flash :

Imagerie ^{64}Cu -TEP *in vivo* des cancers, vectorisée par un antagoniste des récepteurs CXCR4
Colloque de l'Institut Brestois Santé-Agro-Matière (IBSAM), Distanciel, **8 Juin 2021**

[Prix de la meilleure présentation flash](#)

Communication par affiche :

In vivo ^{64}Cu -PET imaging of cancers, targeted by a CXCR4 receptor antagonist

Journée de l'Ecole Doctorale Matière, Molécule et Matériaux, Distanciel, **27 Mai 2021**

[Prix du meilleur poster](#)

Innovative ^{64}Cu -cyclam-based radiopharmaceuticals for cancer targeting PET imaging with a CXCR4 antagonist

Journées scientifiques de la SCF section Bretagne Pays de Loire, Rennes, **30 Septembre-1^{er} Octobre 2021**

Innovative ^{64}Cu -cyclam-based radiopharmaceuticals for cancer targeting PET imaging with a CXCR4 antagonist

16th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC-16), Grenoble, **17-21 Juillet 2022**

Titre : Dérivés du cyclam pour le ciblage du récepteur CXCR4 et la médecine nucléaire : synthèse, complexation et études biologiques

Mots clés : cyclam, CXCR4, cuivre-64, imagerie TEP, chimie de coordination, synthèse macrocyclique

Résumé : Ce travail de thèse a consisté en la synthèse et l'étude de nouveaux dérivés polyazamacrocycliques à la fois pour le ciblage spécifique de CXCR4 et le développement de nouveaux radiopharmaceutiques d'imagerie TEP au cuivre-64 en médecine nucléaire.

Le récepteur de chimiokine CXCR4 apparaît comme une cible d'intérêt grâce à sa surexpression dans une vingtaine de cancers ainsi que son implication dans l'entrée du VIH au sein des cellules saines.

L'étude bibliographique entreprise dans un premier temps a permis de mettre en évidence l'excellente adéquation entre le TE1PA, un cyclam monopicolinate, et le cuivre-64 pour le radiomarquage.

Par ailleurs, l'intérêt des petites molécules de

synthèse telles que l'AMD070 a également été mis en avant pour la reconnaissance du récepteur ciblé.

Deux nouveaux radiopharmaceutiques synthétiques associant le motif AMD070 et le TE1PA ont été développés avec succès permettant leurs études pour la reconnaissance de CXCR4.

En parallèle, l'accent a été porté sur la recherche de nouveaux inhibiteurs organiques de CXCR4 ainsi que des chélateurs spécifiques du cuivre (II) et du cuivre-64, grâce à la chimie des polyazamacrocycles. Ainsi, respectivement un bis-cyclam C-fonctionnalisé et des cyclams porteurs de fonctions oxyde de phosphine ont été synthétisés et les premières études menées à bien.

Title : Cyclam derivatives for CXCR4 receptor targeting and nuclear medicine: synthesis, complexation and biological studies

Keywords : cyclam, CXCR4, copper-64, PET imaging, coordination chemistry, macrocyclic synthesis

Abstract : This work consisted in the synthesis and study of new polyazamacrocyclic derivatives for the specific targeting of CXCR4 as well as the development of new copper-64 PET imaging radiopharmaceuticals in nuclear medicine.

The chemokine receptor CXCR4 appears to be a target of interest due to its overexpression in about twenty cancer types as well as its involvement in HIV entry into healthy cells.

The bibliographic study carried out in the first instance highlighted the excellent suitability of TE1PA, a cyclam monopicolinate, and copper-64 for radiolabeling.

Moreover, the interest of small synthetic

molecules such as AMD070 has been pointed out for the recognition of the targeted receptor.

Therefore, two novel synthetic radiopharmaceuticals combining AMD070 and TE1PA have been successfully developed allowing their study for the recognition of CXCR4.

In parallel, this work also focused on the search for new CXCR4 organic inhibitors as well as specific chelators of copper (II) and copper-64, thanks to polyazamacrocyclic chemistry. Thus, both a C-functionalized bis-cyclam and phosphine oxide functionalized cyclam were synthesized and their first studies carried out.