



HAL
open science

**Nouveaux complexes de lanthanides pour le
développement d'agents de contraste bimodaux
IRM/luminescence**

Gaylord Tallec

► **To cite this version:**

Gaylord Tallec. Nouveaux complexes de lanthanides pour le développement d'agents de contraste bimodaux IRM/luminescence. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV051 . tel-00637586

HAL Id: tel-00637586

<https://theses.hal.science/tel-00637586>

Submitted on 2 Nov 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Gaylord TALLEC

Thèse dirigée par **Marinella Mazzanti**

préparée au sein du **Laboratoire de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination, Service de Chimie Inorganique et Biologique, INAC, CEA Grenoble**

dans l'École Doctorale de Chimie et Science du Vivant

Nouveaux Complexes de Lanthanides pour le développement d'agent de contraste bimodaux IRM/luminescence

Thèse soutenue publiquement le **6 octobre 2011**,
devant le jury composé de :

Dr. Loïc CHARBONNIERE

Université de Strasbourg, Rapporteur

Pr. Jens HASSERODT

ENS- Université de Lyon, Rapporteur

Dr. Sarah CATOEN

Guerbet S.A., Examinatrice

Pr. Fabrice THOMAS

Université de Grenoble, Président

Dr. Pascal FRIES

CEA Grenoble, invité

Dr. Marinella MAZZANTI

CEA Grenoble, Directrice de thèse



Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination du CEA Grenoble dirigé par Pascale Maldivi, que je remercie pour m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie Marinella Mazzanti qui a dirigé cette thèse, pour m'avoir suivi pendant ses trois ans, pour avoir toujours été disponible et pour m'avoir transmis son enthousiasme pour la chimie des lanthanides. Ce sujet a été pour moi l'occasion d'élargir mon horizon chimique grâce à l'opportunité qu'elle m'a offerte à travers ce sujet de thèse.

Je voudrais remercier le professeur Jens Hasserodt et le docteur Loïc Charbonnière pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire en qualité de rapporteurs. Merci beaucoup pour le temps que vous avez pris pour lire et juger ce travail de thèse. Je remercie également le docteur Sarah Catoen et le professeur Fabrice Thomas pour l'intérêt qu'ils ont témoigné pour ce travail en acceptant de faire partie du jury de cette thèse.

Je souhaite remercier tout particulièrement Pascal Fries, dont l'aide a été très précieuse au cours de ces trois ans, que ce soit pour les interprétations théoriques des résultats expérimentaux, pour les différentes expériences de relaxométrie ainsi que pour la relecture attentive du manuscrit.

Je tiens à remercier Daniel Imbert pour les mesures de luminescence, ainsi que pour son aide pour la synthèse organique et les mesures de physico-chimie. Je tiens également à remercier Christelle Gâteau pour la synthèse des dérivés de la dpaa ainsi que pour son aide et ses conseils pour la synthèse organique en général. En grand merci à Lydia Plassais qui m'a beaucoup aidé pour le développement des synthèses des ligands basés sur le 1,4,7 triazacyclononane.

Je remercie Lothar Helm pour m'avoir accueilli quelques jours au sein de son équipe à Lausanne et pour son aide pour les mesures de RMN de l' ^{17}O . Un grand merci également à Hugues Jacquard pour m'avoir aidé au laboratoire pendant ces dix jours.

Un grand merci à Colette Lebrun pour l'ensemble des spectres de masse, son aide précieuse et sa gentillesse au quotidien.

Merci à Pierre-Alain Bayle pour toujours avoir pris le temps de m'aider pour les expériences de RMN, et pour m'avoir dépanné de nombreuses fois quand les spectromètres étaient capricieux !

Merci à Armelle Guillermo pour son aide et sa disponibilité pour les mesures de relaxométrie effectuées à 45 et 90 MHz.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont collaboré sur le projet des nano billes : Samuel Jorice, Peter Cherns, Wai L. Ling, Olivier Raccurt et Olivier Poncelet. Je tiens également à remercier Michel De Waard et son équipe pour les expériences IRM réalisées sur les rats. Enfin je tiens à remercier Didier Gasparutto et Christine Saint Pierre pour leur travail sur le greffage des nucléosides.

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

Je tiens enfin à remercier l'ensemble des personnes du laboratoire, qui permettent que l'ambiance soit si agréable et qui rendent le travail au quotidien un peu plus facile.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	4
Chapitre I : Introduction	11
Introduction	12
1. Généralité sur les lanthanides	12
1.1. Structure électronique	13
1.2. Propriétés des lanthanides	14
1.3. Les propriétés magnétiques et spectroscopiques des lanthanides.	15
2. L'IRM	17
2.1. Principe de l'IRM	17
2.2. Mécanisme de relaxivité des complexes de gadolinium	19
2.2.1. Temps de relaxation	19
2.2.2. Mécanisme de sphère interne (IS)	22
2.2.3. Mécanisme de sphère externe (OS)	25
2.2.4. Mécanisme de seconde sphère (SS)	26
2.2.5. Les paramètres influençant le mécanisme de sphère interne	27
2.3. Les agents de contrastes.	32
2.3.1. Les agents de contrastes commerciaux	32
2.3.1.1. Les agents de type T_1	33
2.3.1.2. Les agents de type T_2	40
3. Les complexes de lanthanides comme sondes luminescentes	44
3.1. Définitions	44
3.1.1. Fluorescence et phosphorescence	44
3.1.2. Rendement quantique	46
3.2. Les chromophores organiques	46
3.3. Les ions lanthanides et la luminescence en temps résolu	48
3.4.1. Différentes voies de sensibilisation	49
3.4.1.1. Effet d'antenne	49
3.4.1.2. Transferts par les bandes de transfert de charge	50
3.4.1.3. Sensibilisation par les métaux d.	51
3.4.1.4. Cas de l'ion Yb(III)	51
3.4.1.5. Les mécanismes de transfert	52
3.4.2. Conception de chélates de Ln(III) luminescents	54
4. Les agents bimodaux	56
4.1. Sondes IRM et fluorophores organiques	57
4.2. Sonde IRM et fluorophores inorganiques	60
4.2.1. Complexes de métaux de transition	60
4.2.2. Quantum dots	60
4.3. Nanoparticules bimodales : silices et polymères	63
4.3.1. Les silices	63
4.4. Ligand « bimodaux »	65
Contexte et objectif du travail	72
Bibliographie	76

Chapitre II : Synthèse des ligands	82
1. Conceptions des ligands	83
2. Les ligands basés sur le motif hydroxyquinoléine	85
3. Stratégie de synthèse	87
4. Synthèse et caractérisation des ligands à pivot azote central	90
4.1 Synthèse du H ₃ thqN-SO ₃	90
4.2 Synthèse du H ₄ dhqN-asp.....	92
4.3 Synthèse du H ₃ dhqN-gly	95
4.4 Synthèse du H ₃ dhqN-SO ₃	98
5. Synthèse et caractérisation des ligands à pivot 1,4,7-triazacyclononane	101
5.1 Synthèse du H ₃ dhqN-SO ₃	101
5.2 Synthèse du H ₃ dhqtcn-SO ₃	103
5.3 Synthèse du H ₃ hqtcn-SO ₃	106
6. Synthèse des ligands dérivés de la dpaa	108
5.4 Synthèse du dU2'PdpaH ₃	109
5.5 Synthèse du dU5PdpaH ₃ et du dU5EdpaH ₃	110
Chapitre III : Stabilité et relaxivité des complexes	115
1. Complexes de gadolinium dérivés du 1,4,7-triazacyclononane	116
1.1. Synthèse des complexes	119
1.2. Etude structurales en solutions	119
1.2.1. Etude RMN	119
1.2.1.1. Ligand H ₃ thqtcn-SO ₃	120
1.2.1.2. Ligand H ₃ dhqtcn-SO ₃	121
1.2.1.3. Ligand H ₃ hqtcn-SO ₃	125
1.2.2. Protonation des ligands et stabilité des complexes	126
1.3. Etude de la relaxivité des complexes	131
1.3.1. Relaxivité des complexes	131
1.3.1.1. [Gd(thqtcn-SO ₃)] ³⁻	131
1.3.1.2. [Gd(dhqtcn-SO ₃)(H ₂ O)] ³⁻ et [Gd(hqtcn-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	141
1.3.2. Influence des anions endogènes sur la relaxivité	151
1.3.3. Relaxivité avec l'albumine	153
1.3.4. Relaxivité dans avec le sérum	159
2. Complexes de gadolinium à azote central	162
2.1. Synthèse des complexes	162
2.2. Etude structurales en solutions	163
2.2.1. Etude RMN	163
2.2.1.1. Ligand H ₃ thqN-SO ₃	163
2.2.1.2. Ligand H ₃ dhqN-SO ₃	165
2.2.2. Protonation des ligands et stabilité des complexes	167
2.3. Etude de la relaxivité des complexes	170
2.3.1. Relaxivité des complexes	170
2.3.1.1. [Gd(dhqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻ et [Gd(thqN-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	170
2.3.2. Influence des anions endogènes sur la relaxivité	177
2.3.3. Relaxivité dans l'albumine	180
2.3.4. Relaxivité dans avec le sérum	181
2.3.5. Images IRM.....	183
3. Complexes de H ₃ dhqN-gly et H ₄ dhqN-asp	186
3.1. Etude structurales en solutions	186
3.1.1. Etude RMN	186

3.1.1.1.	Ligand H ₃ dhqN-gly	186
3.1.1.2.	Ligand H ₄ dhqN-asp	187
3.2.	Etude de la relaxivité des complexes	188
3.2.1.	Relaxivité des complexes	188
4.	Complexes dérivés de l'homosérine	189
	Bibliographie	195
<hr/>		
	Chapitre IV : Luminescence des complexes	200
1.	Complexes luminescents émettant dans le proche infra-rouge	201
2.	Complexes basés sur le chromophore 8-hydroxyquinoléine	203
2.1.1	[Ln(thqtcn-SO ₃)] ³⁻	205
2.1.2	[Ln(dhqtcn-SO ₃)(H ₂ O)] ³⁻	206
2.1.3	[Ln(hqtcn-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	209
2.2	Complexes basés sur le pivot azote central	211
2.2.1	[Ln(thqN-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	211
2.2.2	[Ln(dhqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻	213
3.	Complexes de lanthanides encapsulés dans des billes de silice	215
	Bibliographie	222
<hr/>		
	Conclusions et perspectives	225
<hr/>		
	Partie expérimentale	229
1.	Généralités	230
1.1.	Réactifs et solvant	230
1.2.	Chromatographies	230
1.2.1.	CCM et colonnes	230
1.2.2.	HPLC	230
1.3.	Caractérisation	231
2.	Synthèse des ligands	232
2.1.	Synthèse du ligand H ₃ hqtcn-SO ₃	232
2.2.	Synthèse du ligand H ₃ dhqtcn-SO ₃	235
2.3.	Synthèse du ligand H ₃ thqtcn-SO ₃	237
2.4.	Synthèse du ligand H ₃ dhqN-SO ₃	239
2.5.	Synthèse du ligand H ₃ dhqNgly	241
2.6.	Synthèse du ligand H ₄ dhqNasp	243
2.7.	Synthèse du ligand H ₃ thqN-SO ₃	244
3.	Synthèse des complexes	255
3.1.	Ligand H ₃ thqtcn-SO ₃	255
3.2.	Ligand H ₃ dhqtcn-SO ₃	256
3.3.	Ligand H ₃ thqN-SO ₃	257
3.4.	Ligand H ₃ dhqN-SO ₃	258
3.5.	Ligand N ₃ dpa	258
3.6.	Ligand dU2'Pdpa	259
3.7.	Ligand dU5Pdpa	259
3.8.	Ligand dU5Pdpa	260
4.	Méthodes analytiques	260
4.1.	Etudes potentiométriques	260
4.1.1.	Calibration de l'électrode	261
4.1.2.	Dosages	261
	Détermination des pKa du ligand	261

4.2. Mesures spectrophotométriques	262
4.3. Mesures de luminescence	262
4.4. Mesures de relaxométrie	263
Bibliographie	268
Résumé	269
Abstract	270

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une des techniques d'imagerie les plus puissantes utilisée cliniquement. Elle permet d'obtenir des images en trois dimensions avec une résolution de l'ordre du millimètre. L'IRM est non seulement la technique d'imagerie donnant les informations anatomiques les plus riches, mais elle permet également d'obtenir des informations sur l'organisation spatiale des vaisseaux cérébraux (angiographie IRM), sur l'architecture fine du tissu neuronal et ses changements à l'échelle microscopique (IRM de diffusion), ou la distribution du sang dans le cerveau (IRM fonctionnelle). Indispensable aux diagnostics de nombreuses pathologies comme les tumeurs, angiomes, ou accidents vasculaires, elle a également été le point de départ de toute l'étude du fonctionnement du cerveau. La recherche en neurosciences s'appuie en effet sur une observation en temps réel des variations de l'oxygénation du sang, qui met en avant les zones du cerveau stimulées.

L'IRM est basée sur la détection de signaux nucléaire générés par les protons soumis à un signal de radiofréquences (RF). Ce sont majoritairement les protons de l'eau contenus en grande quantité dans les tissus biologiques qui génèrent les signaux les plus intenses. Cependant, l'IRM reste limitée par sa faible sensibilité, et il est souvent nécessaire d'allonger les temps d'examen du patient pour améliorer le rapport signal sur bruit. C'est pour cette raison que dans la plupart des cas, l'injection par voie intraveineuse d'un produit de contraste est nécessaire. C'est dans cette optique que les agents de contrastes ont été développés. Les agents de contraste sont des composés paramagnétiques qui permettent d'accélérer la vitesse de relaxation des protons de l'eau dans les tissus et contribuent également à améliorer le contraste entre tissus sains et tissus malades.

Cependant, l'efficacité des agents de contrastes commerciaux restent faible et de nombreuses recherches sont menées dans le but d'améliorer leur sensibilité, mais aussi de mieux contrôler leur biodistribution, afin d'obtenir des agents de contraste spécifiques d'une cible biologique. L'ensemble des techniques d'imagerie visent désormais à apporter de cette façon une information au niveau moléculaire et non plus au niveau anatomique global, afin de pouvoir détecter des cancers naissants, de suivre l'expression des gènes ou encore de visualiser l'évolution temporelle d'un médicament dans l'organisme. Cependant, les techniques d'imagerie utilisées aujourd'hui cliniquement (rayons X, tomographie à émission de positron, IRM, imagerie optique) présentent toutes leurs propres limitations, si bien qu'aucune

technique ne semble apporter une information exhaustive. Des recherches tendent donc vers l'association de plusieurs techniques d'imagerie complémentaire. Des études associant notamment l'IRM et la tomographie par émission de positron (TEP) ont été menées dans ce sens.¹

Le travail de cette thèse s'inscrit dans cette tendance, en cherchant à étudier des systèmes qui soient à la fois viables pour l'IRM et l'imagerie optique. En effet cette dernière présente une grande sensibilité mais ne possède pas les mêmes qualités de résolution que l'IRM. Dans ce manuscrit, nous présenterons dans un premier chapitre les lanthanides et leurs propriétés magnétiques et de luminescence. Ce chapitre ne représente pas une revue exhaustive des applications des lanthanides, mais précise les directions des recherches dans ce domaine. Dans une seconde partie, nous nous intéresserons à la conception de nouveaux ligands pour la complexation des lanthanides. Nous rapporterons dans une troisième partie les propriétés de stabilité et de relaxivité des complexes de Gd(III) synthétisés. Enfin une dernière partie sera consacrée à l'étude des propriétés de luminescence des complexes de Nd(III) et d'Yb(III).

Terminons cette introduction par quelques considérations sur la théorie de l'efficacité de contraste d'un complexe donné de Gd^{3+} , mesurée par sa relaxivité, c'est-à-dire par l'augmentation de la vitesse de relaxation (des spins nucléaires) des protons de l'eau causée par l'ajout de 1 mM de ce complexe. Dans cette thèse, l'usage principal de la théorie est qualitatif. En effet, aux champs magnétiques $B_0 \geq 1.5$ T maintenant standards de l'IRM, la théorie connecte simplement²⁻⁵ la relaxivité à des paramètres moléculaires numériques du complexe que le chimiste peut optimiser en modifiant le ligand par synthèse. Ainsi, nous ferons continuellement appel aux variations de la relaxivité en fonction de ces paramètres du complexe pour guider nos synthèses de ligand et expliquer qualitativement les effets observés. Deuxièmement, la théorie fournit des formules mathématiques et des méthodes numériques, ainsi que leurs domaines de validité, pour calculer précisément la relaxivité en fonction des paramètres du complexe et en déterminer les valeurs par ajustement de la relaxivité théorique à l'expérience. Dans cette thèse expérimentale, nous limiterons à quelques cas particulièrement intéressants pour mener à bien cette caractérisation quantitative des complexes aux champs standards de l'IRM. En revanche, dans nous ne chercherons pas à interpréter la relaxivité à bas champ contrairement à une habitude ancienne encore très répandue, mais seulement justifiée jusqu'au début des années 2000 par une idée fautive^{6,7} sur

l'origine de la fluctuation ou relaxation des états de spin électronique de Gd^{3+} . En effet, l'ancien formalisme à bas champ est simple, mais ne donne qu'une vision quantitative erronée des processus et paramètres moléculaires à l'origine de la relaxivité. Le nouveau formalisme théorique rigoureux à mettre en œuvre est trop compliqué au regard de l'importance de l'information supplémentaire obtenue sur la relaxation électronique, d'impact généralement mineure sur la relaxivité aux champs standards de l'IRM qui nous intéressent.

- (1) Pichler, B. J.; Judenhofer, M. S.; Catana, C.; Walton, J. H.; Kneilling, M.; Nutt, R. E.; Siegel, S. B.; Claussen, C. D.; Cherry, S. R. In *J. Nucl. Med.*, 2006; Vol. 47; pp 639-647.
- (2) Caravan, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 512-523.
- (3) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Gadelle, A.; Gambarelli, S.; Delangle, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10401-10413.
- (4) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Seneque, O.; Cisnetti, F.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Delangle, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 7083-7093.
- (5) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Delangle, P. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 8770-8781.
- (6) Rast, S.; Fries, P. H.; Belorizky, E. *J. Chem. Phys.* **2000**, 113, 8724-8735.
- (7) Belorizky, E.; Fries, P. H.; Helm, L.; Kowalewski, J.; Kruk, D.; Sharp, R. R.; Westlund, P.-O. *J. Chem. Phys.* **2008**, 128, 052315.

Chapitre I : Introduction

Introduction	12
1. Généralité sur les lanthanides.....	12
1.1. Structure électronique.....	13
1.2. Propriétés des lanthanides	14
1.3. Les propriétés magnétiques et spectroscopiques des lanthanides.	15
2. L'IRM.....	17
2.1. Principe de l'IRM.....	17
2.2. Mécanisme de relaxivité des complexes de gadolinium	19
2.2.1. Temps de relaxation	19
2.2.2. Mécanisme de sphère interne (IS)	22
2.2.3. Mécanisme de sphère externe (OS).....	25
2.2.4. Mécanisme de seconde sphère (SS)	26
2.2.5. Les paramètres influençant le mécanisme de sphère interne	27
2.3. Les agents de contrastes.	32
2.3.1. Les agents de contrastes commerciaux	32
2.3.1.1. Les agents de type T_1	33
2.3.1.2. Les agents de type T_2	40
3. Les complexes de lanthanides comme sondes luminescentes.....	44
3.1. Définitions	44
3.1.1. Fluorescence et phosphorescence.....	44
3.1.2. Rendement quantique	46
3.2. Les chromophores organiques.....	46
3.3. Les ions lanthanides et la luminescence en temps résolu.....	48
3.4.1. Différentes voies de sensibilisation.....	49
3.4.1.1. Effet d'antenne	49
3.4.1.2. Transferts par les bandes de transfert de charge.....	50
3.4.1.3. Sensibilisation par les métaux d.	51
3.4.1.4. Cas de l'ion Yb(III)	51
3.4.1.5. Les mécanismes de transfert.....	52
3.4.2. Conception de chélates de Ln(III) luminescents	54
4. Les agents bimodaux	56
4.1. Sondes IRM et fluorophores organiques	57
4.2. Sonde IRM et fluorophores inorganiques	60
4.2.1. Complexes de métaux de transition.....	60
4.2.2. Quantum dots	60
4.3. Nanoparticules bimodales : silices et polymères.....	63
4.3.1. Les silices	63
4.4. Ligand « bimodaux ».....	65
Contexte et objectif du travail	72
Bibliographie	76

Introduction

1. Généralité sur les lanthanides

Les lanthanides sont les 15 éléments du tableau périodique (du lanthane au lutétium) de numéro atomique compris entre 57 et 71. Ils appartiennent à la première période du bloc f et se caractérisent par une configuration électronique de type $[\text{Xe}] 5d^0 6s^2 4f^{n+1}$ ou $[\text{Xe}] 5d^1 6s^2 4f^n$ (sauf le lanthane qui présente une configuration $[\text{Xe}] 5d^1 6s^2 4f^0$). La perte de trois électrons conduit à l'ion lanthanide trivalent qui est le degré d'oxydation le plus stable pour l'ensemble de la série.

1 H Hydrogène																	2 He Hélium														
3 Li Lithium	4 Be Béryllium											5 B Bore	6 C Carbone	7 N Azote	8 O Oxygène	9 F Fluor	10 Ne Néon														
11 Na Sodium	12 Mg Magnésium											13 Al Aluminium	14 Si Silicium	15 P Phosphore	16 S Soufre	17 Cl Chlore	18 Ar Argon														
19 K Potassium	20 Ca Calcium	21 Sc Scandium	22 Ti Titane	23 V Vanadium	24 Cr Chrome	25 Mn Manganèse	26 Fe Fer	27 Co Cobalt	28 Ni Nickel	29 Cu Cuivre	30 Zn Zinc	31 Ga Gallium	32 Ge Germanium	33 As Arsenic	34 Se Sélénium	35 Br Brome	36 Kr Krypton														
37 Rb Rubidium	38 Sr Strontium	39 Y Yttrium	40 Zr Zirconium	41 Nb Niobium	42 Mo Molybdène	43 Tc Technétium	44 Ru Ruthénium	45 Rh Rhodium	46 Pd Palladium	47 Ag Argent	48 Cd Cadmium	49 In Indium	50 Sn Étain	51 Sb Antimoine	52 Te Tellure	53 I Iode	54 Xe Xénon														
55 Cs Césium	56 Ba Baryum	57 La Lanthane	58 Ce Cérium	59 Pr Praséodyme	60 Nd Néodyme	61 Pm Prométhium	62 Sm Samarium	63 Eu Europium	64 Gd Gadolinium	65 Tb Terbium	66 Dy Dysprosium	67 Ho Holmium	68 Er Erbium	69 Tm Thulium	70 Yb Ytterbium	71 Lu Lutétium	72 Hf Hafnium	73 Ta Tantale	74 W Tungstène	75 Re Rhenium	76 Os Osmium	77 Ir Iridium	78 Pt Platine	79 Au Or	80 Hg Mercure	81 Tl Thallium	82 Pb Plomb	83 Bi Bismuth	84 Po Polonium	85 At Astaté	86 Rn Radon
87 Fr Francium	88 Ra Radium	89 La Lanthane	90 Ce Cérium	91 Pr Praséodyme	92 Nd Néodyme	93 Pm Prométhium	94 Pu Plutonium	95 Am Américium	96 Cm Curium	97 Bk Berkélium	98 Cf Californium	99 Es Einsteinium	100 Fm Fermium	101 Md Mendélévium	102 No Nobélium	103 Lw Lawrencium															

Tableau 1.1 Classification périodique des éléments chimiques

La très forte proximité des propriétés physiques et chimiques de l'Yttrium et du Scandium font que ces deux éléments sont souvent rapprochés des lanthanides. L'ensemble de ses 17 éléments constitue ainsi la famille dite des « terres rares ».

Les premiers minerais furent découverts en Suède par Cronstedt, en 1752, puis isolés par Gadolin (Suède, 1794) sous la forme d'un mélange d'oxydes appelé Ytterbia. Ce n'est qu'en 1842 que trois lanthanides (Y, Er, Tb) furent isolés de ce mélange.

Le terme de « terres rares » fait référence à la faible concentration de ces espèces dans les minerais. Cependant, ce qualificatif s'avère faux si l'on considère l'abondance sur Terre de ces éléments, de l'ordre de 0.08%, c'est-à-dire du même ordre que le zinc ou l'étain.

1.1. Structure électronique

Comme mentionné précédemment, la configuration électronique des lanthanides correspond au remplissage progressif de la couche 4f qui est blindée par les couches externes 5s² et 5p⁶.

Lanthanide	Configuration électronique
La	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ⁰
Ce	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹
Pr	[Xe] 5d ⁰ 6s ² 4f ³
Nd	[Xe] 5d ⁰ 6s ² 4f ⁴
Pm	[Xe] 5d ⁰ 6s ² 4f ⁵
Sm	[Xe] 5d ⁰ 6s ² 4f ⁶
Eu	[Xe] 5d ⁰ 6s ² 4f ⁷
Gd	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ⁷
Tb	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ⁹
Dy	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹⁰
Ho	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹¹
Er	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹²
Tm	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹³
Yb	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹⁴
Lu	[Xe] 5d ¹ 6s ² 4f ¹⁴

Tableau 1.2 Configuration électronique des lanthanides

Le degré d'oxydation normal des ions lanthanides est III, qui correspond à une configuration électronique de type [Xe] 5d⁰ 6s⁰ 4fⁿ mais quelques éléments ont la possibilité d'être stabilisés à un degré d'oxydation inférieur (II pour l'euporium, l'ytterbium et le samarium), ou supérieur (IV pour le cérium, le praséodyme et le terbium).

1.2. Propriétés des lanthanides

La particularité des lanthanides réside dans le fait qu'ils présentent des propriétés relativement proches, qui évoluent lentement du début à la fin de la période. L'augmentation de l'effet d'écran dû au nombre d'électrons de la sous-couche f est légèrement moins rapide que celle de la charge du noyau. Il en résulte une faible augmentation de la charge nucléaire et donc une diminution lente du rayon atomique sur la période (contraction des orbitales 5s et 5p). Cette diminution est appelé **contraction des lanthanides**.

Lanthanide	CN = 6	CN = 7	CN = 8	CN = 9	CN = 10	CN = 12
La	1.032	1.100	1.160	1.216	1.270	1.360
Ce	1.010	1.070	1.143	1.196	1.250	1.340
Pr	0.990		1.126	1.179		
Nd	0.983		1.109	1.163		1.270
Sm	0.958	1.020	1.079	1.132		1.240
Eu	0.947	1.010	1.066	1.120		
Gd	0.938	1.000	1.053	1.107		
Tb	0.923	0.980	1.040	1.095		
Dy	0.912	0.970	1.027	1.083		
Ho	0.901		1.015	1.072	1.120	
Er	0.890	0.945	1.004	1.062		
Tm	0.880		0.994	1.052		
Yb	0.868	0.925	0.985	1.042		
Lu	0.861		0.977	1.032		

Tableau 1.3 Rayons ioniques des lanthanides pour différents nombres de coordinations (CN) ¹

Les électrons 4f subissant un fort effet de blindage des couches externes du nuage électronique sont très peu sensibles à leur environnement chimique et ne peuvent pas former de liaisons covalentes. Dans les complexes de Ln(III), l'interaction métal-ligand est donc totalement décrite par un modèle purement ionique. De plus les lanthanides sont des acides durs dans la classification de Pearson² et interagiront de préférence avec des ligands durs contenant notamment des atomes d'oxygène donateurs (eau, carboxylates, phosphonates...). On parle de caractère « oxophile ». Les lanthanides sont également des acides forts au sens de Lewis, ce qui conduit à l'activation des protons présents sur les molécules d'eau coordonnées

aux cations métalliques ainsi qu'à la formation, à partir d'un pH de 6.5, d'espèces hydroxo $\text{Ln}(\text{OH})_3$ insolubles. Du fait de l'enfouissement des orbitales f au sein du nuage électronique, l'effet du champ cristallin est très faible comparé au couplage spin orbite (de l'ordre de 500 cm^{-1} contre 5000 à 30000 cm^{-1} pour les métaux d). Par conséquent deux niveaux d'énergie différents de J sont suffisamment éloignés en énergie pour être parfaitement séparés sur le spectre électronique. Ainsi, dans les complexes de lanthanides, les bandes d'absorption ne subissent pas l'élargissement vibrationnel dû aux ligands et sont, de ce fait, parfaitement résolues.

Cette faible influence du champ cristallin explique également la grande flexibilité des complexes de lanthanides que ce soit en terme de nombre de coordination ou de géométrie des complexes, puisqu'elle ne sera pas imposée par la direction des orbitales. Les ligands s'organisent donc autour du centre métallique de façon à minimiser l'énergie électrostatique et les interactions stériques répulsives. Le nombre de coordination le plus souvent observé est 8 ou 9 mais il peut varier de 6 à 12 (voir tableau 1.3). On observe souvent une décroissance du nombre de coordination sur la série (10 pour La^{3+} , 8 pour Lu^{3+}) qui est associée à la contraction des lanthanides.

1.3. Les propriétés magnétiques et spectroscopiques des lanthanides.

Les ions lanthanides $\text{Ln}(\text{III})$ sont tous paramagnétiques dans leur état fondamental, à l'exception du La (III) et Lu (III) de configuration respectives $4f^0$ et $4f^{14}$. Les transitions f-f sont théoriquement interdites par les règles de sélection électrique dipolaire (règle de Laporte et règle de sélection de spin). En pratique, le couplage des états électroniques avec des états vibrationnels et les mélanges de fonctions d'ondes de différents nombres quantiques J ou de différentes parités atténuent cette interdiction. Les ions lanthanides ont de ce fait un coefficient d'extinction molaire faible (entre 1 et $10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et certains ions présentent une durée de vie longue en luminescence. (Nd, Yb, Er, 10^{-4} - 10^{-2} s)

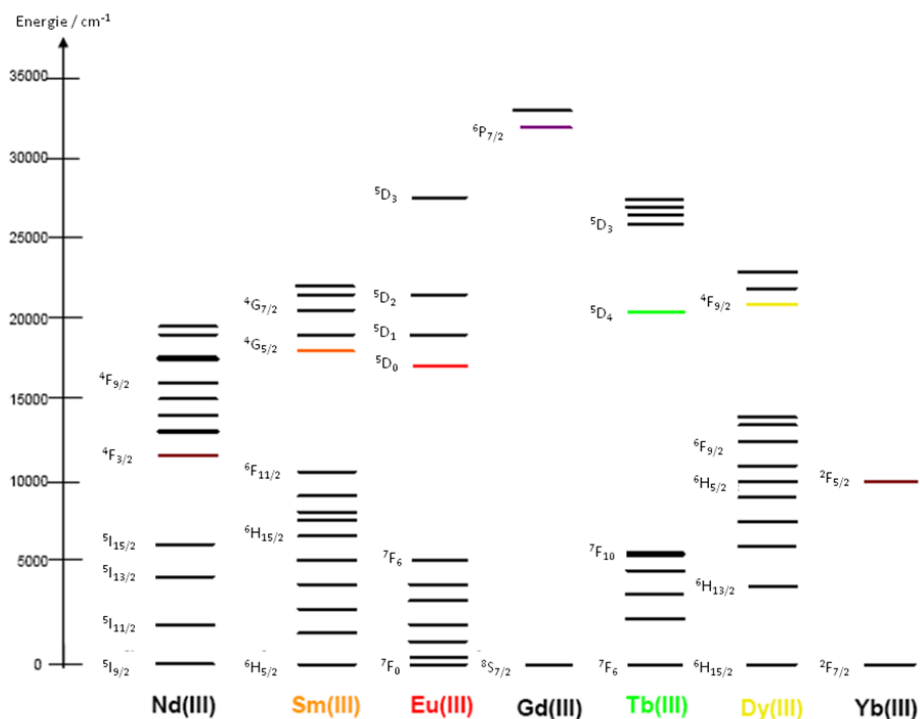


Figure 1.1 Diagramme partiel d'énergie pour les ions Ln(III) aqueux : niveaux fondamentaux et principaux niveaux luminescents (en couleur) ²

Comme mentionné précédemment (§ 1.2), le champ cristallin a peu d'influence sur les orbitales 4f. De ce fait, le ligand organique ne modifie pas la longueur d'onde d'émission du métal. De plus, la longueur d'onde d'absorption est quasiment monochromatique. La différence d'énergie entre le niveau excité et le niveau fondamental de l'ion Ln(III) conditionne l'efficacité du phénomène de luminescence. Plus l'écart d'énergie est grand et moins l'on risque de « désexciter » l'ion via un processus non radiatif.

Les ions Tb(III) et Eu(III) ont des temps de vie relativement long (de l'ordre de la milliseconde) émettent dans le visible (vert $\lambda = 550$ nm pour le terbium, rouge $\lambda = 620$ nm pour l'euporium). Ces ions sont les plus fréquemment utilisés dans des applications telles que les sondes luminescentes pour l'analyse et le diagnostic médical⁴. Dans une moindre mesure le Sm(III) et le Dy(III) (orange $\lambda=590$ nm, jaune-orangé $\lambda=570$ nm respectivement) sont également utilisés. Les ions émettant dans le proche infrarouge (Nd(III) $\lambda=1065$ nm, Er(III) $\lambda=1550$ nm, Yb(III) $\lambda=978$ nm) sont de plus en plus développés, notamment pour leur utilisation dans les lasers, dans les fibres optiques et les amplificateurs pour les télécommunications^{3,4}. Concernant les sondes luminescentes, leur utilisation permet de s'affranchir de l'absorption des tissus qui deviennent « transparents » aux longueurs d'onde supérieures à 900nm et donc d'explorer jusqu'à 20cm en profondeur contre seulement quelques centimètres pour ceux émettant dans le visible⁵. L'ion gadolinium n'est lui que peu

utilisé car son émission dans l'ultraviolet interfère avec les processus d'absorption ou d'émission des composés organiques et biologiques.

Cependant, le gadolinium se distingue parmi les lanthanides pour ses propriétés magnétiques. En effet ces sept électrons non appariés ($S=7/2$) lui confère un moment magnétique élevé et la symétrie de son état orbital S lui permet de présenter un temps de relaxation électronique long ($T_{1e} > 10^{-9}$ s) en comparaison avec d'autres lanthanides ($\sim 10^{-13}$ s pour Eu(III), Yb(III) et Dy(III))⁶. De ce fait, l'ion gadolinium est majoritairement utilisé dans les agents de contrastes pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

2. L'IRM

L'IRM (imagerie par résonance magnétique) est une technique d'imagerie qui fournit des images tridimensionnelles et en coupes à haute résolution (jusqu'à 0.1mm) avec un bon contraste. Cette technique est basée sur la mesure des signaux nucléaires générés par les protons soumis à un signal de radiofréquences (RF). Ce sont majoritairement les protons de l'eau contenus en grande quantité dans les tissus biologiques qui génèrent les signaux les plus intenses.

Découlant du principe de résonance magnétique nucléaire, décrit par Felix Bloch et Edward Mills Purcell en 1946, le développement de l'IRM va de pair avec les avancées faites dans le domaine de la RMN mais aussi dans celui du traitement informatique des données. Ainsi les progrès accomplis au cours des années 1970 conduiront à la première image d'un corps humain entier en 1979.

2.1. Principe de l'IRM

Le patient est soumis à un champ magnétique statique. Actuellement, des champs de 0.5 T à 3T sont couramment utilisés en milieu hospitalier. Un gradient linéaire de champ magnétique est également appliqué et permet l'encodage de la position de chaque noyau dans l'appareil d'imagerie. Ensuite, une impulsion radiofréquence est appliquée et la décroissance temporelle d'induction libre des spins nucléaires est mesurée (Figure 1.2). Pour rappel, le retour à l'équilibre de la composante de l'aimantation nucléaire M_z selon l'axe du champ magnétique suit une loi mono exponentielle avec une constante de temps T_1 , appelée temps de relaxation

longitudinale. De même, l'évolution de l'aimantation transversale M_T est caractérisée par une constante T_2 appelée temps de relaxation transversale.

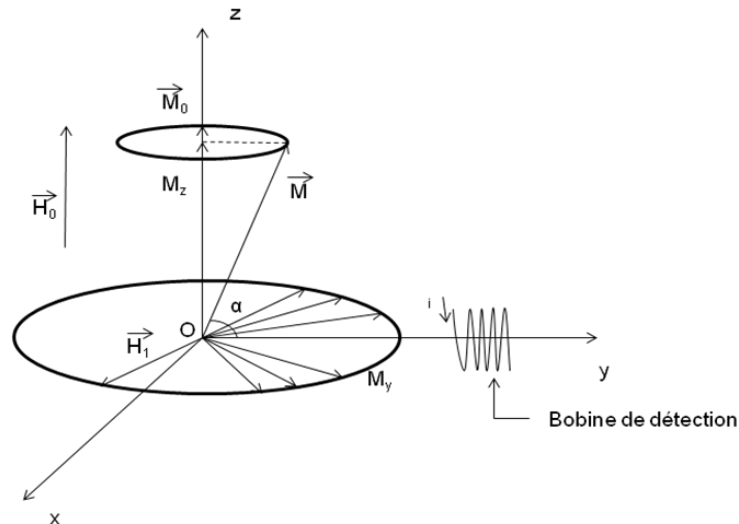


Figure 1.2 Changement d'aimantation du proton \vec{M} dans un champ constant \vec{H}_0 sous l'effet d'un champ magnétique d'excitation \vec{H}_1

L'intensité d'un élément de volume (un voxel c'est-à-dire un pixel 3D) dépend du temps de relaxation des protons de l'eau du tissu et elle est proportionnelle à leur concentration à l'endroit considéré. En effet, ce comportement de relaxation varie en fonction de l'environnement macromoléculaire des protons de l'eau. Ainsi il est possible de distinguer les différents tissus et leurs éventuelles altérations (notamment les tumeurs).

Tissus	sain T1 (ms)	Tumoral T1 (ms)
Foie	140-170	300-450
Pancréas	180-200	275-400
Rein	300-340	400-450
Prostate	250-325	350-400

Tableau 1.4 Temps de relaxation dans différents tissus sains et malades (1,7T)⁷

L'IRM est une technique d'imagerie qui permet une excellente résolution spatiale mais qui n'est malheureusement pas assez sensible dans la plupart des cas. Il est souvent nécessaire de procéder à de longues acquisitions pour réduire le rapport signal/bruit. Une autre possibilité consiste à injecter un agent de contraste paramagnétique qui va améliorer le contraste des

zones à analyser en augmentant les vitesses de relaxation longitudinale et transversale des protons à proximité. Ceci permet à la fois d'augmenter le contraste entre tissus sains et malades mais aussi de réduire le temps d'acquisition. L'efficacité d'un agent de contraste, autrement dit sa capacité à augmenter les vitesses de relaxation des protons des molécules d'eau environnantes, est appelée « relaxivité ».

2.2. Mécanisme de relaxivité des complexes de gadolinium

La relaxivité des protons des molécules d'eau résulte de la dynamique de ces molécules par rapport à l'ion Gd^{3+} complexé et de la fluctuation ou relaxation des états de spin électronique S de cet ion. L'objectif de cette section introductive est de présenter les principaux paramètres moléculaires du complexe que le chimiste doit optimiser en vue d'obtenir la relaxivité la plus élevée possible. C'est pourquoi, nous nous limitons dans cette section à l'approche standard qui est suffisante pour mettre en évidence ces paramètres et conduit à une formulation mathématique élémentaire de la relaxivité en fonction de ces paramètres dans la mesure où elle repose sur la modélisation la plus simple des processus. Au cours de cette thèse, certains de nos résultats nécessiteront d'aller au delà de l'approche standard et de faire appel à des notions plus élaborées⁸⁻¹⁰ que nous introduirons à cette occasion.

2.2.1. Temps de relaxation

La vitesse de relaxation longitudinale ou transversale d'un spin i au voisinage d'une espèce paramagnétique est la somme d'une contribution diamagnétique due à la relaxation des noyaux en l'absence de composé paramagnétique et d'une contribution paramagnétique, tel que décrit par I. Solomon et N. Bloembergen^{11,12}.

Equation 1.1

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

La contribution paramagnétique $(1/T_i)_{para}$ est désignée sous le nom d'augmentation paramagnétique de relaxation ou PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement). Elle est liée à la fluctuation temporelle de l'interaction entre le moment magnétique des électrons non

appariés de l'ion paramagnétique et le moment magnétique du noyau du proton. Trois mécanismes peuvent être à l'origine de cette PRE :

- un mécanisme de contact à travers les liaisons, associé à une polarisation de spin de la densité des électrons à l'emplacement du noyau ;
- un mécanisme de pseudo-contact à travers l'espace, correspondant à l'interaction dipolaire moyenne entre les moments magnétiques électronique et nucléaire ;

Dans le cas de l'interaction avec les protons de l'eau ($I=1/2$), seule l'interaction de pseudo-contact entre en jeu. Dans ce cas, la PRE est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce paramagnétique en solution^{11,12}. L'équation 1.1 devient donc :

Equation 1.2
$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{obs} = \left(\frac{1}{T_1}\right)_{dia} + r_i c \quad (i = 1,2)$$

Où r_i est la relaxivité de l'espèce paramagnétique considéré, c'est-à-dire son efficacité. La relaxivité est donc l'augmentation de vitesse de relaxation des protons résultant de l'ajout d'une millimole par litre de l'espèce paramagnétique donnée. Cette relaxivité est gouvernée par de nombreux paramètres que nous décrivons par la suite (§2.2.5).

La relaxation des protons dans des solutions contenant des espèces paramagnétiques est donc dominée par l'interaction dipolaire entre le spin nucléaire I des protons de l'eau et le spin électronique S des ions paramagnétiques. Cette interaction varie avec la distance entre I et S en r_{IS}^{-6} . Toute interaction chimique qui rapprochera les protons du centre paramagnétique contribuera donc à augmenter la vitesse de relaxation de ces protons. Dans le cas des complexes de gadolinium, cette augmentation de relaxivité peut passer par différents mécanismes :

- le principal mécanisme dit de sphère interne (mécanisme **inner sphere** (IS voir figure 1.3)) est obtenu par la coordination directe d'une ou plusieurs molécules d'eau au centre métallique. Ces molécules d'eau s'échange ensuite rapidement avec les molécules d'eau libre de la solution, permettant de propager l'augmentation de vitesse de relaxation au sein de la solution.

- Le mécanisme dit de sphère externe ou **outer sphere** (OS). Les molécules d'eau à proximité du centre métallique (bien que non coordonnées), subissent également l'effet du paramagnétisme modulé par des mécanismes de diffusions translationnelles.
- Le mécanisme de seconde sphère ou **Second Sphere** (SS). Les molécules d'eau coordonnées en seconde sphère c'est-à-dire non directement liés au centre métallique mais associées via des liaisons faibles de type liaisons hydrogènes avec le ligand et s'échangeant avec les molécules d'eau libre.

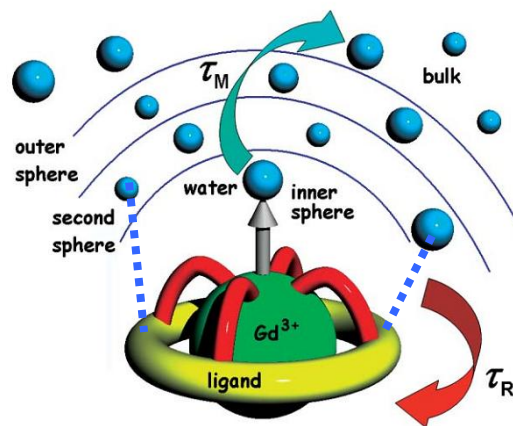


Figure 1.3 Représentation schématique d'un complexe de gadolinium en solution¹³

L'augmentation paramagnétique de relaxation est alors la somme de trois termes (équation 1.3), de même que la relaxivité associée (équation 1.4) :

Equation 1.3
$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} = \left(\frac{1}{T_i}\right)^{IS} + \left(\frac{1}{T_i}\right)^{OS} + \left(\frac{1}{T_i}\right)^{SS} \quad (i = 1,2)$$

Equation 1.4
$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} + r_i^{SS} \quad (i = 1,2)$$

2.2.2. Mécanisme de sphère interne (IS)

Le mécanisme de sphère interne, aussi appelé inner-sphere (IS), contribue à l'augmentation de la vitesse de relaxation des protons de l'eau grâce à la propagation des effets de la très grande vitesse de relaxation (typiquement 10^5 s^{-1}) du petit nombre de protons des molécules d'eau coordonnant l'ion métallique au très grand nombre de protons des molécules d'eau libre par échange chimique entre ces deux types de molécules d'eau. Ce mécanisme est décrit par la théorie de Solomon, Bloembergen, Morgan (SBM) qui repose sur les approximations suivantes ¹⁴:

- le moment magnétique du spin électronique S de l'ion magnétique est assimilé à un dipôle ponctuel au centre de cet ion,
- le facteur de Landé de S est isotrope,
- la rotation Brownienne du complexe est supposée isotrope même si le complexe ne l'est pas,
- les fonctions de corrélation associées à la dynamique de rotation des molécules d'eau coordonnées accompagnant le complexe et à l'échange de ces molécules ont des décroissances mono-exponentielles de temps de corrélation τ_R et τ_m ,
- seule est prise en compte la levée de dégénérescence fluctuante des niveaux électroniques du multiplet fondamental de spin S due aux distorsions - vibrations du ligand.

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

Equation 1.5

$$\frac{1}{T_1^{IS}} = \frac{qP_m}{T_{1m} + \tau_m} = \frac{c}{55.5} \frac{q}{T_{1m} + \tau_m}$$

Où P_m est la fraction molaire de molécules de solvant directement lié au cation métallique, q le nombre de molécules d'eau directement lié par centre métallique, τ_m le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la première sphère de coordination ^{15,16} et T_{1m} le temps de relaxation longitudinale d'une molécule d'eau si elle était coordonnée de façon permanente au gadolinium.

A priori la relaxation des protons de l'eau liée est gouvernée par une interaction dipôle-dipôle et une interaction scalaire ou de contact, toutes deux dépendantes du champ magnétique. Le Gd(III) formant des liaisons de nature ionique avec l'oxygène de l'eau chargé négativement, les protons se trouvent relativement éloignés du centre paramagnétique et l'interaction de contact est négligeable¹⁷. Le temps de relaxation des protons de l'eau liée peut donc, dans une bonne approximation, être considéré comme dépendant uniquement de l'interaction dipolaire.

Le temps de relaxation est donné par les équations de Solomon-Bloembergen modifiées^{11,12} :

Equation 1.6
$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r_{GdH}^6} \left[\frac{3\tau_{c1}}{(1+\omega_I^2\tau_{c2}^2)} + \frac{7\tau_{c2}}{(1+\omega_S^2\tau_{c2}^2)} \right]$$

Avec :

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

Ces deux derniers termes (τ_{c1} et τ_{c2}) sont définis de la manière suivante

Equation 1.7
$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m}$$

Plusieurs facteurs peuvent moduler l'interaction entre les deux spins : le temps de corrélation rotationnelle du complexe (τ_R), le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la première sphère de coordination (τ_m) et le temps de relaxation électronique longitudinale et transversale du Gd(III) T_{1e} et T_{2e} respectivement.

Notons que les deux termes entre crochets de l'équation 1.6 sont responsables d'une baisse importante de la relaxivité à haut champ ($\omega_I^2\tau_{c2}^2 > 1$).

Comme les temps de relaxation nucléaire, les temps de relaxation électronique varient en fonction du champ magnétique. Pour les complexes de Gd(III), T_{1e} est lié à la modulation temporelle de la levée de dégénérescence des niveaux électroniques de spin du Gd(III) («Zero Field Splitting » ou ZFS). Une description précise fait intervenir deux contributions : d'une part la fluctuation moyenne du ZFS (ZFS statique) causée par la rotation brownienne du champ moyen du ligand accompagnant celle du complexe dans le référentiel moléculaire et d'autre part celle liée aux vibrations du champ de ligand (ZFS transitoire ou transient)¹⁸. Une description simplifiée, prenant en compte uniquement la partie vibratoire du ZFS, est donnée par la théorie de Bloembergen et Morgan (équations I. 8 à I. 10)^{12,19} :

Equation 1.8
$$\frac{1}{T_{1s}} = 2C \left(\frac{1}{1+\omega_S^2\tau_v^2} + \frac{4}{1+4\omega_S^2\tau_v^2} \right)$$

Equation 1.9
$$\frac{1}{T_{2s}} = C \left(\frac{5}{1+\omega_S^2\tau_v^2} + \frac{2}{1+4\omega_S^2\tau_v^2} + 3 \right)$$

Equation 1.10
$$C = \frac{1}{50} \Delta_T^2 \tau_v [4S(S+1) - 3]$$

Avec :

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

Δ_T^2 et τ_v sont reliés au temps de relaxation électronique à champ nul τ_{S0} par la relation suivante :

Equation 1.11
$$\frac{1}{\tau_{S0}} = \frac{1}{5} \Delta_T^2 \tau_v [4S(S+1) - 3]$$

L'ensemble de ces équations constitue la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) de la relaxivité de sphère interne.

A partir de cette description théorique, il est possible d'isoler les facteurs qui influent sur la relaxivité de sphère interne, à savoir :

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

2.2.3. Mécanisme de sphère externe (OS)

L'augmentation de relaxivité due au mécanisme de sphère externe est provoquée par l'interaction dipolaire entre le spin nucléaire et le spin électronique lorsque les molécules d'eau sont à proximité du centre paramagnétique. Les paramètres à prendre en compte pour cette interaction sont :

- la distance minimale d'approche entre le centre métallique et le proton d'une molécule d'eau libre a_{GdH}
- le coefficient de diffusion de la molécule d'eau par rapport au complexe D.

Le temps caractéristique sera un temps de corrélation diffusionnelle tel que $\tau_D = a_{\text{GdH}}^2/D$. Le temps de relaxation de sphère externe est donné par :

Equation 1.12
$$\frac{1}{T_{1OS}} = \frac{8\pi}{5} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \left[j\left(\frac{1}{T_{1e}} + i\omega_I\right) + \frac{7}{3} j\left(\frac{1}{T_{2e}} + i\omega_S\right) \right]$$

Avec :

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

La densité spectrale $j(\sigma)$ est la transformée de Fourier des fonctions de corrélation temporelle τ_D et τ_v (associées à T_{1e}). Une expression simple existe pour ces densités spectrales dans le cadre du modèle de Gd(III) et de protons aux centres de sphères dures (les interactions électrostatiques ou spécifiques ne sont pas prises en compte) :

Equation 1.13
$$j(\sigma) = \frac{10^{-6} N_A c}{D a_{GdH}} Re \left[\frac{4+x}{3(9+9x+4x^2+x^5)} \right] \text{ avec } x \equiv \sqrt{\sigma \tau_D}$$

Avec :

- c la concentration en espèce paramagnétique en mM ;
- N_A le nombre d'Avogadro ;
- D le coefficient de diffusion relatif d'une molécule d'eau par rapport au complexe
($D = D_I + D_S$) ;
- a_{GdH} la distance minimale d'approche entre un proton d'une molécule d'eau diffusant librement et l'ion paramagnétique.

L'ensemble de ces équations (1.12-1.13) représente le modèle de Ayant-Belorisky Hwang-Freed (ABHF)²⁰⁻²⁴.

Cette contribution est typiquement de l'ordre de 2 à 3 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 25°C et à 20 MHz (0.5 T)²⁵.

2.2.4. Mécanisme de seconde sphère (SS)

Les molécules d'eau de seconde sphère présentent des interactions (majoritairement des liaisons hydrogène) avec le ligand et ne peuvent, de ce fait, être assimilées à des sphères dures et traitées par un modèle purement diffusionnel. Une approche similaire à la modélisation de phénomène « inner sphere » a donc été développée^{25,26}.

Le terme de seconde sphère n'est pas bien approprié car il ne désigne pas une sphère complète mais seulement les molécules d'eau à proximité du centre paramagnétique. En première approximation, la contribution de seconde sphère est calculée comme celle de sphère interne en ajustant toutefois la vitesse d'échange τ'_M et la distance r'_{GdH} . Il faut noter que l'orientation des molécules n'est pas la même en seconde sphère qu'en sphère interne. Dans ce cas, ce sont les protons qui sont plus proches du cation métallique plutôt que les oxygènes.

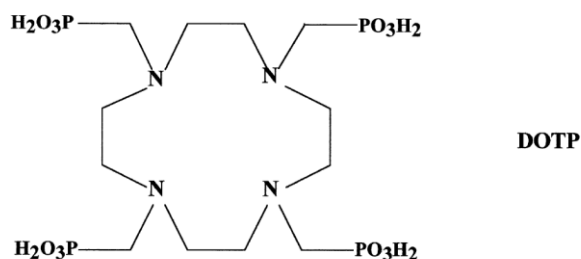


Figure 1.4 Représentation du ligand DOTP. Son complexe de gadolinium présente une relaxivité de $4.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, principalement due aux molécules d'eau de seconde sphère²⁷.

2.2.5. Les paramètres influençant le mécanisme de sphère interne

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux paramètres ont une influence directe sur la relaxivité de sphère interne d'un complexe donné. Pour optimiser le design de ligands adaptés aux phénomènes régissant la relaxivité, il est nécessaire de prendre en compte chacun de ces paramètres et de savoir de quelle façon peuvent être reliées la structure du complexe et la variation de ces différents paramètres.

- Le nombre de molécules d'eau coordonnées en sphère interne q

La relaxivité de sphère interne est directement proportionnelle au nombre de molécules d'eau coordonnées en première sphère (équation 1.5). En modifiant la denticité du ligand utilisé pour complexer l'ion gadolinium, il semble facile d'augmenter la relaxivité d'un complexe. Cependant, l'augmentation du nombre de molécules d'eau coordonnées en première sphère a également des inconvénients. La denticité réduite du ligand va notamment entraîner une stabilité thermodynamique et/ou cinétique plus faible du complexe, ce qui augmentera sa toxicité biologique en tant qu'agent de contraste. De plus, le complexe sera plus sensible à la coordination d'anions endogènes (carbonates, phosphates, oxalates, citrates...) qui pourront remplacer une ou plusieurs molécules d'eau dans la sphère de coordination et, de ce fait, faire chuter complètement la relaxivité d'un tel complexe.

La recherche d'une amélioration franche de la relaxivité ainsi que le besoin d'agents de contraste efficaces à plus haut champ a conduit à la publication d'architectures nouvelles susceptibles d'apporter une stabilité suffisante à ces complexes. Parmi les nouveaux ligands développés pour obtenir des complexes bis aqua, nous pouvons citer le ligand AAZTA²⁸ (figure 1.5) dont le complexe de Gd(III) a démontré une stabilité proche de celle du DTPA

($pGd = 19.26$). En plus de cette stabilité particulièrement intéressante, le $[Gd(AAZTA)(H_2O)_2]$ présente une relaxivité élevée ($7.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20 MHz, 25°C), et cette relaxivité n'est pas altérée par la présence d'anions endogènes en solution.

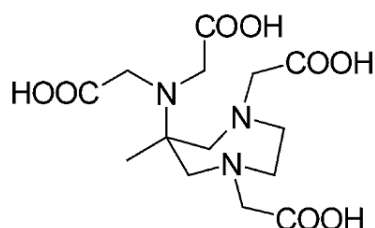


Figure 1.5 Le ligand AAZTA conduisant à des complexes de Gd(III) bis aqua

Une autre famille de composés possédant plusieurs molécules d'eau en première sphère de coordination à avoir soulevé un intérêt particulier est la famille des dérivés de Gd-HOPO (hydroxypyridinone) développée par le groupe de K. Raymond.

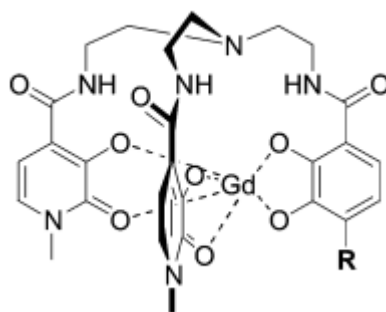


Figure 1.6 Exemples de complexe de la famille des dérivés de Gd-HOPO : complexes Gd-TREN-bisHOPO-TAM

Un des premiers complexes développés dans cette famille, le Gd-TREN-Me-3,2-HOPO, présente deux molécules d'eau en première sphère de coordination et la valeur de sa relaxivité à 20 MHz et à 25°C est particulièrement élevée ($r_1 = 9.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)²⁹. Cependant, la solubilité faible de ce complexe a conduit les auteurs à modifier sa structure pour lui apporter plus de solubilité. Ainsi des complexes présentant un bras TAM (figure 1.6) ont été synthétisés et différents types de substituants ont été greffés pour apporter une solubilité supplémentaire^{30,31}. Cette stratégie a conduit à la synthèse de complexes $q = 2$ et $q = 3$, possédant des relaxivités comprises entre 7.3 et $13.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Les complexes dérivés de HOPO présentent également

des stabilités thermodynamiques particulièrement intéressantes (pGd compris entre 17 et 20), et s'avèrent également peu sensibles à la complexation des anions.

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

La relaxivité de sphère interne (IS) diminue rapidement avec la distance Gd-proton (en $1/r^6$, équation 1.6). Une faible variation de ce paramètre a donc une influence importante sur la valeur de la relaxivité : une augmentation de 0.1 Å de cette distance conduit à une diminution de relaxivité de 20%. Cependant, des études ont montré que l'on a $r_{\text{GdH}} = 3.1 \pm 0.1$ Å pour de nombreux complexes sans corrélation évidente avec la nature du ligand, de sorte que l'on ne cherche pas à optimiser ce paramètre difficile à maîtriser expérimentalement.

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

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

Cet échange peut être décrit suivant trois types de mécanismes³²:

- un mécanisme de type dissociatif D, au cours duquel une molécule d'eau quitte d'abord la première sphère de coordination (passant par un complexe intermédiaire de coordination réduite) avant d'être remplacée par une autre molécule d'eau.
- Un mécanisme de type associatif A, où une molécule d'eau supplémentaire vient se coordonner avant le départ d'une autre molécule d'eau déjà présente sur le cation métallique.
- Un mécanisme intermédiaire I, dans lequel aucun intermédiaire cinétique ne peut être identifié. On distinguera deux variantes I_a et I_d , selon l'étape cinétiquement limitante (association ou dissociation).

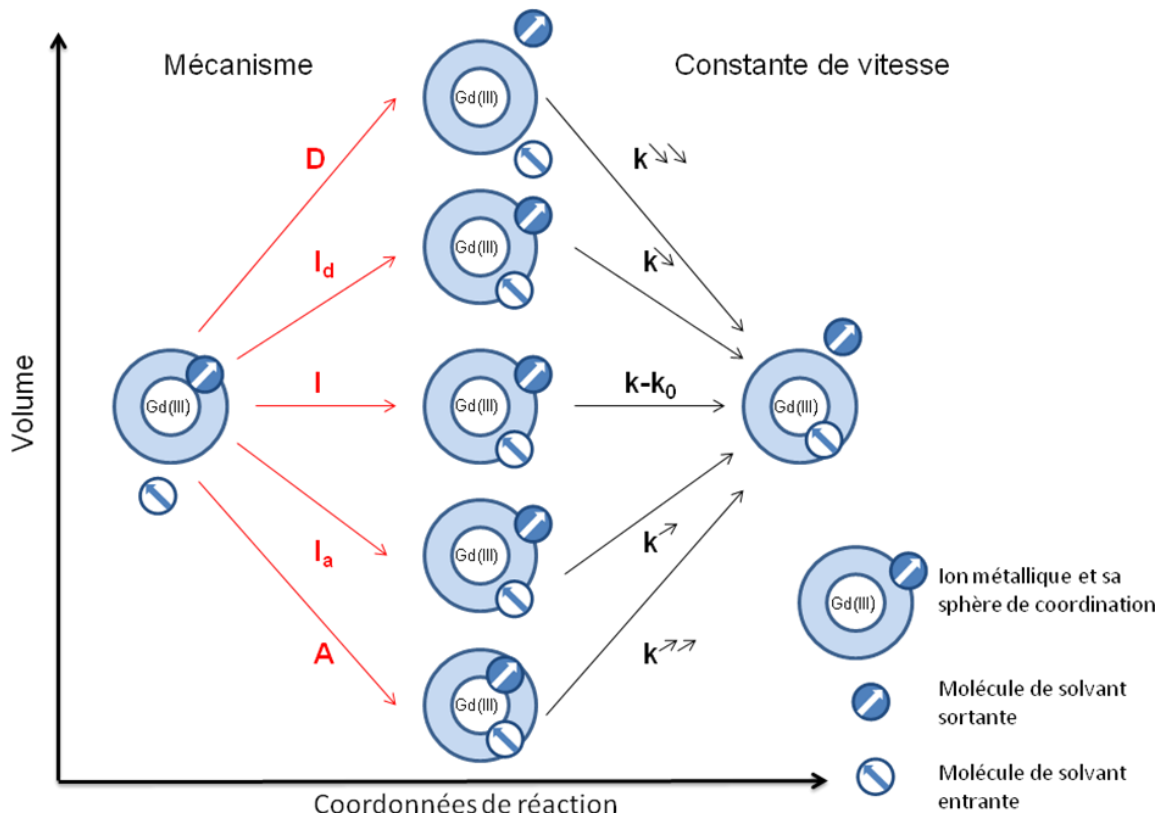


Figure 1.7 Représentation schématique des différents mécanismes d'échange d'une molécule de solvant.

En reprenant les équations 1.5-1.7, on s'aperçoit que la vitesse d'échange peut intervenir de deux façons différentes sur la relaxivité :

- si $\tau_m \gg T_{1M}$, le temps de résidence, très long, devient prépondérant par rapport au temps de relaxation longitudinal ; la vitesse d'échange devient le facteur limitant la relaxivité.
- si $\tau_m \ll T_{1M}$, le temps de résidence est court et seul T_{1M} limite la relaxivité. Notons que T_{1M} est donné par les équations 1.6-1.7 dans la théorie standard approchée et dépend donc a priori de τ_m . Toutefois cette dépendance est formelle car τ_{c1} et τ_{c2} sont quasiment indépendants de τ_m puisque $\tau_r \ll T_{1M}$.

Ainsi, dans le cas de complexe macromoléculaire ($PM > 5000Da$), la vitesse d'échange est souvent le paramètre limitant. En effet dans ce cas, $1/\tau_r$ est petit (les gros complexes tournent lentement) et le terme en $1/\tau_m$ est prépondérant.

- **le temps de corrélation rotationnelle τ_R**

Aux champs magnétiques utilisés couramment en imagerie clinique (0.5-1.5T), la relaxivité des petits complexes de gadolinium est limitée par leur vitesse de rotation élevée (voir équations 1.6-1.7). La solution pour ralentir la vitesse de rotation de ces complexes est d'augmenter leur masse molaire. Pour cela, deux possibilités sont à prendre en considération : soit modifier la structure du ligand pour atteindre une masse molaire plus importante, soit lier de façon non covalente un substrat macromoléculaire sur un petit complexe. Dans les deux cas, ce sont des groupements d'intérêt biologique (protéines, peptides, polysaccharides, liposomes...) qui doivent être biocompatibles et, dans un deuxième temps, vont également permettre de faire du ciblage biologique. A ces valeurs de champ, le τ_R optimal est supérieur à 1 ns environ.

En revanche, aux champs plus élevés des nouveaux imageurs (7-9T), la vitesse de rotation est optimale pour des complexes de tailles moyennes (τ_R compris entre 400 et 1000ps). La figure 1.8 donne la relaxivité de sphère interne calculé par la théorie de Solomon-Bloemberger-Morgan pour des complexes mono-aqua avec différents temps de corrélation rotationnel en fonction du champ magnétique appliqué.

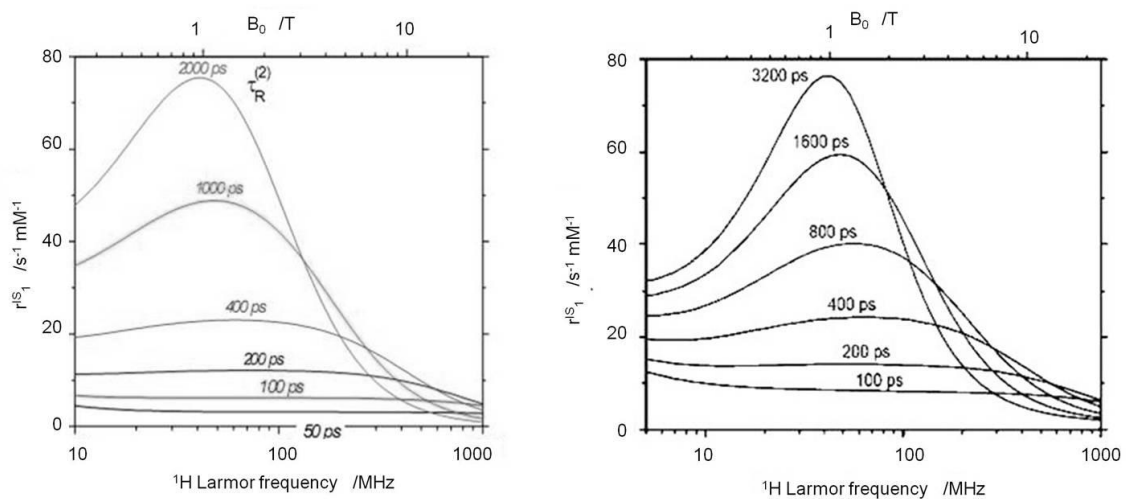


Figure 1.8 Relaxivité de sphère interne simulée par la théorie SBM pour différentes valeurs de τ_R (à gauche, $q=1$, $k_{ex} = 1.10^8 s^{-1}$, à droite, $q=2$, $k_{ex} = 9.10^6 s^{-1}$)

- **le temps de relaxation électronique**

Le dernier paramètre influant sur la relaxivité, T_{1e} , n'intervient qu'à champ faible, en dessous de 0.5 T. Seules les valeurs τ_{S0} à champ nulle sont tabulées et comparées puisque T_{1e} dépend du champ magnétique. Pour que la relaxivité soit la plus haute possible, il faut que les temps de relaxation électronique soient les plus long possibles (équation 1.8-1.11). Il est cependant très difficile de contrôler ce paramètre. Heureusement la théorie montre que la relaxation électronique a un impact mineur sur la relaxivité au dessus de 1 T environ.

2.3. Les agents de contrastes.

2.3.1. Les agents de contrastes commerciaux

De nombreux agents de contrastes ont été développés au cours des vingt-cinq dernières années. Ces agents de contrastes peuvent être classés en deux grandes catégories suivant leur mode d'action : les agents de type T_1 et les agents de type T_2 . Les agents sont de type T_1 ou T_2 suivant qu'ils affectent respectivement la vitesse de relaxation longitudinale ou la vitesse de relaxation transversale. On parle également d'agent de contraste positif (T_1) et négatif (T_2).

Les agents de contrastes les plus utilisés sont ceux de type T_1 , puisqu'ils permettent à la fois d'améliorer le contraste mais aussi de réduire la durée d'examen. En effet, l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale permet un retour à l'équilibre plus rapide. Dans le cas des agents de type T_2 , la relaxation transversale est provoquée par un déphasage de l'aimantation. La vitesse de retour à l'équilibre n'a donc pas d'influence sur la durée d'examen.

Les agents de contrastes commerciaux peuvent aussi être classés selon leur biodistribution. Les deux grandes catégories sont les agents extracellulaires et les agents intravasculaires⁶. Les agents extracellulaires sont des complexes de petite taille qui diffusent du sang vers le liquide interstitiel. Ils sont la plupart du temps utilisés pour la détection de tumeurs au niveau cérébrale. Dans le cas d'un sujet sain, la barrière hémato-encéphalique est totalement imperméable aux agents de contrastes mais la présence de lésions va la rendre perméable à de tels agents. Ceux-ci viennent alors s'accumuler au niveau de la zone malade. Les agents extracellulaires sont éliminés par les reins en 90 minutes environ. Parmi ces agents, ceux présentant une lipophilie élevée sont particulièrement intéressants puisqu'ils permettent une accumulation de l'agent au niveau des hépatocytes (cellules du foie) et permettent de détecter certaines pathologies hépatiques et pancréatiques (tumeur du pancréas, insuffisance

pancréatique exocrine). Ces agents sont qualifiés d'hépatobiliaires¹⁷. Les agents intravasculaires sont des complexes plus gros, ce qui limite leur diffusion dans le liquide interstitiel et augmente leur durée de vie dans le sang. Ils permettent ainsi d'avoir accès à une imagerie des vaisseaux sanguins qui constitue une alternative à l'angiographie par rayons X mais peut également servir à la détection de tumeur qui sont souvent anormalement vascularisées.

2.3.1.1. Les agents de type T₁

Les agents de type T₁ utilisés commercialement sont majoritairement des complexes de gadolinium (III). Il est nécessaire d'associer un ligand organique à l'ion Gd(III) du fait de sa toxicité aux doses où il doit être injecté.

La toxicité d'un agent de contraste peut être due à différents facteurs :

- le relargage de gadolinium libre
- la complexation de métaux endogènes par du ligand libre
- la charge osmotique injectée

En effet, le gadolinium, du fait de sa taille (107.8 pm pour Gd³⁺ contre 114 pm pour Ca²⁺), rentre en compétition avec les systèmes calcium dépendant et bloque le système réticuloendothélial³³. Il entre en compétition avec le calcium au niveau de la contractilité myocardique, la coagulation, les enzymes calcium dépendants, la respiration mitochondriale et la neurotransmission^{34,35}. Il a de ce fait une toxicité considérable au niveau neurologique et cardiovasculaire. Chez la souris, le LD50 du GdCl₃ est compris entre 100 et 200 mg/kg. Le gadolinium libre va se fixer sur les os, dans le foie et les ganglions lymphatiques, puis est libéré dans l'organisme au rythme de 1% par jour.

La complexation du gadolinium par un ligand organique permet de réduire sa toxicité. Cependant, au cours des dernières années, des cas de fibroses systémiques néphrogéniques ont été mis en évidence lors de l'utilisation d'agents de contrastes à base de gadolinium. Il semble qu'une des raisons qui influe sur la toxicité est leur stabilité cinétique vis-à-vis de la transmétallation. Seuls le calcium et le zinc endogènes, qui ont une concentration sérique suffisante, sont susceptibles d'être chélatés par un excès de ligand libre ou de remplacer le gadolinium sur le chélate. La constante d'affinité du calcium pour les différents chélates est faible au regard de celle du gadolinium : le risque de transmétallation est donc faible. Avec le

zinc, le risque est plus probable et une élévation transitoire de la zingurie a été montrée chez l'animal³⁶. Cela a pour conséquence de favoriser le développement de certaines pathologies notamment au niveau des reins, en particulier chez les patients déjà atteints de troubles rénaux. En effet, l'insuffisance rénale retarde l'élimination de l'agent de contraste. La demi-vie d'élimination étant prolongée, le risque potentiel de décomplexation est accru.

Concernant la charge osmotique, celle-ci varie suivant la charge du complexe injecté. Même si des effets cardiopresseurs et des hypotensions transitoires ont été mis en évidence chez l'animal pour des doses élevées (0.5mmol/kg^{-1}) d'agents de contrastes³⁷⁻³⁹, aucun effet cardiovasculaire n'a été observé chez l'homme.

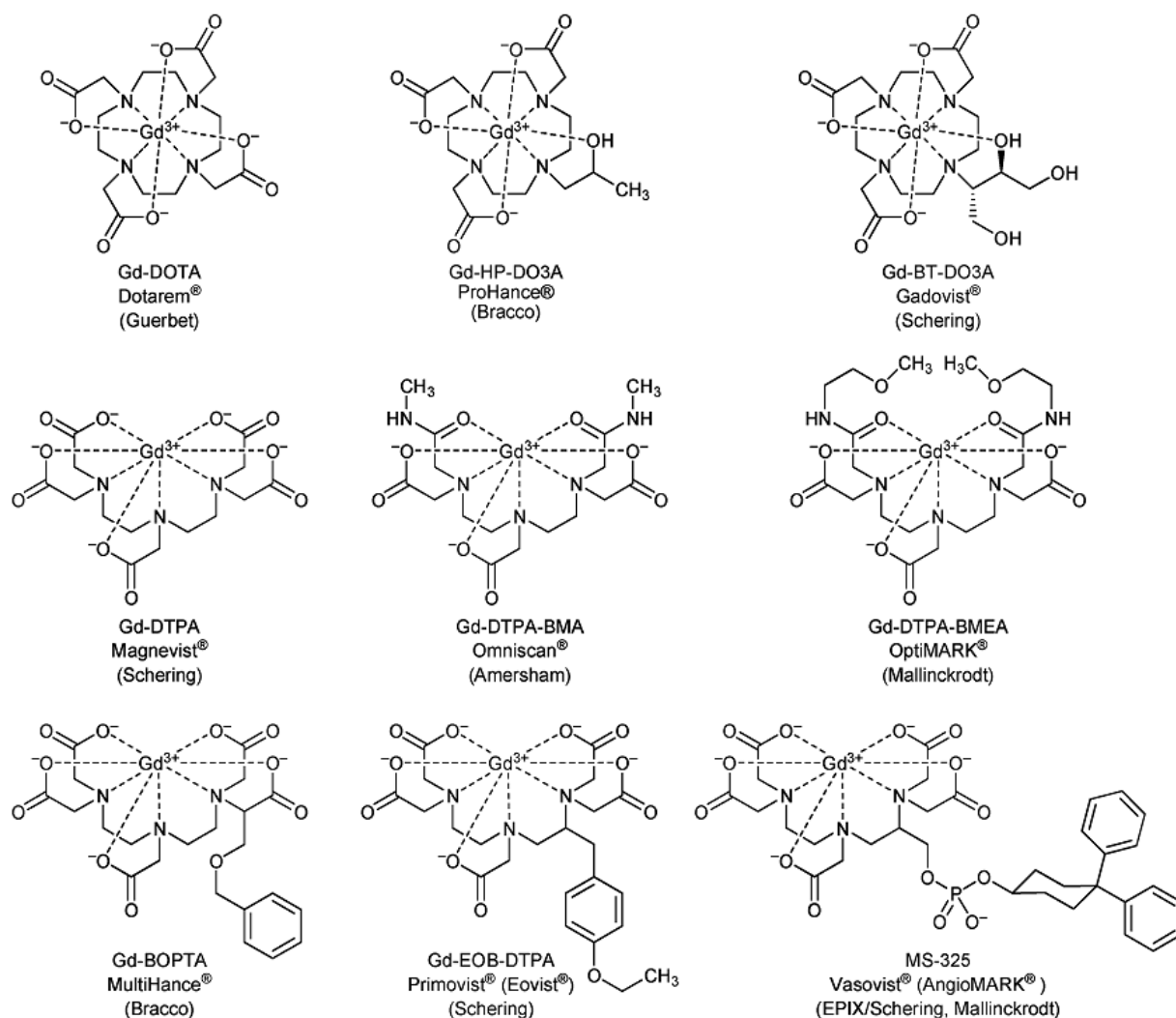


Figure 1.9 Agents de contraste de type T₁ utilisés cliniquement

La figure 1.9 et le tableau 1.5 présentent les structures et les propriétés des principaux agents de contrastes utilisés commercialement. Les complexes de DOTA⁴⁻ et DTPA⁵⁻ ont été les

premiers ligands à complexer l'ion gadolinium III avec une stabilité thermodynamique et cinétique suffisante pour être utilisés in vivo. Le complexe Gd(DTPA) est le premier agent de contraste à avoir été approuvé pour une utilisation clinique chez l'homme. Il est commercialisé depuis 1988. La plupart de ces composés dit « de première génération », diffuse rapidement vers le milieu interstitiel. Les complexes Gd-BOPTA et Gd-EOB-DTPA sont des dérivés du complexe Gd-DTPA où un bras acétate a été remplacé par un groupement plus lipophile, entraînant une affinité plus grande pour les hépatocytes. Leur utilisation est donc privilégiée pour l'imagerie du foie. Concernant le MS-325, la modification de la structure entraîne un temps de vie dans le sang plus long, d'une part à cause de sa taille qui l'empêche de diffuser dans le milieu interstitiel, d'autre part du fait d'une forte affinité de l'agent de contraste avec l'albumine sérique⁴⁰. L'association non covalente du complexe avec une protéine du sang permet également d'augmenter la relaxivité du complexe en ralentissant son temps de corrélation rotationnelle τ_R (à 20MHz $r_1=42 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence d'albumine contre $5.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau). Par ces propriétés, on obtient un agent de contraste dédié à l'angiographie par IRM qui se montre bien plus efficace que les petits complexes, comme le montre la comparaison entre les images obtenues avec le MS-325 et le Gd-DTPA (figure 1.10)

Nom commerciale	Laboratoire	Abreviation	Biodistribution	r_1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Dotarem	Guerbet	Gd-DOTA	extracellulaire	4.2
ProHance	Bracco	Gd-HP-DO3A	extracellulaire	4.4
Gadovist	Schering	Gd-BT-DO3A	extracellulaire	5.3
Magnevist	Schering	Gd-DTPA	extracellulaire	4.3
Omniscan	Amersham	Gd-DTPA-BMA	extracellulaire	4.6
OptiMARK	Mallinckrodt	Gd-DTPA-BMEA	extracellulaire / hépatobiliaire	5.2
MultiHance	Bracco	Gd-BOPTA	extracellulaire / hépatobiliaire	6.7
Primovist	Schering	Gd-EOB-DTPA	hépatobiliaire	7.3
Vasovist	EPIX/Schering	MS-325	intravasculaire	19

Tableau 1.5 Relaxivité des principaux agents de contraste commerciaux à 20MHz¹³



Figure 1.10 Images IRM d'arrière-trains de lapin après injection de MS-325 (a-c, $0,025\text{mmol.kg}^{-1}$), ou de Gd-DTPA (d-f, 0.1mmol.kg^{-1}). Les images sont enregistrées à 5 minutes (a, d), 30 minutes (b, e) et 60 minutes (c, f) après injection⁶.

Cependant, dans ce type d'interaction non covalente, l'affinité du complexe pour la protéine est le principal paramètre qui va conditionner l'association des deux espèces et donc l'augmentation de relaxivité. De ce fait, d'autres agents sont développés afin de s'affranchir de cette constante d'affinité, en greffant directement par liaison covalente une macromolécule sur un agent de contraste de petite taille. Dans cette optique, plusieurs agents de contrastes sont en développement, notamment chez Guerbet SA, et donnent différents agents qui peuvent être caractérisés comme suit :

- Les agents de type LDA (low diffusing agents), qui peuvent diffuser à travers l'endothélium vasculaire (comme les agents non spécifiques) mais à une vitesse plus faible. Ils sont donc confinés au niveau du plasma sanguin juste après l'injection. Leur élimination par les reins est la même que pour les agents non-spécifiques. (Ex : P760 figure 1.12)
- Les agents de types RCBPA (rapid clearance blood pool agents), dont la diffusion dans le milieu interstitiel est faible voire quasi nulle et en font des agents pour

l'utilisation angiographique (blood pool agent). Leur élimination est cependant plus rapide que les agents non spécifiques. (Ex : P792 figure 1.11)

- Les agents de types SCBPA (slow clearance blood pool agents), qui sont strictement confinés au plasma sanguin et dont la faible perméabilité à travers les capillaires sanguins empêche une élimination rénale rapide. (Ex : P717 figure 1.11)

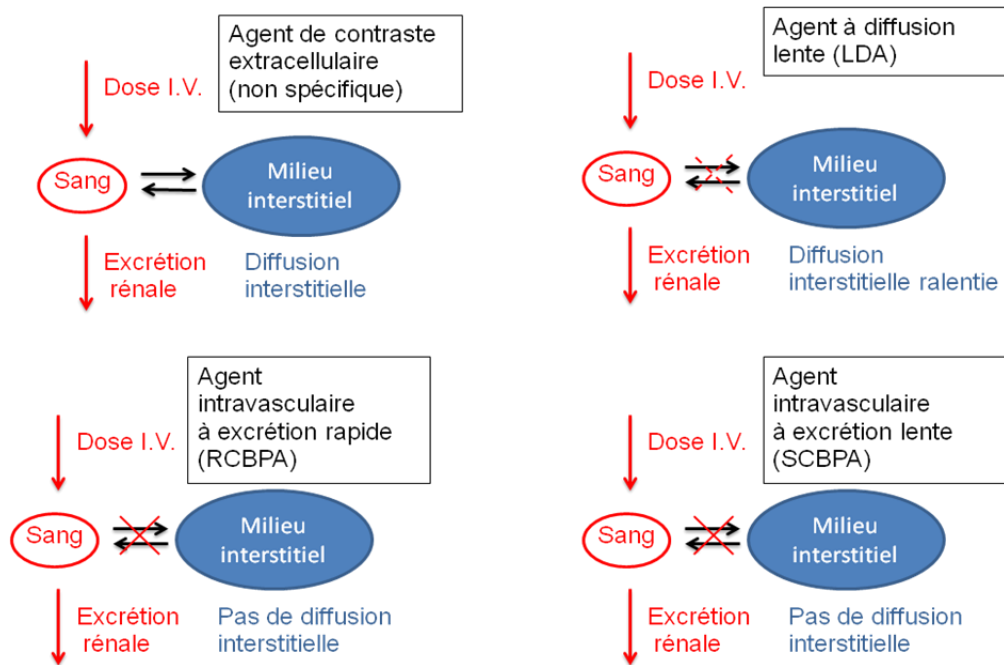


Figure 1.11 Représentation schématique des différentes pharmacocinétiques des agents de contrastes.

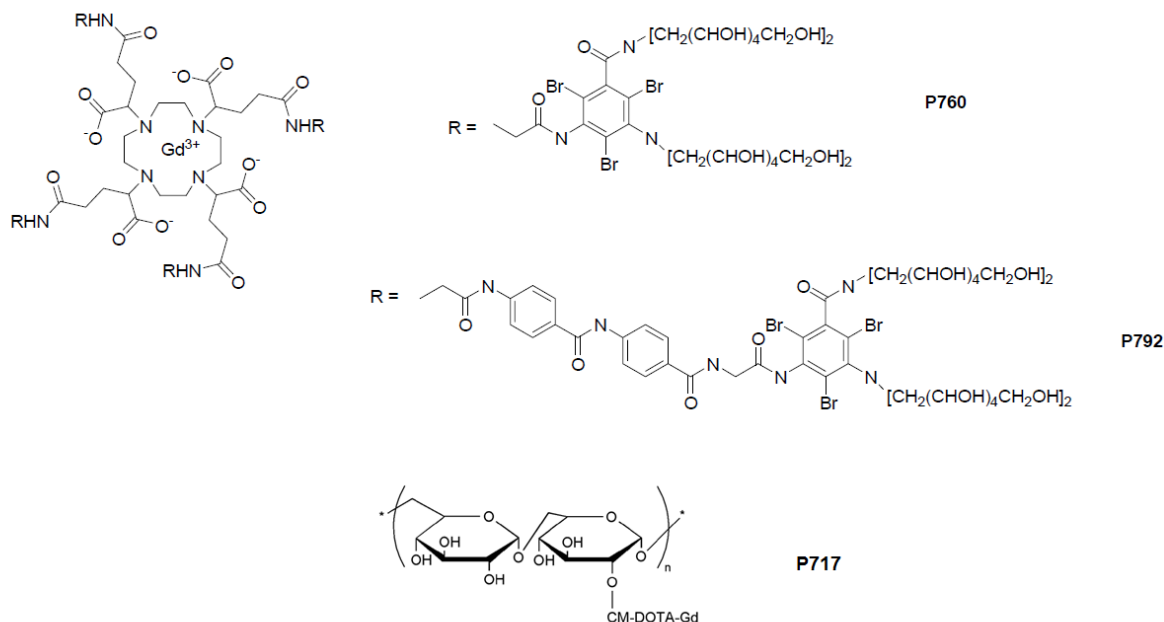


Figure 1.12 Représentation des complexes P760, P792 et P717 du laboratoire Guerbet

Ces trois composés présentent des relaxivités largement améliorées en comparaison du DOTA et leurs différentes pharmacocinétiques permettent des utilisations variées. (Tableau 1.6)

Abréviation	PM (kDa)	type	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
P760	5.29	LDA	25
P792	6.47	RCBPA	40
P717	52	SCBPA	

Tableau 1.6 Propriétés des complexes P760, P792 et P717

Le gadolinium n'est pas le seul métal utilisé comme base pour les agents de contraste. L'ion manganèse (II) présente cinq électrons non appariés et donc un spin élevé de 5/2. Le complexe Mn(H₂DPDP) a été approuvé pour l'usage clinique et est utilisé comme agent hépatobiliaire. C'est le seul agent qui relargue des ions métalliques pour former des adduits avec des macromolécules endogènes. Le PRE obtenu par ces adduits Mn(II)-protéines permet la visualisation des hépatocytes, même administré à faible dose⁴¹.

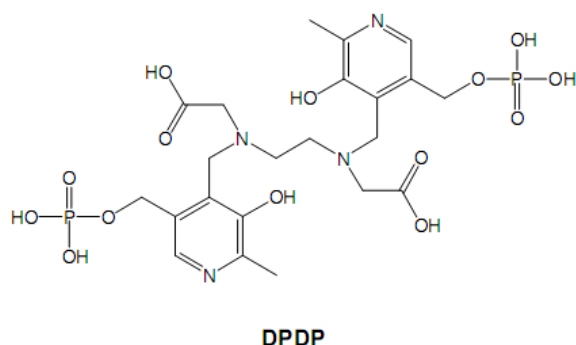


Figure 1.13 Agent de contraste extracellulaire commercial à base de manganèse II

Le manganèse n'est pas le seul métal qui peut être utilisé comme alternative au gadolinium. Des recherches sur les complexes de Fe(II) ont montré qu'il était possible d'obtenir des complexes bas spin et haut spin en jouant sur la coordination du ligand⁴². Le complexe de [Fe(tptacn)], diamagnétique, ne conduit à aucun raccourcissement du temps de relaxation T₁ des protons de l'eau, tandis que l'analogue [Fe(dptacn)], qui est paramagnétique, entraîne un raccourcissement du T₁ des protons de l'eau et pose les bases pour des complexes de Fe(II), dont le passage bas spin / haut spin pourrait être déclenché par un processus biologique. Dans l'optique du développement d'un agent de contraste bio-activable, le ligand tptacn a été modifié pour y greffer un β-galactose (figure 1.14). Le complexe de Fe(II) obtenu subit une dégradation par la β-galactosidase qui conduit à la formation dans le milieu du complexe de [Fe(dptacn)(H₂O)], complexe haut spin qui va induire un contraste en IRM⁴³.

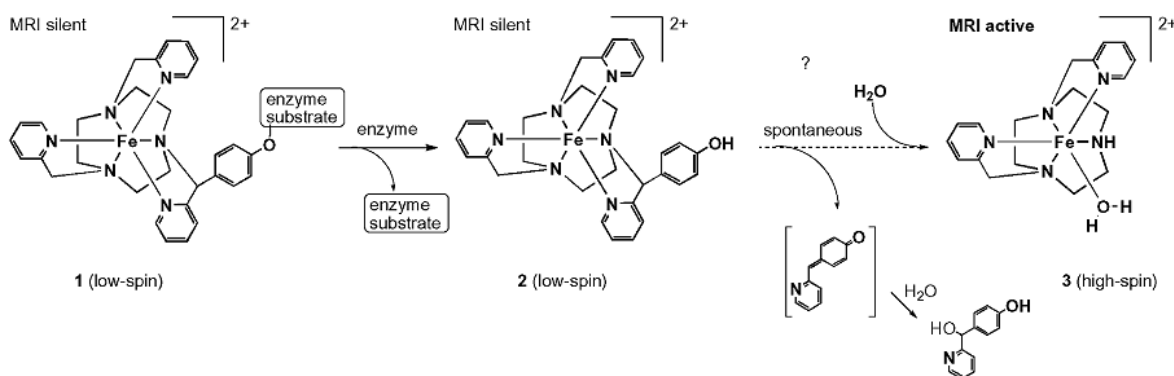


Figure 1.14 Processus de conversion enzymatique conduisant au passage d'un complexe de Fe(II) bas spin à un complexe de Fe(II) haut spin.

De plus, pour compenser la charge positive, qui en milieu biologique a tendance à favoriser la coordination des ions chlorure plutôt que les molécules d'eau, un analogue du dptacn a été

développé pour obtenir un complexe de Fe(II) neutre⁴⁴ (figure 1.15). Ce complexe a été obtenu en remplaçant les pyridines par des groupements tétrazoles et les études in vitro et in vivo ont montré la capacité d'amélioration du contraste, notamment à des valeurs de champ élevées (7T).

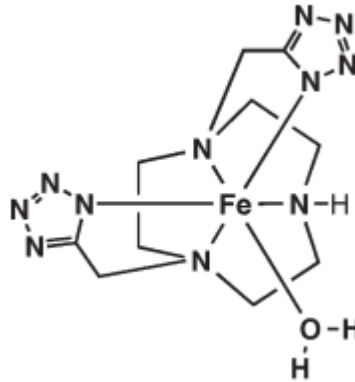


Figure 1.15 Complexe neutre de Fe(II) analogue au $[\text{Fe}(\text{dptacn})]^{2+}$

2.3.1.2. Les agents de type T₂

Les agents de type T₂ sont dits superparamagnétiques. Le superparamagnétisme est une forme de magnétisme qui apparaît lorsque des matériaux ferromagnétiques sont dispersés sous formes de petites particules. Lorsque de telles espèces sont soumises à un champ magnétique externe, elles sont aimantées de la même façon qu'un matériau paramagnétique mais leur susceptibilité magnétique est bien plus grande. La coopération entre les moments de spins individuels est cruciale pour la formation d'un super spin. Ce phénomène est notamment observé dans les oxydes de fer inorganique Fe₃O₄. Du fait de leur moment magnétique très élevé, ces particules induisent une forte perturbation du champ magnétique locale et une diminution importante du temps de relaxation transversale T₂.

Pour éviter l'agrégation de telles particules, différentes techniques de stabilisation sont utilisées :

- une stabilisation de type stérique (A), par l'encapsulation du cœur de Fe₃O₄ dans une enveloppe protectrice (dextran, carboxydextran, polyéthylène glycol, albumine,...)
- une stabilisation par répulsion de charges (B). Dans ce cas des fonctions carboxylates sont greffées à la surface (acétate, aspartate, citrate, ...)

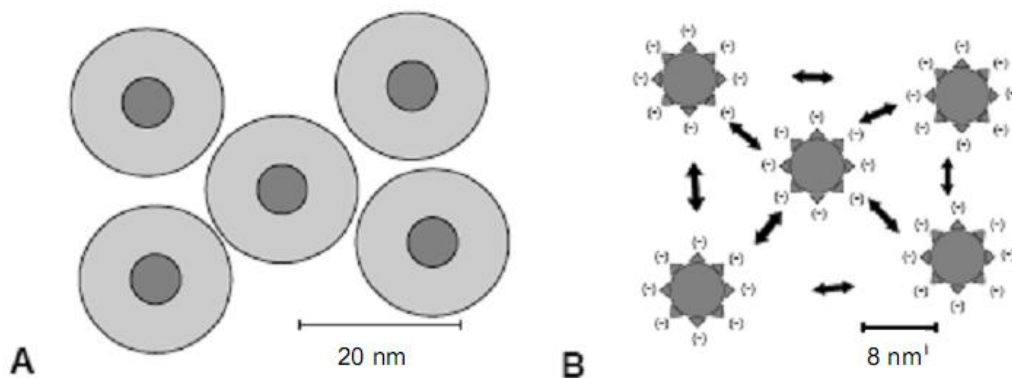


Figure 1.16 Représentation schématique de deux méthodes d'encapsulation des nanoparticules d'oxyde de fer. (A : stérique, B : électrostatique)

Du type d'enrobage utilisé découle la taille des particules, leur biodistribution et leur pharmacocinétique. On peut distinguer trois types de nanoparticules suivant leur taille :

- les très petites particules (USPIO pour ultra small particles of iron oxyde) diamètre < 50nm
- les petites particules (SPIO) 50nm < diamètre < 200nm
- les grosses particules diamètre > 200nm

Le tableau suivant donne les principales propriétés des agents de contrastes T₂ nanoparticulaires.

Nom commercial	Laboratoire	Type de particule	Diamètre (nm)	r_1 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
Endorem	Guerbet	SPIO	200	24	107
Resovist	Schering	SPIO	62	20	197
Abdoscan	GE Healthcare	Grosses particules	3500		
Lumirem	Guerbet	Grosses particules	300	3.4	3.8

Tableau 1.7 Propriétés des agents de contraste superparamagnétiques commerciaux (relaxivités à 37°C et 0.5T)

2.3.1.2.1. Les agents de type CEST (Chemical Exchange Saturation Transfert)

De façon simplifiée, un agent CEST est une molécule contenant des protons labiles susceptibles de s'échanger avec les protons de l'eau. La vitesse d'échange de ces protons avec l'eau doit être inférieure à leur différence de fréquence de résonance (exprimé en rad Hz). Quand cette condition est remplie, la fréquence de résonance des protons de l'agent CEST peut être sélectivement saturée en utilisant un champ à une radiofréquence spécifique (on-irradiation). L'échange chimique des protons labiles transfère leur magnétisation saturée vers l'eau libre dont l'intensité va ensuite diminuer. Cette diminution d'intensité peut ainsi engendrer un contraste négatif.

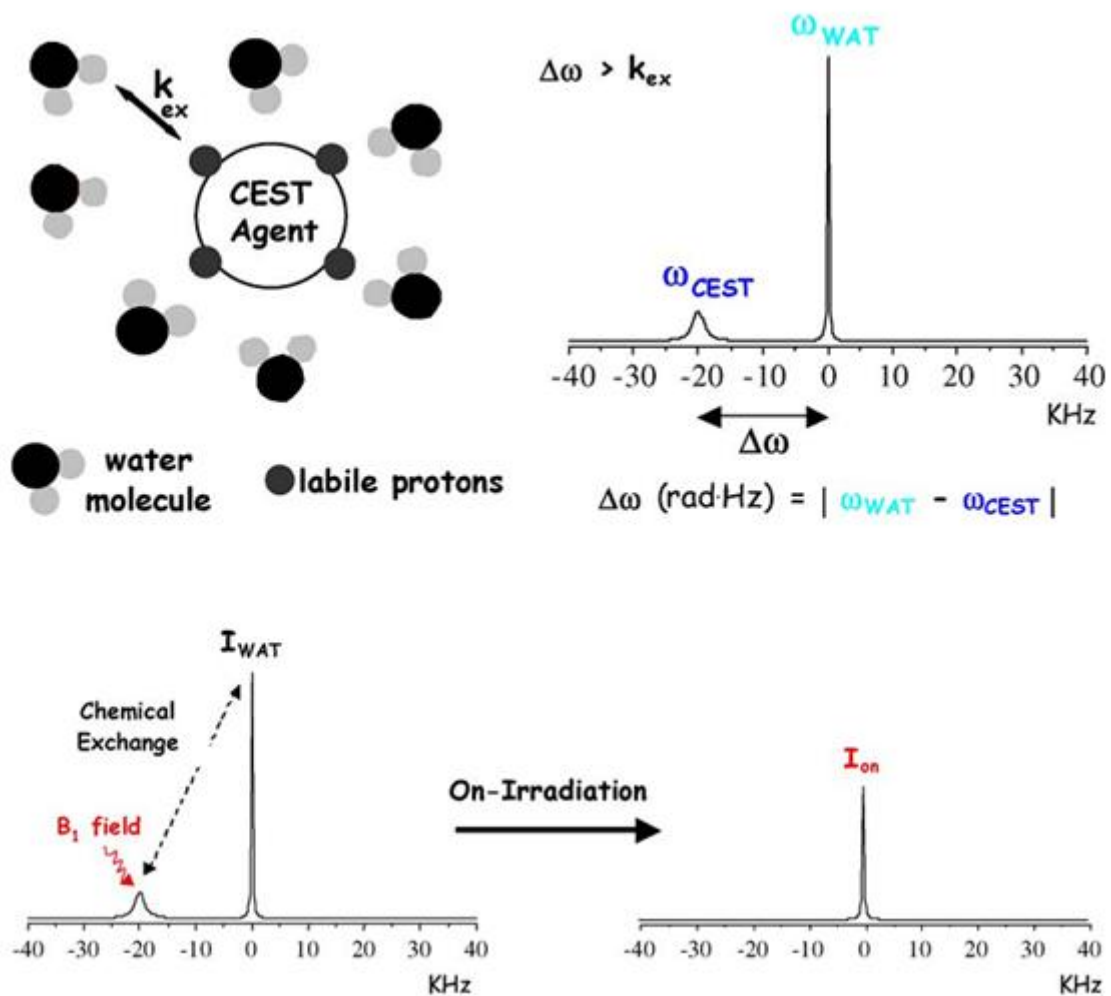


Figure 1.17 Agent CEST et « on-irradiation »⁴⁵

Malheureusement, cette expérience dite « on irradiation » n'est pas suffisante pour établir l'efficacité d'un agent CEST. En effet, le champ de saturation peut affecter l'intensité du signal de l'eau libre même en l'absence d'agent de contraste. Le champ de saturation peut exciter et donc saturer directement les molécules d'eau libre et in vivo cette irradiation peut saturer un signal très large correspondant aux protons endogènes contenus dans les différents tissus et membranes. Ce phénomène n'étant lié qu'à la valeur absolue de la fréquence d'irradiation, il est possible de répéter l'expérience (dite off-irradiation) lors de laquelle la fréquence d'irradiation est la même avec un signe opposé. Il en résulte un signal d'intensité diminué par rapport au signal de l'eau libre mais supérieur à celui obtenu par « on-irradiation ».

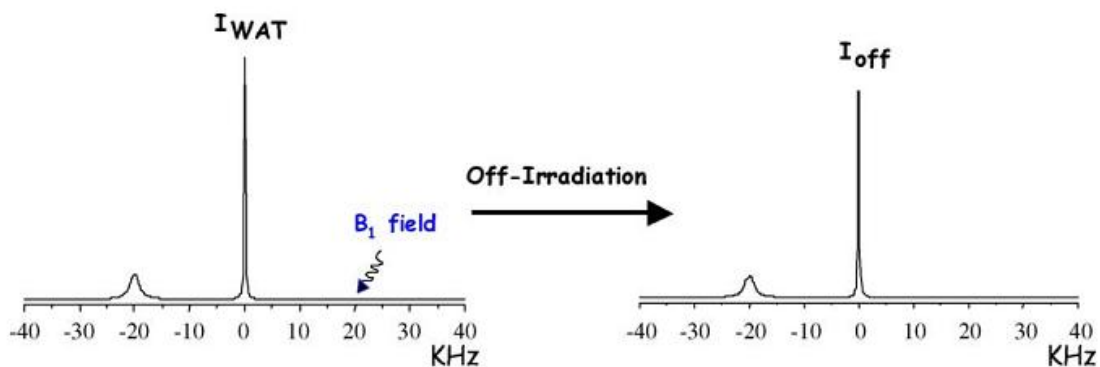


Figure 1.18 « Off irradiation »⁴⁵

Ainsi on peut accéder à l'efficacité de l'agent CEST, c'est-à-dire le transfert de saturation net : $\%ST = (1 - I_{on}/I_{off}) \times 100$.

Le contraste CEST est ainsi obtenu par la différence entre les images des expériences « on » et « off » ou par une carte de transfert de saturation pondéré où le transfert de saturation est représenté par un point blanc et le %ST en module l'intensité.

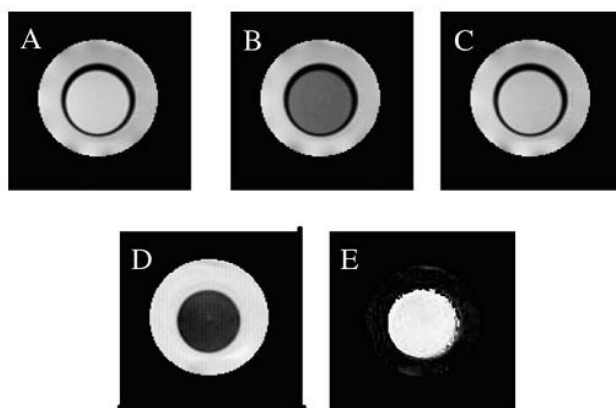


Figure 1.19 Images IRM à 7T de tubes coaxiaux (intérieur : PARACEST agent, extérieur : eau) A) image IRM standard, B) on-irradiation, C) off-irradiation, D) différence entre les expériences on-off, E) image en transfert de saturation pondérée⁴⁵

3. Les complexes de lanthanides comme sondes luminescentes

La microscopie optique est utilisée pour détecter la présence de divers composés par l'observation de leur fluorescence. Le matériel biologique possède des propriétés de fluorescence intrinsèque dues notamment aux acides aminés aromatiques ou aux bases de l'ADN⁴⁶. Toutefois, il est plus aisé pour imager les tissus, cellules ou petits animaux, de faire appel à des marqueurs exogènes (c'est-à-dire étrangers au milieu étudié), encore appelés fluorochromes. Ces marqueurs peuvent être soit des chromophores organiques (fluorescéine, rhodamine,...), soit des nanoparticules luminescentes, soit des complexes de Ln(III) (Ln = Eu, Tb, Yb, Nd, Er ...).

3.1. Définitions

3.1.1. Fluorescence et phosphorescence

Lorsqu'une substance, initialement dans son état électronique singulet fondamental (S_0), absorbe un photon, il en résulte un état électronique d'énergie supérieure appelé « état excité ». Cet état est instable et sa désexcitation vers l'état S_0 peut se faire soit par des

processus vibrationnels (10^{-12} - 10^{-14} s) soit par émission d'un photon. L'émission de photon associée à la relaxation d'un état électroniquement excité est appelée luminescence. L'énergie du photon correspond à la différence d'énergie entre l'état excité et le niveau accepteur de l'état fondamental. Les différents mécanismes de retour à l'équilibre $S_1 \rightarrow S_0$ sont illustrés par le diagramme de Jablonski (Figure 1.20).

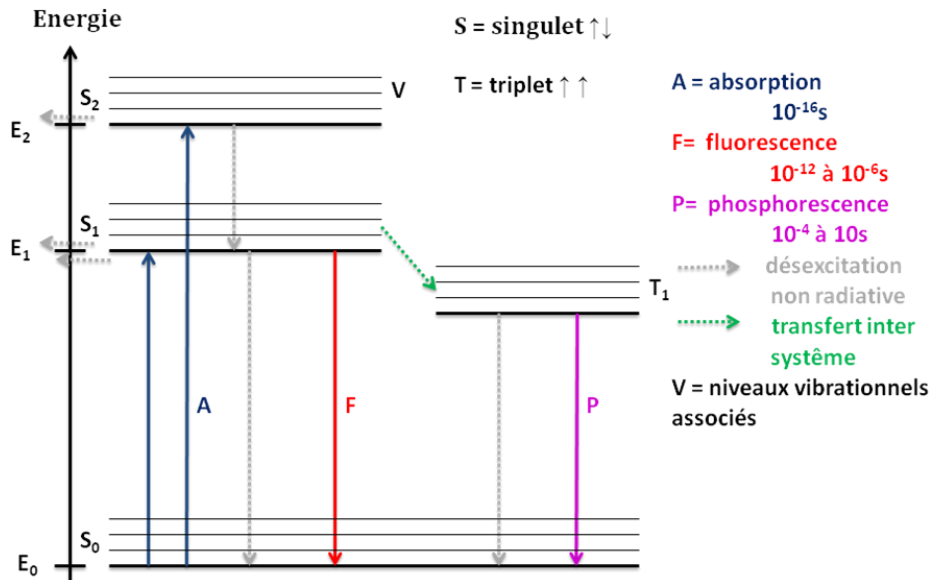


Figure 1.20 Diagramme de Jablonski

Après absorption, l'état excité est relaxé de l'état singulet S_1 jusqu'au niveau fondamental. Les processus non radiatifs mis en jeu peuvent impliquer soit des collisions avec les molécules de solvant soit des échanges vibrationnels avec les molécules environnantes à l'état solide. Ensuite, deux types de mécanisme de luminescence peuvent avoir lieu. Ils sont principalement différenciés par leurs temps caractéristiques :

- La **fluorescence** résulte de l'émission d'un photon en association avec le transfert de spin de l'état singulet S_1^0 vers un niveau vibrationnel excité de l'état fondamental (S_0^*). La durée de vie de l'état excité est comprise entre 10^{-12} et 10^{-6} s.
- La **phosphorescence** implique une inversion de spin de l'un des électrons célibataires. Cette conversion, plus lente (10^{-8} s), est appelée transfert inter système. Elle est en théorie «interdite» mais favorisée par la présence d'atomes lourds comme les lanthanides. Ensuite, le transfert $T_1 \rightarrow S_0$ implique des états de multiplicité différents et

est également interdit. La durée de vie d'un état phosphorescent est donc relativement longue : de 10^{-6} à 10 s.

3.1.2. Rendement quantique

L'efficacité d'un processus luminescent est donnée par son rendement quantique. Il est défini comme le rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés pendant un temps donné. Il est fortement influencé par la position énergétique des niveaux excités et il est d'autant plus fort que les désexcitations non radiatives sont minimisées.

Quel que soit le type de marquage, les molécules ayant un fort rendement quantique, un coefficient d'extinction molaire élevé et également une résistance importante au photo blanchiment (ou « photo-bleaching »), c'est-à-dire dont les propriétés d'émission ne sont pas affectées par les rayonnements lumineux, seront privilégiées.

3.2. Les chromophores organiques

De nombreux chromophores organiques sont disponibles commercialement. Les principales familles de fluorophores utilisées sont les coumarines, les fluorescéines, les rhodamines et les cyanines. Elles permettent de couvrir toute la largeur spectrale du proche UV au proche infrarouge (Figure 1.21).

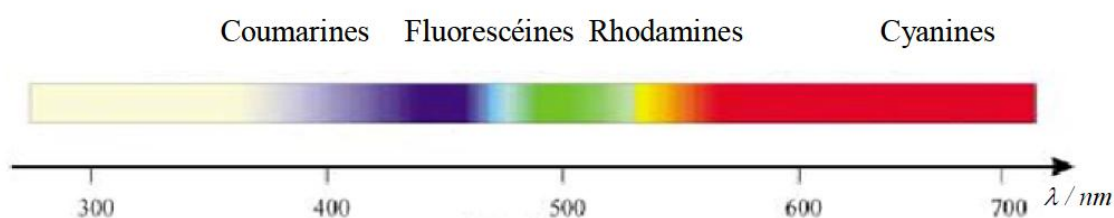
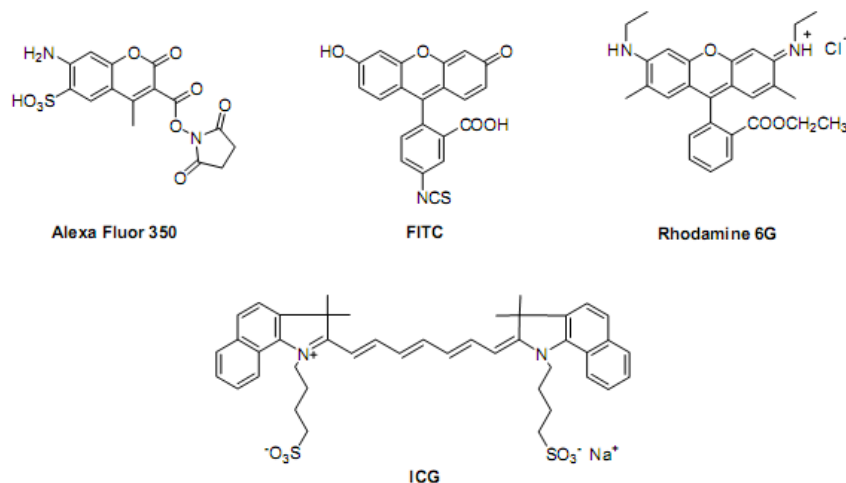


Figure 1.21 Principales familles de fluorophores organiques et leurs longueurs d'onde associées



	Famille	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ (%) ^a	T (ns)
Alexa Fluor 350	Coumarine	346	442	-	-
FITC	Fluorescéine	47	515	92	4.1
Rhodamine 6G	Rhodamine	530	552	61	2.5
ICG	Cyanine	805	830	1.6	0.56

^a PBS 50 mM, 150mM NaCl, pH=7,2, 22°C

Tableau 1.8 Structure et propriétés des principaux fluorophores organiques ⁴⁷

Des séries de fluorophores présentant de bons rendements quantiques et couvrant tout le domaine visible avec des molécules empruntées à ces différentes familles sont commercialisées sous des noms génériques : Alexa Fluor[®] (442 nm < λ_{em} < 775 nm) ^{47,48} par Molecular Probes, Atto[®] dyes par Aldrich.... En particulier, des rendements quantitatifs sont obtenus dans le visible avec certaines fluorescéines et rhodamines. L'émission dans l'infrarouge est moins intense car elle est plus sensible aux désexcitations non radiatives. Toutefois, les temps de vie de luminescence de ces composés sont courts, de l'ordre de la nanoseconde. Une nouvelle famille de composés a également été développée. Elle est basée sur l'utilisation de dérivés du dipyrométhène borane, communément appelé bodipy (Figure 1.22). Des composés, dont les longueurs d'ondes d'émission sont comprises entre 520 et 670 nm, ont pu être obtenus par différentes substitutions des groupements pyrole⁴⁹. Certains de ces dérivés sont commercialisés par Molecular Probes. Cependant, les temps de vie de luminescence restent courts : de 3.9 ns dans l'eau à 5.7 ns dans le méthanol.

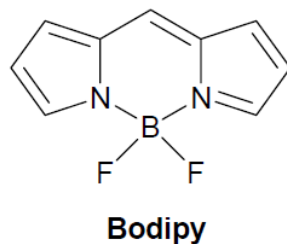


Figure 1.22 Structure de la bodipy

3.3. Les ions lanthanides et la luminescence en temps résolu

Nous avons vu au paragraphe 1.4 que les ions lanthanides possèdent non seulement des bandes d'émission et d'absorption fines (quasi-monochromatiques) mais surtout ils sont phosphorescents et leurs temps de vie de luminescence sont significativement plus longs que ceux des chromophores organiques (de l'ordre de la ms pour Eu(III) et Tb(III)). Ainsi, leur utilisation permet de s'affranchir de la luminescence intrinsèque du milieu biologique en utilisant la méthode de luminescence en temps résolu (Figure 1.23).

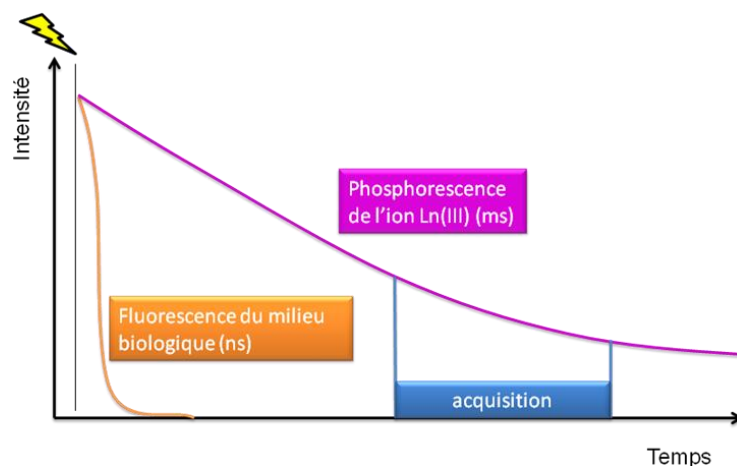


Figure 1.23 Principe de la luminescence en temps résolu

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

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

3.4. Les complexes de lanthanides luminescents

Au sein de ces complexes, le ligand organique possède un (ou plusieurs) chromophores présentant une forte absorption, distincte de celle de l'ion Ln(III), et jouant le rôle d'antenne (Figure 1.24).

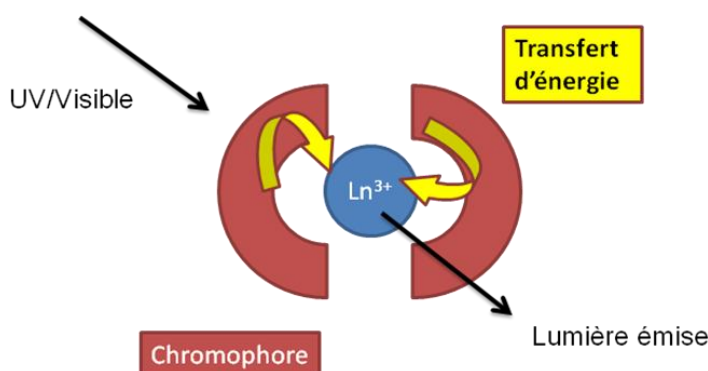


Figure 1.24 Principe de l'effet d'antenne

3.4.1. Différentes voies de sensibilisation

3.4.1.1. Effet d'antenne

Le processus le plus souvent impliqué met en jeu l'état triplet du ligand. Il se déroule en quatre étapes illustrées à la Figure 1.25. Le chromophore organique absorbe l'énergie lumineuse et peuple ses états excités singulets $^1\pi\pi^*$. Le ligand est adapté si d'une part, un transfert inter système permet le peuplement de son état excité triplet $^3\pi\pi^*$ et si, d'autre part, un transfert d'énergie efficace a lieu de cet état triplet vers les états excités du lanthanide. Les états excités du lanthanide sont ensuite relaxés par un processus radiatif, conduisant à l'émission de lumière. Ce mécanisme est communément admis pour tous les complexes de

lanthanides, à l'exception de l'ion Ytterbium(III). Le transfert inter système est efficace si le niveau de l'état triplet du ligand est en adéquation avec l'état excité du métal. Dans le cas d'une différence d'énergie trop faible, un transfert en retour («back transfert») vers l'état triplet a lieu.

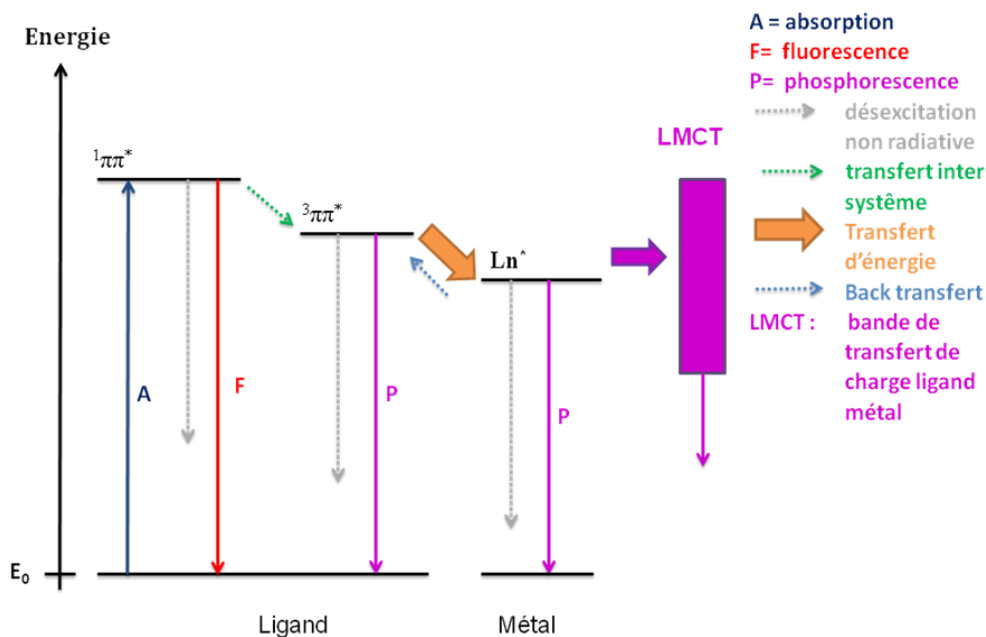


Figure 1.25 Mécanisme de sensibilisation des lanthanides par le ligand via l'état triplet du ligand

3.4.1.2. Transferts par les bandes de transfert de charge.

Le transfert par les bandes de transfert de charge ligand - métal (LMCT) ou métal - ligand (MLCT) permet également de sensibiliser le métal. Cette méthode est largement utilisée pour exciter les métaux de transition. Elle est cependant peu utilisée pour les lanthanides car d'une part, les bandes de transfert de charge sont plus faibles et d'autre part, leur niveau d'énergie doit être parfaitement contrôlé. En effet, un niveau suffisamment élevé permet le transfert vers l'état excité Ln^* et exacerbe la luminescence. En revanche un niveau d'énergie trop bas l'éteint (Figure 1.25). Les bandes de transfert de charge sont ainsi impliquées dans les processus de désactivation non radiatifs électriques comme le Transfert Electronique Photo-induit (PET). Ce phénomène est lié à une oxydation ou une réduction du métal associée à l'excitation du ligand. Il est d'autant plus probable que le caractère électro-attracteur ou donneur d'une molécule est exacerbé dans son état excité. En général, une réduction du métal est observée. Elle est d'autant plus favorisée que le métal est facilement réduit : $\text{Eu(III)} > \text{Sm(III)} > \text{Yb(III)}$ ⁵⁰.

3.4.1.3.Sensibilisation par les métaux d.

Le dernier mode d'excitation implique le transfert énergétique d→f depuis un métal de transition. Cette stratégie est particulièrement adaptée pour la sensibilisation des ions Ln(III) émettant dans le proche infrarouge. Deux types de transferts énergétiques sont possibles : transfert à travers les liaisons ou à travers l'espace. Récemment des complexes bimétalliques d-f ont été mis au point avec les ions Cr(III), Pt(II) et Ru(II) afin de favoriser le peuplement de l'état excité des ions Ln(III). Dans ce contexte, Guo et al. ont reporté le complexe tétramétallique Ru₂Ln₂ (Ln= Yb, Nd) où l'état triplet LMCT du système Ru-bipy est particulièrement adapté pour la sensibilisation de l'ion Nd(III) et, dans une moindre mesure, de l'ion Yb(III)⁵¹.

Une autre approche consiste à augmenter le temps de vie de luminescence des ions émettants dans le proche infrarouge. Ainsi, Imbert et al. ont réussi à augmenter ce temps de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde en contrôlant la population du niveau excité de Ln(III) par des transferts énergétiques Cr(III)→Ln(III) dans des hélicates bimétalliques où le temps de vie intrinsèque de l'ion Cr(III) est long⁵².

3.4.1.4.Cas de l'ion Yb(III)

Pour l'ion Yb(III) qui ne possède qu'un état excité (²F_{5/2}, E =10300 cm⁻¹), le mécanisme de transfert d'énergie depuis le chromophore est plus controversé. Deux alternatives ont été proposées. La première suggère un transfert «classique» par l'intermédiaire de l'état triplet du ligand en dépit d'une différence d'énergie importante entre les états ³ππ* et Ln* ; l'énergie en excès étant transformée en énergie vibrationnelle et en chaleur⁵³. La deuxième explication met en jeu un transfert d'électron associé à un mécanisme d'oxydoréduction impliquant le degré d'oxydation Yb(II). Ce mécanisme est illustré à la Figure 1.26. Il n'est envisageable que si les deux étapes de transfert d'électron sont thermodynamiquement possibles.

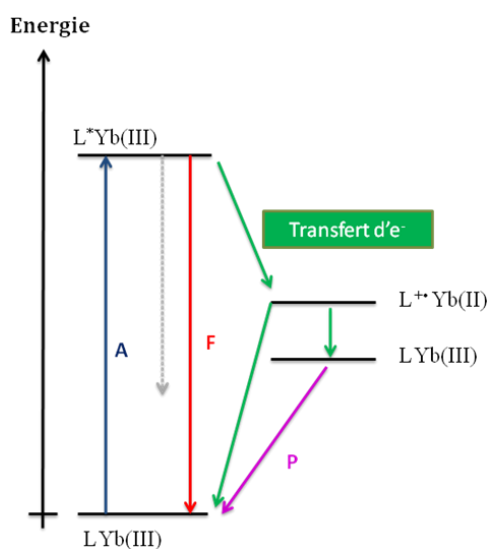


Figure 1.26 Mécanisme de sensibilisation de l'Yb(III) via le transfert d'électron

Ce mécanisme a été mis en évidence par Horrocks et al.⁵⁴ en observant la luminescence de l'Yb(III) en présence de parvalbumine après excitation des unités tryptophanes de la protéine. La réduction de l'Yb(III) par le tryptophane dans son état excité singulet L^* produit un radical cationique $L^{+\bullet}$ et Yb(II). Le radical cation, oxydant très puissant, va oxyder à nouveau l'Yb(II) pour donner le ligand L dans son état fondamental et le métal trivalent, soit dans son état fondamental Ln, soit dans son état excité Ln^* . La fraction de Ln^* obtenue est à l'origine de la phosphorescence observée.

3.4.1.5. Les mécanismes de transfert

Le transfert d'énergie de l'état triplet du ligand vers les états excités du métal est un phénomène très complexe qui implique plusieurs mécanismes. Deux mécanismes limites ont été proposés et sont représentés Figure 1.27 : celui de Dexter et celui de Förster.

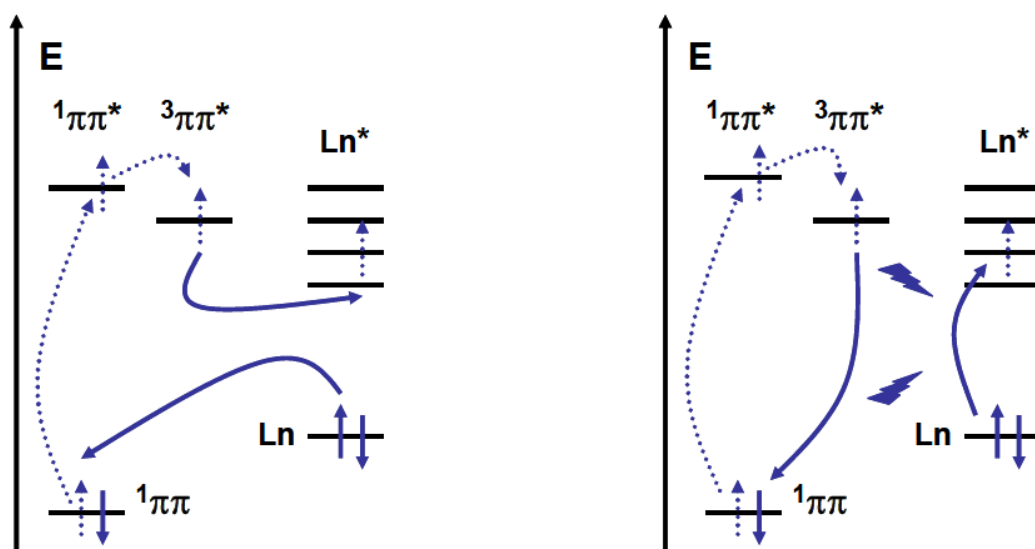


Figure 1.27 Représentation schématique des mécanismes de Dexter et de Förster

- Le mécanisme de Dexter⁵⁵ repose sur un échange électronique entre le ligand et le métal. Ce transfert nécessite un contact entre les orbitales moléculaires du donneur et de l'accepteur. Ainsi, son efficacité dépend exponentiellement de la distance R entre le donneur et l'accepteur (e^{-R}). On peut considérer qu'il cesse d'être impliqué au delà de $R = 3 \text{ \AA}$
- Le mécanisme de Förster⁵⁶ s'appuie sur le couplage entre le moment dipolaire associé à l'état triplet et celui des orbitales 4f. Dans le cas d'un mécanisme purement dipolaire, l'efficacité du transfert peut être estimée à partir de l'équation simplifiée suivante :

Equation 1.14

$$\eta_{st} = \frac{1}{1 + \left[\frac{R}{R_0}\right]^6}$$

avec R la distance donneur-accepteur et R_0 la distance de Förster, correspondant à une efficacité de transfert moyenne de 50%. Elle dépend de plusieurs paramètres comme le rendement quantique du donneur (en absence d'accepteur), l'indice de réfraction du milieu étudié, l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

Ainsi, les deux mécanismes impliquent l'intégrale de recouvrement spectrale. Leurs dépendances spécifiques envers la distance donneur-accepteur R (i.e. e^{-R} pour l'échange électronique et R^{-6} pour le couplage dipolaire) limitent souvent le mécanisme de Dexter à des

distances courtes où le recouvrement orbitalaire est significatif, alors que le mécanisme de Förster peut être efficace sur de plus longues distances.

3.4.2. Conception de chélates de Ln(III) luminescents

A la lumière de ces mécanismes, plusieurs points doivent attirer notre attention lors de la conception d'une sonde luminescente :

- Les désexcitations non radiatives vibrationnelles liées aux oscillateurs O-H du solvant ou aux vibrations des liaisons du ligand devront être minimisées. Pour cela, la présence d'oscillateurs moléculaires de type O-H ou N-H dans la première sphère de coordination du lanthanide est à éviter. En effet, les modes vibrationnels peuvent interagir avec les niveaux électroniques excités de l'ion, conduisant à une atténuation (« quenching ») de la luminescence. Ainsi, lorsque des molécules de solvants protiques (H_2O , et dans une moindre mesure MeOH) sont coordonnées au centre métallique, la durée de vie de luminescence et le rendement quantique se trouvent fortement affectés. L'efficacité du processus est fortement influencée par la nature du vibreur. Ainsi, la désactivation par les vibreurs O-H est supérieure à celle provoquée par les vibreurs O-D. Cette différence peut être mise à profit pour déterminer le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal. Afin d'éviter ces vibrations, les complexes, dont la sphère de coordination est saturée, sont privilégiés. De plus, pour un vibreur donné, la désactivation est d'autant plus faible que la différence d'énergie ΔE entre l'état émissif du lanthanide et son état fondamental est grande. Par exemple, l'extinction de luminescence est plus importante pour l'ion Eu(III) ($\Delta E(^5\text{D}_0-^7\text{F}_6) = 12\,300\text{ cm}^{-1}$) que pour l'ion Tb(III) ($\Delta E(^5\text{D}_4-^7\text{F}_0) = 14\,200\text{ cm}^{-1}$) (Figure 1. 28).

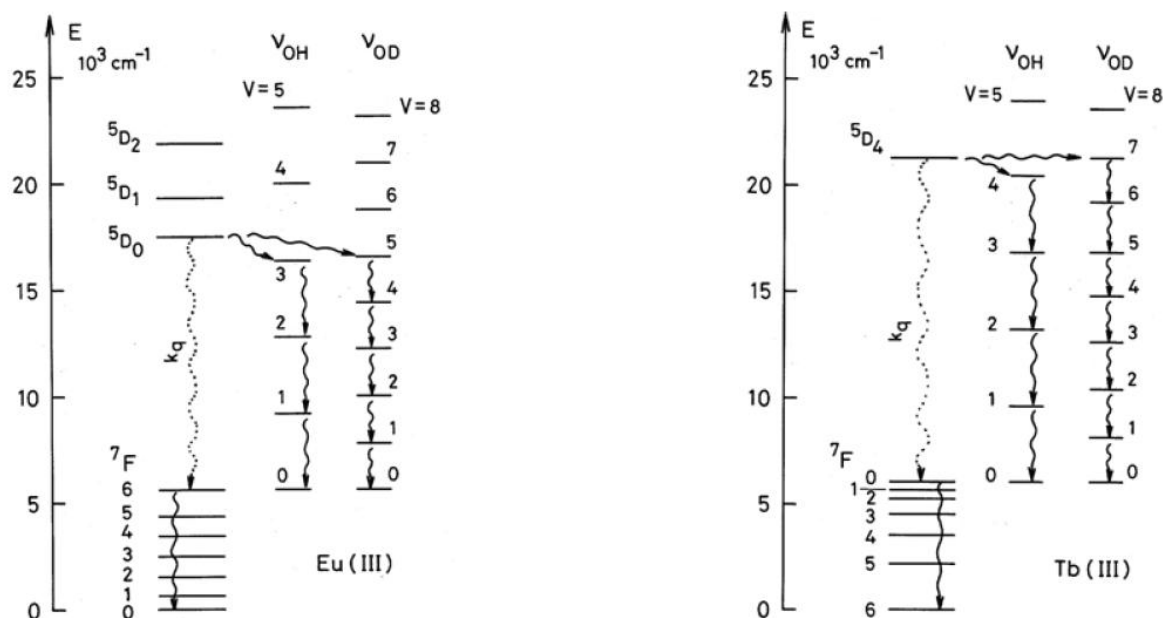


Figure 1.28 Désexcitation vibrationnelle des complexes d'Eu(III) et de Tb(III) dans l'eau légère et dans D₂O

- De même, nous avons vu que des désexcitations non radiatives par Transfert Electronique Photo induit (PET) sont d'autant plus probables que le lanthanide utilisé est oxydant et que le ligand est réducteur. Ce processus, principalement observé dans le cas de l'Eu(III), est favorisé par la présence de groupements donneurs d'électrons (comme les amines) sur le ligand.^{57,58}

- Aussi, le niveau énergétique de l'état triplet du ligand doit être correctement positionné par rapport aux états excités de l'ion étudié. Une étude détaillée a été réalisée par M. Latva et ses collaborateurs sur une série de complexes de Tb(III) et d'Eu(III). Ils ont démontré que le transfert était irréversible à partir d'une différence d'énergie entre les deux états supérieurs à 1850 cm^{-1} ⁵⁹. Pour les complexes d'Eu(III), la relation entre la position énergétique de l'état triplet du ligand et l'efficacité du transfert semble moins bien comprise. Néanmoins, cette même étude a révélé un transfert efficace pour un état triplet du ligand positionné autour de $22\,000 \text{ cm}^{-1}$. Dans le cas d'une différence énergétique plus faible, un processus de transfert en retour de type vibrationnel a lieu. Son temps de vie dépend de la température selon une équation de type Arrhenius.

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

4. Les agents bimodaux

La recherche médicale et la médecine diagnostique a à sa disposition de nombreuses techniques d'imageries in vivo : microscopie confocale ou à deux électrons, l'IRM, la tomographie par émission de positron (PET), la tomographie d'émission monophotonique(SPECT) ou les ultrasons.

Technique d'imagerie	Résolution spatiale	Temps de résolution	Sensibilité
Résonnance magnétique - IRM - Spectroscopie ^1H	Sub-mm >mm	1-2s >5 min	mM Gd, nM Fe >10 μM
Médecine nucléaire - PET - SPECT	mm Sub-mm	8 min min	pM traceur Sub_nM traceur
Optique - Bioluminescence - Fluorescence	mm μm	min ms	pM
Tomographie Rayon X - Avec agent de contraste	Sub_mm	1-2s	mM
Ultrason - Micro bulles	μm	ms	1 bulle

Tableau 1.9 Principales technique d'imagerie et leur sensibilité approximative⁶⁰

Chacune de ces technologies possède certaines forces et faiblesses qui lui sont propres et dépendent de leurs limitations en termes de résolution temporelle et spatiale ainsi que leur limite de sensibilité. Elles apportent donc des informations complémentaires et des appareils d'imagerie bimodaux existent déjà au niveau clinique comme c'est le cas pour les appareils PET/CT ⁶¹ mais aussi plus récemment avec le développement d'imageur IRM/PET ^{62,63}. L'IRM présente elle une très bonne résolution, mais a cependant une sensibilité basse, exigeant l'injection de quantité importante (0.1 à 0.5 mM/kg) pour une détection efficace.

Les traceurs marqués et les sondes pour l'imagerie optique, à l'inverse, sont bien plus sensibles et peuvent être détectés à plus faible concentration (pM or μM respectivement). Un intérêt grandissant a donc été porté au développement d'agents multimodaux pour combiner les avantages de plusieurs techniques d'imagerie.

4.1. **Sondes IRM et fluorophores organiques**

Les agents d'imagerie pour la fluorescence sont déjà largement utilisés, notamment pour l'imagerie cellulaire *in vitro* mais l'utilisation d'agents émettant dans le proche infrarouge autorise les études *in vivo*, notamment sur le petit animal, du fait de sa forte capacité de pénétration dans les tissus (tableau 1.9). Le premier agent de contraste bimodal optique/IRM est apparu en 1998⁶⁴ et associait le Gd-DOTA et la tetraméthylrhodamine (figure 1.29) afin de suivre certaines lignées de cellules au niveau embryonnaire. L'utilisation d'agent pour la fluorescence s'est rapidement étendue, notamment pour le design de sondes bimodales.

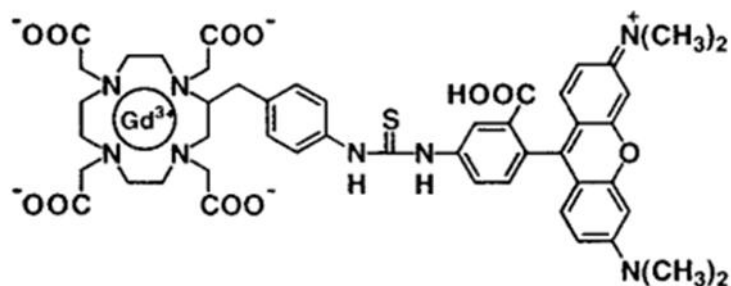


Figure 1.29 Gd (rhoda-DOTA)⁶⁴

Parmi les agents bimodaux fréquemment utilisés, on peut par exemple citer la sonde CLIO-cy5.5 qui allie un agent de contraste IRM à base de particules d'oxyde de fer (Cross Linked Iron Oxid particles), servant à obtenir une image préopératoire des tumeurs, et cy5.5, un fluorophore émettant dans le proche infra-rouge, qui permet une localisation précise des tissus tumoraux pendant l'opération. L'utilisation de fluorophores proche infra-rouge est particulièrement avantageuse. En effet, les ondes électromagnétiques sont fortement absorbées par les tissus biologiques, à l'exception des longueurs d'ondes comprises entre 700 et 1000 nm (figure 1.31)⁶⁰. De plus, l'utilisation de la fluorescence proche infrarouge permet de minimiser l'autofluorescence des tissus.

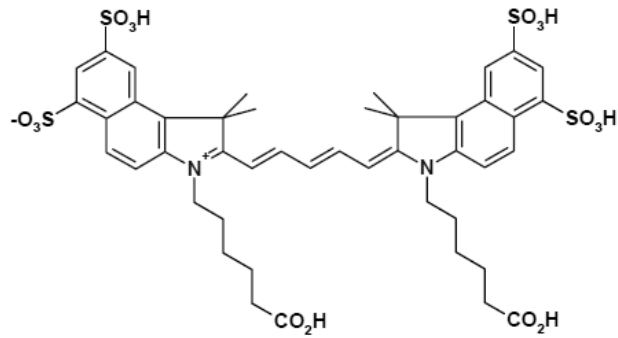


Figure 1.30 Exemple de fluorophore organique cy 5.5

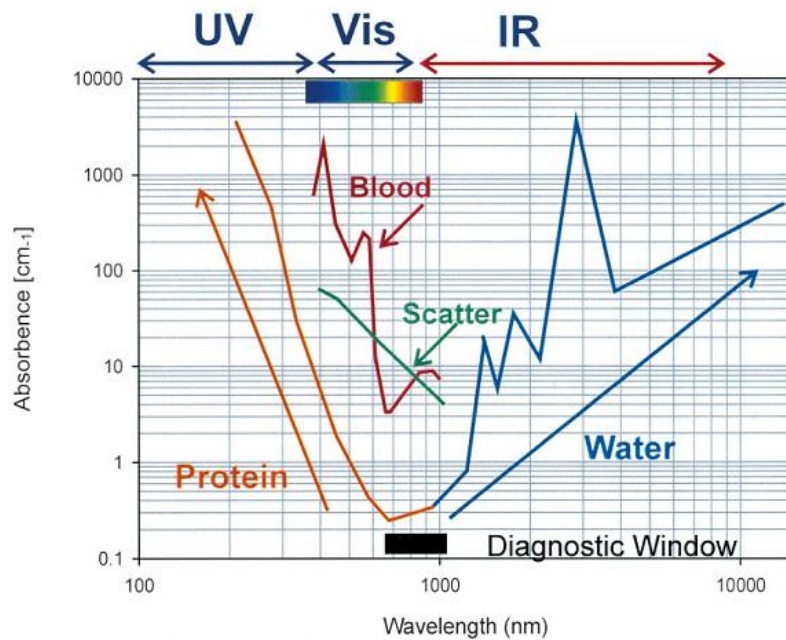


Figure 1.31 Absorption des photons par les tissus. La sensibilité optique est dégradée par l'absorbance. Dans la région UV, les photons sont absorbés par les macromolécules (acides nucléiques, protéines). Au dessus de 1000 nm, l'eau absorbe les photons via des transitions d'énergie rotationnelle ou vibrationnelle. La zone proche infra rouge (NIR) représente la zone idéale pour le diagnostic.⁶⁰

D'autres agents bimodaux couplant un fluorophore organique et un complexe de gadolinium peuvent être cités. C'est le cas notamment du Gadolinium Rhodamine Dextran (GRID) et du Gadolinium Rhodamine Polylysine (GRIP) (figure 1.32) qui ont été utilisés pour le suivi de la transplantation et de la migration de cellules souches dans des cerveaux de rats. Le recoupement des images de fluorescence ex vivo et d'IRM in vivo permettait de valider la migration des cellules souches ainsi marquées^{65,66}.

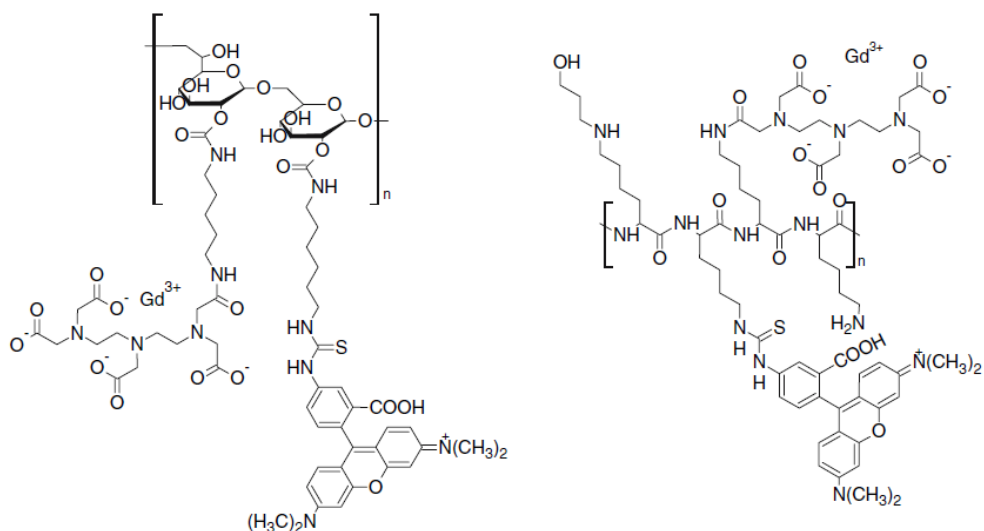


Figure 1.32 Deux exemples de sondes bimodales utilisées dans le marquage cellulaire GRIP (à gauche) et GRID (à droite).

Plus récemment, S. Achifelu et al.⁶⁷ ont réalisé un complexe de gadolinium dérivant du Gd-DTPA avec deux molécules d'eau en première sphère de coordination et un fluorophore organique (figure 1.33), qui sert à la fois pour la fluorescence et pour la liaison non covalente avec l'albumine sérique (BSA). De plus, la luminescence de ce complexe est dépendante de l'environnement biologique du complexe et des études sur des rats ont permis de différencier les complexes qui passent dans le milieu interstitiel et ceux qui restent dans le sang.

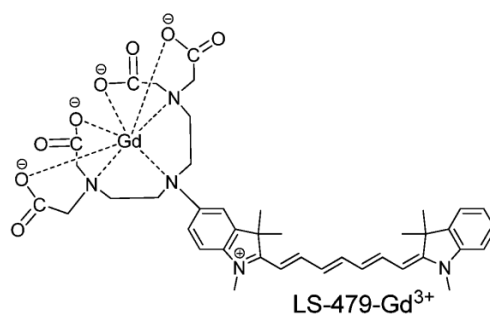


Figure 1.33 Complexe bimodale LS-479- Gd^{3+}

4.2. Sonde IRM et fluorophores inorganiques

4.2.1. Complexes de métaux de transition

Le design de tels agents bimodaux ne se limite pas à l'utilisation de chromophores organiques. En effet, il est possible de greffer des complexes de gadolinium sur différentes unités qui pourraient apporter des propriétés luminescentes. Cela peut être par exemple un complexe d'un élément du bloc d, comme utilisé par Faulkner et al.⁶⁸ qui, via le remplacement d'un bras carboxylate par une pyridine sur le Gd-DOTA, permet l'association avec un complexe $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})$. Le complexe $\text{Gd}(\text{L})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})$ obtenu présente une relaxivité améliorée par rapport aux agents commerciaux ($r_1=8.6\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 500MHz), due au deux molécules coordonnées en première sphère et une émission autour de 600nm.

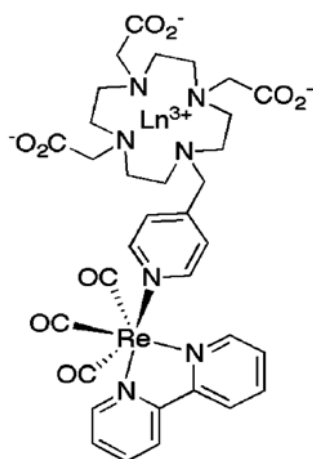


Figure 1.34 Le complexe $\text{Gd}(\text{L})\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy})$ développé par Faulkner et al.

4.2.2. Quantum dots

D'autres alternatives existent pour obtenir la partie luminescente du complexe, comme par exemple, le greffage des complexes de gadolinium sur des quantum dots. Depuis les premières applications des QDs dans des systèmes biologiques, ces nanoparticules ont été considérées comme une alternative prometteuse aux fluorophores organiques. Cette solution représente un certain intérêt du fait de l'intense fluorescence des QDs et de leurs propriétés spectrales ajustables (liées à la taille de la QD). Du fait du grand nombre de positions disponibles pour le greffage, ces systèmes permettent d'attacher en surface plusieurs complexes de gadolinium par quantum dots sans que l'encombrement stérique des complexes en surface ne présente de problème. Une relaxivité par nano-objet particulièrement élevée est

ainsi obtenue et permet de compenser la faible sensibilité de l'IRM. Dans l'exemple présenté figure 1.35⁶⁹, les QDs entourées de glutathion et couplées à des complexes de Gd-DOTA atteignent une relaxivité de $365 \text{ s}^{-1}(\text{mM QD})^{-1}$. De la même façon, Gerion et al.⁷⁰ ont obtenu des QDs de 10nm entouré de 1 à 2 nm d'une couche de silice fonctionnalisée avec des PEGs présentant une fonction thiol terminale, à partir de laquelle des dérivés aminés du Gd-DOTA sont greffés. Les relaxivités observées sont de l'ordre de $r_1 = 808 \text{ s}^{-1}(\text{mM QD})^{-1}$ (9.4T)

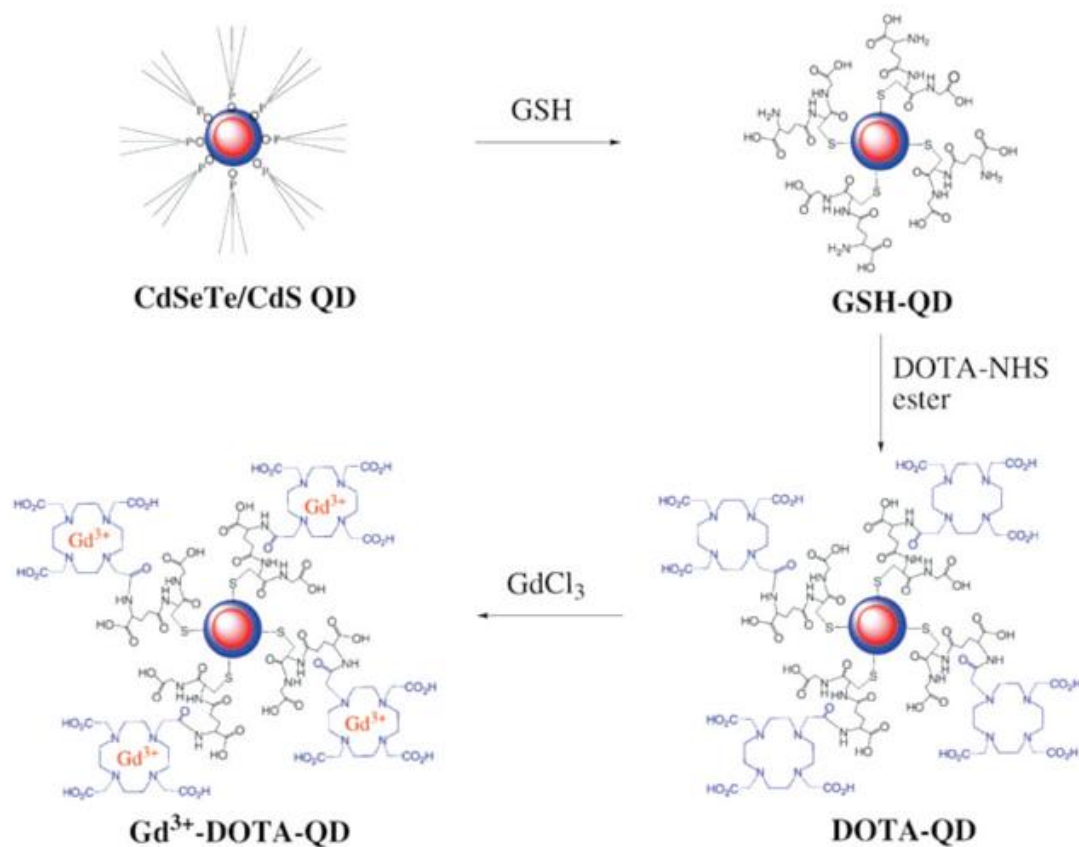


Figure 1.35 QD-Glutathion-GdDOTA

D'autres mécanismes ont été utilisés pour coupler des complexes de gadolinium à la surface des QDs. Le couplage non-covalent entre la biotine et la streptavidine, déjà couramment utilisé pour des techniques de couplage moléculaire, peut l'être également pour l'association de complexe de gadolinium avec les QDs (figure 1.36). Dans le travail de Prinzen et al.⁷¹, la streptavidine est couplée à la quantum dots tandis que le Gd-DTPA est conjugué avec la biotine. Le fait que l'avidine présente de nombreux sites d'interactions avec la biotine permet une amplification naturelle de la quantité de complexes de gadolinium fixés sur la QD. La relaxivité r_1 est de $17.5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ et entre 420 et $630 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ par particule. Les valeurs citées

précédemment mettent en lumière un point soulevé par le nombre important de publication sur des systèmes nanoparticulaires destinés à l'imagerie IRM : il n'y a pas de convention déterminée pour rapporter la relaxivité qui est donnée soit en fonction de la concentration en ion paramagnétique, soit en fonction de la concentration en QD. La concentration en ion paramagnétique est importante d'un point de vue biologique, par rapport à la quantité de gadolinium et la limite de toxicité éventuellement atteinte par la dose injectée. De plus la concentration en nanoparticule est parfois difficile à déterminer. Les particules sont trop petites pour les méthodes classiques de comptage de particules. Leur concentration est plus souvent évaluée en fonction de la taille des particules et sur l'analyse élémentaire pour certains atomes (Cd, In, Te), ce qui peut introduire une certaine incertitude sur la relaxivité mesurée par nanoparticule.

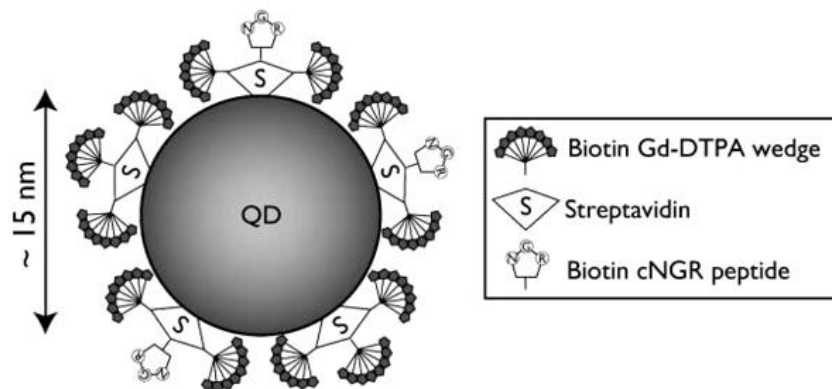


Figure 1.36 Représentation schématique du couplage streptavidine biotine pour le greffage de sonde magnétique sur une QD

Une autre stratégie pour l'utilisation de QDs pour la formation d'agents d'imagerie bimodaux est l'encapsulation des quantum dots par des lysosomes. Des systèmes micellaires dépourvus de QDs ont déjà été publiés⁷²⁻⁷⁴ et l'enrobage de QDs par de tels systèmes reprend le même principe, le quantum dots remplaçant le compartiment aqueux central. Ainsi, l'espèce paramagnétique est introduite en enrobant la QD avec une couche lipidique, au sein de laquelle des complexes de gadolinium liés à des lipides sont insérés⁷⁵⁻⁷⁹. De la même façon des entités servant pour le ciblage (biotine, anticorps, ...) peuvent être insérées dans la couche lipidique. Cependant, un tel enrobage présente certains inconvénients, notamment le quenching de la luminescence de la QD. En effet, la modification des surfaces des QDs pour les rendre hydrosolubles entraînent la plupart du temps une diminution de la luminescence. Cette diminution est cependant plus faible dans le cas d'un enrobage lipidique car il n'y a pas d'interactions directes entre les lipides et les atomes à la surface de la QD.

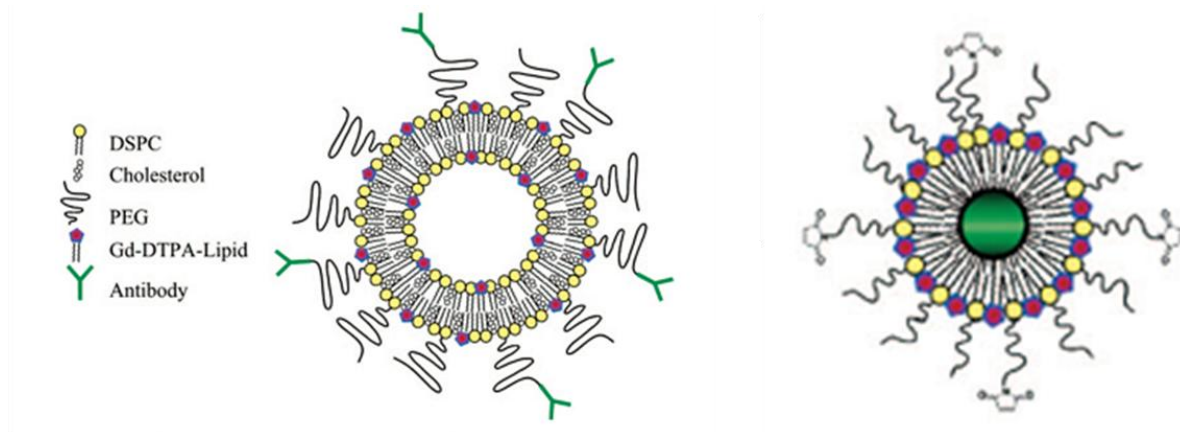


Figure 1.37 Comparaison entre un système micellaire liposomique et une QD enrobé par des liposomes.

4.3. Nanoparticules bimodales : silices et polymères

Dans les exemples précédemment évoqués, la matrice des nanoparticules fournissait les propriétés de luminescence, des agents multimodaux peuvent également être développés à partir de matrices inertes. La stratégie consiste alors à encapsuler des agents d'imagerie aux performances déjà connues dans une telle matrice. La synthèse de tels objets est souvent plus simple et la stœchiométrie des différents types de sondes peut être ajustée en fonction de la sensibilité des techniques d'imagerie associées. Parmi ces matrices inertes on peut distinguer deux grands types : les polymères et les nanoparticules de silice.

4.3.1. Les silices

Il existe une large littérature pour l'utilisation de la silice comme matrice pour nanoparticules multimodales. L'utilisation de la silice s'explique par ces nombreux avantages : elle est optiquement transparente et elle présente une bonne solubilité en milieu aqueux sans subir de gonflement particulier.

Deux types de synthèses sont couramment utilisés : le procédé sol gel de Stober et la microémulsion inverse (W/O)⁸⁰.

La méthode de Stober a l'avantage de ne pas utiliser de surfactants. Elle consiste en l'hydrolyse et la condensation (catalysées par une base) de tétraéthyle orthosilicate (TEOS) pour obtenir la matrice. Les conditions de réactions relativement douces permettent d'incorporer différentes sondes, comme des particules d'oxyde de fer, des chromophores

organiques (FITC) ou inorganiques (Ru(bpy)), ou des complexes de gadolinium (GdDTTA) 81-83.

Concernant l'approche via la microémulsion, la synthèse utilise un mélange de surfactant, d'huile et d'eau qui vont former des nanoréacteurs permettant la formation des particules de silice. Des agents bi-fonctionnels ont été produits grâce à cette méthode contenant des particules d'oxyde de fer ou des complexes de gadolinium mélangés à des chromophores organiques ou inorganiques⁸⁴⁻⁸⁶. Dans le cas des particules contenant du gadolinium, la synthèse permet d'obtenir des particules de 100 nm à la fois fluorescentes et générant un contraste à la fois sur les images T₁ et T₂. La charge en gadolinium de telles nanoparticules atteint les 16 000 Gd³⁺ par particule, donnant des valeurs de r₁ = 9 mM⁻¹s⁻¹ et r₂ = 116 mM⁻¹s⁻¹.

Une stratégie consistant à déposer des couches successives de silice est possible afin d'isoler les unes des autres les différentes sondes et éviter des interactions défavorables (quenching de la luminescence par exemple).

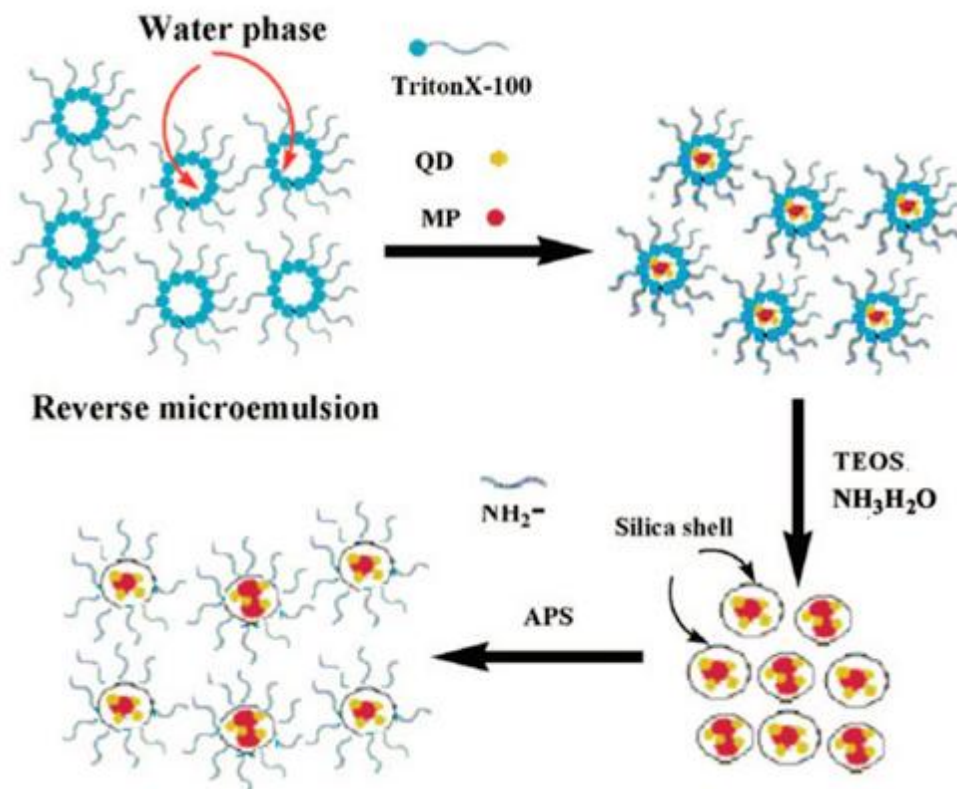


Figure 1.38 Représentation schématique de la synthèse par microémulsion inverse pour l'intégration de QD et de sondes magnétiques dans des nanobilles de silice.

4.4. Ligand « bimodaux »

Les agents de contrastes bimodaux désignent des systèmes qui portent en même temps deux entités apportant chacun un contraste pour deux types de techniques d'imagerie, en particulier pour les exemples qui nous intéressent, une sonde pour l'IRM et une sonde luminescente. Ce que nous avons décidé d'appeler ligand « bimodaux » par simplification de langage, sont des ligands qui sont capables de complexer le Gd(III) et de proposer des propriétés de relaxivité intéressantes mais aussi de complexer les lanthanides luminescents et de les sensibiliser efficacement pour la luminescence, qu'elle soit visible ou proche infrarouge.

Toutes les stratégies exposées précédemment reposent sur le même principe. La sonde bimodale est constituée de deux parties distinctes, l'une pour l'imagerie IRM (complexes de Gd(III), particules d'oxyde de fer, ...) et l'autre pour la luminescence (chromophores organiques, quantum dots, ...). Cependant, nous avons montré dans le paragraphe 3.4 que les complexes de lanthanides pouvaient constituer des sondes luminescentes performantes.

L'intérêt de l'utilisation des lanthanides réside dans la proximité de leur structure électronique. Le remplacement d'un lanthanide par un autre au sein d'un complexe permet d'obtenir un composé ayant des propriétés physiques différentes sans présenter de différences chimiques particulières. Le Gd³⁺ sera utilisé pour ses propriétés magnétiques tandis que l'Eu³⁺ et le Tb³⁺ ou l'Yb³⁺ et le Nd³⁺ seront utilisés respectivement pour la luminescence dans le visible ou le proche infra-rouge.

Cette approche est utilisée par exemple avec le Gd-HPDO3A (Prohance) utilisé par Geninatti Crich et al.⁸⁷ pour sensibiliser l'Europium(III) et permettre après incubation par des cellules, de visualiser celle-ci in vitro à la fois en luminescence visible et en IRM. Une stratégie similaire est utilisée par Manning et al.⁸⁸, avec une antenne quinoléine pour sensibiliser l'euporium et un motif pour cibler une protéine surexprimée (le récepteur périphérique des benzodiazepines PBR) dans certains tissus malades (cellules cancéreuses).

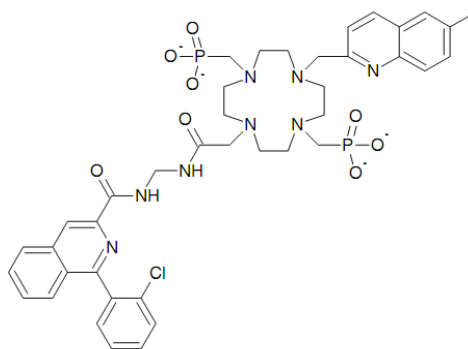


Figure 1.39 Structure du ligand PK111195 utilisé par Manning et al.

Les auteurs ont montré qu'en utilisant un mélange des complexes de gadolinium et d'euporium, ils parvenaient à obtenir une augmentation du rapport signal sur bruit de 9 :1 dans le cas de la luminescence et de 1.7 :1 dans le cas de l'IRM. Le ratio entre les deux complexes utilisés pour cette étude était de 60% de complexe de gadolinium et de 40% de complexe d'euporium. De cette façon, les auteurs ont pu obtenir deux types d'images des cellules surexprimant la protéine PBR.

D'autres ligands ont été développés dans le but d'être adaptés à la fois au gadolinium et aux lanthanides luminescents. Le point le plus délicat reste la présence de molécules d'eau en première sphère de coordination. En effet, si la relaxivité est corrélée au nombre de molécules d'eau directement liées au centre métallique, la présence d'oscillateurs OH à proximité a pour conséquence de quencher fortement la luminescence et il n'est pas toujours facile de conjuguer de bonnes propriétés de contrastes en IRM avec un bon rendement quantique.

Le groupe de Picard et al. a notamment développé plusieurs ligands visant à obtenir des complexes de lanthanides qui répondent à ces deux contraintes.

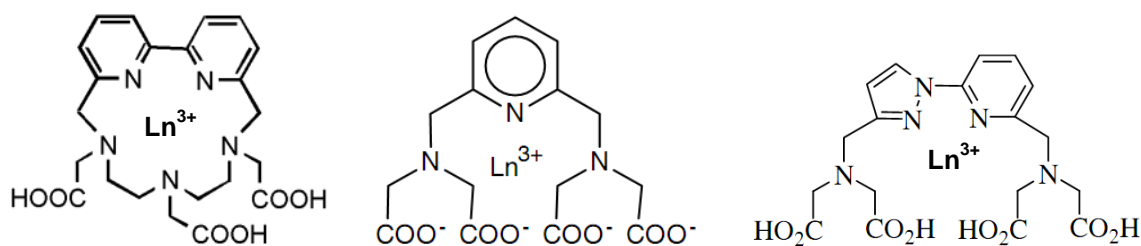


Figure 1.40 Complexes de lanthanides développés par Picard et al.

Le premier de ces trois ligands (figure 1.40), est basé sur une architecture macrocyclique inspirée d'un ligand heptadentate (PCPT[12])⁸⁹, dont le complexe de gadolinium présentait une relaxivité plus élevée que les agents commerciaux ($6.9 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$). Cependant, la présence de deux molécules d'eau sur le centre métallique empêche une bonne sensibilisation de l'Eu(III) pour la luminescence⁹⁰. En modifiant cette architecture macrocyclique et en remplaçant la pyridine par la bipyridine afin d'avoir un groupe sensibilisant plus efficacement l'Eu³⁺ et le Tb³⁺, les auteurs ont synthétisé un complexe de lanthanides mono aquo présentant des rendements quantiques intéressants ($\Phi_{\text{Eu}}=0.21$, $\Phi_{\text{Tb}}=0.10$)⁹¹ mais la relaxivité du complexe de Gd³⁺ reste assez faible ($r_1 = 3.4 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, 310K) notamment limitée par une vitesse d'échange très lente (25 fois inférieure à celle du DTPA). Les deux autres ligands présentent, eux, une structure polyaminocarboxylate. Le dérivé de N,C-pyrazolypyridine présente une relaxivité intéressante pour le complexe de Gd³⁺ mono aquo correspondant ($r_1 = 5.3 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) et il est capable de sensibiliser efficacement le Tb³⁺ ($\Phi_{\text{Tb}}=0.42$). Cependant, l'augmentation de relaxivité reste faible et la stabilité de ces complexes n'est pas forcément optimale pour une utilisation biologique ($\log K_{\text{cond}}=14.9$).

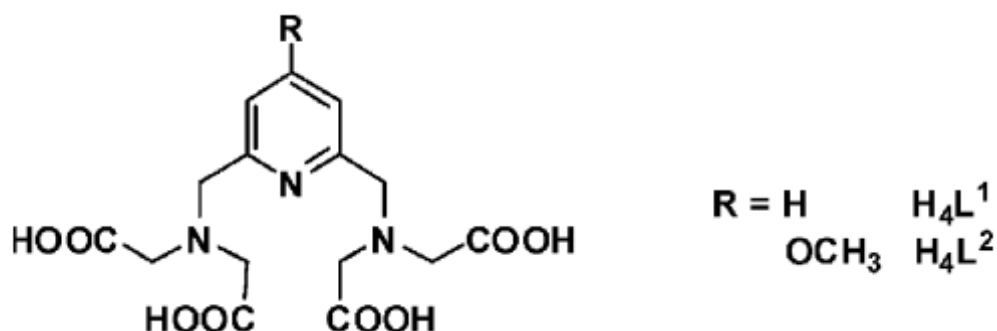


Figure 1.41 Le ligand PNM tétracétate et son dérivé métoxy.

Sur une architecture semblable, le PNM tétracétate a déjà été étudié pour les propriétés de luminescence de ses complexes d'Eu(III) et de Tb(III)⁹². Picard et al. ont mis en lumière des valeurs de relaxivité intéressantes pour le complexe de Gd(III) ($r_1 = 5.69 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁹³, soulignant ainsi la bimodalité d'un mélange entre complexe d'Eu(III) et de Gd(III). Sur ces bases, Toth et al.⁹⁴ se sont intéressés à la luminescence proche infra rouge, et ont obtenu, pour le complexe de Nd(III), des rendements quantiques comparables à ceux obtenus pour des systèmes uniquement optimisés pour la luminescence proche infrarouge⁹⁵. Il s'agit là d'un des rares systèmes reportés dans la littérature offrant à la fois la luminescence dans le proche infrarouge et le contraste en IRM. De plus, cet exemple démontre que malgré la présence en première sphère de deux molécules d'eau, il est possible de synthétiser des ligands qui

sensibiliseront suffisamment les lanthanides pour obtenir de bons rendements quantiques malgré l'hydratation des complexes.

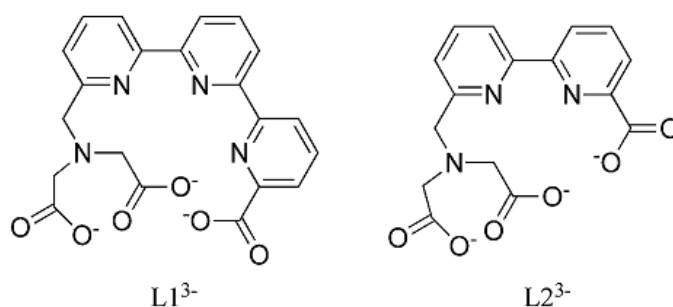


Figure 1.42 Structure des ligands basés sur la terpyridine (L1) et la bipyridine (L2)

Dans la même optique, des ligands bipyridine et terpyridine ont été synthétisés⁹⁶ et les propriétés de luminescence de leurs complexes d'Eu(III) ainsi que les propriétés de relaxivité de leurs complexes de Gd(III) ont été étudiés. Les relaxivités de ces complexes sont relativement élevées et le restent à haut champ ($GdL1 = 8.18 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $GdL2 = 8.25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 60MHz, 298K), en raison du nombre de molécules d'eau en première sphère pour ces complexes (respectivement $q = 2$ et 3). Malgré la présence de ces molécules d'eau, les ligands sont capables de sensibiliser efficacement l'Eu(III) et présentent des rendements quantiques de $\Phi = 5.8 \%$ et 2.6% respectivement, dont les valeurs limitées s'expliquent par la prévalence des phénomènes de désexcitations non radiatives dus à la présence des molécules d'eau en première sphère de coordination.

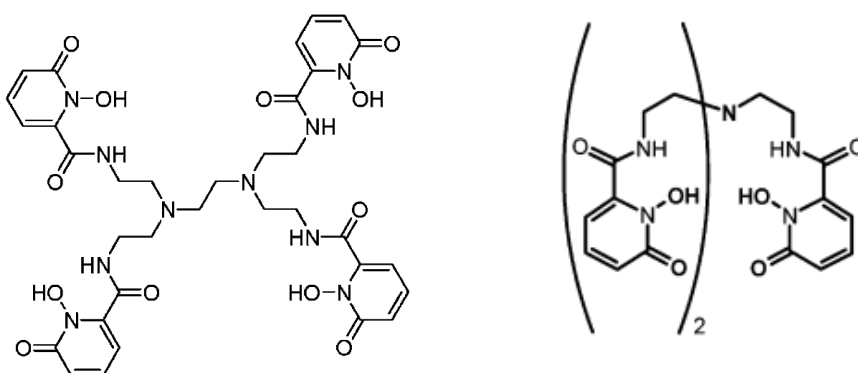


Figure 1.43 Ligand H(2,2)-1,2-HOPO et TREN-1,2-HOPO

Les ligands de type HOPO, qui ont déjà montré leur efficacité pour la synthèse de complexe de Gd(III) particulièrement efficaces comme sonde magnétique²⁹⁻³¹, sont également des chromophores efficaces pour sensibiliser l'ion Eu(III). Ainsi le complexe [Eu(H(2,2)-1,2-

HOPO)(H₂O)]⁻ présente un rendement quantique de 3.6% du fait de la présence d'une molécule d'eau en première sphère. La capacité de ces ligands à sensibiliser l'Eu(III) est d'ailleurs utilisée pour les études de complexation des anions, notamment dans le cas du [Eu(TREN-1,2-HOPO)(H₂O)₂]⁹⁷, où la titration par différents anions endogènes permet de suivre la complexation de l'ion au centre métallique et d'apporter des précisions sur la structure des adduits en solution.

Au sein de notre laboratoire, des complexes basés sur une unité chélatante picolinate ont été étudiés dans l'optique du développement de ligands bimodaux. Deux architectures différentes ont été choisies, un pivot 1,4,7-triazacyclononane et un pivot azote central, pour conduire à la production de deux familles de ligands qui ont été utilisées pour la complexation du Gd(III) d'une part et pour celle des ions Eu(III) et Tb(III) d'autre part.

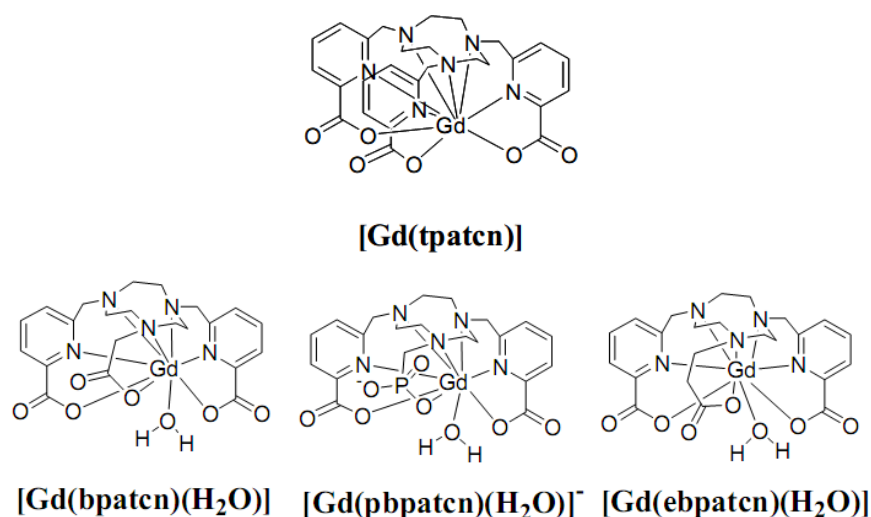


Figure 1.44 Complexes dérivés du [Gd(tpatcn)]

Le complexe [Gd(bpatcn)(H₂O)] a été synthétisé dans le but d'étudier l'influence de la structure du ligand sur la relaxation électronique du complexe. En effet, la relaxation électronique extrêmement lente du [Gd(tpatcn)] a été attribuée à sa symétrie C₃ et à sa rigidité en solution et à un champ du ligand faible. L'étude du [Gd(bpatcn)(H₂O)], qui a montré une relaxivité comparable à celle des agents commerciaux de première génération (3.95 mM⁻¹s⁻¹)⁹⁸ a lui aussi montré une relaxation électronique particulièrement lente à bas champ confirmant que la plateforme triazacyclononane et la présence de picolinate favorisent cette propriété. La détermination des paramètres dynamiques de ce complexe ont montré que la vitesse d'échange ($k_{ex} = 0.6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) de l'eau en première sphère correspondait à un échange

lent comparable au $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$. L'introduction d'un groupe encombrant à proximité du centre métallique a pour effet d'accélérer le processus d'échange dans les complexes mono aqua. Cette stratégie a conduit à la synthèse de deux analogue du $[\text{Gd}(\text{bpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ en remplaçant le carboxylate par un phosphonate pour le $[\text{Gd}(\text{pbpatcn})(\text{H}_2\text{O})]^-$ et un groupement propionate pour le $[\text{Gd}(\text{ebpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$. La vitesse d'échange de ces complexes est 100 fois supérieure à celle du $[\text{Gd}(\text{bpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$, mais dans le cas du complexe comportant le groupement phosphonate la relaxation électronique s'avère très rapide quelque soit le champ considéré, alors que dans le cas du complexe comportant le groupement propionate, la relaxation électronique lente semble préservée. De plus, les rendements quantiques des complexes de $[\text{Eu}(\text{bpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ et $[\text{Tb}(\text{bpatcn})(\text{H}_2\text{O})]$ sont particulièrement intéressants, bien qu'une molécule d'eau soit présente en première sphère de coordination. Ainsi les rendements quantiques atteignent 27% pour l'Eu(III) et 43% pour le Tb(III).

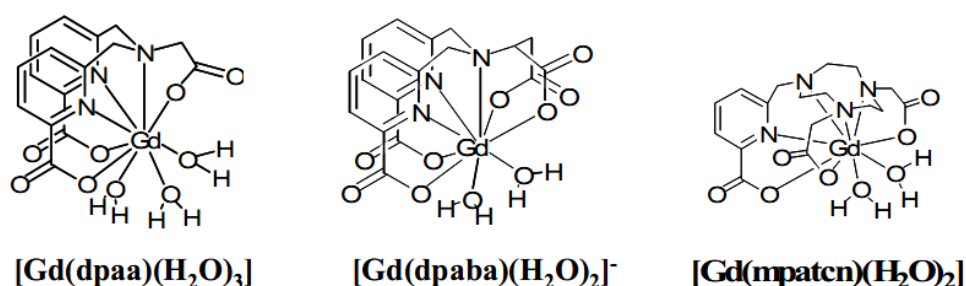


Figure 1.45 Complexes bis et tris aqua dérivés du $[\text{Gd}(\text{tpaa})(\text{H}_2\text{O})]$ (gauche) et du $[\text{Gd}(\text{tpatcn})]$ (droite).

Les études menées sur les complexes dérivés de picolines ne se sont pas cantonnées aux complexes mono aqua et des complexes de gadolinium poly hydratés ont été étudiés, afin d'obtenir des sondes performantes à haut champ. Pour cela, la structure du $[\text{Gd}(\text{tpaa})(\text{H}_2\text{O})_2]$ a été modifiée. Ce complexe présente des propriétés de relaxivités intéressantes mais sa solubilité trop faible limite son utilisation. Ainsi les complexes $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ et $[\text{Gd}(\text{dpaba})(\text{H}_2\text{O})_2]$ basés sur un azote central ainsi que le $[\text{Gd}(\text{mpatcn})(\text{H}_2\text{O})_2]$ ont été synthétisés. Ces systèmes ont montré une structure rigide en solution et un nombre de molécules d'eau en première sphère compris entre 2 et 3. Les valeurs de relaxivité obtenues pour ces complexes sont élevées à haut champ ($9.40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ ⁹⁹, $7.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le $[\text{Gd}(\text{dpaba})(\text{H}_2\text{O})_2]$, et $5.88 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le $[\text{Gd}(\text{mpatcn})(\text{H}_2\text{O})_2]$) en accord avec le nombre de molécules d'eau en première sphère et leur vitesse d'échange rapide.

L'intérêt de toutes ces structures est la possibilité de remplacer l'ion Gd(III) par les ions Tb(III) et Eu(III). En effet, les picolinates sont capables de sensibiliser ces lanthanides pour obtenir une émission dans le visible avec des rendements quantiques très intéressants, et cela malgré la présence de plusieurs molécules d'eau dans la première sphère de coordination. Ainsi le rendement quantique du complexe $[\text{Eu}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ atteint 10% et celui du $[\text{Tb}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ 21%.

Contexte et objectif du travail

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du développement de nouveaux complexes de lanthanides comme sondes bimodales pour l'imagerie optique et l'imagerie par résonance magnétique. Des agents de contrastes à base de Gd(III) sont utilisés avec succès depuis la fin des années 80. Si l'efficacité des agents commerciaux est satisfaisante, elle n'en reste pas moins inférieure aux valeurs optimales prédites par la théorie. Ces valeurs expérimentales, bien en dessous des possibilités théoriques des complexes de gadolinium comme sondes magnétiques, laissent donc la possibilité à une optimisation de la structure des complexes et à l'obtention de sondes plus efficaces. De plus, les progrès scientifiques réalisés ces dernières années dans le développement d'aimants à haut champ demandent le développement d'une nouvelle classe d'agents de contrastes. Nous avons vu dans l'introduction que de nombreux paramètres influençaient la relaxivité des agents de contrastes, que ce soit le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination, leur vitesse d'échange ou le temps de corrélation rotationnelle du complexe. Par la conception de nouvelles structures, il est possible d'influer sur ces paramètres et de les optimiser. Leur influence variant en fonction du champ, des complexes ayant des propriétés différentes sont nécessaires pour l'imagerie à haut champ (7 à 9.4 T) ou aux champs utilisés couramment cliniquement (0.5 à 1.5 T).

Aux champs classiques des imageurs, les paramètres à optimiser pour améliorer la relaxivité des complexes sont la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère et le temps de corrélation rotationnelle du complexe. De nombreuses études sur ces paramètres ont été menées et ont mis en lumière leur influence sur la relaxivité. Le développement s'est donc orienté vers des complexes ayant une vitesse d'échange k_{ex} très élevée, afin de pouvoir ensuite optimiser d'autres paramètres. La nécessité d'un temps de corrélation rotationnelle plus long a dirigé les recherches vers des complexes plus gros, soit par association non covalente avec des macromolécules, soit par le greffage sur des supports et le développement d'agents multimériques. Cependant à haut champ l'influence de ces deux paramètres est plus limitée et l'allongement du τ_R peut avoir l'effet inverse sur la relaxivité. La stratégie pour le développement d'agent de contraste à haut champ réside plus dans l'augmentation du nombre de molécules d'eau en première sphère, bien que l'optimisation du τ_R à haut champ soit aussi possible par la conception de complexes de taille moyenne.

Mais de par sa faible sensibilité et malgré des avantages non négligeables (haute résolution spatiale, forte pénétration dans les tissus), l'IRM reste limitée, notamment dans l'optique de développement de l'imagerie moléculaire. En effet, le développement de l'imagerie médicale tend vers l'imagerie moléculaire, c'est-à-dire la capacité de détecter et de localiser des processus biologiques au niveau des cellules, des tissus et des organismes vivants. Mais aucune technique d'imagerie seule ne permet d'atteindre une telle précision, un tel degré d'information. Le recours à une combinaison de technique semble alors envisageable afin de pallier les inconvénients des unes par les avantages des autres. La sensibilité étant la principale carence de l'IRM, le couplage avec l'imagerie optique est un moyen d'apporter une information complémentaire et de développer des applications inédites en combinant les deux techniques. Les complexes de lanthanides offrent dans cette optique des possibilités à la fois pour les sondes magnétiques et pour les sondes luminescentes.

Parmi les différentes stratégies envisageables, le recours à une même structure pouvant chélater à la fois le Gd(III) et les lanthanides émettant dans le proche infrarouge présentent plusieurs avantages. La grande proximité chimique des lanthanides permet d'obtenir des complexes qui auront le même comportement chimique au sein d'un milieu donné (solubilité, association avec des macromolécules, stabilité). Cette grande proximité des complexes permettrait d'obtenir une biodistribution similaire pour les deux types de sondes et une co-validation de leur migration au sein des organismes. Comme mentionné précédemment, les sensibilités des deux types de techniques différentes sont différentes. Il serait ainsi possible, au sein d'un mélange entre sonde magnétique et optique, de pondérer les concentrations de chaque complexe pour compenser ces différences.

Une série de complexes de lanthanides a déjà été étudiée au laboratoire. Il s'agissait de complexes présentant des unités chélatantes picolines, qui permettait d'obtenir des complexes de gadolinium avec des relaxivités intéressantes et de bons rendements quantiques pour la luminescence de l'Eu(III) et du Tb(III) dans le visible.

En plus de cette série, le changement d'unité chélatante avait été amorcé et les complexes $[\text{Ln}(\text{thqtcn})]$ et $[\text{Ln}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ présentant trois unités 8-hydroxyquinoléine avaient été étudiés, et s'étaient avérés particulièrement intéressants pour la sensibilisation de l'Yb(III) et du Nd(III) pour la luminescence dans le proche infrarouge.

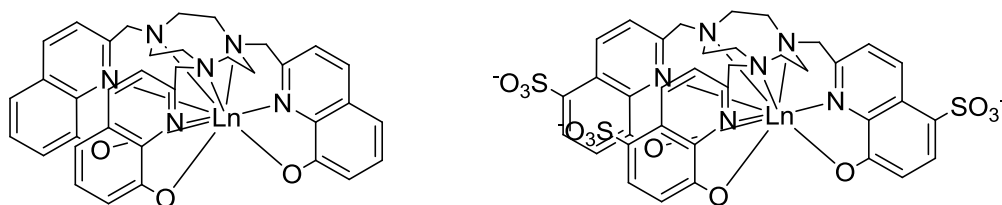


Figure 1.46 Complexe [Ln(thqtcn)] et [Ln(thqtcn-SO₃)]³⁻

En partant des différentes architectures déjà utilisées, une série de complexes utilisant les 8-hydroxyquinoléines a été étudiée. En reprenant la plateforme 1,4,7-triazacyclononane, des analogues du ligand thqtcn-SO₃ ont été synthétisés, en remplaçant respectivement un et deux bras par un groupement phénol. Les trois complexes de lanthanides correspondant ont ensuite été étudiés pour déterminer et comparer leurs différentes propriétés en termes de relaxivité ainsi que de luminescence.

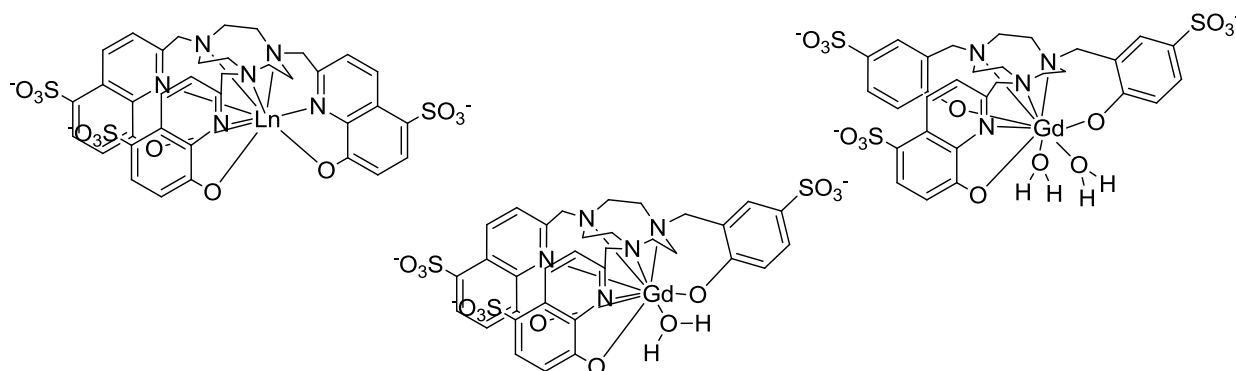


Figure 1.47 Complexes de [Ln(thqtcn-SO₃)]³⁻ [Ln(dhqtcn-SO₃)(H₂O)]³⁻ et [Ln(hqtcn-SO₃)(H₂O)₂]³⁻

Afin d'obtenir des informations sur l'influence structurale des ligands utilisés, notamment concernant les paramètres de relaxivité, une autre architecture a été employée, à savoir l'architecture amine tertiaire, déjà employée pour les complexes basés sur des picolines (dpaa, dpaba). Ceci a eu également pour but d'accéder à des ligands de denticité réduite, autorisant des complexes possédant deux et trois molécules d'eau directement liées sur le centre métallique.

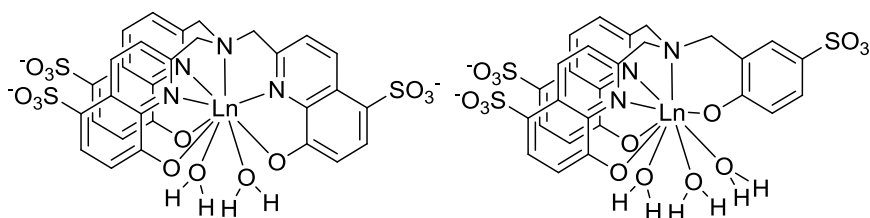


Figure 1.48 Complexes de $[\text{Ln}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ et $[\text{Ln}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Ces complexes poly-hydratés doivent produire des relaxivités plus élevées et les études en solutions permettront d'évaluer les variations de stabilité des complexes et leurs éventuelles interactions avec les espèces présentes en milieu biologique (anions endogènes, protéines) ainsi que de jauger l'impact du nombre de molécules d'eau sur la luminescence de ces complexes. En effet, si la relaxivité est favorisée par le nombre de molécules d'eau, la luminescence est quenchée par les oscillateurs de type liaison O-H qui induisent des désexcitations non radiatives de l'état excité des lanthanides. L'étude de complexe poly-hydraté permettrait de savoir si un transfert d'énergie suffisamment efficace entre le ligand et le métal peut compenser ce genre de limitation.

Ce manuscrit est organisé de la manière suivante : après avoir exposé la synthèse des ligands (chapitre II), nous présenterons l'étude des complexes de Gd(III) du point de vue de leur structure, leur stabilité et leurs propriétés de relaxivité (chapitre III). Enfin, le chapitre IV sera consacré à l'étude de la luminescence des complexes dans le proche infrarouge (Ln =Yb, Nd, Er).

Bibliographie

- (1) Shannon, R. D. In *Acta Crystallogr.*, **1969**, 25, 925.
- (2) Bünzli, J. C.; Piguet, C. In *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 1048.
- (3) Kuriki, K.; Koike, Y.; Okamoto, Y. *Chem Rev*, **2002**, 102, 2347.
- (4) Kido, J.; Okamoto, Y. *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 2357.
- (5) König, K. *J. Microscop.*, **2000**, 200, 83-104.
- (6) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2293.
- (7) Goldstein, H.; Lumma, W.; Rudzik, A. *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1989**, 24, 265.
- (8) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Gadelle, A.; Gambarelli, S.; Delangle, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 10401-10413.
- (9) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Seneque, O.; Cisnetti, F.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Delangle, P. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 7083-7093.
- (10) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Delangle, P. *J. Phy. Chem. B*, **2010**, 114, 8770-8781.
- (11) Solomon, I.; Bloembergen, N. *J Chem Phy*, **1956**; 25, 261.
- (12) Bloembergen, N.; Morgan, L. O. *J Chem Phy*, **1961**, 34, 842.
- (13) Hermann, P.; Kotek, J.; Kubicek, V.; Lukes, I. *Dalton Trans.*, **2008**, 3027-3047.
- (14) Dweck, R. A. *Relaxation in paramagnetic systems. Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry*; Clarendon Press, Oxford, **1973**.
- (15) Swift, T. J.; Connick, R. E. *J. Chem. Phys.*, **1962**, 37, 307.
- (16) Z. Luz, S. J. Meiboom, *J. Chem. Phys.*, **1963**, 39, 366.
- (17) Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Wiley, 1st ed. : Winchester, **2001**.
- (18) Fries, P. H.; Mazzanti, M.; Gateau, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 15801.
- (19) McLachlan, A. D., Proceedings of the Royal Society of London a Mathematical and Physical Sciences, **1964**, 280, 271.
- (20) Y. Ayant, E. Belorisky., J. Alizon, J. Gallice, *Journal de Physique*, **1975**, 36, 991.
- (21) Hwang, L. P.; J. H. Freed *J. Chem. Phys.*, **1975**, 4017.
- (22) Freed, J. H. *J. Chem. Phys.*, **1978**, 68, 4034.

- (23) Albrand, J. P.; Taieb, M. C.; Fries, P. H.; Belorisky, E. *J. Chem. Phys.*, **1983**, 78, 5809.
- (24) Polnaszek, C. F.; Bryant, R. G. *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81, 4038.
- (25) Botta, M. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 399.
- (26) Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzan, G.; Pagliarin, R.; Piccinini, M.; Sisti, M.; Terreno, E. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1997**, 2, 470-479
- (27) Aime, S.; Botta, M.; Terreno, E.; Anelli, P. L.; Uggeri, F. *Magn. Res. Med.*, **1993**, 30, 583-591.
- (28) Aime, S.; Calabi, L.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Losi, P.; Maiocchi, A.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 7588-90.
- (29) Hajela, S.; Botta, M.; Giraudo, S.; Xu, J.; Raymond, K. N.; Aime, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122.
- (30) Thompson, M. K.; Doble, D. M.; Tso, L. S.; Barra, S.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 8577-86.
- (31) Pierre, V. C.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 8355-8364.
- (32) Helm, L.; Merbach, A. E. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 187, 151.
- (33) Barnhart, J. L.; N.Kuhnert; Bakan, D. A.; Berk, R. N. *Magn. Reson. Imag.*, **1987**, 5, 221-231.
- (34) Docherty, R. J. *J. Physiol. (Lond)*, **1988**, 398, 33-47.
- (35) Wray, D.; Porter, V. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1993**, 356-367.
- (36) Cacheris, W. P.; Quay, S. C.; Rocklage, S. M. *Magn. Reson. Imag.*, **1990**, 8, 467-481.
- (37) Muhler, A.; Saeed, M.; Brasch, R. C.; Higgins, C. B. *Radiology*, **1992**, 183, 523-528.
- (38) Muhler, A.; Saeed, M.; Brasch, R. C.; Higgins, C. B. *Radiology*, **1992**, 184, 159-164.
- (39) Sullivan, M. E.; Goldstein, H. A.; Sansone, K. J.; Stoner, S. A.; Holyoak, W. L.; Wiggins, J. *Am. J. Neuroradiol.*, **1990**, 11, 537-540.
- (40) Caravan, P.; Cloutier, N. J.; Greenfield, M. T.; McDermid, S. A.; Dunham, S. U.; Bulte, J. W. M.; J. C. Amedio, J.; Looby, R. J.; Supkowski, R. M.; W. Horrocks, J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3152-3162.
- (41) Rummeny, E. J.; Marchal, G. *Acta Radiol.*, **1997**, 38, 626.

- (42) Stavila, V.; Allali, M.; Canaple, L.; Stortz, Y.; Franc, C.; Maurin, P.; Beuf, O.; Dufay, O.; Samarut, J.; Janier, M.; Hasserodt, J. *New J. Chem.* **2007**, *32*, 428-435.
- (43) Hasserodt, J.; Stavila, V.; Stortz, Y.; Franc, C.; Pitrat, D.; Maurin, P. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 3943-3947.
- (44) Hasserodt, J.; Touti, F.; Singh, A. K.; Maurin, P.; Canaple, L.; Beuf, O.; Samarut, J. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 4274-4278.
- (45) Aime, S.; Crich, S. G.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Teia, L.; Terreno, E. *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, *250*, 1562-1579.
- (46) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy 2nd edition*; Kluwer Academics /Plenum Publishers: New York, **1999**.
- (47) Haugland, R. *Web edition ed.*; Invitrogen.
- (48) Panchuk-Voloshina, N.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; F.Mao; Leung, W. Y.; Hauglang, R. P. *J. Histochem. Cytochem.*, **1999**, *47*, 1179.
- (49) Zhao, W.; Carreira, E. M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 7254.
- (50) Parker, D.; Williams, J. A. G. *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 40*, **2003**.
- (51) Guo, D.; Duan, C.; Lu, F.; Hasegawa, Y.; Meng, Q.; Yanagida, S. *Chem. Commun.*, **2004**, 1486–1487.
- (52) Imbert, D.; Cantuel, M.; Bünzli, J. C.; Bernardinelli, G.; Piguet, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 15698–15699.
- (53) Crosby, G. A.; Kasha, M. *Spectrochim. Acta*, **1958**, *10*, 377-382.
- (54) Horrocks, W. D. J.; Bolender, J. P.; Smith, W. D.; Supkowski, R. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 156998-156999.
- (55) Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.*, **1953**, *21*, 836-850.
- (56) Förster, T. H., *Discussion Faraday Soc.*, **1959**, *27*, 7-17.
- (57) Silva, A. P. D.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; T.Rademacher, J.; Rice, T. E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *25*, 2116.
- (58) Silva, A. P. D.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; T.Rademacher, J.; Rice, T. E. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1515.
- (59) Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V. M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J. C.; Kantare, J. *J. Lum.*, **1997**, *75*, 149.
- (60) Gillies, R. J. *J. Cell. Biochem. Supp.*, **2002**, *39*, 231-238.
- (61) Wechalekar, K.; Sharma, B.; Cook, G. *Clin. Radiol*, **2005**, *60*, 1143.

- (62) Judenhofer, M. S.; Wehrl, H. F.; Newport, D. F.; Catana, C.; Siegel, S. B.; Becker, M.; Thielscher, A.; Kneilling, M.; Lichy, M. P.; Eichner, M.; Klingel, K.; Reischl, G.; Widmaier, S.; Röcken, M. *Nat. Med.*, **2008**, *14*, 459.
- (63) Pichler, B. J.; Judenhofer, M. S.; Catana, C.; Walton, J. H.; Kneilling, M.; Nutt, R. E.; Siegel, S. B.; Claussen, C. D.; Cherry, S. R. *J. Nucl. Med.*, **2006**, *47*, 639-647.
- (64) Hueber, M. M.; Staubli, A. B.; Kustedjo, K.; Gray, M. H. B.; Shih, J.; Fraser, S. E.; Jacobs, R. E.; Meade, T. J. *Bioconjug. Chem.*, **1998**, *9*, 242-249.
- (65) Modo, M.; Cash, D.; Mellodew, K.; Williams, S. C. R.; Fraser, S. E.; Meade, T. J.; Price, J.; Hodges, H. *Neuroimage*, **2002**, *17*, 803.
- (66) Modo, M.; Mellodew, K.; Cash, D.; Fraser, S. E.; Meade, T. J.; Price, J.; Williams, S. C. R. *Neuroimage*, **2004**, *21*, 311-317.
- (67) Guo, K.; Berezin, M. Y.; Zheng, J.; Akers, W.; Lin, F.; Teng, B.; Vasalatiy, O.; Gandjbakhche, A.; Griffiths, G. L.; Achilefu, S. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3705-3707.
- (68) T.Koullourou; Natrajan, L. S.; Bhavsar, H.; Pope, S. J. A.; Feng, J.; Narvainen, J.; Shaw, R.; Scales, E.; Kauppinen, R.; Kenwright, A. M.; Faulkner, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2178-2179.
- (69) Jin, T.; Yoshioka, Y.; Fujii, F.; Komai, Y.; Seki, J.; Seiyama, A. *Chem. Commun.*, **2008**, 5764.
- (70) Gerion, D.; Herberg, J.; Bok, R.; Gjersing, E.; Ramon, E.; Maxwell, R.; Kurhanewicz, J.; Budinger, T. F.; Gray, J. W.; Shuman, M. A.; Chen, F. F. *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 12542.
- (71) Prinzen, L.; Miserus, R.; Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Deckers, N.; Bitsch, N. J.; Megens, R. T. A.; Douma, K.; Heemskerk, J. W.; Kooi, M. E.; Frederik, P. M.; Slaaf, D. W.; van Zandvoort, M.; Reutel-ingsperger, C. P. M. *Nano Lett.*, **2007**, *7*, 93.
- (72) Lanza, G.; Lorenz, C.; Fischer, S.; Scott, M.; Cacheris, W.; kaufmann, R.; Gaffney, P.; Wickline, S. *Acad. Radiol.*, **1998**, *5*, 1173.
- (73) Yu, X.; Song, S. K.; Chen, J. J.; Scott, M. J.; Fuhrhop, R. J.; Hall, C. S.; Gaffney, P. J.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M., *Magn. Reson. Med.* , **2000**, *44*, 867.
- (74) Mulder, J.; Strijkers, G.; Griffioen, A.; Molema, G.; Storm, G.; Koning, G.; Nicolay, K. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 799.
- (75) Koole, R.; van Schooneveld, M. M.; Hilhorst, J.; Castermans, K.; Cormode, D. P.; Strijkers, G. J.; Donega, C. D.; Vanmaekelbergh, D.; Griffioen, A. W.; Nicolay, K.; Fayad, Z. A.; Meijerink, A.; Mulder, W. J. M. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2471.

- (76) Mulder, W. J. M.; Castermans, K.; van Beijnum, J. R.; Egbrink, M.; Chin, P. T. K.; Fayad, Z. A.; Lowik, C.; Kaijzel, E. L.; Que, I.; Storm, G.; Strijkers, G. J.; Griffioen, A. W.; Nicolay, K. *Angiogenesis* **2009**, *12*, 17.
- (77) Mulder, W. J. M.; Strijkers, G. J.; Briley-Saboe, K. C.; Frias, J. C.; Aguinaldo, J. G. S.; Vucic, E.; Amirbekian, V.; Tang, C.; Chin, P. T. K.; Nicolay, K.; Fayad, Z. A. *Magn. Reson. Med.*, **2007**, *58*, 1164.
- (78) van Schooneveld, M. M.; Vucic, E.; Koole, R.; Zhou, Y.; Stocks, J.; Cormode, D. P.; Tang, C. Y.; Gordon, R. E.; Nicolay, K.; Meijerink, A.; Fayad, Z. A.; Mulder, W. J. M. *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 2517.
- (79) van Tilborg, G. A. F.; Mulder, W. J. M.; Chin, P. T. K.; Storm, G.; Reutelingsperger, C. P.; Nicolay, K.; Strijkers, G. J. B. C., 17, 865. Yu, W. W.; Chang, E.; Drezek, R.; Colvin, V. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **2006**, *348*, 781.
- (80) Santra, S.; Dutta, D.; Walter, G. A.; Moudgil, B. M. *Technol. Cancer Res. Treat.*, **2005**, *4*, 593.
- (81) Yang, J.; Lee, J.; Kang, J.; Chung, H. H.; Lee, K.; Suh, J. S.; Yoon, H. G.; Huh, Y. M.; Haam, S. *Nanotech.*, **2008**, *19*, 075610.
- (82) Kim, J. S.; Rieter, W. J.; Taylor, K. M. L.; An, H.; Lin, W. L.; Lin, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8962.
- (83) Ren, C. L.; Sun, J. F.; Li, J. H.; Chen, X. G.; Hu, Z. D.; Xue, D. S. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 640.
- (84) Kim, J. S.; Rieter, W. J.; Taylor, K. M. L.; An, H.; Lin, W. L.; Lin, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8962.
- (85) Kim, J. S.; Rieter, W. J.; Taylor, K. M. L.; An, H.; Lin, W. L.; Lin, W. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3680.
- (86) Santra, S.; Bagwe, R. P.; Dutta, D.; Stanley, J. T.; Walter, G. A.; Tan, W.; Moudgil, B. M.; Mericle, R. A. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2165.
- (87) Crich, S. G.; Biancon, L.; Cantaluppi, V.; Duo, D.; Esposito, G.; Russo, S.; Camussi, G.; Aime, S. *Magn. Res. Med.*, **2004**, 938-944
- (88) Manning, H. C.; Goebel, T.; Thompson, R. C.; Price, R. R.; Lee, H.; Bornhop, D. J. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 1488-1495.
- (89) Kim, W. D.; Kiefer, G. E.; Maton, F.; McMillan, K.; Muller, R. N.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2233-2243.
- (90) Siaugue, J. M.; Favre-Réguillon, A.; Dioury, F.; Plancque, G.; Foos, J.; Madic, C.; Moulin, C.; Guy, A. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2003**, 2834-2838.

- (91) Nasso, I.; Galaup, C.; Havas, F.; Tisnès, P.; Picard, C.; Laurent, S.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 8293.
- (92) Mukkala, V.-M.; Sund, C.; Kwiatkowski, M.; Pasanen, P.; Högberg, M.; Kankare, J.; Takalo, H. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 1621-1632.
- (93) Laurent, S.; Elst, L. V.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C. *Bioorg. Med. Lett.* **2007**, *17*, 6230-6233.
- (94) Pellegatti, L.; Zhang, J.; B.Drahos; S.Villette; Suzenet, F.; G.Guillaumet; Petoud, S.; Toth, E. *Chem. Commun.* **2008**, 6591-6593.
- (95) Comby, S.; Imbert, D.; Vandevyver, C.; Bünzli, J. C. *Chem. Eur.J.* **2007**, *13*, 936.
- (96) Toth, E.; Kubicek, V.; Hamplova, A.; Maribe, L.; Mameri, S.; Ziessel, R.; Charbonniere, L. *Dalton Trans.* **2009**, 9466-9474.
- (97) Jocher, C. J.; Moore, E. G.; Xu, J. D.; Avedano, S.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 9182-9191.
- (98) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, 7133 - 7150.
- (99) Nonat, A.; Fries, P. H.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8489-8506.

Chapitre II : Synthèse des ligands

Chapitre II : Synthèse des ligands	82
1. Conceptions des ligands	83
2. Les ligands basés sur le motif hydroxyquinoléine	85
3. Stratégie de synthèse	87
4. Synthèse et caractérisation des ligands à pivot azote central	90
4.1 Synthèse du H ₃ thqN-SO ₃	90
4.2 Synthèse du H ₄ dhqN-asp.....	92
4.3 Synthèse du H ₃ dhqN-gly.....	95
4.4 Synthèse du H ₃ dhqN-SO ₃	98
5. Synthèse et caractérisation des ligands à pivot 1,4,7-triazacyclononane.....	101
5.1 Synthèse du H ₃ dhqN-SO ₃	101
5.2 Synthèse du H ₃ dhqtcn-SO ₃	103
5.3 Synthèse du H ₃ hqtcn-SO ₃	106
6. Synthèse des ligands dérivés de la dpaa.....	108
5.4 Synthèse du dU2'Pd ₃ paaH ₃	109
5.5 Synthèse du dU5Pd ₃ paaH ₃ et du dU5Ed ₃ paaH ₃	110
Bibliographie	112

1. Conceptions des ligands

Nous avons souligné qu'en jouant sur la structure et l'architecture des ligands il est possible de modifier les propriétés des complexes de lanthanides associés. Comme nous l'avons vu en introduction, les ligands utilisés pour la synthèse de complexes de lanthanides présentent deux types d'architectures : les dérivés macrocycliques, utilisant des dérivés de cyclènes fonctionnalisés (DOTA, DO3A, ...) et les ligands présentant une structure linéaire (DTPA et dérivés notamment). Tous ces ligands présentent des bras carboxylates. Si l'on cherche une stratégie intermédiaire, l'utilisation de ligands tripodes représente une alternative intéressante entre des récepteurs rigides et des ligands linéaires trop flexibles. Cette architecture permet d'une part d'apporter une pré-disposition à la complexation qui peut conduire à une stabilité accrue. D'autre part la flexibilité du ligand assure une cinétique de complexation rapide. Différents types de motifs (ou ancres) permettent d'accéder à des tripodes : le motif amine tertiaire, dans lequel trois motifs coordonnants sont reliés par des ponts méthylènes à un azote central, le motif *tren*¹, dans lequel l'azote central est relié à trois fonctions amide via un pont éthylène, et le motif cyclique 1,4,7 triazacyclononane (*tacn*).

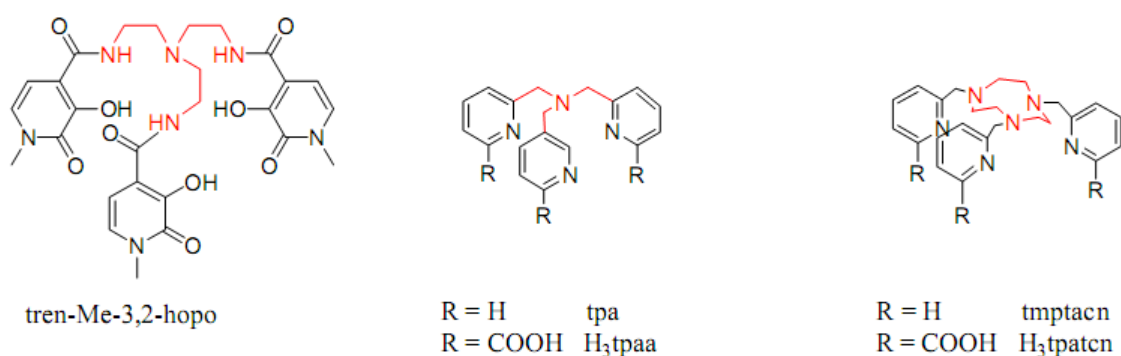


Figure 2.1 Exemple de ligands utilisant les différentes « ancres » : *tren*, amine tertiaire, *tacn*.

La plupart des motifs utilisés pour la chimie de coordination des lanthanides (III) viennent de la chimie des métaux de transitions. Le motif *tren* a notamment été utilisé dans le développement de ligands pour la complexation des métaux de transition²⁻⁵. En ce qui concerne la chimie des lanthanides(III), K. Raymond et al. ont développé une famille de ligands dérivés du *tren-Me-3,2-hopo* dont les complexes de gadolinium présentent une relaxivité particulièrement intéressante^{1,6-8}. Les ligands basés sur une amine tertiaire sont

synthétiquement plus difficiles d'accès mais permettent d'obtenir des complexes plus rigides. Une telle architecture est depuis longtemps utilisée pour obtenir des complexes de Fe(II)⁹ ou de Cu(I)^{10,11} afin de modéliser les sites actifs d'enzymes ou de métalloprotéines. La tpa (tris(2-pyridylméthyl)amine), synthétisée par G. Anderegg et F. Wenk en 1967¹², a été utilisée au laboratoire pour la synthèse de complexes de lanthanides en milieu organique puis a servi de base pour le développement de nouveaux ligands (tpaa, dpaba, dpaa) contenant des groupements pyridines carboxylates capables de former des complexes de lanthanides stables dans l'eau¹³⁻¹⁵. De la même façon, le 1,4,7 triazacyclononane et ses dérivés sont utilisés pour la complexation des métaux de transition et pour le développement de modèles fonctionnels de site actifs de métalloprotéines^{13,14}. Cependant, l'introduction d'une dissymétrie sur une telle plateforme est délicate et diminue souvent le rendement de la synthèse. A partir de cette plateforme, des analogues des ligands « amine tertiaire » ont été synthétisés au sein du laboratoire pour la complexation des lanthanides(III) et la formation d'espèces stables dans l'eau¹⁵⁻¹⁷ (mpatcn, bpatcn, tpatcn). Nous avons donc décidé de nous appuyer sur ces deux architectures : la plateforme 1,4,7 triazacyclononane et le pivot azote central. Ces deux structures ont permis, comme mentionné précédemment, de synthétiser des ligands basés sur l'unité chélatante picolinate bien adaptés aux lanthanides et qui ont montré des propriétés intéressantes aussi bien pour la relaxivité des complexes de gadolinium que pour la luminescence de l'Eu(III) et du Tb(III). En reprenant les mêmes architectures et en remplaçant l'unité chélatante par l'hydroxyquinoléine, nous espérons conserver voire améliorer les propriétés de relaxivité des complexes de gadolinium, ainsi qu'accéder à la sensibilisation du Nd(III) et de l'Yb(III) pour la luminescence proche infrarouge. Les complexes basés sur les picolines ne présentent pas une stabilité suffisante pour leur utilisation in vivo et cela explique également le choix de l'hydroxyquinoléine comme unité chélatante.

2. Les ligands basés sur le motif hydroxyquinoléine

Des complexes de Ln(III) ont déjà été développés au sein de notre groupe comme sondes bimodales IRM / imagerie optique. Les ligands correspondants sont basés sur des unités picolines, qui permettent de sensibiliser les ions Eu(III) et Tb(III) dans le domaine du visible. Pour le design de nos ligands, nous avons décidé de remplacer les unités picolines par des hydroxyquinoléines, et cela pour plusieurs raisons. En effet, l'hydroxyquinoléine est connue pour former des complexes stables avec une grande variété de métaux²¹⁻²⁸. Ces complexes sont souvent luminescents et la longueur d'onde d'émission peut être ajustée du bleu (complexe d'Al(III)¹⁸) au proche infra rouge (Yb, Nd, Er)²⁹⁻³⁵. Les complexes d'hydroxyquinoléine ont donc été largement utilisés ces dernières années pour le développement des OLEDs notamment^{19,20}. Cette capacité à sensibiliser ces lanthanides pour l'émission proche infrarouge a dirigé notre choix vers des complexes d'hydroxyquinoléine. Comme nous l'avons vu en introduction, les tissus biologiques présentent une fenêtre de transparence qui correspond aux longueurs d'onde du proche infra-rouge, permettant le développement d'applications médicales pour l'imagerie optique. De plus, la stabilité des complexes de lanthanides est particulièrement intéressante²¹⁻²³, cette propriété étant cruciale pour le développement de sondes bimodales et pour leur potentiel usage in-vivo. La biocompatibilité du synthon hydroxyquinoléine est également importante. Des dérivés d'hydroxyquinoléines ont par exemple été étudiés pour l'inhibition d'HIV-1 intégrase et les tests menés ont montré que la plupart de ces molécules n'avait pas de cytotoxicité notable^{40,41}. De la même façon, l'utilisation de l'hydroxyquinoléine pour le développement de sondes fluorescentes sensibles au Cd(II) ou au Mg(II) au sein des cellules n'a pas non plus montré de cytotoxicité particulière^{24,25}. Dans un rapport du NIH (National Health Institute) de 1985²⁶, il est noté que l'absorption par voie orale de 5-chloro-8-hydroxyquinoléine (750mg) par des sujets volontaires n'entraîne pas d'accumulation du produit, qui présente un temps de demi-vie plasmatisque de 11 à 14h et pas de toxicité particulière.

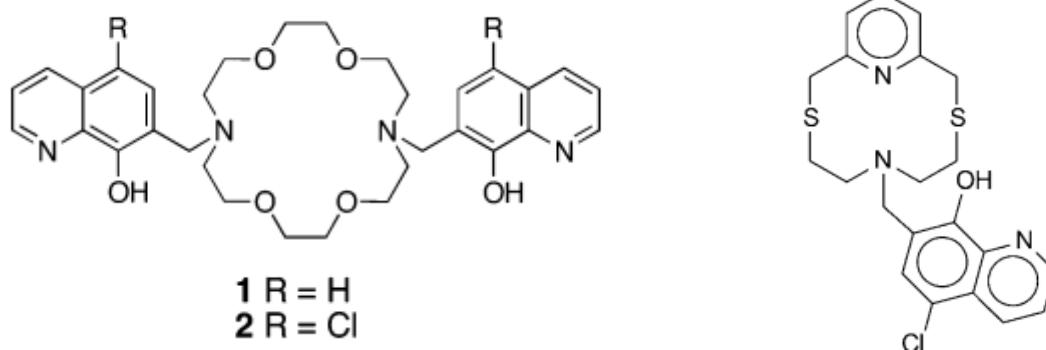


Figure 2.2 exemple de ligand comportant des unités hydroxyquinoléines utilisés comme sondes cellulaires pour la détection des métaux (respectivement Mg(II) ²⁴ et Cd(II) ²⁵)

Enfin l'hydroxyquinoléine est capable d'interagir avec certains sites hydrophobes des protéines. La 7-hydroxyquinoléine est capable par exemple de se lier spécifiquement avec la poche hydrophobe IIA de l'albumine sérique humaine (HSA)²⁷. La possibilité d'interaction avec l'albumine sérique représente un intérêt certain pour le développement d'agents de contrastes vasculaires, la formation d'un adduit albumine-complexe Gd(III) dans le sang entraînant une augmentation de la relaxivité de tel système.

L'ensemble de ces travaux indique une bonne biocompatibilité de l'hydroxyquinoléine et en fait un synthon adapté à la synthèse d'agents de contrastes, à la fois par ses propriétés en luminescence mais aussi par sa faible toxicité et sa potentielle interaction avec des protéines.

3. Stratégie de synthèse

Comme mentionné précédemment §1.1, des ligands utilisant les picolinates comme unités chélatantes ont déjà été développés au laboratoire, aussi bien en se basant sur une architecture à azote central qu'en utilisant la plateforme 1,4,7-triazacyclononane.

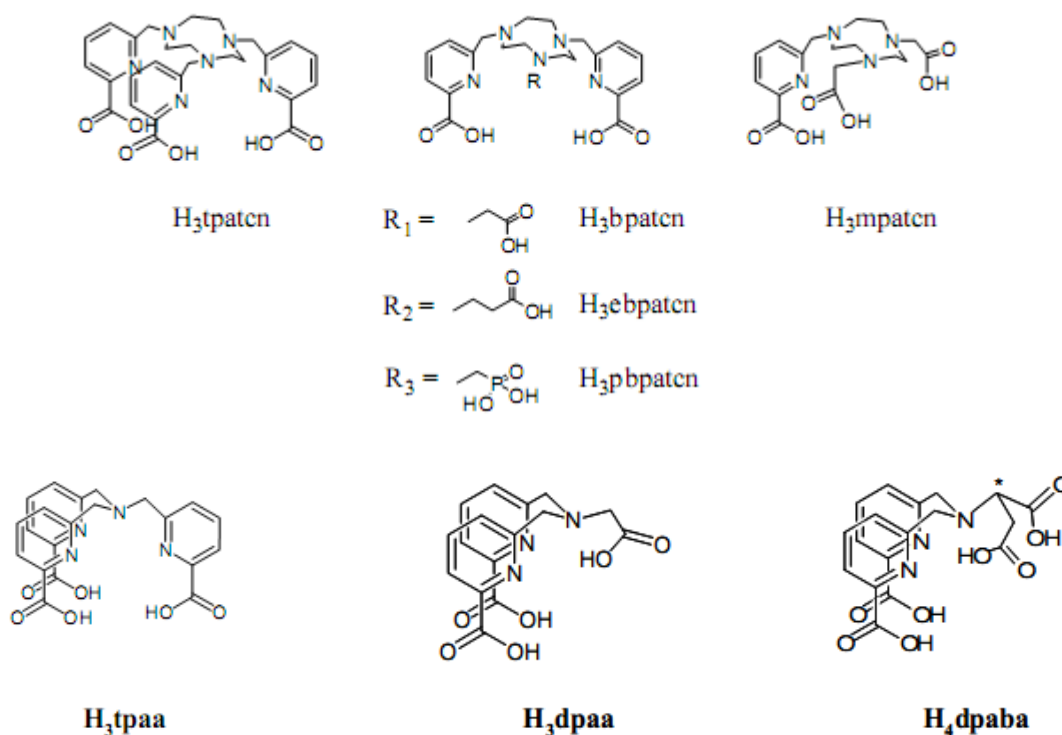


Figure 2.3 différents ligands développés au sein du laboratoire avec les architectures 1,4,7 triazacyclononane et amine tertiaire

La stratégie globale consiste donc à s'appuyer sur le même type d'architecture mais en remplaçant les picolinates par des hydroxyquinoléines. Les ligands H₃thqtcn et H₃thqtcn-SO₃³⁻, analogue de la H₃tpatcn, ont déjà été préparés au sein de notre laboratoire²⁸. Cependant le nombre de coordination de 9 de ce ligand empêche la présence de molécules d'eau en première sphère du gadolinium, ce qui limite son usage comme sonde IRM. Le but est donc de réaliser des ligands octadentates et heptadentates pour améliorer les propriétés de relaxivité des complexes de Gd(III) correspondants. Sur le même principe, des ligands heptadentates et hexadentates ont été synthétisés à partir du pivot azote central pour obtenir des complexes avec plus d'une molécule d'eau en première sphère de coordination. Le but de ces ligands basés sur l'hydroxyquinoléine est d'obtenir des complexes présentant une stabilité améliorée

par rapport aux complexes de picolinates et qui soient capables d'être utilisés aussi bien comme sonde magnétique que comme sonde pour la luminescence proche infrarouge.

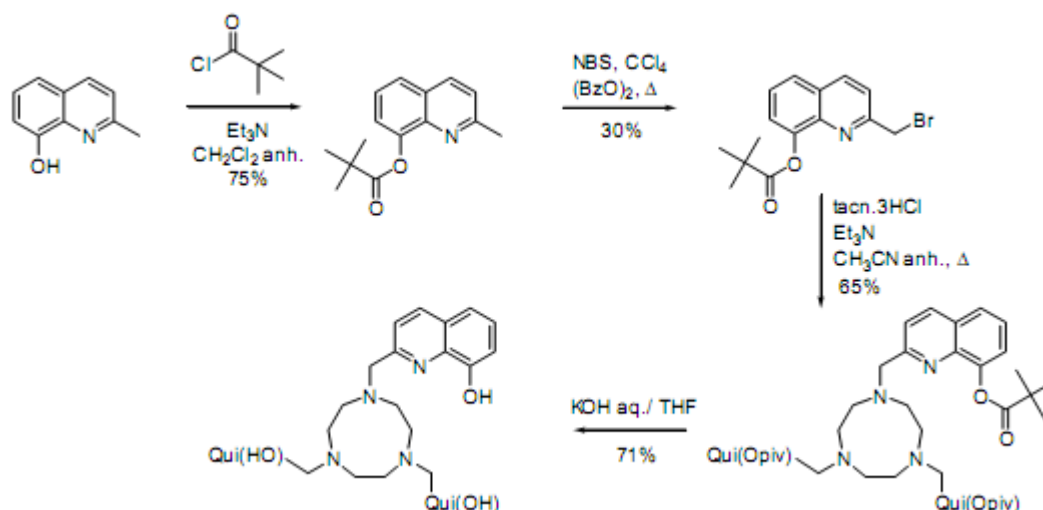


Figure 2.4 Synthèse de la H₃thqtcn utilisé par Nonat et al.²⁸

Par rapport à la synthèse déjà publiée pour le H₃thqtcn-SO₃, une alternative a été développée, car bien que les rendements de cette synthèse soient bons, l'étape de déprotection du groupement pyvaloyle par saponification durait six jours. Dans un premier temps, le groupement protecteur pyvaloyle a été remplacé par un groupement acétyle par réaction de la 8-hydroxyquinoléine sur l'anhydride acétique à reflux. Cependant les traces d'acide acétique contenues dans le produit empêchaient d'obtenir des rendements acceptables lors de la réaction de couplage avec le 1,4,7-triazacyclononane. Un changement plus radical de stratégie a donc été effectué et la réaction de bromation a été abandonnée au profit de la synthèse de l'analogue aldéhyde. En effet, la réaction de bromation entraîne la formation de nombreux produits secondaires et la purification du produit s'avère difficile. Le groupement protecteur pyvaloyle a été remplacé par un groupement benzyloxy, rendant les produits intermédiaires de cette synthèse moins polaires et facilitant leur purification par chromatographie sur silice. Le schéma de la synthèse optimisée est présenté au paragraphe 4.1.

Le couplage entre l'amine et l'unité chélatante ne repose plus sur une substitution nucléophile mais sur une amination réductrice qui nous évite donc de passer par un dérivé bromé qui présente plusieurs inconvénients (réaction radicalaire mal contrôlée, nombreux produits secondaires, faible stabilité de l'intermédiaire réactionnel dans le temps).

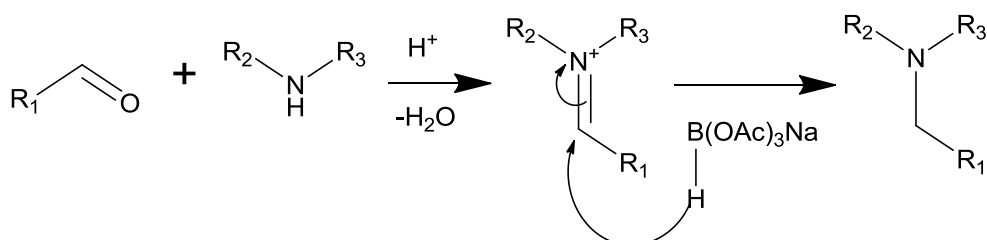


Figure 2.5 Mécanisme simplifié de la réaction d'amination réductrice.

L'amination réductrice peut se décomposer en deux étapes : d'abord la condensation entre l'amine et l'aldéhyde pour former une imine (ou un iminium dans le cas d'amine secondaire), puis la réduction de l'imine (ou de l'iminium) par un hydrure de bore. Le choix du réducteur est crucial dans le cas où plusieurs aminations réductrices doivent être effectuées one pot. C'est ici notre cas, que ce soit dans le cas de la plateforme 1,4,7-triazacyclononane ou dans le cas de l'architecture à azote central. En effet la réduction de l'aldéhyde peut entrer en compétition avec la réduction de l'imine. Cette méthode a déjà été employée pour la synthèse de ligands bis-hydroxyquinoline²⁹.

Un problème récurrent pour ce type de ligand reste la solubilité dans l'eau qui est pourtant nécessaire pour mener les études sur les complexes en milieux aqueux. Le groupement hydroxyquinoléine s'avère être particulièrement hydrophobe et il est nécessaire d'envisager une modification structurale pour apporter la solubilité nécessaire. Deux stratégies ont été utilisées. La sulfonation des 8-hydroxyquinoléine en position 5, afin d'apporter un groupement chargé qui a une forte capacité de solubilisation. La sulfonation est couramment utilisée pour solubiliser des groupements aromatiques fortement hydrophobes. Par exemple la sulfonation du styrène permet d'obtenir un polymère hydrosoluble pour différentes applications (plastifiant dans les ciments, membranes échangeuse d'ions, régulation du potassium dans le sang). Cette stratégie de sulfonation a déjà été utilisée sur les hydroxyquinoléine par Comby et al.³⁰ pour la synthèse de complexes hydrosolubles d'Yb(III) et de Nd(III) émettant dans le proche infrarouge. L'autre stratégie pour améliorer la solubilité consiste à substituer un des bras du ligand par un bras carboxylate. Cette stratégie avait déjà été employée pour le design des analogues de la tpa.

4. Synthèse et caractérisation des ligands à pivot azote central

4.1 Synthèse du H₃thqN-SO₃

Le ligand H₃thqN-SO₃ a été synthétisé en quatre étapes à partir de la 8-hydroxy-2-méthyl-quinoléine et de la 8-hydroxyquinoléine-2-carbonitrile avec un rendement global de 24%

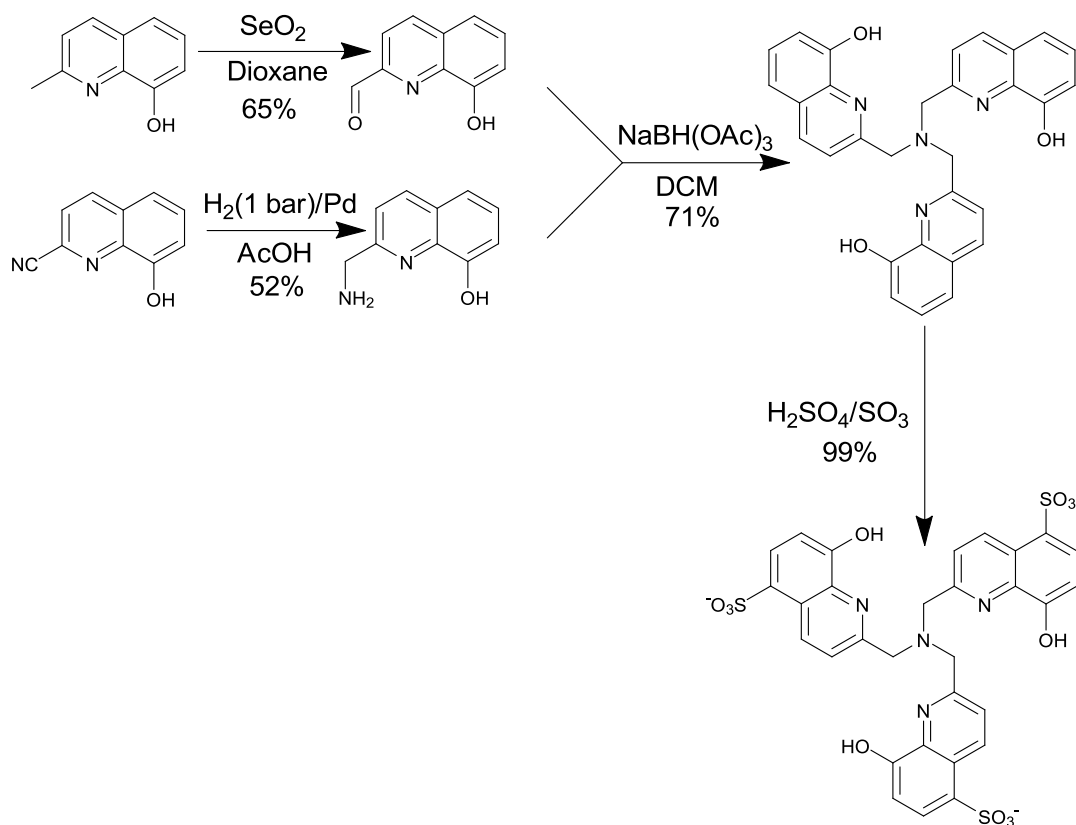


Figure 2.6 Synthèse du ligand H₃thqN-SO₃

La première étape consiste en l'oxydation contrôlée en présence de dioxyde de sélénium du groupement méthyle de la 8-hydroxy-2-méthyl-quinoléine pour obtenir l'aldéhyde correspondant. Parallèlement, la 8-hydroxyquinoléine-2-carbonitrile est réduite en amine grâce à une hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon, sous une pression d'hydrogène de 1 bar. Un excès de l'aldéhyde (3 équivalents) est condensé sur le dérivé amine via une amination réductrice comme décrit par R. D. Shah et al³¹. Le borohydrure triacétate de sodium est utilisé pour cette réaction car c'est un réducteur plus doux que le tétraborohydrure de sodium. L'encombrement stérique et l'effet électro-attracteur des trois groupements acétoxy permettent de stabiliser la liaison bore-hydrogène et expliquent que le borohydrure triacétate de sodium soit un réducteur plus doux³². Bien que celui-ci soit

également capable de réduire les aldéhydes et donc que la réduction de l'aldéhyde se trouve en compétition avec l'amination réductrice. Les conditions utilisées permettent d'obtenir des rendements corrects de l'amine bis-substituée. L'ajout d'un excès d'aldéhyde permet d'obtenir majoritairement l'amine bis-substituée. Les produits minoritaires (amine monosubstituée et alcool issu de la réduction de l'excès d'aldéhyde) sont séparés du produit majoritaire sur une colonne de résine LH20 dans le méthanol. Cependant, même si cette méthode de purification permet d'obtenir la molécule avec une bonne pureté pour ensuite procéder à l'étape de sulfonation, la mise en place de cette purification s'avère laborieuse. Le produit doit être passé deux fois sur la colonne pour obtenir un produit propre, et la résine doit être lavée au méthanol entre les deux purifications. Cette méthode est très consommatrice au niveau du temps et ne permet pas de purifier de grandes quantités de produit à la fois. Des purifications plus classiques par chromatographie sur colonne, sur silice ou sur alumine, ont été envisagés et testés mais le produit reste bloqué sur la colonne, à cause principalement de la présence des groupements OH très polaires. Nous avons décidé de réaliser cette synthèse sans protéger les fonctions OH, car aucune des réactions mises en jeu au cours de la synthèse ne présentait de risque de modification de ces groupements. Cependant la purification d'espèces particulièrement polaires comme le H₃thqN s'avère délicat si ces groupements ne sont pas protégés. Par la suite, les groupements OH seront protégés pour permettre une purification plus aisée. Le tripode de quinoléine ainsi obtenu est ensuite sulfoné dans l'oléum et obtenu par précipitation dans un mélange d'éthanol et d'éther diéthylique. Cette méthode a déjà été utilisée³⁰ et la sulfonation est parfaitement régiosélective sur la position 5 de l'hydroxyquinoléine.

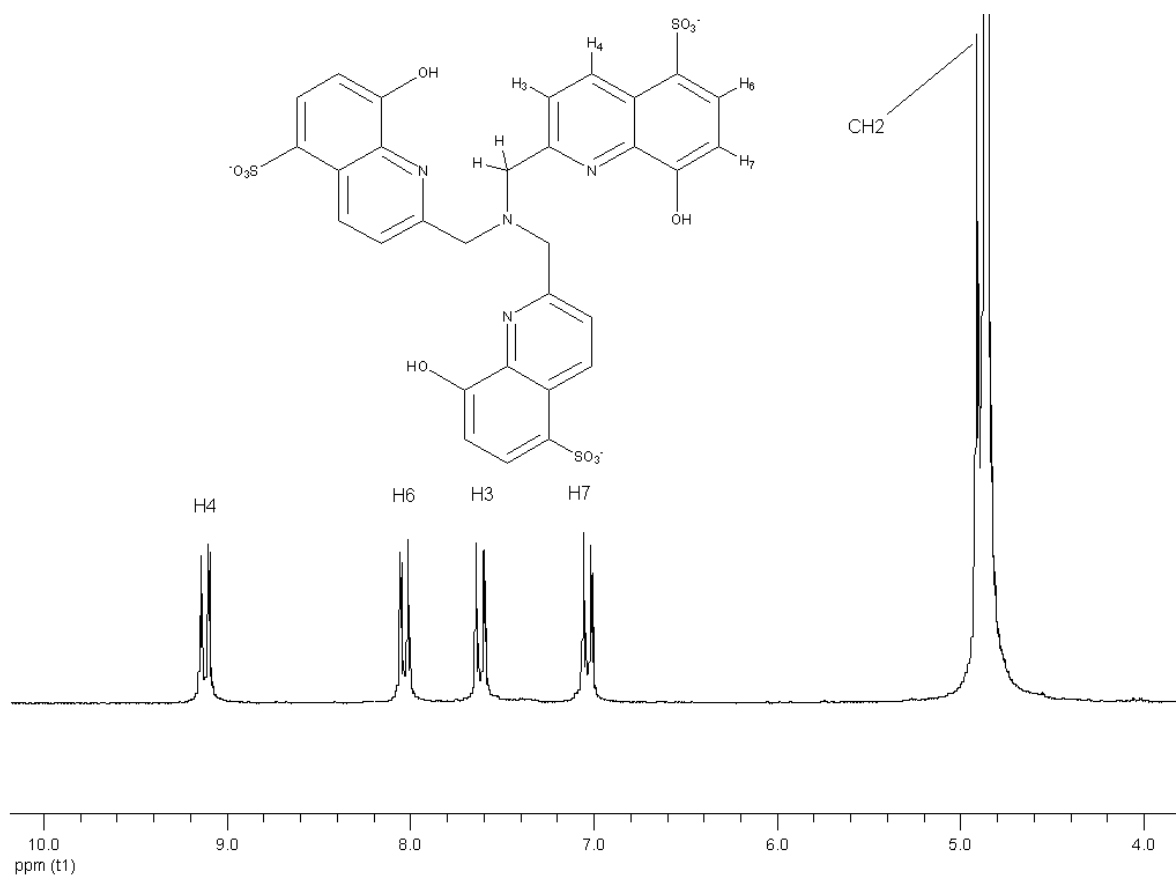


Figure 2.7 Spectre RMN ^1H $\text{H}_3\text{thqN-SO}_3$, D_2O , 25°C , $\text{pD} = 7.4$

Le spectre RMN ^1H de ce ligand ne présente que cinq résonnances : un singulet à 4.98 ppm correspondant aux protons éthyléniques portant les hydroxyquinoléines et quatre doublets (9.23, 8.05, 7.79, 7.20 ppm) correspondant aux protons aromatiques de l'hydroxyquinoléine. Ainsi le ligand possède une symétrie C_{3v} en solution.

4.2 Synthèse du $\text{H}_4\text{dhqN-asp}$

De la même façon que précédemment, un autre acide aminé est utilisé pour la synthèse de ce ligand. L'acide aminé de départ est cette fois-ci l'acide aspartique utilisé sous la forme d'un diester éthylique. Ce ligand a été conçu pour obtenir un analogue du ligand H_4dpaba avec l'hydroxyquinoléine. La méthode d'amination réductrice utilisée précédemment a été reprise en partant du diester éthylique de l'acide aspartique. Cette stratégie devait nous permettre d'obtenir un ligand présentant le même nombre de coordination que le ligand $\text{H}_3\text{thqN-SO}_3$, mais en ayant une structure asymétrique.

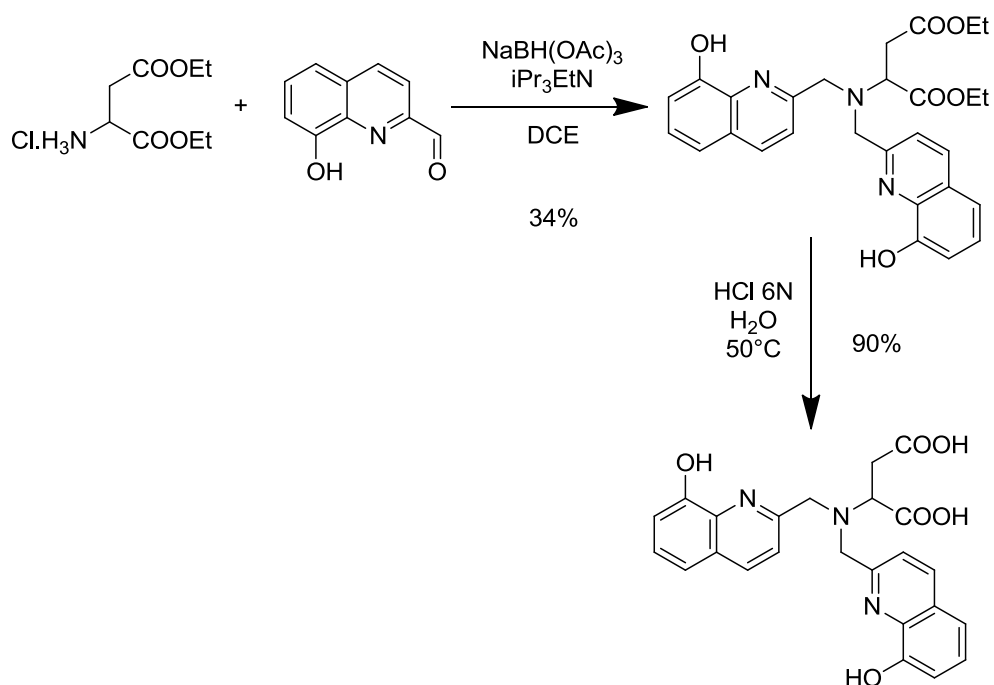


Figure 2.8 Synthèse du ligand $H_4dhqN-asp$

Après l'amination réductrice, la purification de la molécule formée n'est pas possible avec des techniques de chromatographie sur silice, malgré la présence d'une protection sur les deux acides carboxylique. Le composé est donc purifié sur une colonne RP18, mais le produit obtenu n'est pas suffisamment propre et une purification supplémentaire sur LH20 dans le méthanol de façon analogue à la purification du H_3thqN est effectuée. Le recours à ces deux purifications successives explique le faible rendement de la première étape de la synthèse. La molécule obtenue est ensuite déprotégée par chauffage dans une solution concentrée d'acide chlorhydrique, puis évaporée à sec pour donner le produit attendu.

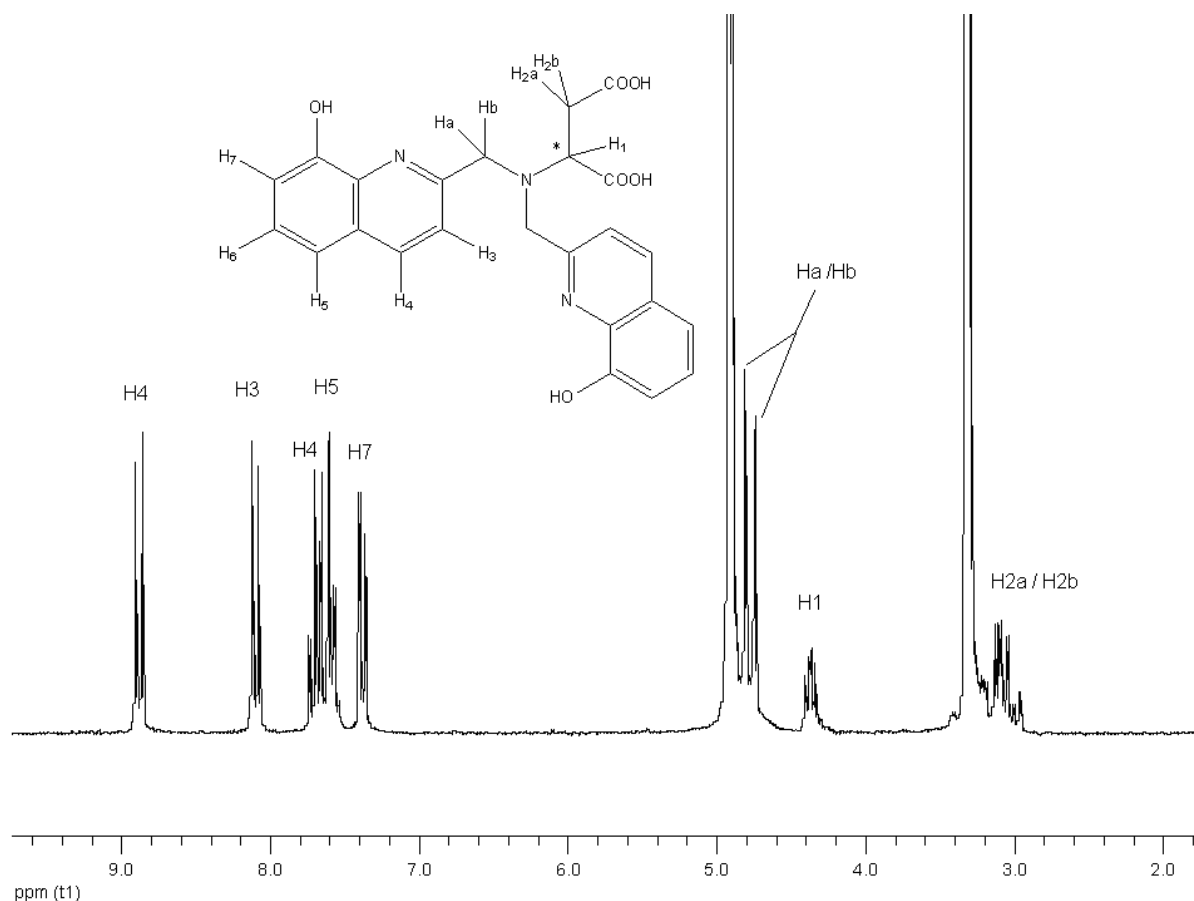


Figure 2.9 Spectre RMN ^1H $\text{H}_4\text{dhqN-asp}$, MeOD, 25°C

Le spectre RMN ^1H du ligand présente huit résonances. Les protons du CH_2 en alpha du carbone asymétrique sort sous la forme d'un multiplet à 3 ppm. En effet, ces protons étant diastéréotopiques, on obtient deux signaux différents pour chacun des protons. Cependant, les deux signaux n'étant pas bien résolus, ils sortent sous la forme d'un multiplet. Le proton placé sur le carbone asymétrique sort, quant à lui, sous la forme d'un doublet de doublets. Les protons éthyléniques sont également diastéréotopiques et sortent sous la forme d'un système AB (4.62, 4.68 ppm). Les protons des hydroxyquinoléines donnent quatre doublets (7.26, 7.46, 7.98, 8.76 ppm) et un triplet (7.58 ppm). Cela indique une symétrie C_s en solution.

4.3 Synthèse du H₃dhqN-gly

La synthèse du ligand H₃dhqN-gly est réalisée en partant de l'ester éthylique de la glycine et de l'aldéhyde dérivé de la 8-hydroxy-2-méthyl-quinoléine. De la même façon que pour le ligand H₄dhqN-asp, le but de cette synthèse était d'obtenir le dérivé hydroxyquinoléine analogue du ligand H₃dpaa.

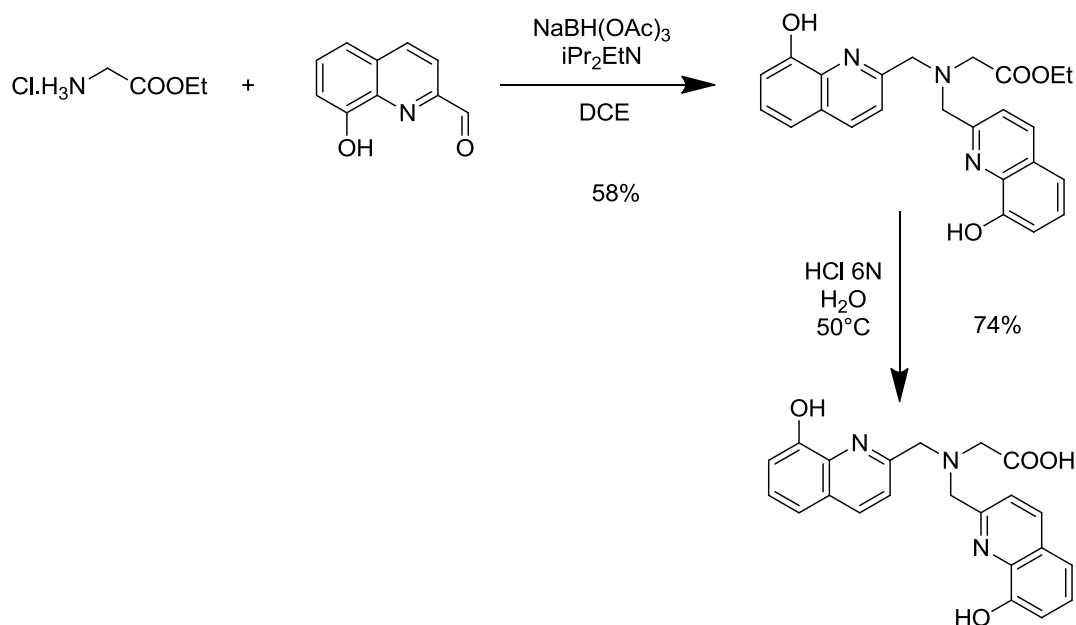


Figure 2.10 Synthèse du ligand H₃dhqN-gly

L'amination réductrice est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (3eq d'aldéhyde, 6 eq de NaBH(OAc)₃). La diisopropyle éthyle amine est ajoutée au début de la réaction à l'amine afin de déprotonner cette dernière et permettre la formation de l'imine avant la réduction. La purification de ce composé a pu être effectuée simplement sur RP18 pour parvenir à un composé de pureté satisfaisante. La purification moins lourde dans ce cas-ci (pas de recours à une purification sur résine) nous permet d'obtenir un rendement plus élevé sur la première étape de la synthèse. La fonction carboxylique est ensuite déprotégée en chauffant le composé dans une solution concentrée d'acide chlorhydrique et le milieu est évaporé à sec pour donner le produit attendu.

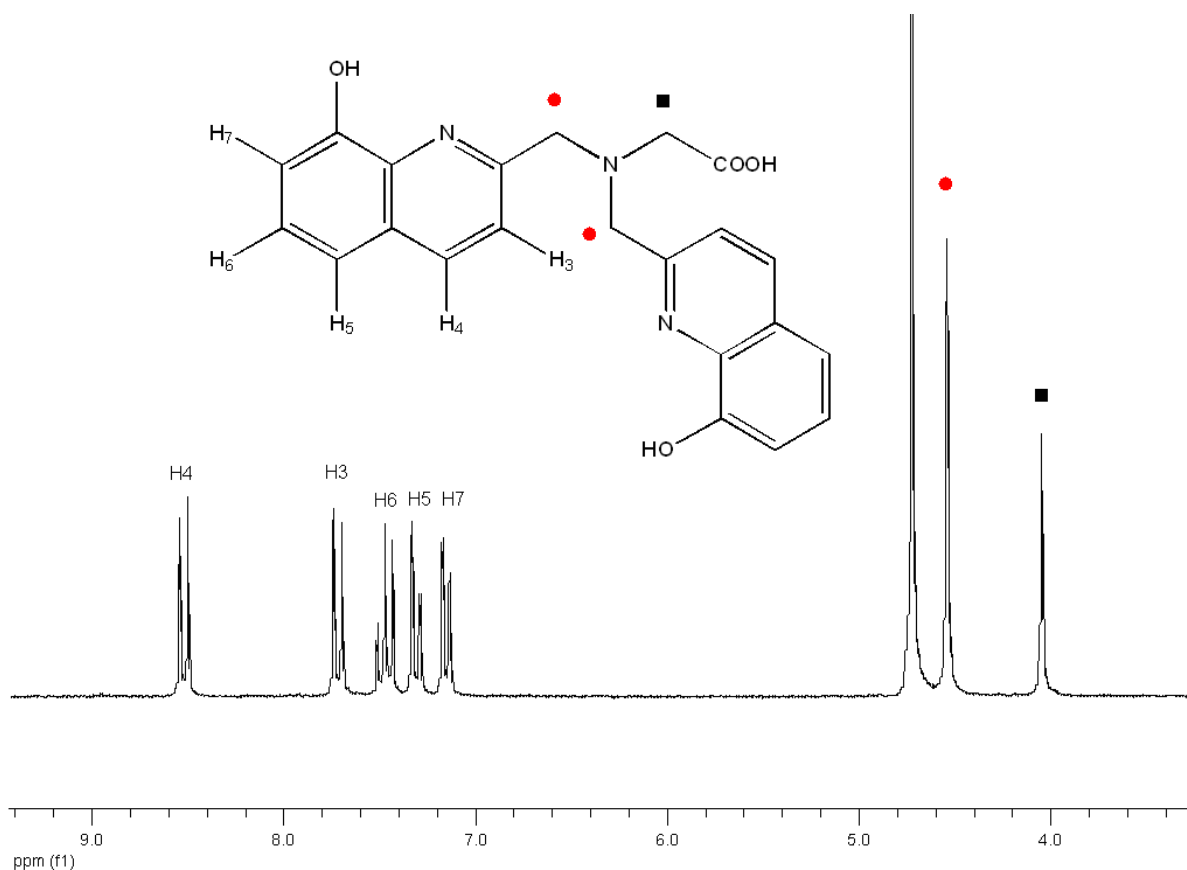


Figure 2.11 Spectre RMN ^1H $\text{H}_3\text{dhqN-gly}$, MeOD, 25°C

Le spectre RMN ^1H du ligand présente un motif caractéristique d'une symétrie de type C_2 . Il présente sept résonnances. Le singulet à 4.04 ppm correspond aux deux protons du groupement acétate tandis que le singulet à 4.54 ppm correspond aux quatre protons éthyléniques des bras portant les hydroxyquinoléines. Cinq signaux correspondent aux dix protons des deux hydroxyquinoléines : quatre doublets (8.52, 7.72, 7.30, 7.15 ppm) et un triplet (7.47 ppm).

Sulfonation des ligands dérivés d'acides aminés

La présence respectivement d'un et deux bras carboxylates sur les ligands $\text{H}_3\text{dhqN-gly}$ et $\text{H}_4\text{dhqN-asp}$ a permis d'augmenter la solubilité de ces molécules comportant des unités hydroxyquinoléines. En effet, si le ligand non-sulfoné H_3thqN s'avérait parfaitement insoluble dans l'eau aux environ de $\text{pH} = 7.4$, les deux ligands évoqués précédemment présenteraient, du fait de leur modification de structure, une solubilité intéressante dans de telles conditions. Malheureusement, si les ligands démontraient une bonne solubilité dans l'eau à $\text{pH} = 7.4$, il n'en était pas de même pour les complexes de lanthanides correspondants, et ceux-ci se sont

révélés insolubles en milieu aqueux. En comparaison des ligands portant des groupements sulfonates, ces complexes se révèlent beaucoup moins chargés (neutre pour le $[\text{Ln}(\text{dhqN-gly})(\text{H}_2\text{O})_3]$, -1 pour le $[\text{Ln}(\text{dhqN-asp})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$). Le complexe $[\text{Ln}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ est bien plus chargé en plus de l'effet solubilisant des groupements sulfonates. Ceci peut présenter une première explication quant à la faible solubilité de ces complexes. Les complexes de Ln(III) de ces deux ligands ($[\text{Ln}(\text{dhqN-gly})(\text{H}_2\text{O})_3]$ et $[\text{Ln}(\text{dhqN-asp})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$) sont cependant solubles dans le méthanol et dans un mélange eau/DMSO 75 : 25, qui permettront de faire des études sur ces complexes.

Pour parvenir à des complexes plus solubles, des essais de sulfonation ont été menés sur les ligands $\text{H}_3\text{dhqN-gly}$ et $\text{H}_4\text{dhqN-asp}$. Bien que la sulfonation des hydroxyquinoléine fonctionne parfaitement, les conditions acides drastiques de la réaction ($\text{SO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ fumant) entraînent une décarboxylation instantanée. Le produit obtenu est une amine primaire bis hydroxyquinoléine.

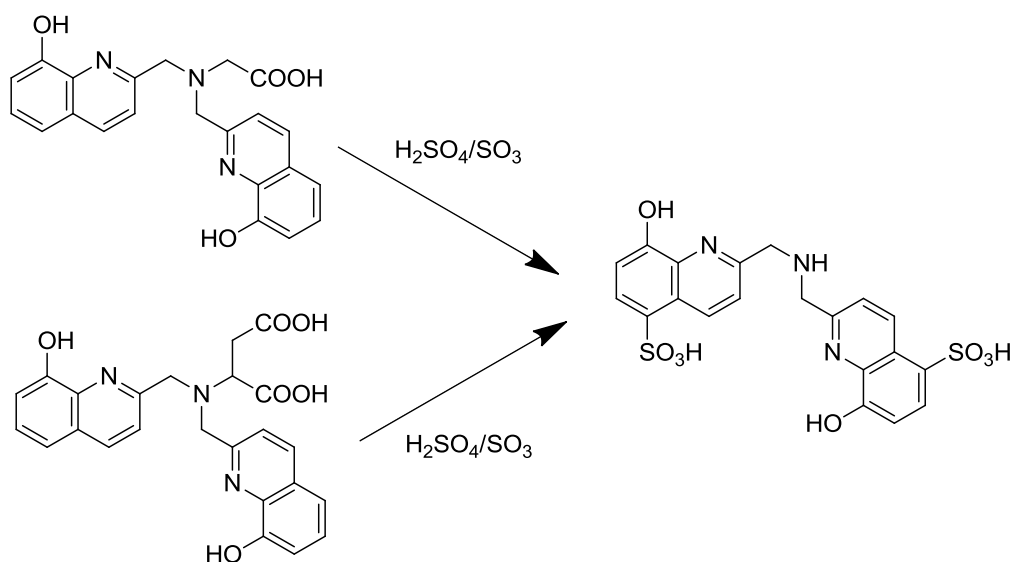


Figure 2.12 Décarboxylation des ligands $\text{H}_3\text{dhqN-gly}$ et $\text{H}_4\text{dhqN-asp}$ au cours de la sulfonation

4.4 Synthèse du $H_3dhqN-SO_3$

La synthèse du ligand $H_3dhqN-SO_3$ est relativement similaire à la méthode utilisée précédemment. Cependant, pour rendre la purification plus simple après l'amination réductrice et éviter l'utilisation d'une colonne de résine LH20, le produit de départ utilisé pour la synthèse est la 8-benzyloxy-2-méthylquinoléine.

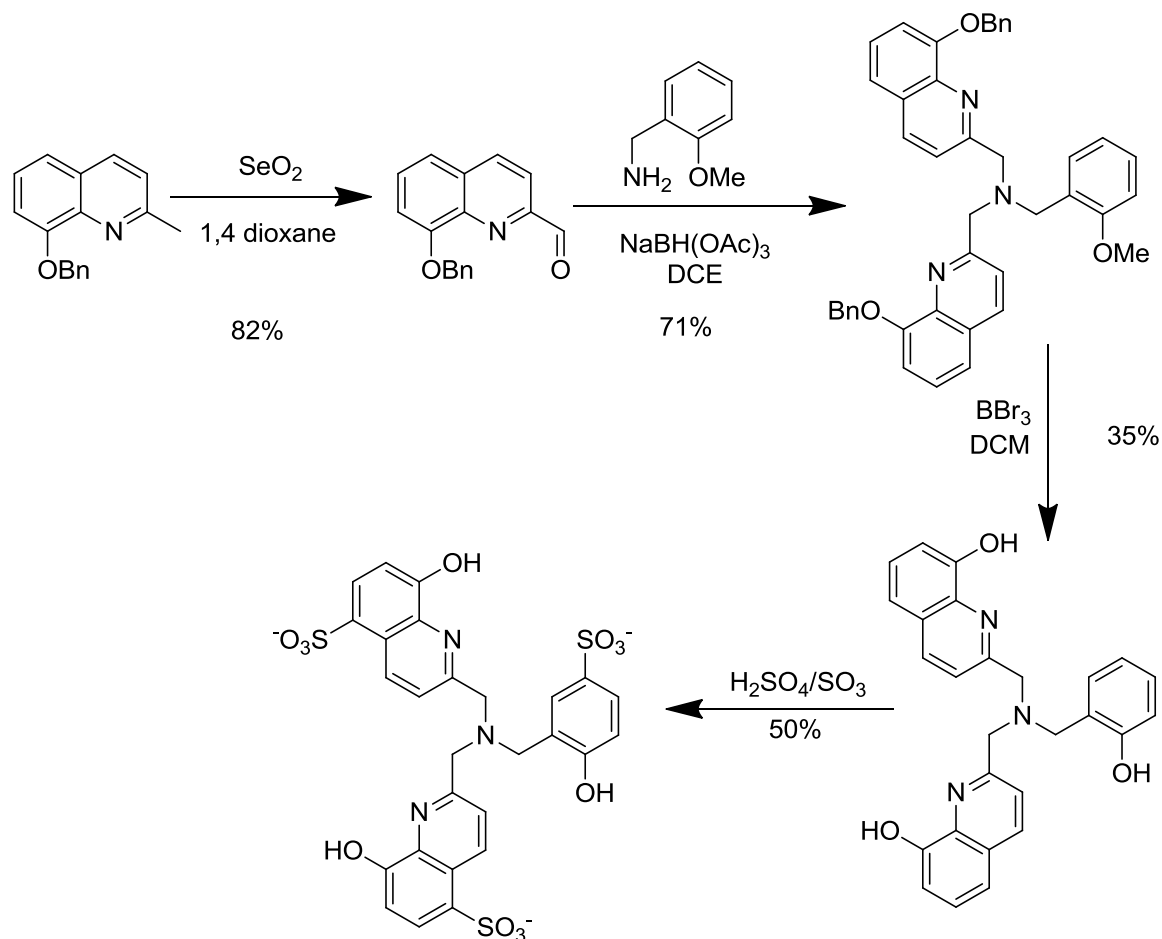


Figure 2.13 Synthèse du ligand $H_3dhqN-SO_3$

Le dérivé aldéhyde de la quinoléine réagit cette fois avec la (2-méthoxyphényl)méthanamine commerciale via une amination réductrice dans les mêmes conditions que précédemment. La purification est cette fois-ci réalisée sur colonne de silice pour donner le tripode protégé avec un rendement de 71%. La déprotection est effectuée grâce à une solution molaire de tribromure de bore dans le dichlorométhane. Le produit est, dans un premier temps, précipité dans un mélange méthanol/éther diéthylique et utilisé tel quel pour la sulfonation. Le spectre RMN du produit sulfoné montre la présence d'autres

signaux et les analyses en spectrométrie de masse confirment la présence d'un mélange du produit attendu et d'un produit présentant un sulfonate supplémentaire. Pour résoudre ce problème de poly-sulfonation, nous avons testé plusieurs conditions de sulfonation, en faisant varier le temps de réaction (d'une dizaine de minute à une heure), et la température de réaction (0°C ou température ambiante). Malgré de légères améliorations, la pureté du produit sulfoné n'était pas suffisante et il était délicat de séparer les différents produits sulfonés présents dans le milieu. La sulfonation n'avait pas montré de problèmes pour obtenir le H₃thqN-SO₃, mais la voie de synthèse ne fait pas intervenir de groupement protecteur. La possible présence de traces de plusieurs produits après la déprotection (sels de brome, résidu de bromure de benzyle) nous a orientés vers l'hypothèse d'une qualité insuffisante du produit non sulfoné. Celui-ci a donc été purifié sur colonne RP18 avant la dernière réaction pour permettre l'obtention d'un produit sulfoné parfaitement propre. La précipitation du produit non sulfoné dans un mélange éthanol / éther diéthylique et le lavage à l'éther ne sont pas suffisant et pour obtenir un produit sulfoné parfaitement propre, une purification supplémentaire sur une colonne RP18 est nécessaire. C'est cette purification qui explique que le rendement de la déprotection des groupements benzyloxy et méthyloxy conduisent à un rendement de 35% pour cette étape. En effet, dans la synthèse du H₃thqN-SO₃, la purification sur une colonne de résine LH20, bien que lourde à mettre en place, permet d'obtenir un produit très propre, et donc une sulfonation sans produit secondaire.

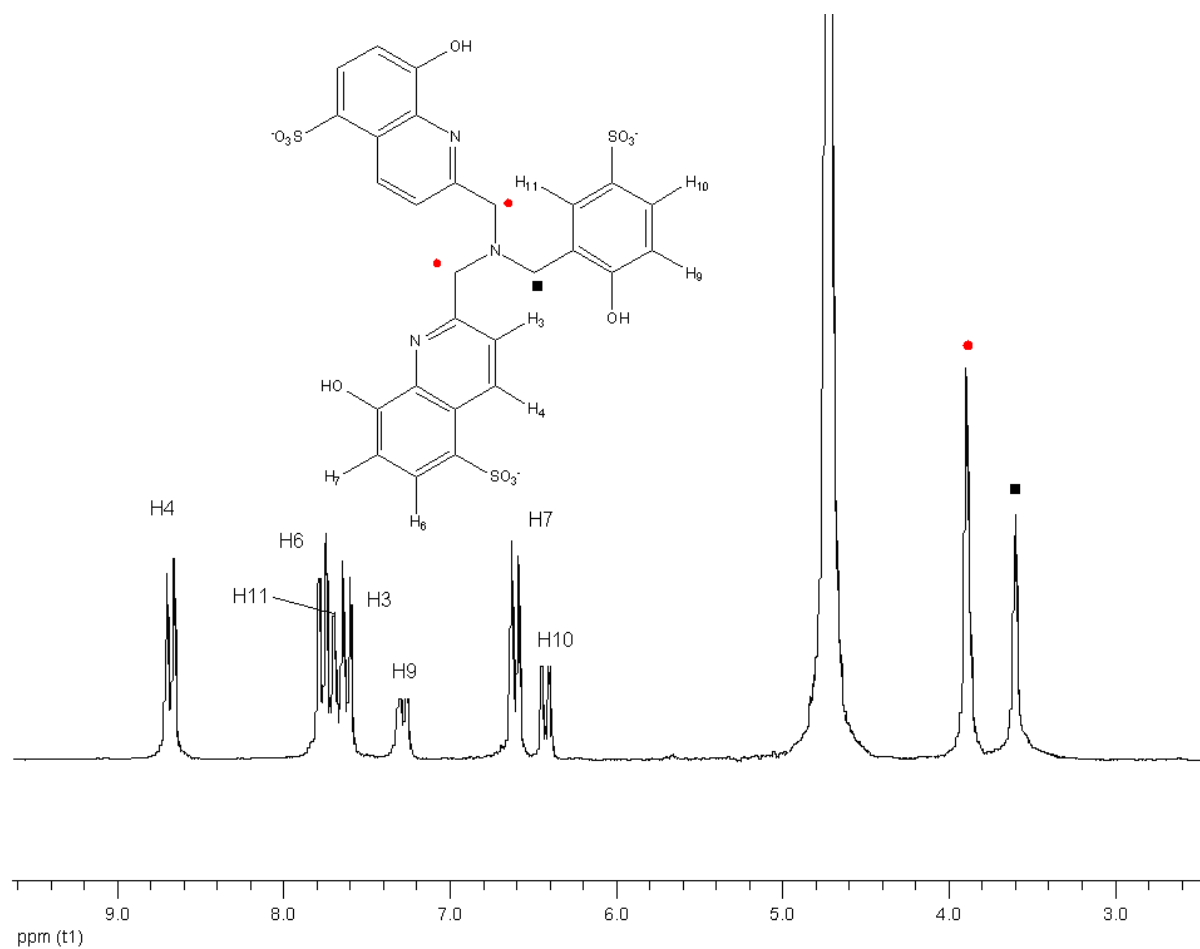


Figure 2.14 Spectre RMN ^1H $\text{H}_3\text{dhqN-SO}_3$, D_2O , 25°C , $\text{pD} = 7.4$

Le spectre RMN ^1H du ligand présente neuf résonances. Le singulet à 3.59 correspond aux protons éthyléniques du bras qui porte le phénol tandis que le singulet à 3.89 correspond aux quatre protons éthyléniques des bras portant les hydroxyquinoléines. Quatre doublets (8.68, 7.76, 6.60, 7.69 ppm) correspondent aux huit protons aromatiques des hydroxyquinoléines tandis qu'un singulet (7.62 ppm) et deux doublets (7.28, 6.42 ppm) correspondent aux trois protons aromatiques du phénol. Ce motif est en accord avec une symétrie du ligand en solution de type C_s .

5. Synthèse et caractérisation des ligands à pivot 1,4,7-triazacyclononane

5.1 Synthèse du $H_3dhqN-SO_3^-$

La méthode de synthèse basée sur l'amination réductrice déjà décrite précédemment a également été reprise pour la synthèse des composés basés sur le pivot 1,4,7 triazacyclononane. Une synthèse alternative de ce composé avait déjà été publiée²⁸ mais la méthode présentait de nombreux inconvénients, comme expliqué au paragraphe 3.

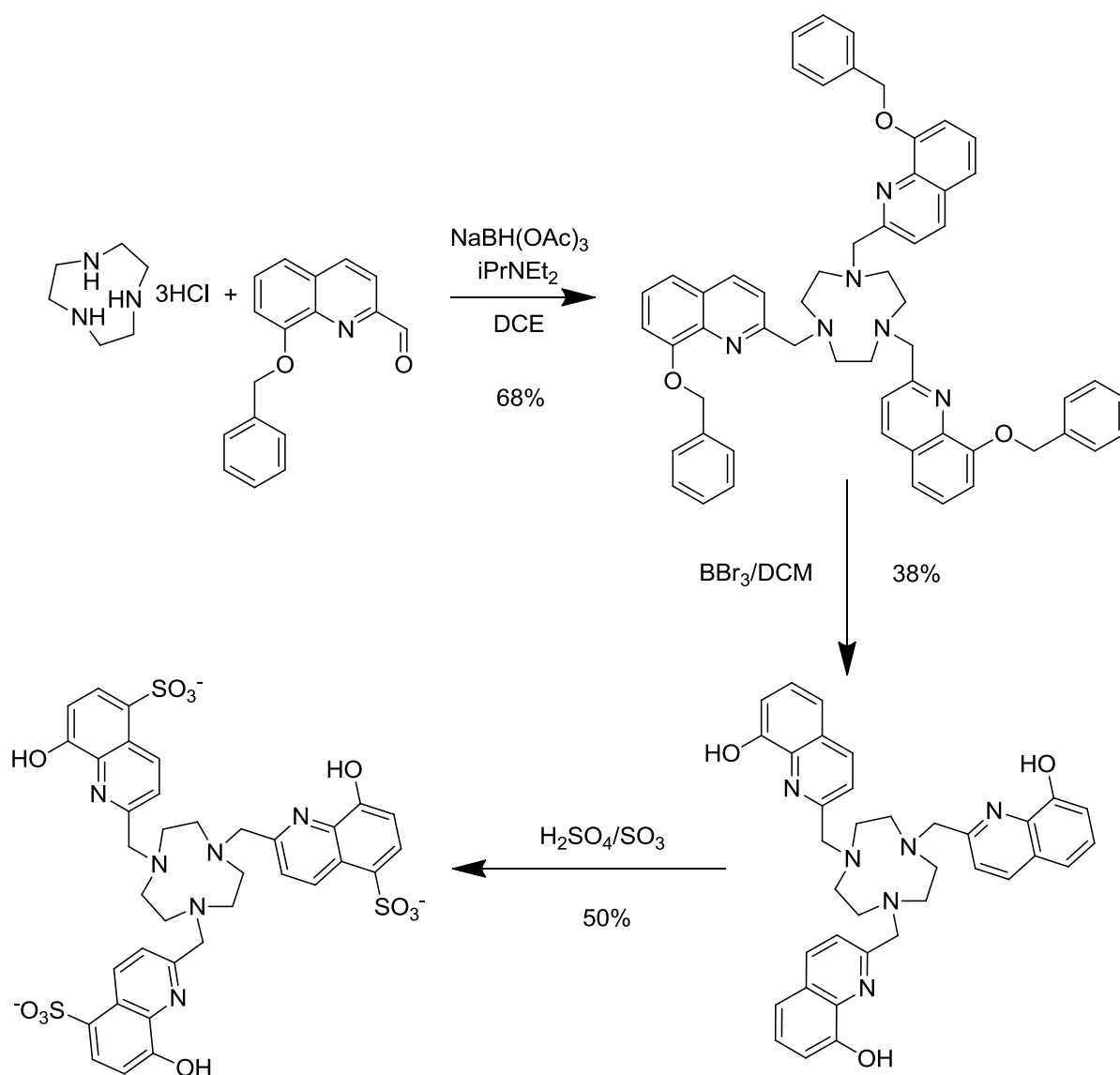


Figure 2.15 Synthèse du ligand $H_3thqtcn-SO_3^-$

La première étape est la bromation sélective du groupe méthyle en position 2 de l'hydroxyquinoléine protégée. Le choix du groupement protecteur est crucial pour la

régiosélectivité de la bromation. Dans le cas d'une protection par un acide carboxylique (acétique ou pivaloïque), la bromation est dirigée sur le groupement méthyle en position 2 de l'hydroxyquinoléine. Dans le cas d'une protection éther (benzyloxy par exemple), l'effet donneur mésomère de la protection induit une forte sélectivité de la bromation en para du groupement benzyloxy, et il est donc impossible d'obtenir la bromation sur la position souhaitée. Cependant, nous ne souhaitons pas continuer à utiliser des groupements de protections de type acide carboxylique car la déprotection des groupements hydroxy des quinoléines s'est avéré particulièrement longue (six jours). Le choix du groupement de protection benzyloxy nous a donc orienté notre choix vers la méthode par amination réductrice. De plus, la préparation simple de l'aldéhyde de l'hydroxyquinoléine protégée (oxydation au sélénium dans le dioxane), permet de préparer de grandes quantités du produit du départ de notre synthèse, et l'aldéhyde se conserve bien mieux dans le temps que le dérivé bromé correspondant, qui se dégrade rapidement.

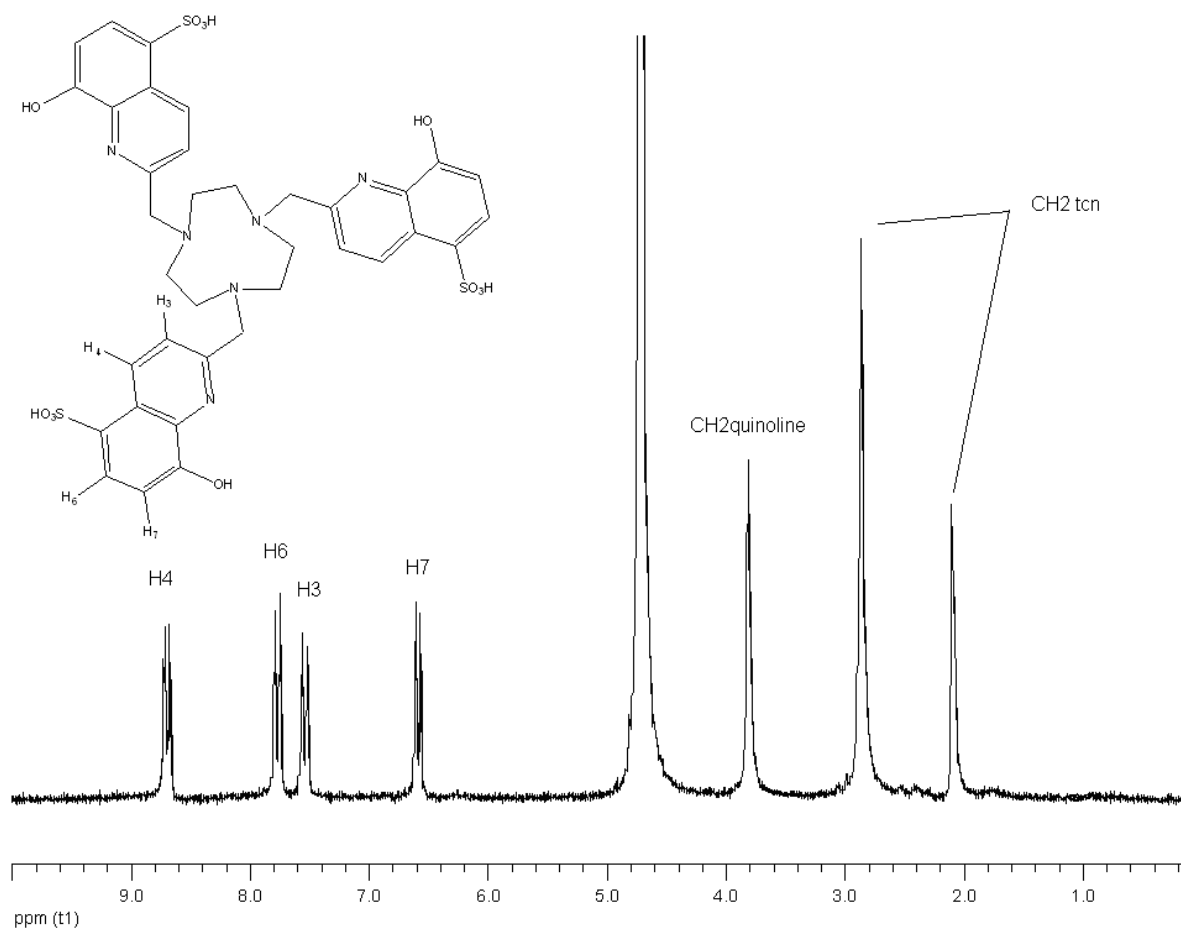


Figure 2.16 Spectre RMN ^1H $\text{H}_3\text{thqtcn-SO}_3$, D_2O , 25°C , $\text{pD} = 7.4$

Le spectre RMN ^1H de ce ligand présente sept résonnances : deux singulets (2.17, 2.93 ppm) correspondant aux protons du triazacyclononane. Le singulet à 3.88 ppm correspond aux six

protons éthyléniques portant les hydroxyquinoléines et les quatre doublets (8.76, 7.84, 7.61, 6.65 ppm) correspondant aux protons aromatiques de l'hydroxyquinoléine. Ainsi le ligand possède une symétrie C_{3v} en solution.

5.2 Synthèse du $H_3dhqtcn-SO_3$

De la même façon que précédemment, une méthode de synthèse similaire via amination réductrice est utilisée pour obtenir le composé $H_3dhqtcn-SO_3$.

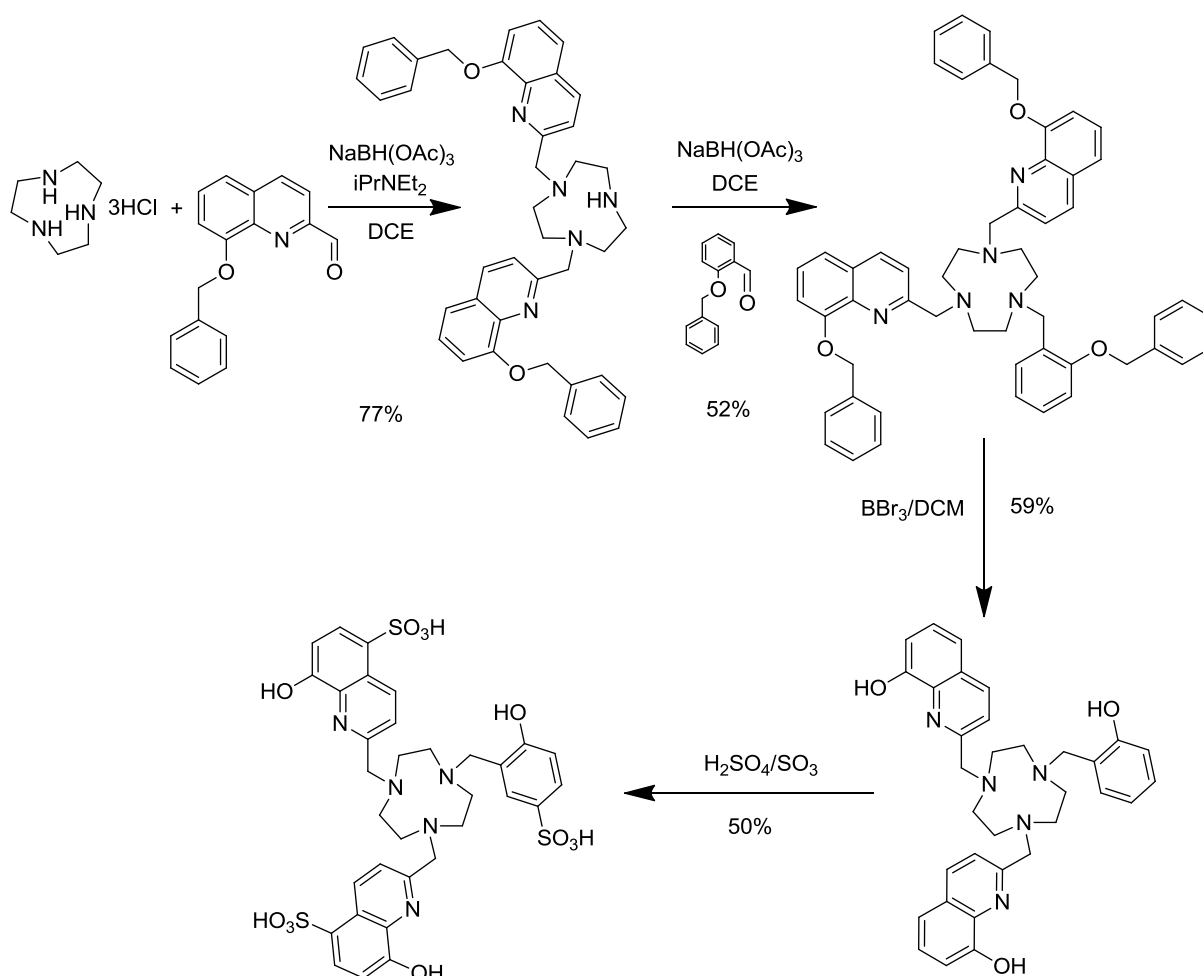


Figure 2.17 Synthèse du ligand $H_3dhqtcn-SO_3$

Cependant, les trois amines secondaires du triazacyclononane ne devant être substituées de la même façon, les équivalents d'aldéhyde utilisés ont été modifiés. Au lieu d'utiliser un large excès de l'aldéhyde (1,5 eq par fonction amine), la synthèse a été effectuée avec une équivalence stricte 1 : 1 entre l'aldéhyde et la fonction amine pour éviter au maximum la formation du composé trisubstitué.

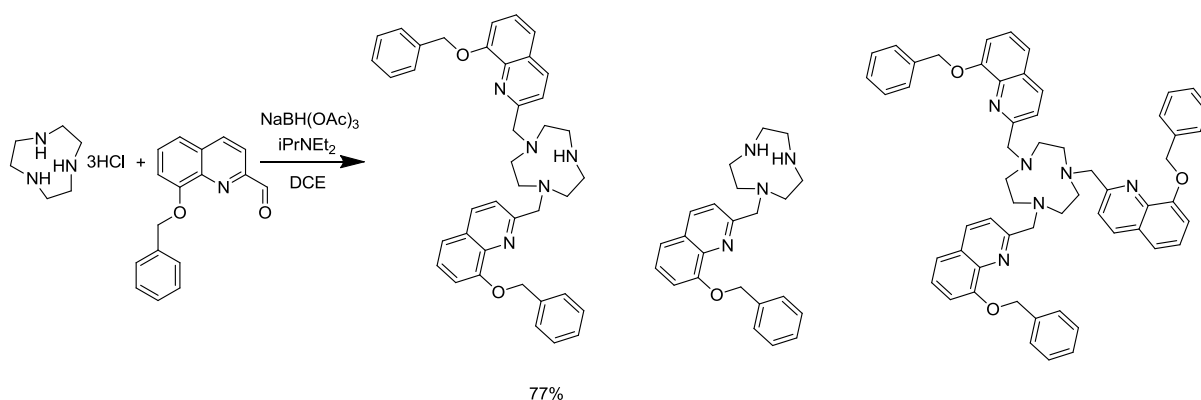


Figure 2.18 Réaction d'amination réductrice pour la synthèse du triazacyclononane bis substitué et les produits secondaires de la réaction.

Après séparation des trois produits par chromatographie sur colonne, l'amine secondaire restante est substituée par la même méthode d'amination réductrice en utilisant cette fois le 2-benzyloxybenzaldéhyde. A noter que le rendement de cette dernière substitution est bien inférieur à celui obtenu pour les hydroxyquinoléines. Ce mauvais rendement peut s'expliquer par l'encombrement stérique du triazacyclononane bis substitué mais aussi par l'encombrement de l'aldéhyde en lui-même. En effet, l'encombrement de la protection benzyloxy est bien plus important car placé plus près de la fonction aldéhyde. Les mêmes baisses de rendement sont observées lorsque l'amination réductrice est d'abord faite avec le phénol (voir § 3.3).

Une fois le composé trisubstitué obtenu, les phénols sont déprotégés avec le tribromure de bore et le produit est purifié par HPLC avant de subir la réaction de sulfonation.

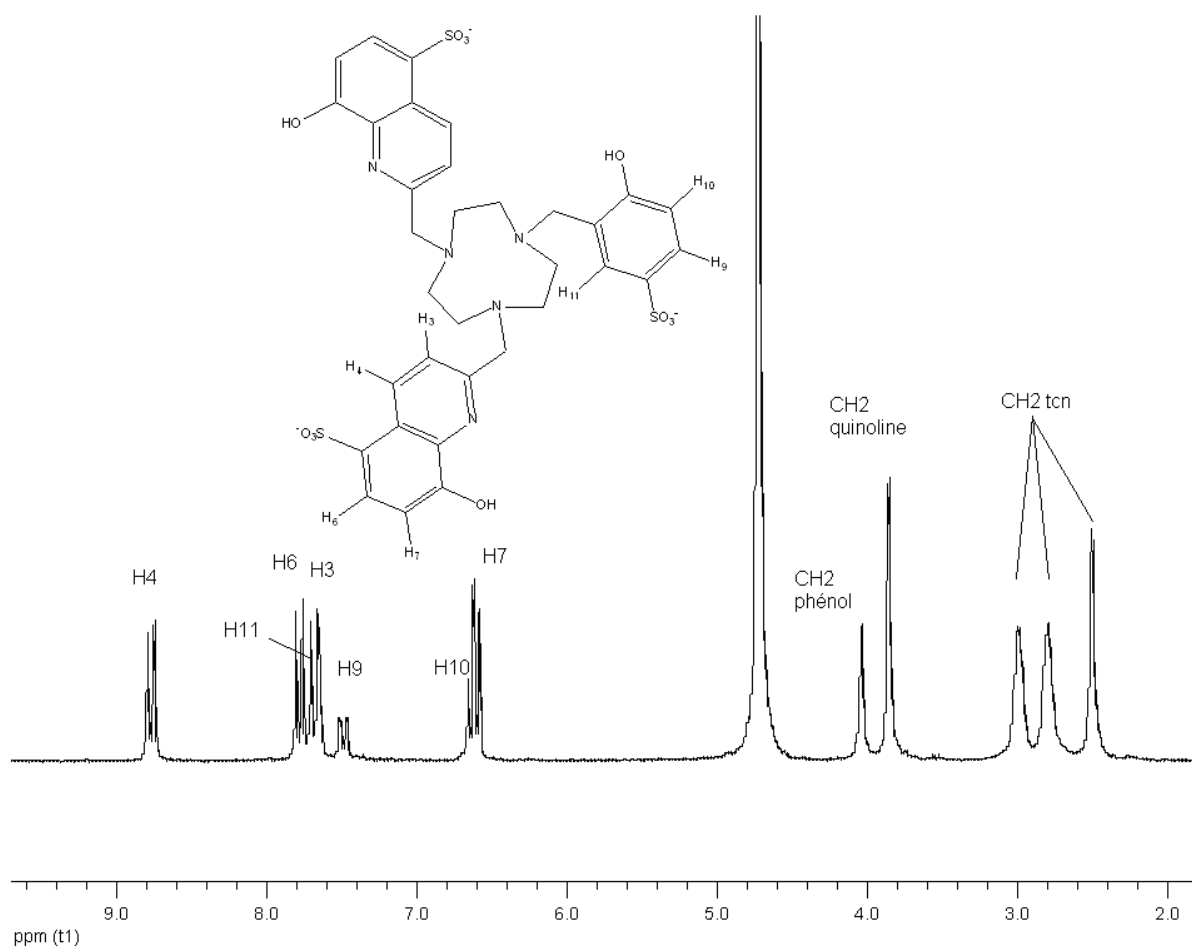


Figure 2.19 Spectre RMN ¹H H₃dhqtcn-SO₃, D₂O, 25°C, pD = 7.4

Le spectre RMN ¹H montre douze résonnances. Trois singulets (2.56, 2.86, 3.06ppm) intègrent pour les douze protons correspondant au triazacyclononane. Le singulet à 3.92 ppm correspond aux quatre protons éthyléniques des bras portant les hydroxyquinoléines et le singulet à 4.10 ppm correspond aux deux protons éthyléniques du bras portant le phénol. Les huit protons correspondant aux hydroxyquinoléines sortent sous la forme de quatre doublets (8.83, 7.84, 7.74, 6.66 ppm) et les trois protons du phénol sortent sous la forme de deux doublets (7.55, 6.70 ppm) et d'un singulet (7.70 ppm). Le motif est caractéristique d'une symétrie C₃.

5.3 Synthèse du H₃hqtcn-SO₃

La synthèse du ligand H₃hqtcn-SO₃ suit le même principe que la synthèse précédente (§3.2).

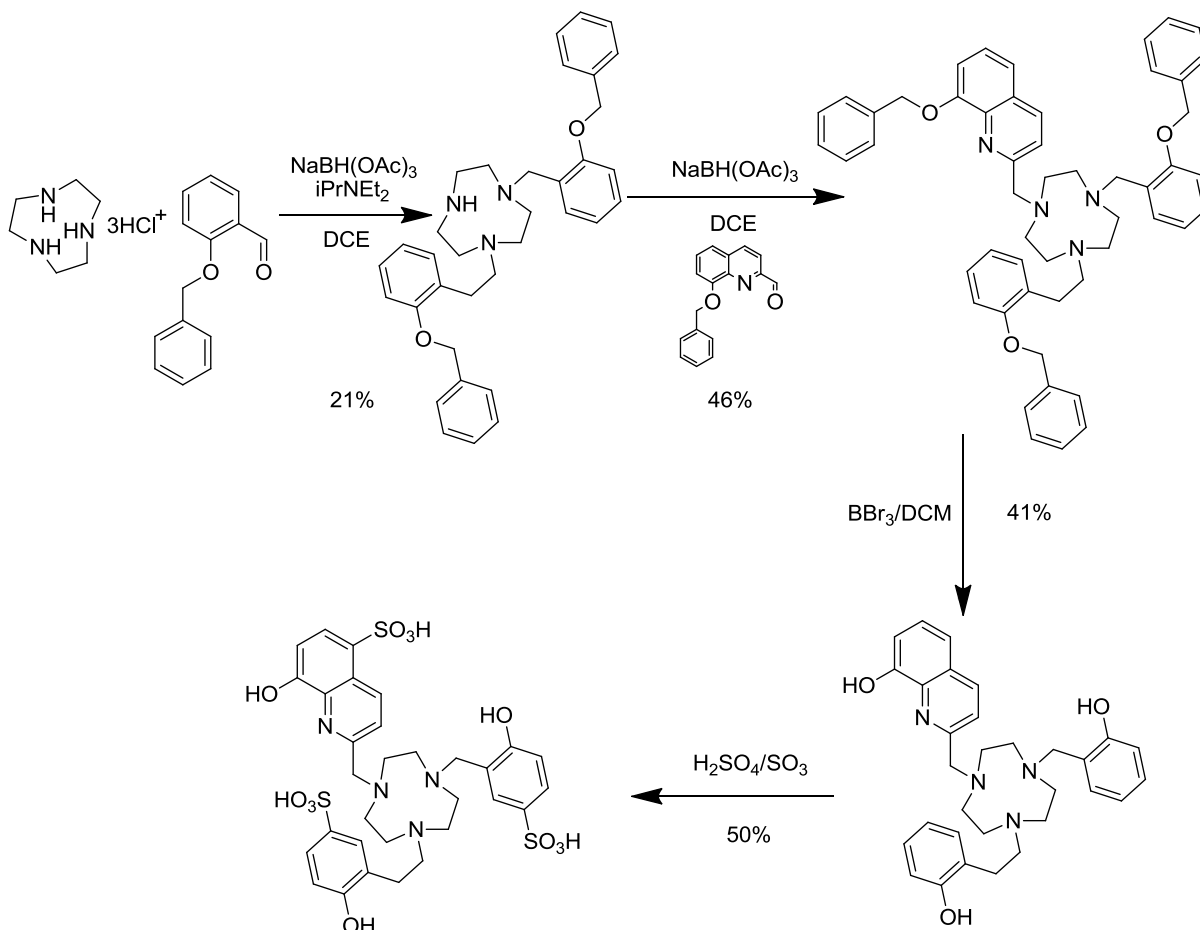


Figure 2.20 Synthèse du ligand H₃hqtcn-SO₃

Simplement, deux équivalents de la 2-benzyloxybenzaldéhyde sont d'abord couplés au triazacyclononane. Après séparation des différents sous produits par chromatographie sur colonne, le 2-benzyloxybenzaldéhyde est mis en réaction pour obtenir le composé trisubstitué, qui est déprotégé avec le tribromure de bore avant d'être purifier par HPLC. Le composé est ensuite sulfoné suivant la procédure précédemment décrite.

On peut noter que la première amination réductrice est la réaction qui fait chuter le rendement globale de la synthèse. Le rendement semble cependant cohérent avec la diminution observée dans le cas de la seconde réaction d'amination réductrice pour le composé H₃dhqtcn-SO₃ (§ 3.2). Ceci semble confirmer que l'encombrement stérique dû au groupement benzyloxy est la principale raison expliquant ces faibles rendements. En effet, si l'on compare à la synthèse du

N,N',N''-Tris(2-hydroxybenzyl)-1,4,7-triazacyclononane (H_3bcn)³³, dans laquelle le salicyaldéhyde est utilisée, à notre synthèse, le rendement obtenu par les auteurs pour la trisubstitution est largement supérieur (82%) et l'encombrement stérique de notre aldéhyde semble être responsable des faibles rendements obtenus.

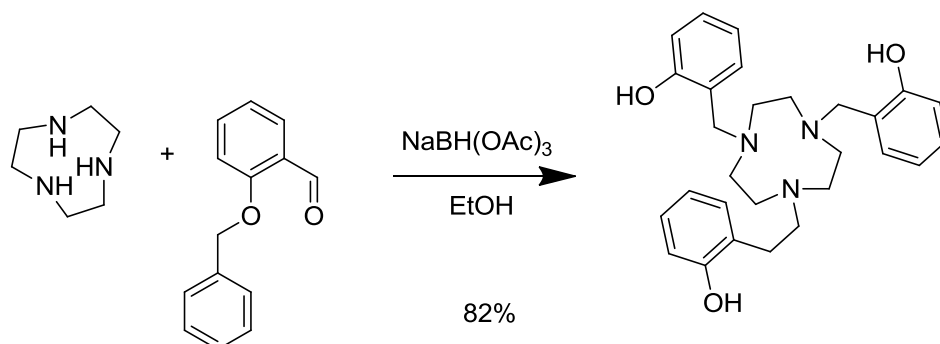


Figure 2.21 Synthèse de H_3bcn par Barta et al.

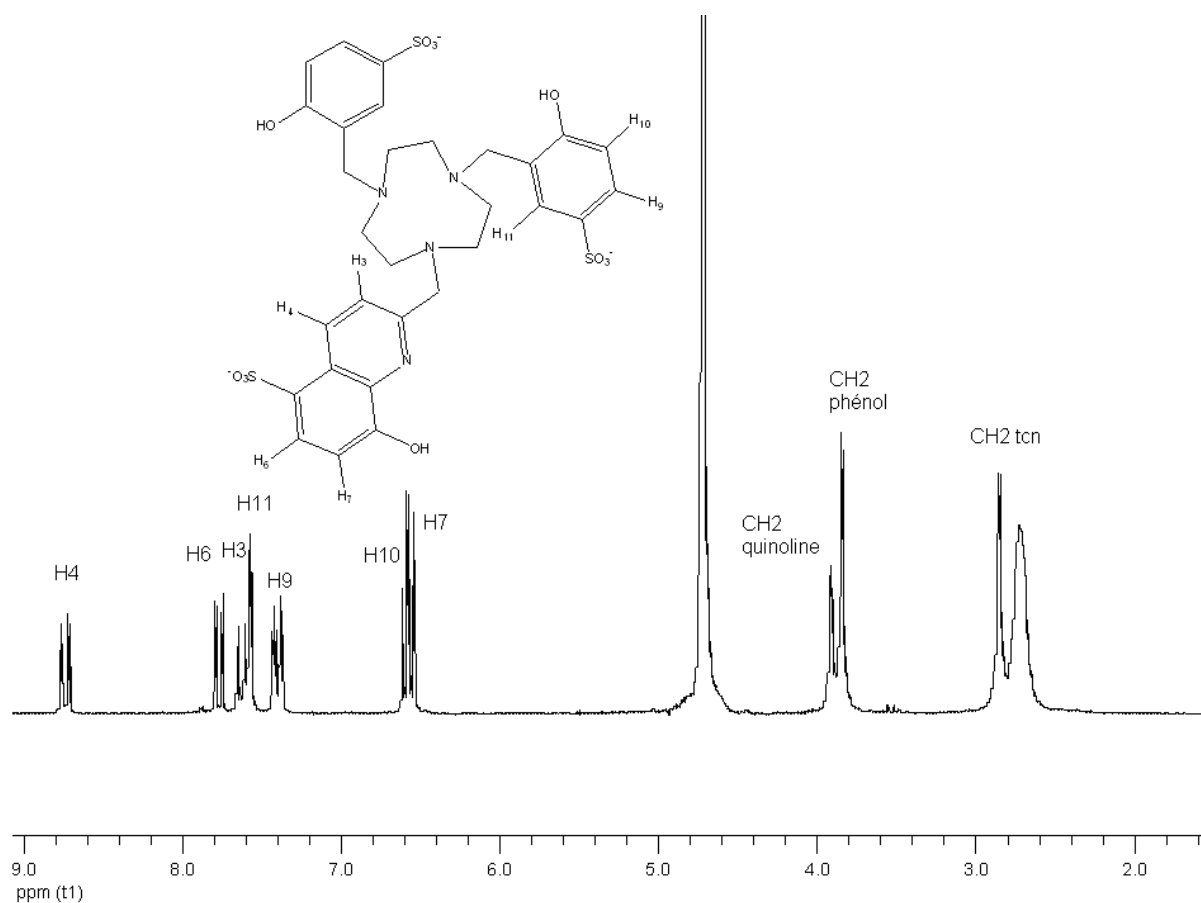


Figure 2.22 Spectre RMN 1H $H_3hqtcn-SO_3$, D_2O , $25^\circ C$, $pD = 7.4$

Le spectre RMN ^1H montre 12 résonnances. Deux singulets (2.68, 2.79 ppm) intègrent pour les douzes protons du triazacyclononane. Un singulet à 3.73 ppm intègre pour les quatre protons éthyléniques des bras portant les phénols et le singulet à 3.85 ppm intègre pour les deux protons éthyléniques du bras portant l'hydroxyquinoléine. Dans la zone aromatique trois doublets (7.63, 7.47, 6.61 ppm) intègrent pour les six protons des phénols et quatre doublets (8.76, 7.77, 7.68, 6.56 ppm) pour les quatre protons de l'hydroxyquinoléine. Le motif correspond à une symétrie de type C_s .

6. Synthèse des ligands dérivés de la dpaa

Dans les études menés sur les complexes $[\text{Ln}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]^{34}$ ont montré une augmentation de la relaxivité des complexes lorsqu'ils sont liés de façon non covalentes à des protéines comme la BSA. La structure du ligand H3dpaa a été modifiée pour pouvoir accrocher de façon covalente une macromolécule (nucléoside) qui permettrait d'optimiser le temps de corrélation rotationnel pour ces complexes afin d'augmenter la relaxivité. Les synthèses présentées ici ont été réalisées au sein du laboratoire par le Dr. Christelle Gateau et la relaxivité des complexes correspondant a été étudié et est présentée dans le chapitre 3.

Synthèse du N_3dpaa

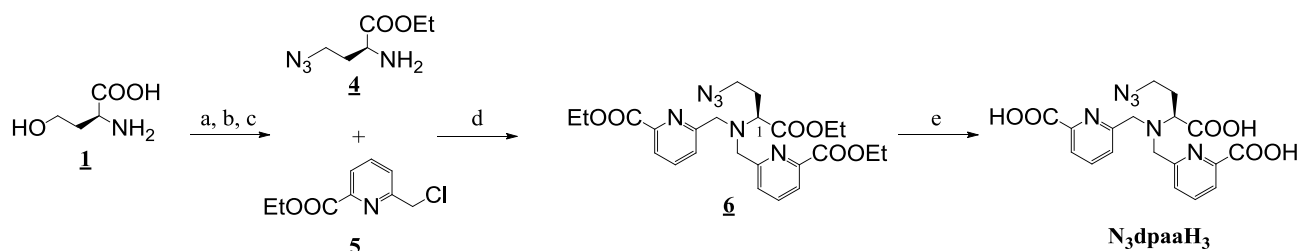


Figure 2.23 Synthèse de N_3dpaaH_3 – réactifs et conditions: a - i) Boc_2O , $\text{H}_2\text{O}/4$ -dioxane, ii) EtBr , DMF, 51 % ; b - i) MsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , ii) NaN_3 , DMF, 89 % ; c) TFA, CH_2Cl_2 , 96 % ; d) DIEA, KI, CH_3CN , 86 % ; e) KOH, $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, 79 %

Le ligand analogue à la dpaa comportant un groupement azide est synthétisé à partir de la L-homosérine. L'amine de celle-ci est protégée par un groupement Boc, puis l'acide carboxylique est protégé à son tour via la formation d'un ester éthylique grâce au bromure d'éthyle dans le DMF. Les deux fonctions étant protégées, l'alcool est activé par réaction avec le chlorure de mésyle, l'intermédiaire activé est filtré sur silice avant de réagir avec l'azide de sodium. Le produit obtenu est isolé par purification par chromatographie sur silice, puis subit

la déprotection en milieu acide du groupement Boc pour donner le produit **4** avec un rendement global de 44 %. Le couplage de l'amine se fait par réaction avec 2.2 équivalents du dérivé chloré **5**, en présence de diisopropylethylamine et d'iodure de potassium dans l'acétonitrile anhydre. Le dérivé **6** est obtenu avec un rendement de 86 % et les fonctions esters sont déprotégés via une réaction de saponification pour donner le produit désiré avec un rendement total de 30%.

5.4 Synthèse du dU2'Pdpaah₃

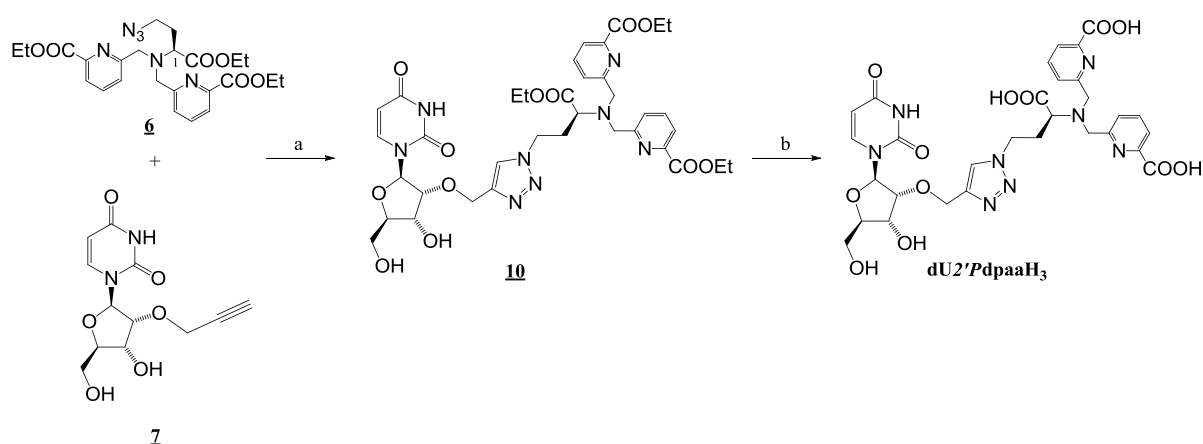


Figure 2.24 Synthèse de dU2'Pdpaah₃ – réactifs et conditions: a - CuI, DMSO, 63% ; b - KOH, H₂O/EtOH, 94 %.

Le couplage du nucléotide sur le ligand protégé **6** se fait par la réaction de Huisgen, à savoir la formation d'un cycle triazole entre le dérivé azide et l'allyle terminal porté ici par le nucléoside. Cette réaction dite de « chimie click » présente l'avantage de ne pas nécessiter de conditions de réactions trop dures, qui pourrait entraîner des réactions secondaires aussi bien sur le ligand protégé que sur le nucléoside. Il n'est donc pas nécessaire de protéger ce dernier. La seule contrainte de cette réaction reste l'utilisation de cuivre, certes dans des conditions catalytique, qui oblige de laver plusieurs fois le produit de la réaction avec une solution de Na₂EDTA, afin d'éliminer toute trace du métal. La présence de cuivre dans le produit peut poser des problèmes lors de la complexation avec les lanthanides et faire chuter les rendements lors de la synthèse des complexes. Le produit **10** complètement estérifié est déprotégé par saponification.

5.5 Synthèse du dU5Pdpaah₃ et du dU5Edpaah₃

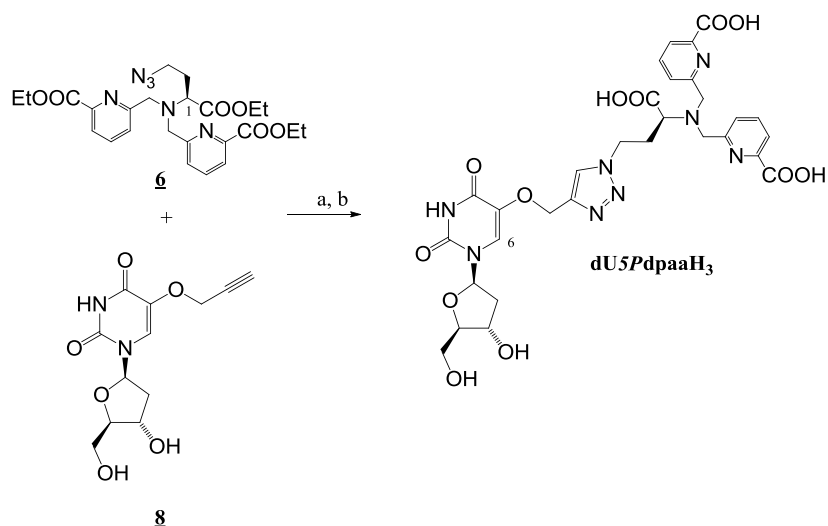


Figure 2.25 Synthèse de dU5Pdpaah₃ – réactifs et conditions: a - CuI, DMSO, 94 % ; b KOH, H₂O/EtOH, 98 %.

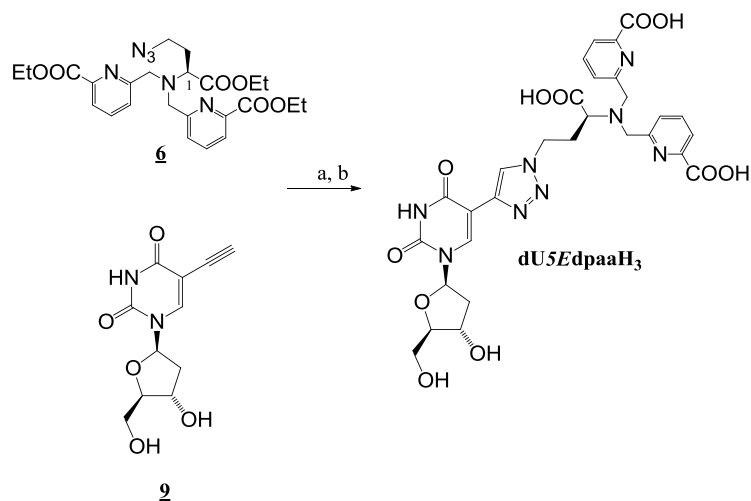


Figure 2.26 Synthèse de dU5Edpaah₃ – réactifs et conditions: a - CuI, DMSO, 59 % ; b KOH, H₂O/EtOH, 84 %.

Les deux autres analogues sont synthétisés de la même façon par la réaction de Huisgen puis déprotégés par saponification. Les rendements de l'étape de cycloaddition sont du même ordre que ceux obtenus par Horvinen et al.³⁵ (autour de 60%), même si le rendement de la cycloaddition dans le cas du 5Pdpaah₃ est obtenu avec un rendement très supérieur (94%). Contrairement aux conditions utilisées classiquement pour les cycloadditions³⁶, les deux réactifs principaux de départ ne sont pas utilisés en conditions équimolaires et il est nécessaire

d'utiliser deux équivalents du dérivé alcyne. L'excès utilisé oblige une purification plus lourde que dans des procédures utilisant un rapport 1 : 1 stricte entre l'azide et l'alcyne. Le choix de la chromatographie sur plaque s'est imposé pour la purification du fait des faibles quantités utilisées pour la synthèse. En effet, ces synthèses n'ont pu être effectuées sur de larges quantités aux vues du coût particulièrement élevé des dérivés de nucléosides utilisés. Le choix du DMSO par rapport aux autres solvants possible s'est fait sur la base d'une procédure déjà développée³⁷. Les rendements obtenus avec d'autres solvants sont inférieurs car ils ne solubilisent pas suffisamment nos réactifs pour obtenir un bon rendement.

Bibliographie

- (1) Xu, J.; Franklin, S. J.; D. W. Whisenhunt, J.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 7245.
- (2) Blanc, S.; Yakirevitch, P.; Leize, E.; Meyer, M.; Libman, J.; Dorsselaer, A. V.; Albrecht-Gary, A. M.; Shanzer, A. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119.
- (3) Dittler-Klingermann, A. M.; Hahn, F. E. *Inorg. Chem.*, **1996**, 35.
- (4) Serratrice, G.; H. Boukhalfa; Béguin, C.; Baret, P.; Caris, C.; Pierre, J. L. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 3898.
- (5) Ward, T. R.; Lutz, A.; Parel, S. P.; Ensling, J.; Gütlich, P.; Buglyo, P.; Orvig, C. *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 840.
- (6) Hajela, S.; Botta, M.; Giraud, S.; Xu, J.; Raymond, K. N.; Aime, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122.
- (7) Pierre, V. C.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5344-5345.
- (8) Thompson, M. K.; Botta, M.; Nicolle, G.; Helm, L.; Aime, S.; Merbach, A. E.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14274-14275
- (9) Fontecave, M.; Ménage, S.; Duboc-Toia, C. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 178-180 part2, 1555-15572.
- (10) Kitajima, N.; Moro-oka, Y. *Chem. Rev.*, **1994**, 94, 737.
- (11) Karlin, K. D.; Zuberbühler, A. D.; Dekker, M., *Bioinorganic Catalysis*, Eds. J. Reedijk, E. Bouwman, New York, **1999**, 469-534
- (12) Anderegg, G.; Wenk, F. *Helv. Chim. Acta*, **1967**, 50, 2330.
- (13) Wainwright, K. P. *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 35.
- (14) Chaudhuri, P.; Wieghardt, K. *Progr. Inorg. Chem.*, **1987**, 25, 239.
- (15) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 7133-7150.
- (16) Nonat, A.; Giraud, M.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Helm, L.; Mazzanti, M. *Dalton Trans.*, **2009**, 8033-8046.
- (17) Gateau, C.; Mazzanti, M.; Pécaut, J.; Dunand, F., A; Helm, L. *Dalton Trans.* **2003**, 2428-2433.
- (18) Wang, J.; Oyler, K. D.; Bernhard, S. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 5700.

- (19) Curry, R. J.; Gillin, W. P.; Knights, A. P.; William, R. G. *Optical Materials*, **2001**, 161-163.
- (20) Eliseeva, S. V.; Bünzli, J. C. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 189-227.
- (21) Katkova, M. A.; Kurskii, Y. A.; Fukin, G. K.; Averyushkin, A. S.; Artamonov, A. N.; Vitukhnovsky, A. G.; Bochkarev, M. N. *Inorg Chim. Acta*, **2005**, 358, 3625.
- (22) Iwamuro, M.; Adachi, T.; Wada, Y.; Kitamura, T.; Nakashima, N.; Yanagida, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2000**, 73, 1359.
- (23) Van Deun, R.; Fias, P.; Nockemann, P.; Schepers, A.; Parac-Vogt, T. N.; Van Hecke, K.; Van Meervelt, L.; Binnemans, K. *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 8461-8469.
- (24) Mameli, M.; Aragoni, M. C.; Arca, M.; Caltagirone, C.; Demartin, F.; Farruggia, G.; Filippo, G. D.; Devillanova, F. A.; Garau, A.; Isaia, F.; Lippolis, V.; Murgia, S.; Prodi, L.; Pintus, A.; Zaccheroni, N. *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 919-930.
- (25) Farruggia, G.; Iotti, S.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N.; Savage, P. B.; Trapani, V.; Sale, P.; Wolf, F. I. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 344-350.
- (26) NIH Publication 1985.
- (27) Abou-Zied, O. K.; Al-Lawatia, N. *Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications II*: San Francisco, California, USA 2010; Vol. Proc. SPIE 7576, 757618.
- (28) Nonat, A.; Imbert, D.; Pécaut, J.; Giraud, M.; Mazzanti, M. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 4207-4218.
- (29) Deraeve, C.; Boldron, C.; Maraval, A.; Mazarguil, H.; Gornitzka, H.; Vendier, L.; Pitie, M.; Meunier, B. *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 682 - 696.
- (30) Comby, S.; Imbert, D.; Vandevyver, C.; Bünzli, J. C. *Chem.-Eur. J.*, **2007**, 13, 936-944.
- (31) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3849-3862.
- (32) Gribble, G. W.; Nutaitis, C. F. *Org. Prep. Proced. Int.*, **1985**, 17, 317.
- (33) Barta, C. A.; Bayly, S. R.; Read, P. W.; Patrick, B. O.; Thompson, R. C.; Orvig, C. *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 2280-2293.
- (34) Nonat, A.; Fries, P. H.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 8489-8506.
- (35) Ketola, J.; Katajisto, J.; Hakala, H.; Hovinen, J. *Helv. Chim. Acta* **2007**, 90, 607-615.

(36) Rostovtsev, V. V.; Luke G. Green; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

(37) Molander, G. A.; Ham, J. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2767-2770.

Chapitre III : Stabilité et relaxivité des complexes

Chapitre III : Stabilité et relaxivité des complexes	115
1. Complexes de gadolinium dérivés du 1,4,7-triazacyclononane	116
1.1. Synthèse des complexes	119
1.2. Etude structurales en solutions	119
1.2.1. Etude RMN	119
1.2.1.1. Ligand H ₃ thqtcn-SO ₃	120
1.2.1.2. Ligand H ₃ dhqtcn-SO ₃	121
1.2.1.3. Ligand H ₃ hqtcn-SO ₃	125
1.2.2. Protonation des ligands et stabilité des complexes	126
1.3. Etude de la relaxivité des complexes	131
1.3.1. Relaxivité des complexes	131
1.3.1.1. [Gd(thqtcn-SO ₃)] ³⁻	131
1.3.1.2. [Gd(dhqtcn-SO ₃)(H ₂ O)] ³⁻ et [Gd(hqtcn-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	141
1.3.2. Influence des anions endogènes sur la relaxivité	151
1.3.3. Relaxivité avec l'albumine	153
1.3.4. Relaxivité dans avec le sérum	159
2. Complexes de gadolinium à azote central	162
2.1. Synthèse des complexes	162
2.2. Etude structurales en solutions	163
2.2.1. Etude RMN	163
2.2.1.1. Ligand H ₃ thqN-SO ₃	163
2.2.1.2. Ligand H ₃ dhqN-SO ₃	165
2.2.2. Protonation des ligands et stabilité des complexes	167
2.3. Etude de la relaxivité des complexes	170
2.3.1. Relaxivité des complexes	170
2.3.1.1. [Gd(dhqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻ et [Gd(thqN-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	170
2.3.2. Influence des anions endogènes sur la relaxivité	177
2.3.3. Relaxivité dans l'albumine	180
2.3.4. Relaxivité dans avec le sérum	181
2.3.5. Images IRM.....	183
3. Complexes de H ₃ dhqN-gly et H ₄ dhqN-asg	186
3.1. Etude structurales en solutions	186
3.1.1. Etude RMN	186
3.1.1.1. Ligand H ₃ dhqN-gly	186
3.1.1.2. Ligand H ₄ dhqN-asg.....	187
3.2. Etude de la relaxivité des complexes	188
3.2.1. Relaxivité des complexes	188
4. Complexes dérivés de l'homosérine.....	189
Bibliographie	195

1. Complexes de gadolinium dérivés du 1,4,7-triazacyclononane

Comme nous l'avons vu précédemment, la relaxivité des complexes de gadolinium III commercialement utilisés est trop faible pour des applications en imagerie moléculaire. La théorie indique que l'optimisation des différents paramètres, le nombre de molécules d'eau q , la vitesse d'échange k_{ex} et le temps de corrélation rotationnelle τ_r pourrait permettre d'accéder à des relaxivités bien plus élevées.

Des complexes basées sur le pivot 1,4,7-triazacyclononane ont déjà été étudiés, notamment au sein de notre laboratoire. Cette architecture s'est montrée particulièrement adaptée pour la complexation des lanthanides. Ainsi les complexes symétriques comme le $[Ln(tpatcn)]^1$ ou asymétriques comme le $[Ln(bpatcn)(H_2O)]^2$ présentent des structures rigides en solution dans lesquelles les bras et les azotes du macrocycles restent parfaitement liés au centre métallique. Les complexes de Gd(III) correspondant avaient mis à jour l'influence de l'architecture des complexes sur la relaxation électronique. En effet, le temps de relaxation électronique de ces deux complexes s'est avéré bien plus lent pour ces deux complexes que pour des analogues présentant les mêmes unités chélatantes picolines mais une architecture moins rigide et moins symétrique comme le $[Gd(bpeda)(H_2O)]^-^3$. L'étude des complexes de $[Gd(ebpatcn)(H_2O)]$ et $[Gd(pbpatcn)(H_2O)]^-$ a également mis en évidence que des vitesses d'échange rapide (40 à $85 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) pouvaient être atteintes avec ce type d'architecture. Toutes ces propriétés physiques conduisent à une amélioration de la relaxivité. Nous avons donc repris cette architecture pour le design de complexes basés sur une unité chélatante hydroxyquinoléine.

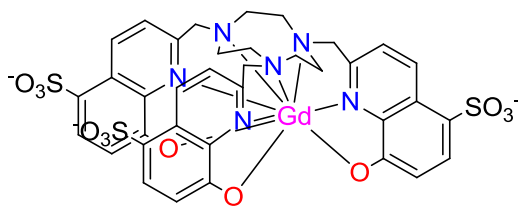


Figure 3.1 Complexe de $[Gd(thqtcn-SO_3)]^{3-}$

Un complexe hydrosoluble de lanthanide (figure 3.1), le $[Ln(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ a déjà été étudié au sein du laboratoire ⁴, mais uniquement pour ses propriétés de stabilité ainsi que celle liées à

la luminescence dans le proche infra-rouge. Bien que ne présentant aucune molécule d'eau en première sphère de coordination, il nous a paru intéressant d'étudier la relaxivité du complexe. En effet, si l'absence de molécule d'eau directement liée au centre métallique est la plupart du temps réhibitoire pour l'utilisation des complexes comme sondes magnétiques, il existe cependant quelques exemples dans la littérature de complexes $q = 0$ qui présentent des valeurs de r_1 non négligeables. C'est le cas des complexes présentant des groupements phosphonates qui ont la capacité de retenir les molécules d'eau en seconde sphère par des liaisons hydrogènes. Ainsi, le complexe de $[\text{Gd}(\text{DOTP})^{5-}]$ ainsi que ces dérivés $[\text{Gd}(\text{C}_{11}\text{-DOTP})^{5-}]$ et $[\text{Gd}(\text{C}_8\text{-DOTP})^{5-}]$ (figure 3.2) présentent des valeurs de r_1 comparables à celles des complexes mono hydratés (respectivement 4,7 ; 5,1 et 4,6 $\text{s}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ à 20 MHz). Si la contribution de sphère externe est due à la diffusion des molécules d'eau à proximité du complexe, la contribution de seconde sphère est due à des molécules d'eau qui sont associées au complexe avec un temps de résidence beaucoup plus long ($>10^{-10}$ s) que le temps de corrélation translationnelle ($\sim 10^{-11}$ à 10^{-10} s) associé à la simple diffusion. Cette contribution de seconde sphère est liée à la charge globale du complexe et la nature des groupements en surface de ce complexe. Les groupements phosphonates sont capables de lier fortement les molécules d'eau en seconde sphère et d'induire une relaxivité comparable à celle d'un complexes $q = 1$.

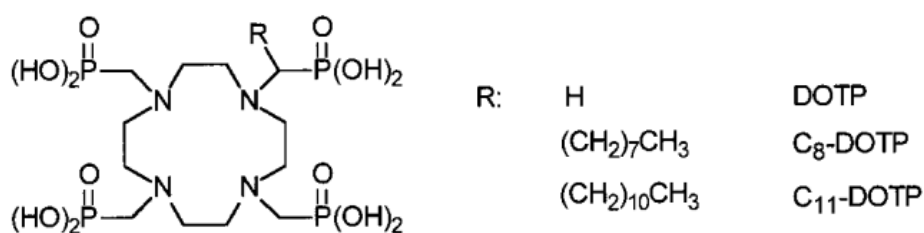


Figure 3.2 Ligand H_8DOTP et ces dérivés $\text{C}_8\text{-DOTP}$ et $\text{C}_{11}\text{-DOTP}$

Aux vues des bonnes performances des complexes $[\text{Yb}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ et $[\text{Nd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ pour la luminescence proche infrarouge⁴, l'obtention d'une relaxivité comparable à un complexe mono hydraté serait particulièrement intéressante, le nombre de composés permettant d'associer la luminescence proche infrarouge et le contraste IRM étant, comme nous avons pu le voir en introduction, relativement rare dans la littérature^{5,6}. La présence de groupements chargés négativement et de groupement OH susceptibles de former des liaisons hydrogènes est prometteur pour l'obtention de relaxivité de seconde sphère. En partant de ce complexe, nous avons décidé de préparer les analogues mono et bis hydratés, afin d'augmenter la relaxivité de ces complexes par rapport aux complexes $[\text{Ln}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$.

Pour obtenir ces composés, le ligand $H_3thqtcn-SO_3$ a été modifié en remplaçant respectivement un et deux bras hydroxyquinoléines par un et deux groupements phénols plutôt que des groupements carboxylates comme cela avait été fait pour le ligand $tpatcn$.

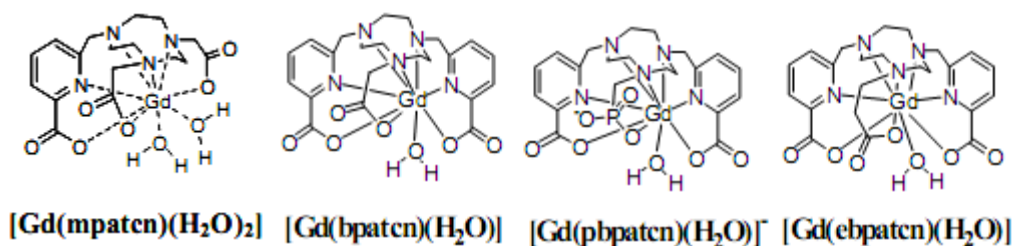


Figure 3.3 Complexes basés sur une architectures 1,4,7-triazacyclononane et des unités chélatantes picolinates

En effet, pour la préparation d'analogues du $[Gd(tpatcn)]$, un ou deux picolines avaient été remplacé par des bras carboxylates, afin d'augmenter le nombre de molécules d'eau en première sphère, et d'étudier l'influence des modifications de la structure sur la relaxation électronique et la vitesse d'échange des molécules d'eau. Dans notre cas, le choix du phénol s'explique par différentes raisons. D'abord, d'un point de vue synthétique, les bras carboxylates ne résistent pas à la sulfonation et la réaction conduit à une décarboxylation. Ensuite la présence du cycle aromatique permet d'obtenir un bras plus rigide qu'un bras carboxylate. Enfin, les valeurs des pK_a des groupements hydroxy du phénol et de l'hydroxyquinoléine sont relativement proches, alors que le pK_a du carboxylate est lui bien plus acide. En effet le pK_a de l'orthohydroxybenzaldéhyde est de 7.95⁷, celui de la 5-sulfo-8-hydroxyquinoléine est de 8.42⁸. Le complexe de $[Gd(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ étant particulièrement stable, nous avons cherché à modifier le moins possible l'environnement direct du lanthanide et donc à conserver des valeurs de pK_a suffisamment proche en espérant conserver cette stabilité élevée.

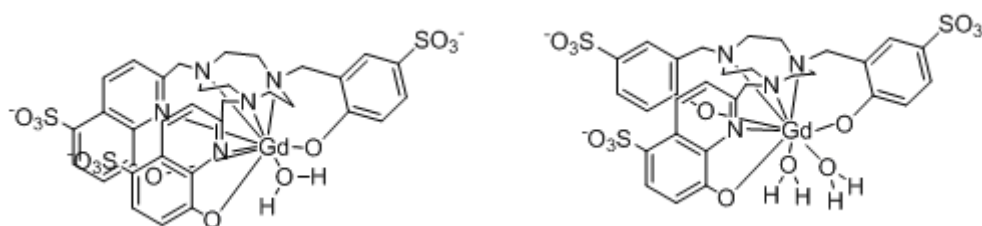


Figure 3.4 Complexe $[Gd(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$ et $[Gd(hqtcn-SO_3)(H_2O)_2]^{3-}$

1.1. Synthèse des complexes

Les ligands H₃thqtcn-SO₃, H₃dhqtcn-SO₃ et H₃hqtcn-SO₃ réagissent dans l'eau avec un équivalent de chlorures de lanthanides (III), pour donner, après ajustement du pH avec une solution de KOH ou de NaOH, des complexes de stoechiométrie 1 : 1. Les complexes ont été, à chaque étude, synthétisés in situ. L'absence de lanthanides libres dans le milieu a été testée par le test du xylénol orange⁹.

1.2. Etude structurales en solutions

1.2.1. Etude RMN

Les complexes de différents Ln(III) (Ln= Nd, Eu, Y) avec les différents ligands ont été étudiés par RMN ¹H en solution aqueuse. Plusieurs études structurales ont été reportées dans la littérature pour des ligands polyaminocarboxylate cycliques, de type DOTA⁶⁻¹¹. Dans ces complexes, différents équilibres conformationnels ou de coordination ont été observés. Avec un ligand de type DOTA, le cyclène peut adopter deux conformations (δδδδ) ou (λλλλ) selon la valeur des angles de torsion N-C-C-N. De la même façon les bras acétates peuvent avoir une orientation gauche (Λ) ou droite (Δ), ce qui donne quatre stéréoisomères possibles en solution entre lesquels des interconversions peuvent avoir lieu. De façon similaire, un tel comportement peut être envisagé pour nos complexes basés sur la plateforme triazacyclononane. Ainsi la torsion du tacn induit deux conformations possibles (δδδ ou λλλ) et l'orientation des bras chélatants peut prendre deux orientations (Λ) ou (Δ). Nos complexes peuvent donc exister sous la forme de quatre stéréoisomères. (Λ(δδδ), Δ(λλλ), Δ(δδδ), Λ(λλλ)). Par un changement simultané du sens d'enroulement des bras et de la torsion du cycle, on passe d'un énantiomère à l'autre. En ne changeant que l'hélicité des bras ou celle du cycle, on passe d'un diastéréoisomère à l'autre.

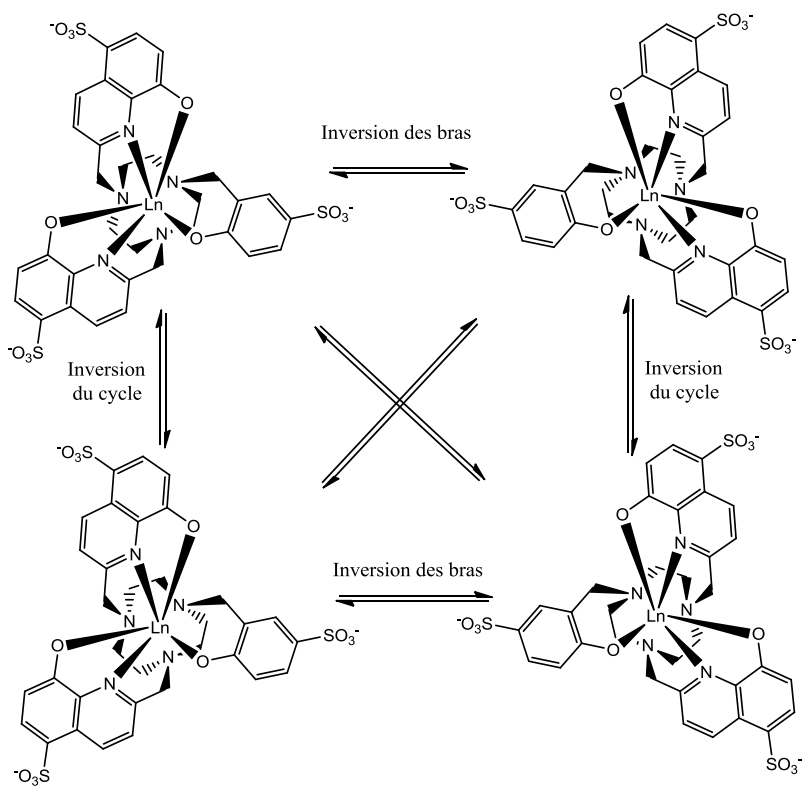


Figure 3.5 Représentation schématique des différents mécanismes d'échanges entre les isomères du $[\text{Ln}(\text{dhqtcn-SO}_3)]^{3-}$

1.2.1.1. Ligand $\text{H}_3\text{thqtcn-SO}_3$

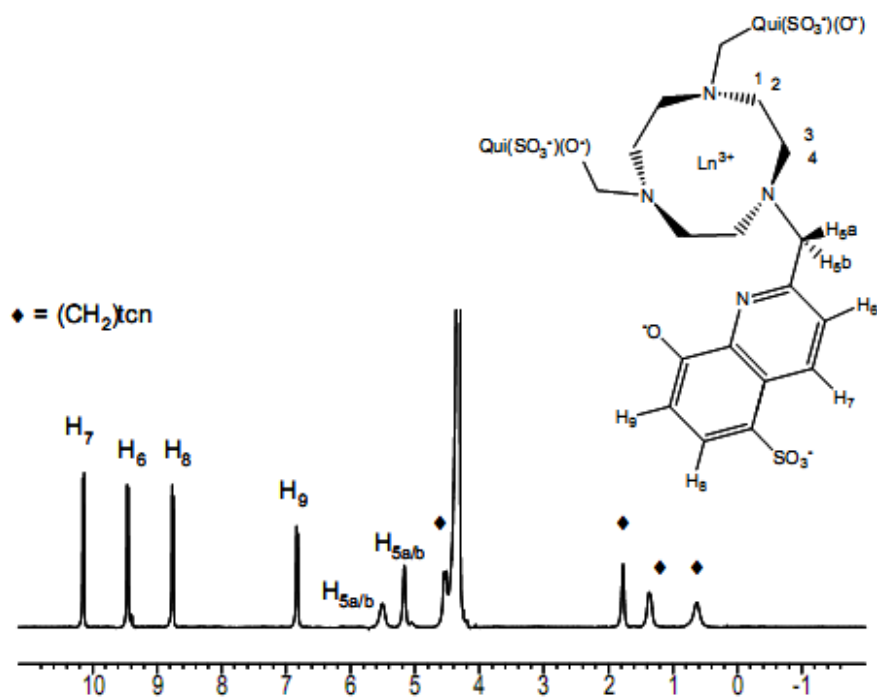


Figure 3.6 Spectre proton ^1H $[\text{Nd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$, D_2O , $\text{pD} = 7.4$, 70°C , 400 MHz^4

Les spectres RMN ^1H dans l'eau (à 25°C et à 70°C) sont en accord avec la formation d'une espèce paramagnétique rigide de symétrie C_3 . En effet, seulement dix signaux sont observés conformément à une symétrie C_3 : quatre signaux sont attribués aux protons diastéréotopiques du cycle triazacyclononane (0.62, 1.30, 1.75, 4.50 ppm), deux résonances correspondent aux protons éthyléniques des bras portant les quinoléines (5.16, 5.54 ppm). Les quatre derniers signaux sont attribués aux protons de l'hydroxyquinoléine (6.81, 8.75, 9.46, 10.52). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour les complexes $[\text{Ln}(\text{tpatcn})]^1$, qui ne présentent que neuf signaux attribués de la même façon que pour notre complexe (trois résonances pour les picolinate, quatre résonances pour les protons du cycle triazacyclononane et deux pour les protons éthyléniques des bras). Cette signature spectrale est en accord avec la présence d'une structure rigide dans laquelle les bras hydroxyquinoléines restent coordonnés au centre métallique à l'échelle de temps de la RMN.

1.2.1.2. Ligand $\text{H}_3\text{dhqtcn-SO}_3$

Contrairement aux complexes de $\text{H}_3\text{thqtcn-SO}_3$, qui présentent en solution une symétrie C_3 , on attend pour les complexes de $\text{H}_3\text{dhqtcn-SO}_3$ la formation d'une espèce de symétrie C_1 , le complexe ne présentant ni centre, ni axe de symétrie. Dans le cas d'une coordination rigide des huit atomes donneurs, une telle espèce conduirait à un spectre ^1H RMN comportant 29 signaux distincts. En fonction du nombre d'espèces en solution (figure 3.5), plusieurs cas de figures sont envisageables :

- Les deux paires de diastéréoisomères sont présentes en solution sans interconversion. Dans ce cas, deux groupes distincts de 29 signaux chacun sont observés sur le spectre ^1H RMN.
- Une seule paire d'énantiomères est présente en solution et il n'y a pas de phénomène d'échange. Le spectre ^1H RMN comporte alors un seul jeu de 29 signaux distincts.
- Un échange rapide entre les deux énantiomères a lieu : une espèce moyenne de symétrie C_s est observée, et la coalescence des 29 signaux conduit à un ensemble de 15 pics.

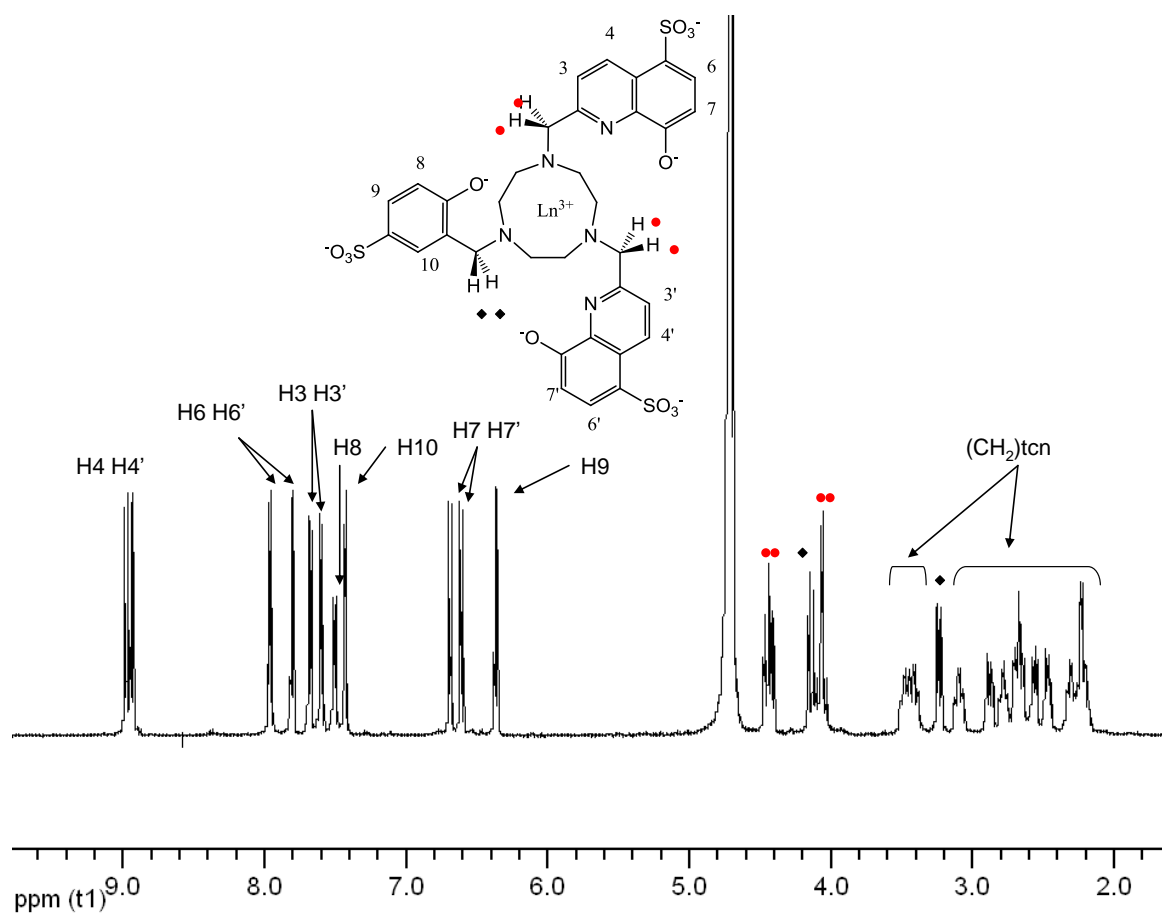


Figure 3.7 Spectre proton ^1H $[\text{Y}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, D_2O , $\text{pD} = 7.4$, 25°C , 500 MHz

Sur le spectre RMN ^1H du complexe d' $\text{Y}(\text{III})$, on peut observer 29 signaux. Huit signaux correspondent aux protons des deux hydroxyquinoléines (8.97, 8.93, 7.95, 7.80, 7.67, 7.59, 6.68, 6.61 ppm), trois correspondent aux protons du phénol (7.50, 7.42, 6.36 ppm). Six signaux sont attribués aux protons éthyléniques des bras et douze signaux qui se recouvrent partiellement correspondent aux protons du macrocycle. Le spectre est en accord avec une architecture rigide et la présence d'un couple d'énantiomère $\Lambda(\delta\delta\delta)/\Delta(\lambda\lambda\lambda)$ ou $\Lambda(\lambda\lambda\lambda)/\Delta(\delta\delta\delta)$.

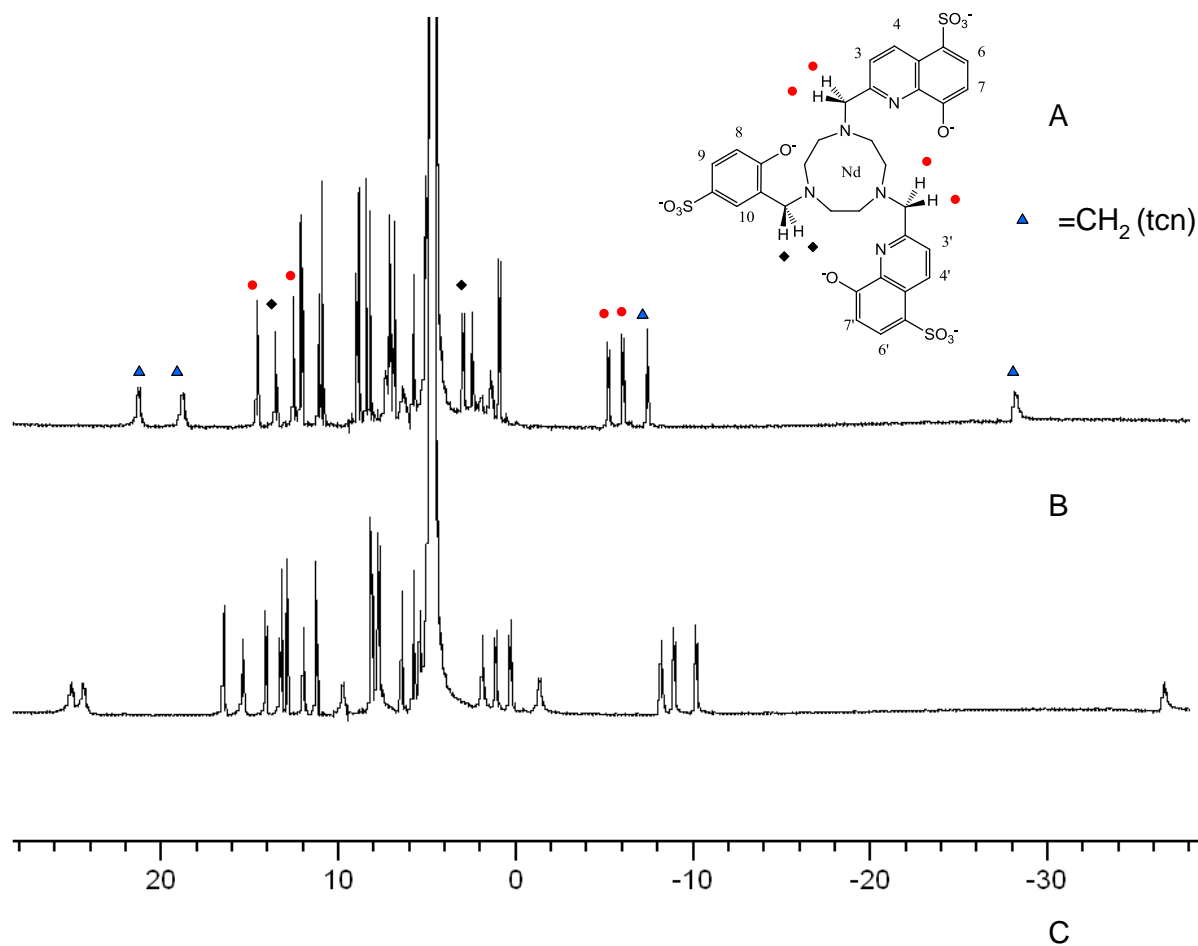


Figure 3.8 Spectre proton ^1H $[\text{Nd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, D_2O , $\text{pD} = 7.4$, 500 MHz à 70°C (A), 25°C (B) et agrandissement à 70°C entre 0 et 16ppm (C)

Pour le complexe de Nd(III) les signaux se trouvent sur une plus grande plage de déplacement chimique du à son paramagnétisme. Le spectre est parfaitement figé et présente également 29 signaux qui se recouvrent partiellement. La variation de température n'a que très peu d'influence sur les spectres (figure 3.8) et ne met en lumière aucun phénomène d'échange ou de coalescence. Cependant, elle permet de mieux distinguer les 29 signaux confirmant ainsi la symétrie C_1 pour le complexe de Nd(III). Sur le spectre à 70°C, les expériences COSY et NOESY permettent d'attribuer les protons des hydroxyquinoléines (8 signaux, 12.25, 12.12, 9.00, 8.91, 8.51, 8.26, 7.16, 6.94 ppm), les trois signaux correspondant aux phénols (11.18, 10.95, 5.85 ppm), les protons des éthyléniques des bras quinoléines (14.66, 12.61, -5.16, -5.94) ainsi que du bras phénol (13.60, 3.02 ppm). Les autres signaux correspondent aux protons du macrocycle (21.30, 18.86, 7.35, 6.44, 5.17, 5.07, 3.02, 2.54, 1.98, 1.49, 0.98, -28.13 ppm). Ces expériences confirment la présence d'un seul couple d'énantiomères en solution et, de manière analogue aux complexes de $[Ln(tpatcn)]^1$ et de $[Ln(thqtcn-SO_3)]^{3-4}$ le montrent, l'absence de phénomène dynamique à l'échelle de temps de la RMN. A contrario, les complexes non symétriques dérivés du $[Gd(tpatcn)]$ ont montré que le remplacement d'un des bras picolines par un bras carboxylates ou phosphates avait une incidence sur la rigidité du complexe et les études en température sur ces complexes ont mis en évidence l'existence d'un processus dynamique. Dans notre cas, la substitution d'une hydroxyquinoléine par un phénol n'a pas modifié la rigidité de la structure.

L'étude de ces deux complexes montre que notre ligand s'adapte parfaitement à des ions lanthanides de différentes tailles, puisque les spectres se montrent parfaitement figés aussi bien pour le Nd(III) (1.16 Å) que pour l'Y(III) (1.06 Å) dont la taille est proche du Gd(III) (1.10 Å). L'enroulement de la structure permet de s'adapter au mieux à la taille de l'ion considéré.

1.2.1.3. Ligand H₃hqtcn-SO₃

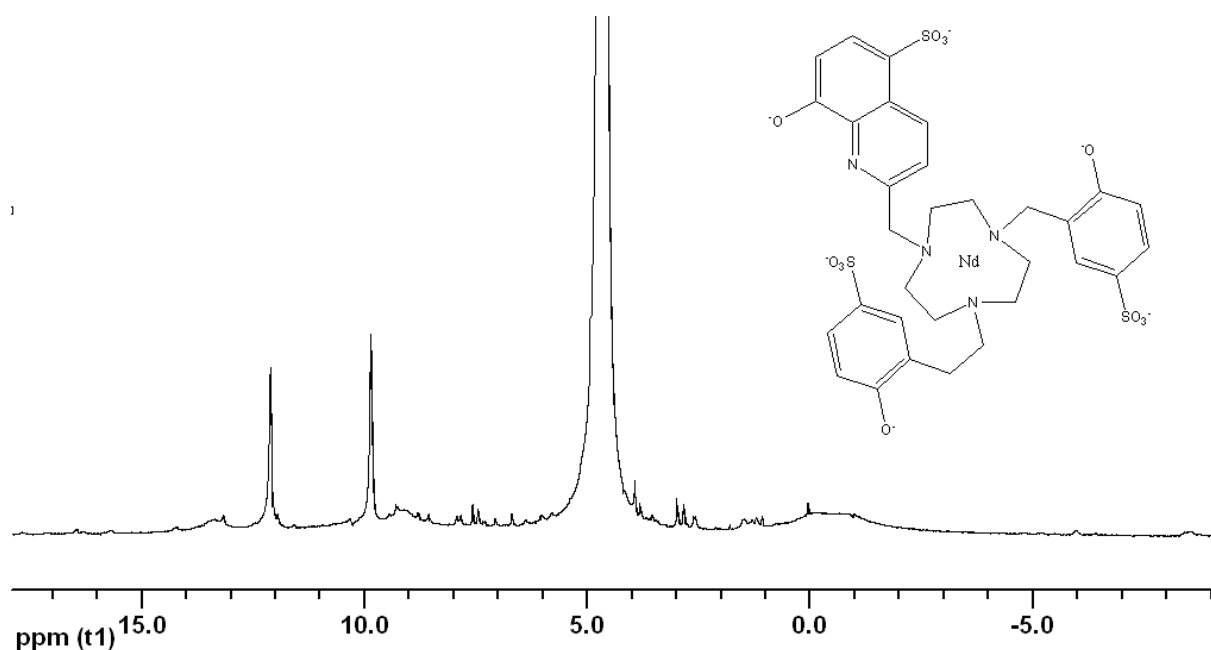


Figure 3.9 Spectre proton ¹H [Nd(hqtcn-SO₃)(H₂O)₂]³⁻, D₂O, pD =7.4, à 25°C, 500 MHz

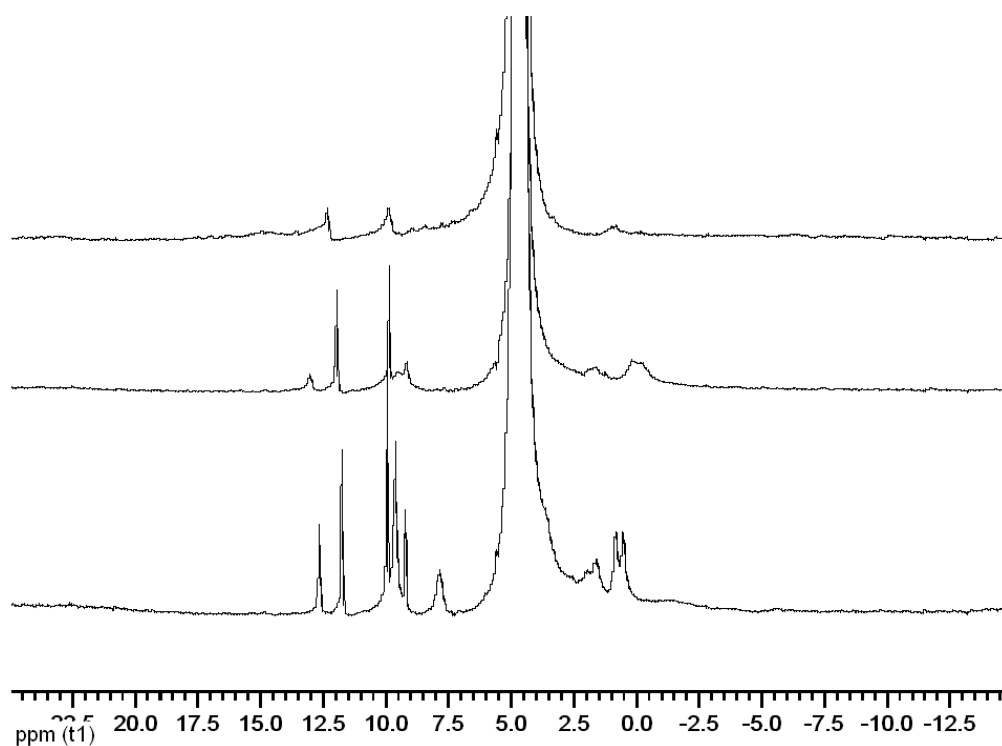


Figure 3.10 Spectres proton ¹H [Nd(hqtcn-SO₃)(H₂O)₂]³⁻, D₂O, pD =7.4, à 5°C, 40°C, 70°C, 500 MHz

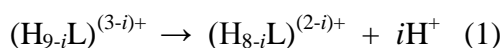
Contrairement aux deux exemples précédents, le ligand H₃hqtcn-SO₃ ne forme pas une espèce rigide avec le Nd(III) en solution. Une étude en température a été réalisée et si aucune amélioration du spectre n'est observée à basse température, le spectre enregistré à 70°C, sans

montrer l'ensemble des signaux RMN attendus pour le complexe, présente un affinement de certains pics. L'accélération avec la température de la vitesse des mécanismes d'échanges conformationnels conduit progressivement à la coalescence des signaux. Cependant celle-ci n'est pas atteinte dans la gamme de température qui nous est accessible. Ces expériences mettent en lumière la plus grande flexibilité du ligand H₃hqtcn-SO₃. En effet, si aucun phénomène d'interconversion n'avait été mis à jour pour les complexes de H₃thqtcn-SO₃ et de H₃dhqtcn-SO₃, les complexes de H₃hqtcn-SO₃ présentent une rigidité bien moindre à température ambiante. Cette flexibilité accrue peut s'expliquer par la structure du ligand lui-même. En effet, le changement d'orientation des bras phénolates est probablement plus facile que celui des bras hydroxyquinolines, l'unité chélatante n'étant reliée au métal que par un seul site de coordination. Dans le cas des complexes de H₃dhqtcn-SO₃, la présence de deux unités quinoléines suffit probablement à contraindre l'enroulement des bras dans un sens, contraignant ainsi le seul bras phénol. Dans le cas du ligand H₃hqtcn-SO₃, le seul bras quinoline ne suffit pas à contraindre le sens d'enroulement des deux autres bras phénol, expliquant la flexibilité de la structure constatée en RMN.

1.2.2. Protonation des ligands et stabilité des complexes

Les trois formes complètement protonées des ligands H₃thqtcn-SO₃, H₃dhqtcn-SO₃, H₃hqtcn-SO₃, présentent respectivement 8, 8 et 7 sites de protonations dans la gamme de pH étudiée, 2 < pH < 10. En effet dans les conditions du dosage, les trois groupements sulfonates sont totalement déprotonés, et dans le cas du H₃thqtcn-SO₃, un des azotes de l'hydroxyquinoléine présente un pK_a trop bas pour être déterminé. Les constantes de protonation sont déterminées par potentiométrie.

Les dosages potentiométriques sont réalisés entre pH = 2.5 et pH = 12 et les pK_a extraits de ces mesures sont définis par les équations suivantes :



$$K_{ai} = \frac{[\text{H}_{8-i}\text{L}^{(2-i)+}][\text{H}^+]^i}{[\text{H}_{9-i}\text{L}^{(3-i)+}]} \quad (i = 1-8) \quad (2)$$

Pour cela, des solutions de 10mL du ligand de concentrations connues (1.10⁻³ M) et de forces ioniques constantes (KCl 0.1 M) sont placées dans une cellule thermostatée à 25°C. Le titrage est effectué par une solution calibrée de KOH (0.1 M). Le pH est mesuré après chaque ajout

de base. La courbe (figure 3.11) représente le pH en fonction du nombre d'équivalent de bases ajoutées. Un dosage retour avec une solution d'HCl (0.1 M) est ensuite systématiquement effectué. Les données sont traitées mathématiquement par HYPERQUAD2000^{10,11}.

Les valeurs des constantes de protonation des trois ligands sont regroupées dans le tableau 3.1. Les valeurs calculées résultent du traitement de trois dosages aller-retour indépendants.

ligand	H ₃ thqtcn-SO ₃ ⁴	H ₃ dhqtcn-SO ₃	H ₃ hqtcn-SO ₃
pKa 1		2.04(2)	-
pKa 2	8.51(1)	4.61(2)	4.16(3)
pKa 3	8.01(8)	8.10(1)	7.58(3)
pKa 4	8.78(1)	8.52(1)	9.13(3)
pKa 5	8.98(4)	19.39(1)	9.83(3)
pKa 6	10.25(2)		10.80(3)
pKa 7	22.51(3)	23.15(9)	23.86(2)
pKa 8			

Tableau 3.1 Constantes de protonation des différents ligands dérivés du triazacyclononane

Dans certains cas, lorsque les deux valeurs de pK_a sont trop proches, il est impossible de déterminer la valeur exacte des deux pK_a, qui sont alors exprimés sous la forme d'une somme. Les pKa 1 et pKa 2 peuvent être attribués à la déprotonation des azotes des pyridines. Dans le cas des trois ligands, les valeurs s'approchent de la valeur rapportée pour la 5-sulfo-8-hydroxyquinoléine (pK_a = 3.92)⁸ et sont en accord avec les pK_a publiés pour les ligands tripodes basés sur la 2-carboxy-8-hydroxyquinoléine (3.70 et 4.62)¹². Les pKa 3, 4 et 5 correspondent à la déprotonation des groupements hydroxyles. Pour le ligand H₃dhqtcn-SO₃ les pKa 3 et 4 correspondent aux groupements hydroxyles des quinoléines et sont similaires aux valeurs reportées pour la 5-sulfo-8-hydroxyquinoléine (pK_a = 8.42)⁸. Pour le ligand H₃hqtcn-SO₃, le pKa 3 (7.58), bien que présentant une valeur plus faible que pour les autres ligands, peut être attribué à la déprotection du groupement hydroxyle de la seule quinoléine du ligand. On peut encadrer cette valeur par les pKa les plus faibles attribués à des groupements hydroxyles du TSox¹³ et du T2Sox¹², respectivement 6.40 et 8.33. Le pKa 5 n'a pu être déterminé pour le H₃dhqtcn-SO₃ seul mais correspond au proton du phénol. Les pKa 4 et 5 du H₃hqtcn-SO₃ correspondent aussi aux deux phénols, le pKa du phénol étant de 9.95.

Dans les trois cas, la somme des pK_a 5 et 6, correspondant à un phénol et à un azote du macrocycle oscille entre 19.34 et 20.63. Les derniers pK_a (6, 7, 8) correspondent à la déprotonation des azotes du macrocycle. Ces valeurs sont en accord avec la déprotonation du dernier azote du 1,4,7-triazacyclononane, dont le pK_a est de 10,42¹⁴.

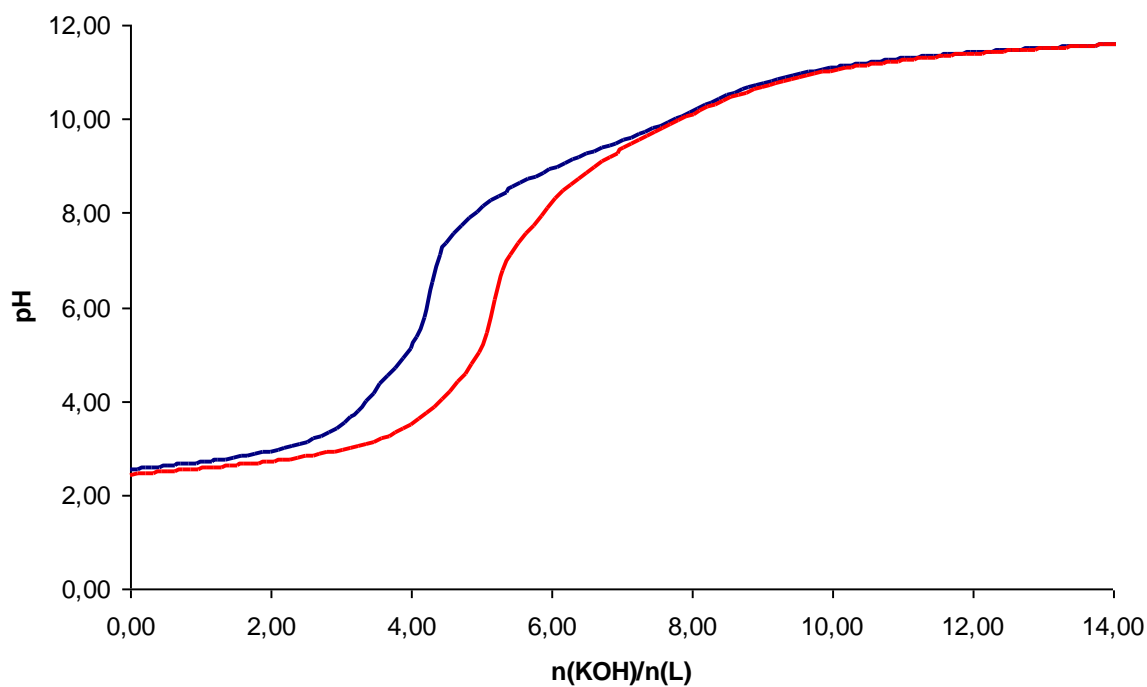


Figure 3.11 Courbes de titrations normalisées pour les ligands $H_3dhqtcn-SO_3$ (---) et $H_3hqtcn-SO_3$ (---)

Les constantes de stabilité des complexes de Gd(III) et Zn(II) n'ont pu être mesurées par potentiométrie. En effet, même au pH acide de départ, le complexe est déjà presque complètement formé. La courbe de titration potentiométrique des complexes ne nous permet donc pas de déterminer les constantes de stabilité globales des complexes. Pour contourner ce problème, la stabilité des complexes de Gd(III) et de Zn(II) a été mesurée par spectrophotométrie UV-visible grâce à une méthode de titration compétitive avec le ligand H_5dtpa . Cette méthode, déjà utilisé par Raymond et al.^{15,16} consiste à faire varier la concentration de H_5dtpa de 0.01 équivalent à 100 équivalents. Les concentrations des deux complexes en solution sont déterminées pour chaque échantillon et il est ainsi possible d'accéder à la constante de stabilité de notre complexe précisément pGd ($pGd = -\log [Gd_{aq}]$) pour une concentration totale $[Gd]_{total} = 10^{-6}$ M et $[L]_{total} = 10^{-5}$ M). Le graphique $\log([Gd(DTPA)]/[GdL])$ en fonction de $\log([DTPA]/[L])$ donne directement la différence de pM entre notre ligand et la DTPA ($\log([DTPA]/[L])$ quand $\log([Gd(DTPA)]/[GdL]) = 0$).

$$\Delta pM = x ; pGd = pGd_{dtpa^+} + x$$

Dans la procédure initiale, le complexe 1 : 1 entre le métal et le ligand est formé dans chaque échantillon et différentes quantités de H₅dtpa sont ajoutées. Dans le cas des ligands H₃thqtcn-SO₃ et H₃dhqtcn-SO₃, il n'a pas été possible d'effectuer la procédure dans cet ordre. En effet, même en ajoutant 100 équivalents de H₅dtpa dans l'échantillon, il est impossible de déplacer le métal. Ces deux ligands forment donc des complexes particulièrement inertes cinétiquement avec le Gd(III). Pour parvenir à une constante de stabilité, nous avons procédé de la façon inverse, à savoir ajouter un équivalent de métal à des solutions de H₅dtpa de différentes concentrations puis, après équilibration, ajouter un équivalent de notre ligand.

Les valeurs des constantes de stabilité sont rapportées dans le tableau 3.2.

ligand	H ₃ thqtcn-SO ₃ ⁴	H ₃ dhqtcn-SO ₃	H ₃ hqtcn-SO ₃
pGd	19.8 (2)	19.8(2)	19.1(2)
pZn	-	14.8(2)	-
ΔpM		5.0	
ΣpKa	67.0	65.8	64.4

Tableau 3.2 Constantes de stabilité des complexes de Gd(III) et Zn(II)

Le pM permet de comparer les propriétés de complexation des différents ligands en s'affranchissant de l'influence liée aux propriétés acido-basiques du ligand. Il est défini comme suit :

$$pM = - \log [M]_{\text{libre}} \text{ à } pH = 7.4$$

avec $[L]_{\text{total}} = 10^{-5} \text{ M}$ et $[M]_{\text{total}} = 10^{-6} \text{ M}$

Les constantes de stabilités de nos complexes de gadolinium sont comprises entre 19 et 20, ce qui représente une très bonne stabilité thermodynamique, comparable avec les agents de contrastes commerciaux. En effet les stabilités des nos complexes sont situées dans la plage de valeurs admise pour les agents commerciaux, ($\log K_{GdL} = 16.85$ pour le Gd(DTPA-BMA), $\log K_{GdL} = 25.3$ pour le Gd(DOTA)¹⁷. La stabilité de nos complexes peut être rapprochée de celle du Gd(DTPA). Comme nous l'avons vu en introduction, cette stabilité est très importante du fait de la forte toxicité du gadolinium libre en milieu biologique^{18,19}.

Les différences de stabilité thermodynamique entre les complexes sont relativement faibles. Pour les complexes de $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ et de $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, la réduction de la denticité du ligand n'a pas d'influence sur la stabilité des complexes. Pour le $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, il y a une variation de la stabilité même si elle reste limitée ($\Delta p\text{Gd} = 0.7$). Entre ces différents ligands, la somme des pKa est relativement proche, puisque la basicité des groupements hydroxyles des hydroxyquinoléines et des phénols est relativement proche. Même si l'effet chélate est plus important dans un complexe comportant plus d'atomes donneurs, il est possible que la contribution des azotes des pyridines soit relativement limitée, et qu'elle n'ait de ce fait qu'une faible influence sur la stabilité. La différence ne devient sensible que lorsque deux contributions des pyridines sont supprimées. Ceci pourrait expliquer la proximité de stabilité entre les trois complexes.

Une autre propriété importante est la sélectivité de nos ligands par rapport à d'autres métaux. Même si de nombreux métaux existent en milieu biologique, le zinc est un des seuls qui présente des concentrations suffisantes en milieu biologique pour envisager une transmétallation et qui se retrouve sous forme libre (et non pas complexé par diverses protéines comme d'autres métaux) au sein des organismes. Le calcium est aussi un des cations endogènes présent en grande quantité mais il s'accommode d'un nombre de coordination moindre (CN = 6) et les liaisons ioniques sont privilégiées. Les différents azotes du ligand interviennent donc dans la coordination mais ne contribuent pas à sa stabilisation. De son côté le Zn(II) peut former des liaisons covalentes avec les azotes. C'est donc la stabilité des complexes de Zn(II) qu'il est nécessaire de tester. Dans le cas de nos ligands, nous avons obtenu une différence entre les deux constantes de complexation ΔpM de l'ordre de 5. Cette différence notable permet de conclure à une forte sélectivité de nos ligands en faveur du Gd(III).

De plus, la forte stabilité cinétique pour deux de ces ligands est un atout supplémentaire. En effet, malgré des stabilités thermodynamiques fortes, ces constantes ne rapportent pas forcément la cinétique du processus de transmétallation. Cette donnée est en effet difficile à anticiper et n'est pas corrélée avec la stabilité thermodynamique. Ainsi, R.N. Muller et al.²⁰ ont montré que le $[\text{Gd}(\text{BOPTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, qui ne présente qu'une légère modification de structure par rapport au $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$, subit la transmétallation vis-à-vis du Zn(II) (mesurée pour une diminution de relaxivité de 20%), 2.5 fois moins vite que le $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$. Cette étude montre également que les systèmes macrocyclique dérivés du DOTA sont bien moins sensibles à la transmétallation que des systèmes linéaires. La

grande inertie cinétique de nos complexes ainsi que la différence d'affinité observée entre le Gd(III) et le Zn(II) nous permet de conclure que des systèmes basés sur une plateforme macrocyclique comme le 1,4,7 triazacyclononane s'avèrent peu sensibles aux phénomènes de transmétallation.

1.3. Etude de la relaxivité des complexes

1.3.1. Relaxivité des complexes

1.3.1.1. [Gd(thqtcn-SO₃)]³⁻

La plupart des agents de contrastes utilisés cliniquement sont des complexes de Gd(III) mono hydratés. Il est donc normal que la plupart des recherches se concentrent sur l'optimisation de ces complexes, notamment en optimisant la vitesse d'échange de cette molécule d'eau et le temps de corrélation rotationnel de tels complexes. Cependant des exemples dans la littérature montrent qu'il est possible d'obtenir une relaxivité semblable à des complexes mono aqua par la présence de molécules d'eau en seconde sphère²¹. De plus, de fortes valeurs de relaxivités ont été obtenues pour des complexes comportant plusieurs groupements carboxylates libres²² ou des groupements dendritiques comportant des glucoses²³. L'interprétation de ces données a montré une forte contribution des molécules d'eau de seconde sphère. Cependant, les paramètres menant à une compréhension plus approfondie de la contribution de seconde sphère sont mal connus et il est toujours difficile d'évaluer a priori la contribution de la seconde sphère dans la relaxivité d'un composé donné. L'effet est cependant bien connu dans les composés où des groupements carboxylates ont été remplacés par des groupements phosphates²⁴⁻²⁶. Mais ces groupements phosphates induisent des effets électroniques défavorables à la relaxivité des complexes de gadolinium¹⁷

Dans ce contexte, les groupements quinoléines peuvent s'avérer intéressants dans l'optique d'une contribution de seconde sphère. En effet, la forte basicité des groupements hydroxyles peut permettre la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau environnantes, permettant de maintenir des molécules d'eau à proximité du centre métallique. En dépit de l'absence de molécule d'eau directement liée au centre métallique, le complexe de [Gd(thqtcn-SO₃)]³⁻ présente une relaxivité de 5.1 mM⁻¹s⁻¹ (20MHz) dans l'eau à pH = 7.4. Cette relaxivité est très inhabituelle pour un composé $q = 0$ et est comparable à celle des complexes mono hydratés. Elle est même supérieure à la relaxivité d'un complexe comme le

[Gd(DOTA)(H₂O)]⁻ (4.2 mM⁻¹s⁻¹). Les mesures de luminescences ont permis de confirmer l'absence de molécules d'eau en première sphère pour le complexe de [Gd(thqtcn-SO₃)]³⁻.⁴ Dans ce cas, la valeur de la relaxivité du complexe ne peut être due qu'aux contributions de sphère externe et de seconde sphère. L'analogie tris-picolinate, le [Gd(tpatcn)], également dépourvu de molécule d'eau en première sphère, présente une valeur de la relaxivité bien plus faible ($r_1 = 1.89 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ at 30 MHz). Dans ce complexe, la relaxivité n'est due qu'à la contribution de sphère externe. Même si les picolates et les hydroxyquinoléines ne présentent pas les mêmes propriétés de complexations, les complexes [Gd(thqtcn-SO₃)]³⁻ et [Gd(tpatcn)] présentent une architecture similaire et forment tous les deux des complexes rigides en solution. La valeur de la relaxivité du [Gd(tpatcn)] représente une bonne approximation de la contribution de sphère externe du [Gd(thqtcn-SO₃)]³⁻. Cette contribution de sphère externe très inférieure à la relaxivité du complexe, indique qu'une contribution de seconde sphère pourrait expliquer une valeur si élevée. Afin de déterminer plus précisément cette contribution, des études plus approfondies ont été menés sur ce complexe.

Comme nous venons de le noter, la relaxivité expérimentale r_{exp} des protons de l'eau H₂O est nettement plus élevée que la relaxivité attendue pour un complexe de Gd³⁺ sans molécule d'eau en sphère externe. Par exemple, dans une solution à pH = 7.37, à 35 MHz, $r_{\text{exp}} = 5.74 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ est trois fois supérieure à la valeur théorique $\cong 1.7 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ prédite par la théorie ABHF de relaxivité de sphère externe supposant une distance minimale d'approche Gd³⁺ - proton $a_{\text{GdH}} = 3.6 \text{ \AA}$ et négligeant les modestes effets de la relaxation électronique à cette fréquence. Dans la plupart des cas, un tel supplément de relaxivité est attribué à un mécanisme de seconde sphère, c'est-à-dire à la présence de molécules d'eau situées à proximité de l'ion Gd³⁺, liées temporairement à son ligand (par exemple via des liaisons hydrogène) et s'échangeant avec les molécules d'eau voisines de sphère externe. Les expressions théoriques des relaxivités r_1^{2S} et $r_{1\rho}^{2S}$ de seconde sphère sont analogues à celles de sphère interne, les paramètres q , r_H et τ_M étant remplacés par les paramètres prime q' , r'_H et τ'_M qui désignent respectivement le nombre effectif de molécules d'eau de seconde sphère, la distance effective des protons de ces molécules à Gd³⁺ et leur temps moyen de résidence avant échange. Toutefois, la liaison des molécules d'eau de seconde sphère au ligand étant labile, τ'_M est beaucoup plus court que τ_M et négligeable devant les temps de relaxation intramoléculaire T'_{1M} et $T'_{1\rho M}$. Par ailleurs, r_1^{2S} et $r_{1\rho}^{2S}$ dépendent de τ_r de la

même façon que leurs analogues de sphère interne. Il est donc souhaitable de mesurer τ_r avant d'estimer q' et r'_H .

Détermination de τ_r

Dans le cas d'un complexe sans molécule d'eau de sphère interne, la valeur de τ_r peut être obtenue directement à partir des temps de relaxation des spins de deutérium remplaçant des protons équivalents du ligand coordonnant un ion diamagnétique de terre rare comme Y^{3+} , La^{3+} ou Lu^{3+} qui a une chimie analogue à celle de Gd^{3+} . Les mesures de RMN sont simples, mais la synthèse du ligand partiellement deutéré peut s'avérer très onéreuse en réactifs. Pour éviter ce problème, nous utilisons une méthode alternative proposée par P. H. Fries et basée sur l'étude des temps de relaxation $T_1^{int ra}$ et $T_{1\rho}^{int ra}$ de protons d'un ligand non deutéré, ayant des raies bien séparées dans un complexe rigide LnL (L = ligand) avec Ln = Y^{3+} , La^{3+} ou Lu^{3+} . Pour cette étude, le complexe d' Y^{3+} a été choisi.

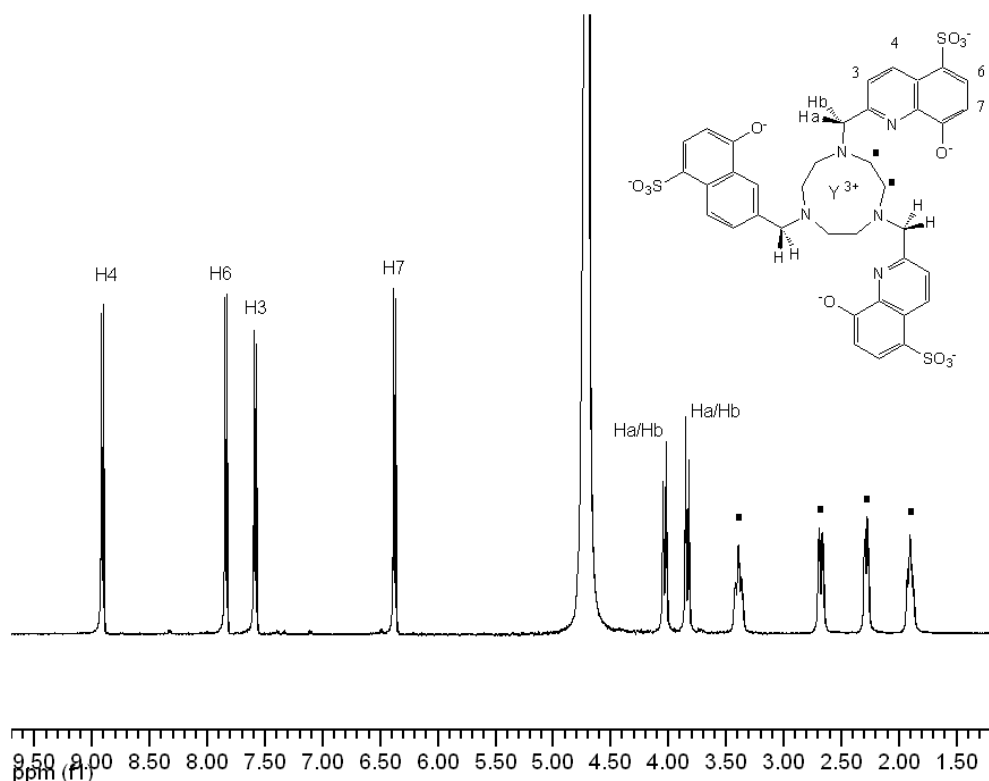


Figure 3.12 Spectre proton 1H $[Y(thqtcn-SO_3)]^{3-}$, D_2O , pD =7.4, 25°C, 500 MHz

Si on considère un tel complexe animé d'une rotation Brownienne de temps de corrélation τ_r , le proton $I = 1/2$ étudié est situé à des distances fixes r_k des protons voisins I_k entraînant sa

relaxation par interaction dipolaire magnétique intramoléculaire. Les temps de relaxation T_1^{intra} et $T_{1\rho}^{\text{intra}}$ de ce proton sont donnés par les expressions théoriques suivantes :

$$\text{Equation 3.1} \quad \left\{ \begin{array}{l} R_1^{\text{intra}} = 1/T_1^{\text{intra}} = \frac{2}{5} \gamma_I^4 \hbar^2 I(I+1) \sum_k \frac{1}{r_k^6} \tau_r \left[\frac{1}{1 + \omega_I^2 \tau_r^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_I^2 \tau_r^2} \right] \\ R_{1\rho}^{\text{intra}} = 1/T_{1\rho}^{\text{intra}} = \frac{1}{5} \gamma_I^4 \hbar^2 I(I+1) \sum_k \frac{1}{r_k^6} \tau_r \left[3 + \frac{5}{1 + \omega_I^2 \tau_r^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_I^2 \tau_r^2} \right] \end{array} \right.$$

Pris indépendamment, les temps de relaxation dépendent de la structure du ligand au travers du facteur $\sum_k \frac{1}{r_k^6}$. En revanche, sur un spectromètre standard opérant à une fréquence fixe $\nu_I = \omega_I/(2\pi)$, le quotient $T_1^{\text{intra}}/T_{1\rho}^{\text{intra}} = f(\omega_I, \tau_r)$ est une fraction qui dépend seulement du temps de corrélation rotationnelle τ_r . La valeur de τ_r est obtenue en résolvant numériquement l'équation $f(\omega_I, \tau_r) = T_{1\text{exp}}^{\text{intra}}/T_{1\rho\text{exp}}^{\text{intra}}$ où $T_{1\text{exp}}^{\text{intra}}$, $T_{1\rho\text{exp}}^{\text{intra}}$ sont les temps de relaxation expérimentaux déduits des temps de relaxation mesurés T_1 , $T_{1\rho}$ par les équations

$$\text{Equation 3.2} \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{T_{1\text{exp}}^{\text{intra}}} = \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_1^{\text{inter}}} \\ \frac{1}{T_{1\rho\text{exp}}^{\text{intra}}} = \frac{1}{T_{1\rho}} - \frac{1}{T_{1\rho}^{\text{inter}}} \end{array} \right.$$

$1/T_1^{\text{inter}}$, $1/T_{1\rho}^{\text{inter}}$ étant les petites contributions intermoléculaires aux vitesses de relaxation dues au dioxygène paramagnétique dissous et voisines de 0.05 s^{-1} dans une solution non dégazée. L'application de la méthode aux mesures de T_1 , $T_{1\rho}$ de protons de $[\text{Y}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ dans D_2O reportées dans le tableau 3.3 conduisent aux valeurs moyennes de $\tau_r = 667, 500, 360 \text{ ps}$ à respectivement $T = 278, 288, 298 \text{ K}$. La viscosité de D_2O vaut $\eta_{\text{D}_2\text{O}} = 1.987, 1.451, 1.100$ à ces températures successives. On vérifie que τ_r est proportionnel à $\eta_{\text{D}_2\text{O}}/T$ selon l'équation de Debye, Stokes, Einstein dans la mesure où les rapports $\tau_r(T)/\tau_r(298) = 1.39$,

1.85 respectivement à $T = 278, 288$ K sont en très bon accord avec les rapports $[\eta_{D_2O}(T)/\eta_{D_2O}(298\text{ K})](298/T) = 1.36, 1.94$ à ces températures.

D'après l'équation de Debye, Stokes, Einstein, le temps de corrélation rotationnelle τ_r dans H_2O à une température T peut se déduire de sa valeur dans $\tau_{r,D_2O}(298)$ dans D_2O à 298 K par l'équation

Equation 3.3
$$\tau_r = \tau_{r,D_2O}(298) \frac{\eta_{H_2O}(T)}{\eta_{D_2O}(298)} \frac{298}{T}$$

A 298 K, comme $\eta_{D_2O}/\eta_{H_2O} = 1.23$, on trouve $\tau_r = 293$ ps. Nous pouvons maintenant chercher à reproduire par la théorie la relaxivité expérimentale $r_{1\text{exp}} = 5.74 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ due à $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ à 35 MHz. Nous supposons que les molécules d'eau de seconde sphère se trouvent parmi les molécules de sphère externe dont les protons s'approchent le plus de Gd^{3+} , donc sont à la distance $r'_H = a_{\text{GdH}} = 3.6 \text{ \AA}$ de cet ion. Dans ce cas, la valeur $5.74 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ de $r_{1\text{exp}}$ est obtenue théoriquement pour $q' = 1.07$, ce qui semble une valeur effective raisonnable.

Néanmoins, pour vérifier la pertinence de notre modèle, nous avons mesuré $T_1, T_{1\rho}$ des protons de HOD sans $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ (voir tableau 3.4) et avec ce complexe (voir tableau 3.5) dans D_2O à hautes fréquences. Notons que la relaxivité longitudinale dans le référentiel tournant $r_{1\rho}$ associée à $T_{1\rho}$ est égale à la relaxivité transversale r_2 associée à T_2 . Les relaxivités expérimentales longitudinale r_1 et mélangée $r_{\text{mix}} \equiv (3/2)(r_{1\rho} - r_1/2)$ obtenues à partir de ces données sont présentées dans le tableau 3.6. L'application du modèle précédent à 298 K conduit à des valeurs théoriques $r_1 = 6.2, 4.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 200, 500 MHz nettement supérieures aux valeurs expérimentales correspondantes $3.9, 3.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Le désaccord avec l'expérience est encore plus flagrant dans le cas de r_{mix} qui, à 500 MHz, a une valeur théorique $7.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, non pas supérieure, mais presque deux fois plus petite que sa valeur expérimentale $13.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les différences importantes entre les prédictions théoriques et l'expérience, encore confirmées à 278 K, souligne l'inadéquation du modèle de sphère externe avec la contribution importante de mécanisme standard de seconde sphère. Il n'existe donc pas de théorie disponible capable d'interpréter les mesures de relaxivité due au $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$. D'une manière générale, la relaxivité des protons d'une espèce en solution est fonction de sa dynamique moléculaire par rapport à l'ion Gd^{3+} complexé. Compte tenu de la géométrie très anisotrope du complexe avec ses trois grandes « ailes » rigides et fortement hydrophobes

formées par les bi-cycles aromatiques des hydroxyquinoléines, il est intéressant d’approfondir l’étude de cette dynamique en étudiant la relaxivité de solutés sondes comme le méthanol MeOD, le t-butanol, *t*-BuOD et le p-dioxane dont la tendance à former des liaisons hydrogène décroît jusqu’à disparaître.

278 K	δ (ppm)	8.79	7.72	7.47	6.26						
	T_1 (s)	1.98	2.36	0.94	2.00						
	$T_{1\rho}$ (s)	0.66	0.77	9	0.67						
		5	4	-	7						
288 K	δ (ppm)	8.71	7.65	7.35	6.19						
	T_1 (s)	2.14	2.69	1.05	2.25						
	$T_{1\rho}$ (s)	0.58	0.63	0.23	0.54						
		7	4	7	2						
298 K	δ (ppm)	8.93	7.84	7.59	6.38	4.03	3.84	3.39	2.68	2.28	1.90
	T_1 (s)	2.07	2.41	1.03	2.02	0.35	0.29	0.20	0.25	0.24	0.27
	$T_{1\rho}$ (s)	0.88	1.05	0.52	0.84	1	5	6	7	0	7
		3		2	6	0.12	0.13	0.08	0.12	0.10	0.12
						9	3	1	5	4	0

Tableau 3.3. Temps de relaxation diamagnétique longitudinale T_1 et longitudinale dans le référentiel tournant $T_{1\rho}$ des protons du complexe $[\text{Y}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ dans D_2O à $T = 278, 288, 298 \text{ K}$, mesurés à 500 MHz . La concentration de $[\text{Y}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ est de 6.7 mM

- : difficulté de mesure due au recouvrement des pics.

Nous avons mesuré T_1 , $T_{1\rho}$ des protons de ces solutés sans $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ (voir tableau 3.4) et avec ce complexe (voir tableau 3.5) dans D_2O à hautes fréquences. Les relaxivités expérimentales longitudinales r_1 et mélangées $r_{\text{mix}} \equiv (3/2)(r_{1\rho} - r_1/2)$ obtenues à partir de ces données sont à nouveau présentées dans le tableau 3.6. Le résultat le plus frappant est la grande valeur du rapport $r_{\text{mix,exp}}/r_{1\text{exp}}$ qui varie entre 4 et presque 9 pour les protons de HOD et de toutes les sondes. Le modèle ABHF de sphère externe prédit des valeurs beaucoup plus petites, comprises entre 1.3 et 2.0, en utilisant les coefficients d’auto-diffusion mesurés et reportés dans le tableau 3.7 et des valeurs raisonnables de la distance minimale d’approche Gd

– proton de HOD ou du soluté sonde. Clairement, ce modèle ne représente pas la réalité de la dynamique moléculaire de sphère externe par rapport au complexe. Comme l’ont montré des simulations récentes, une dynamique moléculaire de sphère externe restreinte par les « ailes » hydroxyquinoléïnes et ralentie entre ces ailes est un mécanisme conduisant à un accroissement notable du rapport $r_{mix,exp}/r_{1exp}$ ²⁷. Le complexe $[Gd(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ est certainement un exemple de choix pour valider ce nouveau concept d’augmentation de la relaxivité, justifiant des études complémentaires de la relaxivité sur la plus large gamme possible de fréquences.

T (K)	T_{10} (s)			
	HOD	p-dioxane	MeOD	<i>t</i> -BuOD
278	7.53	2.95	5.26	1.22
298	12.4	4.84	8.05	2.35

Tableau 3.4. Temps de relaxation diamagnétique longitudinale T_{10} des protons de HOD et des solutés sondes p-dioxane, MeOD, *t*-BuOD mesurés à 500 MHz dans une solution dans D_2O à $T = 278$ et 298 K en l'absence de complexes de lanthanides, mais sans dégazage de l'oxygène paramagnétique dissous. La concentration de chaque soluté sonde est approximativement 200 mM

La bonne solubilité des complexes synthétisés dans ce travail nous a permis de mesurer la relaxivité sans avoir recours au dégazage, en préparant des solutions de complexes de Gd^{3+} à des concentrations supérieures à 2-3 mM. En effet, l’augmentation paramagnétique de relaxation R_{1p} (s^{-1}) induite par ces complexes est alors typiquement 50 à 100 fois supérieure à la contribution $R_1(O_2)$ qui est due à l’oxygène dissous et peut être négligée. Pour une solution diamagnétique particulière, la valeur de $R_1(O_2)$, variant légèrement autour de $0.05 s^{-1}$ selon la concentration aléatoire en oxygène, est donnée par la différence entre R_{10} avant et après dégazage. Notons que les mouvements des petites molécules considérées sont rapides de sorte que l’approximation du régime de rétrécissement extrême de la relaxation s’applique et conduit à la simplification $T_{1,\rho_0} \cong T_{10}$.

ν_I (MHz)	T (K)		HOD	p-dioxane	MeOD	tBuOD
200	298	T_1 (ms)	68.2	57.7	84.7	59.1
500	278	T_1 (ms)	56.7	69.1	79.5	99.5
		$T_{1\rho}$ (ms)	19.3	16.3	21.7	17.1
500	298	T_1 (ms)	82.8	80.6	105.2	91.0
		$T_{1\rho}$ (ms)	25.9	23.2	29.9	23.4

Tableau 3.5 Temps de relaxation longitudinale T_1 et longitudinale dans le référentiel tournant $T_{1\rho}$ des protons de HOD et des solutés sondes p-dioxane, MeOD, t-BuOD mesurés à $\nu_I = 200$ MHz, $T = 278$ K et $\nu_I = 500$ MHz, $T = 278, 298$ K dans une solution dans D_2O contenant 3.7 mM de complexe paramagnétique $[Gd(thqtcn-SO_3)]^{3-}$. La concentration de chaque soluté sonde est approximativement de 100 mM

ν_I (MHz)	T (K)		HOD	p-dioxane	MeOD	tBuOD
200	298	r_{1exp} ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	3.9	4.6	3.1	4.4
500	278	r_{1exp} ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	4.7	3.8	3.3	2.5
		r_{mix} ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	17.3	21.7	16.0	21.4
500	298	r_{1exp} ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	3.2	3.3	2.5	2.8
		r_{mix} ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	13.1	14.8	11.5	14.9

Tableau 3.6 Valeurs expérimentales des relaxivités longitudinale r_{1exp} et mélangée r_{mix} des protons de HOD et des solutés sondes p-dioxane, MeOD, t-BuOD dues au complexe $[Gd(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ à $\nu_I = 200$ MHz, $T = 278$ K et $\nu_I = 500$ MHz, $T = 278, 298$ K dans une solution dans D_2O

La mesure de D_x^1 de HOD et des solutés sondes a été réalisée dans une solution dans D_2O contenant, d'une part, les trois solutés, chacun à une concentration voisine de 200 mM et, d'autre part, 0.5 mM de Gd^{3+} paramagnétique (solution de $GdCl_3$) pour raccourcir entre 0.1 et 1 s environ les temps de relaxation T_1 des protons des espèces diffusantes de manière à augmenter la fréquence d'accumulation des signaux RMN et réduire les durées d'expérience à

la dizaine de minutes. La mesure de D_X^t de $[Y(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ a bien sûr été réalisée sans Gd^{3+} pouvant remplacer Y^{3+} , ce qui n'est pas pénalisant puisque les temps de relaxation diamagnétique (intramoléculaire) T_{10} des protons de ce complexe sont déjà courts.

T (K)	$D_X^t (\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1})$				
	HOD	p-dioxane	MeOD	<i>t</i> -BuOD	YthqtcnSO ₃
278	0.85	0.41	0.57	0.30	0.163
298	1.70	0.77	1.12	0.65	0.285

Tableau 3.7 Coefficients d'auto-diffusion D_X^t de l'espèce X = solvant HOD, soluté sonde p-dioxane, MeOD, *t*-BuOD et complexe $[Y(\text{thqtcnSO}_3)]^{3-}$ dans D_2O à $T = 278$ et 298 K, mesurés à 500 MHz par une méthode d'échos de spin en présence de gradients pulsés de champ magnétique d'intensité variable

Dépendance au pH

En plus de cette relaxivité de seconde sphère inhabituelle décrite précédemment, la valeur de la relaxivité de notre complexe varie également avec le pH. Si un mécanisme classique de seconde sphère ne suffit pas à expliquer la relaxivité à $\text{pH} = 7.4$, l'hypothèse la plus probable pour expliquer l'augmentation de la relaxivité à pH acide reste la protonation des groupements hydroxyles des hydroxyquinoléines.

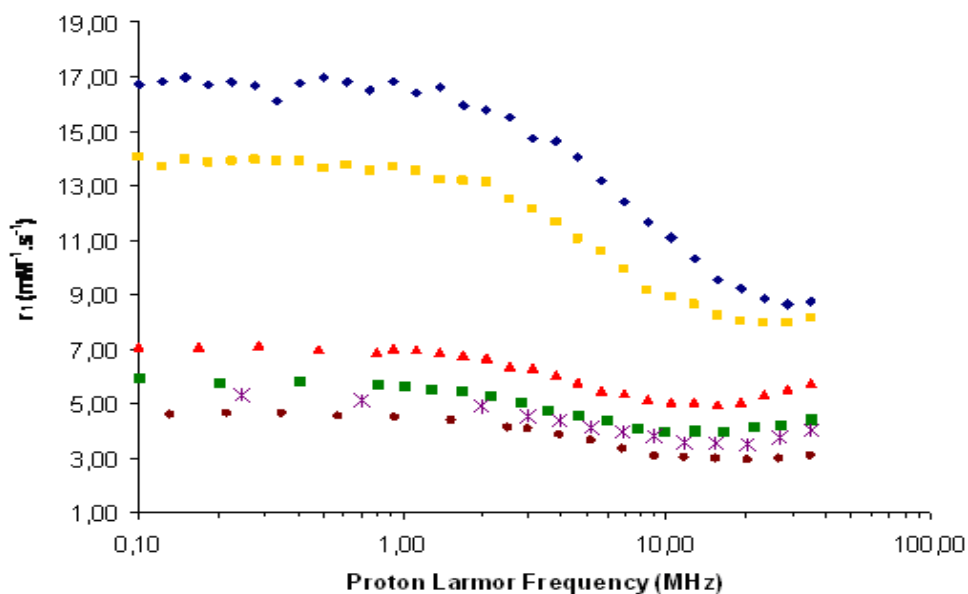


Figure 3.13 Profils NMRD du $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ dans l'eau à pH 3.5(♦), 5.9(■), 7.4(▲), 8.5(■), 9.0 (*), 11.2(●)

Si la variation de la relaxivité en fonction du pH confirme l'hypothèse d'une contribution de seconde sphère favorisée par la protonation des hydroxyles à pH acide, elle permet également de confirmer l'hypothèse d'une contribution de seconde sphère inhabituelle comme décrite précédemment. En effet, si la protonation des hydroxyles était responsable de la relaxivité à pH = 7.4, les mesures de relaxivité à des pH plus élevés conduiraient à retrouver une valeur de relaxivité très faible uniquement due à la contribution de sphère externe, ce que ne montrent pas les profils NMRD mesurés à pH élevés. Cette propriété peut également être un avantage pour notre complexe. En effet, au cours des années, plusieurs sondes magnétiques sensibles aux changements de pH se sont développées²⁸⁻³⁰. Le but de ces sondes sensibles au pH est notamment de détecter et d'anticiper le développement de cellule cancéreuse. En effet, dans le cas de certaines tumeurs, le pH extracellulaire (pHe) est légèrement plus acide que la valeur du pH physiologique normal (7.4). De plus, des études ont montré qu'un pHe acide favorisait le développement des cellules cancéreuses³¹. Le repérage de zone présentant un pH acide peut ainsi être un outil de détection de certaines cellules cancéreuses.

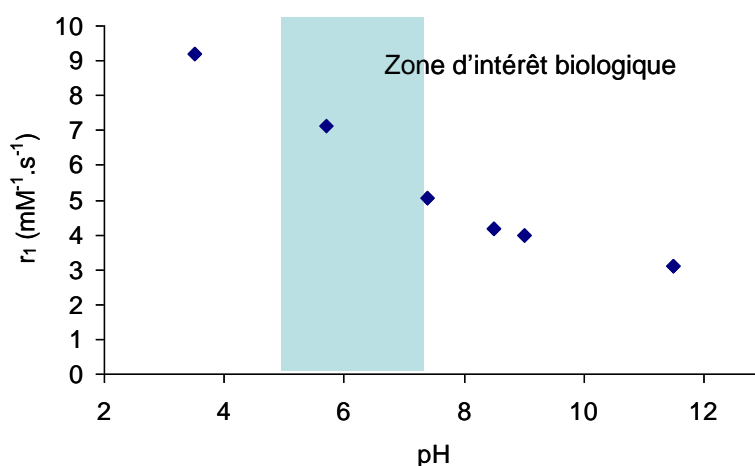


Figure 3.14 Relaxivité du complexe $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ en fonction du pH, dans l'eau à 20 MHz

Pour le développement de ce type de sonde, la variation de la relaxivité avec le pH doit être particulièrement importante dans la zone s'étalant de pH = 5 à pH = 7.4. En effet, l'acidité du milieu intercellulaire des tumeurs ne descend jamais en dessous de pH = 5 et la valeur moyenne du pH se situe autour de 6.8. Pour notre complexe la variation de relaxivité entre pH = 5.9 et 7.4 de $2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ représente un écart suffisamment important pour envisager un tel développement pour ce complexe. Plusieurs solutions pour développer un agent de contraste sensible au pH sont possibles. Il s'agit de faire varier en fonction du pH l'un des paramètres

influençant la relaxivité, à savoir le nombre de molécules d'eau en première sphère, la vitesse d'échange k_{ex} , ou le temps de corrélation rotationnel du complexe τ_R . Le $[\text{Gd}(\text{DOTA-4Amp})(\text{H}_2\text{O})]^{5-}$ est un exemple de complexe qui a été utilisé au sein de tissu biologique. Aux pH inférieurs à 8 la protonation des groupements phosphonates a lieu. Ceux-ci peuvent alors interagir via une liaison hydrogène avec la molécule d'eau coordonnée au gadolinium. Cette interaction catalyse l'échange de protons fortement relaxés par le gadolinium avec les protons de l'eau environnante, ce qui a un effet similaire à une accélération de la vitesse d'échange k_{ex} quand le pH descend. L'écart de relaxivité²⁸ entre pH = 8 et pH = 6 est d'environ $1.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, ce qui est comparable à la variation de relaxivité obtenue avec notre complexe.

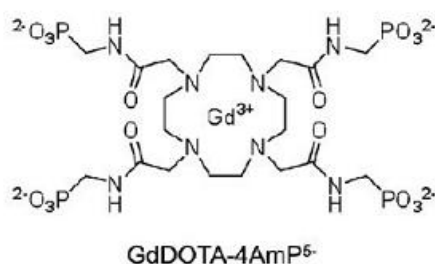


Figure 3.15 Complexe $[\text{GdDOTA-4Amp}]^{5-}$

1.3.1.2. $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$

Les résultats encourageants obtenus pour les complexes de $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ nous ont donc orientés vers la synthèse de complexes mono et bis hydratés dérivés du $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$. Des mesures de relaxivité à pH = 7.4 des deux complexes ont montré une différence de relaxivité entre les complexes de $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, mais pas dans le sens attendu. En effet, en comparant des deux profils NMRD, mesurés entre 0,03 et 35 MHz, le complexe mono hydraté se révèle plus performant que son analogue bis hydraté. Notons toutefois que les valeurs de relaxivités obtenues pour le $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ semblent cohérentes pour un complexe présentant deux molécules d'eau en première sphère de coordination ($r_1 = 7.34 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20MHz). Ces performances modestes ne justifient pas d'interpréter la relaxivité de manière approfondie. En revanche, nous nous focalisons maintenant sur les valeurs du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ qui semblent très élevées pour un complexe mono hydraté ($r_1 = 9.14 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20MHz). En comparaison, le $[\text{Gd}(\text{DOTA})]$ présente une relaxivité plus de deux fois inférieure ($r_1 = 4.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

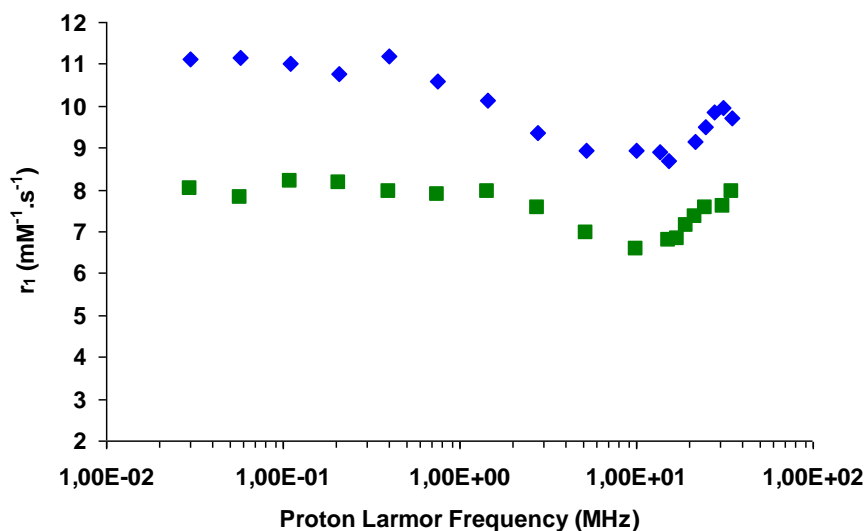


Figure 3.16 Profils NMRD du [Gd(dhqtcn-SO₃)(H₂O)] (♦) et du [Gd(hqtcn-SO₃)(H₂O)₂] (■) dans l'eau à pH 7.4

Pour tenter de comprendre ces valeurs, nous allons maintenant présenter une série d'études à hauts champs, où l'influence de la relaxation électronique est plus faible voire négligeable de sorte que la relaxivité est bien plus facile à modéliser³²⁻³⁴. Dans un premier temps, le maximum local obtenu sur le profil NMRD nous indique un temps de corrélation rotationnel τ_R relativement long^{17,35}. Pour confirmer cette hypothèse, les temps de relaxation des protons du complexes [Y(dhqtcn-SO₃)]³⁻ ont été mesurés à 25°C et 500MHz.

Relaxation longitudinale dipolaire entre les protons du complexe [Y(dhqtcn-SO₃)(D₂O)]³⁻

Cette nouvelle méthode a été développée par le Dr. Pascal H. Fries pour la détermination du temps de corrélation rotationnel.

Le temps de relaxation d'un proton déterminé I du ligand H₃dhqtcnSO₃ du à un autre proton localisé sur ce même ligand à une distance connue d_{HH} de I est donné par³⁶ :

$$\text{Equation 3.4} \quad \frac{1}{T_{1HH}} = \frac{2}{5} \frac{\gamma_I^4 \hbar^2}{d_{HH}^6} I(I+1) \tau_r \left[\frac{1}{1 + (\omega_I \tau_r)^2} + \frac{4}{1 + 4(\omega_I \tau_r)^2} \right]$$

Dans la plupart des complexes de lanthanides (III), la flexibilité des ligands polyaminocarboxylates fait que chaque proton a plusieurs voisins et que la distance entre ces protons est mal définie. A l'opposé, le ligand H₃dhqtcn-SO₃ présente une rigidité particulière

due à la présence de cycles aromatiques. Les protons portés par ces cycles sont à une distance bien définie des protons voisins et sont suffisamment éloignés des autres protons du ligand. En reprenant l'équation 3.4, ces protons peuvent donc aisément servir à mesurer τ_r .

Ces mesures de T_1 permettent de confirmer l'hypothèse d'un τ_R relativement long. En reportant ces temps de relaxations, l'équation 3.4 permet d'évaluer une valeur $\tau_R = 320$ ps (dans D_2O , soit 258 ps dans H_2O). Cette valeur est environ trois fois supérieure à la valeur reportée pour le $Gd(DOTA)$ ($\tau_R = 83$ ps)^{20,37}. L'allongement important du temps de corrélation rotationnel τ_R est la principale raison de l'augmentation de relaxivité du complexe de $[Gd(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$. Un complexe de $Gd(III)$ 1,2-HOPO mono hydraté présentant une relaxivité élevée liée à un τ_R inhabituellement long existe dans la littérature ($r_1 = 8.2$ $mM^{-1} \cdot s^{-1}$, 20MHz)³⁸.

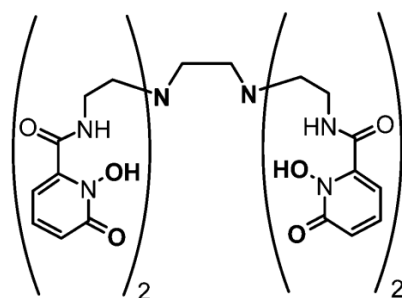


Figure 3.17 Ligand H(2,2)-1,2-HOPO

Le τ_R long de notre complexe peut s'expliquer par une masse moléculaire importante du complexe ($MW = 959$ $g \cdot mol^{-1}$). Les complexes commerciaux, qui présentent des τ_R beaucoup plus courts, ont des masses molaires comprises entre 450 et 600 $g \cdot mol^{-1}$. Le complexe de $Gd(III)$ 1,2-HOPO mono hydraté est lui bien plus gros et atteint une masse molaire de 952 $g \cdot mol^{-1}$, comparable à celle de notre complexe. Cependant, l'augmentation de la masse du complexe n'est pas l'unique raison de l'allongement du temps de corrélation rotationnel, mais la rigidité du complexe est aussi importante. La rotation d'une petite molécule est souvent supposée isotrope et cela représente une bonne approximation. Cependant, cela n'est pas toujours valable pour une molécule plus grosse des mouvements au sein même de la structure de la molécule vont induire une baisse du temps effectif de corrélation rotationnel par rapport à celui évalué à partir de la masse molaire pour une rotation isotrope. Comme le confirme l'étude des spectres RMN (voir § 1.2.1.2.), les complexes de $[Nd(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$ et de $[Y(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$ ont des structures parfaitement figées en solution. Cette rigidité,

alliée à la masse élevée du complexe, explique la valeur de τ_R particulièrement longue obtenue.

Pour les complexes $[\text{Ln}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, le manque de rigidité du complexe a été souligné par le spectre du $[\text{Nd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ qui montrait une espèce particulièrement flexible. L'absence de spectre parfaitement défini pour ce complexe ne nous a pas permis de déterminer le τ_R par la méthode précédemment décrite. Si le complexe $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ présente une valeur de relaxivité ($r_1 = 7.34 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20MHz) en accord avec un complexe bis hydraté, cette valeur reste inférieure à celle de l'analogue mono hydraté $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ ($r_1 = 9.14 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, 20MHz). Pourtant les masses molaires des deux complexes sont relativement proches ($926 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ contre $959 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour le $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$). Cette faible différence ne suffit pas à expliquer l'écart de relaxivité entre les deux complexes. Le manque de rigidité du $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ pourrait être une des raisons pour expliquer cette valeur de relaxivité. Les différents mouvements internes à la molécule, à la fois l'inversion de la torsion du cycle triazacyclononane et l'inversion de l'hélicité des bras pourraient être responsable d'une diminution du temps de corrélation rotationnel globale du complexe, entraînant une baisse de la relaxivité par rapport à une espèce rigide.

La seconde étape de l'étude du complexe de $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ a consisté à déterminer la vitesse d'échange k_{ex} de la molécules d'eau de sa première sphère de coordination pour comprendre son influence sur la relaxivité du complexe. La méthode employée repose sur la relaxivité de l' ^{17}O de l'eau en fonction de la température.

Mesure de relaxivité de l' ^{17}O

En suivant les procédures standards,³⁹⁻⁴¹ nous avons calculé la vitesse de relaxation transverse réduite expérimentale $1/T_{2r}$ à partir des valeurs $1/T_2$ and $1/T_{2a}$ des vitesses de relaxations transversales de l' ^{17}O respectivement d'une solution paramagnétique de notre complexe de Gd(III) et d'une solution acide de référence (a) sans complexe. La vitesse de relaxation transversale $1/T_{2r}$ est donnée par l'équation 3.5.

$$\text{Equation 3.5} \quad \frac{1}{T_{2r}} = \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2a}} \right) / (1.8 \times 10^{-5} q)$$

Le lien avec le temps de résidence de l'eau τ_m est donné par l'équation 3.6 due à Swift et Connick⁴² :

$$\text{Equation 3.6} \quad \frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + (\Delta\omega_m)^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + (\Delta\omega_m)^2}$$

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

$$\text{Equation 3.7} \quad \Delta\omega_m = \frac{g_S \mu_B S(S+1) B_0}{3k_B T} \frac{A}{\hbar}$$

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

$$\text{Equation 3.8} \quad 1/T_{2m} \cong \frac{1}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \left(\frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1e}} \right)$$

Avec $1/T_{1e}$ représentant la vitesse de relaxation longitudinal du spin électronique du Gd³⁺. La dépendance en température de la vitesse d'échange de l'eau $k_{ex} = 1/\tau_m$ suit la loi d'Arrhenius :

$$\text{Equation 3.9} \quad k_{ex} \cong 1/\tau_m = k_{ex}^{298} (T/298.15) \exp \left[\frac{\Delta H^+}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right]$$

où k_{ex}^{298} est la vitesse d'échange à 298.15 K et ΔH^+ est l'enthalpie d'activation du processus d'échange. A des valeurs de champs $B_0 \geq 4.7$ T, il est à noter que les effets de la relaxation du spin électronique S sur $1/T_{2m}$ sont simplement pris en compte par la vitesse de relaxation électronique $1/T_{1e}$ donnée par l'équation de McLachlan :

$$\text{Equation 3.10} \quad \frac{1}{T_{1e}} = \frac{12}{5} \Delta_T^2 \tau_v \left(\frac{1}{1 + (\omega_S \tau_v)^2} + \frac{4}{1 + 4(\omega_S \tau_v)^2} \right)$$

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

Equation 3.11
$$\tau_v = \tau_v^{298} \sqrt{\frac{298.15}{T}}$$

et correspond à la variation avec la température de la fréquence du "bombardement" du complexe par les molécules d'eau, telle qu'elle est donnée par l'inverse de leur vitesse de Maxwell moyenne.⁴³ Nous supposons donc que τ_v suit la loi de Maxwell de l'équation 3.11 de façon à réduire le nombre de paramètre à fitter. Enfin, il est nécessaire de souligner que l'Hamiltonien du zero-field splitting statique (ZFS), qui gouverne à la fois la relaxation transversale et longitudinale de S à bas champ, a une influence décroissante sur la relaxivité longitudinale à mesure que le champ augmente.⁴⁴ Cette simplification justifie la précision de l'équation 3.10 pour calculer $1/T_{1e}$.

parameters	[Gd(dhqtcn-SO ₃)(H ₂ O)]
ΔH^+ [kJ/mol]	23
k_{ex}^{298} [10^6 s^{-1}]	10-50
τ_r^{298} [ps]	258 ^a
τ_v^{298} [ps]	1-3
A/\hbar [10^6 rad/s]	-1.6
q	1
Δ_T [$10^{10} \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$]	0.43
r_H [Å]	3.2

Tableau 3.7 Paramètres utilisés pour les fits des données de relaxivité en accord avec la théorie. ^a paramètre obtenu du traitement des données du complexe [Y(dhqtcn-SO₃)(H₂O)]³⁻

A partir de la théorie exposée ci-dessus, la dépendance en température de τ_m des molécules d'eau coordonnées au Gd^{3+} est déduite du fit des vitesses de relaxations transverses réduites $1/T_{2r}$ et se caractérise par une valeur assez courte de $\tau_m^{298} \cong 20$ à 100 ns à 298 K et d'une enthalpie d'activation $\Delta H^+ \cong 23 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. L'ensemble des paramètres utilisés pour le fit sont rappelés dans le tableau 3.7.

Mesures de relaxivité à haut champ

Les relaxivités expérimentales longitudinales r_1 et longitudinales dans le repère tournant $r_{1\rho}$ des protons de l'eau de spin $I = 1/2$ représentent l'augmentation de la vitesse de relaxation longitudinale et de la vitesse de relaxation longitudinale dans le repère tournant par millimole de complexe de Gd^{3+} . Dans une solution paramagnétique de complexe de Gd^{3+} de concentration c_{Gd} (mM), les vitesses de relaxations $1/T_\alpha$ ($\alpha = 1, 1\rho$) et les relaxivités expérimentales r_α sont liées par l'équation 3.12.

Equation 3.12
$$r_\alpha = (1/T_\alpha - 1/T_{\alpha 0}) / c_{\text{Gd}} \quad (\alpha = 1, 1\rho)$$

Où $1/T_{\alpha 0}$ est la vitesse de relaxation dans la solution diamagnétique sans complexe. La relaxivité mesurée est attribuée^{40,45} à la somme des contributions de sphère externe (OS) des molécules d'eau libre à proximité du complexe et de sphère interne (IS) des molécules d'eau directement coordonnées au centre métallique et qui s'échange au cours du temps avec l'eau du solvant. La relaxivité est alors définie par l'équation 3.13

Equation 3.13
$$r_\alpha = r_\alpha^{\text{OS}} + r_\alpha^{\text{IS}} \quad (\alpha = 1, 1\rho)$$

En prenant $g_S \cong 2$ pour le facteur de Landé du spin électronique $S = 7/2$ du Gd^{3+} , les relaxivités théoriques dépendent des rapports giromagnétiques γ_I et $\gamma_S \equiv -g_S \mu_B / \hbar$ dus à l'interaction des spins I et S à travers un couplage magnétique dipôle-dipôle, défini par le facteur de couplage $C_{DD} \equiv (8\pi/5) \gamma_I^2 \mu_{\text{eff}}^2$, dans lequel $\mu_{\text{eff}} \equiv g_S \mu_B \sqrt{S(S+1)}$ est le moment magnétique effectif du Gd^{3+} . Les relaxivités théoriques dépendent aussi du champ magnétique B_0 , en particulier à travers les fréquences de Larmor angulaires des

spins $\omega_I = 2\pi\nu_I \equiv -\gamma_I B_0$, $\omega_S \equiv -\gamma_S B_0$. Ici, nous nous intéressons à la théorie pour des relaxivités à haut champ, $B_0 \geq 1.5$ T, où la relaxation S du spin électronique a des effets négligeable sur la relaxivité des protons de l'eau, ce qui permet de simplifier les expressions théoriques de la relaxation^{44,46,47}.

Relaxivités de sphère externe

Le modèle postulé pour la dynamique de sphère externe suppose que le proton considéré et l'ion Gd^{3+} soient au centre de sphères dures. Le diamètre de collision de ces sphères est noté a_{GdH} et le coefficient de diffusion relatif $D = D_{GdL} + D_{water}$, où D_{GdL} et D_{water} sont respectivement les coefficients de diffusion du complexe de Gd^{3+} et de l'eau. $\tau \equiv a_{GdH}^2 / D$ est défini comme le temps de corrélation rotationnel pour ce modèle de sphère externe. Par la suite, la relaxivité de sphère externe peut être exprimé suivant la densité spectrale définie par Ayant, Belorizky, Hwang, et Freed (ABHF)^{48,49} $j_{2c}^{OS}(\sigma)$ de l'argument complexe σ donné par l'équation 3.14.

$$\text{Equation 3.14} \quad j_{2c}^{OS}(\sigma) = \frac{10^{-6} N_{Avogadro}}{a_{GdH} D} \text{Real Part} \left[\frac{4+k}{3(9+9k+4k^2+k^3)} \right] \text{ with } k \equiv \sqrt{\sigma\tau}$$

La relaxivité de sphère externe est alors donnée par les équations 3.15 et 3.16

$$\text{Equation 3.15} \quad r_1^{OS} = C_{DD} j_{2c}^{OS}(i\omega_I)$$

$$\text{Equation 3.16} \quad r_{1\rho}^{OS} = C_{DD} \left[\frac{2}{3} j_{2c}^{OS}(0) + \frac{1}{2} j_{2c}^{OS}(i\omega_I) \right]$$

Dans notre cas, des estimation raisonnables de la relaxivité de sphère externe ont été obtenues en fixant la paramètre $a_{GdH} = 3.6$ Å, et en utilisant un coefficient de diffusion de l'eau $D_{water} = 2.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 298 K, et en supposant que le coefficient de diffusion du complexe de Gd^{3+} de petite taille est environ $D_{GdL} \cong 0.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 298 K.

Relaxivité de sphère interne.

En premier lieu, la relaxivité de sphère interne est proportionnelle au nombre de molécules d'eau q directement liées au centre métallique. Ensuite, cette valeur varie rapidement (en $1/r_H^6$) avec la distance moyenne $r_H = 3.1 \pm 0.1 \text{ \AA}$ entre l'ion Gd^{3+} et les protons des molécules d'eau coordonnées⁵⁰. Enfin, et parce que les complexes de Gd^{3+} sont considérés comme ayant une forme sphérique, la relaxivité de sphère interne dépend également du mouvement de rotation Brownien au travers du temps de corrélation rotationnel τ_r . De plus la relaxivité décroît avec le temps de résidence des molécules d'eau de première sphère τ_m . L'équation 3.17 donne l'expression de la relaxivité de sphère interne^{40,45}.

$$\text{Equation 3.17} \quad r_\alpha^{IS} = 1.8 \times 10^{-5} q / (T_{\alpha m} + \tau_m) \quad (\alpha = 1, 1\rho)$$

Où le facteur 1.8×10^{-5} est le rapport entre le nombre de molécules de complexe et le nombre de molécules d'eau dans 1 millimole de solution du complexe et $T_{\alpha m}$ est le temps de relaxation intramoléculaire des protons des molécules d'eau liés hypothétiquement de façon permanente au centre métallique. $T_{\alpha m}$ peut être exprimé par les équations 3.18 et 3.19 de la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) à haut champ.

$$\text{Equation 3.18} \quad \frac{1}{T_{1m}} = C_{DD} \frac{1}{4\pi r_H^6} \frac{\tau_r}{1 + \omega_I^2 \tau_r^2}$$

$$\text{Equation 3.19} \quad \frac{1}{T_{1\rho m}} = C_{DD} \frac{\tau_r}{4\pi r_H^6} \left[\frac{2}{3} + \frac{1}{2} \frac{1}{1 + \omega_I^2 \tau_r^2} \right]$$

Les mesures de vitesse de relaxation transverse réduite $1/T_{2r}$ de 1^{17}O de l'eau ont permis de déterminer la dépendance à la température du temps de résidence τ_m des molécules d'eau coordonnées au Gd^{3+} et donc de déterminer sa valeur à 298 K. Les mesures de temps de relaxation des protons du ligand dans le complexe d' $[\text{Y}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ ont permis d'accéder, à partir de l'équation 3.4, à la valeur du temps de corrélation rotationnel τ_r . Ces paramètres étant déterminés, il est possible de calculer les valeurs théoriques de relaxivités pour le complexe de $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 3.8 ainsi que les valeurs de relaxivités obtenues expérimentalement.

D ₂ O (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Champ	
	200 MHz	500 MHz
r ₁ ^{IS} théo	6.7	4.0
r ₁ ^{OS} théo	1.8	1.6
r ₁ théo	8.5	5.6
r _{1ρ} théo	11.0	9.6
r ₁ exp	7.1	4.8
r _{1ρ} exp	11.7	10.8

Tableau 3.8 Relaxivités théorique de sphère interne (IS) et de sphère externe (OS) calculées et relaxivités expérimentales.

En utilisant les paramètres précédemment déterminés (τ_m, τ_r) et en fixant la distance entre le proton de la molécule d'eau et l'ion Gd³⁺ $r_H = 3.2 \text{ \AA}$, les valeurs théoriques calculées à 298K sont une bonne approximation des valeurs obtenues expérimentalement. Il est à noter que la valeur un peu grande, mais certes raisonnable⁵⁰, de la distance gadolinium proton, indique que la molécule d'eau est à une distance un peu plus grande de l'ion Gd³⁺ que dans la plupart des complexes. Cette observation est cohérente avec la valeur obtenue pour la constante de couplage scalaire $|A/\hbar|$ qui est inférieure à la valeur couramment admise ($\cong 3.8 \times 10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) pour la plupart des complexes^{38,40}. Cependant, des valeurs plus faibles de cette constante ont déjà été rapporté ($|A/\hbar| = 2.1 \times 10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) pour un nouveau type de complexe (figure 3.18)³.

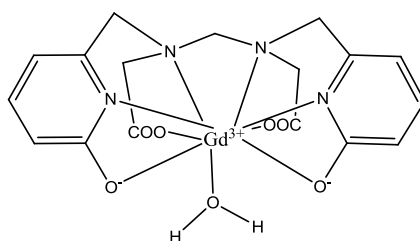


Figure 3.18 Complexe de Gd(III) présentant une valeur de $|A/\hbar| = 2.1 \times 10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$

Les expériences réalisées à haut champ montrent une forte diminution de la relaxivité au fur et à mesure que le champ augmente. Ainsi entre 200 MHz et 500MHz, la valeur de r_1 mesurée expérimentalement passe de $7.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à $4.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Cette forte diminution à haut champ est en accord avec l'allure du profil NMRD, qui montre une légère bosse à 30MHz, indiquant

un complexe ayant une dynamique de rotation lente en solution. En effet, la dépendance en ω_I^{-2} de $1/T_{1m}$ (équation 3.18) conduit à réduire l'influence de τ_r sur la relaxivité à mesure que la valeur du champ augmente. La chute de la relaxivité à haut champ est donc d'autant plus rapide que la valeur du temps de corrélation rotationnel est grande, ce qui est confirmé par les résultats à la fois expérimentaux et théoriques dans le cas de notre complexe.

1.3.2. Influence des anions endogènes sur la relaxivité

L'augmentation du nombre de molécules d'eau directement liées au centre métallique en première sphère est obtenue en réduisant la denticité du ligand. Cependant il est possible de former des complexes ternaires avec les anions endogènes présents dans le milieu biologique et la coordination diminuée du ligand peut faciliter la complexation des lanthanides par les anions, qui remplacent partiellement ou totalement les molécules d'eau en première sphère, diminuant de fait la relaxivité du complexe. Pour étudier l'effet des anions, des mesures de relaxivités des complexes $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ ont été effectuées en présence de 200 équivalents de différentes solutions d'anions. Ces concentrations en anions ne sont pas représentatives des concentrations présentes en milieu biologique mais sont utilisées couramment dans la littérature et nous avons repris ces mêmes concentrations afin de pouvoir établir des comparaisons entre nos résultats et les valeurs de relaxivités déjà publiées. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3.9.

	$[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$		$[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$	
	r_1 ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	Δr_1 ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	r_1 ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	Δr_1 ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
H ₂ O	5.84		6.24	
Carbonates	5.63	0.21	3.24	3.00
Oxalates	3.96	1.88	1.00	5.24
Phosphates	4.90	0.94	-	

Tableau 3.9 Relaxivités longitudinales des complexes dans l'eau à pH = 7.4, 25°C, mesurées à 200MHz, 200 équivalents d'anions. $\Delta r_1 = r_{1\text{H}_2\text{O}} - r_{1\text{anions}}$

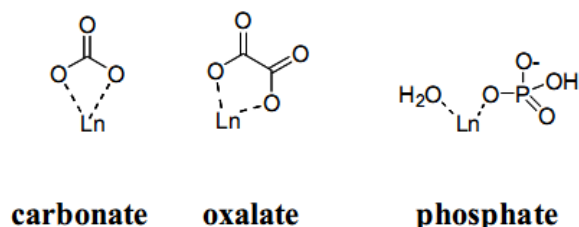


Figure 3.19 Mode de liaisons de plusieurs anions avec les lanthanides⁵¹



La diminution de relaxivité observé pour le complexe [Gd(dhqtcn-SO₃)(H₂O)]³⁻ est variable en fonction de l'anion utilisé. Si la relaxivité reste quasiment constante en présence de carbonates, on observe une sensible diminution pour les ions oxalates et phosphates. Les ions phosphates ont un mode de coordination monodentate et peuvent donc interagir avec le complexe. L'interaction obtenue avec les oxalates est moins attendue, puisque le mode de coordination classique des oxalates est bidentate. Cependant, sa configuration, avec les deux oxygènes assez distants, pourrait également autoriser la coordination d'un de ces deux oxygènes de façon monodentate. La proximité des oxygènes dans le carbonate n'autoriserait pas ce mode de coordination et expliquerait que ces derniers n'interagissent pas avec le complexe.

La contribution de sphère interne est évaluée à $r_1^{IS} = 6.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans D₂O et celle de sphère externe $r_1^{OS} = 1.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui donne, en corrigeant ces valeurs par la variation de viscosité entre l'eau et D₂O, $r_1^{IS} = 5.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $r_1^{OS} = 1.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau. A partir de ces valeurs théoriques et de la valeur de la relaxivité expérimentale mesuré dans l'eau à 200MHz, on peut approximer la contribution de sphère interne $r_1^{IS} = 4.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et celle de sphère externe $r_1^{OS} = 1.21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. A partir de ces valeurs il est possible d'évaluer la relaxivité des complexes ternaires, en supposant que, par leur petite taille, les anions ne modifient pas la dynamique du complexe, et que l'influence des protons échangeables des anions (phosphates) peut être négligée.

$$r_1 = r_1^{IS} \times q^{(b)} + r_1^{OS}$$

Où $q^{(b)}$ est le nombre de molécule d'eau en première sphère du complexe ternaire.

Le remplacement totale de la molécule d'eau du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ conduirait donc à une relaxivité de $1.23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les valeurs expérimentales plus élevées nous permettent de dire qu'il s'agit d'un équilibre entre un complexe ternaire et la forme hydratée du complexe. Dans le cas des oxalates, le calcul nous donne $q^{(b)} = 0.6$ et pour les phosphates $q^{(b)} = 0.8$. Ces anions ne déplacent que partiellement l'eau en première sphère et la relaxivité du complexe ne chute pas dramatiquement dans ces conditions.



Le complexe bis hydraté est, en comparaison, bien plus sensible à la complexation compétitive des anions. La relaxivité en présence de carbonates chute presque de moitié ($3.24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), et la valeur en présence d'oxalate correspond au remplacement total des deux molécules d'eau de première sphère par la complexation d'un oxalate de façon similaire à un ligand bidentate. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les complexes de DO3A^{51-53} , c'est-à-dire que les anions bidentates sont capables de déplacer les deux molécules d'eau en première sphère.

1.3.3. Relaxivité avec l'albumine

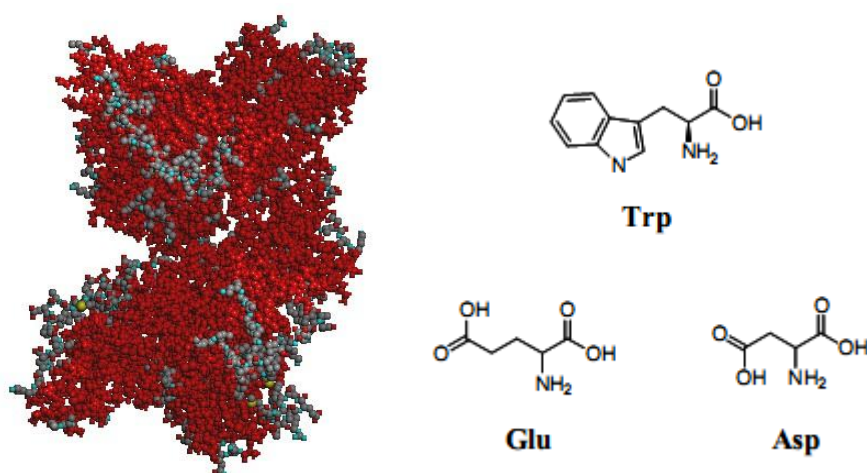


Figure 3.20 Représentation schématique de l'albumine sérique bovine (BSA) et des acides aminés pouvant interagir avec les complexes

L'albumine sérique sert de transporteur à beaucoup de ligands exogène ou endogène, comme les acides gras, des ions métalliques ou des produits pharmaceutiques^{54,55}. Cette protéine, dont la masse avoisine les 66.4 kDa, est composée de trois domaines (I, II et III) qui sont

structurellement identiques et associés pour former une structure en forme de cœur. Dans chacun de ses domaines, certains enchaînement d'acides aminés sont responsables de la formation de poches hydrophobes, qui servent de sites de liaisons pour les complexes⁵⁶. Cette protéine est la protéine sanguine la plus abondante : elle représente 60% du total des protéines sériques, et sa concentration est de 4.5 % m/v, soit environ 0.68 mM. Pour les études menées, la BSA (Bovine Serum Albumin) a été utilisée. De part sa structure, l'enchaînement de ses acides aminés et l'emplacement de ses sites de liaisons, elle s'avère suffisamment proche de la HSA (Human Serum Albumin) pour servir de modèle.

Comme nous l'avons vu en introduction, la possibilité d'interactions entre l'albumine et des molécules présentes dans le sang a été mise à profit pour le développement d'agents de contraste destinés à l'angiographie, et le complexe de Gd(III) MS325⁵⁷ est désormais utilisé cliniquement pour la recherche de thrombose et autres problèmes artériels. En effet, la formation d'un adduit entre le complexe de Gd(III) et l'albumine va permettre d'obtenir un système macromoléculaire qui va avoir une dynamique de rotation beaucoup plus lente (allongement du τ_R) et donc une relaxivité plus élevée. Cependant, si l'albumine présente des poches hydrophobes permettant de lier de façon non covalentes de petites molécules, elle dispose aussi de nombreux acides aminés présentant des chaînes latérales anioniques (glutamine, asparagine) qui sont susceptibles d'interagir avec le centre Gd(III) et de déplacer les molécules d'eau situées en première sphère de coordination. En fonction du mode de liaison du complexe, l'albumine peut avoir un effet favorable ou défavorable sur la relaxivité.

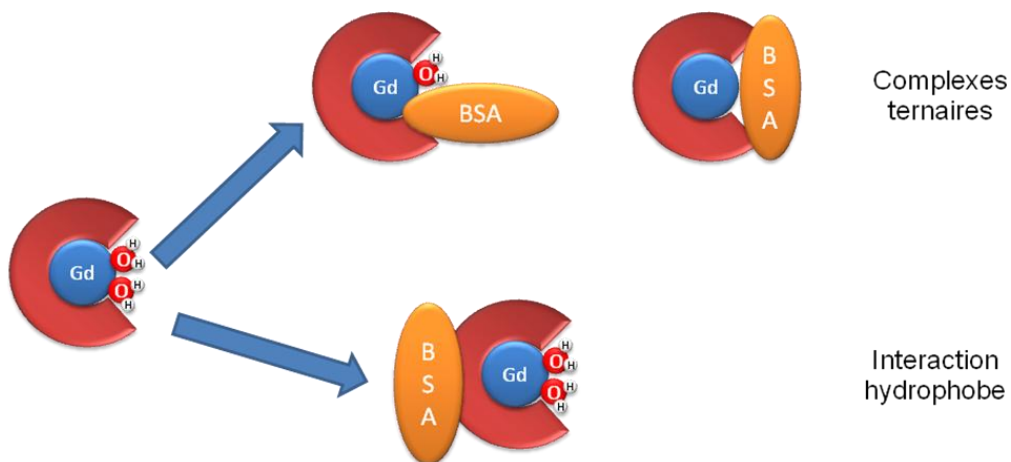
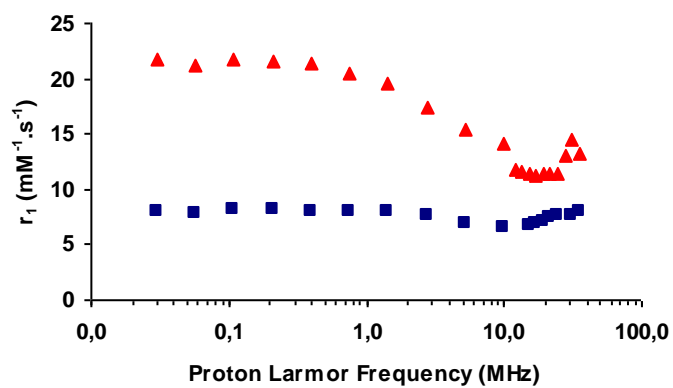
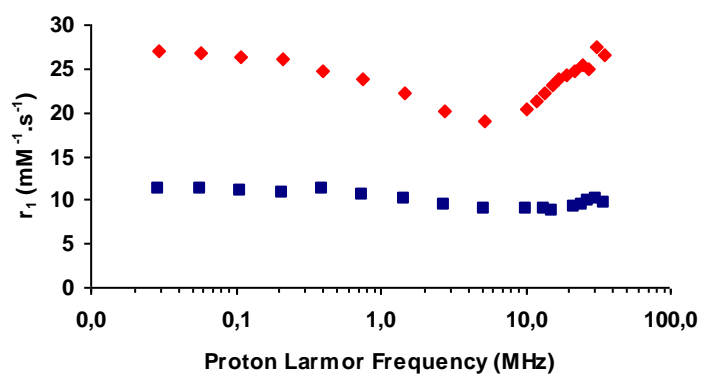


Figure 3.21 Différents modes d'interaction de la BSA avec les complexes de Gadolinium

A



B



C

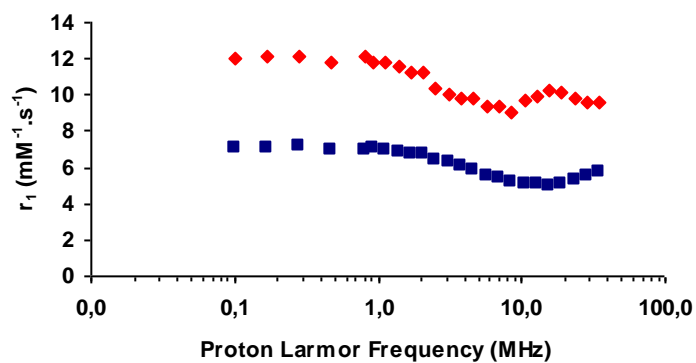


Figure 3.22 Profils NMRD de solutions de complexes ($C^{\circ}_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (A), $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (B), $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ (C) à 25°C et pH 7.4 en absence (■) et en présence (◆) de BSA ($C^{\circ}_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$)

$[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$

La comparaison des profils NMRD dans l'eau et dans la BSA montre une augmentation notable de la relaxivité du complexe en présence d'albumine. Dans un complexe $q = 0$ ne présentant que de la relaxivité « outer sphere », comme par exemple le $[\text{Gd}(\text{tpatcn})]$, l'effet de l'albumine sur la relaxivité est quasiment inexistante. La relaxivité du $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ présente soit une forte contribution des molécules d'eau en seconde sphère, soit à nouveau un effet supplémentaire dû à une modification de la dynamique de sphère externe. Cependant, l'augmentation de relaxivité autour de 30 MHz n'est pas très importante si on compare notre complexe au $[\text{Gd}(\text{C}_8\text{-DOTP})]$, $[\text{Gd}(\text{C}_{11}\text{-DOTP})]^{21}$. Ces complexes n'ont pas de molécules d'eau en première sphère de coordination et présente une forte contribution des molécules de seconde sphère dans la valeur de relaxivité. Le profil NMRD du $[\text{Gd}(\text{C}_{11}\text{-DOTP})]$ montre une inflexion plus importante autour de 35 MHz et l'augmentation globale de relaxivité est plus importante que pour notre complexe. Cette différence dans les profils peut s'expliquer par une association plus faible dans le cas de notre complexe, alors que le $[\text{Gd}(\text{C}_{11}\text{-DOTP})]$ est conçu pour interagir de façon non covalente avec les sites de liaisons hydrophobes de l'albumine, grâce à une longue chaîne aliphatique.

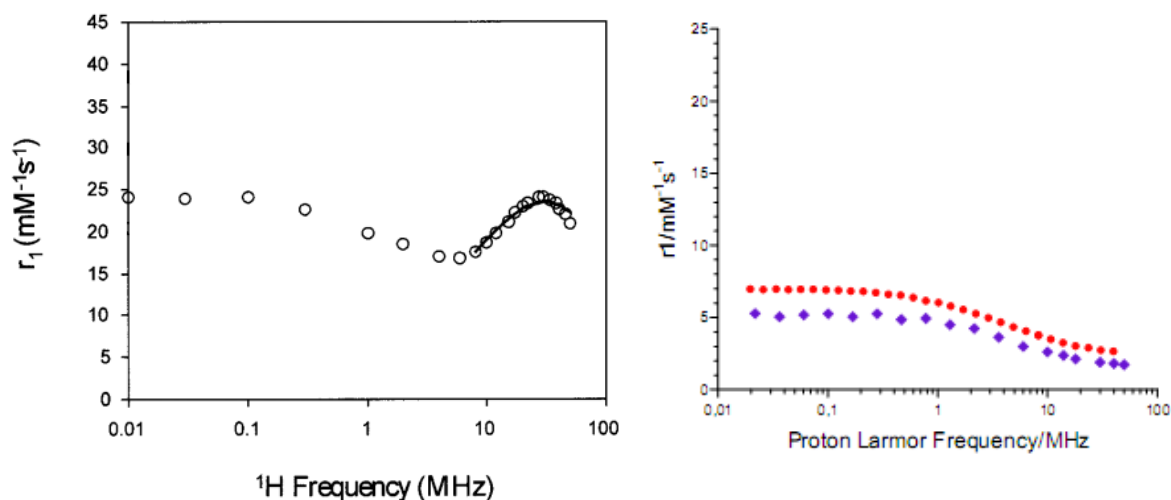


Figure 3.23 Profils NMRD du $[\text{Gd}(\text{C}_{11}\text{-DOTP})]$ en présence de 4.5% d'HSA à 25°C $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (à gauche). Profil NMRD du $[\text{Gd}(\text{tpatcn})]$ en présence (●) de 4.5% d'HSA et dans l'eau (◆) à 25°C

La comparaison des deux profils NMRD montre une augmentation de la relaxivité importante qui culmine à $27.4 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ pour une valeur de champs de 30 MHz, ce qui correspond à

l'allongement du τ_R provoqué par l'association du complexe avec une macromolécule. Dans l'hypothèse d'une interaction ne mettant en jeu qu'un seul site de liaison de la protéine, la relaxivité peut s'écrire :

$$r_1 = ([GdL^{(f)}]/[GdL_{tot}]) r_1^{(f)} + (1 - ([GdL^{(f)}]/[GdL_{tot}])) r_1^{(b)}$$

où $[GdL^{(f)}]$ est la concentration en complexe libre en solution, $[GdL_{tot}]$ la concentration totale du complexe de gadolinium, $r_1^{(f)}$ la relaxivité du complexe lié et $r_1^{(b)}$ la relaxivité de l'adduit entre le complexe de gadolinium et la BSA.

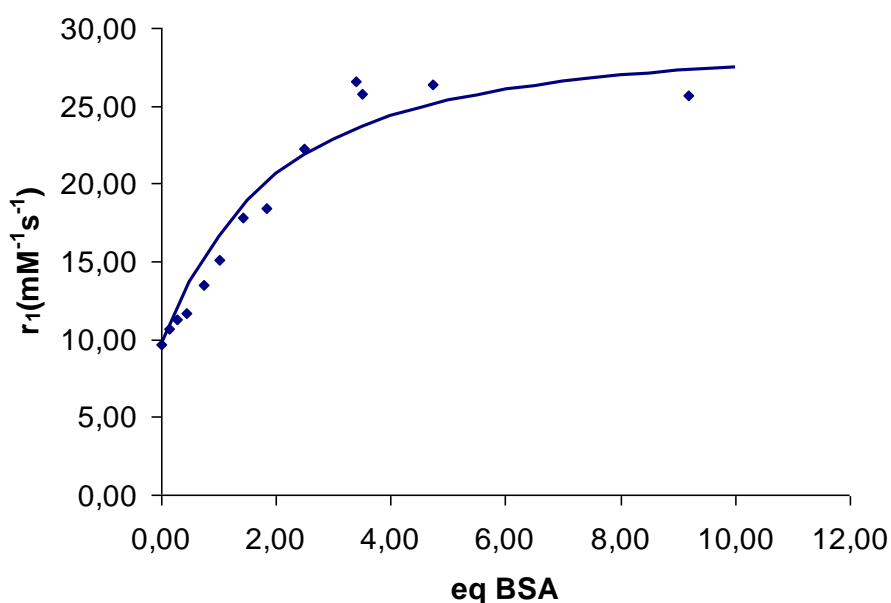


Figure 3.24 Titration du complexe $[Gd(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$ par des concentrations croissantes de BSA effectué à 35 MHz – données expérimentales(♦), courbe théorique (-)

A partir de la courbe de titrage de la relaxivité longitudinale du complexe en fonction du nombre d'équivalents de BSA, il est possible d'ajuster une courbe de dosage théorique, pour un équilibre : $GdL + BSA \rightarrow GdL-BSA$ qui définit une constante d'association $K = [GdL-BSA]/[GdL][BSA]$. Le meilleur fit est obtenu pour une constante $K = 3.2 M^{-1}$ et une relaxivité de l'adduit $r_1^{(b)} = 30 mM^{-1}.s^{-1}$. Cette constante d'association est particulièrement faible, si on la compare aux agents de contrastes connus pour avoir une affinité particulière avec l'albumine sérique, $[Gd(EOB-DTPA)(H_2O)]^{2-}$ et $[Gd-BOPTA]^{2-}$ (figure 3.25)⁵⁸. En effet ces complexes présentent tous les deux des constantes d'affinités avec la HSA de $1500 M^{-1}$ pour un seul site de fixation et des valeurs de relaxivités liés de respectivement $37 mM^{-1}.s^{-1}$ et 43

$\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$ avec une marge d'erreur de l'ordre de 10 à 16 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Ces valeurs de relaxivité liées semblent tout à fait en accord avec la valeur de 30 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$. La relaxivité de l'adduit formé entre notre complexe et la BSA est limitée par la faible valeur de la constante d'association.

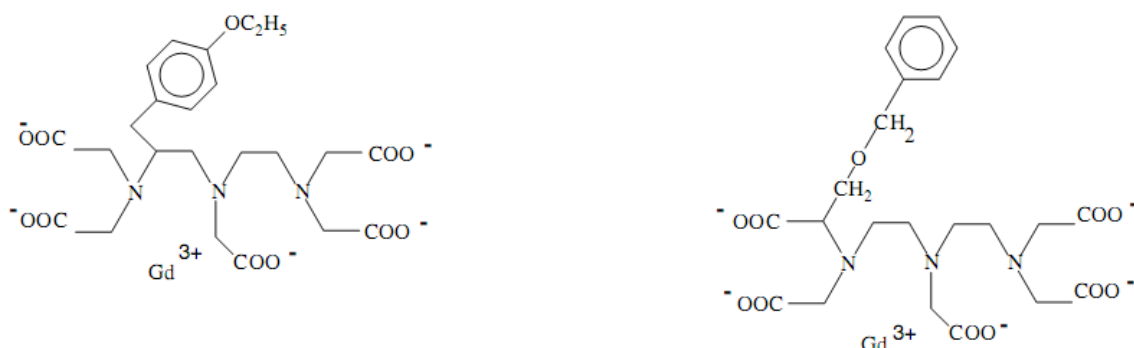


Figure 3.25 Structure des complexes Gd-EOB-DTPA et GD-BOPTA



Le complexe de $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ montre également une augmentation de relaxivité en présence de BSA, bien que celle-ci soit moins importante que celle observée pour le complexe mono-hydraté. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette forte différence de relaxivité entre les profils des deux complexes en présence de BSA (figure 3.29). Tout d'abord il est possible que dans les deux complexes, la BSA soit liée de façon différente et que dans le cas du complexe bis hydraté, elle déplace tout ou partie des molécules d'eau en première sphère. Le remplacement des molécules d'eau par des groupements chélatants de la protéine a déjà été montré pour des dérivés $q = 2$ du $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ ⁵⁹. Dans ce cas l'augmentation de relaxivité ne serait due qu'à la contribution de seconde sphère et expliquerait le faible maximum local obtenu dans la région entre 20 et 30 MHz. La forte affinité des anions (§1.3.2) conforte cette hypothèse.

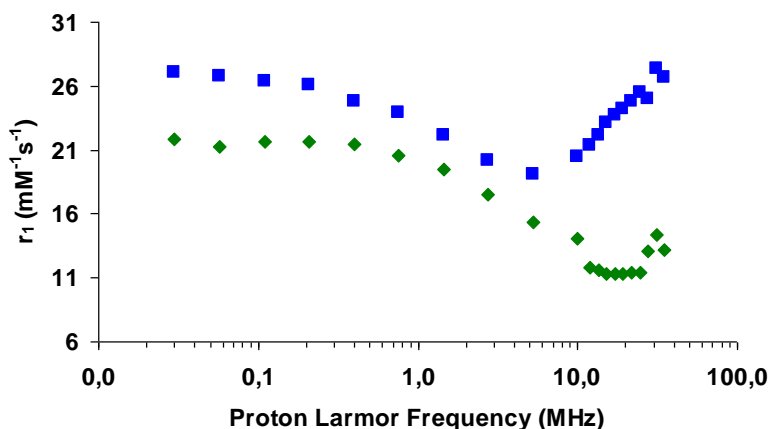


Figure 3.26 Profils NMRD de solutions de complexes ($C^{\circ}_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (◆), $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (■) en présence de BSA ($C^{\circ}_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$)

Si les deux complexes se lient de la même façon à la BSA par une interaction hydrophobe, une autre possibilité pour expliquer la faible augmentation de relaxivité serait le ralentissement de la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère. En effet, une vitesse d'échange lente représente souvent une limitation importante pour atteindre des relaxivités plus élevées. Le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ possède un temps de résidence optimal (20-100 ns) pour un complexe ayant un τ_R long⁶⁰. Mais si la vitesse d'échange du complexe bis-hydraté est plus faible, la relaxivité de l'adduit sera de fait limité. C'est le cas notamment de l'analogue $q = 2$ du MS325⁶¹ où l'augmentation du nombre de molécules d'eau en première sphère entraîne une chute de la relaxivité de l'adduit de ce complexe avec la BSA.

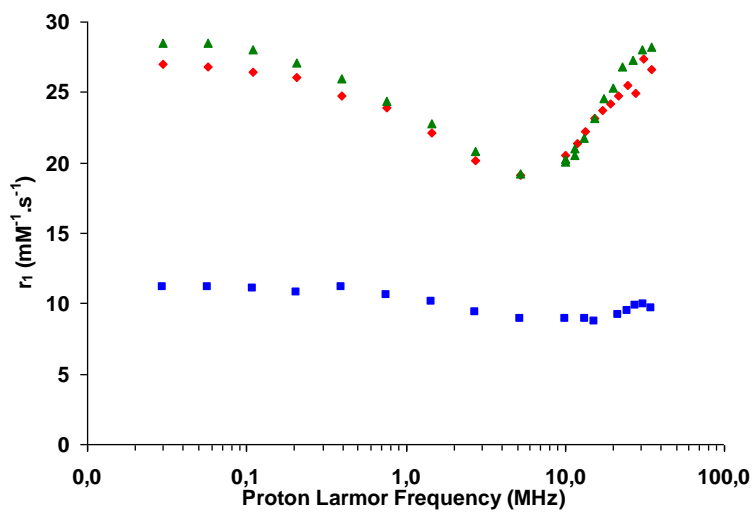
1.3.4. Relaxivité dans avec le sérum

Le sérum est constitué par une partie du sang débarrassé de ses facteurs de coagulation telle que la fibrine. Ce liquide majoritairement constitué d'eau contient de nombreux sels inorganiques (Na^+ , Cl^- , K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , ...), des anions organiques et des protéines plasmatiques, dont 60% d'albumine. La mesure de la relaxivité des complexes dans le sérum permet d'avoir une première approximation de leur comportement en milieu biologique. Les principaux anions endogènes et leurs concentrations dans le sérum sont présentés dans le tableau 3.10.

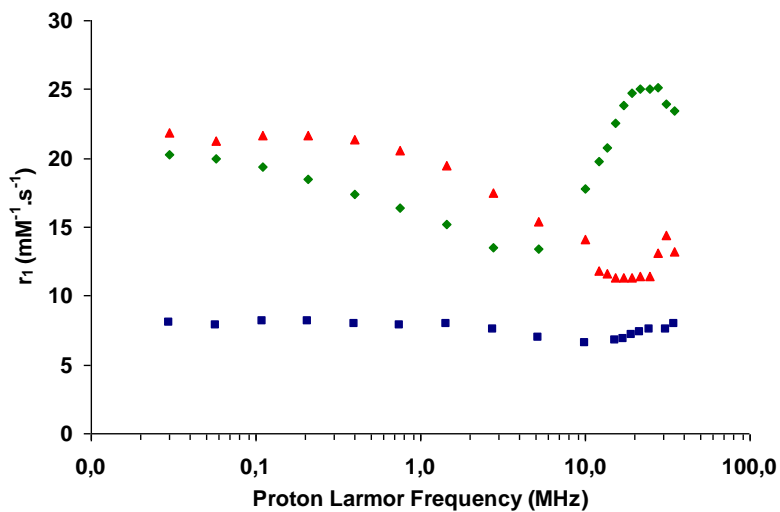
	Carbonate	Lactate	Phosphate	Citrate
C° (mM)	30	2.3	0.9	0.13

Tableau 3.10 Concentrations des principaux anions endogènes dans le plasma humain.

Les mesures ont été effectuées pour des solutions de complexe de concentrations connues dans du sérum bovin (FBS, Invitrogen, origine Nouvelle-Zélande). La contribution diamagnétique du sérum est de 0.8 s^{-1} .



A



B

Figure 3.27 Profil NMRD de solution de complexes ($C^{\circ}_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (A), $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (B) à 25°C à pH 7.4 dans H_2O (■), en présence (▲) de BSA ($C^{\circ}_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$), et dans le sérum (◆).

Dans le cas du $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, les profils dans le sérum et en présence de BSA sont quasiment superposables. Dans le sérum, le complexe forme toujours un adduit avec la BSA, et la présence de différents anions en solution n'a pas d'influence sur la relaxivité. En effet, dans le sérum, seuls les carbonates sont présents en quantités importantes (150 équivalents) si l'on considère la concentration du complexe (0.2mM). Les mesures de relaxivités avec 200 équivalents d'anions (§1.3.2) ne sont pas forcément représentatives des concentrations présentes en milieu biologique. Le complexe mono hydraté présente une relaxivité élevée dans le sérum avec un maximum dans la zone située autour de 30 MHz. Nous obtenons ici un complexe qui présente une relaxivité élevée en milieu biologique aux champs des imageurs classiques.

En ce qui concerne le complexe $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, l'interprétation des profils NMRD est plus délicate. En effet, nous avons constaté une augmentation de la relaxivité limitée en présence de BSA. Cependant, dans le sérum, on retrouve un profil certes un peu inférieur en valeur à celui du $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, mais avec une allure similaire et un net maximum autour de 30 MHz. Si l'on suppose le remplacement d'une molécule d'eau par la BSA dans le premier cas, il semble que la présence d'anions en solution ait un effet sur le mode de coordination de la protéine. La relaxivité de ce complexe en milieu biologique reste bonne, malgré une sensibilité particulière aux anions. Cependant, ce complexe n'apporte pas d'amélioration par rapport à l'analogue mono-hydraté, qui, de part sa structure plus rigide et sa meilleure stabilité, présente des performances supérieures par bien des aspects.

2. Complexes de gadolinium à azote central

L'optimisation des paramètres dynamiques des complexes mono aqua (temps de corrélation rotationnel, vitesse d'échange) n'est pas suffisante pour obtenir des relaxivités élevées aux champs des nouveaux imageurs (7 à 9.4 T). Le développement de complexes comportant plusieurs molécules d'eau en première sphère permet d'accéder à des relaxivités plus élevées à la fois aux champs classiques des imageurs mais également à haut champ. De ce fait, nous nous sommes intéressés à des complexes comportant deux ou trois molécules d'eau en première sphère de coordination.

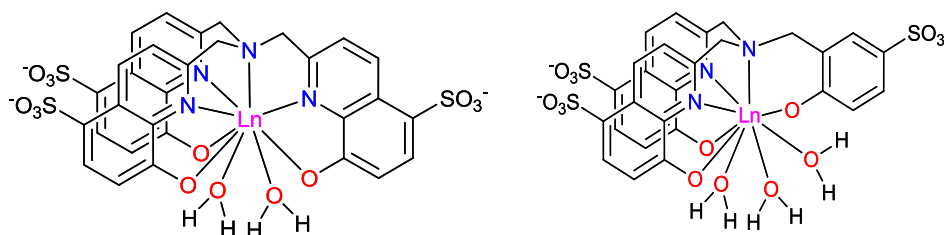


Figure 3.28 Complexe $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Les complexes présentant une architecture à azote central dérivée du $[\text{Gd}(\text{tpaa})(\text{H}_2\text{O})_2]$, à savoir les complexes $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ et $[\text{Gd}(\text{dpaba})(\text{H}_2\text{O})_2]$, ont des relaxivités à 200 MHz relativement élevées (respectivement $9.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $7.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Nous avons donc repris le même type d'architecture pour nos complexes dérivés d'hydroxyquinoléine. Cependant, plusieurs éléments sont à prendre en compte dans la conception de complexe poly hydraté. D'une part, la réduction de denticité du ligand a souvent pour effet de diminuer la stabilité thermodynamique et cinétique des complexes. D'autre part, la complexation d'anions endogènes en milieu biologique susceptibles de remplacer une ou plusieurs molécules d'eau, peut annihiler totalement ou partiellement le gain de relaxivité obtenu avec la présence de plusieurs molécules d'eau.

2.1. Synthèse des complexes

Les ligands $\text{H}_3\text{thqN-SO}_3$ et $\text{H}_3\text{dhqN-SO}_3$ réagissent dans l'eau avec un équivalent de chlorures de lanthanides (III), pour donner, après ajustement du pH avec une solution de KOH ou de NaOH, des complexes de stoechiométrie 1 : 1. Les complexes ont été, à chaque étude, synthétisés in situ. L'absence de lanthanides libres dans le milieu a été testé par le test du xylénol orange⁹.

2.2. Etude structurales en solutions

2.2.1. Etude RMN

2.2.1.1. Ligand H₃thqN-SO₃

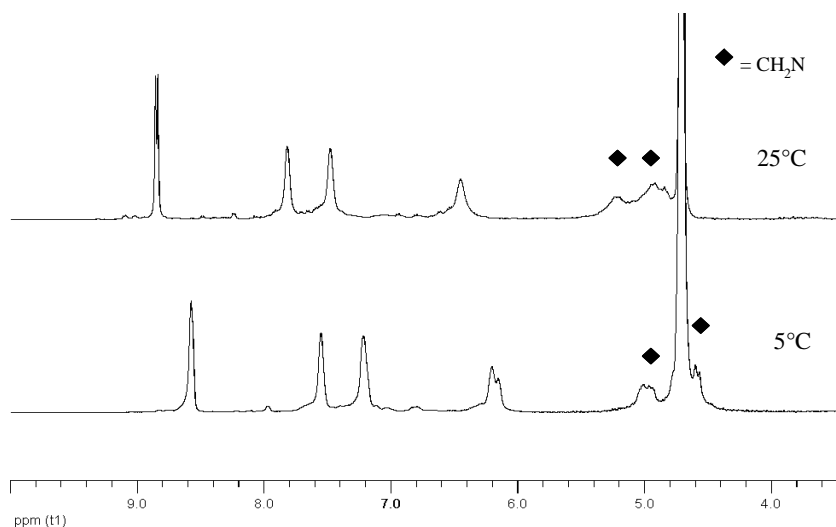


Figure 3.29 Spectre RMN ¹H du complexe de [Lu(thqN-SO₃)(H₂O)₂]³⁻ dans D₂O à pD = 7.4 à 5°C et à 25°C

Les spectres RMN ¹H dans l'eau (à 25°C et à 5°C) sont en accord avec la formation d'une espèce de symétrie C₃. En effet, seulement six signaux sont observés conformément à une symétrie C₃ : deux résonances correspondent aux protons éthyléniques des bras portant les quinoléines (4.58, 4.98 ppm). Les quatre autres signaux sont attribués aux protons de l'hydroxyquinoléine (8.57, 7.82, 7.48, 6.45 ppm). Les résonances des protons éthyléniques sont mal résolus à 25°C, probablement du fait d'une interconversion entre les conformations Λ et Δ à cette température. Un tel comportement fluxionnel a déjà été observé pour les complexes de tpa³⁻⁶².

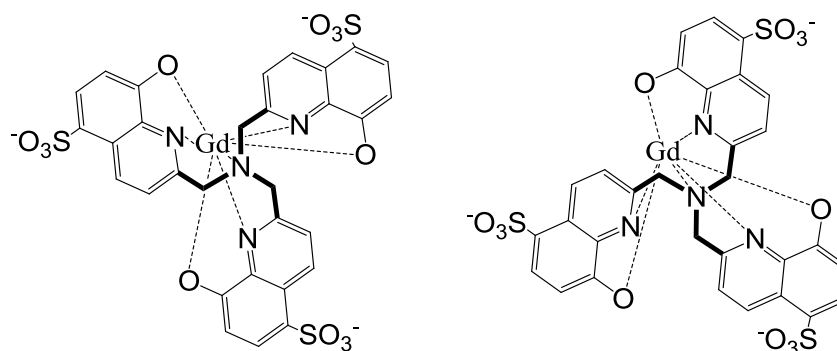


Figure 3.30 Représentation schématique des isomères Δ et Λ du complexe [Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₂]³⁻

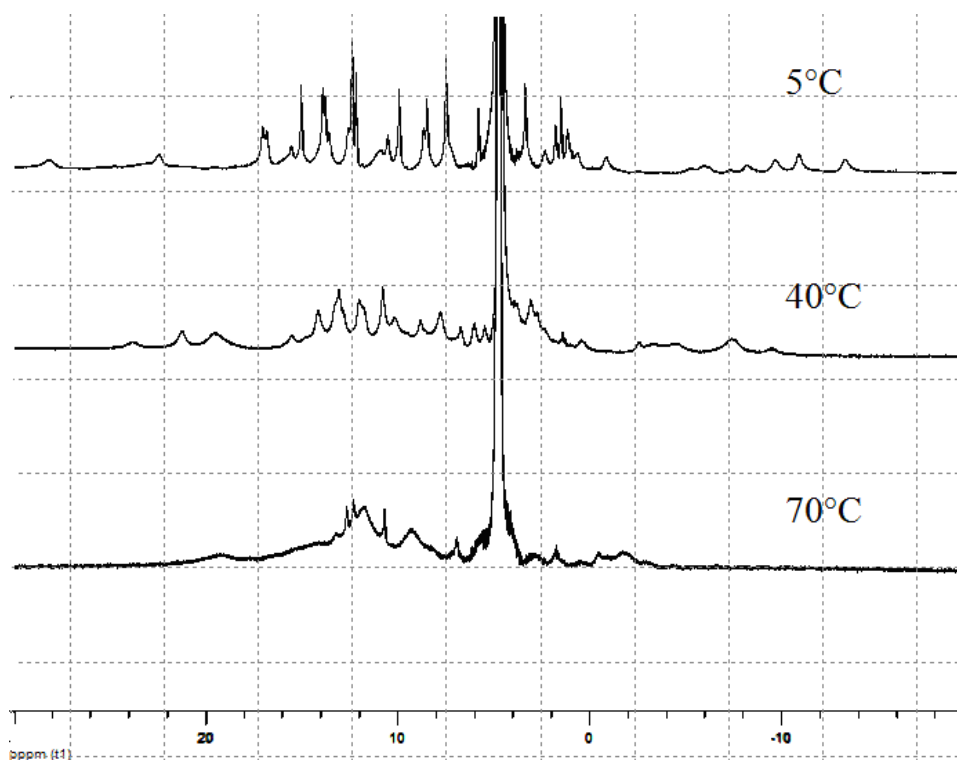


Figure 3.31 Spectre RMN ^1H du complexe de $[\text{Nd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ dans D_2O à $\text{pD} = 7.4$ à 5°C , 25°C , 40°C et 70°C

Le complexe de Nd(III) est trop fluxionnel pour donner un spectre RMN bien résolu. Une étude en température du complexe montre que le spectre RMN tend vers la coalescence mais celle-ci n'est pas atteinte dans la gamme de température accessible en RMN. A basse température, la multiplication du nombre de signaux semble indiquer la présence des deux espèces Δ et Λ en solution, le processus d'interconversion entre les deux isomères étant ralenti.

Le spectre du complexe de La(III) confirme la présence d'un phénomène d'interconversion. En effet, si les spectres à 25°C et à 70°C pour des ions plus petits comme le Lu présente une signature spectrale très proche, l'étude en température du complexe de La(III) montre qu'un spectre bien défini n'est atteint qu'à 70°C , lorsque l'échange entre les isomères Δ et Λ est suffisamment rapide pour obtenir la coalescence.

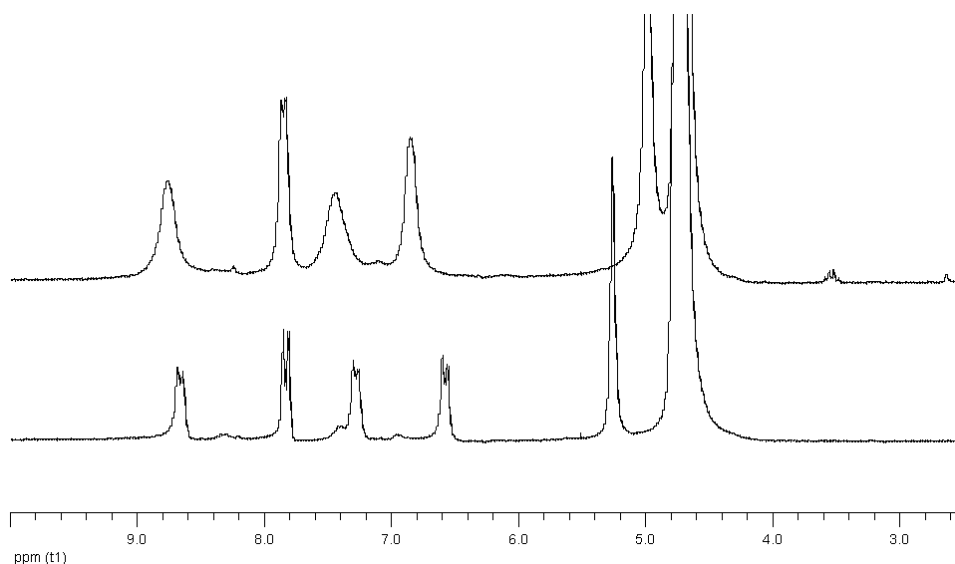


Figure 3.32 Spectre RMN ^1H du complexe de $[\text{La}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ dans D_2O à $\text{pD} = 7.4$ à 5°C , 25°C .

2.2.1.2. Ligand $\text{H}_3\text{dhqN-SO}_3$

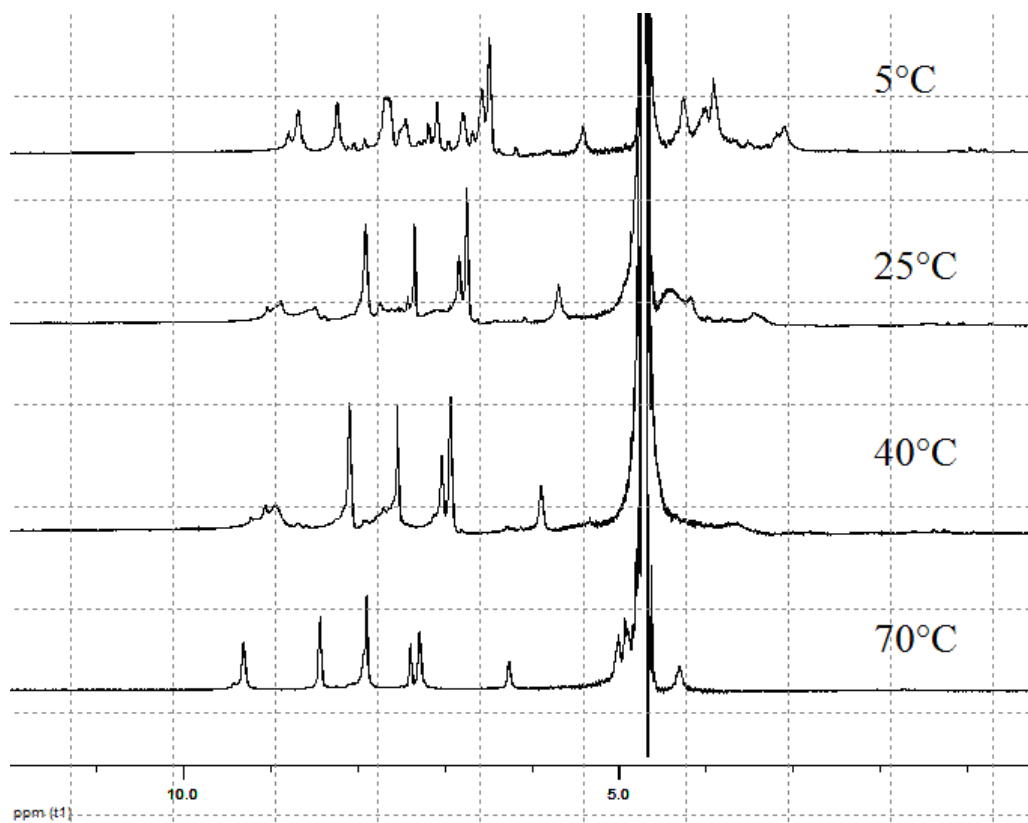


Figure 3.33 Spectre RMN ^1H du complexe de $[\text{Lu}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ dans D_2O à $\text{pD} = 7.4$ à 5°C , 25°C , 40°C et 70°C

A température ambiante, le spectre du complexe de Lu(III) est mal défini, du fait de la présence de deux type de conformation Λ et Δ à cette température. Contrairement au complexe $[\text{Lu}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, le spectre à 5°C ne fige pas une seule des deux conformations mais plutôt deux complexes distincts. Le spectre reste cependant assez mal défini pour pouvoir distinguer clairement les deux espèces. En augmentant la température, cette interconversion devient plus rapide et le spectre obtenu à 70°C présente 10 signaux correspondant à une symétrie C_2 . Quatre signaux peuvent être attribués aux quinoléines (9.31, 8.43, 7.89, 7.29 ppm), trois signaux au phénol (7.93, 7.40, 6.27 ppm). Deux résonnances correspondent aux protons éthyléniques des bras portant les quinoléines (5.00, 4.92 ppm). La dernière résonnance correspond aux protons éthyléniques du bras portant le phénol (3.40 ppm).

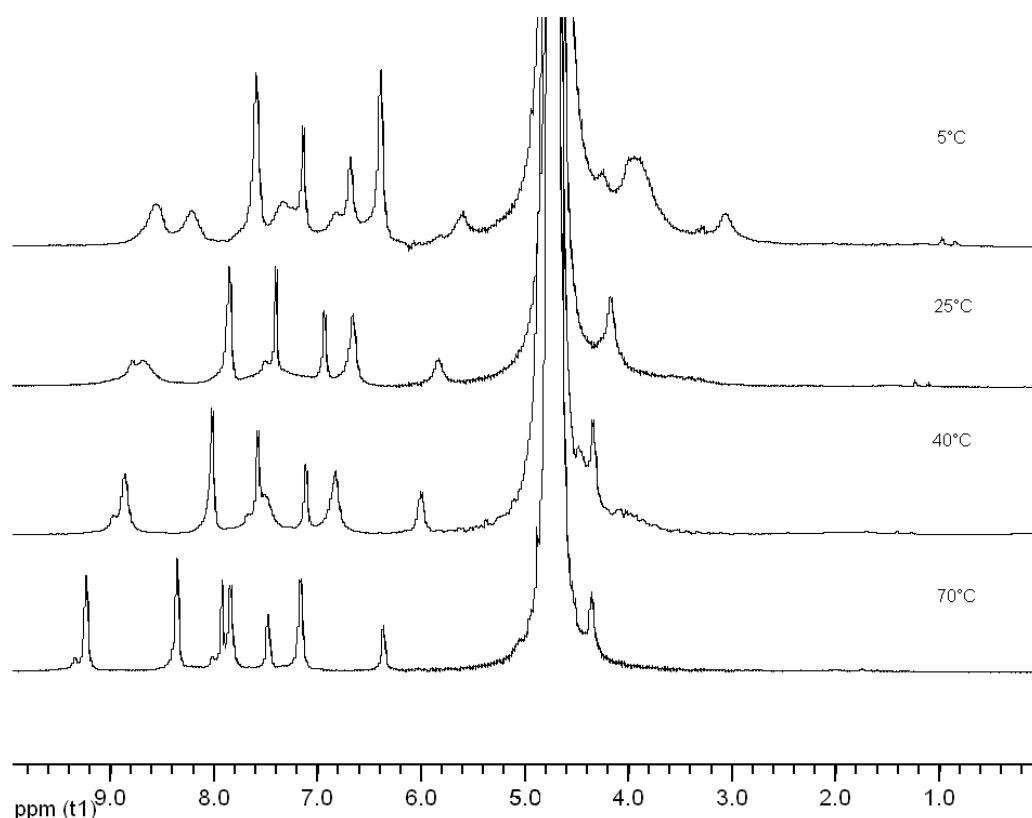


Figure 3.34 Spectre RMN ^1H du complexe de $[\text{La}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ dans D_2O à $\text{pD} = 7.4$ à 5°C, 25°C, 40°C et 70°C

De la même façon que pour le complexe de Lu(III), le complexe de La(III) présente un spectre caractéristique d'une espèce fluxionnelle. A 70°C, l'interconversion entre les conformations Λ et Δ devient suffisamment rapide pour atteindre la coalescence. On peut alors attribuer les résonnances correspondant aux protons de la quinoléine (9.23, 8.35, 7.84, 7.16), ceux correspondant aux protons du phénol (7.92, 7.48, 6.36). Le pic à 4.36 ppm

correspond aux protons éthyléniques du bras phénol, les signaux des autres protons éthyléniques se trouvant sous le pic d'eau. Le spectre RMN du complexe de La(III) à 5°C montre un ensemble de pics qui indique la présence de plusieurs espèces dont l'échange est ralenti à basse température. Cependant, les signaux sont moins bien résolus dans le complexe de lanthane que dans celui du lutécium, signe que les processus d'échanges entre les conformations Λ et Δ sont favorisés par des ions de plus grosse taille et qu'il est impossible d'obtenir un spectre figé comportant les deux espèces dans la gamme de température qui nous est accessible.

2.2.2. Protonation des ligands et stabilité des complexes

Les deux formes totalement protonées des ligands $H_3thqN-SO_3$, $H_3dhqN-SO_3$, présentent respectivement 7 et 6 sites de protonations dans la gamme de pH étudiée, $2 < pH < 10$. En effet dans les conditions du dosage, les trois groupements sulfonates sont totalement déprotonés. Les constantes de protonation sont déterminées par potentiométrie, de manière analogue à la méthode décrite pour les ligands détaillés précédemment. Les valeurs des constantes de protonation des deux ligands sont regroupées dans le tableau 3.11. Les valeurs calculées résultent du traitement de trois dosages aller-retour indépendants.

ligand	$H_3thqN-SO_3$	$H_3dhqtcn-SO_3$
pKa 1		
pKa 2	6.36	3.77
pKa 3	4.08	6.17
pKa 4	7.66	8.57
pKa 5		9.43
pKa 6	17.36	9.70
pKa 7	9.16	

Tableau 3.11 Constantes de protonation des ligands $H_3thqN-SO_3$, $H_3dhqN-SO_3$

Pour le ligand $H_3thqN-SO_3$, les trois premiers pKa correspondent à la déprotonation des azotes des pyridines. Il en va de même pour le premier pKa du $H_3dhqN-SO_3$. Cependant, la valeur de la constante de protonation de la première pyridine est trop faible dans ce cas pour être déterminée. Les valeurs obtenues pour les deux ligands sont en accord avec la valeur rapportée pour la déprotonation de l'azote de la 5-sulfo-8-hydroxyquinoléine. Le pKa 3 pour le $H_3thqN-SO_3$ peut être attribué à la déprotonation de l'azote central. Cette valeur est comparable aux pKa de l'azote central de la dpaa (7.33) et de la dpa (7.3). Dans le cas du

$H_3dhqN-SO_3$, le pKa correspondant à l'azote central est un peu plus acide (6.17) probablement à cause de l'effet électro-attracteur plus important du phénol comparé à l'hydroxyquinoléine. Les trois pKa suivant pour le $H_3thqN-SO_3$ (pKa 5+6, pKa 7), correspondent à la déprotonation des groupements hydroxyles des trois quinoléines et leurs valeurs sont comparables à la valeur donnée pour la 5-sulfo-8-hydroxyquinoléine (8.42). Il en va de même pour les pKa 4 et pKa 5 du $H_3dhqN-SO_3$. Le dernier pKa de ce ligand peut être attribué au proton du groupement phénol.

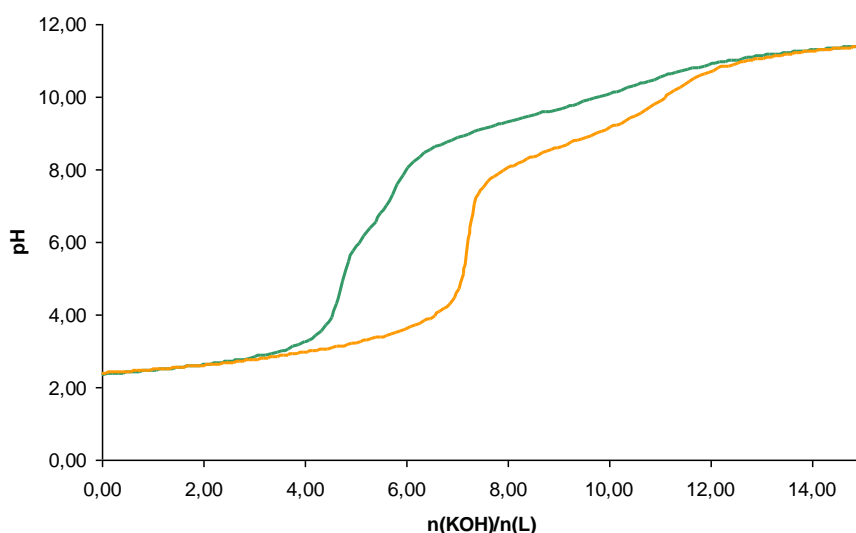


Figure 3.35 Courbes de titration normalisées pour les ligands $H_3thqN-SO_3$ (---) et $H_3dhqN-SO_3$ (---)

La stabilité des complexes de Gd(III) et Zn(II) a été mesurée comme précédemment par spectrophotométrie UV-visible grâce à une méthode de titration compétitive avec le ligand H_5DTPA . Pour les ligands à azote central, l'ordre d'ajout de la DTPA et de notre ligand n'a pas d'influence sur l'expérience. Les complexes issus de ces architectures à azote central ne présentent donc pas la même inertie cinétique que les complexes dérivés du triazacyclononane. Cependant les valeurs obtenues pour les pGd sont du même ordre de grandeur que pour la DTPA. Il est relativement rare d'obtenir des stabilités si importantes des complexes poly hydratés^{63,64}. Les résultats obtenus sont assez comparables avec les stabilités des complexes de Gd(III) 1,2-hydroxypyridinone (HOPO) de Raymond et al¹⁶ ou celle du $[Gd(AAZTA)(H_2O)_2]^{65}$. Ces valeurs se situent définitivement dans l'intervalle de stabilité demandée pour les agents utilisés cliniquement. De plus, les constantes de stabilité des complexes de Zn(II) sont beaucoup plus faibles (pZn=15) que celle des complexes de Gd(III).

On peut donc s'attendre à ce que les complexes de Gd(III) soient résistants à la transmétallation.

ligand	H ₃ thqN-SO ₃	H ₃ dhqN-SO ₃
ΣpKa	44.6	37.6
pGd	19.2 (2)	19.4 (2)
pZn	15.1 (2)	15.0 (2)

Tableau 3.12 Constantes de stabilité des complexes de Gd(III) et Zn(II)

Cependant, la stabilité quasiment identique des deux complexes est assez surprenante si l'on considère que le H₃dhqN-SO₃ a un nombre de coordination plus faible que le H₃thqN-SO₃. Même si l'écart de basicité donné par la somme des pKa est plus important dans le cas ligand à azote central en comparaison des ligands basés sur le triazacyclononane, nous avons vu précédemment que le remplacement d'une seule pyridine par un phénol n'avait que peu d'influence sur la stabilité, ce qui semble être également le cas pour les deux ligands à azote central présentés ici. Cependant, c'est la valeur même de la stabilité qui est surprenante, puisque celle-ci est très proche de celle des complexes de basés sur le pivot triazacyclononane, alors qu'entre ces deux familles de ligands, la somme des pKa est nettement différente (autour de 65 pour les ligands basés sur le triazacyclononane contre 37 et 44 pour les deux ligands basés sur une structure à azote central). Cependant, des résultats similaires ont déjà été obtenus avec les ligands utilisant le picolinate comme unité chélatante. En effet, pour un même nombre de coordination (7), les complexes de [Gd(mpatcn)(H₂O)₂] et de [Gd(tpaa)(H₂O)₂] présente des stabilités relativement proches (les pGd sont respectivement 11.8 et 12.3), alors que la somme des pKa entre les deux ligands est différente de 10 unités. Si le pivot triazacyclononane semble avoir une influence sur la rigidité des complexes, il ne semble pas avoir une influence sur la stabilité thermodynamique de ceux-ci. La différence entre les deux architectures est cependant sensible au niveau de la stabilité cinétique, les composés basés sur le triazacyclononane étant nettement plus cinétiquement inertes que leurs analogues basés sur un pivot azote central.

Pour ce qui est de l'absence de différence de stabilité entre les complexes de H₃thqN-SO₃ et de H₃dhqN-SO₃, il est à noter que la stabilité des complexes de H₃tpaa et de H₃dpaa, respectivement de coordination 7 et 6, présente une valeur de stabilité identique (pGd=12.3). Dans ce type d'architecture, l'absence de contribution d'une pyridine ne semble pas avoir d'influence sur la stabilité des complexes de Gd(III) formés.

2.3. Etude de la relaxivité des complexes

2.3.1. Relaxivité des complexes

2.3.1.1. $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$

La relaxivité mesurée pour le complexe de Gd(III) à pH physiologique (7.4) et 25 °C est de $5.16 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 200 MHz et de $5.73 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz. Cette valeur est plus haute que celle des complexes mono hydratés utilisés cliniquement ($[\text{Gd}(\text{dtpa})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ ou $[\text{Gd}(\text{dota})(\text{H}_2\text{O})]^-$, $4.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ at 25 °C). Cependant, cette valeur demeure un peu basse pour un complexe bis hydraté, et les valeurs attendues se situent classiquement autour de $7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Deux phénomènes peuvent être responsables de cette relaxivité limitée, soit le complexe ne comporte pas deux molécules d'eau, soit la vitesse d'échange de ces molécules d'eau est limitante pour la relaxivité. Le nombre de molécules d'eau ayant été confirmé par des mesures de luminescence, une vitesse d'échange particulièrement lente reste la seule possibilité.

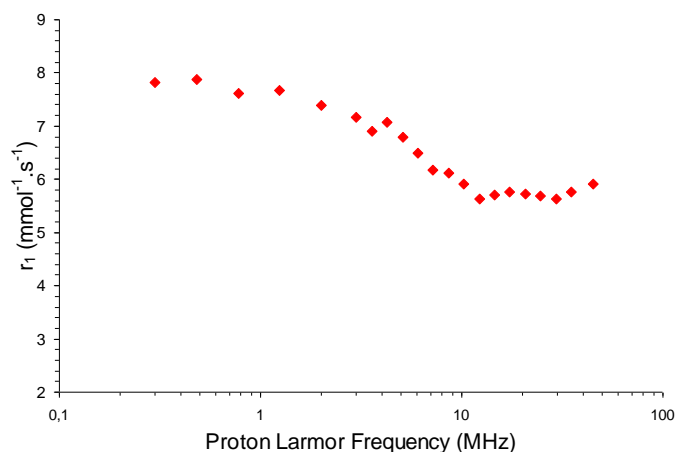


Figure 3.36 Profils NMRD du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ dans l'eau à pH 7.4, 25°C

Une façon assez directe d'accéder à la vitesse d'échange des molécules d'eau d'un complexe est de mesurer la dépendance à la température de la vitesse de relaxation transversale $1/T_{2r}$ du noyau ^{17}O de l'eau. La vitesse de relaxation longitudinale $1/T_{1r}$ et le déplacement chimique du noyau ^{17}O ont également été mesurés. Ces mesures ont été réalisées au sein du laboratoire du Professeur Lothar Helm à L'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne.

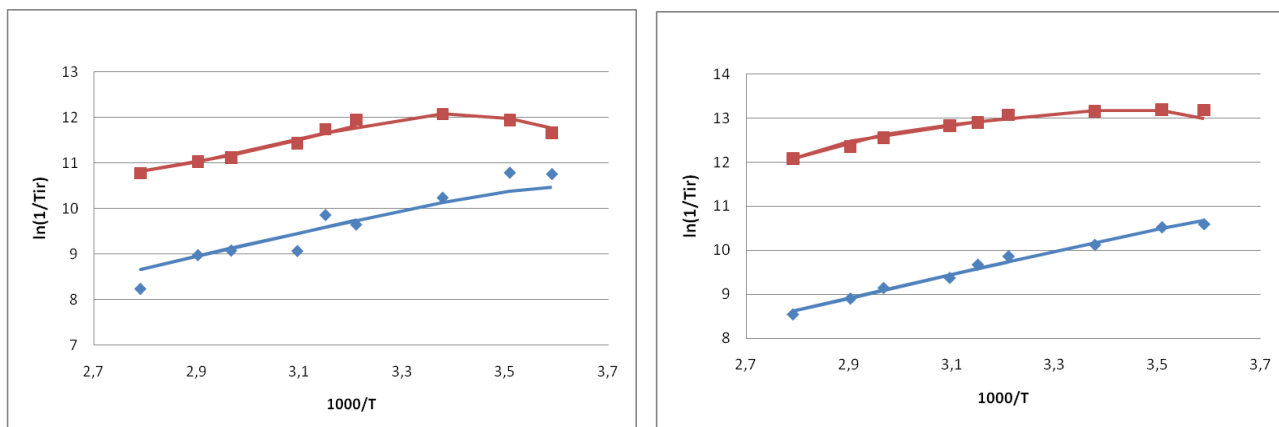


Figure 3.37 Vitesses de relaxation transversale (■) et longitudinale (◆) de ^{17}O de l'eau en fonction de la température et les courbes ajustées correspondantes (—) et (—) pour le $[\text{Gd}(\text{thqNSO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (à gauche) et le $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ (à droite).

	$[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$	$[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$
ΔH [kJ/mol]	35	58
k_{ex}^{298} [10^6 s^{-1}]	0.48	4.02
E_r [kJ/mol]	22	22
$\tau_r(\text{OW})^{298}$ [ps]	151	217
E_v [kJ/mol]	1	1
τ_v^{298} [ps]	2.12	2.80
$A/hbar$ [10^6 rad/s]	-1.53	-3.8
d_{gL}	0	0
D_{GdH}^{298} [$10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$]	1	1
E_{DGdH} [kJ/mol]	1	1
r_{GdO} [Å]	2.5	2.5
$\tau_r(\text{HW})/\tau_r(\text{OW})$	1	1
Δ^2 [10^{20} s^{-2}]	4.31	3.03
χ [MHz]	7.36	7.36
q_{WAT}	2	3
Gd-HW 1 st [Å]	3.1	3.1
Gd-HW 2 nd [Å]	3.6	3.6

Tableau 3.13 Paramètres utilisés pour les fits des données de relaxivité en accord avec la théorie. Les valeurs en gras ont été fixées.

parametres	[Gd(thqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻	[Gd(dhqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻
ΔH^+ [kJ/mol]	35	58
k_{ex}^{298} [10^6 s^{-1}]	0.48	4.02
τ_r^{298} [ps]	150	140 ^a
τ_v^{298} [ps]	2.12	2.80
A/\hbar [10^6 rad/s]	-1.53	-3.8
q	2	3
r_H [Å]	3.2	3.1

Tableau 3.14 Paramètres utilisés pour les fits des données de relaxivité en accord avec la théorie. ^a Valeur approximée en fonction de la masse molaire du complexe.

Les vitesses de relaxation ¹⁷O longitudinales and transversales ont été mesurées dans des solutions aqueuses des complexes [Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻ et [Gd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻ sur une gamme de température allant de 5 à 80°C (figure 3.37). L'analyse des données a été réalisée sur la base de la theory de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) (équation 3.5 à 3.11). Afin de pouvoir fitter les données, plusieurs paramètres sont fixés. Le nombre de molécules d'eau est fixé à 2 pour le [Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻ et à 3 pour le [Gd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻. La distance entre le spin électronique du Gd(III) et le noyau d'¹⁷O r_{GdO} a été fixé à 2.50 Å, la distance Gd(III) proton a été choisi égale à 3.1 Å.

Pour le [Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻, la valeur de vitesse d'échange obtenue pour le fit de ces courbes est très faible ($k_{ex}^{298} = 0.48 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), c'est-à-dire plus lente d'un ordre de grandeur si on la compare à la valeur du [Gd(DO3A)(H₂O)₂] ($k_{ex}^{298} = 6.25 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$)⁶⁶. En effet, les complexes q = 2 ont généralement des vitesses d'échanges supérieures aux complexes q = 1. Ici, notre valeur de k_{ex}^{298} est égale à la valeur du complexe mono aqua [Gd(DTPA-BMA)(H₂O)] ($k_{ex}^{298} = 0.48 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$)¹⁷ ce qui explique la valeur modeste de la relaxivité de notre complexe. En comparaison, les complexes de picolinate bis hydratés présentent des vitesses d'échanges 25 fois plus élevées pour le [Gd(dpaba)(H₂O)₂] ($k_{ex}^{298} = 12.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). Le complexe [Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₂] représente donc un exemple inhabituel de complexe bis aqua ayant une vitesse d'échange particulièrement lente. Les valeurs théoriques de relaxivité sont calculées à partir des équations 3.12 à 3.19 précédemment utilisées pour le [Gd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻ et des paramètres reportés dans le tableau 3.14. La valeur de la relaxivité théorique est un peu plus élevée que la valeur de la relaxivité mesurée expérimentalement mais les valeurs restent dans le même ordre de grandeur.

	Champ
H ₂ O	200 MHz
r ₁ ^{1S} théo	5.28
r ₁ ^{0S} théo	1.54
r ₁ théo	6.82
r ₁ exp	5.16

Tableau 3.15 relaxivité longitudinale théorique calculée et relaxivité expérimentale à 200MHz

De la même façon que pour le complexe bis aqua, la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère a été déterminé pas des mesures de vitesses de relaxations du noyau ¹⁷O de l'eau pour le [Gd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻.

Pour ce complexe, la vitesse d'échange ($k_{ex}^{298} = 4.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) est plus rapide que pour l'analogie bis aquo ($k_{ex}^{298} = 0.48 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). La valeur obtenue est comparable à celle du [Gd(DO3A)(H₂O)₂] ($k_{ex}^{298} = 6.25 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) et n'est probablement pas limitante à 200MHz, mais en comparaison, cette valeur est inférieure d'un facteur 4 à celle du complexe tris aqua basés sur les picolines [Gd(dpaa)(H₂O)₃] , ($k_{ex}^{298} = 29 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), et est également inférieur à celle du complexe bis aqua analogue [Gd(dpaba)(H₂O)₂] ($k_{ex}^{298} = 12.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). Ces deux complexes dérivés d'hydroxyquinoléines présentent donc des vitesses d'échange relativement basses si l'on considère leur nombre respectif de molécules d'eau. La détermination du mécanisme d'échange pourrait fournir de plus amples informations sur ces valeurs, notamment pour le complexe bis-aqua. En effet, si les complexes q = 2 étudiés jusqu'ici dans la littérature ont un mécanisme de type associatif, présentant une barrière énergétique plus basse que le mécanisme dissociatif, il serait possible que l'échange des molécules d'eau pour notre complexe passe par ce dernier mécanisme, expliquant ainsi la valeurs plus limitée de la vitesse d'échange.

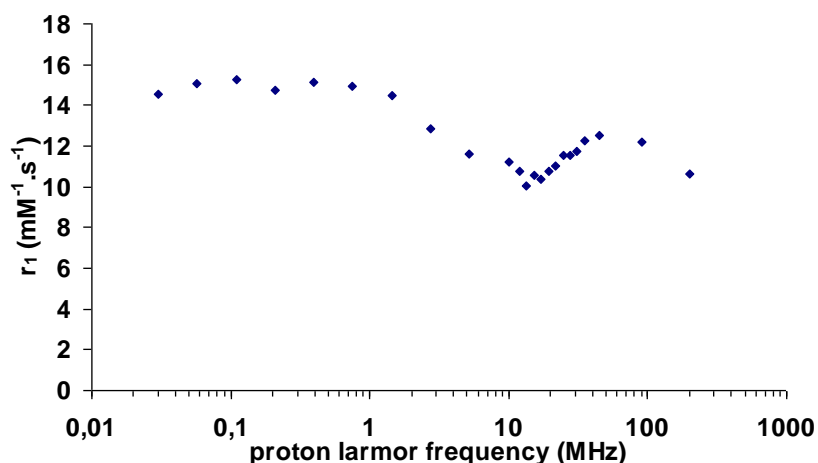


Figure 3.38 Profils NMRD du $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ dans l'eau à pH 7.4, 25°C

Si la relaxivité du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]$ est limitée par la vitesse d'échange, celle du complexe tris aqua est conforme aux valeurs attendues. La relaxivité théorique du complexe est calculée à partir des équations 3.12 à 3.19 et des paramètres reportés dans la tableau 3.14. Notons que la valeur du τ_R utilisée est différente de celle obtenu par les mesures RMN de l' ^{17}O . En effet, si l'on considère que la masse du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ est un peu plus faible que celle du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$, le temps de corrélation rotationnel du $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ doit être plus court. Or, les valeurs reportées dans le tableau 3.13 montre un temps de corrélation rotationnel de 217 ps supérieur aux 150 ps du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$. Une incertitude existant sur la valeur du τ_R déterminée expérimentalement, nous avons décidé de réévaluer cette valeur par rapport à celle, plus cohérente avec la taille des complexe, du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$, et le rapport des masse entre ces deux complexes. La valeur de τ_R a ainsi été estimée à 140ps. Nous n'avons pas pu confirmer la valeur estimée de τ_R par des mesures de temps de relaxation des protons comme précédemment (§ 1.3.1.2) car les spectres RMN des complexes n'étaient pas suffisamment résolus à cause du caractère fluxionnel de nos complexes. Cette estimation a été confirmée en fittant les relaxivités mesurées à 45, 90 et 200 MHz en utilisant la valeur de vitesse d'échange déjà déterminée ($4.02 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), et une distance Gd-H de 3.2 Å. Les valeurs de relaxivités obtenues par calcul en utilisant ces différents paramètres sont tout à fait un accord avec les relaxivités expérimentales et ces résultats sont présentés dans le tableau 3.15. Pour appuyer cette estimation, Vander Elst et al.⁶⁷ ont montré dans des travaux qu'il y avait une très bonne corrélation entre les valeurs de τ_R estimées à partir des données relaxométriques et les τ_R mesurés par des méthodes de coefficient de diffusion. Ceci nous permet donc de proposer des

valeurs de τ_R raisonnables en l'absence de mesure directe. La comparaison entre les relaxivités théoriques obtenues et les valeurs expérimentales nous permet ensuite de valider le choix de ces valeurs de τ_R .

La relaxivité du complexe à 20 MHz est de $10.75 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Il existe peu de complexes tris hydratés étudiés en détail dans la littérature, notamment du fait que la réduction de denticité du ligand entraîne une chute de la stabilité de ces complexes. Cependant, la valeur obtenue à 20 MHz peut être comparée avec les complexes $q = 3$ de types HOPO¹⁶, dont les relaxivités sont comprises entre 13.45 et $11.10 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La relaxivité de notre complexe est un peu inférieure, la vitesse d'échange des complexes HOPO étant bien supérieure à celle de notre complexe ($4.02 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, contre $160 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). Cependant cette valeur de relaxivité reste très bonne si on la compare au $[\text{Gd}(\text{EDTA})(\text{H}_2\text{O})_3]$ ($7.15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 20 MHz, 40°C), et est également supérieure à la valeur obtenue pour le $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ ($9.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 20 MHz). Cela s'explique par le temps de corrélation rotationnelle nettement plus long pour notre complexe (140 ps contre 79 ps pour le $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$). Cette valeur élevée de τ_R est d'ailleurs en accord avec l'allure général du profil qui montre une légère bosse entre 10 et 100 MHz, caractéristique d'une rotation assez lente (figure 3.38).

	Champ		
	45 MHz	90 MHz	200 MHz
$r_1^{\text{IS}} \text{ théo}$	10.42	10.37	10.13
$r_1^{\text{OS}} \text{ théo}$	1.66	1.62	1.55
$r_1 \text{ théo}$	12.08	11.99	11.68
$r_1 \text{ exp}$	12.54	12.22	10.65

Tableau 3.16 relaxivité longitudinale théorique calculée et relaxivité expérimentale du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ à 45, 90, et 200 MHz

Dépendance au pH

Le complexe de $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ présente une variation de relaxivité en fonction du pH, qui fait passer sa relaxivité de $7.50 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH = 4.5, à 4.40 à pH = 8. Comme nous l'avons noté précédemment, la plupart des études sur les sondes d'imagerie sensibles au pH se concentrent sur une gamme de pH comprise entre 6 et 8. Dans notre cas, la variation de relaxivité est assez faible dans cette gamme ($\Delta r_1 = 0.82 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Cependant, la forte variation à des pH plus bas peut avoir un intérêt et notamment mesurer les pH au sein des cellules (pH = 5.5–6 dans les endosomes, 4–5 dans les lysosomes)⁶⁸⁻⁷¹. Le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ ne présente, lui, aucune variation en fonction du pH. Ce résultat peut s'expliquer par la différence de basicité des oxygènes de ce ligand comparé à l'ensemble des

ligands étudiés précédemment. En effet, si cette variation de pH est associée à l'augmentation de la seconde sphère due à la formation de liaison hydrogène, le caractère plus acide des phénols joue un rôle important dans ce phénomène. Dans le cas du complexe $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ la moyenne des trois pKa associés à la protonation des oxygènes est de 9.22, alors que dans le cas des autres complexes qui présentent des variation de relaxivité en fonction du pH ($[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$, $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$, $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$) la moyenne de ces trois pKa est comprise entre 8.5 et 8.8. Cette différence notable d'acidité favorise la formation de liaisons hydrogènes et explique la variation de relaxivité en fonction du pH. On peut donc en conclure que le phénomène de seconde sphère observé pour les autres complexes n'a que très peu d'influence dans le cas du complexe tris hydraté.

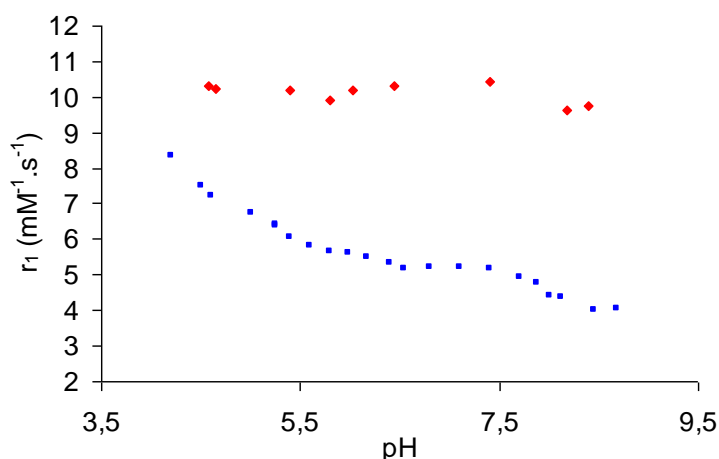


Figure 3.39 Variation de la relaxivité des complexes $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (■) et $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ (♦) en fonction du pH (25°C, 200MHz)

2.3.2. Influence des anions endogènes sur la relaxivité

De la même façon que précédemment (§ 1.3.2), l'influence des principaux anions endogènes sur la relaxivité des complexes a été étudiée. Les mesures ont été réalisées à 200 MHz avec 200 équivalents d'anions.

	[Gd(thqN-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻		[Gd(dhqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻	
	r ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	Δr ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	r ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	Δr ₁ (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
H ₂ O	5.16	-	10.65	-
Acétates	4.09	-1.07	-	-
Citrates	4.66	-0.50	10.79	+0.14
Carbonates	3.76	-0.29	5.62	-5.03
Oxalates	3.72	-1.45	4.56	-6.09
Phosphates	4.87	-1.40	-	-

Tableau 3.17 relaxivité longitudinale des complexes à 200MHz en présence d'anions endogènes (200 eq)

Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₂

Ce complexe est peu sensible à la coordination des anions endogènes et la diminution maximale de relaxivité est de 1.45 mM⁻¹.s⁻¹. Les anions phosphates et oxalates semblent être ceux qui présentent le plus d'affinité pour ce complexe. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus pour les complexes de [Gd-TREN-bisHOPO-TAM] fonctionnalisés¹⁶, qui présentaient une affinité notable pour ces deux même anions et une absence d'interaction avec les carbonates. Cependant, la faible diminution de relaxivité de ce complexe en présence d'anions représente une amélioration comparée au complexe de [Gd(DO3A)(H₂O)₂] dans lequel à la fois les phosphates et les carbonates déplacent au moins une molécule d'eau⁷². Pour les phosphates et les oxalates, la constante apparente de formation des complexes ternaires peut être déduite de la variation de la relaxivité moyenne des espèces en solution en fonction de la concentration en anions. Si l'équilibre est défini par GdL + A = GDLA, la relaxivité moyenne peut être définie par :

$$\bar{r}_1 = \frac{[GdL]_{eq}}{C_{Gd}} r_1^{(f)} + \left(1 - \frac{[GdL]_{eq}}{C_{Gd}}\right) r_1^{(b)}$$

avec C_{Gd} , la concentration totale en ions Gd(III), $[GdL]_{eq}$ la concentration de complexe à l'équilibre, $r_1^{(f)}$ la relaxivité du complexe libre et $r_1^{(b)}$ la relaxivité de l'adduit.

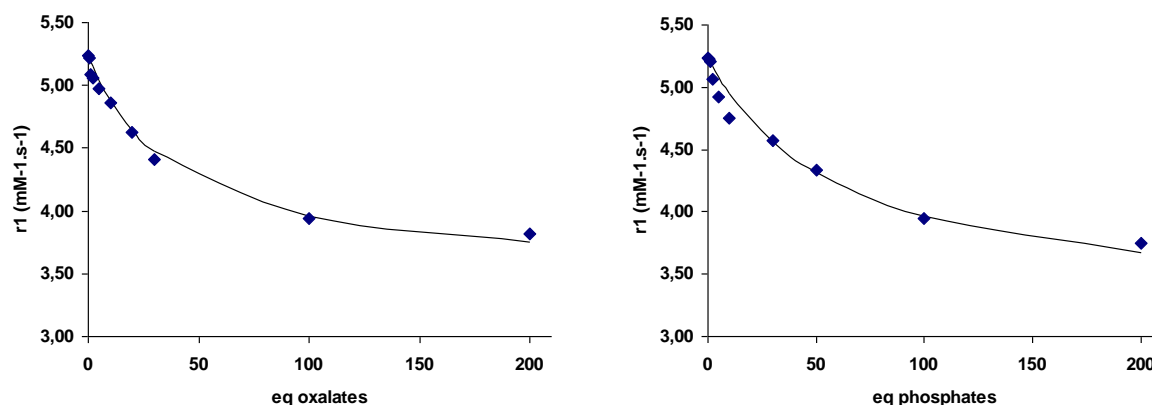


Figure 3.40 Courbes de titration de la relaxivité en fonction du nombre d'équivalent d'anions ajoutés (gauche : oxalates, droite : phosphates)

L'ajustement des courbes de titration du complexe permettent de définir les valeurs de ces constantes ($\log K = 1.9$ pour les oxalates et 1.7 pour les phosphates). En comparaison les constantes d'affinité pour ces deux mêmes anions pour les complexes de $[Gd-TREN-bisHOPO-TAM]$ fonctionnalisés sont comprises entre 1.0 et 2.9 ¹⁶.

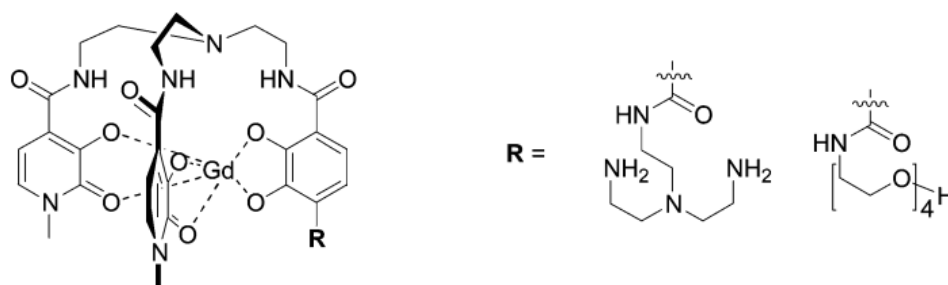


Figure 3.41 Complexes de $[Gd-TREN-bisHOPO-TAM]$ fonctionnalisés

La constante du $[Gd(DO3A)(H_2O)_2]$ avec les carbonates, avec lesquels l'interaction est assez forte présente une constante $\log K = 4.8$. Les agents commerciaux classiques, $[Gd(DOTA)(H_2O)]$. et $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ présentent des constantes avec les carbonates respectivement de 1.9 et 1.4 ³⁵. La relaxivité de notre complexe est donc relativement peu sensible à la complexation des anions endogènes. Le fait que notre complexe présente une charge négative importante (-3) pourrait en partie expliquer cet effet. Botta et al. ont montré

que dans la famille des complexes dérivés du DO3A, l'affinité du complexe pour les anions décroît à mesure que sa charge négative augmente⁷³. Le même effet est constaté entre deux complexes [Gd-TREN-bisHOPO-TAM], l'un chargé positivement, l'autre négativement.

[Gd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻

Contrairement à l'analogue bis-aquo, les interactions des complexes de [Gd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃] sont beaucoup plus sensibles à la coordination des anions. Le citrate, qui présente un mode de coordination tridentate, n'interagit pas du tout avec le complexe. Ceci est probablement dû à la taille de l'anion, qui est trop gros pour se complexer au centre métallique et remplacer les molécules d'eau. Par contre, les anions bidentates comme les oxalates et les carbonates interagissent fortement avec le complexe, entraînant une chute de relaxivité de $-5.03 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et de $-6.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement. Ces résultats sont en accord avec le remplacement de deux des trois molécules d'eau du complexe, et la relaxivité des complexes ternaires obtenus ($5.62 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les carbonates et $4.56 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les oxalates) correspondent à des valeurs de relaxivités de complexes mono-hydratés. Ces valeurs sont cohérentes avec les relaxivités obtenues dans les mêmes conditions pour les complexes de [Gd(dpaa)(H₂O)₃] ($5.08 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les carbonates et $4.95 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les oxalates) pour lesquels deux molécules d'eau étaient également déplacées. Cependant, le [Gd(dpaa)(H₂O)₃] interagissait également avec le citrate qui déplaçait les trois molécules d'eau du complexe. Dans notre cas, le citrate n'a aucune influence sur la relaxivité, le centre métallique étant probablement moins accessible.

2.3.3. Relaxivité dans l'albumine

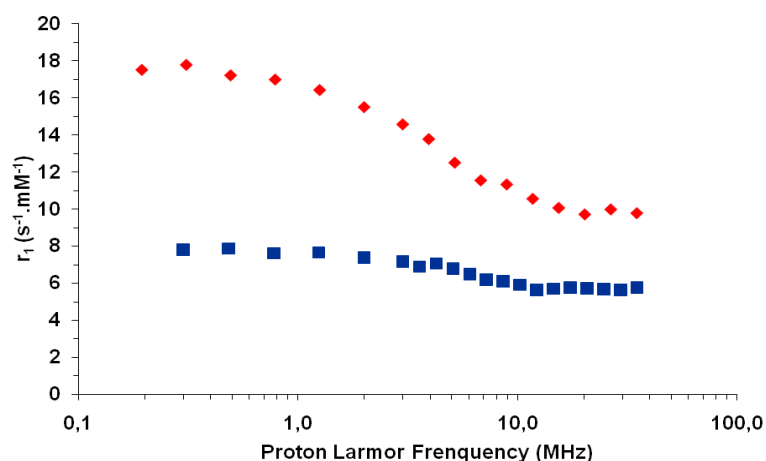


Figure 3.42 Profil NMRD de solution de complexes ($C^{\circ}_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ à 25°C et pH 7.4 en absence (■) et en présence (◆) de BSA ($C^{\circ}_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$)

Le profil du complexe en présence de BSA montre une nette augmentation de la relaxivité par rapport au profil mesuré dans l'eau. Cependant, une diminution de relaxivité est observée aux champs compris entre 10 et 35 MHz. La vitesse d'échange plutôt faible de ce complexe a un impact sur la relaxivité de l'adduit. En effet, les valeurs de τ_m optimales calculées pour des complexes macromoléculaires se situent entre 10 et 30 ns⁶⁰ quand notre complexe possède une valeur de τ_m de 2,1 μs .

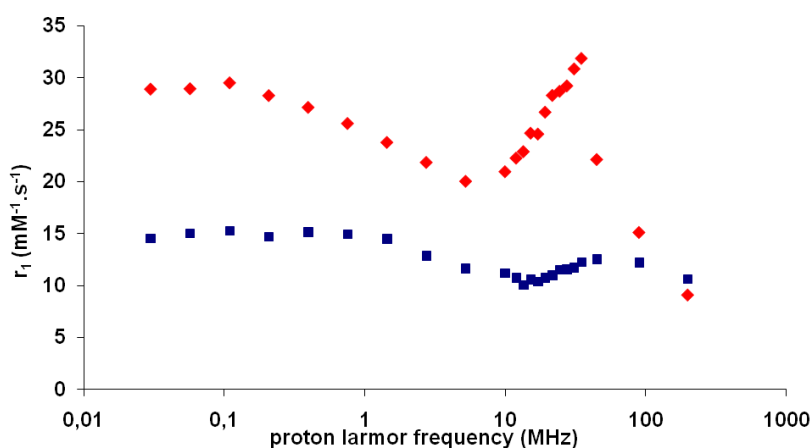


Figure 3.43 Profil NMRD de solution de complexes ($C^{\circ}_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ à 25°C et pH 7.4 en absence (■) et en présence (◆) de BSA ($C^{\circ}_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$)

Le profil du complexe tris aquo présente une large augmentation de relaxivité. La valeur de r_1 passe ainsi de $10.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau à $26.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence de BSA. Si l'on considère l'affinité de ce complexe pour les anions endogènes, on aurait pu craindre que les groupements carboxylates des chaînes latérales des acides aminés de la protéine déplace les molécules d'eau en première sphère de coordination, comme cela a été observé pour les complexes de $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]^{74}$. La valeur de la relaxivité du complexe de $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ en présence de BSA ne présente donc pas une augmentation importante de relaxivité, et est limitée à $13,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Notre complexe en comparaison, présente une valeur deux fois supérieure, signe que les molécules d'eau de première sphère ne sont pas toutes complètement déplacées. Le profil de notre complexe présente l'allure d'un complexe tournant très lentement, avec un maximum de relaxivité à 35MHz de l'ordre de $32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La vitesse d'échange de notre complexe est cependant plus lente que celle du $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ (4×10^6 contre $29 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$) et limite la relaxivité de l'adduit.

2.3.4. Relaxivité dans avec le sérum

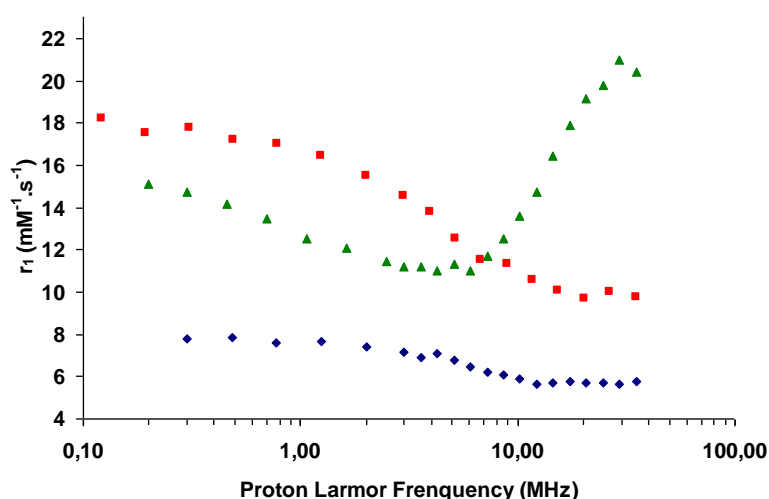


Figure 3.44 Profil NMRD de solution de complexes ($C^\circ_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ à 25°C à pH 7.4 dans H_2O (◆), en présence (■) de BSA ($C^\circ_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$), et dans le sérum (▲).

Le profil de relaxivité obtenu dans le sérum est assez surprenant. En effet, les résultats précédemment obtenus avec les anions tendent à montrer que leur influence sur la relaxivité, bien qu'existante, est relativement faible. Le profil attendu dans le sérum devrait ressembler à

celui en présence de BSA, avec une éventuelle légère diminution due à l'effet des anions. Si à bas champ, le relaxivité du complexe est inférieure à celle obtenu avec la BSA, au dessus de 7 MHz, la relaxivité du complexe est supérieur dans le sérum et atteint une valeur maximale de $21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 30MHz.

<i>Anions</i>	$r_1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$\Delta r_1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
BSA	9.8	-
BSA + tampon TRIS	11.3	1,6
BSA+ tampon PBS	11.3	1,5
BSA+ anions	6.0	-3,7
BSA+ NaCl	9.3	-0,5
Sérum	20.4	10,7

Tableau 3.18 relaxivités longitudinales du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3+}$ à 25°C et 35MHz dans différentes conditions.

Pour essayer de comprendre d'où pouvait venir cette augmentation de relaxivité entre 10 et 35 MHz, des mesures ont été effectuées dans diverses conditions en présence de BSA, pour simuler les conditions du sérum. Les valeurs obtenues sont résumées dans le tableau 3.18. Si la présence de tampon (PBS ou TRIS-HCl) semble améliorer la relaxivité du complexe en présence de BSA, la valeur obtenue n'en reste pas moins largement inférieure à celle obtenue dans le sérum. En présence d'un mélange d'anions de concentrations similaire à celle du sérum (voir tableau 3.10), la relaxivité est diminuée et se rapproche de la valeur obtenue dans l'eau. Les anions semblent plutôt avoir une influence négative sur la relaxivité en présence de BSA. La valeur obtenue dans une solution saline isotonique au sérum ($9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl), est quasiment similaire à celle obtenue avec la BSA seule. Aucune expérience n'a permis d'atteindre les valeurs obtenues dans le sérum. Une étude plus approfondie du complexe dans la BSA et le sérum (mesure du nombre de molécules d'eau et de la vitesse d'échange) serait nécessaire pour comprendre la nature du phénomène qui induit cette augmentation de relaxivité. Le sérum est un milieu complexe et ces différents constituants peuvent avoir des conséquences surprenantes sur la relaxivité.

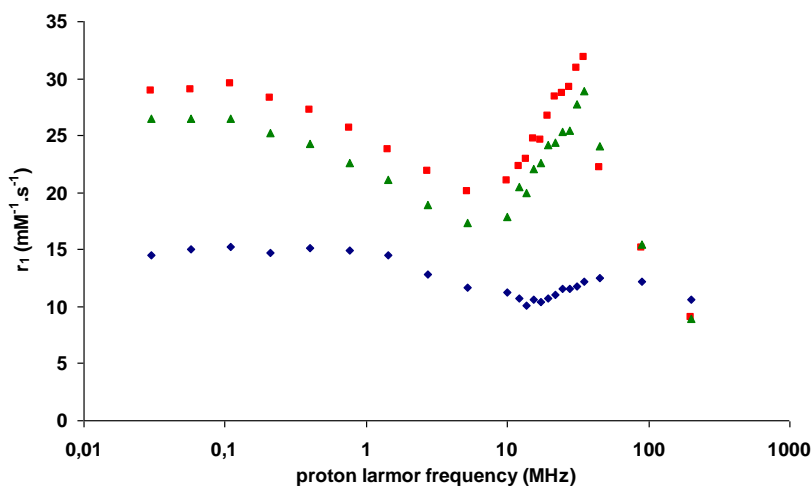


Figure 3.45 Profil NMRD de solution de complexes ($C^{\circ}_{\text{GdL}}=0.2\text{mM}$) $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ à 25°C à pH 7.4 dans H_2O (\blacklozenge), en présence (\blacksquare) de BSA ($C^{\circ}_{\text{BSA}} = 0.68\text{mM}$), et dans le sérum (\blacktriangle).

Le complexe de $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ présente un profil plus attendu dans le sérum, similaire à celui de la BSA avec simplement une légère diminution de relaxivité probablement due à l'interaction avec les anions. Malgré une forte affinité pour les anions, la relaxivité de ce complexe reste importante en milieu biologique et atteint une valeur de $28,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En comparaison avec un autre complexe tris aqua, cette valeur est 60% supérieure à celle du $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$.

2.3.5. Images IRM

Ces images ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Miche De Waard à l'institut des neurosciences de Grenoble. Pour comparer la rétention de nos complexes $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ au sein des tissus cérébraux, des solutions de 10 μL de solution de concentration 1 mM en complexe ont été injectées directement dans le striatum de rats âgés de sept semaines (figure 3.46). De la même façon, une solution de Dotarem (10 μL à 1 mM) a été injectée pour servir de référence. Comme le montre la figure 3.46, les trois complexes permettent l'obtention d'un bon contraste 15 minutes après l'injection. Après environ 4 heures, le signal du Dotarem a quasiment disparu, alors que l'intensité du signal est toujours mesurable pour nos deux complexes $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ et $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$. Plusieurs images ont été réalisées à intervalles réguliers et

l'analyse des données permet d'obtenir l'intensité du signal en fonction du temps (figure 3.46). Ces courbes montrent que, d'une part, la décroissance du signal est plus rapide dans le cas du Dotarem que dans le cas de nos complexes, qui présentent une rétention plus importante au sein des tissus cérébraux. D'autre part, l'intensité du signal pour nos complexes est bien plus élevée que le Dotarem, confirmant la relaxivité plus élevée de nos complexes bis et tris hydraté en comparaison d'un agent de contraste commercial comme le Dotarem.

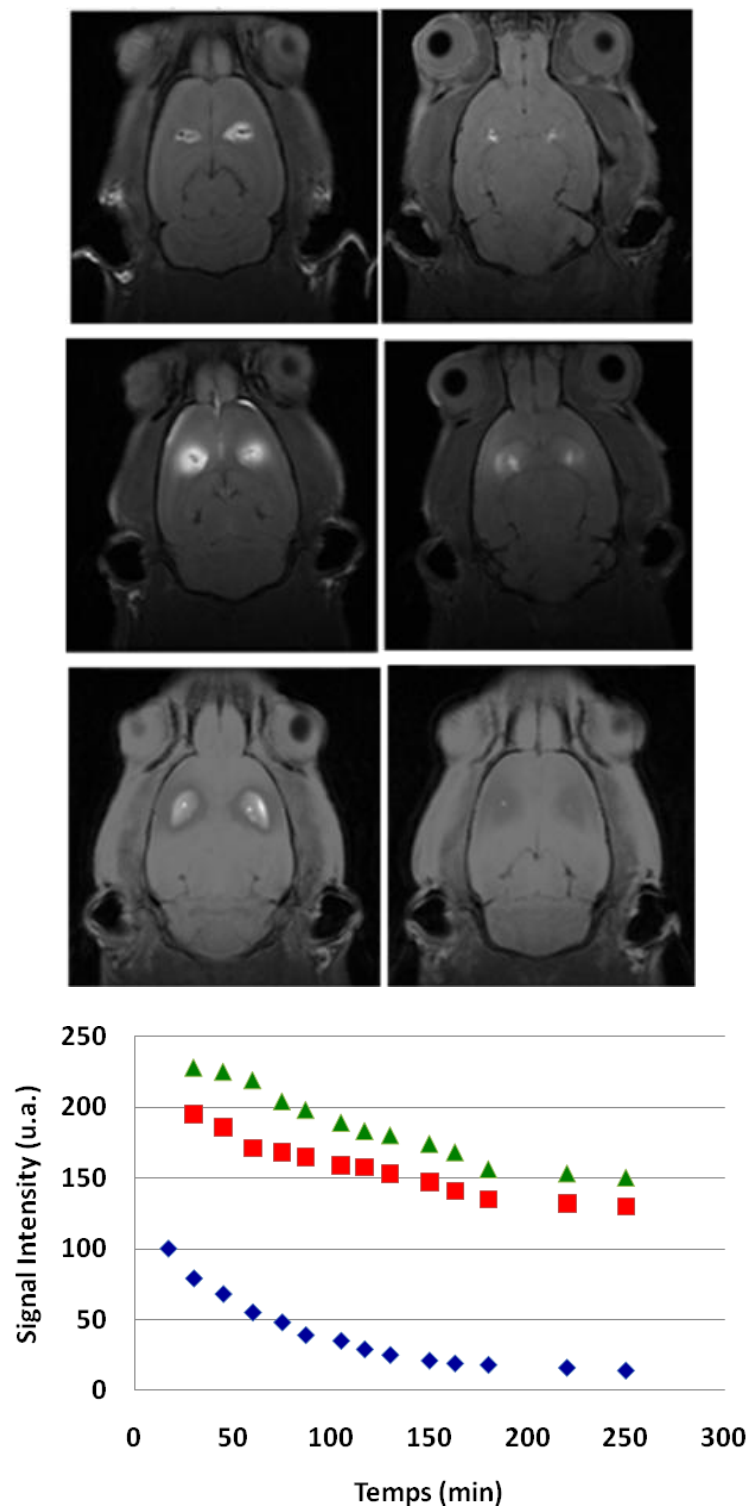


Figure 3.46 Images IRM pondérées T_1 de cerveaux de rat à 7 T (1 mM, 10 μ L) de $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ à 15 minutes et 250 minutes (A), de $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ à 15 minutes et 250 minutes (B) et de Dotarem à 15 minutes et 250 minutes (C). A droite, graphique de l'intensité du signal en fonction du temps pour le Dotarem(\blacklozenge), le $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ (\blacksquare) et le $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ (\blacktriangle)

3. Complexes de H₃dhqN-gly et H₄dhqN-asp

Les ligands H₃dhqN-gly et H₄dhqN-asp ont été synthétisés comme analogue du H₃thqN, en partant respectivement de la glycine et de l'acide aspartique. Le but de cette modification était d'obtenir une augmentation de solubilité des complexes de lanthanides correspondant, par la présence de bras carboxylates, pour obtenir des complexes hydrosolubles sans sulfonates. Les ligands obtenus présentent une solubilité dans l'eau bien meilleure que le H₃thqN, qui n'était que très peu soluble à pH 7.4. Mais lors de la synthèse des complexes de lanthanides en milieu aqueux, les complexes formés [Gd(dhqN-gly)(H₂O)₃] et [Gd(dhqN-asp)(H₂O)₂] précipitent instantanément, l'absence de charge pour l'un et la présence d'une seule charge négative pour l'autre ne permettent pas de solubiliser suffisamment ces espèces, qui comportent chacune deux unités hydroxyquinoléines plutôt hydrophobes.

Des études en RMN et en relaxivité ont cependant été menées pour ces deux composés.

3.1. Etude structurales en solutions

3.1.1. Etude RMN

3.1.1.1. Ligand H₃dhqN-gly

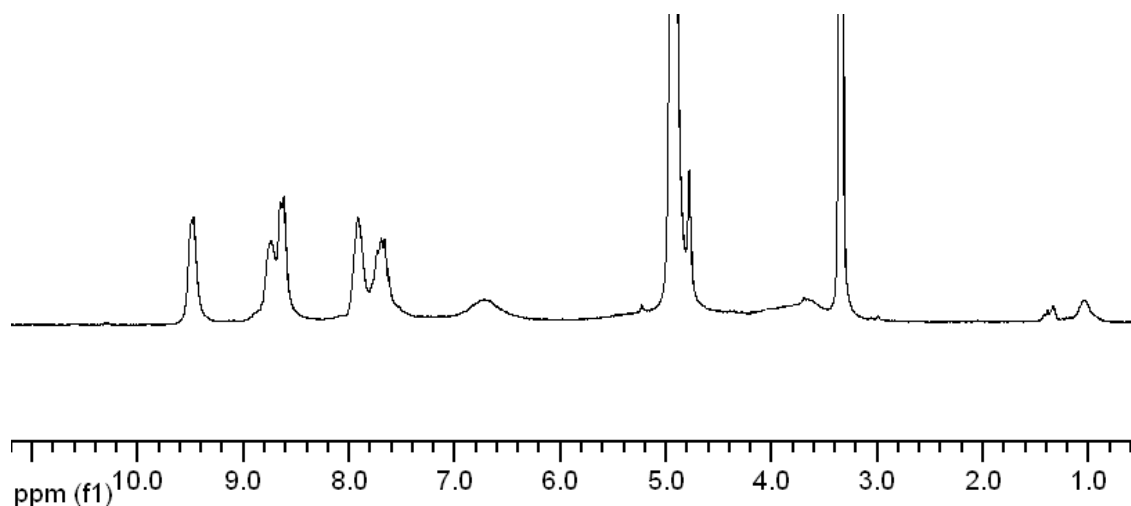


Figure 3.47 Spectre RMN ¹H du complexe de [Nd(dhqN-gly)] dans MeOD à 25°C

Le complexe est synthétisé in situ dans le méthanol deutéré en ajoutant un équivalent de Nd(OTf)₃ à un équivalent de ligand et en les faisant réagir avec 3 équivalents d'une solution de KOD dans le méthanol deutéré. Sur ce spectre il est possible d'observer les résonances

des protons correspondant à l'hydroxyquinoléine (9.50, 8.77, 8.65, 7.91, 7.67). Les signaux plus « larges » correspondent aux protons éthyléniques des bras quinoléines et carboxylates, mais la largeur de ces signaux semble indiquer que le composé est relativement fluxionnel à température ambiante. Ce comportement est en accord avec ce qui a été observé précédemment en solution pour les complexes présentant une structure avec un azote central, qui présentent toujours une certaine flexibilité à température ambiante.

3.1.1.2. Ligand H₄dhqN-asp

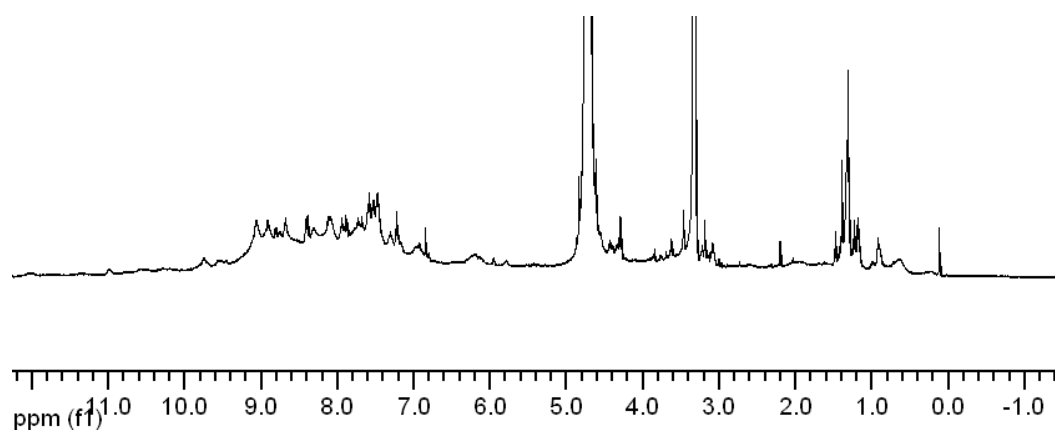


Figure 3.48 Spectre RMN ¹H du complexe de [Nd(dhqN-asp)] dans MeOD à 40°C

Le complexe de [Nd(dhqN-asp)] est synthétisé in situ comme décrit précédemment, en ajout 4 équivalent de KOD. Le spectre RMN obtenu présente un composé fluxionnel et aucun pic ne peut être facilement attribué. Une étude en température sur la gamme 70°C-5°C ne permet pas d'obtenir des spectres plus figés en vue d'une éventuelle attribution.

3.2. Etude de la relaxivité des complexes

3.2.1. Relaxivité des complexes

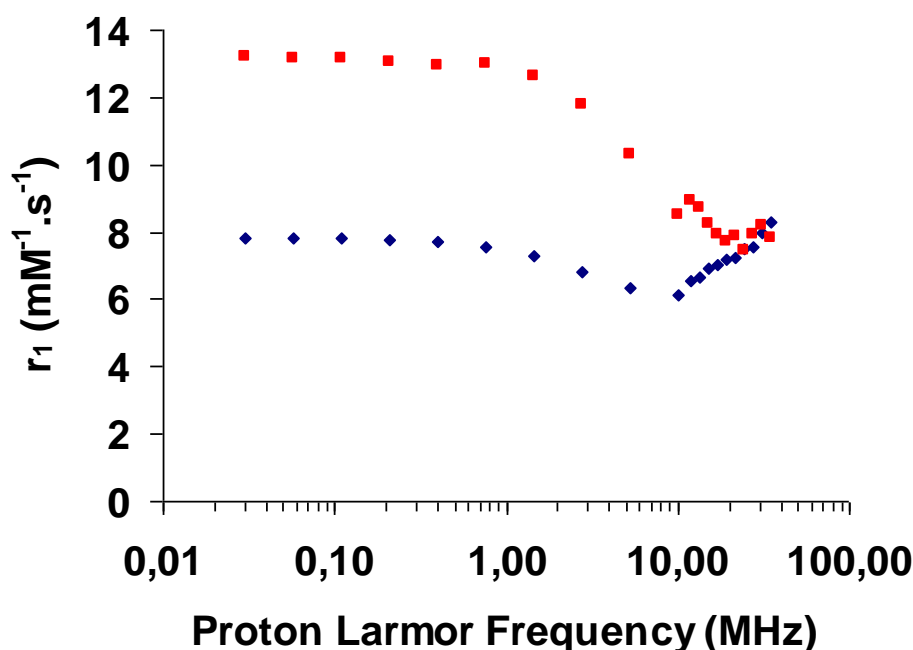


Figure 3.49 Profil NMRD de solution de complexes à 25°C à pH 7.4 dans H₂O + 25% DMSO de [Gd(dhqN-gly)(H₂O)₃] (◆), [Gd(dhqN-asp)(H₂O)₂]⁻ (■)

Les profils NMRD des complexes sont mesurés dans l'eau avec 25% de DMSO afin de pouvoir les solubiliser. Les relaxivité sont corrigées en fonction de la viscosité du DMSO (1996 Pa.s). Notons qu'une partie du signal est due à la relaxation des protons du DMSO, ce qui rend l'interprétation difficile. Le profil obtenu pour le complexe de [Gd(dhqN-asp)(H₂O)₂]⁻ est en accord avec un profil classique pour un complexe $q = 2$ et ressemble en particulier au profil obtenu pour le complexe analogue dérivés de picolinate [Gd(dpaba)(H₂O)₂]⁻. La modification d'un des bras hydroxyquinoléine semble favoriser une vitesse d'échange des molécules d'eau plus rapide que l'analogue bis aquo [Gd(thqN-SO₃)(H₂O)₂]³⁻ dont la relaxivité était limitée par une vitesse d'échange lente. La relaxivité à 20 MHz du complexe atteint $7.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, et est en accord avec la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination. L'introduction des carboxylates semble modifier l'allure générale du profil et avoir une influence sur la relaxation électronique à bas champ, l'écart entre les valeurs de relaxivité à 20 MHz et à bas champs est plus important que dans le

profil du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$. Concernant le $[\text{Gd}(\text{dhqN-gly})(\text{H}_2\text{O})_3]$, le profil n'atteint pas les valeurs attendue pour un complexe $q = 3$. L'écart en les valeurs à bas champs et à 20 MHz semble plus proche du profil obtenu pour le $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$. L'absence de charge sur ce complexe conduit à une solubilité faible pour ce complexe et l'ajout de 25% de DMSO permet à peine d'obtenir la solubilité du produit dans l'eau. Cependant, le profil montre une inflexion entre 20 et 30 MHz, caractéristique d'une rotation lente. La relaxivité passe ainsi de $6.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20MHz à $8.2 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 30MHz. Cependant, la faible solubilité de ce complexe, notamment due à l'absence de charge négative, empêche d'interpréter plus en détail ce profil.

4. Complexes dérivés de l'homosérine

Nous avons vu précédemment qu'un des paramètres pour améliorer la relaxivité consiste à augmenter le temps de corrélation rotationnel τ_R . L'optimisation de ce paramètre conduit à se diriger vers des complexes plus gros. Cette augmentation de la taille des complexes est souvent, comme nous l'avons précédemment, obtenue par la formation d'adduit en solution entre le complexe et une macromolécule, comme par exemple la BSA.

Une étude a été menée pour produire des complexes plus lourds, en synthétisant un dérivé du $[\text{Gd}(\text{dpaa})]$ et en y greffant différents acides nucléiques, avec à terme, la possibilité d'effectuer le même type de greffages avec des brins d'ADN regroupant 10 à 15 bases azotés, et qui pourraient permettre d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne sur l'allongement du τ_R . Ce projet a été mené en collaboration avec Christelle Gâteau pour la synthèse des complexes et l'équipe de Didier Gasparutto pour la synthèse d'oligomères.

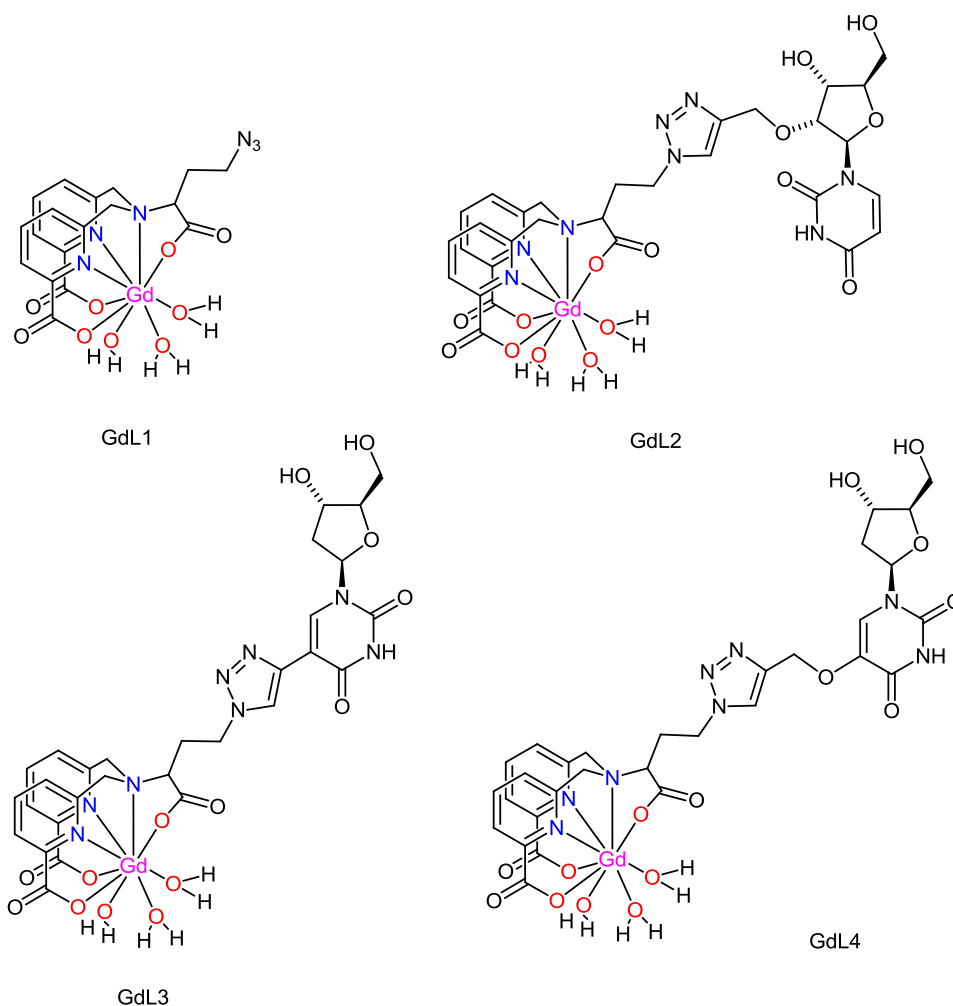


Figure 3.50 Complexes dérivés du $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$

Le choix du complexe de départ s'est porté sur le $[Gd(dpaa)(H_2O)_3]$ pour différentes raisons. Ce complexe possède trois molécules d'eau et une haute relaxivité⁷⁴ ($9.62 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, à 200 MHz), ainsi qu'une vitesse d'échange $k_{ex} = 10 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ suffisamment rapide pour ne pas être limitante dans le cas d'un gros complexe. En effet, si le temps de résidence d'une molécule d'eau est suffisamment court, c'est le temps de relaxation intrinsèque T_{1m} qui va déterminer la relaxivité. Or T_{1m} dépend à la fois de la vitesse d'échange des molécules d'eau et d'autres paramètres du complexe, lié à la rotation et à la relaxation électronique du complexe. En plus de présenter des bonnes propriétés de relaxivité, le dpaa est capable de sensibiliser le Tb(III) et l'Eu(III) avec des rendements quantiques relativement bons si l'on considère la présence de trois molécules d'eau en première sphère (respectivement 22% et 1.5 %)⁷⁴. Enfin, la synthèse d'analogue de ce complexe présentant un bras autorisant le greffage sur une autre molécule est rendu possible en remplaçant la glycine par l'homosérine, ce qui permet de conserver la sphère de coordination du complexe inchangée et de préserver les propriétés de relaxivités.

Les complexes ont été préparés en faisant réagir un équivalent de $GdCl_3$ avec un équivalent de ligand dans une solution de formiate d'ammonium. Les complexes sont ensuite purifiés par HPLC préparatrice puis lyophilisés. Une préparation alternative des complexes a été réalisée en déprotonnant le ligand dans une solution de KOH aqueuse puis en ajoutant le lanthanide, la purification étant effectuée par HPLC préparatrice dans un mélange acétonitrile / eau. Des mesures de relaxivités ont été effectuées sur des complexes de Gd(III) utilisant ces deux types de préparations et les relaxivités obtenues ont montré l'absence d'effet du formiate d'ammonium sur le complexe. Cette préparation a ensuite été appliquée pour l'ensemble des complexes synthétisés.

Complexe	condition	r_1 ($mM^{-1}.s^{-1}$)
GdL1	H ₂ O/KOH	10.78
	Formiate d'ammonium	10.81
GdL2	H ₂ O/KOH	16.40
	Formiate d'ammonium	16.09

Tableau 3.19 Relaxivité des complexes GdL1 et GdL2 en fonction de leur mode préparation.

Différents ligands dérivés du ligand L1 ont été synthétisés par le Dr. Christelle Gateau par chimie « click » en utilisant des dérivés du D-uracile. Le nucléoside a été attaché au ligand de deux façons différentes, soit en étant relié à la position 2' du D-ribose, soit en étant relié à la position 5 de l'uracile (respectivement L2 et L4). Une variante avec un bras plus long comportant un oxygène de la liaison en position 5 de l'uracile conduit au dérivé L3. Ces modifications ont pour but de voir l'influence, à la fois de la position de greffage sur le nucléoside ainsi que de la longueur de la chaîne, sur la rotation du complexe et donc la valeur de τ_R .

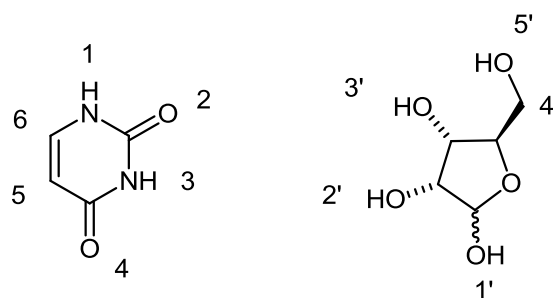


Figure 3.51 Numérotation des positions de l'uracile et du ribose.

Complexes	MW	r_1 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
GdL1	622	10.81
GdL2	904	16.09
GdL3	874	15.94
GdL4	904	16.08

Tableau 3.20 Relaxivités des complexes GdL1 à GdL4 à 200MHz, 25°C, et leurs masses moléculaires associées

La relaxivité obtenu pour le GdL1, est relativement proche de celle obtenu pour le $[\text{Gd}(\text{dpaa})(\text{H}_2\text{O})_3]$ ($r_1 = 9.62 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) et confirme que la modification du bras n'as pas entraîné de changement dans la sphère de coordination. La relaxivité des différents complexes comprenant un nucléoside est nettement augmentée par rapport au complexe non greffé. Les trois complexes atteignent une valeur de relaxivité autour de $16 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cependant la position de greffage du nucléoside ne semble pas avoir d'influence sur la relaxivité et aucune des variantes envisagées ne semble apporter un surcroit de rigidité au complexe. Les valeurs de relaxivité obtenues pour ces complexes sont particulièrement élevées et peuvent être comparées à celle obtenues dans la littérature pour des complexes présentant trois molécules d'eau en première sphère de coordination. Raymond et al. ont publié plusieurs complexes dérivés du Gd-TREN-bisHOPO-TAM présentant trois molécules d'eau en première sphère de coordination. Pour les quatre complexes présentés en figure 3.50, les relaxivités à 20MHz sont comprises entre $11.10 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $13.45 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Même si ces valeurs ont été obtenues à un champ plus bas que celui utilisé pour nos mesures, l'effet du temps de corrélation rotationnel étant maximal autour de 30 MHz et s'estompe à mesure que le champ augmente, les valeurs de relaxivités obtenues à haut champ sont particulièrement remarquables.

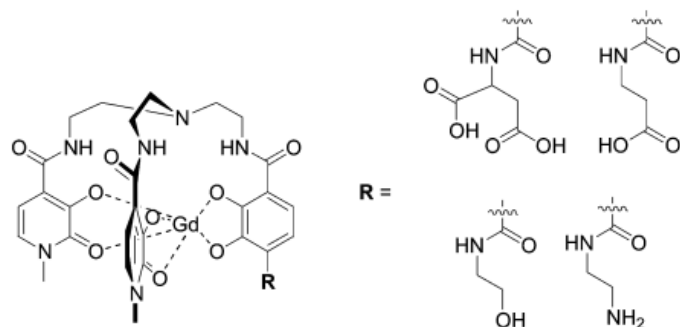


Figure 3.52 Complexe de Gd-TREN-bisHOPO-TAM fonctionnalisés comportant trois molécules d'eau en première sphère de coordination

Les résultats obtenus avec le greffage d'un nucléoside étant particulièrement encourageant, un protocole de greffage sur support a donc été développé. La synthèse des oligonucléides sur support a été mise au point au sein de laboratoire de lésions des acides nucléiques (LAN) et est couramment utilisé pour la synthèse de brin d'ADN et l'étude des dommages et des réparations de celui-ci. L'adaptation de ce protocole a permis la synthèse d'un dinucléotide monophosphate TpU terminé par un groupement aryle permettant de greffer par chimie « click » le dérivé azide de la dpaa.

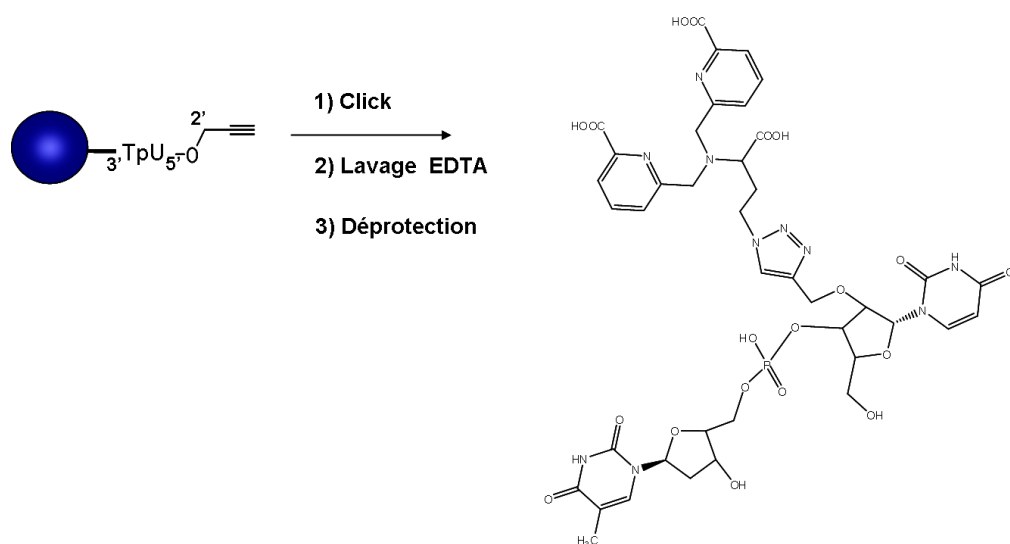


Figure 3.53 Représentation schématique de la synthèse des dérivés dinucléotides du ligand dpaa

De la même façon il a été possible d'obtenir le greffage du ligand dpaa sur un oligomère comportant 15 bases (figure 3.54).

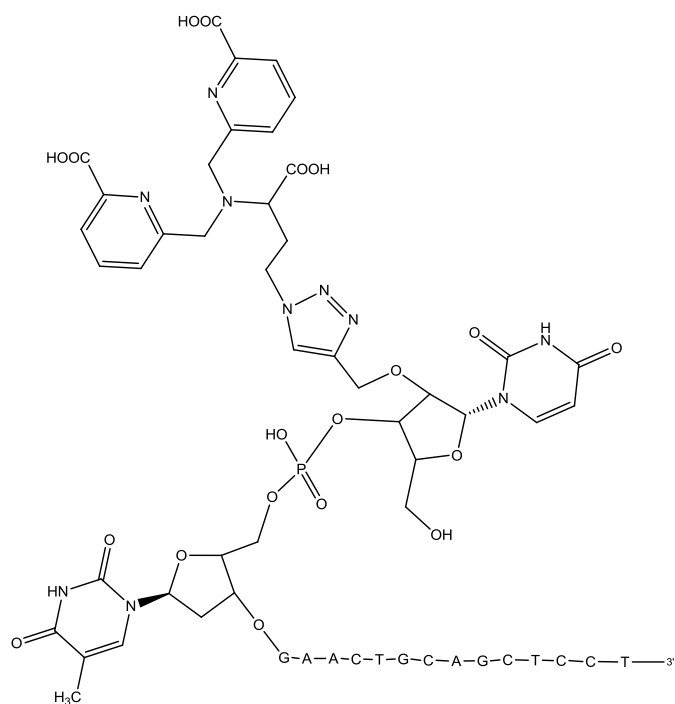


Figure 3.54 Ligand dpaa greffé sur un oligomère comportant une séquence de 15 bases.

Les différents produits obtenus ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF, et ont ensuite été utilisés pour obtenir les complexes de gadolinium correspondants. Lors des premiers essais, les analyses MALDI-TOF des complexes ont permis d'identifier le pic de masse correspondant au complexe (1151 Da pour le dinucléoside, 5540 Da pour le 15-mère). Malheureusement, les faibles quantités obtenues ne nous ont pas permis de poursuivre les études de relaxivité sur ces complexes.

La synthèse de ces composés ouvre des perspectives vers l'optimisation de la valeur du temps de corrélation rotationnel τ_R pour des complexes de Gd(III) utilisés à haut champ. En effet, si la valeur optimale de ce paramètre est relativement élevée à 30MHz (supérieur à 1ns), la relaxivité à haut champ est maximale pour des valeurs de τ_R plus limitées (400-800 ns). Il est donc plus facile de se rapprocher de cette valeur à haut champ et c'est dans ce sens que la synthèse de ces complexes montre un progrès, et nous permet d'augmenter la relaxivité de $5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ par le greffage d'un seul nucléoside pour des complexes tris aqua. Il sera intéressant par la suite d'étudier l'influence de la rigidité des systèmes obtenus sur l'augmentation de τ_R et donc son impact sur la relaxivité.

Bibliographie

- (1) Gateau, C.; Mazzanti, M.; Pécaut, J.; Dunand, F., A; Helm, L. *Dalton Trans.* **2003**, 2428-2433.
- (2) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, 7133-7150.
- (3) Platas, C.; Mato-Iglesias, M.; Djanashvili, K.; Muller, R. N.; Elst, L. V.; Peters, J. A.; De Blas, A. ; Rodriguez-Blas, T. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3579-3590.
- (4) Nonat, A.; Imbert, D.; Pécaut, J.; Giraud, M.; Mazzanti, M. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4207-4218.
- (5) Laurent, S.; Elst, L. V.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C. *Bioorg. Med. Lett.* **2007**, *17*, 6230-6233.
- (6) Pellegatti, L.; Zhang, J.; B.Drahos; S.Villette; Suzenet, F.; G.Guillaumet; Petoud, S.; Toth, E. *Chem. Commun.* **2008**, 6591-6593.
- (7) Gawron, O. D., M.; Grelechi, C.J. *Anal. Chem.* **1952**, *24*, 969.
- (8) Schmidt, H.; Lensink, C.; Xi, S. K.; Verkade, J. G. *Z. Anal. Chem.* **1989**, 578-75-80.
- (9) Brunisholz, G.; Randin, M. *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1927.
- (10) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.
- (11) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; University of Leeds and University of Florence: Leeds, UK and Florence, Italy, 2000.
- (12) Comby, S.; Imbert, D.; Vandevyver, C.; Bünzli, J. C. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 936-944.
- (13) Comby, S.; Imbert, D.; Chauvin, A. S.; Bünzli, J. C. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 732-743.
- (14) Yang, R.; Zompa, L. J. *Inorg. Chem.* **1976**, *15*, 1499.
- (15) Dan, M.; Doble, J.; Melchior, M.; O'Sullivan, B.; Siering, C.; Xu, J.; Pierre, V. C.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4930-4937.
- (16) Pierre, V. C.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8355-8364.
- (17) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.

- (18) Barnhart, J. L.; Kuhnert, N.; Bakan, D. A.; Berk, R. N. *Magn. Reson. Imag.* **1987**, 221-231.
- (19) Docherty, R. J. *J. Physiol. (Lond.)*, **1988**, 33-34.
- (20) Laurent, S.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Contrast Med. Mol. Imag.*, **2006**, *1*, 128-137.
- (21) Caravan, P.; Greenfield, M. T.; Li, X.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6580-7.
- (22) Messeri, D.; Lowe, M. P.; Parker, D.; Botta, M. *Chem. Commun.* **2001**, 2742-2743.
- (23) Fulton, D. A.; Elemento, E. M.; Aime, S.; Chaabane, L.; Botta, M.; Parker, D. *Chem. Commun.* **2006**, 1064-1066.
- (24) Botta, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 399-407.
- (25) Aime, S.; Batsanov, A. S.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Parker, D.; Senanayake, K.; Williams, G. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4696-4706.
- (26) Rudovsky, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukes, I.; Mainero, V.; Aime, S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 112-117.
- (27) Fries, P. H. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 224103.
- (28) Kalman, F. K.; Woods, M.; Caravan, P.; Jurek, P.; Spiller, M.; Tircso, G.; Kiraly, R.; Brucher, E.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5260-70.
- (29) Zhang, S.; Wu, K.; Sherry, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3192-3194.
- (30) Lowe, M. P.; Parker, D.; Reany, O.; Aime, S.; Botta, M.; Castellano, G.; Gianolio, E.; Pagliarin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7601-7609.
- (31) Rofstad, E. K.; Mathiesen, B.; Kindem, K.; Galappathi, K. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6699.
- (32) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Gabelle, A.; Gambarelli, S.; Delangle, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10401-10413.
- (33) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Delangle, P. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8770-8781
- (34) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Seneque, O.; Cisnetti, F.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Delangle, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *25*, 7083-7093.
- (35) Merbach, A. E. T., E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Wiley: Chichester, 2001., Ed.
- (36) Abragam, A. *Les Principes du Magnétisme Nucléaire*; Presses Universitaires de France: Paris, 1961.

- (37) Rast, S.; Fries, P. H.; Belorizky, E.; Borel, A.; Helm, L.; Merbach, A. E. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 7554-7563.
- (38) Jocher, C. J.; Moore, E. G.; Xu, J. D.; Avedano, S.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 9182-9191.
- (39) Powell, D. H.; NiDhubhghaill, O. M.; Pubanz, D.; Helm, L.; Lebedev, Y. S.; Schlaepfer, W.; Merbach, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9333-9346.
- (40) *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*; Merbach, A. E.; Toth, E., Eds.; Wiley: New York, 2001.
- (41) Aime, S.; Botta, M.; Fedeli, F.; Gianolio, E.; Terreno, E.; Anelli, P. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5262-5269.
- (42) Swift, T. J.; Connick, R. E. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307-320.
- (43) Atkins, P. W. *Phys. Chem.* Oxford University Press: Oxford, 1992.
- (44) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Delangle, P. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8770-8781.
- (45) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.
- (46) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Gadelle, A.; Gambarelli, S.; Delangle, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10401-10413.
- (47) Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Seneque, O.; Cisnetti, F.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Delangle, P. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7083-7093.
- (48) Ayant, Y.; Belorizky, E.; Alizon, J.; Gallice, J. *J. Phys. (Paris)* **1975**, *36*, 991-1004.
- (49) Hwang, L. P.; Freed, J. H. *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 4017-4025.
- (50) Caravan, P. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 851-862.
- (51) Dickins, R. S.; Aime, S.; Batsanov, A. S.; Beeby, A.; Botta, M.; Bruce, J.; Howard, J. A. K.; Love, C. S.; Parker, D.; Peacock, R. D.; Puschmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12697-12705.
- (52) Aime, S.; Botta, M.; Bruce, J. I.; Mainero, V.; Parker, D.; Terreno, E. *Chem. Commun.* **2001**, 115-116.
- (53) Bruce, J. I.; Dickins, R. S.; Govenlock, L. J.; Gunnlaugsson, T.; Lopinski, S.; Lowe, M. P.; Parker, D.; Peacock, R. D.; Perry, J. J. B.; Aime, S.; Botta, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9674-9684.
- (54) *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications* Academic Press: San Diego, CA, **1995** Peters, T., Ed.

- (55) Carter, D. C.; Ho, J. X. *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 152-203.
- (56) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209-215.
- (57) Caravan, P.; Cloutier, N. J.; Greenfield, M. T.; McDermid, S. A.; Dunham, S. U.; Bulte, J. W.; Amedio, J. C., Jr.; Looby, R. J.; Supkowski, R. M.; Horrocks, W. D., Jr.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3152-62.
- (58) Henrotte, V.; Elst, L. V.; Laurent, S.; Muller, R. N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 929-937.
- (59) Aime, S.; Gianolio, E.; Terreno, E.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Sisti, M.; Palmisano, G.; Botta, M.; Lowe, M. P.; Parker, D. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 488-497.
- (60) Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 19-29.
- (61) Caravan, P.; Amedio, J. C.; Dunham, S. U.; Greenfield, M. T.; Cloutier, N. J.; McDermid, S. A.; Spiller, M.; Zech, S. G.; Looby, R. J.; Raitsimring, A. M.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5866-5874.
- (62) Bretonnière, Y.; Mazzanti, M.; Pécaut, J.; Dunand, F. A.; Merbach, A. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6737.
- (63) Bretonniere, Y.; Mazzanti, M.; Pecaut, J.; Dunand, F. A.; Merbach, A. E. *Chem. Commun.* **2001**, 621-622.
- (64) Moriggi, L.; Cannizzo, C.; Prestinari, C.; Berriere, F.; Helm, L. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 8357-66.
- (65) Aime, S.; Calabi, L.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Losi, P.; Maiocchi, A.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7588-90.
- (66) Toth, E. Ä.; Ni Dhubhghaill O. M.; Besson G.; Helm, L.; Merbach, A. E. *Magn. Reson. Chem.* **1999**, *37*, 701.
- (67) Vander Elst, L.; Sessoye, A.; Laurent, S.; Muller, R. N. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 574-587.
- (68) Lin, H. J.; Herman, P.; Kang, J. S.; Lakowicz, J. R. *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 118-125.
- (69) McNamara, K. P.; Nguyen, T.; Dumitrascu, G.; Ji, N. R.; Rosenzweig, Z. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3240-3246.
- (70) Jiang, X.-J.; Lo, P.-C.; Yeung, S.-L.; Fong, W.-P.; Ng, D. K. P. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3188-3190.
- (71) Tang, B.; Liu, X.; Xu, K. H.; Huang, H.; Yang, G. W.; An, L. G. *Chem. Commun.* **2007**, 3726-3728.

- (72) Supkowski, R. M.; Jr., W. D. H. *Inorg. Chem.* **1998**, *38*, 5616.
- (73) Botta, M.; Aime, S.; Barge, A.; Bobba, G.; Dickins, R. S.; Parker, D.; Terreno, E. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2102-2109.
- (74) Nonat, A.; Fries, P. H.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8489-8506.

Chapitre IV : Luminescence des complexes

Chapitre IV : Luminescence des complexes	200
1. Complexes luminescents émettant dans le proche infra-rouge	201
2. Complexes basés sur le chromophore 8-hydroxyquinoléine.....	203
2.1.1 [Ln(thqtcn-SO ₃)] ³⁻	205
2.1.2 [Ln(dhqtcn-SO ₃)(H ₂ O)] ³⁻	206
2.1.3 [Ln(hqtcn-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	209
2.2 Complexes basés sur le pivot azote central	211
2.2.1 [Ln(thqN-SO ₃)(H ₂ O) ₂] ³⁻	211
2.2.2 [Ln(dhqN-SO ₃)(H ₂ O) ₃] ³⁻	213
3. Complexes de lanthanides encapsulés dans des billes de silice	215
Bibliographie	222

1. Complexes luminescents émettant dans le proche infra-rouge

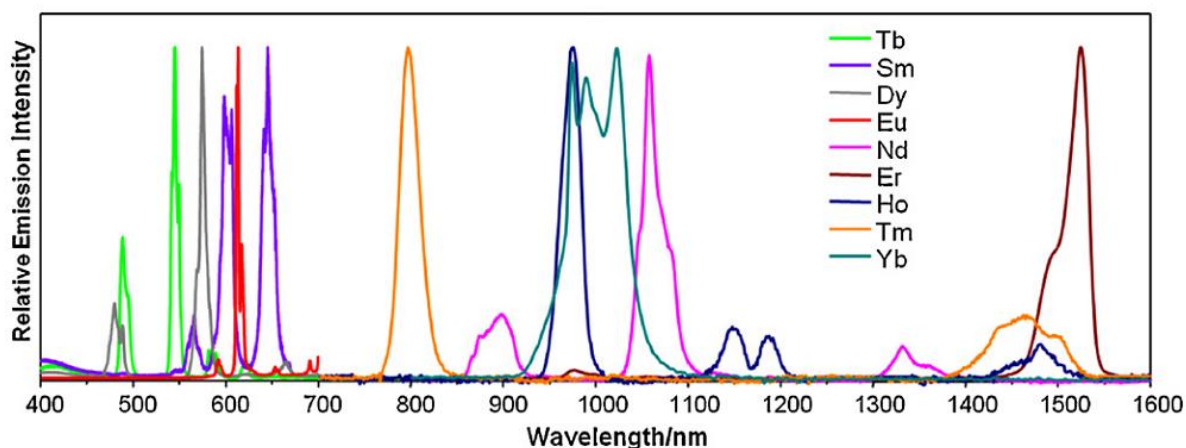


Figure 4.1 Spectres d'émission des lanthanides

Les lanthanides émettant dans le proche infrarouge sont utilisés depuis une quarantaine d'années pour des dispositifs optiques ou électro-optiques, comme les lasers (Nd-YAG lasers), les amplificateurs pour les télécommunications (fibre optiques dopées à l'Er) ou encore les diodes électroluminescentes (OLEDs, organic light-emitting diodes).

Comme nous l'avons vu en introduction, ces lanthanides présentent un intérêt particulier dans le domaine biomédical. Le développement des sondes luminescentes a été initié dans le milieu des années 70 avec l'utilisation de polyaminocarboxylates et de β -dicétones pour sensibiliser l'Eu(III) et le Tb(III) dans le but de réaliser des tests immunologiques grâce à la luminescence en temps résolu. Cette nouvelle technologie a initié l'intérêt porté aux complexes de lanthanides luminescents¹ et à leur greffage sur des substrats biocompatibles (anticorps, peptides, ...) et au développement de la microscopie pour la luminescence en temps résolu (TLRM time-resolved microscopy²). Ces avancées ont conduit à l'utilisation de biosondes luminescentes à base de lanthanides (LLBs lanthanides luminescent bioprobes)³ dans des domaines allant de l'analyse biologique⁴ à l'analyse médicale, y compris au sein de tissus ou de cellules, jusqu'au suivi de la biodistribution de médicaments⁵.

En effet, les sondes luminescentes basées sur des complexes de lanthanides présentent plusieurs avantages en comparaison des fluorophores organiques⁶⁻¹². Ils présentent des temps de vie relativement longs qui permettent de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus biologiques (qui sont de l'ordre de la nanoseconde), grâce à la microscopie en temps résolu.

De plus, les lanthanides présentent des spectres d'émission fins à des longueurs d'onde bien définies. Il est ainsi possible d'observer plusieurs marqueurs simultanément, ce qui est impossible avec de simples marqueurs organiques. Les lanthanides émettant dans le proche infra-rouge autorisent une plus grande pénétration dans les tissus biologiques (qui absorbent peu au-dessus de 700 nm) et la longueur d'absorption de l'eau se situe au-dessus de 1000 nm¹³. Mais leur faible coefficient d'absorption molaire empêche leur excitation directe par une source lumineuse à faible énergie. Le peuplement de l'état excité du lanthanide doit être facilité par un ligand organique qui va permettre le transfert d'énergie entre la source lumineuse et l'ion lanthanide (effet d'antenne)¹⁴⁻¹⁶. Pour que ce transfert soit suffisamment efficace, il est nécessaire que l'état triplet du ligand soit suffisamment proche en énergie de l'état excité. En effet, plus l'écart entre les deux niveaux est grand, plus les phénomènes de désexcitations non radiatifs sont favorisés. D'autres conditions sont nécessaires pour la conception de sondes luminescentes efficaces. De la même façon que ce qui a été décrit pour les complexes de Gd(III) utilisés pour l'IRM, les complexes de lanthanides luminescents doivent présenter une bonne stabilité aussi bien thermodynamique que cinétique afin d'éviter la décomplexation de l'ion lanthanide et sa libération dans le milieu biologique. De plus, le complexe doit être photochimiquement stable, aussi bien à l'état fondamental qu'à l'état excité. Le fait de soumettre le complexe à certaines longueurs d'onde ne doit pas entraîner de réactions chimiques qui pourraient altérer la structure de celui-ci. La longueur d'onde d'excitation doit être la plus élevée possible, de préférence supérieure à 330 nm. En effet, les longueurs d'ondes plus courtes sont plus énergétiques et leur impact sur les tissus biologiques ne permettent pas leur utilisation. Il est donc nécessaire de conserver une longueur d'onde d'excitation aussi haute que possible pour limiter ces effets. Enfin, le ligand utilisé doit avoir un fort coefficient d'excitation à la longueur d'onde utilisée et sa capacité de transfert d'énergie au métal doit être suffisamment élevée pour qu'il puisse le sensibiliser de manière efficace. La présence de molécules d'eau dans la sphère de coordination du métal pose également un problème car la vibration des liaisons O-H entraîne des phénomènes de désexcitation non radiatifs, qui vont limiter la luminescence. De ce fait, il existe peu de systèmes qui soient adaptés à la fois à la luminescence et à l'imagerie IRM¹⁷⁻¹⁹. L'optimisation de système pouvant concilier les deux aspects reste un défi qui nécessite d'optimiser au mieux les paramètres du ligand pour l'ion lanthanide utilisé.

2. Complexes basés sur le chromophore 8-hydroxyquinoléine

Depuis que le complexe d'Er(III) tris(8-hydroxyquinoléine) a démontré des propriétés de luminescences particulièrement intéressantes²⁰, la 8-hydroxyquinoléine a été souvent utilisée dans des complexes pour sensibiliser les lanthanides émettant dans le proche infrarouge. En effet, son état triplet se situe à une basse énergie (autour de $17\ 100\text{ cm}^{-1}$) et est donc bien adapté à la sensibilisation des lanthanides émettant dans le proche infra rouge. La longueur d'onde d'excitation située entre 340 et 450 nm a l'avantage d'être peu dommageable pour les tissus biologiques.

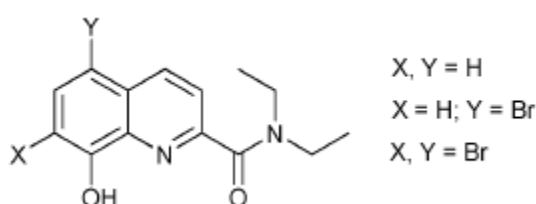


Figure 4.2 Structure du ligand 8-CHQ et de ses dérivés.

De nombreux ligands ont été développés à partir de la 8-hydroxyquinoléine pour la complexation des lanthanides. Albrecht et al. ont développé une hydroxyquinoléine présentant une coordination étendue via la substitution par un amide de la position 2 afin d'obtenir des complexes de stoechiométrie 3:1 (figure 4.2) et de protéger le lanthanide de la coordination d'une molécule de solvant, responsable de désexcitations non radiatives. Ces complexes présentent de bons rendements quantiques mesurés à l'état solide et ces rendements sont améliorés d'un facteur 2.5-3 en fonction de la substitution de l'hydroxyquinoléine par des bromes²¹. Cet effet est en grande partie dû à la diminution des processus de désactivations non radiatives. Ces désactivations sont causées par les vibrations des oscillateurs O-H, N-H et C-H. L'halogénéation partielle du ligand, en diminuant le nombre d'oscillateurs C-H, permet une réduction de ces processus de désactivations non radiatifs. Ces dérivés amide de la 8-hydroxyquinoléine ont été utilisés pour synthétiser des ligands comportant deux unités 8-hydroxyquinoléine susceptibles de former des complexes hélicoïdaux bimétalliques (Ln/Ln ou Al/Ln), qui présentent dans le cas de l'Yb(III), une émission dans le proche infrarouge, avec des rendements quantiques de l'ordre de 1% à l'état solide²².

D'autres ligands ont été obtenus en substituant la position 2 de l'hydroxyquinoléine par une unité benzoxazole, permettant d'avoir une unité chélatante N,N,O portant un chromophore qui peut être modifié par le greffage de divers substituants²³. En plus d'une large bande

d'absorption dans le visible (508-527 nm), les complexes 3:1 issus de ces ligands possèdent une efficacité particulière pour la sensibilisation de la luminescence du Nd(III), avec des rendements quantiques de l'ordre de 0.33%. De la même façon que pour les dérivés amide de la 8-hydroxyquinoléine, l'halogénéation des positions 5 et 7 de l'hydroxyquinoléine améliore d'un facteur 2 les valeurs de rendements quantiques²⁴.

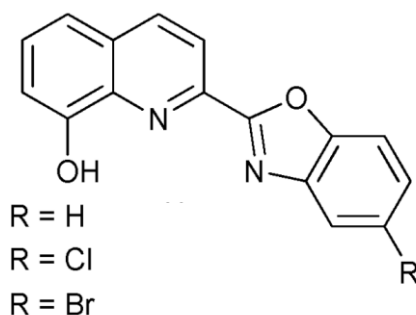


Figure 4.3 Ligand hydroxyquinoléine substitué en position 2 par des benzoxazoles

Cependant, il est parfois difficile de contrôler la stœchiométrie des complexes formés par auto-assemblage²⁵. Pour y remédier, les unités hydroxyquinoléine ont été insérées sur des structures tripodales²⁶ ou tétrapodales²⁷ et sulfonées pour permettre une grande solubilité dans l'eau. Non seulement ces structures permettent de contrôler précisément la stœchiométrie des complexes (formation de complexes 1 : 1) mais améliorent également leur stabilité thermodynamique ($pEu = 14.9$ pour le TsoxMe). Cette stabilité permet d'envisager l'utilisation de ce type de sondes pour des analyses *in-vitro*.

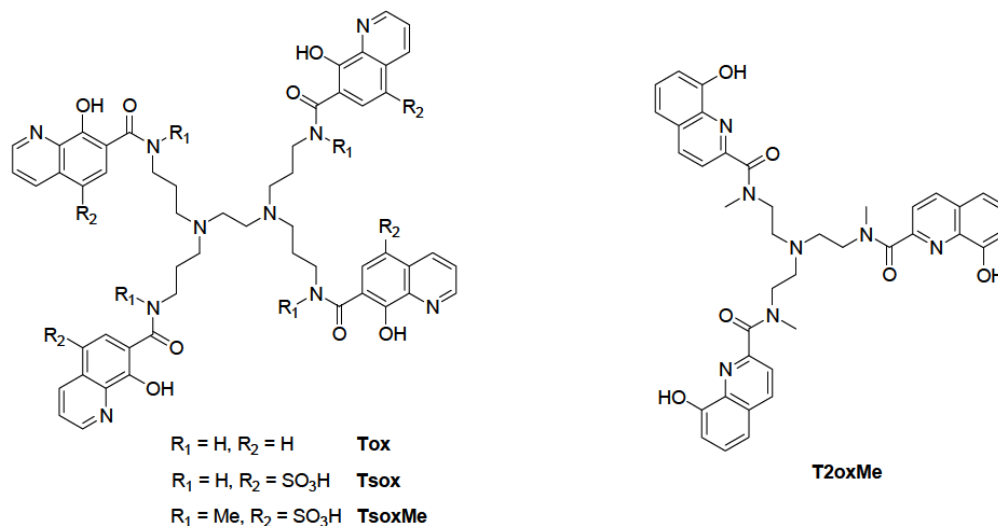


Figure 4.4 Ligands tripodes et tétrapodes basés sur l'unité 8-hydroxyquinoléine.

Cependant, la stabilité de ces composés doit être améliorée pour pouvoir les utiliser comme sondes in-vivo et la grande stabilité de nos complexes peut être un avantage pour la production de sondes lumineuses adaptées au milieu biologique.

2.1 Complexes basés sur le pivot triazacyclononane

2.1.1 $[\text{Ln}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$

L'étude de la luminescence des complexes de $\text{H}_3\text{thqtcn-SO}_3$ a déjà fait l'objet d'une étude²⁸. Ces mesures ont été menées dans des solutions de tampon TRIS à pH = 7.4. Les spectres d'émission et d'absorption des différents complexes sont présentés en figure 4.5.

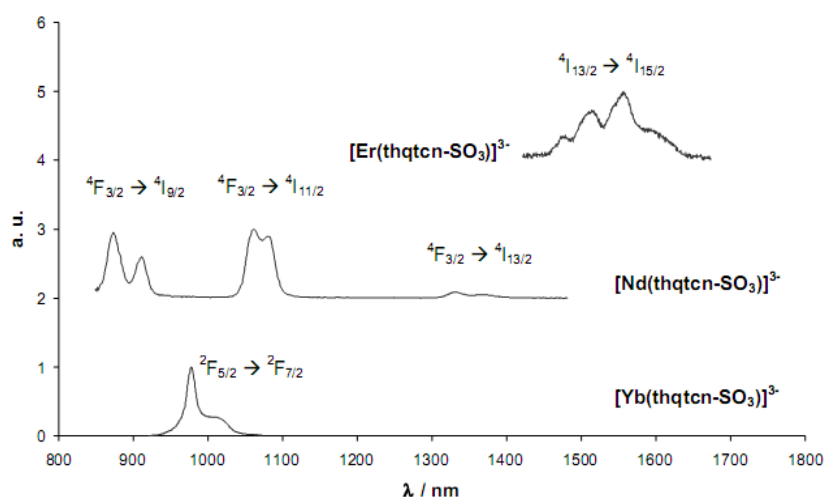


Figure 4.5 Spectres d'émission normalisés ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$) des complexes $[\text{Ln}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$, Ln = Yb, Nd, Er, dans H_2O à pH = 7.4

Le nombre de molécules d'eau en première sphère pour ces complexes a été déterminé par des mesures de temps de vie dans l'eau et dans D_2O . Les résultats obtenus confirment l'absence de molécules d'eau, en accord avec un complexe présentant un nombre de coordination de neuf. Les valeurs résiduelles (0.17 et 0.1) du nombre de molécules d'eau sont liées à la fois à l'incertitude de la méthode ainsi qu'à la probable contribution de molécules d'eau de seconde sphère ou à la présence d'oscillateurs C-H à proximité du centre métallique²⁹.

Ces complexes montrent des valeurs de rendements quantiques particulièrement élevées pour les ions Yb(III) et Nd(III) en solution aqueuse. Ces valeurs sont comparables à celle obtenues pour le fluorexon³⁰, ou avec le tétrapode TSoxMe, mais sont cependant deux fois plus faibles que celle publiées pour le T2oxMe³¹.

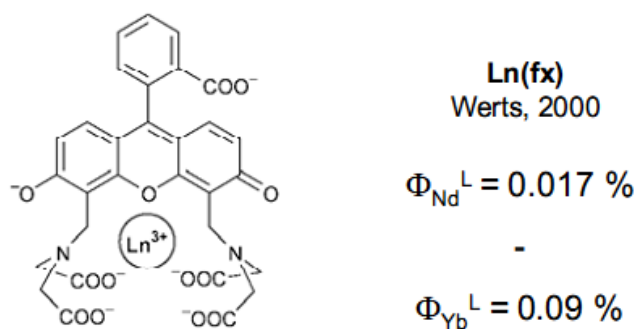


Figure 4.6 Complexes de Nd(III) et Yb(III) de fluorexon et leurs rendements quantiques en solution.

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	$\Phi_{tot} H_2O$ (%)	$\Phi_{tot} D_2O$ (%)	τ_{H_2O} (μs)	τ_{D_2O} (μs)	q
$[Yb(thqtcn-SO_3)]^{3-}$	370/978	0.14(1)	0.55(5)	2.05(4)	8.63(4)	0.17
$[Nd(thqtcn-SO_3)]^{3-}$	370/1065	0.016(1)	0.047(7)	0.16(3)	0.41(2)	0.1
$[Er(thqtcn-SO_3)]^{3-}$	370/1509	$<2 \cdot 10^{-3}$	$5.7 \cdot 10^{-3}$	-	0.64(4)	-

Tableau 4.1 Temps de vie de luminescence et rendements quantiques des complexes $[Ln(thqtcn-SO_3)]^{3-}$, Ln = Yb, Nd, Er, dans H₂O et D₂O à pH = 7.4

2.1.2 $[Ln(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$

Les valeurs de rendements quantiques étant relativement bonnes pour les complexes $q = 0$, les mêmes mesures ont été effectuées pour les complexes de $[Yb(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$ et de $[Yb(dhqtcn-SO_3)(H_2O)]^{3-}$. Le nombre de molécules d'eau a été obtenu par excitation directe du métal sur une solution de complexe d'Eu(III) ($12 \cdot 10^{-3}$ M). Les temps de vie des états excités du niveau $Eu(^5D_0)$ ont été mesurés dans H₂O et dans D₂O et utilisés pour calculer le nombre de molécules d'eau q directement liées au centre métallique. Cette valeur a été déterminée selon l'équation proposé par Beeby et al.²⁹ :

$$q = 1.2(\Delta k_{obs} - 0.25 - 0.075q^N)$$

Où $k_{obs} = 1/\tau_{obs}$, $\Delta k_{obs} = k_{obs}(\text{H}_2\text{O}) - k_{obs}(\text{D}_2\text{O})$, k_{obs} est donné en ms^{-1} et q^N est le nombre d'oscillateurs N-H quand des groupement amides sont coordonnés au centre métallique. La détermination des temps de vie dans H_2O et D_2O sont $\tau_{obs\text{H}_2\text{O}} = 0.44 \pm 0.03$ et $\tau_{obs\text{D}_2\text{O}} = 0.79 \pm 0.04$ ms. En réinjectant ces valeurs dans l'équation précédente, on obtient $q = 0.9$ pour l' Eu^{3+} , confirmant la présence d'une seule molécule d'eau en première sphère de coordination pour ces complexes.

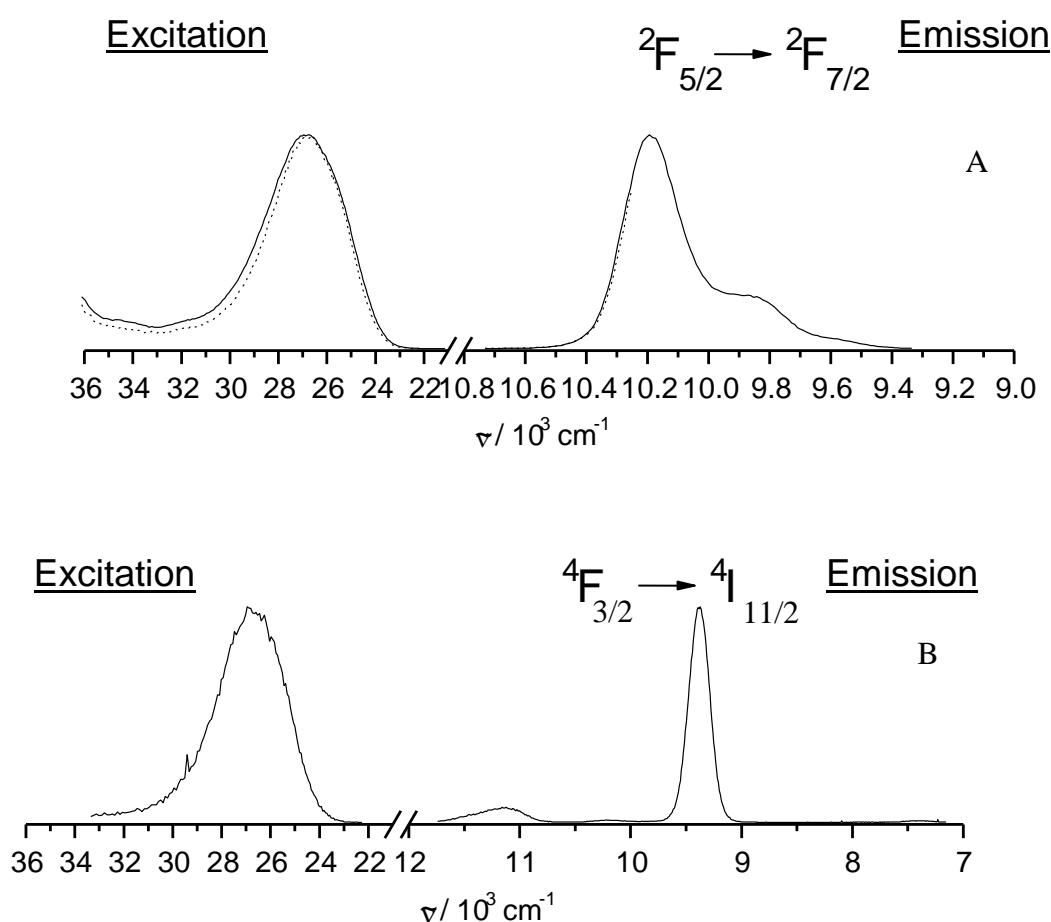


Figure 4.7 : Spectres normalisés d'excitation et d'émission dans la région proche infra rouge des complexes de $[\text{Yb}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (A) et de $[\text{Nd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ (B) à température ambiante dans le D_2O (trait plein) et l'eau (pointillés), à pH = 7.4

Comme attendu, les rendements quantiques sont plus faibles que pour l'espèce $q = 0$. Cependant, la diminution de rendement quantique est nettement supérieure dans le cas des complexes de Nd(III) comparés aux complexes d'Yb(III). Ceci est dû au fait que le niveau de l'état excité du Nd(III) est plus éloigné en énergie du niveau de l'état triplet du ligand, et que de ce fait, les phénomènes de désexcitations non radiatifs sont beaucoup plus importants.

Composé	$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_{\text{tot H}_2\text{O}}$ (%)	$\Phi_{\text{tot D}_2\text{O}}$ (%)	q
$[\text{Yb}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$	375/979	$1.8 \cdot 10^{-2}$ (5)	$52 \cdot 10^{-2}$ (2)	
$[\text{Nd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$	375/1066	$9 \cdot 10^{-5}$	$70 \cdot 10^{-5}$	
$[\text{Eu}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$				0.9

Tableau 4.2 Rendements quantiques absolus (%) des complexes $[\text{Yb}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et de $[\text{Nd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ à température ambiante dans le D_2O et l'eau à pH = 7.4

2.1.3 $[\text{Ln}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$

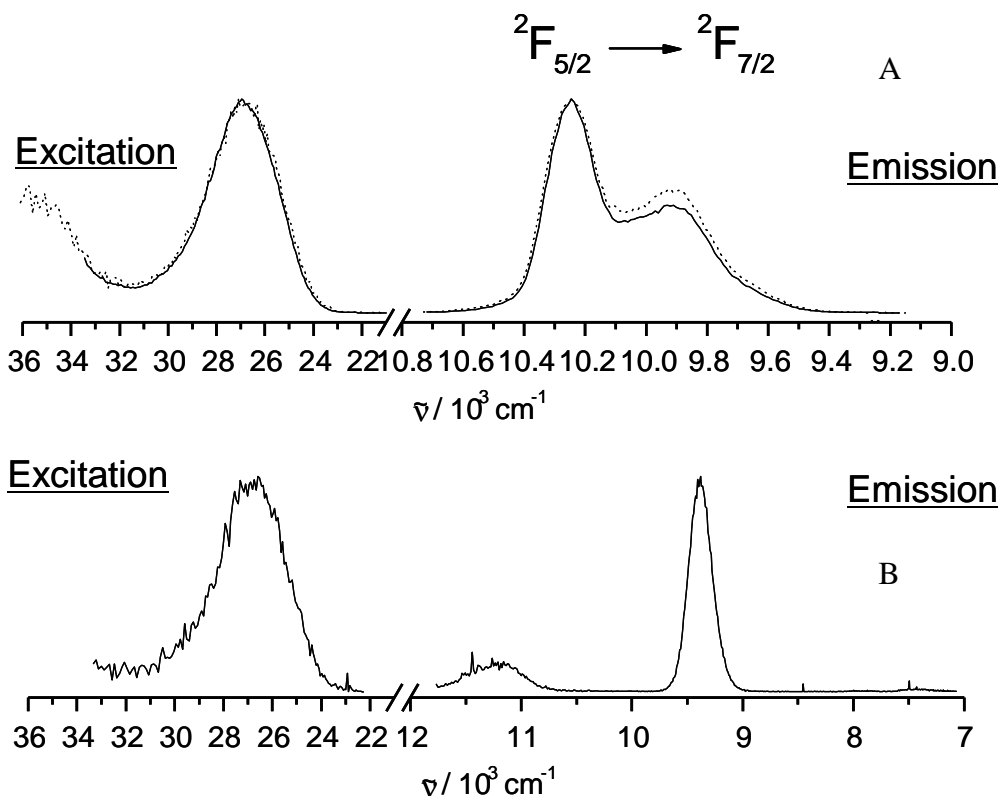


Figure 4.8 : Spectres normalisés d'excitation et d'émission dans la région proche infra rouge des complexes de $[\text{Yb}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]$ (A) et de $[\text{Nd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]$ (B) à température ambiante dans le D_2O (trait plein) et l'eau (pointillés), à $\text{pH} = 7.4$

De la même façon que précédemment, l'ajout d'une molécule d'eau en première sphère fait chuter les rendements quantiques mesurés dans l'eau et dans D_2O . Les rendements quantiques mesurés pour l' $\text{Yb}(\text{III})$ chutent presque d'un ordre de grandeur alors que les rendements quantiques mesurés pour le $\text{Nd}(\text{III})$ sont divisés par deux. Dans le cas du $\text{Nd}(\text{III})$, les phénomènes de désexcitations non radiatifs sont d'une très grande ampleur lorsqu'une molécule d'eau est ajoutée dans la sphère de coordination. La seconde molécule d'eau présente dans ce complexe n'amplifie que peu ces phénomènes et cela explique la faible différence de rendements quantiques des complexes de $[\text{Nd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]$ et de $[\text{Nd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]$. Le phénomène étant moins important dans le cas des complexes $\text{Yb}(\text{III})$, chaque nouvelle molécule d'eau apportée dans la sphère de coordination du métal augmente ce phénomène de quenching de la luminescence.

Composé	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	$\Phi_{tot} H_2O$ (%)	$\Phi_{tot} D_2O$ (%)
$[Yb(hqtcn-SO_3)(H_2O)_2]^{3-}$	375/979	$3 \cdot 10^{-3}$ (1)	$79 \cdot 10^{-3}$ (4)
$[Nd(hqtcn-SO_3)(H_2O)_2]^{3-}$	375/1066	$4 \cdot 10^{-5}$	$30 \cdot 10^{-5}$

Tableau 4.3 Rendements quantiques absolus (%) des complexes $[Yb(hqtcn-SO_3)(H_2O)_2]$ et de $[Nd(hqtcn-SO_3)(H_2O)_2]$ à température ambiante dans le D_2O et l'eau à pH = 7.4

Ces différents complexes mettent en lumière l'importance du choix du ligand en fonction du lanthanide utilisé et à quel point la proximité entre le niveau énergétique de l'état triplet du complexe et le niveau d'énergie de l'état excité du métal peut compenser les phénomènes de désexcitations non radiatifs du à la présence d'oscillateurs O-H à proximité du centre métallique. Dans le cas du Nd(III), où le niveau de l'état triplet du ligand est mal adapté, le rendement quantique est divisé par un facteur 1000 à la suite de l'introduction de deux molécules d'eau directement liées au métal. Dans le cas de l'Yb, la luminescence n'est divisée que par un facteur 200. La conception des ligands est donc cruciale dans la production de sondes fluorescentes efficaces et peut permettre de concilier la présence de molécules d'eau en première sphère et la luminescence proche infra rouge.

2.2 Complexes basés sur le pivot azote central

2.2.1 $[\text{Ln}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$

Les complexes $[\text{Ln}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ ont été étudiés en solution dans le tampon Tris à pH = 7.4. Les complexes ont été préparés *in situ* en mélangeant le ligand et le sel de lanthanide LnCl_3 correspondant dans des proportions stœchiométriques. Les spectres d'émission sont présentés en figure 4.9

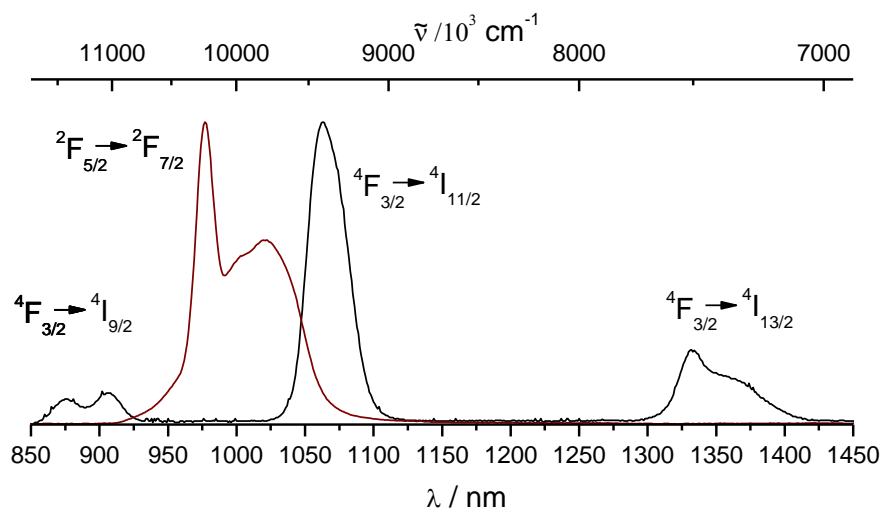


Figure 4.9 Spectre d'émission normalisé ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$) des complexes $[\text{Nd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ et $[\text{Yb}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$, $\text{Nd}(^4\text{F}_{3/2})$, $\text{Yb}(^2\text{F}_{5/2})$ dans H_2O ($C^\circ = 1 \text{ mM}$)

Composés	λ_{ex} (nm)	$\tau / \mu\text{s}$	$\Phi_{\text{tot H}_2\text{O}}$	$\tau / \mu\text{s}$	$\Phi_{\text{tot D}_2\text{O}}$	q
		H_2O	(%)	D_2O	(%)	
$[\text{Nd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$	370 nm	0.0521	$5.3 \cdot 10^{-4}$	0.350	$6.8 \cdot 10^{-3}$	1.7
$[\text{Yb}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$	370 nm	0.00186	$1.22 \cdot 10^{-3}$	0.329	-	2.3

Tableau 4.4 Temps de vie de luminescence et rendements quantiques des complexes de $[\text{Ln}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ $\text{Ln} = \text{Yb, Nd}$, dans H_2O et D_2O à pH = 7.4

Nous avons mesurés la capacité de notre ligand $\text{H}_3\text{thqN-SO}_3$ à agir comme sensibilisateur pour la luminescence proche infrarouge de l'Yb(III) et du Nd(III). L'excitation des ligands à

une longueur d'onde de 370 nm a permis de mesurer les rendements quantiques des complexes de l'Yb(III) et du Nd(III) dans l'eau. Malgré la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination, ces complexes présentent des rendements quantiques de 5.3×10^{-4} % pour le Nd^{3+} et 1.2×10^{-3} % pour Yb^{3+} . Il existe peu de complexes bis-hydratés capables de sensibiliser les ions Nd(III) et Yb(III) dans la littérature.

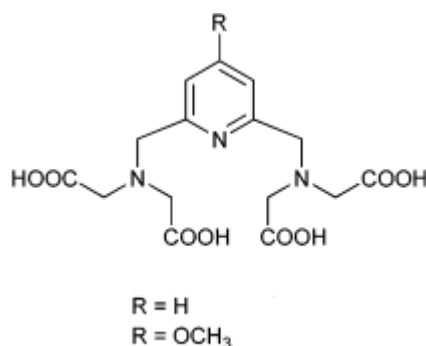


Figure 4.10 Ligand PNM trétracétate

Le ligand ($\text{R} = \text{H}$) présenté en figure 4.5 avait déjà été étudié pour la sensibilisation de lanthanides émettant dans le visible^{32,33}. Il a également montré qu'il était capable de sensibiliser le Nd(III) de façon efficace malgré la présence de deux molécules d'eau sur le métal. Les rendements quantiques obtenus pour le Nd(III) sont de 9.7×10^{-2} % et de 7.5×10^{-2} % (respectivement pour $\text{R} = \text{H}$ et OCH_3)¹⁹. Nos valeurs de rendements quantiques sont plus faibles mais il est tout de même remarquable d'obtenir une sensibilisation des lanthanides (Nd, Yb) dans le proche infrarouge malgré la présence de deux molécules d'eau en première sphère. De plus, la longueur d'onde utilisée pour sensibiliser notre complexe est située à 370 nm alors que pour le complexe présenté en figure 4.5, la longueur d'onde d'excitation est située entre 266 et 250 nm, c'est-à-dire aux longueurs d'ondes auxquelles les tissus biologiques présentent le plus d'absorption. Mis à part l'exemple des complexes basés sur une structure pyridine, et des TSoxMe, peu de ligands dans la littérature sont capables de sensibiliser les ions lanthanides pour le proche infrarouge ainsi que de présenter une solubilité convenable dans l'eau, qui autoriserait leur utilisation pour des applications biomédicales.

2.2.2 $[\text{Ln}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$

Rares sont les composés présentant un grand nombre de molécules d'eau en première sphère à être testés pour la luminescence proche infrarouge. Pour le cas des ions lanthanides émettant dans le visible, les rendements quantiques dans l'eau du $[\text{Tb}(\text{dpaa})]$ (21%) et de $[\text{Eu}(\text{dpaa})]$ (1.5%)¹⁸ sont bien inférieurs aux rendements quantiques obtenus pour les complexes ne présentant pas de molécules d'eau en première sphère d'hydratation. Cependant, ces rendements restent mesurables et pas totalement inintéressants dans l'optique d'une utilisation de ces ligands pour des sondes bimodales.

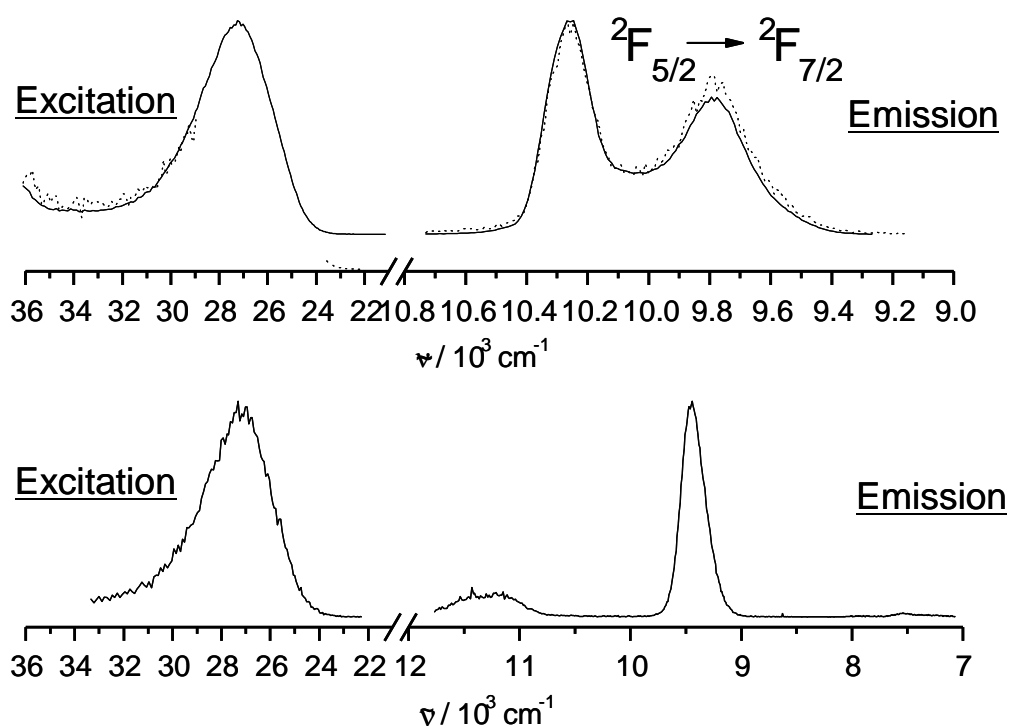


Figure 4.11 : Spectres normalisés d'excitation ($\lambda_{\text{an}} = 10\,214 \text{ cm}^{-1}$) et d'émission dans le domaine proche infrarouge ($\lambda_{\text{ex}} = 26\,666 \text{ cm}^{-1}$) de complexes $[\text{Yb}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ et $[\text{Nd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ à température ambiante dans le D_2O (trait plein) et l'eau (pointillés), à $\text{pH} = 7.4$

Les rendements quantiques obtenus en solution sont certes faibles mais restent mesurables, ce qui est assez notable pour un complexe présentant trois molécules d'eau liées au métal. Comme attendu, le rendement quantique dans l'eau est plus faible que pour les complexes de thqN-SO_3 .

composé	Φ_{tot} (%)				Q (th)
	Yb		Nd		
	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	
dhqN-SO ₃	6·10 ⁻⁴ (2)	59·10 ⁻³ (3)	2·10 ⁻⁵	18·10 ⁻⁵	3

Table 4.5 Rendements quantiques absolus (%) de complexes of [Yb(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻ et [Nd(dhqN-SO₃)(H₂O)₃]³⁻

L'étude des ces différents complexes a montré qu'il était possible de sensibiliser les lanthanides émettant dans le proche infrarouge malgré la présence de molécules d'eau en première sphère de coordination. Même si les rendements quantiques obtenus restent très modestes et nécessitent encore une optimisation, le peu d'exemples de tels complexes dans la littérature les rend intéressants dans la perspective du développement de systèmes adaptés à la fois à la luminescence proche infrarouge et à l'IRM. De plus l'utilisation de l'hydroxyquinoléine comme antenne permet d'atteindre une longueur d'excitation autour de 370 nm qui se rapproche des longueurs d'onde du visible et à laquelle les protéines contenues dans les milieux biologiques absorbent peu¹³. L'architecture de ses systèmes a une influence directe sur la luminescence des complexes de lanthanides associés. D'une part, l'hydroxyquinoléine semble plus adaptée à la sensibilisation de l'Yb(III) que du Nd(III). D'autre part, la symétrie et la rigidité des complexes peut avoir une influence sur leur luminescence mais les résultats sont difficiles à mettre en perspective puisque les complexes présentés ici possèdent tous un nombre différent de molécules d'eau.

3. Complexes de lanthanides encapsulés dans des billes de silice

Ce projet a été mené en collaboration avec les équipes du CEA LITEN, DTNM/LCSN et du CEA LETI-Minatec.

Le développement de système nanoparticulaires fait partie des domaines de recherches qui ont fait l'objet d'un essor croissant ces dernières années. Les nanoparticules luminescentes présentent un intérêt dans le développement de sondes luminescentes multicolores. En effet, il est possible d'inclure au sein de ce type de matrice plusieurs complexes de lanthanides différents, et d'avoir, en fonction de la longueur d'excitation choisi, l'une ou l'autre des longueurs d'émission.

Les ligands H₃thqtcn-SO₃ et H₃tpatcn ont montré des propriétés de coordination particulièrement intéressantes pour la sensibilisation des lanthanides pour la luminescence proche infrarouge et visible, respectivement (Nd, Yb, Er) et (Tb, Eu, Nd). Ces deux systèmes forment des complexes particulièrement stables dans l'eau et présentent parmi les meilleurs rendements quantiques pour l'émission dans le visible et le proche infrarouge^{34,35}.

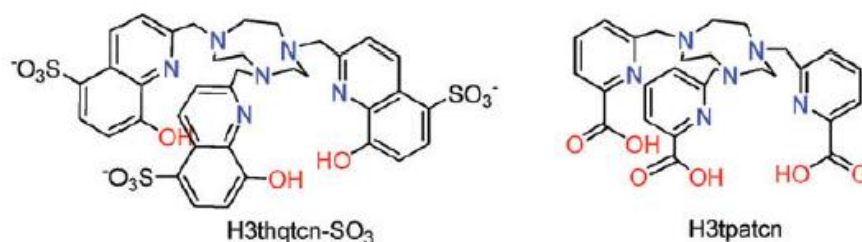


Figure 4.12 Ligands H₃thqtcn-SO₃ et H₃tpatcn

La tpatcn présente une bande d'absorption à 271 nm qui peut être assignée à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Soumis à une longueur d'onde d'excitation de 274 nm, le spectre de luminescence du tpatcn présente 5 bandes entre 570 et 730 nm dont la principale bande est attribuée à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ présentant un maximum autour de 615 nm. Pour le complexe de [Tb(tpatcn)], le spectre est caractérisé par 7 bandes entre 450 et 700 nm, la bande principale (maximum à 545 nm) étant attribuée à la transition $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$.

Pour le ligand thqtcn-SO₃, le complexe d'Yb(III) émet entre 930 et 1080 nm, avec une bande étroite présentant un maximum à 977 nm correspondant à la transition $^2F_{5/2} \rightarrow ^2F_{7/2}$.

L'encapsulation de plusieurs chélates de lanthanides dans des nanoparticules de silice présente un intérêt particulier pour le développement de marqueurs multicolores, qui pourraient avoir de multiples applications dans les matériaux (codes barres, sondes, OLEDs, lasers) ou dans les tests biologiques. En effet, cette encapsulation présente de nombreux avantages par rapport à l'utilisation d'autres nanostructures³⁶. Les billes de silice présentent une bonne biocompatibilité, elles sont facilement fonctionnalisables et permettent un parfait isolement de l'unité luminescente. La silice constitue de plus une structure d'accueil adéquate du fait de sa stabilité et de sa transparence. L'incorporation de complexe de lanthanides dans des matrices inorganiques a été particulièrement étudiée³⁷⁻³⁹ pour comprendre l'influence de la matrice sur les propriétés photophysiques des complexes luminescents. En fonction de la structure chimique de ces derniers, de faibles interactions (liaisons hydrogènes, interactions de Van der Waals électrostatiques) avec la matrice inorganique étaient obtenues et conduisait à une dispersion hétérogène des complexes au sein de la matrice et même à la perte de ces mêmes complexes. De ce fait, le greffage covalent des espèces luminescentes a été utilisée^{40,41} mais demandait des efforts synthétiques supplémentaires pour obtenir la fonctionnalisation des complexes de lanthanides et pouvait même altérer leur stabilité.

Dans notre cas, les complexes de lanthanides ont été encapsulés directement dans des nanobilles de silice par un procédé de microémulsion inverse. La microémulsion est obtenue en mélangeant du cyclohexane, du 1-hexanol qui agit comme co-surfactant, et du Triton X-100, un surfactant non ionique auxquels sont ajoutés une solution aqueuse contenant les complexes de lanthanides et une solution d'hydroxylamine. Une fois la microémulsion stabilisée, le précurseur de silice (TEOS tétraethyl orthosilicate) est ajouté. Après réaction les nanoparticules sont lavées à l'eau et l'éthanol par centrifugation, puis par dialyse. Après un dernier lavage à l'eau par centrifugation, les nanoparticules sont obtenues et l'eau de lavage après dialyse est testée par dosage par colorimétrie pour vérifier l'absence de lanthanides en solution. Le spectre de luminescence de cette même solution ne présente pas les bandes classiques d'émission des ions lanthanides ou des états singulets des ligands libres. Après immersion des nanoparticules dans l'eau pendant un mois, les mêmes tests sont effectués sur la solution aqueuse après centrifugation des nanoparticules et présentent les mêmes résultats, confirmant la stabilité des nanoparticules dans l'eau et l'absence de relargage des complexes. La grande stabilité des complexes sur une large gamme de pH (2-9) empêche l'agrégation et le relargage des ions lanthanides sous la forme d'hydroxydes insolubles au cours de la

synthèse des nanoparticules. Différentes synthèses sont réalisées : des nanoparticules ne contenant que le complexe $[\text{Yb}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ ou contenant un mélange $[\text{Eu}(\text{tpatcn})]$: $[\text{Tb}(\text{tpatcn})]$ ou un mélange $[\text{Yb}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$: $[\text{Nd}(\text{tpatcn})]$. En modifiant les conditions de synthèse, il est possible de faire varier la taille des nanoparticules obtenues de 10 à 100 nm. Les études ont été effectuées sur des particules présentant une taille homogène de 50 nm.

Un des principaux inconvénients de ce type d'encapsulation réside dans le manque d'homogénéité de la répartition des complexes au sein des nanoparticules. L'utilisation de la microscopie électronique en transmission (TEM) permet de localiser précisément et en 3D la position des complexes encapsulés. Cette localisation s'avère être influencée par le caractère hydrophile des complexes considérés. La présence des lanthanides au sein des nanoparticules a d'abord été confirmée par ICPMS.

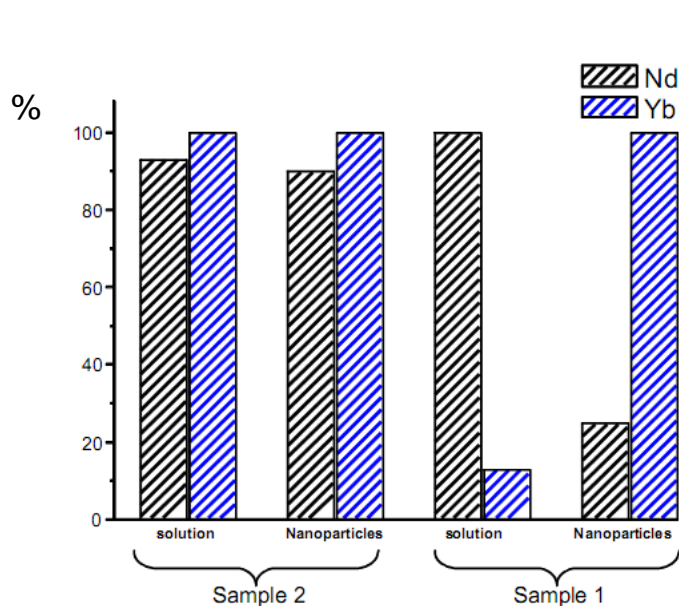


Figure 4.13 Pourcentage d'encapsulation mesuré par ICPMS (sample 1 : NP-NdYb, sample 2 : NP-NdYbtpatcn)

La titration par ICPMS montre que lorsque deux ligands sont présents dans l'échantillon ($[\text{Yb}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ et $[\text{Nd}(\text{tpatcn})]$), la concentration du complexe d' $[\text{Yb}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ est trois fois supérieure à la concentration du complexe de $[\text{Nd}(\text{tpatcn})]$. Dans le cas où un seul ligand (tpatcn) est utilisé, l'insertion des deux complexes se fait dans les mêmes proportions, en accord avec les concentrations utilisées pour les deux ions. Afin de préciser la position des différents complexes dans les nanoparticules, une analyse plus précise de la répartition dans le volume de la nanoparticule a été obtenue par une technique de HAADF (high angle annular dark filed) sur un microscope électronique à balayage par transmission (STEM). Cette

technique d'analyse est particulièrement adaptée à l'analyse d'échantillon hétérogène⁴² et permet de reconstruire en 3D la répartition des chélates dans les nanoparticules de silices.

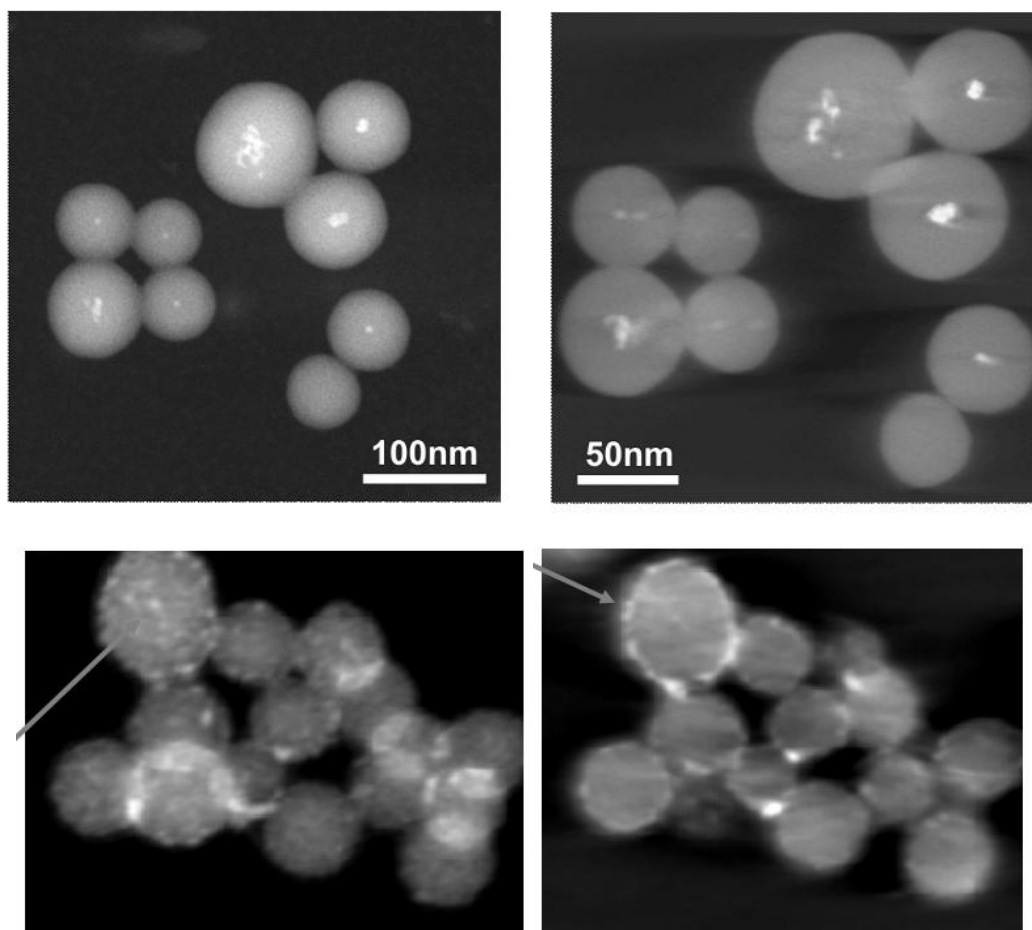


Figure 4.14 NP-NdYb : (A) Image HAADF – simple projection. 141 images similaires sont prises. (B) Reconstruction tomographique en 3D des billes de silice. L'image ne représente pas une projection mais une coupe planaire des intensités. NP-EuTb : (C) Image HAADF – simple projection. (D) Reconstruction tomographique en 3D des billes de silice.

Les images obtenues à partir des particules Tb/Eu tpatcn (figure 4.14) montrent que les complexes sont localisés au bord de la matrice inorganique. Sur les reconstructions tomographiques effectuées sur les particules NP-Yb et NP-NdYb, les complexes d'Yb(III) sont clairement localisés au centre des nanoparticules (figure 4.14). Sur les particules NP-NdYb, les complexes de [Nd(tpatcn)] ne sont pas visibles, ceci étant probablement à un problème de contraste sur les images. La différence de répartition observée entre les deux ligands est probablement due à un caractère hydrophile plus marqué dans le cas des

complexes de thqtcn-SO₃. Cette conclusion est confirmée par les concentrations obtenues en ICPMS, qui montrent que l'incorporation des complexes d'[Yb(thqtcn-SO₃)]³⁻ se fait dans des proportions plus importantes que pour le [Nd(tpatcn)]. Le caractère hydrophile du ligand qui semble crucial dans l'incorporation des complexes de lanthanides au sein de la matrice de silice pourrait être utilisé pour optimiser l'intensité de la luminescence et la stabilité de nanoparticules intégrant des complexes de lanthanides.

Les propriétés de luminescences de ces particules ont été étudiées. Les particules NP-EuTb contenant deux lanthanides émettant dans le visible, montre une double émission avec deux bandes fines à 613 nm et 545 nm correspondant respectivement à l'émission de l'Eu(III) et du Tb(III), lorsqu'elles sont soumises à une longueur d'onde d'excitation de 279 nm. Ces deux bandes d'émission correspondent respectivement aux transitions ⁵D₀→⁷F₂ et ⁵D₄→⁷F₅. Les spectres d'émission sont identiques à ceux des complexes en solution⁴³.

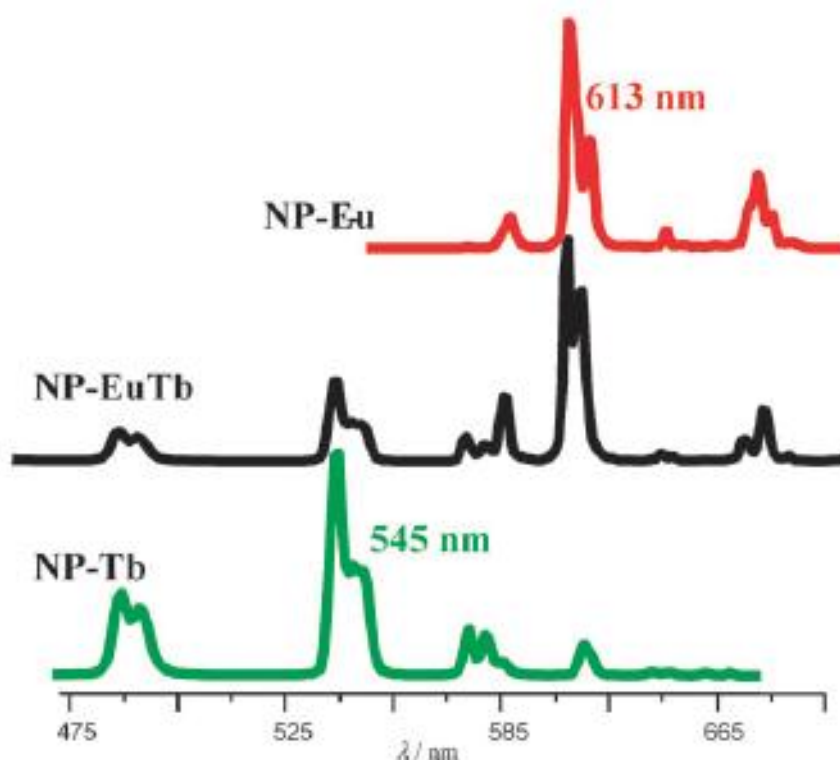


Figure 4.15 Spectres d'émission des nanoparticules NP-Eu, NP-EuTb et NP-Tb ($\lambda_{\text{ex}} = 279 \text{ nm}$)

Pour les particules NP-NdYb et NP-Yb, l'émission des ions Yb(III) se caractérise par une bande entre 895 et 1120 nm avec un maximum à 978 nm, correspondant au niveau ²F_{5/2}. L'ion

Nd(III) présente trois bandes d'émission entre 830 nm et 1420 nm, correspondant aux transitions du niveau $^4F_{3/2}$ vers les niveaux $^4I_{9/2}$, $^4I_{11/2}$ et $^4I_{13/2}$. Les spectres d'émission du complexe $[Yb(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ libre et de la nanoparticule NP-Yb sont parfaitement superposables, montrant que la symétrie du complexe est préservée et qu'il n'y a aucune interaction entre le lanthanide et la matrice de silice. Concernant les particules contenant du Nd(III) et de l'Yb(III), l'émission peut être modifiée en fonction de la longueur d'onde d'excitation. En excitant les particules à 272 nm, les signaux à la fois du Nd(III) et de l'Yb(III) sont observables.

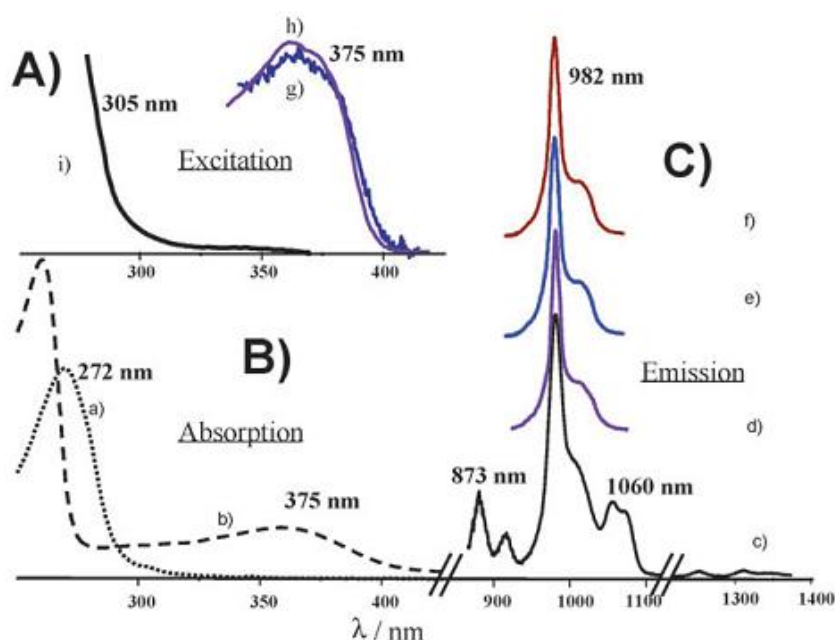


Figure 4.16 (A) Spectres normalisés d'excitation du complexe $[Yb(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ (g) et de NP-NdYb ($\lambda_{em} = 1060$ nm (i), $\lambda_{em} = 982$ nm (h)). (B) Spectres d'absorption du $[Nd(tpatcn)]$ (a), $[Yb(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ (b). (C) Spectres normalisés d'émission de NP-NdYb ($\lambda_{ex} = 272$ nm (c), $\lambda_{ex} = 375$ nm (d)), du complexe $[Yb(thqtcn-SO_3)]^{3-}$ ($\lambda_{ex} = 375$ nm) (e) et de NP-Yb ($\lambda_{ex} = 375$ nm) (f). Toutes les solutions sont à pH = 7.4

La mesure des temps de vie pour les particules NP-NdYb (4.01(5) μ s) et NP-Yb (4.17(1) μ s) présente des temps de vie relativement plus longs que ceux des complexes isolés. De la même façon, les temps de vie des complexes encapsulés émettant dans le visible sont plus longs (entre 11% et 29%) que ceux des complexes isolés. Ces résultats suggèrent que la matrice de silice agit comme une protection autour des complexes et empêche les phénomènes de dé-excitations non radiatives. Les rendements quantiques obtenus pour ces espèces ont été

mesurés en solution à pH = 7.4 et à l'état solide. Des rendements quantiques similaires à ceux mesurés pour les complexes libres ont été obtenus (tableau 4.6).

	τ (ms)	Φ (%)	
		H ₂ O	Phase solide
[Nd(tpatcn)]	0.045(3) 10 ⁻³		
[Yb(thqtcn-SO ₃)]	2.05(1) 10 ⁻³	0.14	0.11
NP-[Yb(thqtcn-SO ₃)]	4.17(1) 10 ⁻³		
NP-NdYb	0.058(4) 10 ⁻³ (Nd)	0.13 (Yb λ = 375 nm)	
	4.01(5) 10 ⁻³ (Yb)	0.095 (Yb λ = 272 nm)	
		0.018 (Nd λ = 272 nm)	
[Eu(tpatcn)]	1.08(1)		
NP-[Eu(tpatcn)]	1.23(2)		
[Tb(tpatcn)]	2.00(1)		
NP-[Tb(tpatcn)]	2.06(2)		

Tableau 4.6 Temps de vie de luminescence et rendements quantiques des complexes libres et au sein des nanoparticules.

La synthèse de ces systèmes a donc permis d'allier deux complexes de lanthanides différents et d'avoir un nano objet émettant à la fois dans le visible et le proche infrarouge. L'utilisation de ces systèmes présente de nombreux avantages. Les nanoparticules s'avèrent très stables dans le temps en solution et le fait d'avoir les complexes de lanthanides à l'intérieur de la matrice évite tout risque d'altération de ces complexes, contrairement à un greffage en surface. De plus la méthode de synthèse de ces billes permet d'internaliser les complexes sans modification de la structure du ligand. Ainsi inclus dans la nanoparticule, les complexes sont également protégés des phénomènes de désexcitations non radiatifs dus au solvant qui peuvent diminuer la luminescence. Les temps de vie de luminescence des différents objets sont ainsi identiques voire meilleurs que ceux des complexes en solution. La biocompatibilité des ces objets peut en faire des marqueurs efficaces au niveau biologique, aussi bien pour du marquage in vitro que pour du suivi in vivo, ou être utilisés comme code barre sur différents matériaux.

Bibliographie

- (1) Hovinen, J.; Guy, P. M. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 404-21.
- (2) Vereb, G.; Jares-Erijman, E.; Selvin, P. R.; Jovin, T. M. *Biophys. J.*, **1998**, *74*, 2210.
- (3) Bünzli, G. J.-C. *Chem. Lett.* **2009**, *308*, 104.
- (4) Eibanowski, M.; Makowska, B. *J.Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1996**, *99*, 85-92.
- (5) Licha, K.; Olbrich, C. *Advanced Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1087-1108.
- (6) Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283-4374.
- (7) Carlos, L. D.; Ferreira, R. A. S.; Bermudez, V. D.; Ribeiro, S. J. L. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 509-534.
- (8) Bünzli, J. C. G. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 53-61.
- (9) De Bettencourt-Dias, A. *Dalton Trans.* **2007**, 2229-2241.
- (10) De Lill, D. T.; De Bettencourt-Dias, A.; Cahill, C. L. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3960-3965.
- (11) White, A. K.; Chengelis, D. A.; Gogick, K. A.; J. Stehman; Rosi, N. L.; Petoud, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18069.
- (12) Chen, X. Y.; Bretonniere, Y.; Pecaut, J.; Imbert, D.; Bünzli, J. C.; Mazzanti, M. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 625-637.
- (13) Gillies, R. J. In *J. Cell. Biochem. Supp.* **2002**, *39*, 231-238.
- (14) S. Faulkner and J. L. Matthews *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier, Oxford, UK, **2004**.
- (15) Bünzli, J. C.; Piguet, C. In *Chem Soc Rev*, **2005**, *34*, 1048.
- (16) Parker, D.; Dickins, R. S.; Puschmann, H.; Crossland, C.; Howard, J. A. K. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1977-2010.
- (17) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7133 - 7150.
- (18) Nonat, A.; Fries, P. H.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8489-8506.
- (19) Pellegatti, L.; Zhang, J.; B.Drahos; S.Villette; Suzenet, F.; G.Guillaumet; Petoud, S.; Toth, E. *Chem. Commun.* **2008**, 6591-6593.
- (20) Gillin, W. P.; Curry, R. J. *J. Appl. Phys. Lett.* **1999**, *74*, 798.

- (21) Albrecht, M.; Osetska, O.; Klankermayer, J.; Fröhlich, R.; Gumyd, F.; Bünzli, J. C. *Chem. Commun.* **2007**, 1834-1836.
- (22) Albrecht, M.; Osetska, O.; Fröhlich, R.; Bünzli, J.-C. G.; Aebischer, A.; Gumy, F.; Hamacek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14178-14179.
- (23) Shavaleev, N. M.; Scopelliti, R.; Gumy, F.; Bünzli, J. C. *Inorg Chem* **2009**, *48*, 2908-18.
- (24) Shavaleev, N. M.; Gumy, F.; Scopelliti, R.; Bünzli, J. C. *Inorg Chem* **2009**, *48*, 5611-3.
- (25) Deun, R. V.; Fias, P.; Nockemann, P.; Schepers, A.; Parac-Vogt, T. N.; Hecke, K. V.; Meervelt, L. V.; Binnemans, K. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 8461.
- (26) Comby, S.; Imbert, D.; Vandevyver, C. D. B.; Bünzli, J. C. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 936.
- (27) Comby, S.; Imbert, D.; Chauvin, A. S.; Bünzli, J. C. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 732-743.
- (28) Nonat, A.; Imbert, D.; Pécaut, J.; Giraud, M.; Mazzanti, M. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4207-4218.
- (29) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Williams, G. J. A.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 493-503.
- (30) Werts, M. H. V.; Verhoeven, J. W.; Hofstraat, J. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 433.
- (31) Comby, S.; Imbert, D.; Vandevyver, C.; Bünzli, J. C. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 936-944.
- (32) Laurent, S.; Elst, L. V.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C. *Bioorg. Med. Lett.* **2007**, *17*, 6230-6233.
- (33) Gunanathan, C.; Pais, A.; Furman-Haran, E.; Seger, D.; Eyal, E.; Mukhopadhyay, S.; Ben-David, Y.; Leitun, G.; Cohen, H.; Vilan, A.; Degani, H.; Milstein, D. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1361.
- (34) *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier, Amsterdam, 2007.; Comby, S.; Bünzli, J. C., Eds.
- (35) Albrecht, M.; Fiege, M.; Osetska, O. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 812-824.
- (36) Armelao, L.; Quici, S.; Barigelletti, F.; Accorsi, G.; Bottarod, G.; Cavazzini, M.; Tondello, E. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 487.

- (37) Carlos, L. D.; Ferreira, R. A. S.; Bermudez, V. d. Z.; Ribeiro, S. J. L. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 509.
- (38) Escribano, P.; Julian-Lopez, B.; Planelles-Arago, J.; Cordoncillo, E.; Viana, B.; Sanchez, C. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 23.
- (39) Y. Li, B. Y.; Yang, H. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 3959.
- (40) Armelao, L.; Bottaro, G.; Quici, S.; Cavazzini, M.; Raffo, M. C.; Barigelletti, F.; Accorsi, G. *Chem. Commun.* **2007**, *28*, 2911.
- (41) Quici, S.; Cavazzini, M.; Raffo, M. C.; Armelao, L.; Bottaro, G.; Accorsi, G.; Sabatini, C.; Barigelletti, F. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 741.
- (42) Klink, S. I.; Hebbink, G. A.; Grave, L.; Veggel, F. V.; Reinhoudt, D. N.; Slooff, L. H.; Polman, A.; Hofstraat, J. W. *J. Appl. Phys. Lett.* **1999**, *86*, 1181.
- (43) Nocton, G.; Nonat, A.; Gateau, C.; Mazzanti, M. **2009**, *92*, 2257.

Conclusions et perspectives

Dans ce travail de thèse nous avons développé la synthèse de ligands dérivés de l'hydroxyquinoléine, en s'appuyant sur deux types d'architectures : un pivot azote central et la plateforme macrocyclique 1,4,7 triazacyclononane. Nous avons étudié la complexation des ions Ln(III) avec ces différents ligands. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'influence des différentes structures sur la relaxivité des complexes de Gd(III), ainsi que sur leur stabilité thermodynamique et sur l'efficacité des complexes de Nd(III) et d'Yb(III) pour la luminescence dans le proche infrarouge.

Dans le cas des complexes s'appuyant sur la plateforme 1,4,7 triazacyclononane, une famille de complexe présentant respectivement 0, 1 et 2 molécules d'eau en première sphère de coordination ont été synthétisés. Le complexe de $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ a montré une relaxivité particulièrement élevée ($5.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz) pour un complexe $q = 0$. Les études sur ce complexe ont montré qu'une rotation lente associée à un phénomène de seconde sphère inhabituel pouvait expliquer cette valeur de la relaxivité. Le complexe $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ a montré, de la même façon que le $[\text{Gd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ une structure rigide de ces complexes en solution, et présente une valeur de relaxivité bien supérieure ($9.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz) aux relaxivités classiquement observées pour les complexes mono aqua. Par la mesure des vitesses de relaxation transversales de l' ^{17}O de la molécule d'eau coordonnée au complexe, nous avons pu déterminer la valeur de la vitesse d'échange de l'eau ($k_{\text{ex}} = 10\text{-}50 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), qui est rapide mais ne suffit pas à expliquer les bonnes performances du complexe de Gd(III). Le temps de corrélation rotationnel τ_r a été mesuré par des mesures de temps de relaxation des protons aromatiques du ligand dans un complexe d'Y(III). Ce temps de corrélation rotationnel s'est révélé particulièrement long (258 ps) et nous a permis d'expliquer la valeur particulièrement haute de la relaxivité du complexe. L'analogue bis aqua, le $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ a lui montré des performances en accord avec son nombre de molécules d'eau. Sa relaxivité à 20 MHz s'élève à $7.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, une valeur comparable à celles des complexes bis aqua rapportés dans la littérature mais qui reste inférieure au complexe mono aqua $[\text{Gd}(\text{dhqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$. La présence d'une seule hydroxyquinoléine dans la structure a provoqué une perte de rigidité du complexe, comme le montrent les expériences menées en RMN. Cette perte de rigidité du complexe explique qu'il ne possède pas une relaxivité plus élevée qu'attendue, même si cette valeur reste supérieure aux

relaxivités des agents commerciaux, grâce à la présence de deux molécules d'eau en première sphère de coordination.

Dans le cas des complexes basés sur une architecture à azote central, le complexe bis aquo $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ a montré une valeur de relaxivité intéressante ($5.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 20 MHz) supérieure à celle des agents commerciaux. Cependant, la valeur de relaxivité est un peu inférieure à celle attendue pour un complexe bis-aquo. Nous avons cherché à comprendre d'où venait cette limitation et la vitesse d'échange obtenue par la mesure des vitesses de relaxation transversale de l' ^{17}O de l'eau nous a apporté un éclairage sur ce point. En effet, cette valeur s'est avérée particulièrement basse pour un complexe bis aquo ($k_{\text{ex}} = 0.48 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) et explique la relaxivité limitée pour ce complexe. La synthèse de l'analogue tris aqua $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ a permis d'accéder à une vitesse d'échange plus rapide ($k_{\text{ex}} = 4.02 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) et la valeur de la relaxivité de ce complexe est parfaitement en accord avec les valeurs prédites par la théorie pour des complexes possédant trois molécules d'eau en première sphère de coordination. La valeur de la relaxivité à 20 MHz pour ce complexe atteint donc $10.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ces deux complexes présentent un intérêt particulier pour leur relaxivité à haut champ, car leur nombre de molécules d'eau directement liées au Gd(III), respectivement 2 et 3, leur permet de maintenir à des champs élevés, la valeur de la relaxivité quand celle des complexes mono aqua chute rapidement. Ainsi, la relaxivité du $[\text{Gd}(\text{thqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$ à 200 MHz est de $5.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et celle du $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ atteint $10.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ces deux complexes s'avèrent donc particulièrement adaptés pour le développement d'agents de contraste IRM à haut champ. Les images IRM de cerveaux de rats obtenues avec ces deux composés laissent entrevoir des perspectives intéressantes.

Le motif hydroxyquinoléine a montré à travers tous ces complexes, son apport en termes de stabilité. En effet, l'ensemble de nos complexe présente des pM supérieurs à 19, et cette stabilité peut être comparée à celle du $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ et montre une amélioration notable par rapport aux résultat obtenus avec les complexes basés sur des unités picolines. Si la stabilité thermodynamique est apportée par le motif hydroxyquinoléine, la plateforme 1,4,7 triazacyclononane a une influence sur la stabilité cinétique des complexe et semble également favoriser la formation d'espèces rigides en solution, alors que les complexes basés sur le pivot azote central ont montré un comportement plus fluxionnel.

Dans l'ensemble, nos complexes ont montré qu'ils interagissaient avec l'albumine sérique pour donner des adduits avec une relaxivité plus importante que dans l'eau. L'influence des anions endogènes sur nos complexes est faible, même si leur impact est notable sur le $[\text{Gd}(\text{dhqN-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3]^{3-}$ et le $[\text{Gd}(\text{hqtcn-SO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2]^{3-}$. Cependant, les mesures en présence d'anions se font dans des conditions (200 équivalents d'anions) qui ne traduisent pas la réalité du milieu biologique mais sont utilisées pour comparer les valeurs avec celles de la littérature. Les mesures de relaxivité de nos complexes dans le sérum ont d'ailleurs confirmé le bon comportement en milieu biologique de nos complexes, aussi bien par leur capacité d'association avec les protéines que par leur faible sensibilité aux anions endogènes.

Si le nombre de molécules d'eau des complexes de Gd(III) est crucial pour obtenir une bonne relaxivité à haut champ, il n'est pas moins essentiel d'optimiser les autres paramètres dynamiques qui influent sur la relaxivité. De ce fait, les études réalisées sur les dérivées de la dpaa ont montré qu'une augmentation importante de relaxivité à haut champ pouvait être obtenue en greffant de façon covalente sur un complexe tris aqua, une macromolécule de type nucléoside. L'augmentation de relaxivité obtenue à 200MHz est de l'ordre de 5 à 6 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ entre le complexe simple et le complexe greffé. L'étude menée sur ces différents dérivés n'a pas montré d'influence du type ou de la position de la liaison formée avec le nucléoside, et l'ensemble des complexes de Gd(III) synthétisés atteignent des valeurs de relaxivité à 200 MHz comprises entre 15 et 16 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ particulièrement élevées pour des valeurs à haut champ. Ces études ouvrent des perspectives particulièrement intéressantes pour l'optimisation de la valeur de τ_r à haut champ et le greffage d'unité plus grosse pourrait permettre de déterminer l'influence de la flexibilité du groupement greffé sur l'allongement du τ_r et donc sur la relaxivité.

En ce qui concerne la luminescence des complexes de Nd(III) et Yb(III), l'hydroxyquinoléine a montré sa capacité à sensibiliser efficacement ces ions lanthanides pour la luminescence dans le proche infrarouge. Cependant, la présence de molécules d'eau sur la plupart des complexes a pour conséquence de faire chuter les rendements quantiques, mais ces résultats restent remarquables car il existe peu de complexes montrant un rendement quantique mesurable pour la luminescence proche infrarouge malgré la présence de molécules d'eau en première sphère de coordination. Le $[\text{Nd}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ et le $[\text{Yb}(\text{thqtcn-SO}_3)]^{3-}$ restent cependant les complexes les plus intéressants pour la luminescence proche infra rouge. Un travail en collaboration avec deux équipes (CEA LITEN, DTNM/LCSN et CEA LETI-

Minatec) ont permis d'exploiter ces propriétés de luminescence ainsi que celles des complexes de [Nd(tpatcn)] et [Tb(tpatcn)] déjà étudiées au sein de notre laboratoire pour la réalisation de nanobilles de silice présentant deux longueurs d'onde d'émissions différentes. La forte stabilité de nos complexes associés à leurs performances pour la luminescence en font de bons candidats pour être insérés au sein de ce type d'objet. En effet, nos complexes restent stables sur une large gamme de pH et peuvent ainsi endurer les conditions nécessaires à la synthèse des billes de silice sans subir de dégradation. Les images STEM des nanobilles soulignent l'influence de la solubilité de nos complexes en phase aqueuse sur leur localisation dans les nanoparticules et la perspective d'un travail sur la solubilité des complexes pourrait permettre de contrôler la répartition de ces derniers au sein de ces nanobilles de silices.

Les résultats particulièrement intéressants obtenus avec ces complexes montrent que le motif 8-hydroxyquinoléine permet de synthétiser des complexes particulièrement stables et présentant des propriétés remarquables tant du point de vue de la relaxivité que de celui de la luminescence proche infrarouge. De ce fait, le développement d'autres complexes basés sur ce même motif ouvrirait des perspectives, à la fois au niveau de la compréhension de l'influence de la structure des complexes sur leurs propriétés qu'au niveau de l'optimisation de ces propriétés dans le but d'obtenir des complexes plus performants. Dans cette optique, le remplacement des groupements solubilisants sulfonates par d'autres substituants capables d'assurer la solubilité des complexes (chaînes PEG par exemple), permettrait d'accéder à des analogues des complexes déjà étudiés, et autoriserait la synthèse de nouveaux composés, inaccessibles car leur structure ne supporte pas la sulfonation (par exemple, les analogues solubles des complexes [Ln(dhqN-gly)(H₂O)₃] et [Ln(dhqN-asp)(H₂O)₂]). De plus, la synthèse de complexes portant des groupements plus encombrants permettraient d'étudier l'influence de l'encombrement stérique sur la dynamique de rotation des complexes, sur les interactions avec les anions et avec l'albumine, et sur la luminescence proche infrarouge.

Partie expérimentale

Partie expérimentale.....	229
1. Généralités.....	230
1.1. Réactifs et solvant	230
1.2. Chromatographies	230
1.2.1. CCM et colonnes.....	230
1.2.2. HPLC.....	230
1.3. Caractérisation.....	231
2. Synthèse des ligands.....	232
2.1. Synthèse du ligand H ₃ hqtcn-SO ₃	232
2.2. Synthèse du ligand H ₃ dhqtcn-SO ₃	235
2.3. Synthèse du ligand H ₃ thqtcn-SO ₃	237
2.4. Synthèse du ligand H ₃ dhqN-SO ₃	239
2.5. Synthèse du ligand H ₃ dhqNgly	241
2.6. Synthèse du ligand H ₄ dhqNasp	243
2.7. Synthèse du ligand H ₃ thqN-SO ₃	244
3. Synthèse des complexes	255
3.1. Ligand H ₃ thqtcn-SO ₃	255
3.2. Ligand H ₃ dhqtcn-SO ₃	256
3.3. Ligand H ₃ thqN-SO ₃	257
3.4. Ligand H ₃ dhqN-SO ₃	258
3.5. Ligand N ₃ dpaa.....	258
3.6. Ligand dU2'Pdpa.....	259
3.7. Ligand dU5Pdpa.....	259
3.8. Ligand dU5Pdpa.....	260
4. Méthodes analytiques	260
4.1. Etudes potentiométriques	260
4.1.1. Calibration de l'électrode	261
4.1.2. Dosages	261
Détermination des pKa du ligand	261
4.2. Mesures spectrophotométriques	262
4.3. Mesures de luminescence	262
4.4. Mesures de relaxométrie	263
Bibliographie	268

1. Généralités

1.1. Réactifs et solvant

Les solvants et les réactifs de départ proviennent de chez Aldrich, Flucka, Acros et Alfa. Ils ont été utilisés sans purification particulière sauf si spécifié. Les solvant anhydres proviennent de chez Aldrich et ont été utilisés sans purification supplémentaire. L'eau utilisée correspond à une eau de grande pureté présentant une valeur de résistivité de 18 M Ω .cm, obtenue à partir d'un système de purification «Millipore/MilliQ». Les sels de lanthanides proviennent de chez Aldrich. Ceux-ci ont été dosés par titration par colorimétrie avant utilisation.

1.2. Chromatographies

1.2.1. CCM et colonnes

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ Merck, des plaques de gel de silice 60 RP18 F₂₅₄S Merck ou des plaques d'oxyde d'aluminium F₂₅₄ neutre Merck.

Les chromatographies sur silice ont été réalisés sur gel de silice 60 F₂₅₄ (40-53 μ m), 60 RP18 F₂₅₄S, ou sur oxyde d'aluminium 90 activité III (4.9% d'eau, 63-200 μ m).

1.2.2. HPLC

HPLC analytique

Colonne :

- Purosphere RP18
- p = 5 μ m
- L = 250 mm
- \varnothing = 5 mm
- d = 1 mL/min

Détection (UV) : λ = 270 nm

Éluant :

- A : CH₃CN/H₂O/TFA : 90/10/0.01
- B : H₂O/TFA : 99.925/0.075

Méthode : Au départ, la colonne est conditionnée dans l'éluant B (100 %). Trois gradients linéaires sont successivement appliqués pour éluer le composé à analyser (jusqu'à atteindre une concentration en A de 100%). Pour finir, un dernier gradient est appliqué jusqu'à atteindre à nouveau une concentration en B de 100 %.

HPLC préparative

Colonne :

- Purosphere RP18
- $p = 5\mu\text{m}$
- $L = 250\text{ mm}$
- $\varnothing = 50\text{ mm}$
- $d = 1\text{ mL/min}$

Détection (UV) : $\lambda = 270\text{ nm}$

Éluant :

- A : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} : 90/10/0.01$
- B : $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} : 99.925/0.075$

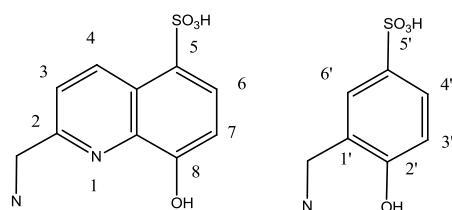
1.3. Caractérisation

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker Avance DMX 200, Varian Mercury et Varian Unity 400, et Bruker Avance DMX 500. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm en utilisant le solvant comme référence interne. Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux : s (singulet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet de doublets), m (multiplet).

Les spectres de masse d'ionisation par électrospray (ES-MS) ont été enregistrés sur un spectromètre Finigan LCQ à trappe d'ions.

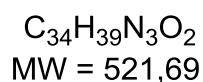
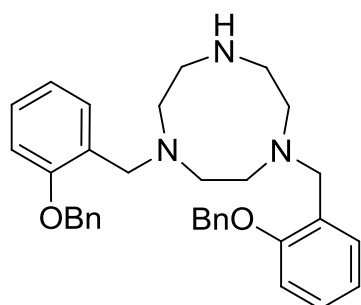
Les analyses élémentaires ont été réalisées au Service Central d'Analyse du CNRS à Vernaison.

2. Synthèse des ligands



2.1. Synthèse du ligand $H_3hqtcn-SO_3$

1,4-bis(2-(benzyloxy)benzyl)-1,4,7-triazonane: to a solution of, 1,4,7-triazacyclononane tris-HCl (1g, 4.19mmol) in 1,2 anhydrous dichloroethane (200mL) under argon, diisopropylethylamine (2.1 mL, 8.38 mmol) is added. After 15 minutes of stirring, sodium triacetoxymethylborohydride (2.218g, 10.48mmol) and 2-benzyloxybenzaldehyde commercial (1.78g, 8.38 mmol) are added to the reaction mixture. The mixture is stirred overnight at room temperature. The reaction is stopped by addition of 75mL of water. The aqueous phase is extracted with dichloromethane (3x50mL). The organic phases are gathered, dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude orange oil (2.945g) is purified by column chromatography on silica gel (400mL, $CH_2Cl_2/EtOH$ gradient from 100/0 to 80/20). The compound is obtained as a pale yellow solid (460mg)

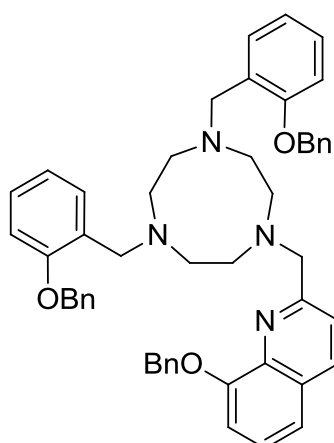


Yield : 21%

1H NMR ($CDCl_3$, 200MHz) δ (ppm): 7.42 (m, 10H, benzyl), 7.24 (d, 6.6Hz, 2H, H5), 6.96 (m, 6H, H phenol), 5.16 (s, 4H, CH_2 -benzyl), 3.66 (s, 4H, CH_2 phenol), 2.86 (d, 4.8Hz, 4H, CH_2 triazacyclononane H5 H9), 2.78 (d, 4.8Hz, 4H, CH_2 triazacyclononane H6 H8), 2.45 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane H2 H3)

ES-MS (m/z) : $[M+H]^+$: 522.6

8-(benzyloxy)-2-((4,7-bis(2-(benzyloxy)benzyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)methyl)quinoline :



$C_{51}H_{52}N_4O_3$
MW = 768,98

to a solution of 1,4-bis(2-(benzyloxy)benzyl)-1,4,7-triazonane (460 mg, 0.88mmol) in anhydrous 1,2-dichloroethane (10mL) under argon, sodium triacetoxyborohydride (234 mg, 1.10mmol) and 8-(benzyloxy)quinoline-2-carbaldehyde (290 mg, 1.10mmol) are successively added to the reaction mixture. The mixture is stirred overnight at room temperature. The reaction is stopped by adding of 5 mL of water, the aqueous phase is extracted with CH_2Cl_2 (3x50mL). The organic phases are gathered, dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude orange oil (850 mg) is purified by column chromatography on silica gel (100mL, CH_2Cl_2 /EtOH gradient from 100/0 to 90/10) to give the

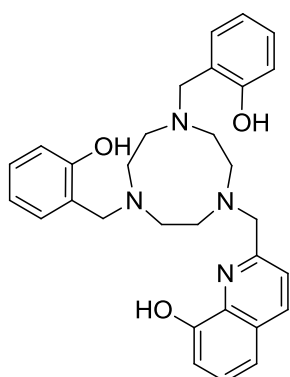
product as an orange oil (300mg).

Yield : 46%

1H NMR ($CDCl_3$, 200MHz) δ (ppm): 7.97 (d, 9.8Hz, 1H, H4 quinoline), 7.26 (m, 19H, H aromatic), 7.24 (d, 6.6Hz, 2H, H5), 7.00(dd , 6.6Hz, 2.5Hz, 1H, H quinoline), 6.85(m, H aromatic), 5.22 (s, 2H, quinoline- CH_2 -benzyl), 4.92 (s, 4H, phenol- CH_2 -benzyl), 3.86 (s, 2H, CH_2 quinoline), 3.81 (s, 4H, CH_2 phenol), 3.03 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane), 2.77 (s, 8H, CH_2 triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : $[M+H]^+$: 769.7

2,2'-(7-((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)bis(methylene)diphenol :



$C_{30}H_{34}N_4O_3$
MW = 498,62

to a solution of 8-(benzyloxy)-2-((4,7-bis(2-(benzyloxy)benzyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)methyl)quinoline (300 mg, 0.41mmol) in anhydrous dichloromethane (5 mL) under argon at 0°C, a molar solution of boron tribromide in anhydrous dichloromethane (2.36mL, 7.38mmol) is slowly added .A precipitate is formed immediately in the reaction mixture. After 1h of stirring, the reaction was stopped by slow addition of methanol at 0°C. Evaporate under reduced pressure, then add methanol and evaporate again. This operation is repeated many times. The crude orange oil

is purified by HPLC.

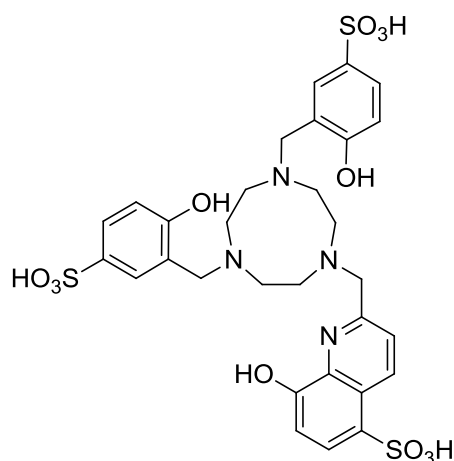
Yield : 41%

^1H NMR (CD_3OD , 200MHz) δ (ppm): 8.36 (d, 8.4Hz, 1H, H4), 7.43 (m, 3H, Hquinoline H3, 2H phenol H6'), 7.24 (d, 8.7Hz, 1H, H7), 7.11 (dd, 6.5Hz, 2.2 Hz, 1H, H6), 7.01 (t, 7.7Hz, H5'), 6.79 (d, 8.0Hz, 2H, H3'), 6.66 (m, 3H, H5, H4'), 4.08 (s, 4H, CH_2 quinoline), 4.01 (s, 4H, CH_2 phenol), 3.15 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane), 2.92 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane), 2.79 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : $[\text{M}+\text{H}]^+$: 499.5

3,3'-(7-((8-hydroxy-5-sulfoquinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane-1,4-

diyl)bis(methylene)bis(4-hydroxybenzenesulfonic acid): 2,2'-(7-((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane-1,4-



$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_3$
MW = 738,81

diyl)bis(methylene)diphenol is dissolved (55mg, 0.11mmol) in the minimum amount of oleum (2mL) and is stirred for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by adding ice, and the water is removed under reduced pressure. The product is dissolved into ethanol (2mL) and precipitated with diethyl ether (50mL), then filtered off to give a yellow solide.

Yield = 50%

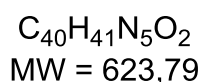
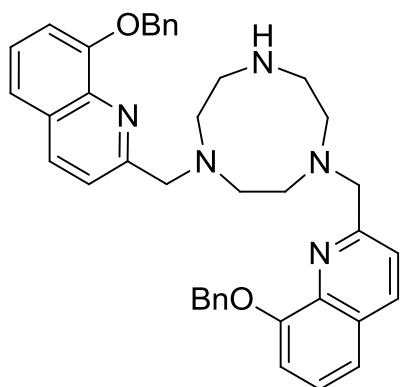
^1H NMR (D_2O , 200MHz) δ (ppm): 8.73 (d, 8.8Hz, 1H, H4), 7.77 (d, 8.5Hz, 1H, H6), 7.62(d, 1H, 8.9Hz, H3), 7.57 (d, 2.5Hz, 1H, H6'), 7.38 (dd, 8.6Hz, 2.5Hz, 2H, H3'), 6.57 (d, 8.7Hz, 2H, H7), 6.52(d, 8.7Hz, H4'), 3.85(s, 2H, CH_2 quinoline), 3.73(s, 4H, CH_2 phenol), 2.79 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane), 2.68 (s, 8H, CH_2 triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : $[\text{M}-\text{H}]^-$: 737.0

Elemental Anal. (%) Calcd. for $\text{hqdphtcnSO}_3 \cdot 4.1\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 1.0\text{MeOH}$: C 31.66, H 4.22, N 4.76, found C 31.74, H 4.49, N 4.81

2.2. Synthèse du ligand $H_3dhqtcn-SO_3$

1,4-bis((8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane : to a solution of, 1,4,7-



triazacyclononane tris-HCl (1g, 4.19mmol) in anhydrous 1,2 dichloroethane (200mL) under argon, diisopropylethylamine (2.1 mL, 8.38 mmol) is added. After 15 minutes of stirring, sodium triacetoxyborohydride (2.218g, 10.48mmol) and 8-(benzyloxy)quinoline-2-carbaldehyde (2.207g, 8.38 mmol) are added successively to the reaction mixture. The mixture is stirred overnight at room temperature. The reaction is stopped by addition of 75mL of water, the aqueous phase is extracted with CH_2Cl_2 (3x50mL). The organic phases are gathered, dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced

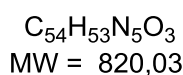
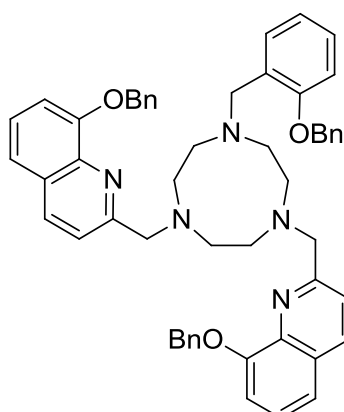
pressure. The crude orange oil is purified by column chromatography on alumina activity III (400mL, CH_2Cl_2 /EtOH gradient from 100/0 to 80/20). The product is obtained as an orange solid.

Yield : 77%

1H NMR ($CDCl_3$, 200MHz) δ (ppm): 7.94 (d, 8.5Hz, 2H, H quinoline), 7.32 (m, 16H, H aromatique), 7.07 (d, 3.1Hz, 1H, H phenol), 7.04 (d, 3.1Hz, 1H, H phenol), 5.56 (s, 4H, CH_2 benzyl), 4.10 (s, 4H, CH_2 quinoline), 3.29 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane), 3.02 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane), 2.76 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : $[M+H]^+$: 624.6

2,2'-(7-(2-(benzyloxy)benzyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)bis(methylene)bis(8-



(benzyloxy)quinoline) : To a solution of 1,4-bis((8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane (2g, 3.2 mmol) in 1,2 dichloroethane anhydrous (100mL) under argon atmosphere, add successively sodium triacetoxyborohydride (0.849 g, 4.0mmol) and 2-benzyloxybenzaldehyde commercial (0.682 g, 3.2mmol). The mixture is stirred overnight at room temperature. The reaction is stopped by addition of 50 mL of water, the aqueous phase is extracted 3x50mL of CH_2Cl_2 . The

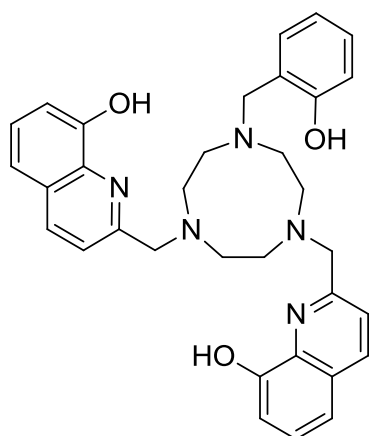
organic phases are gathered, dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude orange oil is purified by column chromatography on alumina activity III (400mL, CH₂Cl₂/EtOH gradient from 100/0 to 95/5) to give an orange oil .

Yield : 52%

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm): 7.97 (d, 8.6Hz, 2H, Hquinoline), 7.76 (d, 8.3Hz, 2H, Hquinoline), 7.46 (m, 5H, H aromatic), 7.31 (m, 16H, H aromatic), 6.96 (t, 3.1Hz, 1H, H phenol), 6.90 (m, 2H, H phenol), 5.41 (s, 4H, quinoline-CH₂-benzyl), 5.03 (s, 2H, quinoline-CH₂-phenol), 4.04 (s, 2H, CH₂ quinoline), 3.76 (s, 4H, CH₂ phenol), 2.93 (s, 12H, CH₂ triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : [M+H]⁺ : 820.7

2-(2-(4-(2-hydroxybenzyl)-7-((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonan-1-



C₃₃H₃₅N₅O₃
MW = 549,66

yl)ethyl)quinolin-8-ol : To a solution of 2,2'-(7-(2-(benzyloxy)benzyl)-1,4,7-triazonan-1,4-diyl)bis(methylene)bis(8-(benzyloxy)quinoline) (754 mg, 0.9mmol) in anhydrous dichloromethane (16 mL) under argon atmosphere and on a ice bath, add slowly boron tribromide solution (1.6mL in 16mL anhydrous dichloromethane). A precipitate is formed immediately in the reaction mixture. After 1h of stirring, the reaction was stopped by slow addition of methanol in an ice bath. Evaporate under reduced pressure, then add methanol and evaporate again. This operation is repeated many times. The crude orange oil is purified by

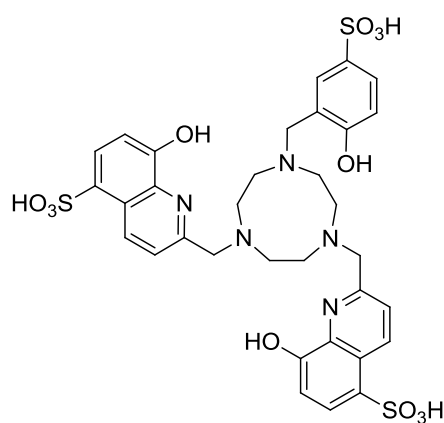
HPLC.

Yield : 59%

¹H NMR (CD₃OD, 200MHz) δ (ppm): 8.16 (d, 8.5Hz, 2H, H4), 7.42 (m, 8.3Hz, 5H, H3, H7, H6'), 7.37 (d, 2.5Hz, 1H, H6'), 7.28, (d, 7.2Hz, 2H, H6), 7.20 (t, 7.8Hz, 1H, H5'), 7.11 (d, 7.6Hz, 2H, H5), 6.96 (d, 8.1Hz, 1H, H3'), 6.75 (t, 7.3Hz, 1H, H4'), 4.10 (s, 2H, CH₂ phenol), 3.92 (s, 4H, CH₂ quinoline), 3.06 (s, 4H, CH₂ triazacyclononane), 2.86 (s, 4H, CH₂ triazacyclononane), 2.56 (s, 4H, CH₂ triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : [M+H]⁺ : 550.5

2,2'-(7-(2-hydroxy-5-sulfobenzyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)bis(methylene)bis(8-



$C_{33}H_{35}N_5O_{12}S_3$
MW = 789,85

hydroxyquinoline-5-sulfonic acid) : 2-(2-(4-(2-hydroxybenzyl)-7-((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonan-1-yl)ethyl)quinolin-8-ol is dissolved in the minimum amount of oleum (2mL) and is stirred for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by adding ice, and the water is removed under reduced pressure. The product is dissolved into ethanol (2mL) and precipitated with diethyl ether (50mL), then filtered off to give a yellow solide.

Yield = 50%

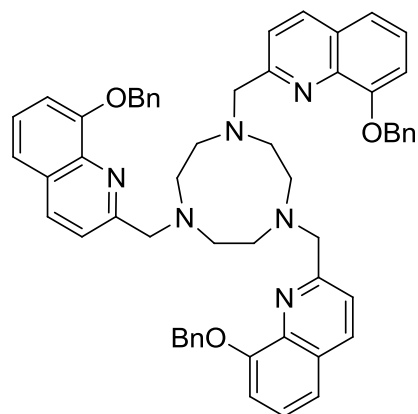
1H NMR (D_2O , 200MHz) δ (ppm): 8.76 (d, 8.8Hz, 2H, H4), 7.77 (d, 8.5Hz, 2H, H6), 7.68 (d, 9.2Hz, 2H, H3), 7.63 (s, 1H, H6'), 7.47(d, 8.7Hz, 1H H3'), 6.61 (m, 3H, H7, H4'), 4.03(s, 2H, CH₂ phenol), 3.85 (s, 4H, CH₂ quinoline), 2.89 (s, 4H, CH₂ triazacyclononane), 2.79 (s, 4H, CH₂ triazacyclononane), 2.49 (s, 4H, CH₂ triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : [M-H]⁻ : 788.1

Elemental Anal. (%) Calcd. for dhqtcn-SO₃·3.6H₂SO₄·1.0MeOH: C 35.25, H 4.25, N 6.05, found C 35.44, H 4.55, N 6.20

2.3. Synthèse du ligand *H₃thqtcn-SO₃*

1,4,7-tris((8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane



$C_{57}H_{54}N_6O_3$
MW = 871,08

to a solution of, 1,4,7-triazacyclononane tris-HCl (400mg, 1.67 mmol) in anhydrous 1,2 dichloroethane (25mL) under argon, diisopropylethylamine (1.66 mL, 10.0 mmol) is added. After 15 minutes of stirring, sodium triacetoxyborohydride (3.20g, 15.0 mmol) and 8-(benzyloxy)quinoline-2-carbaldehyde (1.98 g, 7.54 mmol) are added successively to the reaction mixture. The mixture is stirred overnight at room temperature. The reaction is stopped by addition of 75mL of water, the aqueous phase is extracted with CH₂Cl₂ (3x50mL). The organic phases are gathered, dried over Na₂SO₄ and

evaporated under reduced pressure. The crude orange oil is purified by column

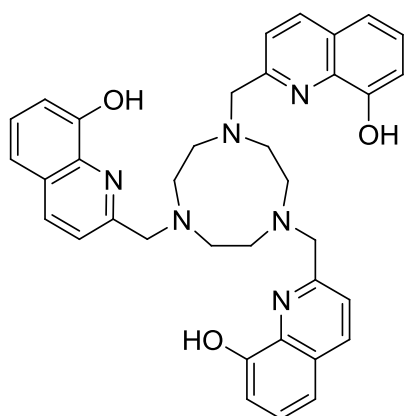
chromatography on silica (CH₂Cl₂/EtOH gradient from 100/0 to 95/5). The product is obtained as an orange solid.

Yield : 68%

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm): 7.94 (d, 8.5Hz, 3H, H quinoline), 7.70(d, 8,5 Hz, 3H, H quinoline), 7.36 (m, 21H, H aromatique), 7.07 (d, 8,5Hz, 3H quinoline) 5.30 (s, 6H, CH₂ benzyl), 4.21 (s, 6H, CH₂ quinoline), 3.31 (s, 12H, CH₂ triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : [M+H]⁺ : 871.3

2,2',2''-(1,4,7-triazonane-1,4,7-triyl)tris(methylene)triquinolin-8-ol



C₃₆H₃₆N₆O₃
MW = 600.71

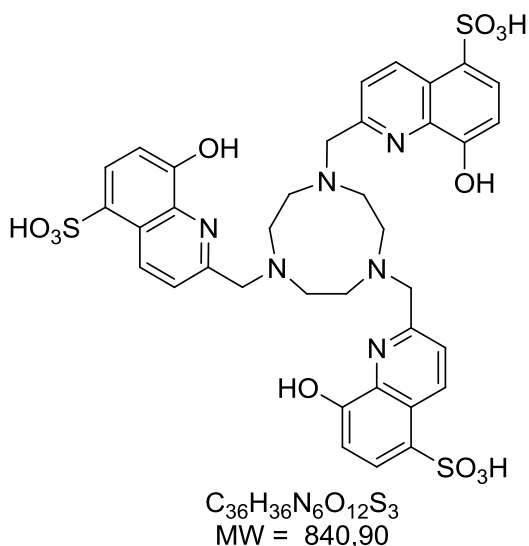
To a solution of 1,4,7-tris((8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)methyl)-1,4,7-triazonane (1.00 g, 1.14 mmol) in anhydrous dichloromethane (16 mL) under argon atmosphere and on a ice bath, add slowly boron tribromide solution (1.6mL in 16mL anhydrous dichloromethane). A precipitate is formed immediately in the reaction mixture. After 1h of stirring, the reaction was stopped by slow addition of methanol in an ice bath. Evaporate under reduced pressure, then add methanol and evaporate again. This operation is repeated many times. The crude orange oil is purified by HPLC.

Yield : 38%

¹H NMR (CD₃OD, 200MHz) δ (ppm): 7.77 (d, 3H, H4, 8.5Hz), 7.24 (d, 3H, H3, 8.3Hz), 7.07 (t, 3H, H6, 7.8Hz), 6.88 (dd, 3H, H7, 8.0Hz, 1.2Hz), 6.72 (dd, 3H, H5, 8.0Hz, 1.2Hz), 3.68 (s, 2H, CH₂ quinoline), 2.68 (s, 12H, CH₂ triazacyclononane)

ES-MS (m/z) : [M+H]⁺ : 601.3

2,2',2''-(1,4,7-triazonane-1,4,7-triyl)tris(methylene)tris(8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid)



2,2',2''-(1,4,7-triazonane-1,4,7-triyl)tris(methylene)triquinolin-8-ol is dissolved in the minimum amount of oleum (2mL) and is stirred for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by adding ice, and the water is removed under reduced pressure. The product is dissolved into ethanol (2mL) and precipitated with diethyl ether (50mL), then filtered off to give a yellow solide.

Yield = 50%

1H NMR (D_2O , 200MHz) δ (ppm): 8.76 (d, 8.8Hz, 3H, H4), 7.84 (d, 8.5Hz, 3H, H6), 7.61 (d, 9.2Hz,

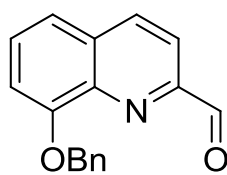
3H, H3), 6.65 (m, 3H, H7), 3.88 (s, 6H, CH_2 quinoline), 2.17 (s, 8H, CH_2 triazacyclononane), 2.93 (s, 4H, CH_2 triazacyclononane)

ES-MS m/z (%): $[M + H]^+$: 641.2

Analyse élémentaire calculée (%) pour $thqtcn-SO_3 \cdot 6H_2O \cdot 0.3H_2SO_4$: C 44.23, H 4.95, N 8.60; expérimentale : C 44.07, H 4.99, N 8.63%.

2.4. Synthèse du ligand $H_3dhqN-SO_3$

8-(benzyloxy)quinoline-2-carbaldehyde: 8-(benzyloxy)-2-methylquinoline (23.1g, 92mmol)



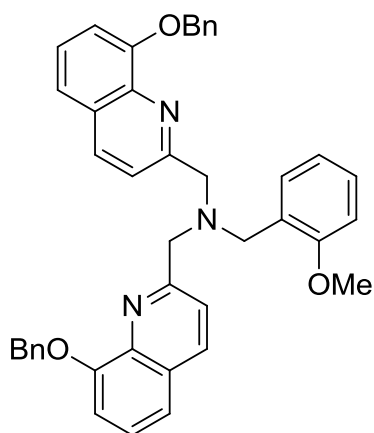
$C_{17}H_{13}NO_2$
MW = 263,29

is added to a suspension of selenium oxide (12.85g, 115 mmol, 1.25eq) in dioxane (500ml) under argon. The mixture was heated at 80 °C during 24h. After cooling at room temperature, the mixture is filtered on celite and then the filtrate is concentrated under vacuum. Purification of the resulting crude product (on silica column chromatography with dichloromethane) afforded the desired aldehyde as a yellow solid.

Yield : 82%

1H NMR ($CDCl_3$, 200MHz) δ (ppm): 10.32 (s, 1H, CHO), 8.28 (d, 1H, H4 , 8.6Hz), 8.07 (d, 1H, H3, 8.9Hz), 7.5 (m, 7H, 2H quinoline, 5H benzyloxy), 7.28 (dd, 1H, H5, 8.3Hz, 1.3Hz), 5.50 (s, 2H, CH_2OBn).

1-(8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)-N-((8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)methyl)-N-(2-



$C_{42}H_{37}N_3O_3$
MW = 631,76

methoxybenzyl)methanamine : (2-methoxyphenyl)methanamine (479 mg, 3.5 mmol) and 8-(benzyloxy)quinoline-2-carbaldehyde (2.76 g, 10.5 mmol) are mixed in extra dry dichloroethane (30mL) under argon. $NaBH(OAc)_3$ (6.33g, 21mmol) is added and the mixture is stirred at room temperature during 24h. The reaction is quenched with $NaHCO_3$ (1M, 30mL), extracted with dichloromethane (2x50mL) and washed with brine (2x30mL). The organic layer is dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The product is purified by column chromatography on aluminium oxide with DCM. The desired

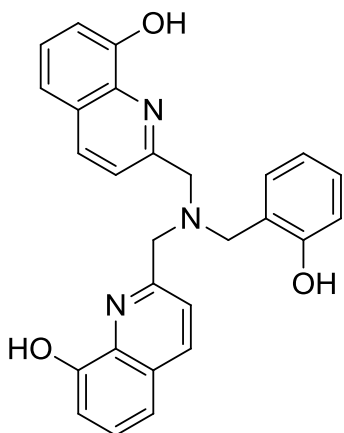
product is obtained as a white solide.

Yield : 71%

1H NMR ($CDCl_3$, 200MHz) δ (ppm): 8.09 (d, 2H, 8.6Hz), 7.95 (d, 2H, 8.4Hz), 7.70 (d, 1H, 7.4Hz), 7.57 (d, 4H, 6.6Hz), 7.37 (m, 10H, benzyl), 7.23 (d, 1H, 7.8Hz), 7.05 (dd, 2H, 6.2Hz, 2.6Hz), 6.97 (d, 1H, 7.4Hz), 6.87 (d, 1H, 8.2Hz), 5.48 (s, 4H, CH_2 -Nquinoline), 4.18 (s, 4H, CH_2 -O quinoline), 3.90 (s, 2H, CH_2 -N phénol), 3.81 (s, CH_3O -)

ES-MS: m/z (%): 631.2 [$M + H$]⁺

2,2'-(2-hydroxybenzylazanediy)bis(methylene)diquinolin-8-ol :



$C_{27}H_{23}N_3O_3$
MW = 437,49

(benzyloxy)quinolin-2-yl)-N-((8-(benzyloxy)quinolin-2-yl)methyl)-N-(2-methoxybenzyl)methanamine (680mg, 1.1mmol) is dissolved in extra dry dichloromethane (20mL) under argon. A molar solution of BBr_3 in dichloromethane (20mL, 19.4mmol) is added dropwise at 0°C. After the addition, the reaction is stirred overnight at room temperature. Methanol (20mL) is added dropwise to the reaction and concentrated under vacuum. The operation is repeated four times until bromobenzyl is totally removed. The product is dissolved into a minimum of methanol (2mL) and precipitated with diethylique

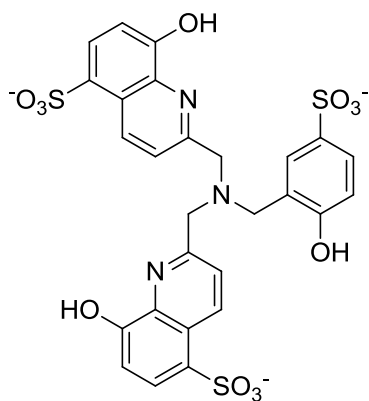
ether (50mL). The yellow powder obtain is filtered off and washed with diethylique ether (2x10mL). The raw product is then purified on column chromatography (RP18) (Water/Acetonitrile/TFA 70:30:0.01)

Yield : 35%

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 200MHz) δ (ppm): 8.85(d, 2H, 8.6Hz, H4), 8.13 (d, 2H, 8.6Hz, H3), 7.68(m, 4H, H5, H7), 7.44 (dd, 2H, 7.2Hz, 2.4Hz, H6), 7.29 (dd, 1H, 7.4Hz, 1.6Hz H6'), 6.90 (td, 1H, 8Hz, 1.6Hz, H5'), 6.67 (td, 1H, 7.4Hz, 1.2Hz, H4'), 6.50 (dd, 1H, 8.0Hz, 0.8Hz, H3'), 4.82 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-Nquinoline}$), 4.23 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N phénol}$).

ES-MS: m/z (%): 438.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$

2,2'-(2-hydroxy-5-sulfonatobenzylazanediyl)bis(methylene)bis(8-hydroxyquinoline-5-sulfonate):



$\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{S}_3^{3-}$
MW = 674,66

2,2'-(2-hydroxybenzylazanediyl)bis(methylene)diquinolin-8-ol (80 mg, 0.18mmol) is dissolved in the minimum amount of oleum (2mL) and is stirred for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by adding ice, and the water is removed under reduced pressure. The product is dissolved into ethanol (2mL) and precipitated with diethyl ether (50mL), then filtered off to give a yellow solide.

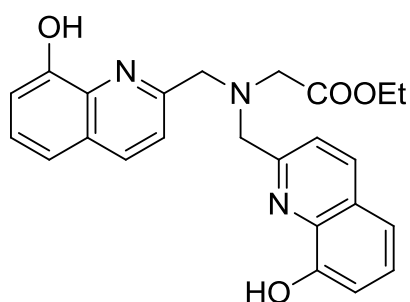
Yield = 50%

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 200MHz) δ (ppm): 8.68(d, 9.0Hz, 2H, H4), 7.76(d, 8.2Hz, 2H, H6), 7.69(d, 8.8Hz, 2H, H3), 7.62 (s,1H, H6'), 7.28 (d, 8.4Hz, 1H, H3'), 6.60(d, 8.2Hz, 2H, H7), 6.42 (d, 8.4Hz, 1H, H4'), 3.89(s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N quinoline}$), 3.59 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N phénol}$)

Elemental Anal. (%) Calcd. for $\text{dhqN-SO}_3 \cdot 3.6\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 0.7\text{MeOH}$: C 31.65, H 3.03, N 4.00, found C 31.54, H 3.62, N 4.01

2.5. Synthèse du ligand $\text{H}_3\text{dhqNgly}$

Ethyl-2-(bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)amino) acetate



$\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$
MW = 417,46

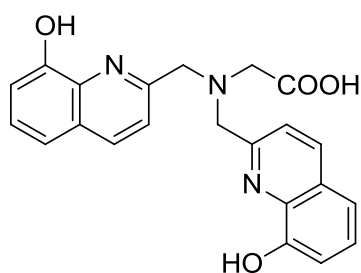
Ethyl glycine ester (0.5g, 3.58mmol) and 8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde (1.87g, 10.7mmol) are dissolved in anhydrous dichloroethane (30mL) under argon. Diisopropylethylamine (4.55g, 21.5mmol) is added and the mixture is stirred an hour at room temperature. Then $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ is added and the reaction mixture is stirred at

room temperature overnight. The reaction is quenched with NaHCO₃ (1M, 30mL), extracted with dichloromethane (2x50mL) and washed with brine (2x30mL). The organic layer is dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product is purified by column chromatography on RP18 (RP18) (Water/Acetonitrile/TFA from 90:10:0.01 to 75:25:0.01). The desired product is obtained as a yellow solide.

Yield : 58%

¹H NMR (CD₃OD, 200MHz) δ (ppm): 8.38 (d, 8.4Hz, 2H), 7.68 (d, 8.4Hz, 2H), 7.48 (t, 2H, 8.4Hz), 7.34 (d, 8.5Hz, 2H), 7.17 (d, 2H, 8.5Hz), 4.65 (s, 4H, CH₂quinoline), 4.23 (q, 2H, 7.2Hz, OCH₂CH₃), 4.09 (s, 2H (CH₂gly), 1.26 (t, 3H, 7.2Hz, OCH₂CH₃)

ES-MS: m/z (%): 440.3 [M + Na]⁺



C₂₂H₁₉N₃O₄
MW = 389,40

2-(bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)amino)acetic acid

ethyl 2-(bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)amino)acetate (0.87g, 2.1mmol) is dissolved in HCl (6N, 40mL). The mixture is stirred overnight at 50°C, and then concentrated under vacuum to give a yellow solid.

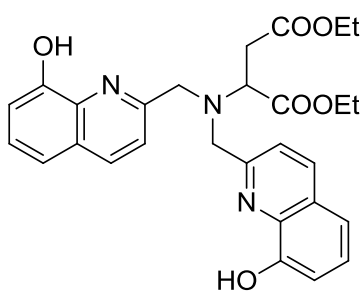
Yield : 50%

¹H NMR (CD₃OD, 200MHz) δ (ppm): 8.52 (d, H₄, 2H, 8.5Hz), 7.72 (d, H₃, 2H, 8.5Hz), 7.47 (t, H₆, 2H, 8.1Hz), 7.30 (d, H₅, 2H, 7.8Hz), 7.15 (d, H₇, 2H, 7.7Hz), 4.54 (s, 4H, CH₂quinoline), 4.04 (s, 2H (CH₂gly)

ES-MS: m/z (%): 390.1

2.6. Synthèse du ligand $H_4dhqNasp$

diethyl 2-(bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)amino)succinate



C₂₈H₂₉N₃O₆
MW = 503,55

Diethyl 2-aminosuccinate (0.5g, 2.64mmol) and 8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde (1.38g, 7.93mmol) are dissolved in anhydrous dichloroethane (30mL) under argon. NaBH(OAc)₃ is added and the reaction mixture is stirred at room temperature overnight. The reaction is quenched with NaHCO₃ (1M, 30mL), extracted with dichloromethane (2x50mL) and washed with brine (2x30mL). The organic layer is dried on Na₂SO₄, filtered and concentrated under

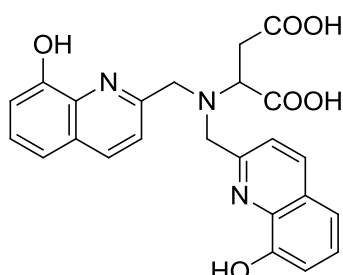
vacuum. The product is purified by column chromatography on RP18 (RP18) (Water/Acetonitrile/TFA from 90:10:0.01 to 80:20:0.01) and then on sephadex LH20 (methanol). The desired product is obtained as a yellow solide.

Yield : 34%

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm): 8.62 (d, 8.5Hz, 2H), 7.82 (d, 8.5Hz, 2H), 7.57 (t, 2H, 8.1Hz), 7.44 (d, 7.8Hz, 2H), 7.34 (d, 7.7Hz, 2H), 4.84 (s, 4H, CH₂quinoline), 4.50 (dd, 1H, CHAsp), 4.36 (q, 2H, 7.2Hz, OCH₂CH₃), 4.14 (q, 2H, 7.2Hz, OCH₂CH₃), 2.90 (ddd, 1H, (CH₂Asp), 1.37 (t, 3H, 7.2Hz, OCH₂CH₃), 1.16 (t, 3H, 7.2Hz, OCH₂CH₃)

ES-MS: m/z (%): 504.4 [M + H]⁺

2-(bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)amino)succinic acid



C₂₄H₂₁N₃O₆
MW = 447,44

ethyl 2-(bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)methyl)amino)acetate (0.87g, 2.1mmol) is dissolved in HCl (6N, 40mL). The mixture is stirred overnight at 50°C, and then concentrated under vacuum to give a yellow solid.

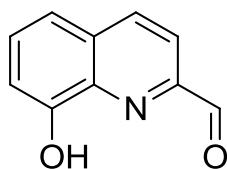
Yield : 90%

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm): 8.76 (d, 8.5Hz, 2H), 7.98 (d, 8.5Hz, 2H), 7.58 (t, 2H, 8.1Hz), 7.46 (d, 7.8Hz, 2H), 7.26 (d, 7.7Hz, 2H), 4.68 (s, 2H, CH₂quinoline), 4.62 (s, 2H, CH₂quinoline), 4.25 (dd, 1H, CHAsp), 3.00 (ddd, 2H, CH₂Asp)

ES-MS: m/z (%): 448.3 [M + H]⁺

2.7. Synthèse du ligand H₃thqN-SO₃

8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde: Commercially available 8-hydroxy-2-methyl-quinoline (5.0g, 31 mol) was added to a suspension of selenium oxide (4.35g, 39 mmol, 1.25eq) in dioxane (100ml) under argon. The mixture was heated at 80 °C during 24h. After cooling at room temperature, the mixture was filtered on celite. The filtrate was concentrated under vacuum. Purification of the resulting crude product (on silica column chromatography with dichloromethane) afforded the desired aldehyde as a yellow solid.

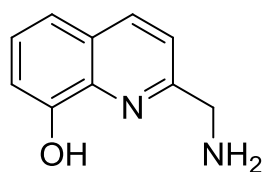


C₁₀H₇NO₂
MW = 173,17

Yield : 65%

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm): 10.22 (s, 1H, CHO), 8.32 (d, 1H, H4 , 8.6Hz), 8.05 (d, 1H, H3, 8.9Hz), 7.62 (t, 1H, H6, 8.2Hz), 7.42 (dd, 1H, H7, 8.3Hz, 1.3Hz), 7.28 (dd, 1H, H5, 8.3Hz, 1.3Hz).

2-(aminomethyl)quinolin-8-ol : 8-hydroxyquinoline-2-carbonitrile (1.5g, 8.8 mmol) was dissolved in acetic acid (60mL). Palladium/C 10% (330mg, 3.1 mmol, 0.35eq) was added. The mixture was placed under dihydrogen (1 bar), and stirred at room temperature for 1 night. The mixture was filtered on celite. The solution was concentrated under vacuum. The product was precipitated in a mixture of CHCl₃/ Et₂O, filtered, and washed with Et₂O. The solid obtained was dissolved in CHCl₃, washed with saturated K₂CO₃, and then extracted with CHCl₃ (3x50mL). The organic layer was dried on Na₂SO₃, filtered, and concentrated under vacuum to give a light brown solid.

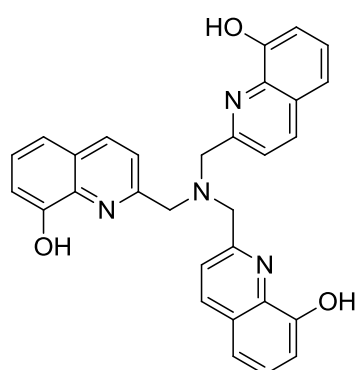


C₁₀H₁₀N₂O
MW= 174,20

Yield : 52%

¹H NMR (CDCl₃, 200MHz) δ (ppm): 8.11 (d, 1H, H4 , 8.4Hz), 7.43 (s, 1H, H3), 7.39 (s, 1H, H6), 7.33 (dd, 1H, H7, 8.3Hz, 2Hz), 7.29 (dd, 1H, H5, 8.3Hz, 2Hz), 4.18 (s, 2H, CH₂).

2,2',2''-nitrilotris(methylene)triquinolin-8-ol : 2-(aminomethyl)quinolin-8-ol (300 mg,



$C_{30}H_{24}N_4O_3$
MW = 488,54

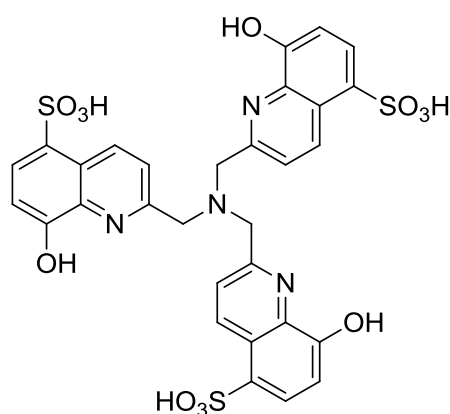
1.7mmol) and 8-hydroxyquinoline-2-carbaldehyde were mixed in extra dry dichloromethane (25mL) under argon. $NaBH(OAc)_3$ (2.2g, 10.4mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature during 48h. The reaction was quenched with HCl (1M, 10mL) and then neutralised with a solution of NaOH and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried on Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under vacuum. The product was purified on column (Sephadex LH20) in MeOH to give a light brown solid.

Yield : 71%

1H NMR ($CDCl_3$, 200MHz) δ (ppm): 8.18 (d, 1H, H4, 8.5Hz), 7.43 (d, 1H, H3, 8.3Hz), 7.37 (t, 1H, H6, 7.8Hz), 7.03 (dd, 1H, H7, 8.0Hz, 1.2Hz), 6.83 (dd, 1H, H5, 8.0Hz, 1.2Hz), 4.84 (s, 2H, CH₂).

ES-MS: m/z (%): 489.3 [M + H]⁺

2,2',2''-nitrilotris(methylene)tris(8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid)



$C_{30}H_{24}N_4O_{12}S_3$
MW = 728,73

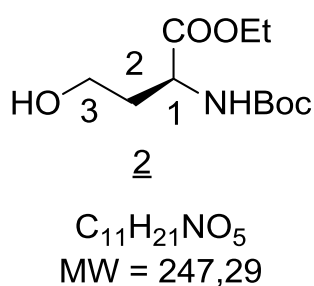
2,2',2''-nitrilotris(methylene)triquinolin-8-ol (130 mg, 0.26mmol) was dissolved in the minimum amount of oleum (5mL) and was stirred for one night at room temperature. The mixture was then poured on crushed iced. The resulting yellow solid was collected, washed with cold water (2x10mL), cold ethanol (2x10mL), cold diethylether (2x10mL) and then dried to give a brow solid.

Yield = 99%

1H NMR (D_2O , 200MHz) δ (ppm): 9.23(d, 1H, H4, 8.9Hz), 8.05(d, 1H, H6, 8.2Hz), 7.79(d, 1H, H3, 8.9Hz), 7.20(d, 1H, H7, 8.2Hz), 4.98(s, 2H, CH₂)

Elemental Anal. Calcd. for $H_7thqN-SO_3 \cdot 5.5H_2O \cdot 1.5H_2SO_4$; (%) $C_{30}H_{38}N_4O_{23.5}S_{4.5}$ (974.93): C 36.96, H 3.93, N 5.75; found: C 36.99, H 3.93, N 4.56.

N-(*tert*-butoxycarbonyl)L-homoserine ethyl ester 2



Adapted from the procedure described by M. Sisido *et al.*¹

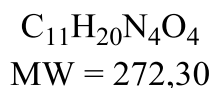
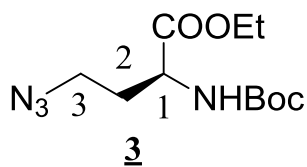
Di-*tert*-butyldicarbonate (1.378 g, 6.312 mmol) in 1,4-dioxane (10 ml) was added dropwise to a stirred solution of L-homoserine 1 (0.627 g, 5.263 mmol) in H₂O (10 ml) and 1,4-dioxane (5 ml) at 0°C for 10 minutes. After stirring overnight at room temperature, the solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in H₂O and the aqueous layer was washed with diethyl ether (2 x 10 ml), acidified to pH 2 with 1M aqueous KHSO₄ solution (≈ 20 ml) and extracted with ethyl acetate (4 x 20 ml). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated by three quarter. Dicyclohexylamine (1.26 ml, 6.312 mmol) was added and the resulting salt was filtered and dried under reduced pressure. The formed salt (1.732 g, 82 %) was used without further purification.

The dicyclohexylammonium N-(*tert*-butoxycarbonyl)L-homoserine (1.732 g, 4.320 mmol) salt was suspended in DMF under argon atmosphere. Ethyl bromide (0.677 ml, 9.078 mmol) was added at once and the heterogeneous mixture was stirred for 21h at room temperature. The mixture was poured into H₂O (40 ml) and the aqueous suspension was extracted with ethyl acetate (6 x 20 ml). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Purification of the crude pale yellow oil (5.496 g) over silica (100 g, ethyl acetate/cyclohexane 50/50) yielded to the desired product 2 as a pale yellow oil

Yield : 62 %

¹H NMR (200 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 1.22 (t, 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.40 (s, 9H, NHCOOC(CH₃)₃), 1.67-1.86 (m, 2H, H2), 2.86 (s broad, 1H, CH₂OH), 3.55-3.66 (m, 2H, H3), 4.12-4.28 (m, 3H, H1, COOCH₂CH₃), 5.71 (s broad, 1H, NH).

Ethyl 4-azido-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)butanoate **3**



Adapted from the procedure described by M. McLaughlin et al. ²

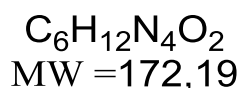
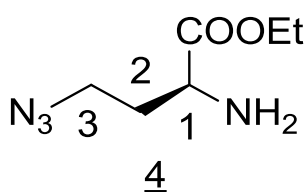
To a solution of N-(*tert*-butoxycarbonyl)L-homoserine ethyl ester **2** (0.420 g, 1.698 mmol) in anhydrous dichloromethane (20 mL), freshly distilled triethylamine (0.36 mL, 2.548 mmol) was added at room temperature. The reaction mixture was cooled at 0°C and mesyl chloride (0.15 mL, 1.868 mmol) was added dropwise. After stirring for 30 minutes at 0°C, ethyl acetate (20 mL) was added and the resulting solution was filtered through a pad of silica and evaporated to dryness. The resulting white solid (0.595 g) was used without further purification in the next step.

The above crude mesylate (0.595 g) was dissolved in anhydrous dimethylformamide (50 mL) and sodium azide (0.331 g, 5.095 mmol) was added. After stirring for 44 hours at room temperature, the solvent was removed under vacuum. The resulting product was dissolved in half-saturated aqueous NaCl solution (20 mL), extracted with ethyl acetate (4 x 20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The resulting oil (0.992 g) was purified by column chromatography on silica gel (60 g, cyclohexane/ethyl acetate: 90/10) to give the compound **3** as a clear oil

Yield : 89 %

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.30 (t, 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.45 (s, 9H, NHCOO(CH₃)₃), 1.85-2.17 (m, 2H, H₂), 3.41 (t, 6.8 Hz, 2H, H₃), 4.22 (q, 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.40 (s broad, 1H, H₁), 5.20 (s broad, 1H, NHCOO(CH₃)₃).

Ethyl 2-amino-4-azidobutanoate **4**



To a solution of ethyl 4-azido-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)butanoate **3** (0.410 g, 1.506 mmol) in dichloromethane (10 mL), trifluoroacetic acid (2.3 mL, 30.12 mmol) was added dropwise at 0°C. After stirring for 1 hour and a half, the reaction mixture is poured carefully on saturated aqueous NaHCO₃ solution (40 mL) and extracted with dichloromethane (6

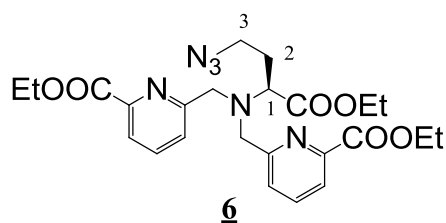
x 50 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporation to dryness give the desired compound **4** as a pale yellow oil.

Yield : 96%

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ (ppm): 1.29 (t, 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.57 (s broad, 2H, CHNH₂), 1.76-1.84 (m, 1H, H₂), 2.00-2.12 (m, 1H, H₂), 3.40-3.60 (m, 3H, H₁, H₃), 4.197 (q, 7.1 Hz, 2H, COOCH₂CH₃).

ES-MS: m/z (%): 173.1 [M+H⁺].

Ethyl 2,2'-[bis((6-(ethoxycarbonyl)pyridin-2-yl)methyl)amino]-4-azidobutanoate **6**



C₂₄H₃₀N₆O₆
MW = 498,53

Ethyl 6-(chloromethyl)pyridine-2-carboxylate **5** (0.612 g, 3.066 mmol), diisopropylethylamine (0.51 mL, 3.066 mmol) and KI (0.509 g, 3.066 mmol) were successively added to a solution of ethyl 2-amino-4-azidobutanoate **4** (0.240 g, 1.394 mmol) in anhydrous acetonitrile (20 mL) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at reflux for 23h. After

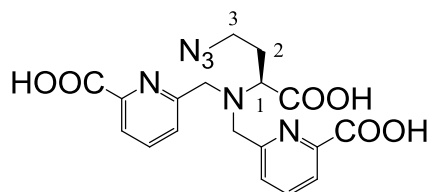
filtration and evaporation of the reaction mixture, the resulting crude product (1.536 g) was purified by column chromatography on silica gel (90 g, cyclohexane/ethyl acetate: 55/45) to give the desired compound **5** as a pale yellow oil.

Yield : 86 %

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz) δ (ppm): 1.30 (t, 7.0 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.37 (t, 7.2 Hz, 6H, pyCOOCH₂CH₃), 1.96-2.08 (m, 2H, H₂), 3.44-3.64 (m, 3H, H₃, H₁), 4.01 and 4.05 (AB, 19.2 Hz, 4H, N(CH₂py)₂), 4.19 and 4.21 (ABX₃, 4.7 Hz, 7.0Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.49 (q, 7.2 Hz, 4H, pyCOOCH₂CH₃), 7.70 (d, 7.8 Hz, 2H, H_{py}), 7.80 (t, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 7.89 (d, 7.4 Hz, 2H, H_{py}).

ES-MS: m/z (%): 521.2 [M+Na⁺].

2,2'-[bis((6-(carboxy)pyridin-2-yl)methyl)amino]-4-azidobutanoate N₃dpaaH₃



N₃dpaaH₃

C₁₈H₁₈N₆O₆

MW = 414,37

A 1M aqueous KOH solution (7.0 mL, 7.045 mmol) was added to a solution of compound **6** (0.585 g, 1.174 mmol) in ethanol (20 mL). The reaction mixture was refluxed overnight. After evaporation to dryness, the resulting oil was dissolved in water (10 mL) and the pH was adjusted to 2 by adding a 1M aqueous HCl solution. After reducing the volume to ~ 5 ml, the solution was cooled

down to 4°C. The formed white precipitated was filtrated and dried under vacuum to yield the compound **7** as white solid.

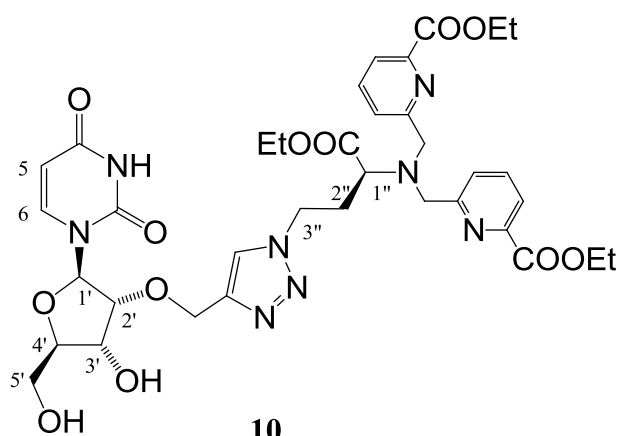
Yield : 79 %

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 2.18-2.38 (m, 2H, H₂), 3.60-3.76 (m, 2H, H₃), 3.96 (t, 6.8 Hz, 1H, H₁), 4.52 (s, 4H, N(CH₂py)₂), 7.85 (d, 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 8.04 (d, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 7.80 (t, 7.6 Hz, 2H, H_{py}).

ES-MS: m/z (%): 415.5 [M+H⁺], 437.5 [M+Na⁺], 453.4 [M+K⁺].

Elemental analysis calcd (%) for C₁₈H₁₈N₆O₆·1HCl·3.2 KCl (689.40): C 31.36, H 2.78, N 12.19; found: C 31.22, H 2.64, N 11.94; the salt content was confirmed by NMR titration.

Compound **10**



10

C₃₆H₄₄N₈O₁₂

MW = 780,78

Adapted from the procedure described by J. Hovinen et al³

2'-propargyl-uridine **7** (10 mg, 35.4 μmol) and ethyl 2,2'-[bis((6-(ethoxycarbonyl)pyridin-2-yl)methyl)amino]-4-azidobutanoate **5** (35 mg, 70.8 μmol) were dissolved in DMSO (2 mL). The mixture was flushed with

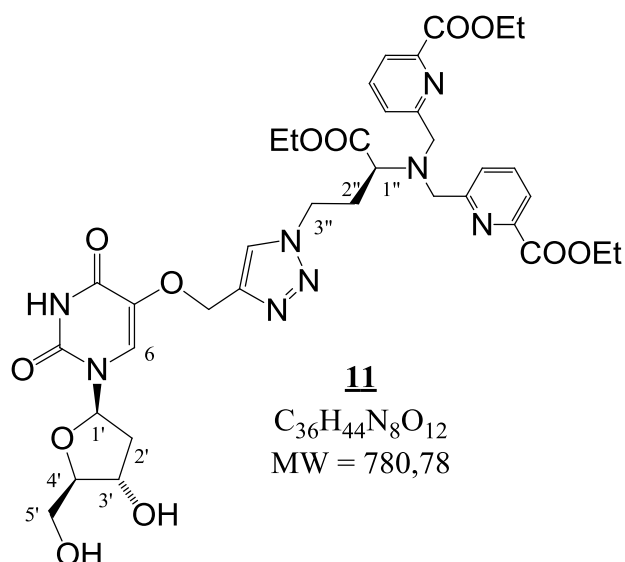
argon and a catalytic amount of copper iodide was added. The reaction mixture was stirred overnight at 60°C in the dark. After concentration, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL), washed with a 0.1 M solution of Na₂EDTA (4 x 2 mL) and evaporated. The crude product (39.6 mg) was purified by semi-preparative TLC (CH₂Cl₂/EtOH, 95/5) to give the desired compound **10** as orange oil

Yield : 63 %

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ = 1.28 (t, J = 7.3, 3H, COOCH₂CH₃), 1.32 (t, 7.3Hz, 6H, pyCOOCH₂CH₃), 2.08-2.16 (m, 1H, H2''), 2.28-2.46 (m, 2H, H2', H2''), 3.30 (t, 5.1 Hz, 1H, H1''), 3.37 (dd, 5.9 Hz, 9.5 Hz, 1H, OH_{5'}), 3.54 (d, 1H, 5.1 Hz, OH_{3'}), 3.65 and 3.75 (ABXY, 2.9 Hz, 5.1 Hz, 12.4 Hz, 2H, H5'), 3.88-3.94 (m, 1H, H3' or H4'), 3.98 and 4.07 (AB, 14.7 Hz, 4H, CH₂py), 4.05-4.13 (m, 1H, H3' or H4'), 4.18 (dd, 2.9 Hz, 7.3 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.32 (q, 7.3 Hz, 4H, pyCOOCH₂CH₃), 4.59-4.68 (m, 1H, H3''), 4.74 and 4.68 (AB, 12.0 Hz, 2H, CH₂tz), 4.79-4.88 (m, 1H, H3''), 5.55 (d, 8.1 Hz, 1H, H5), 5.82 (d, 3.7 Hz, 1H, H1'), 7.54 (d, 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 7.71 (d, 7.7 Hz, 1H, H₆), 7.74 (t, 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 7.85 (d, 8.0 Hz, 2H, H_{py}), 7.94 (s, 1H, H_{Tz}), 8.96 (s broad, 1H, NH).

ES-MS: m/z (%): 781.4 [M+H⁺], 803.5 [M+Na⁺]; 779.3 [M-H⁺], 815.1 [M+Cl⁻].

Compound **11**



5-propargyl-2'-deoxyuridine **8** (10 mg, 35.4 μmmol) and ethyl 2,2'-[bis((6-(ethoxycarbonyl)pyridin-2-yl)methyl)amino]-4-azidobutanoate **5** (28 mg, 56.7 μmmol) were dissolved in DMSO (2 mL). The mixture was flushed with argon and a catalytic amount of copper iodide was added. The reaction mixture was stirred overnight at 60°C in the dark. After concentration, the residue

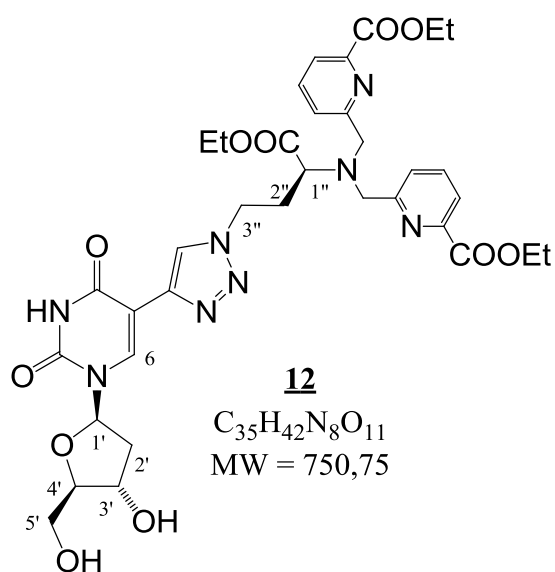
was dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL), washed with a 0.1 M solution of Na₂EDTA (5 x 2 mL) and evaporated. The crude product (39.8 mg) was purified by semi-preparative TLC (CH₂Cl₂/EtOH, 95/5) to give the desired compound **11** as orange oil

Yield : 94 %

¹H NMR (CD₃CN, 400 MHz): δ = 1.28 (t, 7.1 Hz, 3H, COOCH₂CH₃), 1.30 (t, 7.1 Hz, 6H, pyCOOCH₂CH₃), 2.06-2.50 (m, 4H, H₂', H₂''), 3.34 (t, 5.2 Hz, 1H, H₁''), 3.31-3.38 (m, 1H, OH₃'), 3.61-3.77 (m, 2H, H₅''), 3.80 (q, 2.9 Hz, 1H, H₃' or H₄''), 3.85 (t, 5.3 Hz, 1H, OH₅''), 3.99 and 4.06 (AB, 14.9 Hz, 4H, CH₂py), 4.16 (qd, 1.8 Hz, 7.2 Hz, 2H, COOCH₂CH₃), 4.29-4.38 (m, 1H, H₃' or H₄''), 4.33 (q, 7.2 Hz, 4H, pyCOOCH₂CH₃), 4.63 (ddd, 4.9 Hz, 7.2 Hz, 13.7 Hz, 1H, H₃''), 4.86-4.95 (m, 1H, H₃''), 4.92 and 4.99 (AB, 12.8 Hz, 2H, CH₂tz), 6.14 (t, 6.7 Hz, 1H, H₁''), 7.49 (d, 7.8 Hz, 2H, H_{py}), 7.52 (s, 1H, H_{Tz}), 7.69 (t, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 7.83 (d, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 8.07 (s, 1H, H₆), 8.97 (s broad, 1H, NH).

ES-MS: m/z (%): 781.6 [M+H⁺], 803.6 [M+Na⁺]; 779.3 [M-H⁺], 815.2 [M+Cl⁻].

Compound **12**



5-ethynyl-2'-deoxyuridine **9** (10 mg, 39.6 μmmol) and ethyl 2,2'-[bis((6-(ethoxycarbonyl)pyridin-2-yl)methyl)amino]-4-azidobutanoate **5** (32 mg, 63.5 μmmol) were dissolved in DMSO (2 mL). The mixture was flushed with argon and a catalytic amount of copper iodide was added. The reaction mixture was stirred overnight at 60°C in the dark. After concentration, the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL), washed with a 0.1 M solution of Na₂EDTA (5 x 2 mL) and evaporated. The

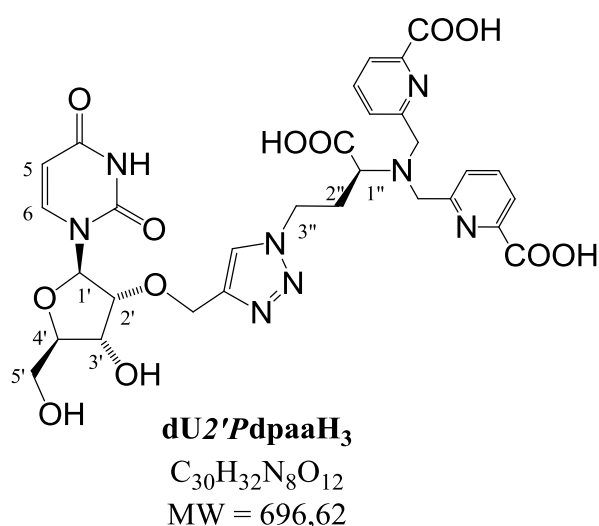
crude product (37.8 mg) was purified by semi-preparative TLC (CH₂Cl₂/EtOH, 97/3) to give the desired compound **12** as orange oil.

Yield : 59%

^1H NMR (CD_3CN , 400 MHz): δ = 1.08 (t, 7.1 Hz, 3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 1.32 (t, 7.0 Hz, 6H, $\text{pyCOOCH}_2\text{CH}_3$), 2.08-2.16 (m, 3H, H_2' , H_2''), 2.25 (dd, 4.9 Hz, 6.7 Hz, 1H, H_2' or H_2''), 3.25 (t, 5.0 Hz, 1H, H_1''), 3.39 (dd, 5.5 Hz, 9.8 Hz, 1H, OH_5'), 3.41 (d, 4.0 Hz, 1H, OH_3'), 3.67-3.79 (m, 2H, H_5'), 3.91 (q, 3.5 Hz, 1H, H_3' or H_4'), 3.79 and 4.06 (AB, 14.9 Hz, 4H, CH_2py), 4.19 (qd, 4.0 Hz, 7.2 Hz, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4.33 (q, 7.2 Hz, 4H, $\text{pyCOOCH}_2\text{CH}_3$), 4.30-4.41 (m, 1H, H_3' or H_4'), 4.63 and 4.74 (ABX₂, 6.5 Hz, 13.2 Hz, 2H, H_3''), 6.24 (t, 6.7 Hz, 1H, H_1'), 7.59 (d, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 7.73 (t, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 7.85 (d, 7.6 Hz, 2H, H_{py}), 8.13 (s, 1H, H_{Tz}), 8.56 (s, 1H, H_6), 9.19 (s broad, 1H, NH).

ES-MS: m/z (%): 751.6 [$\text{M}+\text{H}^+$], 773.6 [$\text{M}+\text{Na}^+$], 789.5 [$\text{M}+\text{K}^+$]; 749.4 [$\text{M}-\text{H}^+$], 785.3 [$\text{M}+\text{Cl}^-$].

dU2'Pdpaah₃



A 1M aqueous solution of potassium hydroxide (0.13 mL) was added to a solution of compound **10** (17 mg, 21.8 μmol) in ethanol (1 mL). The reaction mixture was stirred at 60°C overnight. After cooling at room temperature, the potassium salt was precipitated by addition of ethanol, filtrated, washed with ethanol (3 x 2 mL) and ethyl ether (3 x 2 mL) and dried in vacuum to give the desired compound

dU2'Pdpaah₃ as a white solid.

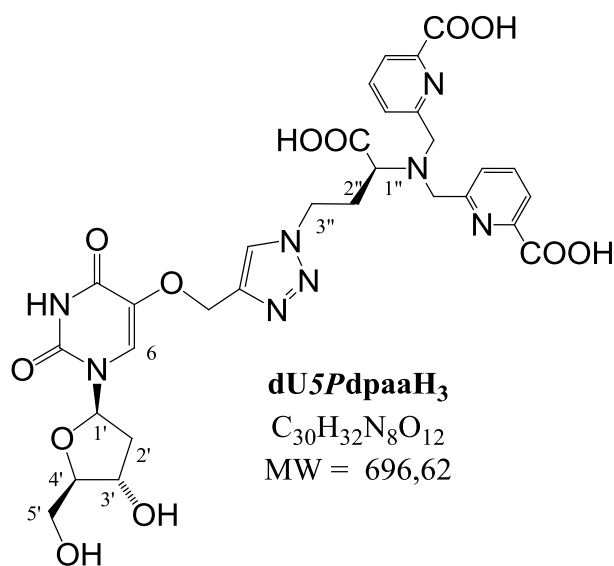
Yield : 84 %

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ (ppm): 2.26-2.42 (m, 2H, H_2''), 3.02 (t, 7.3 Hz, 1H, H_1''), 3.78 and 3.95 (ABX, 2.9 Hz, 4.4 Hz, 12.5 Hz, 2H, H_5'), 3.89 and 4.03 (AB, 14.7 Hz, 4H, CH_2py), 4.09 (q broad, $J = 3.7$, 1H, H_4'), 4.20 (t, 5.5 Hz, H_2'), 4.29-4.33 (m, 1H, H_3''), 4.33-4.59 (m, 2H, H_3' , H_3''), 4.61 and 4.72 (AB, 12.8 Hz, 2H, CH_2tz), 5.71 (d, 7.3 Hz, 1H,

H5), 5.87 (d, 5.9 Hz, 1H, H1'), 7.47 (d, 7.3 Hz, 1H, H6), 7.50 (d, 7.3 Hz, 2H, H_{Py}), 7.67 (d, 7.3 Hz, 2H, H_{Py}), 7.74 (t, 7.3 Hz, 2H, H_{Py}), 7.76 (s, 1H, H_{Tz}).

ES-MS: m/z : 695.2 [M-H⁺], 733.2 [M-2H⁺+K⁺], 771.1 [M-3H⁺+2K⁺], 347.1 [M-2H⁺]²⁻, 366.1 [M-3H⁺+K⁺]²⁻.

dU5Pdpaah₃



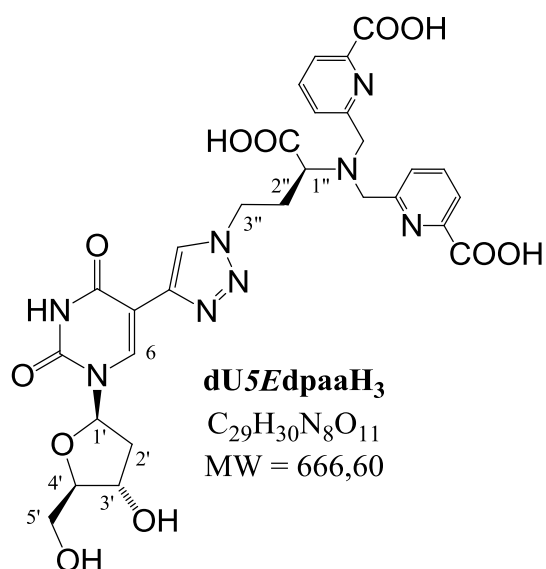
A 1M aqueous solution of potassium hydroxide (0.19 mL) was added to a solution of compound **11** (24 mg, 30.7 μmol) in ethanol (1.6 mL). The reaction mixture was stirred at 60°C overnight. After cooling at room temperature, the potassium salt was precipitated by addition of ethanol (2 mL), filtrated, washed with ethanol (3 x 2 mL) and ethyl ether (3 x 2 mL) and dried in vacuo to give the desired compound **dU5Pdpaah₃** as a white solid.

Yield : 98%

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ (ppm): 2.03-2.13 (m, 1H, H2'), 2.25-2.43 (m, 3H, H2', H2''), 3.14 (t, 7.3 Hz, 1H, H1''), 3.64-3.68 (m, 1H, H5'), 3.75 (dd, 3.7 Hz, 12.4 Hz, 1H, H5'), 3.95 (dd, 3.7 Hz, 7.8 Hz, 1H, H4'), 3.90 and 4.04 (AB, 14.7 Hz, 4H, CH₂py), 4.31-4.37 (m, 1H, H3''), 4.45-4.59 (m, 2H, H3', H3''), 4.93 and 4.98 (AB, 13.2 Hz, 2H, CH₂tz), 6.25 (t, 6.6 Hz, 1H, H1'), 7.23 (s, 1H, H6), 7.49 (d, 7.3 Hz, 2H, H_{Py}), 7.65 (d, 7.3 Hz, 2H, H_{Py}), 7.71 (t, 7.3 Hz, 2H, H_{Py}), 7.91 (s, 1H, H_{Tz}).

ES-MS: m/z : 695.2 [M-H⁺], 347.0 [M-2H⁺]²⁻, 733.2 [M-2H⁺+K⁺], 366.1 [M-3H⁺+K⁺]²⁻, 771.2 [M-3H⁺+2K⁺].

dU5EdpaaH₃



Yield : 84 %

¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ (ppm): 2.33-2.51 (m, 4H, H_{2'}, H_{2''}), 3.11 (t, J = 7.3, 1H, H_{1''}), 3.75-3.92 (m, 2H, H_{5'}), 3.90 and 4.02 (AB, 14.7 Hz, 4H, CH₂py), 4.05-4.09 (m, 1H, H_{4'}), 4.44-4.63 (m, 3H, H_{3'}, H_{3''}), 6.38 (t, 6.6 Hz, 1H, H_{1'}), 7.50 (d, 7.8 Hz, 2H, H_{py}), 7.61 (d, 7.8 Hz, 2H, H_{py}), 7.69 (t, 7.8 Hz, 2H, H_{py}), 8.13 (s, 1H, H_{Tz}), 8.26 (s, 1H, H₆).

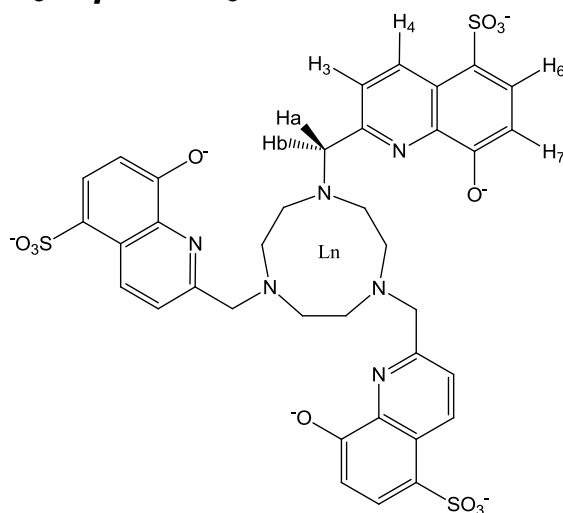
ES-MS: m/z : 665.0 [M-H]⁻, 332.0 [M-2H]²⁻, 703.2 [M-2H⁺+K⁺]⁻, 220.9 [M-3H]³⁻, 351.0 [M-3H⁺+K⁺]²⁻, 741.2 [M-3H⁺+2K⁺]⁻.

A 1M aqueous solution of potassium hydroxide (0.13 mL) was added to a solution of compound **12** (16 mg, 21.3 μmol) in ethanol (1 mL). The reaction mixture was stirred at 60°C overnight. After cooling at room temperature, the potassium salt was precipitated by addition of ethanol, filtrated, washed with ethanol (3 x 2 mL) and ethyl ether (3 x 2 mL) and dried in vacuo to give the desired compound **dU5EdpaaK₃** as a white solid.

3. Synthèse des complexes

The lanthanides (Ln = Nd, La, Lu, Y) complexes for NMR measurements were prepared in situ by dissolving equimolar amounts of the corresponding ligand and of the lanthanide chloride salt LnCl_3 into D_2O followed by adjustment of the pD with solutions of KOD in D_2O (1M and 0.1M). Concentrations in the range of $5 \cdot 10^{-3}$ M to $10 \cdot 10^{-3}$ M were used.

3.1. Ligand $\text{H}_3\text{thqtcn-SO}_3^-$



$[\text{Nd}(\text{thqtcn-SO}_3^-)]^{3-}$

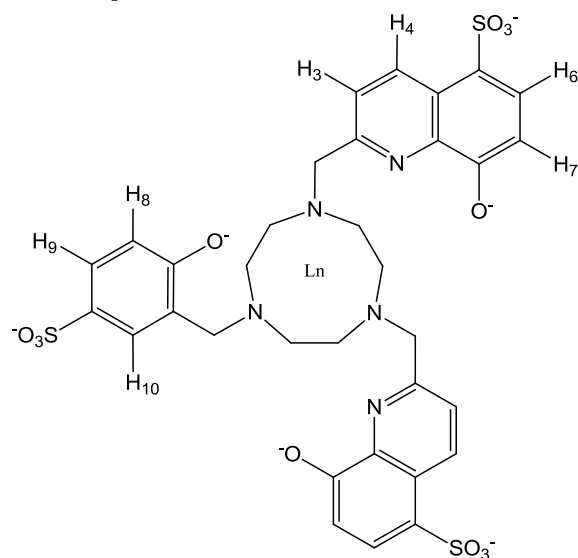
RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, 25°C, pD 7.7): δ (ppm) : 0.46 (s, 1H, H triazacyclononane), 0.78 (s, 1H, H triazacyclononane), 1.68 (s, 1H, H triazacyclononane), 4.82 (s, 1H, H triazacyclononane), 5.46 (s, 1H, Ha/Hb), 5.97 (s, 1H, Ha/Hb), 6.87 (d, 7.0 Hz, 1H, H7), 8.89 (d, 7.0 Hz, 1H, H6), 9.83 (d, 8.0 Hz, 1H, H3), 10.32 (d, 8.0 Hz, 1H, H4).

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz, 70°C, pD 7.7): δ (ppm) : 0.62 (s, 1H, H triazacyclononane), 1.30 (s, 1H, H triazacyclononane), 1.75 (s, 1H, H triazacyclononane), 4.50 (s, 1H, H triazacyclononane), 5.16 (s, 1H, Ha/Hb), 5.54 (s, 1H, Ha/Hb), 6.81 (d, 7.0 Hz, 1H, H7), 8.75 (d, 7.0 Hz, 1H, H6), 9.46 (d, 8.0 Hz, 1H, H3), 10.52 (d, 8.0 Hz, 1H, H4).



RMN ^1H (D_2O , 500 MHz, 25°C , pD 7.4): δ (ppm) : 1.90 (m, 1H, H triazacyclononane), 2.28 (s, 1H, H triazacyclononane), 2.68 (s, 1H, H triazacyclononane), 3.39 (s, 1H, H triazacyclononane), 3.84 (d, 1H, Ha/Hb), 4.03 (d, 1H, Ha/Hb), 6.38 (d, 7.0 Hz, 1H, H7), 7.59 (d, 7.0 Hz, 1H, H3), 7.84 (d, 8.0 Hz, 1H, H6), 8.93 (d, 8.0 Hz, 1H, H4).

3.2. Ligand $\text{H}_3\text{dhqtcn-SO}_3$



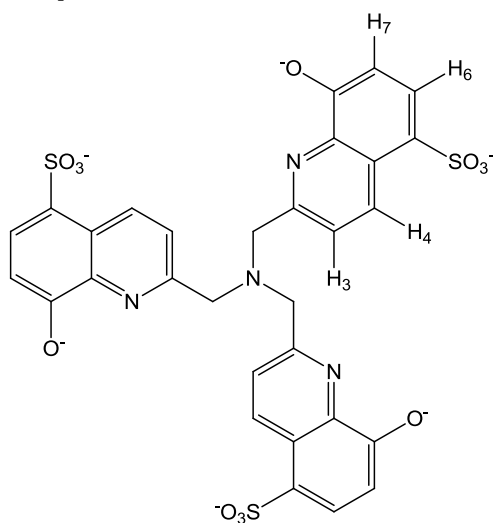
RMN ^1H (D_2O , 500MHz, 25°C , pD = 7.4) δ (ppm) : 8.97, 8.93 (d, 2H, H4/H4'), 7.95, 7.80 (d, 2H, H6/H6'), 7.67, 7.59 (d, 2H, H3/H3'), 7.50 (d, 1H, H8), 7.42(s, 1H, H10), 6.68, 6.61 (d, 2H, H7/H7'), 6.36(d, 1H, H9), 4.43 (dd, 2H, CH₂ quinoline), 4.13 (d, 1H, CH₂ phenol), 4.06 (dd, 2H, CH₂ quinoline), 3.23 (d, 1H, CH₂ phenol), 3.43, 3.09, 2.88, 2.77, 2.66, 2.57, 2.47, 2.30, 2.22 (m, 12H, H triazacyclononane)



RMN ^1H (D_2O , 500MHz, 70°C , pD = 7.4) δ (ppm) : 21.30 (s, 1H, H triazacyclononane), 18.86 (s, 1H, H triazacyclononane), 14.66 (s, 1H, CH₂ quinoline), 13.60 (s, 1H, CH₂ phenol), 12.61 (s, 1H, CH₂ quinoline), 12.25 (s, 1H, H4/H4'), 12.12 (s, 1H, H4/H4'), 11.18 (s, 1H, H8), 10.95 (s, 1H, H10), 9.00(s, 1H, H6/H6'), 8.91 (s, 1H, H6/H6'), 8.51 26 (s, 1H, H3/H3'), 8.26 (s, 1H, H3/H3'), 7.35 (s, 1H, H triazacyclononane), 7.16 (s, 1H, H7/H7'), 6.94 (s, 1H, H7/H7'), 6.44 (s, 1H, H triazacyclononane), 5.85 (s, 1H, H9), 5.17 (s, 1H, H triazacyclononane), 5.07 (s, 1H, H triazacyclononane), 3.02 (s, 1H, CH₂ phenol), 2.54 (s, 1H, H triazacyclononane), 1.98 (s, 1H, H triazacyclononane), 1.49(s, 1H, H triazacyclononane),

0.98 (s, 1H, H triazacyclononane), -5.16 (s, 1H, CH₂ quinoline), -5.97 (s, 1H, CH₂ quinoline), -28.13 (s, 1H, H triazacyclononane)

3.3. Ligand *H₃thqN-SO₃*



[Lu(thqN-SO₃)(H₂O)₂]

RMN ¹H (D₂O, 500MHz, 25°C, pD = 7.4) δ (ppm) : 8.84 (s, 1H, H₄), 7.82 (s, 1H, H₆), 7.48(s, 1H, H₃), 6.45(s, 1H, H₇), 5.21 (s, 1H, CH₂) 4.92 (s, 1H, CH₂)

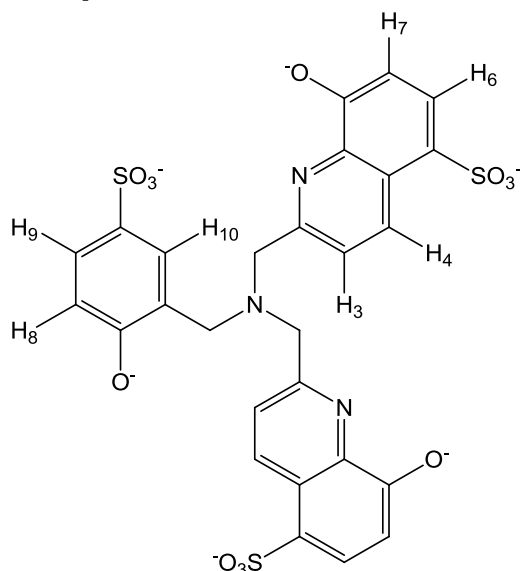
RMN ¹H (D₂O, 500MHz, 5°C, pD = 7.4) δ (ppm) : 8.57 (s, 1H, H₄), 7.55 (s, 1H, H₆), 7.22(s, 1H, H₃), 6.17(d, 1H, H₇), 4.98 (d, 1H, CH₂), 4.58 (d, 1H, CH₂)

[La(thqN-SO₃)(H₂O)₂]

RMN ¹H (D₂O, 500MHz, 25°C, pD = 7.4) δ (ppm) : 8.98 (s, 1H, H₄), 8.04 (s, 1H, H₆), 7.75 (s, 1H, H₃), 7.16 (s, 1H, H₇), 4.98 (s, 2H, CH₂)

RMN ¹H (D₂O, 500MHz, 5°C, pD = 7.4) δ (ppm) : 8.70 (s, 1H, H₄), 7.77 (s, 1H, H₆), 7.50(s, 1H, H₃), 6.90(s, 1H, H₇), 4.71 (s, 1H, CH₂)

3.4. Ligand $H_3dhqN-SO_3$



[Lu(dhqphNSO3)(H₂O)₃]

RMN ¹H (D₂O, 500MHz, 70°C, pD = 7.4) : 9.31(s, 2H, H4), 8.43(d, 2H, H6), 7.93 (s, 1H, H10), 7.89(s, 2H, H3), 7.40 (s, 1H, H8), 7.29(s, 2H, H7), 6.27 (s, 1H, H9), 4.96(d, 2H, CH₂-N quinoline), 4.30 (s, 2H, CH₂-N phénol)

[La(dhqphNSO3)(H₂O)₃]

RMN ¹H (D₂O, 500MHz, 70°C, pD = 7.4) : 9.23(s, 2H, H4), 8.35(d, 2H, H6), 7.92 (s, 1H, H10), 7.84(s, 2H, H3), 7.48 (s, 1H, H8), 7.16(s, 2H, H7), 6.36 (s, 1H, H9), (under the water pic, 2H, CH₂-N quinoline), 4.36 (s, 2H, CH₂-N phénol)

3.5. Ligand N_3dpaa

[Gd(N₃dpaa)(H₂O)₃]

N₃dpaaH₃ (1.14 mg, 1.65 μmol) was dissolved in a solution of GdCl₃·6H₂O (3.12 mmol in 25 mM aqueous ammonium formate solution, 0.58 mL, 1.82 μmol). The pH of the resulting mixture was adjusted (pH 7.5) by adding an 1M aqueous ammonium formate solution. After stirring for 1 hour at 25°C, the reaction mixture was directly subjected to purification on semi-preparative HPLC to give after concentration and lyophilisation (repeated 3 times), the desired gadolinium complex as a white solid (Rt = 22 min).

ES-MS: m/z (%) : 565.9 (15), 566.9 (50), 567.9 (80), 568.9 (73), 569.9 (100), 570.9 (27), 571.9 (66), 572.9 (12), 574.0 (4) [(N₃dpaa)³⁻ + Gd³⁺ + H⁺]⁺; 610.1 (8), 611.0 (53), 612.0 (80), 613.0 (72), 613.9 (100) , 615.1 (26), 616.1 (84), 617.0 (26), 618.0 (8) [(N₃dpaa)³⁻ + Gd³⁺ + HCOO]⁻

3.6. *Ligand dU2'Pdpaa*

[Gd(dU2'Pdpaa)(H₂O)₃]

dU2'PdpaaH₃ (2.78 mg, 3.43 μmmol) was dissolved in a solution of GdCl₃·6H₂O (3.12 mmol in 25 mM aqueous ammonium formate solution, 1.21 mL, 3.77 μmol). After stirring for 1 hour at 25°C, the reaction mixture was directly subjected to purification on semi-preparative HPLC to give after concentration and lyophilisation (repeated 3 times), the desired gadolinium complex as a white solid (Rt = 16 min).

ES-MS: m/z (%) : 848.0 (5), 849.0 (68), 850.0 (68), 851.0 (80), 852.0 (100), 853.0 (42), 854.0 (57), 855.0 (30), 856.0 (7) [(dU2'Pdpaa)³⁻ + Gd³⁺ + H⁺]⁺; 846.2 (7), 847.2 (48), 848.2 (81), 842.2 (75), 850.2 (100), 851.2 (34), 852.2 (72), 853.2 (28), 854.2 (6) [(dU2'Pdpaa-H⁺)⁴⁻ + Gd³⁺]⁻

3.7. *Ligand dU5Pdpaa*

[Gd(dU5Pdpaa)(H₂O)₃]

dU5PdpaaH₃ (1.43 mg, 1.76 μmmol) was dissolved in a solution of GdCl₃·6H₂O (3.12 mmol in 25 mM aqueous ammonium formate solution, 0.62 mL, 1.94 μmol). After stirring for 1 hour at 25°C the reaction mixture was directly subjected to purification on semi-preparative HPLC to give after concentration and lyophilisation (repeated 3 times), the desired gadolinium complex as a white solid (Rt = 19.5 min).

ES-MS: m/z (%) : 847.9 (4), 848.9 (25), 849.9 (64), 850.9 (72), 851.9 (100), 852.9 (36), 853.9 (56), 855.0 (14), 855.9 (5) [(dU5Pdpaa)³⁻ + Gd³⁺ + H⁺]⁺; 892.8 (54), 893.8 (88), 894.8 (80), 895.7 (100), 896.8 (42), 897.8 (76), 898.7 (26), 899.6 (8) [(dU5Pdpaa)³⁻ + Gd³⁺ + HCOO]⁻

3.8. Ligand dU5Pdpaa

[Gd(dU5Edpaa)(H₂O)₃]

dU5EdpaaH₃ (1.29 mg, 1.65 μmmol) was dissolved in a solution of GdCl₃·6H₂O (3.12 mmol in 25 mM aqueous ammonium formate solution, 0.58 mL, 1.82 μmol). After stirring for 1 hour at 25°C, the reaction mixture was directly subjected to purification on semi preparative HPLC to give after concentration and lyophilisation (repeated 3 times), the desired gadolinium complex as a white solid (Rt = 18 min).

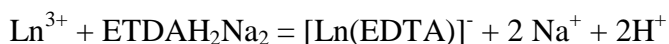
ES-MS: m/z (%) : 818.1 (8), 819.1 (46), 820.1 (76), 821.1 (74), 822.1 (100), 823.1 (34), 824.1 (70), 825.1 (22), 826.1 (6) [(**dU5Edpaa**)³⁻ + Gd³⁺ + H⁺]⁺; 861.8 (7), 862.8 (45), 863.8 (80), 864.8 (68), 865.8 (100), 866.8 (34), 867.8 (67), 868.8 (25), 869.9 (8) [(**dU5Edpaa**)³⁻ + Gd³⁺ + HCOO⁻]

4. Méthodes analytiques

Les solutions de sels de lanthanides préparées à partir des sels commerciaux sont utilisées pour les mesures de potentiométrie, de spectrophotométrie, ou de spectrofluométrie, ainsi que pour les études de relaxométrie et les études RMN ¹H. Ces solutions sont systématiquement dosées par colorimétrie avant d'être utilisées, afin de déterminer précisément le taux d'hydratation des sels utilisés.

Dosage des sels de Ln(III)

A un volume constant de solution (1 mL), on ajoute 10 mL de tampon acétique (CH₃COOH/CH₃COONa, 0,1M, pH = 4.5) et trois quatre gouttes de xylénol orange comme indicateur coloré. La solution est dosée par une solution d'ETDAH₂Na₂ de concentration 0,5 M, selon l'équation :



Lorsque 3 < pH < 5, l'indicateur coloré est mauve lorsqu'il est complexé par le cation métallique et jaune sinon.

4.1. Etudes potentiométriques

L'appareil utilisé est un potentiomètre (751GDP Titrino, Metrohm) équipé d'une burette automatique (V = 5 mL). Le pH est mesuré avec une électrode de verre combinée (Metrohm,

Ag/AgCl, dans 3M KCl). La cellule de mesure est thermostatée à 25°C et la température de la solution est mesurée par une électrode thermocouple. Les dosages sont effectués sous atmosphère d'argon pour éliminer le CO₂ atmosphérique.

Les dosages sont effectués à force ionique constante, dans KCl 0,1 M. Les solutions titrantes de KOH et de HCl 0,1 M sont préparées par dilution d'ampoules commerciales titrées (Titrisol, Merck) avec de l'eau MilliQ. Les solutions titrantes sont remplacées tous les deux mois ou lorsque que la carbonatation de la solution de KOH déterminée par la méthode de Gran est supérieur à 2%⁴.

4.1.1. Calibration de l'électrode

Il s'agit de déterminer la caractéristique $E = f(\text{pH})$ de l'appareil. En effet, la force électromotrice E (mV) de la solution est donnée par la relation suivante :

$$E_{\text{mesurée}} = E^{\circ} - f \times \frac{1000 \times RT \times \ln 10}{F} \times \text{pH}$$

Où $R = 8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$ et $F = 96500 \text{ C.mol}^{-1}$ (constante de Faraday)

Calibrer l'électrode revient donc à déterminer les paramètres E° et f qui sont respectivement l'ordonnée à l'origine et la pente de la droite $E = f(\text{pH})$.

0.6 mL d'une solution de HCl 0,1M dissous dans 20 mL d'une solution de KCl 0,1 M sont dosés par une solution de KOH 0,1 M. 24 incréments de 0.05 mL sont distribués. A chaque incréments la force électromotrice de la solution est mesurée et le pH calculé. Des calibrations systématiques sont effectuées avant chaque dosage. L'électrode est considérée comme stable lorsque les valeurs de E° et de f sont reproductibles sur 3 étalonnages.

4.1.2. Dosages

Détermination des pKa du ligand

Une solution de 20 mL de ligand (1.10^{-3} M) dans KCl 0.1 M est dosé par KOH 0.1 M. Des incréments de 10 μL sont utilisés et un temps d'attente de 120 secondes est fixé entre deux mesures. Plus de 200 points sont collectés. Un dosage retour par HCl est réalisé systématiquement dans les mêmes conditions. Chaque expérience est répétée trois fois.

L'ajustement mathématique des courbes $\text{pH} = f(V)$ est réalisé à l'aide du programme HYPERQUAD 2000^{5,6} et permet d'accéder aux constantes de protonations du ligand K_{a_i} . Les concentrations en ligand et en proton sont fixées, ainsi que la valeur du pK_w (13.77 avec une

force ionique de 0.1 M)⁷. Toutes les valeurs et les erreurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

4.2. Mesures spectrophotométriques

La constante de complexation du Gd(III) pour chaque ligand est déterminée par rapport au ligand DTPA = diéthylentriaminepentaacetate ($pGd = 19.6$) par spectrophotométrie. Une technique de titration en batch est utilisée. Le protocole expérimental a déjà été décrit par Raymond et al.^{8,9}. Dans le cas où le DTPA n'est pas capable de déplacer notre ligand, le protocole a été adapté¹⁰.

Des aliquotes de DTPA (concentration $4 \cdot 10^{-7}$ M à $4 \cdot 10^{-3}$ M) de solution stock sont ajoutées à des solutions contenant une concentration fixée en Gd(III) ($4 \cdot 10^{-5}$ M) et de ligand ($4 \cdot 10^{-5}$ M). Toutes les solutions sont ajustées à pH 7.4 en utilisant une solution de tampon TRIS (0.1 M). Après équilibration des solutions (48h), la concentration de ligand libre dans chaque batch est déterminé par spectrophotométrie.

Le ration molaire entre le ligand et le métal est fixé à 1:1 tandis que le ratio molaire entre le ligand et la DTPA varie de 1: 0.01 jusqu'à 1:100. Cette méthode permet une détermination précise du pGd ($pGd = -\log [Gd_{aq}]$) pour des concentrations totales de $[Gd]_{tot} = 10^{-6}$ M et $[L]_{tot} = 10^{-5}$ M). Le graphique représentant $\log([Gd-dtpa]/[GdL]) = f(\log([DTPA]/[L]))$ donne directement la différence de pM entre le ligand et la DTPA ($\log([DTPA]/[L])$ quand $\log([Gd-dtpa]/[GdL]) = 0$).

4.3. Mesures de luminescence

Les mesures de luminescence (spectres et temps de vie) ont été enregistré à l'aide d'un spectromètre Fluorolog FL 3-22 de marque Horiba-Jobin Yvon-Spex. Il est équipé d'un double monochromateur d'excitation et d'un imageur iHR320 couplé à un photomultiplicateur R928P Hamamatsu pour les mesures dans le spectre visible. Pour les mesures dans le domaine proche infrarouge, un second photomultiplicateur Hamamatsu R5509 a été utilisé en sortie du spectromètre. La source d'excitation est une lampe au xénon de 450W et tous les spectres ont été corrigés pour la détection et la réponse spectrale du spectrofluoromètre. Les temps de vie de phosphorescence ont été mesurés en temps résolu. Les valeurs données pour les temps de vie représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, réalisées en mode phosphorescence en faisant varier le délai d'acquisition au maximum du spectre d'émission. La décroissance mono exponentielle est analysée avec Origin 7.0 et le programme Labview[®].
7. Les rendements quantiques sont déterminés à température ambiante en utilisant une

méthode absolue¹¹ en utilisant une sphère d'intégration modifiée couplée au spectrofluorimètre Fluorolog FL 3-22. Les valeurs reportées sont la moyenne de trios expériences indépendantes. Les rendements quantiques absolus sont déterminés par l'équation suivante:

$$\Phi = \frac{E_c}{L_a - L_c} = \frac{E_c}{L_a \cdot \alpha} \quad \alpha = \frac{L_a - L_c}{L_a}$$

Où E_c est le spectre d'émission dans la gamme d'émission de l'échantillon (ex: si le maximum d'émission est 975 nm, la gamme d'émission de ce spectre ira de 900 à 1100 nm), L_c le spectre d'émission à la longueur d'excitation de l'échantillon, L_a est le spectre d'émission à la longueur d'excitation de la référence. Des tubes capillaires en quartz de 4 mm de diamètre sont utilisés.

4.4. Mesures de relaxométrie

Temps de relaxation

Trois types de temps de relaxation ont été mesurés : i) le temps de relaxation longitudinale T_1 correspondant au temps de retour à l'équilibre selon l'axe privilégié de l'aimantation (axe z), ii) le temps de relaxation transversale T_2 correspondant au temps de retour à l'équilibre de l'aimantation macroscopique dans le plan (x,y) et iii) le temps de relaxation transversal $T_{1\rho}$ correspondant au temps de décroissance de l'aimantation dans le repère tournant. Le principal intérêt de la mesure de $T_{1\rho}$ est de s'affranchir de l'évolution de l'aimantation selon le couplage J entre noyaux. Avant chaque expérience, l'impulsion à 90° est calibrée, et le délai d_1 (délai de retour à l'équilibre) est fixé à $5 T_1$. Pour chaque expérience, le traitement des données est réalisé en intensités et en intégrales afin de vérifier que les résultats obtenus sont similaires dans les deux cas. En général, on admet que l'erreur sur la mesure est de 5% environ.

Mesures de T_1

Les mesures ont été réalisées sur l'ensemble des spectromètres. La séquence d'inversion-récupération présentée Figure 1 a été utilisée. La perturbation est une impulsion à 180° qui inverse l'aimantation selon l'axe z, suivie d'une attente pendant un délai τ variable et d'une impulsion de lecture à 90° . A_q correspond au temps d'acquisition et d_1 au délai de retour à l'équilibre de l'aimantation (5 à 7 T_1).

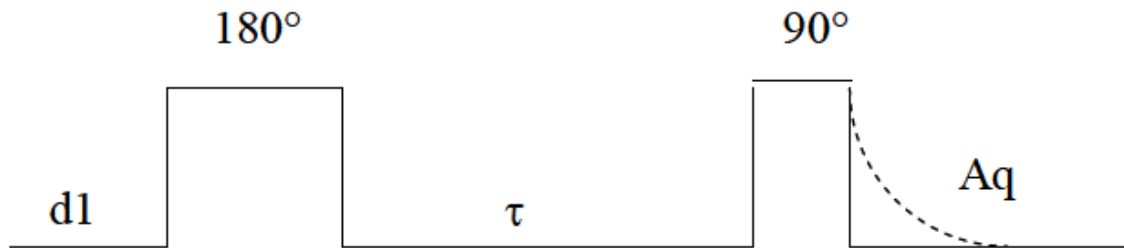


Figure 1 : Séquence d'inversion récupération pour la mesure de T1.

D'après les équations de Bloch, le retour à l'équilibre de l'aimantation est régi par l'équation :

$$M_z(\tau) = M_0 \left[1 - 2 \exp\left(-\frac{\tau}{T_1}\right) \right]$$

Pour chaque échantillon, les valeurs de T_1 ont été obtenues par ajustement d'une exponentielle à trois paramètres, prenant en compte le retournement imparfait de l'aimantation après l'impulsion à 180° , ceci pour des délais τ variant de quelques millisecondes à d_1 .

Mesures de T2

Une perturbation initiale de 90° est d'abord appliquée. L'aimantation évolue ensuite selon une séquence d'écho de Carr-Purcell et Meiboom-Gill (Figure 2). Ceci permet une défocalisation, puis une refocalisation des spins dans le plan (x,y), annulant ainsi tout effet de déplacement chimique. Il ne subsiste que l'atténuation de l'aimantation transversale due à T_2 .

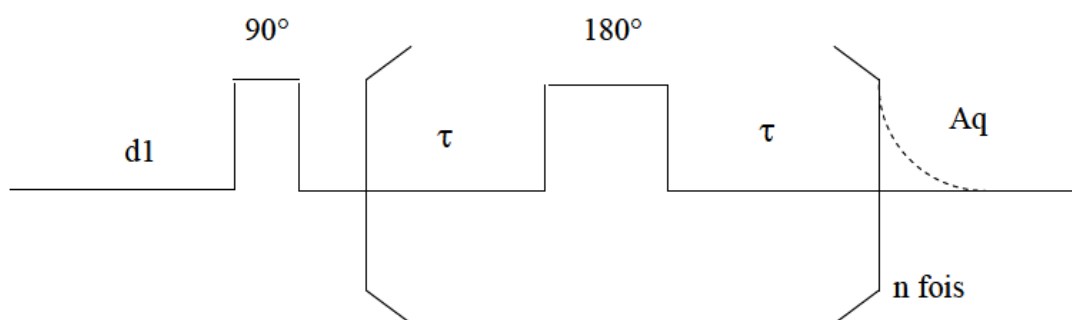


Figure 2 : Séquence Carr-Purcell et Meiboom-Gill de mesure du temps de relaxation transversale.

Le retour à l'équilibre est régi par l'équation suivante :

$$M_{x,y}(\tau) = M_0 \exp\left(-\frac{2n\tau}{T_2}\right)$$

De façon pratique, le temps τ est fixé à 1 ms et l'on fait varier le nombre de fois n où la séquence est répétée. n doit être pair pour diminuer les effets de diffusion translationnelle, et est ajusté de telle sorte que le temps de la sous-séquence $\tau-\pi-\tau$ varie entre 2 ms et d_1 . Le traitement s'effectue ensuite de façon similaire à celui de T_1 , par un ajustement à 3 paramètres.

Mesure de $T_{1\rho}$

Le principal problème de la séquence de mesure de T_2 est que l'aimantation évolue selon le couplage scalaire J lorsque le noyau n'est pas isolé. Pour s'affranchir de ce problème, le temps de relaxation transversale peut être mesuré par verrouillage (spin-lock) le long du champ radiofréquence.

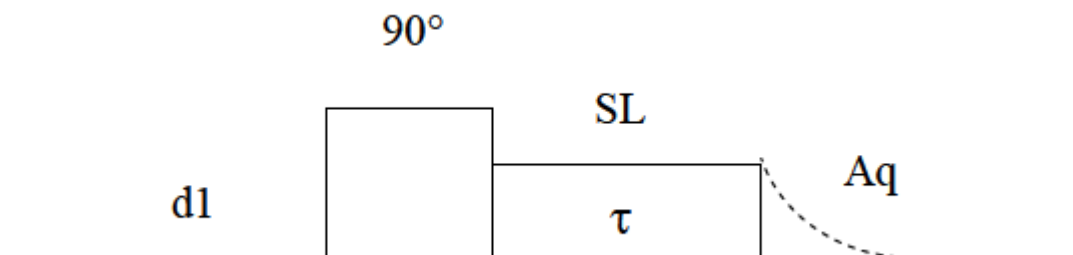


Figure 3 : Mesure du temps de relaxation transversale dans le repère tournant par spin-lock.

Après une impulsion classique à 90° , un champ radiofréquence B_1 est appliqué pendant un temps τ variable. L'aimantation précesse autour de B_1 et comme elle lui est colinéaire, elle reste fixe dans le champ tournant avec B_1 . L'aimantation est alors verrouillée.

En pratique, on fait varier τ entre quelques millisecondes et d_1 . Le traitement est ensuite similaire aux précédents car l'aimantation évolue selon l'équation suivante :

$$S(\tau) = S_0 \exp\left(-\frac{\tau}{T_{1\rho}}\right)$$

La puissance du spin lock appliqué couvre 4 ppm à 500 MHz (spin-lock : 2000 Hz), 7 ppm à 400 MHz (spin-lock : 2800 Hz), et 3 ppm à 200 MHz (spin-lock : 600 Hz).

Solution type

Les échantillons ont été préparés *in situ* en mélangeant des quantités appropriées de ligand et d'une solution mère de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de concentration connue (dans H_2O milliQ ou dans D_2O extra-pure 99.99% d'atome D, Eurisotop). Le pH est ensuite ajusté à 7.4 environ avec une solution de soude (NaOH ou NaOD). L'absence de métal libre est vérifiée par le test du xylénol orange¹².

Mesure de temps de relaxation de l' ^{17}O

Les mesures des temps de relaxation de ^{17}O ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. L. Helm de l'EPF Lausanne. Les échantillons ont été préparés en mélangeant des quantités appropriées de solutions de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et de ligand dans l'eau. Un excès de ligand est utilisé et le pH est ajusté (pH~7) avec une solution aqueuse de KOH. Des concentrations de Gd(III) de 5mM à 20 mM ont été utilisées. L'absence de métal libre est vérifiée par le test au xylénol orange¹² à pH 7.4 environ. De l'eau acidifiée (pH = 3.5) a été utilisée comme référence. Tous les échantillons sont enrichis 1% avec de l'eau enrichie en ^{17}O (Isotrade GmbH, 20%) pour améliorer la sensibilité. La concentration en ion Gd(III) a été déterminée par mesure du déplacement chimique du *ter*-butanol induit par la susceptibilité magnétique¹³. Les vitesses de relaxation transversales et longitudinales de l' ^{17}O et les déplacements chimiques ont été mesurés entre 272 and 348 K. Les données ont été enregistrées sur un spectromètre Bruker DPX (9.4 T, 54.2 MHz). Une unité de contrôle de la température Bruker VT 3000 a été utilisée pour thermostatier l'échantillon. Sa température a été mesurée par une technique de substitution.

Les échantillons ont été scellés dans des sphères en verre qui sont placées dans des tubes RMN de 10 mm de diamètre afin d'éliminer l'influence de la susceptibilité magnétique sur le déplacement chimique.

Les vitesses de relaxation longitudinales $1/T_1$ ont été mesurées par la méthode d'Inversion-Récupération¹⁴ et les vitesses de relaxation transversales $1/T_2$ par la technique d'échos de spins de Carr-Purcell-Meiboom-Gill¹⁵.

Profils NMRD

Les profils NMRD ont été obtenus à 25°C entre 0.02 et 35 MHz sur un relaxomètre RMN Spinmaster FFC (Fast Field Cycling) couvrant des champs magnétiques allant de $2.5 \cdot 10^{-4}$ T à environ 1 T. Une séquence non polarisée (Figure 4) est utilisée pour les champs dont les fréquences varient entre 40 et 12 MHz, alors que pour les champs plus faibles, une séquence prépolarisée (Figure 5) est utilisée.

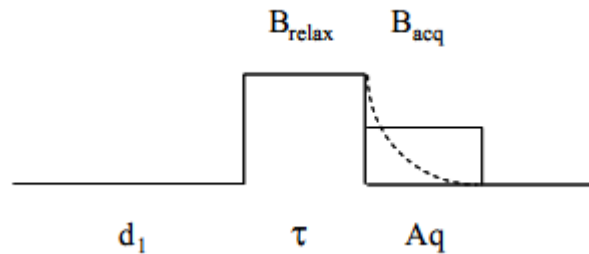


Figure 4 : Séquence de type non polarisée (fréquences entre 12 et 40 MHz).

La fréquence du champ d'acquisition (B_{acq}) est de 20.8 MHz, celle du champ de relaxation (B_{relax}) est variable et celle du champ de polarisation (B_{pol}) est de 28 ou 35 MHz. Le délai d_1 correspond à 4 fois $T_{1,max}$ où $T_{1,max}$ est le temps de relaxation le plus long. Le temps depolarisation (t_{pol}) est fixé à 4 fois le T_1 du champ de polarisation B_{pol} . Le délai τ varie entre 0 et 4 fois le $T_{1,max}$.

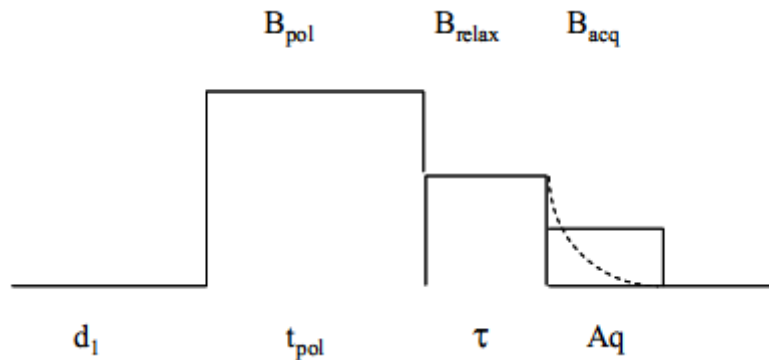
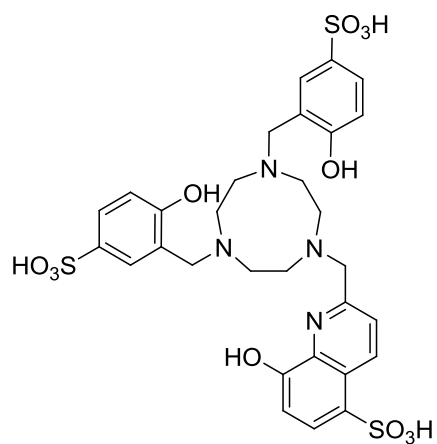


Figure 5 : Séquence prépolarisée (entre 0.01 et 12 MHz).

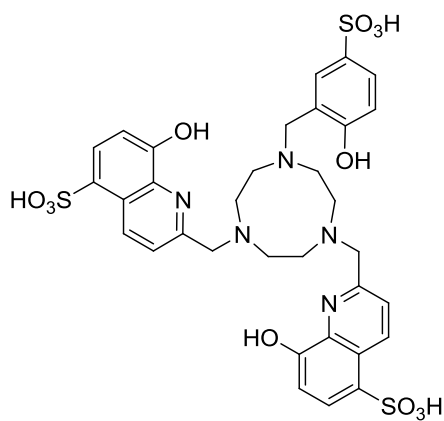
Bibliographie

- (1) Kuwahara, M.; Arimitsu, M.; Masahiko Sisido *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 256-257.
- (2) McLaughlin, M.; Mohareb, R. M.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 50-54.
- (3) Ketola, J.; Katajisto, J.; Hakala, H.; Hovinen, J. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 607-615.
- (4) A. E. Martell, R. J. M., *Determination and use of stability constants*, VCH ed., 1992.
- (5) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739-1753.
- (6) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; University of Leeds and University of Florence: Leeds, UK and Florence, Italy, 2000.
- (7) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York, 1976; Vol. 4.
- (8) Dan, M.; Doble, J.; Melchior, M.; O'Sullivan, B.; Siering, C.; Xu, J.; Pierre, V. C.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4930-4937.
- (9) Pierre, V. C.; Botta, M.; Aime, S.; Raymond, K. N. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8355-8364.
- (10) Nonat, A.; Imbert, D.; Pécaut, J.; Giraud, M.; Mazzanti, M. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4207-4218.
- (11) deMello, J. C.; Wittmann, H. F.; Friend, R. H. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 230-232.
- (12) Brunisholz, G.; Randin, M. *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1927.
- (13) Corsi, D. M.; Platas-Iglesias, C.; Bekkum, H. v.; Peters, J. A. *Magn. Res. Chem* **2001**, 723.
- (14) Vold, R. L.; Waugh, J. S.; Klein, M. P.; Phelps, D. E. *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 3831.
- (15) Meiboom, S.; Gill, D. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688.

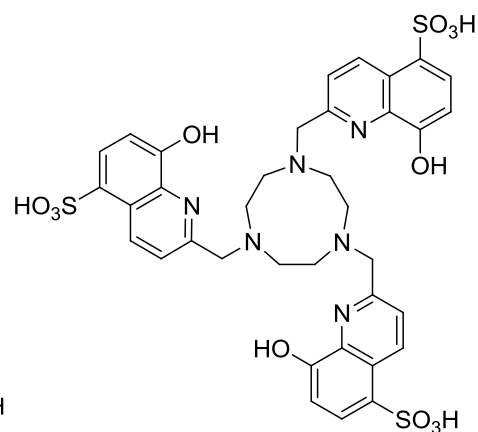
Schéma des ligands



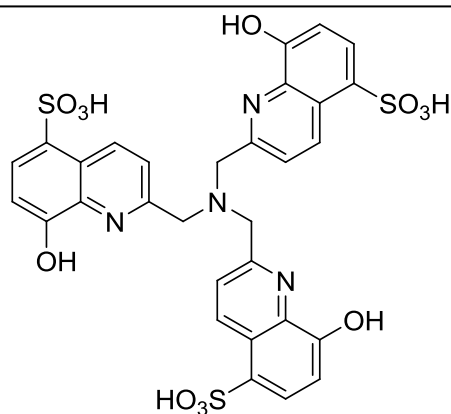
hqtcn-SO₃



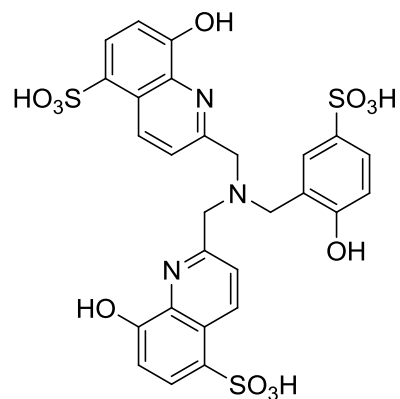
dhqtcn-SO₃



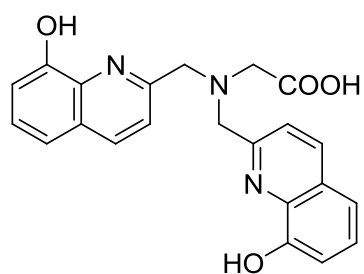
thqtcn-SO₃



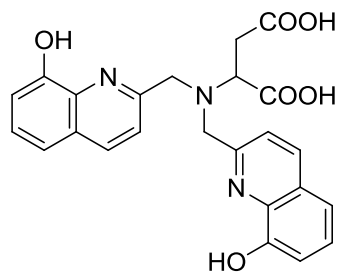
thqN-SO₃



dhqN-SO₃



dhqN-Gly



dhqN-Asp

Résumé

L'imagerie par résonance magnétique est une des méthodes de diagnostic les plus utilisées, aussi bien dans le domaine médical que dans les études précliniques. Cependant, la relaxivité des agents de contraste commerciaux ne représente qu'une fraction de la relaxivité prédite par la théorie et il est nécessaire d'optimiser les différents paramètres dont elle dépend pour atteindre des valeurs de relaxivité plus élevées : nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination, vitesse d'échange de l'eau, dynamique de rotation du complexe, relaxation électronique, distance Gd(III)-proton.

Dans ce travail, nous présentons la synthèse, la stabilité et la relaxivité des complexes de Gd(III) de deux séries de ligands tripodes dérivés de la 8-hydroxyquinoléine, basés l'une sur une plateforme 1,4,7 triazacyclononane, l'autre sur un pivot azote central. Ces complexes ont montré des stabilités comparables à celles des agents commerciaux, des valeurs de relaxivités élevées dans l'eau ainsi qu'en milieu biologique. L'utilisation de la 8-hydroxyquinoléine comme base des ligands a permis de sensibiliser le Nd(III) et l'Yb(III) pour la luminescence proche infrarouge, ouvrant la possibilité pour le développement de nouveaux systèmes bimodaux.

Abstract

Magnetic resonance imaging is a commonly used diagnostic method in medicinal practice as well as in biological and preclinical research. However, the relaxivity of commercial contrast agents is only a few percent of the theoretically predicted relaxivity. An optimisation of the different parameters who have an impact on the relaxivity (number of gadolinium bound water molecules, water exchange rate, rotation dynamic of the complex, electronic relaxation, Gd(III)-proton distance) is needed to obtain higher relaxivities.

In this work, we present the synthesis, the stability and the relaxivity of the Gd(III) complexes of two series of 8-hydroxyquinolate-based ligands, one using a 1,4,7 triazacyclononane platform, the other one using a central nitrogen architecture. Theses complexes show stabilities comparable to commercial agents, and high relaxivities in both water and serum. The 8-hydroxyquinolate moiety allows these ligands to sensitize Nd(III) and Yb(III) for Near Infra Red (NIR) luminescence, leading to a new class of potential bimodal systems.