

# DÉVELOPPEMENT DE SONDES RADICALAIRES INTELLIGENTES POUR LE DIAGNOSTIC PAR IRM REHAUSSÉE PAR L'EFFET OVERHAUSER

**Thèse**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR EN SCIENCES CHIMIQUES**

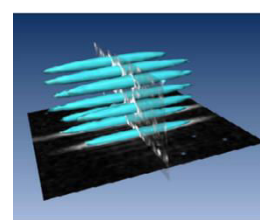
*Spécialité : Chimie Organique*

**Ecole doctorale des Sciences Chimiques ED 250**

Présentée et soutenue publiquement par

**Lionel BOSCO**

Le 20 Novembre 2015



## **JURY**

Docteur A. ROBERT

*Rapporteur*

CNRS Toulouse

Docteur E. DORIS

*Rapporteur*

CEA Saclay

Professeur J.-M. FRANCONI

*Examineur*

Université de Bordeaux

Professeur G. AUDRAN

*Examineur*

Aix-Marseille Université

Docteur P. BREMOND

*Co-directeur*

Aix-Marseille Université

Professeur S. MARQUE

*Directeur de thèse*

Aix-Marseille Université

*A mes parents*

*A ma Sœur*

*A Camille*

*Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie Radicalaire (UMR CNRS 7273) sous la direction du Professeur Sylvain Marque et du Docteur Paul Brémond.*

*Je tiens tout d'abord à les remercier de m'avoir accueilli dans leur équipe et pour ces trois années passées à leurs côtés durant lesquelles leur soutien permanent et leur disponibilité sans failles auront été d'une aide essentielle.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur Gérard Audran pour sa disponibilité, son écoute et ses conseils tout au long de cette thèse.*

*Je remercie également le Professeur Emérite Maurice Santelli pour ses conseils et son aide précieuse en modélisation moléculaire.*

*Que le Docteur Valérie Roubaud soit remerciée pour sa gentillesse et sa bonne humeur durant ces trois années.*

*Je tiens également à remercier les doctorants, Matisse, Paulin et Fanny, ainsi que les post-doctorants, Toshihide, Marvin, Indranil et Jean-Patrick, pour la bonne ambiance qu'ils ont apportée au sein de l'équipe et je leur souhaite bon courage pour la suite. Je remercie aussi les anciens doctorants de l'équipe, Germain et Stéphanie. J'ai également eu plaisir à rencontrer Benjamin, Mehdi et Joris durant leur stage auprès de notre équipe.*

*Je tiens particulièrement à remercier Teddy Butscher pour son travail de stage sur le dosage de l'eau par RPE et Karina Khaliel pour son travail sur la double activation des alcoxyamines.*

*Je remercie le Docteur Yvan Wyart, le Docteur Christelle Crampon et le Docteur Serge Dhainaut pour leur accueil et leur aide en enseignement à l'Institut Universitaire de Technologie.*

*Que le Professeur Stéphane Viel, le Docteur Gaétan Herbette et Roselyne Rosas pour l'acquisition de spectre 2D, le Docteur Nicolas Vanthuyne pour les séparations HPLC, le Docteur Michel Giorgi pour l'analyse par diffraction des rayons X, le Docteur Valérie Monnier et Christophe Chendo pour les analyses de spectrométrie de masse exacte soient remerciés pour leur aide durant ces trois années.*

*Je remercie Didier Pujol et Patrick Bernasconi pour leur aide technique sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.*

*Que les gestionnaires de l'Institut de Chimie Radicalaire, Marie-Thérèse, Julia et Nathalie, soient remerciées pour leur aide.*

*Je tiens également à vivement remercier Jean-Michel Franconi, Neha Koonjoo, Philippe Massot, Philippe Mellet, Elodie Parzy et Eric Thiaudière du Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (CRMSB, UMR CNRS 5536) qui ont pu travailler sur la partie IRM de ce projet.*

*Je remercie aussi l'Agence Nationale de la Recherche (ANR SonRadIs11-JS07-002-01) pour mon financement de thèse.*

*Que Cyril, Hugo, Cyrielle et François soient remerciés pour ces trois années. Je leur souhaite bon courage pour la fin de leurs thèses et je souhaite à François de trouver rapidement un post-doctorat.*

*Et plus personnellement,*

*Je tiens, tout d'abord, à remercier mes parents, ma sœur, Jérôme et le petit Léo qui m'ont soutenu tout au long de ces trois années. Mon seul souhait est de vous rendre ce que vous m'avez apporté.*

*Je remercie également Marlyse et Frédéric pour leur gentillesse et l'accueil qu'ils m'ont donné au sein de leur famille.*

*Je tiens à remercier mes amis Lionel, Marion, Benoit, Sophie, Loïc, Ophélie, Karl, Quentin et Annaïc pour tous les bons moments passés ensemble qui ont fait passer tellement vite ces années. Sachez que vous êtes ma seconde famille.*

*J'ai une pensée pour mon parrain Francis, devant qui j'aurais été fier de présenter ce travail.*

*Pour finir, je remercie profondément Camille pour tout ce qu'elle m'apporte au quotidien. Je sais que je suis là grâce à toi aujourd'hui.*

***J'adresse mes sincères remerciements à***

*Madame Anne Robert*

*Directrice de Recherche CNRS à l'Université de Toulouse*

*Monsieur Eric Doris*

*Chercheur au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay*

***Qui ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs.***

*Monsieur Jean-Michel Franconi*

*Professeur à l'Université de Bordeaux*

*Monsieur Gérard Audran*

*Professeur à Aix-Marseille Université*

***Pour l'honneur qu'ils me font en participant à ce jury.***

# Table des matières

Introduction générale.....	3
I. L'imagerie par résonance magnétique .....	4
1. Principe et historique .....	4
2. Les agents de contraste en IRM.....	6
II. Les nitroxydes comme nouveaux agents de contraste en IRM .....	8
1. La polarisation dynamique nucléaire ou effet Overhauser .....	8
2. L'IRM rehaussée par l'effet Overhauser .....	9
III. Concepts développés .....	11
1. Un nitroxyde sensible à une activité enzymatique .....	11
2. Une alcoxyamine labile comme précurseur de nitroxyde.....	12
Chapitre 1 : les Nitroxydes comme agents de contraste en IRM .....	14
I. Analyse des nitroxydes par Résonance Paramagnétique Electronique .....	16
II. Généralités sur les nitroxydes .....	19
1. Historique .....	19
2. Stabilité des Nitroxydes .....	20
3. Principales voies de synthèse .....	24
4. Les nitroxydes $\beta$ -phosphorés cycliques.....	25
5. Effets de solvants sur les constantes de couplage RPE des nitroxydes .....	25
6. Effets de la protonation sur les constantes de couplage RPE des nitroxydes.....	27
III. Objectifs.....	28
IV. Synthèse du nitroxyde 21 .....	33
1. Analyse rétrosynthétique .....	33
2. Détails de la synthèse .....	34
V. Etudes Physico-Chimiques.....	43
1. Généralités sur l'effet cybotactique .....	43
2. Résultats et discussion .....	45
3. Application au dosage de l'eau en milieu organique.....	50
VI. Nitroxyde pour l'Imagerie par Résonance Magnétique .....	53
1. Résultats RPE .....	53
2. Application à l'IRM rehaussée par l'effet Overhauser .....	57
VII. Conclusion .....	61

Chapitre 2 : les alcoxyamines, nouveaux agents pour le diagnostic .....	62
I. Les alcoxyamines .....	64
1. Généralités .....	64
2. Principales voies de synthèse des alcoxyamines .....	66
3. Paramètres contrôlant la vitesse d'homolyse des alcoxyamines:.....	68
4. Phénomène d'activation des alcoxyamines .....	70
5. Imagerie par Résonance Magnétique .....	73
II. Objectifs .....	75
III. Synthèse de la cible .....	77
1. Analyse rétrosynthétique .....	77
2. Détails de la synthèse .....	78
IV. Résultats et discussions .....	84
1. Etude de l'homolyse de la liaison NO-C .....	84
2. Résultats des mesures cinétiques en milieu aqueux .....	87
3. Résultats cinétiques en milieu organique .....	103
4. Conclusion .....	112
V. Alcoxyamine pour le diagnostic.....	114
1. Synthèse de l'alcoxyamine cible .....	115
2. Etude cinétique .....	118
VI. Conclusion .....	122
Conclusion générale .....	123
Partie expérimentale.....	128
Annexes.....	175

# *Introduction générale*



*La connaissance s'acquiert par l'expérience,  
tout le reste n'est que de l'information.*

*(Albert Einstein)*

# **I. L'imagerie par résonance magnétique**

En dépit de progrès constants dans le domaine du diagnostic par IRM, le cancer reste une pathologie à forte mortalité. Dans ce contexte, et dans un souci d'obtention de meilleures spécificités et innocuités des traitements, des efforts de recherche importants sont entrepris pour développer des approches innovantes utilisant de nouveaux contrastophores peu toxiques, sélectivement délivrés dans la zone tumorale et permettant de détecter des tumeurs à un stade plus précoce qu'à l'heure actuelle.

## ***1. Principe et historique***

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique de diagnostic médical relativement récente, non invasive et sans effets secondaires connus a priori. Elle permet l'obtention d'images tridimensionnelles et en coupe du corps humain.

Cette technologie repose sur l'observation par résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenue dans l'organisme. L'intensité du signal observé dépendra de la concentration en eau présente dans chaque tissu. Cette différence de concentration donne la répartition de l'eau dans le corps humain et permet de construire l'image correspondante.

En 1946, Bloch et Purcell sont les premiers à décrire les phénomènes de résonance et de relaxation, ce qui leur vaudra un prix Nobel en 1952. Jusqu'à la fin des années 70, cette technique est principalement appliquée à l'étude d'échantillons en spectroscopie.

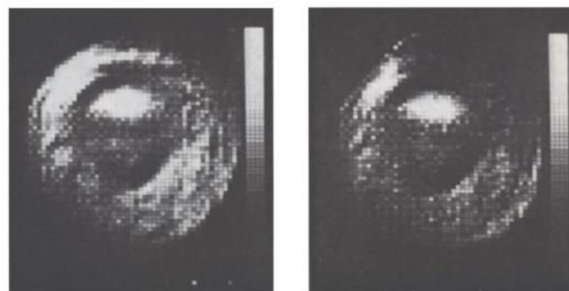
Cependant, en 1969, Damadian montre qu'un tissu tumoral peut être différencié d'un tissu sain par RMN car les protons de l'eau qui le constituent possèdent des temps de relaxation différents. Il propose donc l'utilisation de cette technique de spectroscopie dans un but médical.

C'est seulement en 1973 que les travaux de Lauterbur ont pu aboutir à la première image par résonance magnétique nucléaire de deux tubes à essais contenant de l'eau (Figure 1).<sup>1</sup> Il appelle cette technique la zeugmatographie (du grec ζευγμα : ce qui est utilisé pour joindre) et son image un zeugmatogramme.



**Figure 1 : zeugmatogramme obtenu par Lauterbur en 1973**

Par la suite, en 1977, Mansfiel est le premier à montrer le potentiel de cette nouvelle technologie en enregistrant la première image *in vivo* d'un doigt (Figure 2).<sup>2</sup>



**Figure 2 : première image obtenue par IRM *in vivo***

Les travaux pionniers de Lauterbur et Mansfiel ont été reconnus par le prix Nobel de Médecine en 2003.

De nos jours, des appareils plus sophistiqués sont utilisés en routine dans de nombreux hopitaux à travers le monde : il est réalisé environ 60 millions d'expériences d'imagerie chaque année. De nos jours, la principale application de cette technologie reste la détection de tumeurs.

---

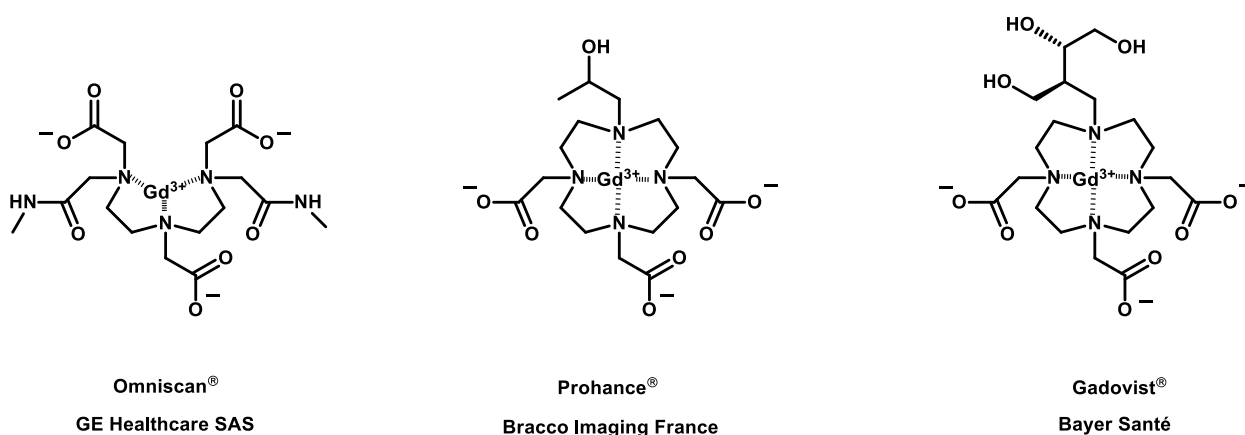
<sup>1</sup> Lauterbur, P.C. *Nature*, **1973**, 242.

<sup>2</sup> Mansfiel, P. ; Maudsley, A. A. *British Journal of Radiology*, **1977**, 50, 188.

## 2. Les agents de contraste en IRM

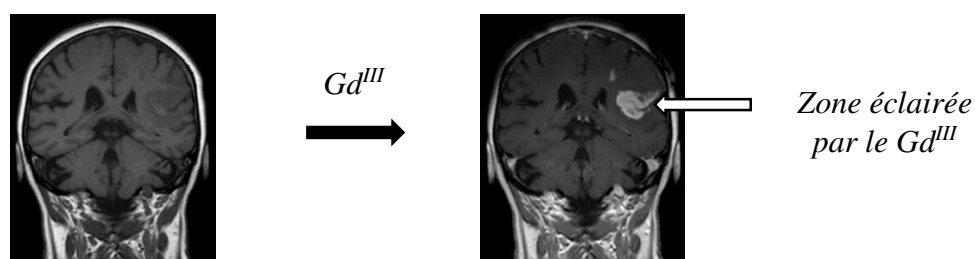
L'apparition des agents de contraste au début des années 80 a permis d'observer des tissus jusqu'alors mal perçus dans leurs environnements. Les plus utilisés de nos jours sont les agents issus de terres rares tels que le gadolinium.

Le gadolinium, sous son degré d'oxydation III, est le contrastophore le plus répandu de nos jours en IRM. Sa configuration électronique  $[Xe] 4f^7$  présente 7 électrons non appariés qui lui confèrent ses propriétés paramagnétiques. Ce métal est vendu sous les noms d'Omniscan<sup>®</sup>, de Prohance<sup>®</sup> ou encore de Gadovist<sup>®</sup> (Figure 3).



**Figure 3 : principaux agents de contraste issus du gadolinium III**

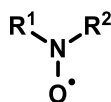
Ces molécules paramagnétiques agissent sur l'IRM en diminuant le temps de relaxation des protons de l'eau environnante. La diminution de ce temps entraîne un gain du signal RMN et, par conséquent, une image mieux résolue. Il est très important de noter que l'agent de contraste est invisible en IRM (Figure 4).



**Figure 4 : Contraste apporté par le gadolinium III au niveau du cerveau**

Cependant, le gadolinium (III) présente un problème majeur. En effet, sous sa forme saline ( $\text{GdCl}_3$ ), sa dose létale 50 ( $\text{LD}_{50}$ ) est de 100-200 mg/kg.<sup>3</sup> Cette toxicité provient principalement du fait que son rayon atomique est très proche de celui du calcium (II) et peut le remplacer dans certains processus biologiques. Ses formes chélatées permettent de diminuer d'un facteur 100 sa toxicité. De plus, le gain de contraste en imagerie reste modeste puisque des valeurs avoisinant les 50% ont été mesurées sur ce type de composés.<sup>4</sup> Il est donc important de développer de nouveaux agents de contraste pour l'IRM.

Dans ce cadre, nous essayons de développer une nouvelle approche du diagnostic par IRM de tumeurs utilisant des molécules paramagnétiques stables de type nitroxyde (Figure 5).



**Figure 5 : structure générale d'un nitroxyde**

---

<sup>3</sup> Caillé, J. M. ; Lemanceau, B. ; Bonnemain, B. *Am. J. of Neuroradiology* **1983**, 4, 1041.

<sup>4</sup> Louie, A. Y. ; Hüber, M. M. ; Ahrens, E. T. ; Rothbacher, U. ; Moats, R. ; Jacobs, R. E. ; Frasier, S. E. ; Meade, T. J. *Nature Biotech.* **1999**, 18, 321.

## II. Les nitroxydes comme nouveaux agents de contraste en IRM

### 1. La polarisation dynamique nucléaire ou effet Overhauser

L'utilisation des nitroxydes comme agent de contraste en IRM met en jeu le phénomène de polarisation dynamique nucléaire. Cet effet, découvert par Albert Overhauser, se définit par le transfert de polarisation de spin électronique à un spin nucléaire après irradiation microonde d'un électron célibataire.

Or, si nous appliquons cet effet à un nitroxyde en milieu biologique, la polarisation du nitroxyde excitée par un rayonnement microonde va être transmise aux molécules d'eau environnantes. Il en résultera une augmentation du contraste de l'image obtenue après IRM. (Schéma 1). Cette technique d'imagerie s'appelle l'Imagerie par Résonance Magnétique rehaussée par l'effet Overhauser (IRMO). Théoriquement, le signal RMN peut être amplifié d'un facteur 660 par cette technique. Comme le montre l'équation 1, ce facteur  $\varepsilon$  correspond au rapport gyromagnétique de l'électron sur celui du proton.

$$\varepsilon = \frac{\gamma_e}{\gamma_n} \approx 660 \quad (1)$$

$\gamma_e$  : rapport gyromagnétique de l'électron.

$\gamma_n$  : rapport gyromagnétique du proton.

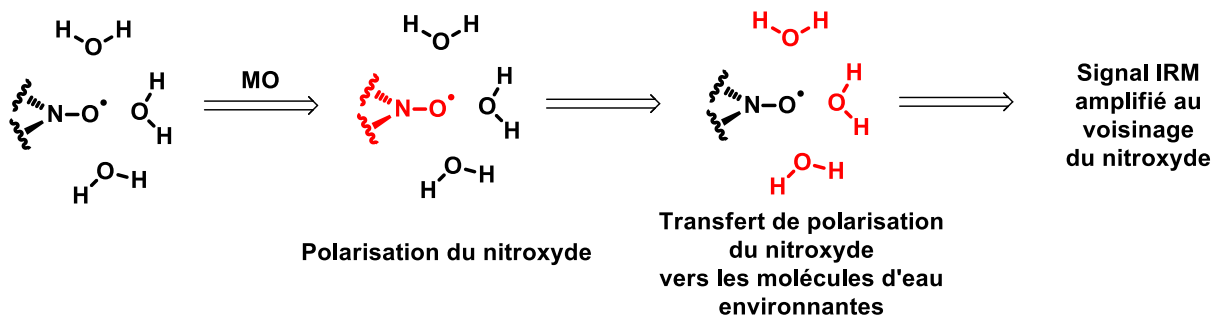


Schéma 1 : principe de l'effet Overhauser dans le corps humain (en rouge sont représentées les molécules polarisées)

## 2. L'IRM rehaussée par l'effet Overhauser

Cependant, cette technique d'IRM implique qu'un spectromètre de résonance paramagnétique électronique (RPE), nécessaire pour exciter le nitroxyde, soit présent dans l'aimant de l'IRM.

Des chercheurs du *Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques (CRMSB, UMR CNRS 5536)* de l'Université de Bordeaux ont réussi à mettre au point cette technologie (Figure 6) et ont obtenu une amplification du signal importante *in vivo* sur le petit animal atteint d'une tumeur cérébrale.<sup>5,6</sup> Une étroite collaboration existe entre le CRMSB et notre équipe depuis plusieurs années.

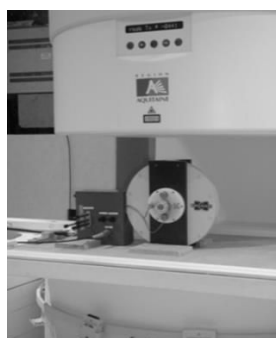


Figure 6 : Spectromètre RPE placé dans une IRM

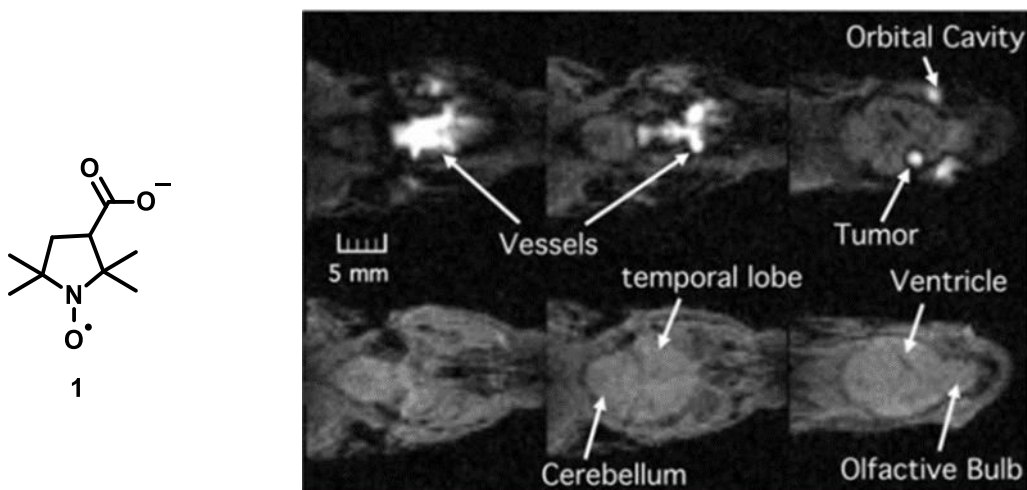


Figure 7 : Haut : IRM rehaussée par l'effet Overhauser (IRMO) d'une souris présentant une tumeur cérébrale. Bas : IRM classique

<sup>5</sup> Mellet, P. ; Massot, P. ; Madelin, G. ; Marque, S. R. A. ; Harte, E. ; Franconi, J.-M. ; Thiaudière, E. *Plos one*, **2009**, 4, e5244.

<sup>6</sup> Massot, P. ; Parzy, E. ; Pourtau, L. ; Mellet, P. ; Madelin, G. ; Marque, S. ; Franconi, J.-M. ; Thiaudière, E. *Contrast Media Mol. Imaging*, **2012**, 7, 45.

Comme le montre la figure 7, après injection intrapéritonéale et irradiation du nitroxyde **1**, l'IRMO montre des zones préférentiellement éclairées. Les zones tumorales étant plus vascularisées que les zones saines, un contraste net est obtenu au niveau de la tumeur cérébrale. Or celle-ci reste invisible lors d'une IRM classique. Les nitroxydes se comportent donc comme de très bons contrastophores pour l'IRM rehaussée par l'effet Overhauser. Actuellement, aucun nitroxyde ne possède une sélectivité suffisante pour les cellules cancéreuses.

### III. Concepts développés

Afin de développer des nitroxydes comme agents de contraste en IRM, nous avons imaginé deux concepts différents.

#### 1. Un nitroxyde sensible à une activité enzymatique

Comme nous l'avons décrit précédemment, les nitroxydes sont un outil puissant pour l'amélioration du signal obtenu par IRM. Cependant, l'enjeu actuel est d'obtenir un nitroxyde capable de se concentrer autour d'une tumeur pour obtenir le meilleur contraste à son niveau. Pour y parvenir, le nitroxyde doit pouvoir être vectorisé. Or, nous savons que les enzymes possèdent, pour la plupart d'entre elles, une haute sélectivité envers des substrats spécifiques. Nous avons alors imaginé un concept faisant intervenir un nitroxyde qui serait modifié par une enzyme surexprimée au niveau d'une zone tumorale.

Le point clé de ce concept est d'arriver à obtenir un changement de signature RPE du nitroxyde en fonction d'une activité enzymatique. A ce jour, aucune sonde radicalaire ne se comporte de cette façon. (Schéma 2)

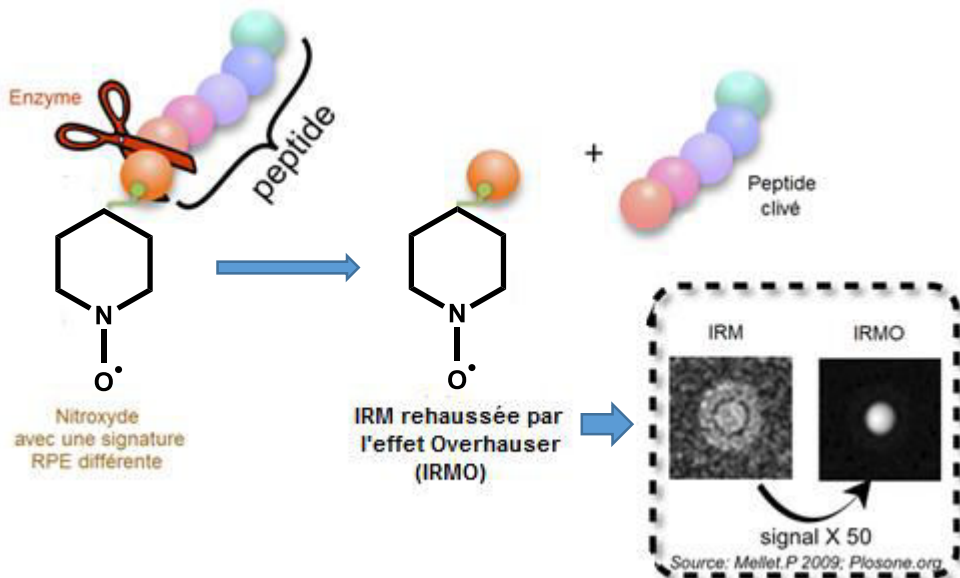


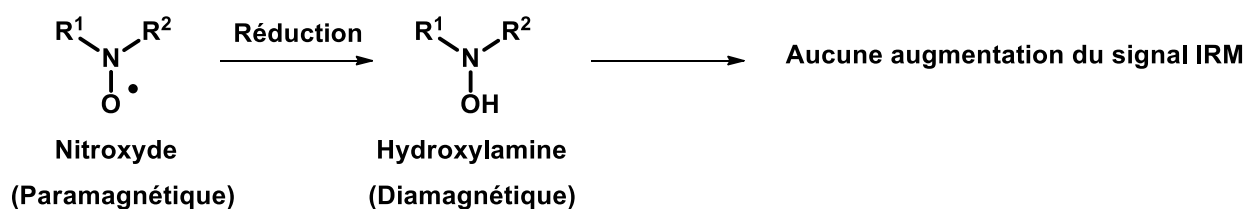
Schéma 2 : Nitroxyde pour l'IRMO



En effet, l'enzyme pourrait alors cliver un peptide préalablement greffé sur le nitroxyde et libérer le nitroxyde. Si la signature RPE du nitroxyde libéré est différente de celle du nitroxyde lié au peptide, alors nous pourrions sélectivement exciter le nitroxyde libéré dans la tumeur et obtenir une image en temps réel de la protéolyse *in vivo* de la sonde. Un tel agent de contraste permettrait la détection de tumeurs cancéreuses bien plus précocement que par IRM classique.

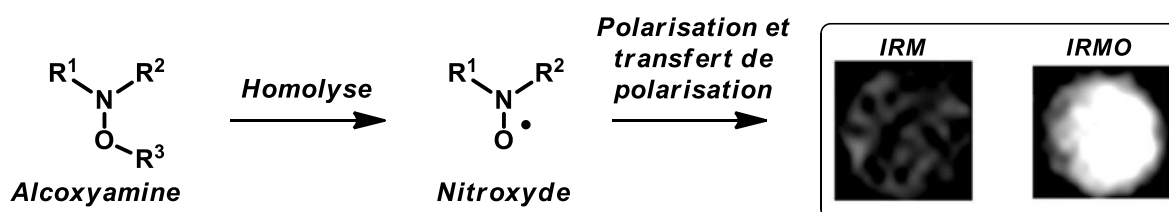
## 2. Une alcoxyamine labile comme précurseur de nitroxyde

Cependant, des problèmes de réduction du nitroxyde avant d'atteindre la tumeur pourraient empêcher la détection puisque l'hydroxylamine ainsi obtenue est diamagnétique, faisant perdre l'avantage procuré par l'effet Overhauser (Schéma 3). Nous avons donc développé un autre concept utilisant un précurseur du nitroxyde.



### Schéma 3 : impact de la bioréduction du nitroxyde sur l'IRMO

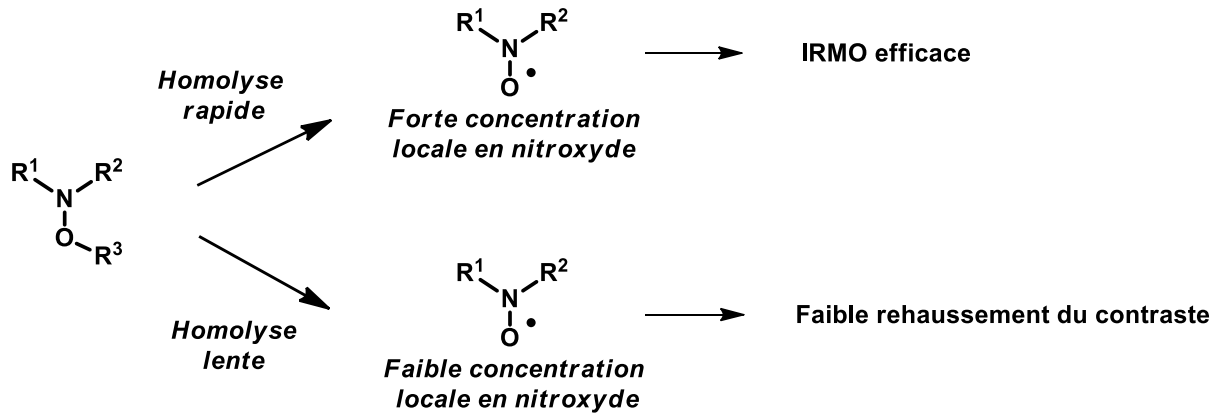
Le second concept que nous cherchons à développer repose sur la synthèse d'une alcoxyamine. Les alcoxyamines, de structure générale  $\text{R}^1\text{R}^2\text{NOR}^3$ , sont des molécules capables de libérer un nitroxyde sous l'effet de la température et peuvent être considérées comme des précurseurs de nitroxyde. (Schéma 4)



### Schéma 4: alcoxyamine pour l'IRMO

Ce concept repose sur l'obtention d'une alcoxyamine susceptible de s'homolyser rapidement à température corporelle dans un environnement proche d'une tumeur. Ce prérequis

est nécessaire pour deux raisons : la première est que sans homolyse, il n'y a pas de nitroxyde et, par conséquent, il n'y aura aucun rehaussement du contraste ; la seconde est que si l'homolyse n'est pas assez rapide, il n'y aura que très peu de contraste au niveau de la cellule cancéreuse. La molécule devra donc subir une activation à proximité ou à l'intérieur d'une zone tumorale qui provoquera son homolyse rapide (Schéma 5).

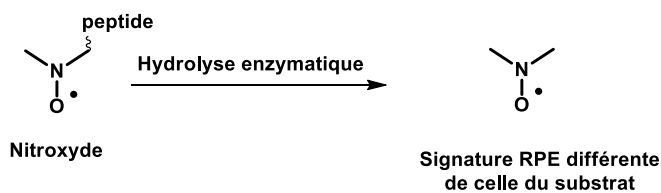


### Schéma 5 : conditions pour l'application des alcoxyamines en IRMO

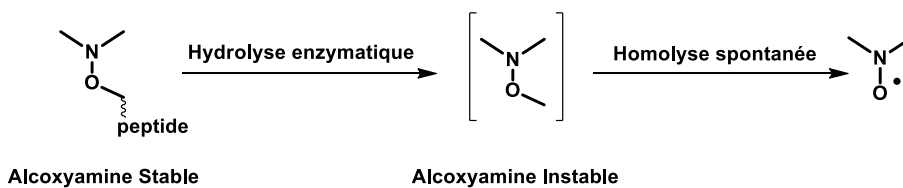
La même stratégie d'utilisation des enzymes, spécifiquement surexprimées dans le microenvironnement tumoral, sera envisagée en greffant un peptide sur la partie R<sup>3</sup> de l'alcoxyamine.

Le développement de ces deux concepts sera exposé au cours de ce travail de thèse au travers de deux chapitres distincts (Schéma 6).

#### CONCEPT 1:



#### CONCEPT 2:



Rehaussement du contraste en IRM

### Schéma 6 : concepts développés au cours de ce travail

# ***Chapitre 1 : les Nitroxydes comme agents de contraste en IRM***

La première stratégie envisagée fait intervenir un changement de structure du nitroxyde en fonction d'une activité protéolytique. Dans cette partie, nous essayerons de développer un nitroxyde capable de ce changement. Dans un premier temps, nous ferons quelques rappels sur la résonance paramagnétique électronique et les nitroxydes, puis nous présenterons les prérequis et la synthèse de la nouvelle sonde radicalaire pour le diagnostic. Nous verrons, qu'au cours de la synthèse, une étude physico-chimique a pu mettre en évidence une particularité d'un intermédiaire de synthèse, ce qui nous a permis d'entrevoir une nouvelle application des nitroxydes dans le dosage de l'eau en milieu organique. Nous finirons ce chapitre par les applications, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, effectuées sur ce nouveau nitroxyde.

### Rappel du concept recherché :

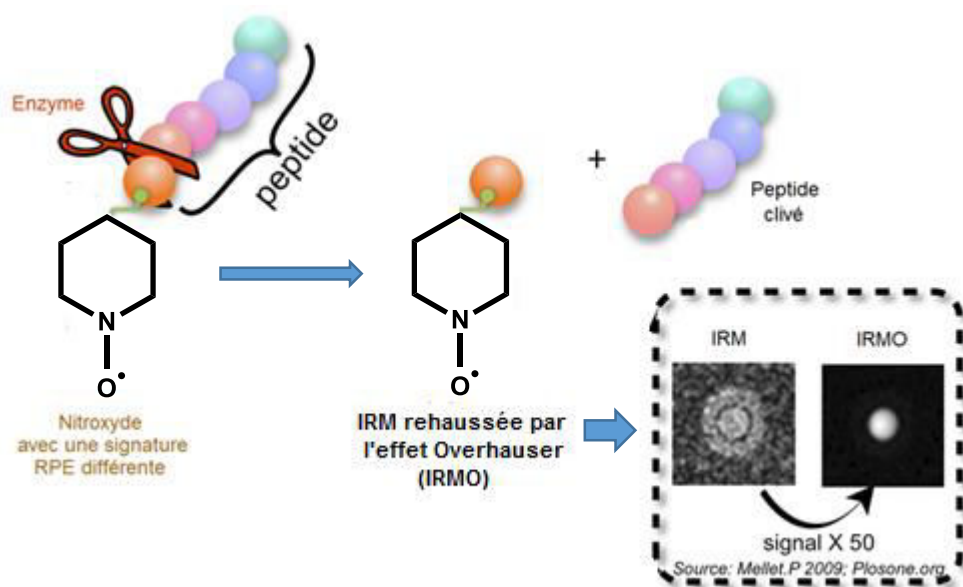


Figure 8

# I. Analyse des nitroxydes par Résonance Paramagnétique Electronique

La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) constitue une méthode spectroscopique de choix pour l'étude de radicaux. Elle fut découverte en URSS, à la fin de la Seconde Guerre Mondiale (1945), par Zavoïsky. Les physiciens du laboratoire Clarendon à Oxford ont ensuite décrit les bases théoriques et expérimentales de cette nouvelle spectroscopie, en 1952. Il s'agit d'une technique complémentaire de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). En effet, la RMN permet de caractériser, entre autres, les molécules diamagnétiques. La RPE s'intéresse, quant à elle, aux molécules paramagnétiques. Cette technique, particulièrement sensible, permet de remonter à une structure pour le radical étudié. Cette structure est déterminée à l'aide des constantes de couplage hyperfin mesurées sur le spectre enregistré.

En RPE, l'hamiltonien magnétique de spin électronique couplé à plusieurs noyaux  $j$  de spin  $\hat{I}^j$  s'écrit :

$$\hat{H}_0 = \hat{H}_{Ze} + \hat{H}_{ZN} + \hat{H}_F \quad (2)$$

$$\hat{H}_0 = g\beta_e B_0 \hat{S}_z - B_0 \sum_j g_j \beta_j \hat{I}_z^j + \hat{S} \sum_j A_j \hat{I}^j \quad (3)$$

$\hat{H}_{Ze} = g\beta_e B_0 \hat{S}_z$  : interaction entre le moment magnétique de spin électronique et le champ magnétique. Sa direction représente l'axe  $z$ . Elle est appelée interaction de Zeeman électronique.

$\hat{H}_{ZN} = - B_0 \sum_j g_j \beta_j \hat{I}_z^j$  : interaction entre les moments magnétiques des noyaux  $j$  et le champ magnétique appelé interaction de Zeeman nucléaire.

$\hat{H}_F = \hat{S} \sum_j A_j \hat{I}^j$  : couplage isotrope, dit de contact.

$\hat{S}$  : opérateur de spin de l'électron ;  $\hat{I}^j$  : opérateur de spin du noyau  $j$  ;  $A_j$  : constante de couplage hyperfin électron-noyau ;  $g$  : facteur de Landé électronique ;  $g_j$  : facteur de Landé nucléaire ;  $\beta_e$  : magnéton de Bohr de l'électron ;  $\beta_j$  : magnéton de Bohr du noyau ;  $B_0$  ; champ magnétique.

Cependant, si la valeur du champ magnétique  $B_0$  est grande devant les valeurs de constante de couplage  $A_j$ , le terme  $A_j(\hat{I}_x \hat{S}_x + \hat{I}_y \hat{S}_y)$  est considéré comme un terme de perturbation. Le nouvel hamiltonien sera donc :

$$\hat{H}_1 = g\beta_e B_0 \hat{S}_z - B_0 \sum_j g_j \beta_j \hat{I}_z^j + \hat{S}_z \sum_j A_j \hat{I}_z^j \quad (4)$$

Si l'on ne tient pas compte des interactions Zeeman nucléaires, qui ne changent ni le nombre ni la position des raies RPE, la base de fonction  $|m_s m_{Ij}\rangle$  est une base de fonctions propres pour  $\hat{H}_1$ . Les énergies du système seront donc de la forme :

$$E = m_s g \beta_e B_0 + m_s \sum_j A_j m_{Ij} \quad (5)$$

$$\Delta E = \Delta m_s g \beta_e B_0 + \Delta m_s \sum_j A_j m_{Ij} + m_s \sum_j A_j \Delta m_{Ij} \quad (6)$$

En RPE, pour tous les noyaux  $j$ , les transitions que nous observons correspondent à :

$$\Delta m_s = \pm 1$$

$$\Delta m_{Ij} = 0$$

$$\text{Donc : } \Delta E = g \beta_e B_0 + \sum_j A_j m_{Ij} \quad (7)$$

Or, en spectrométrie RPE, nous travaillons à une fréquence  $\nu$  fixe et à champ magnétique variable. Si nous n'avons aucun couplage hyperfin :

$$\Delta E = h\nu = g \beta_e B_0^* \quad (8)$$

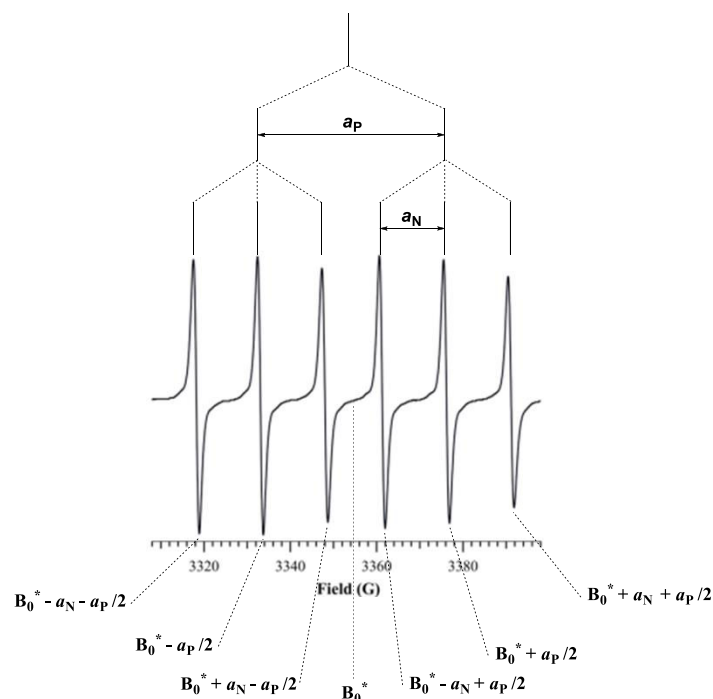
$B_0^*$  est le champ central du spectre.

Or, si on divise nos deux expressions de la différence d'énergie (Equation (7) et (8)) par  $g \beta_e$ , on obtient :

$$B_0 = B_0^* - \sum_j A_j m_{Ij} \quad (9)$$

Cette relation permet de définir la position de chaque raie RPE par rapport au champ central  $B_0^*$ .

Dans le cadre de cette thèse, tous les nitroxydes étudiés présentent un atome de phosphore 31 de spin nucléaire  $I = 1/2$  en position  $\beta$ . Leurs spectres RPE seront composés de 6 raies d'égale intensité qui sont issues du couplage avec deux hétéroatomes présentant des spins non nuls. Un premier couplage à l'azote de spin 1 donnera 3 raies d'égale intensité puis un fort couplage au phosphore de spin  $1/2$  qui dédoublera celles-ci. (Figure 9)



**Figure 9 : Spectre RPE d'un nitroxyde  $\beta$ -phosphoré**

La résultante de ces couplages donne un spectre RPE à 6 raies distinctes dont il est reporté la position de chacune d'elles par rapport au champ central  $B_0^*$ . Leurs positions sont fonction de chaque constante de couplage à l'azote ( $a_N$ ) et au phosphore ( $a_P$ ).

## II. Généralités sur les nitroxydes

### 1. Historique

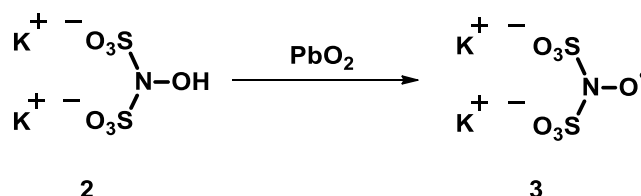


Schéma 7 : synthèse du sel de Fremy

La découverte, en 1845, du sel de Fremy,<sup>7</sup> résultant de l'oxydation du disulfonate de potassium d'hydroxylamine par du dioxyde de plomb (Schéma 7), a conduit à l'émergence d'une nouvelle classe de molécules peu connue jusqu'alors : les nitroxydes.

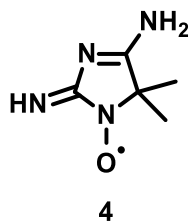


Figure 10 : Porphyraxide

La porphyraxide (Figure 10), bien que non reconnue comme une espèce radicalaire à l'époque, fut le premier nitroxyde organique découvert par Piloty et Schwerin en 1901.<sup>8</sup>

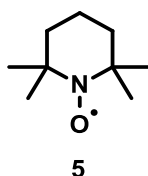
Cependant, la plus grande contribution à cette chimie a été apportée par Lebedev et Kazarnovsky en 1959. En effet, ils ont synthétisé les nitroxydes les plus courants actuellement, à savoir les dérivés du 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-*N*-Oxyl (TEMPO) (Figure 11), dont certains sont commerciaux.<sup>9</sup>

<sup>7</sup> Fremy, E. *Ann. Chim. Phys.* **1845**, 15, 408.

<sup>8</sup> O. Piloty, B. G. Schwerin, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, 1870.

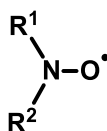
<sup>9</sup> O. L. Lebedev, S. N. Kazarnovsky, *Tr. Khim. Khim. Tekhnol.* **1959**, 3, 649.





**Figure 11 : 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-N-Oxyl (TEMPO)**

Les nitroxydes, de formule générale  $R^1R^2N-O\cdot$  (Figure 12), constituent une famille de radicaux allant de persistants à stables selon la définition d'Ingold.<sup>10</sup> Le sel de Frémy n'étant que très peu stable (de l'ordre de 1 semaine à l'air libre), de nombreuses recherches ont été menées afin de mieux comprendre et appréhender la synthèse ainsi que la stabilité de ces radicaux particuliers.<sup>11</sup>



**Figure 12 : Formule générale d'un nitroxyde**

Grâce à leur persistance, les nitroxydes jouent un rôle primordial dans les techniques de spin-trapping ou encore en polymérisation radicalaire contrôlée. De nos jours, plusieurs équipes de recherche portent un intérêt croissant à ces radicaux pour l'étude de phénomènes biologiques.<sup>12</sup>

## ***2. Stabilité des Nitroxydes***

La majorité des radicaux présents dans notre environnement ne possèdent pas une stabilité suffisante pour être conservés dans des conditions normales de pression et de température. Ce sont les radicaux transitoires qui sont extrêmement importants dans de nombreux processus biologiques. Cependant, certains d'entre eux ont une stabilité suffisante

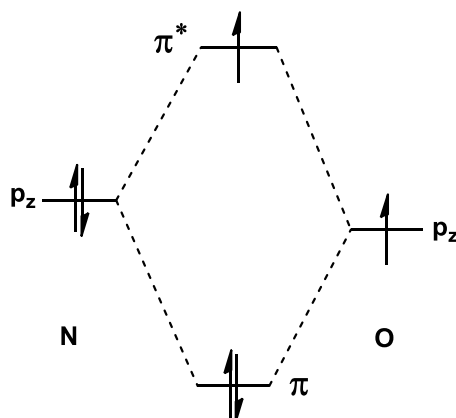
<sup>10</sup> Griller, D. ; Ingold, K. U. *Acc. Chem. Res.* **1976**, 9,13

<sup>11</sup> Rosantsev, E.G. ; Scholle, V.D. *Synthesis*, **1971**, 4, 190.

<sup>12</sup> Bagryanskaya, E.G. ; Krumkacheva, O.A. ; Fedin, M. V. ; Marque S.R.A. *Methods in enzymology*, **2015**, sous presse.

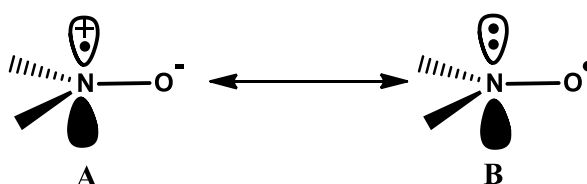
pour être observés. Il est donc important de comprendre la nature de la stabilisation des nitroxydes afin de mieux appréhender les phénomènes dans lesquels ils seront impliqués.

Les nitroxydes sont caractérisés par une liaison  $\pi$  à trois électrons (Figure 13) délocalisés sur les atomes d'azote et d'oxygène. Deux électrons sont situés sur une orbitale  $\pi$  liante et un électron célibataire se retrouve contenu dans une orbitale antiliante  $\pi^*$ . Cette caractéristique particulière fait des nitroxydes des molécules paramagnétiques.



**Figure 13 : Diagramme d'énergie de la liaison N-O**

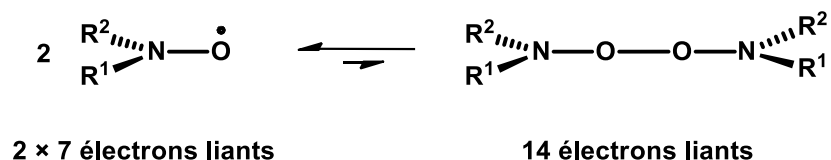
Le radical nitroxyde est tout d'abord stabilisé thermodynamiquement par effet mésomère (Schéma 8).



**Schéma 8 : Formes mésomères d'un nitroxyde**

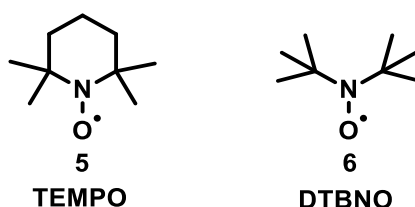
Ces deux formes mésomères vont stabiliser thermodynamiquement le radical nitroxyde. Le poids de chaque forme sera déterminé par différents facteurs. Le premier implique la proximité d'un groupement électroattracteur qui favorisera la forme B. A l'inverse, des groupements électrodonneurs entraîneront une prépondérance de la forme A. De plus, une première couche de solvation polaire stabilisera la forme A tandis qu'un solvant apolaire favorisera la forme B. Une partie de ce manuscrit sera consacré à l'effet de solvant sur les constantes de couplage de ces radicaux.

Il est commun de penser que les radicaux en solution peuvent se dimériser. Cependant, cette réaction n'est pas favorisée pour les nitroxydes. En effet, pour qu'elle ait lieu, il faut que le produit formé soit plus stable que les réactifs. Or, la formation de la liaison peroxy par dimérisation d'un nitroxyde n'augmente pas le nombre d'électrons liants (Schéma 9).



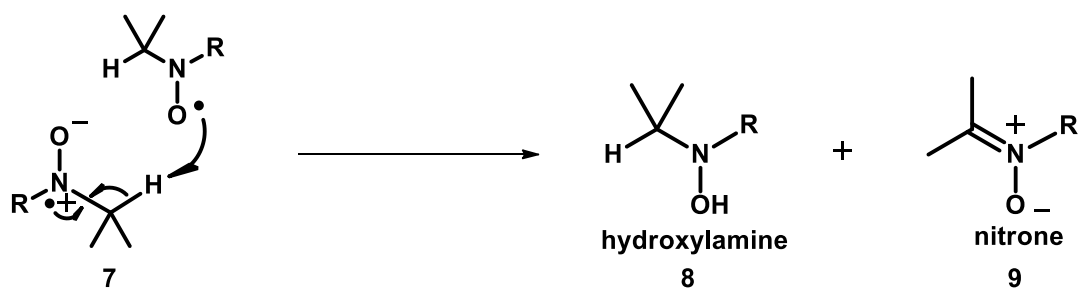
**Schéma 9 : Dimérisation d'un nitroxyde**

Les facteurs thermodynamiques expliquent la stabilité de ces molécules, un effet stérique peut aussi entrer en ligne de compte dans leur stabilité. En effet, de nombreux nitroxydes possèdent deux carbones quaternaires en  $\alpha$ . Cette gêne stérique importante autour de la fonction nitroxyde va protéger le radical, allongeant ainsi considérablement sa durée de vie. C'est le cas du TEMPO ou encore le di-*tertio*-butylnitroxyde (DTBNO) (Figure 14).



**Figure 14**

De plus, le fait de ne pas avoir d'atome d'hydrogène en  $\alpha$  va empêcher une réaction de dismutation. (Schéma 10)



### Schéma 10 : Dismutation d'un nitroxyde présentant un hydrogène en $\alpha$

Les deux formes mésomères vont pouvoir réagir de manière intermoléculaire pour former une hydroxylamine et une nitrone.

Cependant, Rassat *et al.* ont montré qu'un nitroxyde  $\alpha$ -hydrogéné est stable si la formation de la nitrone ou l'attaque de l'hydrogène lui sont impossibles par la règle de Bredt.<sup>13,14</sup> Par la suite, Inamoto *et al.*<sup>15</sup>, Volodarski *et al.*<sup>16, 17</sup> et Tordo *et al* ont pu isoler plusieurs de ces composés.<sup>18</sup> Ces structures mettent en évidence l'importance de groupements volumineux autour de la fonction nitroxyde. (Figure 15)

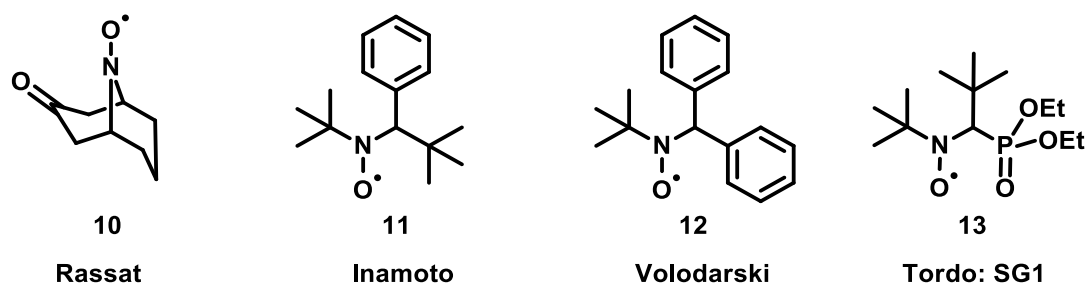


Figure 15

Comme nous pouvons le remarquer sur la projection de Newman (Figure 16), cette stabilité vient principalement du fait que l'hydrogène se retrouve dans le plan nodal de l'orbitale contenant le radical. Le recouvrement orbitaire n'étant pas efficace, l'hydrogène n'a pas la

<sup>13</sup> Dupeyre, R.-M. ; Rassat, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3180.

<sup>14</sup> Martinie-Hombrouck, J. ; Rassat, A. *Tetrahedron* **1974**, 30, 433.

<sup>15</sup> Iwamura, M. ; Inamoto, N. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 703.

<sup>16</sup> Reznikov, V. A. ; Volodarsky, L. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2239.

<sup>17</sup> Reznikov, V.A. ; Gutorov, I. A. ; Gatlov, Y.V. ; Rybalova, T. V. ; Volodarsky, L. B. *Russ. Chem. Bull.* **1996**, 45, 384.

<sup>18</sup> a) Grimaldi, S. ; Le moigne, F. ; Finet, J.-P. ; Tordo, P. ; Nicol, P. ; Plechot, M. *PCT Int. Appl.* **1996**, WO 96 / 24620. b) Grimaldi, S. *Thèse de doctorat* **1997**, Aix-Marseille 3. c) Grimaldi, S. ; Finet, J.-P. ; Le moigne, F. ; Zeghdaoui, A. ; Tordo, P. ; Benoit, D. ; Fontanille, M. ; Gnanou, Y. *Macromolecules* **2000**, 33, 1141.

possibilité d'être arraché et le nitroxyde est donc stable. Cependant, il est très difficile de prévoir la stabilité d'un radical nitroxyde possédant un hydrogène en  $\alpha$ .

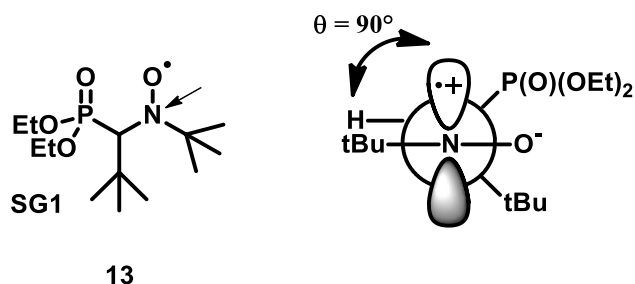


Figure 16 : Stabilité du SG1

### 3. Principales voies de synthèse

Les nitroxydes sont généralement préparés selon 4 méthodes différentes (Schéma 11). La méthode la plus efficace reste l'oxydation directe d'une amine secondaire en nitroxyde (méthode a). Des catalyseurs au vanadium, au molybdène ou au tungstène, combinés avec de l'eau oxygénée, peuvent accomplir cette réaction avec de très bons rendements. De plus, les peroxydes organiques tels que l'acide *meta*-chloroperbenzoïque permettent aussi d'accéder au radical nitroxyde très aisément.

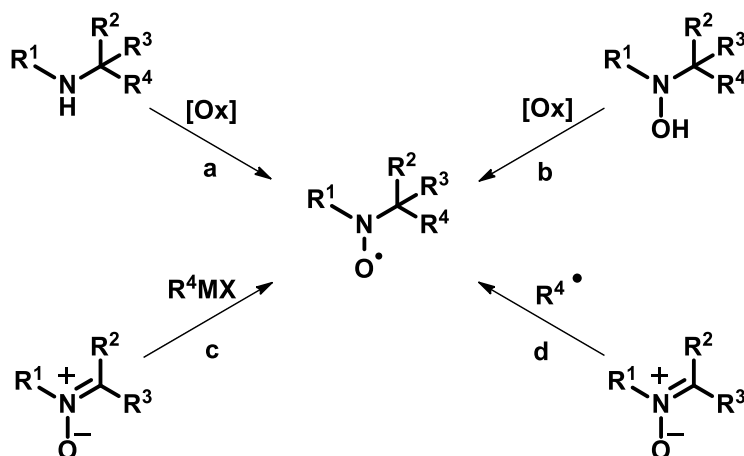


Schéma 11 : Voies de synthèse des nitroxydes

Il est aussi possible d'obtenir un nitroxyde en utilisant une hydroxylamine comme substrat (méthode b). Celle-ci est oxydée en conditions douces par des complexes métalliques de type oxyde d'argent, de manganèse ou de plomb. D'autres méthodes moins développées ont été utilisées pour oxyder ces hydroxylamines comme le peroxyde de nickel, le ferricyanure de potassium ou encore le periodate de sodium. Les nitroxydes peuvent aussi être obtenus par

l'addition d'un organométallique (grignard ou organolithien) sur une nitronne (méthode c) pour donner une hydroxylamine qui pourra être oxydée en nitroxyde.

La dernière méthode reste le piégeage direct de radicaux par une nitronne (méthode d). C'est la méthode utilisée lors de l'étude par résonance paramagnétique électronique de radicaux transitoires par spin-trapping.

## 4. Les nitroxydes $\beta$ -phosphorés cycliques

Comme nous l'avons vu, il est tout à fait possible d'obtenir des nitroxydes présentant un hétéroatome en  $\beta$ . Ceux qui ont particulièrement retenu notre attention sont les nitroxydes cycliques possédant un groupement phosphonate proche du radical (Figure 17). En effet, une grande diversité de ces radicaux a été synthétisée auparavant.<sup>19, 20</sup> De plus, la plupart de ces nitroxydes présentent une certaine stabilité aussi bien purs qu'en solution.

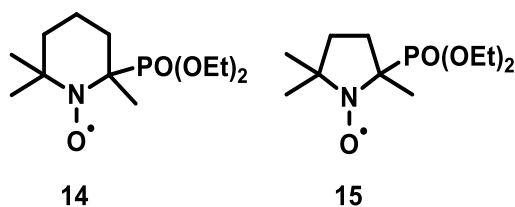


Figure 17

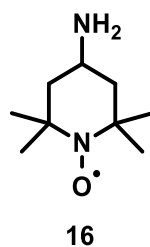
## 5. Effets de solvants sur les constantes de couplage RPE des nitroxydes

Depuis 40 ans, les effets de la première couche de solvatation, ou effet cybotactique, sur la constante de couplage hyperfin à l'azote ( $a_N$ ) des nitroxydes ont été largement étudiés. La première étude complète a été réalisée par Knauer et Napier en 1976 sur le 4-aminoTEMPO

<sup>19</sup> Stipa, P. ; Finet, J. P. ; Le Moigne, F. ; Tordo, P. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4465.

<sup>20</sup> Le Moigne, F. ; Mercier, A. ; Tordo, P. *Tetrahedron Letters.* **1991**, 32, 3844.

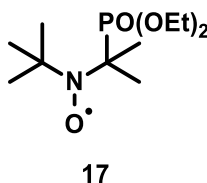
(Figure 18).<sup>21</sup> Depuis ce jour, ce radical stable est considéré comme nitroxyde de référence pour toute étude de l'effet de solvant impliquant des nitroxydes.



**Figure 18 : 4-aminoTEMPO**

Lors de cette étude, ces auteurs ont pu mettre en évidence une augmentation de la constante de couplage hyperfin à l'azote du nitroxyde  $a_N$  en fonction de la polarité du solvant donnée par la constante de Reichardt-Dimroth ( $E_T$ <sup>30</sup>).<sup>22</sup>

A la même période, l'équipe de Il'Yasov a montré une forte décroissance de la constante de couplage hyperfin au phosphore ( $a_P$ ) sur le nitroxyde **17** (Figure 19) en fonction de cette constante de polarité du solvant.<sup>23</sup> En effet, le  $a_P$  passe d'un couplage de 40.80 G pour le pentane à 22.80 G en milieu aqueux.



**Figure 19**

Cependant, ce résultat, unique et très convaincant, n'a pas soulevé un grand intérêt car ce nitroxyde est instable.

Récemment, notre équipe a pu montrer une faible décroissance du  $a_P$  en fonction de la polarité sur le nitroxyde SG1.<sup>24</sup> Bien que ce radical, très proche structurellement de celui d'Il'Yasov, soit stable, cette faible différence de constante de couplage au phosphore ne permet pas d'application intéressante.

<sup>21</sup> B. Knauer, J. J. Napier, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 4395.

<sup>22</sup> Reichardt, C. ; Welton, T. *Solvent and Solvent Effect in Organic Chemistry*, Wiley- VCH, 4th edn.

<sup>23</sup> Mukhtarov, A. S. ; Il'Yavov, A. V. ; Levin, Y. A. ; Gozman, I. P. ; Skorobogatova, M. S. ; Zoroatskaya, E. I. *Theor. Exp. Chem.* **1976**, 12, 656. And *Theor. Eksp. Khim.* **1976**, 12, 831.

<sup>24</sup> Audran, G. ; Brémond, P. ; Marque, S. R. A. ; Obame, G. *ChemPhysChem*, **2012**, 13, 3542.

Nous avons donc essayé d'obtenir de nouveaux nitroxydes stables qui possèderaient une différence de constante de couplage au phosphore très différente en fonction de la polarité du solvant. Nous verrons que ces nouveaux nitroxydes nous ont ouvert une application inattendue : le dosage de traces d'eau par RPE.

## 6. Effets de la protonation sur les constantes de couplage RPE des nitroxydes

La réussite de ce projet repose sur un changement de constante de couplage hyperfin suffisant entre un nitroxyde possédant une liaison peptidique de type amide ou ester et cette même molécule clivée. Pour l'heure, aucun nitroxyde ne possède cette capacité. Cependant, des travaux de Khramtsov et Volodarsky<sup>25</sup> ont montré une différence de constante de couplage hyperfin de plus de 1 Gauss entre un nitroxyde de type imidazole **18** et son équivalent protoné **19**. (Figure 20)

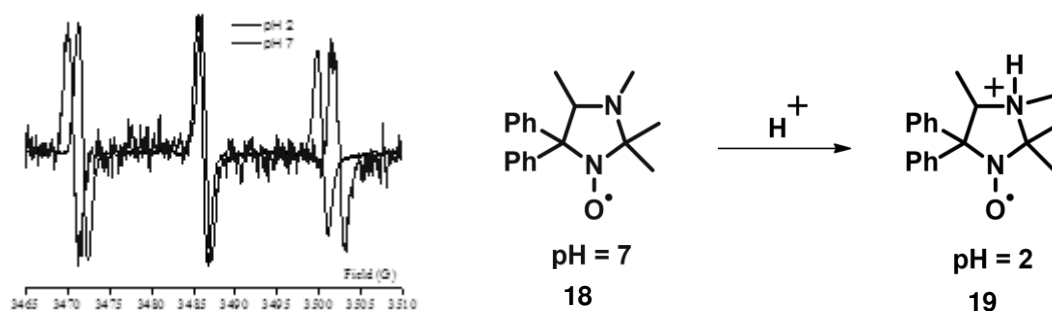


Figure 20 : Effet du pH sur les constantes de couplage hyperfin

Ce changement de couplage vient principalement du fait de l'apparition d'un groupement électroattracteur proche de la fonction porteuse du radical. Ceci va induire une décroissance de la constante de couplage hyperfin à l'azote.

<sup>25</sup> Khramtsov, V. V. ; Volodarsky, L. B., *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 14 ; Berliner, L. J., Ed. ; Plenum Press : New York, **1998**, 109.



### III. Objectifs

L'objectif de ce travail est de développer une sonde radicalaire de type nitroxyde qui présente une différence de constante de couplage hyperfin supérieure à 1 Gauss entre une molécule attachée à un peptide et cette même sonde libre. Si ce critère est validé, il sera possible d'exciter sélectivement par rayonnement micro-onde la sonde relarguée après protéolyse et donc de suivre une activité enzymatique aussi bien par RPE que par IRM rehaussée par l'effet Overhauser.

Malgré les résultats prometteurs de Khramtsov et Volodarsky sur la protonation des nitroxydes, cette solution à notre problématique semble très compliquée. En effet, miser sur un changement de constante de couplage à l'azote est risqué car il n'offre que de petites variations et il y aura donc forcément un chevauchement des raies RPE. Nous avons donc dû choisir un modèle de nitroxyde offrant une plus grande marge de manœuvre.

Un nitroxyde possédant un atome de phosphore en  $\beta$  semble être un choix judicieux pour plusieurs raisons:

-D'après la relation d'Heller McConnel (Equation 10), la constante de couplage hyperfin au phosphore varie fortement selon l'angle dièdre  $\theta$  entre la liaison C-P et l'orbitale  $\pi$  (Figure 21) contenant le radical:

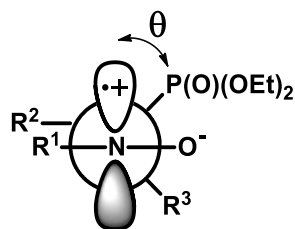
$$a_{\beta} = B_0 + B_1 \cdot \rho_{N^{\pi}} \cdot \cos^2 \theta \quad (10)$$

$B_0$  : constante de transfert de densité de spin par polarisation, en général négligeable,

$B_1$  : constante de transfert de densité de spin par hyperconjugaison,

$\rho_{N^{\pi}}$ : densité de spin sur l'azote,

$\theta$  : angle dièdre entre la SOMO et la liaison C-P.



**Figure 21 : Définition de l'angle dièdre  $\theta$ : angle entre le plan formé par les atomes NCP et le plan perpendiculaire au plan formé par les atomes NCO**

Sachant que  $B_0$  est négligeable et que  $B_1 \cdot \rho_{N\pi}$  est estimé à 60,<sup>26</sup> il est possible de prévoir par le calcul une valeur de cette constante de couplage.

-Ces nitroxydes  $\beta$ -phosphorés offrent une grande stabilité dans les conditions normales de pression et de température.

Cependant, nous avons le choix de plusieurs types de structures. Nous pourrions nous tourner vers les nitroxydes linéaires de type SG1 mais il sera très difficile de prévoir leur stabilité (hydrogène en  $\alpha$ ) et le changement d'angle dièdre jouant sur la constante de couplage hyperfin au phosphore. De plus, la largeur de raie de ces nitroxydes est souvent élevée ce qui pourra engendrer un recouvrement des raies et un effet Overhauser plus faible. Nous nous sommes donc tournés vers un nitroxyde cyclique.

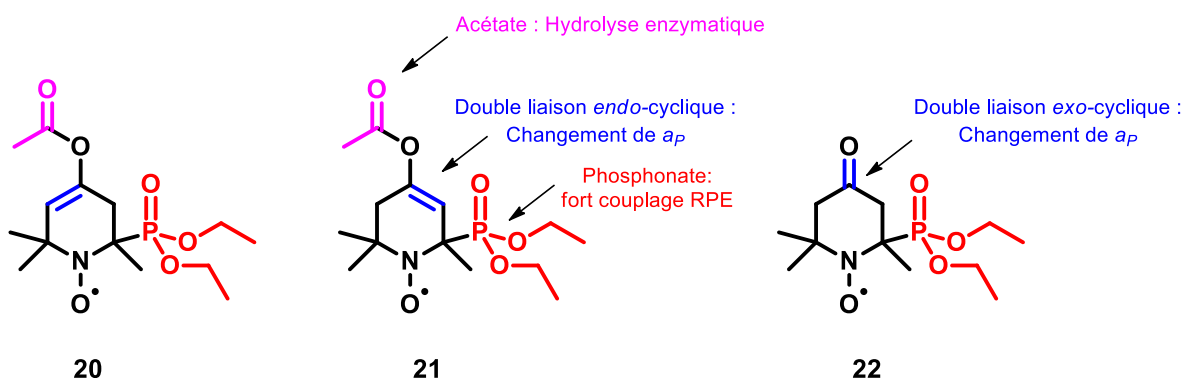
Un dérivé phosphoré du TEMPO est donc notre cible. Cependant, nous savons que le changement de constante de couplage au phosphore passe par un changement d'angle dièdre entre la liaison C-P et l'orbitale  $\pi$  contenant le radical.

Or, nous savons qu'un cycle à 6 chaînons va pouvoir changer de conformation s'il possède une double liaison *intra* ou *exo*-cyclique. Ceci nous amène à penser que la présence d'un carbone supplémentaire hybridé  $sp^2$  dans le cycle impactera le  $a_P$  du nitroxyde en changeant la conformation du cycle. Nous avons imaginé la présence d'un ester d'énol présentant une double liaison *intra*-cyclique qui disparaîtra après hydrolyse enzymatique de l'ester amenant un changement de conformation et donc de  $a_P$ . Le nitroxyde souhaité devra donc posséder une fonction ester d'énol.

Le dernier problème auquel nous devons faire face est que le groupement qui viendra piéger l'énolate formé devra être hydrolysable facilement par une protéase, sans quoi le concept ne pourra être validé. Au laboratoire, notre équipe a montré que le groupement acétate peut être

<sup>26</sup> Audran, G., Bosco, L., Brémond, P. Butscher, T., Marque, S. R. A., *App. Magn. Res.*, **2015**, 46, 3.

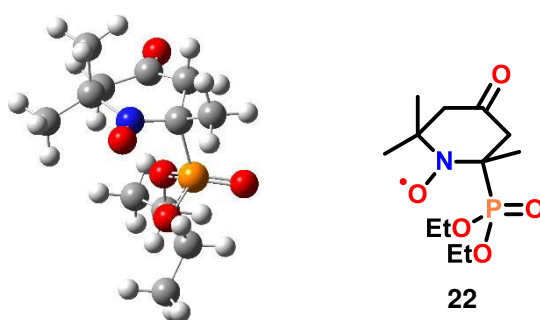
facilement hydrolysé enzymatiquement<sup>27</sup>. Ce groupement apparait donc, autant sur le plan biologique que synthétique, comme une solution modèle pour l'hydrolyse enzymatique de cette molécule.



**Figure 22**

Comme le montre la figure 22, la formation de l'acétate à partir de la cétone **22** peut aboutir à la formation de deux régio-isomères : **20** et **21**. Nous ne pouvons que difficilement prévoir laquelle de ces deux molécules offrira la plus grande différence de constante de couplage RPE par rapport à **22**. Or, nous savons que la constante de couplage au phosphore dépend directement de l'angle dièdre  $\theta$ .

Pour obtenir ces valeurs d'angle dièdre, nous avons effectué une étude de modélisation moléculaire (Base : UB3LYP/6-311++g(d,p)).



**Figure 23**

<sup>27</sup> Audran, G.; Acherar, S. ; Monti, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 5, 92.

Dans un premier temps, nous avons obtenu *in silico* la conformation la plus stable de la cétone **22** (Figure 23). Le premier constat que nous pouvons faire est que le groupement phosphonate se retrouve en position axiale. En effet, au regard de la contrainte stérique apportée par ce groupement volumineux, nous aurions pu aisément le placer en position équatoriale.

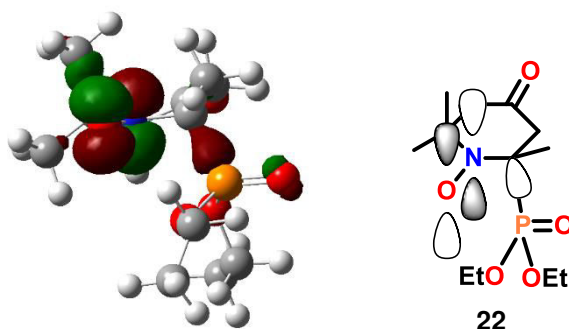


Figure 24

Pour mieux comprendre cette position non conventionnelle, nous avons obtenu la représentation de l'orbitale SOMO de la liaison N–O (Figure 24). Celle-ci montre une interaction stabilisante SOMO  $\rightarrow \sigma^*_{C-P}$  qui explique la position axiale du groupement phosphoré.

L'angle dièdre  $\theta$  mesuré sur cette molécule est de  $7.4^\circ$ , soit une constante de couplage au phosphore calculée par la relation d'Heller McConnell d'environ 59.0 G.

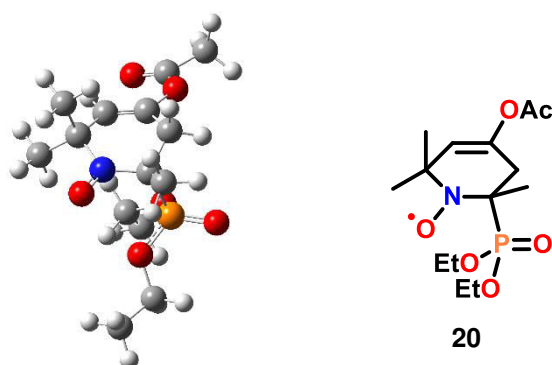
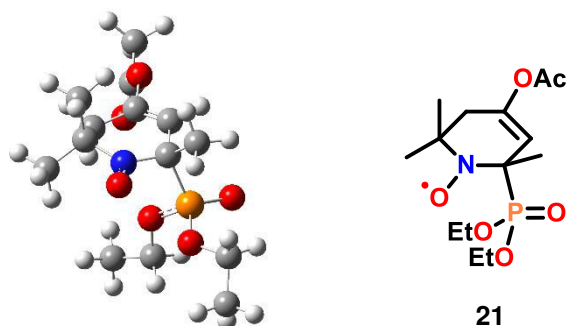


Figure 25

Par la suite, nous avons modélisé la conformation préférentielle de l'ester d'énol **20** possédant une double liaison du côté du groupe *gem*-diméthyle (Figure 25). Nous pouvons

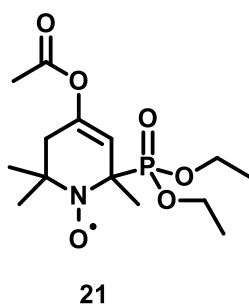
observer la même stabilisation du phosphore en position axiale. Cette fois-ci, l'angle dièdre est de  $4.9^\circ$ , ce qui conduit à un couplage de 59.6 G. Cette différence de constante de couplage de 0.6 G avec la cétone **22** risque d'être insuffisante pour pouvoir les différencier.



**Figure 26**

Enfin, les dernières modélisations concernent l'acétate **21** présentant une double liaison du côté du phosphore (Figure 26). L'effet attendu sur l'angle dièdre  $\theta$  devrait être plus important puisque le carbone hybridé  $sp^2$  se retrouve directement en position  $\alpha$  par rapport à la liaison C-P. En effet, cet angle est de  $14.5^\circ$ , ce qui correspond à une constante de couplage au phosphore de 56.2 G, soit une différence avec la cétone **22** de 2.8 G. Ces deux molécules, en mélange, devraient présenter un spectre RPE dont certaines raies ne se recouvriraient pas.

Ces résultats théoriques nous confortent dans l'idée que cette molécule cible (Figure 27) possède les prérequis nécessaires à notre objectif.



**Figure 27 : Molécule cible**

# IV. Synthèse du nitroxyde 21

## 1. Analyse rétrosynthétique

La molécule cible étant définie, voici l'analyse rétrosynthétique proposée (Schéma 12):

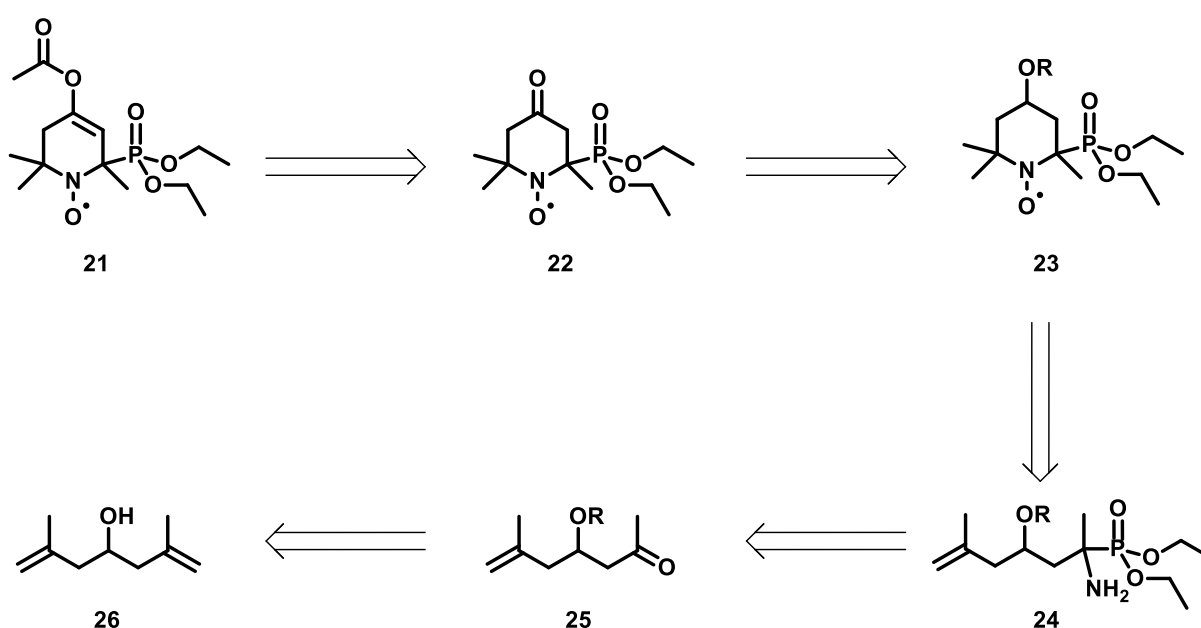


Schéma 12

Le nitroxyde **21** pourrait être obtenu par condensation de l'anhydride acétique sur l'énolate de **22**. Cette cétone serait, quant à elle, obtenue après déprotection et oxydation de l'alcool **23**. La pipéridine **23** pourrait être obtenue par cyclisation de l'aminophosphonate **24** provenant d'une réaction de Kabachnik-Fields sur la cétone **25**. Cette cétone serait issue du diène **26** qui subirait une protection puis une coupure oxydante sélective d'une seule de ses deux doubles liaisons.

## 2. Détails de la synthèse

### a. Synthèse de l'alcool 26

L'alcool **26**, utilisé dans la synthèse du nitroxyde souhaité, est un alcool symétrique décrit par Breit.<sup>28</sup> Il est issu d'une double condensation du Grignard **27** sur du formate d'éthyle avec un rendement de 52%.

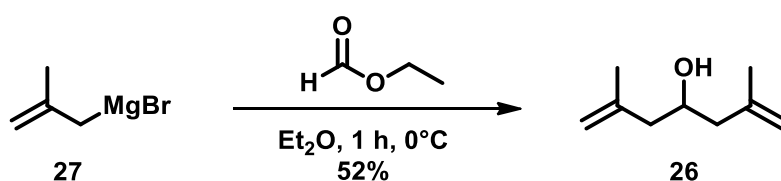


Schéma 13

### b. Protection de l'alcool secondaire 26

L'alcool secondaire **26** a été protégé, selon la méthodologie décrite par Corey,<sup>29</sup> sous forme d'éther silylé **27** par l'action du chlorure de tertibutyldiméthylsilyle en présence d'imidazole comme base, dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF), avec un excellent rendement (99%). Nous nous sommes tournés vers ce type de protection car elle offre une large gamme de conditions de déprotection avec de très bons rendements.

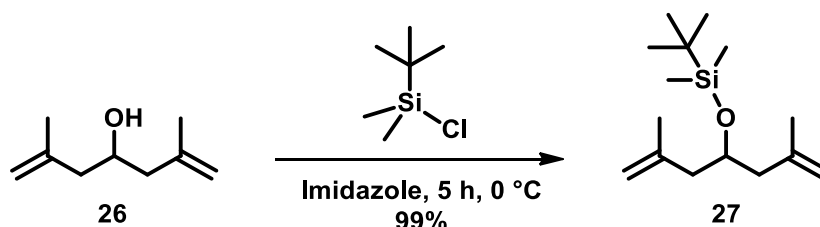


Schéma 14

<sup>28</sup> Breit, B. ; Breuninger, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10244.

<sup>29</sup> Corey, E. J. ; Venkasterwarlu, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190.

### c. Formation de la cétone 29

Un test de réaction de Lemieux-Johnson, permettant de passer directement de l'alcène 27 à la cétone 29, a été effectué (Conditions : OsO<sub>4</sub>, NaIO<sub>4</sub>). Il a permis d'obtenir la cétone à partir de l'alcène en une seule étape mais avec de faibles rendements probablement en raison de la plus grande réactivité de la cétone 29 envers le tétr oxyde d'osmium par rapport au diène 27.

Cette réaction a donc été décomposée en deux étapes. L'alcène 27 a subi une réaction de dihydroxylation d'Upjohn.<sup>30</sup> L'ajout d'une quantité catalytique de tétr oxyde d'osmium en présence de 2 équivalents d'oxyde de N- méthylmorpholine (NMO) dans un mélange acétone/eau (3:1) à 0 °C conduit à la formation du diol 28 avec un rendement de 86% après 4 heures. Le taux de conversion de cette réaction reste faible car celle-ci doit être rapidement stoppée pour éviter la formation du tétraol non désiré pour cette synthèse.

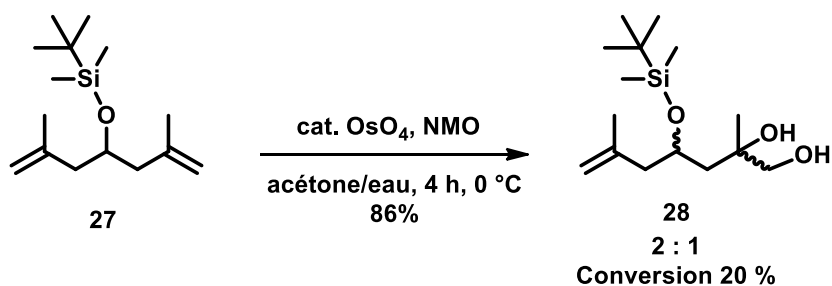


Schéma 15

Le mécanisme de dihydroxylation d'Upjohn débute par une addition de OsO<sub>4</sub> sur l'alcène. L'attaque de l'eau permet de libérer le diol et l'osmium au degré d'oxydation VI. La NMO réoxyde l'osmium VI en osmium VIII afin de rendre le cycle catalytique.

<sup>30</sup> Van Rheenen, V. ; Kelly, R. C. ; Cha, P. Y. *Tetrahedron Letters*. **1976**, 23, 1973.



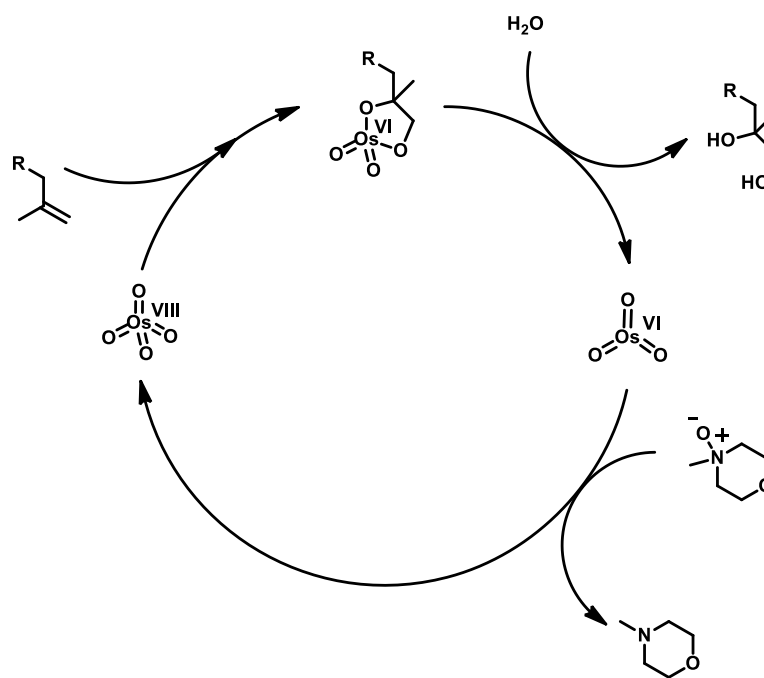


Schéma 16 : Mécanisme de la cis-dihydroxylation

La coupure oxydante des deux alcools vicinaux du diol **28** s'effectue dans un mélange de tétrahydrofurane/eau à 0 °C pendant 3 heures par l'action du periodate de sodium. Cette réaction fournit la cétone **29** après colonne chromatographique avec un rendement de 96%.

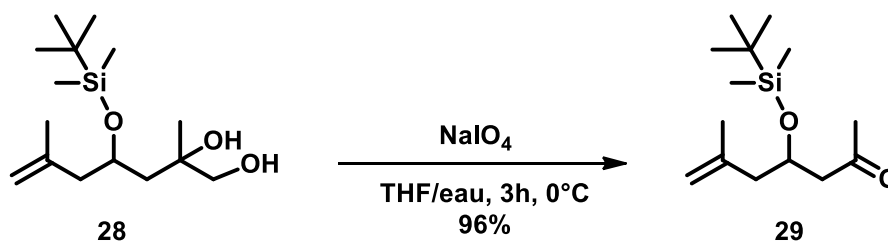
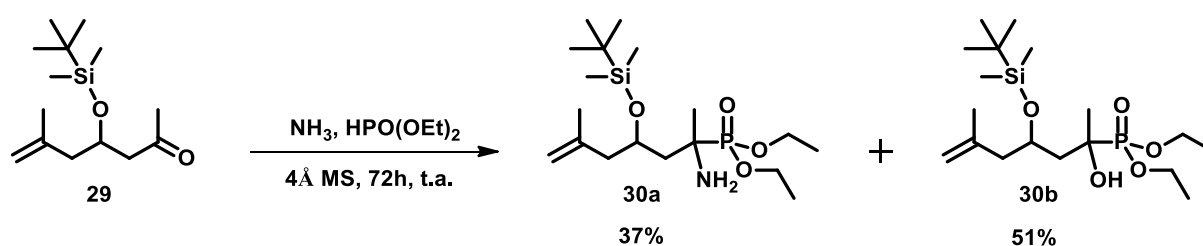


Schéma 17

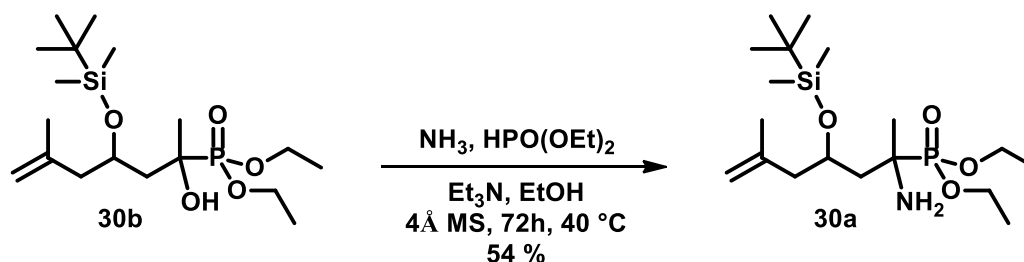
## d. Aminophosphorylation de la cétone 29

L'aminophosphorylation de la cétone **29** est effectuée, sans solvant, dans les conditions de Kabachnik-Fields.<sup>31,32</sup> La cétone est diluée dans le diéthylphosphite. Après ajout de tamis moléculaire, la réaction est agitée pendant 3 jours à température ambiante sous flux continu d'ammoniac gazeux. Nous obtenons le produit désiré pur **30a** sous la forme de deux diastéréoisomères présentant un ratio de 2:1 avec un rendement de 37 %. L'hydroxyphosphonate **30b**, issu de l'addition directe du diéthylphosphite sur la cétone **29**, est obtenu avec un rendement de 51 %.



Dans le but de valoriser le produit majoritaire de type hydroxyphosphonate **30b** de la réaction précédente, nous avons suivi la méthode décrite par Gancarz utilisant la réversibilité de la formation de l'hydroxyphosphonate dans la réaction de Kabachnik-Fields.<sup>33</sup>

En effet, nous plaçons l'hydroxyphosphonate dans un mélange éthanol/triéthylamine/diéthylphosphite avec du tamis moléculaire et nous chauffons à 40 °C sous flux continu d'ammoniac pendant 3 jours. Cette réaction nous permet d'obtenir l'aminophosphonate souhaité avec un rendement de 54%.



<sup>31</sup> Kabachnik, M. I. ; Medved, T. Y. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. **1952**, 83, 689.

<sup>32</sup> Fields, E. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1528.

<sup>33</sup> Gancarz, R. ; Gancarz, I. ; Walkowiak, U. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, **1995**, 104, 45

## e. Etape clé : Cyclisation et oxydation

Le cycle pipéridinique est obtenu par aminomercuration intramoléculaire de l'aminophosphonate **30a**.

L'aminophosphonate **30a** est dilué dans un mélange tétrahydrofurane/eau puis une suspension d'acétate de mercure est ajoutée. Par la suite, la solution est mise en présence de borohydrure de sodium à 0 °C. Après hydrolyse, nous obtenons le cycle pipéridine.

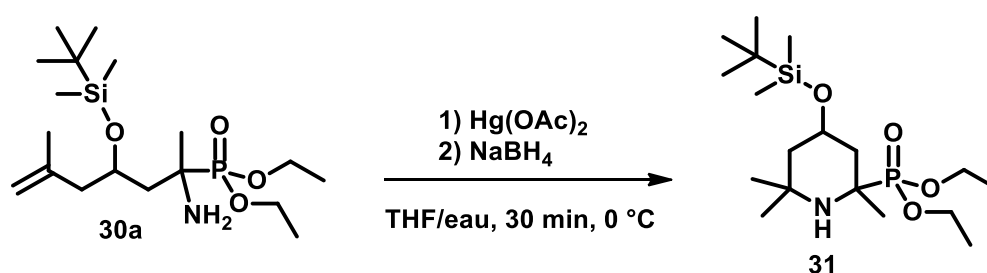


Schéma 20

Cependant, cette pipéridine est hautement instable. Le cycle est donc immédiatement oxydé en nitroxyde avec de l'acide métachloroperbenzoïque (*m*-CPBA) dans du dichlorométhane à 0 °C avec un rendement de 73% en deux étapes. Les deux diastéréoisomères **32t** et **32c** ont pu être séparés à ce stade.

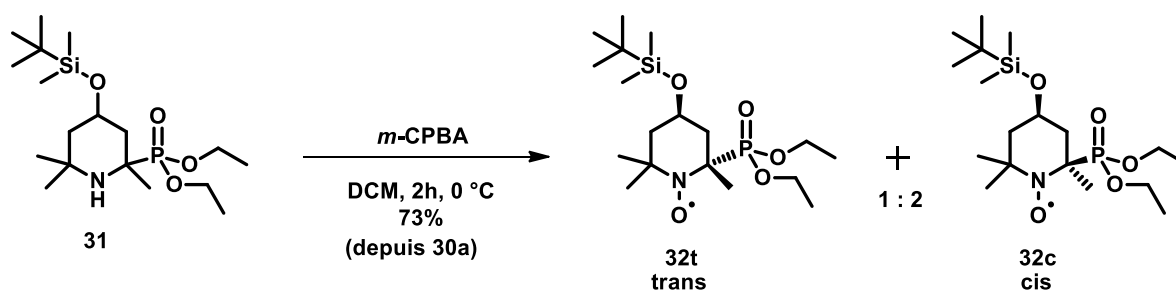


Schéma 21

Le diastéréoisomère majoritaire **32c** étant un solide, il a pu être recristallisé dans l'éther diéthylique. L'analyse, par diffraction des rayons X (Figure 28), nous confirme la cyclisation *6-exo-tet* prédite par les règles de Baldwin ainsi que la formation du nitroxyde.<sup>34</sup> Nous pouvons voir que l'éther silylé et le groupement phosphonate se retrouvent tous deux au-dessus du plan moyen du cycle. Ils sont donc de configuration relative *cis*.

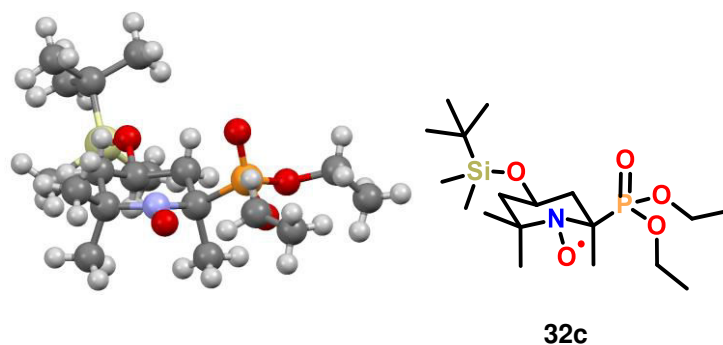


Figure 28 : Diffraction des rayons X de **32c**

## f. Déprotection de **32**

L'alcool secondaire **33** a été obtenu par l'action du fluorure de tétrabutylammonium sur **32** à 0 °C dans du tétrahydrofurane. Ces conditions classiques de déprotection nous ont permis d'obtenir l'alcool secondaire avec un rendement de 91%.

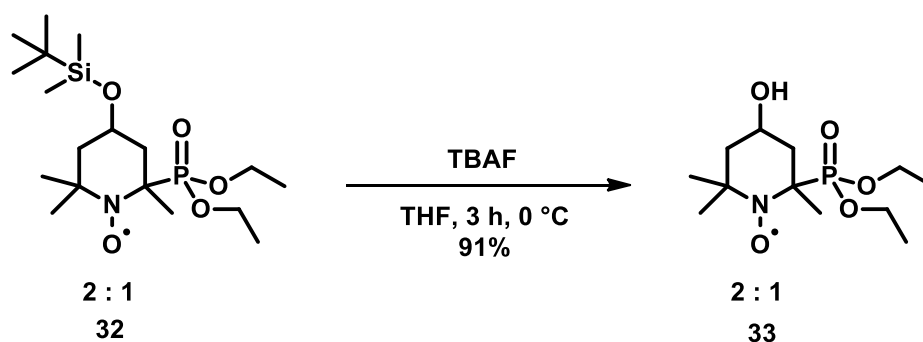


Schéma 22

<sup>34</sup> Baldwin, J. E. *J. C. S. Chem. Comm.* **1976**, 18, 734.

## g. Oxydation de l'alcool secondaire 33

L'oxydation de l'alcool secondaire **33** a été réalisée dans les conditions décrites par Ley.<sup>35</sup> Le perruthénate de tétrapropylammonium (TPAP) est utilisé comme oxydant. Sa combinaison avec la NMO permet de l'utiliser en quantité catalytique à température ambiante. Le TPAP est constitué d'un anion perruthénate  $[\text{RuO}_4]^-$  dont l'atome de ruthénium est dans un état octavalent. L'utilisation du cation tétrapropylammonium va augmenter sa solubilité dans les solvants organiques, tels que le dichlorométhane ou l'acétonitrile.

La cétone **22** est obtenue après colonne chromatographique avec un rendement de 88%.

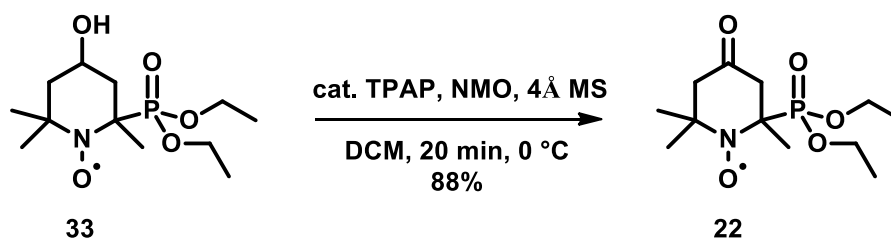


Schéma 23

## h. Formation de l'ester d'énol

L'énolate de la cétone **22** est formé par l'action de l'hexaméthylidisilamide de lithium à -80 °C. L'énolate est ensuite piégé par de l'anhydride acétique pour conduire à la formation de l'ester **20** ou **21** avec un rendement de 88%.

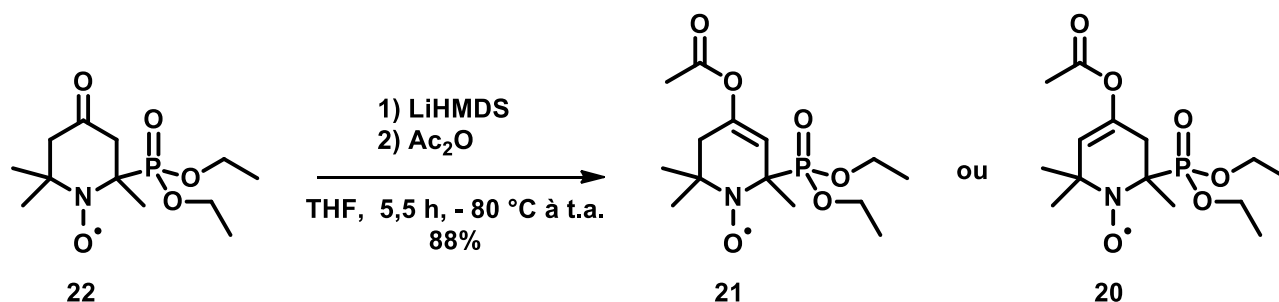


Schéma 24

<sup>35</sup> Griffith, W. P. ; Ley, S. V. *Aldrichim. Acta.* **1990**, *23*, 13.

## i. Etude par RMN bidimensionnelle

Dans le but de valider les étapes de déprotection, d'oxydation et de formation de l'ester d'énol ainsi que la régiochimie de la liaison intracyclique, nous avons réalisé une réaction de Fenton sur le composé **21**. L'alcoxyamine formée peut ainsi être analysée par Résonance Magnétique Nucléaire. Les nitroxydes étant paramagnétiques, cette analyse n'avait pas pu être menée jusqu'alors.

L'ester d'énol **21** est dilué dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) puis mis en présence de sulfate de fer (II) hexahydraté et d'eau oxygénée à température ambiante. Le produit souhaité est obtenu après colonne chromatographique avec un rendement de 82%.

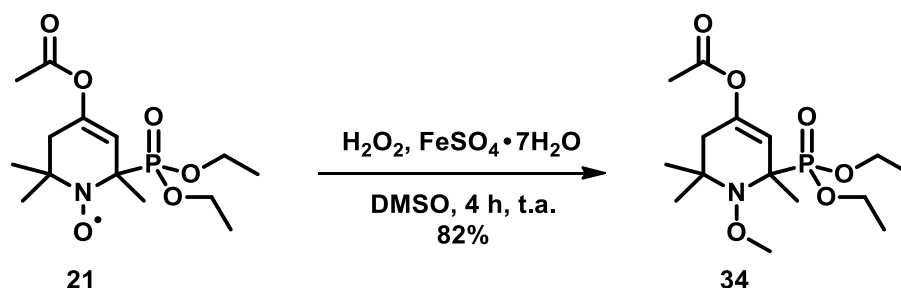
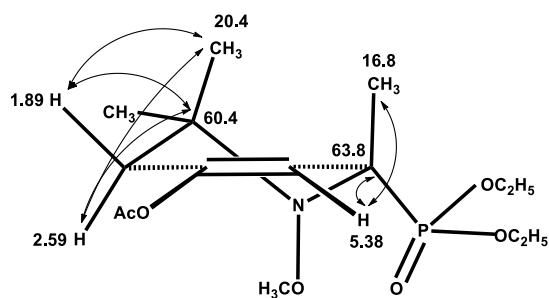


Schéma 25

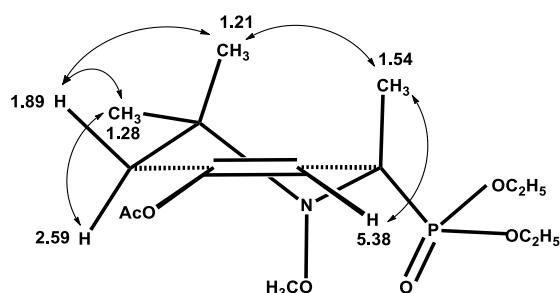
La présence d'un proton vinylique à 5,38 ppm et de deux carbones à 146,0 et 114,8 ppm permet de définir sans équivoque la formation de l'ester d'énol **21** présentant une double liaison endocyclique. Cependant, elle ne permet pas de connaître la position de la double liaison avec certitude. Nous avons donc approfondi cette étude en pratiquant une série de séquences RMN bidimensionnelles de type HMBC (Figure 29) et NOESY (Figure 30).



**Figure 29 : HMBC de 34**

Les taches observées lors de la séquence HMBC mettent en évidence une corrélation entre le proton vinylique ( $\delta = 5.38$  ppm), le carbone portant le phosphore ( $\delta = 63.8$  ppm) et le méthyle sur ce même carbone ( $\delta = 16.8$  ppm). De l'autre côté de la molécule, chaque proton du  $\text{CH}_2$  ( $\delta = 1.89$  et  $2.59$  ppm) possède des taches de corrélation avec les carbones à  $60.4$  ppm et  $20.4$  ppm. D'après cette analyse, la double liaison serait donc du côté du phosphore.

Pour confirmer cette position, nous avons effectué une analyse de type NOESY sur cette molécule.



**Figure 30 : NOESY de 34**

Les taches de corrélation observées entre le proton vinylique ( $\delta = 5.38$  ppm) et le méthyle en  $\alpha$  du phosphore ( $\delta = 1.54$  ppm) confirment la position de la double liaison du côté du phosphore. De plus, il existe des taches de corrélation entre les protons du  $\text{CH}_2$  ( $\delta = 1.89$  et  $2.59$  ppm) et les protons des deux méthyles adjacents.

Ces deux expériences distinctes nous permettent de définir sans équivoque la position de la double liaison du côté du phosphore. Cette position pourrait être expliquée par une chélation du lithium sur l'oxygène du phosphonate conduisant préférentiellement à l'arrachement de ce proton. De plus, il pourrait exister une stabilisation de l'anion formé par hyperconjugaison avec la liaison carbone-phosphore.

# V. Etudes Physico-Chimiques

## 1. Généralités sur l'effet cybotactique

### a. Effet cybotactique sur la constante de couplage hyperfin à l'azote $a_N$

D'une manière générale, en résonance paramagnétique électronique, le couplage hyperfin en  $\alpha$  est décrit par la relation de McConnell, ci-dessous :

$$a_\alpha = Q \cdot \rho \quad (11)$$

Cette équation met en évidence la proportionnalité entre la constante de couplage  $a_\alpha$  et la densité de spin ( $\rho$ ) de l'atome concerné.

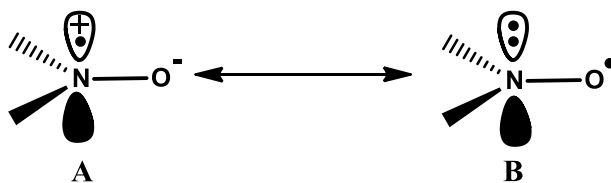


Schéma 26 : Formes mésomères

Dans le cas d'un nitroxyde, il s'agit de l'azote. En effet, plus la densité de spin sera élevée sur l'atome d'azote, plus la constante de couplage sera élevée. Réciproquement, une densité de spin élevée sur l'atome d'oxygène fera baisser cette constante. Le nitroxyde aura donc deux formes mésomères avec l'électron célibataire totalement sur l'azote ou totalement sur l'oxygène, dont les proportions dépendront des conditions de solvatation ou des substituants autour de la fonction nitroxyde. (Schéma 26)



Deux cas de figure sont alors présents :

- Si le nitroxyde est solubilisé dans un solvant apolaire, la constante de couplage à l'azote est faible. La densité de spin sera donc localisée préférentiellement sur l'oxygène (forme mésomère B).
- *A contrario*, dans un solvant polaire protique tel que l'eau, la constante de couplage est forte, ce qui montre une forte densité de spin sur l'azote (forme mésomère A).

De plus, la présence d'un groupement électroattracteur va favoriser la forme mésomère B et aura un  $a_N$  plus faible. C'est le cas de nos nitroxydes qui présentent tous un groupement phosphonate adjacent.

La valeur du  $a_N$  dépend de l'hybridation de l'atome d'azote. Nous savons que l'électron célibataire est contenu dans une orbitale anti-liante  $\pi^*$ .



**Figure 31 : Pyramidalisation de l'azote**

Cette SOMO est décrite par une orbitale atomique de type  $p$  et est hybridée  $sp^2$  (Forme C). Ceci impliquera une diminution du  $a_N$ . Des atomes électroattracteurs présents sur le nitroxyde vont changer l'hybridation de l'azote en augmentant sa pyramidalisation (Forme D). Le caractère  $s$  de l'orbitale va donc augmenter et, de ce fait, nous observerons une constante de couplage à l'azote plus importante.

## **b. Effet cybotactique sur la constante de couplage hyperfin au phosphore $a_P$**

Comme vu précédemment (voir page 28), la relation d'Heller-McConnell (Equation 10) montre que la valeur de  $a_P$  est directement dépendante de l'angle dièdre  $\theta$  entre la SOMO et la liaison C-P.

(10)

$$a_{\beta} = B_0 + B_1 \cdot \rho^{\pi} \cdot \cos^2 \theta$$

Plus cet angle est petit et plus la constante de couplage au phosphore sera élevée et inversement. Cette constante est aussi dépendante de la densité de spin  $\rho$  sur l'azote et, par conséquent, de sa constante de couplage  $a_N$ .

## 2. Résultats et discussion

Nous avons effectué des études de solvants sur une large gamme de nitroxydes. Nous présenterons ici nos résultats les plus intéressants sur les nitroxydes de type pipéridine.

Les deux diastéréoisomères du composé **33**, présentant un groupement hydroxyle et diéthoxyphosphoryle en configuration relative *cis* ou *trans*, ont été préparé séparément à partir de **32c** et **32t** et étudiés en utilisant les deux nitroxydes connus comme référence (4-aminoTEMPO et **17**) (Figure 32).

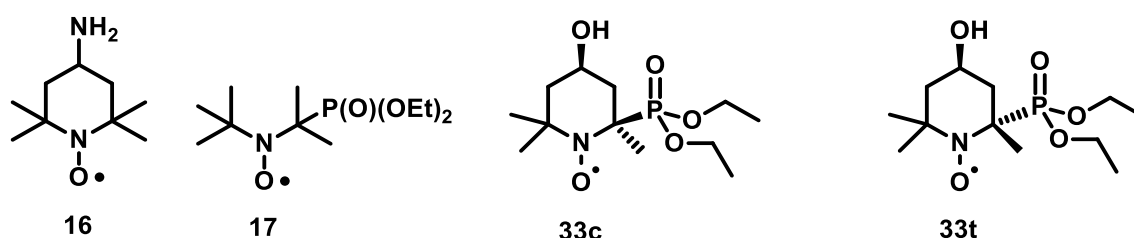
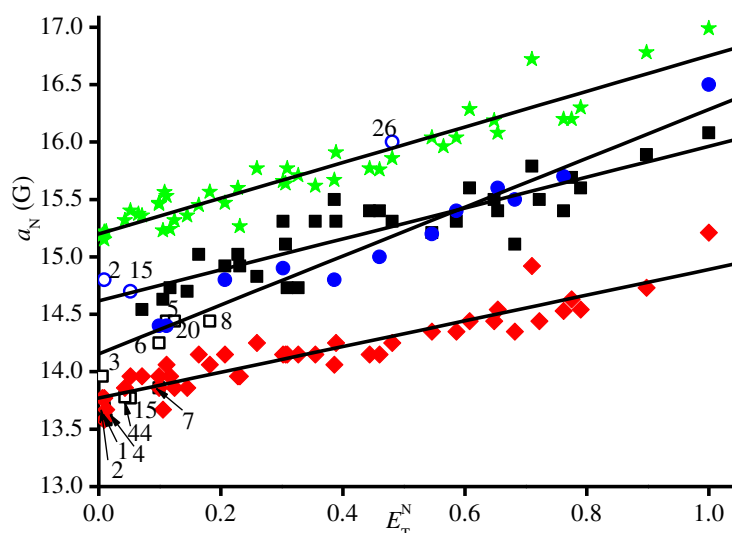


Figure 32 : Nitroxydes étudiés

Une série de mesures des constantes de couplage à l'azote et au phosphore a été effectuée par RPE dans une gamme représentative de 45 solvants.

### a. Effet cybotactique sur le $a_N$

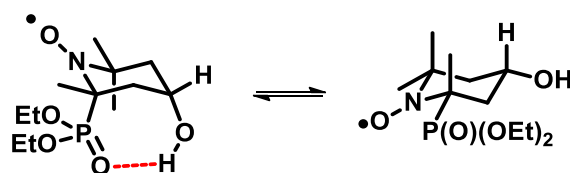
Comme expliqué précédemment, les valeurs de  $a_N$  en fonction de la constante normalisée de Reichardt-Dimroth ( $E_T^N$ ) augmentent avec la polarité du solvant pour les molécules **16**, **17** et **33t** (Figure 33). Ceci s'explique par la préférence pour la forme mésomère A (Schéma 26) dans les solvants polaires.



**Figure 33 : Courbe  $a_N$  en fonction de  $E_T^N$  pour 16 (★), 17 (●), 33c (■), et 33t (◆). Les symboles vides sont hors corrélation**

Nous pouvons remarquer que l'ordonnée à l'origine ( $E_T^N = 0$ ) est différente pour chaque nitroxyde. Ceci est dû à la différence de polarité entre ces nitroxydes ( $\sigma_{I,16} = -0.03$ ,  $\sigma_{I,17} = 0.27$ ,  $\sigma_{I,33} = 0.32$ ,  $\sigma_I$ : constante de polarité de Hammett).<sup>36</sup> La plus grande pente observée pour **17** par rapport à **16** montre une meilleure accessibilité du solvant vers le nitroxyde. La pente plus faible pour **33t** est principalement due à sa forte polarité.

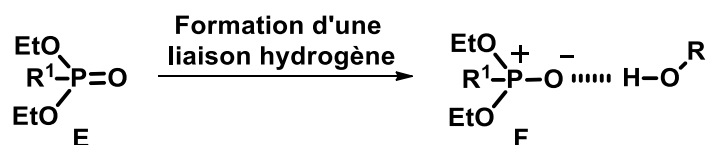
Une rupture de pente est observée pour **33c** pour une valeur de  $E_T^N < 0,2$ . Cette perte ne peut être expliquée que par une forte augmentation de sa polarité. En effet, **33c** existe sous la forme de deux conformères. Un premier conformère présentant les groupements hydroxyles et diéthylphosphoryles en position axiale et l'autre équatoriale (Schéma 27).



**Schéma 27 : Equilibre conformationnel de 33c**

Comme nous pouvons le voir sur le schéma 27, dans un solvant apolaire ( $E_T^N < 0.2$ ), une liaison hydrogène intramoléculaire est possible par la formation d'un cycle à 7 chaînons entre l'hydrogène de l'alcool et l'oxygène du phosphonate. La formation de cette liaison va changer la distribution de charge partielle au sein de la liaison P-O (Schéma 28).

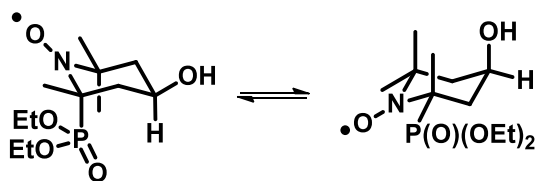
<sup>36</sup> Bagryanskaya, E. G. ; Marque, S. R. A. ; Tsentlovich, Y. P. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 4996.



**Schéma 28**

Ce changement de charge partielle va augmenter le caractère électroattracteur du phosphore ce qui favorisera la forme mésomère B (Schéma 26) du nitroxyde et par conséquent diminuera son  $a_N$ .

Pour **33t**, les groupements hydroxyle et diéthoxyphosphoryle n'étant pas en position 1,3-diaxiale, aucune formation de liaison hydrogène n'est possible (Schéma 29) ce qui explique le comportement classique de son  $a_N$ .



**Schéma 29 : Equilibre conformationnel de 33t**

## b. Effet cybotactique sur la constante de couplage à l'atome de phosphore

Comme vu précédemment, les valeurs de la constante de couplage hyperfin en position  $\beta$  sont décrites par la relation d'Heller-McConnel (Equation 10).

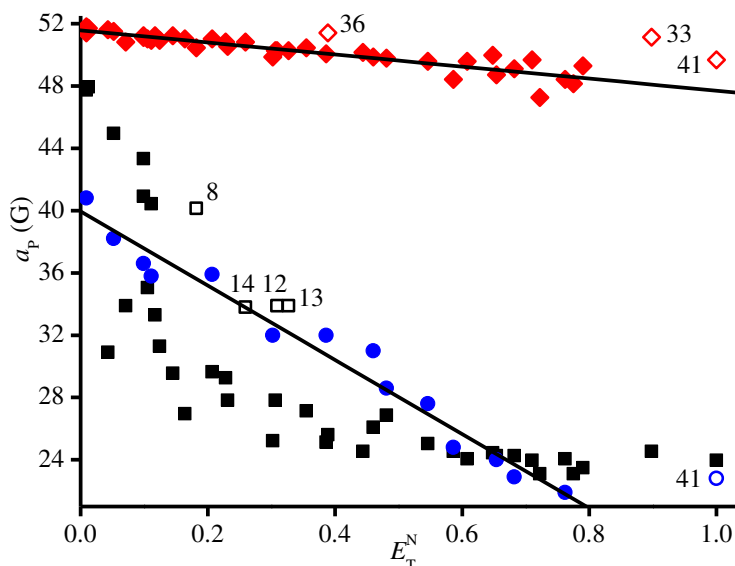


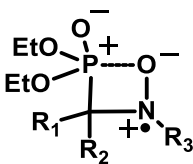
Figure 34 : Courbe  $a_P$  en fonction de  $E_T^N$  pour 17 (●), 33c (■), et 33t (◆). Les symboles vides sont hors corrélation.

Nous savons que la constante de couplage à l'azote augmente avec l'accroissement de polarité. Par conséquent, la densité de spin sur l'azote  $\rho^\pi$  augmente elle aussi. De ce fait, nous pourrions donc prévoir, d'après cette relation, une augmentation de la constante de couplage hyperfin au phosphore.

Cependant, nous observons une diminution du  $a_P$  avec l'augmentation de la polarité du solvant (Figure 34). Cet effet est plus marqué pour 17 que pour 33t. En effet, le  $a_P$  de 17 passe de 40.8 G dans le *n*-hexane à 21.8 G dans le méthanol alors que pour 33t, il passe de 51.8 G dans le *n*-pentane à 47.3 G dans le NMF (*N*-Me-formamide). Cette chute du  $a_P$ , concerté avec une hausse du  $a_N$ , implique une importante valeur de l'angle  $\theta$  pour 17 et une faible valeur pour 33t.

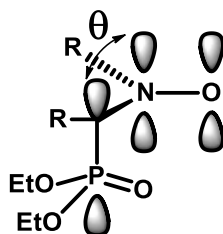
En fait, l'augmentation de la polarité du solvant va favoriser les formes A (Schéma 26) et D (Figure 31). L'augmentation de la valeur de l'angle  $\theta$  signifie que ces deux groupements

se rapprochent de plus en plus afin de minimiser les interactions dipôle-dipôle comme indiqué sur la figure 35.



**Figure 35 : structure de type oxaphosphétane**

La valeur élevée du  $a_P$  pour la molécule **33t** indique une faible valeur de  $\theta$  d'après Heller-McConnel. Cet angle faible implique un fort effet d'hyperconjugaison entre la SOMO et la liaison C-P favorisant une position axiale du groupement phosphoré. (Figure 36)



**Figure 36**

La molécule **33c** montre aussi une baisse importante de  $a_P$ . En effet, nous pouvons observer une variation d'environ 25 G entre les solvants les moins polaires et les solvants les plus polaires suivant une variation de type exponentielle décroissante. (Figure 34)

Nous avons pu proposer que le changement de  $a_N$  venait d'un équilibre conformationnel dû à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Dans les solvants apolaires, la position axiale du groupement phosphoré maximise les interactions entre la SOMO et la liaison C-P, ce qui explique le fort couplage observé. La rupture de la liaison hydrogène dans les solvants polaires va ramener le groupement phosphoré en position équatoriale. De ce fait, l'angle dièdre  $\theta$  va augmenter, ce qui va minimiser les recouvrements orbitaux et, par conséquent, va entraîner une baisse significative de la constante de couplage au phosphore (Schéma 30).

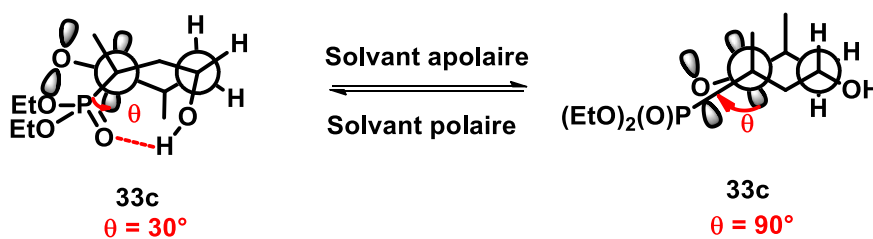


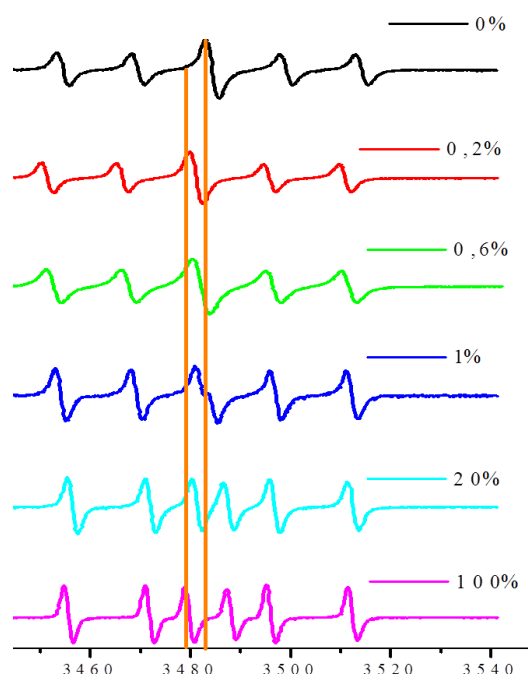
Schéma 30

### 3. Application au dosage de l'eau en milieu organique

Cet effet conformationnel mis en évidence pour le nitroxyde **33c**, les changements conséquents de constantes de couplage hyperfin au phosphore de 25 G selon la polarité du solvant nous ont permis d'envisager un dosage de l'eau dans un solvant organique par RPE.

Cependant, plusieurs conditions doivent être remplies pour pouvoir effectuer un dosage :

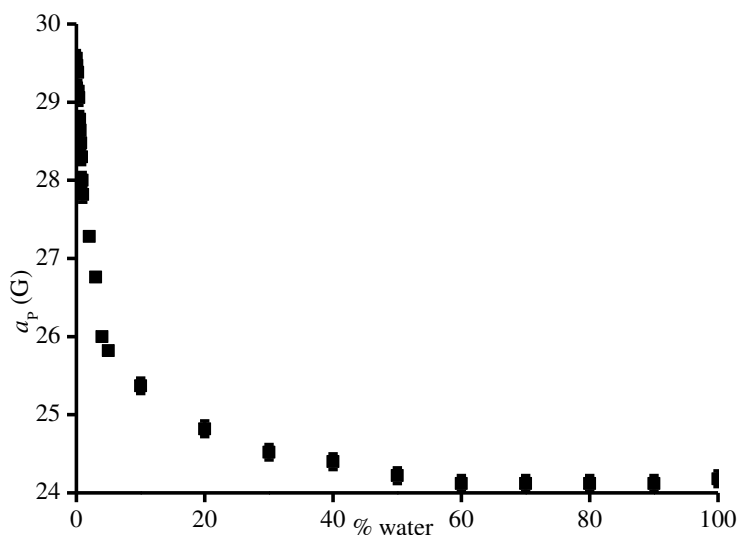
- Le solvant doit être miscible à l'eau.
- La différence entre les deux constantes de couplage hyperfin au phosphore dans les deux solvants doit être suffisante pour gagner en précision.



**Figure 37 : Evolution des spectres RPE en fonction du pourcentage en eau dans le THF (les droites représentent la différence de constante de couplage hyperfin observée entre les deux solvants purs)**

Nous avons réalisé une étude RPE en faisant varier le pourcentage d'eau dans le THF. En fonction de la concentration en eau, nous avons pu mesurer différentes valeurs de  $a_p$ .

Comme nous pouvons le voir sur la figure 37, une différence de constante de couplage hyperfin de 5 G existe entre l'eau pure et le THF pur. Ces deux solvants étant miscibles, nous avons pu effectuer un dosage de l'eau dans le THF

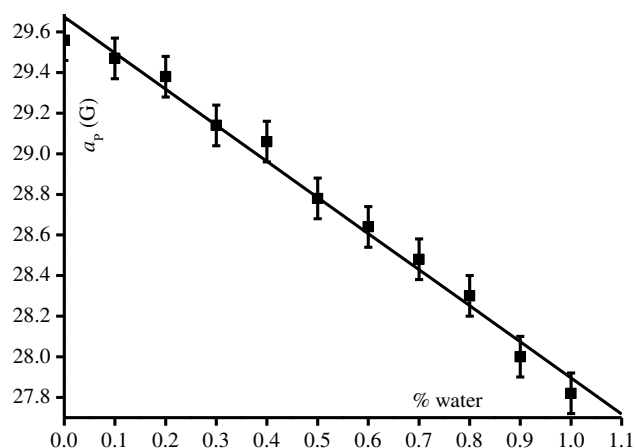


**Figure 38 : Courbe de dosage de l'eau dans le THF**

La figure 38 montre que cette sonde radicalaire ne nous permet pas de doser la quantité d'eau dans le THF lorsqu'elle est supérieure à 30% environ. Cependant, plus nous nous rapprochons de valeurs de concentration faible en eau, plus le changement de  $a_p$  est fort. Ce changement est rendu possible par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Celle-ci va être rompue par l'eau. Nous pouvons voir là un effet très fort de la concentration en eau. Il nous est donc possible de doser de faibles quantités d'eau dans le THF avec cette sonde.

Pour connaître les limites de notre sonde, nous avons essayé d'obtenir des valeurs de  $a_p$  comprises entre 0 et 1%.





**Figure 39 : Variation de  $a_p$  dans le THF en présence de 0-1% d'eau**

Nous pouvons voir sur la figure 39 que la variation entre le pourcentage d'eau et le  $a_p$  entre 0 et 1% est linéaire, ce qui simplifie le dosage et nous permet de déterminer la sensibilité de notre sonde. En tenant compte du fait que les mesures RPE ont une erreur de 0.1 G, nous pouvons affirmer que notre sonde est précise jusqu'à 0.2 % d'eau dans le THF.

Cette sonde radicalaire est donc la première pouvant offrir un dosage aussi précis de l'eau en milieu organique. Ce dosage est rendu possible par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire qui vient changer grandement la conformation de notre sonde. Pour le moment, celle-ci ne permet pas de concurrencer la technologie Karl-Fisher qui permet de doser des ppm d'eau. Cependant, nous avons pu montrer qu'il était tout à fait possible de doser de l'eau en milieu organique par RPE. De plus, la RPE fait partie des spectroscopies les plus sensibles. Nous pourrions donc envisager une sonde qui permettrait de mesurer précisément des ppb d'eau en milieu organique avec une méthode très simple à mettre en œuvre telle qu'une mesure de RPE.

# VI. Nitroxyde pour l'Imagerie par Résonance Magnétique

## 1. Résultats RPE

Comme nous l'avons montré précédemment, le concept que nous cherchons à développer repose sur un changement de constante de couplage hyperfin entre un nitroxyde portant un groupement hydrolysable par voie enzymatique (**21**) et un nitroxyde libre (**22**). Cette différenciation nous permettra, à terme, de suivre une activité enzymatique. Nous avons tenté d'obtenir une différenciation de signature RPE *via* la formation d'un ester d'énol comportant un acétate qui, une fois hydrolysée enzymatiquement, régènera une cétone (Schéma 31).

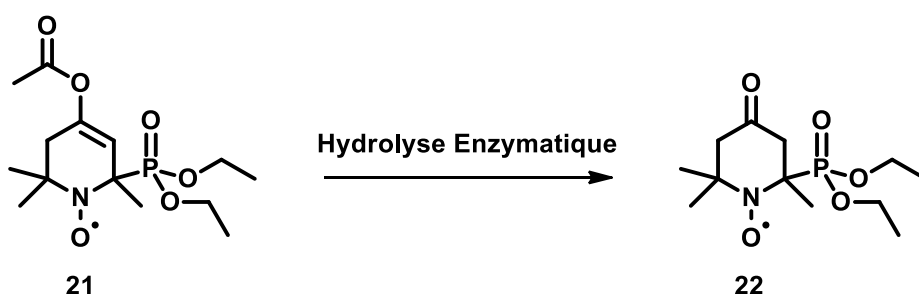


Schéma 31

### a. Résultats *in vitro*

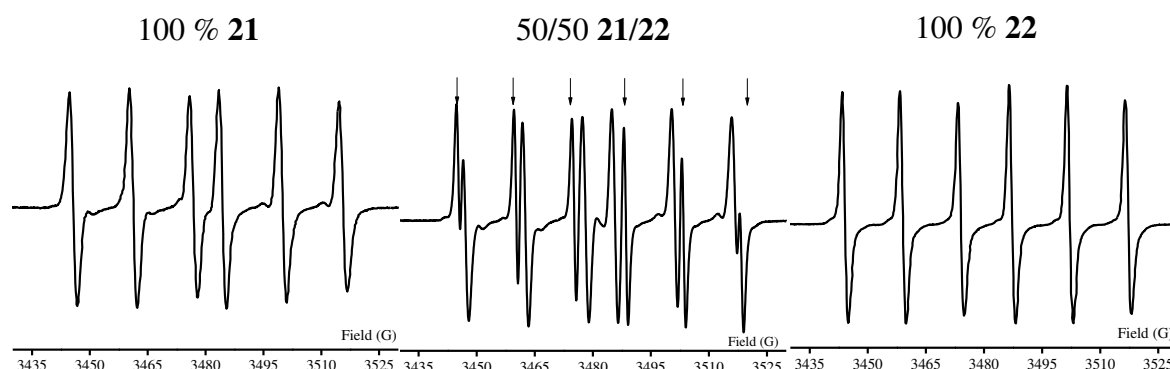
En premier lieu, nous avons analysé, séparément, chaque nitroxyde par RPE dans du tampon phosphate à pH 7.2. Les résultats obtenus sont en accord avec les valeurs reportées dans la littérature.<sup>37</sup>

Nitroxydes	$a_N$ (G)	$a_P$ (G)	$g$	Largeur de raie pic à pic (G)
<b>22</b>	15.0	43.1	2.0062	1.2
<b>21</b>	15.6	38.7	2.0063	1.8

Tableau 1

<sup>37</sup> A. Alberti, in *Nitroxide Radicals and Nitroxide Based High-Spin Systems*, Landolt-Börnstein : Molecules and Radicals, (Ed. H. Fischer), Springer Verlag, Heidelberg, **2005**, 26, Part D.

Le tableau 1 nous montre que le nitroxyde présentant une double liaison intracyclique **21** possède une constante de couplage au phosphore plus faible de 4 G par rapport à l'exocyclique **22**.

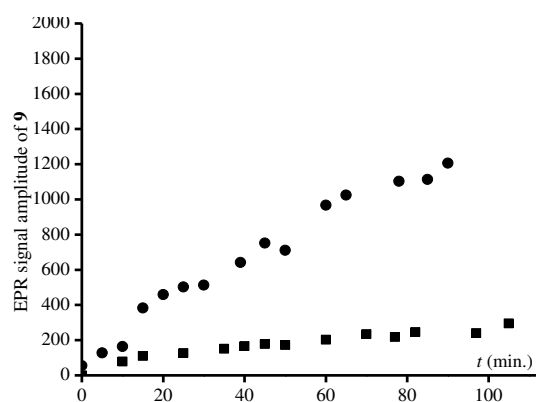


**Figure 40 : Spectres RPE de 21 et 22 purs et en mélange. Les flèches indiquent les raies du spectre de 22**

Grâce à leurs différences de  $a_P$  et des largeurs de raies fines, les spectres en mélange (Figure 40) ne souffrent d'aucun recouvrement au niveau des raies centrales. Ces deux molécules sont donc tout à fait différenciables et quantifiables par RPE et permettront des applications en IRM rehaussée par l'effet Overhauser.

## b. Résistance de l'acétate 21

Dans l'optique de futures applications biologiques, nous avons mesuré la résistance de l'acétate **21** en milieux acide et basique.



**Figure 41 : Cinétique de l'hydrolyse de 21 en 22 par RPE en solutions acide (pH = 1, ■) et basique (pH = 9, ●)**

La figure 41 nous montre que l'acétate **21** semble peu stable à pH 9. Par ailleurs, la cinétique d'hydrolyse de l'acétate en cétone à pH 1 est lente. En effet, seulement 10% de conversion de l'acétate **21** en cétone **22** ont pu être observés après 100 minutes de réaction. La liaison ester de l'acétate est donc relativement stable en conditions très acides.

### c. Screening enzymatique *in vitro*

Les résultats RPE étant en accord avec les prérequis du projet, la fonction acétate de la molécule **21** doit pouvoir être hydrolysée par une enzyme afin de libérer la cétone **22** que nous suivrons par IRM.

Pour cela, un screening de huit protéases a été effectué. La réaction enzymatique est suivie par quantification de la quatrième raie de la cétone **22**. Après 5 heures d'incubation, des mesures RPE montrent la formation de la cétone **22** avec certaines enzymes. (Figure 42)

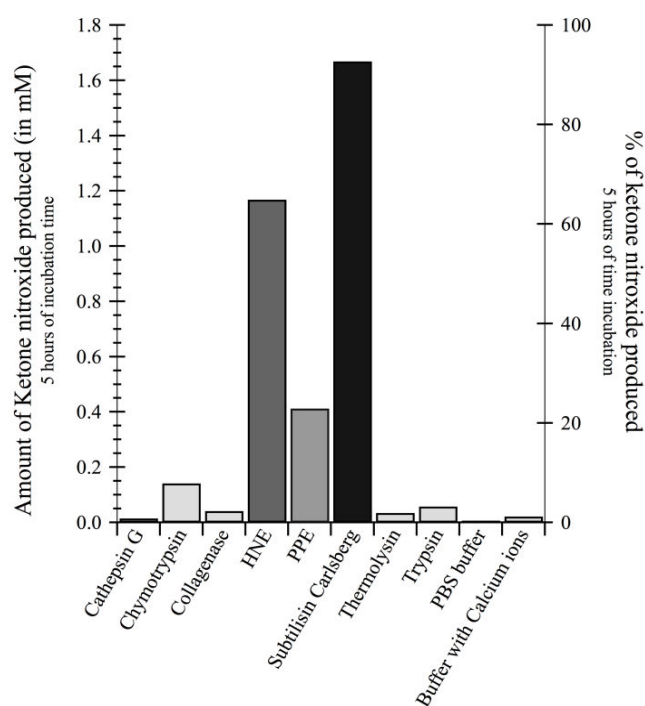
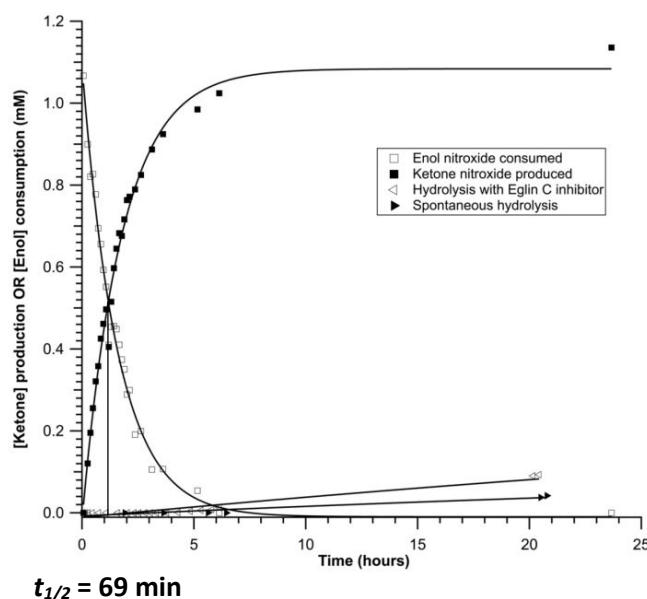


Figure 42 : Screening enzymatique

En effet, nous pouvons remarquer que quatre de ces enzymes (la cathepsine G, la collagénase, la thermolysine et la trypsine) n'hydrolysent pas le composé **21**. La chymotrypsine et l'élastase pancréatique de porc (PPE) présentent une activité mais qui reste trop lente pour des applications en IRM. Nous pouvons voir que l'élastase neutrophile humaine (HNE) et la subtilisine présentent une forte affinité pour l'acétate **21**. L'enzyme la plus active reste la subtilisine qui hydrolyse 95 % du produit en 5 heures. Cette enzyme sera donc notre enzyme de choix pour la suite de l'étude.



**Figure 43 : Cinétique RPE d'hydrolyse enzymatique**

Dans le but de vérifier si nous observons bien une activité enzymatique, plusieurs cinétiques ont été mesurées (Figure 43).

Dans un premier temps, la molécule a été solubilisée dans du tampon phosphate et une mesure de son hydrolyse spontanée a été menée. Nous observons une hydrolyse très lente de l'ester.

Par la suite, l'acétate **21** a été mis en présence de subtilisine et d'églisine C, un inhibiteur naturel des protéases. Comme nous pouvons le remarquer, nous n'observons qu'une hydrolyse négligeable.

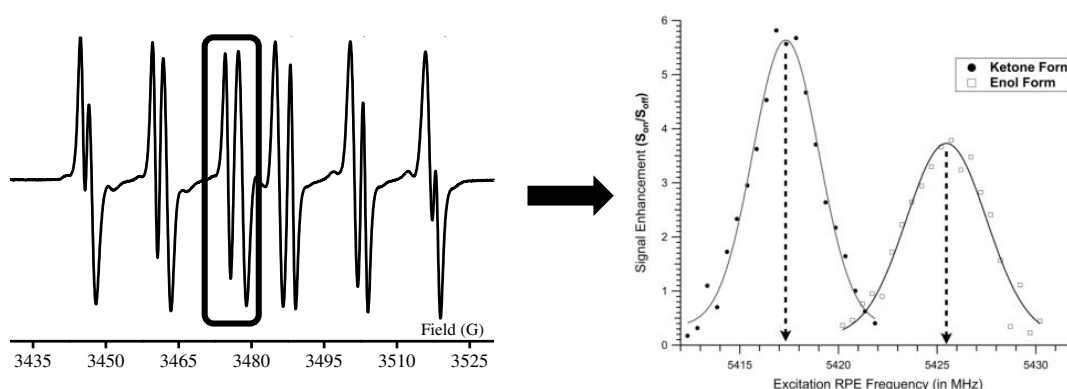
L'apparition de la cétone **22**, accompagnée de la disparition de l'acétate **21**, est donc bien issue d'une hydrolyse enzymatique.

## 2. Application à l'IRM rehaussée par l'effet Overhauser

### a. Test de sélectivité

Comme nous avons pu le remarquer sur les spectres RPE (Figure 40), le substrat et le produit révèlent une différence de constante de couplage hyperfin au phosphore de 4 G. Ces caractéristiques de RPE ont pu être appliquées afin de suivre par Imagerie par Résonance Magnétique rehaussée par l'effet Overhauser (IRMO) des réactions enzymatiques.

Cependant, avant toute application biologique, une fréquence d'excitation RPE spécifique du substrat et du produit a été déterminée.



**Figure 44 : Sélectivité IRMO *in vitro***

Cette étude fait apparaître une excitation spécifique et maximale de l'ester d'enol **21** à 5425.3 MHz et de la cétone **22** à 5417.3 MHz (Figure 44). Cette différence de fréquence d'excitation est suffisante pour pouvoir les exciter sélectivement par IRMO.

Chaque nitroxyde a, par la suite, été placé dans un capillaire différent. Comme nous pouvons le voir sur la figure 45, chacun des deux nitroxydes a pu être excité sélectivement faisant apparaître un rehaussement conséquent de l'image. Une expérience sans excitation RPE a été réalisée et ne montre aucune augmentation du contraste de l'image, ce qui démontre bien

l'effet crucial de l'excitation RPE. Il est à noter que l'acétate **21** présente une image moins amplifiée que la cétone **22**. Ceci s'explique par sa plus grande largeur de raie (1.8 G) par rapport à celle de la cétone (1.2 G).

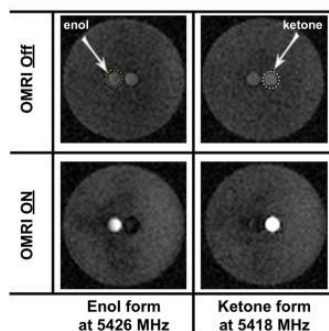


Figure 45 : Test IRMO *in vitro*

## b. Suivi d'une hydrolyse enzymatique *in vitro* par IRMO

Nous avons donc pu réunir toutes les conditions nécessaires à un suivi d'une hydrolyse enzymatique *in vitro* par IRMO. Cette expérience de suivi a pu être menée à 37 °C dans du tampon phosphate à pH physiologique (pH 7.3) (Figure 46).

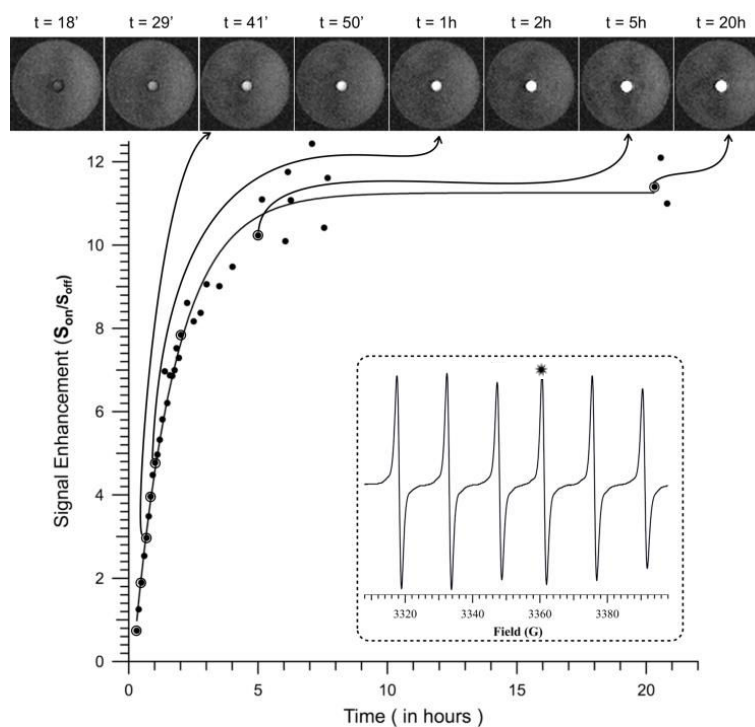
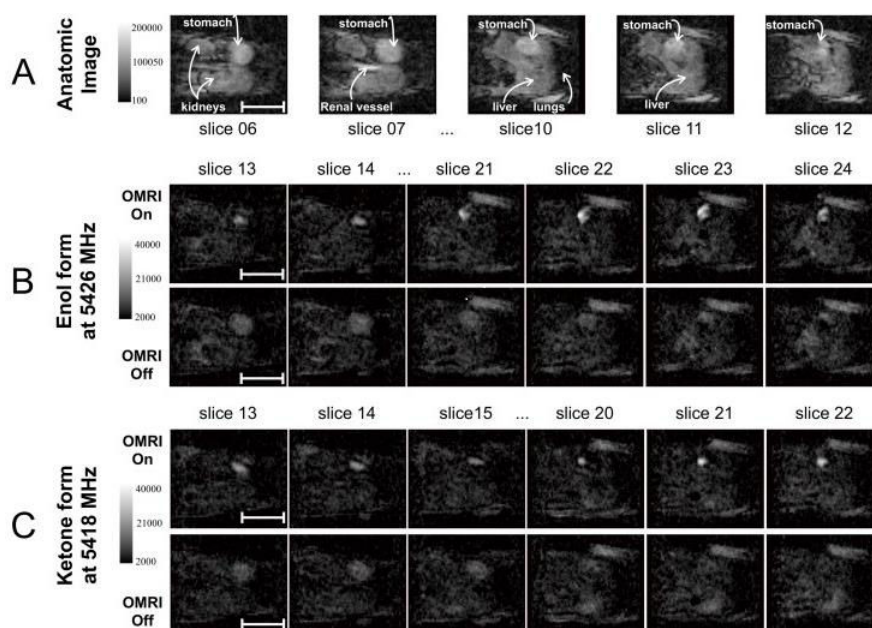


Figure 46 : Cinétique par IRMO

L'acétate **21** est mis en présence de subtilisine et nous suivons la formation de la cétone **22** au cours du temps en irradiant spécifiquement la troisième raie de son spectre RPE. La vitesse de production de **22** par hydrolyse de **21** est suivie par IRMO. Nous obtenons un temps de demi-vie de l'acétate **21** de 69 minutes dans ces conditions. Cette valeur reste très proche de la valeur déterminée par RPE. Le maximum d'amélioration de l'image se situe après 20 heures d'hydrolyse où nous avons un rehaussement de celle-ci d'un facteur 11.3.

### c. Application *in vivo*

Pour montrer le potentiel de cette molécule couplée à une technologie d'IRMO, une expérience *in vivo* a été réalisée en gavant une souris avec une solution d'acétate **21**. (Figure 47)



**Figure 47 : Hydrolyse *in vivo* de l'acétate **21** en cétone **22****

Tout d'abord, une IRM classique a été effectuée sans irradiation RPE. Nous ne voyons aucune zone préférentiellement mise en valeur. Puis une irradiation RPE est appliquée à la fréquence des nitroxydes étudiés. Les images montrent qu'une partie du substrat **21** a été convertie en cétone **22**, ce qui génère une augmentation du contraste au niveau de l'estomac.



Ce contraste améliore l'image au niveau de l'estomac de 600% pour la cétone **22**. Nous sommes donc en mesure de retrouver et de suivre, à souhait, l'apparition du produit ou la disparition du substrat. De plus, sachant que l'acétate est stable en condition très acide (pH 1) (Figure 41) et que le pH de l'estomac se situe entre 1 et 3.5, nous pouvons affirmer que seules les enzymes, présentes dans l'estomac de la souris, ont pu cliver l'acétate **21** pour reformer la cétone **21**.

Cette expérience met donc clairement en valeur la puissance de cette technologie couplée à l'échange conformationnel de notre sonde radicalaire. Nous sommes donc en mesure de visualiser une protéolyse *in vivo* de la sonde radicalaire par une expérience d'IRMO, ce qui, jusqu'alors, n'a jamais été développé.

## VII. Conclusion

Conformément aux objectifs que nous nous étions fixés, ces différents travaux ont conduit à synthétiser deux nouvelles sondes radicalaires ayant deux applications distinctes.

La première nous a permis de doser de l'eau dans un solvant organique grâce à un changement de constante de couplage hyperfin au phosphore. Nous avons proposé que ce changement est principalement dû à la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Cette nouvelle méthode de dosage, qui n'était pas développée jusqu'alors, semble très prometteuse puisque nous avons pu doser de très faibles quantités d'eau.

La seconde sonde que nous avons pu développer au cours de ce travail peut tout à fait s'inscrire dans le concept de diagnostic que nous cherchons à développer. En effet, nous avons pu montrer l'efficacité du changement conformationnel d'un nitroxyde sur la constante de couplage hyperfin au phosphore. De plus, les études RPE et IRM ont montré que nous étions capables de suivre la formation de la cétone de manière exclusive après l'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'ester d'énol **21**. De plus, le transfert de polarisation sur les molécules d'eau, amené par l'irradiation microonde du nitroxyde (effet Overhauser) formé par protéolyse, nous a ainsi permis d'améliorer l'image d'un IRM de 1200% en conditions *in vitro*. Nous avons pu également montrer que cette molécule est capable d'améliorer le contraste de l'image au niveau de l'estomac de 600 % en conditions *in vivo*. Nous avons donc pu prouver la validité du concept que nous cherchions à développer grâce à cette sonde radicalaire.

***Chapitre 2 : les alcoxyamines,  
nouveaux agents pour le diagnostic***

La seconde stratégie envisagée pour l'utilisation d'un nitroxyde comme agent de contraste en IRMO fait intervenir une alcoxyamine capable de libérer ce radical stable au sein d'une tumeur. Une certaine instabilité de cette alcoxyamine est donc nécessaire puisque le rehaussement de l'image est provoqué par la formation du nitroxyde par homolyse de l'alcoxyamine.

Nous ferons, tout d'abord, quelques rappels bibliographiques sur la structure des alcoxyamines, leurs applications, les différentes voies de synthèse et leurs propriétés physico-chimiques. Sur ces bases, nous proposerons une nouvelle structure d'alcoxyamines activables chimiquement. Nous verrons que cette structure nous a permis d'aller plus loin dans notre concept *via* la synthèse d'un pseudo-peptide attaché à notre molécule cible, ce qui permettra son adressage vers une enzyme.

#### Rappel du concept de diagnostique appliqué aux alcoxyamines :

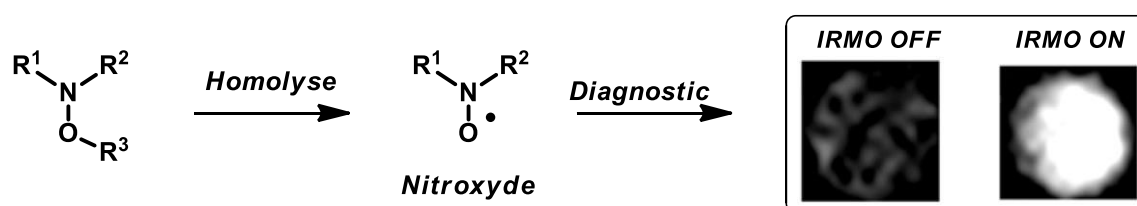


Schéma 32 : les alcoxyamines comme agents diagnostiques

# I. Les alcoxyamines

## 1. Généralités

Les alcoxyamines, de formule générale  $R^1R^2NO-R^3$ , sont des dérivés trialkylés de l'hydroxylamine et ont été découvertes en 1927.<sup>38</sup> (Figure 48)

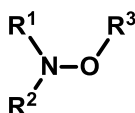


Figure 48 : structure d'une alcoxyamine

La liaison NO-C a la capacité de s'homolyser, avec une constante de vitesse de dissociation  $k_d$ , en un radical nitroxy stable et un radical alkyle hautement réactif. Ces deux radicaux peuvent ensuite se recombiner avec une constante de vitesse  $k_c$  pour reformer l'alcoxyamine initiale (Schéma 33).

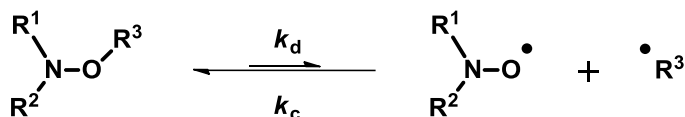


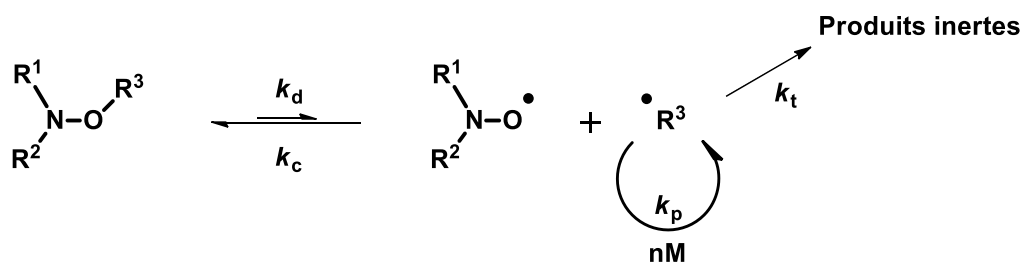
Schéma 33 : homolyse des alcoxyamines

Au milieu des années 80, Rizzardo a montré que la réversibilité de la fragmentation des alcoxyamines constituait le processus clé de la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMP).<sup>39,40</sup> De nos jours, la NMP reste l'application principale de ces molécules. Son principe est illustré par le schéma simplifié suivant (Schéma 34) :

<sup>38</sup> Jones, L. W. ; Major, R.T. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, 49, 1527.

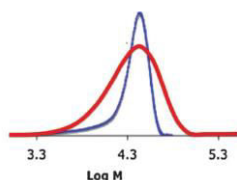
<sup>39</sup> Solomon, D. H. ; Rizzardo, E. ; Cacioli, P. *Eur. Pat. Appl.* **1985**, 135280 ; *US Patent*, 4,581,429 ; *Chem. Abstr.*, **1985**, 102, 221335q.

<sup>40</sup> Moad, G. ; Rizzardo, E. *Macromolecules*, **1995**, 28, 8722.



**Schéma 34 : principe de la NMP**

L'alcoxyamine est chauffée en présence de monomères. Le radical alkyle formé s'additionne sur un monomère, amorçant et propageant ainsi une chaîne polymère. L'avantage de cette technique est la quasi suppression de toute réaction de terminaison. En effet, le nitroxyde obtenu par homolyse viendra piéger le macroradical formé pour conduire à une macroalcoxyamine qui sera réamorcée thermiquement. La conséquence directe de cette réactivité sera que les chaînes polymères grandiront avec des vitesses similaires. Par conséquent, les chaînes polymères, issues d'une NMP, seront homogènes en longueur (Figure 49, bleu). Celles d'une polymérisation radicalaire classique (Figure 49, rouge) auront une distribution de chaînes plus large.



**Figure 49 : Distribution de masse d'une chaîne polymère (bleu : NMP ; rouge : polymérisation radicalaire classique)**

Comme nous venons de le voir, le contrôle de ce type de polymérisation repose sur la capacité qu'a un radical à se recombiner avec un nitroxyde. Cet effet cinétique est connu comme l'« effet radical persistant ».

En 2000, Studer a illustré cet effet radical persistant ainsi que l'utilité des alcoxyamines comme alternatives à l'étain (Schéma 35).<sup>41</sup>

<sup>41</sup> Studer, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 36, 1108.

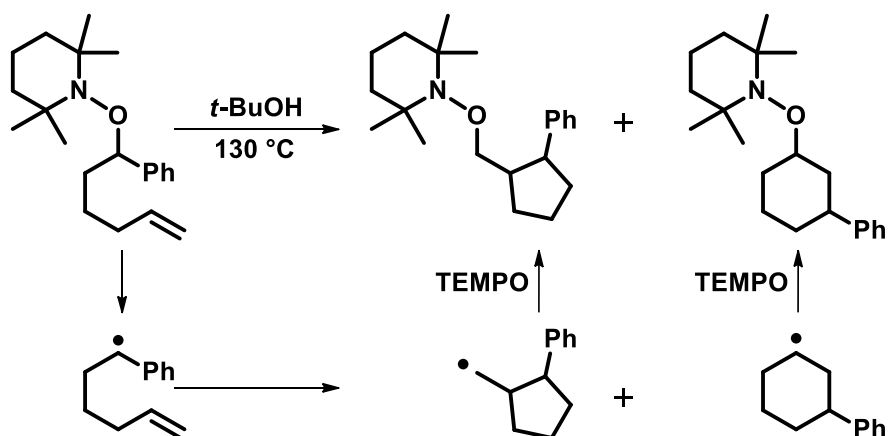


Schéma 35 : Effet radical persistant des nitroxydes

En l'absence de tout autre réactif, cette réaction de cyclisation intramoléculaire met en évidence l'effet radical persistant du nitroxyde, capable de piéger le radical alkyle formé par homolyse de l'alcoxyamine.

## 2. Principales voies de synthèse des alcoxyamines

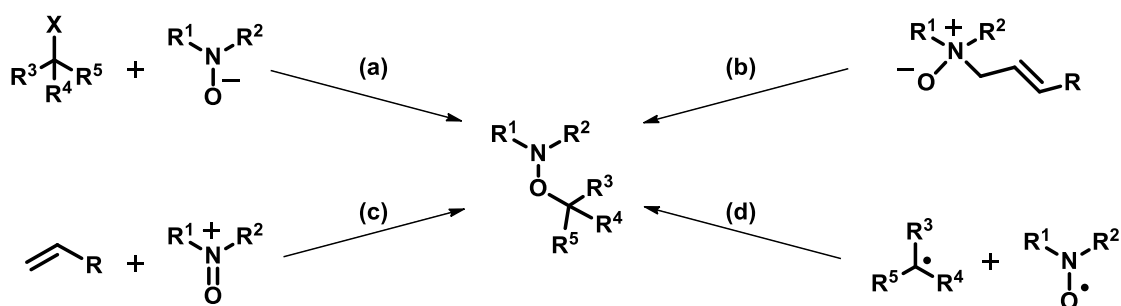
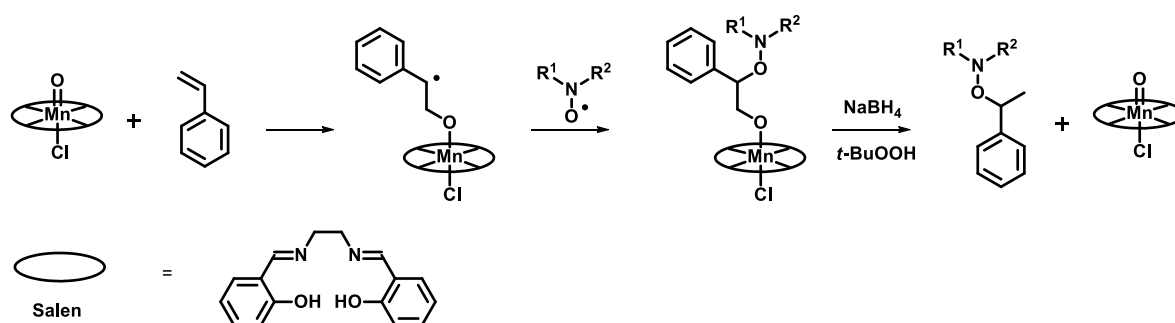


Schéma 36 : principales voies de synthèse des alcoxyamines

Les alcoxyamines sont essentiellement préparées selon les 4 différentes méthodes décrites dans le schéma 36. La première méthode (a) correspond à une substitution nucléophile d'un anion hydroxylamine sur un halogénure. La seconde méthode (b) implique un réarrangement de Meisenheimer sur un oxyde d'amine tertiaire. La troisième méthode (c) est basée sur une réaction entre un sel d'oxoammonium et une oléfine. Enfin, la dernière méthode (d), la plus répandue, correspond à la formation, *in situ*, d'un radical alkyle qui est immédiatement piégé par un nitroxyde.

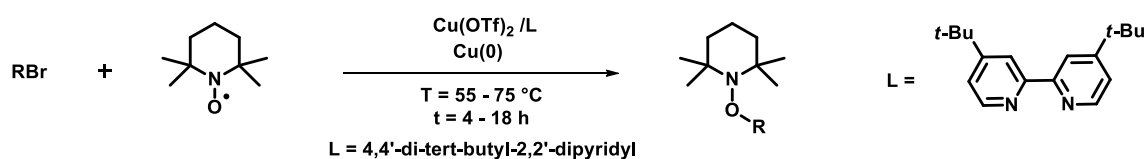
C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée pour la synthèse de nos alcoxyamines. La génération de radicaux alkyles est obtenue par deux méthodes distinctes. La première, développée par Kano<sup>42</sup> et Hawker<sup>43</sup>, utilise un catalyseur au manganèse (Schéma 37)



**Schéma 37 : principe de synthèse des alcoxyamines développé par Kano et Hawker**

Le catalyseur s'additionne sur une double liaison pour former le radical secondaire benzylique. Le radical nitroxyle vient alors piéger l'électron célibataire pour former l'alcoxyamine. Le catalyseur est ensuite régénéré par oxydation.

Cependant, cette méthode doit faire intervenir une oléfine. L'autre voie de synthèse, très efficace, a été développée par Matyjaszewski en 1998 (Schéma 38).<sup>44</sup>



**Schéma 38 : principe de synthèse des alcoxyamines développé par Matyjaszewski**

. Cette réaction, dite d'ATRA, (Atom Transfer Radical Addition) résulte d'un transfert de l'atome de brome du substrat vers un complexe de cuivre de degré d'oxydation I. Ce transfert d'atome engendre un radical alkyle dans le milieu réactionnel. Le radical persistant de type

<sup>42</sup> Takeushi, M. ; Kano, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, 67, 1726.

<sup>43</sup> Dao, J. ; Benoit, D. ; Hawker, C. J. *J. Polym. Sci. : Part A : Polym. Chem.* **1998**, 36, 2161.

<sup>44</sup> Matyjaszewski, K.; Woodworth, B. E.; Zhang, X.; Gaynor, S. G.; Metzner, Z. *Macromolecules*, **1998**, 31, 5955.



nitroxy, présent dans le milieu réactionnel, va venir piéger le radical alkyle et ainsi former l'alcoxyamine. Le mécanisme de cette réaction est illustré dans le schéma 39.

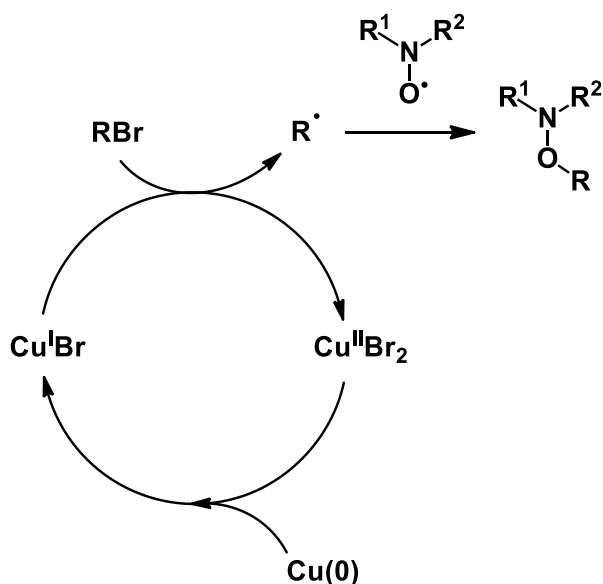


Schéma 39 : mécanisme du couplage ATRA

### 3. Paramètres contrôlant la vitesse d'homolyse des alcoxyamines<sup>45,46</sup>

Afin de comprendre et de rationaliser la vitesse d'homolyse des alcoxyamines, de nombreuses études ont été menées, en particulier à Aix-Marseille Université.

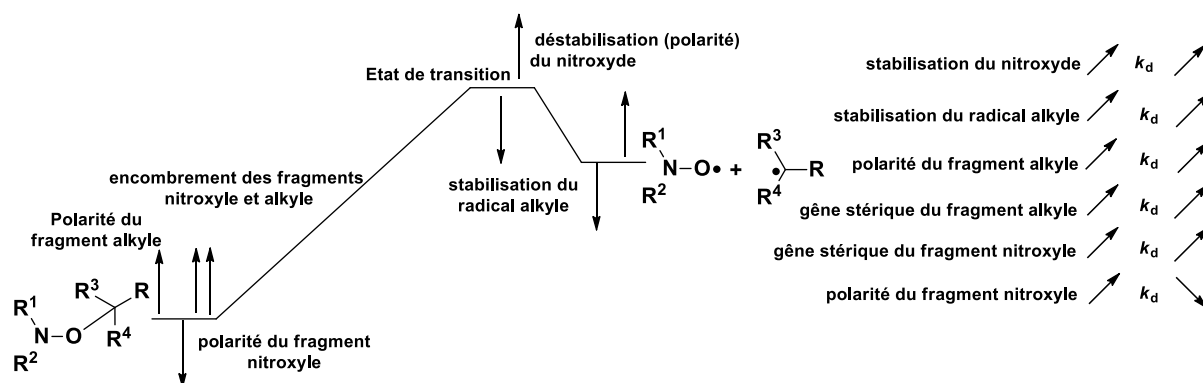
L'homolyse étant une réaction endothermique, l'état de transition qui en découle sera donc tardif. Il ressemblera fortement aux produits de la réaction. Ceci implique que si l'on stabilise les deux radicaux formés, une stabilisation de l'état de transition devrait se produire et, par conséquent, un abaissement de l'énergie d'activation, qui correspond à l'énergie qu'il faut fournir à l'alcoxyamine pour provoquer son homolyse, et donc une augmentation de la

<sup>45</sup> Bertin, D. ; Gimes, D. ; Marque, S.R.A. *Recent Res. Devel. Organic Chem.* **2006**, 10, 63.

<sup>46</sup> Gimes, D. ; Marque, S.R.A. *Nitroxide mediated polymerization and its applications. In Encyclopedia of radicals in chemistry, Biology and materials*, **2012**.

constante de dissociation  $k_d$ . D'un autre côté, si on déstabilise l'alcoxyamine, une même baisse de l'énergie d'activation se produira.

L'essentiel des paramètres contrôlant cette homolyse est regroupé dans la figure 50:



**Figure 50 : paramètres contrôlant la vitesse d'homolyse des alcoxyamines**

Comme le montre ce schéma, la polarité n'entre en compte que pour l'alcoxyamine. En effet, une hausse de polarité du fragment nitroxyde viendra augmenter la force de la liaison NO-C. A l'inverse, celle-ci sera affaiblie par une hausse de polarité du fragment alkyle.

Pour comprendre cet effet, il faut remonter à la définition par Pauling en 1960 de l'énergie qu'il faut fournir à une liaison chimique pour provoquer son homolyse (Bond Dissociation Energy : BDE).

Pour toute molécule A-B, elle s'écrit :<sup>47</sup>

$$\text{BDE}_{(A-B)} = \frac{1}{2} [\text{BDE}_{(A-A)} + \text{BDE}_{(B-B)}] + 96.23 (\chi_A - \chi_B)^2 \quad (12)$$

Dans notre cas, nous pouvons voir que la BDE est proportionnelle à la différence d'électronégativité entre les atomes d'oxygène et de carbone. Si cette différence est faible (cas d'une augmentation de polarité du fragment alkyle), l'alcoxyamine sera facilement homolysable. Si elle est forte (cas d'une augmentation de polarité du fragment nitroxyde), l'alcoxyamine sera plus stable.

<sup>47</sup> Pauling, L. *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd ed. ; Cornell University Press : Ithaca, NY, 1960, 212.

De plus, l'augmentation de l'encombrement stérique de chaque partie de l'alcoxyamine favorise une homolyse rapide (Figure 51).

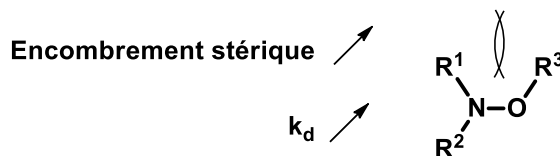


Figure 51 : effet de l'encombrement stérique

## 4. Phénomène d'activation des alcoxyamines

Le phénomène d'activation chimique des alcoxyamines par protonation a été découvert en 2011 par deux groupes.

Le groupe de Bagryanskaya a pu montrer que la protonation d'un fragment nitroxyde d'une alcoxyamine renforce sa liaison NO-C (Figure 52).<sup>48</sup>

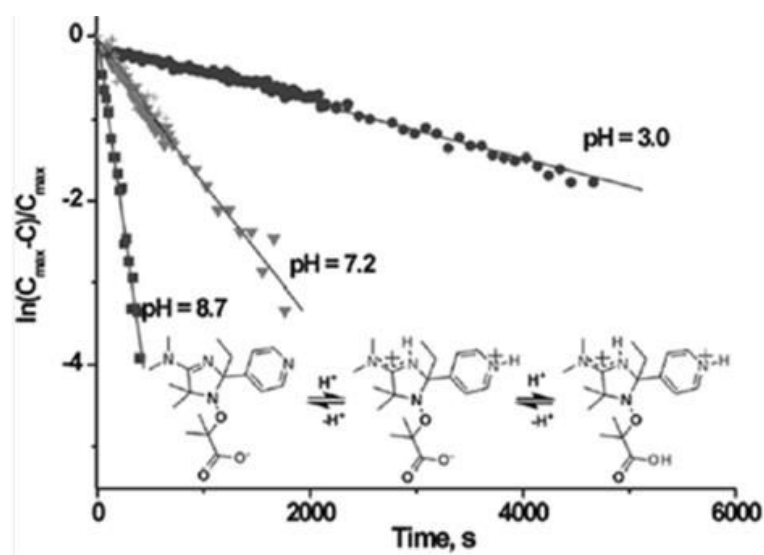
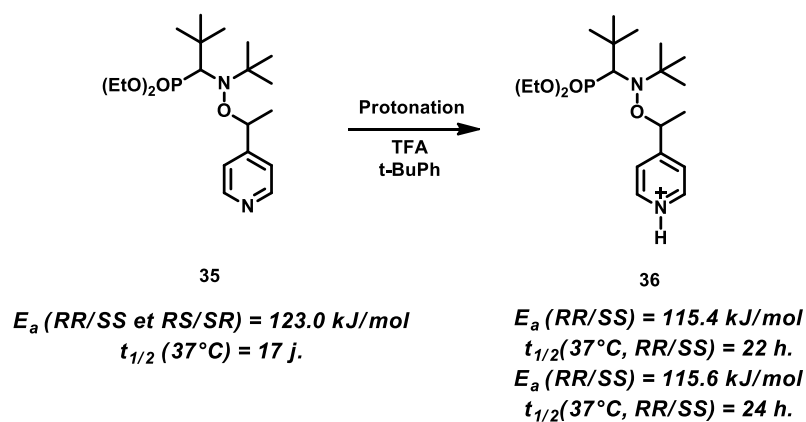


Figure 52 : effet de la protonation du nitroxyde

La molécule à l'état neutre s'homolyse plus rapidement que ses dérivés mono- ou di-protonés.

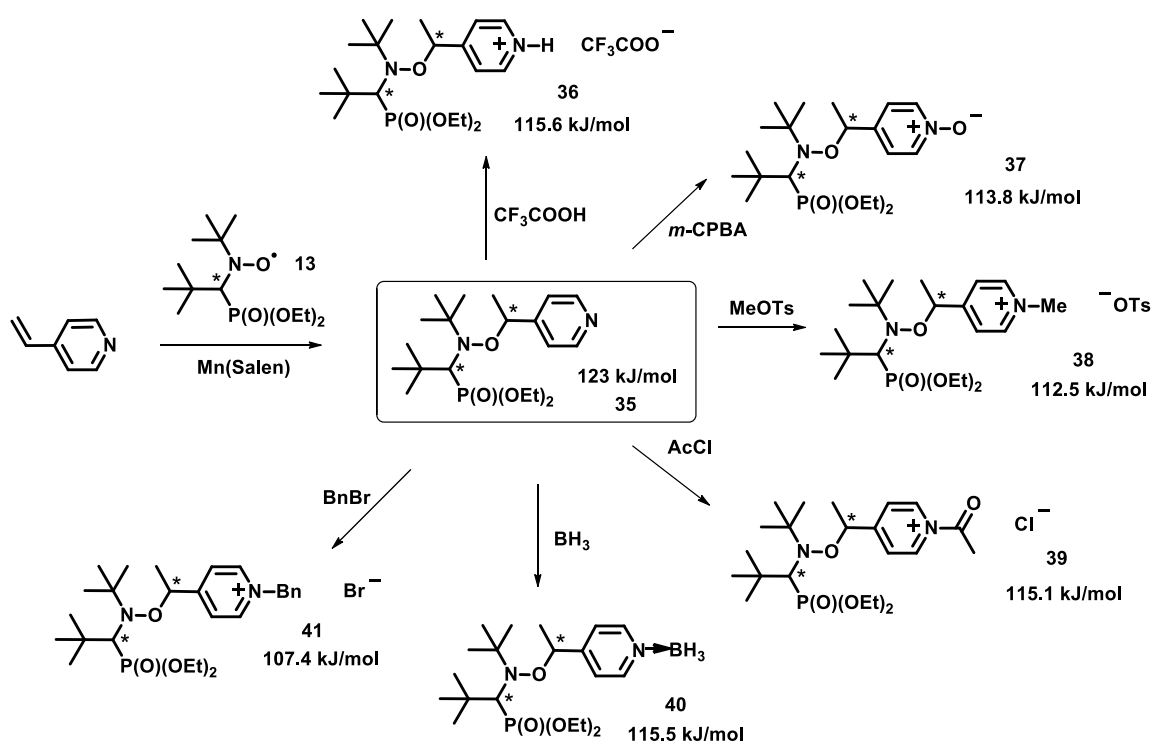
<sup>48</sup> Edeleva, M. V. ; Kirilyuk, I. A. ; Zhurko, I. F. ; Parkhomenko, D. A. ; Tsentelovich, Y. P. ; Bagryanskaya, E. *G. J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5558.

La même année, notre équipe a pu montrer que la protonation d'un noyau pyridine, situé sur le fragment alkyle de l'alcoxyamine **35**, conduit à un abaissement drastique de son énergie d'activation en milieu organique (Schéma 40).<sup>49</sup>



### Schéma 40 : protonation du noyau pyridine

Après ce résultat prometteur, une étude plus approfondie de la fonctionnalisation du noyau pyridine a été menée.<sup>50</sup> Les principaux résultats sont réunis dans le schéma 41:



### Schéma 41 : fonctionnalisation du noyau pyridine

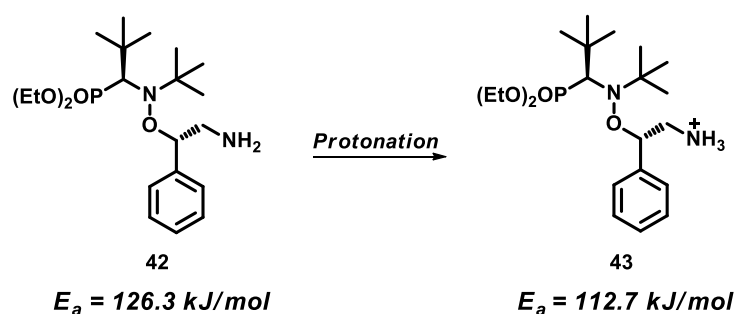
<sup>49</sup> Brémond, P. ; Marque, S. R. A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4291.

<sup>50</sup> Brémond, P. ; Koïta, A. ; Marque, S. R. A. ; Pesce, V. ; Roubaud, V. ; Siri, D. *Org. Lett.* **2014**, 14, 358.

Le noyau pyridine a été fonctionnalisé par protonation, oxydation, alkylation ou encore par formation d'une liaison dative avec un groupement  $BH_3$ . Nous pouvons observer une baisse conséquente de l'énergie d'activation de l'alcoxyamine pour chaque molécule fonctionnalisée.

Le fragment nitroyle étant identique pour chaque alcoxyamine, cette baisse de l'énergie d'activation est donc due au fragment alkyle. Pour les alcoxyamines protonées **36**, méthylées **38**, benzylées **41** ou encore acylées **39**, il s'agit principalement d'un effet dû à l'augmentation de la polarité du noyau pyridine. Cette augmentation va se traduire par une déstabilisation de l'alcoxyamine conduisant à une diminution de son énergie d'activation. Quant à la baisse de l'énergie d'activation du dérivé oxydé **37**, elle s'explique par une stabilisation supplémentaire par mésomérie, du radical alkyle formé après homolyse.

Très récemment, notre équipe a pu mettre en évidence un effet conséquent de la protonation d'une amine primaire en milieu organique (Schéma 42). (*Résultats non publiés*)



**Schéma 42 : protonation de l'amine primaire**

Cette diminution de l'énergie d'activation par protonation de l'amine **42** est directement reliée à une déstabilisation de l'alcoxyamine par un accroissement de la polarité du fragment alkyle. En effet, le carbone porteur de la liaison  $NO-C$  se retrouve déficient en électron. Cette hausse de sa polarité va abaisser son énergie d'activation. Les phénomènes d'activation par protonation et oxydation seront détaillés dans la partie « Résultats et discussion ».

## 5. Imagerie par Résonance Magnétique

L'application en diagnostic des alcoxyamines suppose que le radical nitroxy, produit lors de l'homolyse, soit capable d'améliorer l'image obtenue par IRMO. Dans le cadre de ce travail, seules des alcoxyamines présentant un fragment nitroxy SG1 (Schéma 43) ont été développées.

Auparavant, une étude de l'alcoxyamine **38** a pu montrer une réelle application pour le rehaussement de l'image en IRM.<sup>51</sup>

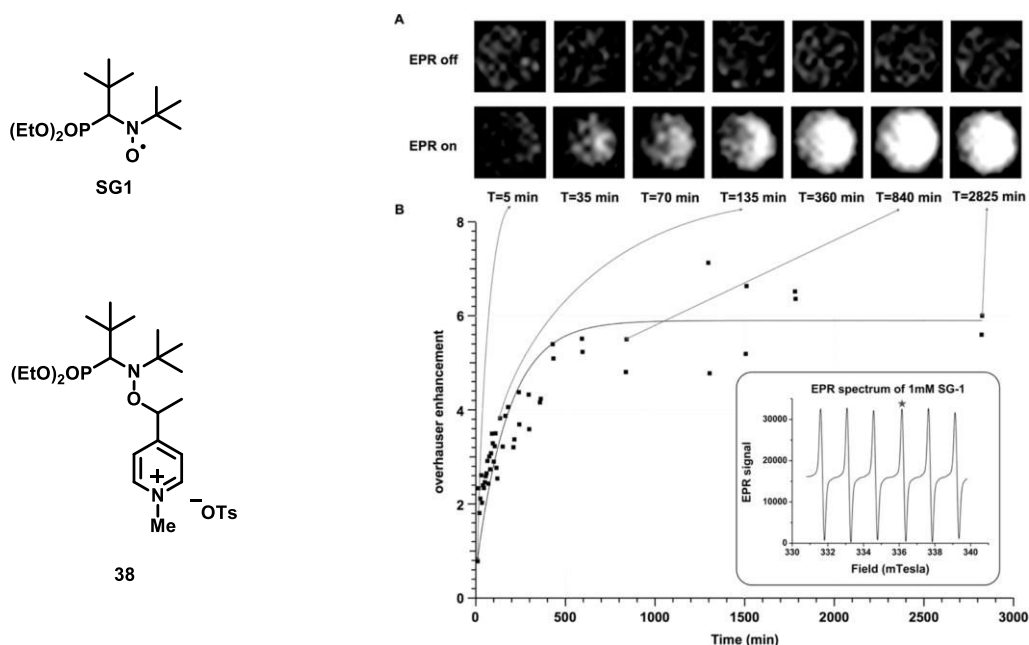


Schéma 43 : cinétique d'homolyse de l'alcoxyamine **38** suivie par IRMO

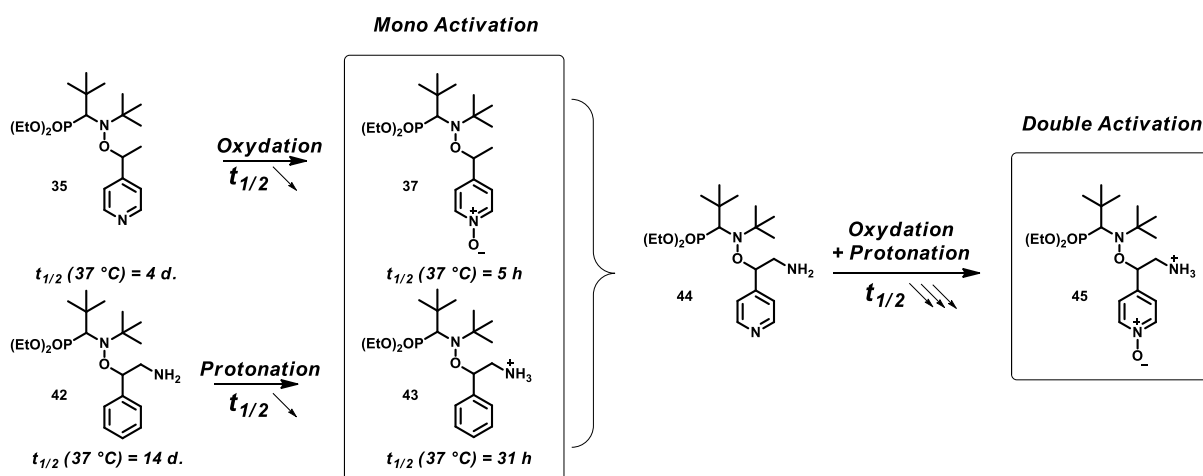
Le schéma 43 montre la cinétique d'homolyse de l'alcoxyamine suivie par IRMO. Comme nous pouvons le noter, nous avons un rehaussement significatif de l'image au cours du temps. Ce rehaussement est attribué à la formation du SG1 après homolyse de la liaison NO-C car l'expérience menée en l'absence d'irradiation microonde ne révèle aucune amélioration de l'image.

<sup>51</sup> Moncelet, D. ; Voisin, P. ; Koonjoo, N. ; Bouchaud, V. ; Massot, P. ; Parzy, E. ; Audran, G. ; Franconi, J.-M. ; Thiaudière, E. ; Marque, S. R. A. ; Brémond, P. ; Mellet, P. *Mol. Pharmaceutics*, **2014**, *11*, 2412.

Cependant, cette alcoxyamine possède un temps de demi-vie trop long ( $t_{1/2}$  (37 °C) = 50 min.) pour une réelle application en diagnostic. De plus, il nous est impossible de la vectoriser. En effet, elle ne possède pas de site propice à une activité enzymatique. Le nitroxyde choisi est donc efficace mais nous devons travailler sur un fragment alkyle plus performant en diagnostic.

## II. Objectifs

L'objet de ce travail repose donc sur l'obtention d'une alcoxyamine à visée diagnostique.



**Schéma 44 : alcoxyamine cible**

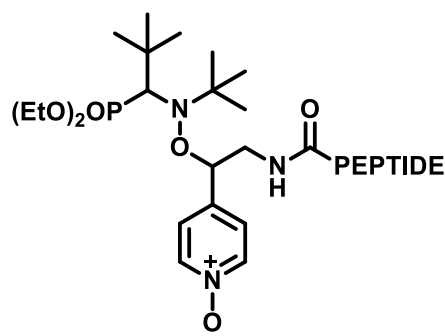
Dans la partie précédente, nous avons pu voir que deux types d'alcoxyamines, présentant une activation chimique différente, ont été synthétisés, soit par oxydation du noyau pyridyl **35**, soit par protonation de la fonction amine primaire **42**. Ces activations chimiques ont permis d'accélérer grandement leurs homolyses et donc de diminuer les temps de demi-vie (Schéma 44). Cependant, ces temps de 5 h et de 31 h, sous forme activée en milieu aqueux, restent trop long pour une application en diagnostic.

Dans le but d'obtenir une alcoxyamine plus labile et exploitable en diagnostic, notre objectif est de préparer une nouvelle molécule activable répondant à plusieurs critères clés :

- Une fonction pouvant être greffée sur un peptide
- Une fonction qui active l'homolyse après hydrolyse enzymatique du peptide
- Un temps de demi-vie faible



Une alcoxyamine présentant un noyau pyridine et une amine primaire pourrait répondre à nos critères pour diverses raisons. La première activation chimique peut être obtenue, au préalable, en laboratoire par oxydation du noyau pyridine. La seconde activation pourra être obtenue directement *in vivo* par protonation de l'amine à pH physiologique. La combinaison de ces deux phénomènes d'activation devrait permettre d'accéder à des temps de demi-vie faibles.



**Figure 53 : adressage possible de l'alcoxyamine cible**

Cette structure présente un autre avantage majeur, celui de comporter une amine primaire. Il nous serait donc très aisé de coupler un peptide et d'obtenir une alcoxyamine vectorisée (Figure 53).

Dans un premier temps, nous présenterons la synthèse de cette nouvelle alcoxyamine doublement activable. L'étude physico-chimique de cette nouvelle molécule nous conduira à la synthèse d'un pseudo-peptide dans le but de valider ce concept de diagnostic.

# III. Synthèse de la cible

## 1. Analyse rétrosynthétique

Dans la partie précédente, nous avons défini la structure chimique de l'alcoxyamine pouvant répondre à nos attentes dans une stratégie diagnostique. L'analyse rétrosynthétique que nous proposons est la suivante :

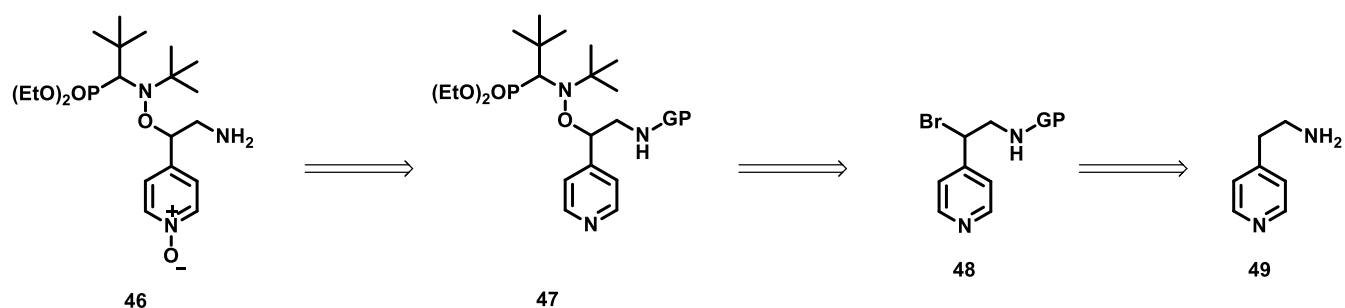


Schéma 45 : schéma rétrosynthétique (GP : groupement protecteur)

Dans un premier temps, l'alcoxyamine cible **46** serait obtenue après oxydation puis déprotection de l'amine **47**. Celle-ci pourra être synthétisée par couplage du radical nitroxy SG1 sur le bromure benzylique **48**. Ce bromure sera, quant à lui, issu d'une protection de l'amine **49** puis d'une bromation en position benzylique.

## 2. Détails de la synthèse

### a. Synthèse du SG1

La synthèse du nitroxyde SG1 de nos alcoxyamines a été décrite par l'équipe de Tordo en 2000.<sup>52</sup> Elle met en jeu l'imine **50** formée par la condensation de la *t*-butylamine sur le pivalaldéhyde. L'imine **50** est ensuite piégée par du diéthylphosphite pour former l'aminophosphonate **51**. L'oxydation de **51**, par l'Oxone, conduit au nitroxyde SG1.

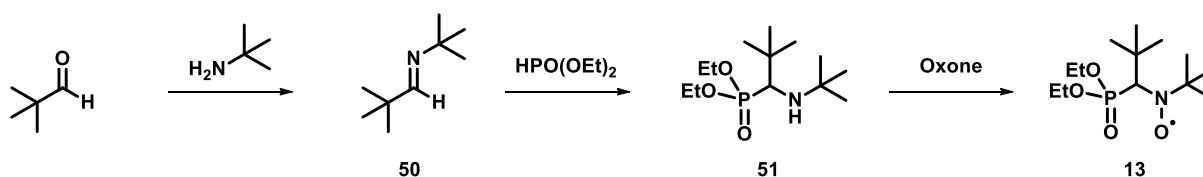


Schéma 46

### b. Synthèse de l'amine 49

La synthèse de la molécule cible débute par une addition d'ammoniac sur la 4-vinylpyridine. La vinylpyridine est placée à reflux dans un mélange eau/méthanol pendant 12 heures en présence de chlorure d'ammonium. Nous obtenons l'amine primaire **49** avec un rendement de 56%.<sup>53</sup>

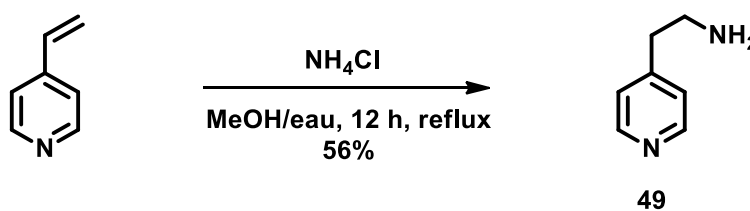


Schéma 47

<sup>52</sup> Grimaldi, S. ; Finet, J.-P. ; Le Moigne, F. ; Zeghdaoui, A. ; Tordo, P. ; Benoit, D. ; Fontanille, M. ; Gnanou, Y. *Macromolecule*, **2000**, 33, 1141.

<sup>53</sup> Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Dönnecke, D.; Uhland, K.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Müller, F.; Friedrich, R.; Than, M.E.; Bode, W.; Stürzebecher, J. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 4116.

### c. Protection de l'amine primaire 49

Lors de la rétrosynthèse de **46**, nous avons mis en évidence la présence d'un bromure en position benzylique. La protection de l'amine **49** sous forme d'amide empêchera celle-ci de réagir pendant la réaction de bromation pour former l'aziridine **53** (Schéma 48). Cette amine doit donc être protégée.

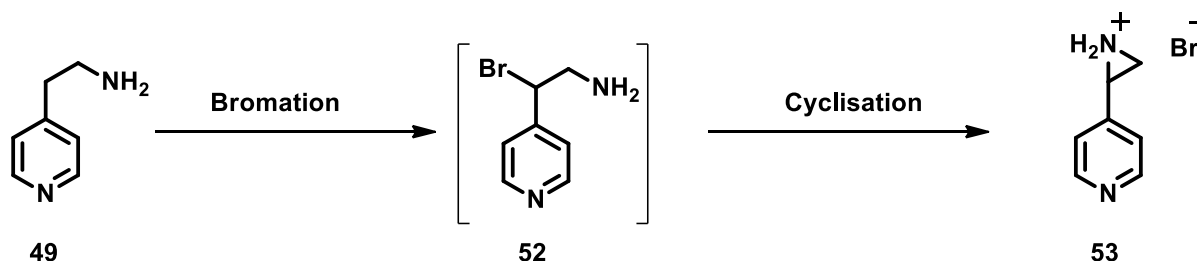


Schéma 48

Nous avons décidé de masquer cette amine par un groupement trifluoroacétamide. Le choix de ce groupement protecteur nous a semblé judicieux pour diverses raisons. En premier lieu, la suite de la synthèse va nous amener à former une alcoxyamine possédant un noyau pyridine. Nous savons, par expérience, qu'une alcoxyamine présentant ce type de substituant verra son temps de demi-vie diminué si on la protone. En second lieu, la molécule présentera un groupement phosphonate qui, comme nous le savons, résiste difficilement à des conditions acides fortes. Ces deux fonctions excluent, de fait, tous groupements protecteurs qui seraient déprotégés en conditions acides.

L'amine primaire **49** est donc protégée sous la forme du trifluoroacétamide **54**, dans les conditions décrites par Pyne, avec un rendement de 89%.<sup>54</sup>

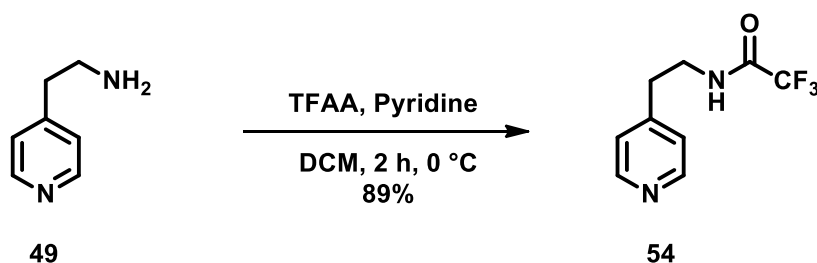


Schéma 49

<sup>54</sup> Pyne, S. G. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4737.

## d. Bromation radicalaire en position benzylique

Le composé **54** a, par la suite, subi une réaction de bromation radicalaire en position benzylique. Il est solubilisé dans du chloroforme en présence de *N*-bromosuccinimide (NBS) puis irradié par une lampe ultraviolette à spectre large. Cependant, cette réaction produit également de l'acide bromhydrique. Nous avons pu remarquer que cet acide venait protoner les composés **54** et **55**. Cette protonation induit une précipitation du substrat et empêche la réaction. Nous avons pu pallier à ce manque de réactivité par l'ajout d'hydrogencarbonate de sodium. En effet, cette base piège l'acide formé et laisse le substrat en solution. Une purification rapide sur SiO<sub>2</sub> permet d'obtenir le bromure **55** avec une pureté suffisante pour la prochaine étape. Malheureusement, ce produit est relativement instable et seuls des rendements de 10 à 20 % ont été obtenus.

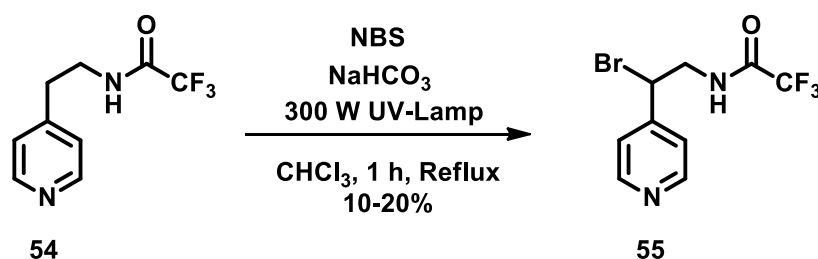


Schéma 50

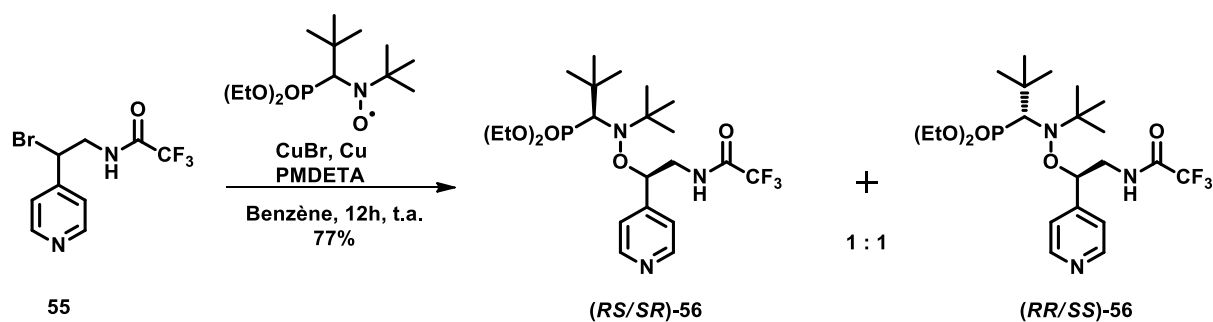
## e. Formation de l'alcoxyamine

L'étape clé de cette synthèse est l'étape de formation de l'alcoxyamine **56**. Nous avons utilisé une méthode dite ATRA (Atom Transfer Radical Addition) découverte par Matyjaszewski.<sup>55</sup>

Le couplage du radical nitroxyle stable SG1 et du radical alkyle issu du bromure **55** a été effectué afin de conduire à la formation de l'alcoxyamine **56**. Cette molécule présentant

<sup>55</sup> Matyjaszewski, K.; Woodworth, B. E.; Zhang, X.; Gaynor, S. G.; Metzner, Z. *Macromolecules*, **1998**, *31*, 5955.

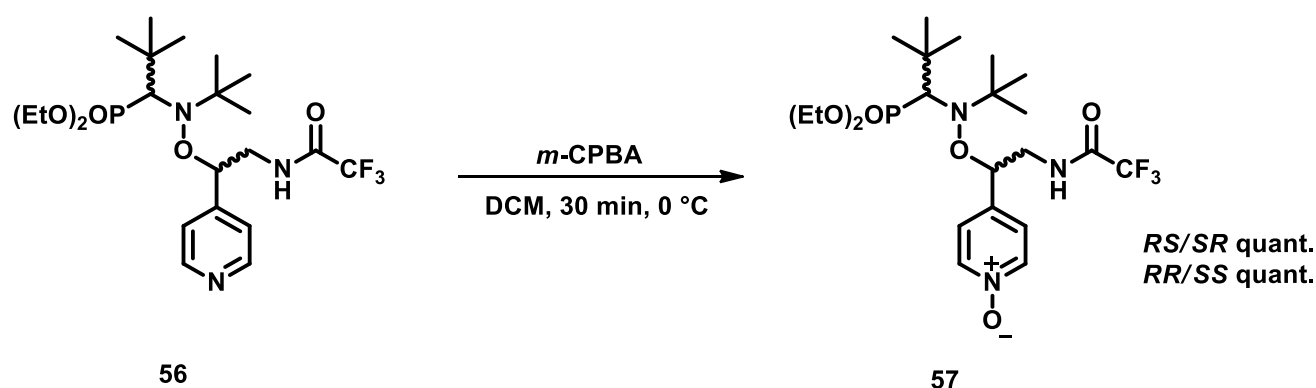
deux carbones asymétriques, nous avons obtenu deux diastéréoisomères présentant un *ratio* de 1 : 1 avec un rendement de 77 %. Ces deux isomères ont pu être séparés par colonne chromatographique. L'ensemble des étapes suivantes ont été effectuées sur chaque diastéréoisomère pur. L'identification de ces deux diastéréoisomères a été effectuée ultérieurement (p. 83).



**Schéma 51**

## f. Oxydation du noyau pyridine

La synthèse de l'alcoxyamine cible se poursuit par l'oxydation du noyau pyridine **56** par l'action de l'acide *meta*-chloroperbenzoïque dans le dichlorométhane à 0 °C. Cette réaction permet d'obtenir, après colonne chromatographique, l'oxyde de pyridine correspondant (**57**) avec des rendements quantitatifs pour chaque diastéréoisomère.



**Schéma 52**

## g. Déprotection de l'amine du dérivé oxydé

La déprotection de cette amine a été conduite dans les conditions développées par Albanese en 1997 utilisant la potasse méthanolique.<sup>56</sup> Nous obtenons, après colonne chromatographique, l'amine primaire **46** avec un rendement quantitatif pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 90% pour le diastéréoisomère *RS/SR*.

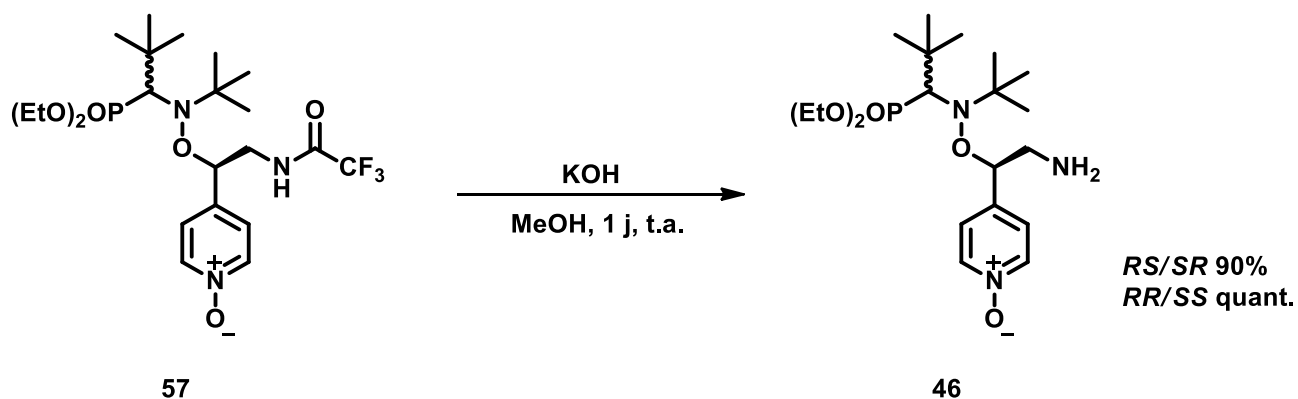


Schéma 53

<sup>56</sup> Albanese, D.; Corcella, F.; Landini, D.; Maia, A.; Penso, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1997**, 247.

## h. Détermination des configurations relatives des carbones asymétriques

Dans le but de connaître la configuration relative des carbones asymétriques et de futures études physico-chimiques, nous avons déprotégé l'amide **56** en milieu basique. Nous avons obtenu les deux diastéréoisomères **44** avec des rendements de 91% et 76%.

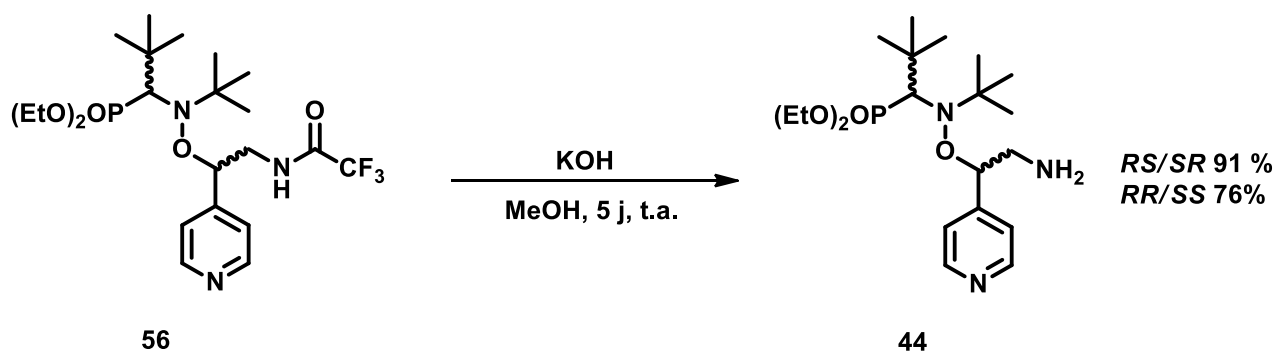


Schéma 54

Chaque diastéréoisomère a été obtenu sous forme solide. Une étude par diffraction des rayons X a été menée et nous permet de mettre en évidence la configuration relative des carbones asymétriques (Schéma 55).

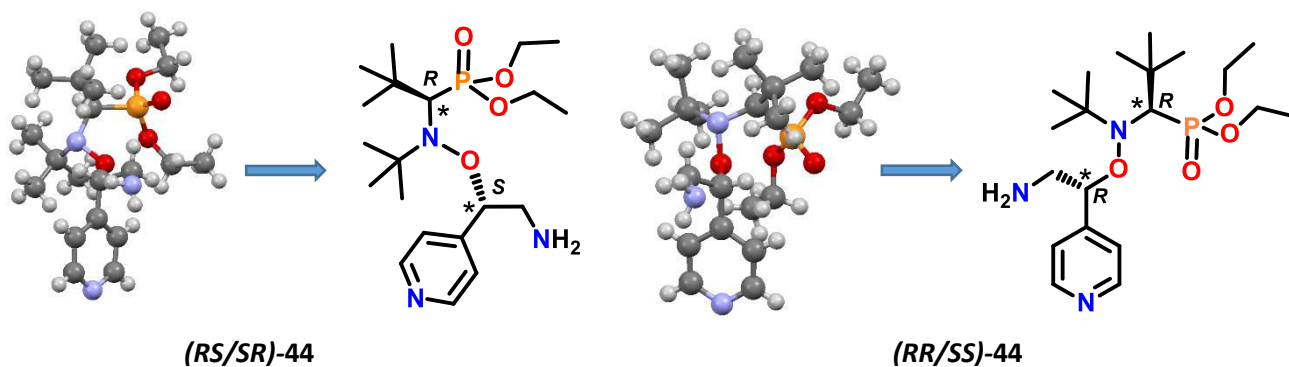


Schéma 55 : diffraction des RX et détermination de la configuration relative des carbones asymétriques des composés  $(RS/SR)$ -**44** et  $(RR/SS)$ -**44**

A la différence des résultats observés avec l'amine **42**, aucune liaison hydrogène intramoléculaire n'est observée à l'état cristallin entre le groupement phosphonate et l'amine primaire.



## IV. Résultats et discussions

Les molécules cibles ayant été obtenues avec succès, celles-ci ont ensuite été étudiées d'un point de vue cinétique afin de vérifier la validité de ces nouvelles alcoxyamines dans un concept de diagnostic. La connaissance de l'énergie d'activation de la liaison NO-C nous est essentielle pour prévoir si cette molécule peut être appliquée à l'IRMO.

### 1. Etude de l'homolyse de la liaison NO-C

Une solution à  $10^{-4}$  M de l'alcoxyamine étudiée est chauffée, ce qui provoque son homolyse en un radical alkyle et un nitroxyde SG1 stable, en utilisant l'oxygène comme piège du radical alkyle. Cela permet d'empêcher la réaction de recombinaison des deux radicaux en alcoxyamine qui viendrait biaiser cette mesure (Schéma 56).

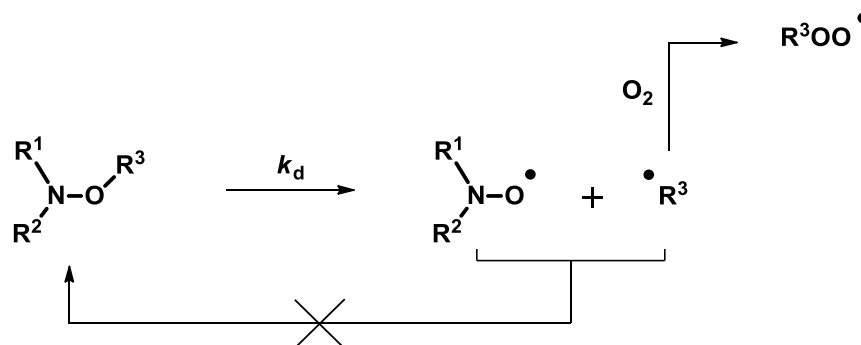
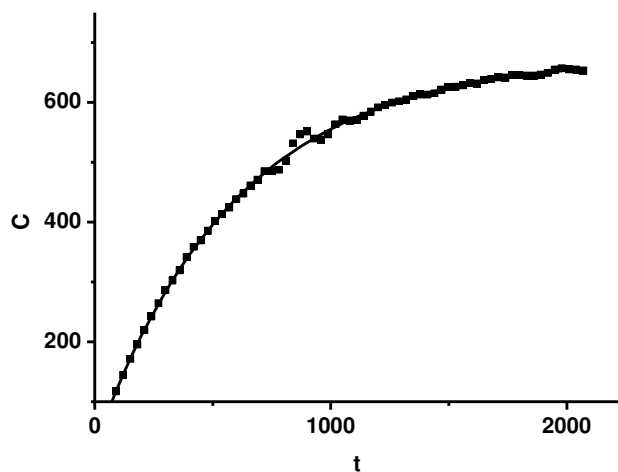


Schéma 56 : principe de la mesure de la constante de vitesse d'homolyse  $k_d$  par RPE

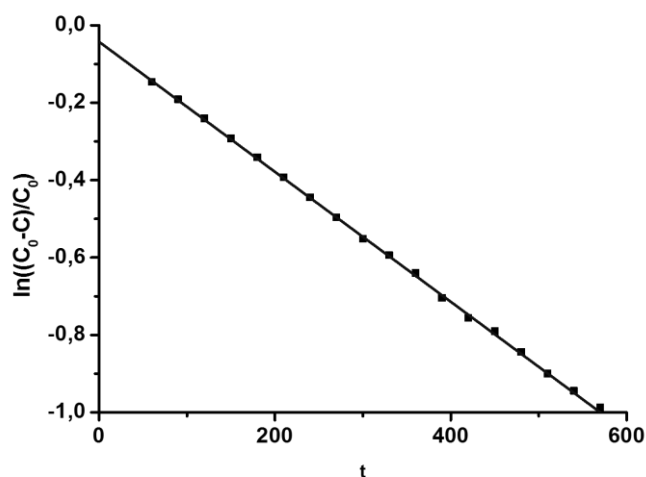
Nous enregistrons, à intervalles de temps réguliers, des spectres RPE du SG1. L'évolution de la concentration en fonction du temps est décrite par une exponentielle (Figure 54).



**Figure 54 : évolution de la concentration en nitroxyde au cours du temps**

Après linéarisation, nous obtenons une droite dont la pente (Equation 13) représente la constante de vitesse de dissociation  $k_d$  (Figure 55) de l'alcoxyamine mesurée à une température donnée.

$$\ln\left(\frac{[R_1R_2NO \cdot]_\infty - [R_1R_2NO \cdot]_t}{[R_1R_2NO \cdot]_\infty}\right) = -k_d t \quad (13)$$



**Figure 55 : détermination de la constante de dissociation**

Connaissant  $k_d$ , T et A, il est donc possible de calculer l'énergie d'activation  $E_a$  en utilisant l'équation d'Arrhénius.

$$k_d = Ae^{-E_a/RT} \quad (14)$$

Une fois l'énergie d'activation connue, la constante de dissociation peut être déterminée pour toute température et il est possible d'en déduire un temps de demi-vie avec l'équation 15.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (15)$$

Dans notre cas, il est capital de connaître la vitesse d'homolyse de la liaison NO-C à température corporelle. Nous avons donc calculé toutes ces vitesses et les temps de demi-vie associés à cette température. Ce simple calcul nous permet d'entrevoir le comportement de l'homolyse de nos molécules à température physiologique.

## 2. Résultats des mesures cinétiques en milieu aqueux

L'application *in vivo* des alcoxyamines pour le diagnostic nécessite une mesure de leurs énergies d'activation en milieu aqueux.

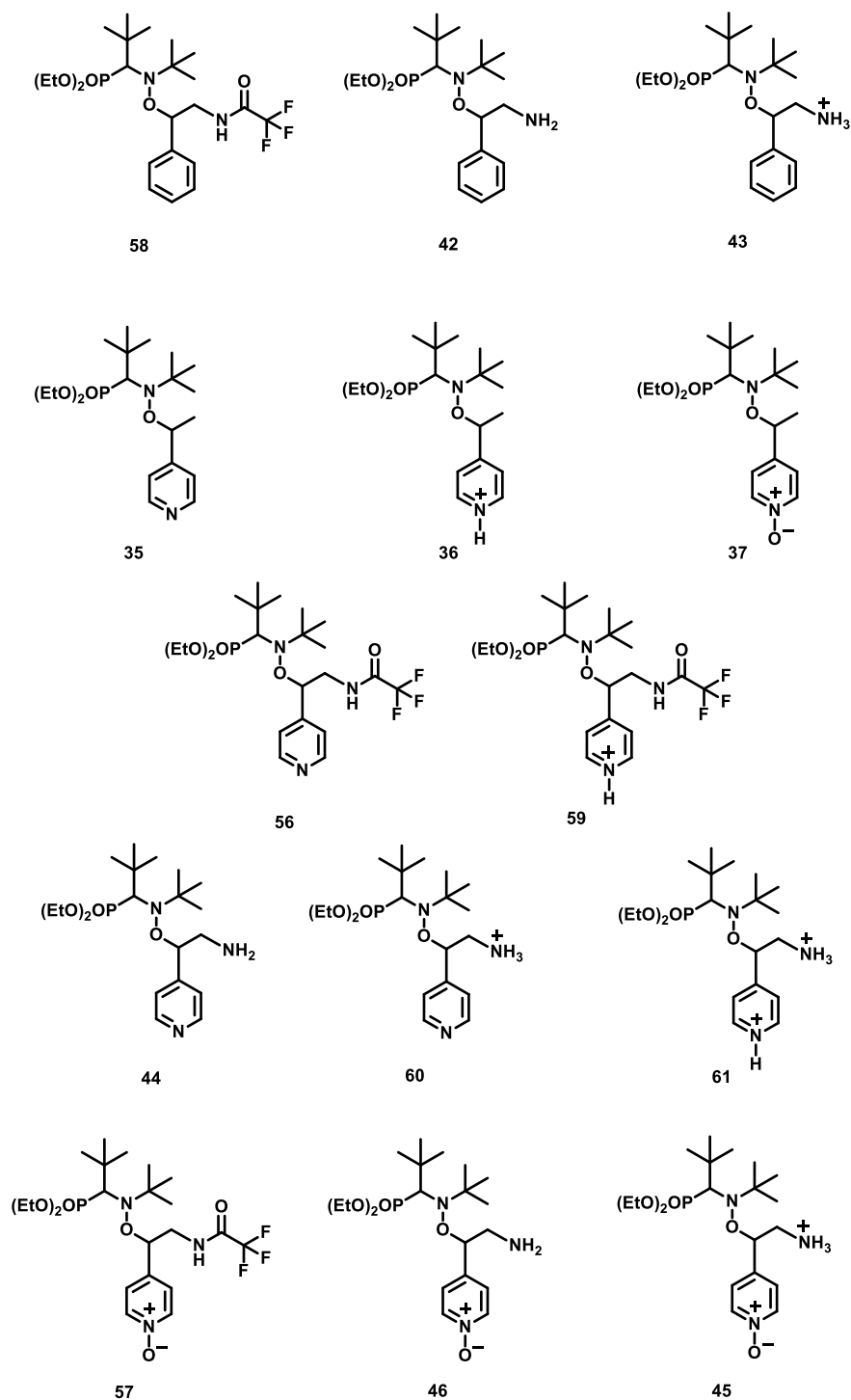
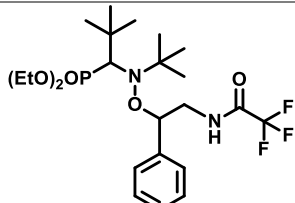
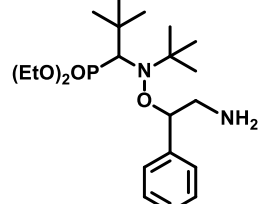
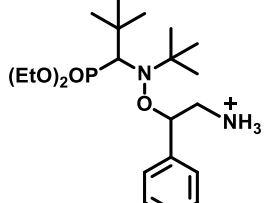
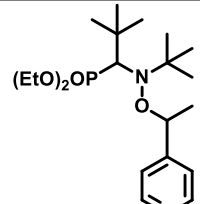
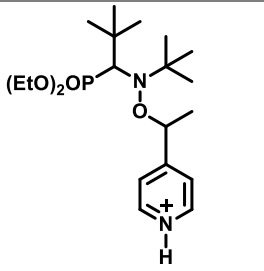
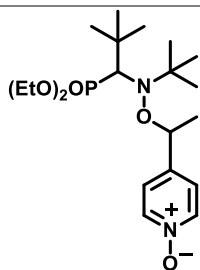
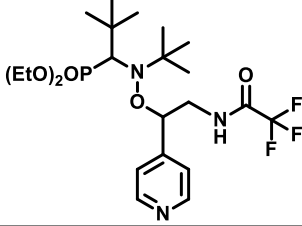
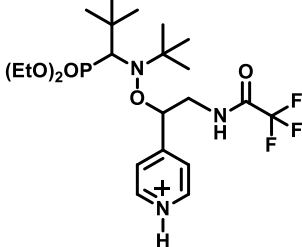
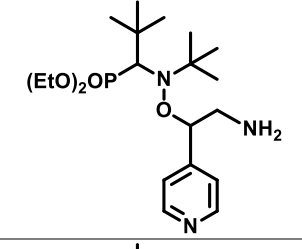
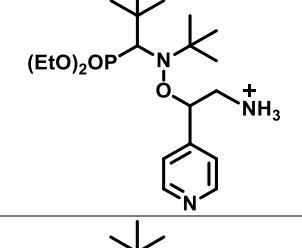
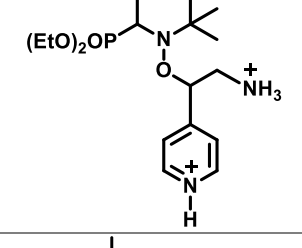
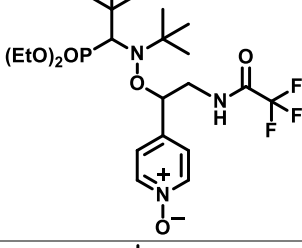
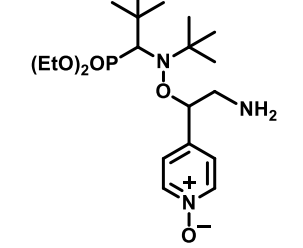
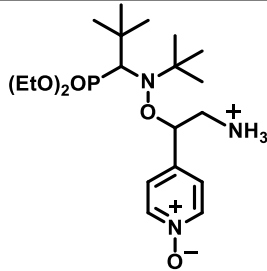


Figure 56 : schéma général des alcoxyamines mesurées

Le tableau suivant (2) résume les principaux résultats cinétiques obtenus lors de la mesure de la vitesse d'homolyse de la liaison NO–C des alcoxyamines en milieu aqueux.

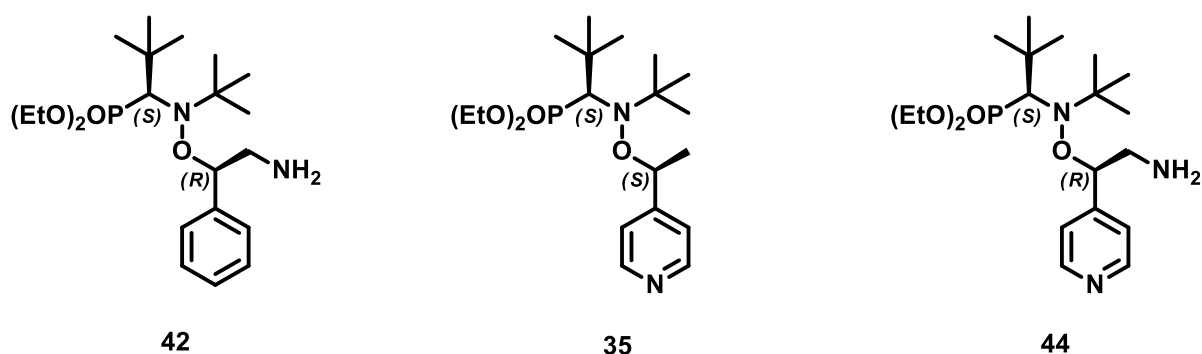
Alcoxyamines	Structures	Conditions	$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		$t_{1/2}$ à 37 °C	
			RR/SS	RS/SR	RR/SS	RS/SR
58		H <sub>2</sub> O/MeOH	121.6	125.8	10 j.	51 j.
42		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 10	122.5	122.7	14 j.	15 j.
43		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 6	116.3	119.2	1 j.	4 j.
35		H <sub>2</sub> O/MeOH	119.4	119.2	4 j.	4 j.
36		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 1	108.3	109.7	1 h.	2 h.
37		H <sub>2</sub> O	111.8	111.7	5 h.	5 h.

56		H <sub>2</sub> O/MeOH	118.0	121.3	3 j.	9 j.
59		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 1.88	109.1	110.3	2 h.	3 h.
44		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 10	119.0	119.8	4 j.	5 j.
60		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 6	112.4	115.6	7 h.	1 j.
61		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 1	103.8	106.5	15 min.	41 min.
57		H <sub>2</sub> O/MeOH	110.6	115.5	3 h.	23 h.
46		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 10	112.9	113.8	8 h.	12 h.

45		H <sub>2</sub> O/MeOH pH 6	105.9	108.3	33 min.	1 h.
----	---	-------------------------------	-------	-------	---------	------

**Tableau 2 : énergie d'activation ( $E_a$ ) et temps de demi-vie à 37 °C des alcoxyamines mesurées en milieu aqueux**

### a. Conformation et topologie des alcoxyamines mesurées



**Figure 57 : agencement spatial des molécules étudiées**

Dans cette étude, nous allons comparer les énergies d'activation de chaque alcoxyamine diastéréoisomériquement pure. Cependant, la discussion doit être reliée à l'agencement spatial de la molécule et les molécules comparées entre elles à stéréochimie identique. Or, dans le cas de l'alcoxyamine **35**, une inversion du centre stéréogène pour un même agencement spatial est observée. La comparaison devra donc tenir compte de cette inversion (Figure 57).

## b. Effet de la monoactivation

Les premières lignes de ce tableau montrent les résultats obtenus sur les alcoxyamines de référence en milieu aqueux.

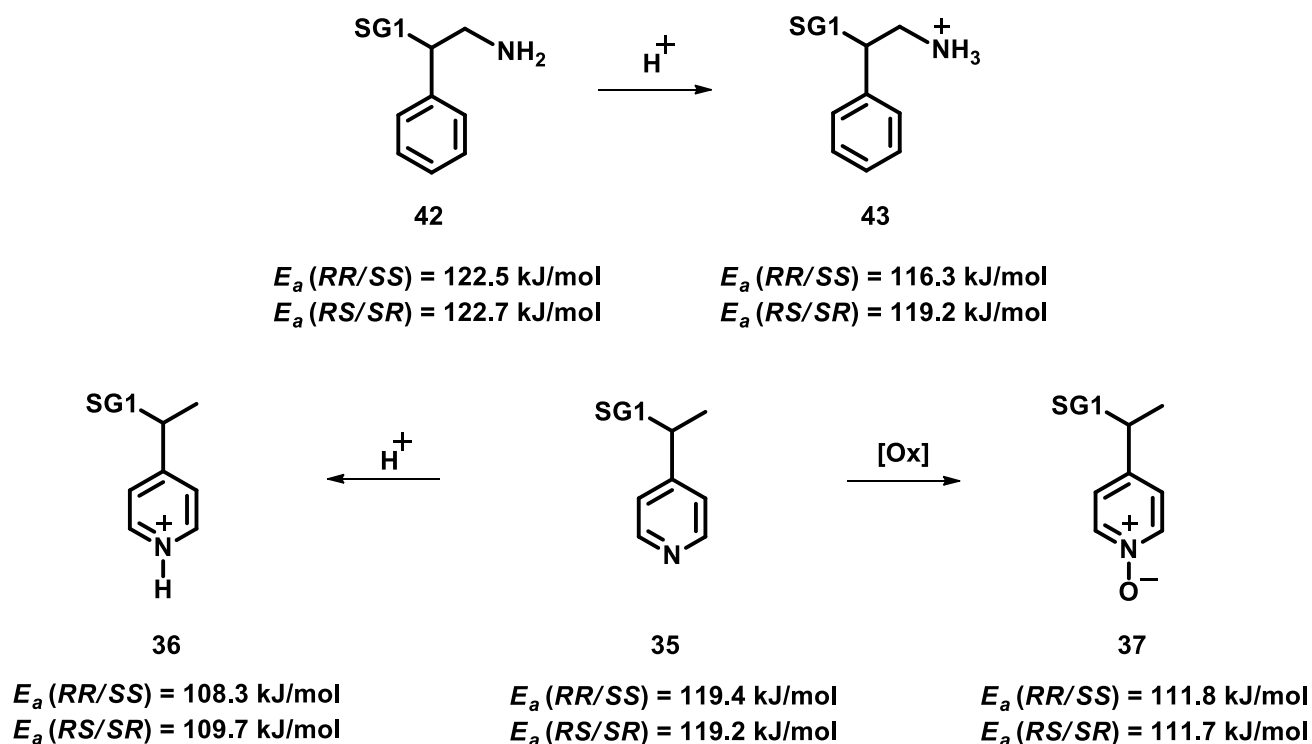


Schéma 57 : molécules étudiées

Tout d'abord, nous pouvons voir que l'alcoxyamine **42**, présentant une amine primaire, possède une énergie d'activation de 122.5 et 122.7 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère. La protonation en milieu acide fait chuter cette énergie à 116.3 kJ/mol pour le diastéréoisomère  $RR/SS$  et à 119.2 kJ/mol pour le  $RS/SR$ . Le gain d'énergie apporté par cette protonation est de 6.2 kJ/mol et de 3.5 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère (Schéma 57).

L'alcoxyamine **35**, présentant un noyau pyridine, a pu être activée de deux manières différentes. La première, par protonation, apporte une perte d'énergie d'environ 10 kJ/mol pour



chaque diastéréoisomère respectif. La seconde, par oxydation, a permis un abaissement de l'énergie d'activation de 7.5 kJ/mol de chaque diastéréoisomère.

### c. Effet de la protonation du noyau pyridine et de l'amine primaire

L'équation 12 nous montre que l'homolyse d'une liaison est directement reliée à la différence d'électronégativité ( $\chi$ ) des atomes formant la liaison. Si nous l'appliquons à nos molécules, il s'agit de la liaison NO-C. L'atome d'oxygène étant plus électronégatif que l'atome de carbone, la liaison sera d'autant plus affaiblie que des groupements électroattracteurs seront placés autour de ce carbone.

Concernant la protonation de l'amine primaire **42** (Schéma 58), l'ammonium formé **43** pourra augmenter l'électronégativité du carbone porteur de la fonction aminoxyle. Ce carbone se retrouvant déficient en électrons, l'énergie d'activation s'en verra abaissée.

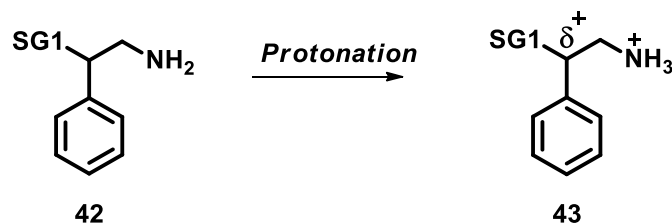


Schéma 58 : protonation de l'alcoxyamine **42**

Concernant le noyau pyridine **36** (Schéma 59), la charge positive, engendrée par la protonation, a la possibilité de se délocaliser le long du cycle aromatique pour se retrouver en  $\alpha$  du carbone de la liaison NO-C.

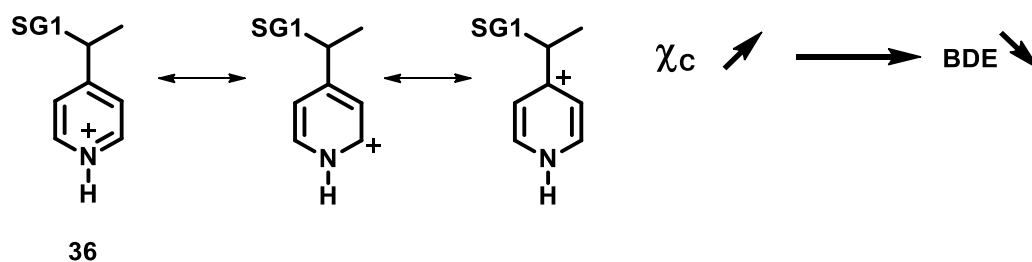
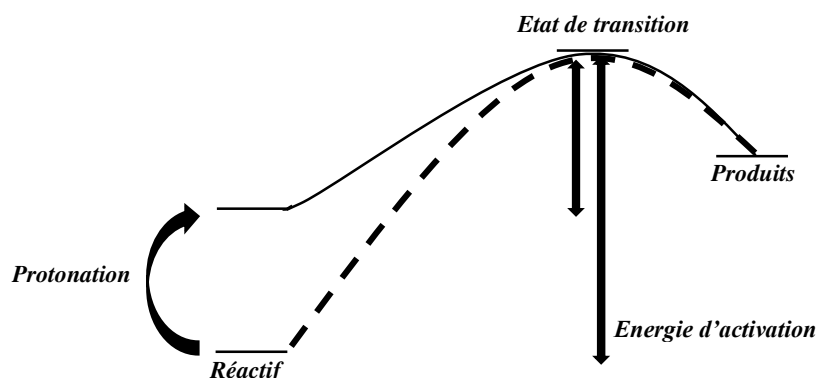


Schéma 59 : délocalisation de la charge

Cette charge étant proche du carbone porteur de la liaison NO–C, l'énergie d'activation sera abaissée par cette protonation.

Les résultats expérimentaux nous montrent que le gain d'énergie apporté par la protonation de l'amine primaire **42** est de 6.2 et 3.5 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère alors que pour la protonation du noyau pyridine **35**, il est de 10 kJ/mol. L'abaissement, plus conséquent, observé pour le noyau pyridine est dû à la position de la charge positive. En effet, elle se retrouve plus proche de la liaison NO–C lors de la protonation du noyau pyridine que lors de la protonation d'une amine, dont l'effet inductif électroattracteur est atténué par la présence d'un méthylène entre l'ammonium et la liaison NO–C.

L'effet de la protonation semble donc être principalement dû à un effet inductif électroattracteur apporté par la protonation des atomes d'azote présents sur ces deux types de molécules.



**Figure 58 : effet de la protonation**

Cette protonation induira une déstabilisation de l'alcoxyamine, ce qui conduit à un temps de demi-vie plus faible (Figure 58).

## d. Effet de l'oxydation du noyau pyridine

D'après les résultats expérimentaux, l'oxydation du noyau pyridine conduit à un abaissement de l'énergie d'activation de 7.5 kJ/mol de la liaison NO–C. Ce gain d'énergie peut être attribué à deux facteurs. Comme nous l'avons vu, un effet inductif peut entrer en ligne de compte. En effet, la charge positive que possède le zwitterion **37** pourra se délocaliser de la même façon que lors d'une protonation (Schéma 60).

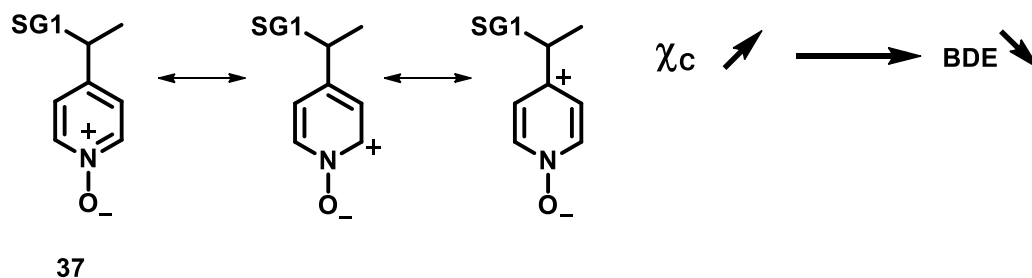


Schéma 60 : délocalisation de la charge positive

Cependant, le facteur prépondérant contrôlant l'homolyse de cette alcoxyamine reste un effet mésomère (Schéma 61).

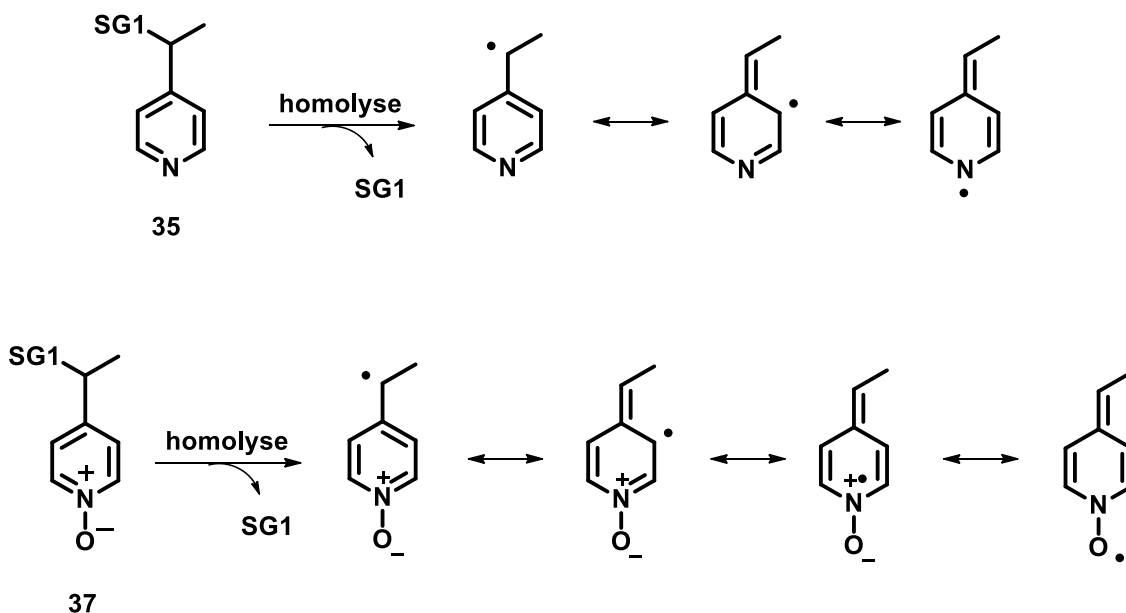
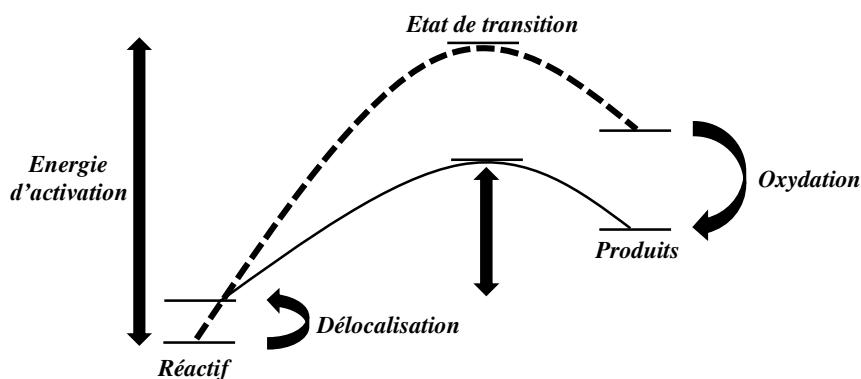


Schéma 61: formes mésomères des radicaux

Comme nous pouvons le remarquer sur le schéma précédent, après homolyse de l'alcoxyamine **37**, le radical obtenu possèdera trois formes mésomères. Après oxydation du noyau pyridine, l'existence d'une quatrième forme augmente fortement la stabilisation du radical (Schéma 61).



**Figure 59 : effet de la stabilisation du radical alkyle**

La stabilisation du radical formé par homolyse va engendrer une stabilisation de l'état de transition nécessaire à l'homolyse. La stabilisation de cet état de transition aura pour conséquence d'abaisser l'énergie d'activation de cette alcoxyamine et donc de réduire son temps de demi-vie (Figure 59).

### **e. Alcoxyamine présentant un groupement trifluoroacétamide**

Au cours de la synthèse, nous avons utilisé un groupement protecteur de type trifluoroacétamide. Ce groupement protecteur est intéressant pour notre étude physico-chimique. En effet, il permet de mimer la présence d'un peptide positionné sur l'amine primaire. De plus, ce groupement électroattracteur devrait activer l'alcoxyamine. Un peptide ne devrait pas être plus électroattracteur qu'un groupement trifluoroacétamide, on pourra ainsi obtenir la valeur minimale d'énergie d'activation possible lors de la formation d'une liaison amide.

L'alcoxyamine **58** présente un groupement trifluoroacétamide. Ce groupement ne semble pas fortement impacter la stabilité de ces molécules en milieu aqueux. Nous pouvons observer une perte de 0.9 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS*. Ce groupement a un effet stabilisant sur l'autre diastéréoisomère (*RS/SR*) puisque les résultats expérimentaux montrent une hausse de l'énergie d'activation de 3.1 kJ/mol. Cette hausse de l'énergie d'activation pourrait traduire un changement de conformation de la molécule.

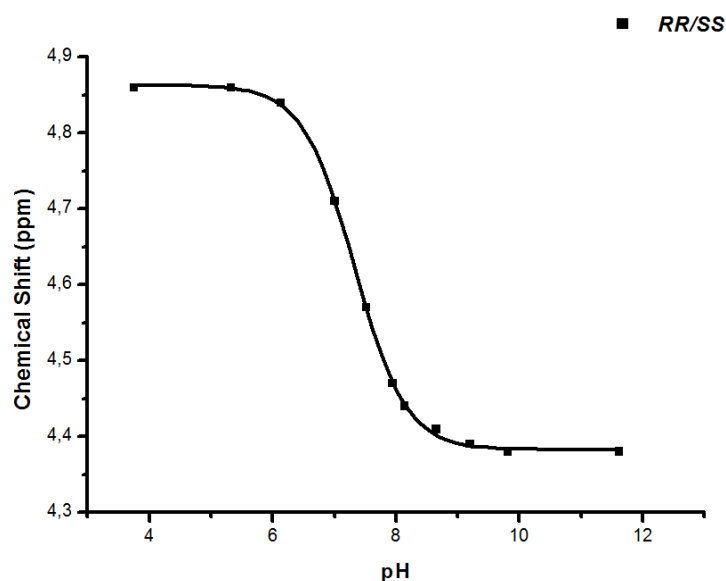
## **f. Combinaison des effets : double activation en milieu aqueux**

D'après les résultats expérimentaux, les effets mésomères et inductifs ont pu être quantifiés sur chaque molécule mono-activable :

- effet de la protonation du noyau pyridine : chute d'environ 10 kJ/mol
- effet de l'oxydation du noyau pyridine : chute d'environ 7.5 kJ/mol
- effet de la protonation de l'amine primaire : chute de 6.2 kJ/mol et 3.5 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère.

Si nous supposons que ces valeurs sont additives, l'effet d'une double protonation devrait abaisser l'énergie d'activation de 16,2 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 13.5 kJ/mol pour le *RS/SR*. L'oxydation du noyau pyridine suivie d'une protonation de l'amine primaire devrait, quant à elle, abaisser l'énergie d'activation de 13.7 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 11 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RS/SR*.

Afin de cibler le pH de mesure, le  $pK_a$  de chaque molécule a été déterminé expérimentalement. L'alcoxyamine mesurée est diluée dans un mélange  $D_2O/MeOD$  et le pH est ajusté par du  $DCl$  et du  $NaOD$  puis nous enregistrons des spectres RMN du proton. Le déplacement chimique des protons aromatiques ou de  $CH_2N$  étant directement dépendant du pH de mesure, il est possible de tracer une courbe de titration (Figure 60).



**Figure 60 : exemple de mesure de  $pK_a$**

Cependant, la réaction mise en jeu lors de cette mesure n'est pas une protonation mais une deutération. Les valeurs de pH mesurées ( $pH^*$ ) doivent donc être corrigées par la relation 16:<sup>57</sup>

$$pH = 0.929 \cdot pH^* + 0.42 \quad (16)$$

Les valeurs de chaque mesure de  $pK_a$  sont reportées dans le tableau 3.

Composés	Structures	$pK_a$ RR/SS	$pK_a$ RS/SR
4-éthylpyridine		-	6.03
2-phényléthylamine		-	9.83
49		-	4.41/8.53

<sup>57</sup> Krężel, A.; Bal, W. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 161.

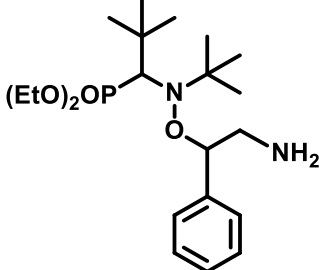
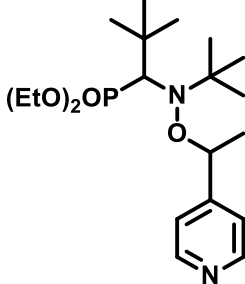
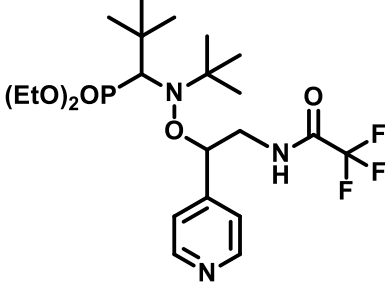
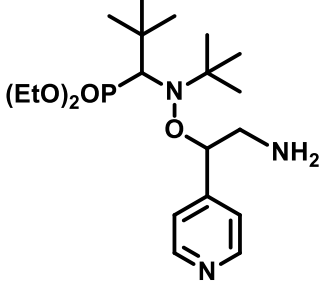
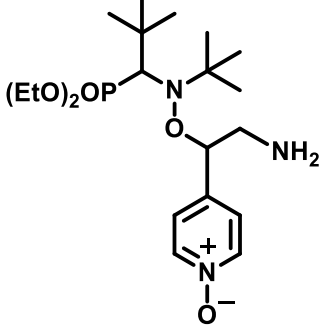
42		8.33	-	8.73
35		4.67	-	4.70
56		3.96	-	3.89
44		3.40/7.64	-	3.34/8.05
46		7.32	-	7.97

Tableau 3 : pK<sub>a</sub> des molécules étudiées

Le premier constat apporté par ces résultats est que chaque  $pK_a$  mesuré se retrouve inférieur aux valeurs de la 4-éthylpyridine (6.03) et de la 2-phényléthylamine (9.83). Cette baisse atteste d'une perte de basicité de l'amine primaire et du noyau pyridine. Elle peut être attribuée à l'effet électroattracteur de la partie nitroxyde. Il impactera donc directement la basicité des centres protonables en abaissant leurs  $pK_a$ .

De plus, on peut remarquer une valeur plus faible de  $pK_a$  lorsque l'on considère les molécules doublement activables (**44**; **46**; **56**) par rapport à leurs équivalents mono-activables (**35**; **42**). Pour les mêmes raisons, les alcoxyamines, doublement activables, possèdent plus de groupements électroattracteurs, ce qui abaissera le  $pK_a$  des sites basiques de ces molécules.

Ce tableau nous indique aussi que nous devons nous placer à un pH de 6 pour protoner l'amine primaire et à un pH entre 1 et 2 pour protoner la pyridine.

### g. Résultat de la protonation sur les alcoxyamines doublement activables

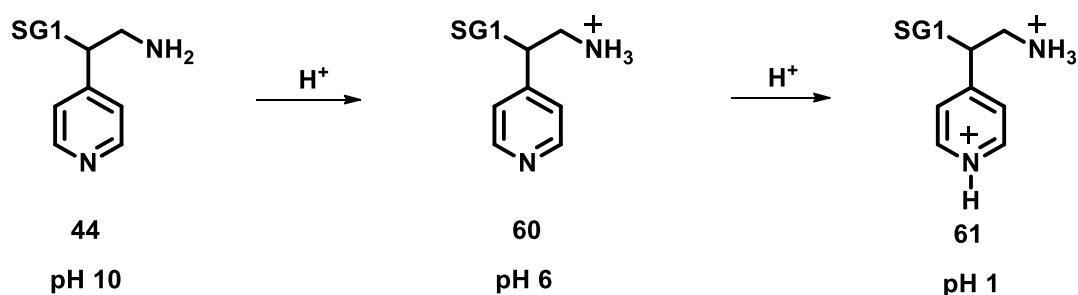


Schéma 62 : sélectivité de la protonation en fonction du pH

Les  $pK_a$  des deux sites basiques déterminés, nous pouvons définir un pH de mesure qui nous permet de quantifier, d'une part, l'énergie d'activation de la molécule neutre **44** à pH 10 et, d'autre part, l'effet de la mono protonation **60** à pH 6 et de la double protonation **61** à pH 1 (Schéma 62).

Cependant, le  $pK_a$  de l'amine étant supérieur à celui de la pyridine, il nous est impossible de protoner la pyridine seule sur cette molécule. Pour pallier ce problème et connaître l'effet de la protonation de la pyridine seule sur cette molécule, nous avons étudié cette réaction sur la molécule **56**, dont la fonction amine est masquée sous la forme d'un trifluoroacétamide.



## h. Protonation de la pyridine

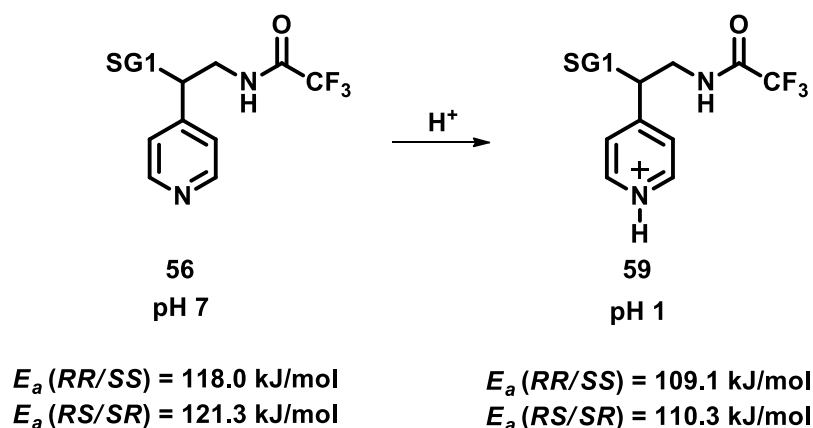


Schéma 63 : protonation de la pyridine seule

L'alcoxyamine **56** protégée possède une énergie d'activation de 118.0 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 121.3 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RS/SR*. La protonation du noyau pyridine permet d'abaisser ces énergies à 109.1 kJ/mol (*RR/SS*) et à 110.3 kJ/mol (*RS/SR*) (Schéma 63). Nous observons donc un abaissement de l'énergie d'activation d'environ 10 kJ/mol par cette protonation. Cet abaissement est tout à fait en accord avec les résultats obtenus sur la protonation de l'alcoxyamine **35**.

## i. Protonation de l'amine primaire

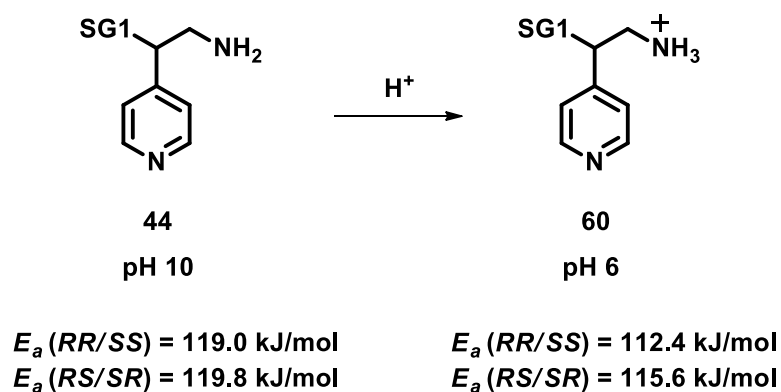
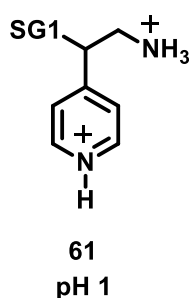


Schéma 64 : effet de la mono protonation

Une première mesure de l'alcoxyamine **44** a été menée pour obtenir l'énergie d'activation de cette molécule neutre à pH 10. Nous avons obtenu une énergie d'activation de 119.0 kJ/mol (*RR/SS*) et de 119.8 kJ/mol (*RS/SR*). La mesure de cette molécule à pH 6 nous permet d'abaisser cette énergie d'activation à 112.4 (*RR/SS*) et 115.6 (*RS/SR*) kJ/mol, soit une baisse de 6.6 et de 4.2 kJ/mol, respectivement (Schéma 64). Là encore, ces baisses sont totalement en accord avec les résultats de monoactivation sur l'alcoxyamine **42** qui prévoyaient des baisses de 6.2 et 3.5 kJ/mol.

## j. Double protonation



$$E_a(RR/SS) = 103.8 \text{ kJ/mol}$$

$$E_a(RS/SR) = 106.5 \text{ kJ/mol}$$

**Figure 61 : double protonation**

La mesure à pH 1 de l'alcoxyamine **44** permet d'obtenir la valeur de double activation par double protonation. L'énergie d'activation obtenue est de 103.8 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 106.5 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RS/SR* (Figure 61).

L'énergie d'activation de la molécule neutre **44** est de 119.0 et 119.8 kJ/mol pour les diastéréoisomères *RR/SS* et *RS/SR*. Cet abaissement de 15.2 kJ/mol (*RR/SS*) et de 13.3 kJ/mol (*RS/SR*) pour chaque diastéréoisomère correspond à l'addition de chaque effet et est en accord avec les résultats obtenus sur les molécules mono activables **35** et **42**.

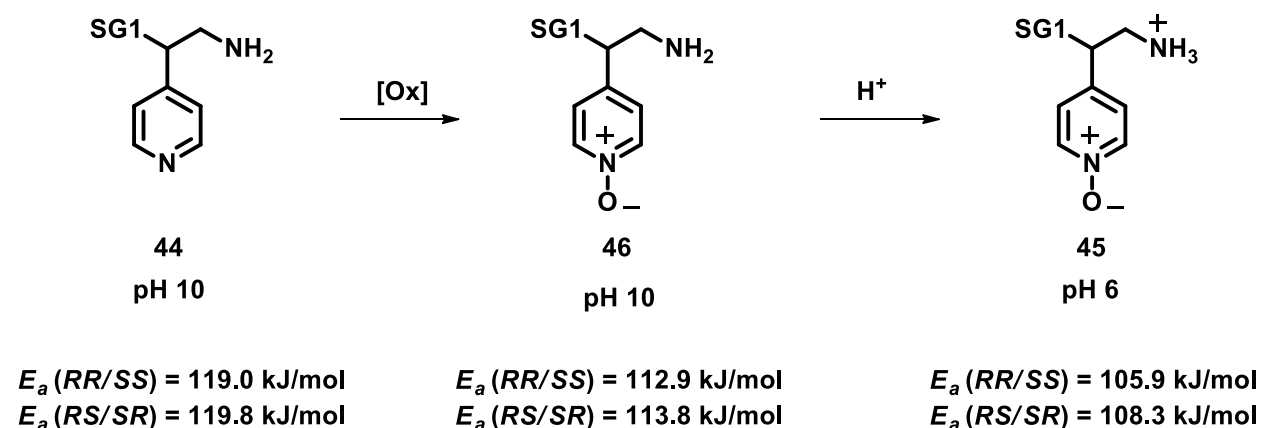
On peut donc affirmer que les deux protonations en milieu aqueux sont additives. Elles permettent d'abaisser grandement le temps de demi-vie de nos molécules. En effet, pour le

diastéréoisomère *RR/SS*, on passe d'un temps de demi-vie de 4 jours sous forme neutre à un temps de demi-vie de 15 minutes sous forme doublement protonée. Pour le diastéréoisomère *RS/SR*, on passe de 5 jours à 1 jour.

Le temps de demi-vie, de 15 minutes, que présente la molécule **61** lorsqu'elle est doublement protonée serait idéal pour l'application en diagnostic que nous recherchons. Cependant, pour obtenir cette double activation, on doit descendre à un pH très faible (inférieur à 2). Or, ce pH sera très difficile à atteindre dans le corps humain.

Un second mode d'activation a été envisagé pour obtenir une alcoxyamine activable en milieu biologique. Le mode d'activation choisi a été l'oxydation du noyau pyridine.

### k. Oxydation du noyau pyridine puis protonation successive



**Schéma 65 : mono et double activation par oxydation puis protonation**

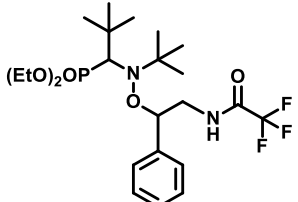
L'effet de l'oxydation du noyau pyridine peut être directement mesuré en milieu aqueux en se plaçant à pH 10 (Schéma 65). Par comparaison avec l'alcoxyamine **44**, l'oxydation apporte une baisse de l'énergie d'activation de 6 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère de **46**. En effet, on passe de 119.0 kJ/mol à 112.9 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 119.8 kJ/mol à 113.8 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RS/SR*.

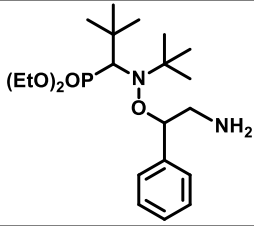
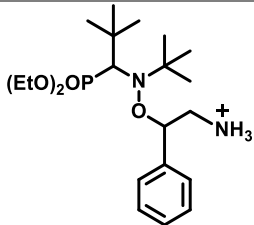
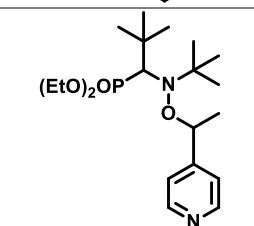
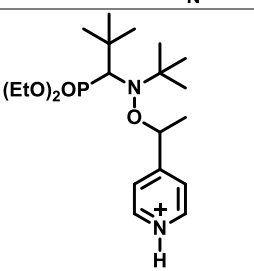
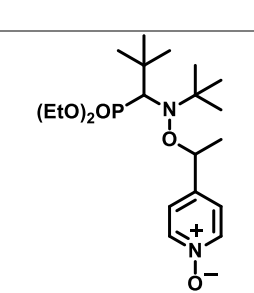
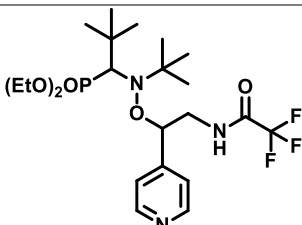
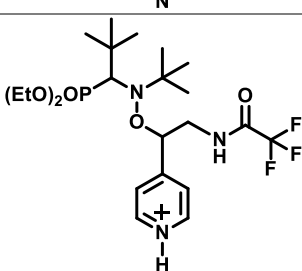
La protonation de cette alcoxyamine **46** à pH 6 (Schéma 65) abaisse l'énergie d'activation à 105.9 kJ/mol (*RR/SS*) et 108.3 kJ/mol (*RS/SR*), soit une diminution de 7 kJ/mol (*RR/SS*) et de 5.5 kJ/mol. Ces valeurs d'énergies d'activation restent en accord avec les valeurs obtenues sur la mono activation.

L'effet de l'oxydation et de la protonation sur nos alcoxyamines semble donc lui aussi se comporter de manière additive puisque les valeurs prévues sont en total accord avec les valeurs expérimentales. Cette nouvelle double activation nous a permis de faire chuter les temps de demi-vie de nos molécules de 4 jours pour **44** à 33 minutes pour **45** pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 5 jours à 1 heure pour le diastéréoisomère *RS/SR*. Ce mode d'activation semble viable biologiquement puisque la première activation peut être obtenue par une oxydation du noyau pyridine au préalable en laboratoire. La seconde activation peut, quant à elle, être obtenue directement *in vivo* car le  $pK_a$  de l'amine primaire de l'alcoxyamine **45** reste légèrement supérieur au pH physiologique.

### 3. Résultats cinétiques en milieu organique

Par la suite, une étude cinétique a été effectuée en milieu organique. Le solvant choisi pour cette étude est le *tertio*-butylbenzène. Il a été retenu principalement pour deux raisons. D'une part, il permet une large gamme de solubilité et de température de mesure. D'autre part, des corrélations prédictives de constantes de dissociation d'alcoxyamines utilisant des mesures effectuées dans ce solvant ont été développées au laboratoire. L'essentiel des résultats cinétiques en milieu organique sont regroupés dans le tableau suivant :

Composés	Structures	Conditions	$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )		$t_{1/2}$ à 37 °C	
			<i>RR/SS</i>	<i>RS/SR</i>	<i>RR/SS</i>	<i>RS/SR</i>
58		<i>t</i> -BuPh	117.5	128.0	2 j.	121 j.

42		<i>t</i> -BuPh	126.3	132.9	63 j.	808 j.
43		<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	112.7	122.6	8 h.	15 j.
35		<i>t</i> -BuPh	123.0	123.0	17 j.	17 j.
36		<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	115.4	115.6	22 h.	1 j.
37		<i>t</i> -BuPh	113.9	113.6	12 h.	11 h.
56		<i>t</i> -BuPh	123.8	123.4	24 j.	21 j.
59		<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	117.5	121.1	2 j.	8 j.

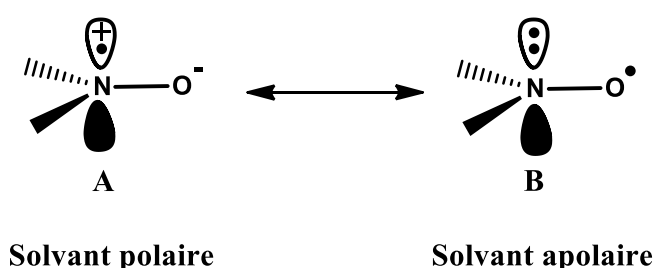
44		<i>t</i> -BuPh	123.0	123.7	17 j.	23 j.
60		<i>t</i> -BuPh + 1 eq. TFA	119.9	121.3	5 j.	9 j.
61		<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	119.6	119.9	5 j.	5 j.
		<i>t</i> -BuPh + 3 eq. TFA	119.8	119.7	5 j.	5 j.
57		<i>t</i> -BuPh	106.1	114.2	36 min.	14 h.
46		<i>t</i> -BuPh	114.6	116.1	16 h.	1 j.
45		<i>t</i> -BuPh + 2 eq. TFA	109.5	110.6	2 h.	3 h.

**Tableau 4 : énergies d'activation ( $E_a$ ) et temps de demi-vie à 37 °C des alcoxyamines mesurées en milieu organique. (TFA : acide trifluoroacétique)**

## a. Effet de solvant

Hormis quelques exceptions, nous constatons que les valeurs regroupées dans le tableau sont toutes supérieures de quelques kJ/mol par rapport aux valeurs en milieu aqueux.

Nous avons pu voir dans la partie précédente que l'énergie d'activation d'une alcoxyamine pouvait être modulée par deux stabilisations différentes, à savoir la stabilisation des produits ou des réactifs. L'effet de solvant intervient principalement sur les produits. En effet, comme nous avons pu le voir sur la partie 1, un nitroxyde possède deux formes de résonance. (Schéma 66).

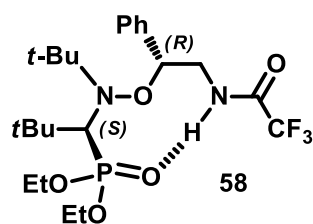


**Schéma 66 : formes mésomères d'un nitroxyde**

L'augmentation du poids de la forme B dans un solvant apolaire déstabilisera le nitroxyde et, par conséquent, l'état de transition sera plus haut en énergie. Cette augmentation se traduira par une légère hausse de l'énergie d'activation de l'alcoxyamine mesurée. De plus, une moins bonne solvatation des produits et de l'état de transition en milieu organique peut également conduire à cette hausse.

## b. Présence d'une liaison hydrogène

L'analyse par diffraction des rayons X de l'alcoxyamine **58** révèle une liaison hydrogène intramoléculaire à 9 chaînons entre le proton de l'amide et l'oxygène du phosphonate pour le diastéréoisomère *RS/SR* (Figure 62).



**Figure 62 : liaison hydrogène intramoléculaire**

La présence de cette liaison hydrogène, uniquement possible en milieu apolaire, aura un effet direct sur l'énergie d'activation de l'alcoxyamine. Cette liaison peut être assimilée à une seconde liaison à rompre lors de l'homolyse de l'alcoxyamine. L'énergie d'activation de cette molécule sera donc plus élevée.

L'analyse par diffraction des rayons X de l'autre diastéréoisomère ne révèle aucune liaison hydrogène intramoléculaire et nous pouvons observer une différence d'énergie d'activation entre les deux diastéréoisomères de l'alcoxyamine **58** de 6.6 kJ/mol dans le *tertio*-butylbenzène. La mesure de cette même alcoxyamine en milieu polaire protique (H<sub>2</sub>O/MeOH) illustre parfaitement ce phénomène car la différence d'énergie d'activation entre ces deux mêmes diastéréoisomères est négligeable (0.2 kJ/mol).

Comme nous avons pu le constater lors de la synthèse de l'alcoxyamine doublement activable, l'analyse par diffraction des rayons X ne révèle aucune liaison hydrogène intramoléculaire. Cependant, cette analyse est réalisée en phase solide. Pour avoir une idée de la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires en solution, une étude par RMN du phosphore a été menée sur un mélange des deux diastéréoisomères de l'alcoxyamine **44** (Tableau 5).

Solvant RMN	$\delta_p$		$\Delta\delta_p$
	<i>RS/SR</i>	<i>RR/SS</i>	
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	25,70	24,31	1,39
Acétone- <i>d</i> <sub>6</sub>	26,00	24,59	1,41
Pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub>	25,70	24,22	1,48
DMF- <i>d</i> <sub>7</sub>	25,80	24,29	1,51
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	26,34	24,82	1,52
Acétonitrile - <i>d</i> <sub>3</sub>	26,11	24,51	1,60
Chloroforme- <i>d</i> <sub>3</sub>	25,91	24,17	1,74
Benzène- <i>d</i> <sub>6</sub>	25,71	23,96	1,75

**Tableau 5 : étude de liaisons hydrogènes en solution**



La différence entre le déplacement chimique de chaque diastéréoisomère ( $\Delta\delta_p$ ) semble constante. Or, si nous avons eu une liaison hydrogène, cette différence aurait dû être beaucoup plus prononcée (environ 2 ppm entre le solvant le moins polaire et le solvant le plus polaire).<sup>58</sup> Cette liaison ne semble donc pas exister en solution.

De plus, l'absence de cette liaison supplémentaire est confirmée par l'étude cinétique en milieu apolaire. En effet, de très faibles différences d'énergies d'activation entre les diastéréoisomères ont été relevées.

### c. Effets de la protonation et de l'oxydation sur les alcoxyamines monoactivables en milieu organique

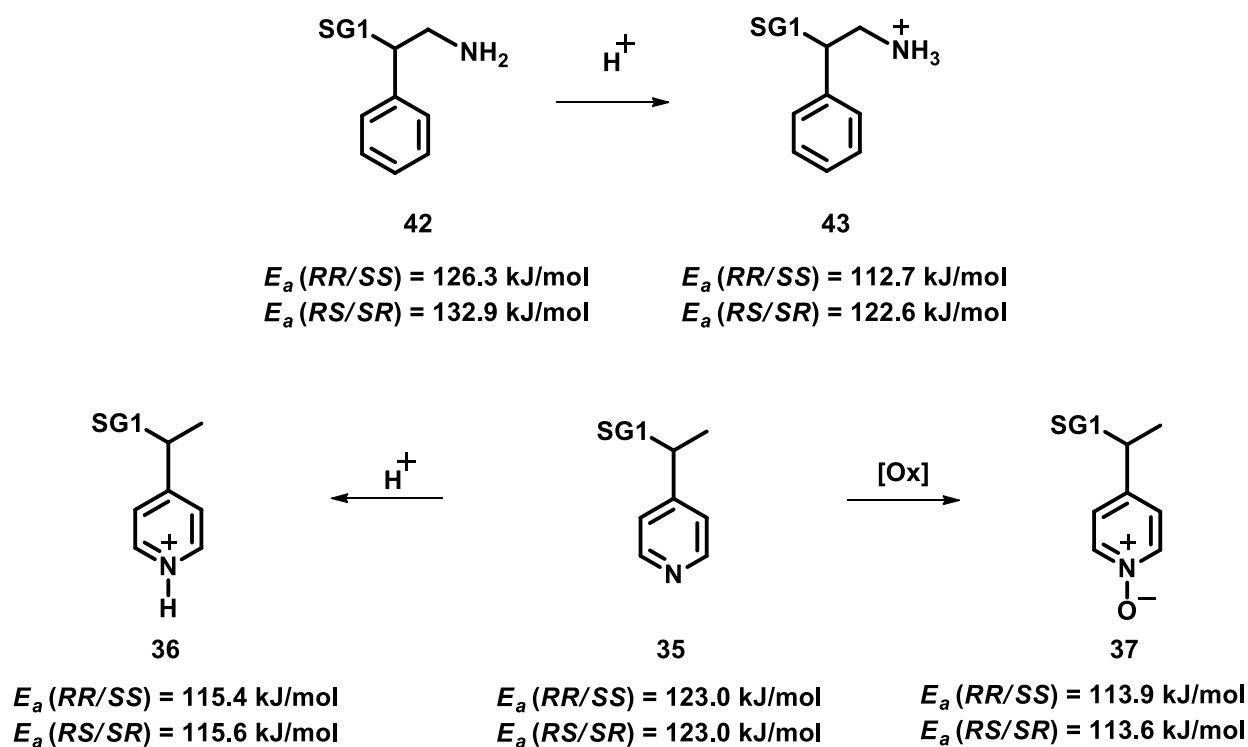
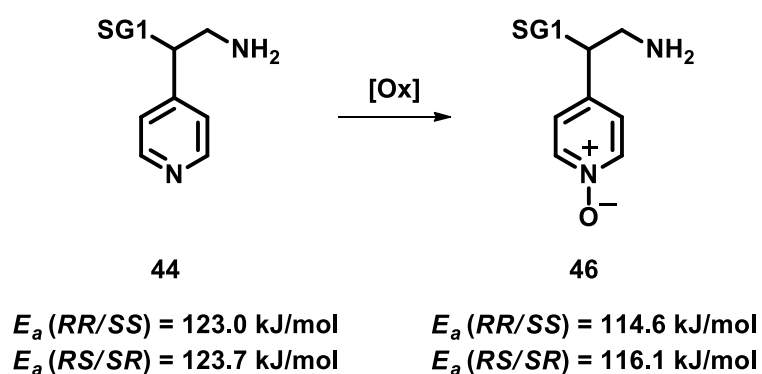


Schéma 67 : alcoxyamine monoactivée par protonation et oxydation

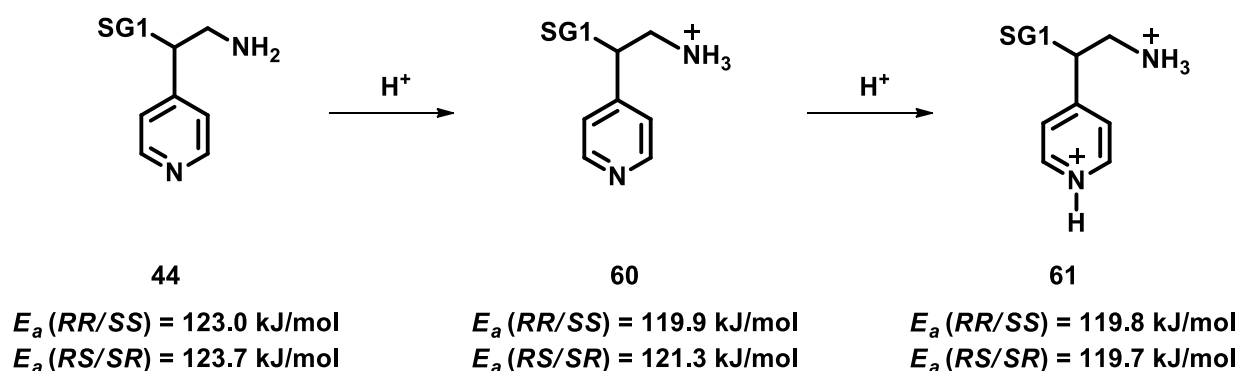
<sup>58</sup> Brémond, P. ; Butscher, T. ; Roubaud, V. ; Siri, D. ; Viel, S. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 10524.

La protonation par de l'acide trifluoroacétique de l'alcoxyamine **42** présentant une amine primaire conduit à une baisse de l'énergie d'activation de 13.6 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 10.3 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RS/SR*. Celle de l'alcoxyamine **35**, par protonation du noyau pyridine, conduit à une baisse d'environ 8 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère. L'oxydation du noyau pyridine de **35** abaisse l'énergie d'activation d'environ 8 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère (Schéma 67). Ce constat établi, nous pourrions prévoir l'effet de chaque activation par protonation (baisse de 10 à 14 kJ/mol selon le diastéréoisomère), double protonation (baisse de 18 à 22 kJ/mol) et oxydation suivie d'une protonation successive (baisse de 18 à 22 kJ/mol).



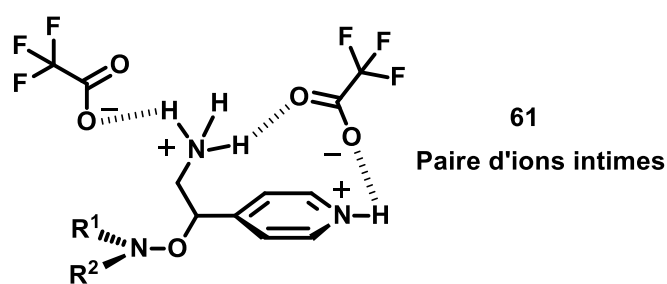
**Schéma 68 : oxydation du noyau pyridine**

L'activation de l'alcoxyamine **44** par oxydation du noyau pyridine conduit à la formation de l'alcoxyamine **46** (Schéma 68). Sa mesure conduit à une énergie d'activation de 114.6 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RR/SS* et de 116.1 kJ/mol pour le diastéréoisomère *RS/SR*. Sachant que l'alcoxyamine **44** possède une énergie d'activation de 123 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère, nous observons une baisse d'environ 8 kJ/mol après oxydation. Cette valeur reste tout à fait en accord avec les valeurs obtenues pour l'alcoxyamine **35**. Comme décrit précédemment, ce gain d'énergie provient principalement d'une stabilité du radical formé par effet mésomère (Schéma 61).



### Schéma 69 : mono et double protonation en milieu organique

Cependant, l'effet de la protonation de l'amine primaire et du noyau pyridine offre des résultats en deçà de ceux attendus (Schéma 69). La mesure de l'alcoxyamine **44** avec 1 équivalent de TFA nous montre une baisse d'environ 3 kJ/mol. Cette baisse correspond à la protonation de l'amine primaire **60** puisqu'elle reste le site le plus basique de cette molécule. La mesure à 2 et 3 équivalents de TFA ne montre, quant à elle, aucune diminution supplémentaire de l'énergie d'activation. Cette faible baisse de l'énergie d'activation lors de la double protonation peut être attribuée à un effet de sel (Figure 63).

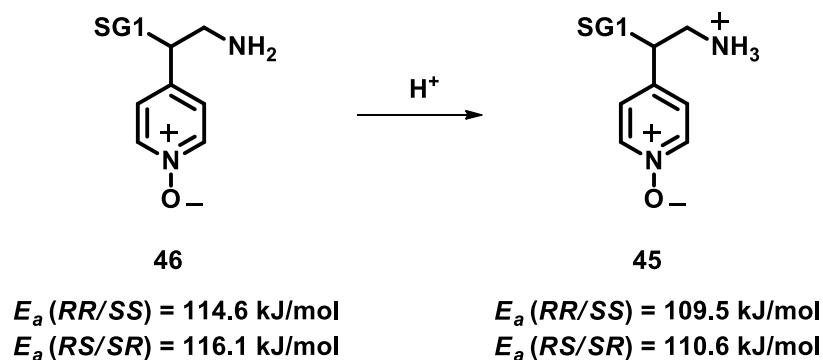


**Figure 63 : effet de paire d'ions**

En effet, en milieu organique apolaire, l'anion carboxylate du trifluoroacétate se retrouve très proche de son cation.<sup>59</sup> L'effet inductif qui devrait découler de cette protonation s'en retrouve alors amoindri car les charges apportées par la formation du sel se compensent. L'effet de cette paire d'ions intimes se retrouve exacerbé lors de la seconde protonation

<sup>59</sup> Audran, G. ; Brémond, P. ; Marque, S.R.A. ; Obame, G. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7754.

(protonation de la pyridine) qui n'offre aucune baisse d'énergie d'activation. Comme illustré dans la figure précédente, un maintien de l'anion par l'ammonium pourrait placer le carboxylate en bonne position pour contrer la charge positive et limiter voire annihiler (dans le cas de la protonation du noyau pyridine) l'effet inductif électroattracteur qu'elle génère.



**Schéma 70 : protonation de l'amine primaire 46**

La protonation de l'amine primaire de l'alcoxyamine **46** abaisse l'énergie d'un peu plus de 5 kJ/mol pour chaque diastéréoisomère (Schéma 70). Cet effet n'est pas aussi fort que celui obtenu pour l'alcoxyamine **42**. Cependant, il reste du même ordre que la diminution observée en milieu aqueux. Ceci nous conforte dans l'idée que nous avons bien un effet de sel lors de la protonation du noyau pyridine. En effet, en milieu aqueux il a été reporté dans notre équipe que la paire d'ions est séparée.<sup>59</sup> Cette compensation ne peut plus exister lorsque la molécule est oxydée et nous observons les mêmes baisses d'énergies d'activation que lors de la protonation de l'amine primaire en milieu aqueux. L'effet de sel n'intervient donc que sur le noyau pyridine.

Les effets sur les énergies d'activation en milieu organique ne semblent donc pas additifs comme nous avons pu le montrer en milieu aqueux. Cependant, cette mesure nous a permis de mettre en évidence trois effets très importants jouant sur la constante de vitesse de dissociation des alcoxyamines : l'effet de solvant, l'effet d'une liaison hydrogène intramoléculaire et l'effet de la protonation.

## 4. Conclusion

Cette étude cinétique a permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes contrôlant la vitesse d'homolyse des alcoxyamines. L'étude en milieu organique apolaire nous a permis d'aborder les effets de sel ou de liaison hydrogène, celle en milieu aqueux, les effets mésomères et inductifs. En corrélant ces deux séries de résultats, nous avons mis en évidence un effet de solvant sur l'homolyse des alcoxyamines.

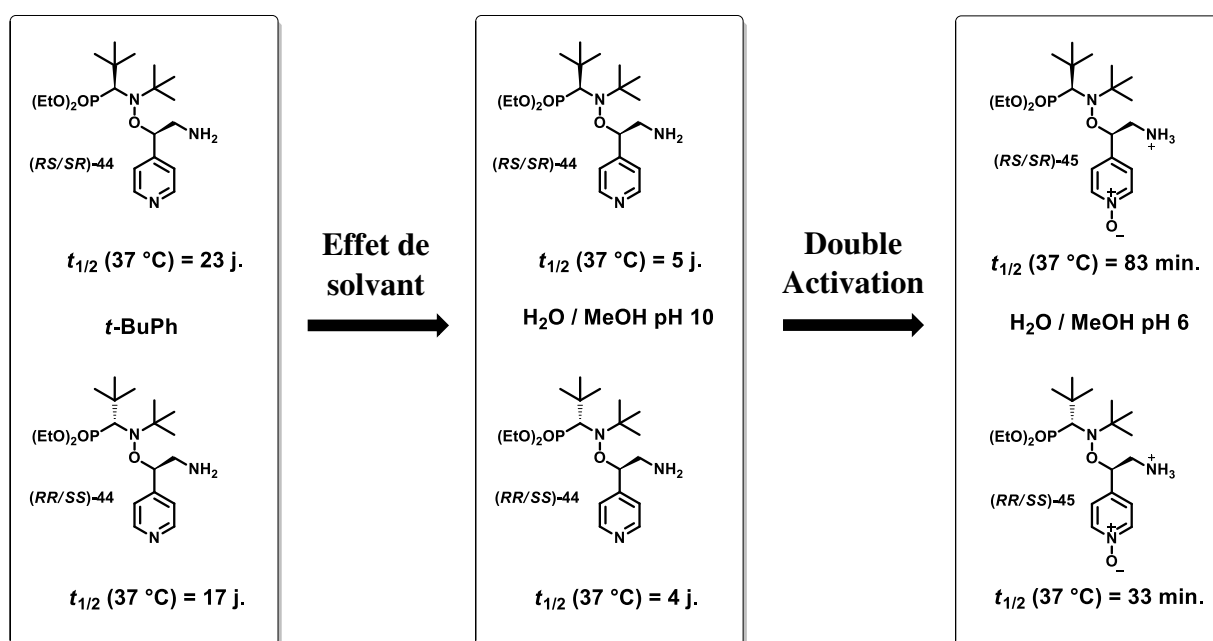


Figure 64 : bilan des effets

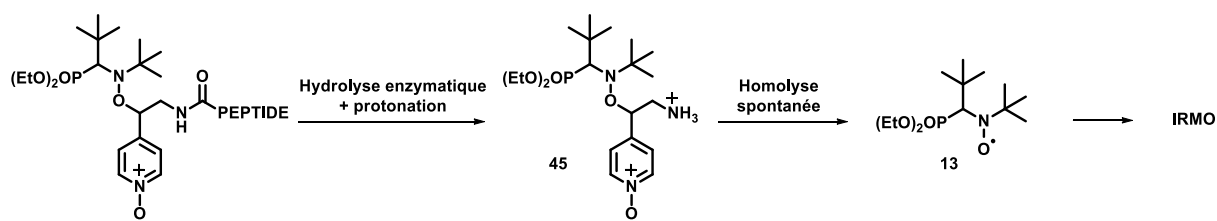
Les résultats cinétiques montrent que cet effet de solvant a permis d'abaisser d'un facteur 4 les temps de demi-vie à 37 °C puisque nous passons de 23 jours et 17 jours pour chaque diastéréoisomère à 5 et 4 jours.

L'effet de la double activation par oxydation du noyau pyridine et protonation de l'amine primaire **44** en milieu aqueux à pH 6 nous a offert une chute drastique des temps de demi-vie d'un facteur 8 pour chaque diastéréoisomère (Figure 64).

Cependant, seul le diastéréoisomère *RR/SS* de l'alcoxyamine **45** a un temps de demi-vie assez faible à température corporelle (33 minutes) pour une application dans notre stratégie

diagnostique. De plus, la première activation par protonation peut être obtenue au préalable au laboratoire. La seconde activation par protonation de l'amine primaire peut, quant à elle, être obtenue *in vivo* puisque le  $pK_a$  de cette amine sera toujours supérieur au pH corporel.

En revanche, cette alcoxyamine ne possède aucune sélectivité. Pour pallier ce problème, nous avons choisi de synthétiser une alcoxyamine présentant une partie pseudo-peptidique qui servira de modèle. Ce pseudo-peptide servira tout d'abord à masquer la fonction amine empêchant ainsi sa protonation et donc la seconde activation de l'alcoxyamine. De plus, après hydrolyse enzymatique, celle-ci sera révélée puis immédiatement protonée, ce qui provoquera l'homolyse rapide. L'homolyse de cette molécule permettra alors de pratiquer une expérience d'IRMO (Schéma 71).



**Schéma 71 : principe recherché**

## V. Alcoxyamine pour le diagnostic

Le pseudo-peptide que nous avons choisi pour l'application en diagnostic présente un enchaînement phénylalanine-acide glutarique (Figure 65). Ce choix a été fait parce que ce groupement est connu pour être assez facilement hydrolysé enzymatiquement par une chymotrypsine.<sup>60,61,62</sup>

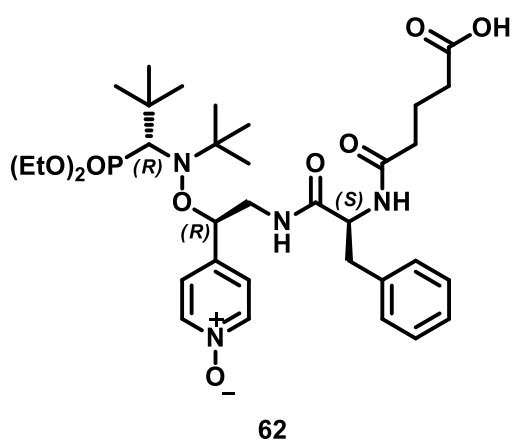


Figure 65 : alcoxyamine cible

<sup>60</sup> Erlanger, B. F. ; Edel, F. ; Cooper, A. G . *Archives of Biochem and Biophy*, **1966**, 115, 206.

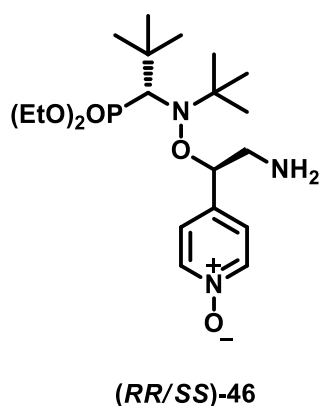
<sup>61</sup> DelMar, E. G. ; Largman, C. ; Brodrick, J. W . Geokas, M. C. *Analytical Biochemistry*, **1979**, 99, 316.

<sup>62</sup> Jakubke H.-D. ; Däumer, H., Könnecke, A. ; Kuhl, P. ; Fischer, J. *Birkhäuser Verlag*, **1980**, 36, 1039.

# 1. Synthèse de l'alcoxyamine cible

## a. Couplage de la phénylalanine

Nous avons poursuivi la synthèse sur l'alcoxyamine présentant la vitesse d'homolyse la plus rapide à température corporelle. Les résultats les plus convaincants ont été obtenus sur le diastéréoisomère (*RR/SS*)-**46** qui, une fois protoné, possède un temps de demi-vie de 33 minutes (Figure 66).



**Figure 66 : alcoxyamine de départ**

La liaison peptidique est obtenue par couplage de l'alcoxyamine **46** sur la L-phénylalanine dont l'amine est protégée par un groupement Fmoc. L'acide est activé par le diisopropylcarbodiimide (DIC) et de l'hydroxybenzotriazole (HOBt). La phénylalanine étant énantiomériquement pure et de configuration absolue *S* et l'alcoxyamine étant racémique, ce couplage conduit à la formation de deux diastéréoisomères énantiomériquement purs (1 : 1) de configuration absolue *RRS* et *SSS*. Une séparation par HPLC chirale semi-préparative fournit les deux diastéréoisomères de l'amide **63** avec un rendement de 89%.



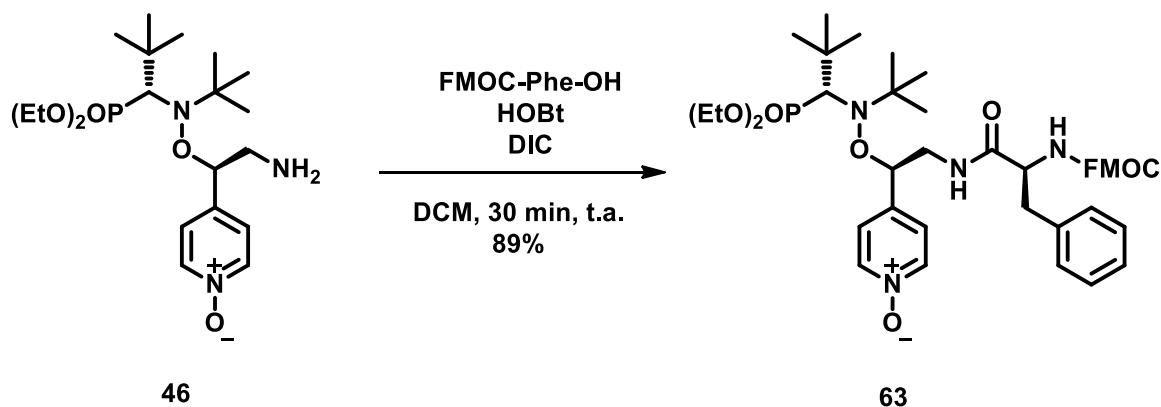


Schéma 72

Bien que ces molécules soient solides, nous n'avons pas pu obtenir de structure par diffraction des rayons X et n'avons donc pas pu attribuer les configurations absolues de chaque diastéréoisomère.

## b. Déprotection de l'amine

Par la suite, une déprotection de l'amine terminale a été effectuée sur chaque diastéréoisomère énantiomériquement pur par l'action du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) dans le dichlorométhane à température ambiante. Après purification par colonne chromatographique classique, nous obtenons l'amine **64** désirée avec des rendements de 93% pour chaque diastéréoisomère.

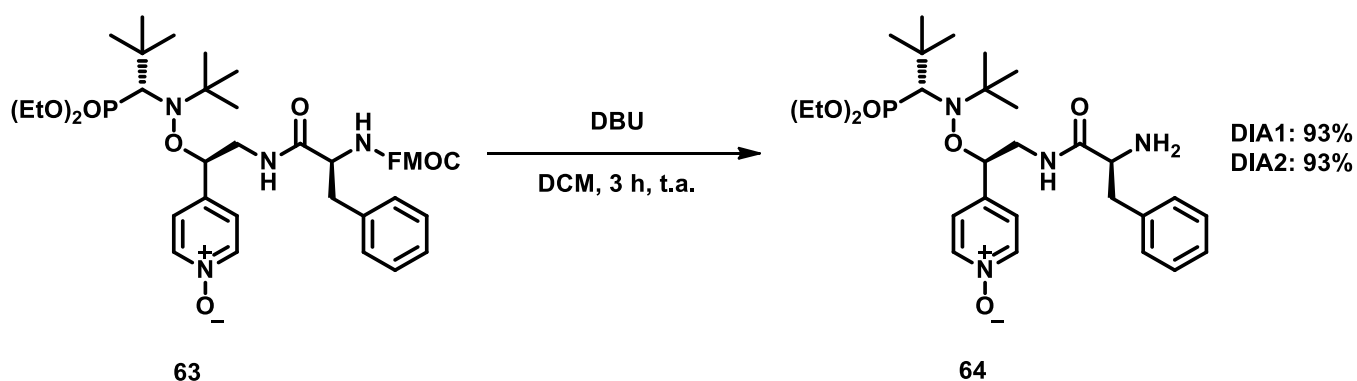


Schéma 73

### c. Couplage et formation de l'acide carboxylique final

Les deux acides carboxyliques cibles **62** sont obtenus par couplage de l'anhydride glutarique sur l'amine primaire terminale **64** de chaque diastéréoisomère énantiomériquement pur dans du dichlorométhane en présence d'hydrogénocarbonate de sodium. Cette méthode nous permet d'obtenir, après colonne chromatographique classique, l'acide carboxylique avec de très bons rendements pour chaque diastéréoisomère (DIA1 : 91% ; DIA2 : 93%).

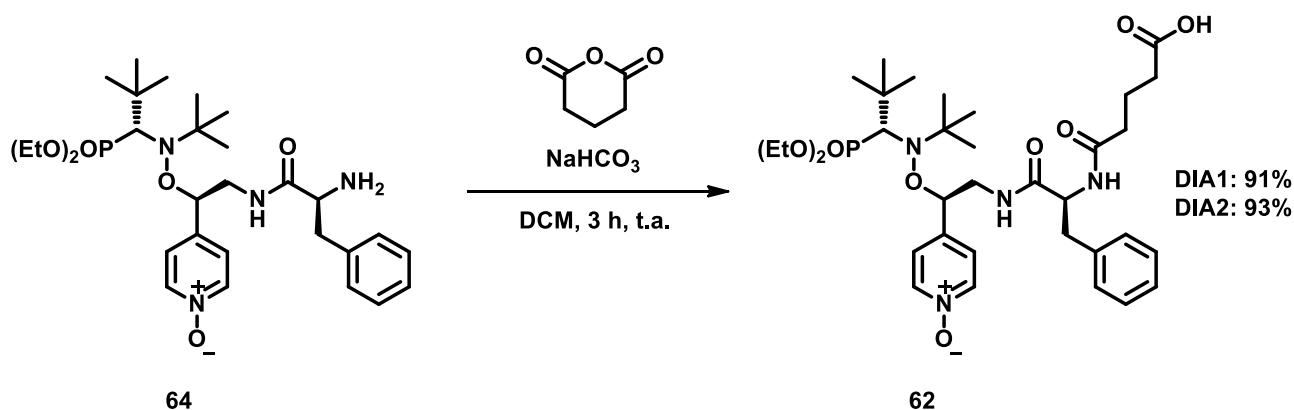


Schéma 74

## 2. Etude cinétique

De la même manière que pour les précédentes alcoxyamines, une étude physico-chimique a été menée sur ces nouvelles alcoxyamines synthétisées. Leurs énergies d'activation ont été déterminées selon la même méthode de mesure que précédemment.

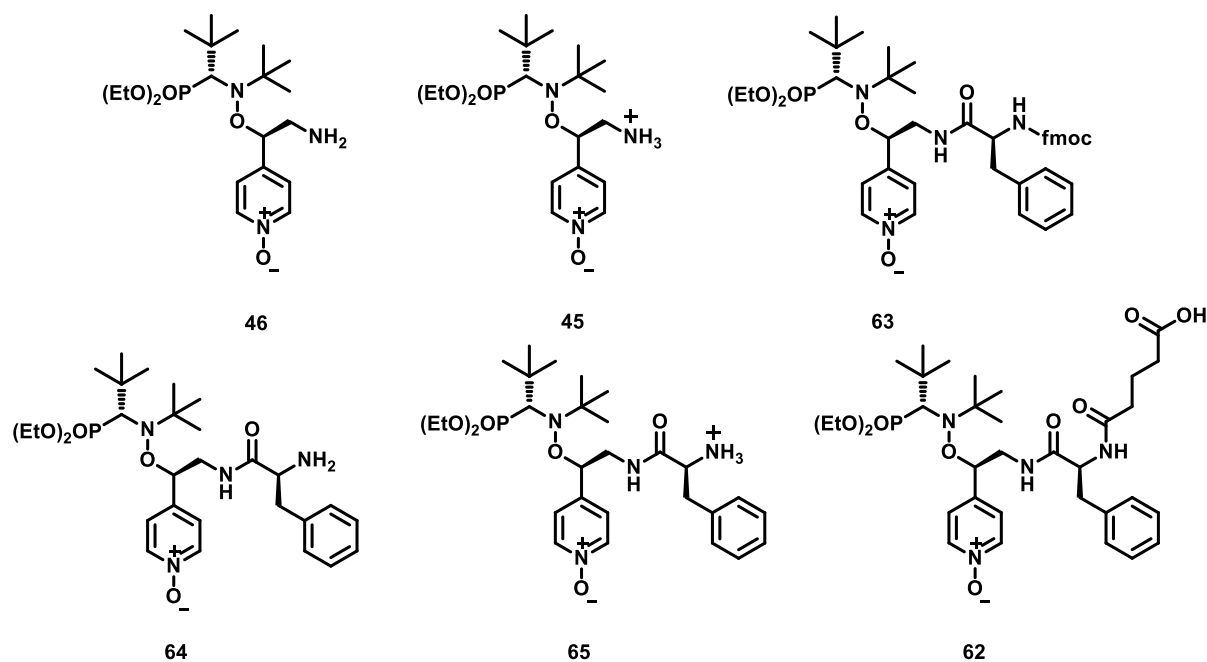
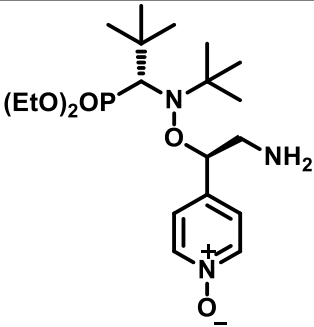
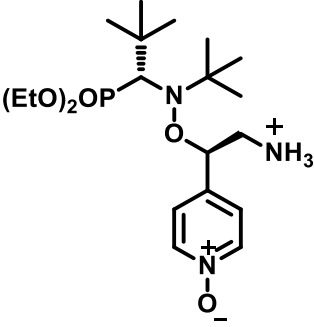
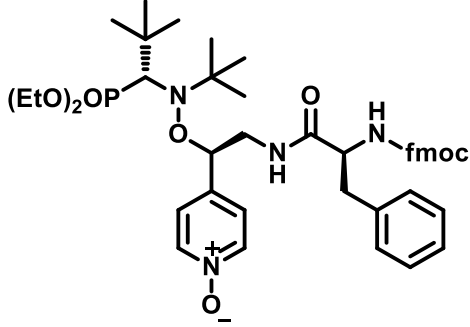
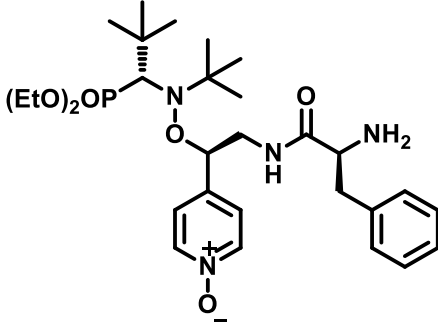
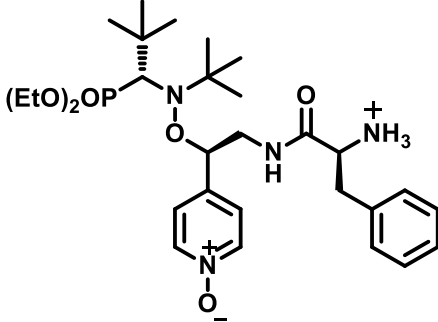


Figure 67 : molécules étudiées

Les résultats cinétiques obtenus ont été regroupés dans le tableau ci-dessous :

Composés	Structures	Conditions	$E_a$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ à 37 °C
46		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH10	112.9	8 h.

45		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH6	105,9	33 min.
63		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1)	112,0	6 h.
64		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH10	112,4	7 h.
65		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH6	112,5	7 h.
62		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1)	112,9	8 h.

46		tBuPh	114.6	16 h.
45		tBuPh + 2eq. TFA	110.6	2 h.
63		tBuPh	111,5	5 h.
64		tBuPh	113,4	10 h.
65		tBuPh + 2eq. TFA	114,8	17 h.

62		tBuPh	117,6	2 j.
----	--	-------	-------	------

**Tableau 6 : résultats cinétiques**

Tout d'abord, on peut observer le même effet de stabilisation par effet de solvant. Les énergies d'activation mesurées en milieu apolaire sont plus élevées de quelques kJ/mol.

Dans le but de mettre en évidence un potentiel effet d'une protonation lointaine d'une amine, les mesures de protonation de l'alcoxyamine **64** en milieu aqueux et organique ont été menées sur l'alcoxyamine **65**. Les valeurs montrent que cet effet est négligeable puisque les énergies d'activation restent quasiment inchangées. L'amine de la phénylalanine étant trop loin de la liaison NO-C, l'effet inductif que génère la protonation de cette amine primaire n'engendre aucune augmentation de sa vitesse d'homolyse.

Comme prévu, la formation de la liaison peptidique stabilise l'alcoxyamine. On peut remarquer que nous passons d'une énergie d'activation de 105.9 kJ/mol pour l'alcoxyamine **45** à un peu plus de 112 kJ/mol pour **62** une fois la liaison peptidique formée en milieu aqueux. Par conséquent, le temps de demi-vie passe de 33 minutes à 8 h pour l'alcoxyamine cible **62**.

Cette molécule est donc beaucoup plus stable et pourrait être un bon modèle pour le concept que nous souhaitons démontrer.

# VI. Conclusion

En utilisant les résultats précédemment obtenus au laboratoire sur les alcoxyamines monoactivables, nous avons pu concevoir et réaliser la synthèse d'un nouveau type d'alcoxyamine doublement activable.

L'étude physico-chimique de l'homolyse de ces molécules nous a permis de valider certains des objectifs que nous nous étions fixés. En effet, la double activation chimique, accompagnée de l'effet de solvant, nous a permis de passer d'une énergie d'activation de 123.0 kJ/mol à 105.9 kJ/mol. Il en découle un abaissement des temps de demi-vie, à 37°C, de 17 jours à 33 minutes, soit une réduction d'un facteur 740. Ceci illustre parfaitement ce que peut apporter la double activation chimique.

La molécule **45**, instable à 37 °C, peut donc être un bon modèle dans la stratégie diagnostique que nous cherchons à développer. Pour aller plus loin dans cette stratégie, nous avons voulu mener à bien la synthèse d'une alcoxyamine présentant un pseudo-peptide. Celle-ci possède un groupement reconnaissable et hydrolysable par une enzyme. L'hydrolyse enzymatique de ce pseudo-peptide **62** libèrera alors l'alcoxyamine **46** qui, après protonation à pH physiologique, sera instable et s'homolysera pour conduire à la formation du radical nitroxyde SG1, pouvant être suivi par IRM, à proximité immédiate de l'enzyme visée (Schéma 75).

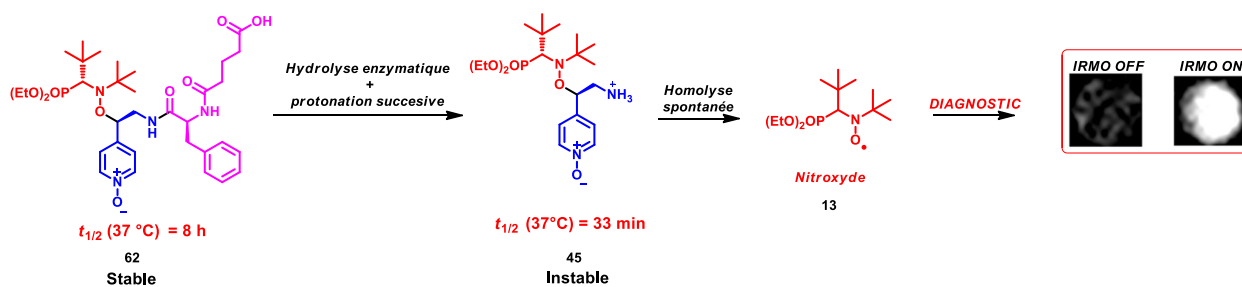


Schéma 75 : alkoxyamine pour le diagnostic

A l'heure où nous écrivons ces lignes, des tests biochimiques d'hydrolyse enzymatique sont en cours afin de confirmer ou d'infirmer la validité de ce concept.

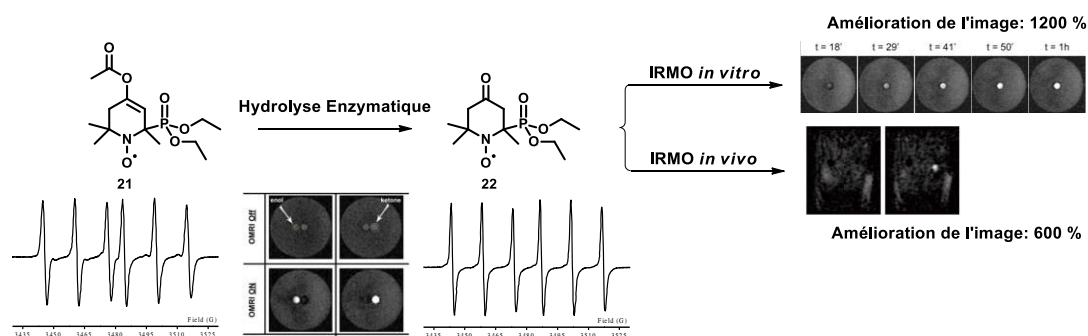
## *Conclusion générale*



L'objectif de cette thèse était de développer de nouveaux agents de contraste pour l'IRM rehaussée par l'effet Overhauser. Nous avons pu aborder deux thèmes centraux au cours de ces travaux : la synthèse de sondes radicalaires de type nitroxyde et la synthèse d'alkoxyamines labiles.

La première partie de ce travail a été consacrée au développement d'une sonde radicalaire capable de changer de constante de couplage hyperfin en fonction d'une activité enzymatique. Conformément à cet objectif fixé, nous avons pu synthétiser un nouveau type de nitroxyde capable d'un changement de 4.4 G de constante de couplage hyperfin au phosphore après hydrolyse enzymatique. Nous avons pu montrer que ce changement repose sur un équilibre conformationnel entre une liaison *intra* ou *exo*-cyclique. Cette capacité de changement de constante de couplage hyperfin a pu être appliquée à l'IRM rehaussée par l'effet Overhauser. Dans un premier temps, nous avons pu montrer qu'il était possible de suivre, *in vitro*, l'hydrolyse enzymatique de l'acétate d'ester d'énol **21** par IRMO et nous avons obtenu un rehaussement de l'image de 1200%.

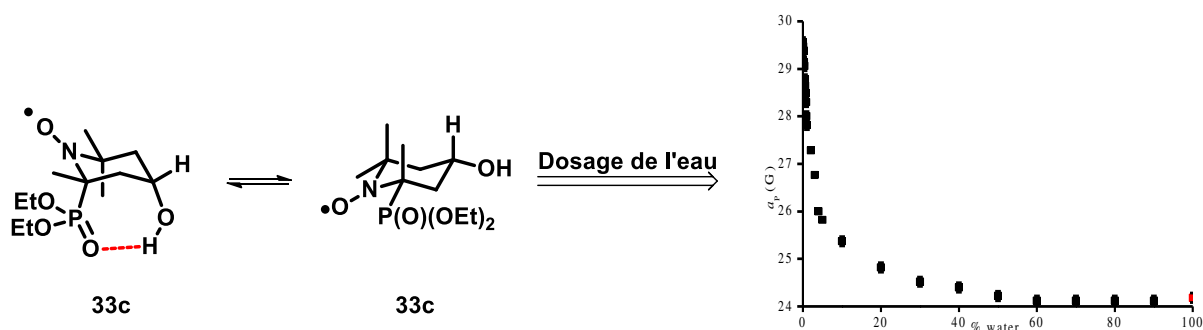
Notre but final étant de détecter des tumeurs plus précocement, des expériences *in vivo* ont été réalisées. Les enzymes présentes dans l'estomac d'une souris ont pu digérer l'acétate **21** et une image rehaussée de 600% au niveau de l'estomac a pu être obtenue (Schéma 76).



**Schéma 76**

Cette nouvelle sonde radicalaire nous a donc permis de démontrer la faisabilité de chaque étape de notre concept de diagnostic. Cette molécule doit donc maintenant être vectorisée vers une cellule cancéreuse et éventuellement protégée de la bioréduction pour qu'elle puisse détecter sélectivement une tumeur.

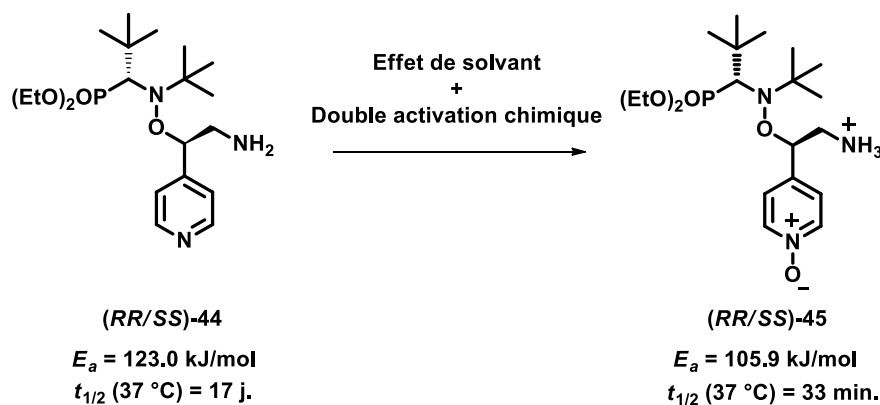
Au cours de la synthèse de cette sonde, une étude de l'effet de la première couche de solvation sur les constantes de couplage hyperfin de nitroxydes intermédiaires a permis de mettre en évidence un fort changement de la valeur de la constante de couplage au phosphore en fonction de la polarité du solvant. Nous avons attribué ce changement à une liaison hydrogène intramoléculaire qui maintient le groupement phosphonate en position axiale. Cette liaison hydrogène étant dépendante de la polarité du solvant, cette nouvelle sonde nous a permis un dosage de l'eau en milieu organique par résonance paramagnétique électronique jusqu'à une concentration de  $5 \cdot 10^{-2}$  M, soit un rapport de 0.1 % d'eau sur le volume total de solution (Schéma 77).



**Schéma 77 : dosage de l'eau par RPE**

La seconde partie de ce travail de thèse a été consacrée à la synthèse et l'étude physico-chimique d'alcoxyamines pour le diagnostic. Le point clé de ce concept repose sur l'activation de ces molécules afin de libérer rapidement le nitroxyde souhaité.

Une première étude physico-chimique de la cinétique d'homolyse de ces molécules nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de la double activation chimique. En effet, l'oxydation d'un noyau pyridine, la protonation d'une amine primaire ainsi que l'effet de solvant conduisent à un abaissement de l'énergie d'activation de la liaison NO-C de 17.1 kJ/mol. Il en résulte un abaissement de son temps de demi-vie à température physiologique de 17 jours à 33 minutes (Schéma 78).



### Schéma 78 : Activation des alkoxyamines

Cette molécule doublement activée ayant un temps de demi-vie assez court pour libérer rapidement le nitroxyde SG1, nous avons par la suite mené à bien la synthèse d'un pseudo-peptide modèle. Cette synthèse permettra, si les tests biochimiques d'hydrolyse enzymatique en cours sont concluants, de valider ce concept de diagnostic appliqué aux alkoxyamines.

Cependant, l'homolyse des alkoxyamines produit un radical alkyle libre hautement réactif. Les radicaux alkyles sont connus pour leurs effets sur le stress oxydatif qui peut déclencher des dommages irréversibles sur les cellules exposées à ces radicaux libres. En 2008, Wang et Yi ont pu montrer que les cellules cancéreuses possèdent une résistance plus faible vis-à-vis du stress oxydant que les cellules saines.<sup>63</sup> Or, si nous sommes capables de générer des radicaux libres par homolyse d'alkoxyamine au bon endroit et au bon moment, c'est-à-dire préférentiellement à proximité des cellules cancéreuses, nous pourrions envisager de détruire sélectivement ces cellules cancéreuses (effet thérapeutique). Nous pourrions donc combiner à la fois cet effet avec le suivi de notre drogue par IRMO (Schéma 79). Ce nouveau concept appliqué aux alkoxyamines, combinant un effet thérapeutique et un effet diagnostique au sein de la même molécule, est appelé ***théranostique*** et fait l'objet d'intenses recherches au sein de notre équipe afin de développer de nouveaux anticancéreux.<sup>64</sup>

<sup>63</sup> Wang, J. ; Yi, J. *Cancer Biol. Ther.* **2008**, 7, 1875.

<sup>64</sup> Audran, G.; Bremond, P.; Franconi, J. - M.; Marque, S. R. A.; Massot, P.; Mellet, P.; Parzy, E.; Thiaudiere, E. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, 12, 719.

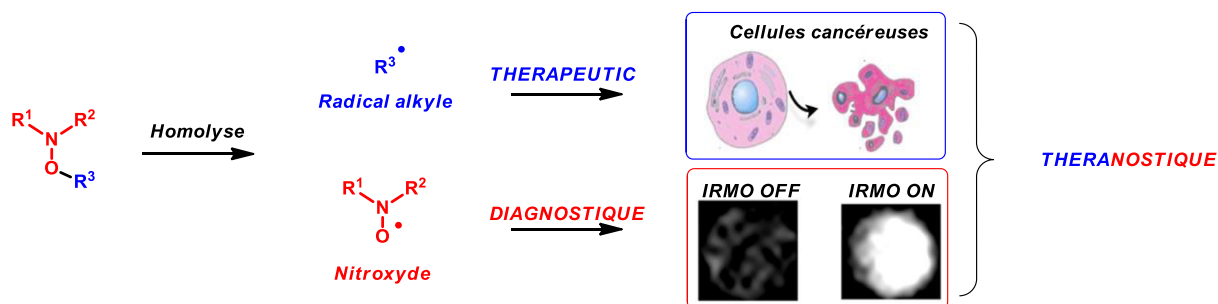


Schéma 79 : concept de théranostique

L'alkoxyamine **62** pourrait être un bon modèle de ce nouveau concept. En effet, cette alkoxyamine stable pourrait être hydrolysée par voie enzymatique, ce qui conduirait à la formation, après protonation à pH physiologique, d'une alkoxyamine instable qui s'homolyserait spontanément, dans un environnement proche de l'enzyme visée, pour conduire à la formation d'un radical alkyle et d'un nitroxyde stable. Le radical alkyle pourra alors augmenter le stress oxydant au sein d'une cellule cancéreuse conduisant à sa mort et le nitroxyde pourra être suivi par une expérience d'IRMO (Schéma 80). La validation de ce concept de théranostique sur ce composé fait actuellement l'objet de travaux de recherche en collaboration entre notre équipe et le *Centre de résonance magnétique des systèmes biologiques* de l'université de Bordeaux.

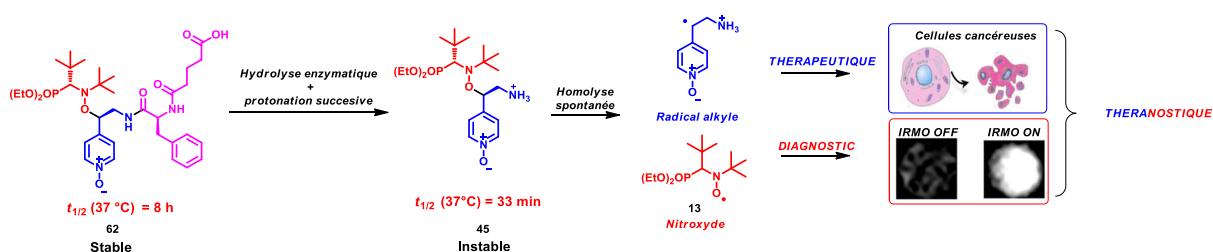


Schéma 80 : alkoxyamine 62 en théranostique

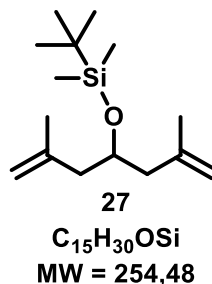
Deux nouveaux concepts de diagnostic ont été développés durant ce travail de thèse. Un premier utilisant un nitroxyde capable d'un changement de constante de couplage selon une activité enzymatique nous a permis d'imager une protéolyse *in vivo* par IRMO. Le second concept nous permettra de valider le concept de diagnostic appliqué aux alkoxyamines et nous ouvre une nouvelle thématique de recherche : *la théranostique*.

## *Partie expérimentale*

### **General chemical procedures:**

<sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using an internal deuterium lock at ambient temperatures on the following instruments: Bruker AC400 (400 MHz) and Bruker AC300 (300 MHz). Data are presented as follows: chemical shift (in ppm), integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br means the signal is broad, dd = doublet of doublets, quint. = quintuplet), coupling constant (*J* in Hz) and integration. <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded on a Bruker AC300 (121 MHz) and on a Bruker AC400 (162 MHz) spectrometers with complete proton decoupling. Chemical shifts ( $\delta$ ) were reported in ppm using residual non-deuterated solvents as internal reference. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter. High-resolution mass spectra (HRMS) were performed on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) spectrometer equipped with atmospheric pressure ionization source (API) pneumatically assisted. Samples were ionized by positive electrospray mode as follows: electrospray tension (ISV): 2800 V ; opening tension (OR): 20 V ; nebulization gas pressure (nitrogen): 800 L/h. The parent ion ( $M^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ) is quoted. All experiments were performed under anhydrous conditions and an inert atmosphere of argon and, except where stated, using dried apparatus and employing standard techniques for handling air-sensitive materials. All reagents were weighed and handled in air at room temperature. For EPR measurements, samples with 0.5 mM concentration of nitroxide were prepared in non-degassed solvents. Experiments were performed indifferently on Elexsys, EMX or ER 100D Bruker machines (a difference smaller than 0.1 G was noticed). EPR spectra were recorded with a gain of  $2 \times 10^5$  (72 dB for Elexsys), a modulation amplitude of 1.0 G, a sweep width of 150 G, a sweep time of 21 s, and a power of 20 mW as parameters.

**4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylhept-1,6-diene (27):**



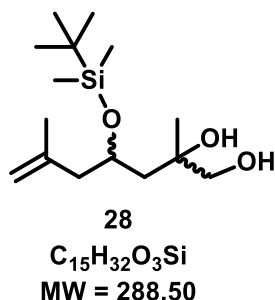
Alcohol **26** (11.5 g, 82.0 mmol) was dissolved in DMF (250 mL), then imidazole (16.7 g, 246 mmol, 3.0 equiv.) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (24.7 g, 164 mmol, 2.0 equiv.) were added, and the mixture was stirred at 0 °C for 5 h. The solution was then poured into water and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic extracts were washed with water, brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography of the residue gave **27** (20.6 g, 99%) as a colorless oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.77 (br s, 2H), 4.71 (br s, 2H), 3.93 (quint. , *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.20-2.11 (m, 4H), 1.73 (s, 6H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 143.0 (2 × C), 113.2 (2 × CH<sub>2</sub>), 69.8 (CH), 46.0.(2 × CH<sub>2</sub>), 26.1 (3 × CH<sub>3</sub>), 23.2 (2 × CH<sub>3</sub>), 18.3 (C), - 4.4 (2 × CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>OSiNa<sup>+</sup>: 277.1958 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 277.1959.

**4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylhept-6-ene-1,2-diol (**28**):**



Alkene **27** (4.30 g, 16.9 mmol) was dissolved in acetone/water (200 mL, 3/1 v:v), then a catalytic amount of OsO<sub>4</sub> (1 mL, 4%wt in water) was added and the mixture was stirred for 15 min at 0 °C. Then, *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (3.96 g, 33.8 mmol, 2.0 equiv.) was added and stirred for 4 h at 0 °C. The solution was poured into 10 % aqueous Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic extracts were washed with water, brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography of the residue gave **27** (starting material, 3.38 g) and **28** (0.9 g, 86%) as a mixture of two diastereoisomers (2:1 ratio, determined by <sup>1</sup>H NMR).

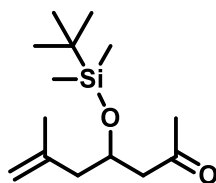
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ 4.78 (br s, 1H, Maj), 4.76 (br s, 1H, Maj + min), 4.70 (br s, 1H, min), 4.26 (m, 1H, Maj + min), 3.78 (s, 1H, min), 3.45-3.28 (m, 3H, Maj + 2H, min), 2.37-2.27 (m, 1H, Maj + min), 2.22-2.07 (m, 1H Maj + 2H, min), 1.87-1.70 (m, 2H, Maj + 1H min), 1.65-1.50 (m, 4H, Maj + 4H, min), 1.18 (s, 3H, Maj), 1.14 (s, 3H, min), 0.94 (s, 9H, Maj + min), 0.11 (s, 3H, min), 0.09 (s, 3H, Maj), 0.05 (s, 3H, Maj + min).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ 142.5 (C, Maj), 142.0 (C, min), 113.9 (CH<sub>2</sub>, min), 113.7 (CH<sub>2</sub>, Maj), 73.0 (C, min), 72.7 (C, Maj), 71.0 (CH<sub>2</sub>, min), 70.1 (CH<sub>2</sub>, Maj), 69.7 (CH, min), 69.6 (CH, Maj), 47.9 (CH<sub>2</sub>, Maj + min), 44.3 (CH<sub>2</sub>, Maj), 43.1 (CH<sub>2</sub>, min), 26.2 (CH<sub>3</sub>, Maj), 26.1 (CH<sub>3</sub>, min), 25.5 (CH<sub>3</sub>, Maj), 24.0 (CH<sub>3</sub>, min), 22.9 (CH<sub>3</sub>, Maj), 22.8 (CH<sub>3</sub>, min), 18.2 (C, Maj), 18.1 (C,min), -3.4 (CH<sub>3</sub>, min), -3.5 (CH<sub>3</sub>, Maj), -4.2 (CH<sub>3</sub>, Maj), -4.3 (CH<sub>3</sub>, min).

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>SiNa<sup>+</sup>: 311.2013 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 311.2013.



**4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-6-methylhept-6-en-2-one (29):**



**29**

**C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>Si**  
**MW = 256,46**

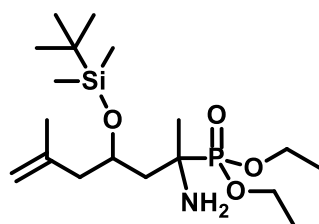
Diol **28** (6.0 g, 20.8 mmol) was dissolved in THF/water (300 ml, 3/1 v:v), then NaIO<sub>4</sub> (11.1 g, 52.0 mmol, 2.50 equiv.) was added and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 3 h. The solution was poured into water and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined organic extracts were washed with water, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography gave **29** (5.11 g, 96%) as a yellowish oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.78 (br s, 1H), 4.70 (br s, 1H), 4.36-4.28 (m, 1H), 2.60-2.47 (m, 2H), 2.27-2.23 (dd, *J* = 13.3 Hz, *J* = 5.3 Hz, 1H), 2.16-2.11 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.74 (br s, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.07 (s, 3H) 0.03 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 207.9 (C), 142.3 (C), 113.7 (CH<sub>2</sub>), 67.8 (CH), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 46.6 (CH<sub>2</sub>), 31.8 (CH<sub>3</sub>), 25.9 (3CH<sub>3</sub>), 23.0 (CH<sub>3</sub>), 18.1 (C), -4.5 (CH<sub>3</sub>), -4.8 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>Si<sup>+</sup>: 257.1931 [M+H]<sup>+</sup>; found: 257.1930.

**Diethyl (2-amino-4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-6-methylhept-6-en-2-yl)phosphonate (30a):**



**30a**

**C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>4</sub>PSi**  
**MW = 393,5738**

**Procedure 1:**

Ketone **29** (1.0 g, 3.9 mmol) was dissolved in diethylphosphite (5 mL, 37.4 mmol, 9.6 equiv.), then 4Å molecular sieves (1.0 g) were added and the mixture was stirred under an ammoniac atmosphere for 72 h. Then, the mixture was filtered and the excess of diethylphosphite was removed under vacuum (50 °C, 2.0 mmHg). Column chromatography gave **30a** (550 mg, 37%) as a colourless oil and **30b** (783 mg, 51%) as colourless oil.

**Procedure 2:**

Hydroxyphosphonate **30b** (1 g, 2.53 mmol) was dissolved in EtOH/Et<sub>3</sub>N/HPO(OEt)<sub>2</sub> (15 mL, 1/1/1, v:v:v), then 4Å molecular sieves (1.0 g) was added and the mixture was stirred at 40 °C under an ammoniac atmosphere for 72 h. Then, the mixture was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and filtered. The solution was poured into water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic extracts were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography gave **30a** (536 mg, 54%) as a colourless oil.

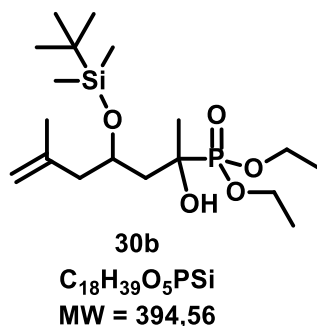
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.77 (br s, 1H, Maj + min), 4.71 (br s, 1H, Maj + min), 4.42-4.32 (m, 1H, Maj), 4.27-4.20 (m, 1H, min), 4.19-4.07 (m, 4H, Maj + min), 2.33-2.26 (m, 1H, Maj + min), 2.23-2.15 (m, 1H, Maj + min), 1.95-1.85 (m, 1H, Maj + min), 1.80-1.55 (m, 6H, Maj + min), 1.37-1.28 (m, 9H, Maj + min), 0.88 (s, 9H, Maj + min), 0.13-0.10 (m, 6H, Maj + min).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 142.5 (C, Maj), 142.0 (C, min), 113.4 (CH<sub>2</sub>, min), 113.3 (CH<sub>2</sub>, Maj), 67.6 (d, *J* = 12.7 Hz, CH, min), 67.5 (d, *J* = 10.5 Hz, CH, Maj), 62.3 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>2</sub>, min), 62.2 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>2</sub>, min), 62.1 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>, Maj), 62.0 (d, *J* = 7.7 Hz, CH, Maj), 51.9 (d, *J* = 154 Hz, C, min), 51.7 (d, *J* = 146 Hz, C, Maj), 48.0 (CH<sub>2</sub>, Maj), 47.9 (CH<sub>2</sub>, min), 42.5 (d, *J* = 3.9 Hz, CH<sub>2</sub>, Maj), 41.8 (CH<sub>2</sub>, min), 25.9 (3 × CH<sub>3</sub>, Maj + min), 23.7 (d, *J* = 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>, Maj), 22.7 (CH<sub>3</sub>, min), 22.7 (CH<sub>3</sub>, Maj), 22.5 (d, *J* = 2.2 Hz, CH<sub>3</sub>, min), 17.9 (C, Maj), 17.8 (C, min), 16.5 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>, min), 16.5 (d, *J* = 5.0 Hz, CH<sub>3</sub>, Maj), -3.7 (CH<sub>3</sub>, min), -3.8 (CH<sub>3</sub>, Maj), -4.2 (CH<sub>3</sub>, min), -4.3 (CH<sub>3</sub>, Maj).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 31.7 (Maj), 30.9 (min).

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>18</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>PSi<sup>+</sup>: 394.2537 [M+H]<sup>+</sup>; found: 394.2537.

**Diethyl (2-hydroxy-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-6-methylhept-6-en-2-yl)phosphonate (30b):**



**Dia 1 :**

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.85 – 4.70 (m, 4H), 4.18 (quint., *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.14 (quint., *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.38 (dd, *J* = 3.2 Hz; *J* = 13.0 Hz, 1H), 2.13–2.01 (m, 2H), 1.72 (s, 3H), 1.65 – 1.60 (m, 1H), 1.40 – 1.27 (m, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.23 (s, 3H), 0.17 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 141.8 (C), 113.4 (CH<sub>2</sub>), 72.5 (d, *J* = 163 Hz, C), 70.1 (d, *J* = 3.9 Hz, CH), 63.0 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 61.7 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 47.8 (CH<sub>2</sub>), 42.6 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 25.8 (3 × CH<sub>3</sub>), 25.8 (d, *J* = 4.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 22.3 (CH<sub>3</sub>), 17.9 (C), 16.6 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.5 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), -3.8 (CH<sub>3</sub>), -4.6 (CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 26.7.

## Dia 2 :

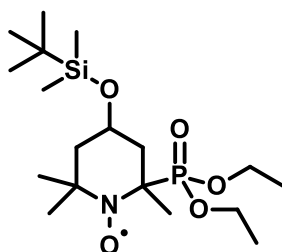
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.79 (s, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.40 – 4.28 (m, 1H), 4.25 – 4.13 (m, 5H), 2.39 (dd,  $J = 3.7$  Hz;  $J = 13.5$  Hz, 1H), 2.18 (dd,  $J = 9.8$  Hz;  $J = 13.3$  Hz, 1H), 2.04–1.84 (m, 2H), 1.46 (d,  $J = 16.1$  Hz, 3H), 1.33 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H), 0.90 (s, 9H), 0.17 (s, 3H), 0.16 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  141.1 (C), 113.9 (CH<sub>2</sub>), 72.3 (d,  $J = 172$  Hz, C), 69.1 (d,  $J = 14.9$  Hz, CH), 62.8 (d,  $J = 7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 62.7 (d,  $J = 7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 47.3 (CH<sub>2</sub>), 40.1 (d, CH<sub>2</sub>), 25.9 (3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 22.7 (CH<sub>3</sub>), 21.8 (d,  $J = 3.9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 17.9 (C), 16.5 (overlapped d, 2  $\times$  CH<sub>3</sub>), –3.4 (CH<sub>3</sub>), –4.4 (CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  26.3.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>18</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>PSi<sup>+</sup>: 395.2377 [M+H]<sup>+</sup>; found: 395.2366.

## **2-(Diethylphosphoryl)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6,6-trimethylpiperidin-*N*-oxyl (32):**



**32**  
**C<sub>18</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub>PSi<sup>+</sup>**  
**MW = 408,57**

Aminophosphonate **30a** (400 mg, 1.02 mmol) was dissolved in THF/water mixture (50 mL, 3/1 v:v), then a solution of Hg(OAc)<sub>2</sub> (389 mg, 1.22 mmol, 1.20 equiv.) in THF/water (50 mL, 3/1 v:v) was slowly added and was stirred for 30 min at room temperature. The mixture was then poured on a solution of NaBH<sub>4</sub> (77 mg, 2.04 mmol, 2.0 equiv.) and NaOH (163 mg, 4.08 mmol, 4 equiv.) in ice-cold water (50 mL) and stirred for 5 min. After extraction with Et<sub>2</sub>O, the combined organic extracts were washed with brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and

concentrated to give piperidine **31** which was used in the next step without any further purification.

A solution of piperidine **31** (900 mg, 2.29 mmol) and *m*-CPBA (1.26 g, 4.58 mmol, 2.0 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (90 mL) was stirred for 2 hours at 0 °C. The solution was then poured into 10 % aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic extracts were washed with saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography gave **32** (685 mg, 73%) as a red oil. The two diastereoisomers were separated and the major diastereomer (*RR/SS*)-**32c** was recrystallized from Et<sub>2</sub>O.

**M.p.** (Major) = 82 °C.

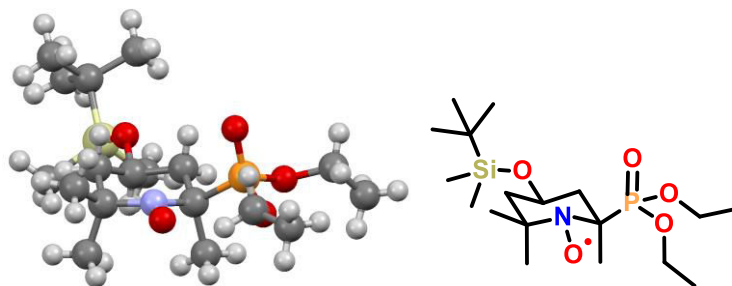
**EPR** (Phosphate buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 M, pH 7.3):

(*RR/SS*)-**32c**, *a<sub>N</sub>* 16.2 G, *a<sub>P</sub>* 24.0 G;

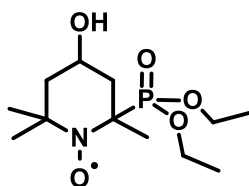
(*RS/SR*)-**32t**, *a<sub>N</sub>* 15.0 G, *a<sub>P</sub>* 52.5 G.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>5</sub>PSi<sup>+</sup>: 409.2408 [M+H]<sup>+</sup>; found: 409.2408.

**RX** (*RR/SS*)-**32c**:



**2-(Diethylphosphoryl)-4-hydroxy-2,6,6-trimethylpiperidin-*N*-oxyl (33):**



**33**

**C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>•</sup>**  
**MW = 294,30**

To an ice-cold solution of silyl ether **32** (*RR/SS* + *RS/SR*) (400 mg, 0.979 mmol) in dry THF (4 mL) was added TBAF (1.0 M solution in THF, 1.47 mL, 1.47 mmol, 1.50 equiv.) dropwise under argon. The mixture was stirred for 3 hours. Concentration under *vacuo* followed by column chromatography gave **33** (262 mg, 91%) as a red oil.

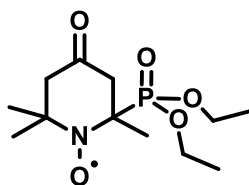
**EPR** (Phosphate buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 M, pH 7.3):

(*RR/SS*)-**33c**,  $a_N$  16.2 G,  $a_P$  24.0 G;

(*RS/SR*)-**33t**,  $a_N$  15.2 G,  $a_P$  49.8 G.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 295.1543 [M+H]<sup>+</sup> ; found: 295.1544 ; calc for C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>PNa<sup>+</sup>: 317.1363 [M+Na]<sup>+</sup> ; found: 317.1363.

**2-(Diethylphosphoryl)-2,6,6-trimethyl-4-oxopiperidin-*N*-oxyl (22):**



**22**

**C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>•</sup>**  
**MW = 292,29**

To a stirred ice-cold solution of **32** (*RR/SS* + *RS/SR*) (80 mg, 0.272 mmol) and powdered 4 Å molecular sieves (80 mg) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was added *N*-methylmorpholine *N*-oxide (128 mg, 1.09 mmol, 4.0 equiv.) followed by a catalytic amount of

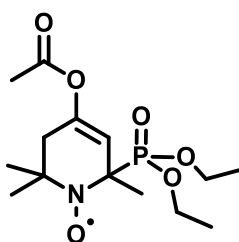
tetrapropylammonium perruthenate under an argon atmosphere. The mixture was stirred for 20 minutes. Concentration under *vacuo* followed by column chromatography gave **22** (70 mg, 88%) as an orange solid.

**EPR** (Phosphate buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 M, pH 7.3):  $a_N$  15.4 G,  $a_P$  44.2 G.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 293.1387 [M+H]<sup>+</sup> ; found: 293.1387 ; calc for C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>PNa<sup>+</sup>: 315.1206 [M+Na]<sup>+</sup> ; found: 315.1205.

**M.p.** = 42 °C.

**2-(Diethylphosphoryl)-2,6,6-trimethyl-4-acetoxy-1-azacyclohex-3-enoxyl (21) :**



**21**  
C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>P<sup>•</sup>  
MW = 334,33

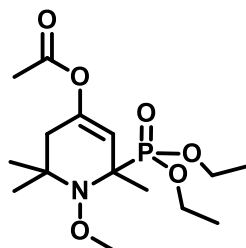
A solution of ketone **22** (100 mg, 0.342 mmol) in dry THF (5 mL) was slowly added to a -80 °C solution of LiHMDS (1.0 M solution in THF, 513 μL, 0.513 mmol, 1.50 equiv.) in dry THF (5 mL). The mixture was stirred for 3 hours from -80 °C to -45 °C. Then, Ac<sub>2</sub>O (65 μL, 0.684 mmol, 2.0 equiv.) was slowly added. The mixture was stirred for 2.5 hours, then it was poured on saturated aqueous NaCl solution and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography of the residue gave **21** (99 mg, 80%) as a red oil.

**EPR** (Phosphate buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 M, pH 7.3):  $a_N$  15.4 G,  $a_P$  38.6 G.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>18</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>PSi<sup>+</sup>: 335.1492 [M+H]<sup>+</sup>; found: 335.1491.

Determination of the double-bond position :

**3-(Diethylphosphoryl)-3,5,5-trimethyl-4-methoxy-4-azacyclohexenyl acetate (34) :**



**34**

**C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>6</sub>P**  
**MW = 349,36**

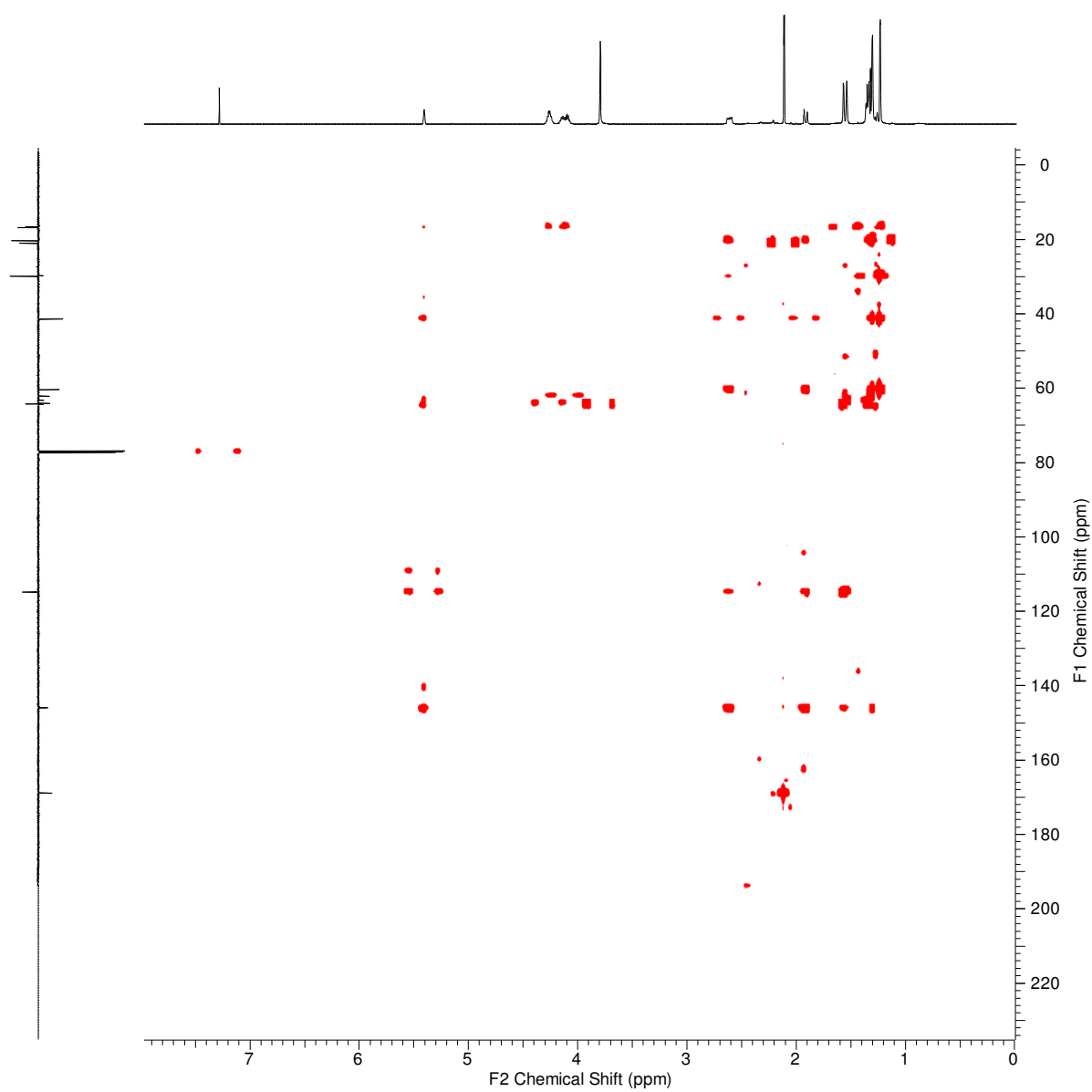
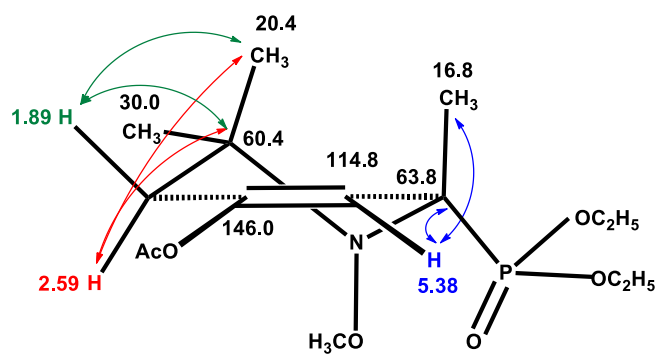
To a stirred solution of acetate **21** (50 mg, 0.150 mmol) in DMSO (1 mL) was added FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (83 mg, 0.300 mmol, 2 equiv.) and 35 % aqueous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (79 μL, 0.900 mmol, 6 equiv.). The mixture was stirred for 4 hours. Then, it was poured on water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic extracts were dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under *vacuo*. Column chromatography of the residue gave **34** (43 mg, 82%) as a yellowish oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.38 (br s, 1H), 4.28 – 4.19 (m, 2H), 4.17 – 4.03 (m, 2H), 3.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H), 2.59 (dd, *J* = 8.1 Hz; *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 3H), 1.89 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 1.54 (d, *J* = 18.1 Hz, 3H), 1.35 – 1.27 (m, 9H), 1.21 (s, 3H).

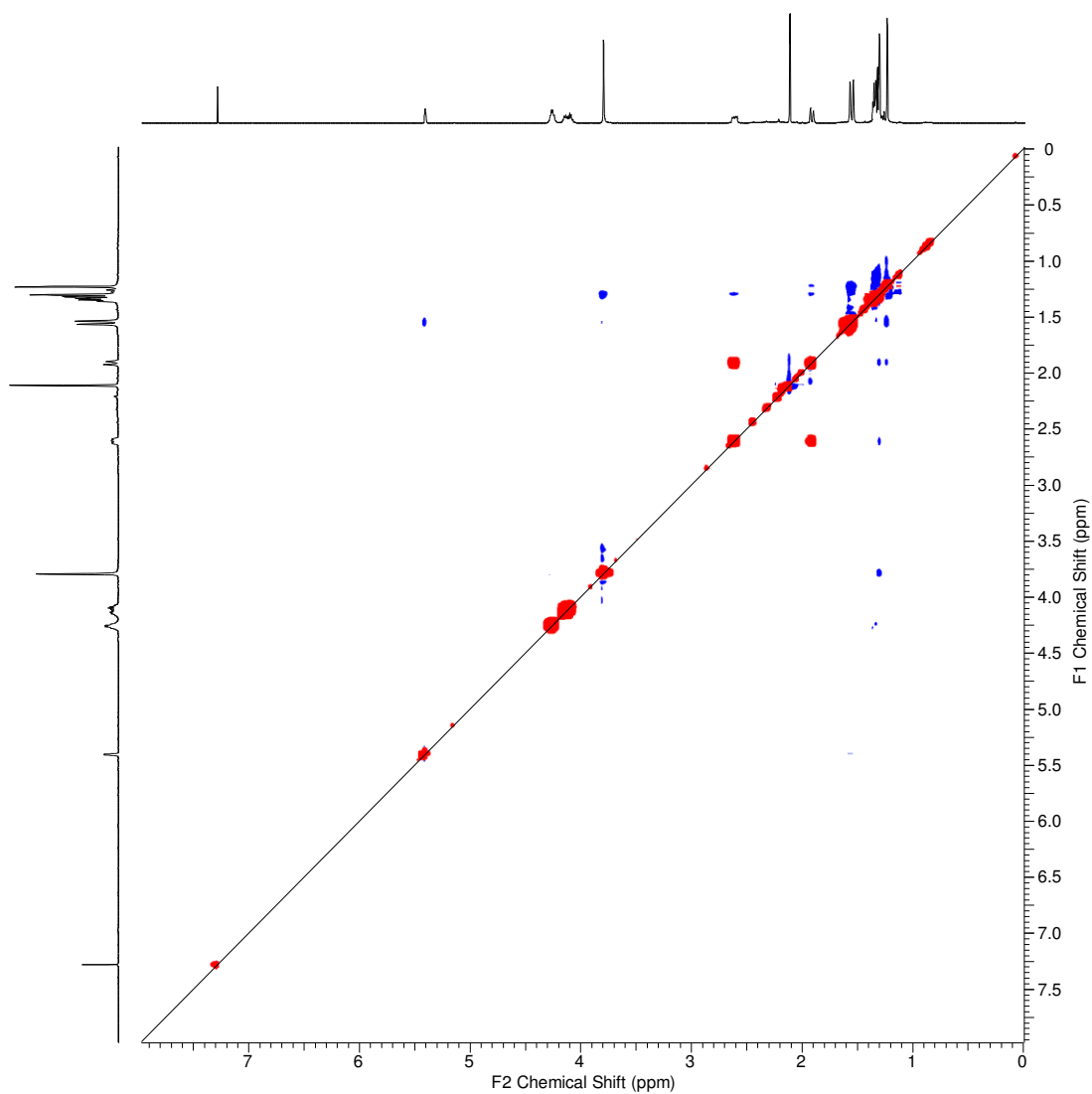
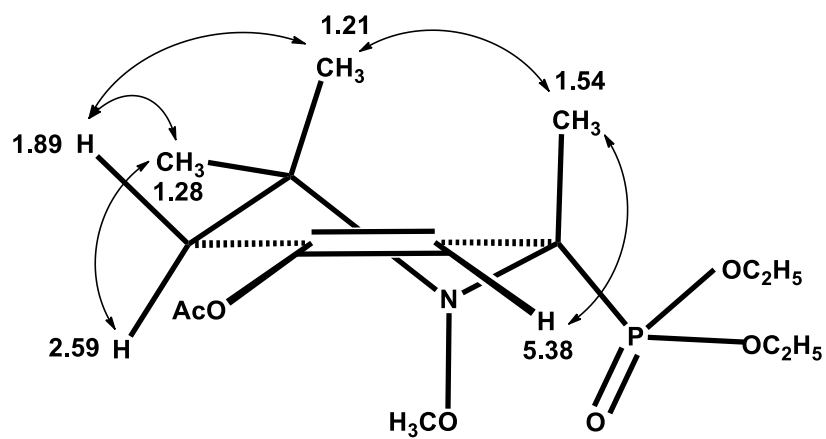
**<sup>13</sup>C NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168.9 (d, *J* = 2.7 Hz, C), 146.0 (d, *J* = 12.7 Hz, C), 114.8 (d, *J* = 10.9 Hz, CH), 64.3 (CH<sub>3</sub>), 64.1 (d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 63.8 (d, *J* = 172 Hz, C), 62.2 (d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 60.4 (d, *J* = 13.6 Hz, C), 41.4 (CH<sub>2</sub>), 30.0 (CH<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>), 16.9 (CH<sub>3</sub>), 16.6 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.5 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>).



## HMBC experiment



## NOESY experiment



**$a_N^a$  and  $a_P^a$  values of 16, 17, 33c and 33t in 45 solvents as well as the corresponding normalized Reichardt polarity solvent constant  $E_T^N$ .**

entry	Solvent <sup>b</sup>	$E_T^N$	$a_{N,16}$	$a_{N,17}$	$a_{P,17}$	$a_{N,33c}$	$a_{P,33c}$	$a_{N,33t}$	$a_{P,33t}$
1	pentane	0.009	15.15	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	13.67	47.75	13.58	51.80
2	<i>n</i> -hexane	0.009	15.219	14.8	40.8	13.69	47.75	13.77	51.41
3	CHex	0.006	15.19	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	13.96	47.85	13.77	51.61
4	<i>n</i> -octane	0.012	15.22	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	13.58	47.95	13.67	51.70
5	benzene	0.111	15.53	14.4	35.8	14.44	40.44	14.06	50.93
6	toluene	0.099	15.461	14.4	36.6	14.25	40.92	13.96	51.12
7	<i>t</i> -BuPh	0.099	15.47	14.4	36.6	13.86	43.33	13.86	51.22
8	PhBr	0.182	15.565	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.44	40.15	14.06	50.45
9	Pyridine	0.302	15.66	14.9	32	15.31	25.23	14.15	49.87
10	AcPh	0.306	15.639	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.11	27.82	14.15	50.26
11	<i>t</i> -BuPH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	- <sup>c</sup>	15.61	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.63	36.20	14.06	49.97
12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.309	15.77	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.73	33.89	14.15	50.26
13	DCE	0.327	15.71	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.73	33.89	14.15	50.26
14	CHCl <sub>3</sub>	0.259	15.77	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.83	33.79	14.25	50.83
15	CCl <sub>4</sub>	0.052	15.404	14.7	38.2	13.77	44.96	13.96	51.51
16	DME	0.231	15.265	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.92	27.83	13.96	50.55
17	Et <sub>2</sub> O	0.117	15.241	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.73	33.31	13.96	51.22
18	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	0.105	15.23	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.63	35.05	13.67	51.03
19	<i>n</i> -Bu <sub>2</sub> O	0.071	15.36	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.54	33.89	13.96	50.83

20	Me $t$ -BuO	0.124	15.32	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.44	31.29	13.86	50.93
21	14D	0.164	15.45	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.02	26.96	14.15	51.03
22	THF	0.207	15.47	14.8	35.9	14.92	29.65	14.15	51.03
23	AcOEt	0.228	15.6	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.02	29.27	13.96	50.83
24	acetone	0.355	15.62	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.31	27.15	14.15	50.45
25	ACN	0.46	15.76	15	31	15.40	26.09	14.15	49.87
26	MeNO <sub>2</sub>	0.481	15.86	16	28.6	15.31	26.86	14.25	49.78
27	DMSO	0.444	15.77	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.40	24.55	14.15	50.16
28	F	0.775	16.2	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.69	23.11	14.63	48.14
29	NMF	0.722	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.50	23.11	14.44	47.27
30	DMF	0.386	15.67	14.8	32	15.50	25.13	14.06	50.06
31	MeOH	0.762	16.2	15.7	21.9	15.40	24.07	14.53	48.43
32	EtOH	0.654	16.08	15.6	24	15.40	24.26	14.54	48.72
33	TFE	0.898	16.78	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.89	24.55	14.73	51.13
34	<i>i</i> -PrOH	0.546	16.04	15.2	27.6	15.21	25.03	14.35	49.58
35	<i>n</i> -BuOH	0.586	16.038	15.4	24.8	15.31	24.55	14.35	48.43
36	<i>t</i> -BuOH	0.389	15.91	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.31	25.61	14.25	51.41
37	BnOH	0.608	16.286	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.60	24.07	14.44	49.58
38	EG	0.79	16.3	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.60	23.49	14.54	49.29
39	TEG	0.682	- <sup>c</sup>	15.5	22.9	15.11	24.26	14.35	49.10
40	water/MeOH	0.71	16.72	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.79	23.97	14.92	49.68
41	water	1	16.99	16.5	22.8	16.08	23.97	15.21	49.68

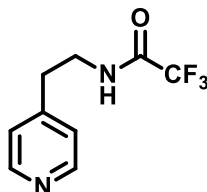
42	Tampon	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	16.08	23.97	15.21	49.78
43	AcOH	0.648	16.189	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	15.50	24.45	14.44	49.97
44	Et <sub>3</sub> N	0.043	15.32	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	13.78	30.91	13.86	51.61
45	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> NH	0.145	15.36	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.70	29.56	13.86	51.22
46	<i>i</i> -PenOH	0.565	15.961	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>				
47	CS <sub>2</sub>	0.065	15.374	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>				
48	Mecyc	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	14.5	39.8				
49	PhCl	0.108	15.563	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>				

<sup>a</sup>  $a_N$  and  $a_P$  are given in G (1 G = 0.1 mT).<sup>b</sup> CHex: *cyclo*-hexane, *t*-BuPh: *tert*-butylbenzene, PhBr: bromobenzene, AcPh: acetophenone, DCE: 1,2-di-chloroethane, DME: 1,2-dimethoxyethane, 14D: 1,4-dioxane, THF: tetrahydrofuran, AcOEt: ethyl acetate, ACN: acetonitrile, DMSO: dimethylsulfoxide, F: formamide, NMF: *N*-methylformamide, DMF: *N,N*-dimethylformamide, TFE: 2,2,2-trifluoroethanol, EG: ethylene glycol, TEG: triethylene glycol, AcOH: acetic acid, BnOH: benzylic alcohol. *i*-PenOH: *iso*-pentanol, Mecyc: Methyl *cyclo*-hexane, PhCl: chlorobenzene. <sup>c</sup> Not measured.

**% water in THF, mole fraction  $x_{\text{water}}$ , nitrogen and phosphorus hyperfine coupling constants  $a_{\text{N}}$  and  $a_{\text{P}}$ , respectively, of 33c for different % of water.**

entry	% water	$x_{\text{water}}$	$a_{\text{N}}$ (G)	$a_{\text{P}}$ (G)
1	0	0	14.94	29.56
2	0.1	0.0045	15.05	29.47
3	0.2	0.0090	15.05	29.38
4	0.3	0.0134	15.00	29.14
5	0.4	0.0178	15.06	29.06
6	0.5	0.0221	15.04	28.78
7	0.6	0.0265	15.04	28.64
8	0.7	0.0308	15.10	28.48
9	0.8	0.0350	15.04	28.30
10	0.9	0.0393	15.04	28.00
11	1	0.0435	15.14	27.82
12	2	0.0840	15.21	27.28
13	3	0.1220	15.24	26.76
14	4	0.1580	15.34	26.00
15	5	0.1920	15.34	25.82
16	10	0.3334	15.38	25.36
17	20	0.5295	15.56	24.82
18	30	0.6586	15.62	24.52
19	40	0.7501	15.68	24.4
20	50	0.8182	15.80	24.22
21	60	0.8710	15.86	24.12
22	70	0.9131	15.98	24.12
23	80	0.9474	16.16	24.12
24	90	0.9759	16.22	24.12
25	100	1	16.22	24.18

**2,2,2-trifluoro-N-(2-(pyridin-4-yl)ethyl)acetamide (54) :**



**54**  
**C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O**  
**MW = 218,18**

2-(pyridin-4-yl)ethanamine<sup>65</sup> **49** (2.00 g, 16.37 mmol) was diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) and pyridine (1.45 mL, 18.01 mmol, 1.1 equiv.) was added. The reaction mixture was cooled to 0 °C and 2,2,2-trifluoroacetic anhydride (2.31 mL, 16.37 mmol, 1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) was added slowly *via* a dropping funnel. The reaction was allowed to stir for 2 h and was then quenched with NaHCO<sub>3</sub> sat.. Solid NaHCO<sub>3</sub> was added to adjust the mixture to pH 9. Then the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was recrystallized with petroleum ether/ toluene to yield trifluoroacetamid **54** (3.19 g, 89 %) as slightly yellowish solid.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.50 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 3.66 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.8 (q, *J* = 37 Hz, C), 149.6 (2 × CH), 147.8 (C), 124.4 (2 × CH), 116.0 (q, *J* = 288 Hz, C), 40.4 (CH<sub>2</sub>), 34.5 (CH<sub>2</sub>).

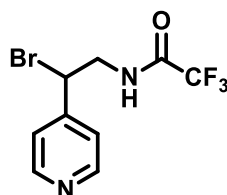
**<sup>19</sup>F NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.9.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>OF<sub>3</sub><sup>+</sup>: 219.0740 [M+H]<sup>+</sup>; found: 218.0739.

**M.p.** = 97 °C

<sup>65</sup> T. Steinmetzer, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 4116-4126.

***N*-(2-bromo-2-(pyridin-4-yl)ethyl)-2,2,2-trifluoroacetamide (55):**



**55**

**C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O**

**MW = 297,07**

Trifluoroacetamide **54** (5.00 g, 22.92 mmol), *N*-bromosuccinimide (8.16 g, 45.83 mmol, 2 equiv.) and NaHCO<sub>3</sub> (7.70 g, 91.67 mmol, 4 equiv.) were dissolved in CHCl<sub>3</sub> (250 mL). The mixture was set under argon, refluxed and irradiated with a 300 W UV-lamp. The solution turned red and the reaction was stopped when the red color vanished. The solution was then stopped and washed with NaHCO<sub>3</sub> sat. and the aqueous phases were extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was subjected to automatic flash-chromatography with a gradient of acetone in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to yield bromide **55** (1.02 g, 15 %) as a brownish oil.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.64 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 5.04 (dd, *J* = 8.6, 5.5 Hz, 1H), 4.07 – 3.98 (m, 1H), 3.91 – 3.83 (m, 1H).

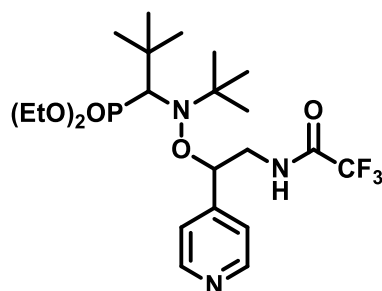
**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.7 (q, *J* = 38.0 Hz, C), 150.0 (2 × CH), 147.7 (C), 122.8 (2 × CH), 115.8 (q, *J* = 288 Hz, C), 48.3 (CH), 46.7 (CH<sub>2</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.8.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>OF<sub>3</sub>Br<sup>+</sup>: 296.9845 [M+H]<sup>+</sup>; found: 296.9845.



**Diethyl(1-(*tert*-butyl(1-(pyridin-4-yl)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)ethoxy)amino)-2,2-dimethylpropyl)phosphonate (**55**):**

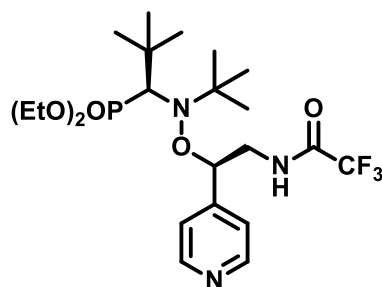


**56**

**C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P**  
**MW = 511,52**

To a suspension of CuBr (861 mg, 6.0 mmol, 0.6 equiv.) and Cu powder (763 mg, 12.0 mmol, 1.2 equiv.) in degassed benzene (30 mL) under argon was added *N,N,N',N',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (1.25 mL, 6.0 mmol, 0.6 equiv.). After stirring for 10 min, a solution of SG<sub>1</sub> nitroxide **1** (3.24 g, 11.0 mmol, 1.1 equiv.) and bromide **55** (2.97 g, 10.0 mmol, 1 equiv.) in degassed benzene (30 mL) was cannulated into the first solution. The mixture was allowed to stir for 12 h. The solution was diluted with EtOAc, quenched and washed with 50 % (v/v) aq. ammonia solution, NaHCO<sub>3</sub> sat. and dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product with a 1:1 (*RR/SS*):(*RS/SR*) diastereomeric ratio (<sup>31</sup>P NMR ratio) was purified by automatic flash-chromatography with a gradient of acetone in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give (*RS/SR*)-**56** (1.7 g) and (*RR/SS*)-**56** (2.24 g) as colourless oils, corresponding to a total yield of 3.94 g (77 %).

**(*RS/SR*)-56:**



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.92 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 5.03 (br s, 1H), 4.40 – 4.28 (m, 1H), 4.25 – 4.13 (m, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.98 – 3.84 (m, 2H), 3.42 (d, *J* = 28.1 Hz, 1H), 1.42 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.24 (s, 9H), 1.01 (s, 9H).

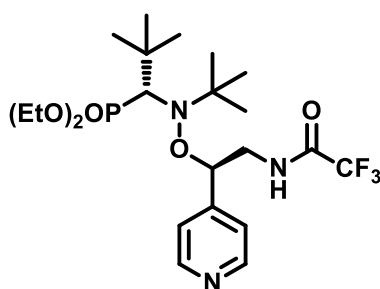
**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.2 (q, *J* = 37 Hz, C), 149.5 (2 × CH), 148.3 (C), 121.4 (2 × CH), 115.9 (q, *J* = 288 Hz, C), 86.10 (CH), 67.6 (d, *J* = 140 Hz, CH), 62.5 (C), 61.5 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 60.4 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 43.3 (CH<sub>2</sub>), 35.5 (d, *J* = 5.0 Hz, C), 30.6 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.7 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.3 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.9 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.6.

**<sup>19</sup>F NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.6.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>F<sub>3</sub>P<sup>+</sup>: 512.2496 [M+H]<sup>+</sup>; found: 512.2498.

**(RR/SS)-56:**



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.56 (d, *J* = 3.5 Hz, 2H), 7.37 (br s, 1H), 7.36 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 5.24 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.23 – 4.12 (m, 1H), 4.03 – 3.85 (m, 2H), 3.69 – 3.60 (m, 1H), 3.57 – 3.40 (m, 2H), 3.46 (d, *J* = 26.6 Hz, 1H), 1.27 – 1.22 (m, 12H), 1.22 (s, 9H), 1.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

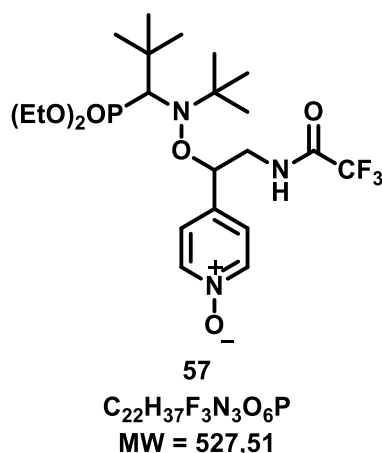
**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.4 (q, *J* = 37 Hz, C), 149.5 (2 × CH), 148.1 (C), 122.9 (2 × CH), 115.9 (q, *J* = 288 Hz), 79.6 (CH), 69.6 (d, *J* = 140 Hz, CH), 62.4 (C), 61.5 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.7 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 35.2 (d, *J* = 4.4 Hz, C), 30.8 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 28.1 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.2 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.1 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 23.9.

**<sup>19</sup>F NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -75.7.

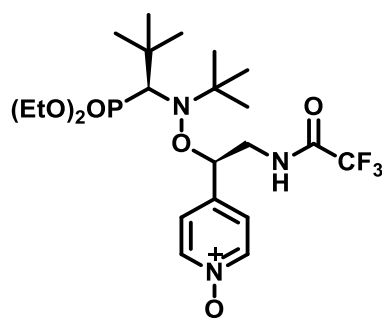
**HRMS (ESI)** calc for  $C_{22}H_{38}N_3O_5F_3P^+$ : 512.2496  $[M+H]^+$ ; found: 512.2498.

**4-(1-((*tert*-butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)ethyl)pyridine 1-oxide (57):**



Diastereomerically pure trifluoroacetamide (*RR/SS*)-**56** (500 mg, 0.977 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (50 mL) and 77 % *m*-CPBA (263 mg, 1.17 mmol, 1.2 equiv.) was added at once to the solution. The solution was allowed to stir for 30 min and was then quenched and washed with 10 %  $Na_2SO_3$  solution and  $NaHCO_3$  sat.. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and the solvents were evaporated *in vacuo*. The crude product was purified by flash-column chromatography with a gradient of MeOH in  $CH_2Cl_2$  to give *N*-oxide (*RR/SS*)-**57** (515 mg, quant.) as a colorless oil. The reaction was likewise performed for (*RS/SR*)-**57** (500 mg, 0.977 mmol) and 77 % *m*-CPBA (263 mg, 1.17 mmol, 1.2 equiv.), yielding 515 mg (quant.) of the desired product.

**(RS/SR)-57:**



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  9.97 (br s, 1H), 8.16 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.16 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 5.03 (br s, 1H), 4.34 – 4.23 (m, 1H), 4.23 – 4.02 (m, 2H), 4.12 – 4.02 (m, 1H), 3.96 – 3.84

(m, 2H), 3.42 (d,  $J = 28.2$  Hz, 1H), 1.40 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.02 (s, 9H).

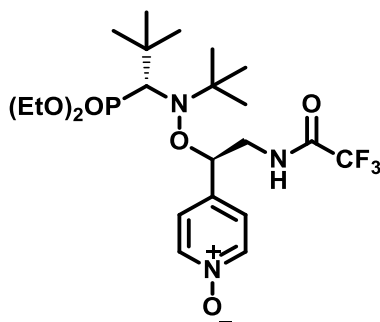
**$^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  157.3 (q,  $J = 37$  Hz, C), 138.8 ( $2 \times \text{CH}$ ), 138.6 (C), 124.0 ( $2 \times \text{CH}$ ), 115.9 (q,  $J = 288$  Hz, C), 85.0 (CH), 67.7 (d,  $J = 140$  Hz, CH), 62.7 (C), 61.5 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 60.6 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 43.0 ( $\text{CH}_2$ ), 35.5 (d,  $J = 5.0$  Hz, C), 30.7 (d,  $J = 6.1$  Hz,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 27.8 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 16.4 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 16.0 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P}$  NMR** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.2.

**$^{19}\text{F}$  NMR** (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -75.6.

**HRMS (ESI)** calc for  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_6\text{F}_3\text{P}^+$ : 528.2445  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found: 528.2447.

**(RR/SS)-57:**



**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.09 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 7.6 (br s, 1H), 7.40 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 5.22 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.27 – 4.17 (m, 1H), 4.06 – 3.88 (m, 2H), 3.70 – 3.47 (m, 3H), 3.46 (d,  $J = 26.6$  Hz, 1H), 1.03 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.20 (s, 9H), 1.10 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H).

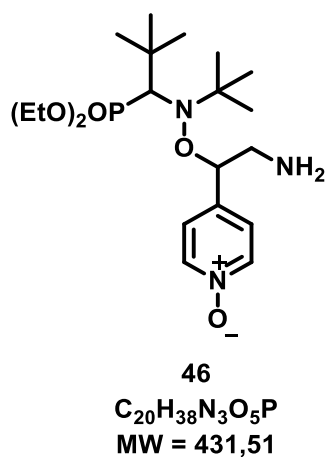
**$^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  157.2 (q,  $J = 37$  Hz, C), 139.3 (C), 137.6 ( $2 \times \text{CH}$ ), 125.7 ( $2 \times \text{CH}$ ), 115.5 (q,  $J = 288$  Hz, C), 78.1 (CH), 68.9 (d,  $J = 141$  Hz, CH), 61.7 (C), 60.8 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 59.1 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 42.6 ( $\text{CH}_2$ ), 34.8 (d,  $J = 3.9$  Hz, C), 30.3 (d,  $J = 6.1$  Hz,  $3 \times \text{CH}_3$ ), 27.6 ( $3 \times \text{CH}_3$ ), 15.8 (d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 15.7 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P}$  NMR** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.0.

**<sup>19</sup>F NMR** (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -75.5.

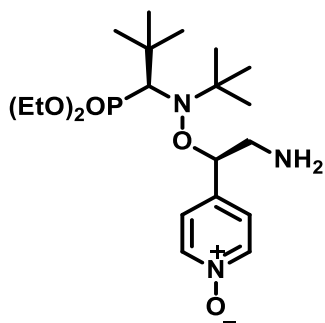
**HRMS (ESI)** calc for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>F<sub>3</sub>P<sup>+</sup>: 528.2445 [M+H]<sup>+</sup>; found: 528.2447.

**4-(2-amino-1-((*tert*-butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)ethyl)pyridine 1-oxide (46):**



Diastereomerically pure *N*-oxide (***RR/SS***)-**57** (86 mg, 0.163 mmol) was dissolved in MeOH (15 mL) and KOH (274 mg, 4.891 mmol, 30 equiv.) was added at once to the flask. The solution was allowed to stir for 1 day and the reaction was quenched with water. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was subjected to automatic flash-column chromatography with a gradient of MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give amine (***RR/SS***)-**46** (70 mg, 100 %) as a colourless oil. The reaction was likewise performed for (***RS/SR***)-**46** (100 mg, 0.189 mmol) and KOH (319 mg, 5.69 mmol, 30 equiv.), yielding 76 mg (90 %) of the desired product.

**(*RS/SR*)-46:**



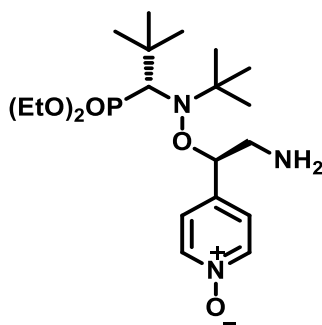
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.25 (overlapped d, 2H), 4.86 (br s, 1H), 4.40 – 4.25 (m, 1H), 4.15 – 3.95 (m, 3H), 3.36 (d, *J* = 26.9 Hz, 1H), 3.35 – 3.17 (m, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.21 (s, 9H), 0.94 (s, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 141.3 (C), 138.8 (2 × CH), 125.3 (2 × CH), 88.3 (CH), 69.0 (d, *J* = 139 Hz, CH), 62.0 (C), 61.5 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.6 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 46.3 (CH<sub>2</sub>), 35.7 (d, *J* = 5.5 Hz, C), 30.3 (d, *J* = 5.5 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 28.6 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.7 (d, *J* = 5.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.3 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.3.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 432.2622 [M+H]<sup>+</sup>; found: 432.2623.

**(RR/SS)-46:**



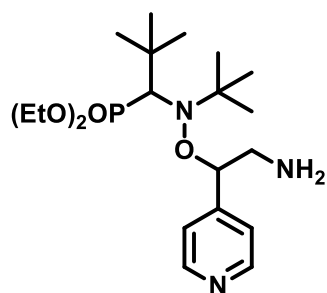
**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.16 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.06 – 3.81 (m, 2H), 3.81 – 3.30 (m, 3H), 3.41 (d, *J* = 26.9 Hz, 1H), 2.90 (br s, 1H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.18 (s, 9H), 1.18 (s, 9H), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 139.4 (C), 138.7 (2 × CH), 126.11 (2 × CH), 82.2 (CH), 69.3 (d, *J* = 140 Hz, CH), 61.7 (C), 61.3 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.2 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 44.08 (CH<sub>2</sub>), 35.2 (d, *J* = 4.4 Hz, C), 30.7 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.9 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.2 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.1 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24.1.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 432.2622 [M+H]<sup>+</sup>; found: 432.2623.

**Diethyl (1-((2-amino-1-(pyridin-4-yl)ethoxy)(*tert*-butyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)phosphonate (**44**):**

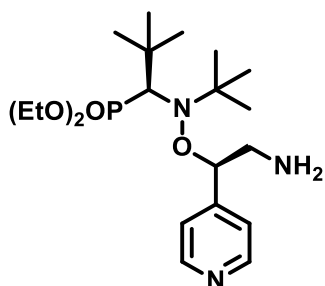


**44**

**C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P**  
**MW = 415,51**

Diastereomerically pure alkoxyamine (***RS/SR***-**56**) (180 mg, 0.433 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and KOH (729 mg, 12.996 mmol, 30 equiv.) was added. The mixture was allowed to stir for 5 days. Then the reaction was quenched with water. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by automatic flash-chromatography. Amine (***RS/SR***-**44**) (133 mg, 91 %) was obtained as colorless oil, which crystallized in the refrigerator. The reaction was likewise performed for (***RR/SS***-**56**) (293 mg, 0.573 mmol) and KOH (964 mg, 17.184 mmol, 30 equiv.), yielding 180 mg (76 %) of (***RR/SS***-**44**) as a colourless oil which co-crystallized with diethyl ether in the refrigerator.

**(*RS/SR*)-44:**



**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.59 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.91 (br s, 1H), 4.40 – 4.29 (m, 1H), 4.20 – 3.95 (m, 3H), 3.38 (d, *J* = 27.0 Hz, 1H), 3.29 (br s, 2H), 1.38 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 0.92 (s, 9H).

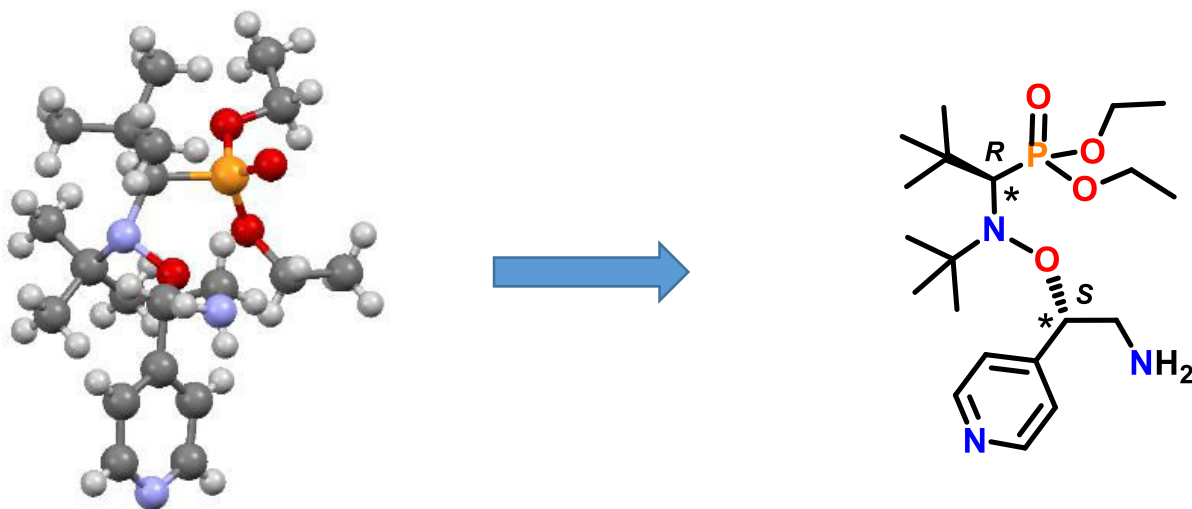
**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.6 (C), 148.9 (2 × CH), 122.0 (2 × CH), 88.0 (CH), 68.1 (d, *J* = 139 Hz, CH), 61.2 (C), 61.0 (CH<sub>2</sub>), 58.9 (d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 45.8 (br s, CH<sub>2</sub>), 35.0 (d, *J* = 5.1 Hz, C), 29.6 (d, *J* = 5.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.8 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.0 (d, *J* = 5.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 15.5 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 25.6.

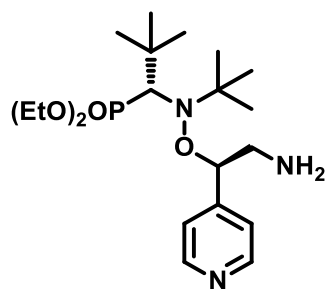
**HRMS (ESI)** calc for C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P<sup>+</sup>: 416.2673 [M+H]<sup>+</sup>; found: 416.2673.

**M.p.** = 86 °C

**RX (RS/SR)-44:**



**(RR/SS)-44:**





**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.58 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 7.41 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 5.01 (dd,  $J$  = 3.5 Hz, 9.2 Hz, 1H), 4.03 – 3.82 (m, 2H), 3.68 (dd,  $J$  = 3.5 Hz, 12.8 Hz, 1H), 3.56 – 3.31 (m, 2H), 3.42 (d,  $J$  = 26.4 Hz, 1H), 2.94 (dd,  $J$  = 9.5 Hz, 12.7 Hz, 1H), 1.24 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.21 (s, 9H), 1.20 (s, 9H), 0.97 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

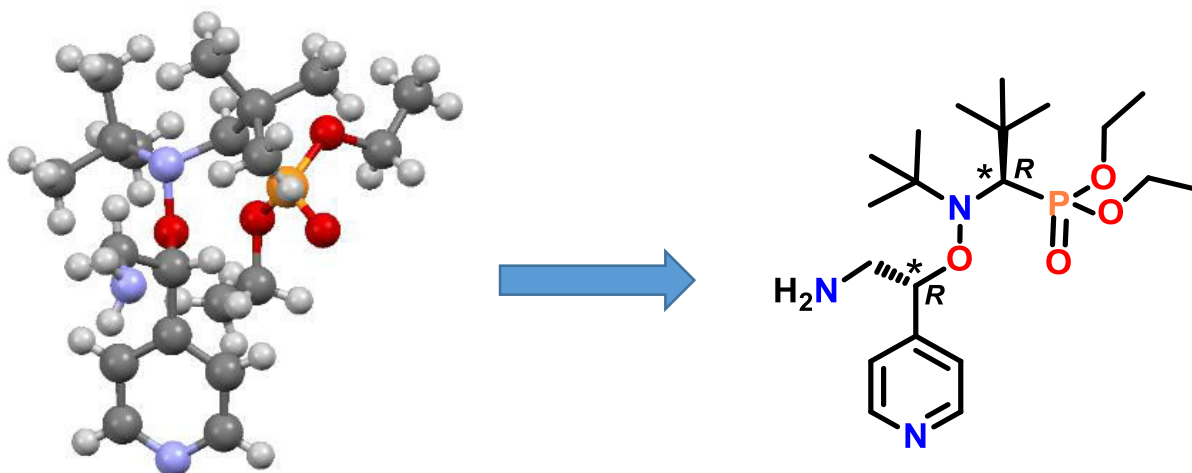
**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  149.7 (2  $\times$  CH), 149.2 (C), 123.6 (2  $\times$  CH), 83.4 (CH), 69.6 (d,  $J$  = 140 Hz, CH), 61.9 (C), 61.6 (d,  $J$  = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.2 (d,  $J$  = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 44.6 (CH<sub>2</sub>), 35.4 (d,  $J$  = 4.4 Hz, C), 30.9 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 28.1 (3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 16.3 (d,  $J$  = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.2 (d,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  24.2.

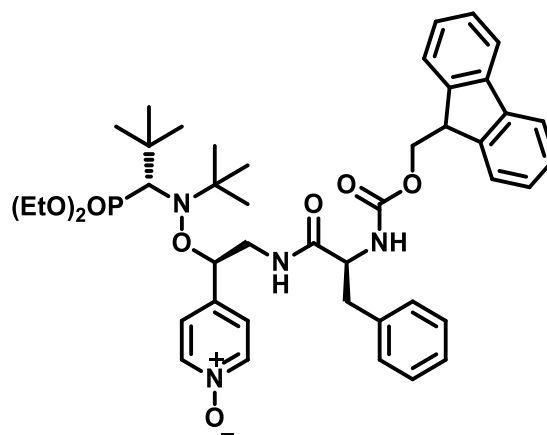
**HRMS (ESI)** calc for C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P<sup>+</sup>: 416.2673 [M+H]<sup>+</sup>; found: 416.2673.

**M.p.** = 92 °C

**RX (RR/SS)-44:**



**4-(5-benzyl-11-(tert-butyl)-12-(diethoxyphosphoryl)-1-(9H-fluoren-9-yl)-13,13-dimethyl-3,6-dioxo-2,10-dioxo-4,7,11-triazatetradecan-9-yl)pyridine 1-oxide (63):**



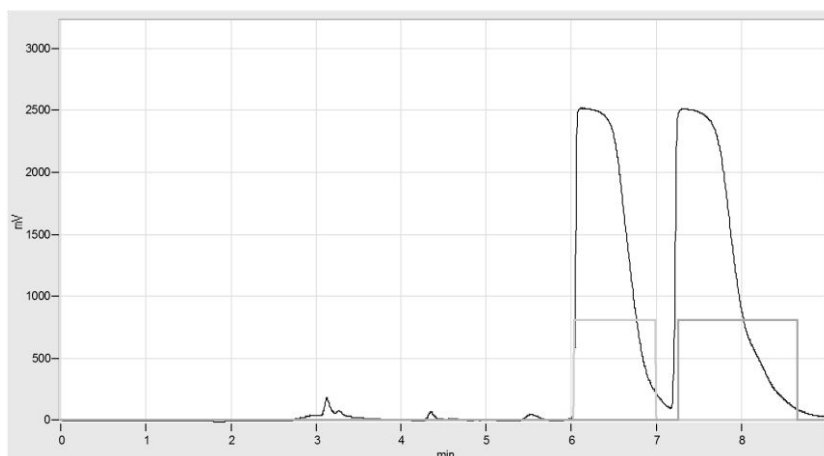
63

C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P

MW = 800,92

Diastereomerically pure *N*-oxide (*RR/SS*)-**7** (40 mg, 0.093 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). Fmoc-Phe-OH (43 mg, 0.111 mmol, 1.2 equiv.), HOBt (15 mg, 0.111 mmol, 1.2 equiv.), DIC (17 μL, 0.111 mmol, 1.2 equiv.) was successively added to the flask. The solution was allowed to stir for 30 minutes and was quenched with water. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product with a 1:1 (*RRS/SSS*) diastereomeric ratio (<sup>31</sup>P NMR ratio) was subjected to automatic flash-column chromatography with a gradient of MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give amide (*RRS/SSS*)-**63** (66 mg, 89 %) as a yellowish solid. The two diastereoisomers was separated by preparative HPLC with Hexane/ EtOH 8/2.

**HPLC:**



### **Dia1-63:**

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.50 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.39 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.33 – 7.22 (m, 7H), 7.11 (br s, 2H), 6.05 (br s, 1H), 5.51 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 5.02 (dd,  $J = 3.7$  Hz;  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.45 – 4.36 (m, 1H), 4.36 – 4.19 (m, 3H), 4.14 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 4.02 – 3.85 (m, 2H), 3.65 – 3.54 (m, 1H), 3.51 – 3.41 (m, 1H), 3.41 (d,  $J = 27.0$  Hz, 1H), 3.65 (br s, 1H), 2.98 (br s, 2H), 1.24 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.19 (s, 9H), 1.15 (s, 9H), 1.05 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.5 (C), 155.9 (C), 143.6 (C), 141.1 (C), 140.1 (C), 138.4 (2  $\times$  CH), 136.6 (C), 129.1 (2  $\times$  CH), 128.5 (2  $\times$  CH), 127.5 (2  $\times$  CH), 126.9 (2  $\times$  CH), 126.8 (2  $\times$  CH), 126.0 (2  $\times$  CH), 125.0 (CH), 119.8 (2  $\times$  CH), 79.1 (CH), 69.2 (d,  $J = 139$  Hz, CH), 66.9 (CH<sub>2</sub>), 62.0 (C), 61.2 (d,  $J = 7.7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 59.4 (d,  $J = 7.2$  Hz, CH<sub>2</sub>), 56.13 (CH), 46.9 (CH), 42.2 (CH<sub>2</sub>), 38.2 (CH<sub>2</sub>), 35.2 (d,  $J = 4.4$  Hz, C), 30.6 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 27.9 (3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 16.2 (d,  $J = 5.5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 16.1 (d,  $J = 6.6$  Hz, CH<sub>3</sub>).

**$^{31}\text{P NMR}$**  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  24.0.

**HRMS (ESI)** calc for  $\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}^+$ : 801.3987  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found: 801.3982.

**$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$**  = +39.9 ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ )

**M. p.** = 120  $^\circ\text{C}$  decomp.

### **Dia2-63:**

**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.03 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.52 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 7.39 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 5H), 7.16 (br s, 2H), 7.08 (d,  $J = 5.7$  Hz,

2H), 5.95 (br s, 1H), 5.46 (br d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 4.87 (br d,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 4.43 (dd,  $J = 6.9$  Hz;  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.34 (br s, 1H), 4.30 – 4.21 (m, 2H), 4.16 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.02 – 3.83 (m, 2H), 3.63 – 3.50 (m, 1H), 3.47 – 3.40 (m, 1H), 3.41 (d,  $J = 26.9$  Hz, 1H), 3.29 (br s, 1H), 2.99 (br d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.19 (s, 9H), 1.18 (s, 9H), 1.04 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.3 (C), 155.8 (C), 143.7 (C), 141.2 (C), 139.9 (C), 138.4 (2  $\times$  CH), 136.7 (C), 129.4 (2  $\times$  CH), 128.7 (2  $\times$  CH), 127.7 (2  $\times$  CH), 127.0 (2  $\times$  CH), 125.9 (2  $\times$  CH), 125.2 (CH), 125.0 (CH), 119.9 (2  $\times$  CH), 79.1 (CH), 69.4 (d,  $J = 140$  Hz, CH), 67.0 ( $\text{CH}_2$ ), 62.0 (C), 61.4 (d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 59.5 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 56.4 (CH), 47.0 (CH), 42.0 ( $\text{CH}_2$ ), 38.7 ( $\text{CH}_2$ ), 35.3 (d,  $J = 3.9$  Hz, C), 30.7 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 28.0 (3  $\times$   $\text{CH}_3$ ), 16.3 (d,  $J = 6.1$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 16.1 (d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

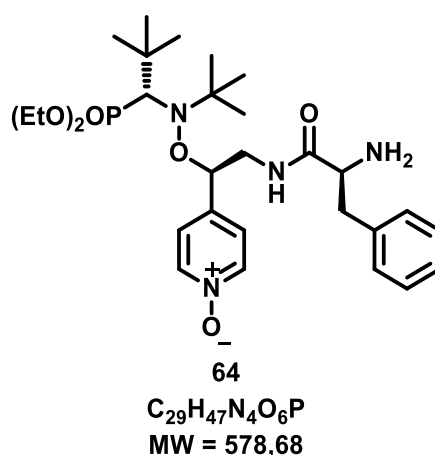
**$^{31}\text{P}$  NMR** (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  23.9.

**HRMS (ESI)** calc for  $\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}^+$ : 801.3987  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; found: 801.3982.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -60.4$  ( $c$  1.0,  $\text{CHCl}_3$ )

**M. p.** = 124 °C decomp.

**4-(2-(2-amino-3-phenylpropanamido)-1-((tert-butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)ethyl)pyridine 1-oxide (64):**



Diastereomerically pure **Dia2-63** (393 mg, 0.462 mmol) was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) at 0 °C under an argon atmosphere and DBU (69  $\mu\text{L}$ , 0.554 mmol, 1.2 equiv.) was

added to the flask. The solution was allowed to stir for 3 hours and was quenched with water. The aqueous phase was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was subjected to automatic flash-column chromatography with a gradient of MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give amide **Dia2-64** (244 mg, 93 %) as a white solid. The reaction was likewise performed for **Dia1-63** (260 mg, 0.325 mmol) and DBU (58 μL, 0.390 mmol, 1.2 equiv.) yielding 162 mg (93 %) of **Dia1-64**.

#### **Dia1-64:**

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.09 (m, 2H), 7.35 – 7.29 (m, 2H), 7.29 – 7.22 (overlapped m, 4H), 7.16 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 5.04 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.40 – 4.31 (m, 1H), 4.04 – 3.85 (m, 2H), 3.66 – 3.54 (m, 1H), 3.54 – 3.36 (m, 4H), 3.07 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 8.6, 13.6 Hz, 1H), 1.25 (partially overlapped t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.22 (s, 18H), 1.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.6 (C), 138.7 (C), 138.4 (2 × CH), 137.1 (C), 129.3 (2 × CH), 128.5 (2 × CH), 126.7 (2 × CH), 125.7 (2 × CH), 79.0 (CH), 69.2 (d, *J* = 139 Hz, CH), 61.8 (C), 61.1 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.2 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 55.6 (CH), 41.3 (CH<sub>2</sub>), 40.3 (CH<sub>2</sub>), 35.1 (d, *J* = 3.9 Hz, C), 30.6 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.8 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.1 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.0 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24.1.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 579.3306 [M+H]<sup>+</sup>; found: 579.3294.

**[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>** = -130.3 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**M. p.** = 69 °C decomp.

#### **Dia2-64:**

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.33 – 7.2 (m, 4H), 7.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.08 (dd, *J* = 4.0; 8.9 Hz, 1H), 4.36 – 4.26 (m, 1H), 4.04 – 3.85 (m, 2H), 3.66 – 3.37 (m, 5H), 3.15 (dd, *J* = 4.4; 13.8 Hz, 1H), 2.51 (br s, 1H), 1.25 (partially overlapped t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.22 (s, 9H), 1.21 (s, 9H), 1.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.7 (C), 138.7 (C), 138.4 (2 × CH), 137.4 (C), 129.1 (2 × CH), 128.5 (2 × CH), 126.6 (2 × CH), 125.8 (2 × CH), 79.0 (CH), 69.3 (d, *J* = 139 Hz, CH), 61.8 (C), 61.1 (d, *J* = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.2 (d, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 56.2 (CH), 41.2 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 35.1 (d, *J* = 4.4 Hz, C), 30.6 (d, *J* = 6.1 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.8 (3 × CH<sub>3</sub>), 16.1 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.0 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).

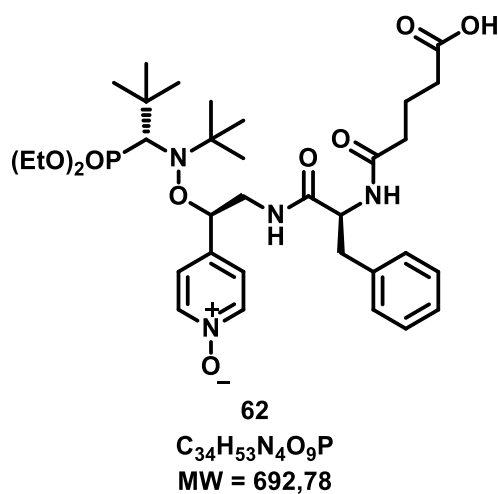
**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 24.0.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 579.3306 [M+H]<sup>+</sup>; found: 579.3294.

**[α]<sup>25</sup><sub>D</sub>** = -274.2 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**M. p.** = 73 °C decomp.

**4-(10-benzyl-4-(tert-butyl)-15-carboxy-3-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethyl-9,12-dioxo-5-oxa-4,8,11-triazapentadecan-6-yl)pyridine 1-oxide (62):**



Diastereomerically pure **Dia2-64** (160 mg, 0.276 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) at 0 °C under an argon atmosphere. NaHCO<sub>3</sub> (93 mg, 1.10 mmol, 4 equiv.) and glutaric anhydride (47 mg, 0.415 mmol, 1.5 equiv.) was added to the flask. The solution was allowed to stir for 3 hours. Then, the solvent was evaporated and the crude product was subjected to automatic flash-column chromatography with a gradient of MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give carboxylic acid **Dia2-62** (180 mg, 93 %) as a white solid. The reaction was likewise performed for **Dia1-**

**64** (160 mg, 0.276 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (93 mg, 0.415 mmol, 4 equiv.) and glutaric anhydride (47 mg, 0.415 mmol, 1.5 equiv.) yielding 173 mg (91 %) of **Dia1-62**.

**Dia1-62:**

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.05 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 3H), 7.20 – 7.13 (m, 4H), 6.60 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 6.32 (br s, 1H), 5.08 (dd,  $J$  = 4.03; 8.7 Hz, 1H), 4.70 (dd,  $J$  = 6.2; 14.6 Hz, 1H), 4.53 – 4.43 (m, 1H), 4.05 – 3.85 (m, 2H), 3.73 – 3.54 (m, 2H), 3.46 (d,  $J$  = 28 Hz, 1H), 3.20 – 3.07 (m, 2H), 2.96 (dd,  $J$  = 5.8, 14.1 Hz, 1H), 2.26 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 2.17 – 2.00 (m, 2H), 1.95 – 1.70 (m, 2H), 1.26 (partially overlapped t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (s, 9H), 1.21 (s, 9H), 1.10 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  175.7 (C), 173.0 (C), 172.0 (C), 141.6 (C), 138.5 (2  $\times$  CH), 136.9 (C), 129.2 (2  $\times$  CH), 128.5 (2  $\times$  CH), 126.8 (2  $\times$  CH), 126.0 (2  $\times$  CH), 79.3 (CH), 69.2 (d,  $J$  = 141 Hz, CH), 62.0 (C), 61.6 (d,  $J$  = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.7 (d,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 54.3 (CH), 42.0 (CH<sub>2</sub>), 37.4 (CH<sub>2</sub>), 35.3 (d,  $J$  = 4.4 Hz, C), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 30.7 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 28.0 (3  $\times$  CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>2</sub>), 16.3 (d,  $J$  = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.1 (d,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  24.1.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sup>+</sup>: 693.3623 [M+H]<sup>+</sup>; found: 693.3630.

**$[\alpha]_D^{25}$**  = +40.6 ( $c$  1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**M. p.** = 104 °C decomp.

**Dia2-62:**

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.12 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 7.35 – 7.27 (m, 2H), 7.27 – 7.19 (m, 3H), 7.11 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 6.91 (br s, 1H), 6.52 (br s, 1H), 5.02 (br d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 4.54 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 4.08 (d,  $J$  = 12.1 Hz, 1H), 4.03 – 3.83 (m, 2H), 3.71 – 3.53 (m, 2H), 3.49 – 3.38 (m, 1H), 3.42 (d,  $J$  = 27 Hz, 1H), 3.01 (dd,  $J$  = 7.5, 13.8 Hz, 1H), 2.91 – 2.81 (m, 1H), 2.40 – 2.20 (m, 2H), 2.14 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.94 – 1.71 (m, 2H), 1.26 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.20 (s, 9H), 1.17 (s, 9H), 1.04 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  175.6 (C), 172.8 (C), 171.6 (C), 140.8 (C), 138.5 (2  $\times$  CH), 136.9 (C), 129.2 (2  $\times$  CH), 128.4 (2  $\times$  CH), 126.7 (2  $\times$  CH), 126.0 (2  $\times$  CH), 79.0 (CH), 69.3 (d,  $J$  = 140 Hz, CH), 61.8 (C), 61.5 (d,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 59.5 (d,  $J$  = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 54.4 (CH),

41.8 (CH<sub>2</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>), 35.1 (d, *J* = 3.9 Hz, C), 34.9 (CH<sub>2</sub>), 33.0 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (d, *J* = 5.5 Hz, 3 × CH<sub>3</sub>), 27.9 (3 × CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>2</sub>), 16.2 (d, *J* = 6.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.0 (d, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).

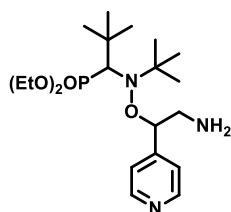
**<sup>31</sup>P NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 23.9.

**HRMS (ESI)** calc for C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P<sup>+</sup>: 693.3623 [M+H]<sup>+</sup>; found: 693.3630.

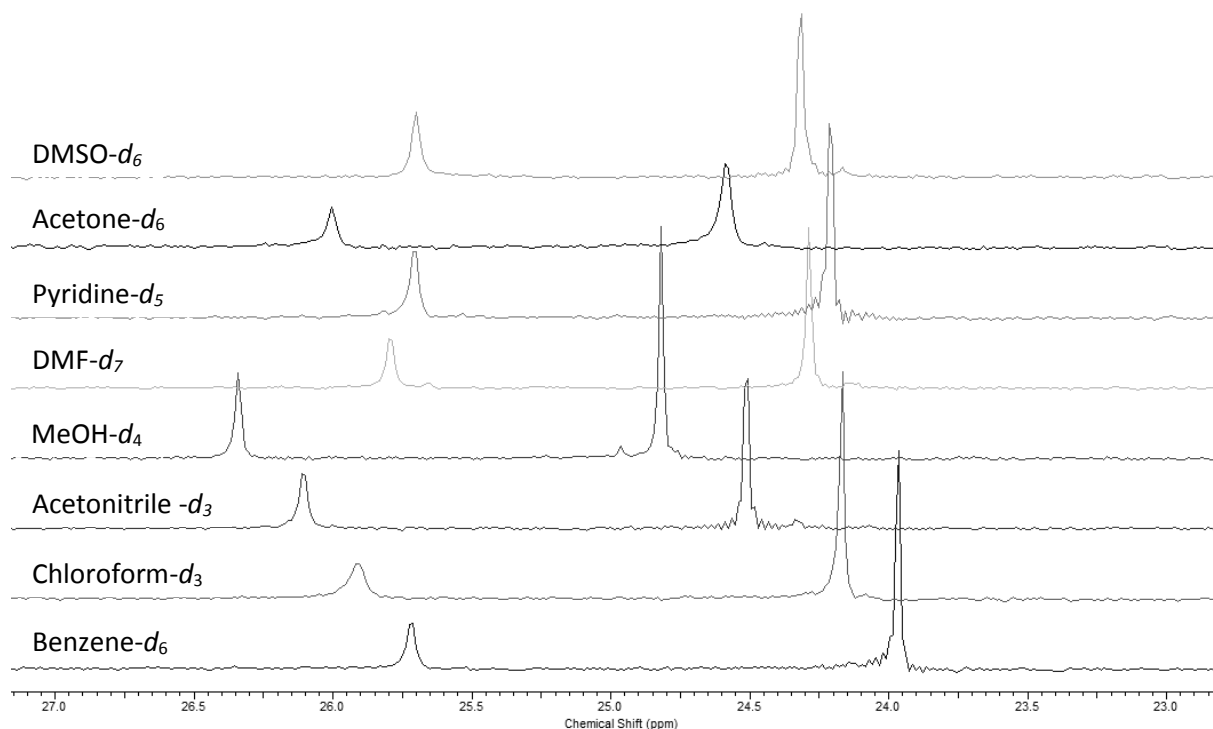
**[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>** = -63.6 (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>)

**M. p.** = 101 °C decomp.

**Intramolecular Hydrogen bond study of 44 :**



Diastereoisomers ratio ***RS/SR* 1 : 2 *RR/SS***



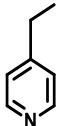
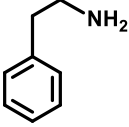
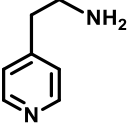
Solvent RMN	<i>RS/SR</i>	<i>RR/SS</i>
	$\delta_p$	$\Delta\delta_p$

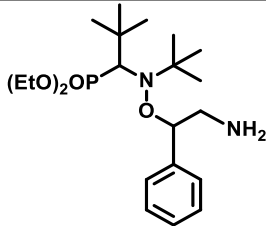
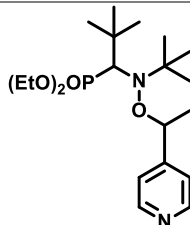
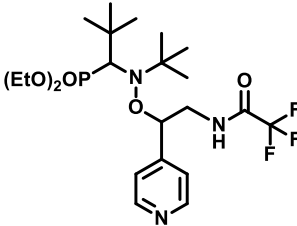
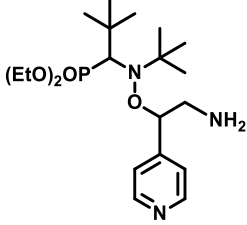
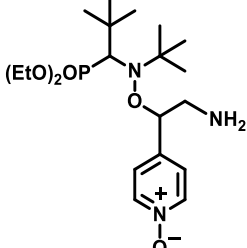


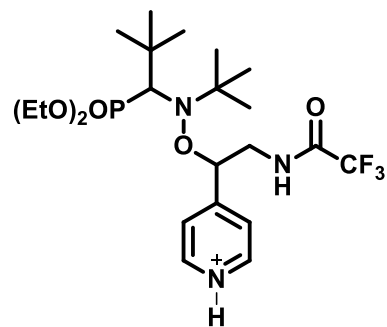
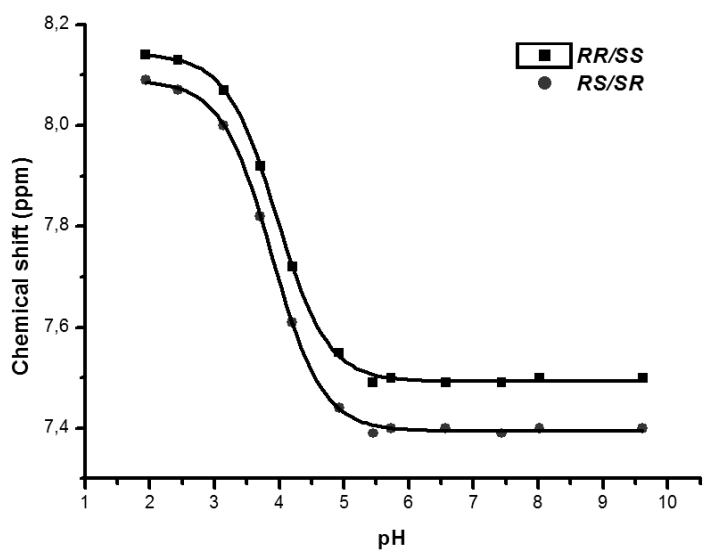
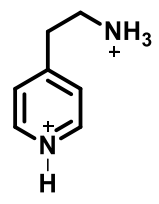
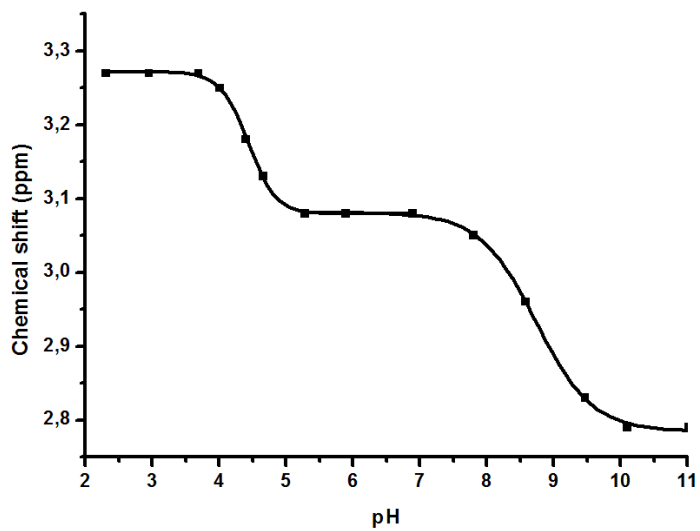
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	25,70	24,31	1,39
Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub>	26,00	24,59	1,41
Pyridine- <i>d</i> <sub>5</sub>	25,70	24,22	1,48
DMF- <i>d</i> <sub>7</sub>	25,80	24,29	1,51
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	26,34	24,82	1,52
Acetonitrile - <i>d</i> <sub>3</sub>	26,11	24,51	1,60
Chloroforme- <i>d</i> <sub>3</sub>	25,91	24,17	1,74
Benzene- <i>d</i> <sub>6</sub>	25,71	23,96	1,75

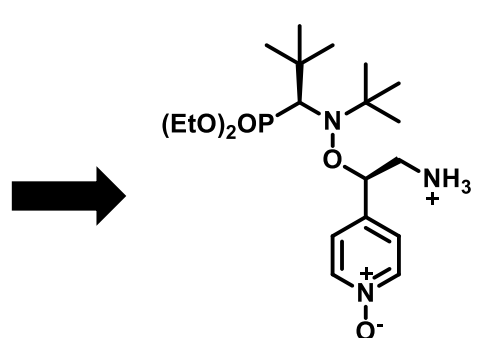
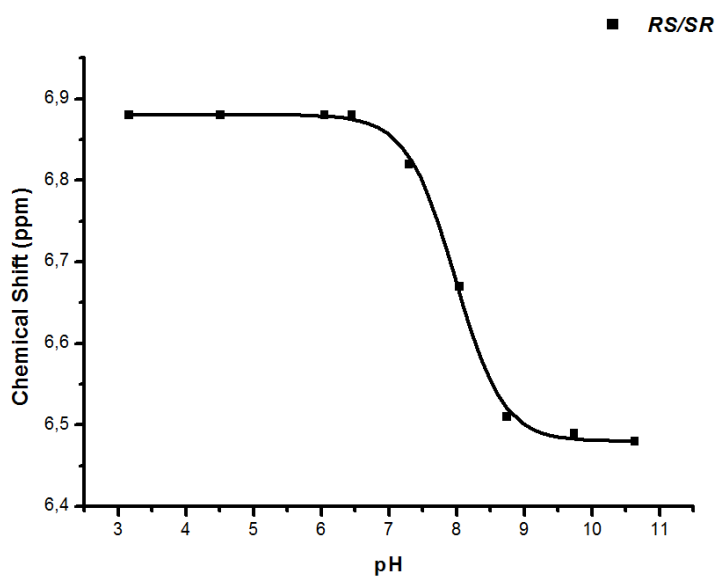
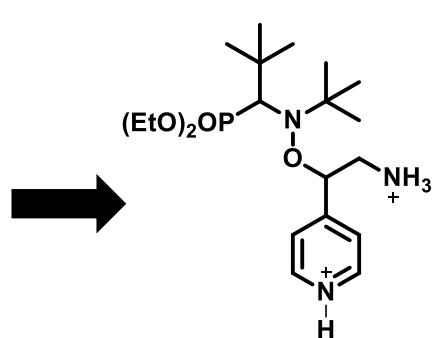
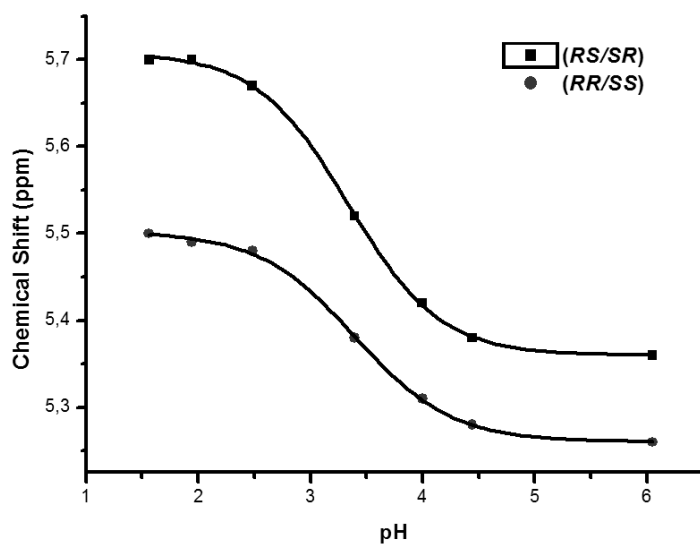
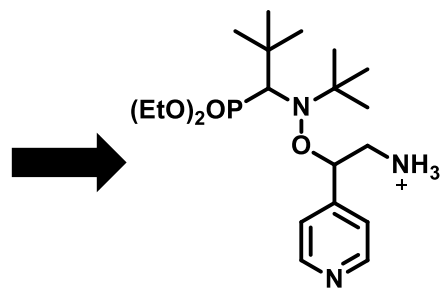
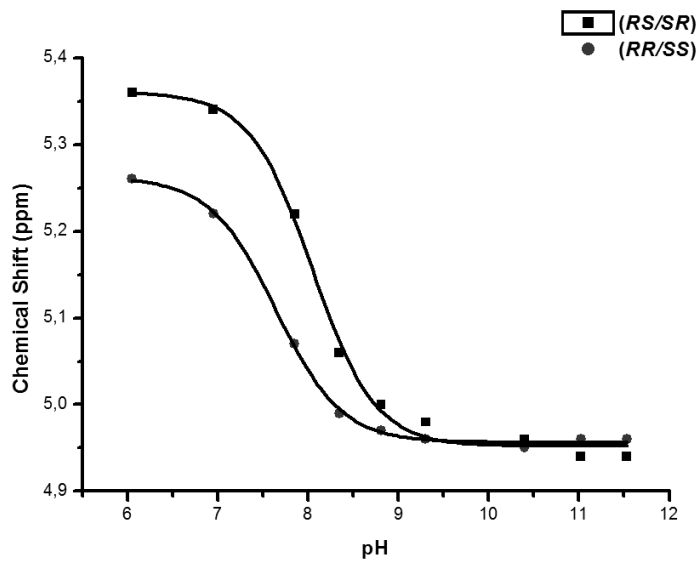
### pKa measurements :

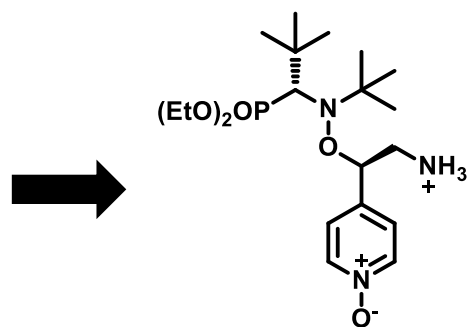
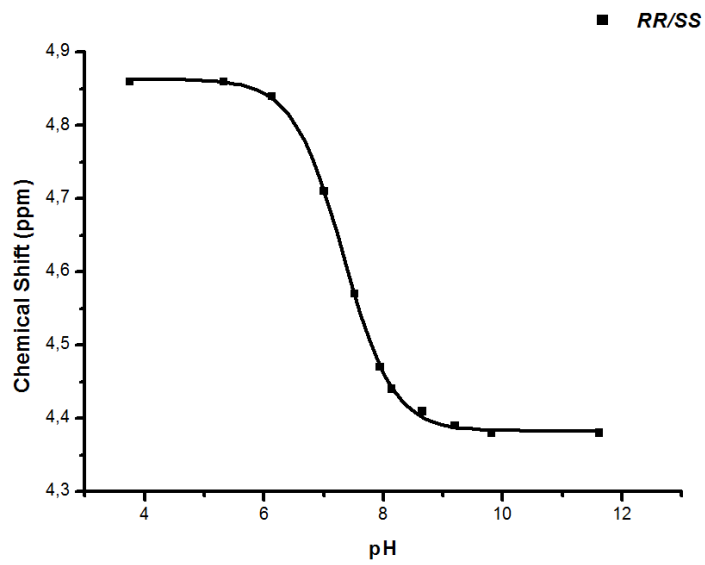
The dependence of the chemical shifts of alkoxyamine **35**, **42**, **44**, **46**, **49** and **56** upon protonation was investigated by means of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. 0.02 M samples in a D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>OD (v/v 1:1) mixture of alkoxyamine were used. The values of pH\* were adjusted with DCl or NaOD (0.2 M) and controlled by a Hanna Instruments HI-2211 pH-meter with SI Analyticmicro-pH electrode N 6003 (o.d. 3 mm glass, 180 mm stem length) and converted into pH-values *via* the correlation  $\text{pH} = 0.929 \cdot \text{pH}^* + 0.42$ . (A. Krężel; W. Bal, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 161-166.) <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz Advance spectrometer.

Composés	Structures	pK <sub>a</sub> RR/SS	pK <sub>a</sub> RS/SR	
4-éthylpyridine		-	6.03	-
2-phényléthylamine		-	9.83	-
49		-	4.41/8.53	-

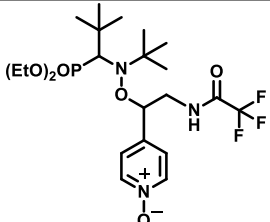
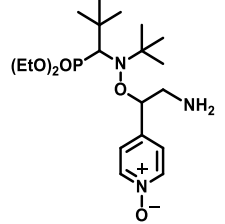
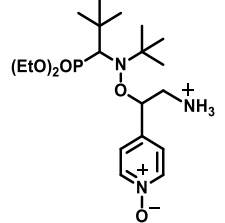
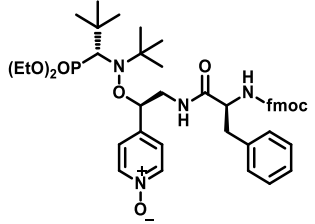
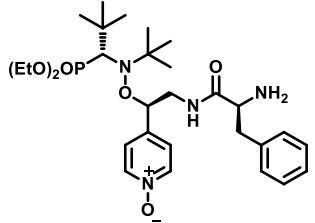
42		8.33	-	8.73
35		4.67	-	4.70
56		3.96	-	3.89
44		3.40/7.64	-	3.34/8.05
46		7.32	-	7.97

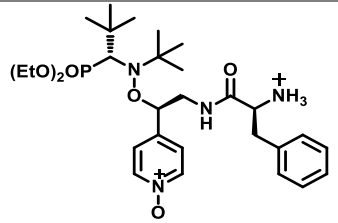
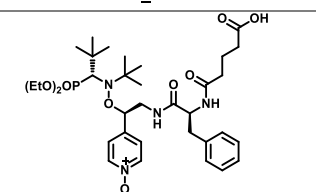
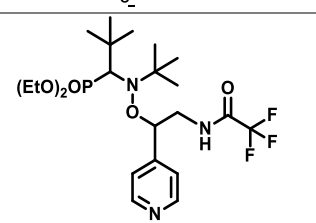
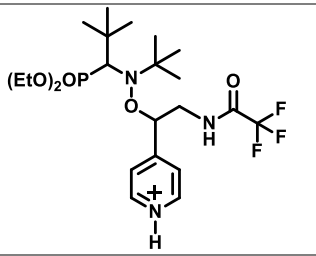
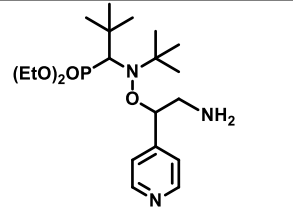






Compounds	Structures	Conditions	T (C°)	$k_a$ (s <sup>-1</sup> )( × 10 <sup>-4</sup> )		E <sub>a</sub> (kJ/mol)		$k_a$ rel. at 120°C		$t_{1/2}$ (s) at 120°C		$t_{1/2}$ at 37°C	
				RR/SS	RS/SR	RR/SS	RS/SR	RR/SS	RS/SR	RR/SS	RS/SR	RR/SS	RS/SR
56		<i>t</i> -BuPh	130		243		123,4		1,0		72,8		21 d.
			110	31,9		123,8		1,0		80,9		24 d.	
59		<i>t</i> -BuPh + 2eq. TFA	70		0,87		121,1		2,0		36,0		8 d.
			70	3,15		117,5		6,9		11,7		2 d.	
44		<i>t</i> -BuPh	130		227		123,7		0,9		78,1		23 d.
			120	110		123,0		1,3		63,0		17 d.	
60		<i>t</i> -BuPh + 1eq. TFA	89		7,73		121,3		1,9		37,5		9 d.
			81	4,96		119,9		3,3		24,6		5 d.	
61		<i>t</i> -BuPh + 2eq. TFA	90		13,7		119,9		3,0		24,5		5 d.
			79	4,32		119,6		3,6		22,7		5 d.	
		<i>t</i> -BuPh + 3eq. TFA	90		14,6		119,7		3,2		23,1		5 d.
			81	5,12		119,8		3,4		23,9		5 d.	

57		<i>t</i> -BuPh	70	9,97	114,2	17	4,3	14 h.
			50	16,8	106,1	222	0,4	36 min.
46		<i>t</i> -BuPh	50	0,42	116,1	9,6	7,6	1 d.
			80	26,6	114,6	16,5	4,9	16 h.
45		<i>t</i> -BuPh + 2eq. TFA	50	3,14	110,6	50,3	1,4	3 h.
			80	154	109,5	79,8	1,0	2 h.
63		<i>t</i> -BuPh	70	25,3	111,5	42,6	1,9	5 h.
64		<i>t</i> -BuPh	70	12,9	113,4	23,7	3,4	10 h.

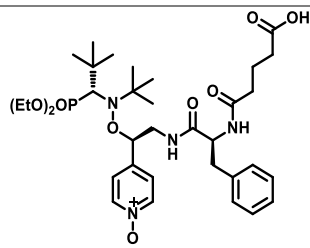
65		<i>t</i> -BuPh + 2eq. TFA	70	8,16	114,8	15,9	5,1	17 h.	
62		<i>t</i> -BuPh	70	2,97	117,6	6,6	12,3	2 d.	
56		H2O/MeOH (1:1)	90		8,57	121,3	1,9	37,7	9 d.
			71	2,95	118,0	5,9	13,8	3 d.	
59		H2O/MeOH (1:1) pH 1,88	80		116	110,3	55,7	1,3	3 h.
			80	176	109,1	90,0	0,9	2 h.	
44		H2O/MeOH (1:1) pH10	90		14,0	119,8	3,0	24,0	5 d.
			80	6,10	119,0	4,4	18,4	4 d.	



60				90	55,9	115,6	10,9	6,7	1 d.
		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH6		80	56,1	112,4	32,2	2,5	7 h.
61				60	48,5	106,5	179,8	0,4	41 min.
		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH1		50	39,4	103,8	448	0,2	15 min.
57				70	6,33	115,5	11,4	6,4	23 h.
		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1)		50	3,20	110,6	56,9	1,4	3 h.
46				50	0,97	113,8	19,2	3,8	12 h.
		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH 10		70	15,7	112,9	28,1	2,9	8 h.

45		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH6	50	7,55	108,3	103,6	0,7	1 h.
			60	60,1	105,9	240	0,3	33 min.
63		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1)	70	21,1	112,0	36,3	2,2	6 h.
64		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH10	70	18,5	112,4	32,4	2,5	7 h.
65		H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1) pH6	70	18,0	112,5	31,6	2,6	7 h.

62



H<sub>2</sub>O/MeOH  
(1:1)

70

15,9

112,9

28,4

2,8

8 h.

# *Annexes*

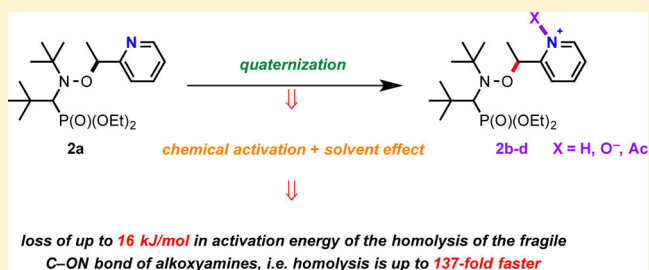
# Chemically Triggered C–ON Bond Homolysis of Alkoxyamines. 8. Quaternization and Steric Effects

Gérard Audran, Lionel Bosco, Paul Brémond,\* Sylvain R. A. Marque,\* Valérie Roubaud, and Didier Siri

Aix-Marseille Université, CNRS, Institut de Chimie Radicalaire UMR 7273, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France

## Supporting Information

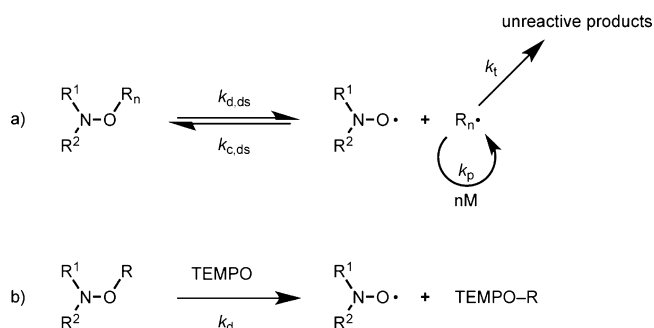
**ABSTRACT:** The C–ON bond homolysis in alkoxyamine **2a** was chemically triggered by quaternization of the 1-(pyridin-2-yl)ethyl fragment using protonation, acylation, and oxidation into the *N*-oxide. The solvent effect was also investigated, and DFT calculations were performed to explore this chemical activation. Alkoxyamines **2a–d** were also compared to the 1-(pyridin-4-yl)ethyl analogues **3a–d**.



## INTRODUCTION

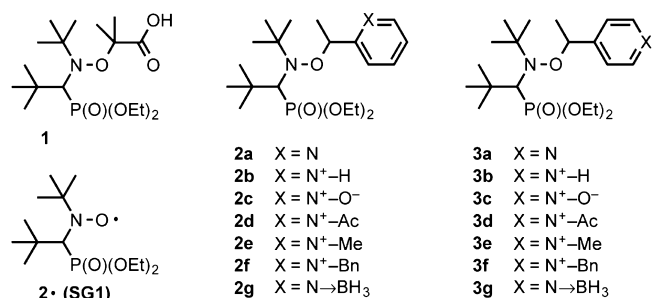
For more than two decades, extensive efforts from academic and industrial laboratories have been devoted to the development of nitroxide-mediated polymerization (NMP), in which nitroxide/alkoxyamine couples are used as controller/initiator reagents, respectively.<sup>1–6</sup> NMP is summarized in a three-stage polymerization process (Scheme 1a) using the following kinetic

**Scheme 1.** (a) Simplified Scheme for NMP; (b) Conditions for Investigation of the C–ON Bond Homolysis in **2a–g**



parameters:  $k_{d,ds}$ , the rate constant of the homolysis of the C–ON bond of the dormant species (ds) to give nitroxyl and macroalkyl radicals;  $k_{c,ds}$ , the rate constant of the cross-coupling reaction between nitroxyl and alkyl radicals;  $k_p$ , the propagation rate constant; and  $k_t$ , the termination rate constant. The main advantage of NMP is the quasi-absence of termination reactions due to the low concentration of active species and to the equilibrium between the dormant and active species. It is now clear that the success of NMP depends on precise tuning of the homolysis rate constant  $k_d$  and the re-formation rate constant  $k_c$  for the initiating alkoxyamine as well as  $k_{d,ds}$  and  $k_{c,ds}$  for the

dormant species.<sup>1,2,7</sup> This has led several groups to develop alkoxyamines suitable only for a few monomers: for example, alkoxyamine **1** (Figure 1) is efficient in triggering and



**Figure 1.** Structures of activated alkoxyamines and SG1 nitroxide.

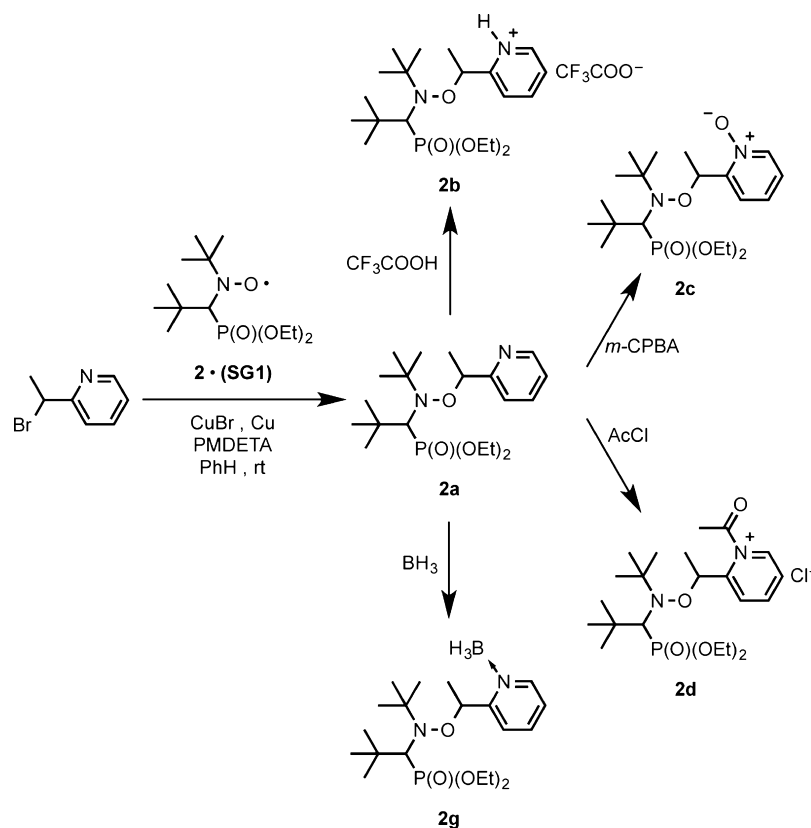
controlling the NMP of monosubstituted monomers (e.g., styrenic and alkyl acrylate monomers) but unsuccessful for 1,1-disubstituted monomers (e.g., cumenic and alkyl methacrylate monomers) under general conditions.<sup>8</sup> Beyond these facts, new strict conditions have emerged about the shipping of low-temperature-labile materials.<sup>9</sup> Therefore, the development of chemically triggered C–ON bond homolysis is an active field for NMP improvement.

The puzzling results of Mazarin et al.<sup>10</sup> were recently confirmed by Bagryanskaya and co-workers, who showed that protonation of the nitroxide part of an alkoxyamine induces a decrease in  $k_d$ .<sup>11</sup> At the same time, we reported that protonation of the pyridine-containing alkyl part of **3a** to afford **3b** led to a striking increase in  $k_d$ .<sup>12,13</sup> We then investigated the effects of the oxidation (**3c**), quaternization (**3d–f**), and complexation with a Lewis acid (**3g**) of the

Received: August 7, 2013

Published: September 23, 2013

Scheme 2. Preparation of Alkoxyamines 2a–d and 2g



**Table 1. Experimental Temperatures  $T$  (°C), C–ON Bond Homolysis Rate Constants  $k_d$ , Activation Energies  $E_a$ , Re-estimated  $k_d'$  Values at 120 °C, and Relative Rate Constants  $k_{d,rel}$ <sup>a</sup> for the Minor and Major Diastereoisomers of Alkoxyamines 2a–d and 3a–d**

T (°C)	$k_d$ ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) <sup>b,c</sup>		$E_a$ (kJ/mol) <sup>d</sup>		$k_d'$ ( $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) <sup>e</sup>		$k_{d,rel}$ (120 °C) <sup>g</sup>			$E_a$ (kJ/mol) <sup>f</sup>		$k_d'$ ( $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) <sup>f</sup>		$k_{d,rel}$ (120 °C) <sup>f</sup>		
	minor <sup>g</sup>	major <sup>g</sup>	minor <sup>g</sup>	major <sup>g</sup>	minor <sup>g</sup>	major <sup>g</sup>	minor <sup>g</sup>	major <sup>g</sup>		minor <sup>h</sup>	major <sup>h</sup>	minor <sup>h</sup>	major <sup>h</sup>	minor <sup>h</sup>	major <sup>h</sup>	
2a	80	1.07	1.17	124.1	123.8	0.79	0.85	1	1	3a	123.0	123.0	1.00	0.92	1	1
2a' <sup>i</sup>	80	2.62	1.82	121.4	122.5	1.76	1.27	2.2	1.5	3a' <sup>i</sup>	119.2	119.4	3.48	3.32	3.5	3.6
2b	61	1.77	1.62	116.0	116.2	9.31	8.64	11.8	10.2	3b	115.6	115.7	11.2	7.63	11.2	8.3
2b' <sup>i</sup>	60	28.3	19.7	108.0	109.0	108	79.8	136.7	93.9	3b' <sup>i</sup>	108.9	109.7	80.9	63.3	80.9	68.8
2c	60	1.57	3.05	116.0	114.1	9.36	16.4	11.8	19.2	3c	113.9	113.7	17.4	19.0	17.4	20.7
2c' <sup>i</sup>	61	1.38	2.31	116.7	115.3	7.54	11.7	9.5	13.8	3c' <sup>i</sup>	111.8	111.7	33.2	34.4	33.2	37.4
2d	61	0.65	0.75	118.8	118.4	3.97	4.92	5.0	5.8	3d	114.8	115.4	13.4	11.0	13.4	12.0

<sup>a</sup> $k_{d,rel} = k_{d,2a-d} / k_{d,2a}$  or  $k_{d,3a-d} / k_{d,3a}$ . <sup>b</sup>This work. Measurements were performed in *t*-BuPh as the solvent unless otherwise mentioned. <sup>c</sup>Measured at the temperature reported in the second column. In general, the reported values are averages of two runs. The statistical error is less than 2%. For all of the reported values, the error is lower than 5% and is mainly due to discrepancies in the temperature measurements. <sup>d</sup>Activation energies  $E_a$  estimated by applying the averaged frequency factor  $A = 2.4 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$  (see ref 19). Error was given as less than 2 kJ/mol. <sup>e</sup> $k_d'$  values re-estimated at 120 °C using the  $E_a$  values given in the fifth and sixth columns and  $A = 2.4 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$ . <sup>f</sup>Data from refs 14, 15, and 21. <sup>g</sup>For a tentative attribution, see ref 22. <sup>h</sup>The minor diastereoisomer is the *SS/RR* one, and the major diastereoisomer is the *SR/RS* one (see ref 12). <sup>i</sup>In 1:1 (v/v) MeOH/H<sub>2</sub>O as the solvent.

pyridinyl fragment.<sup>14</sup> The results were astonishing, as up to 200-fold increases in  $k_d$  were measured.<sup>14</sup> These activations were also investigated by DFT calculations, and we very recently reported the solvent effect on the activated alkoxyamines 3a, 3c, and 3e by screening of 15 solvents.<sup>15,16</sup> Alkoxyamines 3a and 3b were also tested on benchmark NMP systems and performed as well as alkoxyamine 1.<sup>13</sup> Having extensively studied the kinetic aspects of alkoxyamine 3a and its chemically activated derivatives 3b–g, we then turned our attention toward alkoxyamine 2a and its corresponding derivatives 2b–g in order to determine the influence of the steric effect on the activation by changing the alkyl part from 1-

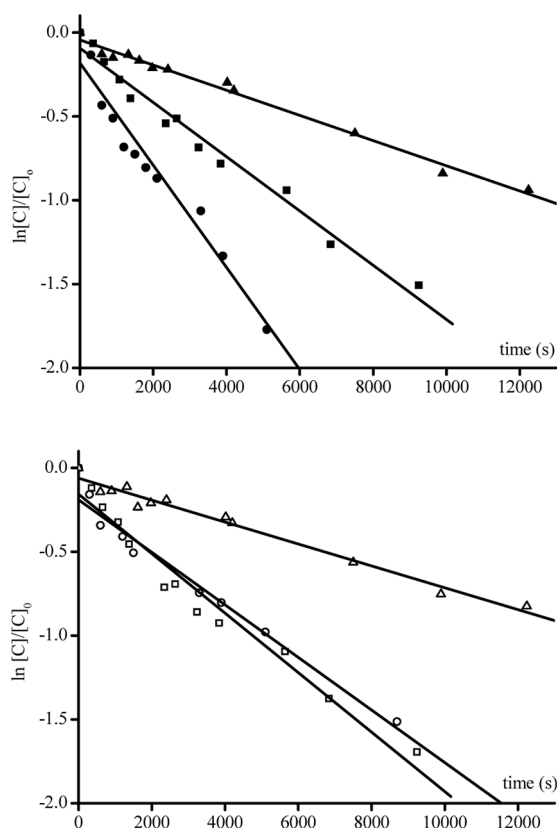
(pyridin-4-yl)ethyl radical to 1-(pyridin-2-yl)ethyl radical. DFT calculations on these new alkoxyamines were also performed.

## RESULTS AND DISCUSSION

Alkoxyamine 2a was prepared from the nitroxide *N*-(2-methylpropyl)-*N*-(1-diethylphosphono-2,2-dimethylpropyl)-*N*-oxyl (SG1) and 2-(1-bromoethyl)pyridine using Matyjaszewski's procedure,<sup>17</sup> which afforded 2a as a 2:1 mixture of diastereoisomers (Scheme 2; also see the Supporting Information). Alkoxyamines 2b–d and 2g were then synthesized from the mother compound 2a using trifluoroacetic

acid (**2b**), *m*-chloroperoxybenzoic acid (**2c**), acetyl chloride (**2d**), and borane–THF complex (**2g**). Compounds **2b** and **2d** were prepared in situ, and compounds **2c** and **2g** were prepared in quantitative yields and purified by precipitation or solvent removal in vacuo. Each compound was thus obtained as a 2:1 mixture of diastereoisomers. Attempts to prepare **2e** and **2f** by methylation and benzylation, respectively, under different conditions did not afford the corresponding quaternized alkoxyamines, presumably because of an important steric hindrance around the nitrogen of the pyridinyl ring, leading to a decrease in its reactivity.

Rate constants were measured as previously described using 2 equiv of TEMPO as an alkyl radical scavenger in *tert*-butylbenzene (*t*-BuPh) as the solvent (Scheme 1b).<sup>18</sup> Except for **2b** and **2d**, which were generated in situ, all of the other  $k_d$  values were measured using pure compounds (Table 1). Figure 2 displays the plots for the first-order decays of the activated



**Figure 2.** Plots of  $\ln([alkoxyamine]_t/[alkoxyamine]_{t=0})$  vs  $t$  for the major (top) and minor (bottom) diastereoisomers of **2b** (■, □), **2c** (●, ○), and **2d** (▲, △) at 60 °C in *t*-BuPh.

major and minor diastereoisomers of alkoxyamines **2b–d**. The activation energies  $E_a$  (Table 1) were estimated using the averaged frequency factor  $A = 2.4 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$ .<sup>19,20</sup>

Upon heating, alkoxyamine **2g** afforded several compounds (as determined by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy) that did not decay in the same way. However, the sum of all the compounds afforded a  $k_d$  value very close to those reported for **2a**. Thus, different compounds might be observed because of the existence of rotamers. Furthermore, the dative bond of amine–borane **2g** might have been cleaved upon heating to release **2a**, and consequently, the measured  $k_d$  may have been the one for **2a** and not that for **2g**.<sup>23</sup>

From the values measured for **2b–d**, it was clear that chemical activation of **2a** was still possible, with a 5- to 20-fold increase in  $k_d$ , despite the increase in steric hindrance around the nitrogen atom. The corresponding drop in  $E_a$  through chemical activation was 8–10 kJ/mol. For alkoxyamines **3b–g**, we previously observed different  $k_d$  values for the diastereoisomers.<sup>14–16</sup> In contrast, similar  $k_d$  values were measured for both diastereoisomers of alkoxyamines **2a**, **2b**, and **2d**. The efficiency of the activation depends on the type of activation, that is,  $k_{d,2b} \approx k_{d,2c} \approx 2.3 \times k_{d,2d} \approx 12 \times k_{d,2a}$  for the minor diastereoisomers and  $k_{d,2b} \approx 1.8 \times k_{d,2d} \approx 10 \times k_{d,2a}$  for the major diastereoisomers. One should also notice that the homolysis of the major diastereoisomer of **2c** is ca. 1.7-fold faster than that of the minor diastereoisomer, leading to a 19-fold increase in  $k_d$  relative to **2a** (vide infra).

However, it must be stressed that the  $k_d$  values for **2a** after protonation (i.e., for **2b**) are very close to those for **3b**, meaning that the same effects are involved (Table 1 and vide infra).

Indeed, we very recently showed that the increase in  $k_d$  under activation is due to the increase in the electronegativity ( $\chi$ ) on the carbon atom of the C–ON bond, which results in weakening of the C–ON bond, as given by eq 1,<sup>24,25</sup> which links the bond dissociation energy (BDE) to the square of the difference between the electronegativities of the atoms forming the bond and shows that a smaller electronegativity difference leads to a weaker bond.<sup>14</sup>

$$\text{BDE}_{(A-B)} = \frac{1}{2} [\text{BDE}_{(A-A)} + \text{BDE}_{(B-B)}] + 96.23(\chi_A - \chi_B)^2 \quad (1)$$

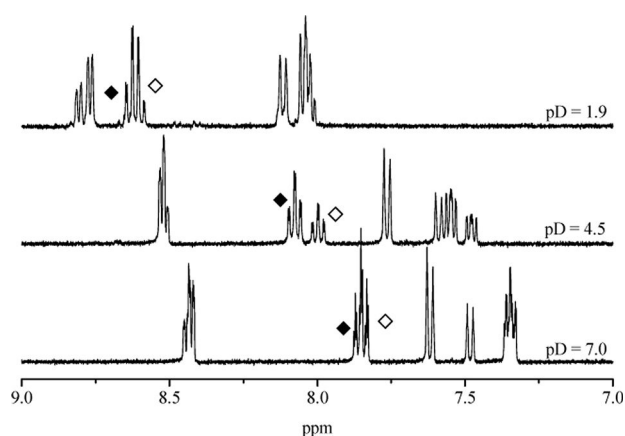
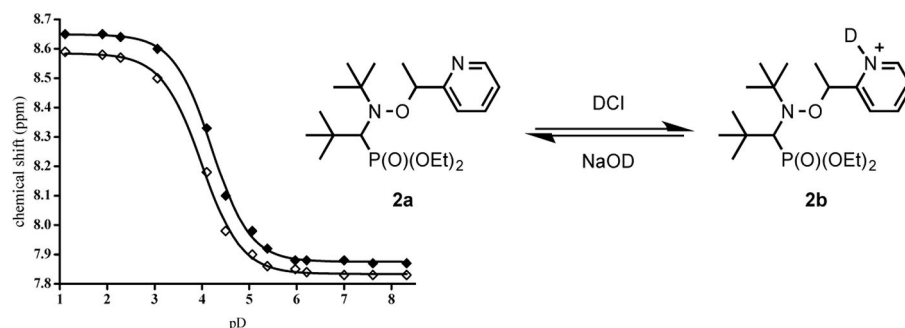
Moreover, we showed that for *t*-BuPh as the solvent, intimate ion pairs are expected, and therefore, the positive charge is partly used to neutralize the negative charge maintained in a close neighborhood, weakening the polar effect. In contrast, in a more polar solvent, the charge dissociation is expected to be more effective, leading to a stronger effect of the positive charge in increasing  $\chi$  of the carbon atom of the C–ON bond and consequently to an increase in  $k_d$ .<sup>15,16,21</sup>

The pD dependence of the <sup>1</sup>H NMR chemical shifts for **2a** and **2b** (Scheme 3) was investigated at room temperature in 1:1 (v/v) MeOH-*d*<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O, as alkoxyamine **2a** is not soluble in water. From pD 1.0 to 8.5, significant shifts were observed for the aromatic protons of the major and minor diastereoisomers from 8.65 and 8.60 to 7.90 and 7.85 ppm, respectively (Figure 3). The titration curve for the diastereoisomers of **2a** (Scheme 3) could be described by the Henderson–Hasselbach equation<sup>26</sup> (eq 2) and afforded pK<sub>a</sub> values of 4.21 and 3.99 for the major and minor diastereoisomers of **2a**, respectively; these are at least 1.6 pK<sub>a</sub> unit lower than the pK<sub>a</sub> value for the corresponding 2-ethylpyridine (pK<sub>a</sub> = 5.89)<sup>27</sup> because of the presence of the nitroxyl fragment, which acts as an electron-withdrawing group.

$$\delta_{\text{pD}} = \delta_{2a} + \frac{\delta_{2b} - \delta_{2a}}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pD}}} \quad (2)$$

The pH dependence of  $k_d$  was therefore investigated at pH 7.0, where **2a** is the major species (>99%), and at pH 2.5, where **2b** is the major species (>99%). When the homolysis rate constants for **2a** and **2b** were measured in 1:1 (v/v) MeOH/H<sub>2</sub>O as the solvent, a small 2-fold increase in  $k_d$  was observed for **2a** and a clear 10-fold increase in  $k_d$  was observed for **2b**

Scheme 3. Titration Curves for the Major (◆) and Minor (◇) Diastereoisomers of **2a** Obtained Using  $^1\text{H}$  NMR Chemical Shifts in the Aromatic Zone of **2a** (0.02 M) at Room Temperature in 1:1 (v/v) MeOH- $d_4$ /D $_2$ O (pD Was Set with DCl and NaOD)



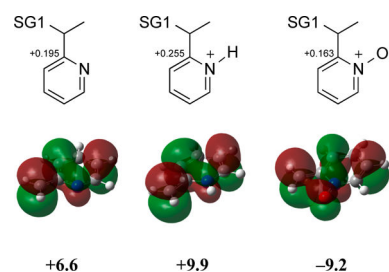
**Figure 3.** Aromatic zone of the  $^1\text{H}$  NMR spectra of a 2:1 mixture of the major (◆) and minor (◇) diastereoisomers of **2a** (0.02 M) at pD = 1.9 (top), 4.5 (middle), and 7.0 (bottom) at room temperature in 1:1 (v/v) MeOH- $d_4$ /D $_2$ O. pD was set with DCl and NaOD. When the NMR signals of the diastereoisomers overlapped, they were ascribed using coupling constants.

relative to the  $k_d$  measured in *t*-BuPh, in good agreement with the data reported for alkoxyamines **3a** and **3b**.<sup>13</sup> Consequently, activation by protonation led to a 62-fold increase in  $k_d$  when it occurred in MeOH/H $_2$ O, while it resulted in only an 11-fold increase in *t*-BuPh. When the solvent and the activation effects were combined, a 94- to 137-fold increase in  $k_d$  was observed, depending on the diastereoisomer. Alkoxyamine **2b** seemed to experience stronger solvent and activation effects than alkoxyamine **3b**, where these effects led to a 8-fold increase for the solvent effect, a 22-fold increase for the activation effect, and a 69- to 81-fold increase in  $k_d$  when these effects were combined, depending on the diastereoisomer. In fact, the averaged activation energies of the diastereoisomers of **2b** are very close to those of **3b** in *t*-BuPh ( $\Delta E_a = 0.5$  kJ/mol) and in MeOH/H $_2$ O ( $\Delta E_a = 0.8$  kJ/mol), while the activation energies of **2a** and **3a** are more different in *t*-BuPh ( $\Delta E_a = 1.0$  kJ/mol) and in MeOH/H $_2$ O ( $\Delta E_a = 2.7$  kJ/mol). This led us to assume that the solvent effect on **2a** is greater than that on **2b**. While it is clear that the nitrogen atom is more congested in **2a** than in **3a** and therefore is less accessible to the solvent, it is rather uncertain on which state (reactant, products, transition state) this solvent effect occurs on **2a**. The same comments hold for **2c**.

To gain deeper insight into the various effects involved in the chemical activation of the C–ON bond homolysis in alkoxyamines, calculations were performed using the B3LYP/

6-31G(d,p) method to optimize the geometries and to determine natural bond orbital (NBO) charges for **2a–c** in toluene. For the sake of simplicity, calculations were performed only on the RR/SS diastereoisomer, and they showed that alkoxyamines **2a–c** display similar values for the geometric parameters of the reactive center ( $l_{\text{O1–C13}}$ ,  $l_{\text{N2–O1}}$ ,  $d_{\text{N2...C13}}$ , and  $\alpha_{\text{N2O1C13}}$ ; Table 1SI in the Supporting Information), meaning that quaternization of the nitrogen atom of the pyridinyl ring did not give rise to any significant structural changes. Thus, as already reported,<sup>28,29</sup> the differences in  $k_{d,2a}$ ,  $k_{d,2b}$ , and  $k_{d,2c}$  could not be correlated with the geometric parameters of the reactive center.

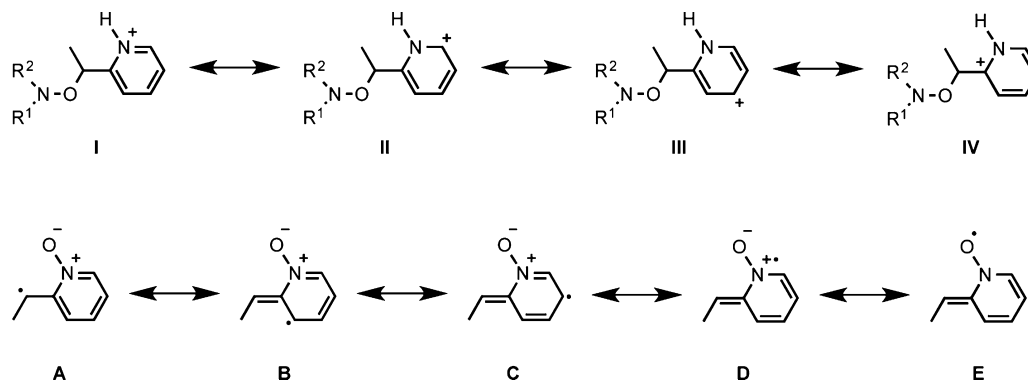
The calculated Gibbs energies for the homolysis were in good agreement with the observed reactivities:  $\Delta_r G$  in toluene decreased in going from **2a** to **2b** ( $\Delta\Delta_r G = -2.5$  kJ/mol) and from **2a** to **2c** ( $\Delta\Delta_r G = -16.4$  kJ/mol) as  $k_d$  increased. To probe the polar effect, the NBO atomic charges on the aromatic moiety were calculated (Figure 4 top). As expected from the



**Figure 4.** UB3LYP/6-31G(d,p) NBO charges (top) for **2a–c** (left to right, respectively) and UBMK/6-311+G(3df,2p)//RB3LYP/6-31G(d) SOMOs (middle) and RSEs (kJ/mol, bottom) of the corresponding benzylic radical models *ortho-a*•, *ortho-b*• and *ortho-c*• (left to right, respectively).

mesomeric forms I–IV (Scheme 4 top), protonation of **2a** to afford **2b** implied positive partial charges located at the *ipso* position (Figure 4 top) whereas a significant decrease in the charge at the *ipso* position was observed for **2c**. These changes in partial NBO charges are related to the changes in the electronegativity of the carbon atom in the C–ON bond. An increase in the partial charge at the *ipso* position involves an increase in  $\chi$  for the carbon atom, which leads to a lower BDE (see eq 1) and consequently an increase in  $k_d$ , in nice agreement with the results observed for **2a** and **2b**. However, the lower partial charge at the *ipso* position for **2c** than **2a** would imply a larger  $k_d$  value for **2a** than for **2c**, in sharp contrast with the results reported (Table 1). This confirmed



Scheme 4. Mesomeric Forms of 2b (top) and *ortho-c*<sup>•</sup> (bottom)

that the polar effect is similarly involved for *ortho* (2a–g) and *para* (3a–g) pyridinyl-based alkoxyamines and does not account for all of the effects involving the reactions observed, highlighted by  $k_{d,2c} = k_{d,2b}$  for the minor diastereoisomer and  $k_{d,2c} \approx 2 \times k_{d,2b}$  for the major diastereoisomer whereas  $k_{d,3c} \approx 2 \times k_{d,3b}$  for both diastereoisomers.

To probe the stabilization of the released alkyl radical, the radical stabilization energies (RSEs) of the benzylic radical models (*ortho-a*<sup>•</sup>, *ortho-b*<sup>•</sup>, and *ortho-c*<sup>•</sup>; Figure 4 bottom) were calculated with the UBMK/6-311+G(3df,2p)//RB3LYP/6-31G(d) method.<sup>30</sup> The positive RSEs of the benzylic radical models *ortho-a*<sup>•</sup> and *ortho-b*<sup>•</sup> (Figure 4 bottom) showed that the presence of either a heteroatom in the aromatic ring or a charge implies a destabilization of the released radical, whereas the negative RSE value for the radical model *ortho-c*<sup>•</sup> confirmed the stabilization of this radical. Indeed, the odd electron is delocalized over the aromatic ring and on the oxygen atom, implying the presence of a highly stabilized mesomeric nitroxide form (E in Scheme 4 bottom), which is highlighted by the delocalization of the SOMO onto the N<sup>+</sup>–O<sup>–</sup> moiety (Figure 4 middle). This stabilization was in good agreement with the kinetic results ( $k_{d,2c} > k_{d,2a}$  and  $k_{d,2c} > k_{d,2b}$  for the major diastereoisomer). Interestingly, the NBO charge of the *ipso* carbon atom in 2c is higher than that in 3c (+0.163 vs –0.076, respectively) whereas radical model *ortho-c*<sup>•</sup> is less stabilized (RSE = –9.2 kJ/mol) than the corresponding radical model *para-c*<sup>•</sup> for 3c (RSE = –25.3 kJ/mol).<sup>14</sup> This means that for activation at the *ortho* and *meta* positions, the trends are qualitatively the same while they differ quantitatively, although they are balanced, i.e., the larger polar effect in 2c than in 3c balances the lower stabilization for *ortho-c*<sup>•</sup> than for *para-c*<sup>•</sup>, affording very close  $k_d$  values for the major diastereoisomers of 2c and 3c.

## CONCLUSION

The results reported above highlight the importance of polar and stabilization effects on the increase in the homolysis rates for alkoxyamines by activation of the pyridine moiety as well as of the effect of congestion around the pyridinyl on the activation modes, as benzylation and methylation are forbidden for 2a, in sharp contrast with 3a, and amine–borane 2g is unstable. Although the change in  $E_a$  looks small (e.g., a change of 16 kJ/mol in going from 2a to 2b), it generates dramatic changes in the half-life (e.g., a decrease from 6 months for 2a to 6 h for 2b at rt). These facts are interesting considering that chemicals such as alkoxyamines are regulated through the REACH guidelines, and their activation energy, and thus their

stability, can be tuned by chemical activation. Such opportunities open new aspects for applications in NMP and radical chemistry at low temperatures.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Information.** All corresponding glassware was oven-dried (80 °C) and/or carefully dried in line with a flameless heat gun. All solvents were used as received. Routine monitoring of reactions was performed using aluminum-supported silica gel 60 F<sub>254</sub> TLC plates; spots were visualized using UV light and ethanolic acidic *p*-anisaldehyde solution or ethanolic phosphomolybdic solution followed by heating. Purifications by means of column chromatography were performed with silica gel 60 (230–400 mesh) and gradients of Et<sub>2</sub>O/pentane, AcOEt/pentane, acetone/pentane, or MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub> or C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> solutions on 300 or 400 MHz spectrometers. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million using residual nondeuterated solvents as internal references; min and Maj stand for minor and major diastereoisomers, respectively. High-resolution mass spectrometry (HRMS) was performed using a mass spectrometer equipped with pneumatically assisted atmospheric pressure ionization. The sample was ionized by positive-mode electrospray ionization under the following conditions: electrospray voltage (ISV), 5500 V; orifice voltage (OR), 80 V; nebulizing gas flow pressure (air), 20 psi. The mass spectra were obtained using a time-of-flight (ToF) analyzer. The measurements were realized in triplicate with double internal standardization. Each sample was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 μL) and then diluted (dilution factor 1/10<sup>4</sup>) in a methanolic solution of ammonium acetate (3 mM). The sample solution was infused into the ionization source at a flow rate of 10 μL/min.

**Diethyl (1-(*tert*-Butyl(1-(pyridin-2-yl)ethoxy)amino)-2,2-dimethylpropyl)phosphonate (2a).** To a stirred suspension of CuBr (1.34 g, 9.35 mmol, 0.55 equiv) and metallic Cu (1.19 g, 18.7 mmol, 1.1 equiv) in degassed benzene (40 mL) was added *N,N,N',N'',N''*-pentamethyldiethylenetriamine (2.00 mL, 9.35 mmol, 0.55 equiv). The resulting mixture was stirred under argon at room temperature for 30 min, and then a solution of 2-(1-bromoethyl)pyridine<sup>31</sup> (3.48 g, 18.7 mmol, 1.1 equiv) and SG1 (5.00 g, 17.0 mmol, 1.0 equiv) in degassed benzene (40 mL) was slowly added. The mixture was stirred under argon at room temperature for 12 h. It was then diluted with ethyl acetate, filtered, and washed several times with saturated aqueous ammonia solution, water, and brine. After drying with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtration, and concentration in vacuo, column chromatography on silica gel gave 2a (5.93 g, 14.8 mmol, 87%) as a 2:1 mixture of diastereoisomers (NMR ratio). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ 8.51–8.47 (m, 1H, min and Maj), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Maj), 7.17–7.06 (m, 1H, min and Maj, partially overlapped), 6.65–6.60 (m, 1H, min and Maj), 5.65 (q, *J* = 6.8 Hz, 1H, Maj), 5.42 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, min), 4.60–4.47 (m, 1H, min), 4.40–4.27 (m, 1H, min), 4.11–4.00 (m, 1H, min), 3.98–3.70 (m, 4H, Maj), 3.57–3.45 (m, 1H, Maj, partially overlapped), 3.49 (d, *J* = 25.9 Hz, 1H, Maj), 3.46 (d, *J* = 25.6 Hz, 1H, min), 1.93 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, min), 1.80 (d, *J* = 6.5 Hz,

3H, Maj), 1.46 (s, 9H, min), 1.36 (s, 9H, Maj), 1.24–1.21 (m, 3H, min, partially overlapped), 1.23 (s, 9H, Maj), 1.12 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, min), 1.03 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, Maj), 0.9 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, Maj), 0.88 (s, 9H, min).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  164.5 (min), 162.2 (Maj), 149.4 (min), 143.3 (Maj), 135.8 (Maj), 135.7 (min), 124.0 (Maj), 122.4 (Maj), 122.3 (min), 122.2 (min), 86.3 (min), 79.8 (Maj), 70.5 (d,  $J = 139.2$  Hz, min and Maj), 61.9 (d,  $J = 6.1$  Hz, min), 61.6 (Maj), 61.5 (d,  $J = 6.6$  Hz, Maj), 61.4 (min), 59.0 (d,  $J = 7.7$  Hz, Maj), 58.8 (d,  $J = 7.1$  Hz, min), 36.0 (d,  $J = 5.5$  Hz, min), 35.7 (d,  $J = 5.0$  Hz, Maj), 31.0 (d,  $J = 6.1$  Hz, Maj), 30.5 (d,  $J = 6.1$  Hz, min), 28.6 (min), 28.5 (Maj), 22.8 (min), 19.7 (Maj), 16.9 (d,  $J = 6.1$  Hz, min), 16.6–16.2 (m, min and Maj).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  25.6 (min), 24.6 (Maj). HRMS (ESI)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}_1$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  401.2564, found 401.2562.

**2-(1-((tert-Butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)ethyl)pyridin-1-ium 2,2,2-Trifluoroacetate (2b).** Compound **2b** was prepared in situ and was not purified. For NMR analyses, compound **2b** was prepared by adding 1.0 equiv of trifluoroacetic acid to a  $\text{C}_6\text{D}_6$  solution of compound **2a** in an NMR tube.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  12.67 (br s, 1H, min and Maj), 8.49–8.46 (m, 1H, min and Maj), 7.52 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, Maj), 7.23–7.13 (m, 2H, min, partially overlapped), 7.07–6.90 (m, 1H, Maj), 6.60–6.50 (m, 1H, min and Maj), 5.46 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, Maj), 5.39 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H, min), 4.44–4.32 (m, 1H, min), 4.29–4.17 (m, 1H, min), 4.08–3.96 (m, 1H, min), 3.94–3.84 (m, 1H, min), 3.84–3.55 (m, 4H, Maj), 3.39 (d,  $J = 27.1$  Hz, 1H, Maj), 3.38 (d,  $J = 26.1$  Hz, 1H, min), 1.76 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, min), 1.53 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Maj), 1.34 (s, 9H, min), 1.20 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, min), 1.16 (s, 9H, Maj), 1.14 (s, 9H, Maj), 1.08 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, min), 0.94 (t,  $J = 7.0$  Hz, Maj), 0.93 (t,  $J = 7.0$  Hz, Maj), 0.79 (s, 9H, min).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  161.5 (min), 160.8 (q,  $J = 36.9$  Hz, min and Maj), 158.8 (Maj), 145.6 (min), 143.9 (Maj), 142.5 (Maj), 140.6 (min), 124.7 (Maj), 124.0 (min), 123.9 (min), 117.2 (q,  $J = 290$  Hz, min and Maj), 83.9 (min), 78.4 (Maj), 70.3 (d,  $J = 138.6$  Hz, min), 69.3 (d,  $J = 139.2$  Hz, Maj), 62.4 (d,  $J = 6.6$  Hz, min), 62.2 (Maj), 62.1 (d,  $J = 7.2$  Hz, Maj), 61.7 (min), 60.3 (d,  $J = 7.7$  Hz, Maj), 59.7 (d,  $J = 7.7$  Hz, min), 35.9 (d,  $J = 5.0$  Hz, min), 35.6 (d,  $J = 5.0$  Hz, Maj), 30.7 (d,  $J = 6.05$  Hz, Maj), 30.4 (d,  $J = 6.1$  Hz, min), 28.4 (min), 28.1 (Maj), 22.4 (min), 20.6 (Maj), 16.7 (d,  $J = 5.5$  Hz, min), 16.3 (d,  $J = 6.1$  Hz, Maj), 16.3 (d,  $J = 6.6$  Hz, min), 16.1 (d,  $J = 6.6$  Hz, Maj).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  25.3 (min), 24.7 (Maj).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  -75.5 (min and Maj). HRMS analysis gave the same results as for **2a**, as **2a** was readily turned into **2b** during the ionization process.

**2-(1-((tert-Butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)ethyl)pyridine N-Oxide (2c).** To a stirred solution of **2a** (500 mg, 1.25 mmol, 1.0 equiv) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (12.5 mL) was added *m*-CPBA (70% in water, 924 mg, 3.75 mmol, 3.0 equiv). The resulting mixture was stirred at 0 °C under argon for 30 min. It was then poured into aqueous 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  solution, extracted three times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with aqueous saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution, dried, and concentrated in vacuo. After purification by column chromatography on silica gel (gradients of acetone/hexanes), compound **2c** (476 mg, 1.14 mmol, 91% yield) was obtained as a 2:1 mixture of diastereoisomers (NMR ratio).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.18–8.14 (m, 1H, min and Maj), 7.78 (dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, 1H, Maj), 7.53 (dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, 1H, min), 7.28–7.25 (m, 1H, min and Maj, partially overlapped), 7.16–7.09 (m, 1H, min and Maj), 5.86 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H, Maj), 5.71 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, min), 4.35–3.82 (m, 4H, min and Maj), 3.38 (d,  $J = 27.1$  Hz, 1H, Maj), 3.32 (d,  $J = 26.1$  Hz, 1H, min), 1.63 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, min), 1.57 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Maj), 1.36 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, min), 1.32 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, min), 1.26 (s, 9H, Maj), 1.21 (s, 9H, min), 1.23–1.17 (m, 6H, Maj), 1.03 (s, 9H, Maj), 0.98 (s, 9H, min).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  155.3 (min), 154.1 (Maj), 138.9 (min), 138.6 (Maj), 125.5 (min), 125.2 (Maj), 124.4 (Maj), 123.8 (min), 123.5 (min), 123.3 (Maj), 78.7 (min), 74.4 (Maj), 69.0 (d,  $J = 138.7$  Hz, min), 68.7 (d,  $J = 137.6$  Hz, Maj), 61.5 (Maj), 61.4 (min), 61.0 (d,  $J = 6.6$  Hz, min), 60.9 (d,  $J = 6.6$  Hz, Maj), 59.2 (d,  $J = 7.7$  Hz, Maj), 59.0 (d,  $J = 7.7$  Hz, min), 35.4 (d,  $J = 5.0$  Hz, min), 35.1 (d,  $J = 5.0$  Hz, Maj), 29.8 (d,  $J = 5.5$  Hz, Maj), 29.4 (d,  $J = 5.5$  Hz, min), 28.1 (Maj), 27.7 (min), 21.0 (min), 18.5 (Maj), 16.4 (d,

$J = 5.0$  Hz, min), 16.0 (d,  $J = 5.5$  Hz, Maj), 15.9 (d,  $J = 6.6$  Hz, min), 15.7 (d,  $J = 6.6$  Hz, Maj).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  25.6 (min), 24.9 (Maj). HRMS (ESI)  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}_1$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  417.2513, found 417.2515.

**N-Acetyl-2-((1-(tert-butyl(1-(diethoxyphosphoryl)-2,2-dimethylpropyl)amino)oxy)ethyl)pyridin-1-ium Chloride (2d).** Compound **2d** was prepared in situ and was not purified. For NMR analyses, compound **2d** was prepared by adding 1.0 equiv of acetyl chloride to a  $\text{C}_6\text{D}_6$  solution of compound **2a** in an NMR tube.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  8.60–8.50 (m, 1H, min and Maj), 7.81 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Maj), 7.28–7.03 (m, 2H, min and Maj, partially overlapped), 6.77–6.62 (m, 1H, min and Maj), 5.82 (q,  $J = 6.3$  Hz, 1H, Maj), 5.58 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H, min), 4.59–4.47 (m, 1H, min), 4.40–4.29 (m, 1H, min), 4.11–3.99 (m, 1H, min), 3.72–3.96 (m, 3H, Maj, 1H, min), 3.71–3.59 (m, 1H, Maj), 3.44 (d,  $J = 25.8$  Hz, 1H, min), 3.43 (d,  $J = 26.3$  Hz, 1H, Maj), 1.96 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, min), 1.73 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Maj), 1.61 (br s, 3H, Maj), 1.53 (br s, 3H, min), 1.44 (s, 9H, min), 1.27–1.21 (m, 3H, min), 1.24 (s, 9H, Maj), 1.23 (s, 9H, Maj), 1.11 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, min), 1.00 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, Maj), 0.96 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Maj), 0.86 (s, 9H, min).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  169.8 (Maj), 166.3 (min), 162.9 (min), 160.8 (Maj), 147.6 (min), 146.8 (Maj), 138.6 (Maj), 138.1 (min), 124.5 (Maj), 123.5 (Maj), 123.2 (min), 123.1 (min), 84.9 (min), 78.9 (Maj), 70.3 (d,  $J = 138.7$  Hz, min), 70.0 (d,  $J = 138.7$  Hz, Maj), 62.0 (d,  $J = 6.1$  Hz, min), 61.8 (Maj), 61.5 (min), 61.4 (d,  $J = 7.2$  Hz, Maj), 59.2 (d,  $J = 7.2$  Hz, Maj), 58.9 (d,  $J = 7.1$  Hz, min), 36.0 (d,  $J = 5.5$  Hz, min), 35.6 (d,  $J = 5.0$  Hz, Maj), 33.0 (Maj), 30.9 (d,  $J = 6.1$  Hz, Maj), 30.5 (d,  $J = 6.1$  Hz, min), 28.5 (min), 28.4 (Maj), 22.6 (min), 21.7 (min), 20.3 (Maj), 16.9 (d,  $J = 5.5$  Hz, min), 16.6 (d,  $J = 6.1$  Hz, Maj), 16.4 (d,  $J = 6.6$  Hz, min), 16.3 (d,  $J = 6.6$  Hz, Maj).  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  25.3 (min), 24.6 (Maj). HRMS analysis could not be performed because of the instability of **2d**.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ☞ Supporting Information

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of **2a–d**, procedures for kinetic and pD measurements, and details of calculations of NBO charges and radical stabilization energies. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: paul.bremond@univ-amu.fr.

\*E-mail: sylvain.marque@univ-amu.fr.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Université d'Aix-Marseille, CNRS, and Agence Nationale de la Recherche are acknowledged for their support and an ANR grant (SonRadIs ANR-11-JS07-002-01). L.B. thanks the Agence Nationale de la Recherche for his Ph.D. grant. The authors are grateful for the time allocation for calculations from the Centre Régional de Compétence en Modélisation Moléculaire, Université d'Aix-Marseille.

## ■ REFERENCES

- (1) Marque, S.; Gignes, D. Nitroxide-Mediated Polymerization and its Applications. In *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology, and Materials*; Chatgililoglu, C., Studer, A., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., 2012; pp 1813–1850 and references cited therein.
- (2) Bertin, D.; Gignes, D.; Marque, S. R. A.; Tordo, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2189–2198.
- (3) Nicolas, J.; Guillauneuf, Y.; Lefay, C.; Bertin, D.; Gignes, D.; Charleux, B. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 63–235.
- (4) Grubbs, R. B. *Polym. Rev.* **2011**, *51*, 104–137.

- (5) Tebben, L.; Studer, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 5034–5068.
- (6) Matyjaszewski, K. *ACS Symp. Ser.* **2012**, *1100*, 1–13.
- (7) Goto, A.; Fukuda, T. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 329–385.
- (8) Guillaneuf, Y.; Gimes, D.; Marque, S. R. A.; Tordo, P.; Bertin, D. *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, *207*, 1278–1288.
- (9) Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemical substances (REACH), EC 1907/2006. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R1907:en:NOT> (accessed Sept 19, 2013).
- (10) Mazarin, M.; Girod, M.; Viel, S.; Phan, T. N. T.; Marque, S. R. A.; Humbel, S.; Charles, L. *Macromolecules* **2009**, *42*, 1849–1859.
- (11) Edeleva, M. V.; Kirilyuk, I. A.; Zhurko, I. F.; Parkhomenko, D. A.; Tsentalovitch, Y. P.; Bagryanskaya, E. G. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5558–5573.
- (12) Brémond, P.; Marque, S. R. A. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4291–4293.
- (13) Bagryanskaya, E.; Brémond, P.; Edeleva, M.; Marque, S. R. A.; Parkhomenko, D.; Roubaud, V.; Siri, D. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 152–157.
- (14) Brémond, P.; Koita, A.; Marque, S. R. A.; Pesce, V.; Roubaud, V.; Siri, D. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 358–361.
- (15) Audran, G.; Brémond, P.; Marque, S. R. A.; Obame, G. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 2901–2908.
- (16) Audran, G.; Brémond, P.; Marque, S. R. A.; Obame, G. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9364–9640.
- (17) Matyjaszewski, K.; Woodworth, B. E.; Zhang, X.; Gaynor, S. G.; Metzner, Z. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5955–5957.
- (18) Bertin, D.; Gimes, D.; Marque, S. R. A.; Tordo, P. *e-Polym.* **2003**, *2*, 1–9.
- (19) Bertin, D.; Gimes, D.; Marque, S. R. A.; Tordo, P. *Macromolecules* **2005**, *38*, 2638–2650.
- (20) One must keep in mind for the discussion that the frequency factor *A* may also be dependent on the solvent. However, for the sake of simplicity, the averaged value of *A* (see ref 19) was used.
- (21) Audran, G.; Brémond, P.; Marque, S. R. A.; Obame, G. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7754–7757.
- (22) A tentative attribution of the relative configuration of the diastereoisomers of **2a** can be done by relying on the available X-ray data for *SS/RR-3a* and on the  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR data for **3a-g**, which indicate that the minor diastereoisomer of **2a** displays the *SS/RR* configuration.
- (23) As described in ref 18, samples were heated in an oil bath and then cooled in icy water, after which their  $^{31}\text{P}$  NMR spectra were recorded at room temperature. Consequently, at 80 °C, it is likely that **2g** decomposed into **2a** and  $\text{BH}_3$ , involving the indirect monitoring of the decay of **2a** by measuring by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy the decay of the isomers of **2g** reformed upon cooling.
- (24) Pauling, L. *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1960; p 212.
- (25) Zavitsas, A. A. Thermochemistry and Hydrogen Transfer Kinetics. In *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology, and Materials*; Chatgililoglu, C., Studer, A., Eds.; Wiley: Chichester, U.K., 2012; pp 81–106.
- (26) Henderson, J. J. *Am. J. Physiol.* **1908**, *21*, 173–179.
- (27) Andon, R. J. L.; Cox, J. D.; Herington, E. F. G. *Trans. Faraday Soc.* **1954**, *50*, 918–927.
- (28) Beaudoin, E.; Bertin, D.; Gimes, D.; Marque, S. R. A.; Siri, D.; Tordo, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *7*, 1555–1768.
- (29) Bertin, D.; Gimes, D.; Marque, S. R. A.; Siri, D.; Tordo, P.; Trappo, G. *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 272–281.
- (30) For the isodesmic reaction used, see the Supporting Information.
- (31) Bull, S. D.; Davies, S. G.; Epstein, S. W.; Garner, A. C.; Mujtaba, N.; Roberts, P. M.; Savory, E. D.; Smith, A. D.; Tamayo, J. A.; Watkin, D. J. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7911–7925.

# Solvent Effect in $\beta$ -Phosphorylated Nitroxides: Model Nitroxides

Gérard Audran · Lionel Bosco · Paul Brémond ·  
Teddy Butscher · Sylvain R. A. Marque

Received: 20 January 2015 / Published online: 24 February 2015  
  Springer-Verlag Wien 2015

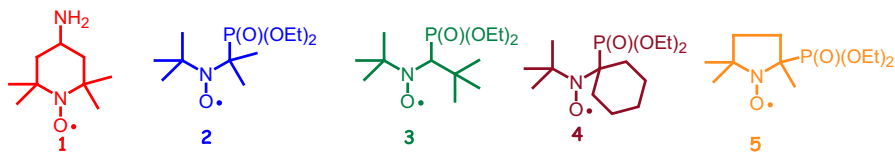
**Abstract** Solvent effects have been investigated for the last four decades. As far as we know, only 3 articles have reported on the solvent effect with  $\beta$ -phosphorylated nitroxides. In 1976, Il'Yasov and coll. (Theor Exp Chem 12:656, 1976) showed in 16 solvents that the phosphorus hyperfine coupling constant  $a_P$  linearly decreased with the polarity of the solvent given by the normalized Reichardt–Dimroth polarity constant  $E_N^T$  for in situ generated nitroxides, e.g., from  $a_P = 40.80$  G in *n*-hexane ( $E_N^T = 0.09$ ) to  $a_P = 22.80$  G in water ( $E_N^T = 1$ ). A few years later, Janzen and coll. (Magn Reson Chem 37:251–258, 1999) reported a weak (around 4 G) decrease in  $a_P$  for a few  $\beta$ -phosphorylated nitroxides in *n*-hexane and methanol. Recently, our group reported hardly any change in  $a_P$  with the solvent for a very stable nitroxide, e.g.,  $a_P = 46.19$  in *n*-pentane and  $a_P = 45.60$  in water. In this article, we report the solvent effect in 40 solvents on two new nitroxides and discuss at the light of the results reported in the literature. It turns out that  $a_P$  changes obey no trends, i.e., strong or weak decrease, no change or even a weak increase in  $a_P$  was observed depending on the structure of each nitroxide.

## 1 Introduction

For 40 years, the solvent effects on the nitrogen hyperfine coupling constants  $a_N$  of nitroxides have been thoroughly investigated. The first extensive investigation (40 solvents and 4 nitroxides) was performed by Knauer and Napier in 1976 [1]. Since that time, nitroxide **1** (Fig. 1) has been considered as a benchmark. They showed [1] that  $a_N$  increased with the increasing polarity of the solvent—given by the normalized Reichardt–Dimroth polarity constant [2, 3]  $E_N^T$ . This trend has been confirmed over the decades for many types of nitroxides carrying various atoms at

---

G. Audran · L. Bosco · P. Brémond · T. Butscher · S. R. A. Marque (✉)  
Aix Marseille Université, CNRS, ICR UMR 7273, 13397 Marseille Cedex 20, France  
e-mail: sylvain.marque@univ-amu.fr



**Fig. 1** Nitroxides investigated

the position  $\beta$  [4–9]. At the same period, Il'Yasol and coll. [4] investigated nitroxide **2** and reported a striking decrease in the phosphorus hyperfine coupling constant  $a_P$  at position  $\beta$  with increasing solvent polarity, e.g., from  $a_P = 40.80$  G in *n*-hexane and to  $a_P = 22.80$  G in water. A weaker (around 4 G) decrease was observed by Janzen and coll. [6] for other nitroxides in benzene and methanol. Recently, with nitroxide **3**, our group [9] reported a weak decrease in  $a_P$  from non-polar to polar solvents, and the absence of decrease in  $a_P$  in protic solvents. Hence, nitroxides **4** and **5** were prepared and the values of  $a_N$  and  $a_P$  were investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) in 40 solvents (Table 1). Interestingly, nitroxides **2–5** exhibit the same polarity for very different structures (Fig. 1). Puzzlingly, a strong decrease in  $a_P$  with increasing solvent polarity was observed for **2**, a weak decrease was observed for **5**, almost no effect was reported for **3**, and a slight increase was observed for **4**.

## 2 Experimental Section

Solvents for EPR experiments and reactants for synthesis were purchased from Aldrich and used as received. Vials were filled with 1 ml of a  $10^{-4}$  M stock solution in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solvent was removed and each vials filled with 1 ml of each of the solvents reported in Table 1. Then, a capillary was filled with 0.3 ml of each solution. The EPR signals were recorded on a Bruker X-band EMX machine (power: 20 mW, gain:  $2 \times 10^5$ , amplitude modulation: 1.0 G sweep time: 21 s, sweep width: 150 G). Nitroxides **4** and **5** were prepared as reported in literature [10, 11].

## 3 Results and Discussion

### 3.1 General Comments

The nitroxides reported here are those exhibiting the simplest features, i.e., only the diethoxyphosphoryl group as an electron withdrawing group (EWG). Data for nitroxides **1–3** have been previously reported [1, 4, 9]. Nitroxides **2–5** exhibited the conventional 6-line signals (Fig. 2) observed for a nitroxide carrying an atom with a nuclear spin  $I = \frac{1}{2}$  at  $\beta$  position. Signals were recorded in 40 solvents covering almost all types of solvent and especially the most frequently used. The solvent effects were described using the normalized Reichardt–Dimroth polarity parameter  $E_T^N$  which includes the dipolarity/polarizability (often given by the parameter  $\pi^*$ )

**Table 1** Nitrogen and phosphorus hyperfine coupling constants  $a_N$  and  $a_{P\beta}^a$ , respectively, in various solvents for nitroxides **1–5**

Solvent <sup>b</sup>	<b>1</b> <sup>c</sup>			<b>2</b> <sup>d</sup>		<b>3</b> <sup>e</sup>		<b>4</b>		<b>5</b>		$E_T^N$
	$a_N$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	$a_{P\beta}$	
1 <i>n</i> -Pentane	15.15	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.54	46.19	13.86	55.07	13.43	51.15	0.009		
2 <i>n</i> -Hexane	15.22	14.80	40.80	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.25	54.97	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	0.009		
3 cHex	15.19	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.54	46.10	13.96	55.17	13.52	51.17	0.006		
4 <i>n</i> -Octane	15.22	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.50	46.20	14.25	55.17	13.57	51.13	0.012		
5 Benzene	15.53	14.40	35.80	13.74	45.14	14.15	55.75	13.86	49.87	0.111		
6 Toluene	15.46	14.40	36.60	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.15	55.55	13.96	50.06	0.099		
7 <i>t</i> -BuPh	15.47	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.70	45.70	14.06	55.55	13.77	50.45	0.099		
8 PhBr	15.57	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.15	56.03	13.77	48.81	0.182		
9 Pyridine	15.66	14.90	32.00	13.86	44.49	14.35	56.32	13.96	48.52	0.302		
10 AcPh	15.64	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.25	56.26	13.96	48.52	0.306		
11 <i>t</i> -BuPh:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>g</sup>	15.61	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.90	44.70	14.25	56.32	13.86	48.62	– <sup>f</sup>		
12 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15.77	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.90	44.61	14.35	56.8	14.06	47.95	0.309		
13 DCE	15.71	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.90	45.10	14.25	56.61	13.96	47.68	0.327		
14 CHCl <sub>3</sub>	15.77	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.98	45.46	14.44	57.09	14.25	48.52	0.259		
15 CCl <sub>4</sub>	15.40	14.70	38.20	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.06	55.75	13.86	50.64	0.052		
16 DME	15.27	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.06	55.55	13.86	49.49	0.231		
17 Et <sub>2</sub> O	15.24	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.06	55.26	13.58	50.26	0.117		
18 <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	15.23	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.62	45.82	13.96	54.97	13.58	50.58	0.105		
19 <i>n</i> -Bu <sub>2</sub> O	15.36	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.50	46.00	14.15	55.36	13.86	50.64	0.071		
20 <i>t</i> -BuOMe	15.32	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.62	45.74	13.96	55.17	13.67	50.06	0.124		
21 14D	15.45	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.78	45.31	14.15	56.13	13.86	49.49	0.164		
22 THF	15.47	14.80	35.90	13.70	45.59	14.25	55.55	13.58	49.58	0.207		
23 AcOEt	15.60	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.66	45.66	14.15	55.84	13.87	49.82	0.228		
24 acetone	15.62	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.82	45.42	14.35	56.03	13.99	48.76	0.355		
25 MeCN	15.76	15.00	31.00	13.86	44.73	14.44	56.42	14.03	47.43	0.460		
26 MeNO <sub>2</sub>	15.86	16.00	28.60	13.94	44.45	14.44	56.9	14.07	47.04	0.481		
27 DMSO	15.77	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.80	45.40	14.36	56.32	14.07	47.88	0.444		
28 F	16.20	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.40	43.70	14.73	58.44	14.25	46.41	0.775		
29 NMF	15.77	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.10	44.20	14.44	57.29	14.25	48.42	0.722		
30 DMF	15.67	14.80	32.20	13.90	45.50	14.25	56.23	14.25	48.71	0.386		
31 MeOH	16.20	15.70	21.90	14.10	45.70	14.44	58.06	14.32	47.79	0.762		
32 EtOH	16.08	15.60	24.00	14.00	45.80	14.44	57.48	14.14	48.58	0.654		
33 TFE	16.78	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.70	46.30	15.21	59.78	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	0.898		
34 <i>i</i> -PrOH	16.04	15.20	27.60	13.94	45.94	14.35	57.19	14.06	49.39	0.546		
35 <i>n</i> -BuOH	16.04	15.40	24.80	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.44	57.29	14.25	48.62	0.586		
36 <i>t</i> -BuOH	15.91	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.90	46.50	14.35	57.09	13.96	49.68	0.389		
37 BnOH	16.29	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.54	58.15	14.44	48.33	0.608		
38 EG	16.30	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.74	45.54	14.63	58.53	14.54	47.85	0.790		
39 TEG	15.30	15.50	22.90	13.62	45.42	14.44	57.48	14.25	48.43	0.682		

**Table 1** continued

Solvent <sup>b</sup>	<b>1</b> <sup>c</sup>	<b>2</b> <sup>d</sup>		<b>3</b> <sup>e</sup>		<b>4</b>		<b>5</b>		$E_T^N$
		$a_N$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	$a_{P\beta}$	$a_N$	
40 Water:MeOH	16.72	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.50	45.70	15.02	59.5	15.02	48.14	0.71
41 Water	16.99	16.50	22.80	14.90	45.60	15.31	60.85	15.31	47.75	1
42 Buffer <sup>h</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	15.31	60.85	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	–
43 AcOH	16.19	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	14.54	58.54	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	0.648
44 Et <sub>3</sub> N	15.32	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.58	46.10	14.06	55.35	13.59	50.67	0.043
45 <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> NH	15.36	– <sup>f</sup>	– <sup>f</sup>	13.62	45.91	14.06	55.36	13.96	50.64	0.145

<sup>a</sup>  $a_N$  and  $a_{P\beta}$  given in G

<sup>b</sup> *cHex* cyclohexane, *t-BuPh* *tert*-butylbenzene, *PhBr* bromobenzene, *AcPh* acetophenone, *DCE* 1,2-dichloroethane, *DME* 1,2-dimethoxyethane, *14D* 1,4-dioxane, *THF* tetrahydrofuran, *AcOEt* ethyl acetate, *DMSO* dimethylsulfoxide, *F* formamide, *NMF* *N*-methylformamide, *DMF* *N,N*-dimethylformamide, *TFE* 2,2,2-trifluoroethanol, *EG* ethylene glycol, *TEG* triethylene glycol, *AcOH* acetic acid

<sup>c</sup> See Ref. [1] and [9]

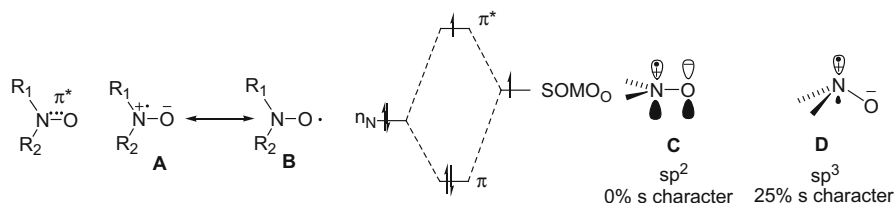
<sup>d</sup> See Ref. [4]

<sup>e</sup> See Ref. [9]

<sup>f</sup> Not available

<sup>g</sup> 1:1 v/v

<sup>h</sup> Phosphate buffer, pH = 7.2



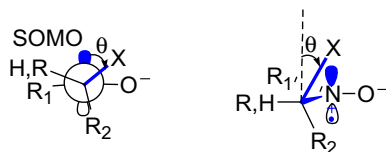
**Fig. 2** 3-Electron bond in nitroxide. Mesomeric forms **A** and **B** of the nitroxide.  $\pi^*$  SOMO in nitroxide. Canonical hybridization forms **C** and **D** of the nitroxyl moiety

and the Hydrogen Bond Acceptor properties (often given by the Abraham's parameter  $\alpha$ ) of the solvent [2, 3].

The McConnell relationship (Eq. 1) shows that the hyperfine coupling constant  $a$  depends on the spin density  $\rho$  on the atom  $\alpha$  carrying the odd electron [12]. Consequently, a low spin density  $\rho$  on the atom carrying the odd electron affords a small hyperfine coupling constant, and conversely. The spin density  $\rho$  depends both on the electron density and on the hybridization of the SOMO at the radical center (i.e., the character  $s$  of the SOMO).

$$a_\alpha = Q \cdot \rho \quad (1)$$

In a nitroxide, the odd electron is located in an antibonding orbital  $\pi^*$  (Fig. 2). Hence, the nitroxyl moiety can be described using two mesomeric forms: the neutral



**Fig. 3** Hyperconjugation effect describing the origin of the coupling between the nuclear spin of the atom X at  $\beta$  position and the SOMO of the nitroxyl moiety (blue colored dihedral angle  $\theta$  on the Newman projection on the *left* and on the Cram projection on the *right*) (color figure online)

form **B**, which has a low density of odd electron on the nitrogen atom affording a small nitrogen hyperfine coupling constant  $a_N$ , and the zwitterionic form **A**, which exhibits a high spin density on the nitrogen atom affording a high  $a_N$  value. Consequently, an electron withdrawing group (EWG) disfavours form **A**, leading to a decrease in  $a_N$ . Moreover, the  $a_N$  value also depends on the hybridization of the nitrogen atom and, consequently, as the odd electron is located in a  $\pi^*$  orbital, the SOMO is described by an atomic orbital of symmetry  $p$  involving a  $sp^2$  hybridized N atom and, hence, a low  $a_N$ . EWGs attached to the nitroxyl moiety change the hybridization of the N atom from  $sp^2$  in **C** to  $sp^3$  in **D**, increasing the  $s$  character of the SOMO and, consequently, the  $a_N$  value.

The hyperfine coupling between the SOMO and the atom X at position  $\beta$  occurs through hyperconjugation between the SOMO and the C–X bond  $\sigma_{C-X}$  (Fig. 3). The Heller–McConnell relationship [6, 12] (Eq. 2) shows that the hyperfine coupling constant  $a_\beta$  depends on the dihedral angle  $\theta$  between the SOMO and the C–X bond  $\sigma_{C-X}$ , that is, the smaller the  $\theta$  the higher  $a_\beta$  and conversely. The value of  $a_\beta$  also directly depends on the spin density  $\rho$  on the atom carrying the SOMO, and in turn, on the value of  $a_N$ , as given in Eq. (1).<sup>1</sup>

Consequently, for nitroxides **2–5**, the  $\beta$ -hyperfine coupling  $a_\beta$  is due to the coupling between the SOMO and the phosphorus atom of the diethoxyphosphoryl group at the position  $\beta$ .

$$a_\beta = B_0 + B_1 \cdot \rho^\pi \cdot \cos^2 \theta \quad (2)$$

### 3.2 Solvent Effects on $a_N$

As expected from  $a_N$  of **1**,  $a_N$  of **2–3** increases linearly with the increasing solvent polarity as given by  $E_T^N$ , meaning that the zwitterionic form **A** is more favored in polar solvents. However, slopes and  $y$ -intercepts are different, implying different interplays of effects for the slope (weights of the mesomeric forms and access to the nitroxyl moiety) and for the  $y$ -intercept (stabilization of the mesomeric forms and hybridization changes).

Nitroxides **2–5** carry a diethoxyphosphoryl group as EWG, which makes these nitroxides more polar than **1**, as given by the value of the electrical Hammett constants  $\sigma_I$  of 0.27 for **2**, **4**, and **5**, and of 0.28 for **3** and  $-0.03$  for **1** [13]. Thus, **2–5**

<sup>1</sup> The term  $B_0$  in Eq. (2) corresponds to the coupling due to the spin polarization through the bond. In general, this term is small enough to be disregarded.



exhibit lower  $y$ -intercepts than **1** as expected. However, although **2–5** exhibit very close  $\sigma_1$  values, their  $y$ -intercepts are different (Table 2), that is,  $y$ -intercepts of **3** and **5** are similar, and lower than those of **2** and **4**. Hence, the  $sp^2$  hybridization in **3** and **5** is more pronounced than in **2** and **3** to relieve the steric strain as much as possible.

Janzen and coll. [5] noted that the more favored the form **B**, the less sensitive the nitroxyl moiety to the solvent effect. Hence, the weaker slope for **3–5** than for **1** is partly accounted for by this effect, except for the stronger slope for **2**. This denotes a change in conformation, providing the solvent with a larger access to the nitroxyl moiety. Interestingly, **3**, a non-cyclic nitroxide, and **5**, a cyclic nitroxide, provide a very similar access to the solvent. On the other hand, **4**, a non-cyclic nitroxide, provides a poorer access.

Statistical outputs are not very good even when some outliers are removed, meaning that other effects than the polarity/polarizability and the hydrogen bond donor (HBD) properties of the solvent are involved.<sup>2</sup>

These effects might be disentangled using the Koppel–Palm and Kalmet–Abboud–Taft relationship [2]. This will be the topic of forthcoming articles as it requires several nitroxides to provide meaningful discussion (Fig 4).

### 3.3 Solvents Effects on $a_p$

As mentioned above, Il'yasov and coll. [4] reported the first investigation of the solvent effect in  $\beta$ -phosphorylated nitroxides and showed with **2** that  $a_p$  values decreased with the increasing polarity of the solvent. This observation was reported a few years later by Janzen and coll. [6] with 3 nitroxides and 2 solvents. Recently, we [9] also reported the same trend with **3**, except that the solvent effect was much weaker for **3** ( $\Delta a_p = 2$  G) than for **2** ( $\Delta a_p = 18$  G).

**Table 2** Correlations for  $a_N$  vs  $E_T^N$  for **1–5**

Nitroxides	$y$ -Intercept	Error <sup>a</sup>	Slope	Error <sup>a</sup>	$N^b$	$R^{2c}$	Outliers <sup>d</sup>
<b>1</b> <sup>e</sup>	15.20	3	1.55	8	44	0.90	29, 39
<b>2</b> <sup>e</sup>	14.16	8	2.13	15	12	0.96	2, 15, 26
<b>3</b> <sup>e</sup>	13.49	4	1.11	9	31	0.85	38, 39
<b>4</b> <sup>e</sup>	14.00	2	0.77	6	38	0.81	2, 4, 33, 40, 41
<b>5</b> <sup>e</sup>	13.64	4	0.96	9	37	0.72	14, 40, 41

<sup>a</sup> Error given on the last digit

<sup>b</sup> Number of solvents

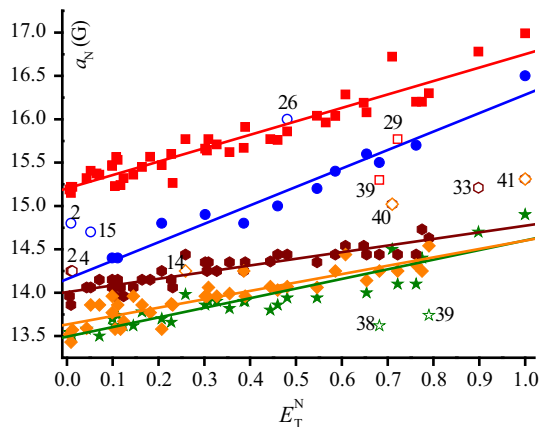
<sup>c</sup> Square of the linear regression coefficient

<sup>d</sup> Outliers displayed in Fig. 4

<sup>e</sup> Given in Ref. [9]

<sup>2</sup>  $E_T^N$  is a composite parameter from polarity/polarizability  $\pi^*$  and HBD  $\alpha$  properties of the solvent.

**Fig. 4** Plots  $a_N$  vs  $E_T^N$  for **1** (filled square), **2** (filled circle), **3** (filled star), **4** (filled hexagon), and **5** (filled diamond). Empty symbols are for outliers



**Table 3** Correlations for  $a_P$  vs  $E_T^N$  for **2**–**5**

Nitroxide	y-Intercept	Error <sup>a</sup>	Slope	Error <sup>a</sup>	$N^b$	$R^{2c}$	Outliers <sup>d</sup>
<b>2</b> <sup>e</sup>	39.73	49	−23.42	112	15	0.98	41
<b>3</b> <sup>e</sup>	46.17	6	−3.02	18	19	0.94	5, 9, 12, 27, 30–34, 36, 38–41
<b>4</b> <sup>e</sup>	54.89	11	4.73	25	40	0.90	29, 31, 32, 34–41
<b>5</b> <sup>e</sup>	50.94	14	−7.09	50	29	0.88	14, 29, 40

<sup>a</sup> Error given on the last digit

<sup>b</sup> Number of solvents

<sup>c</sup> Square of the linear regression coefficient

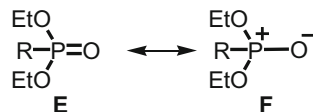
<sup>d</sup> Outliers displayed in Fig. 7

<sup>e</sup> Given in Ref. [9]

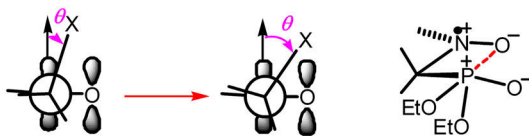
The y-intercept provides the most stable conformation in apolar solvents, that is, the higher  $a_P$ , the lower  $\theta$ , and hence the more eclipsed the SOMO and the C–P bond, i.e., the more perpendicular the C–P bond  $\sigma_{C-P}$  to the N–O• bond.

Interestingly, **5** exhibits a negative slope which is stronger than the slope for **3**. Taking into account that the slopes for the plots  $a_N$  vs  $E_T^N$  are very close for **3** and **5** (even slightly weaker for **5**), the slope for the plots  $a_P$  vs  $E_T^N$  is not related to the accessibility of the nitroxyl moiety to the solvent but rather to the restriction of rotation of the N–C (P) bond (Table 3). Hence, the rotation around the C–N bond is more and more restricted from **2** to **5** and **3** and does not depend on the type of nitroxide, i.e., whether cyclic or non-cyclic. Surprisingly, **4** exhibits a positive slope, implying that  $a_P$  increases with increasing solvent polarity, in sharp contrast to the trends reported for **2**, **3**, and **5**. In fact, as shown above, increasing the solvent polarity increases the weight of the zwitterionic form **A** (Fig. 2) and in the same way increasing the solvent polarity is expected to increase the weight of the zwitterionic form **F** of the P=O moiety in the diethoxyphosphoryl group over the neutral form **E** (Fig. 5). Hence, the driving force leading to the decrease in  $a_P$  with  $E_T^N$  is likely due to the increasing stabilizing dipole–dipole interaction between the partly

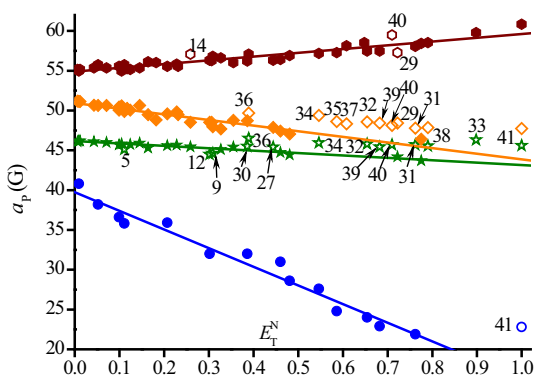
**Fig. 5** Mesomeric forms of the diethoxyphosphoryl group



**Fig. 6** Dipole–dipole interaction leading to the decrease in  $a_p$  in **2**•, **3**•, and **5**•



**Fig. 7** Plots  $a_p$  vs  $E_T^N$  for **2** (filled circle), **3** (filled star), **4** (filled hexagon), and **5** (filled diamond). Empty symbols are for outliers



negatively charged oxygen atom of the nitroxyl moiety and the partly positively charged phosphorus atom of the diethoxyphosphoryl group, as displayed in Fig. 6, affording an aza-oxaphosphetane-like structure.

However, this driving force can account neither for the increase in  $a_p$  (Fig. 7) for **4** nor for the outliers (Table 3) observed for **2** (1), **3** (14) and **5** (3). Indeed, as shown in Eq. (2),  $a_p$  values depend on both the conformations given by the dihedral angle  $\theta$  and the spin density in the SOMO as given by  $\rho^\pi$ , meaning that the plot  $a_p$  vs  $E_T^N$  cannot provide a non-ambiguous discussion.

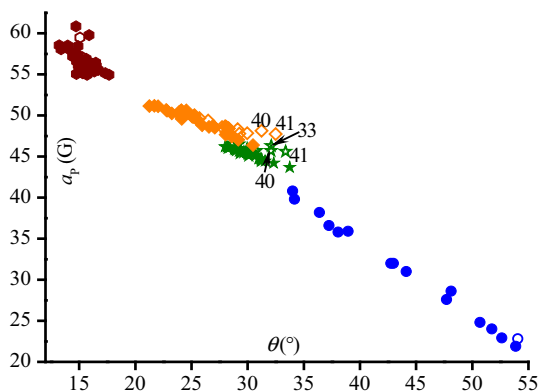
### 3.4 Steric Strain and Nitroxyl Moiety Accessibility

As mentioned above,  $a_p$ , Eq. (2) depends on both  $\theta$  and  $\rho^\pi$ .  $\rho^\pi$  changes for each solvent as it is directly proportional to  $a_N$  (Eq. 1). Hence, assuming  $B_1\rho^\pi = 60$  in apolar solvents [14] such as *n*-hexane, Eq. (2) affords  $\theta_1$  values of ca. 34°, 28°, 15°, and 21° for **2–5**, respectively. Thus, implementing  $\theta_1$  values in Eq. (2) and applying the ratio  $a_{p,1}/a_{p,n}$  (Eq. 3) afford  $\theta$  values for each nitroxide in each solvent.

$$\frac{a_{p,1}}{a_{p,n}} = \frac{a_{N,1}}{a_{N,n}} \cdot \frac{\cos^2 \theta_1}{\cos^2 \theta_n} \quad (3)$$

Interestingly, the conformational change in each nitroxide occurs over different ranges of dihedral angle  $\Delta\theta$ , i.e.,  $\Delta\theta$  of 20°, 6°, 12°, and 3.5° for **2–5**, respectively.

**Fig. 8** Plots  $a_P$  vs  $\theta$  for **2** (filled circle), **3** (filled star), **4** (filled hexagon), and **5** (filled diamond). Empty symbols are for the outliers reported in Fig. 7



The mobility increases in the series **3**, **5**, and **2** and the dipole–dipole interaction overmatches the steric strain until a balance point is reached (Fig. 8). As observed in Fig. 7, most outliers are hydrogen bond donor solvents and, when the dipole–dipole interaction balances the steric strain, the increase in polarity involves an increase in the weight of form **A**, affording higher spin density  $\rho^\pi$  at the nitrogen atom leading to an increase in  $a_P$ , as expected from Eq. (2). Other outliers are likely due to the specific solvation of the nitroxyl moiety caused by the molecular size of the solvent. The small value of  $\Delta\theta$  for **4**• denotes the absence of conformational change. Hence, the increase in  $a_P$  for **4**• is only due to the increase in  $\rho_{N^\pi}$ , i.e., to the increase in  $a_N$  with the solvent polarity.

Interestingly, the higher the free rotations, i.e., the higher the slope of  $a_P$  (Table 3), the better the accessibility, i.e., the higher the slope of  $a_N$  (Table 2), of the nitroxyl moiety to the solvent, as also shown by the correlation between  $a_N$  and the changes in the dihedral angle  $\Delta\theta$ .

## 4 Conclusion

As reported during the last four decades, the solvent effects on  $a_N$  for  $\beta$ -phosphorylated nitroxides **2–5** show the same trends than those reported for more conventional nitroxides. Nevertheless for **2–5**, the accessibility of the solvent to the nitroxyl moiety depends a lot on the steric strain which is readily tuned by the conformational changes driven by the dipole–dipole interaction between the  $P=O\cdots N-O\bullet$  moieties. Interestingly, none of the  $\beta$ -phosphorylated nitroxides exhibits the same sensitivity to the conformational changes, i.e., strong conformational changes for **2**, moderate for **5**, weak for **3**, and a highly restricted conformation for **4**, although **4** is a non-cyclic nitroxide like **2** and **3**.

**Acknowledgments** We are grateful to Aix-Marseille University, CNRS and ANR (grant SonRadis ANR-11-JS07-002-0) for their financial support. LB thanks ANR (grant SonRadIs) for a Ph.D. grant. This article was first the topic of a communication at SPIN 2014 in Zelenogradsk, Kaliningrad, Russia.

## References

1. B. Knauer, J.J. Napier, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 4395–4400 (1976)
2. C. Reichardt, T. Welton, *Solvent and Solvent Effect in Organic Chemistry*, 4th edn. (Wiley, Weinheim, 2011)
3. Y. Marcus, *The Properties of Solvents*, Vol. 4 (Wiley, Chichester, 1998)
4. A. Sh. Mukhtarov, A. V. Il'Yasov, Ya. A. Levin, I. P. Gozman, M. S. Skorobogatova, E. I. Zoroatskaya, *Theor. Exp. Chem.* **12**, 656–660 (1976); *Teor. Eksp. Khim.* **12**, 831–836 (1976)
5. E.G. Janzen, G.A. Coulter, U.M. Oehler, J.P. Bergsma, *Can. J. Chem.* **60**, 2725–2733 (1982)
6. D.L. Haire, E.G. Janzen, G. Chen, V.J. Robinson, I. Hrvoic, *Magn. Reson. Chem.* **37**, 251–258 (1999)
7. C.-H. Deng, C.-J. Guan, M.-H. Shen, C.-X. Zhao, *J. Fluorine Chem.* **116**, 109–115 (2002)
8. M.F. Ottaviani, G. Martini, L. Nuti, *Magn. Reson. Chem.* **25**, 897–904 (1987)
9. G. Audran, P. Brémond, S.R.A. Marque, G. Obame, *Chem. Phys. Chem* **13**(15), 3542–3548 (2012)
10. S. Jousset, J.-M.P. Catala, *Macromolecules* **33**, 4705–4710 (2000)
11. F. Le Moigne, A. Mercier, P. Tordo, *Tetrahedron Lett.* **32**(31), 3841–3844 (1991)
12. F. Gerson, W. Huber, *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals* (Wiley, Weinheim, 2003)
13. E.G. Bagryanskaya, S.R.A. Marque, Y.P. Tsentalovich, *J. Org. Chem.* **77**(11), 4996–5005 (2012)
14. P. Stipa, J.-P. Finet, F. Le Moigne, P. Tordo, *J. Org. Chem.* **58**, 4465–4468 (1993)

# Enzymatically Shifting Nitroxides for EPR Spectroscopy and Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging

Gérard Audran,\* Lionel Bosco, Paul Brémond,\* Jean-Michel Franconi, Neha Koonjoo, Sylvain R. A. Marque,\* Philippe Massot, Philippe Mellet,\* Elodie Parzy, and Eric Thiaudiere\*

In memory of J.-P. Finet

**Abstract:** *In vivo* investigations of enzymatic processes using non-invasive approaches are a long-lasting challenge. Recently, we showed that Overhauser-enhanced MRI is suitable to such a purpose. A  $\beta$ -phosphorylated nitroxide substrate prototype exhibiting keto–enol equilibrium upon enzymatic activity has been prepared. Upon enzymatic hydrolysis, a large variation of the phosphorus hyperfine coupling constant ( $\Delta a_p = 4$  G) was observed. The enzymatic activities of several enzymes were conveniently monitored by electronic paramagnetic resonance (EPR). Using a 0.2 T MRI machine, *in vitro* and *in vivo* OMRI experiments were successfully performed, affording a 1200% enhanced MRI signal *in vitro*, and a 600% enhanced signal *in vivo*. These results highlight the enhanced imaging potential of these nitroxides upon specific enzymatic substrate-to-product conversion.

In recent years, dynamic nuclear polarization (DNP) has experienced a revival owing to bisnitroxide molecules as they can afford a dramatic NMR signal enhancement.<sup>[1]</sup> However, its application *in vivo* is still severely limited owing to its lack of selectivity toward biological processes. Furthermore, because the resonance frequency of the free electron is 660 times higher than that of the proton, free electrons require irradiation with high frequencies. Those are hardly compatible with imaging in living animals because the energy

deposition is too high and wave penetration too shallow. In parallel, in the field of molecular imaging, anatomical magnetic resonance imaging (MRI) is growing into one of the most powerful non-invasive techniques for its high contrast in deeply-seated soft tissues, good spatial and temporal resolution, and its ability to diagnose pathological conditions. Nevertheless, the lack of sensitivity and non-selective contrasting agents hampers the use of MRI, particularly in the study of enzymatic processes occurring *in vivo*.

Proteases are a family of enzymes with a large variety of potential for diagnosis. Proteolytic activity is tightly regulated in space and time in normal tissues and thus is kept at low level and for short periods of time. However, they exhibit a persistent and specific activity in a number of diseases, such as solid tumors, pancreatitis, chronic obstructive pulmonary disease, cystic fibrosis, rheumatoid arthritis, and many inflammatory situations. Imaging these activities would offer an opportunity for early diagnosis independent of the anatomical alterations, which often appear later.<sup>[2–5]</sup> Recently, our groups highlighted the potential of the OMRI technique<sup>[6,7]</sup> at 0.2 T to detect and visualize a naturally occurring proteolytic activity in the digestive tract of living mice.<sup>[8–10]</sup> Herein, our new approach requires a nitroxide probe exhibiting changes in the hyperfine coupling constant larger than one Gauss upon enzymatic hydrolysis. To our knowledge, no nitroxides exhibit such a large frequency shift upon chemical or biological changes at physiological pH and temperature.<sup>[11–16]</sup> Previous reports of the use of nitroxides as probes relied on the changes in the nitrogen hyperfine coupling constant  $a_N$  or on the line width.<sup>[17]</sup> On the other hand,  $\beta$ -hyperfine coupling constants are known to be highly sensitive to conformational changes.<sup>[18]</sup> Thus, we chose to focus on the synthesis of  $\beta$ -phosphorylated nitroxides **9** and **10**, which exhibit exo- and intracyclic double bonds (Scheme 1). The EPR features of nitrogen and phosphorus hyperfine coupling constants ( $a_N$  and  $a_P$ , respectively) were investigated, as well as the kinetics of hydrolysis of **10** into **9** in the presence of various enzymes. The potential of **9** and **10** as polarizing agents was explored through *in vitro* and *in vivo* OMRI experiments (Figure 1).

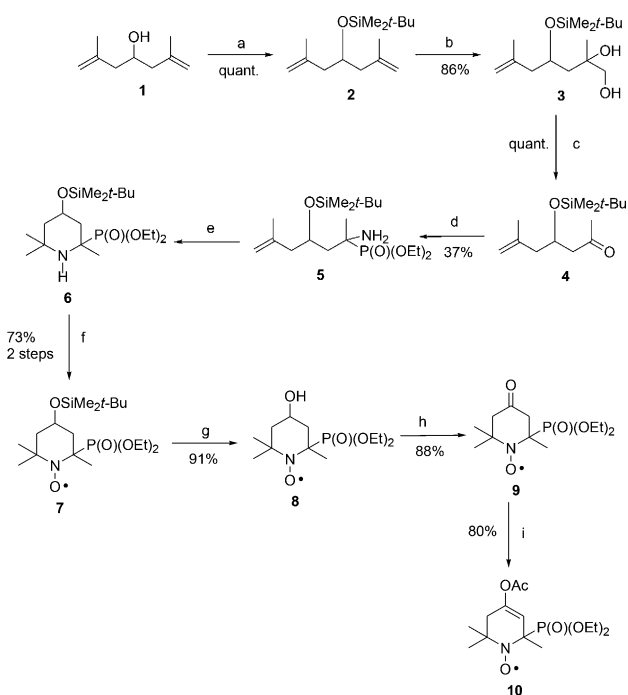
Nitroxide **9** was prepared in eight steps (Scheme 1) starting from the commercially available 2,6-dimethyl-4-hydroxy-hept-1,6-diene **1**. The regioselectivity of the formation of the intracyclic double bond to afford **10**<sup>[19]</sup> was controlled by using a bulky base, potassium hexamethyldi-

[\*] Prof. G. Audran, L. Bosco, Dr. P. Brémond, Prof. S. R. A. Marque  
 Aix-Marseille Université, CNRS, ICR, UMR 7273  
 Case 551, Avenue Escadrille Normandie-Niemen,  
 13397 Marseille Cedex 20 (France)  
 E-mail: g.audran@univ-amu.fr  
 paul.bremond@univ-amu.fr  
 sylvain.marque@univ-amu.fr

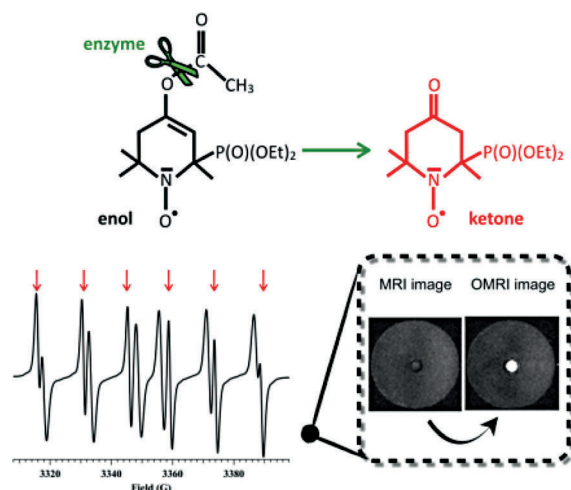
Prof. J.-M. Franconi, N. Koonjoo, P. Massot, Dr. P. Mellet,  
 Dr. E. Parzy, Prof. E. Thiaudiere  
 Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques,  
 UMR 5536 CNRS, Case 93,  
 University Bordeaux Segalen  
 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex (France)  
 E-mail: jean-michel.franconi@rmsb.u-bordeaux2.fr  
 eric.thiaudiere@rmsb.u-bordeaux2.fr

Dr. P. Mellet  
 INSERM  
 33076 Bordeaux Cedex (France)  
 E-mail: philippe.mellet@rmsb.u-bordeaux2.fr

Supporting information and experimental data for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201506267>.



**Scheme 1.** Preparation of **9** and **10**. a) DMF, imidazole, *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl), 5 h, 0 °C; b) (1) OsO<sub>4</sub>, acetone/water, 15 min, 0 °C; (2) *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (NMO), 4 h, 0 °C. c) NaIO<sub>4</sub>, THF/water (1:3, v/v), 3 h, 0 °C. d) HP(O)(OEt)<sub>2</sub>, 4 Å M.S.. e) (1) Hg(OAc)<sub>2</sub>, THF/water (1:3, v/v), 30 min, r.t.; (2) NaBH<sub>4</sub>, NaOH (1 M). f) *meta*-chloroperoxybenzoic acid (mCPBA), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 h, 0 °C. g) TBAF, THF, 3 h, 0 °C. h) NMO, TPAP, 4 Å M.S., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C. i) (1) LiHMDS, THF, 3 h, -80 °C to -45 °C; (2) Ac<sub>2</sub>O, 2.5 h, -45 °C.



**Figure 1.** Nitroxides with different EPR signatures to target enzymatic processes with EPR and/or OMRI techniques in vitro and in vivo.

lazane (KHMDS), which reacted with the most acidic protons (see the Supporting Information).

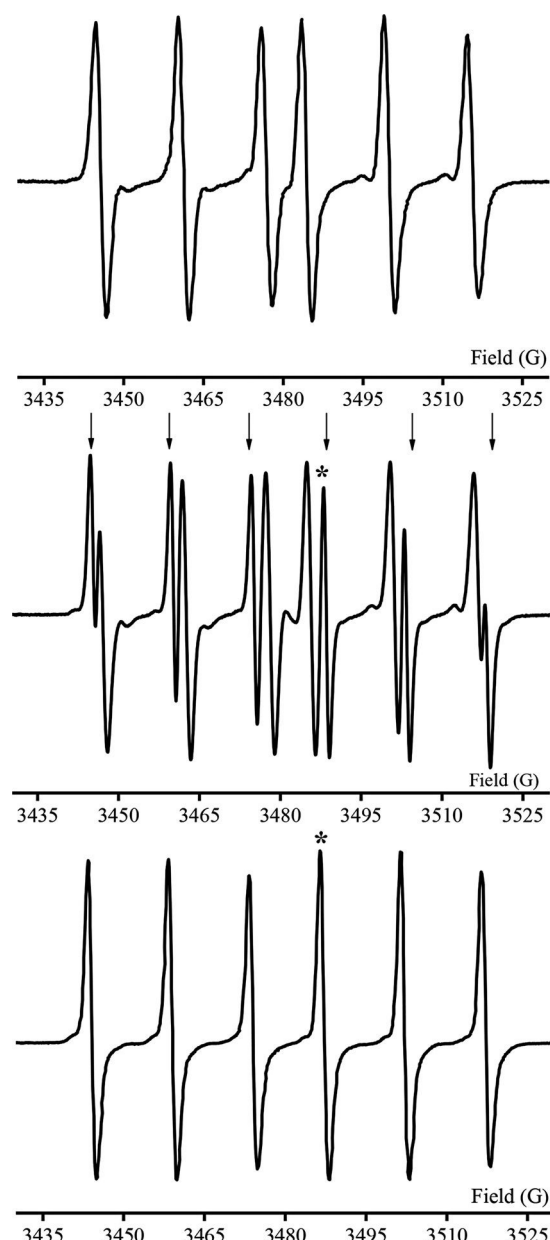
EPR features are reported in Table 1 and Figure 2, and are in very good agreement with previously reported data.<sup>[18]</sup> Interestingly, nitroxide **10** (intracyclic double bond) exhibits an  $a_p$  value 4.4 G smaller than the one of **9** (exocyclic double bond). Moreover, linewidths are narrow enough for OMRI

experiments.<sup>[10]</sup> Owing to this difference in their  $a_p$  values, their spectra are sufficiently resolved to avoid peak overlapping, thus allowing individual quantification of the products in a 1:1 mixture of **9** and **10** (Figure 2).

**Table 1:** EPR parameters of nitroxides **9** and **10**.

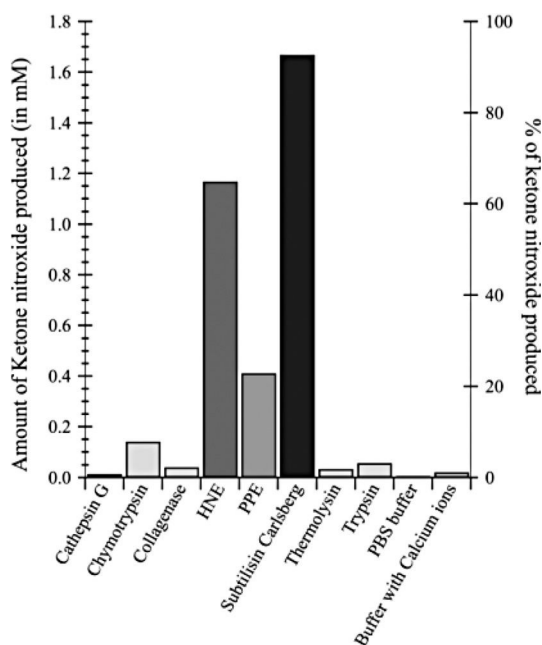
Nitroxides	$a_N$ [G] <sup>[a]</sup>	$a_p$ [G] <sup>[a]</sup>	$g$ <sup>[b]</sup>	$\Delta H_{pp}$ [G] <sup>[a,c]</sup>
<b>9</b>	15.0	43.1	2.0062	1.2
<b>10</b>	15.6	38.7	2.0063	1.8

[a] 1 G = 0.1 mT. [b] Landé's factor. [c] Linewidth peak to peak for the central lines.



**Figure 2.** EPR signals of **10** (top) and **9** (bottom) and a 1:1 mixture of **9/10** (middle; arrows are for lines of **9**). The starred line in the EPR signal of **9** was used for electronic spin excitation for OMRI.

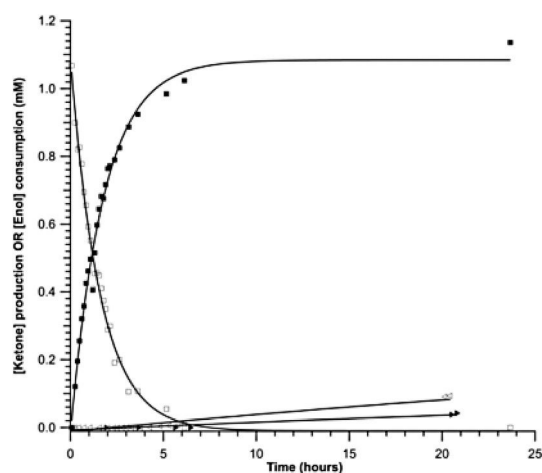
Enzymatic activity assays were carried out *in vitro* using the EPR technique to monitor the keto–enol hydrolysis. After an incubation time of 5 h and quantification of the third EPR line for **9**, out of 8 proteases of various specificities and origin, three were able to hydrolyze **10** into **9**, namely, porcine pancreatic elastase (PPE), human neutrophil elastase (HNE) and subtilisin A (Figure 3). Subtilisin A was selected for further experiments because of it displayed the highest activity (95 % hydrolysis in 5 h).



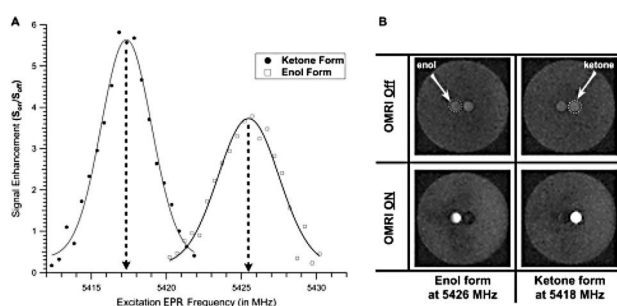
**Figure 3.** Efficiency of various enzymes as well as of PBS buffer and  $\text{Ca}^{2+}$  PBS buffer in hydrolysis of 1.8 mM of **10** into **9** for 5 h incubation. y-axis in mM (left) and % converted (right).

The kinetics of the consumption of substrate **10** consumption, and the formation of product **9** were monitored to complete hydrolysis (Figure 4). The half-life,  $t_{1/2}$  was measured at 74 min with a substrate concentration of 1.1 mM and subtilisin A concentration of 2.8  $\mu\text{M}$ . Given that the Michaelis–Menten condition of  $[\text{S}] \ll K_M$  was fulfilled at substrate concentrations ranging from 0.3 to 1.1 mM, the catalytic constant,  $k_{\text{cat}}/K_M$  was  $55 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at 37 °C in saline phosphate buffer pH 7.3. This low value is due to the very partial occupation of the enzyme active site by the small acetyl ligand.<sup>[20]</sup> The spontaneous hydrolysis rate at 37 °C and pH 7.3 (Figure 4) was not significant during the time of experiment. The rate of increase of **9** in the presence of Eglin C, a natural protease inhibitor from leeches, only showed a slow rate of transformation of **10** into **9** close to the rate of spontaneous hydrolysis, suggesting a complete inhibition of what appears to be a pure enzymatic process.

As already seen above in the EPR spectra, the substrate-to-product conversion revealed a significant coupling shift of about 4 G without line overlapping. This molecular characteristic was then transposed into OMRI applications to monitor enzymatic reactions taking place either *in vitro* or *in vivo*. To check whether the non-overlapping condition is valid for



**Figure 4.** Kinetics for the decay of 1.1 mM of **10** ( $\square$ ) and the generation of **9** ( $\blacksquare$ ) in the presence of 2.8  $\mu\text{M}$  of subtilisin A. The generation of **9** in the presence of subtilisin A plus the Eglin C inhibitor ( $\triangleleft$ ), and spontaneous hydrolysis in PBS buffer solution ( $\blacktriangleright$ ).

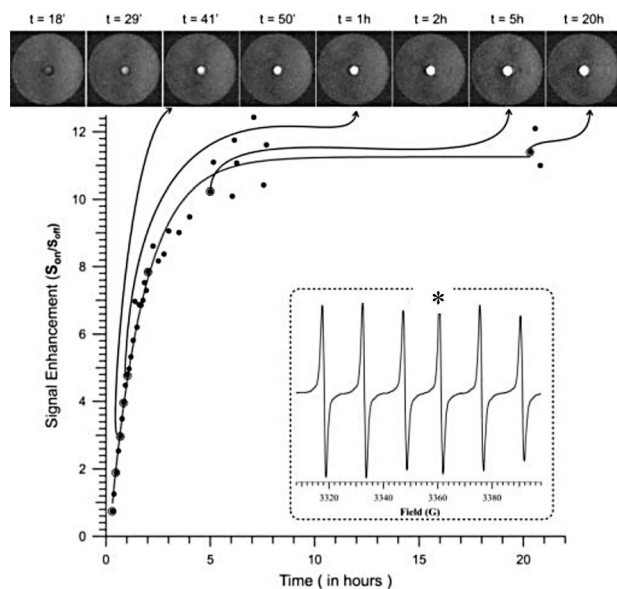


**Figure 5.** A) Optimal excitation EPR frequency (in MHz) determination and OMRI signal enhancements for **9** ( $\bullet$ ) and **10** ( $\square$ ). B) *In vitro* spotting of **9** (left inserted tube labeled as enol) and **10** (right inserted tube labeled as ketone). The first row corresponds to the MRI images without electronic saturation and the second row with electronic saturation.

OMRI, the EPR irradiating frequency was swept for both the substrate and the product. The two spectra are shown in Figure 5a. 2D images with and without electronic spin saturation were acquired (data not shown) at different equally spaced EPR frequencies ranging from 5412.35 to 5429.85 MHz for **9** and **10** for a proton frequency of 8.24264 MHz. Thus, the maximal signal enhancements were observed at 5417.3 and 5425.3 MHz for **9** and **10**, respectively. As already seen in Table 1, the EPR line width was narrow enough to observe high signal enhancement on the OMRI images and the  $\Delta a_p$  (ca. 8 MHz, Figure 5a) between the third EPR line of **9** and that of **10** was sufficiently far apart for a selective and distinct electronic EPR saturation for OMRI experiment. *In vitro* experiments (Figure 5b) showed that nitroxides **9** and **10** were selectively spotted at 5417.9 MHz and of 5426.2 MHz, respectively. Consequently, OMRI experiments showed that each sample of **9** and **10** was lit up selectively (Figure 5b). It should be noted that the enhancements observed for **10** were poorer than those for **9**. This result is due to the larger line width of **10** (Table 1).



In vitro OMRI kinetic assays were then carried out to monitor the hydrolysis of (-)-**10** (1.8 mM) in phosphate buffer, pH 7.2 in the presence of subtilisin A (2.8  $\mu$ M). The rate of production of **9** from (-)-**10** monitored by irradiating the EPR line highlighted in Figure 6 yielded  $t_{1/2} = 69$  min. at 37°C, a value fairly close to the one obtained by EPR monitoring. The maximum signal enhancement was found to be 11.3 after 20 h of reaction time. These OMRI data agree with those obtained by EPR.



**Figure 6.** In vitro OMRI monitoring of the hydrolysis of (-)-**10** (1.8 mM) into **9** (bright spot) by subtilisin A (2.8  $\mu$ M) in phosphate buffer pH 7.2 at 37°C. 2D images were acquired at various time intervals with/without EPR frequency saturation tuned at 5417 MHz. Inset: the starred line in the EPR signal of **9** was used for electronic spin excitation for OMRI.

To definitively highlight the potential of **9** and **10** in probing non-radical enzymatic activity, a mouse was fed with a solution of **10** at 24 mM (see the Supporting Information). Anatomical MRI was first performed and confirmed that the stomach was filled with the nitroxide solution (Figure 7A). Then, the first 3D OMRI images were acquired with and without electronic EPR saturation of the nitroxides found in the stomach. The saturation frequency was set at 5425.7 MHz and thereby specifically exciting one electronic transition of **10**. A hypersignal with a maximal signal amplification of 5.7 was visible in the stomach, highlighting the presence of the substrate at about 10 min post-gavage (Figure 7B).

Afterwards, 3D OMRI images were obtained again with and without electronic saturation at the frequency of 5417.5 MHz, corresponding to the equivalent EPR transition line of the product nitroxide **9**. The images revealed that some of the substrate was converted into the ketone product generating a specific high contrast with an 8.5-fold increase at 35 min post-gavage (Figure 7C). Mouse stomach and intestine pH have been measured at 3 and 5, respectively.<sup>[21]</sup> The spontaneous hydrolysis of (+)-**10** nitroxide between pH 3 and 7 is not detectable while it is significant at pH of 1 or 9

(Supporting Information, Figure S1). Thus it is the digestive enzymes found in the stomach and/or in the intestine that were able to transform nitroxide **10** into **9**. Clearly, the conformational change from **10** to **9** plays the expected on/off role for selective OMRI experiments affording a powerful tool to investigate in vivo enzymatic processes.

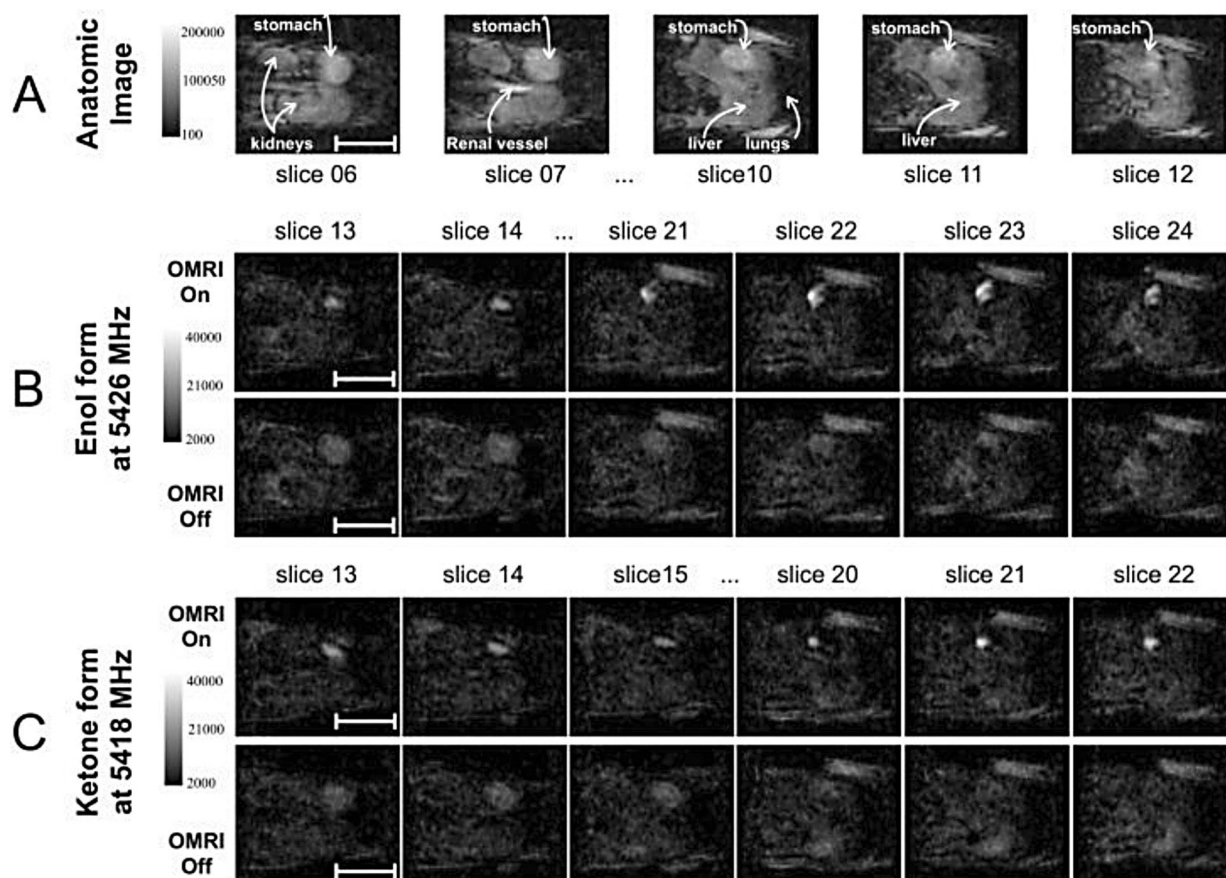
These preliminary results in OMRI show the huge potential of the tautomeric equilibrium between **9** and **10** to investigate non-radical enzymatic processes in vivo using the non-invasive OMRI technique. The primary approach in activity-based molecular imaging has been optical imaging, mainly because of its high sensitivity. MRI is the only one that has high anatomical resolution in 3D, together with no depth limitations and no radiative issues. Furthermore, its poor sensitivity is being handled using the Overhauser effect of **9** and **10** onto the water molecules. In the present study, the signal was enhanced 8.5 times, thus affording a large specific contrast. Here, the in vivo validation was carried out at both substrate and product frequencies using the distinct signatures of each species. Although experiments were performed with only three mice (low statistical reproducibility) and despite that the acetyl nitroxide is a very poor protease substrate compared to usual peptidic substrates, our results confirm unambiguously the feasibility of this approach.

Improvements are still ongoing. Targeting specific disease-related enzymes by grafting enzyme-specific peptides on **10** is expected to enhance  $k_{cat}/K_M$  by several orders of magnitude, thus providing both sensitivity and protease specificity.<sup>[22]</sup>

Proteases are tightly regulated biomolecules involved in many physiological events, and deregulations in their activities are correlated to various diseases, such as cancer with overwhelming matrix metalloproteinase (MMP) activity, pancreatitis with premature in situ pancreatic protease activation, cystic fibrosis, or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with overwhelming concentration of neutrophil proteases, and multiple sclerosis and rheumatoid arthritis with deleterious MMP activity. The specific nitroxides and imaging technique described here would certainly help for better understanding the function of those overexpressed proteases and their sustaining activities in vivo through monitoring and disease localization. Eventually, drug design against those proteases could also be tested accordingly.

Consequently, there is a need to develop such an application for humans. At 0.2 T Tesla, the 5.5 GHz waves corresponding to the resonance frequency of the electron is suitable for small animals but not for humans because of the poor penetration into tissues. However, it is possible at very low field. For instance, at earth field the electron resonance frequency is about 60 MHz, a usual frequency in clinical MRI. For connection to the anatomical images, two possibilities arise: a field cycling apparatus<sup>[23]</sup> or more sensitive detectors.<sup>[24]</sup> As a consequence much higher Overhauser enhancements are predicted<sup>[25]</sup> and hence a much lower detection limit of the nitroxides.

These nitroxides are also suitable for a broad range of enzymes as the ester moiety can be designed for a particular enzyme, such as by using specific peptides, sugars, or lipids.



**Figure 7.** A) 3D anatomical MRI image of the stomach. B) The first row corresponds to the image with electronic saturation at 5425.7 MHz and the slices in the second row are the corresponding non-saturated electronic spins. C) The first row corresponds to the image with an electronic saturation of 5417.5 MHz (first row) and without (second row). All OMRI images were acquired in 18 seconds and then reconstructed into an isotropic spatial resolution of 0.5 mm in all three directions. The anatomical image has a spatial resolution of  $0.5 \times 0.54 \times 1 \text{ mm}^3$  and a temporal resolution of about 3.5 min.

These non-exhaustive biomolecules, once grafted onto the nitroxide moiety, can be applied to several enzyme-specific studies including quantification, kinetic constant determination, and drug inhibition tests.<sup>[22]</sup>

### Acknowledgements

The authors thank CNRS, Aix-Marseille University for A\*MIDEX grant (ANR-11-IDEX-0001-02) funded by the Investissements d'Avenir French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR), University of Bordeaux 2 for the Labex TRAIL grant (ANR-10-LABX-57) funded by the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the Future Program, within the Cluster of Excellence TRAIL. ANR was granted for funding this project (grants SonRadIs ANR-11-JS07-002-01 and NITROMRI ANR-09-BLA-0017-01). L.B. is thankful to ANR for the Ph.D. fellowship (grant SonRadIs).

**Keywords:** dynamic nuclear polarization · enzymes · nitroxides · NMR imaging · Overhauser effect

**How to cite:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13379–13384  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13577–13582

- [1] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, M. Schwarzwald, A. J. Rossini, F. Aussenac, M. Yulikov, G. Jeschke, Ch. Copéret, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12790–12797.
- [2] L. Zhu, J. Xie, M. Swierczewska, F. Zhang, Q. Quan, Y. Ma, X. Fang, K. Kim, S. Lee, X. Chen, *Theranostics* **2011**, *1*, 18–27.
- [3] P. Habibollahi, J. L. Figueiredo, P. Heidari, A. M. Dulak, Y. Imamura, A. J. Bass, S. Ogino, A. T. Chan, U. Mahmood, *Theranostics* **2012**, *2*, 227–234.
- [4] V. Catanzaro, C. V. Gringeri, V. Menchise, S. Padovan, C. Boffa, W. Dastrù, L. Chaabane, G. Digilio, S. Aime, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3926–3930; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4018–4022.
- [5] N. Guyot, J. Wartelle, L. Malleret, A. A. Todorov, G. Devouassoux, Y. Pacheco, D. E. Jenne, A. Belaaouaj, *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 2197–2210.
- [6] D. Grucker, *Magn. Reson. Med.* **1990**, *14*, 140–147.
- [7] K. Golman, J. S. Petersson, J. H. Ardenkjaer-Larsen, I. Leunbach, L. G. Wistrand, G. Ehnholm, K. Liu, *J. Magn. Reson. Imaging* **2000**, *12*, 929–938.
- [8] E. Parzy, V. Bouchaud, P. Massot, P. Voisin, N. Koonjoo, D. Moncelet, J.-M. Franconi, E. Thiaudière, P. Mellet, *PLoS One* **2013**, *8*, 2.
- [9] N. Koonjoo, E. Parzy, P. Massot, M. Lepetit-Coiffé, S. R. A. Marque, J.-M. Franconi, E. Thiaudière, P. Mellet, *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9*, 363–371.

- [10] P. Mellet, P. Massot, G. Madelin, S. R. A. Marque, E. Harte, J.-M. Franconi, E. Thiaudière, *PLoS One* **2009**, *4*, e5244.
- [11] A. R. Forrester, F. A. Neugebauer, *Organic N-Centered Radicals and Nitroxide Radicals, Landolt-Börnstein: Molecules and Radicals, Vol. 9, Part c1* (Ed.: H. Fischer), Springer, Heidelberg, **1979**.
- [12] A. R. Forrester, *Nitroxide Radicals, Landolt-Börnstein: Molecules and Radicals, Vol. 17, Part d1,d2* (Ed.: H. Fischer), Springer, Heidelberg, **1989**.
- [13] O. V. Efimova, Z. Sun, S. Petryakov, E. Kesselring, G. L. Caia, D. Johnson, J. L. Zweier, V. V. Khramtsov, A. Samouilov, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209*, 227–232.
- [14] A. Samouilov, O. V. Efimova, A. A. Bobko, Z. Sun, S. Petryakov, T. D. Eubank, D. G. Trofimov, I. A. Kirilyuk, I. A. Grigor'ev, W. Takahashi, J. L. Zweier, V. V. Khramtsov, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1045–1052.
- [15] A. Alberti in *Nitroxide Radicals and Nitroxide Based High-Spin Systems, Landolt-Börnstein: Molecules and Radicals, Vol. 26, Part D* (Ed.: H. Fischer), Springer, Heidelberg, **2005**.
- [16] W. Takahashi, A. A. Bobko, I. Dhimitruka, H. Hirata, J. L. Zweier, A. Samouilov, V. V. Khramtsov, *Appl. Magn. Reson.* **2014**, *45*, 817–826.
- [17] V. V. Khramtsov, J. L. Zweier, *Functional in vivo EPR Spectroscopy and Imaging Using Nitroxide and Trityl Radicals, Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds* (Ed.: R. G. Hicks), Wiley, Chichester, **2010**, pp. 537–566.
- [18] G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher, S. R. A. Marque, *Appl. Magn. Reson.* **2015**. DOI: 10.1007/s00723-015-0649-4.
- [19] Some amounts of **10** were separated on chiral HPLC to yield (+)-**10** and (-)-**10**.
- [20] However, using enol esters of protease-specific peptides as substrate should easily enhance this catalytic constant  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$   $10^3$  to  $10^4$  times. Work in progress.
- [21] E. L. McConnell, A. W. Basit, S. Murdan, *J. Pharm. Pharmacol.* **2008**, *60*, 63–70.
- [22] G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, J.-M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy, E. Thiaudière, E.U. EP15306115.5.
- [23] P. J. Ross, L. M. Broche, D. J. Lurie, *Magn. Reson. Med.* **2015**, *73*, 1120–1124.
- [24] V. S. Zotev, T. Owens, A. N. Matlashov, I. M. Savukov, J. J. Gomez, M. A. Espy, *J. Magn. Reson.* **2010**, *207*, 78–88.
- [25] T. Guiberteau, D. Grucker, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, *110*, 47–54.

Received: July 8, 2015

Published online: September 17, 2015



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 1288

## Solvent effect in $\beta$ -phosphorylated nitroxides. Part 4: detection of traces of water by electron paramagnetic resonance†

Gérard Audran,\* Lionel Bosco, Paul Brémond,\* Teddy Butscher and Sylvain R. A. Marque\*

For decades, the nitrogen hyperfine coupling constant  $a_N$  of nitroxides has been applied to probe their environment using EPR. However, the small changes observed ( $\approx 2$  G from *n*-pentane to water) with the solvent polarity allow only a qualitative discussion. A stable  $\beta$ -phosphorylated nitroxide exhibiting a small change in  $a_N$  ( $\approx 3$  G from *n*-pentane to water) and a striking change ( $\approx 25$  G from *n*-pentane to water) in phosphorus hyperfine coupling constant  $a_P$  with the polarity of solvent was prepared and used to develop the first procedure for the titration of water in THF by EPR, down to 0.1% v/v.

Received 10th November 2015,  
Accepted 1st December 2015

DOI: 10.1039/c5ob02316e

www.rsc.org/obc

### Introduction

Since the seminal work of Knauer *et al.*<sup>1</sup> on solvent effects, the values of  $a_N$  for nitroxide **1** (Fig. 1) have been considered as benchmark values and used for discussions of solvent effect studies involving nitroxides. Nitroxide sensitivity to solvent effect is rather weak, *i.e.*,  $\Delta a_N \approx 2$  G from *n*-hexane to water for **1**. However, in 1976, Il'Yasov and co-workers<sup>2</sup> reported a striking solvent effect ( $\approx 18$  G) on the phosphorus hyperfine coupling constant  $a_P$  of the non-cyclic nitroxide **2**. We believe that this result did not raise much interest because such a nitroxide was not stable.‡ Recently, we reported<sup>3</sup> a weak effect ( $\approx 2$  G from *n*-pentane to *N*-methyl formamide) of the solvent polarity on  $a_P$  for the stable non-cyclic nitroxide **3**. We investigated different types of nitroxides carrying a diethoxyphosphoryl group at position  $\beta$ ,<sup>4</sup> and showed that some of them were suitable for the titration of a few percent of water in organic solvents.<sup>5</sup> Hereafter, we report on the stable  $\beta$ -phosphorylated 6-membered nitroxide **4** which exhibits a striking difference in  $a_P$  ( $\Delta a_P \approx 25$  G) from *n*-pentane to water. The solvent effect is discussed in terms of intramolecular hydrogen bonding (IHB) and chair/chair conformational equilibrium. These features

are used to investigate the effect on  $a_P$  of a THF/water binary mixture and applied to the titration of water in THF down to 0.1% water by EPR.

### Results and discussion

Nitroxide **4** was prepared as reported in literature.<sup>6</sup> The two diastereoisomers **4c** and **4t** (Fig. 1) with the diethoxyphosphoryl and hydroxyl groups in *cis* and *trans* relationship, respectively, were investigated separately.§¶ The effect of 45 solvents (Table 1SI†) on  $a_N$  and  $a_P$  was investigated by EPR as well as the effect of the THF/water binary mixture (Table 2SI† and Fig. 2).

As expected from **1** and **2**,  $a_N$  values for **4t** increase with increasing solvent polarity given by the normalized Diromth-Reichardt constant  $E_T^N$  (Fig. 3).||<sup>7</sup> Indeed,  $a_N$  values are given by the McConnell relationship<sup>8</sup> (eqn (1)), with  $Q$  being a constant given by quantum mechanics and  $\rho_N$  the electron density on the nitrogen nucleus which depends both on the weight of each canonical forms **A** and **B** (Fig. 4)<sup>9</sup> – the zwitterionic form

Aix-Marseille Université, CNRS, ICR, UMR 7273, case 551, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France.

E-mail: sylvain.marque@univ-amu.fr, g.audran@univ-amu.fr, paul.bremond@univ-amu.fr

‡ It was observed by spin-trapping of the diethoxyphosphoryl radical onto *tertio*-butyl nitroso.

† Electronic supplementary information (ESI) available:  $a_N$  and  $a_P$  values for **1**, **2**, **4c**, and **4t** in 45 solvents.  $a_N$  and  $a_P$  of **4c** in various water/mixtures. Coefficients and statistics for plots  $a_N$  vs.  $E_T^N$  for **1**, **2**, **4c**, and **4t**. Coefficients and statistics for plots  $a_P$  vs.  $E_T^N$  for **2**, **4c**, and **4t**. See DOI: 10.1039/c5ob02316e

§ The solvents used were of HPLC or EPR grade and from freshly opened bottles. Vials were filled with 1 ml of a  $10^{-4}$  M stock solution in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The solvent was removed and each vial filled with 1 ml of each of the solvent reported in Table 1SI.† Then, a capillary was filled with 0.3 ml of each solution. The EPR signals were recorded on a Bruker X-band EMX machine. MW: 20 mW; gain: 2 105, amplitude modulation: 1 G, sweep time: 21 s, sweep width: 150 G. For water titration, THF was dried and freshly distilled as recommended<sup>17</sup> and bidistilled water was used. Binary mixtures were prepared by mixing the suitable volumes of water and of THF (Table 2SI†), and then poured in vials containing nitroxide **4c**.

¶ Diastereoisomers were obtained as racemic.

|| The normalized Dimroth-Reichardt constant  $E_T^N$  described the polarizability/polarity and the hydrogen bond donor properties of the solvent, see ref. 7.

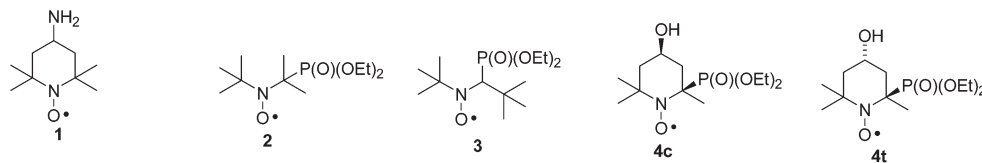


Fig. 1 Nitroxides discussed in this article.

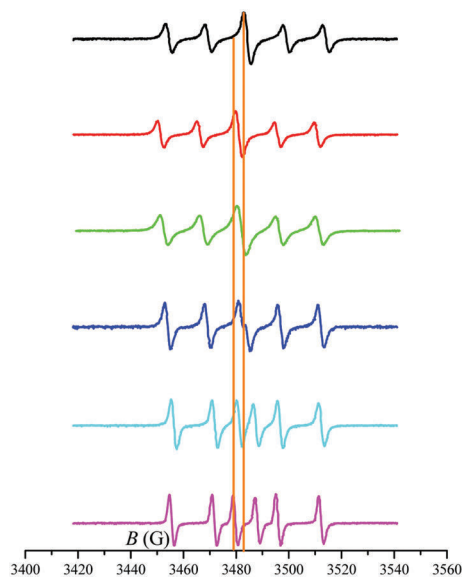


Fig. 2 EPR signals, from pure THF (top) to pure water (bottom) and with different v% of water (from top to bottom, 0, 0.2, 0.6, 1.0, 2.0, and 100). Lines highlight the shift of the signal.

B is favored in polar solvent whereas form A is favored in the presence of electron withdrawing groups (EWG) attached to the nitrogen atom – and on the shape of the Single Occupied Molecular Orbital SOMO – the Fermi contact term which increases with the  $s$  character of the SOMO.

$$a_N = Q \cdot \rho_N \quad (1)$$

The lower values of the  $y$ -intercepts ( $E_T^N = 0$ , Fig. 3)\*\* in series 1, 2, and 4t are due to the increase in polarity of the nitroxides as given by the electrical Hammett constants  $\sigma_I$ , *i.e.*,  $\sigma_{I,1} = -0.03$ ,  $\sigma_{I,2} = 0.27$ ,  $\sigma_{I,4} = 0.32$ .<sup>10</sup> In general, the higher the polarity of the nitroxide, the lower the solvent effect,<sup>11</sup> meaning that the larger slope for 2 than for 1 denotes better accessibility<sup>3</sup> to the nitroxyl moiety in 2 than in 1, whereas the lower slope for 4t is likely due to its polarity (Fig. 3).†† Deviation from the linearity at  $E_T^N = 0.2$  is observed for 4c with an  $a_N$  value smaller by *ca.* 1 G than expected from the  $y$ -intercept (Fig. 3).

This unexpected decrease in  $a_N$  for  $E_T^N < 0.2$  can only be ascribed to a puzzling increase in polarity in 4c compared to

\*\* $y$ -Intercepts are 15.20 ( $\pm 0.03$ ) G, 14.15 ( $\pm 0.08$ ) G, and 13.77 ( $\pm 0.03$ ) G for 1, 2, and 4t, respectively.

†† Slopes are 1.55 ( $\pm 0.08$ ), 2.13 ( $\pm 0.15$ ), and 1.12 ( $\pm 0.07$ ) for 1 ( $R^2 = 0.90$ ,  $N = 44$ ), 2 ( $R^2 = 0.96$ ,  $N = 12$ ), and 4t ( $R^2 = 0.87$ ,  $N = 43$ ), respectively.

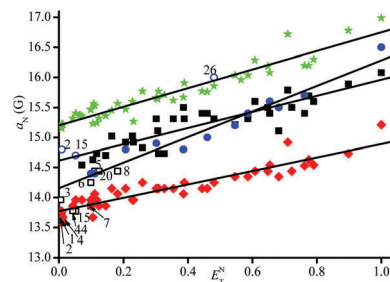


Fig. 3 Plots  $a_N$  vs.  $E_T^N$  for 1 (★), 2 (●), 4c (■), and 4t (◆). Empty symbols are for outliers. Numbers of solvent are given in ESI.†

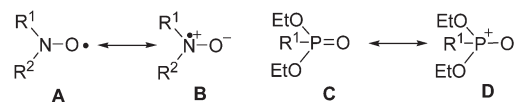


Fig. 4 Canonical forms A and B of the nitroxyl moiety and C and D of the phosphoryl moiety.

4t. In fact, 4c can exhibit two conformers (Fig. 5) 4cA – diethoxyphosphoryl and hydroxyl groups in axial positions – and 4cE – diethoxyphosphoryl and hydroxyl groups in equatorial positions. In 4cA, an IHB is possible through a 7-membered ring between the diethoxyphosphoryl and hydroxyl groups, the latter being favored in non H-bonding disrupting solvents for  $E_T^N < 0.2$ . The occurrence of IHB implies a change in the partial charge distribution in the P=O moiety favoring form D (Fig. 4) which in turn increases the electron withdrawing properties of the P atom, *i.e.*, the diethoxyphosphoryl group becomes a strong EWG, implying smaller  $a_N$  values than expected. This effect cannot be observed with 4t as, whatever the conformations 4tA and 4tE, no IHB is possible (Fig. 5).

The hyperfine coupling constant of the atom at position  $\beta$  is given by the Heller–McConnell relationship (eqn (2))<sup>8,12</sup> with  $B_0$  being the constant for the transfer of the spin density through the spin polarization process (in general disregarded),  $B_1$  being the constant for the transfer of the spin density through the hyperconjugation process,  $\rho_N^\pi$  the spin density on the nitrogen atom, and  $\theta$  the dihedral angle between the SOMO and the C–P bond (Fig. 5).

As a consequence, an increase in  $a_P$  is expected with increasing  $\rho_N^\pi$ , *i.e.*, increasing  $a_N$ , and decreasing angle  $\theta$ .

$$a_{P,\beta} = B_0 + B_1 \cdot \rho_N^\pi \cdot \cos^2 \theta \quad (2)$$

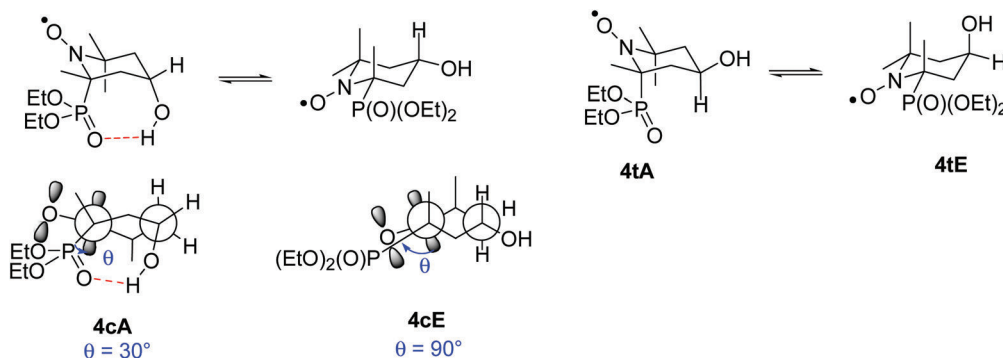


Fig. 5 Conformational chair–chair equilibrium controlled by IHB in **4c** and **4t**. Dotted red line is for IHB.  $\theta$  is the dihedral angle between the SOMO (gray orbitals) and the C–P bond.

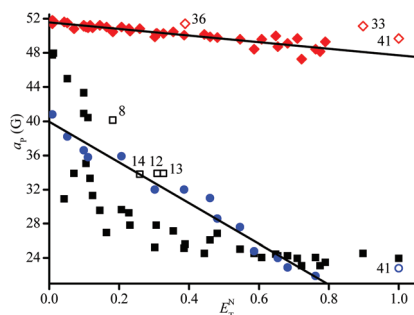


Fig. 6 Plots  $a_p$  vs.  $E_T^N$  for **2** (●), **4c** (■), and **4t** (◆). Empty symbols are for outliers. Numbers of solvent are given in ESI.†

Contra-intuitively,  $a_p$  for **2** and **4t** decrease when the polarity of the solvent  $E_T^N$  increases (Fig. 6),<sup>2</sup> *i.e.*, when  $a_N$  increases. The effect is more marked for **2** than for **4t**, *i.e.*, for **2**  $a_p$  changes from 40.8 G in *n*-hexane to 21.8 G in methanol whereas for **4t** it changes from 51.8 G in *n*-pentane to 47.3 G in NMF. Taking into account eqn (2), this decrease in  $a_p$  with increasing  $a_N$  implies a striking increase in  $\theta$  for **2** and a small increase in  $\theta$  for **4t**. In fact, polar solvents are expected to favor zwitterionic mesomeric forms **B** and **D**. Then, an increase in  $\theta$  means that the phosphoryl and the nitroxyl moieties become increasingly close, favoring a stabilizing dipole–dipole interaction as depicted in the oxaphosphetane-like structure (Fig. 7).<sup>3</sup>

The high  $a_p$  value in *n*-pentane for **4t** implies a small angle  $\theta$ , meaning a strong hyperconjugation interaction between the SOMO and the C–P bond, implying that conformer **4tA** is the favored conformer. The small slope<sup>††</sup> means that bond rotations are strongly impeded in **4t**.

Amazingly, **4c** exhibited the same trend as **2** and **4t** and a striking change in  $\Delta a_p \approx 25$  G was observed from *n*-octane ( $a_p \approx 48$  G) to NMF ( $a_p \approx 23$  G) as for **2**, except that  $a_p$  varies in a

†† For **4t** ( $R^2 = 0.83$ ,  $N = 40$ ), slope =  $-3.87 (\pm 0.27)$  and y-intercept =  $51.57 (\pm 0.11)$ . For **2** ( $R^2 = 0.98$ ,  $N = 15$ ), slope =  $-24.10 (\pm 0.10)$  and y-intercept =  $40.12 (\pm 0.48)$ .

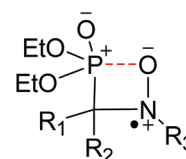


Fig. 7 Oxaphosphetane-like structure.

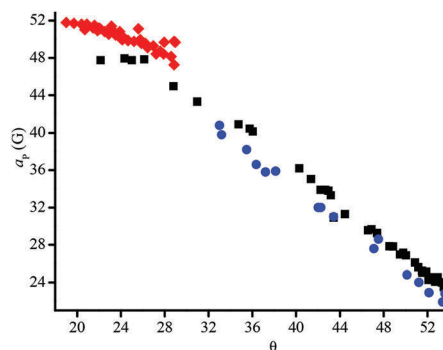


Fig. 8 Plots  $\theta$  vs.  $a_p$  for **2** (●), **4c** (■), and **4t** (◆).

non-linear manner with  $E_T^N$ . The puzzling changes in  $a_N$  (*vide supra*) for **4c** were assumed to be due to a conformational equilibrium between **4cA** and **4cE**, being favored in H-bonding disrupting solvents.

In apolar solvents ( $E_T^N < 0.2$ ), the axial position of the diethoxyphosphoryl group in **4cA** maximized the overlapping between the SOMO and the C–P bond (small angle  $\theta$  in Newman projections, Fig. 5) although 3 *syn*-1,3 interactions which were overbalanced by the IHB and afforded the high  $a_p$  value observed in *n*-hexane. On the other hand, in disrupting H-bonding solvents, conformer **4cE**, exhibiting only one *syn*-1,3 interaction, was favored implying the diethoxyphosphoryl group in equatorial position and, consequently, a large angle  $\theta$  (Newman projections, Fig. 5) affording the small  $a_p$  values observed (Fig. 6). Angle  $\theta$  can be estimated with eqn (2) for

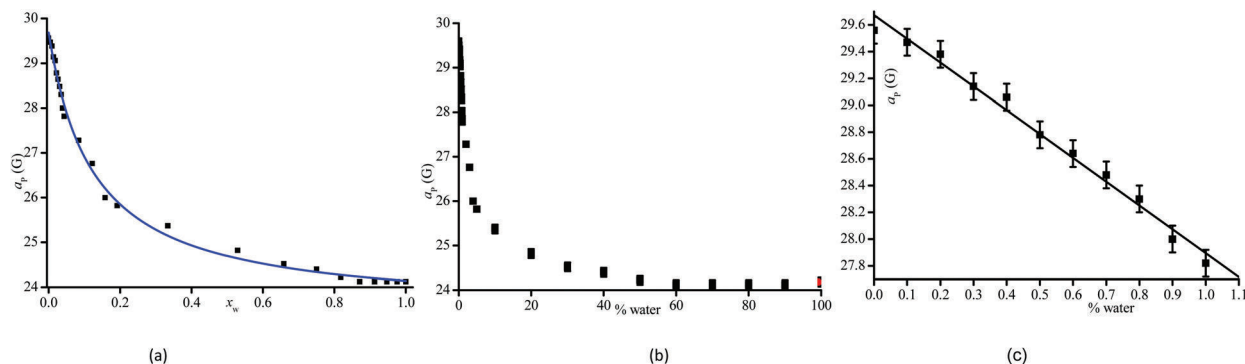


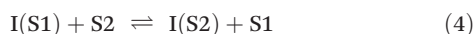
Fig. 9 (a) Plots  $x_w$  (molar fraction of water) vs.  $a_p$  for **4c**, blue curve is given by eqn (5). Plots % volume of water vs.  $a_p$  for **4c** (b) from pure THF to pure water and (c) from pure THF to 1% water.

each solvent, as long as  $B_1 \cdot \rho_N^{\pi}$  values are available. Assuming  $B_1 \cdot \rho_N^{\pi} = 58$  G in *n*-pentane,<sup>13</sup>  $\theta_1$  is given as  $24^\circ$  for **4c**,§§ value very close to the value of angle  $\theta$  observed in the Newman projection supporting conformation **4cA** in apolar solvents.

$$\frac{a_{p,1}}{a_{p,n}} = \frac{a_{N,1}}{a_{N,n}} \cdot \frac{\cos^2 \theta_1}{\cos^2 \theta_n} \quad (3)$$

Using eqn (3) and  $\theta_1$ , it is possible to determine  $\theta_n$  for each solvent for **2**, **4t**, and **4c** (Fig. 8). The small variation in  $\theta$  ( $\Delta\theta = 10^\circ$  from *n*-hexane to water) for **4t** confirms that bond rotations are impeded in **4t** and that conformations deviate only a little from conformer **4tA** (Fig. 5). The variation  $\Delta\theta = 20^\circ$  nicely confirms the change in conformation in **2** toward the occurrence of an azaoxaphosphetane-like structure (Fig. 7) in polar and protic solvents. As expected, the value  $\Delta\theta = 32^\circ$  denotes a dramatic change in the structure of **4c** in nice agreement with the chair–chair equilibrium between conformer **4cA**, favored in apolar solvents, and **4cE**, favored in polar and protic solvents.

Interestingly, a difference  $\Delta a_p$  of ca. 5 G was observed between THF and water. As these two solvents are miscible in any amount, the effect of the binary mixture of solvents on  $a_N$  and  $a_p$  was investigated with the aim to develop the titration of water in solvent by EPR. As displayed in Fig. 2, EPR signals in THF (5 lines) and in water (6 lines) are very different. The EPR signal was recorded between 0 to 1% of water in THF by steps of 0.1%, and 10% to 100% of water by steps of 10% (Fig. 9). The effect of a binary mixture of solvents S1 and S2 on spectroscopic properties of the probe I has been intensively investigated using dyes. This effect is well accounted for by the simplified model (eqn (4)), and the physical property  $Y$  is described as a function of the physical properties  $Y_1$  and  $Y_2$  in solvents S1 and S2, the preferential solvation parameters  $f_{2/1}$ , the initial mole fraction  $x_2^0$  ( $x_2^0 = n_2^0/(n_1^0 + n_2^0)$ ) of the solvent S2, and the parameter  $a$  (eqn (5) and (6)).<sup>14,15</sup>



§§ For **4t**,  $\theta_1 = 19^\circ$  and, for **2**,  $\theta_1 = 33^\circ$ .

$$Y = Y_1 + \frac{a \cdot x_2^0}{(1 - x_2^0) + f_{2/1}(x_2^0)} \quad (5)$$

$$a = f_{2/1}(Y_2 - Y_1) \quad (6)$$

Therefore,  $Y_1$  and  $Y_2$  were defined as  $a_{p,S1}$  and  $a_{p,S2}$  for water as solvent S2 and THF as solvent S1, affording  $a_{p,S1} = 29.7 \pm 0.1$  G,  $a_{p,S2} = 24.1 \pm 0.1$ ,  $f_{2/1} = 9.0 \pm 0.5$ ,  $\chi^2 = 0.017$  and  $R^2 = 0.997$ . The value of  $f_{2/1}$  larger than 1 means that **4c** would rather be solvated either with pure water or with some molecules of water in its cybotatic region than by pure THF.

Lucarini and co-workers<sup>16</sup> performed the titration of benzyl alcohol using 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-*N*-oxyl radical and its ability for intermolecular H-bonding. Thus, the difference of 2.70 G for  $\approx 2\%$  water led us to investigate the potential of **4c** in the titration of water in THF. The plot % volume of water vs.  $a_p$  (Fig. 9b) exhibits the same shape as the plot  $x_w$  (molar fraction of water) vs.  $a_p$ . Obviously, the titration of traces (volume of THF lower than 50%) of THF in water is irrelevant. On the other hand, water in THF can be titrated accurately up to 30%, except that the relation is not linear. However, the enlargement of the zone from pure THF to 1% water (Fig. 6c) shows a linear relationship affording an easy titration down to 0.1% water in THF. Nevertheless, the titration of THF in water might be performed using other type of nitroxides.<sup>5</sup>

## Acknowledgements

Authors thank Aix-Marseille University, CNRS, ANR (ANR-11-JS07-002-01, ANR-09-BLA-0017-01) for their financial support, and RENARD network for the EPR platform. LB thanks ANR for the PhD fellowship.

## Notes and references

- 1 B. Knauer and J. J. Napier, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 4395–4400.

- 2 A. Sh. Mukhtarov, A. V. Il'Yasov, Ya. A. Levin, I. P. Gozman, M. S. Skorobogatova and E. I. Zoroatskaya, *Theor. Exp. Chem.*, 1976, **12**, 656–660.
- 3 G. Audran, P. Brémond, S. R. A. Marque and G. Obame, *ChemPhysChem*, 2012, **13**(15), 3542–3548.
- 4 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher and S. R. A. Marque, *Appl. Magn. Reson.*, 2015, **45**(12), 1333–1342.
- 5 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher, J.-M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Mellet, E. Parzy and E. Thiaudière, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 11393–11400.
- 6 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, J.-M. Franconi, N. Koonjoo, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy and E. Thiaudière, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**(45), 13379–13384.
- 7 C. Reichardt and T. Welton, in *Solvent and Solvent Effect in Organic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 4th edn, 2011.
- 8 F. Gerson and W. Huber, in *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- 9 G. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A. I. Smirnov and R. Tamura, in *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*, Wiley-VCH, 2008.
- 10 To estimate the polarity of nitroxides, see: E. G. Bagryanskaya, S. R. A. Marque and Y. P. Tsentalovich, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**(11), 4996–5005.
- 11 E. G. Janzen, G. A. Coulter, U. M. Oehler and J. P. Bergsma, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 2725–2733.
- 12 D. L. Haire, E. G. Janzen, G. Chen, V. J. Robinson and I. Hrvoic, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, **37**, 251–258.
- 13 P. Stipa, J.-P. Finet, F. Le Moigne and P. Tordo, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4465–4468.
- 14 M. Rosés, C. Ràfols, J. Ortega and E. Bosch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1995, 1607–1615.
- 15 C. Ràfols, M. Rosés and E. Bosch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 243–248.
- 16 P. Franchi, M. Lucarini, P. Pedrilli and G. F. Pedulli, *ChemPhysChem*, 2002, **3**, 789–793.
- 17 W. L. F. Armarego and C. C. L. Chai, in *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, Amsterdam, 5th edn, 2003.





Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 11393

## The $\beta$ -phosphorus hyperfine coupling constant in nitroxide: part 3: titration of water by electron paramagnetic resonance

Gérard Audran,<sup>a</sup> Lionel Bosco,<sup>a</sup> Paul Brémond,<sup>a</sup> Teddy Butscher,<sup>a</sup> Jean-Michel Franconi,<sup>b</sup> Sylvain R. A. Marque,<sup>\*a,c</sup> Philippe Mellet,<sup>b,d</sup> Elodie Parzy,<sup>b</sup> Maurice Santelli<sup>a</sup> and Eric Thiaudiere<sup>b</sup>

Received 7th September 2015,  
Accepted 10th September 2015

DOI: 10.1039/c5ob01867f

www.rsc.org/obc

Recently, we showed that the phosphorus hyperfine coupling constant  $a_{\text{P}\beta}$  of persistent cyclic nitroxides decreased with the normalized polarity Reichardt's constant  $E_{\text{T}}^{\text{N}}$ . Thus, we investigated the changes in  $a_{\text{P}\beta}$  in binary mixtures of solvents. The sensitivity of  $a_{\text{P}\beta}$  to the solvent was high enough to allow us to perform water titration in THF, 1,4-dioxane, and acetonitrile by EPR. Accuracies of a few percent were achieved.

### Introduction

The magnetic properties of nitroxides,<sup>1,2</sup> which are denoted by the nitrogen hyperfine coupling constants  $a_{\text{N}}$ , are the cornerstone of many applications: nitroxides as pH-probes<sup>3</sup> or spin probes in biology,<sup>4</sup> as agents for dynamic nuclear polarization enhanced nuclear magnetic resonance in spectroscopy,<sup>5-7</sup> or as organic magnets in materials science.<sup>8</sup>

Several investigations on the effect of solvents in the cybotactic region are available in the literature.<sup>9-13</sup> They have shown that  $a_{\text{N}}$  increased with increasing the normalized solvent-polarity Reichardt's constant  $E_{\text{T}}^{\text{N}}$ , as exemplified by **1'** (Fig. 1).<sup>14</sup> Some studies showed that the hyperfine coupling constants  $a_{\text{HP}}$ <sup>10</sup> and  $a_{\text{FP}}$ <sup>11</sup> of hydrogen and fluorine at  $\beta$  position are weakly sensitive to the polarity of the solvent as well as to the temperature.<sup>15</sup> Changes in  $a_{\text{P}\beta}$  with the polarity of the solvent ranges from weak variations as for **3'-6c'**, **7'**, and **8'**,<sup>12,16</sup> to moderates ones as for **4t'-6t'**, and strong one as for **2'**.<sup>†</sup>

Thus, the variation in the difference in  $a_{\text{P}\beta}$  and  $\Delta a_{\text{P}\beta}$  between organic solvents (*vide infra*) and water for **5c',t'**, and **8'** was investigated for several binary mixtures. The obser-

vations reported were compared with the models developed for dyes. Moreover, the difference  $\Delta a_{\text{P}\beta}$  was large enough to allow the titration of water by continuous wave Electron Paramagnetic Resonance (cw-EPR) in THF, 1,4-dioxane, and acetonitrile to be performed.

### Results

Among the nitroxides displayed in Fig. 1, only **5c',t'** and **8'** were investigated for the titration of water in THF, 1,4-dioxane, and acetonitrile. As expected, they exhibited the 6-line EPR signal due to the coupling between the nuclear spins of the nitrogen atom ( $I_{\text{N}} = 1$ ) and the phosphorus atom ( $I_{\text{P}} = \frac{1}{2}$ ) and the odd electron on the nitroxyl moiety. The nitrogen and  $\beta$ -phosphorus hyperfine coupling constants (hccs)  $a_{\text{N}}$  and  $a_{\beta,\text{P}}$  are shown in Table 1.

#### Effect of binary mixtures of solvents

Ros s *et al.*<sup>17,18</sup> developed a general model to take into account the effect of a binary mixture of solvents (S1 and S2) on an indicator I (Scheme 1), affording the observed physical variable  $Y$  through eqn (1), where  $Y_1$  and  $Y_2$  are the physical variables for solvents S1 and S2, respectively,  $Y_{12}$  is the physical variable for the binary mixture,  $f_{2/1}$  and  $f_{12/1}$  are the preferential solvation parameters,  $x_2$  is the molar fraction of the solvent S2, and parameters  $a$  and  $c$  are given by eqn (2) and (3), respectively.

$$Y = Y_1 + \frac{a(x_2^0)^m + c\sqrt{[(1-x_2^0)x_2^0]^m}}{(1-x_2^0)^m + f_{2/1}(x_2^0)^m + f_{12/1}\sqrt{[(1-x_2^0)x_2^0]^m}} \quad (1)$$

$$a = f_{2/1}(Y_2 - Y_1) \quad (2)$$

<sup>a</sup>Aix-Marseille Université, CNRS-UMR 7273, ICR, case 541, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France.

E-mail: sylvain.marque@univ-amu.fr

<sup>b</sup>CRMSB, CNRS-UMR-5536, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue L o Saignat, Case 93, 33076 Bordeaux Cedex, France

<sup>c</sup>N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Pr. Lavrentjeva 9, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>d</sup>INSERM, 146 rue L o Saignat, Case 93, 33076 Bordeaux Cedex, France

<sup>†</sup>Despite a striking solvent effect ( $\Delta a_{\text{P}\beta} = 18$  G, see ref. 13), nitroxide **2'** was disregarded because it is weakly stable at room temperature.



(4), the  $Y_{12}$ ,  $f_{12/1}$  and  $f_{12/2}$  parameters being given by eqn (6), (5), and (8), respectively.

Therefore,  $Y_1$ ,  $Y_2$ , and  $Y_{12}$  were defined as  $a_{\beta,P,S1}$ ,  $a_{\beta,P,S2}$ , and  $a_{\beta,P,S12}$  for water as solvent S1, acetonitrile, THF, or 1,4-dioxane as solvent S2, and for the S1/S2 binary mixture with water, respectively. All  $a_{\beta,P}$  measured for the binary mixtures – water/THF, water/1,4-dioxane, and water/acetonitrile – for **5'** and **8'** were fitted (Fig. 2) using eqn (7) and all parameters were given by eqn (5)–(8). They are shown in Table 2.

As quoted by Reichardt:<sup>14</sup> “The *iso-solvation point*  $x_{\text{iso}}$  is defined as the point describing the bulk solvent composition at which both solvents S1 and S2 participate equally in the solvation shell of the cation or anion. It has been developed<sup>21–23</sup> for NMR chemical shift  $\delta$  and is given as the solvent composition at which the NMR chemical shifts lie midway between the values for the two pure solvents”. Taking into account that EPR relies on the similar physics to NMR,<sup>24,25</sup>  $x_{\text{iso}}$  (Table 2) should hold for  $a_{\beta,P}$  values and is graphically read (Fig. 2) as the value corresponding to the  $a_{\beta,P,x_{\text{iso}}}$  value given by eqn (9).

Data in Fig. 2 were tentatively fitted using eqn (1) or (4), which afforded good fits exhibiting as good statistical outputs as those obtained with eqn (7). However, errors on  $f_{2/1}$ ,  $f_{12/1}$

and  $a_{\beta,P,S12}$  given both by eqn (1) and (4) were as large as the estimated values!

Connors *et al.*<sup>19</sup> ranked the binary solvent mixtures in two families: one-step models and two step models. However, Rosés *et al.*<sup>17</sup> showed that this ranking makes no sense because the one-step model is only a peculiar case of the two-step model. Hence, the water/1,4-dioxane, water/THF and water/acetonitrile mixtures belong to the two-step model family, as reported by Connors *et al.*<sup>19</sup> for the [2,6-diphenyl-4-(2,4,6-triphenyl-1-pyridinio)phenolate] dye and their corresponding data is described by eqn (4), whereas they are nicely described by eqn (7) corresponding to the one-step model (Table 2 and Fig. 2). On the other hand, Rosés *et al.*<sup>17</sup> ranked the solvents into 3 main groups: the first group with dipolar strong hydrogen bond acceptors and poor hydrogen bond donors ( $\alpha \leq 0.2$  and  $\beta \geq 0.4$ ), *e.g.*, DMSO, acetone, and acetonitrile; the second group with strong hydrogen bond donors ( $\alpha \geq 0.2$ ), *e.g.*, water,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and  $\text{CHCl}_3$ ; and the third group with poor hydrogen bond acceptors and poor hydrogen bond donors ( $\alpha \leq 0.1$  and  $\beta \leq 0.1$ ), *e.g.*, cyclohexane, and benzene. Binary mixtures of solvents from groups 1 and 2 are prone to exhibit a synergetic effect, *i.e.*, S1 and S2 mixed together exhibit enhanced physical properties compared to pure S1 and

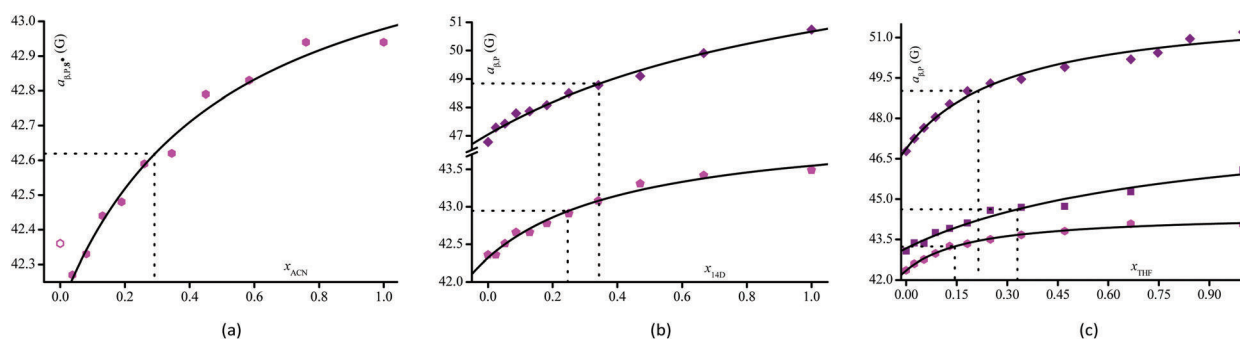


Fig. 2 Plots of  $a_{\beta,P}$  vs.  $x$  in (a) acetonitrile, (b) 1,4-dioxane, and (c) THF for **5c'** (■), **5t'** (◆), and **8'** (●). Empty symbol is for outlier. Full lines are given by eqn (7). Dotted lines are for determining  $x_{\text{iso}}$ .

Table 2 Parameters of water (S1)/S2 binary mixtures

Entry	Nitroxide	Solvent S2 <sup>a</sup>	$a_{\beta,P,\text{water}}^{b,c}$ (G)	$a_{\beta,P,\text{sol.}}^{b,c}$ (G)	$a_{\beta,P,S12}^d$ (G)	$f_{2/1}^{b,c}$	$f_{12/1}^e$	$f_{12/2}^f$	$R^{2g}$	$\chi^2^h$	$N^i$	$x_{\text{iso}}^j$
1	<b>5c'</b>	THF	43.17 (11) 43.07 <sup>k</sup>	45.92 (15) 46.09 <sup>k</sup>	45.07	2.25 (46)	3.25	1.44	0.97	0.028	11	0.33
2	<b>5t'</b>	THF	46.88 (14) 46.78 <sup>k</sup>	50.91 (11) 51.24 <sup>k</sup>	50.13	4.17 (63)	5.17	1.23	0.98	0.037	13	0.21
3	<b>5t'</b>	14D	47.05 (9) 46.78 <sup>k</sup>	50.68 (13) 50.74 <sup>k</sup>	49.40	1.83 (26)	2.83	1.55	0.98	0.022	11	0.34
4	<b>8'</b>	14D	42.32 (4) 42.30 <sup>k</sup>	43.55 (5) 43.70 <sup>k</sup>	43.25	3.12 (49)	4.12	1.32	0.98	0.003	11	0.24
5	<b>8'</b>	THF	42.36 (4) 42.30 <sup>k</sup>	44.11 (4) 44.10 <sup>k</sup>	43.86	6.00 (62)	7.00	1.17	0.99	0.003	11	0.14
6	<b>8'</b>	ACN	42.17 (4) 42.30 <sup>k</sup>	42.98 (3) 42.90 <sup>k</sup>	42.77	3.00 (56)	4.00	1.33	0.98	0.001	10	0.29

<sup>a</sup> Co-solvent S2. <sup>b</sup> Error given in parentheses on the last digit. <sup>c</sup> Given by eqn (7). <sup>d</sup> Given by eqn (6). <sup>e</sup> Given by eqn (5). <sup>f</sup> Given by eqn (8). <sup>g</sup> Square of the regression coefficient. <sup>h</sup> Value for the chi-square test. <sup>i</sup> Number of data. <sup>j</sup> Molar fraction at the isosolvation point (see text). <sup>k</sup> Experimental hccs in a pure solvent.

**Table 3** EPR features of the selected nitroxides for the titration of water<sup>a</sup>

Solvent	5c <sup>•</sup>				5t <sup>•</sup>				8 <sup>•</sup>			
	<i>a</i> <sub>N</sub>	<i>a</i> <sub>β,P</sub>	Δ <i>a</i> <sub>N</sub>	Δ <i>a</i> <sub>β,P</sub>	<i>a</i> <sub>N</sub>	<i>a</i> <sub>β,P</sub>	Δ <i>a</i> <sub>N</sub>	Δ <i>a</i> <sub>β,P</sub>	<i>a</i> <sub>N</sub>	<i>a</i> <sub>β,P</sub>	Δ <i>a</i> <sub>N</sub>	Δ <i>a</i> <sub>β,P</sub>
1,4-Dioxane	13.74	45.25	1.22	2.18	13.43	50.74	1.17	3.96	13.66	43.75	1.04	1.39
THF	13.54	46.09	1.42	3.02	13.24	51.24	1.36	4.46	13.66	44.10	1.04	1.74
Acetonitrile	13.61	43.65	1.35	0.58	13.86	48.33	0.74	1.57	13.77	42.94	0.93	0.58
Water	14.96	43.07	0	0	14.60	46.78	0	0	14.70	42.36	0	0

<sup>a</sup> *a*<sub>N</sub>, *a*<sub>β,P</sub>, Δ*a*<sub>N</sub> and Δ*a*<sub>β,P</sub> given in G.

pure S2. In such cases, the data are better fitted with eqn (1) and in ideal cases, they are fitted as a two-step model (*m* = 2), by eqn (4). Thus, the water/THF (*α* = 0 and *β* = 0.55) and water/acetonitrile mixtures were expected to exhibit an effect described by a parabolic (synergetic) curve or an S-shaped curve (2-step model), whereas good fits were obtained with eqn (7), *i.e.*, one-step model. To the naked eye, the curve for the water/THF mixture with 5<sup>•</sup> as the indicator (Fig. 2c) might be an S-shaped curve although this cannot be ascertained by fitting with the suitable equations (*vide supra*).

$$f_{12/1} = 1 + f_{2/1} \quad (5)$$

$$Y_{12} = \frac{Y_1 + f_{2/1}Y_2}{1 + f_{2/1}} \quad (6)$$

$$Y = Y_1 + \frac{ax_2^0}{(1 - x_2^0) + f_{2/1}(x_2^0)^2} \quad (7)$$

$$f_{12/2} = f_{12/1}/f_{2/1} \quad (8)$$

$$a_{\beta,P,x_{iso}} = a_{\beta,P,water} + \frac{(a_{\beta,P,S2} - a_{\beta,P,water})}{2} \quad (9)$$

### Water titration in THF, 1,4-dioxane, and acetonitrile

The titration of water using the betaine dye is well known. It requires a large difference in the wavelength between the two pure solvents and a high sensitivity of the probe.<sup>26–28</sup> As far as we know, this approach has not been developed using cw-EPR because the largest variation in *a*<sub>N</sub> Δ*a*<sub>N</sub> = 1.8 G observed between *n*-hexane and water is too small for any applications.<sup>‡29</sup> Indeed, the accuracy of EPR is around 0.05 G, *i.e.*, *ca.* 0.3% of *a*<sub>N</sub> or *ca.* 0.1% of *a*<sub>β,P</sub> to the phosphorylated nitroxides. However, a precision of 0.1 G is more likely implying accuracies of 0.5%, 1%, 2%, and 10% for Δ*a* varying from 20 G, 10 G, 5 G, to 1 G. Besides a large Δ*a*<sub>N</sub> and a high accuracy on *a*<sub>N</sub> (or any other physical constants), the probe must be soluble in the two solvents investigated and in the corresponding mixtures, and the solvents must be completely miscible in order to develop a reliable model. All nitroxides do not fulfil all these requirements, since Δ*a*<sub>N</sub> is often around 1–1.5 G. However, 2<sup>•</sup> seems to be a very good candidate, with

‡Lucarini and colleagues published similar titration using traces of benzylic alcohol in apolar solvent. See ref. 29.

Δ*a*<sub>β,P</sub> = 20 G between *n*-hexane and water, and Δ*a*<sub>β,P</sub> = 13 G between THF and water, *i.e.*, accuracy lower than 1%.<sup>13,16</sup>

Unfortunately, 2<sup>•</sup> is not stable enough to allow such a type of experiment to be developed. On the other hand, nitroxides 5c<sup>•</sup>, t<sup>•</sup> and 8<sup>•</sup> prepared for this article are stable at room temperature and exhibit EPR features suitable enough to perform model experiments. 5t<sup>•</sup> was selected as a model because it exhibits the largest Δ*a*<sub>β,P</sub> for 1,4-dioxane and THF, 5c<sup>•</sup> was also tested to investigate the influence of the nitroxide configuration on the solvent effect of binary mixtures, and 8<sup>•</sup> was also selected as it exhibits the largest Δ*a*<sub>β,P</sub> for stable non-cyclic nitroxides (Table 3).

For each case, a nice linear dependence (eqn (10) and Fig. 4) is observed between *a*<sub>β,P</sub> for 5c<sup>•</sup>, t<sup>•</sup> and 8<sup>•</sup> with the percent of water (%w) in 1,4-dioxane, THF, and acetonitrile (Table 4).

$$a_{\beta,P} = y_0 + \alpha_9 \cdot \%w \quad (10)$$

## Discussion

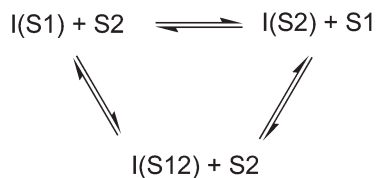
### Binary solvent mixture effect

This dependence of *a*<sub>β,P</sub> on both the solvent and the nitroxide structure led us to investigate the effect of binary mixtures of solvents, especially water/organic solvent, with the aim of developing the titration of water in an organic solvent (*vide infra*). The results are discussed in the light of the model developed by Rosés *et al.*<sup>17,18,20</sup> (Scheme 1 and eqn (1)–(8)). As mentioned in the results section, the results shown in Table 1 are nicely described by a simple three-parameter model (eqn (7)

**Table 4** Linear correlation *a*<sub>β,P</sub> = *f*(%w) for 5c<sup>•</sup>, t<sup>•</sup> and 8<sup>•</sup> in 1,4-dioxane (14D), acetonitrile (ACN), and THF

Eq	Solvent	Nitroxide	<i>y</i> -Intercept <sup>a</sup>	Slope <sup>a</sup> (10 <sup>-2</sup> )	<i>R</i> <sup>2</sup> <sup>b</sup>	<i>N</i> <sup>c</sup>
(10)a	THF	5c <sup>•</sup>	45.60 (13)	-2.7 (2)	0.95	11
(10)b	THF	5t <sup>•</sup>	50.88 (8)	-4.1 (2)	0.98	13
(10)c	14D	5t <sup>•</sup>	50.11 (18)	-3.4 (3)	0.94	11
(10)d	THF	8 <sup>•</sup>	44.18 (7)	-1.7 (1)	0.98	11
(10)e	ACN	8 <sup>•</sup>	42.96 (7)	-0.7 (1)	0.95	11
(10)f	14D	8 <sup>•</sup>	43.47 (4)	-1.2 (1)	0.97	11

<sup>a</sup> Error given on the last digit. <sup>b</sup> Square of the regression coefficient. <sup>c</sup> Number of data.



Scheme 4 General scheme describing the three-parameter model.

and Scheme 2) rather than the complete seven-parameter model (Scheme 1 and eqn (1)). Then, the  $a_{\beta,P}$  reported in Table 2 can be discussed either as values due to the mixture of two species I(S1) and I(S2) (two species as in Scheme 1, with I for the nitroxide) or as values due to the mixture of three species I(S1), I(S2) and I(S12) (Scheme 4, with I for the nitroxide).

Taking into account that  $a_{\beta,PS12}$  are smaller than  $a_{\beta,P,sol.}$ , *i.e.*, no synergetic effect, and very close to each other (less than 1.2 G of difference), only the one-step model (Scheme 2) will be discussed. The exchange of water molecules in the solvent cage ( $f_{2/1}$ ) is clearly dependent on the solvent, as highlighted by  $8^*$  (Table 2), that is, THF is more efficient at displacing water molecules from the solvation cage than 1,4-dioxane and acetonitrile. The same trend holds for  $5t^*$ . The exchange of water molecules in the solvation cage by THF also clearly depends on the type of nitroxide, that is, the exchange is easier along series  $5c^*$ ,  $5t^*$  and  $8^*$ . Intuitively,  $8^*$  is the most congested/shielded nitroxide, implying that the solvation cage should be the least efficient, *i.e.*, the first layer of the solvent is expected to be far from the nitroxyl moiety. Consequently, the solvent effect should be the weakest, and hence, water molecules are expected to be readily displaced. However,  $f_{1/2}$  values cannot be correlated, even roughly, to one single parameter used for the KAT and KP relationships, neither for  $8^*$  nor for THF. Interestingly,  $f_{2/1}$  and  $x_{iso}$  are correlated, that is, the higher  $f_{2/1}$ , the easier the solvent exchange in the cybotactic region is, the lower  $x_{iso}$  is, the more readily the effect of the water solvation is balanced. However, neither  $x_{iso}$  nor  $f_{2/1}$  can be used to predict the efficiency of the nitroxide for the titration of water (*vide infra*).

### Titration of water in organic solvents

Table 3 displays EPR features suitable for water titration tested for  $5c^*$ ,  $5t^*$ , and  $8^*$  in THF, 1,4-dioxane, and acetonitrile. As shown in Fig. 3, the EPR signal for  $5t^*$  depends significantly on the THF/water mixture, highlighting nicely the potential of this family of nitroxides for the titration of water in an organic solvent and conversely. Nice linear plots  $a_{\beta,P}$  vs. % water (Fig. 4) were obtained with all nitroxides and solvents. In THF, the efficiency, given by the absolute value of the slope  $\alpha_9$  in eqn (10) (Table 4), increased in the series  $8^*$ ,  $5c^*$ , and  $5t^*$ . Thus, the best results for titration were obtained for  $5t^*$ , although

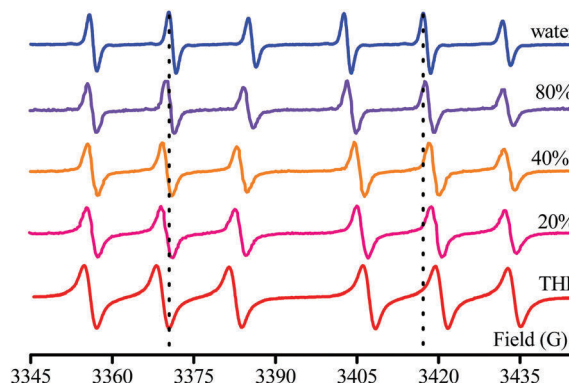


Fig. 3 EPR signal for  $5t^*$  in a THF/water mixture (%) from 0 : 100 (top) to 100 : 0 (bottom). Vertical dotted lines are for visualizing the changes in  $a_{\beta,P}$ .

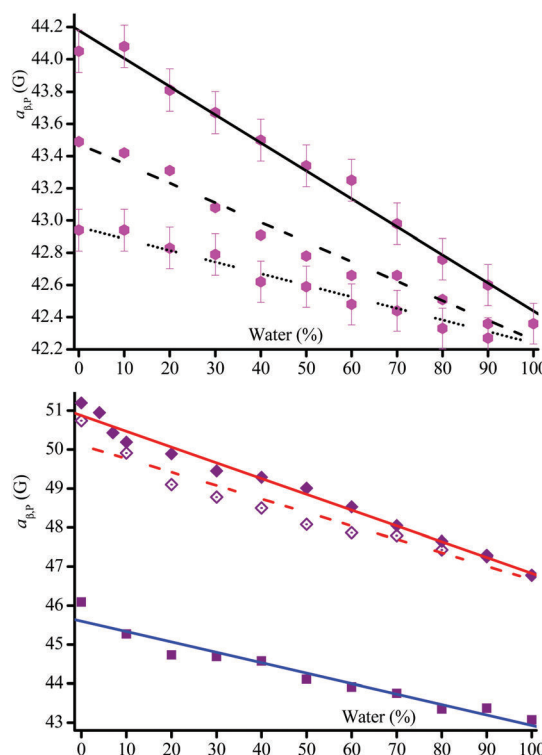


Fig. 4 Plots of  $a_{\beta,P}$  vs. percent of water (%) in acetonitrile (---), 1,4-dioxane (---), and THF (—) with  $8^*$  as a probe (top), and with  $5t^*$  ( $\blacklozenge$ ), and  $5c^*$  ( $\blacksquare$ ) as probes (bottom).

this is still far from the performance reached using the Karl Fischer test.

## Conclusions

As nitroxides  $5^*$  and  $8^*$  are stable at room temperature, it was possible to carefully investigate the solvent effect of binary

§ The set of data was too small to test multiparameter relationships.

solvent mixtures with water as one of the two solvents. As far as we know, this investigation led to the development of the first titration of water in a solvent using the cw-EPR technique. We showed that it was possible to reach an accuracy of a few percent in the titration of water.<sup>¶</sup> Probes belonging to this family of nitroxides have recently been developed by our group,<sup>30</sup> and such a sensitivity of  $a_{\beta,P}$  to water might be applied to probe the local environment of nitroxides attached on proteins. Moreover, it might be envisioned as a possible alternative of the approach based on pulsed-EPR and developed by Dzuba and colleagues.<sup>31,32</sup>

## Experimental section

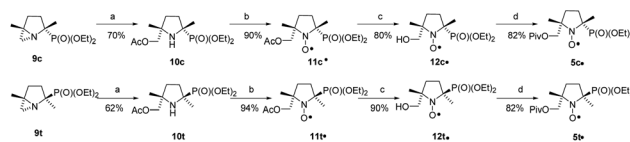
All solvents were purchased from Aldrich and were dried according to the conventional procedures.<sup>33</sup> Nitroxides **5c,t'** were prepared according to Scheme 5. Aziridines **9c** and **9t** were prepared according to the literature.<sup>30</sup> Nitroxide **8'** was prepared by the esterification of **9'**<sup>34</sup> (Scheme 6). <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using an internal deuterium lock at ambient temperatures on the following instruments: Bruker AC400 (400 MHz) and Bruker AC300 (300 MHz). Data are presented as follows: chemical shift (in ppm), integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br means the signal is broad, dd = doublet of doublets), coupling constant (*J* in Hz) and integration. <sup>31</sup>P NMR spectra were recorded on Bruker AC300 (122 MHz) and on Bruker AC400 (162 MHz) spectrometers with complete proton decoupling. Chemical shifts ( $\delta$ ) were reported in ppm using residual non-deuterated solvents as the internal reference.<sup>35</sup>

High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a SYNAPT G2 HDMS (Waters) spectrometer equipped with a pneumatically assisted atmospheric pressure ionization (API) source. Samples were ionized by the positive electrospray mode as follows: electrospray tension (ISV): 2800 V; opening tension (OR): 20 V; nebulization gas pressure (nitrogen): 800 L h<sup>-1</sup>. Low resolution mass spectra were recorded on an ion trap AB SCIEX 3200 QTRAP equipped with an electrospray source. The parent ion ( $M^+$ ,  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$  or  $[M + NH_4]^+$ ) is quoted.

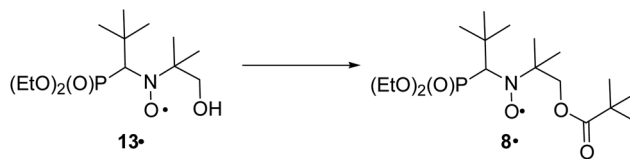
Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out on Merck Kieselgel 60 F254 plates. Flash column chromatography was carried out on a Merck Kieselgel 60 (230–400 mesh). Solvent system: gradients of DCM/MeOH; EtOAc/EtOH.

All experiments were performed under anhydrous conditions and an inert atmosphere of argon and, except where stated, using dried apparatus and employing standard techniques for handling air-sensitive materials. All reagents were weighed and handled in air at room temperature.

<sup>¶</sup>We are aware that an accuracy of a few percent cannot match the hundredth of a percent reached with a Karl Fischer test or using dyes.



**Scheme 5** Synthesis of nitroxides **5c,t'**. Reagents and conditions: (a) AcOH, 24 h, r.t.; (b) *m*-CPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2–4 h, r.t.; (c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 24 h, r.t.; (d) PivCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24 h, r.t.



**Scheme 6** Synthesis of nitroxide **8'**. Reagents and conditions: PivCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 h, r.t., 87%.

### Preparation of **10t**

A solution of aziridine **9t** (500 mg, 2.02 mmol) was dissolved in 2 mL of acetic acid. The mixture was stirred overnight at room temperature under argon. Then, the mixture was dissolved in DCM and poured on a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. After several extractions with DCM, the organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH gradient). The acetate **10t** was obtained as a colorless oil (385 mg, yield 62%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.25–4.10 (m, 4H), 3.96 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.85 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.45–2.28 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.93–1.55 (m, 4H), 1.40–1.28 (m, 9H), 1.20 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  170.9 (C), 71.0 (d, *J* = 2.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 62.7 (d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 62.0 (d, *J* = 8.1 Hz, C), 61.9 (d, *J* = 8.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 60.3 (d, *J* = 164 Hz, C), 34.4 (d, *J* = 5.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 34.1 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>3</sub>), 25.3 (d, *J* = 8.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>), 16.5 (d, *J* = 5.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.4 (d, *J* = 5.9 Hz, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  30.8. HRMS (ESI) calc. for C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 308.1621 [M + H]<sup>+</sup>; found: 308.1622.

### Preparation of **11t'**

A solution of amine **10t** (366 mg, 1.20 mmol) and *m*-CPBA (1.5 eq.) in DCM was stirred 1 hour at 0 °C. Then, the reaction mixture was washed with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and NaHCO<sub>3</sub>. After extraction with DCM, the organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (AcOEt/EtOH gradient). Nitroxide **11t'** was obtained as an orange oil (360 mg, yield 94%). HRMS (ESI) calc. for C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 323.1492 [M + H]<sup>+</sup>; found: 323.1494.

### Preparation of **12t'**

A solution of acetate **11t'** (200 mg, 0.621 mmol) in MeOH (5 mL) at 0 °C was treated with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (129 mg, 0.931 mmol)

and stirred for 1 hour. The mixture was dissolved in DCM and poured on a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (AcOEt/EtOH gradient) and recrystallization from Et<sub>2</sub>O yielded the pure compound **12t'** as a red crystal. Yield 82% Mp = 63 °C. HRMS (ESI) calc. for C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 281.1387 [M + H]<sup>+</sup>; found: 281.1384. C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>+</sup> (280.3): calcd C 47.14, H 8.27, N 5.00; found C 47.05, H 8.41, N 5.07.

### Preparation of 5t'

To a solution of alcohol **12t'** (200 mg, 0.714 mmol) in DCM (3 mL) at room temperature under argon was added Et<sub>3</sub>N (288 mg, 2.85 mmol), a catalytic amount of DMAP and pivaloyl chloride (172 mg, 1.43 mmol). The mixture was stirred for 1 day. Then, the mixture was poured on a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and extracted with DCM. The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt/EtOH gradient) to afford product **5t'**, 203 mg, yield 78%. HRMS (ESI) calc. for C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 365.1962 [M + H]<sup>+</sup>; found: 365.1962.

Molecules **10c**, **11c'**, **12c'**, and **5c'** were prepared according to the procedure described for **10t**, **11t'**, **12t'**, and **5t'**, respectively.

### Preparation of 10c

According to the procedure for the preparation of **10t**, aziridine **9c** (500 mg, 2.02 mmol) afforded acetate **10c** (433 mg, yield 70%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.3–4.05 (m, 4H), 3.98 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 2.40–2.25 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.98–1.87 (m, 1H), 1.85–1.55 (m, 3H), 1.42 (d, *J* = 15.6 Hz, 3H), 1.35–1.27 (m, 6H), 1.25 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.7 (C), 70.7 (CH<sub>2</sub>), 62.8 (d, *J* = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>), 61.8 (d, *J* = 8.1 Hz, CH<sub>2</sub>), 61.7 (d, *J* = 9.5 Hz, C), 60.4 (d, *J* = 172 Hz, C), 34.1 (d, *J* = 5.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 33.6 (d, *J* = 1.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>3</sub>), 25.3 (d, *J* = 8.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 20.71 (CH<sub>3</sub>), 16.4 (d, *J* = 5.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 16.3 (d, *J* = 5.9 Hz, CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 29.9. HRMS (ESI) calc. for C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 308.1621 [M + H]<sup>+</sup>; found: 308.1622.

### Preparation of 11c'

Oxidation of amine **10c** (200 mg, 0.65 mmol) afforded nitroxide **11c'** (189 mg of red oil, yield 90%). HRMS (ESI) calc. for C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 323.1492 [M + H]<sup>+</sup>; found: 323.1494.

### Preparation of 12c'

Saponification of **11c'** and purification by flash chromatography (AcOEt/EtOH gradient) afforded the pure product **12c'** as a red oil (157 mg, 90%). HRMS (ESI) calc. for C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>P<sup>+</sup>: 281.1387 [M + H]<sup>+</sup>; found: 281.1384.

### Preparation of 5c'

Esterification of **12c'** (200 mg, 0.714 mmol) afforded **5c'** as red oil (213 mg, yield 82%). HRMS (ESI) calc. for C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 365.1962 [M + H]<sup>+</sup>; found: 365.1962.

### Preparation of 8'

To a solution of alcohol **13**<sup>34</sup> (300 mg, 0.97 mmol) in dichloromethane (10 mL) at room temperature under argon was added Et<sub>3</sub>N (293 mg, 2.90 mmol), a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine and pivaloyl chloride (351 mg, 2.91 mmol). The mixture was stirred for 20 hours. Then, the mixture was poured on a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/MeOH gradient 1%) to afford product **8'** as red oil, 333 mg, yield 87%. HRMS (ESI) calc. for C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub>P<sup>+</sup>: 395.2431 [M + H]<sup>+</sup>; found: 395.2432.

### Titration experiments

Samples were prepared at 0.5 mM nitroxide concentration in non-degassed solvents. The titration of water in THF, 1,4-dioxane, and acetonitrile as solvents was performed using the EPR parameters: gain of 2 × 10<sup>5</sup> (72 dB for Eleksys), modulation amplitude of 1.0 G, sweep width of 150 G, sweep time of 21 s, and a power of 20 mW. Nitroxides were dissolved in dichloromethane, which was then evaporated. The vials were filled with 1 ml of the binary mixture of solvents under investigation. Samples were measured randomly and some test solutions were prepared.\*\*

## Acknowledgements

The authors thank Aix-Marseille University, University of Bordeaux 2, and CNRS for the financial support. ANR is acknowledged for funding this project (grants SonRadIs ANR-11-JS07-002-01 and NITROMRI ANR-09-BLA-0017-01). LB is thankful to ANR for the Ph.D. fellowship (grant SonRadIs). SRAM thanks the Russian Science Foundation (grant 15-13-20020) for supporting the correlation analysis of this work.

## Notes and references

- 1 G. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A. I. Smirnov and R. Tamura, *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*, Wiley-VCH, 2008, and references therein.
- 2 *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, ed. R. Hicks, Wiley, Hoboken, 2010, pp. 173–229, and references therein.
- 3 I. A. Kirilyuk, A. A. Bobko, V. V. Khramtsov and I. A. Grigor'ev, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 1269–1274.
- 4 V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo, A. Longhi and A. Fournel, *Assessing Structures and Conformations of Intrinsically*

|| One milliliter is the sum of the volumes of the solvents used to prepare the binary mixture.

\*\* These solutions were prepared by one of the co-authors and tested by another.

- Disordered Proteins*, ed. V. N. Uversky, Wiley, Hoboken, 2009, and references cited therein.
- 5 P. Mellet, P. Massot, G. Madelin, S. R. A. Marque, E. Harte, J.-M. Franconi and E. Thiaudière, *PLoS One*, 2009, **4**, e5244.
- 6 P. Massot, E. Parzy, L. Pourtau, P. Mellet, S. Marque, J.-M. Franconi and E. Thiaudière, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2012, **7**, 45–50.
- 7 H. Karoui, F. Le Moigne, O. Ouari and P. Tordo, *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, ed. R. Hicks, John Wiley & Sons, 2010, pp. 173–229.
- 8 V. Ovcharenko, *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, ed. R. Hicks, John Wiley & Sons, 2010, pp. 461–506.
- 9 B. Knauer and J. J. Napier, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 4395–4400.
- 10 E. G. Janzen, G. A. Coulter, U. M. Oehler and J. P. Bergsma, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 2725–2733.
- 11 C.-H. Deng, C.-J. Guan, M.-H. Shen and C.-X. Zhao, *J. Fluorine Chem.*, 2002, **116**, 109–115.
- 12 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher and R. R. A. Marque, *Appl. Magnet. Reson.*, 2015, DOI: 10.1007/s00723-015-0649-4.
- 13 A. Sh. Mukhtarov, A. V. Il'Yasov, Ya. A. Levin, I. P. Gozman, M. S. Skorobogatova and E. I. Zoroatskaya, *Theor. Exp. Chem.*, 1976, **12**, 656–660; A. Sh. Mukhtarov, A. V. Il'Yasov, Ya. A. Levin, I. P. Gozman, M. S. Skorobogatova and E. I. Zoroatskaya, *Teor. Eksp. Khim.*, 1976, **12**, 831–836.
- 14 C. Reichardt and T. Welton, *Solvent and Solvent Effect in Organic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 4th edn, 2011.
- 15 M. F. Ottaviani, G. Martini and L. Nuti, *Magn. Reson. Chem.*, 1987, **25**, 897–904.
- 16 G. Audran, P. Brémond, S. R. A. Marque and G. Obame, *ChemPhysChem*, 2012, **13**(15), 3542–3548.
- 17 M. Rosés, C. Ràfols, J. Ortega and E. Bosch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1995, 1607–1615.
- 18 C. Ràfols, M. Rosés and E. Bosch, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 243–248.
- 19 R. D. Skwierczynski and K. A. Connors, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1994, 467–472.
- 20 J. Ortega, C. Ràfols, E. Bosch and M. Rosés, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 1497–1503.
- 21 L. S. Frankel, T. R. Stengle and C. H. Langford, *Chem. Commun.*, 1965, 393.
- 22 L. S. Frankel, T. R. Stengle and C. H. Langford, *Can. J. Chem.*, 1968, **46**, 3183.
- 23 L. S. Frankel, T. R. Stengle and C. H. Langford, *J. Phys. Chem.*, 1970, **74**, 1376.
- 24 C. P. Poole, *Electron Spin Resonance*, Wiley, New York, 2nd edn, 1983.
- 25 J. E. Wertz and J. R. Bolton, *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, Chapman & Hall & Methuen Inc., New York, 1986.
- 26 S. Kumoi, K. Oyama, T. Yano, H. Kobayashi and K. Uneno, *Talanta*, 1970, **17**, 319–327.
- 27 T. Deng and W. E. Acree Jr., *J. Chem. Educ.*, 1999, **76**, 1555.
- 28 M. F. Vitha, *J. Chem. Educ.*, 2001, **78**, 370–372.
- 29 P. Franchi, M. Lucarini, P. Pedrilli and G. F. Pedulli, *ChemPhysChem*, 2002, **3**, 789–793.
- 30 N. Le Breton, M. Martinho, K. Kabitaev, J. Topin, E. Mileo, D. Blocquel, J. Habchi, S. Longhi, A. Rockenbauer, J. Golebiowski, B. Guigliarelli, S. R. A. Marque and V. Belle, *PhysChemChemPhys*, 2014, **16**, 4202–4209.
- 31 S. A. Dzuba, *J. Struct. Chem.*, 2013, **54**(Suppl. 1), S1–S15.
- 32 S. A. Dzuba and D. Marsh, ESEEM of Spin Labels to Study Intermolecular Interactions, Molecular Assembly and Conformation, in *A Specialist Periodic Report, Electron Paramagnetic Resonance*, ed. C. Gilbert, V. Chechik and D. M. Murphy, RSC Publishing, 2015, vol. 24, pp. 102–121.
- 33 W. L. F. Armarego and C. C. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, Amsterdam, 5th edn, 2003.
- 34 S. Acerbis, D. Bertin, B. Boutevin, D. Gignes, P. Lacroix-Desmazes, C. Le Mercier, J.-F. Lutz, S. R. A. Marque, D. Siri and P. Tordo, *Helv. Chim. Acta*, 2006, **89**(10), 2119–2132.
- 35 H. E. Gottlieb, V. Kotlyar and A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7512.





CrossMark  
click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 5653

## $\beta$ -Phosphorus hyperfine coupling constant in nitroxides: 5. Solvent effect<sup>†</sup>

Gérard Audran,<sup>\*a</sup> Lionel Bosco,<sup>a</sup> Paul Brémond,<sup>\*a</sup> Teddy Butscher,<sup>a</sup> Jean-Michel Franconi,<sup>b</sup> Kuanysh Kabitaev,<sup>a</sup> Sylvain R. A. Marque,<sup>\*ac</sup> Philippe Mellet,<sup>bd</sup> Elodie Parzy,<sup>b</sup> Maurice Santelli,<sup>a</sup> Eric Thiaudière<sup>b</sup> and Stéphane Viel<sup>ae</sup>

Recently, we published the titration of water in organic solvents and conversely using this family of nitroxides (*Org. Biomol. Chem.* 2015 ASAP). In this article, we show that the  $a_{\beta,P}$  of persistent cyclic  $\beta$ -phosphorylated nitroxides decreases with the normalized polarity Reichardt's constant  $E_T^N$ . Koppel–Palm and Kalmet–Abbond–Taft relationships were applied to get a deeper insight into the effects influencing  $a_N$  and  $a_{\beta,P}$ : polarity/polarizability, hydrogen bond donor property, and *structuredness* of the cybotactic region.

Received 8th November 2015  
Accepted 15th December 2015

DOI: 10.1039/c5ra23521a

www.rsc.org/advances

### Introduction

Persistent nitroxides<sup>1,2</sup> find application in biology as pH-probes<sup>3</sup> or spin probes,<sup>4</sup> in spectroscopy as agents for Dynamic Nuclear Polarization enhanced Nuclear Magnetic Resonance (DNP-NMR),<sup>5–7</sup> or in Material Sciences for organic magnetic materials.<sup>8</sup> Their spectroscopic properties, which are represented by the nitrogen hyperfine coupling constant  $a_N$ , are the cornerstone of most of these applications. Several investigations of the solvent effects in the cybotactic region are available in the literature.<sup>9–12</sup> They showed that  $a_N$  increased when increasing the normalized solvent-polarity Reichardt's constant  $E_T^N$ ,<sup>13,14</sup> as exemplified with **1'** (Fig. 1). Some studies showed that the hyperfine coupling constants of hydrogen and of fluorine atoms at the position  $\beta$ ,  $a_{H\beta}$  (ref. 10) and  $a_{F\beta}$ ,<sup>11</sup> are weakly sensitive to the polarity of the solvent as well as to the temperature. However, in 1976, Il'Yasov and coll.<sup>12</sup> showed a dramatic change  $\Delta a_{\beta,P}$  in the phosphorus hyperfine coupling constants  $a_{\beta,P}$  with  $E_{T(30)}$  (a  $\Delta a_{\beta,P}$  of ca. 20 G between *n*-hexane and water) with nitroxide

**2'** (Fig. 1).<sup>‡</sup> A few years later, Janzen and coll.<sup>15</sup> reported a similar effect with  $\beta$ -phosphorylated cyclic nitroxides (only 3 solvents were investigated). On the other hand, with the persistent<sup>16</sup> *N*-(2-methylpropyl)-*N*-(1-diethylphosphono-2,2-dimethylpropyl)-*N*-oxyl radical (**2''** in Fig. 1) we<sup>17</sup> recently showed that  $a_{\beta,P}$  was weakly sensitive to  $E_T^N$ , with a lot of outliers for alcoholic solvents and water. We also reported<sup>18</sup> a non linear variation in  $a_{P\beta}$  with  $E_T^N$  for the stable nitroxide **2'''**. Moreover, with **2'''** and **5c,t'**, we highlighted the potential of these nitroxides to probe the presence of water in organic solvents and conversely.<sup>18,19</sup> It is well known that  $\beta$ -phosphorylated pyrrolidin-based nitroxides are persistent<sup>16,20</sup> and that the changes in conformation of the 5-membered ring can strikingly modify the values of  $a_{\beta,P}$ , as given by the Heller–McConnell relationship<sup>21</sup> (eqn (1)), by modifying the dihedral angle  $\theta$  between the C–P bond and the p-shape orbital describing the odd electron localized (Fig. 2) on the nitrogen atom of the nitroxyl moiety (where  $\rho_N^\pi$  is the electron density on the nitrogen atom of the nitroxyl moiety and proportional to the  $a_N$  value,  $B_0$  is the transfer of the spin density through the spin polarization process and  $B_1$  is the transfer of spin density through the hyperconjugation process):

$$a_{\beta,P} = B_0 \rho_N^\pi + B_1 \rho_N^\pi \cos^2 \theta \quad (1)$$

Surprisingly,  $\beta$ -phosphorylated nitroxides carrying a substituted methylene group at position  $\beta$  (Fig. 1) have been

<sup>a</sup>Aix-Marseille Université, CNRS-UMR 7273, ICR, Case 541, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France. E-mail: paul.brémond@univ-amu.fr; sylvain.marque@univ-amu.fr; g.audran@univ-amu.fr

<sup>b</sup>CRMSB, CNRS-UMR-5536, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, Case 93, 33076 Bordeaux Cedex, France

<sup>c</sup>N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Pr. Lavrentjeva 9, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>d</sup>INSERM, 146 rue Léo Saignat, Case 93, 33076 Bordeaux Cedex, France

<sup>e</sup>Institut Universitaire de France, 75000 Paris, France

<sup>†</sup> Electronic supplementary information (ESI) available: Table 1S1 for the solvent parameters. Fig. 1S1 for plots  $a_N$  vs.  $\mu$ ,  $a_N$  vs.  $\epsilon_r$ ,  $a_{\beta,P}$  vs.  $\mu$  and  $a_{\beta,P}$  vs.  $\epsilon_r$ . Fig. 2S1 for plots  $a_N$  against  $c$ ,  $V_X$  (Å),  $V_M$  (Å),  $\alpha$  and  $\pi^*$  and  $a_{\beta,P}$  against  $c$ ,  $V_X$  (Å),  $V_M$  (Å),  $\alpha$  and  $\pi^*$  (right). Preparation of **4'** and **5'**. CCDC 985888. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c5ra23521a

<sup>‡</sup> As far as we know this nitroxide has only been observed through spin-trapping experiments involving the addition of 2-diethoxyphosphorylprop-2-yl radical onto *tert*-butyl nitroso. Consequently, its preparation on a large scale is expected to be a challenge by conventional procedures.

<sup>§</sup> In general,  $B_0$  is very small and can be neglected. See ref. 10.

<sup>¶</sup> Values of  $B_1$  are dependent on the atom or on the function at position  $\beta$ . See ref. 21 and 10.

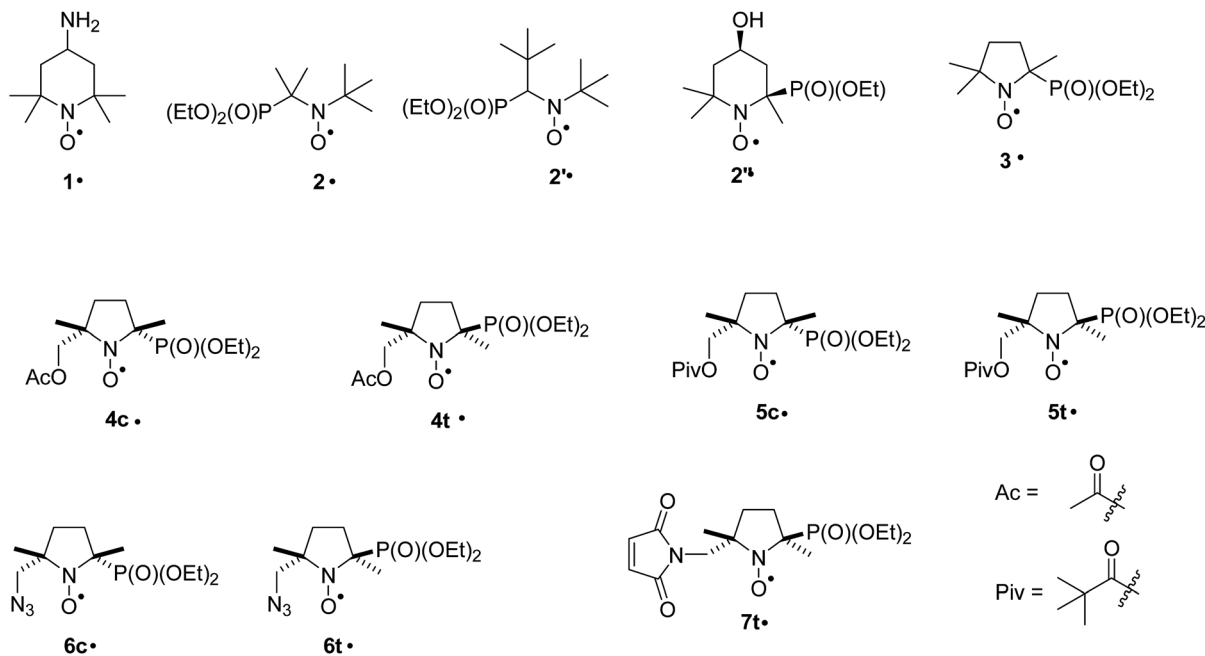


Fig. 1 Nitroxides investigated: c for the *cis* isomer and t for the *trans* isomer.

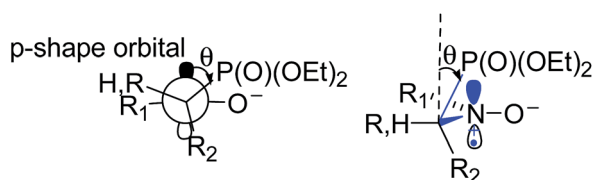


Fig. 2 Hyperconjugation effect describing the origin of the coupling between the nuclear spin of the phosphorus atom and the p-shape orbital on the N atom of the nitroxyl moiety. Newman projection on the left, dihedral angle  $\theta$  (in blue) on the Cram projection on the right.

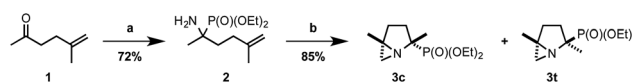
only little investigated<sup>15,22,23</sup> and mainly by spin-trapping.<sup>24–27</sup> Thus, several nitroxides carrying various groups at position  $\beta$  were prepared (Fig. 1), aiming both to vary the steric hindrance and to investigate the effect of stereogenic centres at the  $\alpha$  positions of the nitroxyl moiety. A few investigations of the effect of a substituent at position 3 or 4 as well as of the effect of the configuration at positions 2, 3, and 4 for 2,5,5-trimethyl-2-diethoxyphosphonyl-pyrrolidin-*N*-oxyl radicals on  $a_N$  and  $a_{\beta,P}$  have been reported.<sup>28,29</sup> Indeed, an extensive investigation on the solvent effect in  $\beta$ -phosphorylated is timely due to their various applications: (i) as products issued from the spin-trapping of radicals by  $\beta$ -phosphorylated nitroxides taking into account that only a little is known on the solvent effect on spin-adducts and often the trapped radicals are rather basics such as  $\text{Me}^\bullet$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HOO}^\bullet$ , ...; (ii) as component of alkoxyamines which are currently used as initiator/controller in nitroxide mediated polymerization.<sup>30</sup> The most efficient are often based on  $\beta$ -phosphorylated nitroxyl moiety;<sup>31</sup> (iii) as new spin-label for

Site Directed Spin Labeling (SDSL) for which changes in  $hcc$  might provide information on the folding–unfolding process,<sup>32</sup> and (iv) as spin probe to investigate non-radical enzymatic activity by Overhauser-enhanced Magnetic Resonance Imaging (OMRI) and EPR.<sup>33</sup>

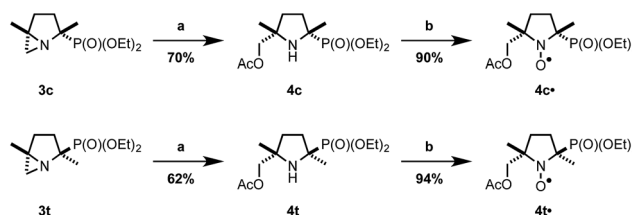
## Results

### Preparation of nitroxides 3'–7t'

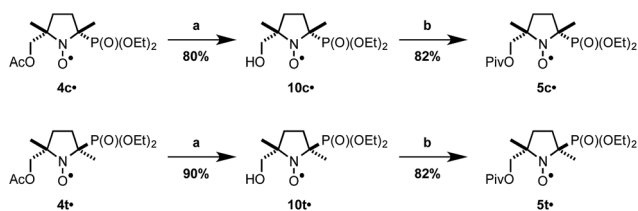
Nitroxides 3' (ref. 34) and 7t' (ref. 35) were prepared as reported in the literature. Aziridine 3 was prepared as recently reported from commercially available 6-methylhex-5-en-2-one 1 (Scheme 1).<sup>35</sup> Aziridine 3 was obtained as two diastereoisomers *cis* (3c)



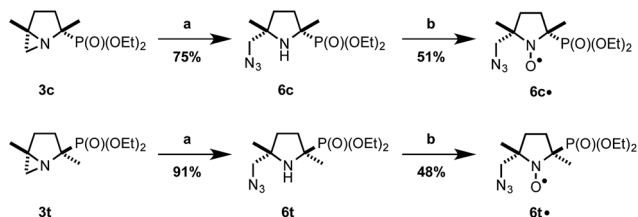
Scheme 1 Preparation of the aziridine key-intermediate 3. Reagents and conditions: (a)  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HP(O)(OEt)}_2$ , 24 h, r.t.; (b)  $\text{I}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , 1,2-dichloroethane,  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 h, reflux.



Scheme 2 Synthesis of 4c,t'. Reagents and conditions: (a)  $\text{AcOH}$ , 24 h, r.t.; (b) *m*-CPBA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2–4 h, r.t.



**Scheme 3** Synthesis of **5c,t\***. Reagents and conditions: (a)  $K_2CO_3$ , MeOH, 24 h, r.t.; (b) PivCl,  $Et_3N$ , DMAP,  $CH_2Cl_2$ , 24 h, r.t.



**Scheme 4** Synthesis of **6c,t\***. Reagents and conditions: (a)  $NaN_3$ ,  $NH_4Cl$ ,  $CH_3CN$ , 3 h, reflux; (b) *m*-CPBA,  $CH_2Cl_2$ , r.t., 1 h.

and *trans* (**3t**), which were separated by column chromatography on silica gel. Their relative configuration was determined by NMR and X-ray studies (*vide infra*).

The nucleophilic addition of acetic acid onto **3c,t** afforded adducts **4c,t** in 62–70%. They were subsequently oxidized by *m*-CPBA (90–94% yield) into nitroxides **4c'** and **4t'** (Scheme 2).

Then, **4c',t'** were treated by potassium carbonate in MeOH to afford **10c',t'** (80–90% yield), which were then esterified with pivaloyl chloride (82% yield) to afford **5c'** and **5t'**, respectively (Scheme 3).

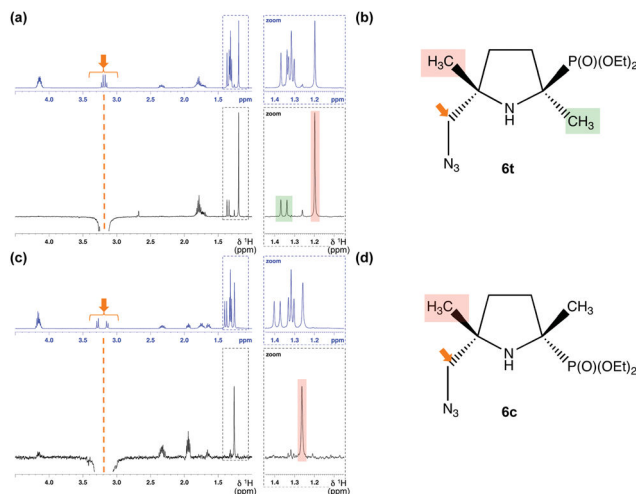
The nucleophilic addition of sodium azide onto **3c** and **3t** afforded **6c** and **6t**, respectively, which were subsequently oxidized into nitroxides **6c'** and **6t'** (Scheme 4).

### NMR, EPR and X-ray analyses

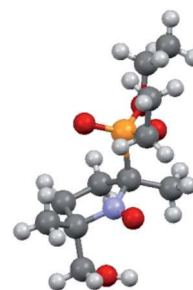
Once aziridines **3c** and **3t** were separated, **6c** (minor diastereoisomer) and **6t** (major diastereoisomer) were prepared by a univocal route (Scheme 4). Their relative configuration was determined using NOESY experiments. The Overhauser effect was observed between the two methyl groups for **6c** whereas it was not observed for **6t** (Fig. 3).|| The relative configuration was definitely ascribed by the X-ray analysis of **10t'** (Fig. 4),\*\* which nicely confirmed the NOESY experiment, as **10t'** was also prepared through a univocal route from **3t** (Scheme 2 and 3). Consequently, the stereochemistry of each stereocenter in **4'-6'** (Fig. 1) was ascertained from these two molecules.

|| In Fig. 3, for (a), selective irradiation of these  $CH_2$  signals gave rise to informative NOE cross-peaks (evidenced by green and red boxes) which are due to  $CH_3$  groups as illustrated in (b). This confirmed the *trans* configuration of the 5-membered ring. In contrast, irradiation of the same  $CH_2$  protons in (c) afforded only rise to one NOE cross-peak with the neighboring  $CH_3$  group, in agreement with the expected *cis* configuration.

\*\* CCDC: 985888.†



**Fig. 3** 500.13 MHz one-dimensional (1D)  $^1H$  NMR and  $^1H$  selective NOE NMR spectra (blue and black traces, respectively) recorded at 300 K in  $CDCl_3$  solutions of (a) **6t** and (c) **6c**, the molecular structures of which are reported in (b) and (d), respectively. The orange arrows shown in (a) and (c) indicate the signals that were selectively irradiated in the 1D  $^1H$  NOE NMR experiments and that correspond to the  $CH_2$  protons (AB spin system) of the pendant  $CH_2N_3$  moiety. Dotted zones in right side in (a) and (c) correspond to a zoom from the dotted zone on the main spectrum. The green and pink colored zones in (a)–(d) highlight the zones sensitive to the irradiation of the  $CH_2N_3$  group.



**Fig. 4** X-ray analysis of **10t'**.

All nitroxides displayed in Fig. 1 exhibit the expected 6-line EPR signal due to the coupling between the nuclear spins of the nitrogen atom ( $I_N = 1$ ) and phosphorus atom ( $I_P = 1/2$ ) and the odd electron on the nitroxyl moiety. Signals were recorded in more than 40 solvents. Nitrogen and  $\beta$ -phosphorus hyperfine coupling constants ( $hcc$ )  $a_N$  and  $a_{\beta,P}$  for **1'-7'** are collected in Table 1 excepted for **2'** and **2''**.

### Non-specific properties of the solvent

Among the non-specific solvent properties available, – dipolar moment  $\mu$ , relative permittivity constant  $\epsilon_r$ , viscosity  $\eta$  and refractive index  $n$  – only  $\mu$  and  $\epsilon_r$  were tested, as they were related to the polarity of the solvent (Table 1SI†). As already reported for **1'**,<sup>17</sup> scattered plots were observed with  $\mu$  and  $\epsilon_r$ ,

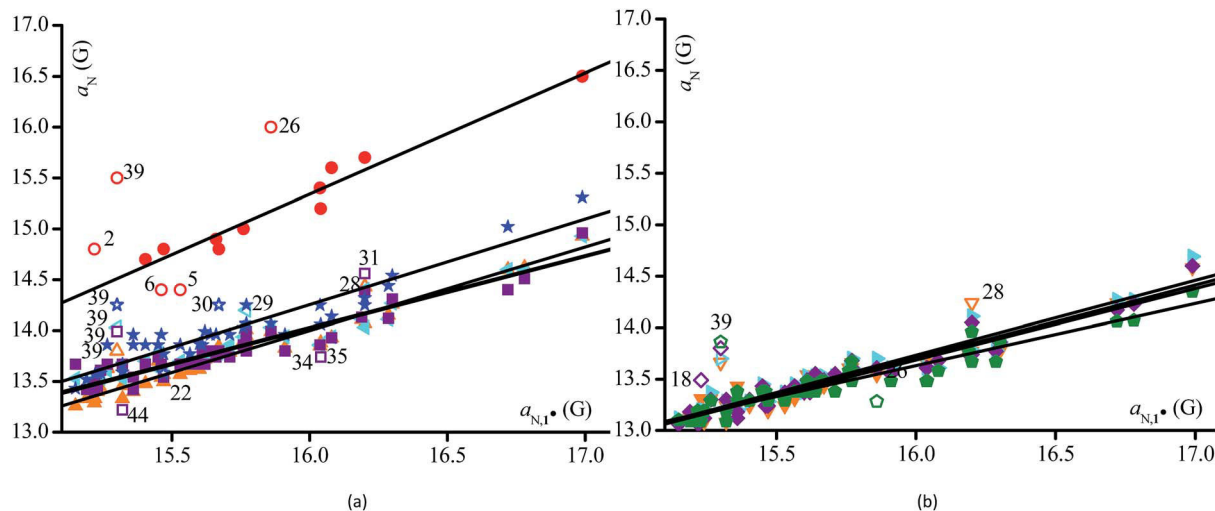


Fig. 5 Correlations  $a_{N,1}$  vs.  $a_N$  for (a)  $2^*$  (●),  $3^*$  (★),  $4c^*$  (◼),  $5c^*$  (◈), and  $6c^*$  (▲), and (b)  $4t^*$  (◈),  $5t^*$  (◈),  $6t^*$  (▼) and  $7t^*$  (●). Empty symbols are for outliers.

like with  $a_N$  and  $a_{\beta,P}$  for  $3^*$ – $7t^*$  (Fig. 1SI†).<sup>††</sup> Nevertheless, two trends were observed:  $a_N$  increased with increasing  $\mu$  and  $\epsilon_r$ , *i.e.*, with increasing polarity, and  $a_{\beta,P}$  decreased with increasing  $\mu$  and  $\epsilon_r$ .

### Correlation of $a_N$ and $a_{\beta,P}$ with benchmark hccs

As  $1^*$  was the nitroxide used in the first extensive study of solvent effects,<sup>9</sup> its  $a_N$  values are considered as benchmark values to investigate the solvent effect.<sup>1,2</sup> In 1976,  $2^*$  was used in the first extensive solvent study (18 solvents) for nitroxides carrying a phosphorus atom at position  $\beta$ .<sup>12</sup>

The plots of  $a_N$  for  $3^*$ – $7t^*$  against  $a_N$  for  $1^*$  (benchmark molecule, eqn (2)) show that  $3^*$ – $7t^*$  experience a weaker solvation effect on their nitroxyl moieties than  $1^*$  does. Thus,  $4c,t^*$ ,  $5c,t^*$ , and  $6t^*$  experience a similar solvent effect (same slopes  $\alpha_1$  in eqn (2c–f and h), Table 2SI) although weaker than for  $3^*$  and  $6c^*$ , and stronger than for  $7t^*$ . TEG (39) is an outlier for all nitroxides, likely due to its high viscosity affording a peculiar solvation of the nitroxyl moiety. At this time, there is no rationale to take into account the other outliers.

$$a_N = y_0 + \alpha_1 a_{N,1^*} \quad (2)$$

The plots  $a_N$  of  $4^*$ – $7t^*$  against  $a_N$  of  $3^*$ , selected as the reference for the nitroxides carrying a phosphoryl group (eqn (3)), show that the nitroxyl moieties of  $4c,t^*$ ,  $5c,t^*$  and  $6t^*$  experienced the same solvation effect as  $3^*$  did (Fig. 6 and Table 3SI†). On the other hand,  $6c^*$  experienced a stronger solvation effect whereas  $7t^*$  experienced a weaker solvation effect. There is no rationale to take into account solvents F (28), *i*-Pr<sub>2</sub>NH (45), *n*-Bu<sub>2</sub>O (19), and DMF (30) as outliers. Interestingly, for most nitroxides, EG (38) and TEG (39) are outliers, likely due to their high viscosity. For  $5c^*$ , MeOH (31) and Et<sub>3</sub>N (44) are also outliers.

†† All figures were very similar.

$$a_N = y_0 + \alpha_2 a_{N,3^*} \quad (3)$$

The plots  $a_{N,1}$  vs.  $a_{\beta,P}$  and  $a_{N,3}$  vs.  $a_{\beta,P}$  exhibit a decrease in  $a_{\beta,P}$  with increasing  $a_N$  values, in sharp contrast to the expectations from eqn (1) (Fig. 7).<sup>‡‡</sup> However, a broad scattering was observed whatever the reference used, implying that the solvation of the nitroxyl moiety has a different impact depending on the nitroxide, as exemplified with  $6t^*$  (Fig. 7).

Thus,  $3^*$  was selected as reference as it is the first 5-membered ring of this series, *i.e.* 3 methyl and one diethoxyphosphoryl group at position  $\beta$ . Good correlations were observed for  $4c^*$ – $6c^*$  (eqn (4), Table 4SI,† Fig. 8) and  $4t^*$ – $7t^*$  (eqn (5), Table 5SI,† Fig. 8) with a few outliers. That is, mainly NMF (29) for  $4c^*$ – $6c^*$ , and NMF (29) and water (41) for  $4t^*$ – $7t^*$ . Interestingly,  $3^*$  and  $4c^*$ – $6c^*$  experienced the same solvent effect, as shown by the very close values of their slopes (Table 4SI†). On the other hand, a stronger effect (Table 5SI†) was observed for  $4t^*$ – $6t^*$ , implying more important conformational changes, in contrast to  $7t^*$ .

$$a_{\beta,P,c} = y_0 + \alpha_3 a_{\beta,P,3^*} \quad (4)$$

$$a_{\beta,P,t} = y_0 + \alpha_4 a_{\beta,P,3^*} \quad (5)$$

$$a_{\beta,P,t} = y_0 + \alpha_5 a_{\beta,P,c} \quad (6)$$

$$a_N = y_0 + \alpha_7 E_T^N \quad (7)$$

$$a_{\beta,P} = y_0 + \alpha_8 E_T^N \quad (8)$$

Interestingly, when the  $a_{\beta,P}$  of the diastereoisomers are plotted against each other, very good correlations are observed (Fig. 8c). They show that the conformational changes are

‡‡ Other plots are similar.

Table 1 Nitrogen and phosphorus hyperfine coupling constants  $a_N$  and  $a_{\text{PP}}$ , respectively, in various solvents for nitroxides  $1^{\cdot-}$ – $7t^{\cdot-}$ 

Solvent <sup>b</sup>	$1^{\cdot-}$		$2^{\cdot d}$		$3^{\cdot e}$		$4c^{\cdot}$		$4t^{\cdot}$		$5c^{\cdot}$		$5t^{\cdot}$		$6c^{\cdot}$		$6t^{\cdot}$		$7t^{\cdot}$	
	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$	$a_N$	$a_{\text{PP}}$
1 <i>n</i> -Pentane	15.15	—	13.43	51.15	13.53	47.77	13.12	52.39	13.67	47.18	13.06	52.54	13.26	49.34	13.07	49.34	13.10	52.86		
2 <i>n</i> -Hexane	15.22	14.80	13.54	50.96	13.45	47.77	13.12	52.39	13.41	46.79	13.12	52.73	13.29	48.63	13.19	48.63	13.19	52.76		
3 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15.19	—	13.52	51.17	13.45	47.86	13.12	52.23	13.42	46.86	13.18	52.72	13.33	48.82	13.12	48.82	13.12	52.95		
4 <i>n</i> -Octane	15.22	—	13.57	51.13	13.53	47.94	13.12	52.48	13.48	46.98	13.06	52.79	13.33	48.82	13.08	48.82	13.08	52.86		
5 Benzene	15.53	14.40	13.86	49.87	13.70	46.95	13.37	50.74	13.67	46.09	13.37	51.11	13.57	47.12	13.24	49.51	13.29	52.18		
6 Toluene	15.46	14.40	13.86	50.06	13.61	47.03	13.28	50.99	13.67	46.21	13.24	51.30	13.54	47.22	13.31	49.77	13.38	52.18		
7 <i>t</i> -BuPh	15.47	—	13.77	50.45	13.61	47.36	13.28	51.49	13.54	46.34	13.24	51.73	13.50	47.63	13.31	50.35	13.29	52.47		
8 PhBr	15.57	—	13.77	48.81	13.70	46.04	13.45	50.00	13.67	45.38	13.43	50.43	13.61	46.90	13.31	48.61	13.38	51.41		
9 Pyridine	15.66	14.90	13.96	48.52	13.78	45.3	13.53	49.26	13.74	44.93	13.49	49.57	13.76	46.10	13.43	47.69	13.48	50.83		
10 AcPh	15.64	—	13.96	48.52	13.78	45.3	13.53	49.51	13.80	44.99	13.55	49.69	13.74	46.15	13.49	47.77	13.38	50.93		
11 <i>t</i> -BuPh/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15.61	—	13.86	48.62	13.70	45.96	13.53	49.42	13.80	44.80	13.49	49.81	13.74	46.15	13.54	47.92	13.48	50.93		
12 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15.77	—	14.06	47.95	13.86	44.55	13.61	48.76	13.80	44.10	13.61	49.13	13.88	45.77	13.54	47.11	13.48	50.26		
13 DCE	15.71	—	13.96	47.68	13.86	44.55	13.53	48.68	13.74	44.03	13.55	49.13	13.79	45.74	13.49	47.03	13.38	50.06		
14 CHCl <sub>3</sub>	15.77	—	14.25	48.52	13.94	45.55	13.61	49.51	13.93	44.8	13.68	50.19	13.92	46.19	13.61	48.39	13.58	51.32		
15 CCl <sub>4</sub>	15.40	14.70	13.86	50.64	13.70	47.69	13.28	51.98	13.67	46.61	13.30	52.41	13.48	48.21	13.24	51.24	13.29	52.76		
16 DME	15.27	—	13.86	49.49	13.61	46.37	13.37	50.66	13.67	45.70	13.30	50.74	13.63	47.12	13.31	49.19	13.29	51.51		
17 Et <sub>2</sub> O	15.24	—	13.58	50.26	13.53	47.11	13.20	51.65	13.61	46.47	13.12	51.8	13.43	48.24	13.08	50.58	13.19	52.38		
18 <i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	15.23	—	13.58	50.58	13.53	47.36	13.20	51.90	13.45	46.66	13.49	52.23	13.40	48.48	13.31	50.93	13.09	52.28		
19 <i>n</i> -Bu <sub>2</sub> O	15.36	—	13.86	50.64	13.53	47.28	13.20	51.82	13.42	46.53	13.18	52.23	13.40	48.18	13.24	50.87	13.29	52.66		
20 Me <sup>t</sup> -BuO	15.32	—	13.67	50.06	13.53	47.03	13.28	51.49	13.67	46.53	13.3	51.80	13.46	48.04	13.24	50.41	13.19	52.18		
21 14D	15.45	—	13.86	49.49	13.78	46.12	13.45	50.41	13.74	45.25	13.43	50.74	13.70	46.63	13.37	49.13	13.38	51.7		
22 THF	15.47	14.80	13.58	49.58	13.61	46.62	13.28	51.07	13.54	46.09	13.24	51.24	13.57	47.57	13.19	49.77	13.29	51.8		
23 AcOEt	15.60	—	13.87	49.82	13.70	46.54	13.37	50.91	13.67	45.70	13.37	50.99	13.62	47.26	13.37	49.51	13.38	51.8		
24 Acetone	15.62	—	13.99	48.76	13.70	45.55	13.45	49.92	13.67	45.06	13.37	50.90	13.72	46.45	13.49	48.14	13.38	51.03		
25 ACN	15.76	15.00	14.03	47.43	13.94	44.06	13.61	48.35	13.86	43.65	13.55	48.33	13.90	45.12	13.61	46.29	13.58	49.97		
26 MeNO <sub>2</sub>	15.86	16.00	14.07	47.04	14.03	43.56	13.70	47.94	13.99	43.26	13.61	48.02	13.99	44.93	13.54	45.83	13.28	49.49		
27 DMSO	15.77	—	14.07	47.88	14.03	44.64	13.61	48.76	13.93	44.03	13.61	48.64	13.95	45.35	13.54	46.99	13.48	50.64		
28 F	16.20	—	14.25	46.41	14.40	42.50	14.11	46.12	14.38	41.85	14.05	45.98	14.43	44.16	14.24	46.53	13.96	48.62		
29 NMF	15.77	—	14.25	48.42	14.20	42.82	13.70	46.87	13.99	42.62	13.68	46.60	14.01	44.50	13.66	44.56	13.67	49.00		
30 DMF	15.67	14.80	14.25	48.71	13.78	44.97	13.53	49.18	13.80	44.54	13.49	49.13	13.84	45.70	13.43	47.22	13.48	50.74		
31 MeOH	16.20	15.70	14.32	47.79	14.03	44.31	13.78	48.43	14.56	44.03	13.74	48.27	14.07	45.48	13.77	46.64	13.67	50.93		
32 EtOH	16.08	15.60	14.14	48.58	13.94	45.05	13.61	49.26	13.93	44.87	13.68	49.2	13.93	46.02	13.66	47.57	13.58	51.61		
33 TFE	16.78	—	15.03	48.45	14.60	44.31	14.27	48.10	14.51	43.58	14.23	48.14	14.62	45.99	14.24	46.53	14.07	50.35		
34 <i>i</i> -PrOH	16.04	15.20	14.06	49.39	13.86	45.71	13.61	50.00	13.74	45.44	13.61	50.00	13.88	46.59	13.66	48.61	13.48	52.09		
35 <i>n</i> -BuOH	16.04	15.40	14.25	48.62	13.86	45.30	13.61	49.67	13.86	45.06	13.61	49.81	13.85	46.25	13.66	48.15	13.48	51.99		
36 <i>t</i> -BuOH	15.91	—	13.96	49.68	13.94	46.21	13.61	50.58	13.80	46.02	13.55	50.80	13.83	47.11	13.54	49.54	13.48	52.09		
37 BnOH	16.29	—	14.44	48.33	14.11	44.97	13.78	48.52	14.12	44.42	13.77	48.89	14.15	45.51	13.74	47.03	13.67	51.22		
38 EG	16.30	—	14.54	47.85	14.27	44.31	13.86	48.02	14.31	43.58	13.86	48.02	14.26	45.45	13.77	46.18	13.86	50.93		
39 TEG	15.30	15.50	14.25	48.43	14.03	45.13	13.70	48.93	13.99	44.42	13.8	49.13	13.80	45.67	13.66	46.99	13.86	51.03		
40 Water/MeOH	16.72	—	15.02	48.14	14.60	44.47	14.27	47.94	14.40	43.39	14.17	47.77	14.60	45.51	14.24	46.18	14.06	50.83		
41 Water	16.99	16.50	15.31	47.75	14.93	44.47	14.69	46.95	14.96	43.07	14.6	46.78	14.93	45.37	14.58	45.37	14.35	50.35		
42 Buffer	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
43 AcOH	16.19	—	14.52	49.13	14.11	45.22	13.78	49.59	14.13	44.42	13.74	49.57	14.11	46.21	13.74	47.90	13.77	51.7	—	—
44 Et <sub>3</sub> N	15.32	—	13.59	50.67	13.53	47.53	13.20	52.23	13.22	46.40	13.3	52.41	13.33	48.22	13.08	48.22	13.09	52.57	—	—

Table 1 (Contd.)

Solvent <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>		2 <sup>d</sup>		3 <sup>e</sup>		4 <sup>c</sup>		4 <sup>t</sup>		5 <sup>c</sup>		5 <sup>t</sup>		6 <sup>c</sup>		6 <sup>t</sup>		7 <sup>t</sup>	
	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>	<i>a<sub>N</sub></i>	<i>a<sub>β,P</sub></i>
45 i-Pr <sub>2</sub> NH	15.36	—	—	—	13.96	50.64	13.53	47.36	13.28	51.90	13.54	46.79	13.12	52.10	13.40	48.18	13.43	51.04	13.38	52.47
46 i-PenOH	15.96	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
47 CS <sub>2</sub>	15.37	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
48 Mecyc	—	—	14.50	39.80	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
49 PhCl	15.56	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> *a<sub>N</sub>* and *a<sub>β,P</sub>* given in G. <sup>b</sup> CHex: cyclohexane, *t*-BuPh: *tert*-butylbenzene, PhBr: bromobenzene, AcPh: acetophenone, DCE: 1,2-dichloroethane, DME: 1,2-dimethoxyethane, 14D: 1,4-dioxane, THF: tetrahydrofuran, AcOEt: ethyl acetate, ACN: acetonitrile, DMSO: dimethylsulfoxide, F: formamide, NMF: *N,N*-dimethylformamide, DMF: *N,N*-dimethylformamide, TFE: 2,2,2-trifluoroethanol, EG: ethylene glycol, TEG: triethylene glycol, AcOH: acetic acid, *i*-PenOH: iso-pentanol, Mecyc: methylcyclopentane, PhCl: chlorobenzene, buffer: phosphate buffer at pH = 7.2. <sup>c</sup> See ref. 9 and 17. <sup>d</sup> See ref. 12. <sup>e</sup> See ref. 17. <sup>f</sup> Not available.

different from one diastereoisomer to the other (Table 6SI†) and always afford a  $\theta$  value smaller for the *trans* configuration than for the *cis* configuration (*vide infra*). Noteworthily, only a few outliers were observed, *i.e.*, water (41) for 4', benzene (5) for 5', formamide (28) for 6'.

### Solvent effect on *a<sub>N</sub>* and *a<sub>β,P</sub>* in the cybotactic region

The cybotactic effect of 45 solvents was investigated for each diastereoisomer separately (Table 1). Correlations of *a<sub>N</sub>* and *a<sub>β,P</sub>* with non-specific solvent parameters such as the dipole moment  $\mu$ , the relative constant  $\epsilon_r$ , and the refractive index  $n$  afforded only scattered plots (see ESI†). Thus, we investigated the specific solvent parameters related to the Hydrogen Bonding Donating (HBD) property  $\alpha$ ,§§ the intrinsic volume  $V_X$ , the cohesive pressure  $c$  (square of the Hildebrand solubility parameter  $\delta$ ), the molar volume  $V_M$ , and the normalized Reichardt polarity solvent parameter  $E_T^N$  (all these values are reported in Table 1SI†). Except for  $E_T^N$ , all parameters afforded scattered plots, both for *a<sub>N</sub>* and *a<sub>β,P</sub>*. Although scattering seems weak in Fig. 9 and 10 for the plots  $E_T^N$  vs. *a<sub>N</sub>* or *a<sub>β,P</sub>*, respectively, it is still strong for 3'–7t' ( $R^2 < 0.90$ , eqn (7c–j) and (8b–i) in Tables 2 and 3, respectively), even after several outliers have been removed.

Amazingly, two correlations are possible for 3' and 7t' (eqn (8b, c and j, k), respectively, in Table 3) affording good statistical outputs and different parameters, provided at least 10 solvents are removed! This highlights very nicely that  $E_T^N$  is not a suitable parameter to describe the solvent effect on *a<sub>β,P</sub>*.

### Dihedral angle changes

As mentioned in the introduction, the coupling with the atom at position  $\beta$  is given by the Heller–McConnell relationship (eqn (1)) which in turn depends on the spin density on the nitrogen atom  $\rho_N^\pi$ , straightforwardly related to *a<sub>N</sub>*, and to the dihedral angle  $\theta$  between the bond of the atom at position  $\beta$  and the p-shape orbital on the N atom. Years ago,<sup>28,29</sup> it was shown that  $\rho_N^\pi B_1$  in an apolar solvent such as *n*-hexane is around 59 G for the diethoxyphosphoryl group at position  $\beta$  of the nitroxyl moiety. Then, using eqn (1) it was possible to determine  $\theta_1$  for each nitroxide in the solvent exhibiting the largest *a<sub>β,P</sub>* value. Thus, applying eqn (9),  $\theta$  values were determined for each nitroxide in each solvent and displayed in Fig. 11. The main features – solvents, lowest and highest values of *a<sub>N</sub>*, *a<sub>β,P</sub>* and  $\theta$ , and its variation  $\Delta\theta$  – are stored in Table 4.

$$\frac{a_{P,1}}{a_{P,n}} = \frac{a_{N,1}}{a_{N,n}} \frac{\cos^2 \theta_1}{\cos^2 \theta_n} \quad (9)$$

Interestingly (Table 4), a difference in *a<sub>β,P</sub>* of *ca.* 1 G between 5t' and 6t' is accounted for by a difference of 2° in  $\theta$ . The largest values of *a<sub>β,P</sub>* are reported in solvents with  $E_T^N$  lower than 0.01. The largest value is not always ascribed to the same solvent.

§§ The hydrogen bonding acceptor HBA property  $\beta$  was not considered, as the investigated nitroxides did not exhibit “acidic” proton.

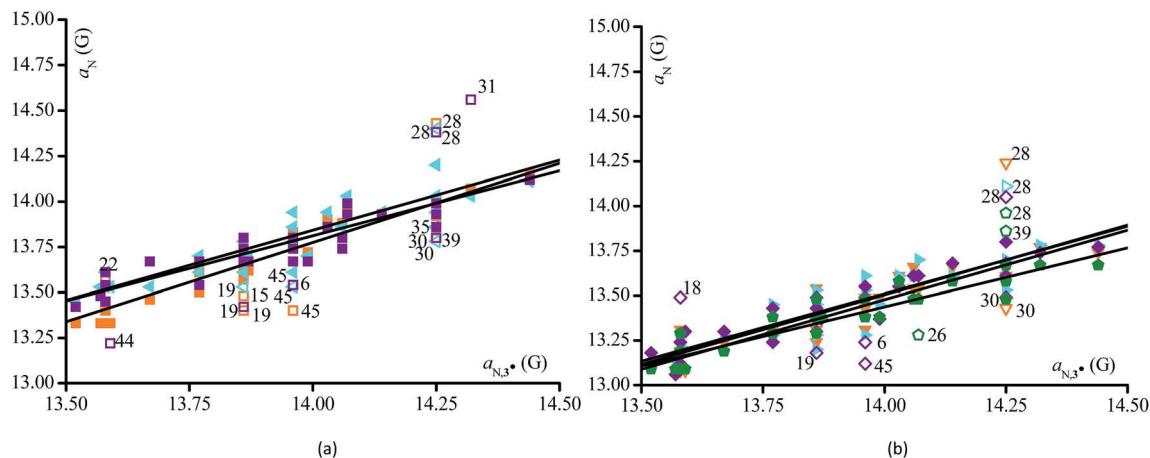


Fig. 6 Correlations  $a_{N,3^*}$  vs.  $a_N$  for (a)  $4c^*$  ( $\blacktriangle$ ),  $5c^*$  ( $\blacksquare$ ), and  $6c^*$  ( $\blacktriangle$ ), and (b)  $4t^*$  ( $\blacktriangleright$ ),  $5t^*$  ( $\blacklozenge$ ),  $6t^*$  ( $\blacktriangledown$ ) and  $7t^*$  ( $\bullet$ ). Empty symbols are for outliers.

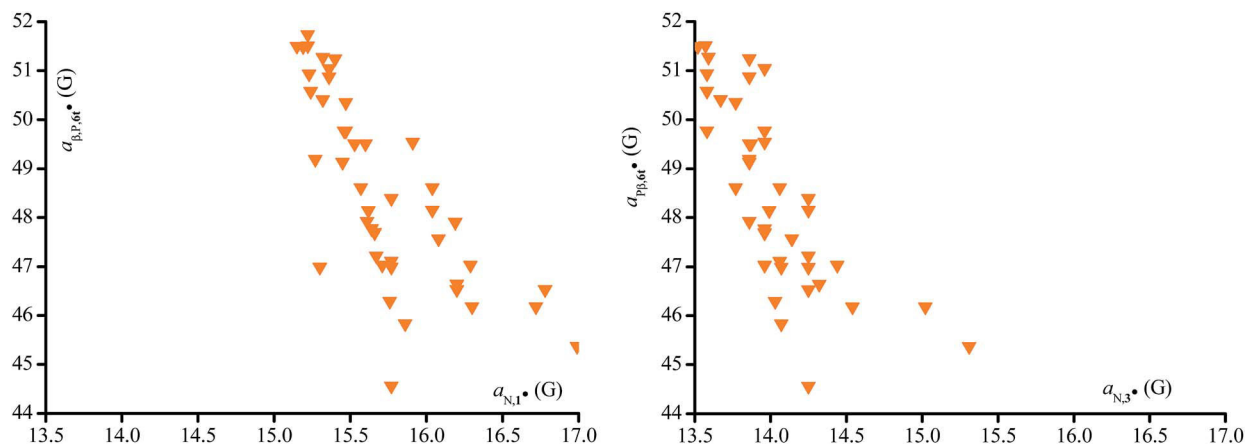


Fig. 7 Plots  $a_{N,1^*}$  vs.  $a_{\beta,P,6t^*}$  (left) and  $a_{N,3^*}$  vs.  $a_{\beta,P,6t^*}$  (right), as examples.

However, the difference in  $a_{P\beta}$  between solvents is negligible, *i.e.*, less than 0.3 G. Except for  $2^*$  and  $6t^*$ ,  $a_{\beta,Pmin}$  values are reported in formamide whereas the corresponding  $\theta_{max}$  are given in water, except for  $4c^*$  and  $7t^*$ . This denotes solvent effects strongly dependent on the structure of the nitroxide.  $\Delta\theta$  varies from  $9^\circ$  to  $14^\circ$ , whatever the difference in  $a_{\beta,Pmax}$  and  $a_{\beta,Pmin}$  for  $3^*$ – $7t^*$  (Table 4). This denotes very similar conformations and conformational changes for both *cis* and *trans* series. Amazingly, the highest values observed for  $\theta_{max}$  for  $3^*$ – $7t^*$  are similar to the lowest value observed for  $\theta$  for  $2^*$ , meaning that the bond rotations in  $3^*$ – $7t^*$  are restricted.

### Multiparameter correlations

As several outliers and significant scatterings were observed when mono-parameter correlations were performed, multiparameter relationships based on the Koppel–Palm (KP) and the Kalmet–Abboud–Taft (KAT) relationships (eqn (10) and (11), and eqn (15) and (16), respectively) were tested with  $a_N$  and

$a_{P\beta}$ . The KP relationship is a 6-parameter relationship combining two non-specific parameters – the polarizability parameter based on the refractive index  $n$ , given by the Lorenz–Lorentz function (eqn (12)), and the polarity parameter, based on the relative permittivity  $\epsilon_r$ , given by the Kirkwood function (eqn (13)) – and four solvent specific parameters – the solvent basicity/nucleophilicity parameter  $B$ , the solvent acidity/electrophilicity parameter  $E$ , the Hildebrand's solubility parameter  $\delta_H$ , and the molar volume  $V_M$  of the solvent. The values of  $E$  were determined using eqn (14) based on the Kirkwood (eqn (13)) and Lorenz–Lorentz (eqn (12)) functions and the Dimroth–Reichardt polarity parameter  $E_{T,30}$ .

$$\log a_N = \log a_{N,0} + a_1 f(n^2) + a_2 f(\epsilon_r) + a_3 B + a_4 E + a_5 \delta_H^2 + a_6 V_M \quad (10)$$

$$\log a_{\beta,P} = \log a_{\beta,P,0} + b_1 f(n^2) + b_2 f(\epsilon_r) + b_3 B + b_4 E + b_5 \delta_H^2 + b_6 V_M \quad (11)$$

$$f(n^2) = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \quad (12)$$

¶¶ These two relationships are often used to investigate the solvent effects. See ref. 13.

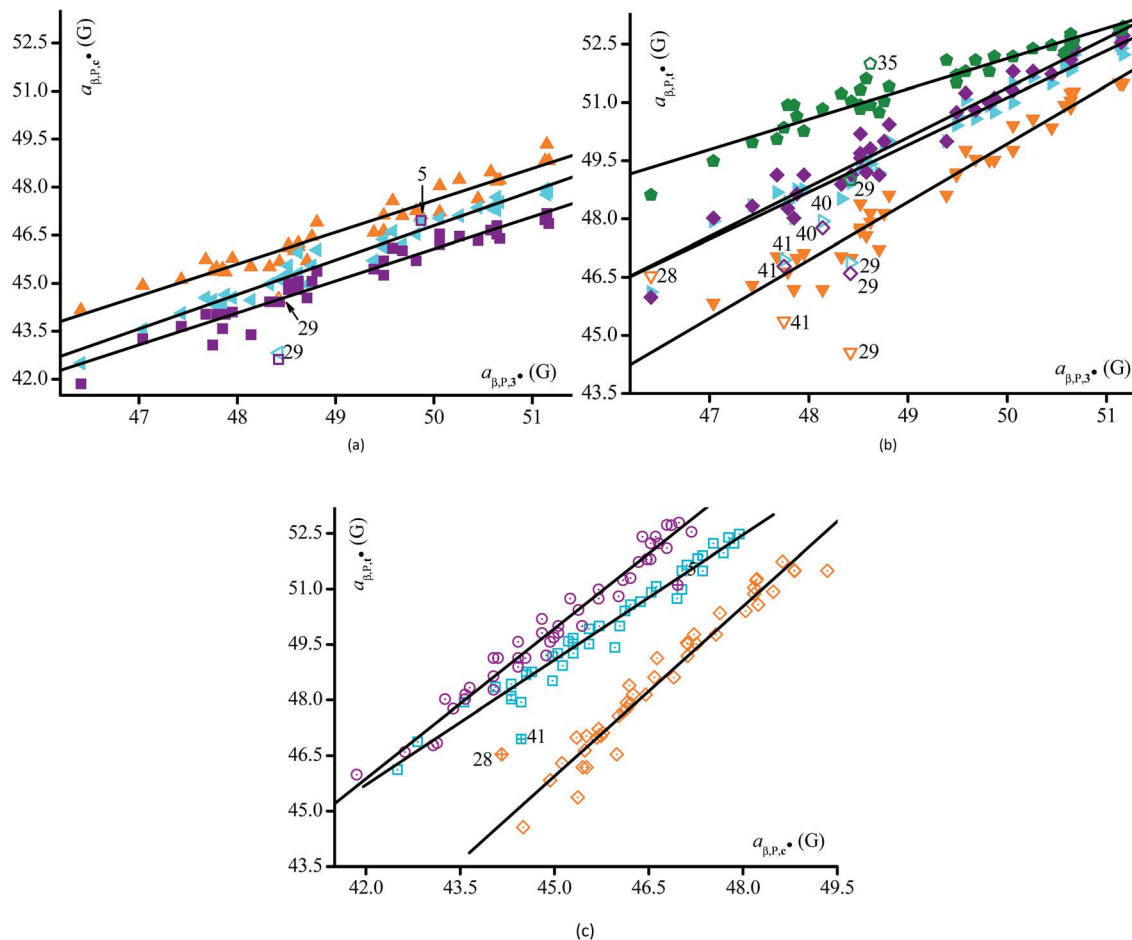


Fig. 8 (a) Plots  $a_{\beta,P,3^*}$  vs.  $a_{\beta,P}$  for  $4c^*$  ( $\blacktriangleleft$ ),  $5c^*$  ( $\blacksquare$ ), and  $6c^*$  ( $\blacktriangle$ ). (b) Plots  $a_{\beta,P,3^*}$  vs.  $a_{\beta,P}$  for  $4t^*$  ( $\blacktriangleright$ ),  $5t^*$  ( $\blacklozenge$ ),  $6t^*$  ( $\blacktriangledown$ ), and  $7t^*$  ( $\blacklozenge$ ). (c) Plots  $a_{\beta,P,3^*}$  vs.  $a_{\beta,P}$  for  $4$  ( $\square$ ),  $5$  ( $\circ$ ), and  $6$  ( $\diamond$ ). Empty symbols are for outliers in (a) and (b). Crossed symbols are for outliers in (c).

$$f(\epsilon_r) = \frac{(\epsilon_r - 1)}{(2\epsilon_r + 1)} \quad (13)$$

$$E = E_{T,30} - 25.10 - 14.84f(\epsilon_r) - 9.59f(n^2) \quad (14)$$

Whatever the combination of parameters – from one to six parameters – applied to the KP relationship (eqn (10)) the basicity  $B$ , the molecular volume  $V_M$  and the polarizability  $f(n^2)$  are useless to describe the effect of the solvent on  $a_N$ , except for

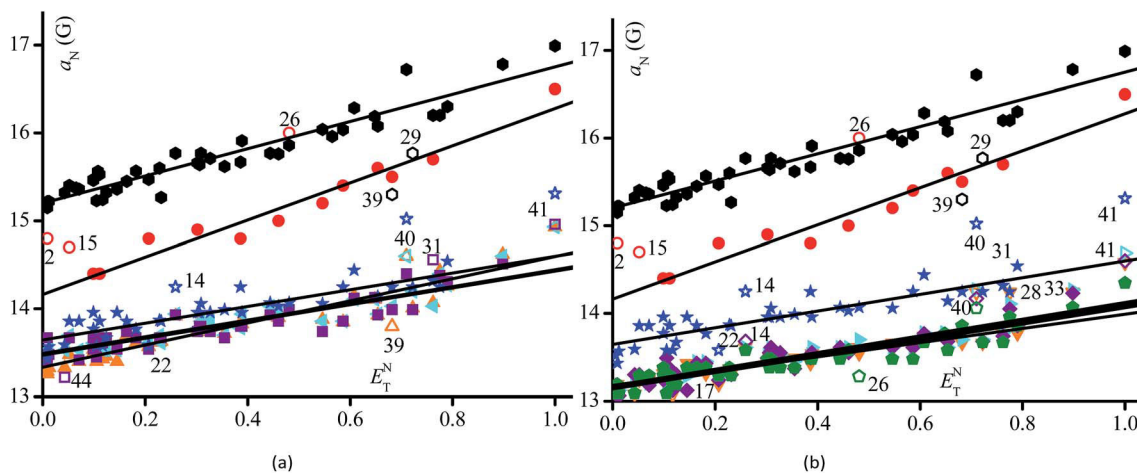


Fig. 9 Plots  $E_T^N$  vs.  $a_N$  for (a)  $1^*$  ( $\bullet$ ),  $2^*$  ( $\bullet$ ),  $3^*$  ( $\star$ ),  $4c^*$  ( $\blacktriangleleft$ ),  $5c^*$  ( $\blacksquare$ ), and  $6c^*$  ( $\blacktriangle$ ), (b)  $1^*$  ( $\bullet$ ),  $2^*$  ( $\bullet$ ),  $3^*$  ( $\star$ ),  $4t^*$  ( $\blacktriangleright$ ),  $5t^*$  ( $\blacklozenge$ ),  $6t^*$  ( $\blacktriangledown$ ) and  $7t^*$  ( $\blacklozenge$ ). Empty symbols are for outliers.



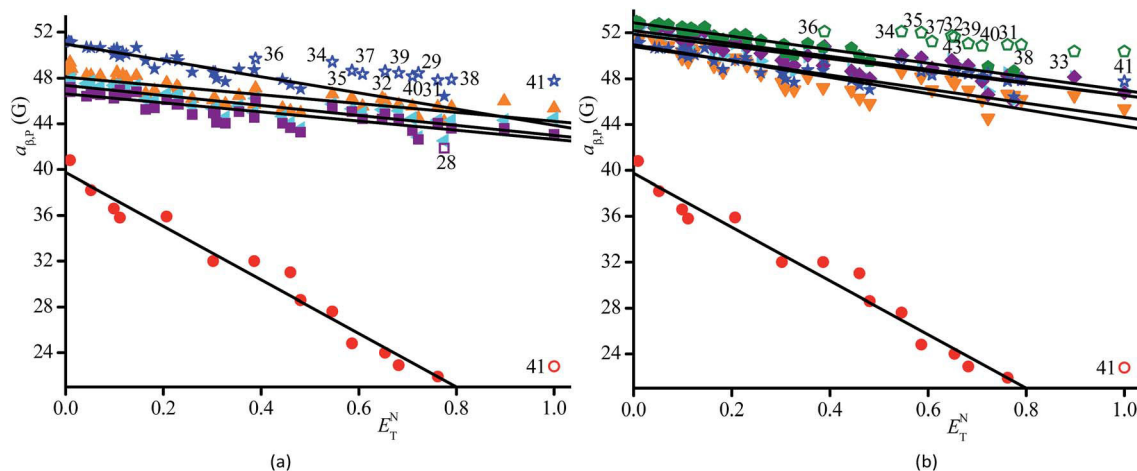


Fig. 10 Plots  $E_T^N$  vs.  $a_{\beta,P}$  for (a)  $2^*$  (●),  $3^*$  (★),  $4c^*$  (▲),  $5c^*$  (■), and  $6c^*$  (▲), (b)  $2^*$  (●),  $4t^*$  (▶),  $5t^*$  (◆),  $6t^*$  (▼) and  $7t^*$  (●). Empty symbols are for outliers.

Table 2 Correlations for  $a_N$  vs.  $E_T^N$  for  $1^*$ – $7t^*$  in various solvents

Eqn	Nitroxide	Slope $\alpha_7$	Error <sup>a</sup>	y-Intercept	Error <sup>a</sup>	$R^{2b}$	$N^c$	Outliers
(7a)	$1^*$	1.55	8	15.20	3	0.90	44	29, 39
(7b)	$2^*$	2.12	15	14.16	8	0.96	12	2, 15, 26
(7c)	$3^*$	0.95	8	13.64	3	0.81	36	14, 22, 40, 41
(7d)	$4c^*$	0.95	6	13.49	3	0.85	41	40, 41
(7e)	$4t^*$	0.95	6	13.17	2	0.86	41	40, 41
(7f)	$5c^*$	0.96	7	13.47	3	0.81	40	31, 41, 44
(7g)	$5t^*$	0.94	6	13.16	3	0.84	40	14, 40, 41
(7h)	$6c^*$	1.26	7	13.33	3	0.88	41	39, 40
(7i)	$6t^*$	0.81	5	13.18	2	0.86	38	17, 28, 33, 40, 41
(7j)	$7t^*$	0.93	6	13.13	3	0.86	41	26, 40

<sup>a</sup> Error given on the last digit. <sup>b</sup> Square of the regression coefficient. <sup>c</sup> Number of data.

$1^*$  for which a correlation is observed (eqn (10a)) with  $E$  and  $f(n^2)$  and not with  $f(\epsilon_r)$ . For  $2^*$ , only  $E$  is sufficient to describe the effect of the solvent (the occurrence of the polarizability  $f(n^2)$  is 84% reliable, below the conventional statistical requirements (eqn (10b)) in Table 7). The solvent effect for  $3^*$ – $7t^*$  is described by the acidity  $E$  and the cohesive pressure  $c$  (as an example see Fig. 4SI†). For  $5c^*$  MeOH (31) and Et<sub>3</sub>N (44) are outliers, for  $5t^*$ , chloroform (14) and i-Pr<sub>2</sub>O (18) are outliers, with no rationale at this time, and TEG (39) is outlier for  $6c^*$  – likely due to its high viscosity (Table 5).

Noteworthy, solvent effects in nitroxides  $4^*$ – $6^*$  are also well described by the cohesive pressure  $c$  and the polarizability  $f(\epsilon_r)$  (see Table 7SI†).

Whatever the combination of parameters – from one to six parameters – applied to the KP relationship (eqn (11)), the basicity  $B$  and polarizability  $f(n^2)$  are useless to describe the effects of the solvent on  $a_{\beta,P}$  (very poor statistical outputs). Surprisingly, the changes in  $a_{\beta,P}$  of  $2^*$  with the solvent cannot be described by eqn (11). Interestingly,  $a_{\beta,P}$  for  $4^*$ – $7t^*$  are described by a 3 parameter KP relationship (Table 6):  $f(\epsilon_r)$  (polarity),  $c$  (cohesive pressure), and  $V_M$  (molar volume). Indeed, good statistical outputs are obtained with two parameters ( $f(\epsilon_r)$  and  $c$ ) but the scattering is decreased when  $V_M$  is included (Fig. 5SI

and 6SI†). At the difference of  $4^*$ – $7t^*$ ,  $a_{\beta,P}$  of  $3^*$  are described by a two-parameter correlation:  $f(\epsilon_r)$  and  $V_M$ . Water (41) is the only outlier observed for KP relationships relying on  $f(c, f(\epsilon_r))$  or  $f(c, f(\epsilon_r), V_M)$ . Water is a small molecule, it might occur that its effect might not be described using conventional molecular descriptors.<sup>13,36,37</sup> In the case of  $6t^*$ , no outliers are observed when  $f(\epsilon_r)$ ,  $c$ , and  $V_M$  are used as parameters.

Solvent effects on  $a_N$  and  $a_{\beta,P}$  are also described by the KAT relationships (eqn (15) and (16), respectively) relying on 4–6 cybotactic parameters:<sup>13</sup> one non specific parameter  $\pi^*$  describing the polarity/polarizability effect, the discontinuous polarizability correction term  $\delta$ , the Hydrogen Bonding Acceptor (basicity) HBA property  $\beta$  and the Hydrogen Bonding Donor (acidity) property  $\alpha$ . In some cases, cohesive pressure  $c$  is included in the KAT relationship. In our case, the intrinsic volume  $V_X$ , as given by McGowan,<sup>38</sup> was also included.

|||  $a_{\beta,P}$  of  $4t^*$ ,  $5t^*$  and  $6t^*$  are also described by another 3-parameter KP relationship relying on the polarity  $f(\epsilon_r)$ , the acidity/electrophily  $E$ , and the molar volume  $V_M$ , with good statistical outputs (see Table 3SI†). Good statistical outputs are obtained when  $f(\epsilon_r)$  and  $E$  are used but the scattering decreases when  $V_M$  is included (Fig. 4SI†).

Table 3 Correlations for  $a_{\beta,P}$  vs.  $E_T^N$  for 2'-7t' in various solvents

Eqn	Nitroxide	Slope $\alpha_g$	Error <sup>a</sup>	y-Intercept	Error <sup>a</sup>	$R^{2b}$	$N^c$	Outliers
(8a)	2'	-23.84	107	39.96	45	0.98	16	41
(8b)	3'	-7.09	50	50.94	14	0.88	29	29, 31, 32, 34-41
(8c)		-3.47	23	50.70	11	0.94	30	8-10, 12-14, 25-28
(8d)	4c'	-4.37	42	47.35	19	0.72	43	None
(8e)	4t'	-5.34	44	51.85	20	0.77	43	None
(8f)	5c'	-3.99	38	46.62	17	0.73	42	28
(8g)	5t'	-5.64	43	52.17	19	0.81	42	28
(8h)	6c'	-3.86	41	48.08	19	0.69	43	None
(8i)	6t'	-6.16	54	50.78	25	0.75	43	None
(8j)	7t'	-5.89	30	52.86	9	0.92	31	31-41, 43
(8k)		-2.17	18	52.67	8	0.84	29	8-14, 16, 24-30

<sup>a</sup> Error given on the last digit. <sup>b</sup> Square of the regression coefficient. <sup>c</sup> Number of data.

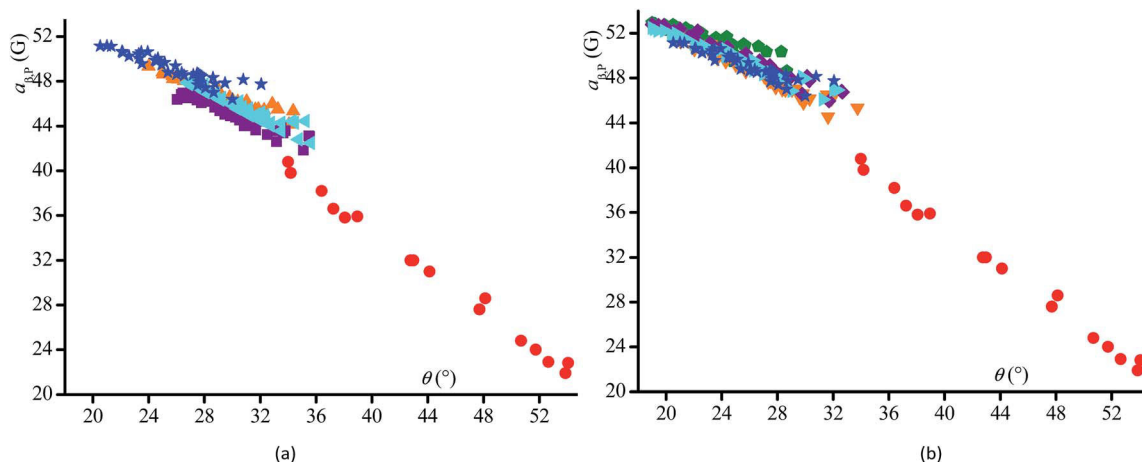


Fig. 11 Plots  $\theta$  vs.  $a_{\beta,P}$  for (a) 2' (●), 3' (★), 4c' (◀), 5c' (■), and 6c' (▲), (b) 2' (●), 3' (★), 4t' (▶), 5t' (◆), 6t' (▼) and 7t' (◆).

$$\log a_N = \log a_{N0} + c_1(\pi^* + c_2\delta) + c_3\alpha + c_4\beta + c_5\delta_H^2 + (c_6V_X) \quad (15)$$

$$\log a_{\beta,P} = \log a_{\beta,P0} + d_1(\pi^* + d_2\delta) + d_3\alpha + d_4\beta + d_5\delta_H^2 + (d_6V_X) \quad (16)$$

$$E_T^N = 0.36\pi^* + 0.47\alpha + 0.01 \quad (17)$$

Whatever the combination of parameters - from one to six parameters - applied to the KAT relationship (eqn (15)); the HBA property  $\beta$ , the intrinsic molecular volume  $V_X$ , and the discontinuous polarizability correction term  $\delta$  are useless to describe the effects of the solvent on  $a_N$  (very poor statistical outputs). The normalized Reichardt  $E_T^N$  encompasses three effects: polarity, polarizability, and HBD property  $\alpha$  of the

Table 4  $a_{\beta,Pmax}$  and the corresponding  $a_N$ ,  $a_{\beta,Pmin}$  and the corresponding  $a_N$ , dihedral angle  $\theta_1$ ,  $\theta_{max}$ , and the difference  $\Delta\theta$  in their corresponding solvents for nitroxides 2'-7t'

Nitroxide	Solvent	$a_{\beta,Pmax}$ (G)	$a_N$ (G)	$\theta_1^a$ (°)	Solvent	$a_{\beta,Pmin}$ (G)	$a_N$ (G)	$\theta_{max}^b$ (°)	$\Delta\theta^c$ (°)
2'	n-Hexane	40.80	14.80	34	MeOH	21.90	16.20	54	20
3'	Cyclohexane	51.17	13.52	21	Formamide	46.41	14.25	32	11
4c'	n-Octane	47.94	13.53	27	Formamide	42.50	14.40	36 <sup>d</sup>	9
4t'	n-Octane	52.48	13.12	19	Formamide	46.12	14.11	32	12
5c'	n-Pentane	47.18	13.67	27 <sup>e</sup>	Formamide	41.85	14.38	36	10
5t'	n-Octane	52.79	13.06	19	Formamide	45.98	14.05	33	14
6c'	n-Pentane	49.34	13.26	24	Formamide	44.16	14.43	34	10
6t'	n-Hexane	51.74	13.19	21	NMF <sup>f</sup>	44.56	13.66	34	13
7t'	Cyclohexane	52.95	13.09	19	Formamide	48.62	13.96	29 <sup>d</sup>	10

<sup>a</sup>  $\theta_1$  corresponds to  $\theta_{min}$  unless otherwise mentioned. <sup>b</sup> Given in water unless otherwise mentioned. <sup>c</sup>  $\Delta\theta = \theta_{max} - \theta_{min}$ . <sup>d</sup> Given in formamide. <sup>e</sup> In Et<sub>3</sub>N,  $\theta_{min} = 26^\circ$ . <sup>f</sup> NMF = N-methyl formamide.

Table 5 Koppel–Palm linear correlations of  $a_N$  for 1\*–7t\*

Eqn	Nitroxide	y-Intercept <sup>a</sup>	$a_4^{a,b}$	$a_5^{a,b}$	$R^{2c}$	$N^d$	$F$ -Test <sup>e</sup>	$w_{\epsilon}^f$	$w_c^f$	Outliers
(10a)	1* <sup>g</sup>	14.82 (14)	0.056 (2)	— <sup>h</sup>	0.94	41	280	89	11 <sup>i</sup>	29, 39
(10b)	2 <sup>j</sup>	15.09 (44)	0.058 (6)	— <sup>h</sup>	0.93	15	82	86	14 <sup>i</sup>	2, 15, 26
(10c)	3*	13.55 (4)	0.017 (6) <sup>k</sup>	0.0006 (1) <sup>l</sup>	0.88	28	95	34	66	14, 28
(10d)	4c*	13.46 (2)	0.020 (4)	0.0004 (1)	0.91	39	182	48	52	33
(10e)	4t*	13.12 (3)	0.020 (10)	0.0004 (1)	0.90	39	171	48	52	33
(10f)	5c*	13.43 (3)	0.027 (4)	0.0003 (1) <sup>m</sup>	0.89	37	135	62	38	31, 44
(10g)	5t*	13.11 (3)	0.028 (3)	0.0003 (1) <sup>n</sup>	0.90	38	154	65	35	14, 18
(10h)	6c*	13.34 (3)	0.036 (4)	0.0002 (1) <sup>o</sup>	0.90	39	167	78	22	39
(10i)	6t*	13.09 (3)	0.022 (4)	0.0004 (1)	0.90	39	160	51	49	33
(10j)	7t*	13.14 (3)	0.024 (3)	0.0002 (1)	0.86	33	96	68	32	None

<sup>a</sup> Errors are given on the last digit in parentheses. <sup>b</sup> Student *t*-test at 99.99% unless otherwise mentioned. <sup>c</sup> Square of the regression coefficient. <sup>d</sup> Number of data. <sup>e</sup> Student–Fischer *F*-test given at 99.99% unless otherwise mentioned. <sup>f</sup> Weight of each parameter in percent with an error of  $\pm 7\%$  as given by eqn (18) and (19). <sup>g</sup> Polarizability was the only parameter affording reliable statistical outputs, *i.e.*,  $a_1 = 1.61$  (50) and  $t = 99.73\%$ . <sup>h</sup> Not included in the correlation. <sup>i</sup> Given for  $f(n^2)$ . <sup>j</sup>  $a_1 = -2.39$  (1.59) and *t*-test at 84%. Other possibilities were even worse. <sup>k</sup>  $t = 98.50\%$ . <sup>l</sup>  $t = 99.00\%$ . <sup>m</sup> *t*-Test at 99.94%. <sup>n</sup> *t*-Test at 99.90%. <sup>o</sup>  $t = 99.35\%$ .

Table 6 Koppel–Palm multiparameter correlations (eqn (11)) based on the Kirkwood function of the relative permittivity  $\epsilon_r$ , the cohesive pressure  $c$  (square of the Hildebrand solubility parameter  $\delta$ ), and on the molar volume  $V_M$  for nitroxides 3\*–7t\*

Eqn		$\log a_{\beta,P,0}^a$	$b_2^{a,b}$	$b_5^{a,b}$	$b_6^{a,b}$	$R^{2c}$	$F^d$	$N^e$	$w_{f(\epsilon_r)}^f$	$w_c^f$	$w_{V_M}^f$	Outliers
(11a)	3*	50.4 (7)	−6.8 (12)	— <sup>g</sup>	0.014 (4) <sup>h</sup>	0.79	62	35	60		40	34
(11b)	4c*	47.8 (7)	−5.8 (12)	−0.0019 (5) <sup>i</sup>	0.012 (4)	0.87	82	39	41	34	25	41
(11c)	4t*	52.2 (8)	−5.6 (14) <sup>i</sup>	−0.0026 (5)	0.012 (5) <sup>i</sup>	0.86	74	39	36	41	23	41
(11d)	5c*	47.0 (7)	−4.3 (13) <sup>k</sup>	−0.0022 (5) <sup>h</sup>	0.009 (4) <sup>l</sup>	0.82	54	39	34	44	22	41
(11e)	5t*	52.7 (7)	−6.1 (13)	−0.0029 (5)	0.013 (4) <sup>m</sup>	0.90	100	39	35	42	23	41
(11f)	6c*	48.6 (7)	−5.3 (13) <sup>h</sup>	−0.0016 (5) <sup>n</sup>	0.009 (4) <sup>o</sup>	0.82	55	39	44	33	23	41
(11g)	6t*	51.8 (11)	−10.4 (18)	−0.0009 (5) <sup>p</sup>	0.015 (6) <sup>q</sup>	0.82	54	40	56	19	25	None
(11h)	7t*	53.4 (7)	−5.2 (11)	−0.0018 (4) <sup>r</sup>	0.007 (4) <sup>q</sup>	0.89	63	28	45	38	17	31, 32, 34–36, 38, 41

<sup>a</sup> Errors are given on the last digit in parentheses. <sup>b</sup> Student *t*-test of confidence given at 99.99% unless otherwise mentioned. <sup>c</sup> Square of the regression coefficient. <sup>d</sup> Student–Fischer *F*-test of reliability given at 99.99% confidence. <sup>e</sup> Number of data. <sup>f</sup> Weight of each parameter in percent with an error of  $\pm 7\%$  as given by eqn (18) and (19). <sup>g</sup> Not included in the correlation. <sup>h</sup>  $t = 99.90\%$ . <sup>i</sup>  $t = 99.98\%$ . <sup>j</sup>  $t = 99.00\%$ . <sup>k</sup>  $t = 99.80\%$ . <sup>l</sup>  $t = 97.40\%$ . <sup>m</sup>  $t = 99.64\%$ . <sup>n</sup>  $t = 99.95\%$ . <sup>o</sup>  $t = 97.80\%$ . <sup>p</sup>  $t = 91.70\%$ . <sup>q</sup>  $t = 98.20\%$ . <sup>r</sup>  $t = 99.96\%$ .

solvent (eqn (17)). As expected from eqn (17) and correlations  $a_N = f(E_T^N)$  (Table 2), good correlations involving  $\pi^*$  and  $\alpha$  are obtained and they are reported in Table 7. Nevertheless, the use of a 3-parameter correlation using  $c$  affords better statistical outputs (Table 7), which is observed as a decrease in the scattering (Fig. 7SI†). Interestingly, the use of  $c$  for the correlation of 4t\*, 5t\*, and 6t\* leads to suppress the outliers observed when two parameter correlations are applied. Several outliers are observed that are different for each nitroxide, and also different according to the type of correlation applied (2- (see Table 9SI†) or 3-parameter correlations, except for 1\* and 2\*) and also different from those reported for  $a_N = f(E_T^N)$  (Table 2).

Whatever the combination of parameters – from one to six parameters – applied to the KAT relationship (eqn (16)): the HBA property  $\beta$  and the discontinuous polarizability correction term

$\delta$  are useless to describe the effects of the solvent on  $a_{\beta,P}$  (very poor statistical outputs). As expected from correlations  $a_{\beta,P} = f(E_T^N)$  and eqn (17), polarity/polarizability  $\pi^*$  and HBD property  $\alpha$  are required to describe  $a_{\beta,P}$  values.\*\*\* The biparameter ( $\pi^*$ ,  $\alpha$ ) relationships are slightly improved when the intrinsic volume  $V_X$  is included, as exemplified with 6c\* (Fig. 8SI†). Interestingly,  $a_{\beta,P}$  for 3\* are well described using either  $\pi^*$  and  $\alpha$  or  $\pi^*$  and  $V_X$  (see Table 10SI†) as parameters whereas only a moderate correlation with  $\pi^*$  and  $V_X$  is observed for 7t\* (7 outliers in Table 8). Acetonitrile (25), nitromethane (26), formamide (28), *N*-methyl formamide (29), and water (41) are the most frequently observed outliers, with no rationale at this time.

Besides the absolute values of the coefficients of the KP and KAT relationships which describe the impact of each effect, the relative distribution given by their weight ( $w$  in %, eqn (18) and (19)) provides information on their relative

\*\*\* However, for 4c\* and 6c\*, the HBD  $\alpha$  parameter might be replaced by  $c$ , affording better correlations (see Table 5SI†), *e.g.*, for 6c\* (Fig. 5SI†). For 4c\* and 6c\*, good correlations are observed using  $\pi^*$ ,  $c$ , and  $V_X$  as parameters (Fig. 5SI†).

**Table 7** Kalmét–Aboud–Taft multiparameter correlations (eqn (15)) for  $a_N$  of nitroxides **1**–**7t**\* based on the polarity/polarizability parameter  $\pi^*$ , the cohesive pressure  $c$ , and on the Hydrogen Bonding Donor (HBD) parameter  $\alpha$  of solvents

Eqn		y-Intercept <sup>a</sup>	$c_1^{a,b}$	$c_3^{a,b}$	$c_5^{a,b}$	$R^{2c}$	$F^d$	$N^e$	$w_{\pi^*f}$	$w_{\alpha}^f$	$w_c^f$	Outliers
(15a)	<b>1</b> *	15.18 (3)	0.49 (6)	0.68 (4)	0.0002 (6) <sup>g</sup>	0.96	281	41	30	58	12	29, 39
(15b)	<b>2</b> *	14.00 (14)	1.05 (20) <sup>h</sup>	1.13 (9)	— <sup>i</sup>	0.96	103	12				2, 15, 26
(15c)	<b>3</b> *	13.57 (4)	0.55 (7)	0.41 (6)	— <sup>i</sup>	0.84	86	35	55	45		41
(15d)	<b>4c</b> *	13.41 (3)	0.29 (6)	0.23 (5)	0.0004 (1)	0.93	167	39	27	26	46	33
(15e)	<b>4t</b> *	13.07 (3)	0.35 (6)	0.34 (4)	0.0003 (1)	0.93	154	40	30	27	43	None
(15f)	<b>5c</b> *	13.34 (4)	0.36 (6)	0.35 (5)	0.0004 (1)	0.91	117	38	27	36	37	1, 31
(15g)	<b>5t</b> *	13.09 (3)	0.33 (7)	0.35 (5)	0.0003 (1) <sup>j</sup>	0.90	108	40	30	37	33	None
(15h)	<b>6c</b> *	13.26 (3)	0.51 (6)	0.41 (4)	0.0002 (1)	0.95	227	39	39	42	19	39
(15i)	<b>6t</b> *	13.07 (3)	0.26 (7) <sup>k</sup>	0.38 (5)	0.0003 (1)	0.91	123	40	22	45	33	None
(15j)	<b>7t</b> *	13.09 (2)	0.29 (5)	0.25 (4)	0.0003 (1)	0.94	150	32	29	31	40	26, 33

<sup>a</sup> Errors are given on the last digit in parentheses. <sup>b</sup> Student *t*-test of confidence given at 99.99% unless otherwise mentioned. <sup>c</sup> Square of the regression coefficient. <sup>d</sup> Student–Fischer *F*-test of reliability given at 99.99% confidence. <sup>e</sup> Number of data. <sup>f</sup> Weight of each parameter in percent with an error of  $\pm 7\%$  as given by eqn (18) and (19). <sup>g</sup>  $t = 99.10\%$ . <sup>h</sup>  $t = 99.94\%$ . <sup>i</sup> Not used in the correlation. <sup>j</sup>  $t = 99.98\%$ . <sup>k</sup>  $t = 99.96\%$ .

**Table 8** Kalmét–Aboud–Taft multiparameter correlations (eqn (16)) for  $a_{B,P}$  of nitroxides **2**–**7t**\* based on the polarity/polarizability parameter  $\pi^*$ , the intrinsic volume  $V_X$ , and on the Hydrogen Bonding Donor (HBD) parameter  $\alpha$  of solvents

Eqn		y-Intercept <sup>a</sup>	$d_1^{a,b}$	$d_3^{a,b}$	$t^b$	$d_6^{a,b}$	$t$	$R^{2c}$	$F^d$	$N^e$	$w_{\pi^*f}$	$w_{\alpha}^f$	$w_{V_X}^f$	Outliers
(16a)	<b>2</b> *	40.52 (58)	−9.87 (93)	−12.86 (63)	99.99	— <sup>g</sup>	— <sup>f</sup>	0.98	297	14	34	66		41
(16b)	<b>3</b> *	51.00 (11)	−2.75 (20)	−0.56 (18)	99.55	— <sup>g</sup>	— <sup>f</sup>	0.91	146	30	81	19		12, 13, 25, 26, 28, 31
(16c)	<b>4c</b> *	46.40 (49)	−2.94 (37)	−0.69 (28) <sup>h</sup>	98.30	1.60 (47)	99.82	0.84	60	39	57	18	25	41
(16d)	<b>4t</b> *	51.31 (38)	−3.44 (38)	−0.77 (21) <sup>i</sup>	99.91	1.15 (36)	99.96	0.91	117	38	63	19	18	28, 29
(16e)	<b>5c</b> *	46.29 (31)	−2.45 (23)	−0.66 (17) <sup>j</sup>	99.95	0.69 (30)	97.10	0.90	97	35	63	23	14	5, 25, 26, 28, 29
(16f)	<b>5t</b> *	51.34 (40)	−3.44 (30)	−0.92 (22) <sup>k</sup>	99.98	1.43 (38)	99.94	0.91	121	38	58	21	21	28, 29
(16g)	<b>6c</b> *	47.86 (36)	−3.24 (27)	−0.41 (20) <sup>l</sup>	95.00	0.96 (35)	99.00	0.89	96	39	71	12	17	41
(16h)	<b>6t</b> *	50.78 (40)	−4.26 (30)	−1.02 (22)	99.99	0.77 (40)	94.30	0.94	159	37	68	22	10	25, 26, 29
(16i)	<b>7t</b> *	52.23 (23)	−1.89 (18)	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	0.007 (2)	99.36	0.87	102	32	77	23		10, 12, 13, 25, 26, 28, 29

<sup>a</sup> Errors are given on the last digit in parenthesis. <sup>b</sup> Student *t*-test of confidence given at 99.99% unless otherwise mentioned. <sup>c</sup> Square of the regression coefficient. <sup>d</sup> Student–Fischer *F*-test of reliability given at 99.99% confidence. <sup>e</sup> Number of data. <sup>f</sup> Weight of each parameter in percent with an error of  $\pm 7\%$  as given by eqn (18) and (19). <sup>g</sup> Not used in the correlation. <sup>h</sup>  $t = 98.30\%$ . <sup>i</sup>  $t = 99.91\%$ . <sup>j</sup>  $t = 99.95\%$ . <sup>k</sup>  $t = 99.98\%$ . <sup>l</sup>  $t = 95.00\%$ .

importance.<sup>39,40</sup> The weight (eqn (18)) of each effect depends on each parameter  $C_i$  – which are not on the same scale – and their respective weighted parameters  $\alpha_i$  given in eqn (19). The latter depends on the average of each parameter and on the degree of freedom (number of data  $N$  and number of parameters  $p$ , eqn (19)).

$$w = \frac{\alpha_i C_i}{\sum \alpha_i C_i} \quad (18)$$

$$\alpha_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}_i)^2}{N - (p - 1)}} \quad (19)$$

## Discussion

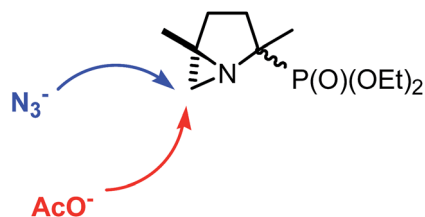
### Preparation of nitroxides **4**–**6**\*

Aziridines are analogues of epoxides, except that they are much less applied and are considered as ugly cousins.<sup>41</sup> Nevertheless, aziridines can readily react as epoxides do, when a strong electronwithdrawing group is attached to the nitrogen atom. In

our case, although weakly activated, aziridines turn out to be versatile key intermediates affording an easy and diastereoselective access to nitroxides **4**–**7t**\* via the one-step addition of the azide and acetoxy groups (Scheme 5). The combination of the polar (electronwithdrawing effect of the diethoxyphosphoryl group) and steric effects affords a selective addition of the nucleophile on the methylenic carbon. This approach is currently under development for the preparation of new nitroxides, for example those carrying thioalkyl or thioester groups.

### General considerations on hccs

For historical considerations,<sup>9</sup>  $a_N$  of **1**\* are commonly accepted as the benchmark values all other  $a_N$  are compared with. As displayed in Fig. 5 and Table 2SI†, good correlations are reported ( $R^2 > 0.85$ ) although several outliers are observed. Hence,  $a_N$  of **2**\* to **7t**\* experienced the same effect as that experienced by  $a_N$  of **1**\* but to a different extent (Table 2SI†), as highlighted by the slopes greater than 1 for **2**\*, between 0.69 and 0.82 for **3**–**6**\*, and 0.6 for **7t**\*. Better correlations are observed when  $a_N$  of **3**\* is used as reference (Table 3SI† and Fig. 6). Interestingly, except



Scheme 5 Aziridine as versatile key intermediate in the preparation of 4'-7t'.

6c' and 7t' – slopes of *ca.* 0.87 and 0.66, respectively – all phosphorylated nitroxides experienced the same solvent effect, *i.e.*, slope  $\approx 0.7$ –0.8 (Table 3SI†).

Given by the EPR theory,<sup>21</sup> the hyperfine coupling on position  $\alpha$  is directly related to the electron density localized on the nucleus, *i.e.*, the Fermi contact term  $Q_N$  given in eqn (20). This term depends on the shape of the localized orbital describing the odd electron. That is, for  $\pi$ -radicals, the SOMO is of p-shape, *i.e.*, a low *s*-character and then a low spin density in contact with the nucleus, and thus any increase in the *s* character will lead to an increase in electron density and, hence, to an increase in  $a_N$ .

$$a_X = cteQ_N \quad (20)$$

In the case of nitroxides, the electron density  $Q_N$  is controlled both by the presence of electron withdrawing groups (EWG) – which favours form A over form B (Fig. 12),<sup>7,9,10</sup> that is,  $Q_N$  decreases,  $a_N$  decreases – and by the hybridisation (pyramidalization) at the nitrogen atom, varying from  $sp^3$  to  $sp^2$  (Fig. 13), *i.e.*, the higher the pyramidalization (form C), the higher the character *s* in the SOMO, the higher  $a_N$  and conversely.

Plots  $a_{N,1'}$  vs.  $a_{N,3'-7t'}$  (Fig. 5) displayed 4 families (Table 2SI†): 2' with a slope greater than 1 implying higher accessibility of the nitroxyl moiety to the solvent despite the presence of EWG (*vide infra*), 3' and 6c' with a slope around 0.83, 4c'-5t' and 6t' exhibiting slopes close to 0.7 and 7t' with a slope at 0.6. The slopes less than 1 for the other families were due to a subtle interplay of polar effect, steric hindrance and steric strain (*vide infra*). To suppress the ring strain, plots  $a_{N,3'}$  vs.  $a_{N,4'-7t'}$  were performed (Fig. 6) showing 3 families: 4c'-5t' and 6t' with slopes between 0.7 and 0.8, 6c' with a slope at 0.87, and 7t' with a slope at 0.66, highlighting again the subtle interplay of steric hindrance and polarity effect as all exhibit lower solvation effect than 3', as 6c' is better solvated than 6t' although it exhibited the same polarity, and 7t' the least efficiently solvated. Nevertheless, these results must be discussed cautiously as 4-5 solvents were considered as outliers for each nitroxide.

The Heller-McConnel relationship (1) shows that  $a_{\beta,P}$  is directly proportional to the electron density  $\rho_N^{\pi}$ ,<sup>21</sup> which, in turn, is expected to be linearly related to  $a_N$ , implying that increasing  $a_{\beta,P}$  is expected with increasing  $a_N$ , provided no change in the hybridization or in the mode of solvation.<sup>10,21</sup> Hence, a decrease in  $a_{\beta,P}$  is observed with increasing  $a_N$  (Table 1) leading to scattered plots between  $a_{\beta,P}$  and both  $a_{N,1'}$  and  $a_{N,3'}$  (Fig. 7). Thus,  $a_{\beta,P}$  of 3' was applied as reference for 4' to 7t' (Fig. 8). Interestingly, 4c'-6c' (Table 4SI† and Fig. 8) exhibit

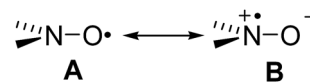


Fig. 12 Mesomeric forms of the nitroxyl moiety.

the same slope as 3', meaning that the solvation of the nitroxyl moiety has the same impact on their conformations. On the other hand, 4t'-6t' exhibit a higher impact whereas it is lower for 7t' (Table 5SI†).

### Correlations based on the normalized Dimroth-Reichardt constants $E_T^N$

The correlations  $a_N$  with  $E_T^N$  or  $E_{T(30)}$  have been known since the work of Napier *et al.*<sup>9</sup> for 1' and that of Il'Yasov and coll.<sup>12</sup> for 2'. As recently reported,<sup>17</sup> the lower *y*-intercept for  $\beta$ -phosphorylated nitroxides than for 1' is due to the presence of the strong EWG P(O)(OEt)<sub>2</sub> ( $\sigma_1 = 0.32$ )<sup>42</sup> favouring form A over form B (Fig. 12). Thus, the lower *y*-intercept for 4'-7t' than for 3' is due to the presence of a second EWG. The lower *y*-intercept for the *trans* series than for the *cis* series is due to a more pronounced  $sp^2$  character of the N atom in the *trans* series (Fig. 13), denoting a larger strain. Recently we observed that the solvent effect (slope in eqn (7)) increased in series 3' < 1' < 2' due to changes both in accessibility (steric hindrance) and in sensitivity (presence of EWG) of the nitroxyl moiety.<sup>17</sup> The polarity of nitroxides is estimated using the Hammett constant  $\sigma_1$  given as -0.06, 0.27, 0.27, 0.43, 0.43, 0.43, 0.43, 0.45, 0.45, and 0.44 for 1'-7t', respectively. Hence, the nitroxides are gathered in 3 families of  $\sigma_1$ : 1', 2' and 3', and 4'-7t'. The slope increases in the series: 6t' < 3'  $\approx$  4'  $\approx$  5'  $\approx$  7t' < 6c' < 1' < 2' meaning that the polarity does not play the major role. Thus, the slopes of 4', 5', and 7t' are very close to that of 3', despite the presence of a second EWG, and this implies a change in the conformation affording a better access of the nitroxyl moiety to the solvent. For 6c' and 6t', the presence of strongly polar azide group implies strong repelling electrostatic interaction affording conformations exhibiting either a better (6c') or a lesser (6t') access of the nitroxyl moiety to the solvent than in 3'-5', and 7t'. The lower slopes for 3'-7t' than for 1' are in part due to higher polarity of these nitroxides than 1'.

The *y*-intercepts for the plots  $a_{\beta,P}$  vs.  $E_T^N$ , for  $E_T^N = 0$ , correspond to the  $a_{\beta,P}$  values expected in *n*-pentane and *n*-hexane. Due to the significant scattering of the data, the error between expected and experimental data is around 0.5 G (Table 3). Nevertheless, several trends emerged. The *y*-intercept (Table 3) shows that the position of the diethoxyphosphoryl groups is similar in 3' and in the *trans* series ( $\theta \approx 20^\circ$ , Table 4) and smaller than in the *cis* series ( $\theta \approx 25^\circ$ , Table 4), implying a better hyperconjugation effect and, hence, larger  $a_{\beta,P}$  values for 3' and the *trans* series.

Il'Yasov and coll.<sup>12</sup> showed that the  $a_{\beta,P}$  of 2' is temperature dependent, implying that the conformation of 2' changes with the temperature, meaning that the rotation around the C-N bond is partly free. Although the rotations around the C-N bond are restricted in the 6-membered ring, the exchange of the

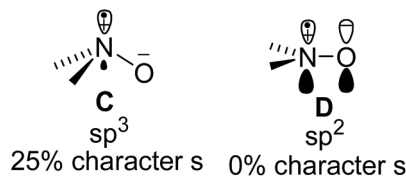


Fig. 13 Canonical forms for the hybridization at the nitrogen atom of a nitroxyl moiety and % of character *s* in the SOMO.

methyl groups between the equatorial and axial positions in symmetrical **1**<sup>•</sup> has no effect on the solvation of the nitroxyl moiety. On the other hand, eqn (1) shows that  $a_{\beta,p}$  depends on both the change in spin density given by  $\rho_N^\pi$  and the conformational changes given by  $\theta$ , meaning either the slope in eqn (8) increases as expected with the increasing the solvent polarity as form **B** is favoured over form **A**, provided no change in conformation, *i.e.*,  $\Delta\theta \approx 0^\circ$  or the slope decreases implying that the conformational changes, *i.e.*, increasing  $\theta$  values, overbalance the effect of the solvent polarity. Recently, we ascribed the solvent effect to a change of conformation for a negative slope. The trends observed in Table 3 shows that the influence of solvent increases in the series as the slopes decreases:  $7t^\bullet > 3^\bullet \approx 6c^\bullet \approx 5c^\bullet \approx 4c^\bullet > 4t^\bullet \approx 5t^\bullet > 6t^\bullet > 2^\bullet$ . It comes out that the solvent has the same effect for the *cis* series and **3**<sup>•</sup>. However, it is not possible to discuss quantitatively the influence of the polarity and the conformation changes on the slope.

Thus, applying eqn (9) affords some hints on the conformational changes through the variation in dihedral angle  $\Delta\theta$  (Fig. 11 and Table 4). Except for **2**<sup>•</sup> for which  $\Delta\theta = 20^\circ$ , values of  $\Delta\theta$  are centered at  $12^\circ \pm 3$ . Interestingly, the distribution of the  $\Delta\theta$  values is in good agreement with the slopes of eqn (4) and (5). Although such a small changes can have a clear effect on  $a_{\beta,p}$  ( $\Delta a_{\beta,p} \approx 2$  G for  $\Delta\theta \approx 2^\circ$ ), the change in conformation is not expected to be large enough to take into account the difference observed between the slopes.

Nevertheless, the negative slopes in eqn (8) mean that the increase in dihedral angle  $\theta$  overmatches the increase in spin density  $\rho_N^\pi$  due to the increase in solvent polarity (*vide supra*). It is likely that the phosphoryl group is solvated in the same way for all nitroxides and the increase in polarity of the solvent favours form **F** (Scheme 6).

It has been noted that increasing the polarity of the solvent favours the mesomeric forms **B** and **F** of the nitroxyl and phosphoryl moieties, respectively (Fig. 12 and Scheme 6), implying that the attractive dipole–dipole interaction between the positive P- and the negative O-atoms of the phosphoryl and the nitroxyl moieties, respectively, is the driving force leading to a change in the dihedral angle  $\theta$  (Scheme 7).<sup>†††</sup> Such a conformation change from a non polar to a polar solvent is expected to

<sup>†††</sup> Janzen and coll. in ref. 15 reported the same solvent effect (only benzene, methanol, and water have been investigated) for some  $\beta$ -phosphorylated nitroxides. They tentatively ascribed this effect to a change in conformation due to a difference in polarity of the mesomeric forms. Nevertheless, their discussion is very ambiguous and their schemes not convincing, although they might agree with our proposal.

lead ultimately to the formation of a highly strained 4-membered ring of the azaoxaphosphetane type (Scheme 7).

### Multiparameter approach. General considerations

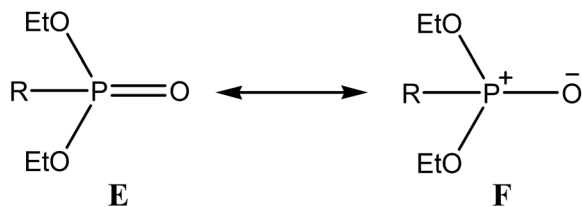
As mentioned above, significant scattering was observed for the plots  $a_N$  vs.  $E_T^N$  and  $a_{\beta,p}$  vs.  $E_T^N$ . It led us to investigate the solvent effect through the Linear Solvation Energy Relationship<sup>13,43</sup> (LSER), as given by eqn (21),  $A$  and  $A_0$  are the values of the solvent-dependent physico-chemical properties; the polarity/polarizability terms describe the solute/solvent dipole and induced dipole interactions: given, for example, by the Kirkwood functions  $f(\epsilon_r)$  (eqn (13)), by the Lorenz–Lorentz function  $f(n^2)$  (eqn (12)), or by  $\pi^*$ ; the hydrogen bonding terms describe the interaction HBD/HBA between the solvent and the solute: given for example, by  $\alpha$  and  $\beta$  parameters as defined by Abraham,<sup>13,36</sup> or by  $E$  (electrophily/Lewis acidity) and  $B$  (nucleophily/Lewis basicity) as defined by Koppel and Palm:<sup>44</sup> and the bulk/cavity terms (*structuredness* of the solvent) describe the energy needed to form cavities for the solute molecules: given, for example, by the cohesive pressure  $c$ ,  $V_M$ , or  $V_X$ .<sup>13,36,37</sup>

The choice of the parameters depends on the type of correlation investigated.<sup>†††</sup> The Koppel–Palm (eqn (10) and (11)) and the Kalmet–Abboud–Taft (eqn (15) and (16)) relationships are the most popular approaches to describe the solvent effect with specific and non-specific parameters.<sup>13,36,37</sup>

$$A = A_0 + \text{polarity/polarizability terms} + \text{hydrogen bonding terms} + \text{bulk/cavity terms} \quad (21)$$

Parameters  $f(n^2)$ ,  $f(\epsilon_r)$ ,  $E$ ,  $B$ ,  $\pi^*$ ,  $E_T^N$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  are currently applied to describe the solvent effect on physical constants such as spectroscopic data.<sup>13,36,37</sup> The use of the cohesive pressure  $c$ , the molar volume  $V_M$  and the intrinsic volume  $V_X$  is less frequent in such cases.<sup>13</sup> Indeed, the cohesive pressure  $c$  is related to the energy required to create cavities in a liquid in order to accommodate solute molecules during the process of dissolution.<sup>13</sup> How this might play a role is not so obvious. In fact,  $c$  can also be considered as a parameter describing *the stiffness of structuredness* of the solvent, *i.e.*, the organization of the solvation cage. It is noticed that  $c$  increases with the increasing H-bonding capacity of the solvent. The molar volume  $V_M$  is often used to take into account the effect of the size of the molecules. However, the weakness of this parameter is that the molecule is described as a sphere.<sup>36</sup> In some cases, this issue is circumvented by using the intrinsic volume  $V_X$  as defined by McGowan,<sup>38</sup> which takes partly into account the shape of the molecule, except that it cannot distinguish between isomers. These parameters describing the *structuredness* of the solvent are expected to play a role when a solute exhibits stereocenters and bulky groups.

<sup>†††</sup> Many other parameters available in the literature can be used to describe the different terms of eqn (21). Here, only the parameters used for the KP and KAT correlations are discussed.



Scheme 6 Mesomeric forms for the phosphoryl group.

### Multiparameter approach. Analysis of $a_N$

As mentioned above, significant scattering was observed for the plots  $a_N$  against  $E_T^N$  for several nitroxides. Thus, the very popular KP and KAP relationships are applied to get deeper insight into the effects involved in the change in  $a_N$ .<sup>13,36,37</sup> All nitroxides are well described by two-parameter KP relationships (Table 5) –  $E$  and  $c$  for 3'-7t' or  $f(\epsilon_r)$  and  $c$  for 3'-6c' and  $E$  and  $f(n^2)$  for 1' and 2'. The use of a bi-parameter equation clearly increases the quality of the correlation (higher  $R^2$  and good  $F$ -test, Table 5) and decreases the number of outliers. The absolute values of the parameters provide information on the strength of the effect while the weights (distribution of the effect for each parameter) provide insight into the importance of each effect for each nitroxide. Hence, for 1' and 2', the use of  $f(n^2)$  and  $E$  is expected from the very good plots reported for  $a_N$  vs.  $E_T(30)$  and eqn (14), as  $E_T^N$  is described as a function of the polarizability  $f(n^2)$ , the polarity  $f(\epsilon_r)$  and the parameter  $E$ .

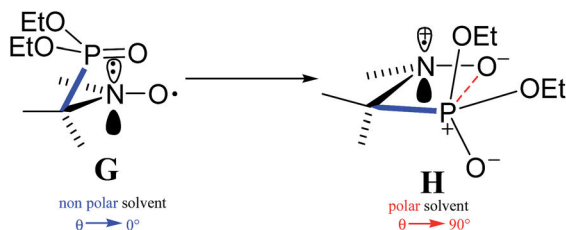
Interestingly, taking into account the errors,  $c$  does not vary significantly with the nitroxide, meaning that the *structuredness* of the solvent in the cybotactic region is the same around the nitroxyl moiety, and its positive value implies that the higher the *structuredness*, the stronger the solvent effect. However,  $c$  plays a minor role ( $w_c < 40\%$ ) for 5c,t' and 7t' and it has the same weight as  $E$  for 4c,t' and 6t'. On the other hand,  $c$  always plays a major role ( $w_c > 60\%$ ) when  $f(\epsilon_r)$  is the second parameter. In fact, *structuredness* depends a lot on the ability of the solvent to make an H-bond network. Then, as  $f(\epsilon_r)$  describes only the polarity effect of the solvent, the impact of H-bonding in  $a_N$  is taken into account by  $c$  affording slightly larger values when  $E$  is used. Except for 6c', the values of  $E$  are very close, meaning that the polar and H-bonding properties of the solvent have the same effect on the nitroxyl moieties. This effect is enhanced for 6c', likely because the two strong EWGs are close neighbours. This is also observed with the greater influence of  $E$  for 6c' ( $w_E = 78$ ).

When  $f(\epsilon_r)$  is used as parameter, taking into account the errors, all values are in the range 0.6–0.7, except for 6c' (1.08). As expected, all values are positive. However, their influence is lower ( $w_{f(\epsilon_r)} < 35\%$ ) than the influence of  $c$ . Indeed,  $f(\epsilon_r)$  describes only the effect of the polarity of the solvent, implying that the occurrence of H-bonding has a significant influence on the global solvent effect.

However, KP relationships do not seem to be the best approach, as the polar effect of the solvent is either described by the polarity  $f(\epsilon_r)$  or by the Lewis acidity/electrophilic  $E$ , and even in two cases by the polarizability.

To circumvent this issue, the KAT relationship (eqn (15)) was applied to 1'-7t', affording good 3-parameter –  $\pi^*$ ,  $\alpha$ , and  $c$  – correlations, except for 2' and 3'. The scattering of the plots  $E_T^N$  vs.  $a_N$  (Fig. 9 and Table 2) is significantly decreased, as highlighted by higher  $R^2$  values, good  $t$ -test and  $F$ -test values (Table 7 and Fig. 7SI†). Noteworthy, taking into account the errors, all nitroxides experience an effect of the same strength, due to the *structuredness* (cohesive pressure) of the solvent, although its influence (different  $w_c$  values) depends strikingly on the structure of the nitroxide. Interestingly, except for 1' and 6t', the influence of  $\alpha$  and  $\pi^*$  is evenly shared by all nitroxides whatever the influence of the cohesive pressure. For 1' and 6t', the major effect is the HBD properties of the solvent. As expected from the very good plot  $E_T^N$  vs.  $a_N$  for 1', the influence of the cohesive pressure is very weak ( $w_c = 12\%$ ). For 4', 5', and 6t', the influence of  $c$  is roughly the same ( $w_c \approx 35$ – $40\%$ ), whereas it is significantly lower for 6c' ( $w_c = 19\%$ ). In fact, 1' is a highly symmetrical molecule (the four methyl groups are equivalent, due to a fast exchange between the equatorial and axial sites). This implies that the two faces are identical, affording optimal unstrained solvation, and then the *structuredness* of the solvent plays hardly any role. In the case of 2', the loss of symmetry (5 methyl groups and a phosphoryl group) is balanced by the free C–N bond rotation, affording an optimized access to the nitroxyl moiety for efficient solvation, and again the *structuredness* of the solvent plays hardly any role. Surprisingly, the loss of symmetry in 3' is not significant enough to induce a significant effect of the *structuredness* of the solvent. For 4', 5', 6t' and 7t', the influence of  $c$  is moderate, meaning that the substituents around the nitroxyl moiety hamper its solvation, whereas the mobility of the ring combined to the *structuredness* affords a good solvation, hence implying a moderate effect of the *structuredness*. For 6c', the repelling effect between the azido group and the phosphoryl group in *cis* relationship is so strong that only one conformation provides the best minimization of the repelling effect, allowing the solvent access to the nitroxyl moiety, and hence leading to a weak influence of the *structuredness* of the solvent. In our case, the effect of parameters  $\pi^*$  and  $\alpha$  affords very similar results, *i.e.*, the stabilization of the zwitterionic form B, and the discussion will only be provided for  $\alpha$ , except for a few cases. The highest HBD effects are reported for 1' and 2' (larger  $w_\alpha$ ). For 4', 5', 6' and 7t', the same HBD effect is observed. The HBD effect involves a hydrogen bond between the protic solvent and the nitroxyl moiety, and as a consequence, the stronger the interaction, the more favoured form B, the higher  $a_N$ .

The polarity/polarizability and hydrogen bonding effects strongly favour (positive sign for the coefficients) form B ( $N^{+}-O^{-}$  moiety), leading to an increase in  $a_N$  with increasing solvent properties. These effects are strengthened by the cohesive pressure  $c$  (positive sign for the coefficient) which is used to describe the *structuredness* of the solvent, *i.e.*, higher organization or stronger solvent–solvent interactions in the cybotactic region will strengthen polarity/polarizability and H-bonding effects. Consequently, the weight of form H will be increased.



Scheme 7 Conformation change by rotation around the C–N bond from a non polar solvent to a polar solvent.

### Multiparameter approach. Analysis of $a_{\beta,P}$

As mentioned above, significant scattering was observed for the plots  $a_{\beta,P}$  against  $E_T^N$  for several nitroxides. Moreover, for **3'** and **7t'**, two correlations  $a_{\beta,P}$  vs.  $E_T^N$  were possible, providing at least 10 solvent were excluded. Then, the very popular KP and KAP relationships were applied to get deeper insight into the effects involved in the change in  $a_{\beta,P}$ . In contrast to the correlation with  $a_N$ , KAT and KP approaches are less general. Indeed, the KAT relationship (eqn (16)) is able to describe the solvent effect for **2'**–**7t'**, although this cannot be done with the same set of parameters.

Surprisingly, KP relationships cannot describe the solvent effect for **2'**, whatever the combination of parameters. Except for **3'**, for which only  $f(\epsilon_r)$  and  $V_M$  are required, the solvent effect is described by KP relationships using  $f(\epsilon_r)$  and  $c$  (see Table 3SI†), and the correlations are significantly improved when the size of the solvent molecule  $V_M$  is included. However, for the *trans* series, except for **7t'**, the cohesive pressure  $c$  can be replaced by the parameter  $E$  (see Table 3SI†). Consequently,  $E$  and  $c$  likely describe the same effect: the ability of the first layer of the solvent molecules to develop stabilizing H-bonds with the nitroxyl moiety.

Interestingly, coefficients of  $f(\epsilon_r)$ ,  $E$ , and  $c$  are negative, implying that  $a_{\beta,P}$  values decrease with increasing properties. In fact, increasing  $f(\epsilon_r)$ ,  $E$ , and  $c$  leads to favour the zwitterionic forms of the N–O<sup>•</sup> (form **B**) and P=O (form **F**) moieties, and to favour the interaction between N<sup>+</sup>–O<sup>•</sup>···P<sup>+</sup>–O<sup>•</sup> moieties (form **H**) as described in Scheme 7, which, in turn, involved an increase in the dihedral angle  $\theta$  affording a decrease in  $a_{\beta,P}$ .

On the other hand, the coefficient of the size of the solvent molecule  $V_M$  is positive, meaning that  $a_{\beta,P}$  increase with the size of the solvent molecule. That is, the bulkier the solvent is, more hampered the PC–N bond rotation is, and the less favoured form **H** is. Taking into account the errors, the impact of  $V_M$  is the same for all nitroxides and its influence is minor ( $w_{V_M} < 25\%$ ) on the whole solvent effect. Taking into account the errors, except for **6t'**, the impacts of  $f(\epsilon_r)$  and  $c$  are the same for **4'**–**6c'** and their influence is moderate ( $33\% < w_c$  and  $w_{f(\epsilon_r)} < 44\%$ ) on the global solvent effect. Similar comments hold for the relationships involving  $f(\epsilon_r)$  and  $E$ . Interestingly, **6t'**, which carries two strong EWGs in *trans* relationship, exhibits the largest and the smallest coefficients for  $f(\epsilon_r)$  and  $c$ , respectively, implying a major influence of  $f(\epsilon_r)$  ( $w_{f(\epsilon_r)} = 56\%$ ) over  $c$  ( $w_c = 19\%$ ) and  $V_M$  ( $w_{V_M} = 25\%$ ).

Unlike the KP relationship, KAT relationships are able to describe the solvent effect on  $a_{\beta,P}$  for all nitroxides although this approach is marred by the number of outliers, *i.e.*, 6–10 for **3'**, 5 for **5c'**, 3 for **6t'**, and 7 for **7t'**. Except for **7t'**, for which parameters  $\pi^*$  and  $V_X$  are used, the solvent effect for all other nitroxides is described using  $\pi^*$  and  $\alpha$  as parameters and the correlations are significantly improved – either better statistical outputs or fewer outliers – by including the size and the shape of the solvent molecule  $V_X$  as third parameter. Interestingly, the coefficients of  $\pi^*$  and  $\alpha$  are negative, meaning that  $a_{\beta,P}$  decrease with increasing polarity/polarizability and the H-bond donor properties of the solvent whereas the positive coefficient for  $V_X$  means that  $a_{\beta,P}$  increase with the bulkiness of the solvent molecule. This is in nice agreement with the observation made using KP relationships and the comments reported above hold.

Taking into account the errors, the impact of  $V_X$  is roughly the same for **4'**–**6'** and its influence is minor ( $w_{V_X} < 25\%$ ) on the global solvent effect. Taking into account the errors, the impact of  $\pi^*$  has a major influence ( $w_{\pi^*} > 57\%$ ) for **4'**–**7t'**. Taking into account the errors, the impact of  $\alpha$  is roughly ( $w_\alpha \approx 17\% \pm 6$ ) the same for **4'**, **5'**, and **6t'**, slightly lower for **6c'** and its influence is very similar to that  $V_X$ .

As mentioned above, the solvent effect in **2'** and **3'** is nicely described using  $\pi^*$  and  $\alpha$ . As expected, their coefficients are negative. The impact of  $\pi^*$  and  $\alpha$  on  $a_{\beta,P}$  is clearly stronger in **2'** than in **3'**, in nice agreement with  $E_T^N$  trends. However, the weight influence of each parameter is sharply contrasted, that is, the HBD property  $\alpha$  is the major effect ( $w_\alpha = 66\%$ ) in **2'** whereas the effect of  $\pi^*$  is the major one ( $w_{\pi^*} = 81\%$ ) in **3'**. Thus, it seems that less restricted rotations and likely less restricted C–N bond rotations, provided conformations favouring the occurrence of H-bonds in **2'** at the difference of the 5-membered ring nitroxide **3'** in which bond rotations are dramatically restricted. The coefficients obtained for  $\pi^*$  and  $\alpha$  given by bi-parametric correlations for **4'**–**6'** are very similar to those for **3'**, meaning that the same effects are involved to a very close extent. Although different parameters are used for **7t'**, coefficient of  $\pi^*$  and  $V_X$  are very similar to those of **3'** given by eqn (16r) (Table 10SI†), meaning that the same effects are again involved.

It stems from the comparing of KAT and KP relationships that the polarity ( $\pi^*$  and  $f(\epsilon_r)$ ) and the size of the solvent molecules ( $V_X$  and  $V_M$ ) are the main effects, which are antagonist effects, ruling the change in  $a_{\beta,P}$ . The effect of  $\alpha$  and of  $c$  is less obvious, as it does not apply to all nitroxides in the same series. Nevertheless, it seems strongly linked to the *stiffness* of the *structuredness* of the solvation cage around the nitroxyl moiety and maybe also around the phosphoryl group.

Although it has a negative coefficient, the polarity/polarizability effect plays a role that is the same for  $a_{\beta,P}$  as for  $a_N$ , that is, increasing solvent polarity favours both form **B** and form **F**, implying stronger N<sup>+</sup>–O<sup>•</sup> → P<sup>+</sup>–O<sup>•</sup> interaction and, hence, a more stabilized form **H**. Amazingly,  $\alpha$  and  $c$  do not apply to all nitroxides and can sometimes be interchanged, meaning that they do not describe their conventional effects. They both probably describe the organization of the solvent molecules around the N–O<sup>•</sup> and P=O moieties in the cybotactic



region, meaning that the higher the *structuredness* (negative coefficients), the stronger the  $N^{+}-O^{-} \rightarrow P^{+}-O^{-}$  interaction. On the other hand, as  $4^{\cdot}-6^{\cdot}$  exhibit strong asymmetry around the nitroxyl moiety, the size of the solvent ( $V_M$  of  $V_X$ ) plays an antagonist role (positive coefficient) to the polarity effect and the *structuredness* of the solvent.

## Conclusions

This survey of the solvent effect on new  $\beta$ -phosphorylated nitroxides  $3^{\cdot}-7t^{\cdot}$  unveils an unexpected entanglement of effects, different for  $a_N$  and  $a_{\beta,P}$ , due to the various properties of the solvents. For all nitroxides,  $a_N$  values are affected by the polarity/polarizability ( $\pi^*$ ), H-bonding ( $\alpha$ ), and *stiffness* of the *structuredness* (cohesive pressure  $c$ ) of the solvents. On the other hand, the impact and the occurrence of each effect are less obvious for  $a_{\beta,P}$  than for  $a_N$ . For example, for  $2^{\cdot}$  and  $3^{\cdot}$ , only  $\pi^*$  and  $\alpha$  are observed whereas for the cyclic nitroxides  $\pi^*$ ,  $\alpha$ ,  $c$ ,  $V_M$  and  $V_X$  are observed. The positive signs for  $\pi^*$ ,  $\alpha$ , and  $c$  mean that  $a_N$  values increase with these solvent properties. On the other hand, the negative values for  $\pi^*$ ,  $\alpha$  and  $c$  mean that  $a_{\beta,P}$  values decrease with these solvent properties, whereas an antagonist effect is observed with  $V_X$ . The anti-correlation between  $a_{\beta,P}$  and  $a_N$  is ascribed to the  $N^{+}-O^{-} \rightarrow P^{+}-O^{-}$  interaction whose the maximization is the *driving force* of the system. As nitroxides  $3^{\cdot}-7t^{\cdot}$  exhibit changes in  $a_{\beta,P}$  with the solvent, one possible application of this observation will be the titration of water in organic solvents.

## Experimental section

All solvents and reactants were purchased from Aldrich and used as received. Nitroxides  $3^{\cdot}$ ,<sup>20</sup> and  $6c^{\cdot},t^{\cdot}$  (ref. 35) and  $7t^{\cdot}$  (ref. 35) were prepared according to the literature. Nitroxides  $4c^{\cdot},t^{\cdot}$ , and  $5c^{\cdot},t^{\cdot}$ , were prepared according to Schemes 1–4.

Samples were prepared at 0.5 mM nitroxide concentration in non-degassed solvents. Experiments were performed indifferently on Elexsys, EMX or ER 100D Bruker machines (a difference smaller than 0.1 G was noticed). EPR spectra were recorded, the parameters being a gain of  $2 \times 10^5$  (72 dB for Elexsys), a modulation amplitude of 1.0 G, a sweep width of 150 G, a sweep time of 21 s, and a power of 20 mW.

## Acknowledgements

The authors thank Aix-Marseille University, University of Bordeaux 2, and CNRS for financial support. ANR was granted for funding this project (grants SonRadIs ANR-11-JS07-002-01 and NITROMRI ANR-09-BLA-0017-01). LB is thankful to ANR for the Ph.D. fellowship (grant SonRadIs). The work was supported by the Russian Science Foundation (grant 15-13-20020).

## Notes and references

- G. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A. I. Smirnov and R. Tamura, *Nitroxides: Applications in Chemistry*,

*Biomedicine, and Materials Science*, Wiley-VCH, 2008, and references therein.

- Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, ed. R. Hicks, Wiley, Hoboken, 2010, pp. 173–229, and references therein.
- I. A. Kirilyuk, A. A. Bobko, V. V. Khramtsov and I. A. Grigor'ev, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 1269–1274.
- V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo, A. Longhi and A. Fournel, *Assessing Structures and Conformations of Intrinsically Disordered Proteins*, ed. V. N. Uversky, Wiley, Hoboken, 2009, and references cited therein.
- P. Mellet, P. Massot, G. Madelin, S. R. A. Marque, E. Harte, J.-M. Franconi and E. Thiaudière, *PLoS One*, 2009, 4, e5244.
- P. Massot, E. Parzy, L. Pourtau, P. Mellet, S. Marque, J.-M. Franconi and E. Thiaudière, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2012, 7, 45–50.
- H. Karoui, F. le Moigne, O. Ouari and P. Tordo, *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, ed. R. Hicks, John Wiley & Sons, 2010, pp. 173–229.
- V. Ovcharenko, *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, ed. R. Hicks, John Wiley & Sons, 2010, pp. 461–506.
- B. Knauer and J. J. Napier, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 4395–4400.
- E. G. Janzen, G. A. Coulter, U. M. Oehler and J. P. Bergsma, *Can. J. Chem.*, 1982, 60, 2725–2733.
- C.-H. Deng, C.-J. Guan, M.-H. Shen and C.-X. Zhao, *J. Fluorine Chem.*, 2002, 116, 109–115.
- A. S. Mukhtarov, A. V. Il'Yasov, Y. A. Levin, I. P. Gozman, M. S. Skorobogatova and E. I. Zoroatskaya, *Theor. Exp. Chem.*, 1976, 12, 656–660; *Teor. Eksp. Khim.*, 1976, 12, 831–836.
- C. Reichardt and T. Welton, *Solvent and Solvent Effect in Organic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 4th edn, 2011.
- C. Reichardt, *Chem. Rev.*, 1994, 94, 2319–2358.
- D. L. Haire, E. G. Janzen, G. Chen, V. J. Robinson and I. Hrvoic, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, 37, 251–258.
- S. Marque, C. Le Mercier, P. Tordo and H. Fischer, *Macromolecules*, 2000, 33(12), 4403–4410.
- G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher and S. R. A. Marque, *Appl. Magn. Reson.*, 2015, 45(12), 1333–1342.
- G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher and S. R. A. Marque, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, DOI: 10.1039/c5ob02316e.
- G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, T. Butscher, J.-M. Franconi, S. R. A. Marque, P. Mellet, E. Parzy, M. Santelli and E. Thiaudière, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 11393–11400.
- F. le Moigne, A. Mercier and P. Tordo, *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32, 3841–3844.
- F. Gerson and W. Huber, *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- S. Acerbis, D. Bertin, B. Boutevin, D. Gígenes, P. Lacroix-Desmazes, C. Le Mercier, J.-F. Lutz, S. R. A. Marque, D. Siri and P. Tordo, *Helv. Chim. Acta*, 2006, 89(10), 2119–2132.

- 23 C. Mathieu, A. Mercier, D. Witt, L. Dembkowski and P. Tordo, *Free Radical Biol. Med.*, 1997, **22**, 802–806.
- 24 C. Ricci, S. Marque, F. Belin, J.-C. Bouteiller, R. Lauricella, B. Tuccio, V. Cerri and P. Tordo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 2513–2518.
- 25 A. Alberti, *Nitroxides radicals and polynitroxides in Landolt-Börnstein*, New Series II/26D, ed. H. Fischer, Springer-Verlag, Heidelberg, 2005, pp. 7–537, and references therein.
- 26 J.-L. Clément, B. C. Gilbert, W. F. Ho, D. N. Jackson, M. S. Newton, S. Silvester, G. S. Timmins, P. Tordo and A. C. Whitwood, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1998, 1715–1717.
- 27 F. Fréjaville, H. Karoui, B. Tuccio, F. Le Moigne, M. Culcasi, S. Pietri, R. Lauricella and P. Tordo, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 258–265.
- 28 P. Stipa, J.-P. Finet, F. le Moigne and P. Tordo, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4465–4468.
- 29 L. Dembkowski, J.-P. Finet, C. Fréjaville, F. le Moigne, R. Maurin, A. Mercier, P. Pages, P. Stipa and P. Tordo, *Free Radical Res.*, 1993, **19**, S23–S32.
- 30 D. Gigmes and S. R. A. Marque, *Nitroxide Mediated Polymerization and its Applications Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology, and Materials*, ed. C. Chatgililoglu and A. Studer, Wiley, Chichester, U.K., 2012, pp. 1813–1850.
- 31 D. Bertin, D. Gigmes, S. R. A. Marque and P. Tordo, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 2189–2198.
- 32 E. G. Bagryanskaya, E. G. Krumkacheva, M. V. Fedin and S. R. A. Marque, *Methods Enzymol.*, 2015, **563**, 365–396.
- 33 G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, J.-M. Franconi, N. Koonjoo, S. R. A. Marque, P. Massot, P. Mellet, E. Parzy and E. Thiaudière, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**(45), 13379–13384.
- 34 D. Benoit, V. Chaplinski, R. Braslau and C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3904–3920.
- 35 N. le Breton, M. Martinho, K. Kabitaev, J. Topin, E. Mileo, D. Blocquel, J. Habchi, S. Longhi, A. Rockenbauer, J. Golebiowski, B. Guigliarelli, S. R. A. Marque and V. Belle, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 4202–4209.
- 36 Y. Marcus, *The Properties of Solvents*, Wiley, Chichester, 1998, vol. 4.
- 37 G. E. Zaikov, R. G. Makitra, G. G. Midyana and L. I. Bazylyak, *Influence of the Solvent on Some Radical Reaction Chemistry Research and Applications Series*, Nova Science Publishers Inc., New York, 2010.
- 38 J. C. McGowan, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 1978, **28**, 599.
- 39 D. Bertin, D. Gigmes, S. R. A. Marque and P. Tordo, *Macromolecules*, 2005, **38**(7), 2638–2650.
- 40 J. Shorter, *Correlation Analysis of Organic Reactivity*, J. Wiley & Sons, New York, 1982, pp. 73–126.
- 41 J. B. Sweeney, *Chem. Soc. Rev.*, 2002, **31**, 247–258.
- 42 M. Charton, *Prog. Phys. Org. Chem.*, 1981, **13**, 119–251.
- 43 A. R. Katritzky, D. C. Fara, H. F. Yang, K. Tamm, T. Tamm and M. Karelson, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 175–198.
- 44 I. A. Koppel and V. A. Palm, The Influence of the Solvent on Organic Reactivity, in *Advances in Linear Free Energy Relationships*, ed. N. B. Chapman and J. Shorter, Plenum Press, London, New York, 1972, ch. 5, p. 203.

## DEVELOPPEMENT DE SONDES RADICALAIRES INTELLIGENTES POUR LE DIAGNOSTIC PAR IRM REHAUSSEE PAR L'EFFET OVERHAUSER

**RESUME :** Ce travail expose deux stratégies pour le développement de nouveaux **agents de contraste** pour le **diagnostic** par **IRM rehaussée par l'effet Overhauser**. Deux thèmes centraux ont donc été abordés.

*Le premier thème* de ce travail est consacré au développement d'une sonde radicalaire, de type **nitroxyde**, capable de modifier sa **signature RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) en fonction d'une activité enzymatique**. Cette modification, due à un changement conformationnel, a permis une irradiation microonde sélective de la sonde libérée par protéolyse. Cette particularité a pu être appliquée à l'**IRM rehaussée par l'effet Overhauser** et une amélioration du contraste de l'image de **1200% in vitro** a été observée après hydrolyse enzymatique. Du fait de contraintes techniques, une amélioration du contraste de **600%** a été obtenue *in vivo* alors que de nos jours, les agents de contraste les plus courants en clinique, basés sur des complexes de  $Gd^{III}$ , améliorent le contraste de l'image d'environ 50 %.

*Le second thème* aborde la synthèse et l'étude physico-chimique d'**alcoxyamines**, précurseurs de nitroxydes, pour le **diagnostic** par **IRM rehaussée par l'effet Overhauser**. Le point clé de cette approche repose sur l'**activation** de ces molécules afin de libérer rapidement le **nitroxyde in situ**. Les résultats de **monoactivation chimique** étant encourageants, la **double activation chimique** de ces nouvelles **alcoxyamines** a permis d'abaisser drastiquement le **temps de demi-vie** de l'une d'entre elles pour obtenir des valeurs compatibles avec des applications en diagnostic. Un **pseudo-peptide** sélectif de la **chymotrypsine** a également été greffé, ce qui a permis d'aboutir à une **alcoxyamine** modèle qui permettra de valider le concept de **diagnostic** recherché.

**MOTS CLES :** agent de contraste, IRM, RPE, effet Overhauser, polarisation dynamique nucléaire, nitroxyde, alcoxyamine, enzymes, diagnostic, théranostique.

## SMART SPIN PROBES DEVELOPMENT FOR THE DIAGNOSIS BY MRI ENHANCED BY THE OVERHAUSER EFFECT

**SUMMARY:** This work promotes two strategies for the development of new **contrast agents** for the **diagnosis** by **Overhauser enhanced MRI**. Two approaches have therefore been addressed.

*The first approach* is devoted to the development of a nitroxide-type spin label, which is capable to change its **EPR (Electron Paramagnetic Resonance) signature upon a non-radical enzymatic activity**. This modification, due to a conformational change, allowed us to perform a selective microwave irradiation of the probe released by proteolysis. This feature was applied to **Overhauser enhanced MRI** and of the image after enzymatic hydrolysis of **1200% in vitro** has been obtained. Due to technical hindrances, a contrast enhancement of **600%** has been obtained *in vivo*, while nowadays, the most common clinical contrast agent, based on  $Gd^{III}$  complex, improve image contrast around a value of 50%.

*The second topic* deals with the syntheses and the physico-chemical study of **alcoxyamines**, as nitroxide precursors, for the diagnosis by **MRI enhanced by the Overhauser effect**. The key point of this approach is based on the **activation** of these molecules to quickly release the **nitroxide in situ**. Encouraged by the results of **chemical monoactivation**, we performed the **double chemical activation** of these new **alcoxyamines** to drastically reduce the **half-life time** of one of them to obtain values compatible with diagnostic applications. A selective **pseudo-peptide** of **chymotrypsin** has also been grafted, which allowed us to achieve an **alcoxyamine** model that will validate our concept of **diagnosis**.

**KEY WORDS:** contrast agent, MRI, EPR, Overhauser, dynamic nuclear polarization, nitroxide, alcoxyamine, enzymes, diagnosis, theranostics.