Numéro National de Thèse : 2016LYSEN070

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'École Normale Supérieure de Lyon

École Doctorale N° 206
École doctorale de Chimie (Chimie, Procédés, Environnement)

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : **Chimie Biologique**

Soutenue publiquement le 10/11/2016 par :
M. Corentin GONDRAND

Étude chémobiologique de sondes magnétogènes et fluorogènes pour l'imagerie moléculaire

---

Devant le jury composé de :

Monsieur Richard DECRÉAU	Maître de Conférences HDR Université de Bourgogne, Dijon	***Rapporteur***
Monsieur Frédéric SCHMIDT	Directeur de Recherche CNRS Institut Curie, Paris	***Rapporteur***
Monsieur Bruno ANDRIOLETTI	Professeur des Universités Université Claude Bernard, Lyon	***Examinateur***
Monsieur Cornelis VAN NOORDEN	Professeur des Universités Universiteit van Amsterdam	***Examinateur***
Monsieur Jens HASSERODT	Professeur des Universités École Normale Supérieure de Lyon	***Directeur de thèse***

Détails pratiques

Ces travaux de thèse (01/09/2013 - 31/08/2016) se sont déroulés sous la direction du Professeur Jens Hasserodt, au sein de l'axe Chimie Supramoléculaire et Chimie Biologique dans le Laboratoire de Chimie de l'École Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Les expériences biologiques ont été réalisées au sein de l'équipe de Génomique Fonctionnelle des Récepteurs Nucléaires, dirigée par le Professeur Jacques Samarut, à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, 32-34 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France, puis au sein de l'équipe de Génétique des Variations Intra-Espèce, dirigée par le Docteur Gaël Yvert, au Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Les expériences d'IRM ont été réalisées au sein du laboratoire CREATIS, dirigé par le Docteur Olivier Beuf, à l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Bâtiment Blaise Pascal, 7 Avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne. Les expériences de relaxométrie en champ cyclique ont été réalisées au sein de l'équipe de Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination, dirigée par la Professeure Pascale Maldivi, à l'Institut Nanosciences et Cryogénie du Commissariat aux Énergies Alternatives, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble. Tous les travaux expérimentaux rapportés dans ce manuscrit relèvent de mon travail personnel, sauf mention explicite du contraire. Ces travaux sont répertoriés dans les cahiers de laboratoire n°E003108, E003085, E75253, E75397, E003799, Z012241, Z012207, Z033268 et E75398.

Ces travaux de thèse ont été financés par un contrat doctoral spécifique normalien délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon.

Mots clefs

Imagerie moléculaire, chimie biologique, sondes magnétogènes, sondes fluorogènes, IRM, activité enzymatique

Keywords

Molecular imaging, chemical biology, magnetogenic probes, fluorogenic probes, MRI, enzyme activity

Table des matières

Remerciements v

Résumé viii

Abstract ix

Liste des abréviations x

Introduction **1**

1 Imagerie médicale anatomique et moléculaire 1

1.1 De l'observation à l'œil nu à l'imagerie médicale anatomique 1
1.2 Invention et essor de l'imagerie moléculaire 4

2 Les modalités d'imagerie moléculaire 6

2.1 La scintigraphie : tomographies par émission monophotonique ou de positrons . 6
2.2 L'imagerie par résonance magnétique 8
2.2.1 De la spectroscopie RMN à l'IRM 8
2.2.2 Agents de contraste pour l'IRM 11
2.2.3 Agents d'imagerie moléculaire 14
2.3 L'imagerie optique par fluorescence 15
2.3.1 Fluorescence et fluorophores 16
2.3.2 Sondes moléculaires fluorescentes 18

3 Imagerie moléculaire d'enzymes 18

3.1 Pourquoi localiser des enzymes ? 19
3.2 Conception de sondes pour des activités enzymatiques 22
3.2.1 Notion de sonde modulable et intérêt 22
3.2.2 Conception de sondes fluorogènes et magnétogènes 23

I Conception et étude de sondes magnétogènes **29**

Chapitre 1 - Contexte : sondes IRM sensibles à une activité enzymatique 31

1 Modulation des propriétés des agents de contraste moléculaires 31

1.1 Relaxivité T_1 des complexes paramagnétiques 32
1.2 Stratégies de modulation de la relaxivité 33
1.3 Modulation des propriétés des agents PARACEST 34

2 Exemples de sondes IRM sensibles à une activité enzymatique 34

2.1 Agents T_1 activables selon le principe de q-modulation 34
2.2 Agents T_1 activables selon le principe de τ_R-modulation 35

2.3 Agents T_1 activables et capables de s'agréger . . . 35
2.4 Agents PARACEST activables . . . 37
3 Discussion des différentes approches présentées . . . 37
Chapitre 2 - Conception de sondes magnétogènes : aspects théoriques et état de l'art . . . 39
1 Intérêt des sondes magnétogènes pour l'IRM moléculaire . . . 39
2 Stratégie d'élaboration de sondes magnétogènes . . . 40
2.1 Magnéto-modulation et échec des solutions chimiques habituelles . . . 40
2.2 Le changement d'état de spin de complexes de fer(II) : notre solution pour la magnétogénèse en solution aqueuse . . . 40
2.3 Choix du ligand et stratégie retenue . . . 41
3 Sondes magnétogènes profitant d'une rupture de liaison covalente . . . 44
4 Sondes magnétogènes profitant de la protonation d'un ligand . . . 47
Chapitre 3 - Étude de nouveaux complexes adoptant une architecture Katritzky . . . 51
1 Synthèse des nouveaux complexes . . . 52
2 Étude structurale et des propriétés magnétiques . . . 53
3 Étude des propriétés magnétogéniques en solution aqueuse . . . 53
4 Étude du mécanisme de fragmentation de **16** . . . 55
5 Conclusion et perspectives . . . 57
Chapitre 4 - Nouveaux complexes comportant une amidine pour l'étude *in vitro* d'activités enzymatiques . . . 59
1 Synthèse des complexes . . . 61
1.1 Synthèse du DPTACN . . . 62
1.2 Synthèse des unités carbamylantes . . . 64
1.3 Assemblage des synthons et obtention des complexes **19** et **20** . . . 65
1.3.1 Construction des ligands . . . 65
1.3.2 Complexation du milieu réactionnel et purification . . . 67
1.3.3 Déprotection finale et obtention de **19** . . . 68
2 Étude du caractère magnétogénique du complexe **19** . . . 70
2.1 Confirmation de la structure et propriétés magnétiques en solution . . . 70
2.2 Essais d'activation enzymatique de **19** . . . 70
3 Étude de la relaxivité des complexes de fer(II) en présence de bas champs magnétiques 72
3.1 Relaxométrie en champ cyclique . . . 72
3.2 Profils NMRD des complexes de fer(II) et conclusions . . . 73
4 Vers la détection *in vitro* d'activités enzymatiques pour le diagnostic médical . . . 75
4.1 Diagnostic médical assisté par résonance magnétique . . . 75
4.2 Intérêt des sondes magnétogènes pour la détection de biomarqueurs enzymatiques 76
4.3 Première tentative de preuve de concept . . . 77
4.4 Deuxième tentative de preuve de concept . . . 79
Chapitre 5 - Nouveaux complexes comportant une guanidine pour l'imagerie d'enzymes *in vivo* . . . 81
1 Identification des molécules cibles . . . 81

2 Synthèse et étude des complexes **35a** et **35b** contenant une guanidine simple 84
2.1 Méthodes de synthèse des guanidines incluses dans des molécules organiques . . 84
2.2 Synthèse des complexes **35a** et **35b** 85
2.3 Étude du caractère magnétogénique du complexe **35a** 87
2.4 Conclusions 91
3 Synthèse des complexes **36a** et **36b** contenant une guanidine carbamylée 92
3.1 Première voie de synthèse des ligands 92
3.1.1 Préparation de la fonction guanidine mono-carbamylée 93
3.1.2 Synthèse des ligands **45a** et **45b** 93
3.2 Tentatives de complexation et discussion sur la structure des ligands 93
3.3 Nouvelle voie de synthèse des ligands 95
Conclusion sur les sondes magnétogènes 97

II Conception et étude de sondes fluorogènes 99

Chapitre 6 - Contexte : sondes fluorogènes précipitantes pour la visualisation *in cellulo* d'activités enzymatiques 101
1 Stratégies pour améliorer la sensibilité 102
2 Stratégies pour réduire la diffusion du signal 103
2.1 Rétention par la création d'une liaison covalente 103
2.2 Rétention par précipitation 104
3 Utilisation de l'ELF®-97 pour la conception de sondes fluorogènes précipitantes 106
3.1 L'ELF®-97, un fluorophore très performant 106
3.2 Premières sondes fluorogènes basées sur l'ELF®-97 107
4 Sondes fluorogènes mises au point dans l'équipe 108
Chapitre 7 - Nouvelles sondes fluorogènes sensibles à une activité glycosidase 113
1 Leucine aminopeptidase et espaceur éliminant : un mariage impossible 113
1.1 Première synthèse d'une sonde comportant un tandem d'espaceurs 114
1.2 Nouvelle voie de préparation des sondes à deux espaceurs 115
1.3 Étude des sondes et mise en évidence de leur instabilité 116
2 Synthèse de nouvelles sondes répondant à des activités glycosidases 118
2.1 Préparation des sondes 118
2.2 Étude *in vitro* de la réponse enzymatique 118
3 Applications *in cellulo* de la sonde ciblant la β-galactosidase 121
3.1 Expériences de microscopie en culture cellulaire 121
3.2 Expériences de cytométrie en flux (FACS) 122
3.3 Étude de la toxicité vis à vis des cellules 124
3.4 Conclusions 125
4 Utilisation de la sonde ciblant la cellulase dans le cadre d'un projet de bioénergétique . 126
4.1 Intérêt de la quantification de l'activité cellulase pour la production de bioéthanol et mise en œuvre 126
4.2 Résultats préliminaires obtenus avec la sonde **63a** 127
5 Conclusions 129

Conclusion générale **133**

Partie expérimentale **S1**

1 - Considérations générales S1

2 - Données expérimentales du chapitre 3 ..... S5

3 - Données expérimentales du chapitre 4 ..... S29

4 - Données expérimentales du chapitre 5 ..... S43

5 - Données expérimentales du chapitre 7 ..... S55

Bibliographie **B1**

Annexes **A1**

Publications A1

Curriculum Vitæ A3

Remerciements

Je remercie tout d'abord Jens Hasserodt, mon directeur de thèse. Pendant ces trois ans, j'ai bénéficié d'une très grande indépendance : j'ai pu mener mon travail, commander les produits et matériels, partir en congrès, tout ça comme je le voulais, car Jens me faisait confiance. Ca m'a permis de toucher à beaucoup de choses et d'apprendre énormément, à la fois sur la chimie, la recherche et sur moi-même. Et même s'il y a eu de nombreux moments difficiles, j'ai eu de la chance d'avoir vécu cette expérience et j'en garde un bilan positif.

Je tiens à remercier Chantal Andraud, la directrice du laboratoire de chimie, pour m'avoir accueilli et écouté quand j'en ai fait la demande. Un grand merci aussi aux secrétaires et gestionnaires qui ont fait ou font tourner le labo, Anne-Gaëlle, Marie-Françoise, Brigitte, Sandy, Damien, Edwige, malgré mes nombreuses demandes (et c'est pas fini !) vous avez toujours assuré ! Enfin, même si je ne les ai pas (encore) croisées, il y a de nombreuses personnes sans lesquelles cette thèse n'aurait pas été possible, à l'ENS (le service du 3ème cycle et Éric Freyssingeas notamment), à l'école doctorale, et ailleurs, je leur dis merci.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury, Bruno Andrioletti et Ron Van Noorden, mais aussi et surtout Frédéric Schmidt et Richard Decréau, qui ont accepté de lire attentivement mon manuscrit et de juger mes travaux. Dans le texte, j'ai essayé d'être le plus précis et pertinent possible tout en apportant un côté "humain" que je trouve indispensable ; j'espère que j'aurai été facile à lire et que j'aurai pu communiquer aussi bien mes résultats que ma passion pour mon sujet et la science.

Je voudrais remercier nos collaborateurs : Olivier Beuf, Sophie Gaillard, Denis Grenier (et le reste du labo CREATIS), Jan Korvink, Bernhard Blümich et leurs équipes à Aachen et Karlsruhe, Pascal Fries au CEA (et oui, j'étais vraiment ravi d'aller faire des manips à Grenoble !), Antoine Maruani et Vijay Chudasama à Londres. À chacune de mes visites, j'ai été très bien reçu, et j'ai vraiment apprécié de travailler avec ces chercheurs dont les centres d'intérêts sont différents des nôtres, ça fait reconsidérer et relativiser ce que l'on fait tout en enrichissant nos connaissances à tous. Je n'oublie pas bien sûr Christophe Bucher au labo (et sa bonne humeur permanente et communicative), Jacques Samarut et Laurence Canaple à l'IGFL ainsi que Gaël Yvert et Gérard Triqueneaux au LBMC pour l'aide précieuse qu'ils m'ont fournie.

Le labo de chimie est un endroit super pour travailler, et ça c'est grâce à des personnes motivées qui donnent sans compter mais qui sont aussi super sympa et font des repas, pauses café et autres, de vrais moments de détente. Merci infiniment à Sandrine pour la RMN, J-C (Jean-Christophe pour les intimes, désolé d'avoir tant parlé de ton âge !) et Delphine pour les commandes diverses, votre connaissance encyclopédique du labo et de la chimie et votre disponibilité à tout moment, Yann pour les solvants et la soute, Christian pour les ordis et les imprimantes. Un merci spécial à Philippe et surtout à Laure pour la masse, cet espèce de truc horrible qui déconne tout le temps mais qui rend de grands services, tu as toujours été là pour m'aider à réparer les nombreux problèmes, et franchement sans toi je n'aurais pas fait la moitié des manips que j'ai faites ! Je pense qu'on se débrouille à peu près aussi bien que les techniciens d'Agilent maintenant, vu tout ce qu'on a résolu, je te souhaite bon courage pour tous les soucis qui se poseront dans l'avenir, capillaires et aiguille bouchées, bulles dans la pompe, masse encrassée, lampe à changer, etc...

Mais un labo, c'est aussi les thésards et post-docs qui le font vivre ! Et pour ça, j'ai clairement beaucoup de chance d'être tombé dans un endroit où l'ambiance est si bonne. Un grand merci à Laure-Lise et Maëlle, piliers de l'agreg, de l'enseignement et du labo, sans vous pas de barbeuq, de repas de Noël, de Ninka countdown, de gâteaux du LR2, de pause café du midi, et j'en oublie ! Si vous vous demandez pourquoi je vous remercie ensemble, c'est parce que vous êtes sœurs of course ;) À Christophe (le thésard), pour avoir changé si souvent les bouteilles de gaz du LR3 et surtout pour nous avoir motivé très régulièrement pour aller boire des coups ; à Sandra, pour nos très nombreuses discussions en 2ème année qui m'ont beaucoup fait cogiter ; je te souhaite de tout cœur de trouver ta voie et de t'épanouir dans ta vie personnelle et professionnelle ! À Anh-Thy, pour m'avoir fait découvrir

l'escalade et pour toutes les discussions qu'on a eues, j'espère vraiment que ton post-doc aux US se passera bien et que tu reviendras triomphalement en France ensuite ! À Margaux, avec qui j'ai tant aimé parler et encadrer les TP de M1 en 3ème année ; à Seba, qui a apporté un vent de fraîcheur venu d'Italie au LR4 et dans tout le labo ; à Maxime, que j'ai été embêter bien trop souvent car il a eu le malheur de tomber dans le labo d'à côté ; à Romain, Mathilde I., Manue, Thomas et F-X (Chavier), les cousins du LR6, qu'on ne voit pas souvent mais qui sont toujours motivés et de bonne humeur ! Il me faut aussi remercier une personne à part entière, le Ninka, où j'ai été dès mon premier jour à l'ENS en septembre 2009 et que j'ai vu évoluer depuis au gré des "Ninkasi crazy" du vendredi soir (et non, je ne dirai pas que "c'était mieux avant" !). Je n'oublie pas Sara, Aline, Estelle, Bastien, Cristina, Christelle, Simon, Lucie, Delphine, Orsola, Martin, Zheng, Dawei, Déborah, Shuai, Paul, Benjamin, Alex, et tous les stagiaires qui sont restés moins longtemps, vous avez tous fait de ce labo un endroit animé et cool.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe CBO, quand il y en avait une, puis de l'axe Chimie supra et Chimie bio : Maxime et Guillaume, j'ai eu de la chance de travailler avec vous et de poursuivre certains de vos projets, vos discussions sur la chimie et la recherche en général m'ont vraiment éclairé, et vos thèses m'ont bien inspiré pour écrire la mienne ! Corinne, c'était super d'être au labo avec toi, toi qui es toujours de bonne humeur malgré les céphalospooooorines, merci beaucoup de m'avoir toujours écouté et soutenu ! Damien, j'ai vraiment aimé nos discussions où bio, chimie, alcools et voyages étaient tout le temps mélangés ! Anissa, j'ai adoré les quelques mois où tu étais au labo, on a passé trop peu de temps ensemble mais c'était des moments super ! Mais aussi tous ceux que je n'ai pas eu le temps de connaître aussi bien, Jacek, Jinping, Fayçal, Oliver, Roman notamment. Je remercie bien sûr mes trois stagiaires, Kévin, Siffedine et surtout Mathieu, vous m'avez été d'une grande aide, j'espère en retour que je ne vous ai pas trop traumatisés ! Mathieu, après avoir été au début le stagiaire de M2 idéal, tu es maintenant le cobureau et le cothésard idéal, merci pour tout, ton soutien, tes blagues, ta bonne humeur, les plantes dans le bureau, tes liqueurs cheloues, les trips do brazil, et tout le reste, je te souhaite tout le meilleur au boulot et dans la vie perso avec Octavie !

J'ai aussi fait des enseignements à l'ENS pendant ces 3 années, c'était une occasion géniale de s'ouvrir à autre chose que le labo et d'apprendre plein de choses et j'en ai vraiment profité ; je remercie Philippe qui m'a permis de faire tout ce que je voulais ; Cyrille et Bélen avec qui j'ai aimé faire les TP de M1 en compagnie de Maxime, Aline, Sandra, Estelle, Christelle, F-X et Margaux ; Cendrine, toi qui m'a fait confiance pour encadrer les TP de PCB (pas évident pour un chimiste !) avec Léo, Coraline, Pauline, Margaux, Mathilde, Aurélie et les autres. J'ai eu la chance d'enseigner à des élèves souvent très sympas et toujours brillants, dont Alexandre et Marie, Augustin et Delphine, F-X, Kévin et Adeline, François, Mathieu et Quentin, Léa, Pauline C. et Simon, Pauline J., Clément "jeune trublion" et ses (courageuses) binômes Mathilde et Laureline, Lilian et Nathan, plus tant d'autres !

Même si ils le sauront jamais et/ou que peu leur chaut, je tiens aussi à remercier des choses plus "matérielles" mais complètement indispendables : ma hotte et ses nombreux tags ; Marcel le rotavap et Josette la pompe ; le Mouv' (quand c'était encore une radio écoutable), RFM (Eye of the Tiger et Indochine surtout, n'est-ce pas Maëlle !), Virgin Radio et Radio Scoop pour le soutien gratuit et permanent pendant les longues colonnes au dichlo/méthanol ; la SNCF, AREA ainsi que le Total Access de l'avenue Tony Garnier pour les indénombrables allers-retours Lyon-Grenoble et les voyages à travers la France et l'Europe. Pour la rédaction, écrire n'aurait jamais été possible sans l'aide cruciale de Tame Impala, Daft Punk, Justice, Petit Biscuit, Jain, Vitalic, les Red Hot, Gorillaz, Asaf Avidan, Parov Stellar, The Avener, Sia, pour les plus avouables ;)

Enfin je remercie infiniment ma famille et mes proches. Sans vous et votre soutien inconditionnel en toutes circonstances, je n'aurai fait ni ces études, ni cette thèse, ni ne l'aurait finie, et même si j'ai une (petite) tendance à me dévaloriser, je dis sans honte que je ne suis là que grâce à vous. Outre Laure et Sylvette qui méritent un remerciement particulier, j'adresse un immense merci à ma famille et à mes amis hors du labo pour leur infinie patience et pour m'avoir porté, quotidiennement pour certains, et évité de sombrer quand j'étais au plus mal. Vous voir m'a toujours fait un bien fou, et

votre présence dans ma vie est le plus beau cadeau que l'on puisse me faire. Enfin, je dédie cette thèse à mon grand-père Michel, décédé au début de ma première année, à qui j'ai pensé tous les jours et qui je l'espère veille sur moi d'en haut.

Bon courage et bonne chance à toutes et à tous, et comme dit Jules-Édouard Moustic, "Allez salut, et Banzaï ! !"

Résumé

Cette thèse de doctorat traite de la conception et de l'évaluation de sondes magnétogènes et fluorogènes pour la détection *in vivo* d'activités enzymatiques.

Des molécules capables d'acquérir un moment magnétique à partir d'un état diamagnétique et en réponse à l'action d'une enzyme seraient d'un grand intérêt pour l'imagerie moléculaire par résonance magnétique. Deux exemples de telles sondes magnétogéniques avaient été mis au point précédemment, l'un pouvant opérer en conditions physiologiques, l'autre nécessitant une acidification du milieu pour devenir paramagnétique. En préparant de nouveaux analogues du premier exemple, j'ai pu trouver une molécule dont la fragmentation a lieu trois fois plus rapidement que la molécule originale. J'ai ensuite travaillé à la conception de sondes dérivées du deuxième exemple et répondant à des activités enzymatiques ; de telles molécules permettraient de réaliser la quantification *in vitro* d'une activité enzymatique à des fins diagnostiques. À ce titre, j'ai participé à l'élaboration de deux preuves de concept de dispositifs dédiés à la mesure du temps de relaxation longitudinale de micro-volumes. J'ai enfin entamé le développement de nouveaux complexes s'inspirant du second exemple mais capables de fonctionner dans le milieu biologique.

Le deuxième volet de mes travaux porte sur la réalisation de sondes fluorogènes précipitantes pour des activités glycosidase. Une sonde pour la leucine aminopeptidase profitant des propriétés exceptionnelles de stabilité, de luminescence et de solubilité du fluorophore ELF®-97 avaient démontré une grande efficacité pour marquer rapidement des cellules HeLa. J'ai mis au point une nouvelle architecture de sondes qui permet le ciblage de glycosidases via l'utilisation d'un tandem d'espaceurs cyclisants. Deux sondes ont été préparées, l'une pour la β-galactosidase, l'autre pour la cellulase. La première a prouvé son bon fonctionnement pour marquer les cellules exprimant l'enzyme en bénéficiant d'une grande sensibilité. La seconde a pu être utilisée pour quantifier l'activité cellulase sécrétée par des levures, avec l'objectif d'obtenir un moyen économiquement intéressant de produire du bioéthanol à partir des déchets végétaux.

Abstract

This PhD thesis deals with the design and evaluation of magnetogenic and fluorogenic probes for the *in vivo* detection of enzyme activities.

Molecules capable of switching from a diamagnetic to a paramagnetic state in response to an enzyme stimulus would be of great interest for molecular magnetic resonance imaging. Two examples of such magnetogenic probes had been designed in a previous work : one can operate in physiological conditions, whereas the other needs an acidification of the water medium to become paramagnetic. I prepared new analogues of the first probe ; one molecule displayed fragmentation three times faster than the original compound. Then I designed and synthesized probes derived from the second example and responsive to enzyme activities ; such molecules are suitable for the *in vitro* quantification of enzyme biomarkers for diagnosis purposes. I participated to the conception of two proofs of concept of devices dedicated to the measurement of longitudinal relaxation times in micro-volumes. Finally, I started the development of a new family of molecules inspired by the second example but able to work at the physiological pH.

I also worked on precipitating fluorogenic probes for the detection of glycosidase activities. A former probe for leucine aminopeptidase, based on the exceptional characteristics of the fluorophore ELF®-97 in terms of solubility, luminescence and stability, had demonstrated great efficiency to label live HeLa cells. I designed a new architecture of probes responding to glycosidases via an original tandem of self-immolative spacers. Two probes have been prepared, one targets β-galactosidase and the second detects cellulase. The first probe performed a fast and sensitive labelling of β-galactosidase-expressing cells. The second molecule was employed successfully to quantify the cellulase activity secreted by yeasts, which will be useful for the high-throughput screening of yeasts capable of producing bioethanol from vegetal waste.

Liste des abréviations

4-MU : 4-méthylumbelliférone
Abs. : absorbance
Aβ : β-amyloïde
Ac : acétyle
ACN : acétonitrile
ADEPT : Thérapie de type pro-médicament assistée par une enzyme administrée via un anticorps (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*)
ADN : Acide désoxyribonucléique
ACQ : Quenching causé par l'agrégation (*Aggregation-Caused Quenching*)
AIE : Émission induite par l'agrégation (*Aggregation-Induced Emission*)
Alloc : allyloxycarbonyle
APTS : Acide *p*-toluènesulfonique (PTSA)
ARM : Angiographie assistée par résonance magnétique
ARN : Acide ribonucléique
B : champ magnétique
BCR-Abl : Breakpoint Cluster Region - Abelson
BHE : Barrière hémato-encéphalique
Boc-ON : 2-(*tert*-butyloxycarbonyloxyimino)-2-phénylacétonitrile
BODIPY : Bore-dipyrrométhène
BPA : Agents sanguins (*Blood-Pool Agents*)
$\vec{B_{det}}$: champ magnétique de détection
$\vec{B_{pol}}$: champ magnétique de polarisation
$\vec{B_{rel}}$: champ magnétique de relaxation
br : large (*broad*)
BRCA : Breast Cancer
BSA : Albumine sérique bovine (*Bovine Serum Albumin*)
BV : Orbitale moléculaire la plus basse vacante
°C : degré Celsius
calc. : calculé (*calculated*)
Carboxypeptidase G2 : Carboxypeptidase à glutamate de type 2
Caspase : Protéase aspartique dépendant d'une cystéine (*Cystein-dependant Aspartate-directed Protease*)
cat. : en quantité catalytique
Cbz : benzyloxycarbonyle
CCM : Chromatographie sur couche mince
CEST : Transfert de saturation par échange chimique (*Chemical Exchange Saturation Transfer*)
cm : centimètre
COMU : hexafluorophosphate de (1-cyano-2-éthoxy-2-oxoéthylidènaminooxy)diméthylamino-morpholino-carbenium
CREATIS : Centre de recherche en acquisition et traitement de l'image pour la santé
CT : tomodensitométrie (*Computerized Tomography*)
Cy5 : Cyanine 5
d : doublet
DABCYL : acide 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque
δ : déplacement chimique
DCM : dichlorométhane
DIPEA : *N*,*N*'-diisopropyléthylamine
DMBA : acide 1,3-diméthylbarbiturique

DMEM : Modification de Dulbecco du milieu d'Eagle (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*)
DMF : *N*,*N'*-diméthylformamide
DMR : Résonance magnétique à des fins diagnostiques (*Diagnostic Magnetic Resonance*)
DOTA : 1,4,7,10-tétraacétate-1,4,7,10-tétraazacyclododécane
DPDP : *N*,*N'*-dipyridoxyléthylènediamine-*N*,*N'*-diacétate-5,5'-bisphosphate
DPTACN : 1,4-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7-triazacyclononane
DTPA : 2-[bis[2-[bis(carboxyméthyl)amino]éthyl]amino]acétate
D-π-A : Donneur-π-accepteur
ECF : Fluides extracellulaires (*Extracellular Fluids*)
EDANS : acide 5-((2-aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique
ELF : Fluorescence de marquage enzymatique (*Enzyme-Labeled Fluorescence*)
ELF®-97 alcool : 2-(5'-chloro-2-hydroxyphényl)-6-chloro-4(3*H*)-quinazolinone (dichloro-HPQ)
ELISA : Dosage d'immuno-absorption par enzyme liée (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
Ém. : émission
ENS : École Normale Supérieure
ESI : Ionisation par électrospray (*Electrospray Ionisation*)
ESIPT : Transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (*Excited-State Intramolecular Proton Transfer*)
Et : éthyle
éq. : équivalent(s)
FACS : Tri cellulaire assisté par fluorescence (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)
FISH : Hybridation *in situ* suivie par fluorescence (*Fluorescence In Situ Hybridization*)
FMN : Flavine mononucléotide
Fmoc : 9-fluorénylméthyloxycarbonyle
FR : Récepteur au folate (*Folate receptor*)
FRET : Transfert d'énergie de résonance de type Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)
FSC : Diffraction vers l'avant (*Forward Scattering*)
g : gramme
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase
GDEPT : Thérapie de type pro-médicament assistée par une enzyme administrée via un gène (*Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*)
GE : General Electric
GGT : γ-glutamyl transpeptidase
h : heure
HBT : 2-(2-hydroxyphényl)benzothiazole
hCG : Gonadotropine chorionique humaine (*human Chorionic Gonadotropin*)
HEK : Rein embryonnaire humain (*Human Embryonic Kidney*)
HeLa : Henrietta Lacks
HEPES : acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)pipérazin-1-yl]éthanesulfonique
HO : Orbitale moléculaire la plus haute occupée
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
HPQ : 2-(2-hydroxyphényl)-4(3*H*)-quinazolinone
HTLV-1 : Virus T-lymphotropique humain 1 (*Human T-Lymphotropic Virus 1*)
Hz : Hertz
ICT : Transfert de charge intramoléculaire (*Intramolecular Charge Transfer*)
IKKγ : sous-unité γ de la kinase inhibitrice de NF-κB (*Inhibitor of NF-κB Kinase subunit γ*)
INAC : Institut nanosciences et cryogénie
INSA : Institut national des sciences appliquées
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ISA : Institut des sciences analytiques
keV : kiloélectronvolt
KIT : Karlsruhe Institut für Technologie

LAP : Leucine aminopeptidase
LBMC : Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LETI : Laboratoire d'électronique et de technologie de l'information
logP : logarithme décimal du coefficient de partage octanol/eau
m : méta (substitution d'un noyau aromatique)
M (concentration) : Molarité
Me : méthyle
MGG : May-Grünwald Giemsa
min : minute
mL : millilitre
MLCT : Transfert de charge métal-ligand (*Metal-Ligand Charge Transfer*)
MMP : Métalloprotéase de la matrice (*Matrix Metalloproteinase*)
MOF : Structure organométallique (*Metal-Organic Framework*)
mol : mole
MPTACN : 1-(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7-triazacyclononane
MS : Tamis moléculaire (*Molecular Sieves*)
mT : millitesla
MTS : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2*H*-tétrazolium
μRMN : spectromètre microRMN
NAD^+ : Nicotinamide dinucléotide
NF-κB : Facteur nucléaire κB (*Nuclear Factor-*κB)
nm : nanomètre
NMRD : Dispersion de la résonance magnétique nucléaire (*Nuclear Magnetic Resonance Dispersion*)
o : ortho (substitution d'un noyau aromatique)
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
o.n. : sur la nuit (*overnight*)
p : para (substitution d'un noyau aromatique)
PABA : Alcool *p*-aminobenzilique (*p-aminobenzyl alcohol*)
PARACEST : Transfert de saturation par échange chimique assisté par paramagnétisme (*Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer*)
PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate Buffer Saline*)
PDMS : polydiméthylsiloxane
PE : Éther de pétrole (*Petroleum Ether*)
PEG : Polyéthylèneglycol
PEI : Polyéthylèneimine
PeT : Transfert d'électron photoinduit (*Photoinduced electron Transfer*)
PGA : Pénicilline G amidase
Ph : phényle
pH : potentiel Hydrogène
PLE : Estérase hépatique porcine (*Porcine Liver Esterase*)
PMT : Thérapie de type pro-médicament simple (*Prodrug Mono-Therapy*)
ppm : partie par million
PSA : Antigène prostatique spécifique (*Prostate-Specific Antigen*)
q : nombre d'hydratation (*hydration number*)
qABP : Sondes basées sur l'activité et quenchées (*quenched Activity-Based Probes*)
quant. : quantitatif
R_1 : relaxivité longitudinale absolue
r_1 : relaxivité longitudinale
r_{1e} : relaxivité longitudinale en sphère externe
r_{1i} : relaxivité longitudinale en sphère interne

r^2 : coefficient de corrélation linéaire
redox : oxydoréduction
RIME : Augmentation de la magnétisation induite par un récepteur (*Receptor-Induced Magnetization Enhancement*)
RMN : Résonance magnétique nucléaire (NMR : *Nuclear Magnetic Resonance*)
ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
RWTH : Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
s : singulet
S : valeur du moment magnétique de spin
S_0 : état électronique fondamental
S_1, S_2 : premier et deuxième états électroniques excités
SCH : Schering-Plough
SPION : nanoparticule d'oxyde de fer superparamagnétique (*Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle*)
SSC : Diffraction perpendiculaire (*Side Scattering*)
t : triplet
t : *tert*
T : Température
T_1 : Temps caractéristique de la relaxation longitudinale
T_2 : Temps caractéristique de la relaxation transverse
Tax : Transactivator of pX
TACN : 1,4,7-triazacyclononane
TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle
TBAI : Iodure de tétra-*n*-butylammonium
TDM : Tomodensitométrie
TEMP : Tomographie par émission monophotonique (SPECT : *Single Photon Emission Computed Tomography*)
TEP : Tomographie par émission de positrons (PET : *Positron Emission Tomography*)
TCEP : tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TF : Transformée de Fourier
TFA : Acide trifluoroacétique (*Trifluoroacetic Acid*)
Tfa : trifluoroacétyle
THF : Tétrahydrofurane
TPTACN : 1,4,7-tris(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7-triazacyclononane
t.a. : température ambiante (r.t. : *room temperature*)
U : Unité d'enzyme
u. a. : unités arbitraires
USPION : nanoparticule d'oxyde de fer superparamagnétique d'ultra-petite taille (*Ultra-Small Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle*)
UV : Ultraviolet
v/v : rapport volumique
VDEPT : Thérapie de type pro-médicament assistée par une enzyme convoyée par un virus (*Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy*)
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
Z : numéro atomique
ϵ : coefficient d'absorption molaire
λ_{ex}, λ_{em} : longueur d'onde d'excitation ou d'émission
μm : micromètre
μ_B : magnéton de Bohr ; $\mu_B = 9,274 \cdot 10^{-24}\,\mathrm{J{\cdot}T^{-1}}$
μ_{eff} : valeur du moment magnétique efficace en solution
$\vec{\mu_{tot}}$: magnétisation

τ (fluorescence) : temps de vie d'un état électronique excité
τ (RMN) : délai de relaxation lors d'une séquence d'inversion-récupération
τ_M : temps de résidence d'une molécule d'eau sur un site de coordination
τ_R : temps moyen de rotation d'un agent de contraste (*Molecular tumbling*)
ϕ : rendement quantique de fluorescence
ω : fréquence de Larmor des protons

Introduction

Introduction

L'imagerie moléculaire, ou la cartographie de molécules particulières au sein d'un organisme vivant, est un domaine de recherche nouveau à la croisée de la chimie pharmaceutique, de la biologie moléculaire et de la médecine. Elle constitue le présent et l'avenir de l'imagerie médicale telle qu'on la connaît pour diagnostiquer des traumatismes ou des maladies, mais aussi un formidable moyen d'étude à plus long terme pour mieux comprendre le fonctionnement de notre corps et prévenir les pathologies plutôt que les guérir. Je vais essayer dans cette introduction de présenter l'imagerie moléculaire, ses prémices, ses objectifs, comment elle est réalisée, en gardant le point de vue du chimiste organicien et médicinal tout en me plaçant, dès que possible, dans le cadre du diagnostic de maladies. Je me focaliserai ensuite sur l'observation de molécules biologiques un peu particulières, les enzymes.

1 Imagerie médicale anatomique et moléculaire

1.1 De l'observation à l'œil nu à l'imagerie médicale anatomique

Les prémices du diagnostic médical remontent à l'Antiquité. Très tôt, l'Homme a cherché à prévoir les maladies en s'intéressant à leurs manifestations physiques. Le papyrus égyptien Edwin Smith[1] (voir Figure 1A), daté à -1600 mais se référant à des écrits remontant à -3000, est consacré à la chirurgie militaire. Il établit un lien, pour la première fois sans référence ni à la magie ni à la mythologie, entre les observations superficielles ou à corps ouvert (côte cassée, fracture du crâne, tumeur, etc...) et les traitements à suivre, avec parfois même un pronostic. Néanmoins, la nécessité de réaliser une chirurgie exploratoire pour effectuer un diagnostic réduit l'intérêt de cette opération, surtout si l'on tient compte des conditions d'hygiène de l'époque (la stérilité ne sera inventée qu'à la fin du XVIIIème siècle et appliquée à la chirurgie seulement un siècle plus tard).

Au premier siècle de notre ère, l'encyclopédiste romain Aulus Cornelius Celsus, dit Celse (Figure 1B), identifie dans le *De medicina*[2, 3] les quatre signes et symptômes caractéristiques de l'infection d'une plaie : *tumor* (l'œdème), *rubor* (la rougeur), *calor* (la chaleur), *dolor* (la douleur) (Figure 1C). Ainsi, la simple observation externe d'une plaie par un œil entraîné suffit pour identifier une complication et suggérer un traitement. Comme les Égyptiens avant eux, les Romains ne connaissaient pas l'origine de cette infection, ni le lien entre cette infection et ses manifestations (les notions d'agent pathogène et d'immunité seront découvertes bien après), mais ils pouvaient reconnaître des signes cliniques et en déduire un diagnostic. Cependant, ces signes cliniques identifiés résultaient tous, en dehors des symptômes, d'observations à l'œil nu : si la manifestation de la pathologie n'était pas externe, il fallait faire appel à la chirurgie pour la voir.

Cette situation a peu évolué jusqu'en 1895. Cette année-là, le physicien allemand Wilhelm Röntgen mène des expériences avec un tube de Crookes (tube à vide contenant deux électrodes reliées à un générateur de forte tension) et un écran en papier recouvert de platinocyanure de baryum ($BaPt(CN)_4$, 4 H_2O), un substrat fluorescent. Il remarque qu'en interposant sa main entre le tube et l'écran, les os de sa main apparaissent sur l'écran (voir Figure 2A) : le physicien vient, en plus de découvrir les rayons X, de réaliser la première radiographie, et d'inventer l'imagerie médicale.[4] Le tube de Crookes est une source de rayons X, lesquels ne sont pas absorbés de façon homogène par le corps humain : alors que les tissus mous sont dans l'ensemble relativement transparents, les os sont opaques,



FIGURE 1 : A. Le papyrus Edwin Smith, premier traité de diagnostic médical (ici, planches VI et VII).[1] B. Gravure représentant Aulus Cornelius Celsus (fin du Ier siècle avant J-C - milieu du Ier siècle après J-C), auteur du *De medicina*.[2] C. Illustration du quadrilatère de Celse : *tumor*, *rubor*, *calor*, *dolor*. Images issues de Wikipédia (A, B) et Pinterest (C).

ce qui permet de les identifier clairement sur l'écran fluorescent (Figure 2B). Pour la première fois, on pouvait voir à l'intérieur du corps sans l'ouvrir ! Cette découverte révolutionnaire a été immédiatement et unanimement reconnue par la communauté scientifique et a valu à Röntgen le premier prix Nobel de physique en 1901.

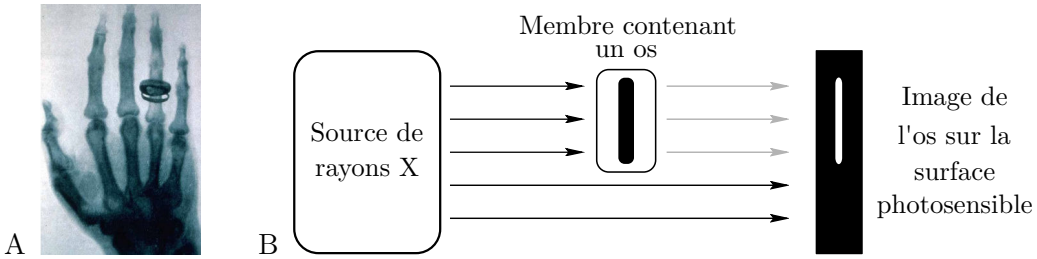


FIGURE 2 : A. Une des premières radiographies, celle de la main d'Albert von Kolliker, médecin anatomiste, en 1896. B. Principe de la radiographie conventionnelle. Image issue de Wikipédia.

La radiographie s'est alors développée considérablement durant toute la première moitié du XXème siècle, et fut utilisée de façon très intensive pour identifier les fractures osseuses tout d'abord, puis diverses pathologies, dont des tumeurs pulmonaires et des calcifications mammaires.[5] La technique était tellement populaire que dans les années 1920, alors qu'on ne connaissait pas encore les effets délétères des radiations ionisantes, elle a été appliquée sur le corps humain pour des applications clairement non médicales, par exemple comme attraction dans les fêtes foraines et dans les magasins de chaussures pour déterminer la pointure des clients. Même si de telles utilisations peuvent faire sourire de nos jours, il faut se rappeler qu'à la même époque, la radioactivité fascinait les foules et était un argument publicitaire très efficace, car là aussi les risques liés n'avaient pas encore été identifiés.[6]

De nombreuses fractures, lésions, tumeurs et autres affections ont été et sont encore repérées par la radiographie conventionnelle. Néanmoins, cette technique souffre de deux inconvénients majeurs qui limitent son utilité pour le dépistage de nombreuses pathologies. Le premier tient au contraste ténu entre les différents tissus mous, car ils possèdent sensiblement les mêmes coefficients d'absorption des rayons X ; il est ainsi difficile d'identifier des hémorragies et certaines métastases par exemple. Le second inconvénient est dû à la nature même de la radiographie, qui est une projection bidimensionnelle d'une structure en trois dimensions : l'information spatiale est donc parcellaire, ce qui est particulièrement handicapant pour des observations thoraciques. Il est possible, et réalisé, de prendre plusieurs clichés selon des axes différents pour améliorer la précision de la localisation, mais au prix d'une irradiation conséquente et en conservant une certaine incertitude. Une méthode d'imagerie permettant d'observer l'intégralité du corps humain, de façon homogène, et avec un contraste intertissulaire intéressant, serait donc très utile.

Les années 1960 et 70 ont vu l'apparition de plusieurs techniques d'imagerie dites tomographiques (du grec *tomê* qui signifie coupe) bénéficiant de ces caractéristiques. La tomodensitométrie (abrégée en TDM, ou CT pour *Computerized Tomography*) est mise au point en 1973 par Godfrey Newbold Hounsfield et Allan MacLeod Cormack[7] ; la même année, les premières expériences d'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont réalisées par Paul Lauterbur et Peter Mansfield[8] ; enfin la scintigraphie, ou imagerie médicale nucléaire, émerge dès le début des années 1960.[9] Le principe et les spécificités de ces techniques seront présentés ci-après (Partie 2). Leur utilisation a révolutionné la pratique de l'imagerie médicale : l'image qu'elles donnent permet de localiser les lésions et tumeurs de façon bien plus efficace. Le gain est multiple : le caractère tridimensionnel intrinsèque de l'image constitue bien sûr une amélioration, mais cette image est aussi bien mieux résolue et précise (les différences de contraste entre tissus mous sont souvent mieux marquées, ce qui permet de délimiter des structures de plus petite taille), et surtout il est possible de combiner, en un seul examen, plusieurs méthodes d'imagerie différentes, qui ensemble fournissent un faisceau d'informations au médecin (ce que l'on appelle l'imagerie multimodale). Il est ainsi devenu possible de diagnostiquer des maladies neurodégénératives, des arthroses ou des métastases précoces[10] avec une précision de l'ordre du centimètre ou moins, ce qui était inimaginable avec la radiographie classique.

La microscopie optique a connu quant à elle un développement plus précoce et a été appliquée plus tôt pour le diagnostic médical par l'analyse de prélèvements. La première moitié du XVIIème siècle a vu la construction des premiers microscopes. Les observations ont été rapidement très fructueuses : dès 1665, Robert Hooke décrit les cellules, qu'il nomme en référence aux chambres monacales,[11] et Marcello Malpighi remarque la structure tissulaire des organismes vivants et fonde ainsi l'histologie. Néanmoins, les savants de l'époque sont limités par le caractère transparent des coupes tissulaires qui rend les observations très délicates. Dès la fin du XIXème siècle, les progrès de la chimie de synthèse permettent de disposer de molécules absorbant très intensément dans le spectre visible ; leur utilisation en tant que colorant va faire progresser considérablement l'histologie et la cytologie, et par ricochet le diagnostic. Par exemple, la coloration de May-Grünwald Giemsa,[12, 13] basée sur deux colorants, l'éosine (rouge) et le bleu de méthylène, a permis d'identifier au sein de préparations sanguines les différents types de granulocytes[14] (éosinophiles, basophiles, neutrophiles), une famille de leucocytes (voir Figure 3). Elle est utilisée quotidiennement dans le dépistage du paludisme à moindre coût.[15] Il est donc possible depuis le début du XXème siècle de reconnaître sur des prélèvements *ex vivo* les cellules au-delà de leur morphologie, grâce à leur capacité respective à fixer différents colorants, pour réaliser des diagnostics médicaux.

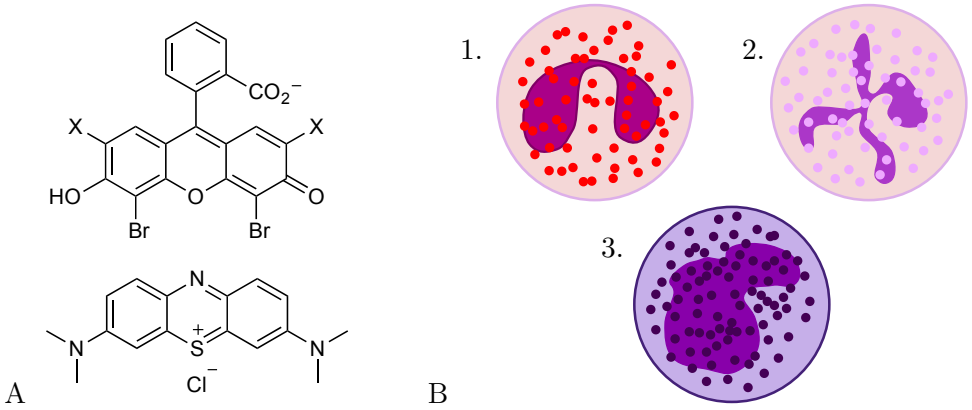


FIGURE 3 : Coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) et identification des granulocytes[14] au microscope optique. A. Colorants utilisés : éosine (en haut, X = NO_2 ou Br) et bleu de méthylène (en bas). B. Représentation schématique de granulocytes après coloration de MGG : 1 : éosinophile ; 2 : neutrophile ; 3 : basophile.

Les techniques d'imagerie médicale et de microscopie optique permettent d'observer les organismes vivants, à différentes échelles, et d'en déduire une information diagnostique. Leur apport considérable à la médecine, aussi bien en termes humains (temps de consultation pour les praticiens, amélioration des chances de survie pour les patients) qu'économiques (non-prescription de traitements lourds grâce à un dépistage précoce), explique la présence des appareils d'imagerie dans les hôpitaux en nombre toujours plus grand. Dans un rapport d'avril 2016,[16] la Cour des comptes estime le parc français en équipements à 812 IRM, 1096 tomodensitomètres et 570 scintigraphes (la part d'appareils capables d'effectuer deux modalités n'est pas précisée) ; les radiographes conventionnels ne sont eux pas recensés mais leur nombre est très supérieur. Bien qu'en augmentation, le taux d'équipement français reste modeste par rapport à la moyenne de l'OCDE, ce qui est à mettre en regard du coût de ces équipements (entre un et deux millions d'euros à l'unité).

1.2 Invention et essor de l'imagerie moléculaire

La mise au point et l'utilisation routinière de l'imagerie médicale et de la microscopie à des fins diagnostiques ou de recherche ont permis de considérables évolutions en médecine, en histologie et en biologie. L'avènement des méthodes tomographiques dès les années 1960 a encore élargi les champs d'application de l'imagerie en rendant les observations plus précises. Néanmoins, le niveau de description reste anatomique : l'imagerie permet d'étudier des structures macroscopiques (tumeurs, hémorragies, fractures, etc...), la microscopie rend visible quant à elle les cellules et les organelles. Or, dès les années 1930, une nouvelle discipline a mis au jour un niveau de complexité supplémentaire : il s'agit de la biologie moléculaire.

On savait déjà que les cellules communiquaient entre elles via des molécules, les hormones et les neurotransmetteurs ; on découvrait que ces cellules étaient faites d'un assemblage précis de molécules de différents types (acides nucléiques, protéines, lipides, métabolites, etc...) dont il est intéressant de connaître la nature, la structure tridimensionnelle, l'activité en tant qu'unité isolée, et surtout le rôle en interaction avec les autres composants cellulaires.[17]

Dans l'espoir de découvrir de nouveaux traitements et moyens diagnostics plus spécifiques et fiables, les médecins et biologistes ont ainsi cherché si les pathologies, des plus communes aux plus rares, avaient une origine moléculaire. Les résultats furent au-delà des attentes, notamment dans le domaine de l'oncologie et des maladies neurodégénératives :

- la mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (pour BReast CAncer), impliqués dans la réparation de l'ADN, a été identifiée au début des années 1990 comme promouvant le développement du cancer du sein de façon très importante : les femmes porteuses de mutations sur au moins l'un des deux gènes (la prévalence est de 1 pour 400 dans la population) ont un risque cumulé à l'âge de 70 ans de l'ordre de 50%.[18]
- la production de la protéine chimère BCR-Abl, suite à une translocation anormale entre les chromosomes 9 et 22, est directement à l'origine de 90% des cas de leucémie myéloïde chronique.[19]
- la mutation de la protéine p53, un facteur de transcription déclenchant l'arrêt de la division cellulaire et/ou l'apoptose (mort cellulaire programmée) en cas de lésions de l'ADN, a lieu dans environ 50% des cancers.[20]
- une des hypothèses communément admises pour l'origine de la maladie d'Alzheimer est le dépôt à la surface de certaines cellules du système nerveux de structures appelées plaques amyloïdes, formées par l'agrégation d'un peptide anormal appelé Aβ.[21]
- l'agrégation de la protéine α-synucléine sous forme de corps de Lewy au sein des neurones de la *substantia nigra* du cerveau est l'origine de la maladie de Parkinson.[22]

Il est donc très intéressant d'étudier à un temps donné et à l'échelle d'une cellule, d'un organe voire d'un organisme entier, la répartition de molécules, notamment celles impliquées dans des pathologies. La cartographie des molécules, leur présence ou leur surabondance en un lieu particulier, ou au contraire

leur absence ou sous-représentation, peut être mise en regard de la survenue d'une affection ou de la prise d'un médicament, ce qui fera éventuellement apparaître des corrélations. L'utilité est multiple et diverse : diagnostic ou recherche médicale à propos d'une maladie, recherche et développement de traitements, ou étude plus générale de la variabilité naturelle entre différents individus, avec l'objectif d'une médecine plus personnalisée et efficace.[23–25]

L'information moléculaire est beaucoup plus précise et spécifique que celle issue de l'imagerie purement anatomique. Elle permet une compréhension plus fine des phénomènes biologiques tout en levant des ambiguïtés. Par exemple, les cas de surdiagnostic du cancer du sein étaient nombreux, en raison de la difficulté à identifier précisément les nodules cancéreux sur les mammographies et à prédire leur capacité à évoluer en tumeurs invasives.[18] La recherche de la présence de mutations des gènes *BRCA* pour les femmes dont au moins une parente a contracté un cancer du sein a permis de compléter ce diagnostic en évitant des mastectomies inutiles, tout en permettant à l'inverse de réaliser des mastectomies préventives pour les patientes à risque.[18, 26]

La cartographie moléculaire à l'échelle des organismes entiers a d'abord été réalisée de manière discrète et invasive par l'observation au microscope de tissus issus de biopsies, au moyen des méthodes classiques de la cytologie. La cytochimie est ainsi un moyen de révéler des molécules, mais de façon très peu sélective : lors de la coloration de MGG (voir Figure 3), les colorants marquent les granules uniquement par réaction acido-basique (l'éosine, un acide, se fixe aux granules basiques des éosinophiles et le bleu de méthylène, une base, marque les granules acides des basophiles). L'immunocytochimie (Figure 4) permet quant à elle de bénéficier d'une très grande sélectivité : un anticorps hautement spécifique de la biomolécule d'intérêt est mis au contact des tissus et va se lier à sa cible ; la visualisation de cet anticorps, et donc de la molécule cible, a lieu ensuite de manière directe ou indirecte. Cette méthode est utilisée quotidiennement dans de très nombreux laboratoires de recherche ou d'analyses.

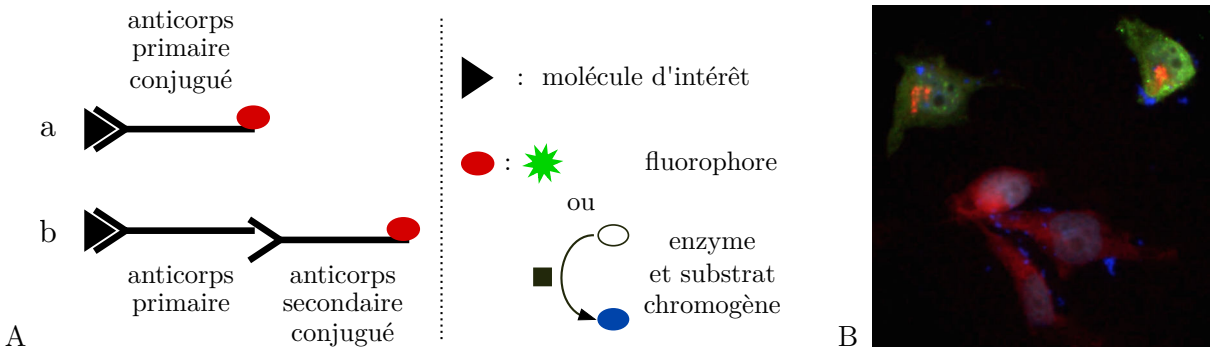


FIGURE 4 : Immunocytochimie. A. Principe : visualisation spécifique des molécules biologiques d'intérêt de manière directe (a) ou indirecte (b) au sein de cellules. B. Exemple : marquage des protéines Tax du virus HTLV-1 (en vert) et IKKγ de la voie de signalisation NF-κB (en rouge) dans des cellules HeLa fixées, et visualisation par microscopie à épifluorescence.[27]

L'avènement des techniques d'imagerie tomographiques a permis un gain conséquent en rendant possible l'observation de molécules précises de façon globale, non-invasive et dynamique : c'est ce qu'on appelle l'imagerie moléculaire.[28, 29] Cette dernière est née au cours des années 1960 et ne cesse de se développer depuis ; ses applications cliniques, en oncologie notamment, sont toujours plus nombreuses.[30, 31] Elle nécessite, outre les techniques et appareils d'imagerie anatomique classiques, des outils capables de transcrire la présence de molécules nanoscopiques en un signal physique détectable à l'extérieur du corps (un flux de photons par exemple). Ces outils, des molécules purement organiques, des complexes de coordination, ou des nanoparticules, créés par les chimistes et injectés dans le corps, sont appelés sondes moléculaires.[29]

L'imagerie moléculaire est donc le dernier développement d'un long cheminement débuté il y a plusieurs millénaires par l'observation à l'œil nu du corps humain. Elle participe, avec les approches

-omiques (génomique, protéomique, métabolomique, etc...), à la nouvelle approche intégrative de la biologie, appelée biologie systémique (en anglais *systems biology*), qui vise à rationaliser les mécanismes moléculaires normaux et pathologiques à l'échelle de l'organisme entier pour améliorer la prédiction des maladies.[32–35]

Je vais maintenant présenter les différentes modalités d'imagerie moléculaire, leur principe de fonctionnement et leurs avantages et inconvénients. J'en profiterai pour donner quelques exemples de sondes moléculaires utilisées en clinique ou en recherche. Etant donné que mon travail de thèse concerne deux techniques d'imagerie, par fluorescence et par résonance magnétique, celles-ci feront l'objet d'une description plus approfondie.

2 Les modalités d'imagerie moléculaire

Parmi les techniques d'imagerie moléculaire, on compte traditionnellement les méthodes appartenant à la médecine nucléaire (la scintigraphie) ainsi que l'IRM et l'imagerie par fluorescence. La visualisation de molécules a aussi été réalisée à l'aide de la tomodensitométrie et de l'imagerie ultrasonore ; néanmoins, ces techniques étant nettement moins développées et par souci de concision, je ne les détaillerai pas.

2.1 La scintigraphie : tomographies par émission monophotonique ou de positrons

Les deux méthodes de scintigraphie, les tomographies par émission monophotonique (TEMP, ou SPECT en anglais pour *Single Photon Emission Computed Tomography*) ou de positrons (TEP, ou en anglais PET pour *Positron Emission Tomography*), profitent du fait que les photons de très haute énergie, dans le domaine gamma, sont très peu arrêtés par les tissus humains (la transparence est grande). Elles utilisent des sondes moléculaires sources de photons γ appelées médicaments radiopharmaceutiques ou traceurs, et des dispositifs de détection spécifique de ces photons appelés gamma caméras et disposés tout autour du patient (voir Figure 5). La différence entre les deux techniques est la voie de génération des photons γ, ce qui a des conséquences sur la sensibilité et la résolution de ces techniques ainsi que sur les noyaux radioactifs incorporés dans les traceurs :

- Pour la TEMP, l'isotope radioactif utilisé est radioactif γ et émet directement les photons utiles pour l'imagerie, "un par un". De nombreux éléments peuvent être utilisés (voir Tableau 1), ce qui permet de ne retenir que ceux dont le temps de demi-vie est optimal (ni trop long pour éviter une exposition inutile au patient, ni trop court pour avoir le temps de synthétiser le traceur et de réaliser l'examen tant qu'une majeure fraction du traceur est radioactif) et les propriétés chimiques intéressantes (délai de synthèse du traceur, et surtout possibilité de changer de radioisotope pour faciliter la transition vers la radiothérapie).
- Pour la TEP au contraire, l'isotope est radioactif β^+ ; il émet des positrons qui, après un libre parcours de l'ordre du millimètre, vont s'annihiler en rencontrant des électrons. La collision engendre deux photons d'énergie identique, 511 keV, et d'impulsion opposée ; deux photons vont ainsi être détectés en même temps sur le même axe par des détecteurs diamétralement opposés, ce qui rend la reconstruction de l'image plus efficace et améliore ainsi la sensibilité et la résolution.[36] Les contreparties sont le plus faible choix de radioisotopes utilisables, la demi-vie généralement plus courte de ceux-ci, et leur coût de production plus élevé.

De très nombreux traceurs pour l'imagerie moléculaire ont été développés et utilisés en recherche et en clinique, et la synthèse et l'évaluation de nouveaux radiopharmaceutiques constitue un domaine d'investigation très actif.[37, 38] Quelques exemples sont présentés ici (voir Figure 6) : le [^{11}C]-SCH23390 **A**, équivalent radioactif d'un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1, est utilisé pour l'imagerie TEP du néocortex.[39] Le NéoTect® **B** est un chélate de technétium qui est sélectif des récepteurs de la somatostatine ; il est indiqué dans l'imagerie TEMP de ces récepteurs présents en grand nombre dans certaines pathologies cancéreuses.[40] Enfin, le ^{68}Ga-MA-NOTMP-BBN$_{(7-14)}$ **C** est un traceur en développement consistant en un conjugué entre un complexe de ^{68}Ga et un octapeptide appelé

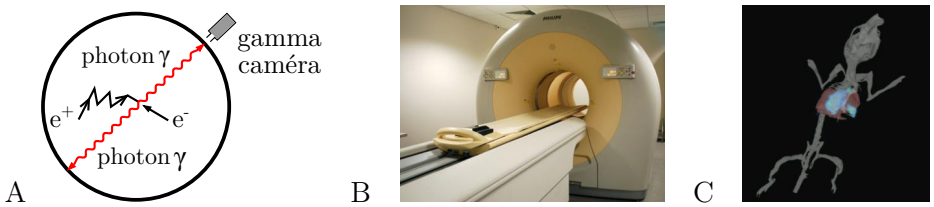


FIGURE 5 : Tomographie par émission de positrons. A. Principe de fonctionnement. B. Photographie de l'appareil TEP-TDM du Centre Léon Bérard de Lyon. C. Image TEP-TDM d'une souris.[25]

Radioisotopes γ pour la TEMP			Radioisotopes β^+ pour la TEP	
Radioisotope	$T_{1/2}$	Énergie	Radioisotope	$T_{1/2}$
^{99m}Tc	6,0 heures	140 keV	^{11}C	20 minutes
^{111}In	2,8 jours	171 keV et 245 keV	^{18}F	110 minutes
^{123}I	13,2 heures	159 keV	^{64}Cu	12,7 heures
^{201}Tl	3,0 jours	167 keV	^{68}Ga	68 minutes

TABLEAU 1: Radioisotopes utilisés couramment pour la médecine nucléaire et leurs caractéristiques.

bombesin$_{(7-14)}$, ce dernier présentant une grande affinité pour certains récepteurs (couplés à des protéines G) surexprimés dans certaines tumeurs ; il est destiné au diagnostic par TEP du cancer.[41]

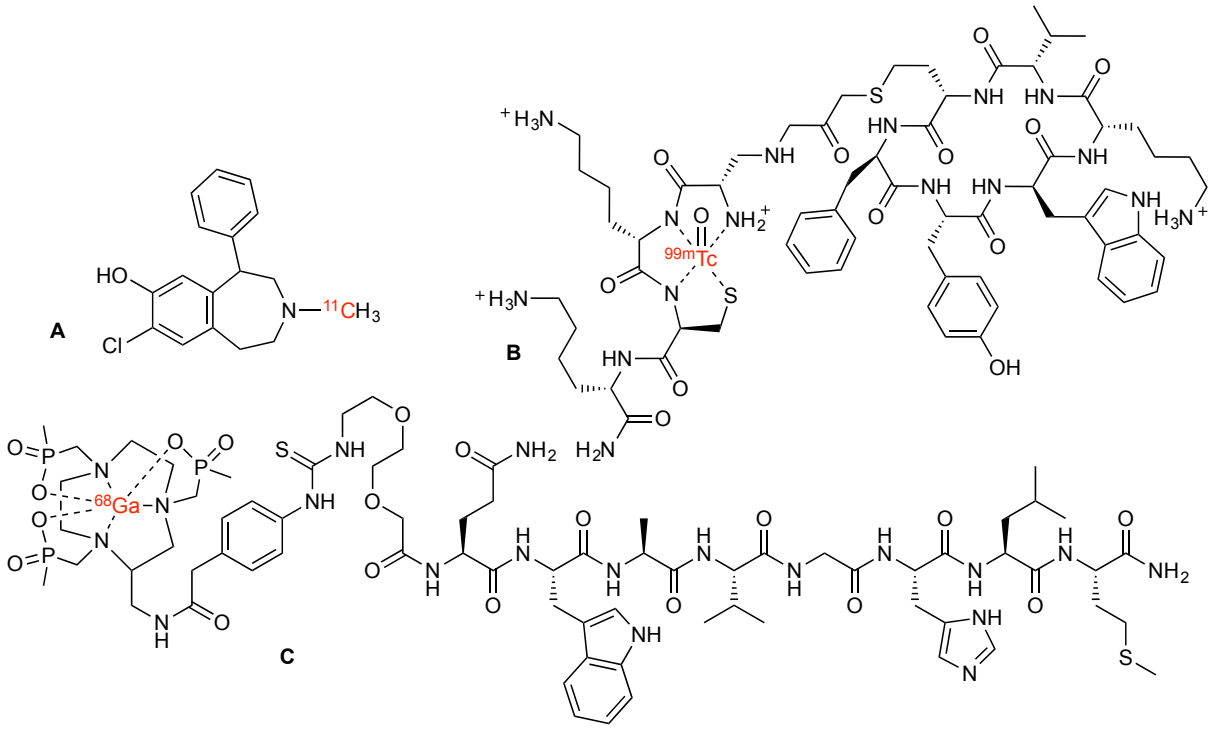


FIGURE 6 : Exemples de traceurs utilisés pour la TEMP ou la TEP. **A** : [^{11}C]-SCH23390, pour la TEP.[39] **B** : NéoTect®, pour la TEMP.[40] **C** : ^{68}Ga-MA-NOTMP-BBN$_{(7-14)}$ pour la TEP.[41]

La TEP et la TEMP bénéficient toutes deux d'une excellente sensibilité de l'ordre du picomolaire voire inférieure,[25] ce qui en fait la méthode d'imagerie de choix lorsque de faibles quantités de molécules cibles sont recherchées, par exemple des récepteurs membranaires. Néanmoins, la résolution est assez

faible, de l'ordre du centimètre pour la TEMP et de quelques millimètres pour la TEP[23] ; un moyen courant pour s'affranchir de cette limite est de réaliser en même temps une tomodensitométrie (l'examen s'appelle alors un PET-CT Scan, selon le terme anglais), ce qui permet de bénéficier, en complément de l'information moléculaire, de la cartographie tissulaire en haute résolution (en dessous de 100 μm pour la TDM).[25] Tous les appareils de TEP commercialisés aujourd'hui sont d'ailleurs aussi capables de réaliser un examen TDM simultané.[16] Mais le principal inconvénient de la médecine nucléaire est la dose très importante de radiations que le patient reçoit lors de l'examen : elle dépend du type d'observation mais peut représenter jusqu'à plusieurs fois la dose de radiation annuelle reçue en temps normal, ce qui oblige à bien évaluer la balance bénéfices-risques avant de réaliser l'examen.

2.2 L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM repose sur l'adaptation de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) en une technique de visualisation tomographique du corps humain. Elle est de nos jours la méthode d'imagerie la plus connue et est utilisée dans de toujours plus nombreuses indications.[16] Je vais d'abord rappeler brièvement le principe de la spectroscopie RMN pour ensuite présenter l'IRM. Puis je préciserai l'intérêt des agents de contraste et leur fonctionnement, avant de décrire quelques exemples d'agents dédiés à l'imagerie moléculaire.

2.2.1 De la spectroscopie RMN à l'IRM

La spectroscopie RMN classique vise à déterminer la fréquence de Larmor ω (avec laquelle est calculé le déplacement chimique) de protons dans un environnement chimique différent, avec l'objectif de caractériser un échantillon. Pour cela, on soumet l'échantillon à un champ magnétique $\vec{B}$ constant et de grande valeur (de l'ordre de la dizaine de teslas aujourd'hui). Un deuxième champ magnétique $\vec{B_1}$, tournant dans un plan perpendiculaire au champ $\vec{B}$, est appliqué sous la forme d'une impulsion radiofréquence autour de la fréquence de Larmor moyenne ; la magnétisation $\vec{\mu_{tot}}$ (somme de tous les moments magnétiques de spin), qui était alignée sur le champ $\vec{B}$ en vertu de l'effet Zeeman, se retrouve alors basculée dans le plan perpendiculaire (voir Figure 7A). Une fois $\vec{B_1}$ éteint, les spins ne sont plus soumis qu'au champ statique ; la magnétisation retourne s'aligner sur le champ $\vec{B}$ en précessant autour de l'axe principal à la fréquence de Larmor (Figure 7B). La précession induit un courant électrique dans une bobine de mesure ; la transformée de Fourier inverse de ce courant permet finalement de déterminer les différentes fréquences de Larmor des protons, ce qui constitue la caractérisation de l'échantillon (Figure 7C).[42]

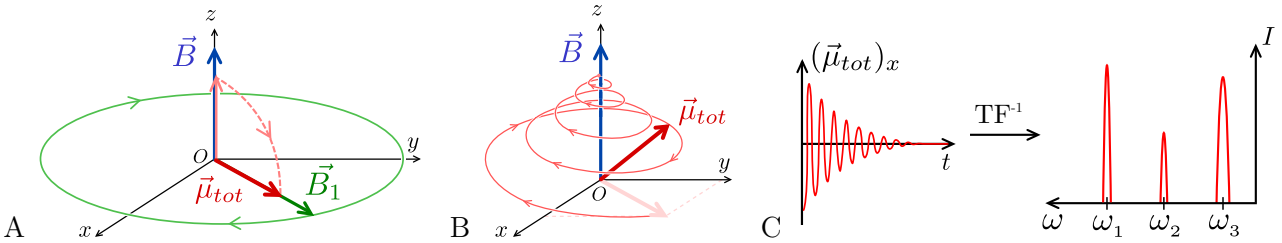


FIGURE 7 : Principe de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN). A. Basculement de $\vec{\mu_{tot}}$ lors de l'application d'un champ perpendiculaire tournant $\vec{B_1}$. B. Retour de $\vec{\mu_{tot}}$ à l'équilibre après l'extinction de $\vec{B_1}$. C. Acquisition du signal issu de la précession de $\vec{\mu_{tot}}$ et transformée de Fourier inverse TF^{-1} pour obtenir les fréquences de Larmor des spins ω.[42]

Le retour à l'état d'équilibre, appelé relaxation, est favorisé par les fluctuations locales du champ magnétique induites par le mouvement aléatoire des spins. On distingue deux phénomènes simultanés[43] :

— la relaxation spin-réseau constitue la désexcitation des spins par échange d'énergie avec le milieu. Elle se traduit par le retour de la magnétisation dans l'axe du champ $\vec{B}$, qui a lieu selon un processus exponentiel de temps caractéristique T_1 (voir Figure 8A).

— la relaxation spin-spin est la perte de cohérence quantique entre spins entraînée par les fluctuations de phase de chaque spin. Sa traduction macroscopique est une diminution de la projection de la magnétisation dans le plan perpendiculaire au champ $\vec{B}$, là aussi au cours d'un processus exponentiel dont le temps caractéristique est noté T_2 (Figure 8B).

A la fois T_1 et T_2 peuvent être mesurés de façon indépendante par des expériences de spectroscopie RMN plus complexes que celle présentée plus haut : inversion-récupération pour T_1, écho de spin pour T_2.

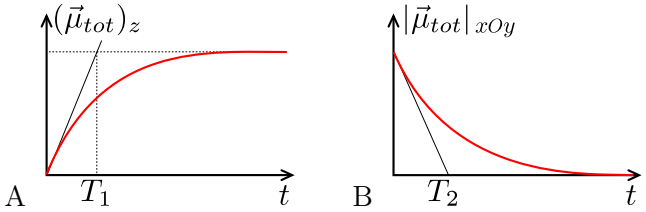


FIGURE 8 : Phénomènes de relaxation. A. Relaxation spin-réseau, ou relaxation T_1 : croissance de la magnétisation longitudinale. B. Relaxation spin-spin, ou relaxation T_2 : décroissance de la magnétisation transverse.

La spectroscopie RMN permet donc d'accéder à de nombreuses grandeurs caractérisant les spins contenus dans un échantillon (fréquences de Larmor ω, temps de relaxation T_1 et T_2) et ainsi de le caractériser de façon moléculaire, mais aussi physico-chimique (étude de la convection, de la viscosité, etc...). Depuis les années 1950 et son invention par Bloch et Purcell, elle est utilisée quotidiennement comme méthode d'analyse de routine en chimie.[42]

L'IRM a quant à elle un objectif différent : réaliser l'observation tomographique d'un organisme vivant (homme ou souris le plus souvent), en effectuant la cartographie des propriétés magnétiques des protons des molécules d'eau contenues dans cet organisme. Les contraintes par rapport à la spectroscopie RMN classique présentée au-dessus ne sont donc pas les mêmes. Ainsi, on ne cherche pas en IRM à mesurer les fréquences de Larmor des protons : les spins étudiés sont tous dans le même environnement chimique (pour schématiser, celui d'une molécule d'eau dans le solvant eau) et ont donc la même fréquence de Larmor. La résolution spectrale n'est donc pas prioritaire. Au contraire, la densité volumique de protons ρ (l'analogue de l'aire absolue sous la courbe sur le spectre de droite de la Figure 7C) et les temps de relaxation vont être les grandeurs pertinentes à mesurer, car ils sont caractéristiques de tissus et d'environnements physico-chimiques particuliers (voir ci-dessous et Figure 10). L'IRM a donc pour but l'acquisition résolue spatialement et si possible temporellement des informations de spin sous la forme de ρ, T_1 et T_2 au niveau d'un organisme entier.[43]

L'information spatiale est obtenue par l'application, en supplément du champ $\vec{B}$ longitudinal uniforme utilisé en spectroscopie RMN classique, de gradients de champ magnétique dans les trois directions de l'espace (voir Figure 9).[8] En effet, la fréquence de Larmor ω d'un spin est proportionnelle à la norme du champ magnétique qu'il ressent ; l'inhomogénéité de champ magnétique due aux gradients se traduit donc en une inhomogénéité de fréquence de Larmor au sein de l'organisme. Cela permet, par l'application d'un champ oscillant $\vec{B_1}$ à une fréquence particulière, de n'exciter qu'une population de spins contenue dans une zone très précise et d'acquérir les informations des spins de cette région uniquement et indépendamment des autres protons. La répétition de ces acquisitions en modifiant la fréquence de $\vec{B_1}$ ou les gradients de champ permet de reconstruire l'image de l'intégralité de la zone étudiée. L'intensité du champ uniforme $\vec{B}$ et surtout des gradients de champ est essentielle pour la résolution spatiale : plus les gradients seront intenses, plus la zone (appelée voxel) où les fréquences de Larmor sont dans un même intervalle sera restreinte et plus la résolution sera grande.[43] De plus, les organismes étant totalement transparents aux champs magnétiques intenses et aux ondes radiofréquences, l'intégralité du corps peut être étudiée de manière satisfaisante, ce qui fait de l'IRM une modalité d'imagerie tomographique.

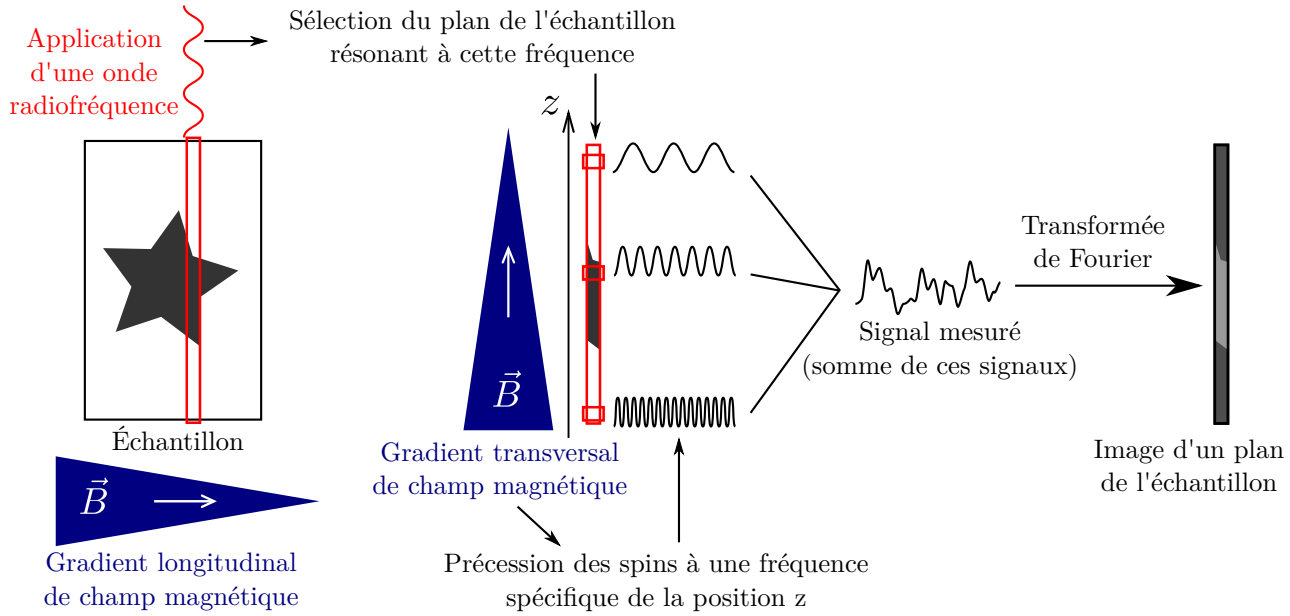


FIGURE 9 : Acquisition de l'image d'un échantillon par Imagerie par Résonance Magnétique, ici pour le cas plus simple d'un échantillon à deux dimensions.

De la même manière qu'en spectroscopie RMN classique, l'intensité du signal acquis est fonction, pour des paramètres d'expérience donnés, de la densité de protons ρ et des temps de relaxation des spins dans la zone concernée. De façon identique, il est possible d'utiliser des séquences d'acquisition de données pour lesquelles l'intensité du signal ne dépendra que de certains de ces paramètres, comme ρ (ce qu'on appelle la pondération du signal en densité protonique), T_1 (pondération en T_1, ou en anglais T_1-*weighting*), ou T_2 (pondération en T_2 ou T_2-*weighting*). La valeur du signal correspondant à chaque voxel est ensuite convertie en niveaux de gris et la reconstitution tridimensionnelle finale est obtenue, coupe par coupe. En pondération T_1, les tissus de T_1 faible apparaissent en hypersignal (zones claires), alors qu'avec la pondération T_2, les régions de T_2 réduit figurent en hyposignal (zones sombres).

Les différents tissus d'un organisme vivant présentent une grande amplitude de temps de relaxation. À titre d'exemples, les T_1 et T_2 au sein de plusieurs tissus sont donnés dans la Figure 10A pour un champ magnétique de 1,5 T (les valeurs varient en fonction de l'intensité du champ mais la tendance reste identique).[44] Les écarts sont dus au fait que la relaxation des spins est engendrée par l'agitation des molécules, qui n'est pas homogène au sein du corps humain. La réponse en T_1 ou T_2 en fonction de l'agitation est présentée de façon qualitative dans la Figure 10B[45] ; les tissus mous comme les muscles ou les tissus adipeux correspondent à la zone centrale, de fréquence d'agitation proche de la fréquence de Larmor, alors que les tissus contenant des fluides biologiques mobiles, comme le liquide céphalo-rachidien ou les œdèmes par exemple, ont une agitation très rapide. Pour visualiser ces différentes régions, on pourra donc opter pour une pondération en T_1 ou en T_2 selon si l'on cherche un hyper- ou un hyposignal.

Les écarts de signal importants et natifs entre les tissus mous obtenus en pondération T_1 ou T_2, meilleurs dans la majorité des cas que ceux obtenus par d'autres modalités comme la TDM, font de l'IRM une méthode de choix pour réaliser la cartographie tomographique des organismes vivants.[45] Les informations obtenues par chacune des pondérations sont de plus complémentaires, ce qui justifie le plus souvent leur utilisation conjointe bien que le temps d'acquisition soit alors plus grand. La résolution est aussi excellente, inférieure au dixième de millimètre,[25] et en constante amélioration grâce à la conception d'équipements de grand champ magnétique (supérieur à 3 T pour les plus récents) et dotés de gradients très intenses (jusqu'à 25 mT/m).[43] L'IRM ne nécessite par ailleurs aucun rayonnement ionisant, au contraire des TEMP, TEP et TDM, et ne présente donc qu'un risque pour la santé réduit

A

Tissu	T_1 (ms)	T_2 (ms)
muscles	900	50
graisses	250	70
LCR	4000	2000
matière grise	900	90

B

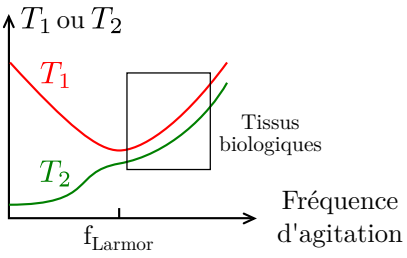


FIGURE 10 : Temps de relaxation dans les tissus biologiques. A. Exemples de temps de relaxation dans quelques tissus humains, mesurés à 1,5 T[44] ; LCR : liquide céphalo-rachidien. B. Evolution des T_1 et T_2 en fonction de la fréquence des mouvements moléculaires.[45]

dû aux hauts champs magnétiques (les ondes radiofréquences sont inoffensives) ; pour toutes ces raisons, elle est devenue rapidement la méthode de choix pour l'observation du cerveau (voir Figure 11), des épanchements et des muscles, ainsi que dans de nombreux autres contextes.[45]

A B C

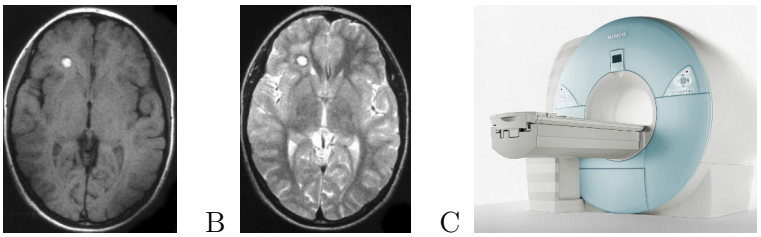


FIGURE 11 : Image IRM. A et B. Image de cerveau d'un patient épileptique en pondération T_1 (A) ou T_2 (B).[46] C. Photographie d'un appareil IRM. Image issue de Wikipédia.

2.2.2 Agents de contraste pour l'IRM

Bien que les écarts de temps de relaxation et les séquences d'acquisition permettent souvent de visualiser les différents tissus avec une précision suffisante pour réaliser un diagnostic fiable, il reste une proportion importante des examens (environ 40%)[47–49] où il est impossible d'identifier clairement les structures recherchées. Cette situation avait été anticipée par Lauterbur dès 1973[8] ; il avait noté l'intérêt de marquer des tissus particuliers, par exemple des tumeurs dans le cas du diagnostic de cancers, afin de pallier au manque de contraste entre des zones de temps de relaxation proches. Il faudrait pour cela les faire apparaître sélectivement en hypo- ou en hypersignal. Cette augmentation artificielle du contraste rendrait l'analyse de l'image plus aisée et son interprétation moins ambigüe. Pour réaliser cet objectif, on peut injecter dans l'organisme des molécules appelées agents de contraste[43] qui sont caractérisées par :

— un effet sur les processus de relaxation des protons situés dans leur voisinage ; on considère généralement un rayon d'action de l'ordre de quelques Å.

— une biodistribution optimisée, dépendant des propriétés pharmacocinétiques de la molécule mais idéalement centrée sur certains tissus (par exemple les tumeurs). Cela permet de limiter leur effet à une zone bien précise et ainsi d'augmenter le contraste de l'image.

Les phénomènes de relaxation sont dus aux fluctuations du champ magnétique induites par le mouvement des moments magnétiques qui sont majoritairement, en l'absence de tout élément extérieur, des protons. Or, ces fluctuations seraient d'amplitude bien plus importante si des structures moléculaires possédant un fort moment magnétique circulaient aussi dans le milieu. Ces structures, paramagnétiques, sont celles qui sont utilisées comme agents de contraste ; leur présence dans les tissus

accroît les fluctuations de champ et accélère donc la relaxation en abaissant T_1 et/ou T_2. Les agents de contraste peuvent être classés selon leur nature moléculaire ou selon leur action sur l'un ou l'autre des phénomènes de relaxation ; néanmoins, ces deux classifications se recoupent relativement bien, ce qui permet d'identifier deux grandes familles d'agents de contraste.[50]

Les agents de contraste de type T_1 agissent sur les deux types de relaxation, mais de façon plus importante sur la relaxation spin-réseau. Lauterbur les a proposés dès son premier article décrivant l'IRM[8] : il a décrit l'utilisation d'ions Mn^{2+} libres comme une méthode pour différencier deux solutions aqueuses.[8, 51] De nos jours, les agents T_1 sont des complexes d'ions métalliques paramagnétiques dont le ligand est multidentate, ramifié, préorganisé pour la chélation et souvent macrocyclique. Les ions libres ou trop faiblement complexés entraînent en effet une toxicité bien trop importante et ont une biodistribution trop désavantageuse.[43] Dans le langage médical, ces complexes sont appelés chélates. Les métaux utilisés sont choisis pour leur valeur de spin électronique maximale, qui garantit au complexe un moment magnétique et un effet relaxant le plus grand possible : il s'agit le plus souvent de Gd^{3+} (valeur de spin S de 7/2), Mn^{2+} (S = 5/2 en configuration champ de ligand fort) et Fe^{3+} (S = 5/2 en configuration champ fort aussi).

Les agents T_1 sont injectés par voie intraveineuse (une absorption orale les détruirait pour la plupart), mais à cause de leur taille relativement réduite, ils se distribuent dans les tissus interstitiels avec un temps de demi-vie de l'ordre de 5 minutes puis sont éliminés par les reins avec une demi-vie d'environ 80 minutes.[43] On parle ainsi d'agents ECF, pour *Extracellular Fluids*. Ils ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) lorsque celle-ci est intacte ; pour cette raison, ils sont utilisés couramment dans le diagnostic de pathologies neurologiques impliquant la rupture de la BHE.[45] Les plus massifs des agents T_1, liés à une macromolécule, ne traversent pas les vaisseaux et restent dans le flux sanguin, on les appelle donc *Blood-Pool Agents* (BPA). Ils sont employés pour l'angiographie assistée par résonance magnétique (ARM).[52] Certains enfin sont relativement spécifiques de certains organes via un ciblage passif.

Les agents de contraste de type T_2 agissent quasi-uniquement sur la relaxation spin-spin. Ce sont des nanoparticules faites d'un assemblage de petits cristallites d'oxyde de fer dans une matrice stabilisante et hydrosolubilisante, l'ensemble présentant un caractère superparamagnétique.[50] On les distingue selon leur taille : les plus grandes, au-dessus de 50 nm, sont appelées particules SPIO (pour *Super Paramagnetic Iron Oxide*), les autres sont nommées particules USPIO (*Ultra-small Super Paramagnetic Iron Oxide*). Les premières s'accumulent rapidement dans le système réticulo-endothélial (notamment les macrophages) du foie et de la rate, et sont donc indiquées pour l'imagerie de ces organes. Les secondes circulent plus longtemps, et peuvent à ce titre servir de BPA ; toutefois, elles sont absorbées de façon importante par les ganglions lymphatiques sains et constituent donc un moyen de les étudier.[50]

Il existe aussi un troisième type d'agent de contraste dont le fonctionnement est relativement différent[53, 54] : il s'agit des agents dits PARACEST, pour *Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer*.[55] Ces molécules sont des chélates d'ions paramagnétiques qui possèdent, à proximité du centre métallique, des protons échangeables avec les molécules d'eau du solvant, portés généralement par des fonctions amines, amides ou carbamates.[56] Le principe de l'effet CEST, son utilisation en IRM ainsi que l'intérêt des agents PARACEST ne seront pas présentés ici par souci de concision, cependant je considérerai ces agents dans la suite de l'exposé.

Depuis les années 1980, de très nombreux agents de contraste pour l'IRM ont été développés, commercialisés et utilisés en clinique ou en recherche et développement.[50] Je vais maintenant présenter quelques exemples.

Parmi les agents T_1, le plus connu est probablement le Dotarem® (molécule **D** représentée Figure 12), commercialisé depuis 1989 par Guerbet. Ce chélate macrocyclique de gadolinium est un agent ECF utilisé couramment pour l'imagerie du rachis. Le MS-325 **E**, vendu sous le nom de Vasovist® par Bayer Schering, est aussi un complexe de Gd^{3+}, quoique non cyclique, mais qui agit en tant que BPA ;

son groupement 6,6'-diphénylcyclohexyle très apolaire possède en effet une forte affinité pour l'albumine sérique, une protéine présente en grande quantité dans le flux sanguin, ce qui permet la longue rétention du MS-325 dans la circulation et son utilisation en ARM.[57, 58] Enfin le Mn(DPDP)HNa_3 **F**, commercialisé sous le nom de Teslascan® par GE Healthcare, est un chélate de manganèse(II) qui présente une sélectivité passive pour les hépatocytes[48] ; il a été interdit à la vente en 2012 pour des raisons de toxicité.

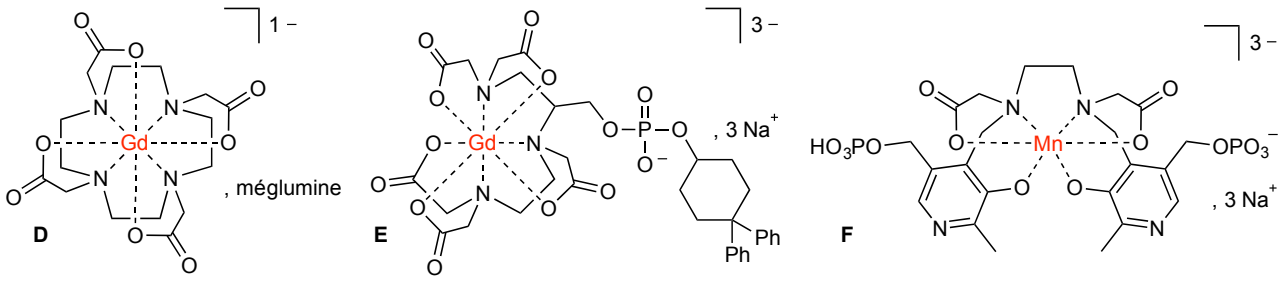


FIGURE 12 : Exemples d'agents de contraste T_1. **D**. Dotarem®, ou 1,4,7,10-tétraacétate-1,4,7,10-tétraazacyclododécanegadolinate(III) de méglumine (Gd(DOTA)méglumine), ou gadotérate de méglumine. **E**. Vasovist®, ou MS-325, ou gadofosveset trisodique. **F**. Teslascan®, ou *N*,*N*'-dipyridoxyléthylènediamine-*N*,*N*'-diacétate-5,5'-bisphosphatomanganate(II) de sodium (Mn(DPDP)HNa_3), ou mangafodipir trisodique.

Comme exemple d'agent T_2, on peut citer le ferumoxtran-10, ou Sinerem® de son nom commercial chez Guerbet, une suspension de particules USPIO à base de dextran et citrate et d'une taille de l'ordre de 50 nm.[50] Du côté des particules SPIO, le Resovist® développé par Bayer Schering est une suspension de nanoparticules faites de carboxydextran dont le diamètre moyen est de 62 nm. Mais alors que le premier n'a jamais été commercialisé car la demande d'autorisation a été annulée par Guerbet, le second a été vendu puis retiré du marché en 2009. À ce jour, le seul agent nanoparticulaire de type T_2 commercialisé est le ferumoxsil, ou Lumirem®, produit spécifique destiné à l'imagerie du tube digestif et administré par voie orale ou rectale.[50]

Enfin, le plus connu des agents PARACEST est le complexe d'europium **G** (Figure 13), qui comporte 4 fonctions amides.[59] La majorité des agents préparés sont des déclinaisons de ce complexe, où l'ion Eu^{3+} a été remplacé par un autre lanthanide comme Yb^{3+} ou Tb^{3+}, ou dans lesquels un ou plusieurs groupements substituant les fonctions amide ont été changés.[56] Plus récemment, de nouveaux complexes à base de métaux de transition de la première période ont démontré une grande efficacité en tant qu'agents PARACEST,[60–62] à l'instar de la molécule **H**.[63]

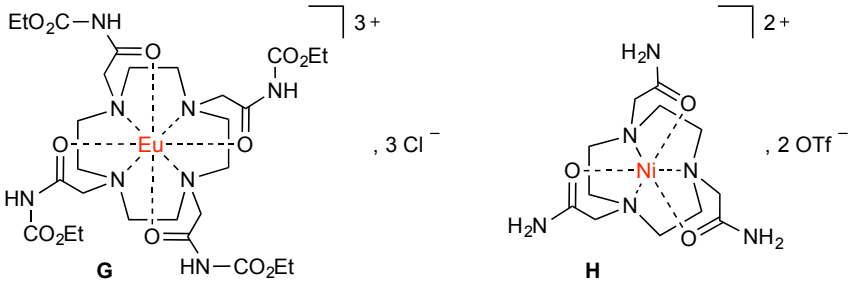


FIGURE 13 : Exemples d'agents de contraste PARACEST. **G**. Chlorure de 1,4,7,10-[(*N*-acétate)acétamide]-1,4,7,10-tétraazacyclododécaneeuropium(III) (Eu(DOTA)-tétraamide).[59] **H**. Triflate de 1,4,7-acétamide-1,4,7-triazacyclononanenickel(II).[63]

Le bénéfice procuré par l'utilisation d'agents de contraste est parfois très important : l'augmentation du contraste peut permettre d'identifier des pathologies qui n'auraient sinon pas été visibles sur l'image, ou de façon ambigüe (voir Figure 14). C'est pour cette raison que les agents se sont imposés dans la panoplie du médecin radiologue comme un outil indispensable dans nombre d'examens IRM.

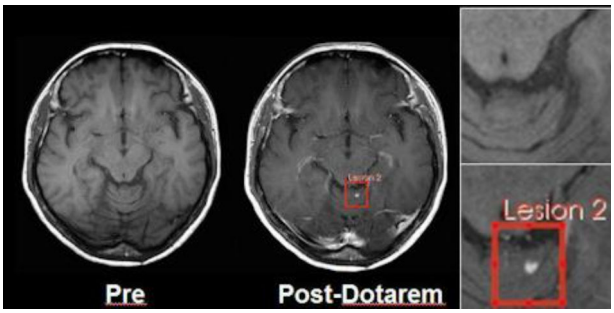


FIGURE 14 : Détection d'une lésion au cerveau assistée par l'utilisation d'un agent de contraste T_1, le Dotarem®.[64]

2.2.3 Agents d'imagerie moléculaire

Tout comme les radiopharmaceutiques, les agents de contraste pour l'IRM peuvent être rendus sélectifs d'une molécule particulière et donc servir de base à l'élaboration de sondes moléculaires.[47, 50] Néanmoins, la sensibilité est très inférieure aux méthodes d'imagerie nucléaire : elle n'est que de l'ordre du millimolaire,[25, 50, 65] voire de la dizaine de millimolaires pour l'imagerie CEST. Cet inconvénient majeur rend la visualisation de molécules biologiques très délicate, en particulier les récepteurs membranaires, car ceux-ci sont présents dans les tissus à des concentrations beaucoup plus réduites (de l'ordre du nanomolaire pour les plus abondants).[50] De rares exemples, qui tiennent plus de la preuve de concept académique que du composé utilisable en routine, ont tout de même été développés[47, 50] ; certains sont présentés à la Figure 15 et discutés ci-après.

Deux bioconjugués ont été réalisés pour l'imagerie de l'intégrine endothéliale $\alpha_\nu\beta_3$, un marqueur ectomembranaire de l'angiogénèse et donc des tumeurs en croissance (voir Figure 15A). Le premier est constitué de liposomes paramagnétiques renfermant des ions Gd^{3+}, couplés (via des liens biotine-streptavidine) à un anticorps monoclonal.[66] Le second est une nanoparticule contenant des chélates de gadolinium et équipée sur sa surface d'un antagoniste peptidomimétique de l'intégrine.[67] Dans les deux cas, le problème de la sensibilité a été résolu en équipant la partie ciblante avec un très grand nombre d'unités paramagnétiques, afin de compenser le grand écart entre la concentration en ions Gd^{3+} nécessaire pour avoir un effet notable sur le contraste d'une part, et le nombre très réduit de récepteurs à la surface des cellules d'autre part ; le ciblage des ions paramagnétiques et le gain en contraste est à chaque fois très bon.

Cette approche présente toutefois d'importantes limites pour des applications *in vivo*. En effet, les propriétés pharmacocinétiques sont défavorables : la biodistribution des conjugués est handicapée par leur taille importante et la diffusion généralement lente des anticorps. Or, la reconnaissance spécifique et rapide des récepteurs cibles est essentielle pour bénéficier d'un contraste suffisant : chaque conjugué qui n'est pas fixé sur une intégrine génère un bruit important qui limite la qualité de l'image. De plus, la stabilité fait aussi l'objet de questions, et l'excrétion rénale semble difficile. Enfin, il paraît délicat avec ce type de constructions de disposer d'un outil de diagnostic fiable et de coût modéré.

Une autre approche a été envisagée pour concentrer suffisamment les agents de contraste afin de visualiser des cibles moléculaires par IRM : il s'agit d'internaliser les agents dans les cellules afin d'accumuler les ions paramagnétiques pour avoir un contraste intéressant (voir Figure 15B). Par exemple, le chélate **I**[68] (Figure 15) comporte une unité progestérone qui le rend à la fois assez apolaire pour traverser les membranes et dans le même temps spécifique du récepteur, intracellulaire, à cette hormone : une fois pénétré dans le cytoplasme par diffusion passive, il est piégé par le récepteur et reste dans la cellule. Cette molécule peut être utilisée pour le diagnostic *in vitro* du cancer, les récepteurs à progestérone étant impliqués dans la majorité des cancers du sein. Dans un autre exemple, un bioconjugué entre des chélates de gadolinium et l'albumine sérique bovine maléylée (*mal*-BSA) a été utilisé pour marquer des macrophages dans le contexte de l'athérosclérose[69] : *mal*-BSA est un ligand connu d'un récepteur de surface des macrophages, elle va ainsi permettre l'endocytose des complexes de gadolinium et leur concentration dans ces cellules immunitaires.

Ces stratégies posent tout d'abord la question de la toxicité : internaliser des concentrations très fortes de complexes métalliques dans des cellules, même si ces chélates ont une grande stabilité thermodynamique et cinétique, fait courir un risque pour ces cellules et l'organisme en général après leur dégradation (par phagocytose, apoptose, etc...). Ainsi, lorsqu'elle a été étudiée, une toxicité importante a été mise en évidence après seulement 24 heures aux concentrations d'utilisation habituelle.[69] Par ailleurs, le bénéfice en termes de contraste n'est pas évident : les concentrations atteintes dans les cellules sont de l'ordre de la centaine de μM, ce qui permet d'obtenir *in vitro* des hypersignaux intéressants, mais potentiellement insuffisants dans un contexte *in vivo* plus compétitif.

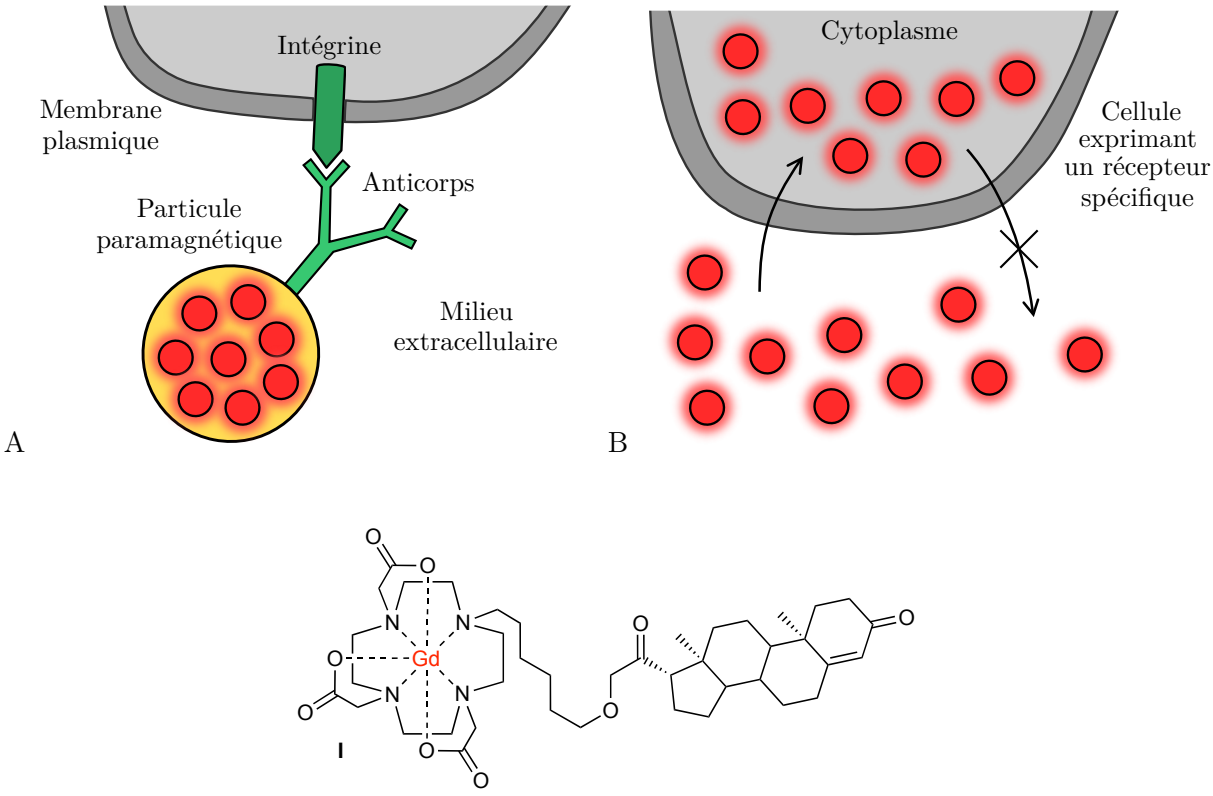


FIGURE 15 : Stratégies d'imagerie moléculaire par résonance magnétique. A. Imagerie de l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$ à l'aide d'anticorps conjugués à des particules paramagnétiques.[66, 67] B. Concentration d'agents de contraste T_1 par internalisation spécifique dans certaines cellules,[68, 69] et représentation du chélate de Gd^{3+} **I** utilisé dans ce contexte.[68]

La visualisation de cibles moléculaires par IRM est donc beaucoup plus délicate que dans le cas de la TEMP et de la TEP, en raison de la faible sensibilité de cette modalité. Pour s'affranchir le plus possible de cet inconvénient, une part importante de la recherche sur les nouveaux agents de contraste est dédiée à l'augmentation de l'efficacité de ces agents[70, 71] ; j'y reviendrai brièvement dans le chapitre 1 (voir page 32). Il est enfin à noter que des stratégies de ciblage prometteuses utilisent l'IRM du fluor 19, en lieu et place de l'IRM du proton dont j'ai parlé jusqu'ici[72] ; l'avantage de cette méthode d'imagerie est l'absence de bruit de fond (très peu de tissus renferment des ions fluorure) qui permet une grande sensibilité.[73] Cependant, je ne les détaillerai pas par souci de concision.

2.3 L'imagerie optique par fluorescence

L'imagerie optique consiste en l'observation de photons issus d'un milieu biologique, dans le domaine du visible, de l'ultraviolet ou du proche infrarouge. Ces photons correspondent à la désexcitation radiative d'une molécule ou d'un matériau, appelé luminophore, préalablement excité dans un état électronique différent de son état fondamental. L'excitation peut être chimique, impliquant ou non une

enzyme : on parle alors de bio- ou de chimioluminescence. Elle peut aussi être photonique, résultant alors de l'absorption d'un photon (dans le cas le plus simple) ; il s'agit alors de la fluorescence ou de la phosphorescence. Je me restreindrai volontairement à la fluorescence dans la suite de cet exposé. Après avoir rappelé son principe, je présenterai quelques exemples de fluorophores et de sondes moléculaires.

2.3.1 Fluorescence et fluorophores

Les transitions énergétiques à l'origine de la fluorescence sont décrites à l'aide du diagramme de Jablonski représenté à la Figure 16.[74] Le fluorophore est au repos dans son état électronique fondamental singulet S_0 ; l'absorption d'un photon, ou de plusieurs de même énergie et dans un temps très court, promeut le fluorophore dans un état excité singulet S_1 ou S_2, qui est le plus souvent aussi un état vibrationnel excité. La désexcitation s'opère alors en deux temps : un premier processus appelé conversion interne, non radiatif et rapide, vers l'état excité S_1, puis un second, radiatif et plus lent, vers un des états vibrationnels excités du fondamental, qui constitue la fluorescence en tant que telle. De façon alternative, la deuxième partie de la désexcitation peut s'opérer de façon non radiative, par des collisions moléculaires ou un transfert d'électron photoinduit (PeT, ou *Photoinduced electron Transfer*) : c'est le phénomène de *quenching*, qui doit être minimisé pour assurer une fluorescence suffisante.

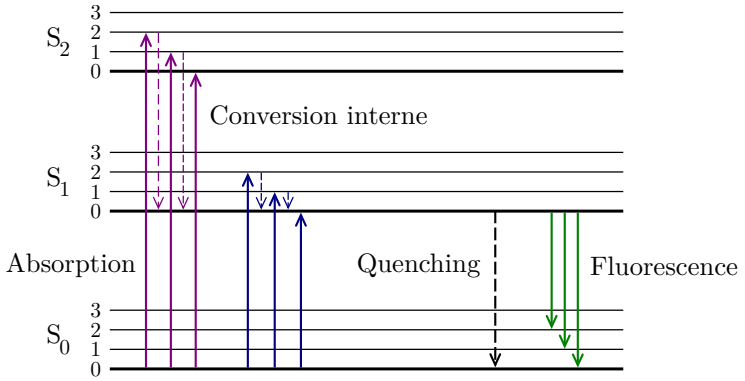


FIGURE 16 : Diagramme de Jablonski, inspiré du livre de B. Valeur.[74] Les processus radiatifs sont symbolisés par une flèche pleine, les processus non-radiatifs sont en pointillés.

Un fluorophore est ainsi caractérisé par quelques grandeurs : ses longueurs d'onde moyennes d'excitation et d'émission λ_{ex} et λ_{em} (on ne considère que la moyenne car, comme on l'a vu, l'absorption et l'émission ont toutes deux lieu sur une plage de longueurs d'onde du fait des transitions vibroniques), le coefficient d'absorption molaire ϵ et le rendement quantique ϕ (le nombre de photons émis par rapport aux photons absorbés), ainsi que le temps de vie de l'état excité τ. Communément, on définit aussi le déplacement de Stokes comme la différence entre λ_{em} et λ_{ex} (toujours positive, du fait du phénomène de conversion interne) et la brillance comme le produit entre ϵ et ϕ. La sensibilité de l'imagerie par fluorescence dépend essentiellement de la brillance et du déplacement de Stokes des fluorophores : lorsqu'ils sont optimaux, le seuil de détection est inférieur au nanomolaire.[25]

Trois types majeurs de fluorophores sont utilisés pour l'imagerie dans le milieu vivant[74] : des molécules organiques π-conjuguées, des complexes métalliques, et des boîtes quantiques. Un exemple de chaque famille est présenté à la Figure 17. Les complexes sont basés sur des métaux de transition[75] ou sur des lanthanides comme la molécule **J**,[76] ces derniers permettant d'avoir des spectres d'émission présentant des raies très fines. Les boîtes quantiques, mieux connues sous leur nom anglais *quantum dots*, sont quant à elles des nanoparticules de semi-conducteurs présentant une fluorescence très forte et facilement modulable[77, 78] ; néanmoins, leur toxicité importante restreint leur usage au petit animal. Dans la suite, je me restreindrai aux fluorophores organiques.

Un grand nombre de molécules organiques π-conjuguées ont été développées et employées dans le cadre de l'imagerie par fluorescence (voir Figure 18).[79] Parmi elles, la sulfocyanine Cy5 **K** et ses dérivés[80] sont couramment utilisés. On peut aussi citer les composés de la famille des BODIPY (boredipyrrométhènes),[81, 82] dont le plus simple **L** est représenté ici, la 4-méthylumbelliférone **M** ainsi que

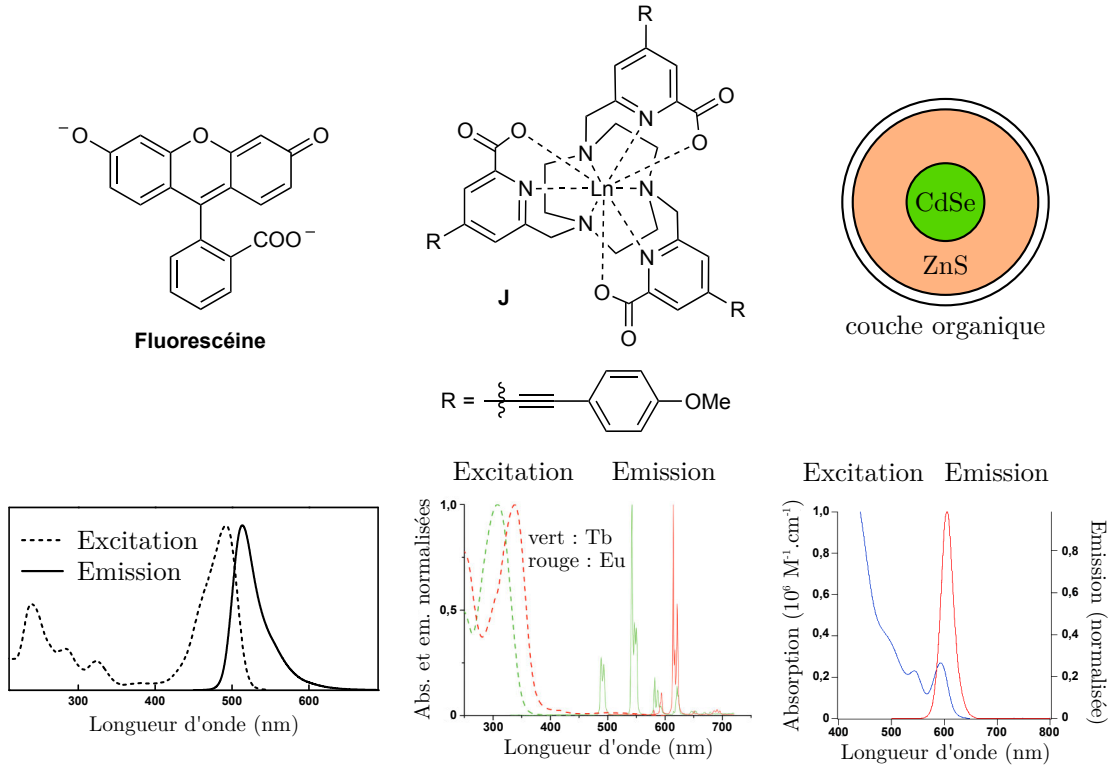


FIGURE 17 : Exemples de fluorophores et spectres d'absorption et d'émission associés : la fluorescéine, les complexes de lanthanides **J**[76] et un *quantum dot*. Les spectres de gauche et de droite sont issus de Wikipédia ; le spectre de droite correspond au nanocristal eFluor-605.

la fluorescéine précédemment mentionnée (voir Figure 17).

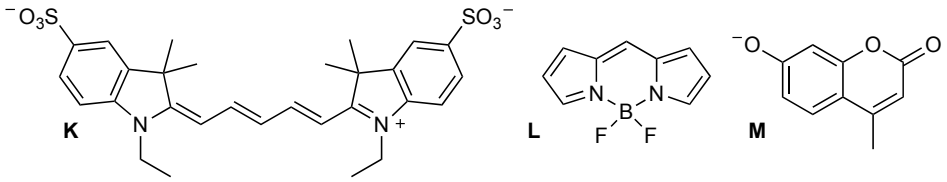


FIGURE 18 : Exemple de fluorophores organiques usuels : la sulfocyanine Cy5 **K**, la BODIPY **L**, la 4-méthylumbelliférone **M**.

L'imagerie par fluorescence souffre de deux difficultés majeures. La première est qu'au sein des tissus, de nombreuses molécules absorbent la lumière : l'eau en premier lieu, mais aussi l'hémoglobine et la mélanine par exemple.[83] Le coefficient d'absorption en fonction de la longueur d'onde est représenté à la Figure 19A[84] : l'absorption est très importante pour des longueurs d'onde inférieures à 650 nm. La seconde difficulté est liée au caractère fluorescent de plusieurs molécules endogènes, dont l'acide aminé tryptophane et les cofacteurs NAD^+ (nicotinamide dinucléotide) et FMN (flavine mononucléotide) (Figure 19B) : les tissus possèdent donc une fluorescence intrinsèque, nommée autofluorescence, qui génère un bruit de fond et réduit davantage la sensibilité.

L'absorption n'est bien sûr pas un obstacle en immunocytochimie, où la distance à parcourir par un photon dans le milieu biologique est très réduite, mais elle constitue un grand handicap pour l'imagerie *in vivo*. Elle se traduit en effet par une profondeur d'observation très réduite, de l'ordre du cm, ainsi que par une résolution très mauvaise due à la diffusion des tissus (quelques mm dans les meilleurs cas).[25, 85] Les techniques pour lesquelles une profondeur limitée n'est pas un obstacle, comme l'imagerie de tumeurs sous-cutanées, l'ablation de tumeurs par chirurgie assistée par fluorescence[86, 87] ou l'endoscopie[88] restent possibles (voir Figure 20). Cependant pour une imagerie du corps entier, l'utilisation de fluorophores absorbant et émettant intensément dans l'intervalle 650 - 1100 nm, pour

lequel relativement peu de photons sont absorbés (Figure 19A), est indispensable.[84, 85, 89] Pour cette raison, le développement de nouveaux fluorophores à émission décalée vers le rouge d'une part et disposant soit d'une forte absorption biphotonique (avec les molécules usuelles, ces photons seraient dans la fenêtre cible), soit d'une absorption monophotonique décalée elle aussi vers le rouge d'autre part, est un important domaine de recherche.[85, 89] Une telle évolution ne peut être que bénéfique du point de vue de la toxicité, les effets délétères des rayonnements UV, nécessaires pour exciter un grand nombre de fluorophores, étant reconnus.

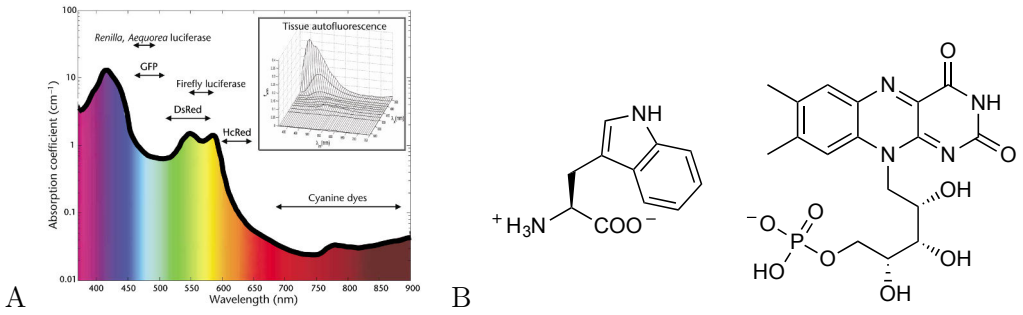


FIGURE 19 : A. Spectre d'absorption des tissus humains.[84] B. L'acide aminé tryptophane (gauche) et le cofacteur flavine mononucléotide (droite), à l'origine de l'autofluorescence.

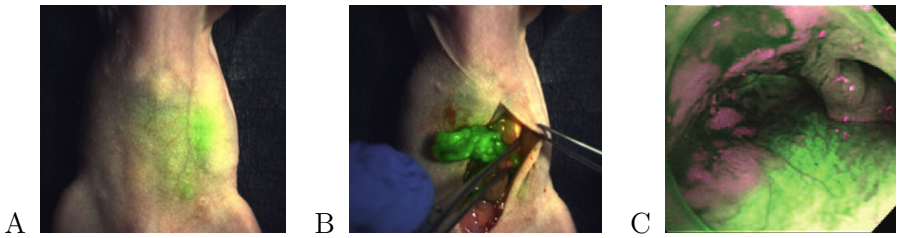


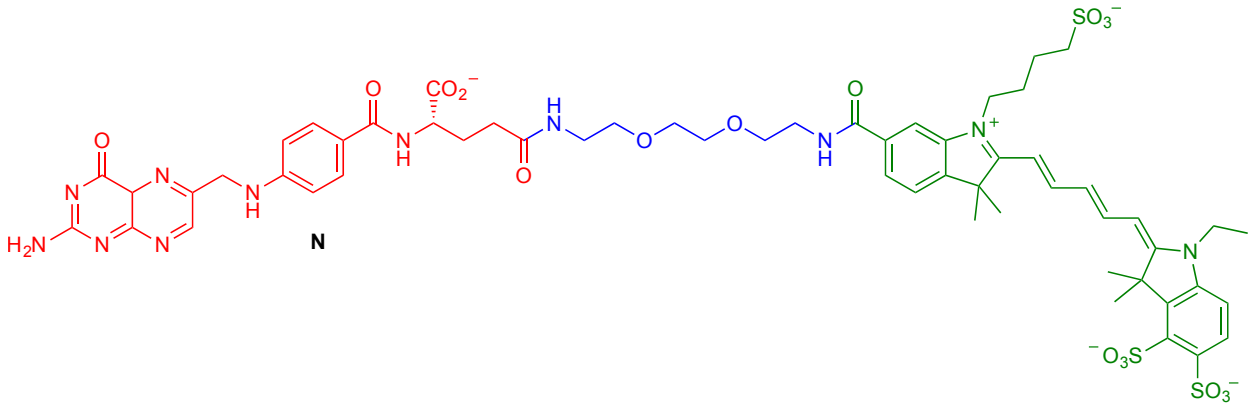
FIGURE 20 : Quelques utilisations *in vivo* de la fluorescence. A. Imagerie de tumeurs sous-cutanées. B. Ablation de tumeurs.[87] C. Endoscopie.[88]

2.3.2 Sondes moléculaires fluorescentes

A partir des fluorophores organiques, de nombreuses sondes moléculaires ont été conçues et employées en imagerie. Tous les anticorps primaires couplés à des fluorophores et utilisés en immunocytochimie par microscopie à épifluorescence ou confocale (voir Figure 4 page 5) sont par définition capables de marquer des molécules particulières.[79] De la même manière, les oligonucléotides (d'ARN ou d'ADN) conjugués à des fluorophores et utilisés pour localiser une séquence d'acides nucléiques par hybridation *in situ* suivie par fluorescence (FISH, ou *Fluorescence* in situ *hybridization*) sont aussi des sondes moléculaires[79] ; la détection de la translocation anormale *BCR-Abl* à l'origine de la leucémie myéloïde chronique a ainsi été réalisée.[90] Des molécules moins complexes, du moins pour un chimiste organicien, peuvent aussi marquer des cibles biologiques : par exemple **N** (voir Figure 21), qui comporte une cyanine liée à un groupement acide folique, est utilisée pour visualiser dans le proche infrarouge les récepteurs à cet acide (FR, ou *Folate Receptor*), surexprimés dans certains cancers ovariens.[91]

3 Imagerie moléculaire d'enzymes

Jusqu'ici, je me suis intéressé à l'imagerie moléculaire de façon générale, en décrivant les techniques d'imagerie usuelles et des exemples de sondes commercialisées ou en développement. Je vais maintenant aborder des aspects plus proches du sujet de mes travaux de thèse et traiter de la visualisation



N

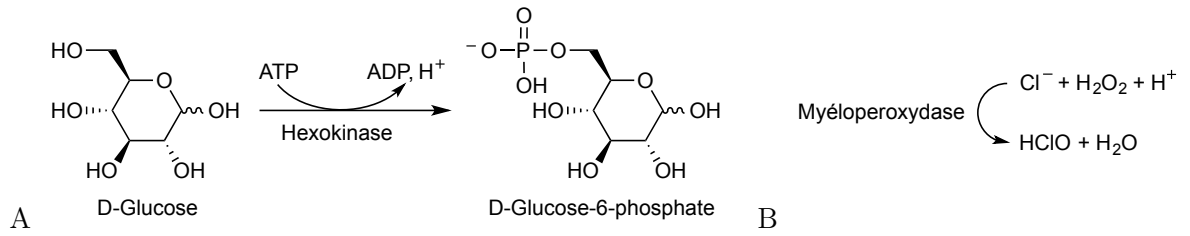
FIGURE 21 : La molécule **N**, sonde moléculaire fluorescente pour les récepteurs à l'acide folique[91] ; en rouge est représenté l'acide folique, en vert le fluorophore cyanine, en bleu un espaceur polyéthylèneglycol.

d'activités enzymatiques. En effet, une des thématiques de recherche du professeur Jens Hasserodt au Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon est la conception de sondes moléculaires spécifiques d'enzymes pour l'imagerie par fluorescence et l'IRM. Je rappellerai en premier lieu ce que sont les enzymes et expliquerai en quoi leur localisation *in cellulo* et *in vivo* est de première importance pour le diagnostic médical et la recherche. Puis je présenterai les stratégies de conception de sondes moléculaires spécifiques d'enzymes, et en particulier celle reposant sur un fonctionnement de type pro-médicament.

3.1 Pourquoi localiser des enzymes ?

Au même titre que tous les récepteurs cellulaires (à somatostatine, à bombesin, l'intégrine endothéliale $\alpha_\nu\beta_3$, etc...) dont j'ai parlé précédemment, les enzymes sont des protéines : elles sont des polypeptides issus de la transcription et de la traduction de gènes, présentent un repliement et des modifications post-traductionnelles particuliers et pouvant évoluer dans le temps, et remplissent un (ou plusieurs) rôles définis au sein des organismes vivants. Néanmoins, elles disposent d'une caractéristique remarquable qui les distingue de toutes les autres biomolécules : elles possèdent une activité catalytique, spécifique pour chaque enzyme, qui en fait des sortes d'"usines biologiques" à l'échelle nanoscopique.[17, 92] Cette fonction de catalyseur peut s'exercer, selon les enzymes, sur une grande variété de molécules allant des plus petites et simples (le dioxygène, le glucose) aux plus grandes et complexes (un chromosome d'ADN double brin, une protéine), et sur des réactions très diverses comme des réactions redox (on parle alors d'oxydo-réductases), des réactions d'hydrolyse (réalisées par les hydrolases) ou des jonctions covalentes entre deux macromolécules (assurées par les ligases). Les enzymes interviennent donc, en les accélérant de façon très importante, dans de nombreux processus biologiques essentiels, comme le métabolisme au sens large (construction, réplication et destruction des molécules du vivant) ou les défenses immunitaires. Citons par exemple l'hexokinase (voir Figure 22A), qui réalise la première étape de la glycolyse (dégradation du glucose issu de l'alimentation) en catalysant la phosphorylation du glucose sur son hydroxyle en 6',[93] ou la myélopéroxydase (Figure 22B), qui assure au sein des cellules neutrophiles la production en grande quantité d'acide hypochloreux pour faciliter la phagocytose des pathogènes.[3]

La visualisation sélective d'enzymes dans un contexte biologique est un objectif intéressant à double titre. En premier lieu, tout comme certains récepteurs sont sur- ou sous-exprimés dans des contextes pathologiques (ce que l'on appelle des biomarqueurs), des enzymes particulières sont présentes en plus faible ou plus forte concentration dans des tissus malades. Les enzymes étant des protéines catalytiques, le facteur le plus pertinent à étudier est plutôt la modulation de l'activité de l'enzyme : cette régulation est liée à de nombreux processus cellulaires et est effectuée par des modifications post-traductionnelles intervenant sur l'enzyme (phosphorylation, glycosylation, etc...) et/ou par sa séquestration dans des compartiments spécifiques.[94, 95]



A D-Glucose D-Glucose-6-phosphate B

FIGURE 22 : Quelques exemples d'enzymes. A. L'hexokinase, impliquée dans le catabolisme du glucose.[93] B. La myéloperoxydase, qui facilite la phagocytose.[3]

Les biomarqueurs enzymatiques sont nombreux ; par exemple, les γ-glutamyltranspeptidases (GGT), une famille d'amino-acyltransférases responsables de l'homéostasie du glutathion, sont retrouvées en forte concentration dans le sang en cas de dysfonctionnements hépatiques (notamment chez les alcooliques)[96] et surexprimées à la surface de certaines cellules tumorales.[86] L'antigène prostatique spécifique (PSA, ou *Prostate-Specific Antigen*), une exopeptidase membre de la famille des kallikréines, est produite et utilisée exclusivement par la prostate ; son activité catalytique dans le sang des hommes est évaluée dans le cadre du dépistage du cancer de la prostate.[97] Quant à la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une réductase impliquée dans la voie des pentoses phosphates, son déficit est la cause de l'anémie hémolytique, ou favisme, une maladie dont souffrent 400 millions de personnes : l'activité réduite de l'enzyme entraîne une grande sensibilité au stress oxydant dans les érythrocytes et favorise leur mort.[98] Le diagnostic de cette maladie se fait donc par la détection de cette enzyme.[99]

L'étude directe de l'activité de ces enzymes est la plus intuitive : elle fournit, de la façon la plus rapide possible, une information dans les conditions endogènes. Toutefois, elle présente trois inconvénients qui limitent son application :

— Les cibles enzymatiques sont parfois produites en quantité très réduite, ce qui oblige à utiliser des sondes dont le seuil de détection est très bas[94] ; cette limitation est tout de même moins marquée que pour les biomarqueurs non enzymatiques grâce à l'effet d'amplification procuré par le pouvoir catalytique (voir page 23).

— Les patterns d'expression des biomarqueurs entre tissus sains et malades ne sont pas toujours très marqués[95] : un bruit de fond est souvent observé, et il est parfois délicat d'analyser sans ambiguïté les images.

— La dernière limitation, et non la moindre, est d'ordre chimique : les biomarqueurs enzymatiques catalysent des réactions chimiques parfois exotiques du point de vue de la chimie organique ou inorganique "habituelle" ; il peut être délicat de concevoir une sonde moléculaire spécifique, en grande quantité et avec un coût raisonnable (voir ci-dessous).[94, 95]

Heureusement, l'imagerie moléculaire d'enzymes peut aussi être utilisée pour la visualisation *in vivo* d'enzymes non endogènes dont la localisation épouse celle d'une biomolécule d'intérêt.[100, 101] L'enzyme n'est ici plus l'objet d'étude en tant que tel, elle ne sert qu'à "rapporter" la présence de la cible ; son activité doit alors être absente de l'organisme au risque de faire la confusion entre enzyme utilisée pour l'imagerie et enzyme présente naturellement.[100] L'imagerie a lieu alors en deux temps (voir Figure 23) : l'enzyme choisie est d'abord administrée puis convoyée vers la biomolécule cible. Dans un deuxième temps, la sonde moléculaire spécifique de l'enzyme est utilisée et va venir marquer l'enzyme, donc la biomolécule cible. L'enzyme choisie peut être transportée jusqu'à sa cible selon différentes méthodes :

— un anticorps peut convoyer l'enzyme jusqu'à sa cible moléculaire, de manière analogue à l'immunocytochimie avec un rapporteur enzymatique (voir Figure 4) ; on parle alors d'approche ADEPT (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*, cas du haut dans la Figure 23 ; on pré-

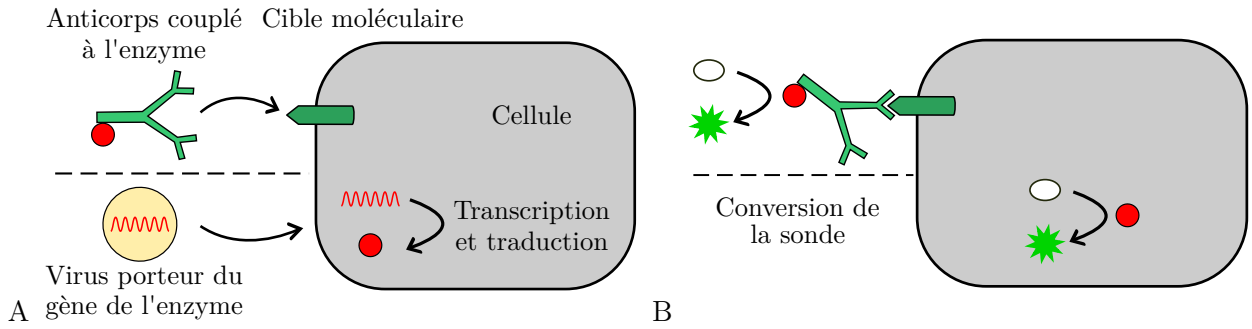


FIGURE 23 : Stratégies d'utilisation d'une enzyme rapporteuse : convoi sous forme de protéine par un anticorps (en haut) ou de gène par un virus (en bas). A. Administration de l'enzyme. B. Ajout des sondes moléculaires modulables et génération du signal.

cisera à la page 24 ce qu'est une prodrogue ou un pro-médicament).[102]

— l'enzyme peut être convoyée sous forme de gène, délivrée par thérapie génique (le plus souvent via un adénovirus modifié), qui sera transcrit et traduit par la cellule portant la biomolécule cible.[103] Cette stratégie est nommée GDEPT (*Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*, cas du bas de la Figure 23), ou dans le cas d'un vecteur viral, VDEPT.

Le choix de l'enzyme repose sur plusieurs contraintes : son activité ne doit pas être déjà présente dans l'organisme étudié (au risque d'une non-spécificité de l'imagerie) et sa taille ne doit pas être trop importante pour ne pas gêner son transport. Néanmoins, du moment que ces conditions sont réunies, il est possible de choisir n'importe quelle enzyme du règne vivant, et en particulier des enzymes dont il sera facile de fabriquer des sondes moléculaires spécifiques (voir ci-dessous). Quelques exemples d'enzymes couramment utilisées dans ce but sont consignés dans le Tableau 2. L'imagerie de ces enzymes est plus facile que celle des enzymes endogènes :

Nom	Famille	Origine	Substrat
β-galactosidase	glycosidase	bactérienne	galactose
β-glucuronidase	glycosidase	humaine	glucuronate
Nitroréductase	réductase	bactérienne	groupement nitro
Carboxypeptidase G2	peptidase	bactérienne	glutamate
Cytochrome P450	oxydase	humaine	alkyle terminal

TABLEAU 2: Enzymes couramment utilisées comme rapporteur en imagerie moléculaire.[100, 102, 103]

— Il est possible d'obtenir de fortes concentrations d'enzyme au niveau des biomolécules d'intérêt, ce qui garantit un signal maximal.[100, 102] Le premier inconvénient des enzymes endogènes peut être écarté ici.

— Les mêmes limites liées à la distribution des biomolécules d'intérêt sont présentes ici, et sont même plus importantes si l'on ajoute le fait que l'enzyme n'atteint pas toujours sa cible. Le bruit de fond persiste donc et il est potentiellement plus important encore.

— Les enzymes utilisées sont choisies pour qu'il soit aisé pour un chimiste de concevoir facilement une sonde moléculaire spécifique, le dernier inconvénient des enzymes endogènes ne tient pas ici non plus.[102, 103]

Il est donc très utile de réaliser l'imagerie moléculaire d'enzymes à des fins médicales ou de recherche, que ces enzymes soient intéressantes en elles-mêmes ou qu'elles ne soient qu'un outil pour visualiser d'autres biomolécules.

3.2 Conception de sondes pour des activités enzymatiques

3.2.1 Notion de sonde modulable et intérêt

Les enzymes étant des protéines, il est possible de réaliser des sondes moléculaires spécifiques en greffant une unité signalante aux propriétés constantes (chélate de métal radioactif, fluorophore, ou complexe paramagnétique) à un groupement ciblant via un éventuel espaceur. L'imagerie de l'aminopeptidase N, une exopeptidase impliquée dans le métabolisme de nombreuses molécules circulantes,[104] a ainsi été réalisée grâce à des conjugués entre un peptide ciblant, le NGR (asparagine-glycine-arginine) ou ses dérivés,[105] et un fluorophore ou un *quantum dot*.[106, 107]

Cependant, il est beaucoup plus intéressant de détourner l'activité catalytique des enzymes pour réaliser leur propre visualisation ; de plus, il s'agit du seul moyen pour détecter non pas l'enzyme en tant que molécule, mais son activité, ce qui est beaucoup plus pertinent d'un point de vue biologique comme je l'ai déjà mentionné. L'idée est alors de concevoir des sondes moléculaires qui seront transformées spécifiquement par l'enzyme cible, la réaction s'accompagnant d'une modification des propriétés signalantes : c'est ce que l'on appelle des sondes modulables (en anglais *responsive probes*).[56, 84] De telles sondes peuvent être des fluorophores ou des complexes paramagnétiques ; en effet, les propriétés radiatives des ions métalliques radioactifs ne sont pas altérables par le milieu biologique, ce qui restreint grandement la possibilité de réaliser des sondes modulables pour l'imagerie nucléaire.

De telles sondes ont été conçues très tôt pour détecter de petits analytes comme des ions. La coordination spécifique d'un ion métallique par un ligand ou la protonation/déprotonation d'une molécule en fonction du pH est en effet un moyen conceptuellement simple pour moduler les propriétés magnétiques ou de fluorescence[50, 56, 108, 109] ; de plus, dans certains contextes, ces ions peuvent être présents localement en grande concentration. Parmi les nombreux exemples développés (voir Figure 24), la molécule **Fura-2**,[110] développée par l'équipe de Roger Tsien dès les années 1980, est capable de chélater des ions Ca^{2+}. Le complexe de gadolinium **O** possède une affinité importante pour Zn^{2+}.[111] Ces deux cations sont en effet impliqués dans la sécrétion d'insuline au sein des cellules β du pancréas : la concentration intracellulaire en Ca^{2+} subit des oscillations brutales alors que de nombreux ions zinc sont libérés dans le domaine extracellulaire[111] ; le suivi en temps réel de la concentration en ces deux ions par différentes modalités d'imagerie permet d'étudier ces processus et leurs disfonctionnements chez les diabétiques. Enfin, le fluorophore **P** permet une lecture par fluorescence du pH intracellulaire.[112]

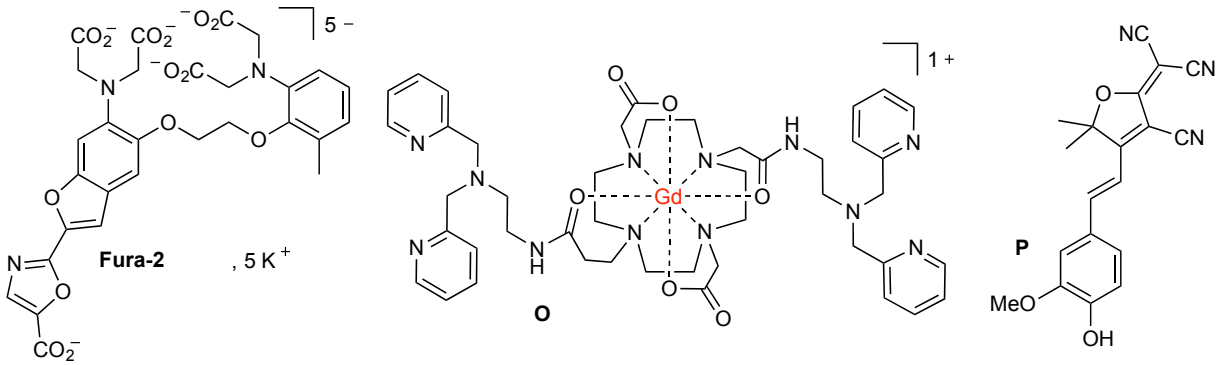


FIGURE 24 : Sondes moléculaires pour des ions : **Fura-2**, sonde fluorescente sensible à Ca^{2+}[110] ; **O**, complexe paramagnétique pour visualiser les ions Zn^{2+} en IRM[111] ; **P**, molécule fluorescente pour la mesure du pH intracellulaire.[112]

Tous ces exemples de sondes présentent des propriétés signalantes (émission de fluorescence à une certaine longueur d'onde, caractère paramagnétique) plus grandes en présence de l'analyte qu'en son absence. Ce fonctionnement est plus intuitif : l'apparition d'un signal et son intensité sont proportionnels à la présence et à la concentration de la molécule ciblée, ce qui facilite l'interprétation de l'image.[113] Dans le cas idéal, en l'absence de toute cible, la sonde est totalement invisible : on parle alors de sondes fluorogène ou magnétogène.[113, 114] Ces molécules garantissent un rapport signal sur

bruit maximal en réduisant le bruit de fond autant qu'il est possible. Les sondes possédant une fluorescence initiale non négligeable sont elles appelées sondes ratiométriques : elles permettent de quantifier la molécule cible mais avec une sensibilité moindre due au bruit de fond résiduel.[113]

3.2.2 Conception de sondes fluorogènes et magnétogènes

Le cahier des charges pour la conception de sondes fluorogènes ou magnétogènes efficaces dédiées à l'imagerie enzymatique est le suivant[94, 95, 114–116] :

1. Ces sondes doivent pouvoir accéder à leur cible rapidement et sans porter atteinte à l'intégrité des tissus.[115] Leur diffusion dans les tissus doit être bonne et, dans le cas de cibles intracellulaires, elles doivent pouvoir traverser la membrane plasmique (par diffusion passive ou endocytose).[94]

2. Ces sondes doivent être stables dans le milieu physiologique pour ne pas générer de faux positifs et diminuer la sensibilité ; le signal qu'elles émettent doit être aussi réduit que possible.[56, 114]

3. Elles doivent être activées par l'enzyme d'intérêt, sélectivement et efficacement.[115] La sélectivité impose de considérer les enzymes de la même famille qui pourraient être présentes dans le milieu étudié et de concevoir une sonde la plus discriminante possible.[94, 115, 117] L'efficacité sera quant à elle plus grande si la conversion enzymatique pour activer la sonde est proche de la conversion du substrat naturel, et si l'activation n'a lieu qu'après une seule action de l'enzyme.[114, 115]

4. L'augmentation de signal après conversion de la sonde doit être maximale pour obtenir un rapport signal sur bruit optimal. Néanmoins, le fait qu'une enzyme puisse convertir un grand nombre de sondes fluorogènes (ce qu'on appelle l'effet d'amplification) limite cette contrainte.[115]

5. La sonde activée doit rester le plus près possible de l'enzyme cible pour améliorer sa localisation et diminuer le bruit de fond.[94, 115]

6. Enfin, les sondes, sous leur forme non-activée ou activée, doivent être aussi peu toxiques que possible, au niveau cellulaire comme à celui de l'organisme entier.[114]

On peut dès lors envisager deux stratégies pour concevoir de telles molécules[56, 95, 114] :

Stratégie de quenching Une première approche consiste à coupler la partie signalante à une unité "désactivante" via un lien qui pourra être clivé par l'enzyme d'intérêt (voir Figure 25A)[113] ; ainsi, avant la réaction enzymatique, la sonde n'émet pas de signal, mais une fois que l'enzyme a agi, la partie signalante retrouve son fonctionnement normal et un signal est observable. Ce type de fonctionnement est possible, et largement employé, dans le cadre de l'imagerie par fluorescence : il existe de nombreuses molécules organiques, appelées quencheurs (désactivateurs en français), qui diminuent le rendement quantique des fluorophores en absorbant les photons émis (transfert d'énergie de résonance, plus communément appelé FRET) ou en favorisant le retour à l'état électronique fondamental par un transfert d'électron du quencheur vers le fluorophore à l'état excité (PeT).[74]

Cette stratégie a notamment été utilisée pour l'imagerie d'endopeptidases, des enzymes qui clivent une séquence peptidique au sein de celle-ci (à la différence des exopeptidases, comme la carboxypeptidase G2, qui elles clivent à une extrémité de la séquence). En effet, il est facile conceptuellement de lier une extrémité de la séquence à un fluorophore et l'autre à un quencheur.[56, 113] Une sonde pour la protéase du VIH a ainsi été conçue et commercialisée (Figure 25B).[118] Cependant, trois limites apparaissent clairement : de telles constructions sont coûteuses car longues à synthétiser, leur distribution est handicapée par leur grande taille, et enfin la sensibilité n'est pas optimale.[113, 114] Le quenching initial est ainsi souvent imparfait (du fait de l'agitation moléculaire et de l'interaction avec d'autres molécules) et surtout la désactivation se poursuit même après la coupure enzymatique, du fait de transferts entre quencheurs et fluorophores non liés de façon covalente mais proches dans l'espace.[113]

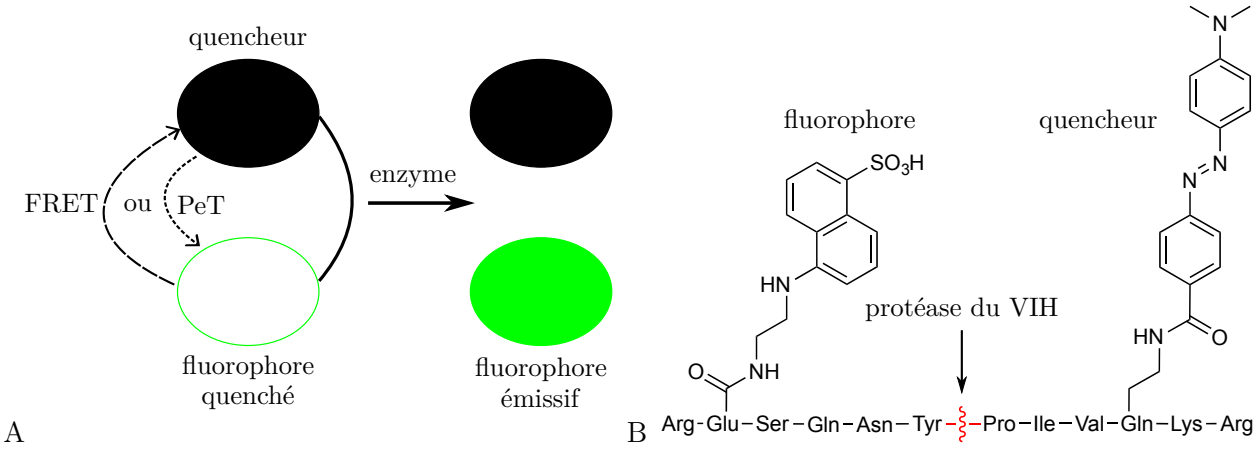


FIGURE 25 : Sondes fluorogènes de type FRET ou PeT. A. Principe : quenching intramoléculaire de la fluorescence et restauration de l'émission après action enzymatique. B. Exemple d'une sonde FRET pour la protéase du VIH[118] ; le fluorophore est l'acide 5-((2-aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique (EDANS) et le quencheur est l'acide 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque (DABCYL).

Une stratégie de quenching est malheureusement impossible pour l'IRM : même s'il est conceptuellement possible de coupler deux entités paramagnétiques pour former un assemblage antiferromagnétique (cette situation est par exemple rencontrée dans le site actif de la métalloprotéine hémérythrine),[119] il est délicat de réaliser cet assemblage pour des sondes moléculaires (le couplage devrait être stable dans le temps dans les conditions physiologiques et susceptible à une activité enzymatique).

Stratégie de pro-médicament La deuxième stratégie de conception de sondes fluorogènes ou magnétogènes consiste à moduler directement les propriétés d'une molécule signalante pour qu'elles soient faibles en l'absence d'une action enzymatique cible, mais restaurées et grandes à l'issue de cette action.[56, 114, 116] Cette approche, qui est celle que l'équipe a retenue, s'inspire directement de la stratégie dite de prodrogue, ou pro-médicament, que je vais maintenant brièvement présenter.

Un pro-médicament est un dérivé d'un médicament qui, en lui-même, n'a pas (ou peu) d'activité, mais qui peut être transformé dans l'organisme pour donner à nouveau le médicament actif.[120] Ce dérivé est obtenu par la fonctionnalisation du médicament, qui peut prendre deux formes :

— le couplage du médicament avec une partie ciblante, afin d'améliorer la biodistribution du composé et de restreindre sa localisation à certaines cellules, notamment des cellules cancéreuses. Ce groupement peut être un anticorps (celui dirigé contre l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$ par exemple),[66] un polypeptide de plus petite taille (comme le RGD, spécifique de cette même intégrine, ou le NGR spécifique de l'aminopeptidase N),[106, 121] ou encore une molécule organique non peptidique (l'acide folique par exemple).[91]

— la liaison avec un substrat enzymatique masquant un groupement fonctionnel essentiel à l'activité du médicament ; l'action de l'enzyme va retirer la partie substrat (appelée déclencheur enzymatique) et libérer la fonction chimique du médicament, restaurant son activité.[120, 122]

C'est la seconde forme de fonctionnalisation qui va nous intéresser ici. L'enzyme concernée peut être, comme précédemment, soit une enzyme surexprimée dans un contexte pathologique particulier (on parle alors de PMT, pour *Prodrug Mono-Therapy*), soit une enzyme exogène rapporteuse d'une autre molécule (ce sont les stratégies ADEPT, GDEPT, VDEPT, etc....).[102, 103, 120]

La fonctionnalisation pour une activation enzymatique peut être réalisée directement avec le substrat, comme dans le cas de la molécule **Q** (voir Figure 26), où la fonction amine de la doxorubicine (un

agent intercalant de l'ADN utilisé comme anticancéreux) est acylée par un tétrapeptide GFLG (glycine-phénylalanine-leucine-glycine) clivable par la cathepsine B, une peptidase lysosomale.[123] Néanmoins, ce type de constructions n'a souvent pas un fonctionnement optimal : un tel pro-médicament n'est pas un bon substrat pour l'enzyme ciblée, car la gène stérique importante au niveau du lieu de clivage (due à la présence du médicament qui est une molécule de grande taille) rend la reconnaissance moléculaire par l'enzyme moins efficace et engendre une baisse de la vitesse de conversion.[120, 124] De plus, des problèmes de stabilité sont fréquemment rencontrés quand la liaison entre déclencheur et médicament est susceptible à l'hydrolyse spontanée[120, 124] : c'est le cas de nombreux esters et carbonates phénoliques notamment.[125]

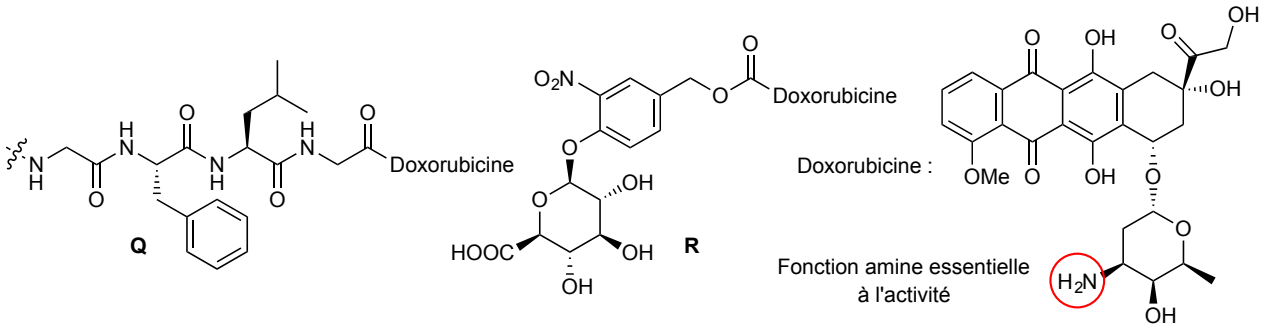


FIGURE 26 : Exemples de pro-médicaments libérant la doxorubicine à l'issue d'une activation enzymatique : **Q**, construction sans espaceur auto-effondrable sensible à la cathepsine B[123] ; **R**, comportant un espaceur éliminant de type PABA et ciblant la β-glucuronidase.[126]

Pour ces raisons, une approche dite de double pro-médicament est souvent préférée : un espaceur dit auto-effondrable est introduit entre la partie déclencheur et le médicament, pour obtenir une molécule en trois parties.[120, 122] L'activation a alors lieu en deux temps : l'action enzymatique va libérer un intermédiaire métastable comprenant l'espaceur et le médicament ; l'évolution spontanée de cet intermédiaire va libérer le médicament. C'est ce type de stratégie qui est mis à profit dans la molécule **R** (Figure 26)[126] : la β-glucuronidase clive l'unité glucuronate, et l'intermédiaire résultant s'effondre pour libérer la doxorubicine, du dioxyde de carbone et une molécule organique dérivée de l'espaceur initial. Ces constructions plus complexes ont toutefois plusieurs avantages : la gène stérique au voisinage du lieu de clivage est très réduite, ce qui améliore la reconnaissance du substrat par l'enzyme et la cinétique d'activation du pro-médicament.[124, 127, 128] La stabilité de ces édifices moléculaires est aussi améliorée : on peut choisir l'espaceur pour que la molécule ne comporte que des liens peu sensibles à l'hydrolyse spontanée.[120, 122, 129]

On rencontre deux grandes familles d'espaceurs auto-effondrables, distinguables par le mécanisme d'effondrement. Les **espaceurs éliminants** fonctionnent à l'aide de transferts électroniques spontanés (voir Figure 27).[120] Ce sont des molécules aromatiques au moins disubstituées, d'une part par un hydroxyle, une amine ou un thiol lié au déclencheur (en rouge), d'autre part par un groupement hydroxyméthyle lié au médicament (représenté en bleu). Quelques exemples sont présentés ici ; le plus connu et utilisé est le deuxième, nommé alcool *p*-aminobenzylique ou PABA.[130] Lorsque l'hétéroatome est lié au déclencheur, son caractère électrodonneur est inhibé, ce qui garantit la stabilité de l'édifice ; la rupture du déclencheur restaure le caractère électrodonneur et permet le transfert électronique spontané menant à la libération d'un ion carbonate ou carbamate d'une part, et d'une espèce hautement électrophile appelée, dans le cas du PABA, azaquinone méthide. Le premier va subir une décarboxylation (très favorisée dans les conditions physiologiques) pour libérer le médicament ; la seconde va réagir avec un nucléophile (idéalement l'eau) et donner une molécule aromatique inerte.

Les espaceurs éliminants sont très versatiles : il est possible de varier les substituants sur le noyau aromatique ou leur position pour optimiser la stabilité du pro-médicament et/ou sa cinétique d'auto-effondrement.[131, 132] Des espaceurs garantissant une grande stabilité et capables, une fois le déclencheur retiré par l'enzyme, de s'effondrer en un temps très court (de l'ordre de la seconde), ont ainsi été conçus.[133, 134] Il est aussi possible, en installant deux groupements hydroxyméthyles substitués sur le

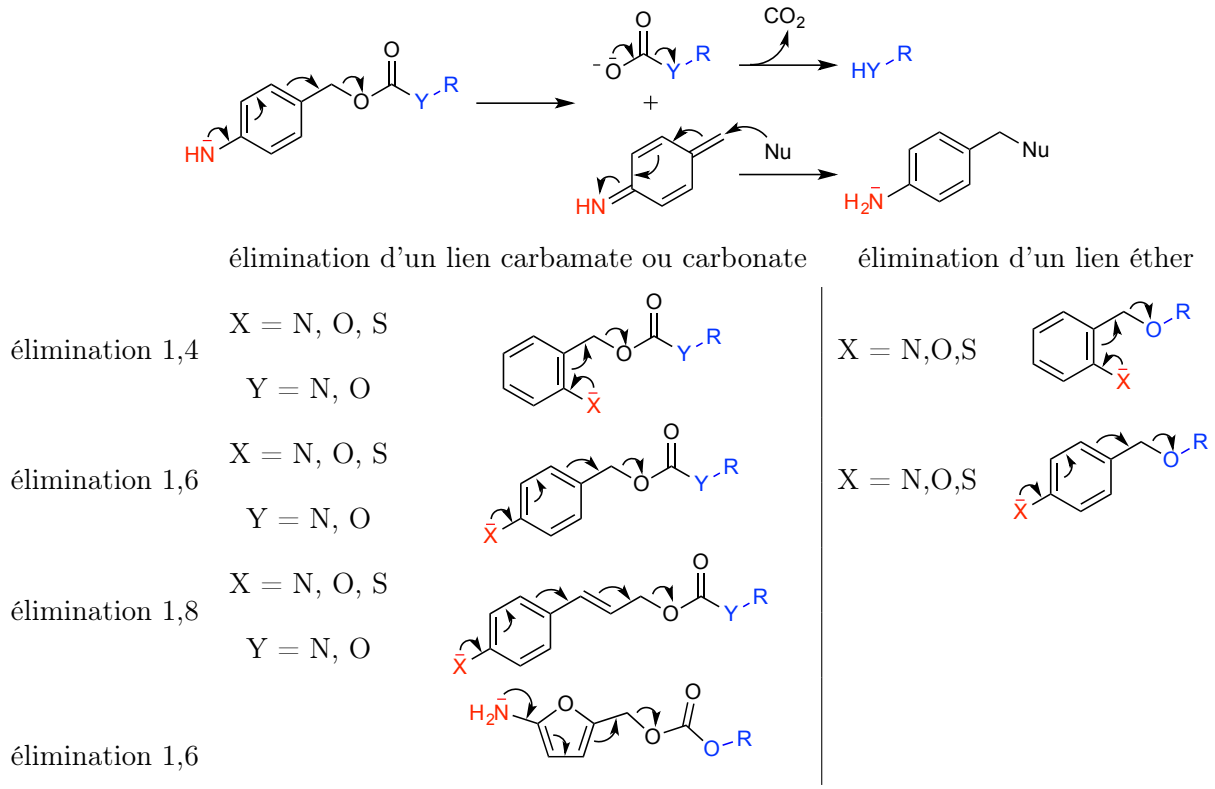


FIGURE 27 : Espaceurs auto-effondrables éliminants : principe (en haut, avec l'exemple du PABA) et exemples (en bas).

noyau aromatique, de libérer successivement deux médicaments (ou d'autres entités plus complexes) pour un seul couple déclencheur-espaceur,[135] ce qui permet de concevoir des structures de type dendrimère relâchant en cascade de nombreuses molécules.[136, 137] Cependant, une limitation importante des espaceurs éliminants est liée à l'intermédiaire quinone méthide : cet électrophile est un très bon agent alkylant, ce qui le rend très toxique s'il est capable de se lier de façon importante à des sites cellulaires sensibles (sites actifs des enzymes et bases de l'ADN notamment).[138, 139] Les propriétés alkylantes étant modulables selon les substituants portés par la quinone méthide, il convient de réfléchir à ces substituants pour optimiser à la fois la vitesse et la toxicité si l'on cherche à réduire cette dernière (ce qui est bien sûr le cas pour la conception de sondes pour l'imagerie comme je l'ai noté ci-dessus). Par ailleurs, dans le cas d'une grande concentration de molécule, la libération d'une quantité stœchiométrique de dioxyde de carbone peut être difficile à réguler et entraîner une acidification du milieu.[120]

Les **espaceurs cyclisants** réalisent quant à eux, une fois libérés de leur déclencheur, une cyclisation qui libère le médicament (voir Figure 28).[120] Ces chaînes carbonées aliphatiques ou aromatiques préorganisées possèdent, à une extrémité, un hydroxyle ou une amine lié au déclencheur, et à l'autre extrémité une unité acylant, carbamylant ou carbonatant le médicament. Quelques exemples d'espaceurs à chaîne aromatique ou aliphatique sont présentés ici ; le plus connu et le premier utilisé est le premier à gauche, nommé "trimethyl lock".[140–142] De la même manière que pour les espaceurs éliminants, lorsque l'hétéroatome est lié au déclencheur, son caractère nucléophile est inhibé, ce qui garantit la stabilité du pro-médicament ; la rupture du déclencheur restaure le caractère nucléophile et rend la cyclisation possible ; *in fine* sont relâchés le médicament et l'espaceur cyclisé.

La vitesse de cyclisation dépend de plusieurs facteurs : le degré de préorganisation de la chaîne carbonée qui va favoriser le rapprochement dans l'espace du nucléophile et de l'électrophile, le caractère nucléofuge du médicament, et la différence de stabilité entre les liaisons brisée (déclencheur-espaceur) et formée (au sein de l'espaceur).[120, 142, 143] Il est ainsi possible de moduler la cinétique : pour rendre cette cyclisation la plus rapide possible, ce qui est notre intérêt ici, on choisira un espaceur préorga-

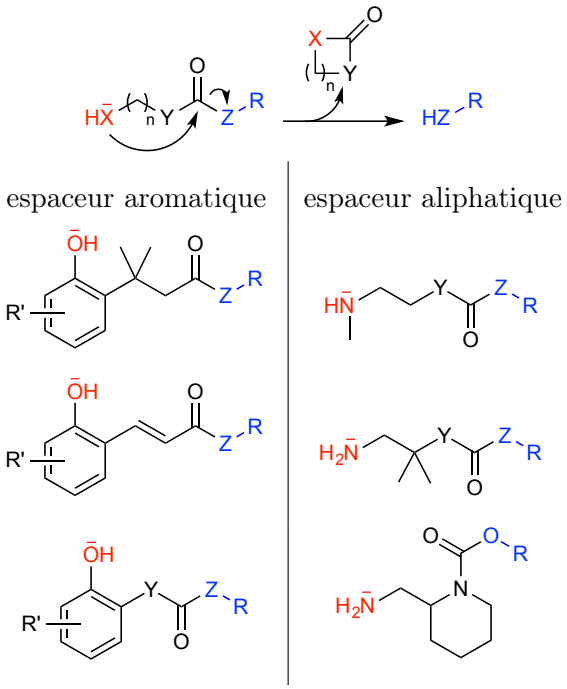


FIGURE 28 : Espaceurs auto-effondrables cyclisants : principe (en haut) et exemples (en bas). X = N, O, S ; Y = N, O ; Z = N, O.

nisé, que ce soit via l'effet *gem*-diméthyl ou l'utilisation d'un composé contenant déjà un cycle (la libre rotation autour des liaisons simples est alors très limitée). Le cycle formé comportera 5 ou 6 atomes et comprendra une fonction carbamate, amide voire urée tertiaire.[129, 142] D'une façon générale, la cinétique d'effondrement des espaceurs cyclisants peut être lente par rapport aux espaceurs éliminants,[143] toutefois leur toxicité est beaucoup plus réduite : il n'y a pas de libération de dioxyde de carbone, l'espèce résultant de la cyclisation est peu réactive et ne présente surtout aucun caractère alkylant. Pour ces raisons, ces espaceurs sont de plus en plus considérés pour des applications *in vivo*.[120, 143]

Le choix d'un d'espaceur parmi les nombreux existants dépend de plusieurs impératifs, comme la facilité d'accès synthétique, la stabilité de la construction, la cinétique d'effondrement souhaitée, et la toxicité liée à l'utilisation de la molécule. Dans mes travaux, j'ai eu l'occasion de travailler avec des espaceurs des deux familles, car les contraintes n'étaient pas les mêmes selon les situations.

Après cette introduction à l'imagerie moléculaire et aux enjeux chimiques, biologiques et médicaux de l'observation d'enzymes dans un contexte *in vivo*, je vais maintenant présenter les travaux que j'ai réalisés durant ma thèse. Ces travaux portent sur la conception et l'évaluation dans le milieu biologique de sondes magnétogènes et fluorogènes ; ils sont dans la suite des études réalisées par les précédents expérimentateurs de l'équipe de Jens Hasserodt, et notamment les anciens doctorants Fayçal Touti (pour l'aspect magnétogénèse)[144] et Maxime Prost (pour les sondes fluorogènes).[145] Pour chaque grande partie, je commencerai par identifier les enjeux spécifiques liés à ces problématiques, puis je présenterai les réalisations précédentes de l'équipe, avant de détailler, projet par projet, mes résultats expérimentaux et les conclusions que j'en ai tirées.

Première partie

Conception et étude de sondes magnétogènes

Chapitre 1

Contexte : sondes IRM sensibles à une activité enzymatique

Avant d'exposer les travaux que j'ai effectués dans le cadre de la conception de sondes magnétogènes, je vais préciser le contexte dans lequel ces travaux s'inscrivent. Je commencerai donc par présenter ici les enjeux spécifiques à la réalisation de sondes IRM sensibles à un stimulus enzymatique.

La visualisation et la quantification d'activités enzymatiques *in vivo* est un objectif très intéressant du point de vue médical. L'IRM est une excellente modalité d'imagerie pour y parvenir grâce, notamment, à sa grande résolution et à son caractère tomographique. Néanmoins, sa faible sensibilité constitue un obstacle important ; pour le contourner, l'utilisation de sondes modulables efficaces est nécessaire. Ces sondes peuvent être des agents de contraste T_1 (majoritairement des complexes métalliques paramagnétiques) ou T_2 (des nanoparticules d'oxydes métalliques superparamagnétiques), ou encore des agents PARACEST.

Différents mécanismes ont été mis à contribution pour rendre des agents sensibles à des activités enzymatiques. Je vais tout d'abord présenter ces stratégies, puis donner quelques exemples de sondes en comparant leurs caractéristiques. Sur la base de ces éléments, je conclurai sur l'approche la plus intéressante à nos yeux et que l'équipe a retenue. Par souci de concision, j'aborderai seulement les stratégies faisant intervenir des molécules, c'est-à-dire des agents T_1 ou PARACEST, bien que des agents T_2 modulables par des enzymes aient été conçus et testés *in vitro*.[146–148] De plus, dans notre souci de localiser précisément les activités enzymatiques, nous envisageons d'utiliser nos sondes dans des conditions de hauts champs magnétiques (supérieurs à 1,5 T) ; en effet, la résolution de l'image augmente avec l'intensité du champ.[71] J'insisterai donc sur les considérations valables notamment lors de l'usage de champs magnétiques intenses.

1 Modulation des propriétés des agents de contraste moléculaires

La génération de contraste positif lors de l'imagerie en pondération T_1 nécessite des molécules qui accélèrent le processus de relaxation longitudinale (voir page 11). Le changement de contraste au sein d'une image acquise via une méthode de CEST requiert quant à lui un agent PARACEST possédant des protons échangeables et dont le déplacement chimique est très différent des protons du *bulk*. Les mécanismes à l'œuvre dans ces deux familles de composés sont très différents ; je vais d'abord décrire les phénomènes par lesquels les complexes paramagnétiques accélèrent la relaxation T_1 et les paramètres physico-chimiques associés, avant de détailler les stratégies couramment employées pour moduler ces processus de relaxation. Je présenterai ensuite très brièvement les moyens employés pour rendre les agents PARACEST sensibles à une activité enzymatique.

1.1 Relaxivité T_1 des complexes paramagnétiques

L'utilisation précoce et intensive de complexes paramagnétiques pour accélérer la relaxation spin-réseau et améliorer le contraste sur les images IRM[49, 51] a rendu nécessaire une compréhension et une rationalisation du fonctionnement de ces molécules.[71, 149, 150] En effet, l'IRM étant une modalité d'imagerie très peu sensible, il est intéressant de concevoir des agents T_1 très efficaces, ce qui permettrait d'abaisser le seuil de détection et d'améliorer la précision d'observation.[49, 70, 71] Les complexes paramagnétiques étant des molécules de composition déterminée précisément, il est possible de connaître leur concentration de façon exacte, et *a fortiori* la concentration en centre métallique paramagnétique.

On définit la relaxivité r_1 comme l'efficacité avec laquelle une quantité donnée d'agent de contraste (ou d'ion métallique dans le cas où la molécule comprend plusieurs centres paramagnétiques) accélère la relaxation spin-réseau :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1d}} + r_1[\mathrm{M}]$$

avec T_1 et T_{1d} les temps de relaxation longitudinale en présence et en absence de l'agent et [M] la concentration millimolaire ; r_1 est exprimée en $\mathrm{mM}^{-1}.\mathrm{s}^{-1}$. Il s'agit de la rationalisation à l'échelle macroscopique du processus de relaxation. Plus r_1 est grande, plus la quantité de complexe nécessaire pour induire une variation de T_1 sera faible, et plus l'agent sera efficace.

Dans un modèle microscopique simple, le complexe paramagnétique agit sur les molécules d'eau l'environnant via une interaction entre le spin électronique de l'ion métallique et les spins nucléaires des protons.[43] Cette interaction est à courte portée pour la (les) molécule(s) coordinée(s) sur le centre métallique, ou à longue portée pour les molécules situées plus loin du centre (voir Figure 1.1A).[149] On parle de mécanismes dits de sphère interne dans le premier cas, et de sphère externe dans le second. La relaxivité totale de l'agent de contraste est la somme de ces deux contributions : $r_1 = r_{1i} + r_{1e}$.

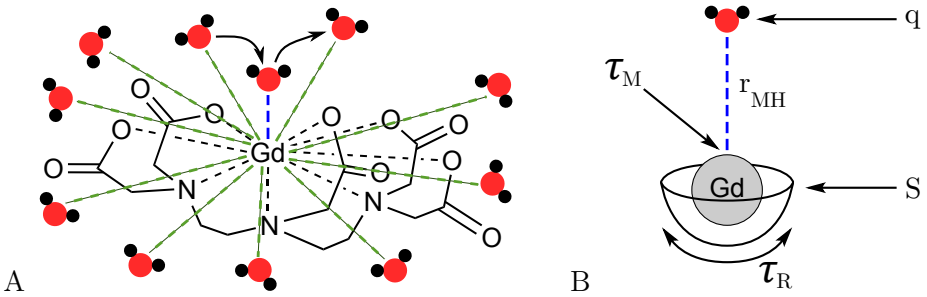


FIGURE 1.1 : Relaxivité T_1 des agents de contraste moléculaires. A. Différents mécanismes de relaxivité, ici sur l'exemple du Magnevist® (2-[bis[2-[bis(carboxyméthyl)amino]éthyl]amino]acétato gadolinate(III) de méglumine, Gd(DTPA), ou gadopentétate de méglumine) : sphère interne (matérialisé par des pointillés bleus) et sphère externe (pointillés verts). B. Paramètres régissant le mécanisme en sphère interne.

Le mécanisme de sphère externe est un phénomène collectif : l'ion paramagnétique catalyse simultanément la relaxation d'un grand nombre de molécules d'eau du *bulk*, chacune de façon relativement limitée. Dans un environnement physico-chimique identique (plus précisément, dans des conditions où les propriétés de diffusion sont similaires), l'intensité de ce mode de relaxation ne dépend pas de la structure de l'agent de contraste mais seulement du spin électronique S de l'ion paramagnétique.[151, 152]

Le mécanisme en sphère interne est plus complexe. Il s'agit d'un processus individuel et séquentiel : la coordination de la molécule d'eau sur l'ion métallique entraîne une relaxation rapide et importante des protons impliqués ; elle se décoordine alors et laisse la place à une autre molécule. Au vu des échelles de temps, les protons conservent leur caractère relaxé longtemps après que la molécule d'eau

est retournée dans le *bulk*. La relaxivité r_{1i} s'exprime à l'aide des équations de Bloch[43] :

$$r_{1i} = \frac{1}{c_{\mathrm{H_2O}}} \cdot \frac{q}{T_{1m} + \tau_M}$$

où q est le nombre d'hydratation (*hydration number* en anglais), soit le nombre de sites de coordination disponibles pour les molécules d'eau ; T_{1m} est le T_1 des protons de la molécule d'eau au contact de l'ion paramagnétique ; τ_M est le temps de résidence d'une molécule d'eau sur le site de coordination. Enfin, $c_{\mathrm{H_2O}}$ est la concentration de l'eau, soit environ 55 mol.L^{-1}. Dans la situation où le champ magnétique est intense, on peut ne prendre en compte que l'interaction dipôle-dipôle et négliger les autres ; T_{1m} peut alors s'écrire comme suit[71] :

$$\frac{1}{T_{1m}} \propto \frac{S(S+1)}{r_{\mathrm{MH}}^6} \cdot \frac{\tau_C}{1 + \omega^2 \tau_C^2}$$

avec r_{MH} la distance moyenne entre l'ion métallique et les protons des molécules d'eau coordinées, ω la fréquence de Larmor des protons et τ_C le temps de corrélation défini de la façon suivante :

$$\frac{1}{\tau_C} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M}$$

où τ_R est le temps moyen de rotation (*molecular tumbling*) de l'agent de contraste.

En résumé, dans la situation qui nous intéresse, r_{1i} dépend de 6 facteurs : S, q, τ_M, τ_R, r_{MH} et ω. À l'exception du dernier, ils sont représentés à la Figure 1.1B. On remarque que r_{1i} est inversement proportionnelle à ω, donc à l'intensité du champ magnétique : l'augmentation du champ entraîne inéluctablement une baisse de la relaxivité.[71] Dans les situations où de hauts champs magnétiques sont utilisés, maximiser la relaxivité d'un agent est ainsi moins crucial, car le gain en valeur absolue sera moindre. Il est plus intéressant de rechercher de grands écarts de temps de relaxation entre régions différentes et de concevoir des agents dont les propriétés relaxatrices sont très modulables. C'est cette stratégie que nous avons retenue et que nous allons essayer de mettre en œuvre.

1.2 Stratégies de modulation de la relaxivité

Parmi les paramètres influençant la relaxivité, il est difficile de prédire r_{MH} au vu de la structure, et donc de concevoir des agents de contraste pour lesquels la distance entre le centre métallique et les protons pourrait être modifiée par une activité enzymatique.[70, 150] τ_M joue quant à lui un rôle mineur : pour des champs magnétiques intenses, sa variation ne joue que peu sur la relaxivité.[71, 153] S est *a priori* invariable : il vaut toujours 7/2 pour les ions Gd^{3+} et 5/2 pour Mn^{2+}. Ainsi, seuls deux paramètres ont un rôle suffisamment important et sont assez facilement modifiables pour être considérés dans la conception de sondes moléculaires activables : il s'agit de q et de τ_R.[49, 146]

L'influence de q est assez intuitive : plus le nombre de sites de coordination disponibles pour les molécules d'eau est grand, plus la capacité à accélérer la relaxation est importante. Ainsi, il est facile d'imaginer des agents de contraste dont la structure et donc le nombre de molécules d'eau pouvant se coordiner en même temps sont modifiables : cette stratégie est appelée q-modulation.[154]

Il est plus difficile d'apprécier l'influence de τ_R. L'interaction entre l'agent paramagnétique et les protons des molécules environnantes est plus forte quand les molécules d'eau peuvent accéder facilement au centre métallique, ce qui requiert que la rotation de l'agent de contraste soit "synchronisée" avec le mouvement d'ensemble des molécules d'eau. Toutefois, l'intensité du champ magnétique a aussi un rôle important sur l'orientation des spins et donc sur l'interaction entre l'agent de contraste et les molécules d'eau.[49, 70, 71, 149, 155] La τ_R-modulation est en conséquence plus délicate.[147, 148, 154]

Pour des champs magnétiques peu intenses (inférieurs à 1,5 T), des valeurs importantes de τ_R entraînent une grande relaxivité. Le ralentissement de la rotation des agents, par exemple en les liant à une biomacromolécule, est alors une excellente stratégie pour augmenter r_1 ; c'est ce que l'on appelle

l'effet RIME (Receptor-Induced Magnetization Enhancement),[58, 70] mis à profit notamment dans le cas du gadofosveset **E** (voir Figure 12 page 13).[58] Néanmoins, cet effet s'annule pour des champs plus hauts, et est même contre-productif dans ce cas : il s'accompagne d'une augmentation fulgurante de la relaxation spin-spin (qui habituellement est négligeable), ce qui entraîne une diminution forte du signal.[58, 71] Pour des champs supérieurs à 1,5 T, une bonne relaxivité est obtenue pour des valeurs de τ_R moyennes (de l'ordre de la nanoseconde) que la majorité des agents de contraste communs possède naturellement[71] ; l'intérêt d'une approche de τ_R-modulation disparaît donc dans des conditions de hauts champs magnétiques.

Il existe donc des stratégies pour moduler la relaxivité en sphère interne en modifiant la structure de l'agent de contraste, afin de faire varier q et τ_R. Toutefois, même s'il est en théorie possible de réduire de façon très importante r_{1i} en rendant très difficile l'approche au centre métallique paramagnétique, la relaxivité en sphère externe demeure quasiment inchangée car les interactions à longue distance perdurent.[151, 152] Cela entraîne une relaxivité résiduelle, dont nous allons voir les effets sur quelques exemples (voir ci-dessous).

1.3 Modulation des propriétés des agents PARACEST

L'efficacité d'un agent PARACEST repose sur sa capacité à échanger rapidement avec les molécules d'eau du *bulk* des protons très déblindés car proches d'un ion paramagnétique.[55] Il est facile de moduler l'écart de signal généré par un agent en cachant ou en libérant les fonctions chimiques impliquées dans le transfert de protons.[56, 109, 146, 147, 154] Par ailleurs, la vitesse d'échange est très variable d'une fonction à l'autre : l'échange est par exemple très rapide pour les amines, légèrement plus lent pour les hydroxyles et beaucoup plus lent pour les amides et carbamates.[56, 153, 154, 156] Ces principes ont été exploités pour la conception d'agents activables, dont je présenterai plus loin (voir page 37) quelques exemples.

2 Exemples de sondes IRM sensibles à une activité enzymatique

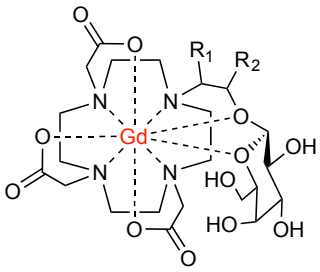
Les stratégies de modulation de l'efficacité des agents de contraste ont été largement utilisées pour la conception de sondes IRM sensibles à la présence d'ions, de petites molécules, ou à une activité enzymatique particulière.[108, 109, 146–148, 154, 157] Je vais m'intéresser aux molécules destinées à la visualisation d'enzymes ; je détaillerai quelques exemples et étudierai leurs propriétés de relaxivité.

2.1 Agents T_1 activables selon le principe de q-modulation

Une première famille de sondes sensibles à une activité enzymatique regroupe des agents T_1 dont le fonctionnement utilise la q-modulation : la molécule initiale ne possède aucun site d'approche libre pour l'eau ($q = 0$), mais la coupure du substrat par l'enzyme libère un complexe où les molécules d'eau peuvent se coordiner ($q \neq 0$). Idéalement, afin d'obtenir un écart de relaxivité maximal, q prend la valeur la plus grande possible ; cependant, afin de garantir la stabilité du complexe, il n'est pas souhaitable que q dépasse 1[70, 150] (même si certains complexes présentent une valeur de q de 2 ou 3).[158, 159]

Le premier exemple de sonde connu est l'agent EGad (voir Figure 1.2) conçu par l'équipe de Thomas Meade.[160] Ce complexe de gadolinium possède un galactose lié par un pont éthyle au macrocycle ; deux atomes d'oxygène portés par le sucre coordinent le métal, ce qui complète la sphère de coordination et assure en théorie $q = 0$. L'hydrolyse de la liaison glycosidique par la β-galactosidase libère un hydroxyle, mais aussi un site de coordination pour l'eau : q devient égal à 1. Par la suite, de nouveaux complexes nommés α- et β-EgadMe ont été étudiés[161, 162] ; le lien éthyle est substitué par un groupement méthyle, ce qui modifie les propriétés de coordination du galactose.[163] Les nombres d'hydratation ont été mesurés pour ces complexes : les valeurs sont non-entières (ce qui traduit la coexistence en solution de plusieurs motifs de coordination), et jamais la valeur $q = 0$ n'est atteinte.[163]

En conséquence, la relaxivité est déjà importante en présence du sucre et ne varie que faiblement après la coupure enzymatique (au mieux 55% dans le cas de α-EgadMe, voir le Tableau 1.1 page 38). La labilité du galactose en tant que ligand et la coordination d'ions carbonates (présents dans le milieu physiologique en grande concentration, environ 25 mM) en lieu et place des molécules d'eau expliquent ces comportements.[163]



$R_1 = R_2 = H$: EGad
$R_1 = Me, R_2 = H$: α-EGadMe
$R_1 = H, R_2 = Me$: β-EGadMe

Molécule	q initial	q final
EGad	0,7	1,2
α-EGadMe	0,5	1,3
β-EGadMe	0,98	1,3

FIGURE 1.2 : Agents de contraste de la famille EGad, sondes sensibles à la β-galactosidase fonctionnant par q-modulation ; structures et valeurs mesurées du nombre d'hydratation q.[160–163]

Dans d'autres exemples, un espaceur auto-effondrable est intercalé entre le substrat enzymatique et le ligand macrocyclique : c'est le cas pour une sonde sensible à la β-glucuronidase dotée d'un espaceur éliminant de type PABA,[164] et dans un complexe ciblant l'estérase hépatique porcine (*Porcine Liver Esterase* ou PLE).[165] Ces sondes présentent elles aussi de faibles différences de relaxivité entre les formes activées et non-activées ; de plus, les molécules non-activées possèdent des relaxivités telles qu'elles génèrent un contraste important (Tableau 1.1). Ces complexes fonctionnant selon le principe de q-modulation semblent donc être des solutions élégantes sur le papier, mais des sondes moléculaires malheureusement peu efficaces.

2.2 Agents T_1 activables selon le principe de τ_R-modulation

Une deuxième famille de sondes comprend les agents T_1 utilisant le principe de τ_R-modulation. Ces molécules possèdent un groupement capable de réaliser la liaison entre le complexe et une bio-macromolécule, mais sous une forme masquée par le substrat enzymatique. L'action de l'enzyme cible libère ce groupement et permet au complexe de se lier à une molécule de grande taille, bénéficiant ainsi de l'effet RIME.[146] On ne trouve que peu d'exemples de sondes dans la littérature. Le complexe **1** (voir Figure 1.3), sensible à l'activité de la carboxypeptidase B, possède un groupement biphényle capable de se lier à l'albumine sérique humaine lorsqu'il n'est pas inaccessible car encombré par les chaînes latérales de trois résidus lysine proches[166] ; une autre sonde de structure proche est quant à elle activable par la β-galactosidase.[167] Toutefois, ces approches souffrent toutes de la limitation de l'effet RIME et donnent ainsi des résultats satisfaisants uniquement en situation de champ faible (0.47 T dans le cas de **1** par exemple).[71]

2.3 Agents T_1 activables et capables de s'agréger

Une troisième famille de sondes est constituée par des agents T_1 sensibles à une activité enzymatique, mais qui ne subissent pas une modification importante des propriétés relaxatrices individuelles comme précédemment. Au contraire, l'activation va conduire à l'agrégation de nombreux complexes, ce qui va entraîner un abaissement local du T_1 par l'augmentation de la concentration locale en agent. Deux processus peuvent être mis en jeu : une oligomérisation des agents induite par la production d'un groupement réactif, ou un abaissement de la solubilité dû au clivage de groupements solubilisants qui va entraîner l'accumulation par interaction hydrophobe.[146–148] Des exemples ont été développés qui utilisent l'une ou l'autre de ces stratégies : la sonde **2** possède un résidu tyrosine masqué par un galactose (voir Figure 1.4). En présence de β-galactosidase, la fonction phénol est libérée, elle peut alors être oxydée en catéchol par une enzyme appelée tyrosinase et provoquer la polymérisation des

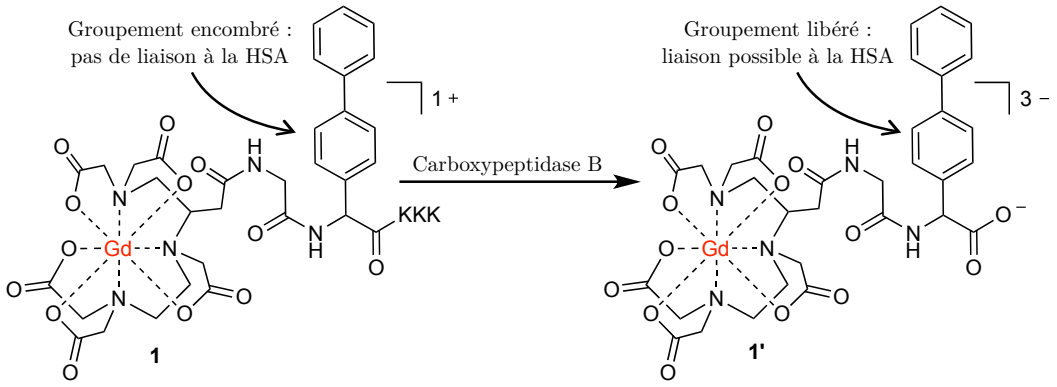


FIGURE 1.3 : Exemple de sonde modulable utilisant le principe de τ_R-modulation : **1**, sensible à la carboxypeptidase B.[166]

complexes.[168] Cette sonde a été utilisée pour l'imagerie de mélanomes, où l'activité tyrosinase est très importante. Cette stratégie a aussi été employée pour la réalisation de sondes sensibles à la myéloperoxydase, une enzyme utilisée par les macrophages pour aider à la phagocytose des bactéries.[169–171] Enfin, la sonde **3** (Figure 1.4) possède des groupements polyéthylèneglycol (PEG) clivables par la MMP2 (*Matrix metalloproteinase* 2, une endopeptidase extracellulaire surexprimée dans certains contextes tumoraux) ; en l'absence des unités hydrosolubilisantes, le complexe lipophile précipite, ce qui entraîne une accumulation et une augmentation locale de la relaxivité.[172]

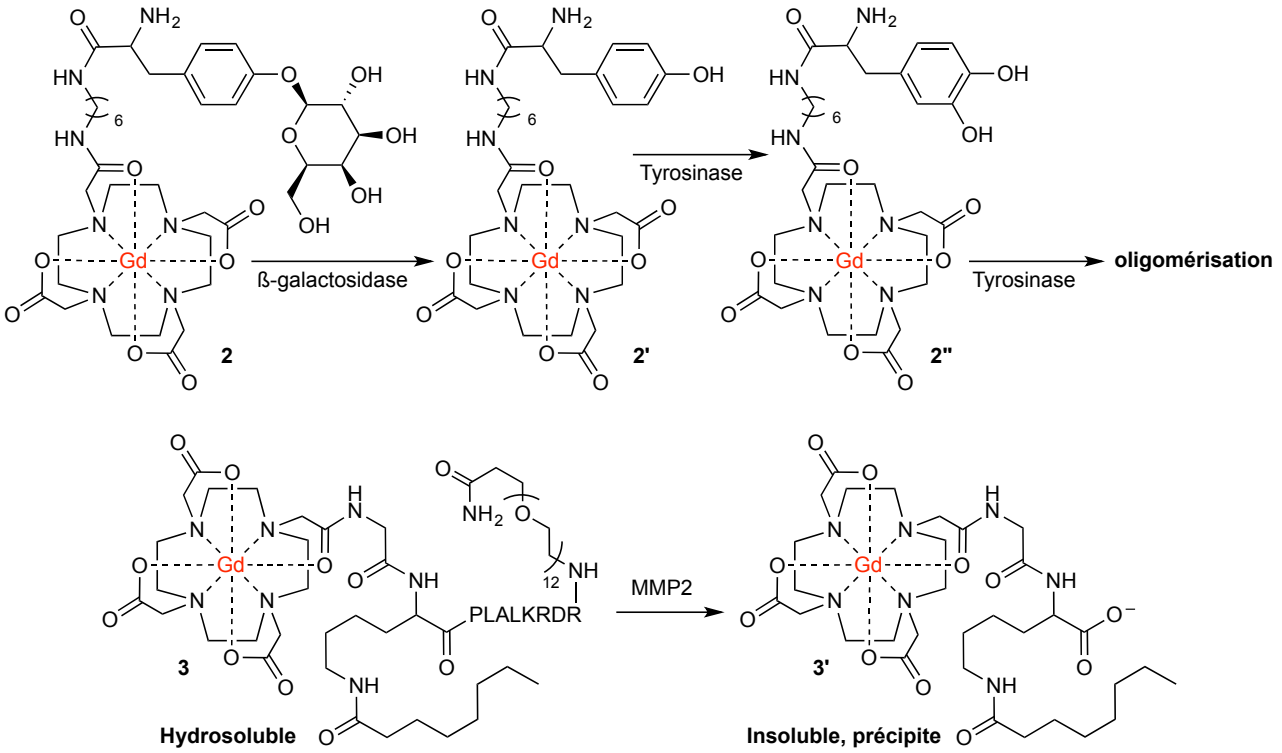


FIGURE 1.4 : Exemple de sonde activable dont le produit peut s'agréger : **2**, sensible à la β-galactosidase et à la tyrosinase,[168] et **3**, sensible à la MMP2.[172]

Ces sondes présentent cependant deux inconvénients : l'agrégation d'agents produit un assemblage de taille plus importante, ce qui s'accompagne donc d'une augmentation du τ_R. Elles souffrent ainsi des mêmes limitations que les sondes basées sur la τ_R-modulation pour une utilisation avec de hauts champs magnétiques. De plus, comme pour toutes les stratégies de ciblage profitant de l'accumulation de nombreux complexes en un lieu donné, cette approche pose des questions quant à la circulation et à la dégradation des complexes, et donc quant à la toxicité (voir page 14).

2.4 Agents PARACEST activables

Enfin, des agents PARACEST sensibles à des activités enzymatiques ont été conçus.[56, 109, 146, 147, 154] Le complexe de thullium **4** (voir Figure 1.5) porte un tétrapeptide substrat de la caspase 3, une exopeptidase impliquée dans l'apoptose[173] ; le proton de la fonction amide (représenté en rouge) s'échange lentement avec les protons du *bulk*, ce qui génère un effet CEST intéressant. L'action enzymatique va transformer cette amide en amine, dont les protons s'échangent beaucoup plus rapidement, avec pour conséquence une disparition de l'effet CEST. Cet exemple a servi de base à l'élaboration d'autres sondes pour peptidases, dont la cathepsine D.[147] Un autre complexe utilise quant à lui un espaceur auto-effondrable pour détecter la présence de la β-galactosidase[174, 175] ; l'adaptation de cet exemple en vue de la conception d'agents de contraste T_1 et/ou de la détection d'activités enzymatiques différentes est en cours de réalisation.[176]

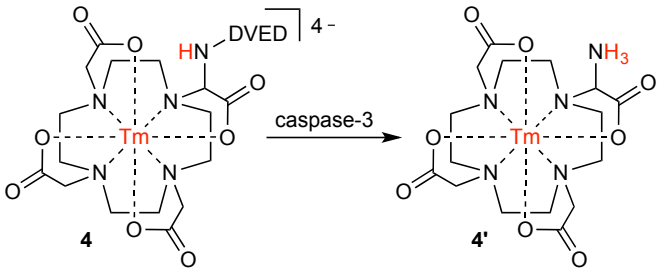


FIGURE 1.5 : Exemple d'agent PARACEST sensible à une activité enzymatique : **4**, sensible à la caspase 3 (*Cysteine-dependent ASPartate-directed proteASE*).[173]

Ces molécules souffrent de deux inconvénients. L'évolution de l'effet CEST n'a pas toujours lieu dans le sens désiré : pour certaines constructions, l'activation enzymatique s'accompagne d'une disparition de l'effet CEST, alors qu'une apparition de signal est plus facile à apprécier. Par ailleurs, malgré les grandes concentrations de sondes utilisées (pour **4** par exemple, la valeur est de 20 mM), la modulation est relativement faible.

3 Discussion des différentes approches présentées

Les données relatives aux sondes que j'ai présentées sont compilées dans le Tableau 1.1. Autant que possible, j'ai essayé de retenir les valeurs correspondant à des conditions similaires (mêmes températures, champs magnétiques, concentrations en anions, etc...) pour rendre la comparaison plus pertinente.

J'ai précisé dans l'introduction (voir page 23) les caractéristiques dont devraient bénéficier des sondes sensibles à une activité enzymatique : afin de minimiser le rapport signal sur bruit et d'améliorer la sensibilité de détection, elles devraient notamment générer le signal le plus faible possible sous la forme non-activée (soit une valeur de r_1 très proche de 0) et garantir un écart de signal maximal lors de l'activation (soit r_1 la plus grande possible). Or, aucune des stratégies que j'ai présentées ici ne permet de concevoir des sondes satisfaisantes de ce point de vue : l'écart relatif entre les formes non-activées et activées est toujours faible si on le compare aux valeurs qu'il est possible d'obtenir avec des sondes fluorogènes (des augmentations de signal de l'ordre de 20000% peuvent être atteintes).[177] De plus, pour les agents T_1 avant leur activation, une relaxivité non négligeable est toujours observée, qui entraîne donc une génération de signal importante. Enfin, les valeurs présentées ici ont été mesurées, sauf en ce qui concerne les agents PARACEST, pour des champs magnétiques peu intenses ; l'utilisation des mêmes molécules dans des situations de hauts champs risque donc d'entraîner des écarts relatifs de relaxivité encore plus réduits.[71]

Ces constats ont poussé Jens Hasserodt à imaginer une stratégie originale pour la conception de sondes IRM sensibles à une activité enzymatique ; je vais maintenant la détailler et décrire sa mise en œuvre moléculaire.

Stratégie	Sonde (ou enzyme ciblée)	r_1 initiale ($mM^{-1}.s^{-1}$)	r_1 finale ($mM^{-1}.s^{-1}$)	Ecart relatif	B (T)	Référence
q-modulation	EGad	n. r.	n. r.	+20%	n. r.	[160]
	α-EGadMe	2,1	3,3	+55%	1,4	[163]
	β-EGadMe	2,8	3,2	+14%	1,4	[163]
	β-glucuronidase	3,99	3,63	-27%	1,4	[164]
	Estérase	5,7	10,8	+89%	0,47	[165]
τ_R-modulation	Carboxypeptidase B	11,1	24,5	+120%	0,47	[166]
	β-galactosidase	6,06	9,51	+55%	0,47	[167]
		Concentration (mM)				
PARACEST	**4**	5,2		5%	9,4	[173]
	β-galactosidase	20		29%	9,4	[174]

TABLEAU 1.1: Valeurs de relaxivité (ou concentration) et écart relatif entre formes non-activées et activées pour les sondes sensibles à une activité enzymatique présentés ici ; n. r. : non renseigné.

Chapitre 2

Conception de sondes magnétogènes : aspects théoriques et état de l'art

Les stratégies communément mises en œuvre pour la conception de sondes IRM destinées à la visualisation d'activités enzymatiques (q-modulation, τ_R-modulation et agrégation d'agents de contraste T_1 ou utilisation d'agents PARACEST modulables) ne permettent pas de concevoir des agents suffisamment efficaces pour accomplir leur objectif : les propriétés signalantes ne pouvant pas être modulées de façon assez importante, il est impossible de marquer de façon fiable les lieux de présence de l'enzyme.

1 Intérêt des sondes magnétogènes pour l'IRM moléculaire

Les valeurs de relaxivité si peu satisfaisantes des sondes conçues jusqu'à présent (voir le Tableau 1.1) ont pour origine le mécanisme de relaxation en sphère externe. En effet, celui-ci n'est pas affecté par l'action de l'enzyme et contribue à la relaxivité de manière identique au cours du temps. La réduction voire dans l'idéal l'annulation de ce processus au sein des sondes sous la forme initiale permettrait d'augmenter l'écart relatif entre les formes non-activée et activée. Or, l'efficacité de ce mécanisme de relaxation ne dépend que du spin électronique S de l'ion métallique[151, 152] ; l'annuler nécessite donc de modifier la valeur de S.

Jens Hasserodt a ainsi eu l'idée de sondes moléculaires capables de changer d'état de spin.[178, 179] La forme non-activée serait de spin nul : sous cette forme diamagnétique, elle n'entraînerait ni mécanisme de sphère interne (voir page 33)[70, 71, 149, 150], ni mécanisme de sphère externe[151, 152] ; sa relaxivité serait alors en théorie nulle. L'activation entraînerait un changement d'état de spin ($S > 0$), s'accompagnant de l'apparition du mécanisme de sphère externe, mais aussi de la relaxation en sphère interne si l'accès des molécules d'eau à l'ion paramagnétique est possible ($q > 0$). Il serait possible d'atteindre, en théorie, les mêmes valeurs de r_1 que les complexes que j'ai présentés plus haut. De telles molécules, dites magnétogènes (la conversion d'un état diamagnétique à un état paramagnétique représente, d'un point de vue formel, une création de moment magnétique de spin électronique, d'où le terme), offriraient ainsi un rapport signal sur bruit optimal, bien plus important que ceux atteints par les sondes rapportées dans la littérature.

L'objectif de l'équipe de Jens Hasserodt est donc la conception de molécules diamagnétiques, capables de devenir paramagnétiques dans le milieu biologique à l'issue d'une action enzymatique spécifique. Pour être des sondes efficaces, ces sondes doivent être stables en l'absence de l'enzyme ciblée, et être capables à la fois d'accéder rapidement à l'enzyme et de demeurer le plus près possible de celle-ci une fois transformées (voir page 23).[116, 179] Elles devront enfin montrer une toxicité minimale.

Je vais maintenant présenter les solutions envisagées par Jens Hasserodt et celle qui a été retenue.

2 Stratégie d'élaboration de sondes magnétogènes

Les différentes approches possibles pour réaliser des molécules capables de changer d'un état diamagnétique à un état paramagnétique à la demande et en solution aqueuse ont été revues récemment[116] ; par souci de concision, je ne détaillerai ici que les conclusions de cette étude utiles pour la conception de sondes pour l'IRM moléculaire d'enzymes.

2.1 Magnéto-modulation et échec des solutions chimiques habituelles

De nombreux composés pouvant se trouver dans deux états magnétiques différents et basculer d'un état à l'autre sous l'effet d'un stimulus physique (ce que l'on appelle la magnéto-modulation, ou *Spin crossover*, induite par exemple par une excitation lumineuse, un changement de température ou l'application d'un champ magnétique) ont été étudiés. Ils sont en effet très utiles pour la conception de nouveaux dispositifs de stockage de données, un domaine de recherche en plein essor.[180] Pour l'essentiel, il s'agit de polymères de coordination, et plus précisément de MOFs (Metal-Organic Frameworks), qui ne sont pas adaptés à une utilisation *in vivo* ; de plus, ces systèmes présentent souvent une magnéto-modulation incomplète, graduelle, et surtout réversible.[181]

Quelques rares exemples de complexes de coordination manifestent une magnéto-modulation en solution en réponse à un stimulus chimique.[181] Cependant, ces molécules présentent une réponse magnétique faible face à de grandes concentrations d'analytes simples (des protons ou des ions halogénures), et ceci dans des environnements chimiques très favorables (solvants non compétitifs comme le dichlorométhane et privés de dioxygène).[181]

Nous devons donc trouver une nouvelle solution chimique pour bénéficier d'une magnéto-modulation en réponse à un stimulus chimique et en solution plus satisfaisante.

2.2 Le changement d'état de spin de complexes de fer(II) : notre solution pour la magnétogénèse en solution aqueuse

Trois stratégies ont été envisagées pour la conception d'une molécule magnétogène opérant en solution aqueuse en réponse à l'action d'une enzyme[116] :

- la génération d'un radical à partir d'une molécule organique diamagnétique ; néanmoins, les radicaux organiques sont souvent peu stables dans le milieu aqueux.
- l'oxydation ou la réduction intramoléculaire d'un complexe de coordination diamagnétique menant à un composé paramagnétique ; toutefois, une telle molécule serait aussi sensible aux conditions redox environnantes et risquerait ainsi d'être activée en l'absence de l'enzyme ciblée.
- le basculement d'un état bas spin (et champ de ligand fort) à un état haut spin (et champ de ligand faible) d'un complexe métallique. Elle peut être réalisée de façon totale, sélective et mener à un composé stable dans le temps. C'est cette approche que nous avons retenue.

Le moment magnétique des complexes basés sur des métaux de transition de la première période est facile à prévoir car il ne dépend que du spin électronique (cas de spin seul) ; les métaux de plus grand numéro atomique Z présentent d'autres contributions au magnétisme, dont notamment le couplage spin-orbite.[116] Nous nous concentrerons donc sur la première période. La théorie du champ cristallin prévoit deux situations seulement où l'abaissement du champ de ligand s'accompagne d'une magnétogénèse :

- le cas des complexes d'ions métalliques de configuration électronique d^6 et de géométrie octaédrique ; la transition a lieu de $S = 0$ à $S = 2$ (voir Figure 2.1A).
- le cas des complexes plan-carré d'ions métalliques d^8 qui changent de géométrie pour devenir octaédriques ou tétraédriques. Le spin change alors de $S = 0$ à $S = 1$ (Figure 2.1B).

Cette deuxième situation n'est rencontrée que dans le cas de complexes de nickel(II), et de plus n'a jamais été observée en solution aqueuse : la géométrie plan-carré n'est pas stable en présence de nucléophiles.[116] Dans le premier cas, le changement de spin est de plus grande amplitude ; deux

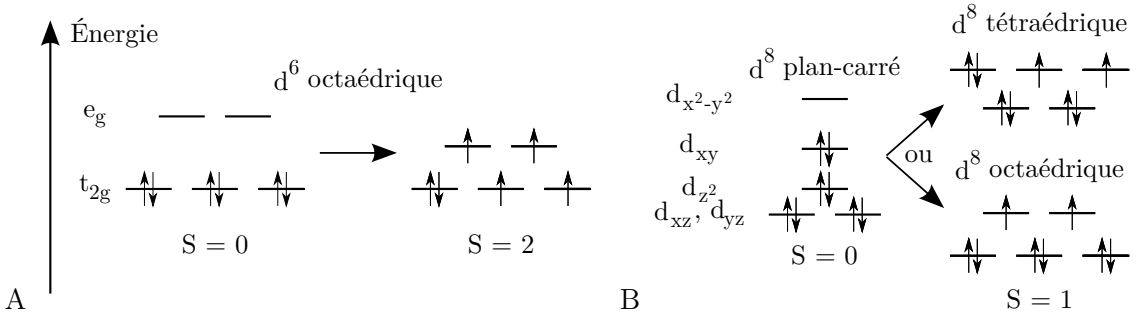


FIGURE 2.1 : Configurations électroniques d des ions métalliques permettant la magnétogénèse, selon la théorie du champ cristallin. A. Cas des ions d^6 en géométrie octaédrique. B. Cas des ions d^8.

métaux sont principalement concernés : le fer(II) et le cobalt(III). Néanmoins, les complexes de Co^{3+} à l'état haut spin sont très rares et ne sont pas stables dans l'eau ; pour ces raisons, nous retenons donc le fer(II) comme centre métallique pour la conception de nos sondes.[116]

2.3 Choix du ligand et stratégie retenue

Il nous faut identifier un ligand du fer(II) permettant de corréler une action enzymatique à un abaissement du champ de ligand du complexe menant *in fine* à la magnétogénèse. Le cahier des charges pour la conception de sondes magnétogènes efficaces (voir page 23) impose des exigences qui se traduisent en contraintes sur le choix du ligand.

Les sondes doivent être stables dans le milieu physiologique, qui est très compétitif. Outre l'eau comme solvant, sont présents notamment des nucléophiles en grande concentration (anions, chaînes latérales de certains acides aminés, liaisons phosphodiester de l'ADN, etc...), de nombreux cations métalliques libres pouvant prendre la place de l'ion Fe^{2+} (Mg^{2+}, Ca^{2+} et la majorité des métaux de transition de la première période) et plusieurs oxydants (comme le dioxygène dissous et les radicaux libres). Le complexe de fer(II) doit donc être capable de résister à la présence de si nombreux nucléophiles, à la transmétallation et à l'oxydation, afin d'éviter à la fois la libération d'ions Fe^{2+} (toxiques pour l'organisme) et la génération d'un chélate de fer(III) (nécessairement paramagnétique, donc réduisant le rapport signal sur bruit). Pour avoir toutes ces qualités, le complexe doit nécessairement présenter de très grandes stabilités thermodynamique et cinétique.[116] Le seul moyen de les obtenir est d'utiliser un ligand hexadentate et macrocyclique ; de tels complexes de fer(II) peuvent bénéficier de constantes de stabilité thermodynamique de l'ordre de 10^{25} et d'une grande inertie.[182]

Par ailleurs, afin d'assurer la transition de $q = 0$ à $q = 1$ désirée (voir page 39), le ligand hexadentate choisi pour la sonde initiale doit être transformé par l'action enzymatique en un ligand pentadentate. Le complexe formé sera nécessairement moins stable, toutefois des ligands pentadentates peuvent tout de même garantir une grande stabilité.

La revue de la littérature réalisée par Jens Hasserodt a permis d'identifier deux ligands appelés TPTACN et DPTACN, sous leur forme complète tri- et dipicolyltriazacyclononane (1,4,7-tris(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7-triazacyclononane et 1,4-bis(pyridin-2-ylméthyl)-1,4,7-triazacyclononane).[183] Le complexe $[Fe(TPTACN)(ClO_4)_2]$ (voir Figure 2.2), décrit pour la première fois en 1986 simultanément par les équipes de Karl Wieghardt et de Hans Toftlund,[184, 185] est diamagnétique à température ambiante, à l'état solide comme en solution aqueuse.[183, 185] Le complexe $[Fe(DPTACN)ClPF_6]$ étudié en 1998 par l'équipe de Leone Spiccia est quant à lui paramagnétique dans les mêmes conditions.[183, 186] Ces deux molécules présentent une très grande stabilité :

— Les deux ligands sont macrocycliques, le premier est hexadentate et le deuxième pentadentate.

— Le complexe **5** possède dans un milieu mimant les conditions physiologiques (100 mM de NaCl dans l'eau à 37°C) une constante de stabilité très importante : $10^{19.3}$.[60]

— Les deux complexes sont peu enclins à s'oxyder dans le milieu biologique : seules l'oxydation puis la réduction du centre métallique sont observées (Fe^{II} vers Fe^{III} puis Fe^{III} vers Fe^{II}), et ont lieu à des potentiels redox relativement élevés par rapport au potentiel intracellulaire ($E_{1/2} >$ + 0,5 V par rapport à - 0,20 V en conditions normales).[185, 187]

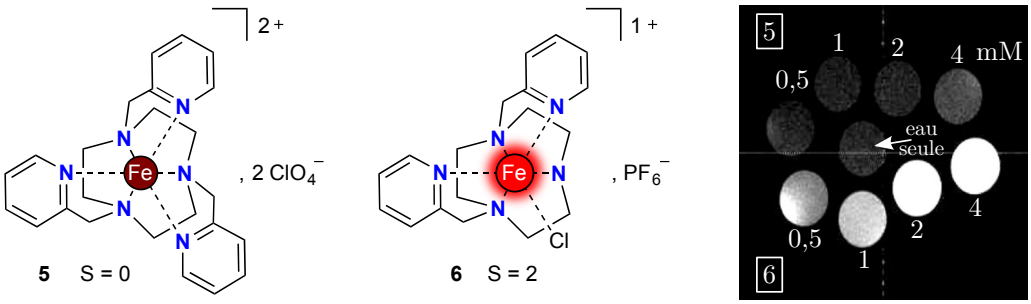


FIGURE 2.2 : Complexes de fer(II) $Fe(TPTACN)^{2+}$ **5** et $Fe(DPTACN)^{2+}$ **6** : structure, état de spin électronique en solution aqueuse et image IRM en pondération T_1 de tubes contenant des solutions de concentrations millimolaires (champ magnétique : 7 T ; température ambiante).[183]

Ces deux complexes possèdent aussi des caractéristiques optimales pour la mise au point de sondes modulables :

— L'écart de moment magnétique entre les deux complexes est maximal. Le complexe **5** possède un moment magnétique en solution μ_{eff} très faible (environ 0,9 μ_B ou magnéton de Bohr, l'unité de référence du magnétisme moléculaire ; $\mu_B = 9,274 \cdot 10^{-24}$ J.T^{-1}),[183] dû uniquement à des effets quantiques indépendants du spin et de la température.[185] Au contraire, **6** présente un moment magnétique de l'ordre de 5 μ_B, ce qui est la plus grande valeur que peut prendre un complexe d^6 de géométrie octaédrique selon la formule du spin seul (elle correspond à S = 2 ; pour rappel, $\mu_{\text{eff}} \simeq 2\sqrt{S(S+1)}$).[183]

— La conséquence pour l'utilisation en imagerie est très intéressante : ces deux complexes ont un effet totalement opposé sur le signal IRM. Une image acquise en pondération T_1 (voir Figure 2.2) de tubes contenant des solutions de **5** (en haut) ou de **6** (en bas) à différentes concentrations montre que le premier complexe ne génère aucun contraste positif : le niveau de gris est indiscernable de celui du tube contrôle pour toutes les concentrations. À l'inverse, le second complexe possède un fort pouvoir relaxant qui se traduit par un contraste important pour les tubes contenant des solutions de concentration millimolaire.[183]

— Les ligands respectivement hexadentate et pentadentate permettent d'obtenir $q = 0$ et $q = 1$ dans les situations désirées.

— De plus, leur structure est très proche : ils ne diffèrent que d'un bras coordinant portant une pyridine. Ce ligand azoté de type imine exerce un grand champ de ligand grâce à l'effet de rétrodonation (*backbonding effect*) dû à son orbitale antiliante π^*. Le remplacement d'une seule pyridine par un ligand plus faible (comme une molécule d'eau ou un ion chlorure) abaisse le champ de ligand total et suffit à basculer complètement d'une situation de champ fort vers une situation de champ faible.[183]

Il paraît donc possible de concevoir des sondes magnétogènes à partir de ces structures modèles. Si l'on remplace dans le TPTACN un des trois bras picolyle (2-pyridylméthyle) par un bras portant un ligand apparenté à une pyridine et dont la décoordination peut être déclenchée par une transformation enzymatique, on obtient un complexe capable de basculer du motif de coordination de **5** à celui de **6** et donc de changer d'état de spin (voir Figure 2.3).[116, 179] La décoordination du ligand peut se produire de deux manières différentes :

— la transformation enzymatique provoque la rupture de la liaison covalente liant le ligand au macrocycle (cas du haut) ; le ligand n'étant plus inclus dans un cycle chélate, sa coordination n'est plus favorisée et il est remplacé par un ligand plus compétitif (un anion ou une molécule

d'eau).

— la transformation enzymatique ne provoque aucune rupture de liaison covalente, mais la protonation du ligand et sa décoordination au profit d'une molécule d'eau (cas du bas).

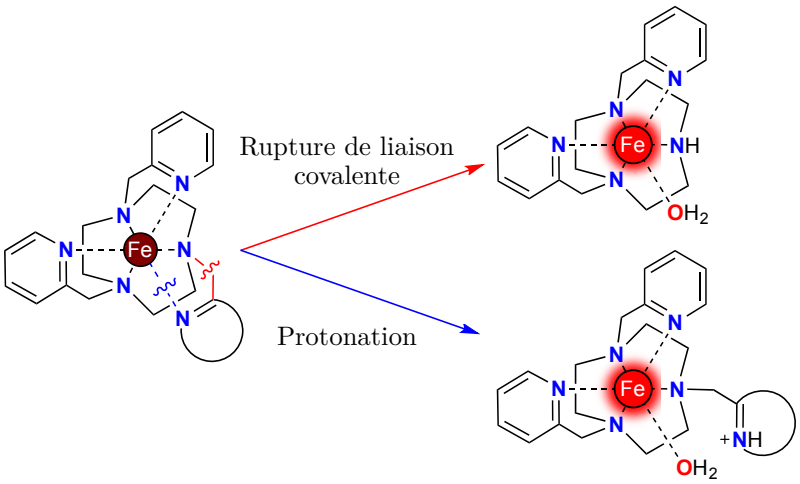


FIGURE 2.3 : Stratégies pour la conception de sondes magnétogènes inspirées par les complexes **5** et **6** : rupture de la liaison covalente reliant un des ligands au macrocycle et s'accompagnant de la décoordination de ce ligand (en haut), ou protonation d'un des ligands (en bas).

Au cours de cette partie, j'ai essayé de montrer que la conception de sondes magnétogènes sensibles à une activité enzymatique était un défi, car malheureusement aucune solution chimique existante ne permet de bénéficier d'une magnéto-modulation satisfaisante en conditions physiologiques. L'équipe a identifié une approche originale très prometteuse, mais qui doit encore être mise en œuvre et prouver qu'elle peut donner les résultats attendus.

Si l'on devait comparer l'objectif entre ce projet de conception de sondes magnétogènes et celui d'élaboration de sondes fluorogènes, l'équipe est ici dans la position dans laquelle se trouvaient les premiers chercheurs dans le domaine des sondes fluorogènes. En effet, l'objectif était alors d'identifier des fluorophores capables de voir leur propriétés de fluorescence modulées, et de rendre cette modulation inductible par une transformation enzymatique. Nous sommes dans la même situation : nous cherchons une molécule dont la capacité à accélérer la relaxation T_1 peut être modulée, et à lier cette modulation à l'action d'une enzyme. Les considérations pharmacocinétiques (biodistribution, toxicité, diffusion du signal) sont donc pour l'instant moins prioritaires que celles liées à la génération du signal (intensité, rapidité et sélectivité), même si aucun aspect ne doit bien sûr être ignoré.

Plusieurs collaborateurs me précédant dans l'équipe, dont les docteur(e)s Vitalie Stavila, Yvon Stortz, Mustapha Allali, Akilesh Singh, Fayçal Touti et Jinping Wang, ont travaillé sur la conception de sondes magnétogènes. Je vais maintenant décrire et analyser les résultats qu'ils ont obtenus.

3 Sondes magnétogènes profitant d'une rupture de liaison covalente

Cette stratégie a été explorée par l'équipe dès 2008. Elle consiste à concevoir des molécules dotées d'une structure en trois parties inspirée par l'approche double pro-médicament (voir page 25) : le complexe métallique et le déclencheur enzymatique sont séparés par un espaceur auto-effondrable. En l'absence du stimulus enzymatique, l'édifice est stable, et en particulier tous les ligands du fer sont coordinés sur l'ion métallique, ce qui garantit un état diamagnétique. La coupure du déclencheur va entraîner l'effondrement de l'espaceur et la rupture de la liaison d'un ligand au macrocycle, libérant outre ce ligand le complexe $Fe(DPTACN)^{2+}$ **6** paramagnétique.

La rupture de la liaison covalente, qui demande une quantité d'énergie déjà grande, s'accompagne dans le même temps de l'ouverture d'un cycle chélate à 5 membres (formé par l'atome de fer, deux atomes d'azote et deux atomes de carbone). Or, ces unités présentent à la fois une très grande stabilité thermodynamique et une tendance à s'ouvrir très lentement[188] : la séparation rapide entre ligand et macrocycle est donc encore plus difficile à réaliser, et nécessite que l'espèce chimique résultant de la transformation enzymatique soit très instable et encline à se fragmenter. Dans le même temps, avant l'action de l'enzyme, l'édifice doit être stable pour ne pas s'activer de façon non spécifique ; il faut donc parvenir à un équilibre entre une fragmentation rapide et une stabilité initiale suffisante.

La molécule **7** sensible à la β-galactosidase a été préparée et étudiée (voir Figure 2.4).[189] La fonction phénol est engagée dans une liaison glycosidique avec le galactose, ce qui réduit son caractère mésomère donneur[131] et rend le complexe stable. Une fois le sucre clivé par l'enzyme, il est attendu que le groupement hydroxyle initie un déplacement d'électrons menant à une élimination en 1,6 (voir Figure 27 page 26). Le complexe **6** serait libéré, ainsi qu'une quinone méthide. Toutefois, cet effondrement n'a pas été observé. Il est supposé que l'ouverture du cycle chélate accompagnant l'élimination en 1,6 du macrocycle est trop défavorable par rapport au gain que constitue l'hydrolyse d'un N,O-aminal phénylogue.[189] En d'autres termes, **6** ne constitue pas un assez bon groupement partant dans ces conditions certes difficiles.

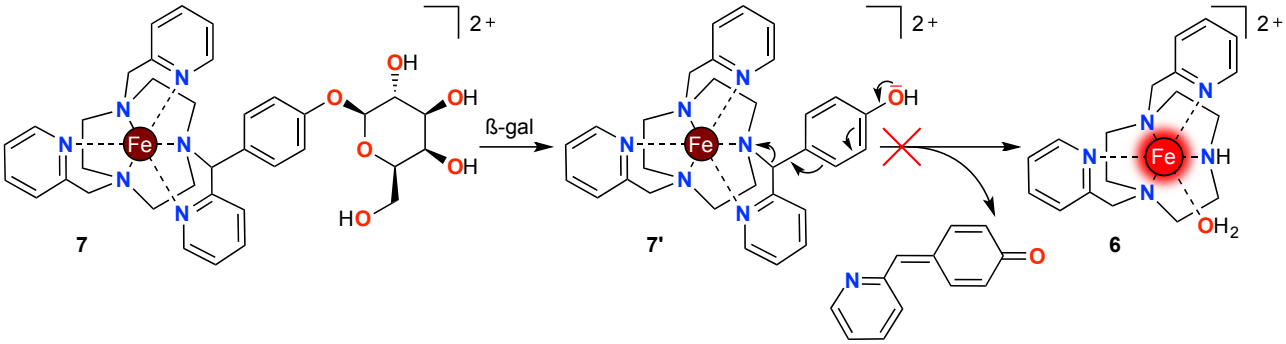


FIGURE 2.4 : Premier exemple d'une molécule utilisant la rupture d'une liaison covalente pour déclencher la magnétogénèse, et échec à cause d'une trop grande stabilité de l'intermédiaire **7'**.[189]

Un système encore plus instable doit donc être élaboré pour concrétiser cette stratégie. Il est possible de changer de groupement partant en modifiant la structure du complexe. Dans la molécule **8** (voir Figure 2.5), le ligand pyridine est remplacé par un autre hétérocycle aromatique azoté, un triazole.[190] Celui-ci coordine toujours le fer(II) via un azote de type imine en formant un cycle chélate à 5 membres, ce qui garantit *a priori* un état diamagnétique. Néanmoins, la liaison carbone-azote liant l'azole au reste du ligand est susceptible d'être clivée plus facilement que celle joignant la pyridine dans la molécule **7** (voir ci-dessous). Enfin, le déclencheur galactose a été remplacé par un groupement nitro plus facile d'accès synthétiquement et permettant une optimisation des conditions réactionnelles sans devoir recourir à de grandes quantités d'enzyme purifiée.

Le complexe **8** a été préparé à l'aide d'un protocole original (voir Figure 2.5) : le DPTACN, le 1,2,3-triazole et le *p*-nitrobenzaldéhyde sont mis à réagir ensemble et réalisent une réaction de condensation à trois composantes appelée réaction de Katritzky[191] pour donner le ligand **8'** (la voie de synthèse du

DPTACN sera précisée au chapitre 3, page 62). Ce ligand ne peut être isolé car il est très susceptible à l'hydrolyse ; l'ajout d'une solution anhydre de sels de fer(II)[192] permet heureusement de former *in situ* le complexe **8**. Après purification par chromatographie en phase inverse, **8** a été cristallisé et sa structure à l'état solide obtenue par une étude de diffraction des rayons X sur un monocristal.

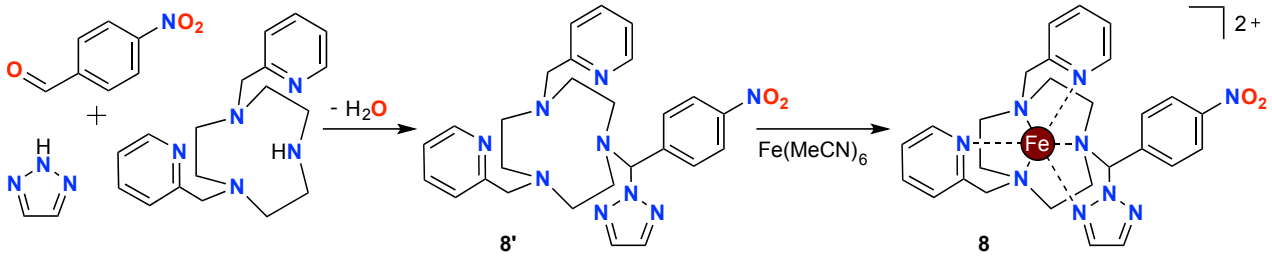


FIGURE 2.5 : Synthèse du complexe **8** à l'aide d'une réaction de Katritzky à trois composantes.[190, 191]

Le complexe **8** est diamagnétique en solution aqueuse : le spectre RMN de la molécule est bien résolu et ne fait apparaître de pics que dans l'intervalle 0 - 10 ppm. La réduction du groupement nitro terminal par hydrogénation catalytique réalisée dans l'eau tamponnée au pH de 7,4 mène à la formation de l'aniline **8a** (voir Figure 2.6), qui constitue un *N,N',N"*-orthoamide phénylogue. Cette espèce instable subit un transfert électronique initié par l'amine qui entraîne l'expulsion du triazole ; la grande stabilité due à l'effet chélate est donc outrepassée ici. Une molécule d'eau vient ensuite restaurer l'aromaticité de l'intermédiaire de type aza-quinone méthide et former un *N,N',O*-orthoaminal phénylogue. Enfin, ce second aminal s'effondre pour libérer le *p*-aminobenzaldéhyde et le complexe paramagnétique **6**.[190]

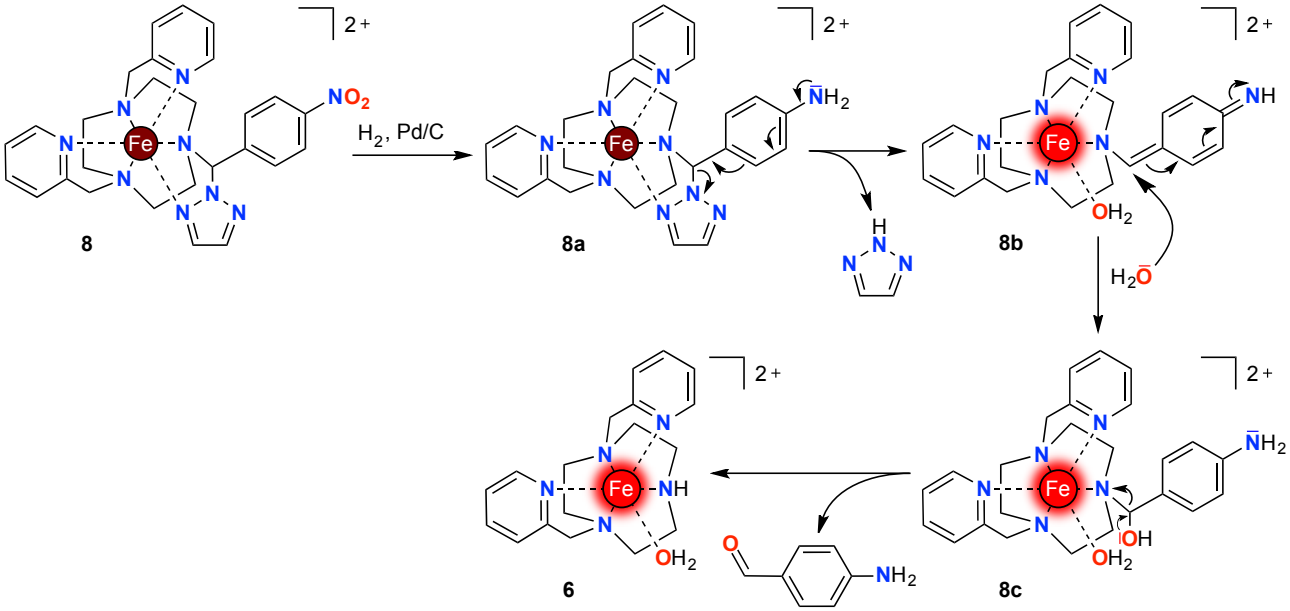


FIGURE 2.6 : Fragmentation du complexe **8** suite à son hydrogénation catalytique pour mener à l'espèce paramagnétique **6**.[190]

Ce processus a été étudié par différentes méthodes physico-chimiques ; les conclusions vont toutes dans le sens d'une magnétogénèse déclenchée par l'hydrogénation du groupement nitro. Premièrement, des analyses de spectrométrie de masse ont mis en évidence l'apparition et la disparition d'espèces ioniques dont les données correspondent aux intermédiaires mentionnés. Deuxièmement, un suivi par HPLC (chromatographie liquide à haute performance) analytique montre clairement la conversion de la molécule **8** en une espèce qui a le même temps de rétention que **6**. Troisièmement, un suivi par spectroscopie d'absorption UV-visible (voir Figure 2.7A) montre la disparition de la bande de transfert de charge métal-ligand intense de **8** (caractéristique de ces complexes macrocycliques de fer(II) bas spin et indiquée par une flèche)[184] au profit d'une bande beaucoup plus faible, de même allure que celle de **6**. Quatrièmement, le temps de relaxation longitudinale d'une solution de **8** à 4 mM (mesuré

à 11,4 T à l'aide d'un spectromètre RMN) diminue progressivement pour atteindre une valeur proche de celle d'une solution de **6** à la même concentration (voir Figure 2.7B). Enfin, des expériences de contrôle réalisées en l'absence de l'hydrogénation catalytique initiale n'ont montré aucune évolution, même après plusieurs heures d'incubation dans les mêmes conditions.

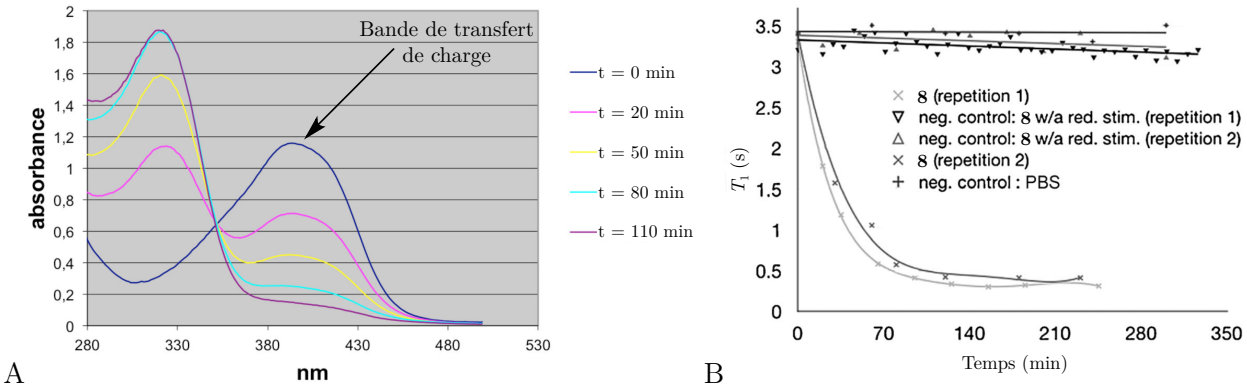


FIGURE 2.7 : Preuves expérimentales du caractère magnétogénique de **8** dans l'eau tamponnée à pH 7,4 et à la température de 37°C ; t = 0 correspond à la fin de la réduction par hydrogénation catalytique. A. Spectres d'absorption UV-visible d'une solution aqueuse de **8** ; concentration : 0,2 mM. B. Evolution du T_1 mesuré en présence d'un champ magnétique de 11,4 T ; concentration : 4 mM.[190]

Ces résultats positifs ont suggéré de suivre l'effet de **8** sur l'évolution du signal IRM. Sur une image acquise à 3 T en pondération T_1 (voir Figure 2.8), on peut observer l'apparition d'un fort hypersignal suite à l'hydrogénation catalytique (colonne de gauche), alors qu'en l'absence de ce stimulus le niveau de gris reste similaire à celui d'un échantillon témoin d'eau pure (colonnes du milieu et de droite). Il est plaisant de noter que l'intensité du signal atteint par une solution de **8** après activation est proche de celle que garantit le Dotarem®, agent de contraste T_1 de référence (deux derniers tubes de la colonne de gauche). Il s'agit de la première démonstration d'une magnétogénèse en solution aqueuse et au pH physiologique.

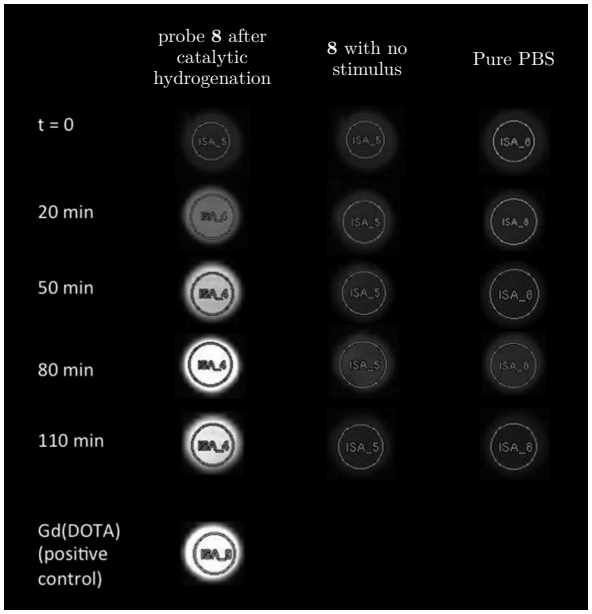


FIGURE 2.8 : Evolution du signal IRM généré par **8** suite à l'hydrogénation catalytique ; pondération T_1, champ magnétique : 3 T ; concentration : 4 mM ; température : 37°C ; pH : 7,4.[190]

Profitant du fait que la synthèse est convergente et efficace, Fayçal Touti a préparé différentes variations où le groupement 1,2,3-triazole est remplacé par un pyrazole ou un benzotriazole, avec l'objectif d'améliorer la cinétique de fragmentation. Malheureusement, aucun complexe n'a présenté de

comportement plus satisfaisant que celui de **8**.[190] Fayçal Touti et moi-même avons réalisé la synthèse et l'étude de nouveaux dérivés de **8**, afin d'obtenir une fragmentation plus rapide ; les résultats ont déjà fait l'objet d'une publication[193] et seront décrits au chapitre 3.

La molécule **8** montre un vrai caractère magnétogénique ; cependant, deux inconvénients semblent limiter la conception de sondes pour l'IRM moléculaire à partir de cette architecture dite Katritzky. Le premier écueil est lié au remplacement du groupement nitro par un substrat enzymatique d'intérêt. Le complexe **9** (voir Figure 2.9) comportant une aniline phénylacétylée en tant que déclencheur a été préparé[190] ; le groupement amide peut être clivé par une enzyme, la pénicilline G amidase. La transformation sélective de **9** en **6** a été observée dans un milieu sérique, toutefois **9** n'est pas stable dans un milieu aqueux plus simple et notamment dans le milieu tamponné par des ions phosphates utilisé précedemment.[193] Il est possible que l'effet mésomère donneur de l'aniline ne soit pas suffisamment inhibé par l'acylation pour réprimer tout effondrement, rendant **9** instable. **8** bénéficiait quant à elle de l'effet mésomère attracteur très important du groupement nitro,[131] ce qui explique pourquoi aucun problème de fragmentation spontanée n'a été observé. L'instabilité de **9** suggère que toutes les sondes comportant une aniline acylée (ciblant les peptidases ou amidases) ou carbamylée, ou bien un phénol acylé (ciblant les estérases) ou glycosylé (pour les glycosidases), souffreront du même inconvénient. Le choix d'enzymes pouvant être ciblées est donc très réduit, sauf si l'on a recourt à des stratégies complexes impliquant plusieurs espaceurs, au prix d'un travail de synthèse conséquent et avec des résultats non garantis.[194]

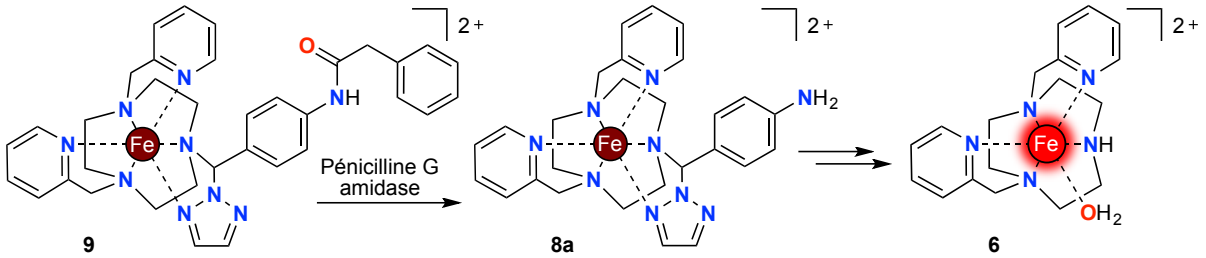


FIGURE 2.9 : Sonde **9** sensible à la pénicilline G amidase.[190]

Le deuxième inconvénient majeur de l'architecture Katritzky est la libération du complexe **6** en tant qu'espèce paramagnétique finale. En effet, cette espèce s'est révélée être instable dans le milieu aqueux utilisé si des précautions particulières ne sont pas prises.[144] Notamment, travailler en absence de dioxygène et dans des conditions particulièrement réductrices (via le bullage de dihydrogène par exemple) est nécessaire pour ne pas assister à l'oxydation du ligand et à la décoordination du fer pour mener à la précipitation de l'hydroxyde de fer(III). Cette oxydation semble s'accompagner d'une toxicité et est largement imputable au site amine secondaire de **6**.[144] Une stratégie magnétogénique où le produit final paramagnétique ne posséderait pas d'amine secondaire mais seulement des amines tertiaires garantirait *a priori* une stabilité de l'espèce paramagnétique plus grande et une toxicité plus réduite.

4 Sondes magnétogènes profitant de la protonation d'un ligand

Afin de s'affranchir des difficultés engendrées par la libération du complexe **6** en tant que molécule paramagnétique finale, une autre stratégie de conception de sondes magnétogènes a été développée depuis 2010.[179] Les molécules, possédant toujours trois parties pour bénéficier des avantages des doubles pro-médicaments, contiennent un ligand azoté de type imine capable de se protoner en milieu aqueux (une fonction basique), et dont la basicité est modulable par l'environnement chimique. En présence du déclencheur enzymatique, le ligand est peu basique, il n'est donc pas protoné mais coordiné sur le centre métallique ; la coupure du déclencheur et l'auto-effondrement qui s'en suit entraînent une augmentation de la basicité du ligand, qui se protone et se décoordine. À la différence de l'approche précédente, la décoordination a lieu sans que le ligand n'ait été séparé du reste du complexe par la rupture d'une liaison covalente ; ainsi ce n'est pas le Fe(DPTACN)$^{2+}$ **6** qui est libéré. Enfin, une molé-

cule d'eau prend place dans la sphère de coordination en remplacement du ligand et la magnétogénèse se produit.

On recherche une base azotée pouvant se coordiner via un motif de type imine.[179] La pyridine possède un pKa de l'ordre de 5 : en conditions physiologiques, seule une très faible proportion est protonée ; par ailleurs, sa basicité est difficilement modulable. Elle ne peut donc pas remplir le rôle de ligand pour notre stratégie. Au contraire, la fonction amidine présente un caractère basique bien plus grand : le pKa est d'environ 12. De plus, l'acylation ou la carbamylation d'une amidine diminue la basicité de façon très importante : le pKa est abaissé de plusieurs unités, jusqu'autour de 6.[195, 196] Il est ainsi possible de changer le caractère basique de l'amidine, et donc sa coordination, en réponse à l'action d'une enzyme.[179] C'est donc cette fonction qui a été retenue comme base azotée.

Le complexe **10** (voir Figure 2.10A) a été synthétisé[197] ; il comporte une amidine coordinant l'ion métallique à l'aide d'un motif de type imine[198] et selon un cycle chélate à 5 membres. L'amidine est carbamylée par un groupement *p*-nitrobenzyle, ce qui permet le déclenchement de l'auto-effondrement par la réduction de la fonction nitro via un réactif réducteur, le dithionite de sodium $Na_2S_2O_4$. Une activation par hydrogénation catalytique est impossible ici car la liaison benzylique y est aussi sensible que le groupement nitro.

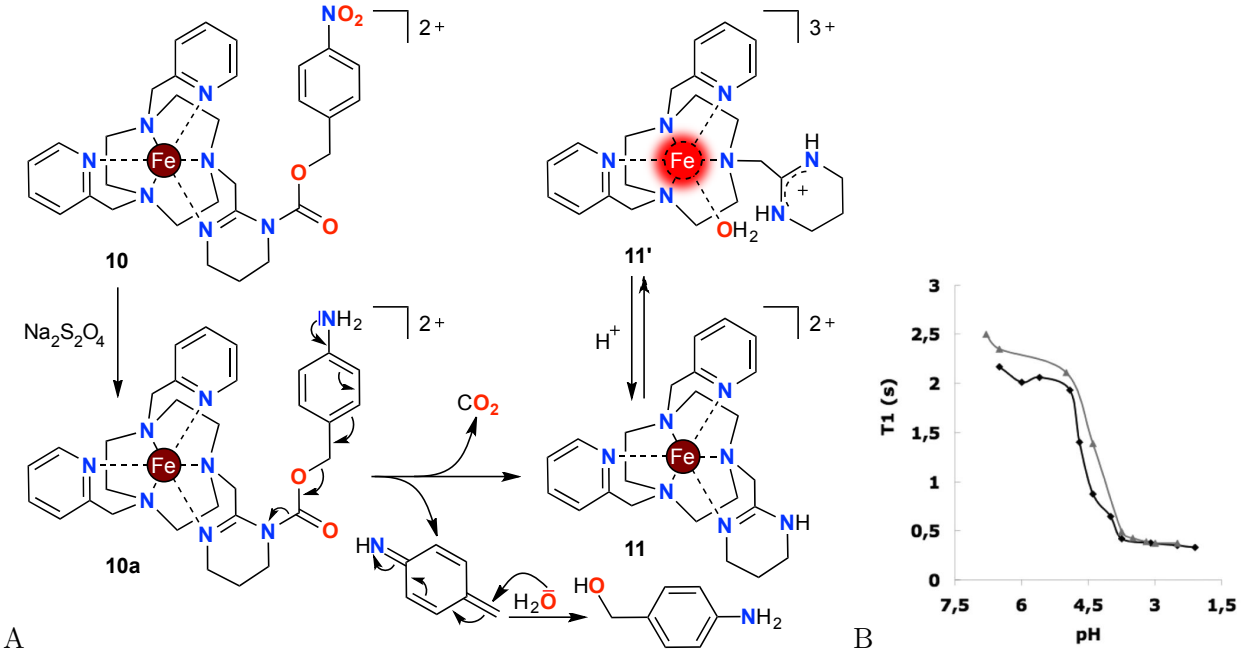


FIGURE 2.10 : A. Mécanisme de fragmentation du complexe **10** et équilibre acido-basique entre **11** et **11'**. B. Evolution du T_1 d'une solution de **11**/**11'** en fonction du pH ; champ magnétique : 11,4 T ; concentration : 4 mM ; température ambiante.[197] ; les deux courbes correspondent à deux expériences indépendantes.

10 est diamagnétique en solution aqueuse : il présente d'un moment magnétique de 0,50 μ_B, mesuré grâce à la méthode d'Evans.[199, 200] L'ajout de $Na_2S_2O_4$ à une solution de **10** tamponnée au pH physiologique est suivie de l'auto-effondrement de l'espaceur éliminant et de la libération de la fonction amidine (Figure 2.10A). Ceci a été observé lors de l'analyse en spectrométrie de masse. Toutefois, aucune magnétogénèse n'est observée. Pour voir apparaître le basculement vers un état paramagnétique, une acidification de la solution vers un pH de 3 ou inférieur est nécessaire.[197] Comme pour les précédentes molécules (voir page 46), ces processus ont été étudiés par plusieurs méthodes d'analyse qui ont donné des résultats convergents (spectroscopie d'absorption UV-visible, mesures du moment magnétique et du T_1 en solution) et ne se produisent pas en l'absence de stimulation chimique.

Le fait que l'amidine de **11** soit déprotonée au pH physiologique et coordinée sur le fer(II) est

étonnant vu que le pKa de cette base est habituellement de l'ordre de 12. Or, il n'est pas anormal que le pKa de l'amidine change considérablement lorsqu'elle peut se coordiner à un cation métallique, qui plus est en formant un cycle chélate à 5 membres. En effet, la protonation de l'amidine est maintenant en compétition avec sa coordination : pour que la protonation ait lieu, il faut dorénavant qu'elle soit thermodynamiquement plus favorable que la coordination. Une concentration de protons plus importante, et donc un pH plus faible, sont requis pour observer la protonation de l'amidine au sein du complexe par rapport à une amidine isolée.

Le pKa de protonation/décoordination a été évalué par la mesure du temps de relaxation longitudinale de solutions de **10** à différents pH (Figure 2.10B). La courbe a l'allure d'une titration pH habituelle ; la valeur de pKa déduite est d'environ 4,5. Ce résultat explique les observations précédentes : au pH physiologique (7,4), une infime partie (environ 1/1000) des complexes est sous une forme paramagnétique. L'acidification vers un pH très inférieur au pKa entraîne le déplacement quantitatif de l'équilibre et la magnétogénèse.

Avec le complexe **10**, contrairement à la molécule **8**, il est nécessaire d'acidifier la solution après l'activation pour faire apparaître un changement de T_1. Cette deuxième étape de "révélation" du signal constitue une grande limitation : il est impossible d'utiliser la molécule **10** dans un contexte *in cellulo* ou plus généralement *in vivo*, car dans ces milieux de pH déterminé aucune variation du signal IRM ne sera détectable. Une activation dans les lysosomes (compartiments cellulaires où le pH peut descendre jusqu'à des valeurs très faibles, de l'ordre de 1) reste en théorie possible, à condition bien sûr que les complexes puissent y pénétrer. De plus, au vu des résultats obtenus avec le complexe **10**, il paraît envisageable d'adapter sa structure pour concevoir une molécule dont le pKa de décoordination serait de l'ordre du pH physiologique, voire supérieur ; dans le milieu biologique, l'équilibre serait alors directement déplacé vers la forme protonée et paramagnétique et aucune acidification ne serait nécessaire pour observer le changement de T_1. Cet objectif sera poursuivi dans le chapitre 5.

Cependant, même si **10** ne convient pas à un usage *in vivo*, une utilisation dans un cadre *in vitro*, où les contraintes de pH sont inexistantes, est tout à fait possible. Par ailleurs, contrairement aux molécules d'architecture Katritzky, il est possible d'adapter facilement la structure de **10** pour concevoir des sondes moléculaires activables par des enzymes, avec un design inspiré de nombreuses molécules doubles pro-médicaments (voir page 25). Cette famille de sondes magnétogènes permet donc la détection et la quantification *in vitro* d'activités enzymatiques d'intérêt, ce qui est un objectif très intéressant, notamment en vue du diagnostic de pathologies. Ce sera l'objet du chapitre 4.

Chapitre 3

Étude de nouveaux complexes adoptant une architecture Katritzky

Dans le chapitre précédent (voir partie 3 page 44), j'ai présenté la molécule **8** et ses caractéristiques très intéressantes en tant que sonde magnétogène. Les spectres d'absorption UV-visible d'une solution de concentration 0,2 mM et les mesures de T_1 d'une solution à 4 mM nous permettent d'estimer le temps de demi-activation à 25 minutes dans ces deux situations (voir Figure 2.7 page 46).[144] Cependant, cette cinétique d'effondrement en conditions aqueuses tamponnées n'est pas très satisfaisante ; de plus, elle ne prend pas en compte la première étape de déclenchement par une enzyme. Or, si un auto-effondrement lent peut être apprécié pour la libération de molécules bioactives, dans le cadre de l'imagerie moléculaire on recherche la cinétique la plus rapide possible (voir page 26). On préférera donc les approches où la coupure enzymatique est l'étape cinétiquement déterminante dans le processus d'activation. Pour cette raison, il est intéressant de développer de nouvelles sondes garantissant une magnétogénèse plus rapide.

La première étude de variations structurales au sein de l'architecture Katritzky avait montré le rôle prépondérant que joue l'azole sur la stabilité des sondes et leur vitesse d'effondrement. En effet, le remplacement dans **8** du triazole par un pyrazole mène au complexe **12** (voir Figure 3.1) qui ne se fragmente pas en solution après hydrogénation catalytique.[144, 190] Au contraire, la molécule **13** comportant un tétrazole s'hydrolyse spontanément dans le milieu aqueux.[144]

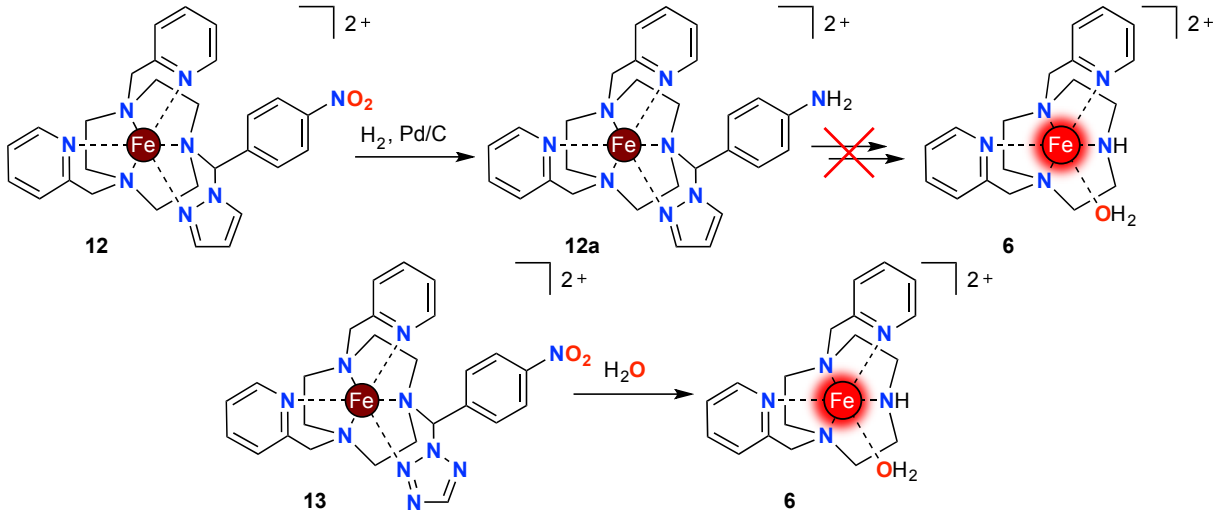


FIGURE 3.1 : Absence de fragmentation de **12** après hydrogénation catalytique, et hydrolyse spontanée de **13**.[144, 190]

Fayçal Touti a alors eu l'idée d'étudier une nouvelle famille de complexes en faisant varier non plus seulement l'azole, mais aussi l'espaceur aromatique.[144] En effet, on a vu précédemment (voir Figure 27 page 26) qu'un cycle furane pouvait être utilisé en tant qu'espaceur éliminant 1,6 ; il en est

de même d'un cycle thiophène.[120] Cependant, le caractère aromatique plus faible de ces hétérocycles comparé à celui du benzène suggère que l'amine issue de la réduction aura un caractère mésomère donneur plus fort et permettra une cinétique d'effondrement plus intéressante. Enfin, les aldéhydes permettant la synthèse de ces nouvelles sondes sont disponibles commercialement, comme l'était le *p*-nitrobenzaldéhyde, ce qui permet une synthèse rapide et efficace.

1 Synthèse des nouveaux complexes

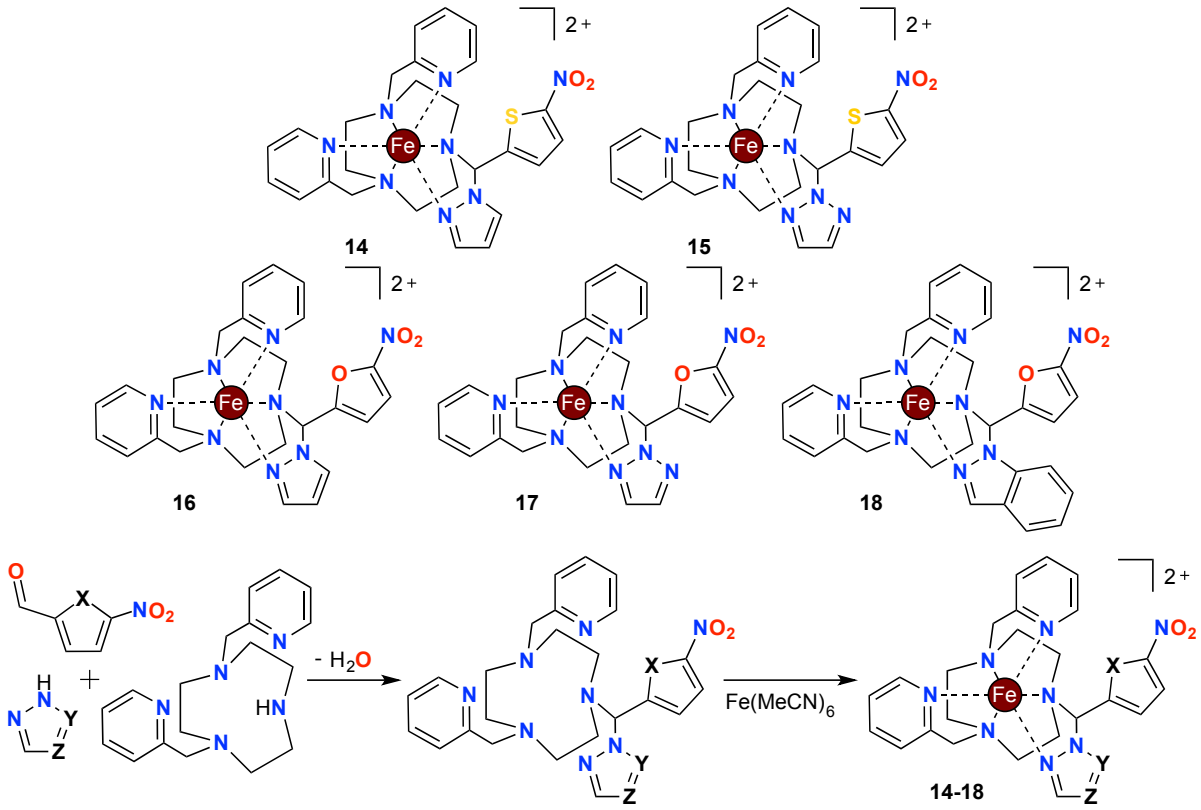
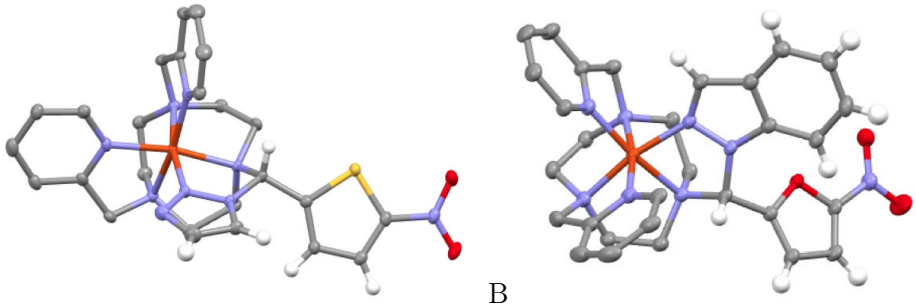


FIGURE 3.2 : Structure et synthèse des complexes **14-18**, basés sur l'architecture Katritzky.[144, 193]

Les complexes **14-18** ont été préparés (voir Figure 3.2).[193] Fayçal Touti a mis au point la méthodologie de synthèse : la réaction de condensation à 3 composantes dite de Katritzky est mise à profit comme précédemment, mais des conditions plus douces suffisent pour obtenir les produits désirés. Pour la première génération de sondes, la condensation était menée à l'aide d'un montage de Dean-Stark dans le benzène à reflux ; ici, l'utilisation de dichlorométhane sec en présence de tamis moléculaire à température ambiante assure une condensation sans dégradation des réactifs ni du produit. La complexation *in situ* du ligand par des sels de fer(II) anhydres[192] mène aux complexes désirés. La purification a lieu par chromatographie en phase inverse, néanmoins elle est plus difficile que pour les molécules précédentes : le remplacement de l'espaceur phényle rend ces nouveaux complexes plus polaires et diminue leur rétention sur la silice greffée. À ce stade, il apparaît que **17** est trop instable en milieu aqueux pour être isolé : l'espaceur furane ne garantit pas un effet mésomère attracteur suffisant du groupement nitro pour stabiliser l'édifice, contrairement à l'espaceur phényle contenu dans **8**. Les autres complexes **14**, **15**, **16** et **18** ont eux été obtenus purs et sous forme monocristalline pour **14**, **15** et **18**. Des analyses élémentaires et de spectrométrie de masse ont confirmé que les molécules obtenues étaient bien celles désirées. Les rendements sur les deux étapes sont de l'ordre de 10%, ce qui est peu dans l'absolu mais comparable aux valeurs obtenues pour la première génération de complexes basés sur l'architecture Katritzky.[190]

2 Étude structurale et des propriétés magnétiques

La diffractométrie par rayons X a permis de résoudre les structures de **15** et de **18** à l'état solide ; elles sont présentées à la Figure 3.3. Il n'a malheureusement pas été possible d'obtenir des monocristaux de **14** de qualité suffisante pour mener l'étude de diffraction. Pour les deux complexes, les structures font apparaître une géométrie quasi-octaédrique des six ligands azotés autour du fer(II) ; les six liaisons fer-azote ont une longueur moyenne de 1,98 Å. Les mêmes observations avaient été faites pour **8**[190] et témoignent d'un comportement diamagnétique à l'état solide ; en effet, les géométries et longueurs de liaison de ces complexes sont similaires à celles rencontrées dans le complexe diamagnétique modèle $Fe(TPTACN)^{2+}$ **5**.[185] À titre de comparaison, le complexe paramagnétique $Fe(DPTACN)^{2+}$ présente lui aussi une géométrie quasi-octaédrique autour de l'ion Fe(II) mais les liaisons fer-azote y sont beaucoup plus longues, de l'ordre de 2,2 Å.[183, 186] Le groupement indazole de **18** adopte une position dans l'espace qui minimise la gène stérique avec le macrocycle et les groupements picolyles (Figure 3.3B).



A B

FIGURE 3.3 : Structures à l'état solide de **15** (A) et de **18** (B) obtenues par diffractométrie par rayons X sur des monocristaux ; les atomes d'hydrogène du macrocycle et des groupements picolyles, les molécules de solvant ainsi que les contre-ions tétrafluoroborate ne sont pas mentionnés pour faciliter la visualisation.[144, 193]

J'ai ensuite étudié les propriétés magnétiques des complexes en solution aqueuse par la mesure du moment magnétique via la méthode d'Evans[199, 200] et par spectroscopie d'absorption UV-visible. Les résultats sont présentés à la Figure 3.4. Tous les complexes présentent un comportement totalement diamagnétique, avec des valeurs de μ_{eff} comprises entre 0,66 et 0,89 μ_B et dans chaque cas une bande de transfert de charge métal-ligand (MLCT, *Metal to Ligand Charge Transfer*) centrée sur la longueur d'onde 400 nm et intense (coefficients d'absorption molaire supérieurs à 5000 $M^{-1}.cm^{-1}$).[184, 190] Cependant, la molécule **15** s'est montrée instable : le spectre d'absorption UV-visible évolue considérablement après deux heures d'incubation à 37°C dans le tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) au pH de 7,4. L'étude par spectrométrie de masse confirme la dégradation spontanée de **15** dans ces conditions. Il semble donc que l'espaceur thiophène, de la même manière que l'espaceur furane au sein de la molécule **17**, ne garantit pas non plus un effet mésomère attracteur suffisant du groupement nitro pour stabiliser ce complexe comportant le 1,2,3-triazole.

3 Étude des propriétés magnétogéniques en solution aqueuse

J'ai mené des essais d'activation de **14**, **16** et **18** pour étudier leurs propriétés magnétogéniques (voir Figure 3.5A). Les trois complexes ont subi sans dommages la réduction du groupement nitro terminal par hydrogénation catalytique pour donner les complexes **14a**, **16a** et **18a**. Malheureusement, ni **14a** ni **18a** ne se fragmentent après deux heures d'incubation à 37°C dans le tampon phosphate au pH de 7,4, comme je l'ai observé à la fois par spectrométrie de masse et mesures d'absorption UV-visible. En ce qui concerne **14**, on retrouve donc une situation similaire à celle du complexe **12a** (Figure 3.1) : le caractère mésomère donneur de la fonction amine n'est pas suffisant pour entraîner le transfert électronique menant au départ du pyrazole. **16a** subit quant à lui une fragmentation : l'utilisation d'un

A

Complexe	μ_{eff}/μ_B
14	0,74
15	0,89
16	0,75
18	0,66
5	0,9
6	5,5

B

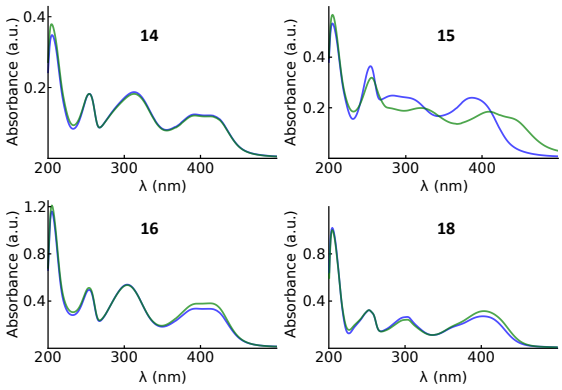
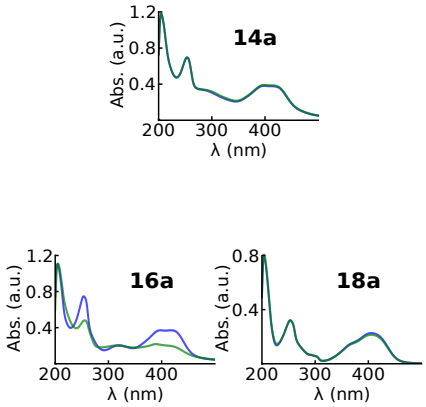


FIGURE 3.4 : Etude des complexes **14**-**16** et **18** en solution aqueuse. A. Moments magnétiques mesurés selon la méthode d'Evans[199, 200] ; solvant : eau distillée ; champ magnétique : 7 T ; température ambiante. B. Spectres d'absorption UV-visible, acquis juste après dissolution (courbes bleues) et après deux heures d'incubation (courbes vertes) ; solvant : PBS (50 mM, pH 7,4) ; concentration : 0,02 mM ; température : 37°C.[193]

espaceur furane semble enfin conférer à l'amine un caractère mésomère donneur suffisant pour que le pyrazole soit expulsé et que la molécule se fragmente en un temps raisonnable.

A



B

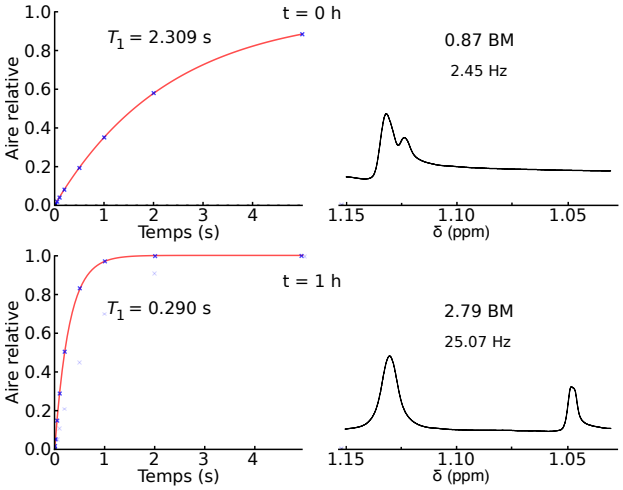


FIGURE 3.5 : A. Spectres d'absorption UV-visible de **14a**, **16a** et **18a**, juste après la réduction (courbes bleues) et après deux heures d'incubation (courbes vertes) ; concentration : 0,02 mM. B. Mesure du temps de relaxation longitudinale (4 mM, à gauche) et du moment magnétique (6 mM, à droite) de solutions de **16a** juste après la réduction (en haut) et après une heure d'incubation (en bas) ; champ magnétique : 7 T. Solvant : PBS ; température : 37°C.[193]

La fragmentation de **16a** (voir Figure 3.6) après son activation par hydrogénation catalytique a été mise en évidence à l'aide des spectroscopies UV-visible et de masse, ainsi que par le suivi du moment magnétique (en considérant la concentration en espèces magnétiques constante) et du temps de relaxation T_1 (Figure 3.5B). La diminution de l'absorption lumineuse au niveau de la bande MLCT, la disparition du pic correspondant à **16a** sur les spectres de masse, l'augmentation du moment magnétique et l'abaissement du T_1 mesurés au champ magnétique de 7 T à l'aide d'un spectromètre RMN vont tous dans le sens de la disparition de **16a** et de la formation d'une espèce paramagnétique. Le temps de demi-fragmentation estimé à partir de la baisse de la bande MLCT est de 8,6 ± 1,9 minutes,

ce qui correspond à un processus trois fois plus rapide que dans le cas de **8**.[144] Le grand caractère mésomère donneur de l'aminofurane permet donc un effondrement très rapide, malgré le fait que le groupement partant soit un pyrazole.

Notre objectif de trouver une sonde magnétogène analogue à **8**, mais dont la cinétique serait plus intéressante, est donc atteint.

4 Étude du mécanisme de fragmentation de 16

La fragmentation de **16a** a été étudiée (Figure 3.6). L'analyse des spectres de masse fait apparaître l'expulsion rapide et quantitative du pyrazole pour former l'intermédiaire de type aza-quinone méthide **16b**. Ceci explique pourquoi l'absorption lumineuse et le temps de relaxation longitudinale diminuent aussi vite : le départ du pyrazole de la sphère de coordination s'accompagne du passage de l'état bas spin à l'état haut spin, qui se traduit directement par la baisse d'intensité de la bande de transfert de charge et par la réduction du temps de relaxation. Une fois **16** converti en **16b**, le spectre d'absorption UV-visible et les propriétés magnétiques ne vont plus évoluer de façon importante ; seuls les spectres de masse vont permettre d'élucider le mécanisme.

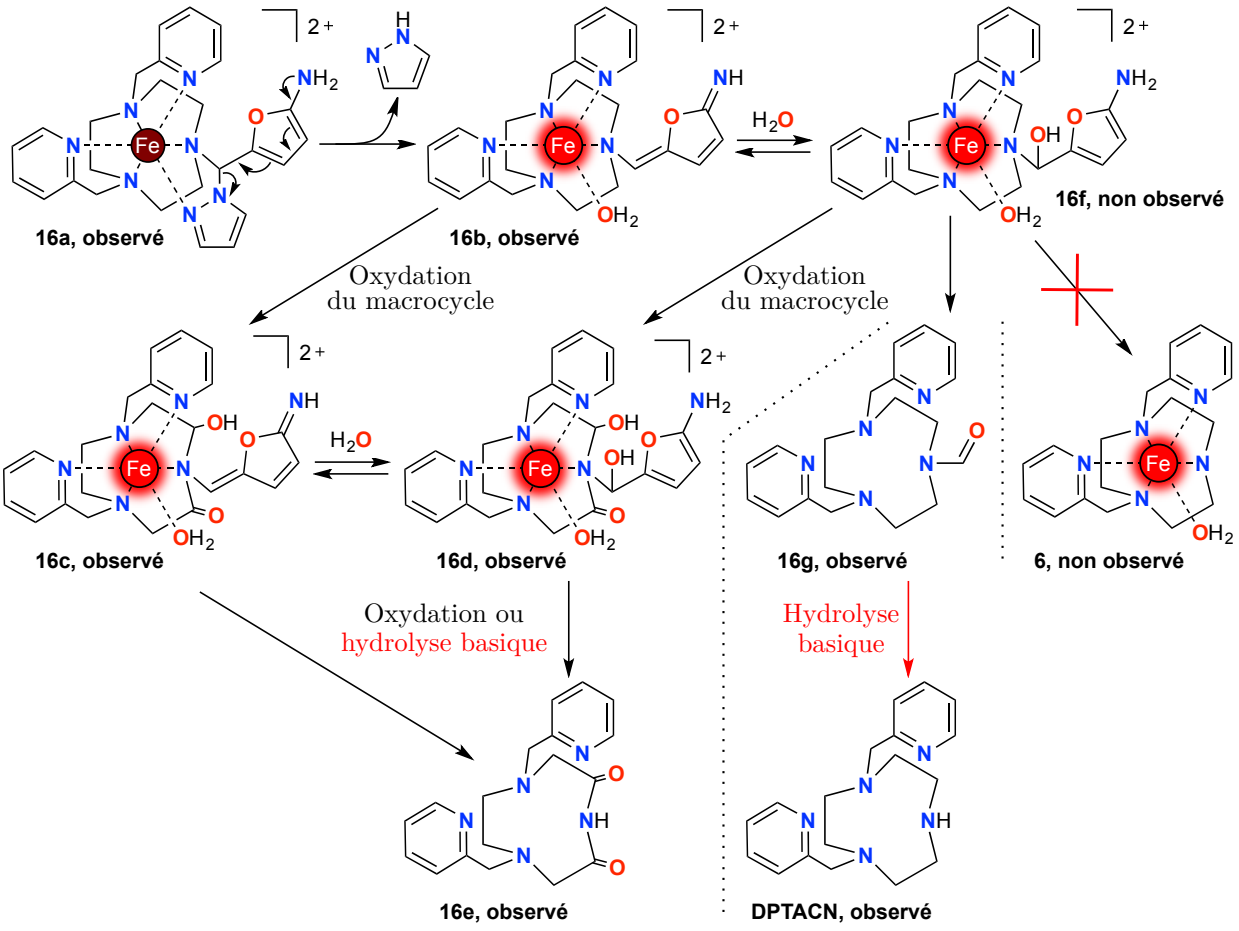


FIGURE 3.6 : Mécanisme supposé d'évolution de **16a**, et espèces produites par une hydrolyse basique finale ; à l'exception de **16f** et **6**, toutes les structures représentées sont celles observées par spectrométrie de masse.

L'évolution de **16b** semble suivre un mécanisme moins simple que celui observé dans le cas de **8b** (Figure 2.6 page 45). L'addition d'une molécule d'eau sur l'aza-quinone méthide pour donner **16f** et l'élimination pour donner **6** et le furfural n'ont pas été observés (voie de droite) ; dans le cas de **8**, même si l'intermédiaire **8c** (voir Figure 2.6 page 45) n'a jamais pu être identifié sur les spectres de masse, le complexe **6** était clairement visible sous la forme d'adduits avec des ions chlorure ou formiate.[190]

On peut par contre voir le ligand 16g, formé par l'élimination de l'aminofurane de **16f** et le départ du cation métallique (voie du milieu). Par ailleurs, on remarque des pics correspondant à des formes oxydées de **16b** et **16f**, où l'aromaticité de l'aza-quinone méthide est restaurée ou non (voie de gauche) ; les structures postulées sont celles de **16c** et **16d**. On observe enfin le ligand **16e**, fruit de l'oxydation des deux complexes précédents.

Il faut tout de même garder à l'esprit que la spectrométrie de masse ne fait pas apparaître toutes les espèces présentes en solution ; en particulier, malgré de longs temps d'optimisation, j'ai rarement pu voir des pics attribuables à des complexes de fer(III), ce qui peut être dû à leur instabilité dans la source d'ionisation ou à la sensibilité insuffisante de l'analyseur. D'autres voies d'évolution du complexe **16a** sont donc possibles.

L'oxydation de complexes de fer(II) macrocycliques a déjà été rapportée ; le fer(II) dans un complexe à sphère de coordination ouverte est en effet facilement oxydable en fer(III), par le dioxygène dissous notamment.[201] Deux processus complémentaires et éventuellement simultanés prennent place : le retour du fer à l'état d'oxydation +II peut se faire via une oxydation directe du ligand (il s'agit d'une C-H activation non sélective) ou via la génération de radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène ou ROS, par exemple l'hydroxyle $HO^{\cdot}$ ou l'ion superoxyde $O_2^{\cdot -}$) qui eux-mêmes vont oxyder le ligand.[202, 203] Il est possible de discriminer entre l'un et l'autre de ces mécanismes en privant artificiellement le milieu de dioxygène et de radicaux, par l'étude en conditions dégazées et en présence d'enzymes dégradant ces espèces réactives comme la superoxyde dismutase.[202] J'ai choisi de ne pas réaliser cette étude ici, aussi je ne présenterai pas de mécanisme pour l'oxydation de **16b**. Toutefois, la génération de stress oxydant par le complexe serait une source de toxicité importante et réduirait grandement sa capacité à être utilisé *in vivo*.[201]

L'oxydation de **16b** peut aussi se produire sur le noyau furane, en particulier après sa réaromatisation ; j'ai supposé qu'en raison du rôle du fer(II) dans le processus d'oxydation, celle-ci avait lieu sur le macrocycle car il est plus proche. De plus, la présence de **16e** en solution indique une oxydation certaine du macrocycle. Les spectroscopies RMN et de masse ne permettent pas de savoir précisément sur quelle position du macrocycle l'oxydation a lieu, néanmoins elle se produit très probablement sur les carbones en α de l'amine portant le furane car ces positions sont les plus activées. On remarque aussi que l'oxydation de **16c** et **16d** pour donner la fonction imide entraîne manifestement une contrainte sur le macrocycle qui rend la chélation du fer impossible, provoquant alors le départ du centre métallique ; en l'absence de ce dernier, la liaison avec le furane s'hydrolyse et **16e** est libéré. Le même phénomène se produit lors de l'élimination du furane au sein de **16f** : la substitution de l'amine secondaire par une fonction formyle empêche la coordination de l'ion fer(II) et mène à la formation du ligand **16g**

Quelles que soient toutes les espèces oxydées issues de **16b**, la présence certaine de **16c** et **16d** en solution peut expliquer pourquoi la diminution de la bande MLCT n'est pas aussi marquée que dans le cas de **8**. En effet, au sein de ces complexes, le furane reste lié au macrocycle et peut donc se coordiner au cation métallique, menant à un complexe bas spin d'absorption importante.

L'oxydation de **16b** (voie de gauche) et la formation de **16g** (voie du milieu) se produisent, cependant on peut se demander s'il s'agit des seuls mécanismes d'évolution de **16b**. Pour cela, le brut de la réaction a été hydrolysé de façon artificielle par l'ajout d'une solution de soude ; les seuls produits observés par spectrométrie de masse sont alors les ligands **16e** et DPTACN. Si l'origine de **16e** est connue, le DPTACN ne peut provenir que de la fragmentation de **16b** sans oxydation du macrocycle, via **16g** par exemple. Ainsi, si **16b** donne lieu à d'autres espèces que celles observées, ces molécules, invisibles par spectrométrie de masse, sont hydrolysées en milieu basique pour donner **16e** et le DPTACN.

On peut finalement se demander pourquoi l'oxydation des complexes et l'élimination du furane en lieu et place de celle de **6** ont lieu dans le cas de **16**, alors qu'elles n'avaient pas été observées pour **8**. La raison peut être que le furane promeut l'oxydation du macrocycle et est un bien meilleur nucléofuge que **6**. En effet, la substitution de l'amine secondaire par un furane et la coordination de ce dernier sur le centre métallique peuvent favoriser l'adoption de conformations plus réactives ; de plus, le furane est

connu pour être un très bon électrophile.

5 Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, j'ai présenté les résultats obtenus pour cette deuxième génération de complexes basés sur une architecture Katritzky. Cinq nouveaux complexes ont été préparés, selon une méthodologie originale ; sur ces cinq dérivés, seuls quatre ont pu être isolés, dont trois ont montré une stabilité suffisante pour être utilisés en milieu aqueux. Au final, seule une molécule, **16**, présente les qualités attendues de stabilité en présence du groupement nitro déclencheur et de fragmentation rapide une fois ce déclencheur réduit par hydrogénation catalytique. Ce complexe s'effondre très rapidement une fois activé, et notamment plus vite que **8**, ce qui était l'objectif de cette étude. Cependant, le mécanisme de fragmentation de **16** est assez complexe et fait apparaître une oxydation du macrocycle en parallèle de l'élimination du furane. En plus d'être à l'origine d'une réponse magnétogénique moins marquée que dans les exemples précédents, ce phénomène pose la question de la toxicité d'un tel complexe et de sa compatibilité avec le milieu biologique.

Si l'on fait le bilan de tous les complexes basés sur une architecture Katritzky qui ont été préparés et étudiés, on peut constater que les propriétés de stabilité des complexes initiaux (**8**, **12**, **14**-**18** parmi d'autres) et d'auto-effondrement des molécules réduites sont très dépendantes à la fois de l'azole et de l'espaceur éliminant utilisé. Ainsi, un même azole dans deux complexes différents peut mener à une molécule stable ou à une espèce qui s'hydrolyse spontanément. De la même manière, un espaceur peut montrer tout un éventail de comportements selon l'azole auquel il sera associé, allant d'une espèce initiale instable à un produit de réduction qui ne se fragmente pas. De plus, le changement de déclencheur s'accompagne d'une perte de stabilité (cas de la molécule **9**, voir Figure 2.9 page 47). Même si la majorité de ces comportements a pu être expliquée, la conception de sondes magnétogènes basées sur une architecture Katritzky oblige donc à prendre en compte de nombreux paramètres et à préparer et tester plusieurs déclinaisons, dans l'espoir que l'une d'entre elles aura les propriétés de stabilité et de magnétogénèse désirées. Cette approche empirique n'est clairement pas la plus simple pour une production efficace de résultats d'imagerie moléculaire. Dans la suite, l'équipe privilégiera la conception et l'emploi d'autres plateformes plus versatiles pour parvenir plus rapidement et plus fiablement à des sondes utilisables dans le milieu biologique.

Enfin, on peut toujours envisager d'appliquer la sonde magnétogène **16** pour visualiser les cellules humaines hypoxiques. Ces cellules qui souffrent d'un apport en dioxygène très réduit par rapport à la moyenne sont souvent retrouvées dans les tumeurs, où la vascularisation anarchique peut conduire à des zones peu irriguées et donc "asphyxiées".[204] Au sein de celles-ci, les enzymes de la famille des réductases sont surexprimées, et parmi elles la nitroréductase, qui comme son nom l'indique catalyse la réduction d'un groupement nitro en hydroxylamine puis en amine. Le déclencheur 2-nitrofurane est très adapté au ciblage de cette enzyme : des pro-médicaments et des sondes fluorogènes contiennent cette unité aromatique et ont montré une bonne réponse *in vitro* et *in cellulo* dans les millieux privés de dioxygène.[204–208] Le complexe **16** devrait donc convenir à cet objectif ; il est même possible que les conditions très réductrices des cellules hypoxiques préviennent toute oxydation de la molécule et permettent d'observer une réponse magnétogénique plus intéressante que celle mise en évidence lors de notre étude *in vitro*.

Chapitre 4

Nouveaux complexes comportant une amidine pour l'étude *in vitro* d'activités enzymatiques

Une des deux stratégies de conception de sondes magnétogènes que j'ai présentées consiste à profiter de la protonation d'un ligand pour ouvrir la sphère de coordination et changer d'état de spin (voir page 47). À ce titre, le complexe diamagnétique **10** contenant une amidine avait démontré des propriétés intéressantes : après réduction de son groupement nitro déclencheur par le dithionite de sodium, la molécule s'effondre pour libérer l'espèce **11** qui, à la faveur d'une protonation en milieu acide, se transforme en **11'** paramagnétique (Figure 2.10A).[197] Comme je l'avais noté, de tels complexes ne peuvent pas être employés pour l'imagerie moléculaire *in vivo*, mais leur utilisation pour la détection et la quantification *in vitro* d'activités enzymatiques reste tout à fait possible. L'adaptation de **10** pour préparer des sondes moléculaires ciblant des enzymes d'intérêt devrait nous permettre d'atteindre cet objectif.

Dans le passé, l'équipe a conçu des sondes fluorogènes et magnétogènes pour des enzymes dites modèles : leucine aminopeptidase,[145, 209] pénicilline G amidase[190, 210] et β-galactosidase.[209, 211] En plus d'appartenir à trois familles différentes (peptidases, amidases et glycosidases), ces enzymes clivent toutes un substrat simple, ce qui permet une synthèse plus facile de sondes moléculaires spécifiques ; c'est la raison principale pour laquelle nous nous y intéressons en premier lieu. Ainsi, les complexes **19**, **20** et **21** (voir Figure 4.1) seront mes molécules cibles dans ce projet. Je présenterai tout d'abord leur synthèse et l'étude des propriétés magnétogéniques que j'en ai faites.

Ces molécules sont destinées à la détection *in vitro* d'activités enzymatiques en vue d'une application diagnostique. Or, les équipements utilisés couramment dans le domaine médical fonctionnent, dans un souci de coûts réduits et de plus grande maniabilité, à de bas voire très bas champs magnétiques par rapport à ceux employés dans les laboratoires de chimie, et avec lesquels les sondes magnétogènes ont été caractérisées jusqu'à présent. Par exemple, il est courant de voir dans les hôpitaux des dispositifs basés sur des aimants permanents, dont le champ magnétique généré est inférieur à 1 T, alors qu'en recherche sont utilisés en majorité des aimants supraconducteurs beaucoup plus puissants mais aussi d'entretien bien plus délicat. Il est donc pertinent d'étudier le comportement de nos complexes en présence de champs magnétiques moins intenses afin de vérifier que leur comportement est similaire. Pour cela, j'ai réalisé des mesures de relaxivité à bas champs à l'Institut Nanosciences et Cryogénie (INAC) sur le site du Commissariat aux Énergies Alternatives (CEA) de Grenoble, avec l'aide du docteur Pascal Fries de l'équipe de Marinella Mazzanti. Je présenterai ces résultats brièvement.

Une fois assurés que le comportement de nos sondes magnétogènes était satisfaisant dans des conditions de champ magnétique peu intense, il était possible de réaliser les premiers essais de détection enzymatique *in vitro*. L'équipe collabore depuis plusieurs années avec le laboratoire CREATIS de l'INSA de Lyon, et en particulier avec le docteur Olivier Beuf, pour réaliser les images IRM utiles à la

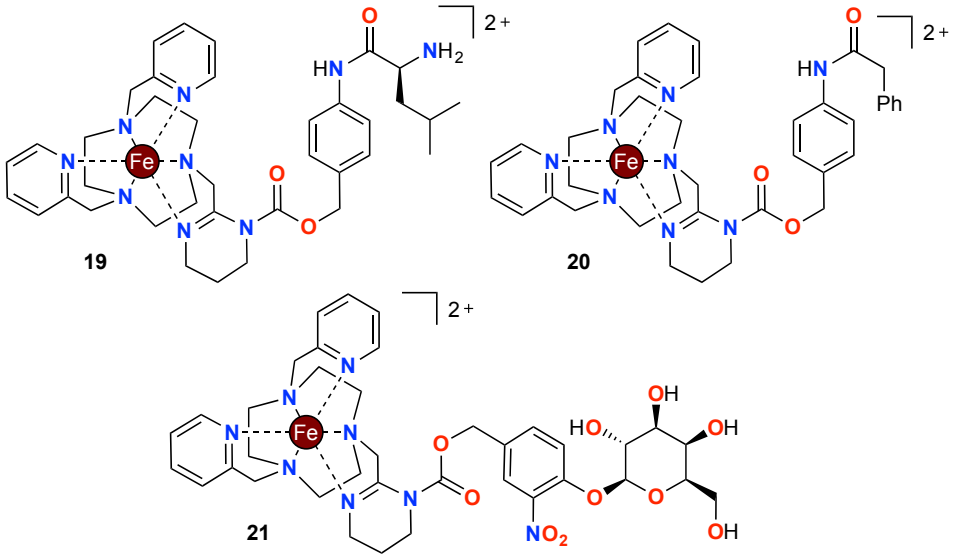


FIGURE 4.1 : Cibles moléculaires : complexes **19**, **20** et **21** sensibles respectivement à la leucine aminopeptidase, à la pénicilline G amidase et à la β-galactosidase.

caractérisation de nos complexes grâce à leur équipement dédié au petit animal.[144, 183, 190, 212] C'est donc tout naturellement vers eux que nous nous sommes tournés en premier lieu. Ils ont conçu un dispositif permettant l'imagerie et la mesure du temps de relaxation longitudinale de solutions dans de petits volumes (de l'ordre de la cinquantaine de microlitres). Après avoir exposé l'intérêt et les enjeux du diagnostic médical assisté par résonance magnétique et les approches décrites dans la littérature, je présenterai ce nouvel appareil et les résultats qu'il nous a permis d'acquérir, ainsi que les limites de cette première tentative.

Enfin, nous avons pu initier récemment une collaboration avec deux équipes allemandes de premier plan : le groupe du docteur Bernhard Blümich de la Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH) d'Aix-la-Chapelle, spécialiste de la conception de micro-aimants,[213, 214] et l'équipe du professeur Jan Korvink basée au Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), renommée dans la spectrométrie RMN pour des micro-volumes.[215–217] Je présenterai brièvement les prémices de ce projet que je trouve extrêmement prometteur.

1 Synthèse des complexes

La préparation de la molécule modèle **10** avait été accomplie grâce à la complexation du ligand correspondant, qui lui-même résultait de l'assemblage de trois synthons : le macrocycle DPTACN, le chlorhydrate de la 2-chlorométhyl-1,4,5,6-tétrahydropyrimidine **22** (unité comportant la fonction amidine) et le chloroformiate de *p*-nitrobenzyle.[197] Deux séquences d'association de ces trois parties avaient été testées avec succès (voir Figure 4.2) : dans un cas, **22** est utilisé directement pour alkyler le DPTACN et donner **23**, puis l'amidine est carbamylée à l'aide du chloroformiate. Dans l'autre, **22** est carbamylé pour donner un nouveau synthon qui peut alkyler le macrocycle. Ces deux stratégies présentent chacune des avantages et des inconvénients :

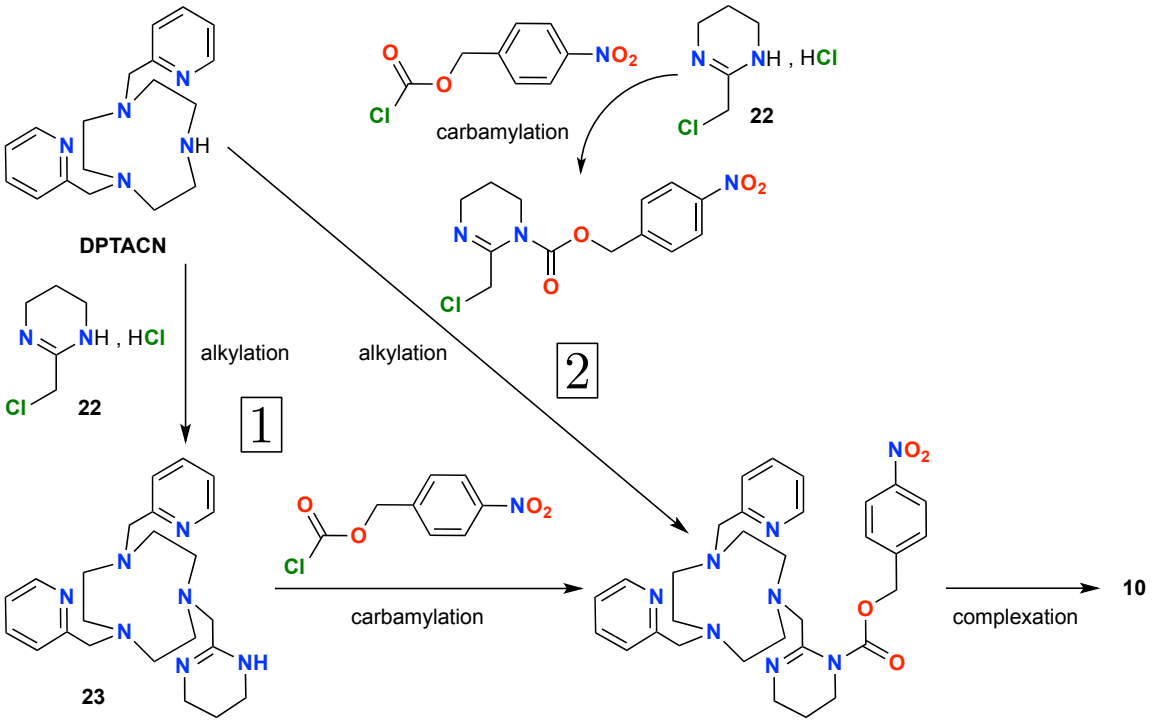


FIGURE 4.2 : Différentes voies de synthèse du complexe **10**.[144, 197]

— Dans le premier cas, la fonction amidine est présente sous une forme déprotonée pendant un temps important (l'alkylation dure une nuit entière). Or, les amidines sous forme déprotonée présentent une forte affinité pour le dioxyde de carbone ; une fois carbamylée par le CO_2, une unité amidine n'est plus capable de réagir avec le chloroformiate. Le travail en conditions très pauvres en CO_2 est donc indispensable pour garantir un rendement suffisant.

— Dans la deuxième séquence, le synthon portant l'amidine carbamylée est très sensible à l'hydrolyse, alors que ni **22** ni le ligand final ne le sont.[144] Un milieu très anhydre est donc requis pour obtenir la molécule souhaitée, notamment lors de l'alkylation de ce synthon qui dure aussi une nuit entière. Néanmoins, la carbamylation de **22** étant très rapide, la sensibilité vis à vis du CO_2 ne pose pas de problèmes.

De meilleurs rendements avaient été obtenus via la seconde voie de synthèse. De plus, dans le premier cas, un large excès de chloroformiate était utilisé pour tenter de déplacer le dioxyde de carbone ; or, si le chloroformiate de *p*-nitrobenzyle est un réactif commercial, j'utiliserai ici des synthons que j'aurai préalablement préparés. Afin de réduire l'effort de synthèse et d'économiser les réactifs, j'ai donc retenu la deuxième séquence.

Je vais maintenant présenter la synthèse des trois parties composant les ligands menant à **19**, **20** et **21**. Au sujet de la molécule **22**, je me contenterai de préciser qu'elle se prépare selon une méthodologie en deux étapes mise au point par Fayçal Touti et déjà publiée[197] ; il est à noter que la première

étape requiert la production et l'utilisation immédiate de chlorure d'hydrogène gazeux, ce qui pose des problèmes de toxicité et d'adaptabilité à grande échelle. Par ailleurs, **22** se conserve sous vide pour éviter sa réaction avec l'eau et le dioxyde de carbone. Je ne parlerai donc dans la suite que de la synthèse du DPTACN et des synthons avec lesquels **22** a été carbamylé.

1.1 Synthèse du DPTACN

Le DPTACN est la plateforme de toutes nos sondes magnétogènes, mais il s'agit déjà d'une molécule assez complexe. Vue notre nécessité de disposer de quantités relativement grandes de ce macrocycle substitué de façon dissymétrique, l'identification d'une voie de synthèse efficace est indispensable. En effet, l'obtention régulière de plusieurs grammes de DPTACN est requise pour plusieurs raisons :

— La sensibilité très réduite de l'IRM nous oblige à travailler à des concentrations finales millimolaires ; compte tenu des volumes considérés, chaque essai de magnétogénèse consomme environ un ou deux milligrammes de sonde. Il faut aussi ajouter les quantités nécessaires aux analyses complémentaires (mesures de moment magnétique, analyses élémentaires, etc...)

— L'utilisation des sondes sous forme microcristalline est requise pour bénéficier d'espèces réellement diamagnétiques ; il s'agit en effet du seul moyen de s'affranchir de la pollution par des sels métalliques paramagnétiques. Même si la cristallisation est souvent superflue de nos jours en chimie organique, elle est au contraire toujours indispensable en chimie inorganique. Cependant, ce processus n'est que rarement quantitatif.

— Les tentatives de cristallisation ont lieu sur les sondes finales, produits de nombreuses étapes de synthèse qui elles-mêmes ne sont pas quantitatives. Si cette limitation est moins prégnante pour les sondes basées sur une architecture Katritzky car la synthèse est convergente, les autres complexes sont davantage préparés de manière linéaire et les rendements à partir du DPTACN sont plus faibles.

L'équipe a donc cherché une voie de synthèse efficace du DPTACN. Plusieurs approches sont rapportées dans la littérature ; toutes impliquent une dissymétrisation du TACN, avec des rendements réduits.[183, 218] Compte tenu des quantités de DPTACN que l'on désire obtenir, nos besoins en TACN sont plus conséquents encore ; le prix élevé de ce macrocycle (le gramme de trichlorhydrate de TACN coûte environ 100 euros) nous oblige à le préparer nous-mêmes à grande échelle. Via un protocole suivant la voie traditionnelle de Richman et Atkins (voir Figure 4.3),[219] 50 grammes de TACN, 3 HCl peuvent être obtenus rapidement (en deux semaines) avec un rendement global de 43%.

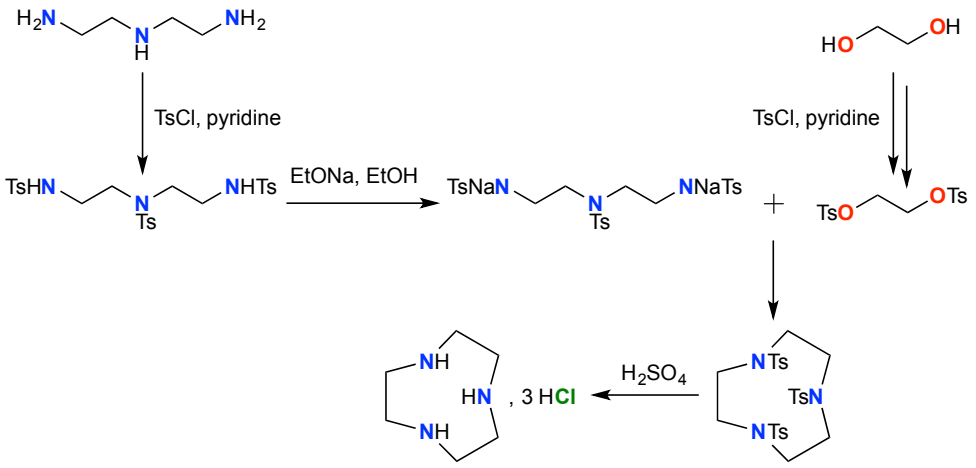


FIGURE 4.3 : Synthèse du TACN, 3 HCl selon la méthodologie de Richman et Atkins.[219]

La dissymétrisation peut ensuite être réalisée de trois manières (voir Figure 4.4) :

— La formation en deux étapes du *N,N',N"*-orthoamide du TACN, suivie par une première puis une deuxième alkylation avec le chlorhydrate du chlorure de picolyle, et enfin l'hydrolyse de la

fonction formyle pour donner le DPTACN (5 étapes).[183]

— La di-protection sélective du TACN à l'aide de réactifs spécifiques comme le Boc-ON (2-(*t*-butyloxycarbonyloxyimino)-2-phénylacétonitrile) suivie par la protection orthogonale de la troisième fonction amine, puis la déprotection des deux premières amines, leur alkylation et enfin la déprotection de la dernière amine (5 étapes).

— L'alkylation directe du TACN à l'aide du chlorhydrate du chlorure de picolyle pour donner un mélange purifiable de TPTACN, DPTACN et MPTACN (une seule étape).[218]

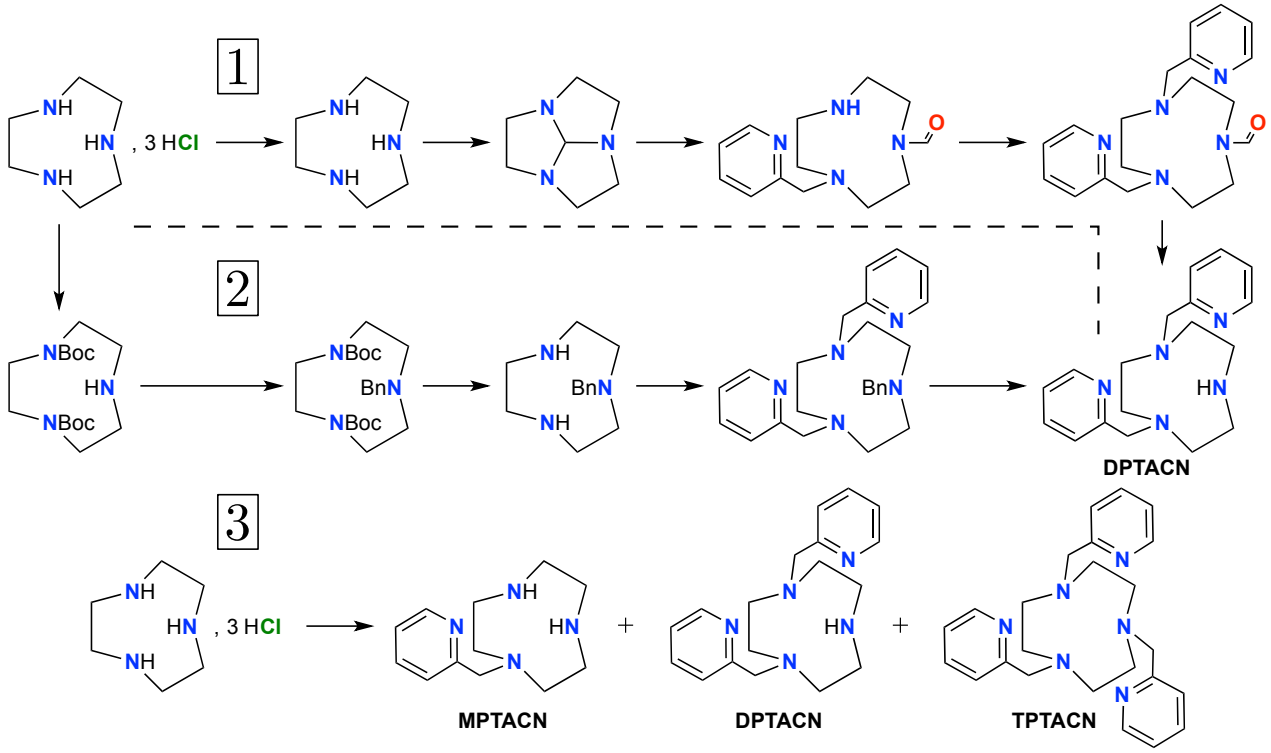


FIGURE 4.4 : Différentes voies de synthèse du DPTACN envisagées.

La première voie a été utilisée dans l'équipe au cours des premières années ; le protocole est long mais le rendement de chaque étape est bon et les purifications très faciles. L'alkylation directe du TACN (la troisième approche) avait été décrite comme une réaction de rendement faible et difficilement reproductible[218] ; le docteur Yevgen Berezhanskyy a réalisé un important travail d'optimisation qui permet maintenant l'obtention du DPTACN avec des rendements corrects (autour de 40%) et de façon très reproductible. Les paramètres clés sont une addition très lente (sur une vingtaine d'heures) d'une base carbonatée sur une solution contenant le TACN, 3 HCl et le chlorhydrate du chlorure de picolyle en proportions stœchiométriques, une réaction menée dans le solvant eau à 60°C, et une séparation efficace des différents produits d'alkylation par chromatographie sur une colonne d'alumine basique de taille calibrée. Bien qu'un temps d'adaptation soit nécessaire pour maîtriser toutes les subtilités de cette réaction (ce que j'ai pu observer avec mes deux premiers stagiaires, Kévin Ollivier et Siffedine Aouina), elle permet d'obtenir rapidement (en deux jours) des quantités raisonnables de DPTACN (un gramme environ), avec une bonne pureté ; c'est cette voie que j'ai intensivement utilisée.

Afin de rendre plus efficace encore la synthèse de cette plateforme cruciale, une méthodologie originale a été développée dans l'équipe par le docteur Guillaume Gros (voir Figure 4.5).[220] Inspirée des travaux menés à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) de Dijon,[221, 222] cette stratégie consiste à s'affranchir du passage par le TACN pour former directement le DPTACN à partir de précurseurs simples. Cette méthode a montré des résultats très prometteurs pour la préparation de TACN substitués par des fonctions benzyles, cependant le remplacement par des groupements picolyles complexifie la synthèse, au point que dans mes mains, la dernière étape de déprotection de la fonction *p*-méthoxybenzyle s'est montrée très délicate. Pour cette raison, j'ai

conservé à regrets la route plus classique de dialkylation du TACN.

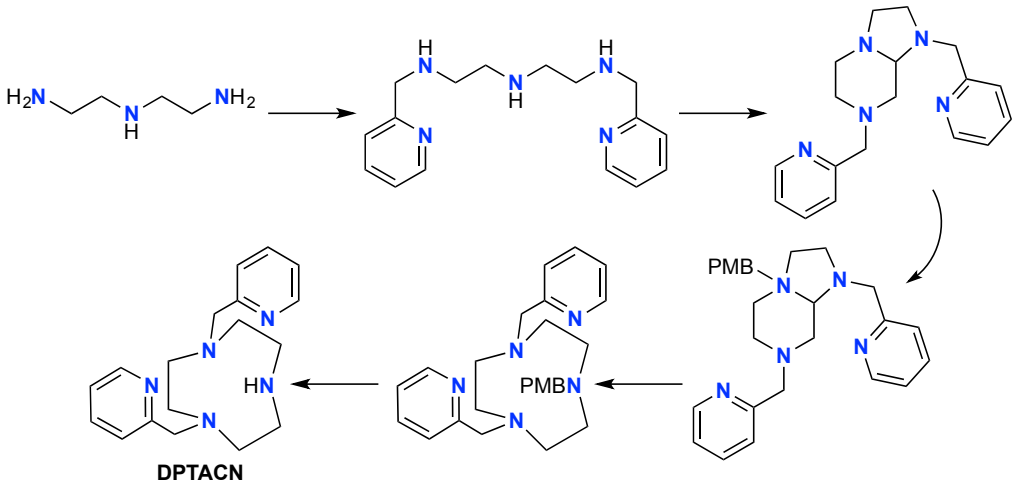


FIGURE 4.5 : Synthèse alternative du DPTACN développée dans l'équipe.[220]

1.2 Synthèse des unités carbamylantes

Pour chacune des sondes **19**, **20** et **21**, il est nécessaire de carbamyler le synthon **22** avec une unité contenant l'espaceur éliminant et le déclencheur, ce dernier étant si besoin sous une forme protégée. Les molécules servant à former des carbamates à partir d'amines sont des intermédiaires généralement obtenus à partir d'alcools ; selon leur nature, ils peuvent ou non être isolés.[223] Les plus connus sont les chloroformiates, dont j'ai déjà donné un exemple, mais leur préparation exige l'emploi de dérivés du phosgène, connus pour leur grande toxicité. Des stratégies plus sûres ont été développées, où le nucléofuge n'est pas un chlorure.

Les alcools **24**, **25** et **26** ont été préparés (voir Figure 4.6). Pour les deux premiers, aucune difficulté n'est à relever ; la formation de la liaison peptidique à partir de l'alcool *p*-aminobenzylique a été réalisée sans soucis. Le rendement précisé pour la synthèse de **24** est celui obtenu en présence du groupement protecteur allyloxycarbonyle (Alloc) ; en effet, plusieurs groupes ont été testés et l'usage de cette fonction s'est révélé indispensable. Je reviendrai sur cet aspect plus tard (voir partie 1.3.3 page 68). Dans le cas de **26**, l'utilisation de groupements Alloc a imposé le changement des groupements protecteurs du sucre, selon une méthodologie inspirée de la littérature.[224, 225] Néanmoins, le travail important réalisé pour l'obtention de **26** m'a poussé à laisser le complexe cible **21** de côté pour me consacrer en priorité aux complexes **19** et **20** plus faciles à préparer.

J'ai ensuite essayé d'activer les alcools **24** et **25** sous forme de chloroformiate à l'aide de triphosgène. Malgré l'essai de différentes conditions opératoires, je n'ai pas pu obtenir l'espèce désirée. Ce comportement a déjà été décrit[223] : lorsque la fonction benzylique est suffisamment activée, une réaction intramoléculaire est favorisée et mène à l'évolution du chloroformiate pour former un chlorure benzylique (voir Figure 4.7). J'ai donc choisi d'activer les alcools sous forme de carbonates de *p*-nitrophényle. Cette approche présente en effet de nombreux avantages :

— La conversion des alcools est réalisée à l'aide du chloroformiate de *p*-nitrophényle, un réactif commercial disponible sous forme solide, stable sur des temps longs et beaucoup moins toxique que le triphosgène, ce qui le rend d'usage beaucoup plus facile.[223]

— L'intermédiaire carbonate de *p*-nitrophényle peut être obtenu avec de bons rendements (parfois même quasi-quantitatifs) et est peu sensible à l'hydrolyse ; il peut donc être préparé en quantités importantes, isolé par chromatographie sur colonne de silice et conservé plusieurs mois au réfrigérateur.

— L'intermédiaire possède tout de même un bon caractère électrophile vis à vis des amines.

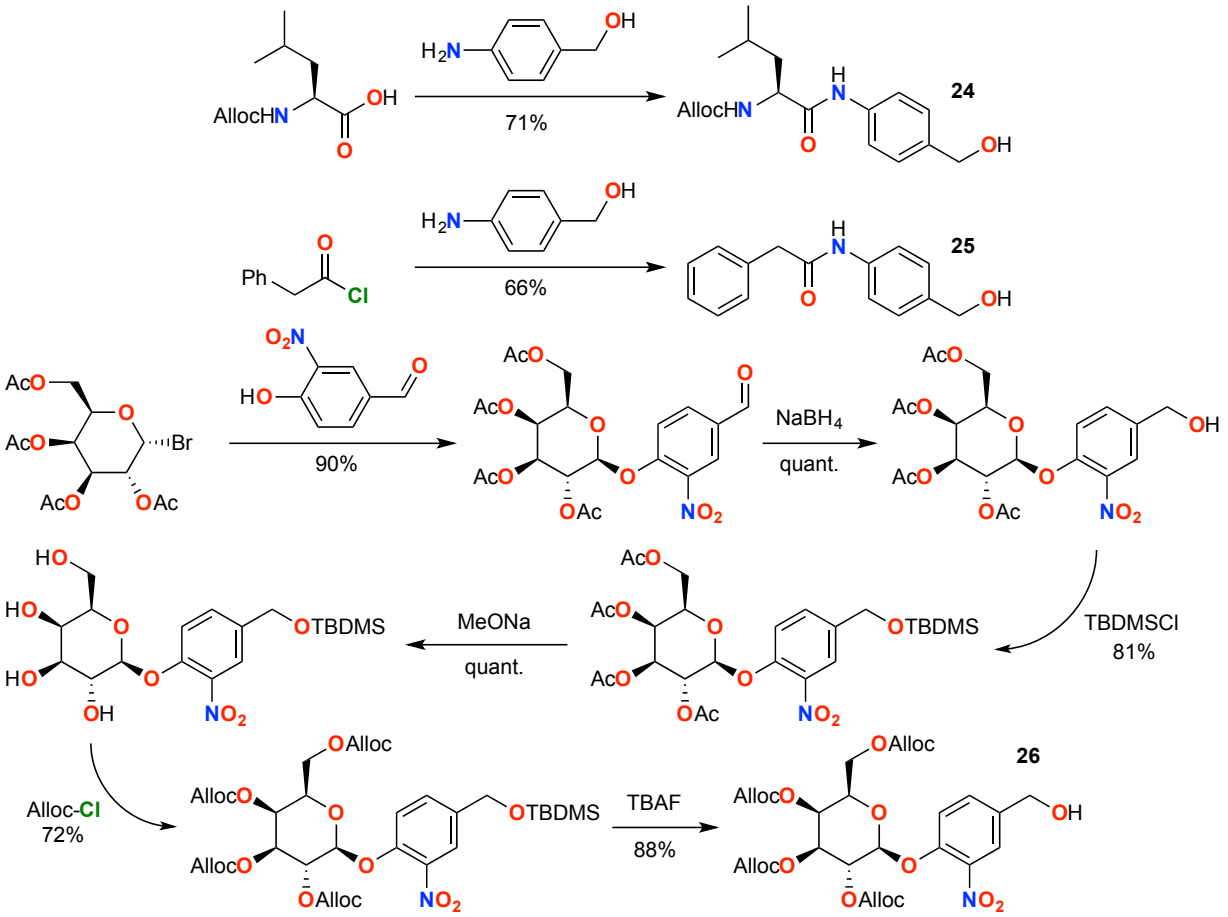


FIGURE 4.6 : Voie de synthèse des alcools **24**, **25** et **26**.

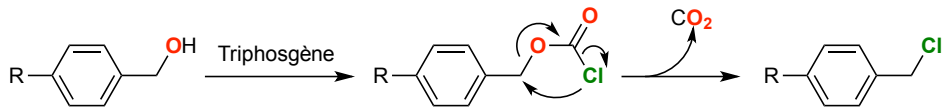


FIGURE 4.7 : Réaction intramoléculaire d'un chloroformiate benzylique pour former un chlorure.

— La carbamylation s'accompagne du départ d'un anion *p*-nitrophénolate, ce qui permet un suivi aisé de la réaction de deux manières. D'abord qualitativement, car cet anion absorbe dans le bleu, ce qui confère au milieu une couleur jaune très vive qui s'intensifie au fur et à mesure que la réaction progresse. Mais un suivi quantitatif peut aussi être réalisé par spectrométrie RMN sur le brut réactionnel : le déplacement chimique des protons phénoliques évolue de façon importante entre la forme carbonate et la forme phénolate libre, de plus dans une région du spectre où aucun autre pic ne se superpose, ce qui permet par intégration d'estimer facilement les proportions relatives de réactif et de produit.

J'ai ainsi pu obtenir les synthons **27** et **28** de façon efficace à partir des alcools correspondants (voir Figure 4.8).

1.3 Assemblage des synthons et obtention des complexes 19 et 20

1.3.1 Construction des ligands

La carbamylation de **22** a été réalisée à l'aide des molécules **27** et **28** et de *N*,*N'*-diisopropyléthylamine (DIPEA, *Hünig's base* ; voir Figure 4.9). À la fois la coloration du milieu réactionnel en jaune et le déplacement des pics sur le spectre RMN attestent d'une conversion très rapide. Cependant, la consommation totale des synthons carbamylants (qui ici sont nos espèces limitantes, en raison du temps plus important nécessaire à leur synthèse et des quantités de matière plus réduites dont on dispose)

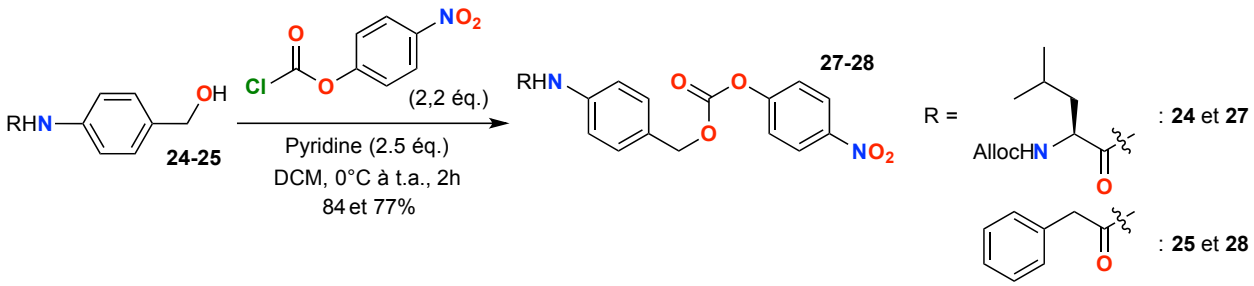


FIGURE 4.8 : Voie de synthèse des carbonates activés **27** et **28**.

n'est atteinte qu'après l'ajout de deux équivalents de **22** et d'un excès de DIPEA ; une température plus élevée ou un temps de réaction plus long n'ont pas d'effets. Ce comportement a été observé de façon répétée et peut avoir deux origines :

— Une fraction du synthon **22** peut avoir réagi avec le dioxyde de carbone et ne pas être disponible pour la carbamylation désirée. Toutefois, la conservation sous vide, le chauffage préalable à l'utilisation en temps que réactif (la formation de carbonate par captation du CO_2 est réversible à haute température pour les amines)[226] et surtout l'emploi d'une molécule fraîchement préparée permet de s'assurer que la dégradation est minime, même s'il est malheureusement impossible de le vérifier : aucune indication claire de la réaction de **22** avec le dioxyde de carbone n'a été observée en spectroscopie RMN, de masse ou infrarouge.

— L'électrophilie du carbonate de *p*-nitrophényle n'est pas suffisante au vu de la faible nucléophilie de l'amidine déprotonée par la DIPEA ; un excès de carbonate est donc nécessaire afin de déplacer l'équilibre dans le sens de la formation du carbamate. Cette hypothèse me paraît la plus probable.

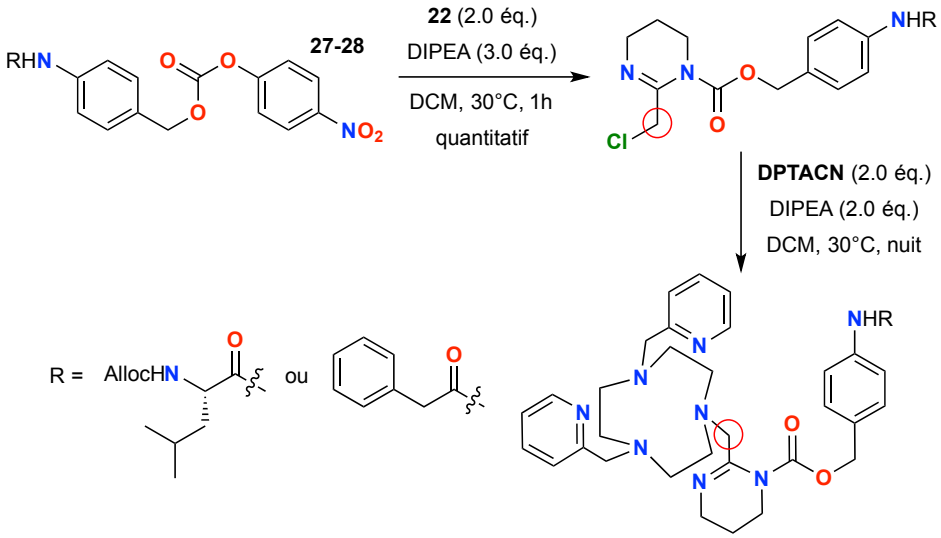


FIGURE 4.9 : Voie de synthèse des ligands issus de **27** et **28**.

Une fois **22** carbamylé, son alkylation sur le DPTACN a été réalisée. Elle doit s'effectuer *in situ* : les amidines carbamylées ne sont pas isolables car elles sont très sensibles à l'hydrolyse. Cependant, alors que l'étape de carbamylation avait pu être suivie facilement par des méthodes spectroscopiques, l'avancement de cette réaction est beaucoup plus difficile à apprécier. En effet, afin de ne pas diminuer le rendement, le DPTACN est ajouté en quantités stœchiométriques par rapport à la quantité totale de synthon **22** utilisée, ce qui représente donc deux équivalents par rapport aux carbonates **27** et **28** ; afin de garantir un excès de base, une quantité de DIPEA est aussi rajoutée. Comme le milieu réactionnel comporte aussi des ions *p*-nitrophénolates issus de la carbamylation, un grand nombre d'espèces se trouvent donc en solution, ce qui rend l'analyse difficile :

— Sur le spectre RMN, les protons du groupement méthylène portant l'amidine carbamylée (en-

tourés en rouge sur la Figure 4.9) sont difficilement identifiables, et ne semblent pas subir un déplacement important entre les formes non-alkylées et la forme alkylées. Les autres protons mis en jeu dans l'alkylation sont pour certains impossibles à attribuer clairement (c'est notamment le cas de ceux du macrocycle TACN) et pour les autres demeurent trop peu impactés par l'alkylation.

— L'analyse par spectrométrie de masse était très prometteuse : elle nous permet souvent d'identifier facilement nos espèces macrocycliques dont le spectre RMN est délicat à interpréter en raison des nombreuses conformations adoptées en solution. Cependant, les spectres de masse se révèlent relativement inutiles : sont identifiables le DPTACN et **23** (Figure 4.2), qui semblent s'ioniser de façon très efficace, mais aucun pic pouvant correspondre au ligand désiré ou à un produit de fragmentation n'a pu être observé. Cette molécule peut avoir des difficultés à s'ioniser, ou souffrir d'une instabilité trop importante dans la source. La seule information que l'on peut tirer de ces spectres est donc la disparition du DPTACN et l'apparition de **23** au cours du temps, ce qui permet d'intuiter par analogie l'avancement de l'alkylation de l'amidine carbamylée, mais de façon incertaine.

— Enfin, comme on l'observe habituellement avec ces molécules très polaires, il est peu évident de suivre la réaction par chromatographie sur couche mince (CCM) : la migration est très difficile sur le gel de silice et s'effectue de manière similaire pour les différentes espèces sur l'alumine traitée.

A l'issue d'un temps de réaction raisonnable (une nuit en conditions anhydres et à la température de 30°C), j'ai tenté d'isoler les ligands pour réaliser leur complexation dans des conditions favorables. Toutefois, je ne suis pas parvenu à réaliser la purification : manifestement, le ligand cible n'est pas identifiable de façon certaine en solution (voir plus haut) et/ou n'est pas stable lors d'une extraction ou d'une chromatographie sur colonne. Devant ces échecs, j'ai donc décidé de ne pas réaliser l'isolation des ligands pour réaliser l'étape de complexation directement avec le brut réactionnel.

1.3.2 Complexation du milieu réactionnel et purification

Après un changement de solvant en faveur de l'acétonitrile sec, capable à la fois de dissoudre tous les réactifs et de stabiliser les complexes de coordination, et un dégazage du milieu, j'ai ajouté plusieurs équivalents de sels de fer(II), sous forme de tétrafluoroborate de fer(II) hexahydraté. Ici encore, il est difficile de suivre la réaction : alors que l'analyse par RMN est impossible du fait de la présence d'espèces paramagnétiques et que les espèces en jeu sont retenues sur la ligne de base des CCM, la spectrométrie de masse ne permet d'observer que la complexation de **23** (aucun pic correspondant à **29** ou à un de ses adduits ou produits de dégradation n'a pu être observé).

J'ai alors réalisé la purification du très complexe brut réactionnel par chromatographie en phase inverse. Après avoir éliminé de grandes quantités d'espèces diverses peu retenues sur la colonne (sels de fer, molécules organiques, complexes, etc...), j'ai pu à ma grande joie identifier dans certaines fractions les complexes **20** et **29** (voir Figure 4.10). Néanmoins, **20** présente une rétention assez faible sur la silice greffée : il sera difficile de l'isoler efficacement par cette voie. L'optimisation de protocoles de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pourrait permettre de préparer **20** de façon suffisamment pure pour réaliser la suite de l'étude dans de bonnes conditions ; j'ai choisi de ne pas réaliser ce travail car à ce moment l'appareil était très utilisé, mais cela reste un objectif intéressant pour l'équipe.

Le complexe **29** est quant à lui mieux retenu : la présence des unités apolaires terminales que sont la chaîne latérale isobutyle de la leucine et la chaîne allyle du groupement protecteur assure manifestement une interaction hydrophobe plus efficace que l'unité benzyle de **20**. La purification de **29** étant (légèrement) plus aisée, j'ai décidé de concentrer mes efforts sur la synthèse ce ce complexe. J'ai pu en obtenir jusqu'à 95 mg en une tentative, ce qui représente un rendement sur les trois dernières étapes (carbamylation, alkylation et complexation) de l'ordre de 10%. Cette valeur relativement faible est tout de même proche de celles rapportées pour la synthèse des complexes Katritzky.[190, 193]

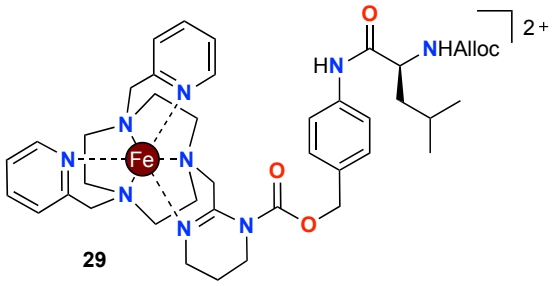


FIGURE 4.10 : Structure du complexe **29**, version protégée par un groupement Alloc de **19**.

1.3.3 Déprotection finale et obtention de 19

Il restait toutefois à mener la déprotection de **29** pour libérer l'amine terminale de la leucine et permettre sa reconnaissance par la leucine aminopeptidase.

L'identification d'un groupement protecteur convenable n'a pas été simple. En effet, mes différents essais ont montré que les complexes comportant une amidine carbamylée possèdent plusieurs fonctions très sensibles à de nombreuses conditions classiques de déprotection des fonctions amines :

— Le complexe de fer(II) en lui-même ne résiste pas à des conditions acides trop prononcées nécessaires pour le clivage d'un groupement *t*-butyloxycarbonyle (Boc), notamment avec l'emploi de l'acide trifluoroacétique.

— Le lien carbamate entre l'amidine et l'espaceur est très électrophile et peut être détruit en milieu basique, y compris dans les solvants organiques, par exemple lors de l'utilisation de pipéridine dans le diméthylformamide (DMF) pour déprotéger une unité 9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) ou de carbonate de potassium dans le méthanol pour retirer un trifluoroacétyle (Tfa).

— La liaison benzylique au sein de l'espaceur est sensible à l'hydrogénation catalytique, la méthode de choix pour libérer une amine d'un groupe benzyloxycarbonyle (Cbz).

De plus, il est malheureusement impossible de s'affranchir de cette déprotection au niveau du complexe. Etant donné que le ligand n'est que difficilement identifiable par les méthodes d'analyse dont on dispose, la déprotection ne peut être réalisée sur cet intermédiaire car il serait impossible de la suivre. Un clivage plus en amont n'est pas envisageable non plus car la carbamylation et l'alkylation pourraient alors avoir lieu sur l'amine primaire non protégée.

Je me suis tourné vers le groupement Alloc. Cette unité dont l'installation est facile (le chloroformiate correspondant est commercial et d'usage facile) permet des conditions de clivage très douces : un complexe de palladium(0) introduit en quantité catalytique permet l'activation électrophile de la chaîne allyle via sa complexation sur le métal ; un nucléophile peut alors attaquer la chaîne carbonée et libérer l'ion carbamate, qui produit spontanément du dioxyde de carbone et l'amine (voir Figure 4.11A).[227] Le nucléophile joue le rôle d'*allyl scavenger* ; ce peut être une amine, un ion carboxylate, un hydrure (via l'utilisation de l'hydrure de tributylétain par exemple), ou une espèce beaucoup plus sélective comme l'acide 1,3-diméthylbarbiturique (Figure 4.11B).[228, 229] Ce diimide agit comme un acide très faible (pKa $\simeq$ 8) : sous sa forme déprotonée, il est suffisamment nucléophile pour attaquer la chaîne allyle coordinée et s'alkyler, mais il est inoffensif vis à vis des électrophiles courants. De plus, son utilisation en excès permet d'éviter l'allylation de l'amine tout juste déprotégée.

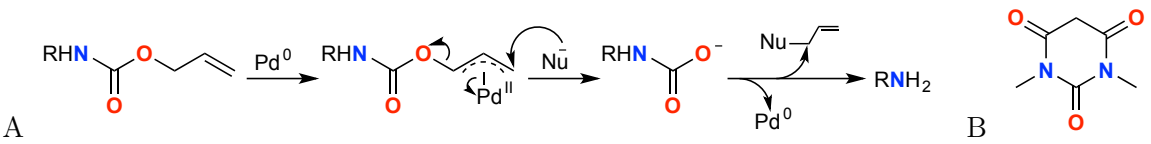


FIGURE 4.11 : A. Mécanisme de déprotection du groupement Alloc à l'aide de palladium en quantité catalytique et d'un nucléophile en excès. B. Structure de l'acide 1,3-diméthylbarbiturique.

L'utilisation de plusieurs équivalents d'acide 1,3-diméthylbarbiturique et d'une quantité catalytique de tétrakis(triphénylphosphine) de palladium(0) dans un solvant anhydre et dégazé a permis la déprotection de **29** pour donner le complexe cible **19**. La réaction peut être suivie par spectrométrie de masse en utilisant une méthode optimisée où les conditions d'ionisation sont particulièrement douces. Dans mes mains, elle s'est révélée assez capricieuse : elle semble mieux fonctionner avec de "grandes" quantités (de l'ordre de 10 mg) et la quantité du complexe de palladium ajoutée ne doit être ni trop faible (pour que la réaction progresse), ni trop grande (j'assiste alors à la dégradation du complexe, probablement par remplacement du fer(II) par le palladium ou à cause de réactions parasites). De plus, la quantité d'*allyl scavenger* utilisée doit être bien choisie. Néanmoins, je n'ai pas observé la formation d'amine allylée, signe que les conditions opératoires sont bonnes et que la difficulté de la déprotection est due à la complexité et à la grande sensibilité de **19** et **29** (voir plus haut). Enfin, la purification du milieu réactionnel peut être réalisée par une nouvelle chromatographie en phase inverse et la cible **19** est obtenue, avec toutefois des rendements toujours faibles sur cette dernière étape (entre 0 et 30%). Disposant de seulement une dizaine de milligrammes de produit, je ne suis malheureusement pas parvenu à en obtenir des monocristaux.

Au cours de cette partie, j'ai pu montrer que la synthèse des complexes comportant une fonction amidine et destinés à la détection *in vitro* d'activités enzymatiques était assez complexe, notamment si on la compare à la préparation des molécules précédemment étudiées dans l'équipe (**8** et **10**, **14** à **18**). En particulier, l'identification difficile voire impossible des produits de réaction par les méthodes spectroscopiques dont on dispose au laboratoire (RMN, spectrométrie de masse), la nécessité systématique de conditions anhydres et dégazées pour ne pas subir de dégradation et le caractère laborieux des purifications rendent la synthèse très hasardeuse. Toutefois, j'ai pu isoler des quantités suffisantes du complexe **19** pour réaliser une étude partielle des propriétés magnétogéniques.

2 Étude du caractère magnétogénique du complexe 19

2.1 Confirmation de la structure et propriétés magnétiques en solution

Avant de vérifier le caractère magnétogénique de **19**, il est important de s'assurer que l'on dispose bien de la molécule désirée. L'échantillon obtenu a été analysé à l'aide des spectrométries RMN et de masse. Le spectre RMN présente des pics assez élargis, notamment dans la région où les protons du macrocycle sont habituellement observés. Ce comportement est observé pour tous les complexes de fer(II) diamagnétiques dont le ligand est basé sur le TACN[183, 190, 193, 197] : il est principalement dû aux multiples conformations que le macrocycle adopte en solution, ainsi qu'aux effets du léger paramagnétisme résiduel (un faible moment magnétique subsiste en solution, comme je l'ai déjà précisé à la page 42). Toutefois, il est possible d'identifier de nombreux pics caractéristiques, notamment dans les régions de hauts déplacements chimiques (protons aromatiques de l'espaceur et des pyridines) et de bas ppm (chaîne isobutyle de la leucine). De plus, le spectre est contenu dans l'intervalle habituel 0 - 10 ppm, ce qui est un indice fort que **19** est diamagnétique. Quant au spectre de masse, il est peu bruité et montre un certain nombre d'adduits qui attestent de la présence de la structure attendue ; il fait bien apparaître la fragilité de la liaison benzylique et du carbamate que j'avais déjà notée (voir page 68).

Le moment magnétique de **19** en solution aqueuse a été mesuré grâce à la méthode d'Evans[199, 200] et vaut 1,01 μ_B. Les échantillons microcristallins de complexes diamagnétiques étudiés auparavant, comme **5**,[184] **10**[197] ou **15**[193] présentaient des valeurs légèrement inférieures, de l'ordre de 0,9 μ_B ; le faible écart peut s'expliquer par le caractère non cristallin de **19** et la présence d'impuretés paramagnétiques telles que des sels de fer résiduels. Le temps de relaxation longitudinale d'une solution de **19** à la concentration de 4 mM est de 2,86 s, ce qui correspond à une valeur de relaxivité r_1 très faible d'environ 0,006 $mM^{-1}.s^{-1}$, proche de celles mesurées habituellement pour nos composés diamagnétiques.[144] Enfin, le spectre d'absorption UV-visible de **19** réalisé dans l'eau pure à température ambiante fait apparaître une bande MLCT similaire (en termes d'allure, de coefficient d'extinction molaire et de longueur d'onde d'absorption maximale) à celle des autres complexes bas spin, et en particulier de **10**. Toutes ces indications prouvent que **19** est un complexe bas spin de fer(II).

Le remplacement du groupement nitro de **10** par une amine acylée n'a donc aucun effet sur les propriétés magnétiques du complexe. Même s'il est vrai que ces propriétés sont uniquement dues au complexe macrocyclique de fer(II) qui est inchangé entre les deux molécules, cela confirme que **10** constitue une plateforme pour la conception de sondes magnétogènes et que la seule limitation pour la conception de sondes enzymatiques est la capacité à synthétiser ces molécules complexes de manière efficace. Une grande variété de déclencheurs, donc de substrats enzymatiques, peut *a priori* être utilisé, ce qui constitue un avantage conséquent par rapport à la stratégie Katritzky (voir page 47).

2.2 Essais d'activation enzymatique de 19

J'ai ensuite tenté l'activation de **19** à l'aide de leucine aminopeptidase purifiée pour vérifier le caractère magnétogénique de ce complexe. La réaction a été suivie par spectrométrie de masse : la molécule **19**, stable dans le PBS à 37°C pendant plusieurs heures, est hydrolysée pour donner l'aniline **10a**, qui elle-même subit l'auto-effondrement de l'espaceur pour donner **11** de la même manière qu'il avait été rapporté pour **10** (voir page 48). Tous les intermédiaires observables, c'est-à-dire tous les produits indiqués sur la Figure 4.12 à l'exception du dioxyde de carbone, ont pu être identifiés. Toutefois, **10b** n'est pas directement reconnaissable : comme précédemment, une décarboxylation se produit dans la source d'ionisation, y compris dans les conditions douces que l'on utilise, et ce complexe apparaît comme le complexe **11**. Quant à l'étude en spectroscopie d'absorption UV-visible, elle a montré une lente évolution de la bande MLCT.

La réduction importante du temps de relaxation longitudinale d'une solution millimolaire de sonde après l'addition de l'enzyme et l'acidification du milieu constitue la preuve réelle du caractère magnétogénique. J'ai pu réaliser deux tentatives de magnétogénèse. Pour suivre la conversion enzymatique,

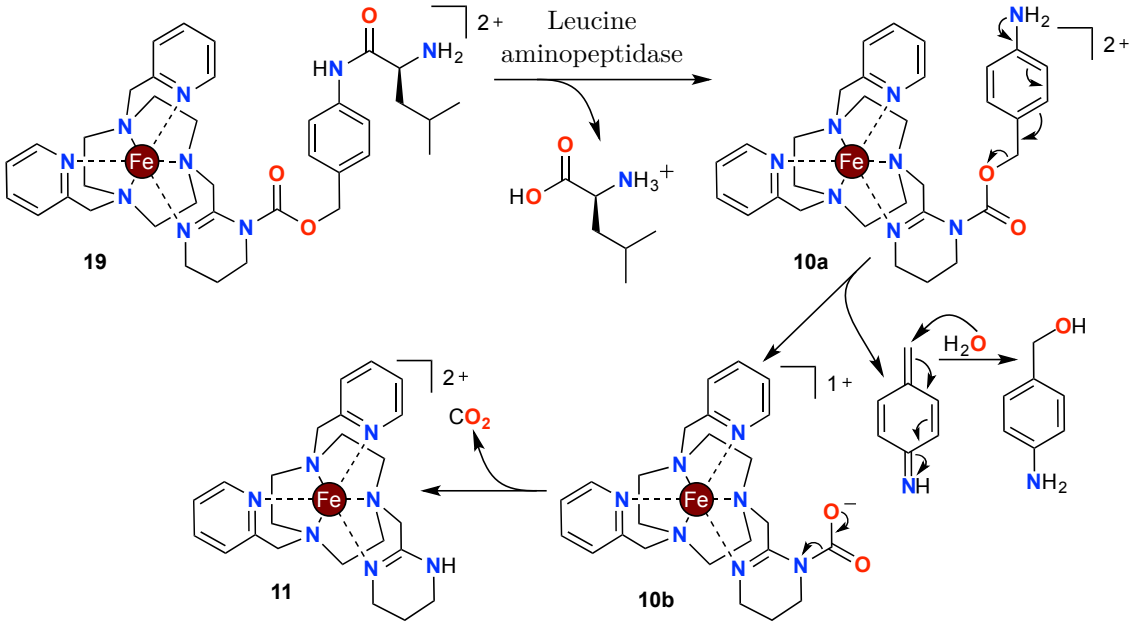


FIGURE 4.12 : Mécanisme d'activation de **19**, supposé d'après l'analyse par spectrométrie de masse.

j'ai effectué à intervalles réguliers des prises de petits volumes de milieu réactionnel que j'ai ensuite diluées dans l'eau pour acquérir le spectre de masse (une concentration de 4 mM est beaucoup trop importante pour la méthode d'analyse très sensible qu'est la spectrométrie de masse). Toutefois, l'acidification du milieu, réalisée après avoir observé la fin de l'hydrolyse et laissé un délai permettant la décarboxylation, n'a entraîné aucune évolution claire du T_1 ou de la couleur de la solution (la magnétogénèse s'accompagne toujours d'une décoloration importante de l'orange foncé au jaune clair due à la baisse d'intensité de la bande MLCT).

L'explication la plus simple est que la décarboxylation n'était pas achevée lorsque j'ai acidifié le milieu réactionnel. Or, l'élimination du dioxyde de carbone de l'amidine est très sensible au pH et à la température : dans le cas de **10**, alors que ce phénomène est rapide à un pH neutre (6,5) et à température ambiante, il nécessite un chauffage à 100°C long de plus d'une heure lorsque le milieu possède un pH acide de 3.[144, 197] Il est possible que l'utilisation du PBS en lieu et place de l'eau distillée employée pour les essais de **10** ralentisse la décarboxylation : les ions sodium et chlorure, présents en grande proportion par rapport à la sonde (137 mM contre 4 mM), peuvent stabiliser **10b** ; de plus, des comportements magnétogéniques très différents selon le tampon pH utilisé (phosphate, citrate, HEPES, etc...) ont déjà été rapportés pour d'autres complexes, dont **9** (voir page 47).

Afin de rationaliser ces comportements et d'identifier des conditions (délai avant l'acidification du milieu, volume d'acide concentré à ajouter pour observer un basculement de pH et de T_1 suffisant, voire éventuellement l'emploi d'un tampon particulier) permettant de réaliser la magnétogénèse de façon certaine et reproductible, de nouveaux essais de magnétogénèse sont nécessaires. Toutefois, ces tentatives requièrent chacune une quantité importante de sonde (environ 1,5 milligrammes). J'ai essayé plusieurs fois de reproduire la synthèse de **19** que j'ai décrite plus haut, afin de disposer d'une masse suffisante pour mener tous les essais et, dans l'idéal, obtenir des monocristaux très purs de **19** ; cependant, aucune tentative n'a abouti. J'ai décidé de remiser cet objectif pour le moment et d'entreprendre d'autres projets d'apparence moins hasardeuse, mais je reste convaincu que l'objectif de concevoir des sondes magnétogènes basées sur une fonction amidine et sensibles à une activité enzymatique est atteignable.

3 Étude de la relaxivité des complexes de fer(II) en présence de bas champs magnétiques

Les études des propriétés magnétiques de nos complexes ont été jusqu'à maintenant réalisées à l'aide des spectromètres RMN dont nous disposons au laboratoire : ces équipements génèrent un champ magnétique très important, 7 T pour l'un (ce qui correspond à une fréquence de Larmor pour les protons de 300 MHz) et 11,4 T pour l'autre (500 MHz). Nous envisageons d'utiliser nos sondes magnétogènes basées sur une amidine pour réaliser le diagnostic *in vitro* de pathologies ; or, les équipements assurant cette fonction profitent généralement d'un champ magnétique réduit, inférieur à 1 T (soit une fréquence de Larmor inférieure à 40 MHz). Afin de nous assurer que nos molécules ont aussi des propriétés magnétiques intéressantes dans ces conditions, et d'approfondir par la même occasion nos connaissances sur ces complexes (la littérature ne comporte, à ma connaissance, aucune étude de relaxivité T_1 concernant les complexes de coordination de fer(II)), nous avons donc décidé d'étudier les propriétés de relaxation de nos sondes dans des conditions de bas champ magnétique. Etant donné que nous ne disposons pas de l'équipement nécessaire au laboratoire, Jens Hasserodt m'a proposé de contacter le docteur Pascal Fries, chercheur au CEA sur le site de Grenoble, pour réaliser les mesures dans ses locaux. C'est donc avec un grand plaisir que j'ai pu me rendre le temps de deux après-midi à l'lNAC, au cœur du foisonnant Polygone Scientifique de la capitale des Alpes.

La mesure de la relaxivité pour de faibles champs magnétiques nécessite notamment un équipement spécial appelé relaxomètre en champ cyclique. Elle permet d'obtenir le profil de dispersion de la résonance magnétique nucléaire (*Nuclear Magnetic Resonance Dispersion profile*, abrégé en *NMRD profile* ou profil NMRD), qui consiste en le tracé de la relaxivité pour différentes intensités de champ. Ce profil permet de comprendre les phénomènes de relaxation mis en œuvre et de concevoir des stratégies pour optimiser ces processus et *in fine* augmenter la relaxivité.[149, 230] Avec Pascal Fries, nous avons acquis le profil de deux complexes modèles : le $Fe(TPTACN)^{2+}$ **5**, notre référence de complexe diamagnétique, et la molécule **30** (voir Figure 4.14A), complexe paramagnétique analogue du $Fe(DPTACN)^{2+}$ **6** et issu des travaux de la docteure Jinping Wang.[231] Alors que le premier est l'archétype d'une sonde magnétogène à l'état non activé, le deuxième possède des propriétés de relaxation *a priori* similaires aux sondes transformées par action enzymatique. Dans un premier temps, je présenterai brièvement le principe de ces mesures de relaxivité, puis j'exposerai les résultats que j'ai obtenus et les analyserai succinctement.

3.1 Relaxométrie en champ cyclique

Toutes les mesures de temps de relaxation longitudinale que j'ai mentionnées jusqu'à maintenant ont été réalisées grâce à une séquence d'inversion-récupération (voir annexe A) en utilisant un spectromètre RMN dont le champ magnétique est constant dans le temps. Si cette méthode convient parfaitement pour des champs magnétiques supérieurs à 0,5 T, elle donne de très mauvais résultats si elle est utilisée pour des champs plus faibles.[232] Ceci est dû à un problème de sensibilité de détection. En effet, la valeur absolue de la magnétisation μ_{tot} (voir page 8) est proportionnelle à l'intensité du champ : dans des champs peu intenses, μ_{tot} sera petite et le signal électrique issu de la précession après basculement dans le plan transverse sera de faible valeur et difficilement détectable. Il sera donc délicat, après la réalisation de plusieurs séquences d'inversion-récupération avec différents délais τ, d'extraire la valeur de T_1 de façon fiable. Pour mesurer le temps de relaxation longitudinale dans des conditions de champ faible, il est nécessaire d'adopter une autre stratégie.

La relaxométrie en champ cyclique permet de contourner cette limite de faible magnétisation en augmentant artificiellement μ_{tot}.[232, 233] La mesure ne s'effectue plus sous un champ magnétique constant : au contraire, l'échantillon est soumis successivement à trois champs d'intensités différentes, ce qui forme un cycle (voir Figure 4.13). Pour générer de tels champs pouvant changer rapidement, on emploie habituellement un électroaimant épaulé par un système de refroidissement performant.

L'échantillon est d'abord soumis à un champ magnétique intense (il vaut ici 0,8 T), appelé champ

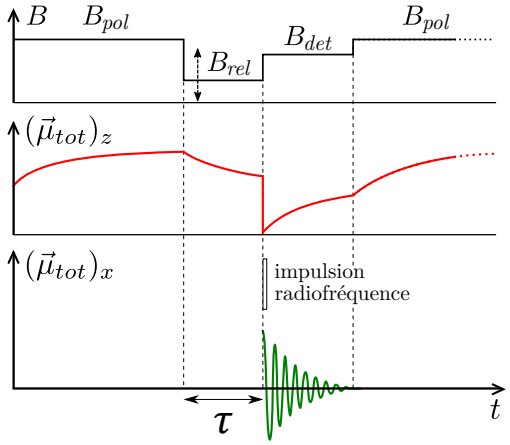


FIGURE 4.13 : Cycle de champ magnétique pour la mesure de la relaxivité en champ faible et évolution de la magnétisation. Schéma inspiré de [233].

de polarisation $\vec{B_{pol}}$, durant un temps de 5 à 10 fois la valeur de T_1 supposée. Ceci a pour effet de faire croître la magnétisation de façon importante (B_{pol} est grand) jusqu'à atteindre un plateau (le délai est beaucoup plus long que T_1).

Un deuxième champ, appelé champ de relaxation $\vec{B_{rel}}$, est alors appliqué : il s'agit du champ auquel on souhaite mesurer la valeur de T_1. B_{rel} peut prendre des valeurs comprises entre B_{pol} (c'est le champ le plus intense que l'appareil puisse générer sur un temps long) et 10^{-4} T, l'ordre de grandeur du champ magnétique terrestre (ce dernier n'est alors plus négligeable et peut perturber les mesures si le relaxomètre n'est pas correctement isolé). $\vec{B_{rel}}$ est appliqué pendant un délai τ ; μ_{tot} va alors diminuer en tendant, selon un processus exponentiel de temps caractéristique T_1, vers la valeur à l'équilibre dans le champ de relaxation. Néanmoins, à ce moment précis, μ_{tot} est très grande par rapport au cas où l'échantillon n'est soumis qu'à un champ $\vec{B_{rel}}$ permanent.

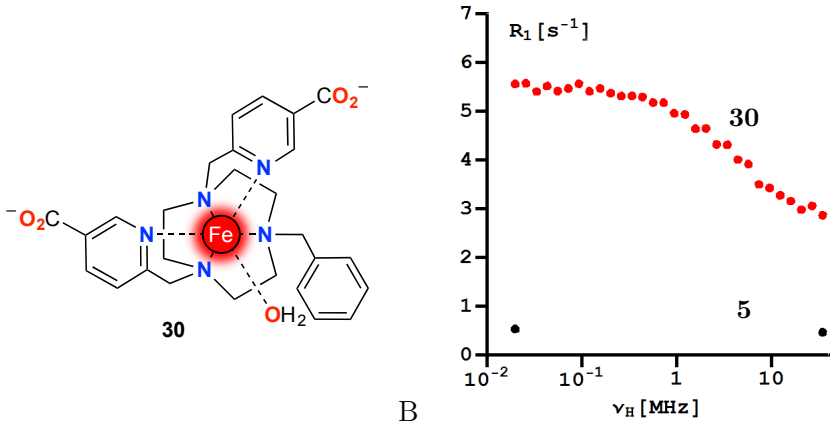
Enfin, l'échantillon est soumis à un troisième champ appelé champ de détection $\vec{B_{det}}$ intense (il vaut ici 0,5 T), en même temps qu'une impulsion radiofréquence est appliquée pour basculer la magnétisation dans le plan transverse. La précession a alors lieu et le signal est acquis sous le champ $\vec{B_{det}}$. La répétition de ce cycle en faisant varier τ permet de construire la courbe de μ_{tot} en fonction de τ, qui donne la valeur de T_1 de la même manière que dans le cas où la séquence d'inversion-récupération est utilisée.

Il est ainsi possible, en connaissant la concentration de l'agent de contraste présent en solution, de calculer la relaxivité r_1 pour une valeur de B_{rel}. La réalisation de cette séquence cyclique en balayant différentes valeurs de B_{rel} permet d'obtenir le profil NMRD complet. Ce profil pour de faibles champs est souvent complété par des mesures plus ponctuelles pour des champs magnétiques plus intenses, obtenues à l'aide de spectromètres RMN supraconducteurs avec la méthode d'inversion-récupération habituelle.[233]

3.2 Profils NMRD des complexes de fer(II) et conclusions

Les profils NMRD des deux complexes modèles **5** et **30** sont représentés à la Figure 4.14B. Dans le cas de **5**, nous n'avons mesuré r_1 que pour deux valeurs de champ magnétique : en effet, la relaxation spin-réseau des solutions de **5** étant très lente, chaque cycle de champ est très long car μ_{tot} ne varie que très lentement. Nous avons privilégié l'étude de **30** qui est à la fois plus rapide et plus intéressante.

Les observations concernant **5** sont conformes à nos attentes : le complexe étant diamagnétique, il ne possède qu'une très faible relaxivité (environ 0,1 $mM^{-1}.s^{-1}$) qui ne varie pas de façon importante en valeur absolue avec le champ magnétique. Cette valeur est toutefois supérieure d'un ordre de grandeur par rapport à la valeur mesurée à 7 T à l'aide du spectromètre RMN 300 MHz,[231] alors que l'échantillon utilisé est le même. La mesure de valeurs de relaxivité aussi faibles n'est pas habituelle avec l'équipement que nous avons utilisé[234, 235] : il est tout à fait possible que les paramètres de mesure (notamment les



A B

FIGURE 4.14 : A. Structure de **30** en solution aqueuse.[231] B. Profils NMRD des complexes **5** et **30** ; R_1 représente la relaxivité absolue, soit $1/T_1$; concentration : 4 mM ; température ambiante.

délais d'application des champs) ne convenaient pas. Après une optimisation, nous avons bon espoir d'aboutir à des valeurs plus fiables.

30 présente un effet relaxateur beaucoup plus fort : la relaxivité est comprise entre 0,75 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour un champ fort (1 T) et 1,3 $mM^{-1}.s^{-1}$ dans une situation de champ faible (0,5 mT). r_1 croît à mesure que le champ diminue, pour atteindre un plateau à partir d'environ 10 mT. Ce comportement est aussi observé pour les chélates de gadolinium[230] ; il est dû au fait que nos molécules fonctionnent selon un mécanisme de relaxation électronique (la relaxation des spins nucléaires des protons de l'eau a pour seule origine la relaxation du spin électronique de l'ion métallique). Une étude plus poussée, notamment en réalisant plusieurs profils à des températures différentes et en mesurant r_1 pour des champs magnétiques plus intenses, permettrait de déterminer les paramètres de la relaxation comme par exemple le temps de relaxation électronique T_{1e}[233, 236] ; elle n'a pas été réalisée mais reste en projet. Par ailleurs, il serait intéressant d'observer la magnétogénèse d'une sonde en suivant la croissance de la relaxivité par relaxométrie en champ cyclique.

Nos complexes présentent donc une relaxivité intéressante en présence de champs magnétiques peu intenses, bien que les valeurs de r_1 restent bien inférieures à celles observées pour des complexes basés sur un ion Gd^{3+} (r_1 est alors généralement comprise entre 5 et 10 $mM^{-1}.s^{-1}$).[230] Nos molécules conviennent donc tout à fait pour des utilisations en présence de champ faible, et notamment dans le cadre du diagnostic *in vitro*.

4 Vers la détection *in vitro* d'activités enzymatiques pour le diagnostic médical

Les sondes magnétogènes basées sur une fonction amidine ne peuvent, comme je l'ai dit plus haut, être utilisées que dans un cadre *in vitro*. Même si cela constitue une limite évidente au vu de notre intérêt de réaliser l'imagerie moléculaire d'enzymes, il est très désirable de détecter et quantifier des activités enzymatiques dans un échantillon *ex vivo*, notamment pour réaliser un diagnostic médical. C'est pourquoi nous avons poursuivi ce but.

Je vais d'abord détailler les intérêts et enjeux du diagnostic assisté par résonance magnétique et préciser pourquoi nos sondes peuvent constituer une solution novatrice pour accomplir cet objectif. Je poursuivrai par la présentation de deux preuves de concept que nous avons ou sommes sur le point de tenter.

4.1 Diagnostic médical assisté par résonance magnétique

Le diagnostic est une étape essentielle de la prise en charge des malades. Traditionnellement, il est réalisé soit grâce à l'examen du patient par un médecin (ce qui recouvre l'imagerie anatomique et moléculaire dont j'ai parlé jusqu'à présent), soit par l'analyse de prélèvements (issus de biopsies, frottis ou de prises de sang par exemple) dans un laboratoire de biologie médicale. Toutefois, sont maintenant privilégiées des méthodologies plus simples pouvant être appliquées directement au chevet du patient, voire par le patient lui-même. Elles utilisent des dispositifs dits *Point-of-care*, à la fois peu chers, d'usage facile et donnant fiablement et dans un temps court une information à partir d'un échantillon facilement accessible (sang, urine, sperme, etc...).[237] Cela permet un diagnostic plus rapide et moins coûteux, que ce soit en termes d'achat et d'utilisation d'équipements et de réactifs, mais aussi de mobilisation du personnel médical ; la qualité de soin est ainsi améliorée.

Comme je l'ai précisé dans l'introduction (voir page 19), le diagnostic de pathologies est de plus en plus fréquemment réalisé par la détection et la quantification de biomarqueurs. Les équipements de diagnostic *Point-of-care* visent donc à la mesure de la concentration de ces molécules ; pour cela, deux moyens sont couramment utilisés : soit une détection par voie électrochimique, soit une détection optique.[237] Par exemple, la mesure de la glycémie par les diabétiques est assurée le plus souvent par ampérométrie lors de l'oxydation du glucose par la glucose déshydrogénase. Au contraire, les tests de grossesse profitent de l'accumulation, en cas de présence de hCG (*human Chorionic Gonadotropin*, une hormone produite uniquement par le fœtus et le placenta) dans l'urine, de nanoparticules d'or équipées d'anticorps anti-hCG, ce qui génère l'apparition d'une bande noire. Cependant, ces méthodes présentent l'inconvénient que l'échantillon doit le plus souvent être préparé pour en retirer les éléments qui peuvent interférer[237] ; en particulier, l'étude de biomarqueurs dans le sang requiert, avant l'usage de sondes fluorescentes, plusieurs étapes de centrifugation et de lavage afin d'éliminer les nombreuses espèces absorbantes.[238]

Une détection magnétique est donc très intéressante car seule une très faible proportion des molécules contenues dans les fluides corporels possède un caractère magnétique et génère donc un bruit de fond.[238] En effet, à l'exception de la désoxyhémoglobine (hémoglobine ne transportant pas de dioxygène) présente en concentration millimolaire dans le sang pauvre en dioxygène,[119] les espèces paramagnétiques et ferromagnétiques, qui sont toutes des métalloprotéines, ne se trouvent qu'à l'état de traces. Des dispositifs de diagnostic reposant sur une lecture des propriétés magnétiques d'échantillons biologiques ont ainsi été conçus.[237, 238] Le principe est le même dans tous les cas : des nanoparticules métalliques capables de reconnaître le biomarqueur étudié sont incubées avec l'échantillon, puis les nanoparticules non liées sont éliminées par lavage, et enfin le magnétisme est mesuré. Différentes techniques sont utilisées : mesure de la susceptibilité magnétique, de la magnétorésistance, du champ magnétique induit par les nanoparticules, ou plus familièrement, mesure du temps de relaxation transverse T_2 des protons par des dispositifs de RMN en petit volume (appelés spectromètres microRMN ou en abrégé μRMN). Ces derniers ont été de loin les plus utilisés.

Plusieurs appareils de type μRMN ont été utilisés pour la mesure de T_2 à des fins diagnostiques.[238] L'équipe de Ralph Weissleder au Massachusetts General Hospital a conçu des dispositifs spécifiquement dédiés au diagnostic médical, qui se distinguent non par les performances intrinsèques mais par une grande facilité d'utilisation et un coût réduit.[239–241] Certains de ces appareils de diagnostic assisté par résonance magnétique (*Diagnostic Magnetic Resonance devices*) sont présentés à la Figure 4.15[242–244] ; la mesure du temps de relaxation transverse est réalisée à l'aide d'un solénoïde et d'un aimant de taille réduite, et permet à l'aide d'une calibration préalable de calculer la concentration dans l'échantillon du biomarqueur d'intérêt. Ces dispositifs ont été utilisés avec succès pour la caractérisation de cellules cancéreuses,[245, 246] la détection de bactéries[247–250] ou l'étude des propriétés de coagulation du sang.[251] En particulier, des seuils de détection très bas ont pu être atteints, de l'ordre de la dizaine de cellules ou de bactéries par échantillon de 10 μL.

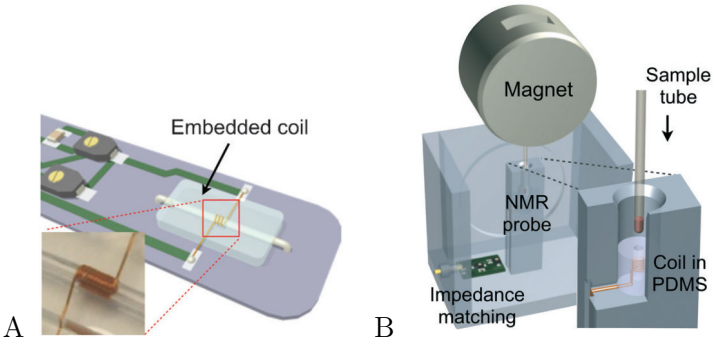


FIGURE 4.15 : Schémas de dispositifs de type μRMN conçus par l'équipe de Ralph Weissleder et destinés au diagnostic médical. Images issues de [243] (A) et [244] (B).

Le diagnostic assisté par résonance magnétique est donc un domaine très prometteur qui peut mener à une investigation rapide et sensible de nombreuses pathologies.

4.2 Intérêt des sondes magnétogènes pour la détection de biomarqueurs enzymatiques

L'utilisation de nanoparticules pour coupler la présence d'un biomarqueur à un signal mesurable d'ordre magnétique permet de bénéficier d'une sensibilité importante. Cependant, la détection d'activités enzymatiques par cette voie est peu évidente. Très peu d'exemples ont été réalisés[252] ; ils mettent à profit l'agrégation des nanoparticules déclenchées par l'action enzymatique pour entraîner un abaissement local du T_2 proportionnel à la concentration en enzyme. Mais la sensibilité est toujours faible ; de plus, les enzymes pouvant être ciblées sont peu nombreuses et d'un intérêt limité pour le diagnostic de pathologies.

Or, la quantification efficace et sensible d'activités enzymatiques dans un échantillon biologique est un objectif hautement intéressant d'un point de vue médical (voir page 19), et nos sondes magnétogènes comportant une amidine sont un excellent outil pour y parvenir. En effet, grâce à un bruit de fond minimal et un écart maximal entre les formes non activée et activée par l'enzyme, elles permettent une détection optimale : une simple incubation de la sonde avec l'échantillon suivie d'une acidification du milieu et de la lecture directe de T_1 rendrait accessible la concentration de l'enzyme ciblée. Aucune étape supplémentaire de préparation de l'échantillon, de lavage, ou aucun autre réactif ne sont utiles, ce qui simplifie grandement le protocole d'analyse par rapport aux stratégies décrites plus haut.

Avant d'envisager l'application de nos sondes pour accomplir le diagnostic de pathologies à l'aide de dispositifs μRMN de type *Point-of-care*, il serait intéressant d'apporter une preuve de concept de la détection d'une activité enzymatique dans un petit volume grâce à l'utilisation de nos complexes. Afin de simplifier la démarche, nous nous restreindrons d'abord au ciblage d'enzymes modèles dans des milieux simples (par exemple de l'eau tamponnée ou du sérum). J'ai décrit plus haut (voir parties 1 et 2) la synthèse et l'étude de sondes adaptées à cet objectif ; en ce qui concerne l'appareillage, nous

n'avons malheureusement identifié aucun dispositif commercial satisfaisant pour réaliser la mesure du T_1 dans un volume de l'ordre de la dizaine de μL. Il nous a donc fallu en imaginer un nous-même et le réaliser. Je vais maintenant présenter les deux tentatives que nous avons ou sommes en train de mener, les équipements mis au point et les résultats obtenus.

4.3 Première tentative de preuve de concept

Pour réaliser la première preuve de concept de la détection *in vitro* d'une enzyme dans un microvolume à l'aide de nos molécules, nous nous sommes tournés vers nos collaborateurs du laboratoire CREATIS de l'INSA de Lyon. Spécialistes d'imagerie médicale, et en particulier d'IRM, ils réalisent les images permettant de caractériser nos sondes depuis que l'équipe a commencé à travailler sur ce projet en 2006-2007. Ils disposent en effet d'un appareil d'IRM de recherche dédié au petit animal et de toutes les facilités de traitement des données. Ils bénéficient de plus d'une expertise dans le développement d'antennes IRM de tailles et formes variées pour réaliser l'imagerie d'éléments divers.

Nous avons demandé à l'équipe d'Olivier Beuf de réaliser un dispositif permettant la mesure du T_1 d'une solution aqueuse d'un volume de l'ordre de 50 μL et contenue dans un tube interchangeable. En réponse, ils ont conçu une antenne émettrice-réceptrice installée sur un lit servant à coucher les souris lors de leur examen (voir Figure 4.16A). L'antenne consiste en un solénoïde en cuivre d'une longueur d'environ 5 mm et de diamètre 1,2 mm lié à une électronique sommaire, et dans lequel un tube en verre de diamètre 1 mm peut être inséré (Figure 4.16B). La bobine permet l'imagerie d'un volume long de quelques mm de la solution présente dans le tube. Ce dispositif est destiné à être glissé dans le conduit de l'appareil IRM et relié à l'amplificateur par un câble coaxial (Figure 4.16C) ; une séquence d'inversion-récupération permet alors l'acquisition du T_1. L'intérêt est de permettre la mesure pour de petits volumes (le remplissage du tube requiert une quarantaine de microlitres pour éviter les effets de bord sur l'image), mais sans avoir besoin de concevoir un microaimant spécifique et l'antenne adaptée, ce qui aurait demandé un investissement beaucoup plus conséquent. De plus, le champ magnétique de l'IRM étant de 4,7 T, il est relativement proche de celui avec lequel nos molécules ont été caractérisées (7 T).

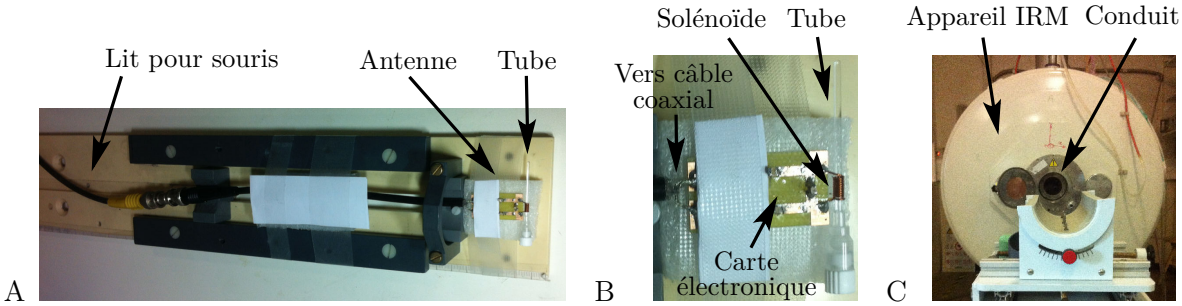


FIGURE 4.16 : Antenne IRM conçue au laboratoire CREATIS pour la mesure de T_1 de microvolumes à l'aide d'un appareil IRM dédié au petit animal. A. Vue générale. B. Agrandissement de la région du solénoïde et du tube contenant l'échantillon. C. Appareil IRM utilisé.

Je me suis rendu à plusieurs reprises au laboratoire CREATIS pour réaliser les expériences avec les ingénieurs Sophie Gaillard et Denis Grenier. Nous avons d'abord commencé par caractériser l'antenne : le rapport signal sur bruit a été estimé en réalisant successivement l'image de deux tubes, l'un contenant 40 μL d'eau distillée, l'autre contenant le même volume d'une solution commerciale de nitrate de fer(III), et en comparant les niveaux de gris des deux images. Avec un rapport de 56, notre dispositif est très sensible. Malheureusement il est délicat de comparer ce résultat avec ceux décrits dans la littérature : les auteurs mentionnent rarement ce paramètre et ne le calculent pas tous de la même manière.

Puis j'ai réalisé la mesure du T_1 d'un tampon phosphate pur ou de solutions de concentration 4 mM du complexe paramagnétique **30** (voir Figure 4.14 page 74) dans ce tampon. Le protocole de mesure est

le suivant : une image grossière est d'abord acquise à l'aide d'une séquence de pondération T_1 rapide, afin de déterminer précisément la localisation du tube dans l'aimant. Puis une coupe très précise (quelques mm de largeur et de longueur pour une épaisseur de l'ordre de 100 μm) est sélectionnée et une image est acquise avec une séquence de type inversion-récupération spécialement adaptée à la mesure précise du T_1. Enfin, la sélection d'une région d'intérêt et le calcul des niveaux de gris des pixels compris dans cette zone permet l'obtention de la valeur du temps de relaxation longitudinale de l'échantillon (voir Figure 4.17). L'ensemble du processus nécessite environ 25 minutes, soit trois fois le temps requis pour une mesure à l'aide du spectromètre RMN du laboratoire.

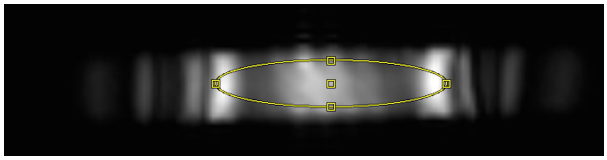


FIGURE 4.17 : Exemple d'image obtenue lors de l'utilisation d'une séquence de mesure du T_1 ; l'ovale jaune au centre de l'image délimite quels pixels sont utilisés. Les stries observées semblent correspondre aux spires du solénoïde.

Malheureusement, les résultats obtenus n'étaient pas du tout reproductibles : les valeurs oscillaient pour le tampon pur entre 4,1 s (ce qui est l'ordre de grandeur attendu) et 154 ms, et entre 256 ms et 430 ms pour les solutions de **30**. Or, si une variation de l'ordre de 10% est habituelle (les valeurs sont très dépendantes des fluctuations de température et de champ magnétique notamment), de tels écarts ne peuvent s'expliquer que par un problème d'instrumentation. Nous avons successivement identifié plusieurs causes, et les moyens de les résoudre :

— La séquence d'acquisition des images utilisée n'était pas optimisée pour la mesure de T_1, mais pour l'obtention d'images nettes. En effet, la mesure absolue du T_1 n'intéresse pas la majorité des utilisateurs de la plateforme IRM, qui recherchent quant à eux des images bien définies. En modifiant les paramètres d'acquisition pour obtenir une mesure plus précise de T_1 au détriment de la qualité de l'image, nous avons pu réduire cette première source d'erreur.

— La mesure du T_1 à partir des images obtenues doit se faire rigoureusement à partir des mêmes régions d'un tube à l'autre, car les variations de niveau de gris au sein du tube sont grandes. Une zone d'intérêt a ainsi été définie et employée pour tous les tubes. De plus, nous avons veillé à sélectionner dans chaque cas la même coupe transverse. Cependant, comme le solénoïde n'est pas totalement fixé par rapport au lit supportant l'antenne (il subsiste toujours un degré de liberté de l'ordre d'un mm dans les trois directions de l'espace) et que le lit n'est pas inséré exactement de la même manière pour chaque expérience, il est délicat avec notre dispositif de garantir un positionnement identique du tube au cours d'acquisitions répétées.

— La mesure est plus fiable si le tube est disposé le long d'un gradient de champ, c'est-à-dire dans notre cas s'il est placé rigoureusement à l'horizontale.

À l'issue de ces optimisations, nous avons pu obtenir des valeurs de T_1 relativement reproductibles. Cependant, le fait que, d'une mesure à l'autre, l'échantillon ne soit pas fixé par rapport à l'aimant et aux gradients de champ est clairement un handicap.

Avant de tenter une expérience de magnétogénèse à l'aide de **19**, j'ai tenu à réaliser une gamme de solutions de concentration en complexe **30** croissante pour vérifier la linéarité de la relaxivité absolue $R_1 = 1/T_1$. En effet, comme il apparaît dans l'équation présentée à la page 32, R_1 est normalement proportionnelle à la concentration en agent de contraste ; un écart à la linéarité proviendrait donc d'un problème d'équipement. Les mesures seraient alors imprécises et rendraient la quantification de l'activité enzymatique ciblée impossible.

Les résultats sont présentés à la Figure 4.18 ; le coefficient de corrélation r^2 indique une relative linéarité qui n'est pas satisfaisante. De plus, la valeur de r_1 obtenue (0,696 $\mathrm{mM^{-1}.s^{-1}}$) est assez éloignée de celle qui avait été mesurée de façon très satisfaisante avec le même appareil IRM et une

antenne éprouvée (0,59 $mM^{-1}.s^{-1}$).[231] Nous avons alors cherché l'origine du problème : il apparaît que l'amplificateur n'est pas adapté pour notre antenne spécifique. Ses caractéristiques sont optimisées pour l'imagerie de souris entières : la puissance émise est forte (de larges zones doivent être couvertes dans toute leur profondeur), et le signal acquis est faible, donc nécessite d'être amplifié de façon importante. Dans notre situation, les besoins sont inverses : comme l'échantillon et la bobine, qui ne sont séparés que par une très fine épaisseur de plastique, sont très proches, seule une très faible puissance d'émission est nécessaire et le signal acquis a une amplitude telle qu'il ne requiert que peu d'amplification. La conséquence directe est une saturation à la fois de l'échantillon (l'excitation est trop forte et inadaptée) et de l'unité de détection, ce qui résulte en des images dont les niveaux de gris sont anormaux et en une mesure faussée du T_1.

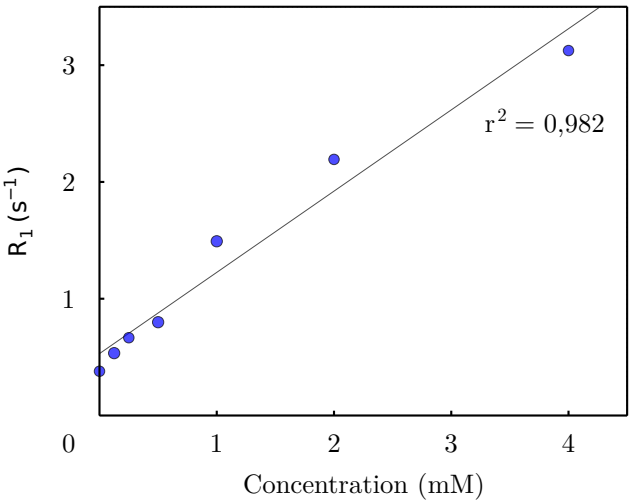


FIGURE 4.18 : Relaxivité absolue de solutions de **30** de différentes concentrations mesurée à l'aide de l'antenne présentée ici et régression linéaire.

Malgré une optimisation des paramètres de l'amplificateur, il est malheureusement impossible de l'utiliser de façon satisfaisante avec notre antenne ; il faudrait en concevoir un nouveau qui corresponde spécifiquement à nos besoins. Cette difficulté s'ajoute aux problèmes de positionnement de l'échantillon dans l'appareil IRM dont j'ai parlé plus haut. Au final, les nombreux obstacles techniques que nous avons rencontrés et qui semblent difficilement surmontables nous font douter de la capacité à mesurer le T_1 de façon fiable avec ces équipements.

4.4 Deuxième tentative de preuve de concept

Notre première preuve de concept s'est soldée par un échec pour une raison matérielle : notre nouvelle antenne, spécialement conçue pour l'imagerie de petits volumes, n'est pas adaptée à la fois à l'aimant et à l'amplificateur radiofréquence de l'appareil IRM dédié au petit animal. Afin de parvenir à des mesures de T_1 fiables, nous avons besoin d'un dispositif dont tous les éléments sont entièrement compatibles. En particulier, il est primordial qu'au sein du système retenu l'échantillon et le solénoïde de l'antenne soient toujours positionnés au même endroit par rapport à l'aimant. C'est d'ailleurs le cas pour les appareils DMR que j'ai présentés plus haut (voir Figure 4.15).

Nous avons consulté les docteurs Michel Bardet, Matthieu le Prado et Jacques Reverdy, chercheurs spécialistes des équipements de mesure magnétique travaillant au Laboratoire d'Électronique et de Technologie de l'Information (LETI) du CEA de Grenoble. Ils nous ont orientés vers deux équipes allemandes pouvant nous apporter leur expertise technique. L'équipe de Bernhard Blümich travaillant à Aix-la-Chapelle est reconnue pour la conception de microaimants[213, 214] ; ils s'intéressent à l'élaboration de spectromètres RMN miniaturisés. Le groupe de Jan Korvink établi à Karlsruhe est quant à lui spécialiste de la réalisation d'antennes de petite taille pour la RMN. Ces deux équipes de haut niveau ont accepté notre idée d'une collaboration pour concevoir un dispositif de type *Point-of-Care* pour la mesure de T_1 au sein de petits échantillons. Au cours d'une réunion à Karlsruhe, nous avons

défini le cahier des charges de l'appareil :

— L'aimant doit permettre de générer un champ magnétique d'environ 1 T sur un volume cylindrique d'une hauteur de 5 mm et de diamètre de l'ordre du mm. L'homogénéité du champ n'est pas un critère essentiel car nous ne recherchons pas une grande résolution spectrale (le seul signal attendu est celui, très massif et élargi, des protons de l'eau). L'aimant doit être assez compact et bon marché pour une utilisation *Point-of-Care*.

— L'antenne doit être adaptable au champ (*tuning* et *matching*) et permettre un réglage fin pour chaque échantillon (*shimming*). Seule la bobine devra être insérée dans l'aimant, le reste de l'électronique sera déporté sur une carte annexe.

— L'aimant doit pouvoir contenir le solénoïde de l'antenne dans lequel l'échantillon aura été glissé, et l'échantillon doit être toujours positionné au même endroit par rapport à l'aimant.

Nous avons choisi d'utiliser un aimant de type Halbach[213] : ces assemblages de barres ferromagnétiques hexagonales en nid d'abeille simples à construire et peu onéreux permettent généralement d'obtenir des champs magnétiques satisfaisants dans la région centrale. Le diamètre externe retenu pour les tubes contenant l'échantillon est 2 mm, ce qui rend la conception de l'aimant et de la bobine plus aisée. Le volume mesuré sera d'environ 50 μL, dans le même ordre de grandeur que précédemment.

Un premier prototype d'aimant a été réalisé par Christian Rehorn, doctorant dans l'équipe de Bernhard Blümich ; il est présenté à la Figure 4.19 (une couverture est prévue pour protéger l'aimant mais a été enlevée ici pour montrer la structure). Une simulation réalisée à l'aide du logiciel COMSOL (Figure 4.19F) montre que le champ généré est très homogène dans la zone de mesure, où il vaut environ 1 T. Ce dispositif a été envoyé à Karlsruhe où l'antenne est réalisée et où les premières mesures de T_1 seront menées très prochainement. Si les résultats sont satisfaisants, nous envisageons la conception d'un deuxième dispositif doté d'instruments de microfluidique, ce qui permettra de simplifier l'analyse : l'échantillon ne devra plus être introduit dans un tube, ce qui est toujours une opération délicate, mais pourra être déposé sur une surface puis aspiré directement par l'appareil.

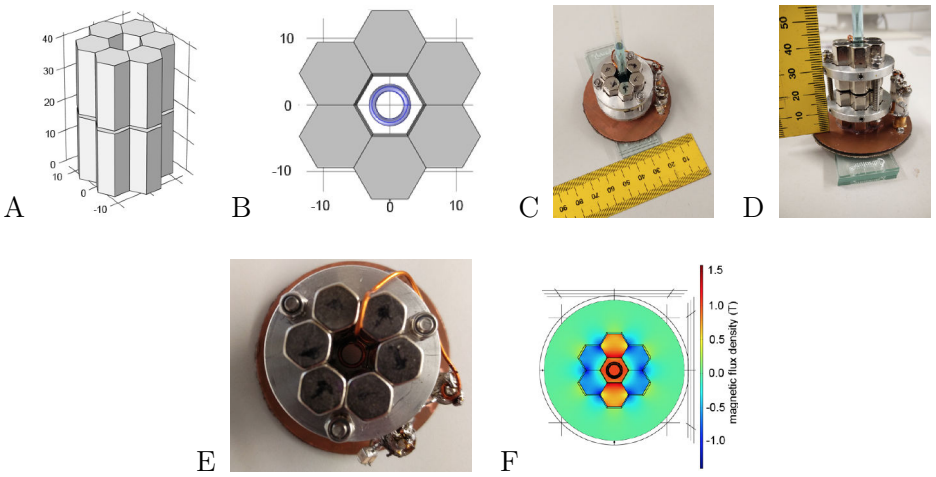


FIGURE 4.19 : Aimant réalisé par l'équipe de Bernhard Blümich pour réaliser la mesure de T_1 dans de petits volumes. Schémas vus de côté (A) et de dessus (B), photographies vues de côté (C et D) et de dessus (E) ; les unités sont des millimètres. F. Simulation du champ magnétique généré vu de dessus réalisée à l'aide du logiciel COMSOL.

La preuve de concept d'une mesure efficace de T_1 dans un petit volume reste donc toujours à accomplir, mais je suis très optimiste pour qu'elle soit réalisée dans un court délai à l'aide de ce nouvel appareil de pointe. En effet, il résout tous les problèmes que nous avons rencontrés avec l'antenne conçue à CREATIS ; les cas de saturation du signal devraient ainsi être évités et la reproductibilité améliorée.

Chapitre 5

Nouveaux complexes comportant une guanidine pour l'imagerie d'enzymes *in vivo*

Au cours du chapitre précédent, j'ai présenté la synthèse et la caractérisation de complexes de fer(II) comportant une fonction amidine. Ces molécules sont des sondes magnétogènes qui nécessitent, après leur activation en conditions physiologiques, une acidification du milieu jusqu'à un pH acide afin de changer d'état de spin et générer une relaxivité importante. Comme je l'ai déjà précisé (voir page 49), même si ces sondes conviennent tout à fait pour une utilisation *in vitro*, par exemple pour réaliser le diagnostic de pathologies au moyen de dispositifs de type *Point-Of-Care*, elles ne peuvent servir pour l'imagerie *in vivo* où il est impossible de modifier artificiellement le pH du milieu.

En effet, la basicité de la fonction amidine dans le complexe **11** (voir Figure 2.10 page 48) n'est pas suffisante pour que cette base soit protonée de façon quantitative dans un contexte biologique. Le pKa étant d'environ 4,5,[144, 197] seule une infime partie (environ 1/1000) des complexes est sous forme paramagnétique dans un milieu de pH 7,4. Dans ces conditions, pour qu'un complexe soit présent majoritairement sous une forme protonée et possède un caractère magnétogénique intéressant, il est nécessaire que son pKa soit au moins égal à 8,5 (soit une unité au-dessus du pH physiologique).[179]

Ainsi, afin de pouvoir réaliser l'imagerie d'enzymes *in vivo*, nous devons concevoir un complexe analogue à **11** mais présentant une plus grande basicité. Ce complexe pourra être adapté en une sonde magnétogène de la même manière que **11** a servi de modèle pour réaliser les complexes **10** et **19-21** (Figures 2.10 et 4.1).

1 Identification des molécules cibles

Jens Hasserodt a eu l'idée de remplacer la fonction amidine de **11** par une base similaire mais plus forte : une guanidine. Les guanidines sont des bases azotées assez répandues puisqu'elles sont présentes dans la chaîne latérale d'un acide aminé, l'arginine. Formées d'atomes d'azote séparés par un atome de carbone d'hybridation sp^2, et possédant des électrons π délocalisés (voir Figure 5.1), elles sont structurellement très proches des amidines ; toutefois, dotées de 3 azotes au lieu de 2, elles possèdent un plus grand pKa. La forme protonée est en effet plus stabilisée du fait d'une plus grande délocalisation. Les valeurs de pKa mesurées dans l'eau sont de l'ordre de 13,6, soit 1,5 unités au-dessus de celles rencontrées pour les amidines.[253] Par ailleurs, il est possible de diminuer de façon importante la basicité des guanidines en acylant ou carbamylant un des atomes d'azote, tout comme il avait été observé pour les amidines.[195, 196] Les guanidines apparaissent donc comme une solution idéale pour concevoir un complexe capable de magnétogénèse *in vivo* : en remplaçant dans **11** la fonction amidine par une guanidine, il devrait être possible d'élaborer de manière analogue des sondes opérant dans le milieu biologique.

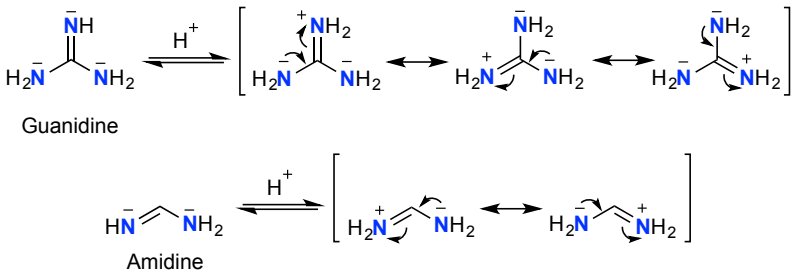


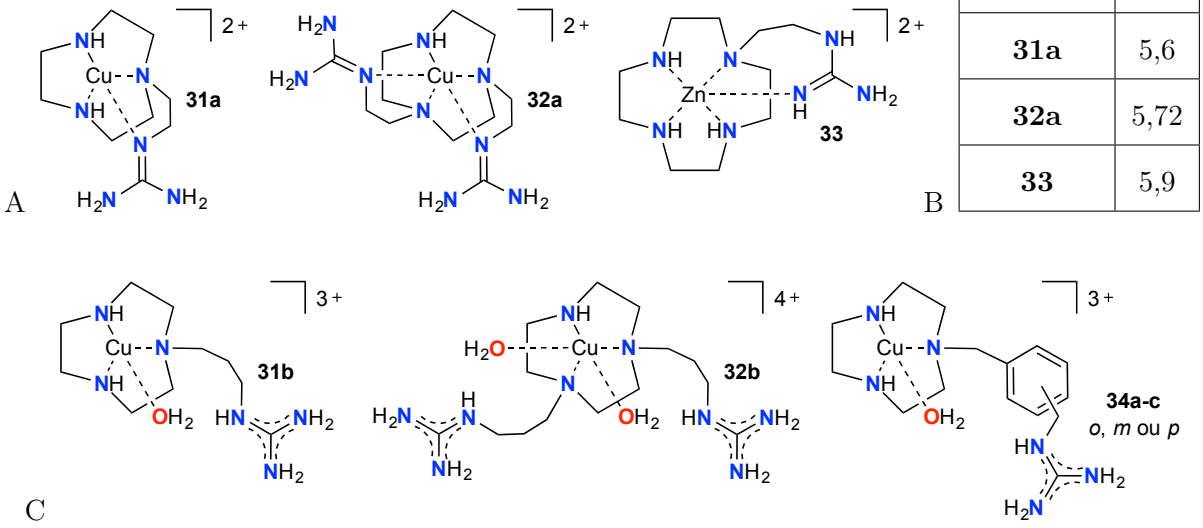
FIGURE 5.1 : Structure d'une guanidine et d'une amidine et formules mésomères des formes protonées.

Les guanidines n'ont été utilisées que tardivement en tant que ligand au sein de complexes de coordination.[254–257] Toutefois, parmi les exemples rapportés dans la littérature, certains sont d'un grand intérêt pour nous (voir Figure 5.2) :

- Les complexes de cuivre(II) **31a**[258] et **32a**[259] ont été préparés et étudiés par l'équipe de Leone Spiccia, qui était déjà à l'origine du complexe paramagnétique modèle **6**[186] (voir page 42). Basés sur un macrocycle TACN, ils comprennent une (cas de **31a**) ou deux (cas de **32a**) fonctions guanidine, liées au macrocycle à l'aide d'une chaîne éthyle. Une étude spectrophotométrique de solutions aqueuses de pH différents a montré qu'au sein de **31a** et **32a**, la fonction guanidine est capable de se coordiner de façon intramoléculaire et via un atome d'azote sur le centre métallique ; un cycle chélate comprenant 5 atomes est alors formé.
- Les complexes **31b**[258] et **32b**,[259] de structure analogue mais au sein desquels la/les guanidines sont liées via une chaîne propyle, n'ont démontré quant à eux aucune coordination dans des milieux de pH inférieur à 12.
- La guanidine du complexe **33**, un chélate de zinc(II) doté d'un ligand cyclène (1,4,7,10-tétraaza-cyclododécane) et d'un lien éthyle, est capable de se coordiner à l'ion métallique en solution aqueuse[260] ; cependant, sur la foi de la structure à l'état solide, le cycle chélate qui se forme comporte 7 atomes et non 5 comme dans le cas de **31a** et **32a**.
- Au sein des complexes **34a-c**,[261] où l'unité guanidine est plus éloignée encore du macrocycle que dans le cas de **31b** et **32b**, la formation du cycle n'est pas non plus observée.
- Les pKa de coordination de la fonction guanidine pour **31a**, **32a** et **33** sont très proches : les valeurs sont comprises entre 5,6 et 5,9.[258–260] De plus, l'azote coordiné est toujours de type imine (voir page 42).

En conclusion, lorsque la guanidine est liée au macrocycle par un lien éthyle, sa déprotonation accompagnée de sa coordination sur le centre métallique est suffisamment favorable pour être observée en milieu aqueux. Le pKa associé, de l'ordre de 6, est supérieur d'environ 1,5 unité à celui du complexe **11** possédant une amidine.[197] L'écart de pKa est proche de celui entre une amidine et une guanidine libres en solution. Ce comportement était attendu : le motif de coordination de la base azotée, déterminé par la géométrie et le type d'atome d'azote impliqué, est identique. En revanche, lorsque le lien entre macrocycle et guanidine est allongé, la formation d'un cycle chélate devient trop peu avantageuse et la coordination intramoléculaire n'est pas observée, même en conditions basiques.

À partir de ces données, il est possible de prévoir le comportement des complexes **35a** et **35b** (voir Figure 5.3). **35a** devrait présenter, tout comme **31a**, **32a** et **33**, une coordination intramoléculaire de la guanidine avec un pKa de l'ordre de 6. Cette valeur, bien que supérieure à celle observée pour **11**, reste inférieure au seuil de 8,5. Toutefois, le fait que **35a** possède à la fois un ion fer(II) en lieu et place du cuivre(II) et deux ligands pyridine en supplément va très probablement influer sur la valeur du pKa en stabilisant ou déstabilisant la forme où la guanidine est coordinée. Par ailleurs, le lien propyle de **35b** devrait empêcher la coordination de la guanidine en milieu aqueux, ce qui constitue le comportement recherché (**35b** serait présent uniquement sous sa forme paramagnétique en conditions physiologiques). Il sera donc utile de synthétiser puis étudier ces deux complexes pour vérifier nos suppositions.



Complexe	pKa
31a	5,6
32a	5,72
33	5,9

FIGURE 5.2 : Complexes **31-34** décrits dans la littérature et présentant (A) ou non (B) une coordination du ligand guanidine en solution aqueuse.[258–261] C. pKa de coordination de la guanidine.

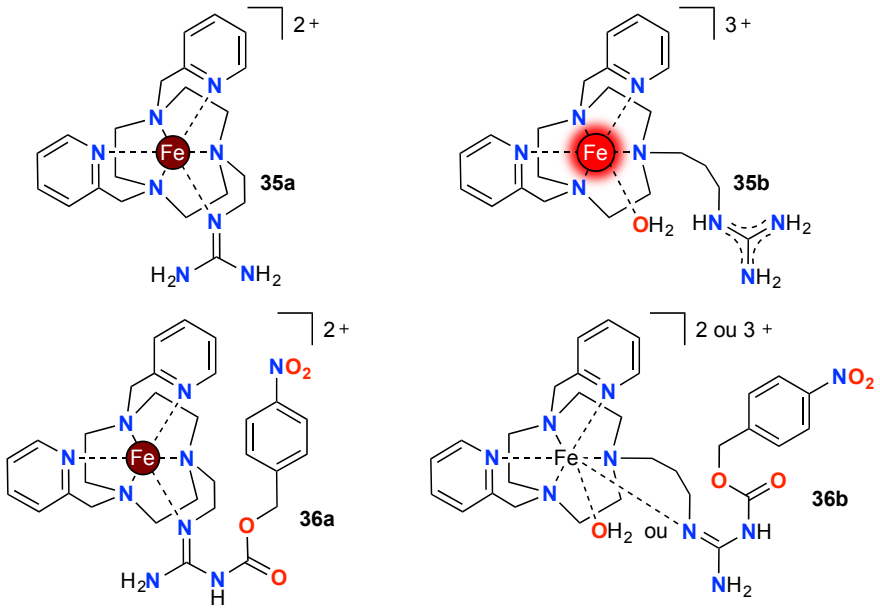


FIGURE 5.3 : Cibles moléculaires **35a**, **35b**, **36a** et **36b**. Les états de coordination et de spin les plus probables en milieu physiologique ont été représentés, à l'exception de **36b** où les deux motifs sont écrits.

Toutefois, pour que les complexes **35a** ou **35b** constituent une plateforme utile pour la conception de sondes magnétogènes, il est nécessaire que leurs analogues carbamylés, c'est-à-dire les molécules n'ayant pas subi d'activation, soient présents dans le milieu biologique sous une forme diamagnétique. C'est le comportement qu'adopte le complexe **10** (voir Figure 2.10 page 48).[197] Ici, il nous faut donc nous assurer que **36a** et/ou **36b** adoptent bien un état diamagnétique. Il semble très probable que la guanidine carbamylée de **36a** soit coordinée au pH physiologique, comme l'amidine carbamylée de **10**. Néanmoins, il n'est pas facile de prédire si dans le cas de **36b** la coordination désirée aura lieu et dans quelles conditions. En effet, même s'il est certain que la carbamylation diminuera le pKa de la guanidine par rapport à **35b**, ce qui rendra sa coordination plus favorable, il est *a priori* impossible d'anticiper si cette mesure suffira à garantir la coordination dans le milieu biologique. La formation d'un cycle chélate à 6 atomes pourrait ainsi être tellement coûteuse en énergie que même la carbamylation de la

guanidine ne permettra pas sa coordination. Il nous faudra préparer puis étudier **36a** et surtout **36b** pour vérifier leur comportement en solution.

Nos premières cibles moléculaires sont donc les complexes **35a** à **36b**. Si une plateforme convenable est identifiée, il sera alors intéressant de remplacer le groupe *p*-nitrobenzyle par un déclencheur enzymatique pour disposer d'une sonde magnétogène utilisable dans le cadre de l'imagerie moléculaire.

2 Synthèse et étude des complexes 35a et 35b contenant une guanidine simple

J'ai préparé les complexes de fer(II) **35a** et **35b**. Bien que les guanidines soient des unités de plus en plus présentes au sein des nouveaux composés destinés à une utilisation thérapeutique,[262, 263] leur synthèse demeure relativement exotique, en particulier lorsqu'elles sont acylées ou carbamylées. Je présenterai d'abord brièvement les méthodes habituelles de préparation des fonctions guanidines, afin d'identifier lesquelles conviennent dans notre situation. Je détaillerai ensuite la voie de synthèse de **35a** et **35b** et l'étude que j'ai pu mener sur ces molécules.

2.1 Méthodes de synthèse des guanidines incluses dans des molécules organiques

La guanidine la plus simple (Figure 5.1) pourrait, en tant que base azotée, théoriquement être substituée par alkylation et acylation afin d'obtenir des molécules plus complexes. Cependant, cette approche est le plus souvent inapplicable pour deux raisons[264] :

— La guanidine est une base forte ; elle est donc habituellement présente sous forme protonée, ce qui limite considérablement sa réactivité.

— La guanidine possède trois atomes d'azote rigoureusement équivalents ; sa substitution de façon asymétrique pose des problèmes de régiosélectivité.

Une autre stratégie est ainsi utilisée : la préparation du motif guanidine substituée directement au sein de la molécule organique cible. Elle a lieu par la réaction entre la fonction amine primaire d'un précurseur d'une part, et un synthon appelé réactif de guanidinylation d'autre part.[265] Ce synthon comprend trois éléments :

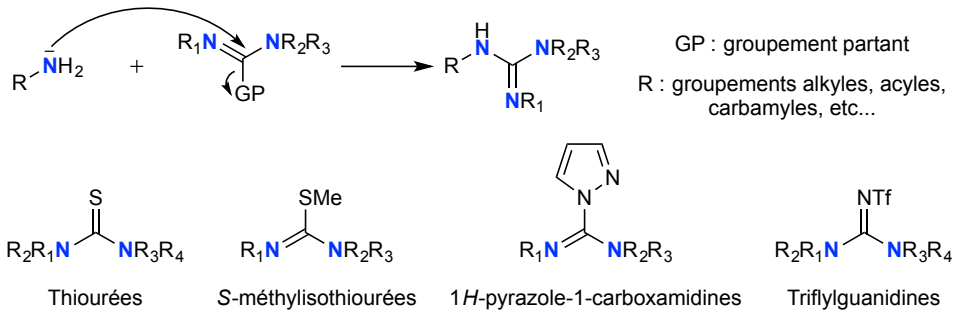


FIGURE 5.4 : Synthèse de fonctions guanidines substituées par guanidinylation d'amines primaires, et exemples de réactifs de guanidinylation.

— Un motif de type amidine, soit deux atomes d'azote liés à un même atome de carbone d'hybridation sp^2.

— Les motifs de substitution désirés sur les deux atomes d'azote : groupements alkyles, acyles, carbamyles, sulfonyles, etc...

— Un groupement de type nucléofuge porté par le carbone central de l'amidine. Il permet la formation de la guanidine via une réaction de type substitution nucléophile, où l'amine primaire joue le rôle de nucléophile. À cette fin, le nucléofuge est toujours relativement mou au sens de la théorie HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*) : il s'agit habituellement d'un atome de soufre (cas des

thiourées), d'une molécule de méthanethiol (cas des *S*-méthylisothiourées), d'un pyrazole (cas des 1*H*-pyrazole-1-carboxamidines) ou d'un triflamide (cas des *N*-triflylguanidines).[262, 264–266]

La formation de la guanidine peut être une étape délicate et de faible rendement ; ainsi, il est souvent nécessaire d'ajouter un excès de base et de réactif de guanidinylation pour améliorer l'avancement. De plus, lorsque le nucléofuge est soufré comme dans le cas des thiourées simples et dérivées, l'usage d'un métal mou tel que le chlorure de mercure(II) en quantité stoechiométrique est obligatoire, ce qui est bien sûr problématique vis à vis de la santé et de l'environnement.[264] Pour cette raison, des solutions alternatives sont activement recherchées. Des séquences réactionnelles très prometteuses utilisant des carbodiimides et des quantités catalytiques de métaux moins toxiques ont été mises au point ; toutefois, les substituants tolérés sur les atomes d'azote sont encore trop peu nombreux et inadaptés à nos besoins.[266, 267] Je me restreindrai donc aux méthodes "historiques" de synthèse des guanidines.

La réactivité des réactifs de guanidinylation dépend des groupements substituants sur les atomes d'azote. L'ordre observé de réactivité en fonction de l'acylation (ou de la carbamylation) est le suivant : les réactifs doublement acylés sont plus réactifs que les réactifs non acylés, qui eux-mêmes réagissent plus vite que les réactifs acylés une seule fois.[268] Ce comportement peut s'expliquer par les différences d'électrophilie du carbone central et de basicité du réactif de guanidinylation : plus les atomes d'azote portent des groupements électroattracteurs, plus le carbone central est électrophile, et moins le réactif est basique. Muni de ces conclusions, je pourrai déterminer quel type de réactif utiliser selon les besoins.

2.2 Synthèse des complexes 35a et 35b

Je me suis inspiré de la voie de synthèse de **31a** pour préparer les complexes (voir Figure 5.5). Dans mon cas, après avoir obtenu le DPTACN par disubstitution directe du trichlorhydrate du TACN (voir page 62), j'ai installé la fonction 2-aminoéthyle (cas de **38a**) ou 3-aminopropyle (cas de **38b**) via une séquence en deux étapes : l'alkylation de l'amine secondaire par le *N*-(2-bromoéthyl)phthalimide ou le *N*-(3-bromopropyl)phthalimide pour donner **37a** et **37b** est suivie de la déprotection du groupement protecteur à l'aide de conditions classiques d'hydrazinolyse. Si la déprotection est efficace, avec à la fois un très bon rendement d'environ 80% et des conditions opératoires simples, la première étape est dans les deux cas plus délicate. Les rendements moyens ont deux origines : d'une part, l'alkylation de l'amine secondaire est difficile car cette dernière est très encombrée et l'électrophile est peu activé (notamment si on le compare au synthon **22** présenté à la page 61), d'autre part, le réactif DPTACN n'est, malgré mes efforts, pas exempt d'impuretés qui réduisent le rendement d'alkylation. Néanmoins, j'ai pu obtenir **38a** et **38b** en quantités relativement importantes (jusqu'à 500 mg en une seule tentative).

Pour la suite de la synthèse, je disposais de deux stratégies pour former l'unité guanidine de **40a** et **40b**. La première consiste à transformer directement les amines primaires en guanidines via un réactif de carbamylation ne comportant pas de groupements acyles, comme le chlorhydrate de la 1*H*-pyrazole-1-carboxamidine. La seconde approche met à profit un réactif de guanidinylation comportant deux groupements protecteurs des amines, tel que la *N*,*N*'-di-(*t*-butyloxycarbonyl)-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine, ce qui permet l'obtention de l'unité guanidine simple en deux étapes : la guanidine est formée dans un premier temps sous une forme doublement protégée par des groupements Boc pour donner **39a** et **39b**, puis la déprotection est réalisée. Dans la littérature, les deux stratégies sont utilisées,[258–261, 268–270] mais la deuxième est souvent préférée car elle possède deux avantages :

— Le rendement global est généralement meilleur : les réactifs de guanidinylation di-carbamylés sont très activés, et la double déprotection des fonctions couramment utilisées, Boc ou Cbz, est quasi-quantitative.[261, 268]

— Les guanidines non carbamylées étant très fortement basiques, ces molécules sont difficiles à purifier par les méthodes habituelles de chromatographie. Au contraire, les guanidines doublement carbamylées n'ont pas de caractère basique et se comportent comme des molécules organiques classiques du point de vue des purifications. Elles sont donc des intermédiaires très intéressants.

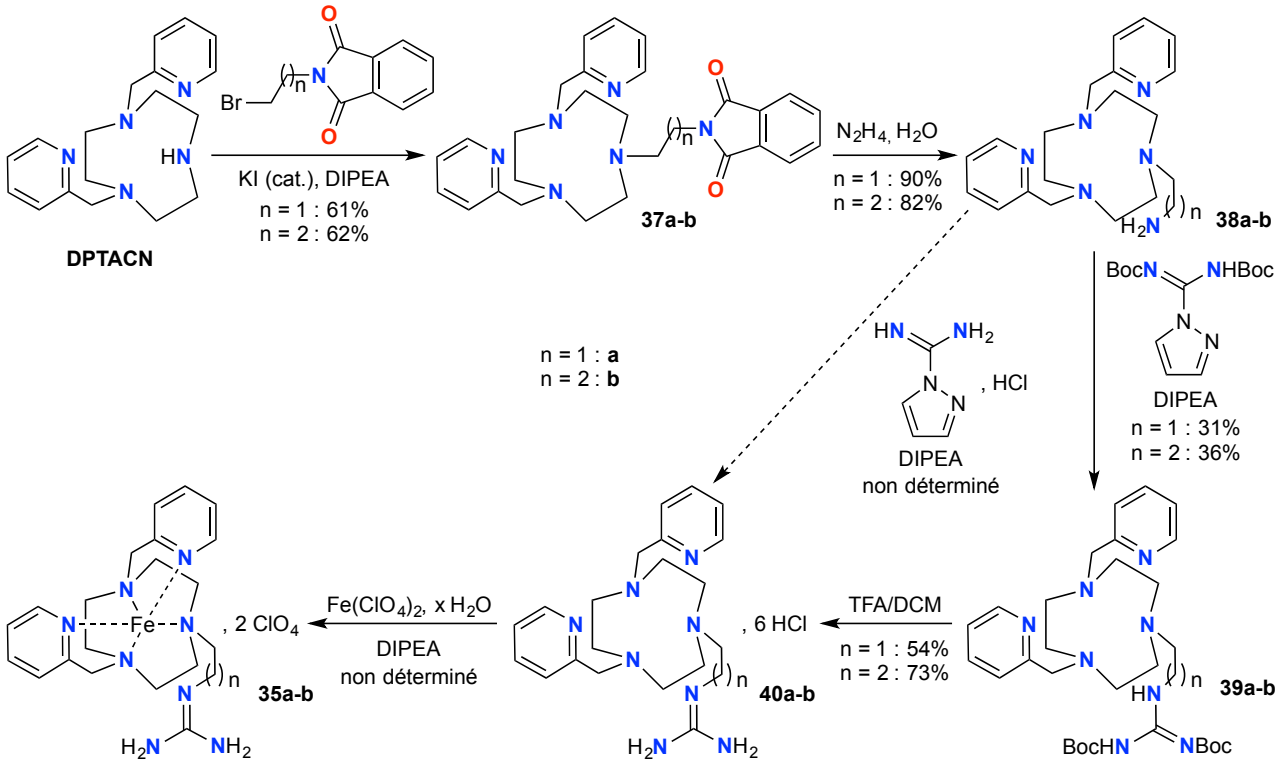


FIGURE 5.5 : Voie de synthèse des complexes **35a** et **35b**.

J'ai testé les deux voies de synthèse à partir de **38a**. La première stratégie m'a permis d'obtenir le produit **40a**, toutefois sa pureté n'était pas suffisante et complexation de ce ligand s'est montrée difficile à suivre. La deuxième approche a donné d'excellents résultats, si l'on ne tient pas compte du rendement. En effet, l'étape de guanidinylation est peu efficace. J'ai essayé d'optimiser les conditions réactionnelles : s'il est possible de parvenir à une conversion totale de **38a** et **38b** au regard des spectres de masse, seule une faible quantité de produit est isolée après chromatographie sur colonne. Il est possible que ces intermédiaires, qui sont des composés très polaires pouvant former de nombreuses liaisons hydrogène et possédant plusieurs fonctions basiques faibles, soient retenus sur les gels de silice et alumine de façon très importante, ou qu'ils se dégradent dans les conditions de purification. De plus, l'étape de déprotection des groupements Boc est loin d'être quantitative : une proportion non négligeable des ligands sous forme de chlorhydrate ne précipite pas, ce qui peut s'expliquer par la grande solubilité de ces molécules polyamines très polaires dans les solvants organiques. Des rendements réduits avaient aussi été obtenus pour des molécules similaires.[258, 259, 261] Néanmoins, **40a** et **40b** ont tout de même pu être obtenus en quantités suffisantes (de l'ordre de 200 mg) pour mener la suite de la synthèse.

J'ai alors réalisé la complexation des ligands en conditions dégazées à l'aide de perchlorate de fer(II) hydraté. Le contre-ion perchlorate, qui avait déjà été employé pour la synthèse de **10**,[197] est de grande taille, ce qui facilitera la cristallisation du complexe. La DIPEA a été utilisée pour déprotoner le ligand et permettre la chélation de l'ion fer. La conversion des ligands en complexes de fer(II) **35a** et **35b** a été observée par spectrométrie de masse : dans les deux cas, les pics attribués au ligand disparaissent totalement au profit de nouveaux pics correspondant au complexe désiré. Dans le cas de **35a**, j'ai observé un assombrissement de la solution : une espèce absorbant fortement a donc été formée. J'ai supposé qu'il s'agissait du complexe dans lequel la guanidine était coordinée sur l'ion métallique ; en effet, la coordination d'un ligand de type imine sur le complexe $Fe(DPTACN)^{2+}$ mène selon toute vraisemblance à la formation d'un complexe diamagnétique possédant une absorption importante autour de 400 nm (voir page 46). L'assombrissement n'a pas été observé pour **35b** ; de plus, la solution initialement jaune claire se colore progressivement en rouge si on ne la maintient pas sous atmosphère inerte : on pourrait être en présence d'un complexe au sein duquel la guanidine ne parvient pas à se coordiner, ce qui rend la sphère de coordination ouverte et l'oxydation du fer(II) en fer(III) possible.

Le complexe **35a** a pu être isolé et même cristallisé en petites quantités (moins de 10 mg). Le rendement de la dernière étape est alors de l'ordre de 10%, mais en l'absence de certitudes sur la pureté de l'échantillon, il est impossible de donner une valeur exacte. Malheureusement, je n'ai pas réussi à isoler **35b** : son oxydation partielle en un complexe de fer(III) au cours de la cristallisation est envisageable. Afin de résoudre ce problème, il serait intéressant de travailler en environnement strictement anaérobie et anhydre, dans une boîte à gants par exemple.

2.3 Étude du caractère magnétogénique du complexe 35a

La structure de **35a** à l'état solide a été obtenue par diffractométrie par rayons X sur un monocristal. Elle est présentée à la Figure 5.6A ; la guanidine est coordinée à l'ion fer(II) en formant un cycle chélate à 5 atomes, tout comme dans les complexes **31a** et **32a**.[258, 259] Les 6 ligands azotés adoptent une géométrie quasi-octaédrique et les 6 liaisons fer-azote ont une longueur moyenne de 2,00 Å : **35a** est donc, par analogie avec **5**, **8**, **15** et **18** (voir pages 42 et 53), un complexe diamagnétique à l'état solide. Afin de minimiser l'encombrement stérique, la guanidine subit une très légère torsion (l'angle dièdre est de 8 degrés) mais reste très proche de la planéité.

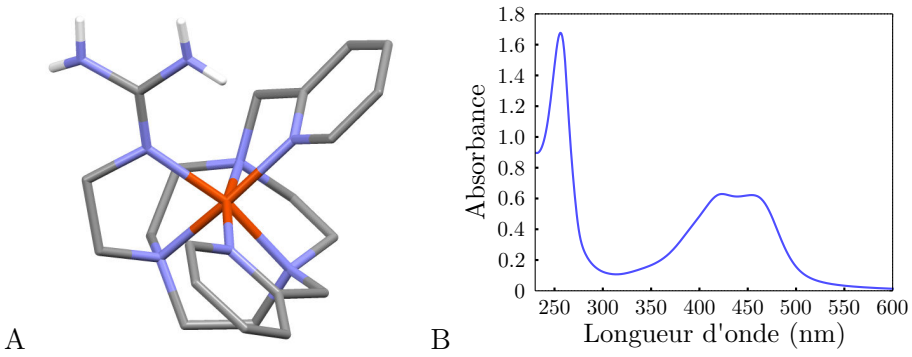


FIGURE 5.6 : A. Structure à l'état solide de **35a** obtenue par diffractométrie par rayons X sur un monocristal ; les atomes d'hydrogène du macrocycle et des groupements picolyles ainsi que les contre-ions perchlorate ne sont pas mentionnés pour faciliter la visualisation. B. Spectre d'absorption UV-visible de **35a** ; solvant : eau distillée (pH neutre) ; concentration : 0,2 mM ; température : 37°C.

La spectroscopie d'absorption UV-visible d'une solution aqueuse de **35a** de pH neutre fait apparaître une bande de transfert de charge métal-ligand double avec deux maxima d'absorption à respectivement 423 nm et 453 nm (Figure 5.6B). Le coefficient d'absorption molaire maximal, atteint à la longueur d'onde de 423 nm, est d'environ 3000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Le spectre a une allure proche de celle du spectre du complexe **11**, qui présentait aussi un épaulement sur la bande MLCT ainsi que des longueurs d'onde d'absorption maximale et coefficients d'absorption molaires similaires.[197] **35a** adopte manifestement un état diamagnétique pour un pH neutre : la guanidine est coordinée sur l'ion fer(II) central.

Le comportement magnétogénique de **35a** a été étudié, tout d'abord par spectrophotométrie : une titration pH suivie par absorption UV-visible a été réalisée (voir Figure 5.7). Comme je l'ai observé pour le complexe **35b** (voir ci-dessus), ces chélates de fer(II) semblent subir une oxydation rapide du centre métallique en fer(III) lorsque la sphère de coordination est ouverte ; afin de préserver l'intégrité du complexe lors du passage en milieu acide, j'ai donc essayé de me placer dans des conditions anaérobies en faisant buller de l'argon dans la cuve entre chaque mesure. Lorsque le pH de la solution est élevé (au-dessus de 7,5), l'absorption à 423 nm est maximale ; la guanidine est coordinée sur l'ion fer(II) de façon quantitative et le complexe est présent sous une forme diamagnétique. La diminution du pH s'accompagne d'une réduction de l'absorption : la décoordination de la guanidine se produit progressivement pour donner **35a'** (voir Figure 5.8) et s'accompagne du changement d'état de spin, à l'origine de la disparition de l'intense bande MLCT. Un palier est atteint à partir d'un pH d'environ 4,5. La variation de l'absorbance est d'amplitude telle qu'elle peut être vue à l'œil nu : la solution contenue

dans la cuve de spectroscopie se décolore, passant du jaune-orangé au jaune ténu ; la même évolution avait eu lieu lors de l'activation de la molécule **8**.[144, 190] Enfin, la présence d'un point isobestique pour la longueur d'onde 365 nm atteste de la transformation de **35a** en **35a'** sans qu'aucune autre espèce absorbante ne soit formée.

Lors de l'ajout d'hydroxyde de sodium pour revenir en conditions neutres, la coordination a été observée à nouveau par le retour à une absorption importante : le système est réversible. Un nouveau palier est atteint à partir d'un pH de 7,5.

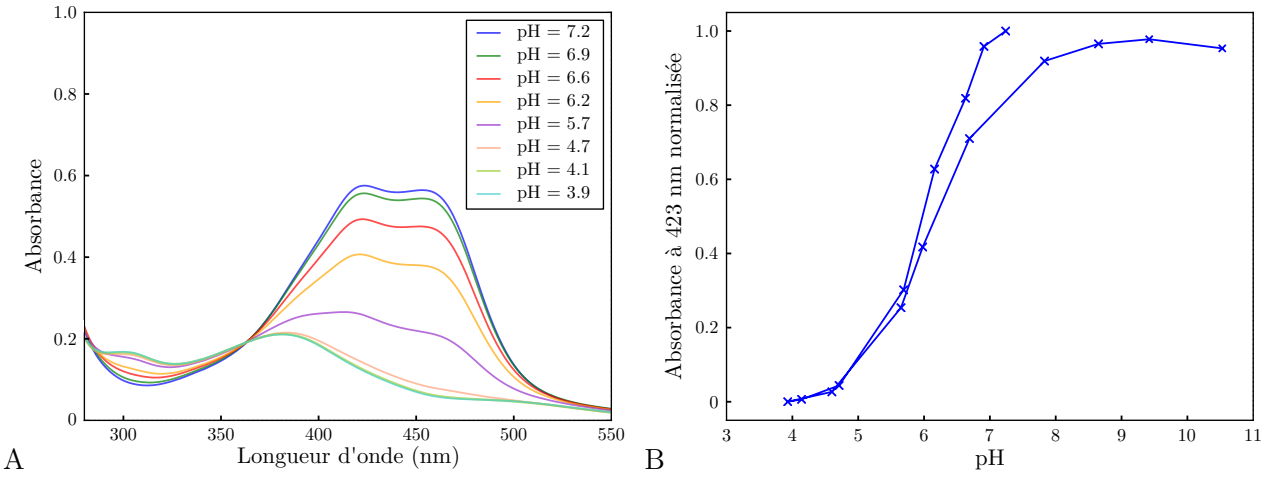


FIGURE 5.7 : Titration pH d'une solution de **35a** suivie par spectrométrie d'absorption UV-visible. A. Spectres mesurés pour différents pH au fur et à mesure de l'acidification de la solution. B. Tracé de l'absorbance maximale normalisée (λ_{max} = 423 nm) en fonction du pH au cours de l'acidification puis de la basification. Solvant : eau distillée ; concentration : 0,2 mM ; température ambiante.

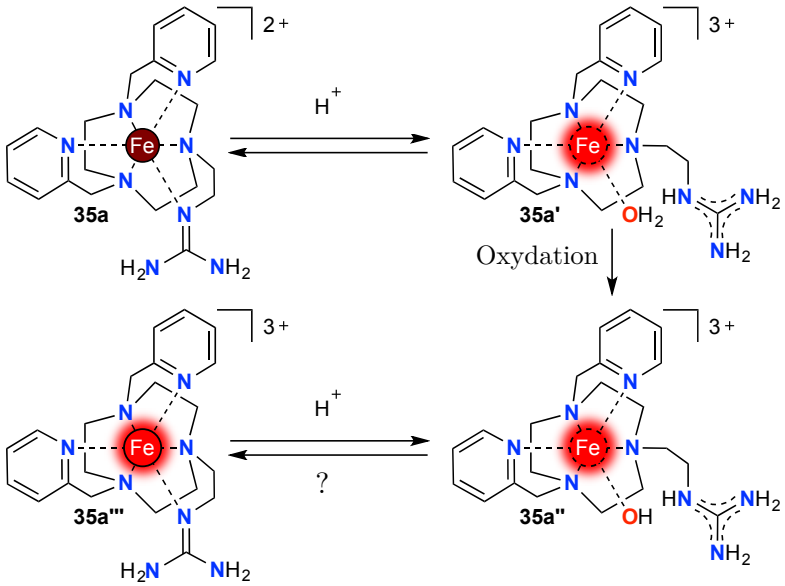


FIGURE 5.8 : Équilibre de coordination de la guanidine de **35a** observé par spectrométrie UV-visible (ligne du haut ; le pKa estimé est d'environ 6,1) et dégradation potentielle par oxydation du complexe **35a'** en milieu acide.

À partir des valeurs mesurées, le pKa de coordination peut être estimé à 6,1 ; cette valeur est légèrement supérieure, quoique très proche, des valeurs de 5,9 rapportées pour les complexes **31a**, **32a** et **33** et mesurées elles aussi par spectrophotométrie (voir Figure 5.2). Le remplacement du cation métallique Cu^{2+} ou Zn^{2+} par un ion fer(II) et la coordination de deux groupements picolyles supplémentaires semblent donc déstabiliser légèrement la formation du cycle chélate. Parmi les raisons possibles (une

moins grande affinité du fer(II) pour le ligand guanidine, une influence défavorable du champ de ligand important exercé par les pyridines, une gène stérique entre la guanidine et les pyridines), je privilégie la dernière. En effet, la torsion de la guanidine coordinée dans la structure à l'état solide est dans notre cas de 8°, à comparer aux seulement 2° au sein du complexe **31a**[258] : la coordination de la base au sein de **35a** nécessite une torsion plus importante, ce qui entraîne un plus grand coût énergétique.

J'ai pu observer la coordination et la décoordination de la guanidine en fonction du pH pour une solution de concentration 0,2 mM. Toutefois, il est essentiel de vérifier si la coordination a bien lieu aussi pour les concentrations auxquelles les sondes magnétogènes sont utilisées ; la faible sensibilité de l'IRM oblige en effet à disposer de solutions millimolaires afin d'obtenir une variation suffisante du temps de relaxation longitudinale. Le comportement de **11** avait été étudié par le suivi du T_1 d'une solution aqueuse à 4 mM en fonction du pH (voir Figure 2.10B) : l'acidification s'accompagnait d'une diminution drastique du T_1 de 2,2 secondes environ (valeur habituelle pour une solution de molécules diamagnétiques) à 330 ms.[197] Cette variation importante, due au changement quantitatif d'état de spin du complexe, avait été attribuée à la décoordination de l'amidine suite à sa protonation.

J'ai réalisé un suivi du T_1 d'une solution de **35a** en fonction du pH (voir Figure 5.9), pour un champ magnétique de 7 T et une concentration de 4 mM. Ici aussi, j'ai essayé de priver le milieu de dioxygène en dégazant la solution entre chaque mesure. En conditions légèrement basiques, le T_1 vaut environ 2 s, un résultat proche de celui de **11** : la guanidine est coordinée et le complexe est diamagnétique. Cependant, l'acidification de la solution ne s'accompagne pas d'une baisse du T_1 aussi importante qu'attendue : le temps de relaxation longitudinale ne descend pas en-dessous de 1 seconde, même en conditions très acides (pH de l'ordre de 3) ; la solution reste dans un état de transition de spin et n'atteint pas l'état paramagnétique désiré ($\mu_{\text{eff}} \simeq 5\,\mu_B$). De plus, la solution à l'origine orange soutenue ne se décolore pas, comme lors de la titration par spectrophotométrie, mais tourne au rouge clair. Ce comportement a été observé de façon répétée ; d'après ces observations, la protonation et la décoordination de la guanidine ont lieu, mais l'ouverture de la sphère de coordination s'accompagne d'une dégradation du complexe **35a'**.

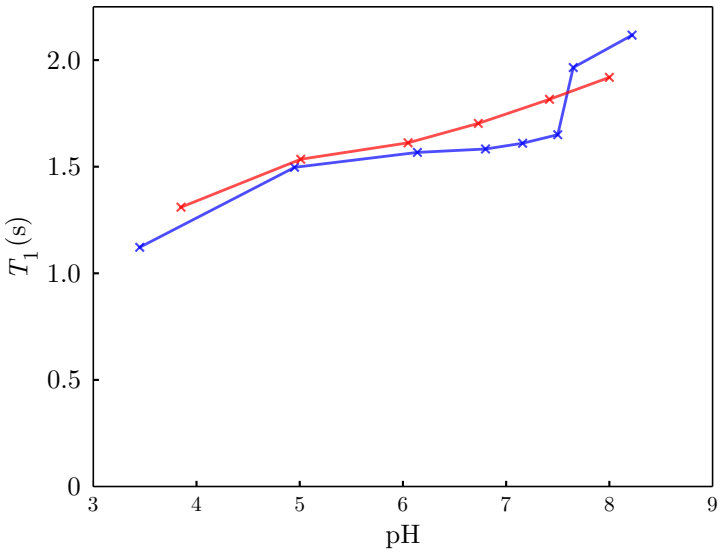


FIGURE 5.9 : Titration pH d'une solution de **35a** suivie par relaxométrie. Solvant : eau distillée ; concentration : 4 mM ; champ magnétique : 7 T ; température ambiante ; les deux courbes correspondent à deux expériences indépendantes.

J'avais noté précédemment que le retour à un pH neutre entraînait la fermeture de la sphère de coordination et la restauration d'un état diamagnétique. Cette situation ne se produit pas ici : la basification du milieu ne modifie ni le T_1, qui demeure autour de 1 seconde, ni la couleur de la solution, qui reste rouge vive. Il apparaît ainsi que le complexe **35a'** n'est pas stable en milieu aqueux acide à la concentration de 4 mM, et que son produit de dégradation n'est pas capable de revenir à un état diamagnétique lorsque le pH est réhaussé.

Ce comportement n'est pas en soi problématique : dans le cadre d'une utilisation "normale", le complexe **35a** sera produit par activation puis auto-effondrement d'une sonde magnétogène, et transformé en **35a'** par acidification du milieu pour abaisser le T_1 et "révéler" la conversion de la sonde. Augmenter à nouveau le pH de la solution ne présente dans ce cadre aucune utilité puisque cela correspond à "masquer" le signal. Toutefois, il est tout de même intéressant de comprendre pourquoi et comment **35a'** se dégrade à haute concentration. En effet, cette dégradation pourrait s'accompagner d'une toxicité *in vivo*, limitant l'usage des sondes magnétogènes possédant une guanidine (même si **35a** en tant que telle ne peut être utilisée car son pKa n'est pas assez élevé). Par ailleurs, l'évolution de **35a'** occasionne une réponse magnétogénique moins intéressante qu'attendue puisque les complexes restent dans un état de transition de spin.

L'analyse par spectrométrie de masse d'une solution de **35a** en milieu acide montre la présence du complexe **35a"**, forme oxydée de **35a'** où un ion hydroxyde coordine le cation métallique fer(III). De plus, l'ajout d'une petite quantité d'ascorbate de sodium, un réducteur communément utilisé comme conservateur alimentaire, entraîne un changement de couleur immédiat de la solution du rouge clair au jaune clair, ainsi qu'une disparition de l'espèce fer(III) sur le spectre de masse. Il semble donc qu'en milieu acide, le cation métallique fer(II) du complexe **35a'**, dont la sphère de coordination est ouverte, s'oxyde en fer(III), par exemple du fait de la présence de dioxygène dissous dans l'eau. L'oxydation de **35a'** en **35a"** peut rendre le retour à un état bas spin impossible pour deux raisons :

— Le passage du fer(II) au fer(III) modifie les propriétés de coordination de la guanidine. En effet, l'ion fer(III) est connu pour être très oxophile ; de nombreux complexes de fer(III) comportant des ligands oxygénés, comme des anions oxalates ou acétylacétonates, sont décrits et utilisés comme références en chimie de coordination.[119] De plus, un ion hydroxyde est coordiné sur le cation fer(III) ; ce ligand bénéficie d'une interaction électrostatique favorable.[271] La coordination de la guanidine nécessite de déplacer ce ligand, ce qui est plus difficile que le remplacement d'une molécule d'eau électroneutre. Ainsi, la coordination de la guanidine au fer(III) peut être beaucoup plus délicate que dans le cas d'un complexe de fer(II), voire ne jamais se produire en solution aqueuse.

— L'oxydation du centre métallique change l'état de spin du complexe. Les complexe $Fe(TPTACN)^{3+}$ et $[Fe(DPTACN)Cl]^{2+}$ sont tous deux paramagnétiques en solution, avec un moment magnétique μ_{eff} égal à 2,71 μ_B pour le premier[184] et 3,58 μ_B pour le second.[272] L'écart entre ces deux complexes de fer(III) est donc beaucoup plus faible qu'entre les deux équivalents fer(II). La coordination de la guanidine au sein de **35a"** pour donner **35a"'** (Figure 5.8), si elle a lieu, peut donc n'entraîner qu'un faible changement d'état de spin et non le retour attendu à un état diamagnétique.

Il est possible que la dégradation ait été observée lors de la titration pH par relaxométrie, et non pendant l'étude par spectrophotométrie, car le temps nécessaire à chaque mesure est beaucoup plus long dans le premier cas que dans le second (environ huit minutes pour le suivi par T_1, seulement une pour le suivi par absorption UV-visible). Malheureusement, il est matériellement impossible de réaliser les mesures de T_1 plus rapidement. Une solution pourrait être de réaliser la titration en présence d'un réducteur, afin de maintenir l'ion métallique sous forme de fer(II). Ce réducteur doit respecter le cahier des charges suivant :

— il doit être soluble dans l'eau et stable dans le milieu aqueux à tous les pH étudiés et durant tout le temps que durera l'analyse ;

— il ne doit pas mener à la dégradation du complexe ;

— il ne doit pas se coordiner au centre métallique ;

— enfin, il ne doit pas présenter un caractère paramagnétique sous ses formes oxydée et/ou réduite pour ne pas interférer avec la mesure de T_1.

La tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) pourrait convenir. Cette molécule utilisée pour la réduction des ponts disulfures ne s'oxyde que lentement dans l'eau, même en conditions acides[273] ; son

atome de phosphore encombré et ses trois fonctions carboxylate ne devraient pas endommager le complexe, ni se coordiner sur le fer(II). De plus, aussi bien la TCEP que son oxyde sont des molécules organiques diamagnétiques. La titration pH de **35a** suivie par relaxométrie en présence d'un excès de TCEP devrait permettre de freiner l'oxydation du fer(II) en milieu acide et de caractériser de façon satisfaisante le caractère magnétogénique de ce complexe.

2.4 Conclusions

J'ai préparé les complexes **35a** et **35b** ; si **35b** n'a pas pu être isolé, j'ai obtenu des monocristaux de **35a**, ce qui m'a permis de mener une étude plus poussée de ce complexe.

Les deux complexes présentent en solution un comportement très similaire à celui des complexes **31a** et **31b** (Figure 5.2) dont ils sont proches structurellement. La guanidine de **35a**, liée au macrocycle selon un lien éthyle, est capable de se coordiner au cation métallique selon un processus réversible de pKa de l'ordre de 6 (Figures 5.7 et 5.8). Cette coordination est aussi présente à l'état solide (Figure 5.6A). Au contraire, au sein du complexe **35b**, aucune coordination de la guanidine n'a été observée.

Ces résultats sont conformes à nos prévisions : ils indiquent que **35a** ne pourra pas servir de plateforme pour la conception de sondes magnétogènes opérant en milieu physiologique, car le pKa de décoordination de la guanidine n'est pas assez élevé. Le caractère paramagnétique de **35b** en solution aqueuse quel que soit le pH, s'il venait à être vérifié, est par contre très intéressant. Il faudra toutefois confirmer si son analogue **36b**, muni d'un déclencheur, adopte quant à lui un état diamagnétique en solution aqueuse, ce qui ferait de la paire **35b**/**36b** une référence pour l'élaboration de sondes pour l'imagerie *in vivo*. Enfin, il est plaisant de constater que **35a** possède une réponse magnétogénique similaire au complexe **11** (voir Figure 2.10), simplement modifiée dans les proportions prévues (le pKa de coordination augmente de 1,5 unité) par le remplacement de l'amidine en une guanidine.

Si les propriétés de coordination de la guanidine sont très proches au sein de **31a-b** et **35a-b**, les complexes diffèrent par contre par leur capacité à s'oxyder en solution aqueuse. Les complexes de cuivre(III) sont en effet très rares dans le milieu aqueux,[119] ce qui explique qu'aucune oxydation de **31a-b** n'ait été observée.[258] En revanche, le maintien d'un complexe de fer(II) sous ce degré d'oxydation, dans l'eau et en présence de dioxygène dissous, est habituellement difficile, en particulier lorsque la sphère de coordination est ouverte.[201] Ainsi, **35a'** et **35b** s'oxydent de façon notable, ce qui a pour effet de modifier leur état de spin et potentiellement d'entraîner la production de radicaux libres toxiques pour le milieu biologique. Avant d'envisager l'utilisation *in vivo* de complexes comportant une fonction guanidine, il sera primordial d'évaluer les effets de ces complexes sur les cellules et de vérifier que leur toxicité est réduite.

On peut se demander pourquoi les complexes comportant une guanidine s'oxydent avec une telle facilité dans des conditions aqueuses dégazées, alors que **11** n'avait pas démontré cette aptitude à s'oxyder lors de la titration. Même si Fayçal Touti n'a pas rapporté l'oxydation du complexe **11'** en milieu acide, il a noté en revanche la décoordination en milieu basique prononcé (pH $>$ 11) de l'amidine au profit d'un ion hydroxyde pour donner **11"**, qui mène à l'oxydation du fer(II) en fer(III) et à la formation de **11"** (voir Figure 5.10).[144] Il est d'ailleurs possible que le même comportement se produise pour **35a'**, quoique à un pH différent. **11'** est donc tout de même capable de s'oxyder, mais ce processus est plus difficile que dans le cas de **35a'**. La différence peut provenir de la capacité de la guanidine protonée à promouvoir l'oxydation du centre métallique fer(II) par rapport à l'amidine cyclique : avec ses nombreux sites disponibles pour des liaisons hydrogène dus à l'absence de substituants, la guanidine de **35a'** peut stabiliser la coordination de nombreuses espèces sur le fer(II), dont des oxydants comme le dioxygène. Au contraire, l'amidine protonée de **11'** est beaucoup moins capable d'interagir avec d'autres molécules environnantes et n'a donc pas une grande influence vis à vis du centre métallique.

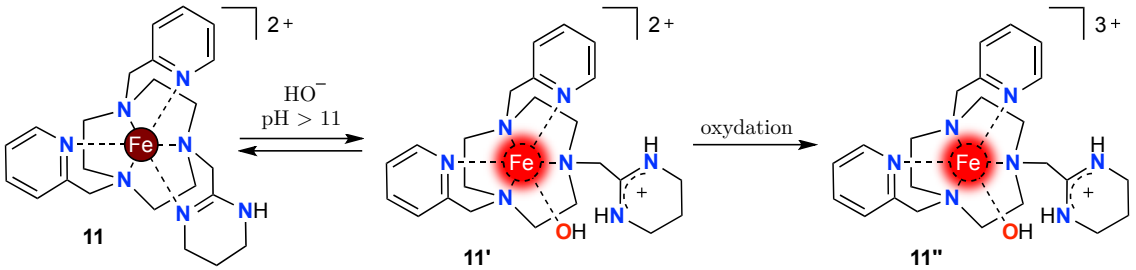


FIGURE 5.10 : Oxydation de **11'** en milieu basique, telle que rapportée par Fayçal Touti.[144]

3 Synthèse des complexes 36a et 36b contenant une guanidine carbamylée

Au vu des résultats intéressants que présentent les complexes **35a** et **35b**, il est intéressant de préparer et étudier leurs analogues **36a** et **36b**, au sein desquels la fonction guanidine est carbamylée par un groupement déclencheur. Je détaillerai tout d'abord une première synthèse des deux ligands correspondants, puis les essais de complexation que j'ai menés et qui ne m'ont pas permis d'isoler les complexes cibles. J'exposerai enfin une nouvelle voie de synthèse qui je l'espère donnera accès à **36a** et **36b**, et nous laissera conclure sur l'intérêt des guanidines pour la conception de sondes magnétogènes destinées à l'imagerie *in vivo*.

3.1 Première voie de synthèse des ligands

Les complexes **36a** et **36b** ont une structure identique à celle de **35a** et **35b**, à l'exception du groupement *p*-nitrobenzyloxycarbonyle substituant la guanidine. Leur synthèse sera donc *a priori* très proche et ne différera que par la voie de formation de la guanidine carbamylée. En premier lieu, je vais discuter la synthèse de cette unité basique substituée ; je présenterai ensuite la synthèse des ligands **45a** et **45b** (voir Figure 5.11).

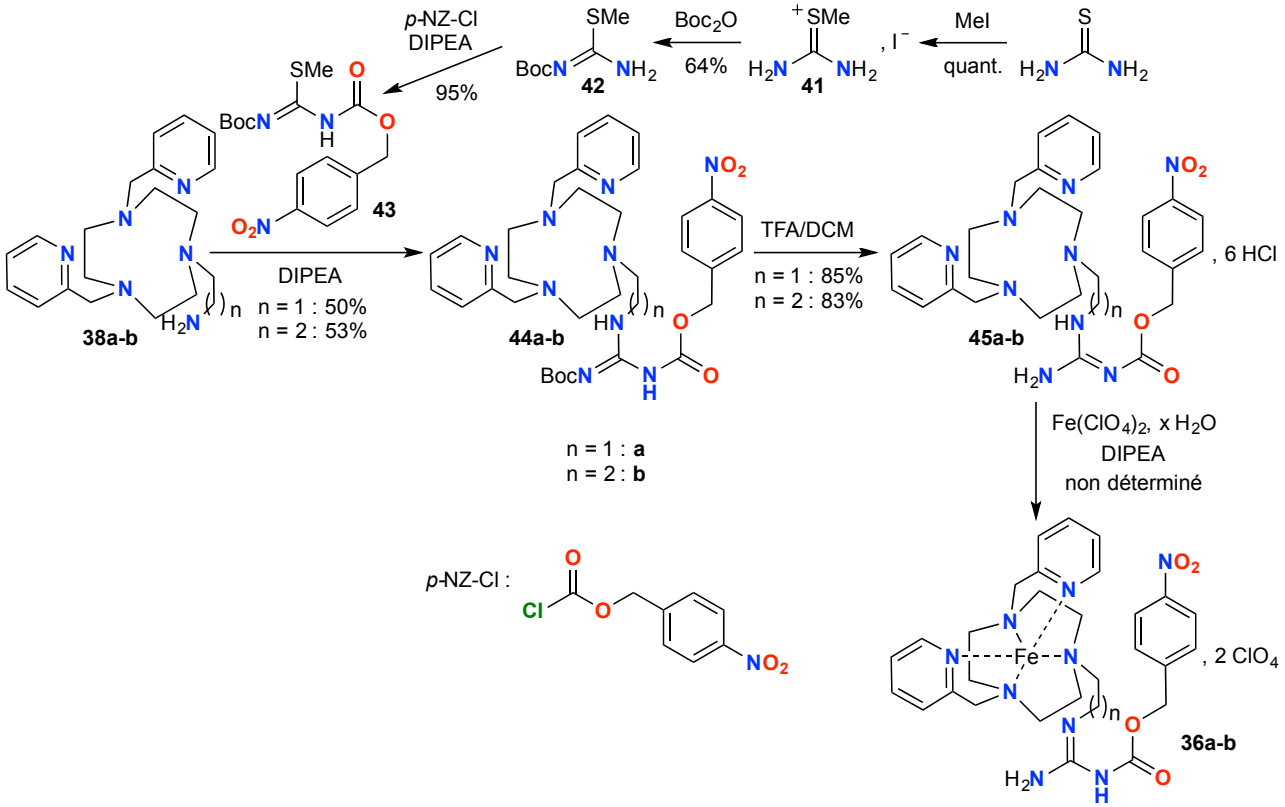


FIGURE 5.11 : Voie de synthèse des complexes **36a** et **36b**.

3.1.1 Préparation de la fonction guanidine mono-carbamylée

Deux stratégies sont possibles pour la préparation de guanidines substituées par un seul groupement carbamyle et incluses dans une molécule organique (voir page 85) :

— La transformation directe de l'amine primaire correspondante en guanidine mono-carbamylée au moyen d'un réactif de guanidinylation mono-substitué ; cependant, ces unités sont habituellement de très mauvais électrophiles.[268] Or, la synthèse de guanidines di-carbamylées, comme **39a** et **39b** (Figure 5.5), est déjà difficile alors que cette réaction est supposée être très efficace. Le risque est donc grand que l'utilisation d'un réactif de guanidinylation mono-substitué se solde par de très faibles rendements.

— La synthèse en deux étapes de la guanidine mono-carbamylée en passant par un intermédiaire di-substitué. Un réactif de guanidinylation asymétrique comportant le groupe carbamyle d'intérêt et un groupement protecteur est d'abord mis à réagir avec l'amine primaire ; cette étape devrait être facile. Dans un deuxième temps, le groupement protecteur est retiré. Cette séquence réactionnelle est la plus couramment utilisée dans la littérature[262, 274, 275] ; elle permet une préparation efficace de la fonction désirée.

J'ai choisi d'utiliser la seconde stratégie. Elle requiert de préparer un réactif de guanidinylation substitué par un Boc, qui jouera le rôle de groupement partant, et une fonction *p*-nitrobenzyloxycarbonyle. Parmi les différents groupements partants que l'on peut envisager (Figure 5.4), les plus courants sont le 1*H*-pyrazole et le méthanethiol ; toutefois, il a été rapporté que les 1*H*-pyrazole-1-carboxamidine di-substituées de façon asymétrique sont assez instables, ce qui rend leur isolement délicat et réduit leur efficacité pour la suite de la synthèse.[274] Les *S*-méthylisothiourées sont quant à elles stables et de préparation plus aisée ; ce sont elles que j'utiliserai.

3.1.2 Synthèse des ligands 45a et 45b

J'ai mené la synthèse des ligands **45a** et **45b** de manière analogue à celle des molécules **40a** et **40b** (voir Figure 5.11). Le réactif de guanidinylation **43** a été obtenu à partir de la thiourée en trois étapes et avec de bons rendements. La thiourée est d'abord alkylée par l'iodométhane pour donner **41**, puis mono-protégée par le di-carbonate de di-*tert*-butyle en **42** ; la carbamylation à l'aide du chloroformiate de *p*-nitrobenzyle fournit **43**. Ce synthon a été mis à réagir avec les amines primaires **38a** et **38b**, dont j'ai décrit la synthèse précédemment (Figure 5.5). Les guanidines di-carbamylées **44a** et **44b** sont obtenues avec des rendements moyens, quoique supérieurs à ceux de la synthèse de **39a** et **39b**. Enfin, la déprotection du groupement Boc a été réalisée à l'aide de conditions habituelles pour donner les ligands **45a** et **45b** de façon très efficace.

3.2 Tentatives de complexation et discussion sur la structure des ligands

Muni du ligand **45b**, j'ai tenté sa complexation dans les mêmes conditions que j'avais utilisées pour **40a** et **40b**. Après avoir dissout le ligand dans de l'éthanol anhydre, j'ai dégazé la solution et ajouté successivement un équivalent de perchlorate de fer(II) hydraté puis une base azotée, la DIPEA. Comme précédemment, la conversion de **45b** en **36b** a été observée par spectrométrie de masse : les pics attribués au ligand disparaissent totalement au profit de nouveaux pics correspondant au complexe désiré. Toutefois, le complexe présente le même comportement que **40b** : la solution de **36b** est jaune claire et devient rouge claire si on ne la préserve pas du dioxygène. J'ai supposé que la guanidine carbamylée n'était pas coordinée sur l'ion fer(II), rendant le complexe paramagnétique, et que la sphère de coordination ouverte permet l'oxydation du complexe, comme je l'ai observé précédemment. L'ajout d'une petite quantité d'acétonitrile s'accompagne d'un assombrissement de la solution : la coordination de ce ligand exerçant un champ important stabilise le complexe sous sa forme Fe(II) et entraîne le basculement vers un état diamagnétique. J'ai alors pu isoler **36b**. Malheureusement, les tentatives de cristallisation ont toutes été infructueuses.

L'étude de **36b** en solution aqueuse a été menée. On s'attend au rapide déplacement de l'acétonitrile par une molécule d'eau, plus compétitive car présente en plus grande concentration (55 M), ou par la guanidine carbamylée, car la formation d'un cycle chélate à six atomes est très favorable. La solution adopte rapidement une couleur rouge claire en conditions acides ou neutres : la sphère de coordination est manifestement ouverte et le cation métallique s'oxyde en fer(III), de la même manière qu'au sein de **35a'** (voir ci-dessus). Le passage en milieu basique s'accompagne d'un faible assombrissement de la solution, mais la couleur rouge prédomine toujours. **36b** semble donc être dans un état paramagnétique en solution et le fer y est au degré d'oxydation +III : la guanidine carbamylée ne parvient pas à se coordiner sur le centre métallique, ou sa coordination ne permet pas l'adoption d'un état diamagnétique.

Le comportement de **36b** en solution n'était pas facilement prévisible : la guanidine de **35b** étant décoordinée dans le milieu aqueux quel que soit le pH, il était impossible de savoir si sa carbamylation suffisait pour permettre sa coordination en conditions neutres. Au contraire, on s'attend à ce que la sphère de coordination de **36a** soit fermée dans le milieu aqueux (voir ci-dessus). J'ai décidé de préparer ce complexe de la même manière que **36b** pour être en mesure de comparer les deux molécules fiablement.

Or, à ma grande surprise, **36a** présente le même état de spin que **36b** en toutes circonstances, aussi bien lors de la complexation en solvant organique que dans le milieu aqueux. Je me suis donc interrogé sur la structure de ces complexes, et notamment sur la capacité de la guanidine carbamylée à coordiner l'ion fer(II) et à rendre le complexe diamagnétique.

Au sein des complexes **31a** et **32a** (Figure 5.2), la guanidine se coordine à l'ion cuivre(II) via un atome d'azote de type imino. Pour notre complexe **35a**, la longueur de la liaison fer-azote dans la structure à l'état solide (Figure 5.6) suggère le même motif de coordination. La guanidine protonée, dans laquelle les trois atomes d'azote sont équivalents et les électrons π tous délocalisés, subit donc une réorganisation électronique lors de sa coordination. L'azote N1, qui est l'atome qui se coordine (afin que se forme un cycle chélate à cinq atomes plus favorable), adopte un caractère imino, les deux atomes d'azote restants prennent quant à eux un caractère amino (voir Figure 5.12A).

Nous avions implicitement fait l'hypothèse que le même phénomène allait se produire pour les complexes **36a** et **36b**. Nous supposions que quelle que soit l'organisation des électrons π au sein de la guanidine carbamylée protonée, la coordination sur le cation métallique via l'atome d'azote N1 (pour former un cycle chélate à cinq ou six atomes) allait entraîner un réarrangement électronique menant à un caractère imino au niveau de N1 et amino au niveau de N2 et N3 (voir Figure 5.12B). Or, sous sa forme libre, une guanidine mono-carbamylée a une répartition des électrons π bien définie : l'atome d'azote carbamylé est celui qui possède le caractère imino, car la double liaison carbone-azote ainsi formée permet une délocalisation de la double liaison carbone-oxygène adjacente du carbonyle et sa stabilisation. Il est donc malheureusement probable que la coordination de la guanidine mono-carbamylée au fer(II) ne modifiera pas cette répartition électronique (cas du haut). La coordination ne permettra alors pas un changement d'état de spin :

- si la coordination a lieu via l'atome d'azote N1, celui-ci étant de caractère amino, il n'exerce pas un champ de ligand suffisant pour que le complexe adopte un état diamagnétique (cas du milieu).
- si la coordination a lieu via l'atome d'azote N3, le cycle chélate formé comporte alors 7 (cas de **36a**) ou 8 atomes (cas de **36b**) ; même si N3 a un caractère imino, le champ de ligand qu'il exerce alors n'est pas assez grand pour permettre le basculement vers un état bas spin (cas du bas). De plus, une gêne stérique importante peut alors avoir lieu entre le groupement carbamyle et le reste du complexe, notamment au niveau d'une des pyridines, ce qui rend ce motif de coordination improbable.

Afin que la coordination de la guanidine carbamylée au fer(II) puisse se produire et rendre le complexe diamagnétique, il faut ainsi "obliger" l'azote N1 à adopter un caractère imino, et N2 comme N3 à prendre un caractère amino. Il est donc indispensable de synthétiser de nouveaux ligands au sein

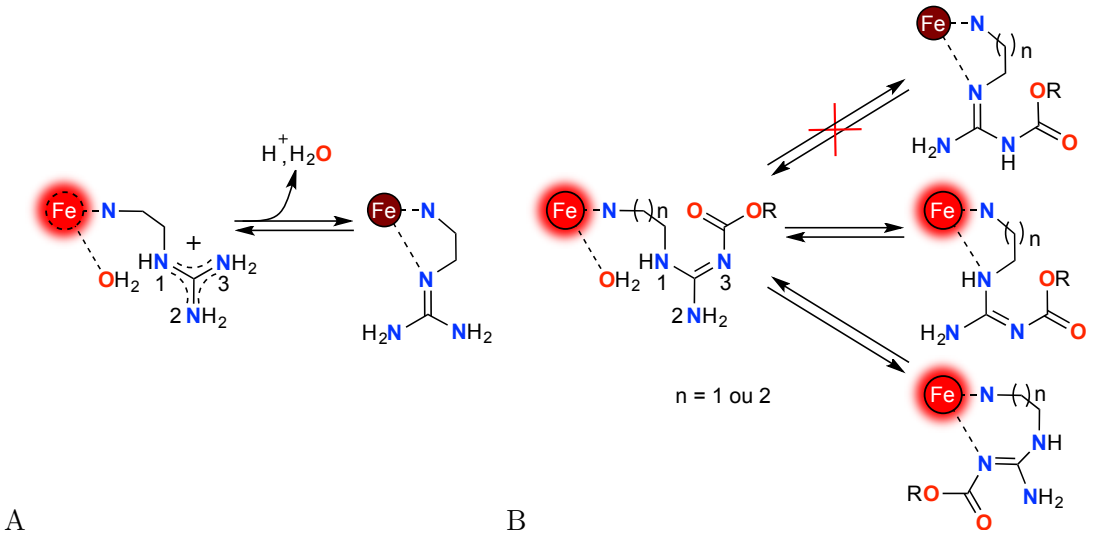


FIGURE 5.12 : Motifs de coordination d'une guanidine simple (A) et mono-carbamylée (B) et conséquence sur l'état de spin du complexe de fer(II) ; R désigne un groupement alkyle.

desquels les atomes d'azote de la guanidine ont précisément cette répartition.

3.3 Nouvelle voie de synthèse des ligands

Après avoir compris pourquoi les ligands **45a** et **45b** ne permettent pas la coordination de la guanidine carbamylée selon le motif désiré, j'ai cherché à concevoir de nouveaux ligands pour lesquels la coordination devrait avoir lieu de façon satisfaisante. J'ai identifié les critères suivants :

— Le seul moyen de garantir un caractère amino pour l'azote N3 est de le substituer par un groupement alkyle ; la formation d'une double liaison au niveau de cet atome obligerait alors l'azote à être chargé positivement, ce qui est très défavorable.

— L'atome d'azote N2 devrait porter dans l'idéal deux substituants, là aussi pour rendre son caractère amino certain. Toutefois, cette double substitution n'est peut-être pas indispensable : les électrons π étant délocalisés seulement entre N1 et N2 qui sont deux atomes d'azotes équivalents, la coordination de la guanidine au niveau de N1 pourrait suffire à établir un caractère imino sur N1 sans qu'il soit nécessaire de le forcer en di-substituant N2.

Cette problématique de coordination via un azote de type imino avait déjà été rencontré pour la molécule **10** (Figure 2.10A) : la substitution, via le cycle pyrimidine de l'amidine, de l'azote portant le carbamyle oblige l'autre atome d'azote à adopter un caractère imino ; c'est ce dernier qui se coordine sur l'ion fer(II). Néanmoins, la présence de trois atomes d'azote dans notre cas complexifie la situation. Par analogie avec le complexe **10**, j'ai proposé deux nouvelles structures et leur voie de synthèse (voir Figure 5.13).

La première guanidine possède un cycle imidazolidine ; l'atome d'azote N3 est ainsi di-substitué, mais N2 ne l'est qu'une seule fois. La voie de synthèse est directe : l'amine primaire est mise à réagir avec la thiourée asymétrique (préparée en deux étapes depuis la 2-imidazolidinethione), puis le groupement protecteur est déprotégé. La seconde guanidine présente la même structure, à l'exception du substituant méthyle.

Si la première cible devrait être préparée de façon efficace, car cette séquence réactionnelle a déjà fait ses preuves pour la synthèse de **45a** et **45b**, il n'est pas certain que la coordination via l'atome d'azote N1 ait lieu de façon satisfaisante (voir ci-dessus). Au contraire, la deuxième cible devrait présenter le motif de coordination désiré, à condition toutefois que le groupement méthyle ne génère pas de gêne

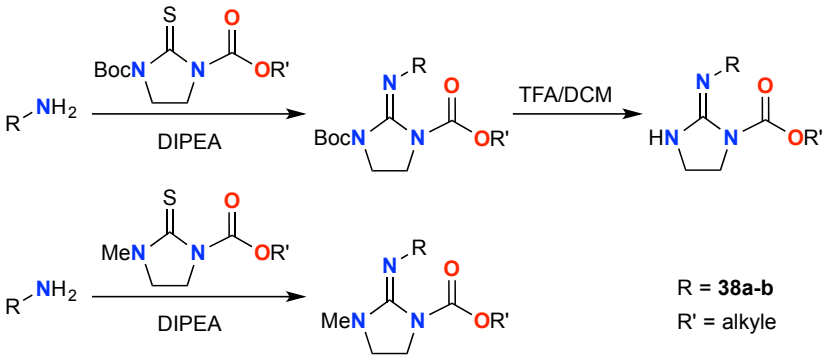


FIGURE 5.13 : Nouvelles guanidines carbamylées, et leur voie de synthèse, proposées pour permettre l'adoption d'un état diamagnétique lors de la coordination au sein d'un complexe de fer(II).

stérique trop importante vis à vis d'une des deux pyridines ; cependant, sa synthèse risque d'être plus délicate car elle fait intervenir une thiourée mono-carbamylée.

J'ai débuté la synthèse de ces deux cibles en menant tout d'abord des essais avec une amine simple, la butylamine. Si je n'ai pas encore réussi à préparer la thiourée di-substituée de façon asymétrique ou les deux guanidines, il s'agit à mon avis d'un objectif atteignable rapidement. Néanmoins, les thiourées sont décrites dans la littérature comme moins réactives que les *S*-méthylisothiourées : je devrai peut-être employer des conditions réactionnelles plus dures que pour la synthèse de **44a-b** afin de mener cette séquence à terme. Notamment, l'usage de sels métalliques comme le chlorure de mercure(II) ou le chlorure de cuivre(II) risque d'être indispensable. Une fois les ligands obtenus, il sera alors très intéressant de réaliser leur complexation afin d'observer quel motif de coordination adopte la guanidine et sous quel état de spin sont présents les complexes.

Conclusion sur les sondes magnétogènes

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai travaillé sur la conception de nouvelles sondes magnétogènes pour visualiser des activités enzymatiques par IRM. J'ai poursuivi les deux stratégies qui avaient été initiées dans l'équipe : la magnétogénèse par rupture d'une liaison covalente d'une part, dont profitent les complexes adoptant une architecture Katritzky, et la génération d'un moment magnétique par protonation d'un ligand d'autre part, qui était illustrée par les complexes comportant une amidine. J'ai essayé de rapprocher ces deux approches du monde biologique, notamment en préparant puis étudiant des molécules utilisables dans un contexte *in vivo* et/ou apportant des informations concrètes sur le vivant. Par ailleurs, j'ai tenté d'approfondir les connaissances de l'équipe sur nos molécules en m'intéressant à des caractéristiques que nous n'avions pas encore examinées, afin de mieux saisir les forces et faiblesses de nos complexes et de réfléchir à des solutions pour les rendre plus efficaces.

Un premier aspect de mon travail a été la synthèse puis l'évaluation de nouveaux complexes basés sur l'architecture Katritzky. M'appuyant sur les résultats préliminaires obtenus par Fayçal Touti, j'ai pu développer une nouvelle gamme de molécules dérivées des composés parents. J'ai ensuite investigué leurs propriétés physico-chimiques, et notamment leur capacité à acquérir un moment magnétique en réponse à un stimulus chimique, l'hydrogénation catalytique. J'ai pu identifier un complexe, **16**, dont la magnétogénèse a lieu de façon plus rapide que la molécule de référence **8**. En poursuivant l'étude de la fragmentation de cette sonde, j'ai mis au jour un processus d'oxydation du ligand qui n'avait pas été rapporté précédemment. Si l'adaptation de ce complexe en une molécule répondeuse à une activité enzymatique sera difficile, il pourra être employé pour l'imagerie de cellules hypoxyques et constituer ainsi un outil pour la caractérisation des environnements tumoraux.

Le deuxième volet de mes travaux a porté sur la valorisation des complexes comportant une amidine pour leur usage dans un cadre *in vitro*. Si l'étude de la molécule **10** s'était avérée décevante pour l'équipe car la sonde ne peut fonctionner *in vivo*, ce complexe robuste doté d'une réponse magnétogénique marquée et originale a ouvert la voie à de nouveaux édifices utiles pour le diagnostic *in vitro* de pathologies. J'ai travaillé à l'élaboration d'une famille de sondes répondant à des activités enzymatiques, et conçu la première molécule magnétogène sensible à une peptidase, **19**. Ce complexe, dont la synthèse est délicate, a démontré une fragmentation rapide en présence de la leucine aminopeptidase. Je me suis ensuite intéressé à l'application de ces molécules pour la détection d'activités enzymatiques modèles dans des micro-volumes, prélude essentiel à la quantification de biomarqueurs enzymatiques à des fins diagnostiques. Afin de connaître le comportement de nos structures en présence de faibles champs magnétiques, ce qui sera le contexte dans lequel ces sondes seront utilisées, j'ai réalisé des mesures de relaxométrie en champ cyclique et constaté que nos complexes avaient une bonne réponse. J'ai ensuite participé à l'élaboration et à l'évaluation de deux dispositifs de mesure de la relaxivité de micro-échantillons, l'un basé sur un imageur IRM dédié à la souris, l'autre reposant sur un mini-aimant. Si de multiples mises au point restent à effectuer, notre objectif de réaliser un dispositif de type Point-of-Care, permettant le diagnostic facile et peu coûteux de maladies par la quantification d'activités enzymatiques via la relaxométrie longitudinale, semble plus atteignable que jamais.

La troisième partie de mon travail consistait à identifier une nouvelle architecture de sondes pouvant opérer en conditions physiologiques. J'ai préparé de nouveaux complexes inspirés de **10**, mais comportant une fonction guanidine. Ces molécules, dont la synthèse doit encore être maîtrisée, s'oxydent dans le milieu aqueux mais sont prometteuses pour parvenir à des sondes compatibles avec le milieu

biologique. Toutefois, compte tenu du temps conséquent que j'ai consacré à synthétiser et étudier ces molécules, j'aurais souhaité que ce projet débouche sur des applications biologiques concrètes, ce dont nous sommes malheureusement toujours assez éloignés.

Les résultats que j'ai obtenus sont de bon augure mais m'interrogent à double titre sur la réalisabilité d'une imagerie moléculaire efficace à l'aide de nos sondes. En premier lieu, la synthèse des nouvelles molécules magnétogènes s'est avérée beaucoup plus laborieuse que celle des sondes modèles préparées auparavant. Bien que j'ai consacré beaucoup de temps à améliorer les rendements et optimiser les purifications, j'ai le sentiment qu'un travail d'ampleur est nécessaire pour que des complexes utiles dans un contexte biologique soient obtenus en grandes quantités, ce qui est une condition *sine qua non* compte tenu de la faible sensibilité de l'IRM.

J'ai aussi observé une tendance de nos molécules à s'oxyder, surtout en ce qui concerne les complexes à sphère de coordination ouverte. Si l'oxydation de complexes de fer(II) en fer(III) dans le milieu aqueux est largement rapportée et découle naturellement du comportement en solution du fer non chélaté, j'ai été surpris car nos systèmes avaient été explicitement choisis pour minimiser ce phénomène. De plus, je n'ai pu trouver que peu d'information sur l'oxydation des molécules étudiées avant mon arrivée dans l'équipe. Ce phénomène est pourtant particulièrement handicapant pour notre projet : le passage du fer(II) en fer(III) au sein d'une sonde magnétogène activée entraîne non seulement une réduction du moment magnétique, et donc du signal généré, mais aussi une dégradation du complexe pouvant mener à une importante toxicité via la déchélation du fer et la génération de stress oxydant. J'ai ainsi supposé que des mesures particulières (privation du milieu en dioxygène, ajout d'un réducteur par exemple) avaient été prises pour s'affranchir de l'oxydation et obtenir les résultats très satisfaisants des molécules **8** et **10**.

Afin de mieux comprendre les phénomènes d'oxydation de nos molécules, j'ai préparé le complexe **30'** (voir Figure 5.14), analogue de **30** présenté plus haut (voir la page 74), et réalisé une étude électrochimique préliminaire avec l'aide du docteur Christophe Bucher. J'ai observé la susceptibilité à l'oxydation de ce complexe dans le milieu aqueux non dégazé et sa grande affinité pour les ions chlorure. La coordination d'un ion chlorure semble de plus promouvoir l'oxydation du complexe en abaissant son potentiel d'oxydoréduction, ce qui est possiblement une importante limitation *in vivo* où ces ions sont présents en concentration très importante par rapport à nos complexes. Toutefois, le caractère réducteur du milieu intracellulaire pourrait rendre tout processus d'oxydation impossible en favorisant l'état d'oxydation +II.

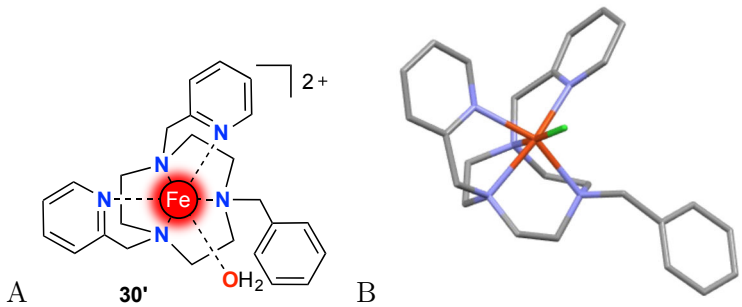


FIGURE 5.14 : **30'**, modèle de sonde magnétogénique activée utilisé pour des caractérisations électrochimiques. A. Représentation théorique en solution. B. Structure à l'état solide obtenue par diffractométrie par rayons X sur un monocristal ; les atomes d'hydrogène du macrocycle et des groupements picolyles ainsi que le contre-ion tétrafluoroborate ne sont pas mentionnés pour faciliter la visualisation.

Malgré les doutes que j'émets sur une concrète application *in vivo* de nos sondes, je reste convaincu de la capacité de l'équipe à relever les différents défis et admiratif de la beauté de ce projet très original.

Deuxième partie

Conception et étude de sondes fluorogènes

Chapitre 6

Contexte : sondes fluorogènes précipitantes pour la visualisation *in cellulo* d'activités enzymatiques

Dans les cinq chapitres précédents, j'ai présenté mes résultats sur la conception et l'étude de sondes magnétogènes pour l'imagerie d'enzymes par résonance magnétique. Au cours de ce travail de thèse, j'ai aussi travaillé sur la réalisation de nouvelles molécules fluorogènes. Ce projet très prometteur était en suspens depuis le départ du docteur Maxime Prost en septembre 2014 ; or, Jens Hasserodt désirait que le projet se poursuive même en l'absence d'un doctorant dédié. J'ai donc commencé en juin 2015, à la fin de ma deuxième année de thèse, mes travaux sur la visualisation d'activités enzymatiques par fluorescence, en parallèle de mes activités sur les sondes magnétogènes. Ici, après avoir décrit le contexte bibliographique dans lequel ce sujet s'inscrit, et rappelé les réalisations précédentes des chercheurs du laboratoire, je détaillerai les résultats que j'ai obtenus concernant de nouvelles sondes fluorogènes précipitantes pour les glycosidases.

La conception de sondes fluorogènes répond à des objectifs différents de l'élaboration de molécules magnétogènes. Comme je l'ai présenté au cours du chapitre 1, très peu de sondes pour l'IRM sensibles à une activité enzymatique permettent réellement une localisation efficace des processus étudiés. Et même si les sondes magnétogènes sont théoriquement les outils idéaux pour accomplir ce but (voir le chapitre 2), dans la pratique, aucune des molécules conçues jusqu'à ce jour n'a encore prouvé son bon fonctionnement dans le contexte biologique.

Le tableau est beaucoup plus réjouissant du côté de l'imagerie par fluorescence : de très nombreuses sondes fluorogènes sensibles à des activités enzymatiques diverses ont été préparées et utilisées avec succès non seulement *in cellulo*, mais aussi *in vivo* dans plusieurs organismes vivants, dont la souris.[114, 276] L'élaboration et l'évaluation de nouvelles molécules permettant une localisation des enzymes toujours plus sensible, précise et rapide constitue de nos jours un domaine de recherche florissant.[29, 56] Afin de participer à cette compétition dans les meilleures dispositions, il nous faut réfléchir aux moyens de concevoir des molécules originales permettant, par leurs caractéristiques exceptionnelles, des applications nouvelles et audacieuses.

L'utilisation *in vivo* de sondes fluorogènes fait apparaître deux limites majeures de ces molécules. La première est la sensibilité parfois trop faible de la détection des activités enzymatiques, qui empêche de visualiser des processus mettant en jeu une quantité d'enzyme réduite.[95, 114] La seconde est l'impossibilité de localiser précisément la cible : la diffusion, au sein du milieu biologique, des fluorophores résultant de l'activation diminue le rapport signal sur bruit.[94, 115] Or, aussi bien la sensibilité que la rétention du signal sont essentiels à l'élaboration d'une sonde efficace (voir page 23). Lever ces deux difficultés permettrait à la fois une visualisation précise et sensible des activités enzymatiques dans tous les contextes, ce qui augmenterait considérablement les potentialités offertes par l'imagerie moléculaire par fluorescence.[94, 95]

Des solutions moléculaires ont été développées pour surmonter ces deux écueils ; elles ont mené à l'obtention de fluorophores aux propriétés spectrales et de rétention très intéressantes. Je vais présenter ces stratégies dans les deux prochaines parties.

1 Stratégies pour améliorer la sensibilité

Comme je l'ai précisé dans l'introduction (voir page 18), le seuil de détection d'un fluorophore dépend principalement de ses propriétés spectrales, et notamment de sa brillance $\epsilon.\phi$ et de ses longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} et d'émission λ_{em}.[25, 74] En effet, un décalage vers le rouge de λ_{ex} et λ_{em} réduit l'absorption des photons par les tissus.[84, 85] Par ailleurs, un grand déplacement de Stokes permet de s'affranchir des phénomènes d'autofluorescence et de réabsorption (absorption par un fluorophore d'un photon émis par un fluorophore voisin) qui diminuent considérablement le signal d'ensemble détecté.[83] La conception de molécules garantissant une excellente sensibilité requiert donc d'optimiser ces deux paramètres.

Le décalage bathochrome des propriétés spectrales est le plus souvent réalisé par l'extension du système π de fluorophores connus.[74] L'augmentation du nombre d'orbitales atomiques impliquées dans la conjugaison diminue l'écart d'énergie entre les orbitales moléculaires plus haute occupée (HO) et plus basse vacante (BV), ce qui correspond à une augmentation à la fois de λ_{ex} et de λ_{em}. Cette mesure a pour effet de diminuer le rendement quantique : l'abaissement de l'énergie de transition rend plus facile la désexcitation non-radiative, notamment par des collisions moléculaires.[85] Le développement de nouveaux fluorophores dont l'excitation et l'émission sont décalées vers le rouge est poursuivi dans l'équipe pour améliorer la capacité de nos sondes à être utilisées *in vivo*.[277] Toutefois, n'ayant pas travaillé sur cet aspect et par souci de concision, je n'en parlerai pas davantage.

L'allongement du déplacement de Stokes requiert quant à lui de diminuer l'énergie de la désexcitation radiative, sans modifier les propriétés d'absorption. Il est alors nécessaire d'augmenter la quantité d'énergie dissipée avant que la fluorescence ne se produise. Pour cela, on peut profiter d'un réarrangement moléculaire à l'état excité au sein du fluorophore : l'intermédiaire plus stable qui se forme alors est celui qui émettra le photon (voir Figure 6.1A). Ce comportement est couramment rencontré lorsque le fluorophore possède une architecture de type donneur-accepteur où un système π relie ces deux éléments (on parle de structure dite donneur-π-accepteur ou D-π-A).[74] Selon la nature du donneur et de l'accepteur et le type de réarrangement, on distingue deux phénomènes :

- Le transfert de charge intramoléculaire (ICT, ou *Intramolecular Charge Transfer*) fait intervenir un donneur et un accepteur d'électrons. La répartition des charges établie à l'état fondamental est modifiée une fois que le fluorophore a été excité : le réarrangement induit une augmentation de la polarité, ce qui stabilise cet intermédiaire dans un solvant polaire comme l'eau.[278] Ce comportement est rencontré par exemple pour la cyanine 5 **K** (voir Figure 18 page 17), le groupement amine jouant le rôle de donneur et l'iminium agissant comme accepteur.
- Le transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (ESIPT, ou *Excited-State Intramolecular Proton Transfer*) nécessite un donneur et un accepteur de liaison hydrogène pouvant établir une liaison H intramoléculaire.[279, 280] À l'état fondamental, la forme énol est la plus stable (voir Figure 6.1B). Mais à l'état excité, la situation s'inverse : c'est la forme céto qui est stabilisée, ce qui entraîne un transfert du proton et un réarrangement du système π pour adopter cette configuration. La désexcitation radiative a alors lieu depuis cet état beaucoup moins haut en énergie ; elle est suivie du réarrangement inverse pour donner l'état fondamental. Quelques exemples de fluorophores seront donnés plus loin (voir Figure 6.5).

L'ESIPT permet d'atteindre des déplacements de Stokes très grands, souvent supérieurs à 150 nm[280, 281] ; la différence d'énergie entre formes céto et énol de l'état excité est très importante. Pour rappel, le déplacement de Stokes des fluorophores endogènes est en moyenne de 80 nm[83] : l'écart est tel que les fluorophores ESIPT permettent de s'affranchir totalement de l'autofluorescence. Les espèces profitant d'un ICT ont aussi un grand déplacement de Stokes, mais tout de même plus réduit car la

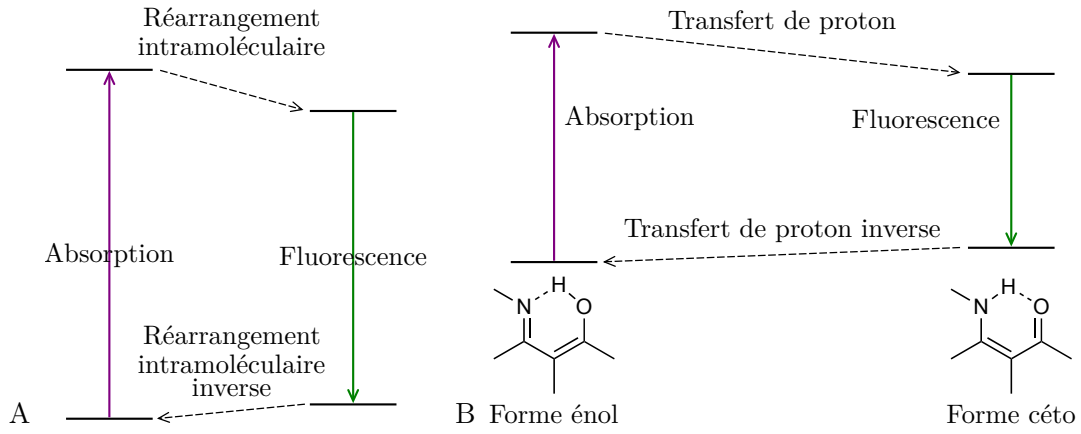


FIGURE 6.1 : Augmentation du déplacement de Stokes par réarrangement intramoléculaire à l'état excité.[74] A. Principe. B. Cas du transfert de proton (ESIPT).

stabilisation de l'état excité est moins importante.[278] En utilisant ces effets de transfert de charge ou de proton à l'état excité, il est ainsi possible de concevoir des fluorophores garantissant une très bonne sensibilité.[83]

Par ailleurs, les fluorophores bénéficiant de l'ICT ou de l'ESIPT peuvent être exploités très facilement pour élaborer des sondes fluorogènes sensibles à une activité enzymatique. En effet, leurs propriétés de fluorescence dépendent fondamentalement du caractère donneur d'une des extrémités : si ce caractère donneur est inhibé, par une fonctionnalisation par exemple, l'émission de la molécule devient négligeable.[74] On peut alors réaliser des sondes selon une architecture de type pro-médicament (voir page 24). Cette stratégie a été utilisée pour la conception de nombreuses molécules destinées à la détection d'enzymes.[114, 282]

2 Stratégies pour réduire la diffusion du signal

Un autre aspect prépondérant pour une imagerie *in vivo* efficace est la limitation de la diffusion des fluorophores. Si les sondes doivent pouvoir circuler librement afin d'accéder à leur cible enzymatique (premier critère de notre cahier des charges, voir page 23), il est au contraire essentiel que le fluorophore résultant de l'activation enzymatique reste le plus près possible de son lieu de production afin de marquer précisément les processus étudiés.[94, 115] Toutefois, la rétention d'une molécule soluble dans un milieu liquide est très difficile. Différentes stratégies ont ainsi été mises au point pour améliorer la rétention du signal issu d'une sonde fluorogène.

2.1 Rétention par la création d'une liaison covalente

Une première solution consiste à concevoir des sondes qui, après leur activation, sont capables de se lier de façon covalente à l'enzyme qui vient de les transformer. La diffusion du signal est ainsi minimale car c'est l'enzyme elle-même qui est marquée par des fluorophores. Ces sondes sont appelées qABP, pour *quenched Activity-Based Probes* ; elles possèdent une architecture de type double pro-médicament et contiennent à la fois un fluorophore et un quencheur (voir Figure 6.2).[283–285] Sous la forme non-activée, les propriétés de fluorescence sont quenchées selon le mécanisme de FRET (voir page 23). La transformation enzymatique mène à l'effondrement de l'espaceur éliminant et à la libération du quencheur, ce qui restaure la fluorescence. L'intermédiaire de type quinone méthide, auquel le fluorophore est toujours attaché, va diffuser jusqu'à rencontrer un site nucléophile en périphérie de l'enzyme (la chaîne latérale d'un résidu lysine, thréonine, sérine, etc...) et se lier à lui. Des sondes pour la β-galactosidase[286] et plusieurs caspases[287] ont ainsi été préparées et se sont avérées efficaces à la fois *in vitro* et *in cellulo*.

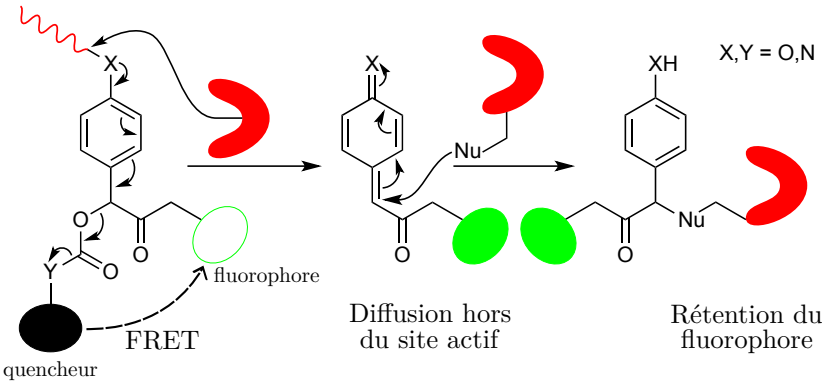


FIGURE 6.2 : Structure et fonctionnement des sondes qABP.

Les qABP présentent néanmoins trois inconvénients qui limitent leur utilisation :

— Ces sondes exploitent le principe du FRET ; or, comme je l'ai mentionné précédemment (voir page 23), les sondes fluorogènes basées sur le FRET souffrent généralement d'une faible sensibilité et d'un accès synthétique difficile dû à leur complexité.[114]

— Les qABP profitent de la diffusion puis de la réaction d'une quinone méthide avec un nucléophile pour contenir le signal dans une zone restreinte. Le caractère électrophile de ces intermédiaires peut être modulé par les substituants sur le cycle aromatique[131, 132] : en théorie, on peut concevoir des espèces pouvant diffuser sur une distance choisie, comme l'intervalle entre le site actif de l'enzyme et les acides aminés périphériques. Cependant, il est délicat de prévoir le comportement des quinones méthides *in vivo* compte tenu de la complexité du milieu biologique.[283] Si la diffusion a lieu sur une trop grande distance, le signal n'est pas suffisamment retenu et cette stratégie perd de son intérêt.

— Les quinones méthides peuvent présenter une grande toxicité car ce sont d'excellents agents alkylants.[288, 289] Si la diffusion n'a pas lieu à une distance suffisante, l'intermédiaire risque d'alkyler le site actif de l'enzyme, ce qui réduit son efficacité catalytique et l'empêche d'accomplir son rôle dans la cellule. Au contraire, une quinone méthide diffusant à très grande distance peut alkyler l'ADN et causer une mutagénèse.

2.2 Rétention par précipitation

Une deuxième solution consiste à profiter de la précipitation d'un fluorophore insoluble. Produite par l'enzyme à partir d'une sonde fluorogène hydrosoluble, la molécule signalante précipite dès sa formation et marque ainsi la localisation de l'enzyme avec précision.

Cette approche a été développée à l'origine pour des sondes chromogènes. Par exemple, le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside ; voir Figure 6.3) est une construction où l'hydroxyle phénolique d'un noyau indoxyle est glycosylé par le galactose[290, 291] ; son hydrolyse par la β-galactosidase libère l'indoxyle, qui dimérise en présence d'un oxydant (le dioxygène par exemple) pour donner le bleu indigo très insoluble en milieu aqueux. Cette sonde est employée quotidiennement en microbiologie pour marquer les bactéries exprimant l'enzyme cible sur les boîtes de Pétri[292] : contrairement à d'autres chromophores qui diffusent dans la gélose, le bleu indigo reste précisément au niveau de la bactérie qui l'a produit. Le X-Gal est utilisé dans de nombreux contextes, comme la recherche en biologie moléculaire (où la β-galactosidase est très souvent utilisée comme gène rapporteur)[17] et la détection de certaines souches bactériennes lors de contrôles qualité d'équipements stériles.[292]

La précipitation de fluorophores pour retenir le signal issu d'une activité enzymatique est plus difficile à mettre en œuvre. En effet, l'agrégation des fluorophores organiques usuels s'accompagne d'une réduction de la fluorescence émise.[74] Ce phénomène appelé quenching causé par l'agrégation ou ACQ (*Aggregation-Caused Quenching*) est dû à l'augmentation de la désexcitation non radiative lorsque les fluorophores ne sont plus dilués en solution, mais agrégés et en interaction étroite via π-

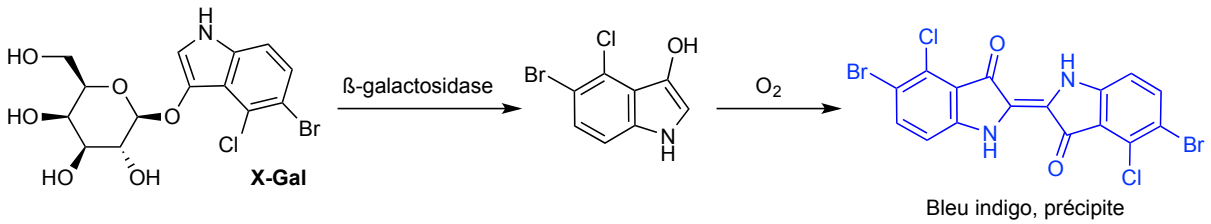


FIGURE 6.3 : Structure et activation du X-Gal, sonde chromogène précipitante pour l'activité β-galactosidase.

stacking.[293] Afin de conserver une fluorescence acceptable tout en bénéficiant de la bonne localisation permise par la précipitation, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules.

On distingue deux types de fluorophores organiques permettant d'obtenir une fluorescence à l'état solide suffisante pour des applications en imagerie moléculaire. Une première famille regroupe les molécules non-fluorescentes en solution, mais dont l'agrégation entraîne l'apparition d'une fluorescence importante : ce phénomène est appelé émission induite par l'agrégation, ou AIE (*Aggregation-Induced Emission*).[294, 295] Les fluorophores AIE ont un fonctionnement inverse des fluorophores habituels : les nombreux cycles aromatiques qu'ils contiennent sont capables de tourner librement en solution, ce qui occasionne une importante désexcitation non-radiative et limite grandement l'émission de photons. L'agrégation va quant à elle figer les degrés de liberté de rotation des cycles et induire une fluorescence intense en limitant considérablement les autres voies de désexcitation.

La liaison du fluorophore avec un substrat enzymatique polaire permet l'élaboration de sondes fluorogènes de façon simple. La molécule initiale est hydrosoluble et ne peut s'agréger, elle est donc non-émissive ; le retrait du substrat par l'enzyme cible libère le fluorophore AIE insoluble qui s'agrège et fluoresce. Cette approche a été abondamment utilisée récemment, notamment par l'équipe du professeur Ben Zhong Tang à l'université de Hong-Kong, pour concevoir de nombreuses sondes répondant à des activités très variées (voir Figure 6.4).[177, 296, 297] Si elle permet une fluorescence forte après activation et d'excellents rapports signal sur bruit, la réalisation de sondes fluorogènes est souvent handicapée par la grande taille et le caractère apolaire des fluorophores AIE. Afin de faciliter l'approche de l'enzyme du substrat et de garantir une solubilité suffisante, les sondes doivent comporter de longs espaceurs et des unités hydrosolubilisantes, ce qui rend leur synthèse délicate et coûteuse.[297]

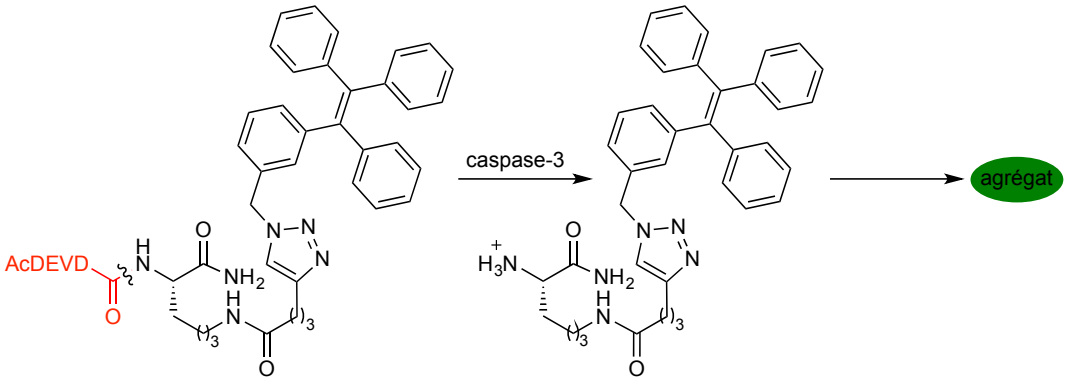


FIGURE 6.4 : Exemple de sonde pour la caspase-3 basée sur l'AIE.[177]

Une deuxième famille de fluorophores est constituée des molécules fluorescentes en solution, mais dont les propriétés spectrales évoluent lors de leur précipitation. Pour garantir un rapport signal sur bruit acceptable, l'émission du fluorophore en solution doit être minimale et la précipitation doit s'accompagner d'un changement de la fluorescence aussi marqué que possible. Quelques molécules possédant ces propriétés ont été développées ; citons par exemple **46**[298] et **47**.[299]

Les fluorophores précipitants présentent l'avantage de garantir une très bonne localisation du signal,[94, 115] tout en générant moins de toxicité que les qABP. Cependant, les sondes fluorogènes

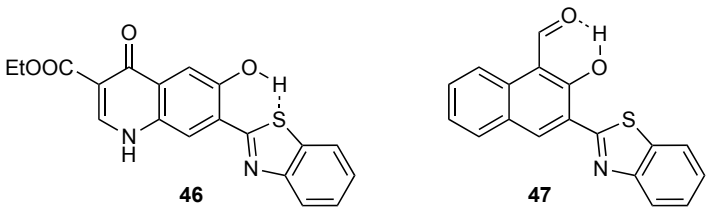


FIGURE 6.5 : Quelques fluorophores précipitants dont la fluorescence à l'état solide est intense.[298, 299]

basées sur des molécules précipitantes souffrent de deux inconvénients majeurs. La précipitation d'une espèce soluble étant un équilibre, il faut que la concentration atteigne un certain seuil de solubilité pour qu'un précipité apparaisse ; dans l'intervalle, le fluorophore peut diffuser et ainsi diluer le signal. Par ailleurs, l'obtention de fluorophores très peu hydrosolubles requiert d'optimiser les propriétés de précipitation au détriment des propriétés spectrales.[300, 301] Ainsi, les fluorophores précipitants les plus couramment utilisés possèdent des longueurs d'onde d'émission et d'absorption peu intéressantes car décalées vers le bleu, et il est très délicat d'améliorer ces propriétés (en substituant les noyaux aromatiques notamment) sans nuire au caractère précipitant.

3 Utilisation de l'ELF®-97 pour la conception de sondes fluorogènes précipitantes

La visualisation d'activités enzymatiques au moyen de sondes fluorogènes nécessite des molécules qui garantissent à la fois une grande sensibilité et une forte rétention du signal près de son lieu d'apparition. Pour parvenir à des fluorophores performants, plusieurs stratégies ont été développées afin d'améliorer les propriétés spectrales et de limiter la diffusion ; toutefois, seules peu d'espèces présentent des caractéristiques satisfaisantes pour tous les aspects essentiels à la conception d'une sonde fluorogène.

3.1 L'ELF®-97, un fluorophore très performant

Une équipe de recherche de la société Molecular Probes (qui fait maintenant partie du géant de la fourniture des laboratoires Thermo Fisher Scientific) a travaillé au début des années 1990 sur des sondes fluorogènes précipitantes destinées à marquer des activités enzymatiques ; le projet s'appelait Enzyme-Labeled Fluorescence (ELF). Les chercheurs ont préparé différents fluorophores ; l'objectif était d'identifier des molécules disposant d'une très faible hydrosolubilité et de propriétés spectrales adaptées à une détection *in vitro* (dans le cadre de Western Blots et d'ELISA notamment) et *in cellulo*.[302] Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le fluorophore dichloro-HPQ (son nom complet est 2-(5'-chloro-2-hydroxyphényl)-6-chloro-4(3*H*)-quinazolinone), baptisé par les auteurs ELF®-97 alcool (voir Figure 6.6A).[118] Dans la suite de ce manuscrit, j'utiliserai le nom raccourci ELF®-97.

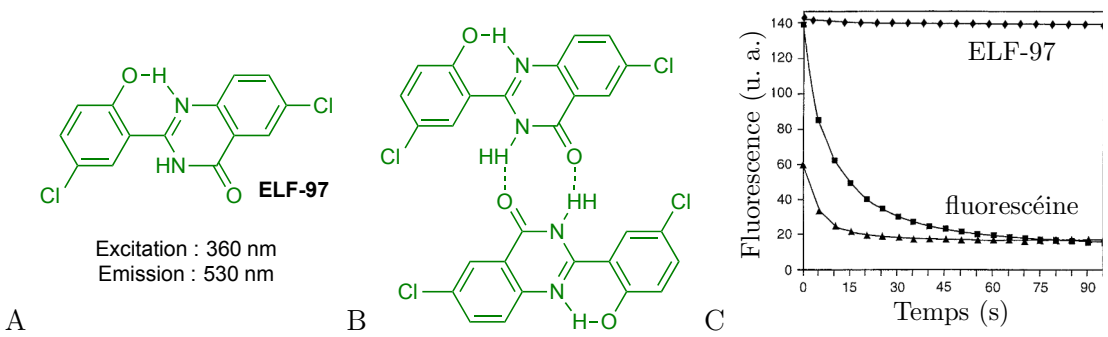


FIGURE 6.6 : Le fluorophore ELF®-97. A. Structure. B. Dimérisation par liaisons hydrogène intermoléculaires. (C) Résistance au photoblanchiment.[303] u. a. : unités arbitraires

Ce fluorophore possède des caractéristiques très intéressantes :

— Il manifeste un phénomène d'ESIPT, ce qui lui confère un déplacement de Stokes colossal de 170 nm (λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 530 nm).[304]

— Il bénéficie d'une très grande brillance grâce à son rendement quantique de l'ordre de 50%[303, 304] ; combinée avec le déplacement de Stokes, cela fait de l'ELF®-97 un fluorophore au seuil de détection très faible. Il est important de noter que les propriétés spectrales présentées sont celles du fluorophore à l'état agrégé : ainsi, même si la molécule souffrait d'ACQ, la fluorescence résiduelle reste satisfaisante. Par ailleurs, l'émission de la forme soluble est négligeable et décalée vers le bleu.[303]

— Ses très bonnes propriétés de fluorescence sont conservées longtemps : comparé à la fluorescéine, il est très résistant au photoblanchiment (capacité à conserver la brillance même après un long temps d'excitation lumineuse ; voir Figure 6.6C).[303]

— Il est très insoluble dans le milieu aqueux : les deux atomes de chlore substituant le noyau HPQ assurent à l'ELF®-97 un logP calculé de grande valeur, de l'ordre de 4,2 (l'HPQ non substitué dispose d'une valeur de seulement 2,8), ce qui lui confère une solubilité théorique d'environ 15 μM.[145, 302, 305] Il est également capable de former de fortes liaisons hydrogène intermoléculaires (voir Figure 6.6B), ce qui favorise son agrégation puis sa précipitation.[301]

— Comme tout fluorophore ESIPT (voir plus haut), la fonctionnalisation de l'oxygène phénolique de l'ELF®-97 inhibe la fluorescence : l'accès à des sondes fluorogènes est facilité.[302]

L'ELF®-97 ne semble souffrir à ce stade que d'une excitation et d'une émission très décalées vers le bleu. L'excitation est dans le domaine ultraviolet, ce qui d'une part est toxique pour les cellules (de nombreuses réactions de dégradation de l'ADN sont photoinduites par des photons à cette longueur d'onde) et d'autre part limite considérablement la profondeur de pénétration car l'absorption des tissus est alors très grande.[74, 84, 85] L'émission a lieu quant à elle dans le vert, une région où l'absorption est moindre mais tout de même élevée. Cependant, dans le cadre d'utilisations *in vitro* et *in cellulo*, la limitation est moins importante. Enfin, λ_{ex} et λ_{em} sont telles que l'observation au microscope et par cytométrie en flux nécessite un filtre spécifique, ce qui rend l'utilisation de ce fluorophore coûteuse pour un laboratoire.

3.2 Premières sondes fluorogènes basées sur l'ELF®-97

Après avoir identifié l'ELF®-97 comme un fluorophore très performant, les chercheurs de Molecular Probes ont travaillé à l'inclusion de cette molécule au sein de sondes fluorogènes ciblant des activités enzymatiques. La fonctionnalisation directe de la fonction hydroxyle phénolique par des substrats simples (phosphoryle, glycosides, esters d'acides gras notamment) a mené à l'obtention et la commercialisation d'une grande variété de sondes,[300, 302, 305–311] dont quelques exemples sont présentés à la Figure 6.7. Le fluorophore est donc une plateforme très versatile pour la détection d'enzymes diverses dans de nombreux contextes.

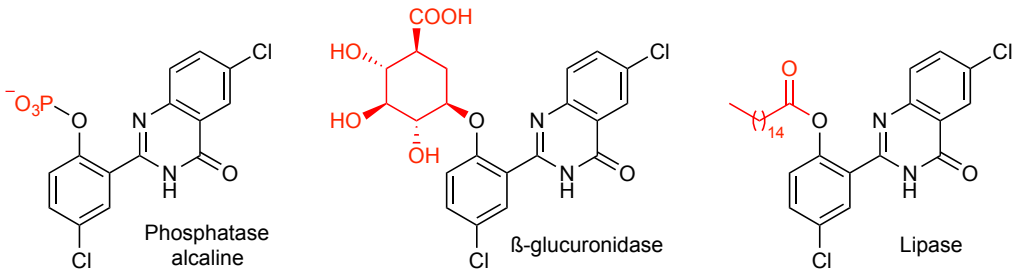


FIGURE 6.7 : Exemples de sondes fluorogènes basées sur l'ELF®-97 et sensibles à des activités enzymatiques.[302, 308]

La sonde ciblant la phosphatase alcaline (nommée ELF®-97-phosphate), une enzyme modèle utilisée comme entité signalante lors d'expériences d'immunocytochimie (voir Figure 4 page 5), de Western

Blot, d'ELISA ou de cytométrie,[118, 306, 312] a été employée pour l'imagerie de nombreux objets biologiques : des cellules mammifères,[303, 306] des bactéries,[313, 314] des phytoplanctons[315, 316] et même des embryons de poissons zèbres.[304, 317, 318] La résolution atteinte permet même parfois d'observer la répartition subcellulaire, ce qui est habituellement impossible.[94] L'ELF®-97 semble donc remplir parfaitement son rôle de marqueur précis de la localisation d'enzymes.

Toutefois, seule cette sonde ELF®-97-phosphate est toujours disponible à la vente. Les autres constructions ont été progressivement retirées du marché dans les années 2000. De plus, la molécule est maintenant vendue sous forme de kit avec un dispositif de filtration ; le manuel indique que la solution de sonde doit être filtrée immédiatement avant usage afin de garantir une détection efficace.[118] Nous pensons que ce retrait inhabituel et cette obligation de filtration sont dus à l'instabilité des sondes : leur structure simple, où le déclencheur enzymatique est directement lié au phénol, ne suffit pas à empêcher l'hydrolyse et la libération du fluorophore. L'ELF®-97 est en effet un excellent nucléofuge : les deux atomes de chlore exercent un fort effet électroattracteur qui rend le phénol très acide (son pKa théorique est d'environ 7,3, contre 8,1 pour l'HPQ non substitué).[145]

Pour parvenir à une imagerie moléculaire d'enzymes très efficace, la réalisation de nouvelles sondes fluorogènes basées sur l'ELF®-97 semble donc très prometteuse. Ces molécules devront toutefois présenter une plus grande stabilité que les sondes précédemment développées.

4 Sondes fluorogènes mises au point dans l'équipe

En complément de l'activité de recherche sur les sondes magnétogènes, l'équipe de Jens Hasserodt travaille depuis 2008 à la conception de sondes fluorogènes. L'objectif est le même : la visualisation précise et sensible d'activités enzymatiques directement dans un contexte *in vivo*, avec en ligne de mire dans le cas présent une localisation subcellulaire lors de l'observation par microscopie.

Cependant, l'effort à fournir est différent. Dans le cas des molécules magnétogènes, la revue de la littérature a montré qu'aucune plateforme satisfaisante n'avait été développée jusqu'à présent : il était nécessaire de concevoir des complexes de coordination modèles présentant les propriétés magnétogéniques désirées, puis d'adapter ces complexes afin d'élaborer des sondes sensibles à des activités enzymatiques. La situation est différente ici : l'ELF®-97 et les exemples de sondes réalisées par les chercheurs de Molecular Probes constituent une base solide pour réaliser des sondes fluorogènes répondant aux buts que nous avons définis. Ainsi, plutôt que de travailler sur le cœur des sondes en préparant et évaluant de nouvelles unités signalantes, l'effort consiste ici à adapter un fluorophore existant à des substrats enzymatiques de manière à obtenir des molécules finales plus performantes que celles décrites jusqu'à maintenant. Ce défi n'est pas plus simple, bien au contraire : pour qu'une sonde possède les propriétés de distribution et d'activation enzymatique désirées, il est nécessaire d'ajuster finement la structure globale de la molécule en prenant en compte de très nombreux paramètres (hydrosolubilité, accessibilité de l'enzyme, cinétique d'effondrement de l'espaceur auto-effondrable, etc...).

L'objectif premier était la conception d'une sonde précipitante, stable, répondant rapidement à l'activité de la leucine aminopeptidase (LAP), et fonctionnant dans un contexte *in cellulo*. La LAP est une exopeptidase qui clive un seul acide aminé à l'extrémité N-terminale d'une chaîne peptidique[319, 320] ; cet acide aminé est préférentiellement une leucine, mais d'autres résidus comportant une chaine apolaire (isoleucine et valine notamment) peuvent aussi être retirés. Elle a été choisie comme cible enzymatique modèle pour plusieurs raisons : d'abord, d'un point de vue de synthèse chimique, son substrat (une L-leucine donc) est simple, disponible commercialement, et facilement incorporable au sein d'une molécule plus complexe, ce qui permet d'élaborer des sondes plus facilement. Le caractère salin au pH physiologique garanti par la fonction amine primaire terminale apporte par ailleurs une hydrosolubilité appréciable au vu de l'insolubilité importance du fluorophore. D'un point de vue biologique, la LAP est rencontrée dans de nombreuses espèces de mammifères, de bactéries et de plantes,[319] et serait surexprimée dans certaines tumeurs[321] : cette enzyme est présente en grande quantité dans des contextes divers et potentiellement intéressante à étudier. Enfin, elle est vendue sous forme purifiée pour un prix

relativement modéré (moins de 200 euros les 50 unités enzymatiques chez Sigma Aldrich), ce qui est utile pour réaliser les nombreux essais de mise au point à moindre coût.

Une sonde efficace pour la LAP doit comporter un espaceur entre le déclencheur enzymatique et le fluorophore pour deux raisons :

— Les sondes conçues par Molecular Probes, d'architecture très simple, souffraient *a priori* d'un manque de stabilité dans l'eau ; un espaceur permettra de limiter l'hydrolyse spontanée et la génération de faux signal positif.

— L'acylation directe du fluorophore via sa fonction hydroxyle mènerait à un ester phénolique. Or, la LAP clive par définition une liaison peptidique et non une fonction ester.

Une première famille de sondes a été préparée par les docteurs Xiao-bing Zhang et Michael Waibel en 2009.[322] Les molécules **48a** et **48b** comportent l'HPQ en tant que fluorophore et deux espaceurs en tandem (voir Figure 6.8A) : le premier est capable de cyclisation, et bénéficie (cas de **48a**) ou non (cas de **48b**) d'une préorganisation par effet *gem*-diméthyl ; le second est de type ester acétoxyméthylique et peut s'éliminer. Les sondes sont non-fluorescentes et hydrosolubles à la concentration considérée (38 μL) : la fonctionnalisation du phénol par un espaceur permet d'inhiber la fluorescence, et le caractère salin de la molécule garantit sa solubilité. L'activation enzymatique *in vitro* à l'aide d'enzyme purifiée a mené à l'apparition d'une fluorescence dans un délai d'une heure (Figure 6.8B). Le processus est plus rapide pour **48a** : la cyclisation du premier espaceur est en effet favorisée car celui-ci est préorganisé. Toutefois, si **48a** et **48b** sont bien des sondes fluorogènes, leur stabilité n'est pas satisfaisante : en l'absence d'enzyme, 3000 secondes suffisent pour observer une fluorescence notable dans les deux situations. Un autre espaceur, ou système d'espaceurs, est donc requis pour parvenir à une sonde à la fois plus stable et capable de générer un signal plus rapidement.

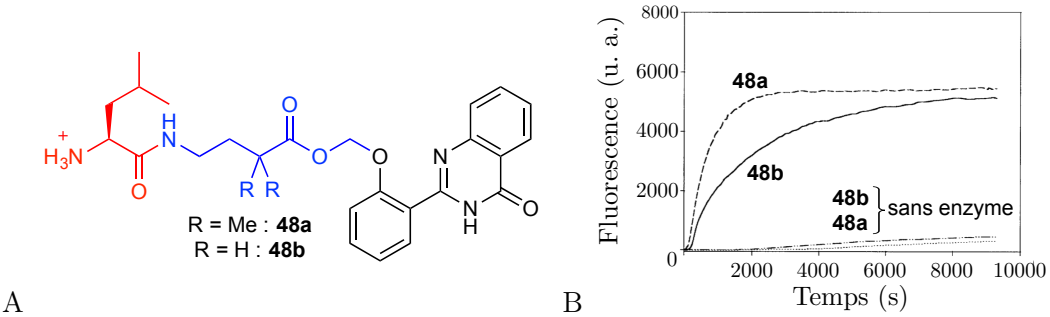


FIGURE 6.8 : Premières sondes fluorogènes pour la LAP. A. Structures. B. Fluorescence mesurée en fonction du temps (λ_{ex} = 365 nm, λ_{em} = 495 nm) : solvant : PBS ; concentration : 38 μM ; température : 37°C ; enzyme ajoutée : 0.002 U.[322]

Une deuxième famille de sondes a ensuite été préparée par les docteurs Monica Vargas-Sanchez, Oliver Thorn-Seshold et Sean McKeon en 2010-2011 (voir Figure 6.9A).[323, 324] Le système d'espaceurs en tandem est remplacé par un seul espaceur cyclisant de type diamine ; la liaison au niveau du fluorophore consiste en un carbamate tertiaire, qui constitue le lien le plus stable lorsque l'alcool utilisé est un phénol pauvre en électrons.[125] La diamine de **49a** présente un groupement *gem*-diméthyl, déjà utilisé dans la sonde **48a**. Celle de **49b** contient un cycle aliphatique à 6 atomes, la pipéridine : cet espaceur bénéficie d'une préorganisation bien supérieure car plusieurs degrés de liberté de rotation sont fortement contraints par la présence du cycle.

L'évaluation *in vitro* montre une activation très rapide de **49b** à la concentration 100 μM (Figure 6.9B). Comme dans le cas précédent, l'espaceur le plus pré-organisé assure la meilleure cinétique. Cependant, la stabilité est ici optimale : aucune génération de signal n'a pu être détectée après 10 heures d'incubation à 37°C. Le lien carbamate tertiaire est donc essentiel à la stabilisation du fluorophore. Ces tentatives d'activation enzymatique fructueuses ont été poursuivies par des tests *in cellulo* ; malheureusement, aucun signal n'a pu être détecté après incubation de **49b** dans des cellules.[145]

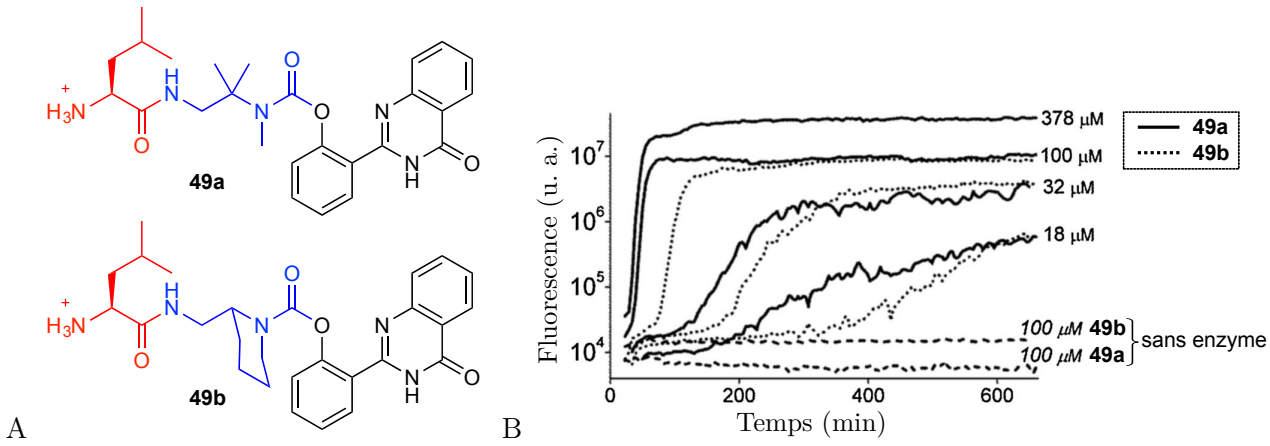


FIGURE 6.9 : Deuxième génération de sondes fluorogènes pour la LAP. A. Structures. B. Fluorescence mesurée en fonction du temps (λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 510 nm) : solvant : PBS ; température : 30°C ; enzyme ajoutée : 0.01 U.[323]

Sur la base de ces résultats, le docteur Maxime Prost a envisagé que l'absence de génération de fluorescence *in vivo* était due au seuil de précipitation trop faible de l'HPQ.[145] Il a alors préparé la sonde **50** (voir Figure 6.10A) où le fluorophore est l'ELF®-97, plus insoluble que l'HPQ (voir ci-dessus).[209] Cette molécule présente, à l'instar de **49b**, une grande stabilité et une cinétique de réponse très rapide (Figure 6.10B). De plus, elle est capable de générer une fluorescence importante dans des cellules HeLa après seulement 26 minutes d'incubation à 22°C (Figure 6.10C). Devant ce succès, de nombreuses autres propriétés ont été évaluées, comme la sélectivité de la sonde vis à vis d'autres peptidases, sa toxicité et sa stabilité à différents pH : le comportement est satisfaisant dans tous les cas et consacre **50** comme une sonde fluorogène efficace pour la détection de la LAP.

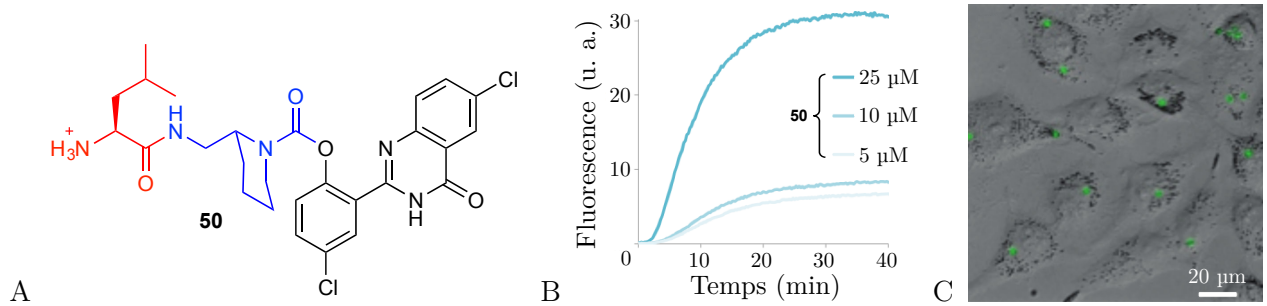


FIGURE 6.10 : **50**, troisième génération de sondes fluorogènes pour la LAP. A. Structure. B. Fluorescence mesurée en fonction du temps (λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm) : solvant : PBS ; température : 37°C ; enzyme ajoutée : 0.007 U. C. Cellules HeLa vivantes incubées avec **50** et observées au microscope à épifluorescence ; superposition des canaux de fluorescence (en vert) et de champ clair (niveaux de gris) ; concentration : 10 μM ; temps d'incubation : 2 heures.[145, 209]

À ce stade, il est intéressant de se demander si un espaceur éliminant plus classique ne pourrait pas être utilisé pour l'élaboration d'une sonde. En effet, les espaceurs aromatiques de type PABA garantissent souvent une cinétique plus intéressante que leurs homologues cyclisants aliphatiques. Ceci est dû à la nature de la liaison clivée par l'enzyme : une liaison peptidique impliquant une aniline sera plus facile à rompre qu'une liaison où l'amine est aliphatique. La molécule **51** a ainsi été préparée et évaluée *in vitro* (voir Figure 6.11). Si elle profite d'une cinétique d'activation plus intéressante, sa stabilité est aussi beaucoup plus réduite : au contraire du carbamate tertiaire de **50**, le lien éther benzylique ne résiste pas à l'hydrolyse spontanée. La même observation avait été faite pour des sondes

comportant des fluorophores également appauvris en électrons[325] : le caractère électro-attracteur prononcé accentue l'électrophilie de la position benzylique et permet une attaque nucléophile d'une molécule d'eau. Toutefois, l'équipe du professeur Nicolas Winssinger de l'université de Genève a utilisé très récemment l'ELF®-97 couplé à un espaceur de type PABA dans deux sondes moléculaires.[326, 327]

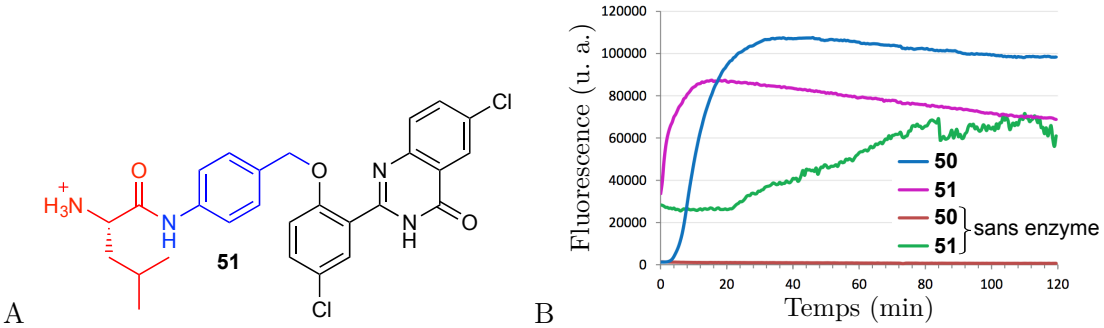


FIGURE 6.11 : A. Structure de **51**, sonde moléculaire pour la LAP basée sur l'ELF®-97 et un espaceur éliminant PABA. B. Fluorescence mesurée en fonction du temps (λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm) : solvant : PBS ; température : 37°C ; concentration : 50 μM ; enzyme ajoutée : 0.007 U.[145]

Le succès de la molécule **50** a inspiré la préparation par Maxime Prost de nombreuses sondes ciblant des activités enzymatiques variées.[145, 328] Notamment, la molécule **52** destinée à la détection de la β-galactosidase a été conçue et étudiée (voir Figure 6.12)[211] : elle génère une fluorescence importante après activation dans un délai de quelques heures. Ce temps est beaucoup plus long que celui observé dans le cas de la molécule **50** ; de plus, la molécule est instable. Les tests *in cellulo* avec des cellules C17.2 (une lignée cancéreuse de neurones de souris exprimant de façon constitutive et importante la β-galactosidase) ont montré l'apparition d'un signal fluorescent, mais seulement après une incubation de 24 heures et de manière *a priori* peu spécifique et reproductible, ce qui limite malheureusement l'utilité de la sonde **52**.

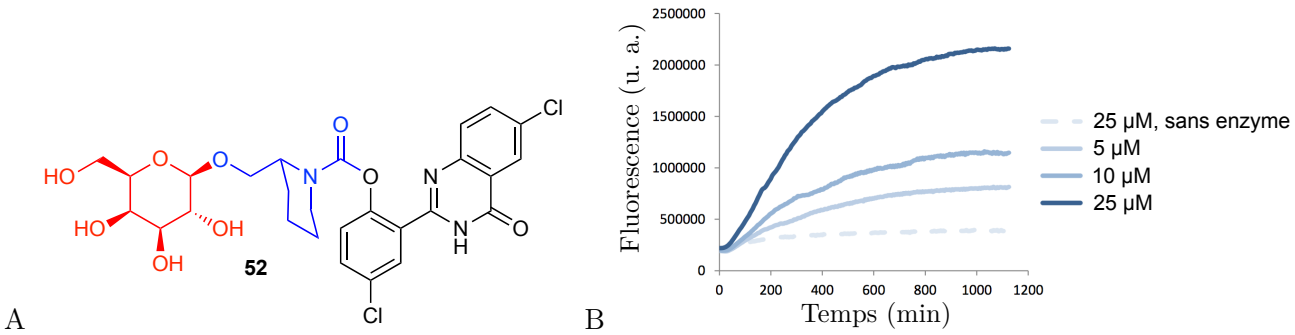


FIGURE 6.12 : **52**, sonde moléculaire pour la β-galactosidase. A. Structure. B. Fluorescence mesurée en fonction du temps (λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm) : solvant : PBS ; température : 37°C ; enzyme ajoutée : 20 μM.[145, 211]

Chapitre 7

Nouvelles sondes fluorogènes sensibles à une activité glycosidase

Les molécules **50**, **51** et **52** préparées et étudiées par Maxime Prost sont des sondes fluorogènes prometteuses ; toutefois il est possible d'améliorer leurs caractéristiques. Il serait notamment intéressant, pour cibler la leucine aminopeptidase, de disposer d'une sonde bénéficiant à la fois de la cinétique de génération du signal de **51** et de la stabilité de **50**. Par ailleurs, une molécule répondant à la β-galactosidase plus rapidement que **52** pourrait s'avérer efficace *in cellulo*.

1 Leucine aminopeptidase et espaceur éliminant : un mariage impossible

L'étude des sondes **50** et **51** suggère une approche plutôt simple pour concevoir une molécule répondant très rapidement à la LAP. La sonde **53a** (voir Figure 7.1) comprenant deux espaceurs en tandem, l'un éliminant et l'autre cyclisant, devrait présenter à la fois une excellente cinétique de fragmentation et une grande stabilité. En effet, l'amine impliquée dans la liaison peptidique est le PABA : la coupure enzymatique devrait être rapide. De même, le lien carbamate tertiaire entre l'espaceur pipéridine et l'ELF®-97 n'est *a priori* pas sensible à l'hydrolyse spontanée. Enfin, l'effondrement du second espaceur se produit dans un temps très court : le temps de demi-vie n'est que de 7 secondes dans le PBS.[209]

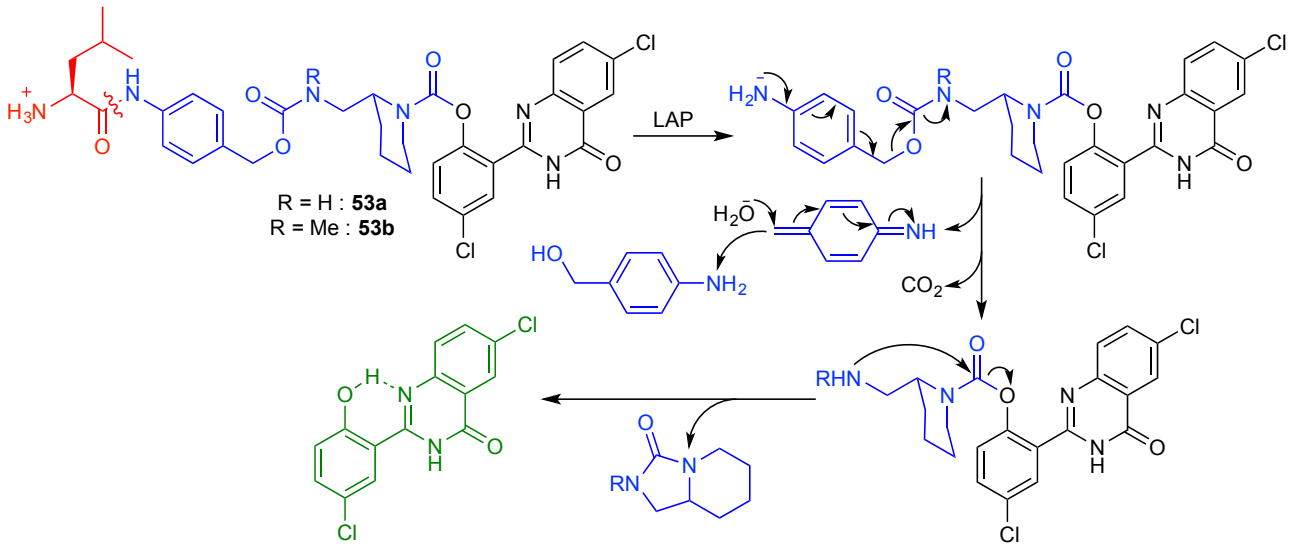


FIGURE 7.1 : Nouvelles sondes fluorogènes **53a-b** répondant à la LAP et comportant un tandem d'espaceurs, et leur mécanisme de fragmentation supposé.

S'il est nécessaire, pour que l'enzyme reconnaisse son substrat, que l'amine impliquée dans la fonction amide soit une amine primaire, il n'y a pas de contrainte particulière sur la substitution du second espaceur. Ainsi, la molécule **53b** pourra être préparée et étudiée. Le lien carbamate tertiaire entre les deux espaceurs devrait être plus stable que son équivalent carbamate secondaire dans **53a**. De plus, l'urée cyclique finale sera plus substituée, donc plus stable, ce qui rendra potentiellement la cyclisation encore plus rapide.

1.1 Première synthèse d'une sonde comportant un tandem d'espaceurs

Une première voie de synthèse du composé **53a** a été essayée en 2014 par Roman Fedoryshchak, alors stagiaire de M2 encadré par Maxime Prost ; elle est détaillée à la Figure 7.2. La méthodologie s'inspire directement de celle utilisée pour préparer la molécule **50**[209] : le couplage peptidique de la 2-aminométhylpipéridine et de la leucine protégée avait lieu de façon régiosélective sur l'amine primaire, la moins encombrée. La carbamylation de l'amine secondaire à l'aide du fluorophore chloroformylé **54**, suivie de la déprotection de l'amine terminale, menait à **50** après seulement 4 étapes au total.

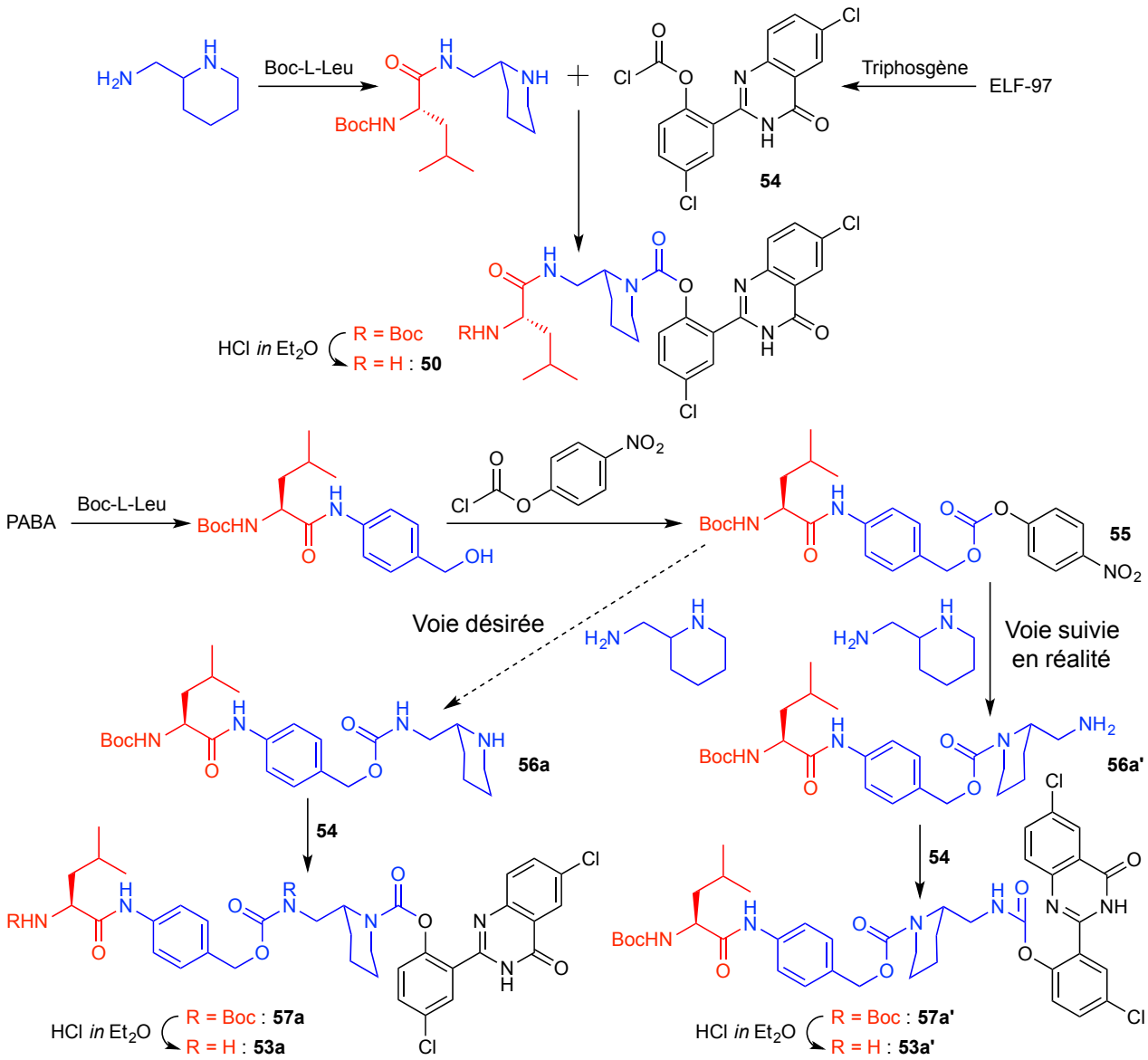


FIGURE 7.2 : Voie de synthèse de la sonde **50**[209] (en haut) et première tentative de préparation de **53a** par Roman Fedoryshchak (en bas).

Ici, la 2-aminométhylpipéridine a été carbamylée à l'aide du synthon **55** comportant la leucine protégée et l'espaceur éliminant. La synthèse a été poursuivie comme précédemment pour aboutir à la sonde finale. Cependant, des essais d'incubation *in vitro* de la molécule dans le PBS ont montré sa grande instabilité. L'équipe a alors supposé que la carbamylation de la 2-aminométhylpipéridine n'avait pas la même régiosélectivité que son acylation : en lieu et place de **56a**, c'est son isomère **56a'** qui est formé. Le composé final **53a'** possède un lien carbamate secondaire au niveau du fluorophore, qui lui est sensible à l'hydrolyse spontanée contrairement au carbamate tertiaire de **50** : un mécanisme de type E_1CB menant à la libération de l'ELF®-97 est en effet possible. Une autre stratégie est donc nécessaire pour parvenir au produit désiré.

1.2 Nouvelle voie de préparation des sondes à deux espaceurs

Afin que la carbamylation avec le synthon **55** ait lieu sur l'amine en bout de chaîne et non sur l'hétérocycle, on peut utiliser, au lieu de la 2-aminométhylpipéridine, un analogue protégé sélectivement sur son amine secondaire, puis réaliser la déprotection de la pipéridine avant son couplage avec le fluorophore chloroformylé **54**. La méthylation de l'amine primaire permettra d'obtenir **53b** en plus de **53a**. C'est cette approche que j'ai poursuivie et que je vais maintenant présenter.

La protection sélective de la 2-aminométhylpipéridine requiert de discriminer les deux amines, l'une étant primaire et peu encombrée, l'autre secondaire et moins facile d'accès. Toutefois, elles présentent toutes deux une réactivité proche qui rend délicate l'obtention d'une régiosélectivité particulière. De plus, l'identification des deux régioisomères est difficile, voire impossible, avec les méthodes d'analyse spectroscopique habituelles. C'est pourquoi j'ai choisi une stratégie qui, si elle n'est sûrement pas la plus efficace, ne laisse place à aucune ambiguïté quant au produit formé.

J'ai d'abord réalisé la protection de la 2-aminométhylpipéridine sous forme de phthalimide (voir Figure 7.3). L'anhydride phthalique réagissant exclusivement avec des fonctions amines primaires, seule la monoprotection de l'amine en bout de chaîne a lieu. L'intermédiaire formé est ensuite alkylé *in situ* par le bromure d'allyle ; les deux produits d'alkylation peuvent être séparés facilement car seul l'un d'eux est chargé positivement, ce qui permet d'isoler la molécule **58** avec un rendement de 38% sur les deux premières étapes. La retrait du phthalimide selon une méthodologie décrite mais peu commune (voir ci-dessous) a mené au composé **59a**, protégé uniquement sur l'hétérocycle comme je le souhaitais.

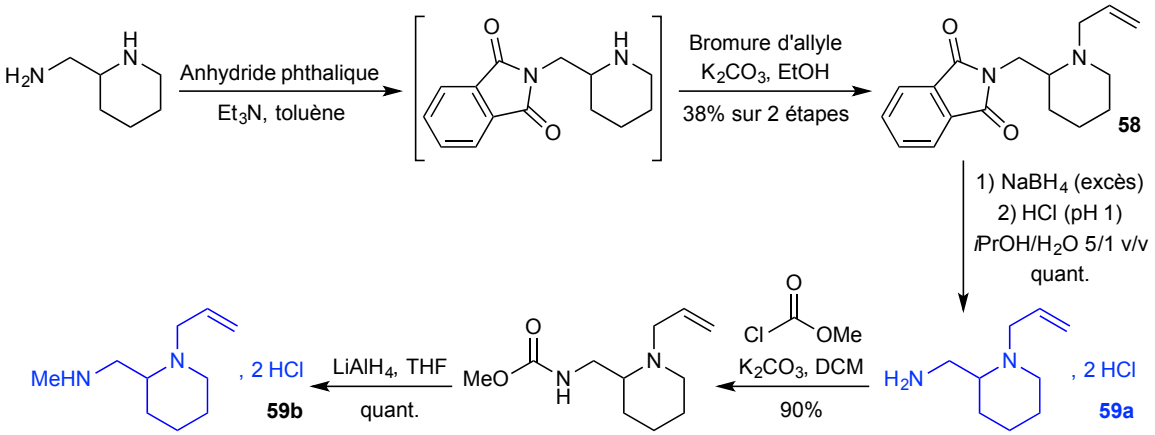


FIGURE 7.3 : Synthèse des intermédiaires **59a-b**, analogues protégés de la 2-aminométhylpipéridine.

Le choix du groupement protecteur de l'amine secondaire était dicté par plusieurs impératifs : il devait être orthogonal à la fois au phthalimide de l'amine primaire, au benzyloxycarbonyle porté par la leucine et à la fonction benzylique de l'espaceur éliminant. Même si en théorie plusieurs groupements de type carbamate comme le Fmoc ou l'Alloc pouvaient convenir,[227] j'ai observé qu'ils ne résistaient pas à la déprotection du phthalimide : l'amine primaire nouvellement libérée va attaquer le carbonyle adjacent pour former une urée cyclique, thermodynamiquement plus stable que le carbamate. Je me suis donc tourné vers un groupement allyle : cette chaîne carbonée n'est pas électrophile, et sa déprotection

n'interfère *a priori* pas avec le reste de la molécule. De plus, j'ai pu mettre à profit mon expérience acquise avec la synthèse des sondes magnétogènes. Toutefois, le retrait du groupement phthalimide par les conditions classiques d'hydrazinolyse occasionnait une réduction partielle de la double liaison. J'ai dû recourir à une séquence en deux étapes : la réduction douce du phthalimide par le borohydrure de sodium est suivie d'une hydrolyse acide,[329, 330] ce qui préserve l'intégrité de la fonction allyle et permet d'obtenir **59** de manière quasi-quantitative.

La fin de la synthèse s'est déroulée sans encombres et est présentée à la Figure 7.4 : la carbamylation de **59a** avec le synthon **55**, suivie de la déprotection de l'hétérocycle selon les conditions que j'avais mises au point pour la molécule **29** (voir page 68), a mené efficacement à l'intermédiaire **56a**. Le couplage avec **54** et la libération de l'extrémité N-terminale m'ont permis d'isoler la cible **53a**.

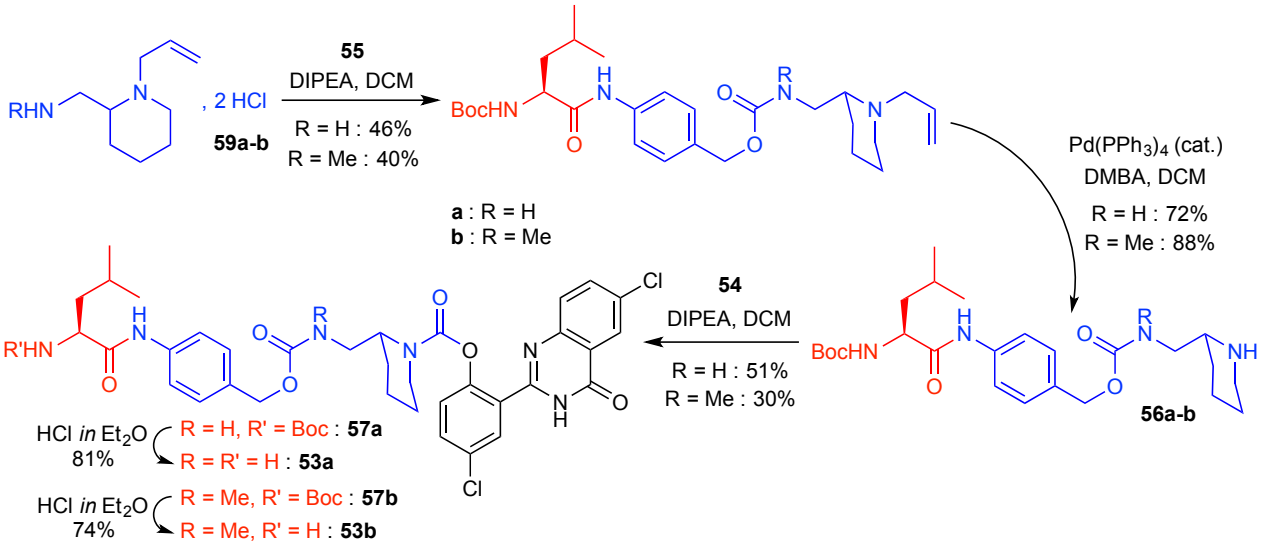


FIGURE 7.4 : Deuxième synthèse des sondes **53a-b** comportant un tandem d'espaceurs.

Afin d'obtenir la molécule **53b**, il est possible de remplacer **59a** par son analogue monométhylé **59b**. Parmi les différentes voies de synthèse que j'ai envisagées, celle qui a donné les meilleurs résultats est présentée à la Figure 7.3 : **59a** a été transformé en deux étapes en **59b** de façon très efficace. Le passage par un carbamate permet de s'affranchir de la di- et triméthylation que j'ai observées à la fois avec l'alkylation directe par l'iodométhane ou lors de l'amination réductrice avec du formaldéhyde et différents réducteurs.[331] Par ailleurs, la réduction de ce carbamate à l'aide de conditions contrôlées préserve le groupement allyle. **59b** est ensuite transformé de la même manière que **59a** pour donner *in fine* la cible **53b**.

1.3 Étude des sondes et mise en évidence de leur instabilité

J'ai réalisé avec Damien Curton, ingénieur d'études biologiste dans l'équipe, des essais d'activation *in vitro* de la molécule **53a** (voir Figure 7.5A). On observe un bruit de fond très important : la fluorescence de la molécule initiale était déjà très grande avant même d'ajouter l'enzyme. Ce comportement était parfaitement reproductible. J'ai alors analysé l'échantillon de **53a** dont je disposais : alors que la molécule **50** se présente sous la forme d'une poudre grise non-fluorescente, **53a** était une poudre blanc cassée qui fluoresçait de la même manière, quoique moins intensément, que l'ELF®-97. Le composé **53a** est donc instable à l'état solide, même stocké sous forme de poudre à -20°C à l'abri de l'humidité et de la lumière : une fraction se dégrade et libère le fluorophore en l'absence de tout stimulus enzymatique. En purifiant à nouveau la molécule, j'ai pu obtenir quelques milligrammes de produit non-fluorescent à l'état solide ; toutefois, après quelques jours, la fluorescence verte était revenue, ce qui est la preuve d'une dégradation et non d'une purification insuffisante.

Ce constat est très surprenant : les liens carbamate et amide de la molécule ne devraient présenter aucune susceptibilité à l'hydrolyse spontanée, étant donné qu'ils sont robustes dans les sondes **50** et

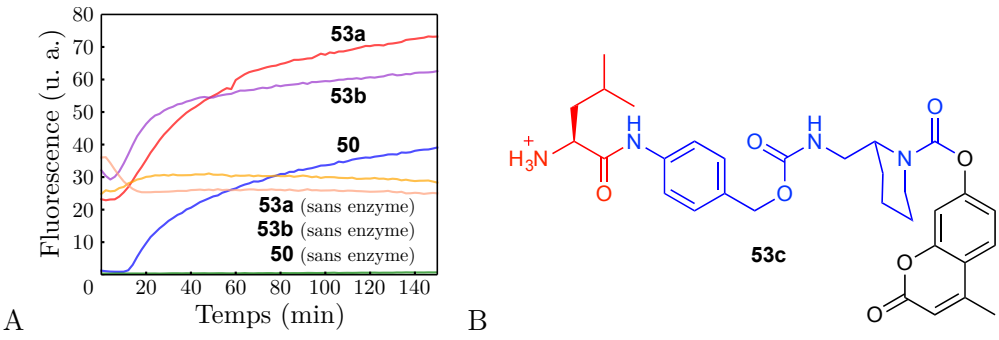


FIGURE 7.5 : A. Fluorescence des sondes **50**, **53a** et **53b** mesurée en fonction du temps (λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm) : concentration : 10 μM ; solvant : PBS ; température : 37°C ; enzyme ajoutée : 0.007 U. B. Structure de la molécule **53c** comportant le fluorophore 4-méthylumbelliférone.

51. De plus, la dégradation a lieu à l'état solide : les seules molécules d'eau de l'atmosphère suffisent pour que la molécule **53a** libère une fluorescence spontanément, alors que les échantillons des sondes précédentes, même vieux de plusieurs années, montrent une stabilité totale.

Nous avons étudié la molécule **53b**, possédant un carbamate tertiaire comme lien entre la PABA et la 2-aminométhylpipéridine. Les mêmes observations ont été effectuées (Figure 7.5A) : **53b** présente la même capacité à générer de la fluorescence spontanément à l'état solide que **53a**. L'instabilité des sondes ne provient donc pas du lien entre les deux espaceurs. Nous avons alors envisagé que le caractère très fortement électroattracteur du fluorophore provoquait la dégradation. Toutefois, la molécule **53c** (Figure 7.5B), analogue de **53a** comprenant la 4-méthylumbelliférone en lieu et place de l'ELF®-97, montre aussi une capacité à générer de la fluorescence en l'absence d'enzyme. À ce jour, la fragmentation des sondes répondant à la LAP et comportant un tandem d'espaceurs reste inexpliquée.

Même si la mesure de fluorescence est parasitée par la grande instabilité, on peut constater sur la Figure 7.5A que le gain en vitesse de fragmentation de **53a** et **53b** par rapport à **50** n'est manifestement pas conséquent. Le remplacement d'un simple espaceur par un tandem d'unités auto-effondrables ne suffit pas à justifier le coût synthétique plus important et la perte en stabilité. Ainsi, j'ai décidé de ne pas poursuivre les investigations sur l'utilisation de deux espaceurs pour concevoir une sonde ciblant la LAP. La génération de fluorescence par la molécule **50** était de toute manière très rapide et permettait déjà un marquage *in cellulo* très efficace.

2 Synthèse de nouvelles sondes répondant à des activités glycosidases

L'utilisation d'un tandem d'espaceurs n'a pas donné de résultats intéressants pour la réalisation de sondes moléculaires servant à détecter la leucine aminopeptidase. Toutefois, cette stratégie pourrait se révéler efficace pour la conception de molécules fluorogènes répondant à une activité glycosidase.

La molécule **52** avait montré une fragmentation très lente comparativement à **50**. La raison pourrait provenir de la structure de la molécule : la cyclisation de l'espaceur mène à un carbamate, ce qui constitue une force motrice beaucoup moins grande que dans le cas de la sonde **50** où une urée est formée. Intercaler un espaceur éliminant entre l'unité osidique et l'espaceur cyclisant permettrait de bénéficier de la libération d'une urée cyclique. De plus, la liaison glycosidique ferait alors intervenir un alcool aromatique et serait plus facile à cliver par l'enzyme cible que son analogue dans **52**.

La sonde **62a** (voir Figure 7.6) pourrait ainsi être une sonde moléculaire efficace. L'alcool 4-hydroxy-3-nitrobenzylique a été employé pour la conception de nombreuses molécules répondant à la β-galactosidase[332, 333] et la β-glucuronidase[135, 224, 225, 334–336] notamment. Le groupement nitro, grâce à l'effet électroattracteur très important qu'il exerce en position ortho par rapport à l'hydroxyle, accélère fortement la cinétique d'effondrement menant à la quinone méthide.[337] Comme précédemment, la molécule **62b** comportant un carbamate tertiaire sera intéressante à étudier compte tenu de ses propriétés potentiellement plus avantageuses.

Si les sondes ciblant la β-galactosidase sont très utiles car cette enzyme est à la fois surexprimée dans les cellules sénescentes[338] et très largement employée comme gène rapporteur,[339] la conception de sondes pour la détection de la cellulase est aussi un de nos objectifs. En effet, l'équipe du docteur Gaël Yvert du Laboratoire de Biologie et de Modélisation de la Cellule à l'ENS de Lyon désire quantifier l'activité de cette enzyme dans le cadre d'un projet de recherche en bioénergétique, sur lequel je reviendrai dans la quatrième partie de ce chapitre (voir page 126). La cellulase est une glycosidase clivant une unité cellobiose (ou β-D-glucopyranosyl(1→4)D-glucopyranose) en bout de chaîne ; les sondes **63a** et **63b** (Figure 7.6) pourront convenir pour évaluer cette activité enzymatique.

2.1 Préparation des sondes

J'ai préparé les molécules **62a-b** et **63a-b** selon la même méthodologie que **53a-b**. J'ai obtenu les intermédiaires carbonates de *p*-nitrophényle **60** et **61** à partir des glycosides protégés et activés sur le carbone anomérique. Leur réaction avec les amines **59a-b**, suivi de la déprotection des fonctions allyles, du couplage avec l'ELF®-97 chloroformylé et de la déprotection des glycosides a mené aux cibles désirées. Les rendements sont comparables à ceux de la synthèse des sondes précédentes **53a-b**. Certaines des étapes ont été réalisées par Mathieu Bordy durant son stage de Master 2 sous ma responsabilité ; il poursuivra ce travail durant sa thèse.

Pour vérifier la supériorité de la stratégie de tandem d'espaceurs par rapport à l'utilisation d'une seule unité auto-effondrable cyclisante, j'ai à nouveau préparé la sonde **52** selon la voie de synthèse mise au point par Maxime Prost (voir Figure 7.7).[145, 211] Une importante fluorescence à temps nul avait été observée (Figure 6.12B) ; pour m'affranchir de ce bruit de fond, j'ai ajouté une étape de purification finale par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), qui permet d'éliminer la quasi-intégralité de l'ELF®-97 résiduel, comme je l'avais fait pour les molécules **62a-b** et **63a-b**.

2.2 Étude *in vitro* de la réponse enzymatique

Les sondes **62a-b** et **52** ont été testées dans les mêmes conditions par Damien Curton (voir Figure 7.8). Les nouvelles molécules montrent une grande stabilité : aucune génération de fluorescence n'a lieu, même après plusieurs heures d'incubation. De plus, aucune dégradation n'a été observée à l'état solide : contrairement au cas des sondes **53a** et **53b**, intercaler un espaceur éliminant entre le substrat enzymatique et l'espaceur cyclisant n'engendre pas d'instabilité.

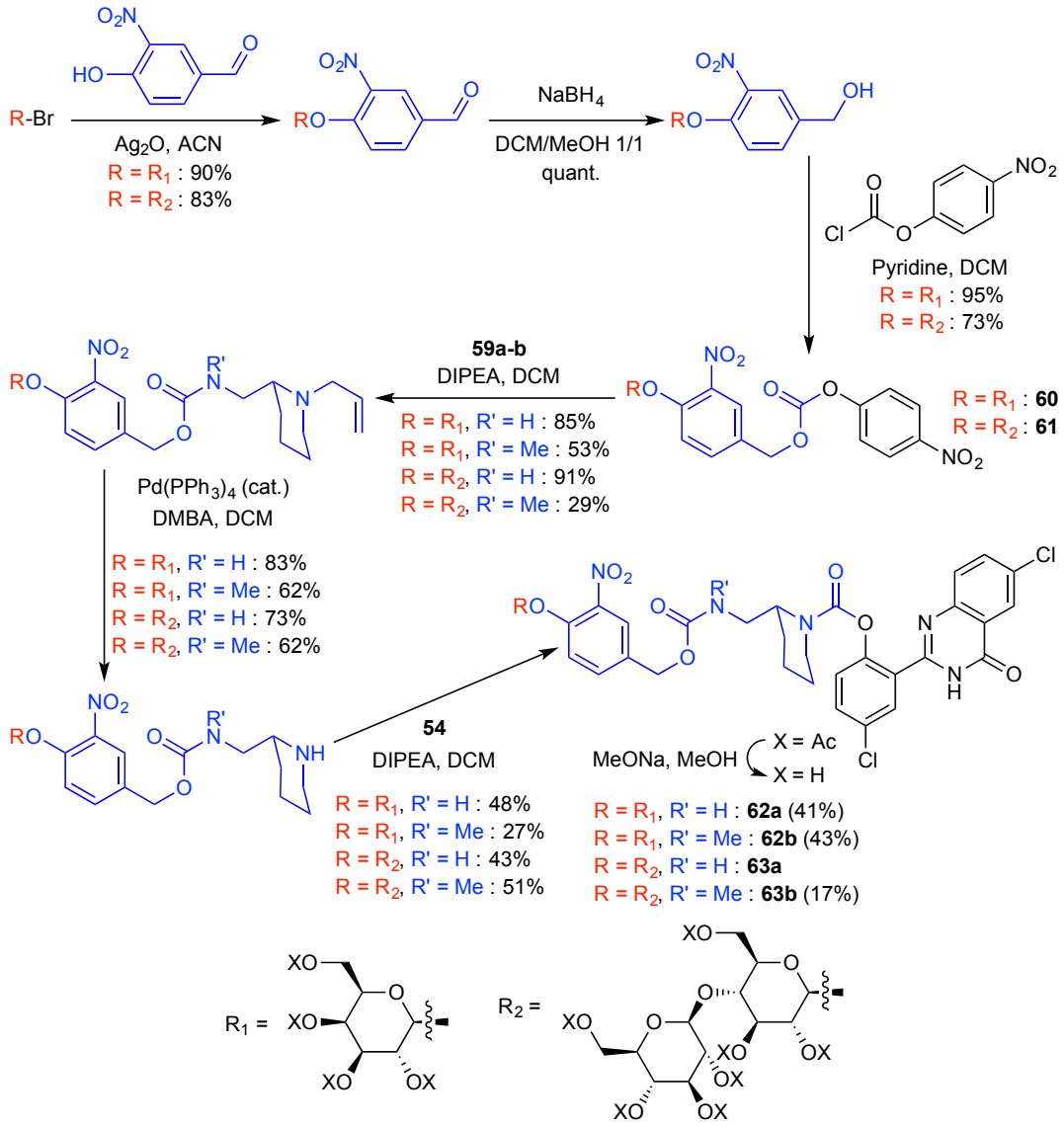


FIGURE 7.6 : Structure et voie de synthèse des sondes **62a-b** et **63a-b** comportant un tandem d'espaceurs et répondant à une activité β-galactosidase ou cellulase.

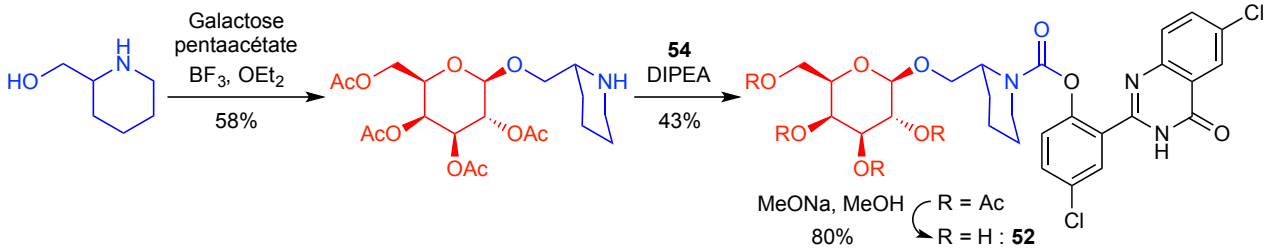


FIGURE 7.7 : Synthèse de la sonde **52** comportant un seul espaceur ; les rendements indiqués sont ceux donnés dans la littérature.[145, 211]

La fragmentation de **62a** est beaucoup plus rapide que celle de **52** (Figure 7.8A) : alors que la fluorescence générée par la sonde d'ancienne génération croît très lentement, un plateau de fluorescence est atteint en environ 50 minutes avec la nouvelle molécule. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue avec la sonde **50** sensible à la LAP : notre objectif d'obtenir des cinétiques aussi intéressantes que précédemment, mais pour la détection de la β-galactosidase, est atteint. Il faut toutefois noter que lorsque 0,007 U d'enzyme étaient ajoutées lors de l'étude de **50**, pas moins d'1 U de β-galactosidase est nécessaire ici ; cependant, la comparaison de l'activité enzymatique d'une famille

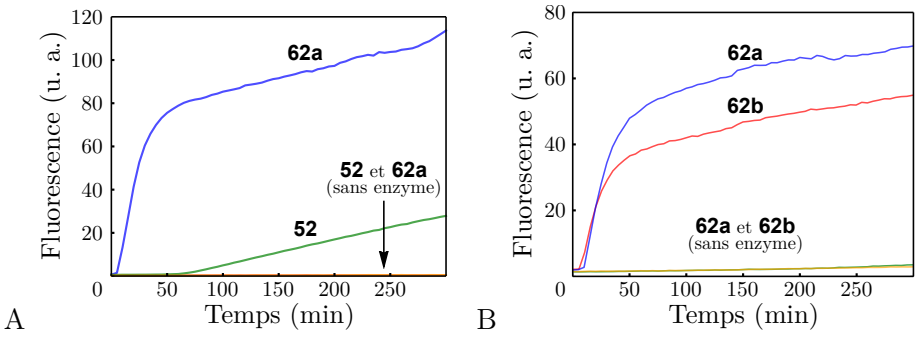


FIGURE 7.8 : Fluorescence des sondes **52** et **62a** (A), **62a** et **62b** (B), mesurée en fonction du temps : concentration : 10 μM ; solvant : PBS ; température : 37°C ; enzyme ajoutée : 1 U.

d'enzyme à une autre est très délicate.

L'incubation simultanée de **62a** et **62b** montre que ces deux sondes présentent une cinétique équivalente (Figure 7.8B) : comme je l'avais observé pour les sondes **53a** et **53b**, la présence d'un groupement méthyle supplémentaire sur l'espaceur cyclisant n'accélère pas l'effondrement de façon suffisamment grande pour justifier le coût synthétique plus important.

Les mêmes constats ont été réalisés pour la sonde **63a** répondant à la cellulase (voir Figure 7.9). L'incubation *in vitro* avec l'enzyme purifiée a montré à la fois une grande stabilité dans le milieu et une réponse rapide. Les temps de demi-activation sont plus longs ici que pour les sondes ciblant la β-galactosidase, toutefois le nombre d'unités d'enzyme ajoutées est aussi trois fois plus réduit.

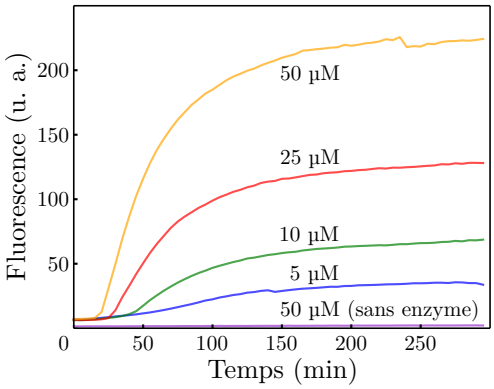


FIGURE 7.9 : Fluorescence de la sonde **63a** mesurée en fonction du temps : solvant : PBS ; température : 37°C ; enzyme ajoutée : 0,32 U.

Les sondes nouvellement préparées bénéficient donc toutes d'une fragmentation très rapide. Leur excellent comportement *in vitro* laisse espérer de nombreuses applications dans des contextes biologiques réels ; je vais les décrire dans les deux prochaines parties.

3 Applications *in cellulo* de la sonde ciblant la β-galactosidase

La sonde **62a** a été employée pour des essais de marquage *in cellulo* de l'activité β-galactosidase. Avec Damien Curton, nous avons réalisé des expériences de microscopie par épifluorescence en culture cellulaire et de cytométrie en flux (FACS, ou *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) afin d'évaluer la capacité de la molécule à générer un signal en présence de l'enzyme cible. Plusieurs lignées cellulaires ont été testées : les HeLa (cellules humaines du cancer du col de l'utérus), les HEK 293 (cellules humaines de rein) et les C17.2. Les deux premières n'expriment habituellement pas l'enzyme cible.

3.1 Expériences de microscopie en culture cellulaire

Une première tentative a été menée avec les lignées HeLa et C17.2, qui serviront respectivement de contrôle négatif et positif. Maxime Prost avait observé que la molécule **52** est capable de marquer les cellules C17.2, mais seulement après un long délai (24 heures) ; aucun signal n'avait été détecté dans les cellules HeLa.[145]

Ici, après 24 heures d'incubation en présence de **62a**, l'immense majorité des cellules C17.2 contient un précipité fluorescent (voir Figure 7.10A). La molécule semble donc capable de traverser la membrane plasmique puis d'être transformée par la β-galactosidase ; le fluorophore produit précipite alors au sein de la cellule. Le marquage est beaucoup plus efficace qu'avec la sonde **52**, ce qui confirme la supériorité de la stratégie de tandem d'espaceurs pour concevoir des molécules ciblant les activités glycosidases. Toutefois, seules des expériences de cytométrie en flux permettent de quantifier avec précision la proportion de cellules fluorescentes ; elles seront décrites ci-après.

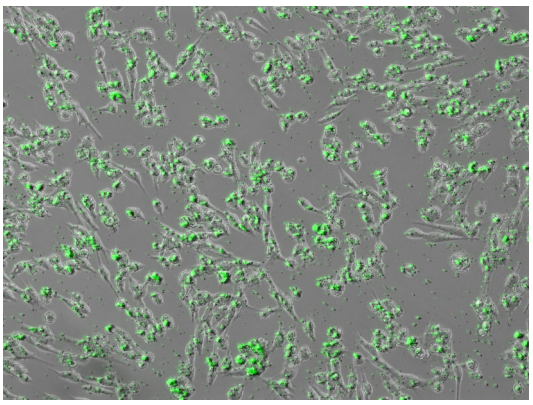
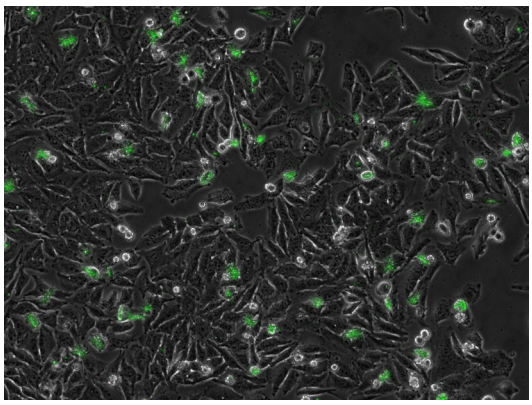
A  B 

FIGURE 7.10 : Images de microscopie de fluorescence de cellules C17.2 (A) ou HeLa (B) après 24 heures d'incubation de **62a** à 50 μM ; superposition de l'image directe par contraste de phase et de l'image de fluorescence (λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm).

On peut noter la présence de quelques précipités extracellulaires de petite taille ; ils peuvent avoir plusieurs origines :

— La sonde peut être instable dans le milieu extracellulaire, ce qui entraîne la libération de fluorophore en l'absence de l'enzyme. Cependant, les essais *in vitro* avaient prouvé une absence de dégradation de **62a**, même après un très long délai. Si le milieu de culture complet, qui est utilisé pour cultiver les cellules, est plus complexe que le PBS, il reste néanmoins peu probable que la sonde ne soit pas stable dans ces conditions.
— La sonde peut être transformée dans le milieu extracellulaire par la β-galactosidase ; néanmoins, cela supposerait que l'enzyme soit sécrétée par ces cellules, ce qui n'a pas été mis en évidence.
— Les précipités peuvent provenir de l'éclatement de cellules marquées ; cette hypothèse me paraît être la plus vraisemblable. L'explosion peut être due à l'accumulation d'agrégats de fluorophore, ou à la mort de la cellule du fait de la toxicité de la sonde ou du fluorophore précipité, voire à

la conjonction de plusieurs de ces phénomènes. J'ai donc étudié la viabilité cellulaire en réponse à la présence de la sonde ; j'y reviendrai ci-après.

Si l'observation d'une fluorescence intracellulaire importante avec les cellules C17.2 est un résultat satisfaisant, il est important de vérifier que les cellules HeLa, qui n'expriment habituellement pas la β-galactosidase, ne sont pas marquées par la sonde **62a**. Malheureusement, l'incubation de la sonde dans les mêmes conditions que précédemment a mené à une fluorescence non négligeable dans les cellules HeLa (Figure 7.10). Il semblerait qu'une faible activité enzymatique subsiste, ce qui mène à un marquage partiel, quoique bien moins important que celui des cellules C17.2. Le fait qu'aucune fluorescence n'avait été observée avec **52** confirme que **62a** est une sonde beaucoup plus sensible. Toutefois, le contrôle négatif n'en est pas un. Il serait tout de même intéressant de s'assurer que seule la transformation enzymatique de la sonde est responsable de la génération de fluorescence, et que le signal ne provient pas d'une instabilité de la molécule *in cellulo*.

Pour ce faire, il est nécessaire d'identifier de nouvelles conditions d'étude, et en particulier de quantifier plus précisément la proportion de cellules marquées dans un échantillon donné. Nous avons ainsi mené des expériences de cytométrie en flux ; pour des raisons de délais et d'accessibilité des équipements, Damien Curton a réalisé seul les manipulations, mais j'ai participé comme toute l'équipe à l'analyse des données.

Des expériences de time-lapse (prise de clichés d'une région définie à un intervalle fixe) pourraient également nous renseigner sur le délai d'apparition de la fluorescence et la manière dont les précipités se forment. Le suivi de la transformation de **50** avait ainsi montré que 26 minutes seulement étaient nécessaires pour observer un signal au sein de cellules HeLa placées à température ambiante (22°C).[209] Toutefois, les tentatives que nous avons menées se sont révélées infructueuses. En particulier, aucune fluorescence n'est observée à température ambiante. Une température de 37°C, idéale pour l'enzyme comme pour les cellules, est manifestement indispensable ; cependant, maintenir ces conditions sur un temps long est beaucoup plus délicat à réaliser.

3.2 Expériences de cytométrie en flux (FACS)

La cytométrie en flux consiste en la mesure de propriétés physiques de cellules individuellement et sur une grande population (les analyses couvrent généralement plusieurs dizaines de milliers de cellules). Sont quantifiées précisément la diffraction dans le sens du faisceau incident (FSC ou *Forward Scattering*), proportionnelle à la taille de la cellule, la diffraction perpendiculairement au faisceau (SSC ou *Side Scattering*), liée à la granularité, et la fluorescence pour différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Il est ainsi possible, en définissant un seuil de fluorescence au-dessus duquel on considère qu'une cellule est marquée, de calculer la proportion exacte de cellules marquées dans un échantillon, et ce avec une statistique très fiable et de manière reproductible entre différentes expériences. Les résultats sont présentés sous forme de courbes de point, ou *dot plots*, avec les deux axes représentant deux grandeurs mesurées et chaque cellule étant figurée par un point. Ce type d'expériences est utilisé en routine en infectiologie pour caractériser l'expression de plusieurs marqueurs simultanément au sein d'une population de cellules.[3]

L'analyse d'une population de C17.2 incubées pendant 24 heures avec **62a** montre que ces cellules ont un caractère granuleux plus prononcé que celles d'une population témoin (voir Figure 7.11). Cela confirme les observations réalisées au microscope : la conversion de la sonde et la précipitation du fluorophore à l'intérieur des cellules entraînent un gonflement de celles-ci, qui peut mener dans certains cas à leur éclatement et à la libération de précipités fluorescents dans le milieu extracellulaire.

Nous avons évalué le marquage de cellules HeLa et C17.2 par les sondes **52** et **62a** après différents délais (45 minutes, 6, 12 et 24 heures) ; les résultats sont représentés à la Figure 7.12. La sonde comportant un tandem d'espaceurs est ici aussi plus efficace : alors qu'avec la molécule d'ancienne génération, le taux de marquage est quasi-nul même après 24 heures d'incubation, **62a** engendre une importante fluorescence intracellulaire à partir de quelques heures. Plus de 90% des cellules C17.2 sont

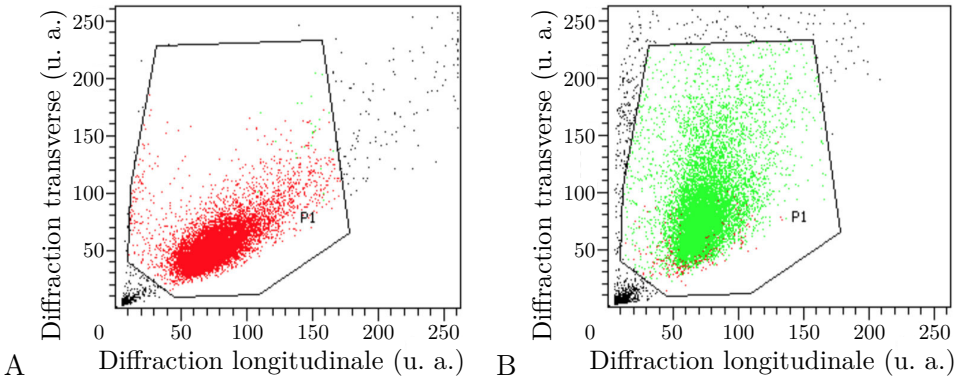


FIGURE 7.11 : *Dot plot* de cellules C17.2 après 24 heures d'incubation de **62a** à 50 μM (B) ou non (A), acquis par cytométrie en flux. Les points rouges représentent les cellules non-fluorescentes et les points verts les cellules fluorescentes.

ainsi marquées au bout d'un jour, ce qui est cohérent avec les précédentes observations au microscope (voir ci-dessus).

Les cellules HeLa ne sont pas non plus marquées par la sonde **52** ; toutefois, en présence de **62a**, environ un quart des cellules sont fluorescentes au bout de 24 heures. On retrouve ici le même comportement que lors des expériences de microscopie : la faible activité β-galactosidase des cellules HeLa suffit à transformer suffisamment de sonde pour qu'une partie non négligeable des cellules devienne fluorescente.

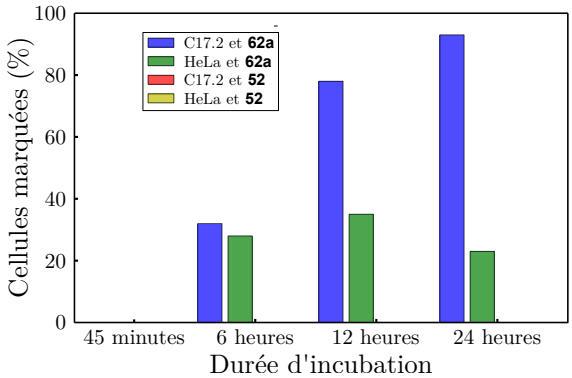


FIGURE 7.12 : Quantification par cytométrie en flux du nombre de cellules marquées pour l'activité β-galactosidase après incubation avec 50 μM de sonde.

Le faible différentiel de marquage entre les cellules HeLa et C17.2 nous a poussé à identifier un autre couple de lignées cellulaires comme contrôles négatif et positif. Damien Curton a alors proposé d'utiliser les cellules HEK 293, qui sont reconnues pour leur capacité à être transfectées facilement. La transfection d'un plasmide contenant le gène de la β-galactosidase permet en effet d'obtenir des cellules exprimant l'enzyme en très grande quantité, faisant de ces cellules notre nouveau contrôle positif. Des cellules HEK 293 non transfectées constitueront le contrôle négatif. La comparaison sera ainsi plus directe car les deux contrôles seront des cellules identiques, à la transfection près.

Une nouvelle expérience de cytométrie en flux a été menée pour évaluer le marquage par la sonde **62a** de cellules HEK 293 transfectées ou non. Les résultats sont présentés à la Figure 7.13. Si un taux de marquage important des cellules transfectées est atteint très rapidement (plus de 50% en seulement 90 minutes), les cellules non transfectées présentent aussi une fluorescence non négligeable et régulièrement croissante (à l'exception d'une valeur aberrante pour un délai de 3 heures). Néanmoins, l'écart observé pour des temps d'incubation courts (moins de quelques heures) est très grand, surtout si on le compare à celui entre cellules C17.2 et HeLa (Figure 7.12). Ces résultats sont encourageants : en diminuant la

concentration de sonde utilisée, et en quantifiant le marquage des cellules après une incubation rapide, nous avons bon espoir d'obtenir un réel contrôle négatif, nécessaire pour marquer efficacement une faible proportion de cellules positives au sein d'une population de cellules négatives.

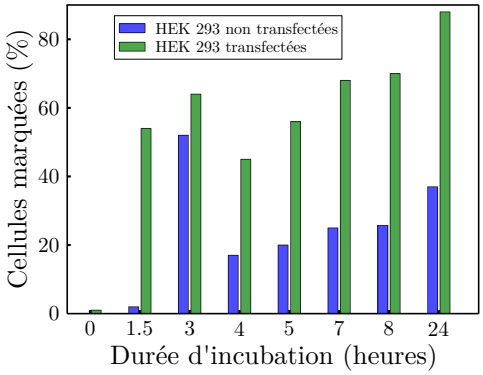


FIGURE 7.13 : Quantification par cytométrie en flux du nombre de cellules HEK 293 marquées pour l'activité β-galactosidase après incubation avec 50 μM de sonde **62a**.

Les expériences de cytométrie en flux nous ont permis de rationaliser les observations que nous avions menées en microscopie, et de confirmer la grande sensibilité de la sonde **62a** pour visualiser l'activité β-galactosidase. Il reste toutefois à identifier des conditions permettant de s'affranchir le plus possible d'une fluorescence résiduelle.

3.3 Étude de la toxicité vis à vis des cellules

Les images de microscopie sur culture cellulaire ont montré l'existence de précipités fluorescents extracellulaires après 24 heures d'incubation avec **62a**. Ils pourraient provenir de l'éclatement de cellules marquées, en réponse à une toxicité de la sonde. J'ai ainsi évalué la viabilité de cellules HEK 293 au contact de la molécule au moyen d'un test de toxicité utilisé couramment en biologie cellulaire, le test MTS.

Ce test consiste à incuber le composé d'intérêt avec les cellules choisies durant une durée définie, 24 heures dans notre cas, puis à quantifier le nombre de cellules qui demeurent en vie (ou qui du moins bénéficient d'une activité métabolique normale) après ce traitement. Pour ce faire, un réactif est ajouté, le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2*H*-tétrazolium ou MTS (voir Figure 7.14A) ; il est transformé par les réductases mitochondriales en un produit appelé formazan qui absorbe intensément la lumière à 490 nm. La mesure de l'absorbance au bout de quatre heures permet de déterminer le taux de cellules viables, en comparant les cellules traitées à des cellules témoin. L'expérience est répétée pour différentes concentrations de molécule étudiée, et réalisée plusieurs fois de manière indépendante afin d'obtenir des valeurs fiables. Une courbe de viabilité cellulaire est alors obtenue, qui permet d'apprécier clairement la toxicité induite par la molécule sur les cellules considérées.

Les résultats du test sont présentés à la Figure 7.14B ; l'incubation de la sonde **62a** induit une mortalité des cellules HEK 293 à partir de concentrations micromolaires. La molécule **50** répondant à l'activité LAP s'était aussi avérée toxique pour les cellules HeLa pour des concentrations supérieures à 25 μM.[209] La nouvelle molécule génère donc une mortalité cellulaire supérieure ; ce comportement peut être dû à l'espaceur éliminant, bien que ce dernier soit décrit dans la littérature comme une espèce peu dangereuse pour les cellules.[340] Il faut toutefois noter que la toxicité observée ne provient pas exclusivement de la sonde : en effet, une partie de celle-ci est transformée en fluorophore dans les cellules HEK 293 (voir ci-dessus), ce qui fait que la sonde cohabite avec des précipités fluorescents et que c'est ce mélange qui induit une mortalité cellulaire non négligeable.

Même si les longueurs d'onde décalées vers le bleu de l'ELF®-97 rendent une application *in vivo* de la sonde **62a** difficile, il serait utile de réduire la toxicité qu'induit la molécule sur les cellules qu'elle marque. Pour cela, d'autres espaceurs éliminants et cyclisants peuvent être envisagés. Toutefois, la voie la plus prometteuse selon moi serait d'employer des fluorophores précipitant avec un seuil plus

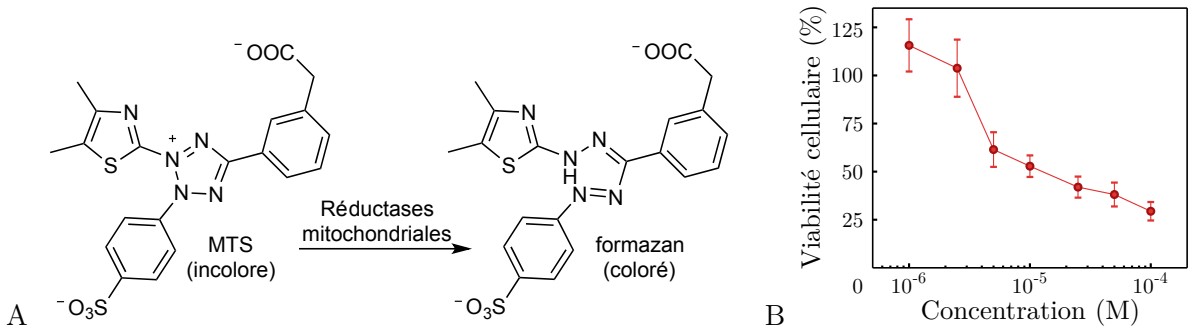


FIGURE 7.14 : Test de toxicité MTS. A. Réactif et produit coloré utilisés dans le cadre du test. B. Viabilité des cellules HEK 293 après 24 heures d'incubation avec la sonde **62a** à différentes concentrations.

bas et disposant de propriétés spectrales plus intéressantes garantissant une meilleure sensibilité. Il serait alors possible de diminuer les concentrations de sondes nécessaires pour marquer les cellules efficacement, et ainsi de réduire la quantité de fluorophore qui s'accumule et occasionne une toxicité.

3.4 Conclusions

L'évaluation *in cellulo* de la sonde **62a** a prouvé sa capacité à marquer très efficacement l'activité β-galactosidase au sein de plusieurs types cellulaires. La cinétique d'activation *in vitro* très rapide que nous avions observée précédemment permet manifestement la génération d'une intense fluorescence dans les cellules exprimant l'enzyme ciblée. La nouvelle molécule est beaucoup plus performante *in cellulo* que sa prédécesseuse **52** : cela montre que la stratégie de tandem d'espaceurs apporte un gain substantiel par rapport au recours à un seul espaceur cyclisant pour la détection de glycosidases. La sonde **62a** a ainsi prouvé sa supériorité à la fois lors des expériences de microscopie et de cytométrie en flux, s'imposant comme un outil précieux pour visualiser la β-galactosidase intracellulaire à l'aide d'un protocole simple.

La molécule **62a** permet une détection très sensible de l'enzyme qu'elle cible, de manière telle qu'elle marque les cellules HeLa et HEK 293 qui ne possèdent pourtant pas une intense activité β-galactosidase. Si un tel comportement peut faire douter de la stabilité de la sonde dans le cytosol, il est toutefois de bonne augure pour une détection efficace de faibles niveaux d'expression enzymatique dans des applications en biologie moléculaire ou *in vivo*. Toutefois, si une sélectivité cellulaire importante est souhaitée, il sera judicieux d'ajouter à la sonde un groupement permettant son adressage vers des récepteurs particuliers. Cette stratégie de double sélectivité (enzymatique et médiée par une unité ciblante) a fait ses preuves pour de nombreux pro-médicaments[120] ; nous allons la poursuivre très prochainement en collaboration avec l'équipe du professeur Sébastien Papot à l'Université de Poitiers.

Les tests de viabilité cellulaire ont démontré une toxicité non négligeable de la sonde **62a**. Ceci n'est pas un problème pour beaucoup d'applications de la sonde en biologie moléculaire ; cependant, il sera tout de même intéressant de travailler à réduire cette nocivité. L'élaboration dans l'équipe de nouveaux fluorophores aux propriétés spectrales et de solubilité améliorées permettra d'obtenir une molécule assurant un marquage aussi efficace mais plus sûr que la molécule étudiée ici.

4 Utilisation de la sonde ciblant la cellulase dans le cadre d'un projet de bioénergétique

La sonde **62a** a montré qu'elle permettait de marquer la β-galactosidase avec une grande sensibilité : l'utilisation d'un tandem d'espaceurs rend l'activation de la sonde rapide tout en garantissant sa stabilité en l'absence de la cible enzymatique. Cette approche étant un succès, il est possible de l'appliquer pour la détection d'autres activités de type glycosidase.

L'équipe de Gaël Yvert, chercheur en biologie travaillant au Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule à l'ENS de Lyon, a débuté un projet de recherche en bioénergétique ; dans ce cadre, ils cherchent à quantifier l'activé cellulase sécrétée par des levures modifiées génétiquement. Nos sondes fluorogènes précipitantes, qui permettent une localisation précise d'une activité enzymatique ciblée dans un échantillon complexe, les ont particulièrement intéressés. Nous avons donc décidé d'initier une collaboration : forts de notre expérience en synthèse et réalisation de tests d'activation *in vitro*, nous prenons en charge la préparation des molécules et l'évaluation de leur caractère fluorogène. Le docteur Gérard Triqueneaux, ingénieur de recherche dans l'équipe de Gaël Yvert, mènera les essais d'incubation des sondes avec les surnageants de levures.

Je commencerai par présenter les grandes lignes de ce projet de recherche, et le rôle que nous pouvons y jouer, avant de détailler les résultats préliminaires que Gérard Triqueneaux a pu acquérir grâce à nos sondes.

4.1 Intérêt de la quantification de l'activité cellulase pour la production de bioéthanol et mise en œuvre

Le bioéthanol représente une formidable alternative aux produits issus du pétrole en tant que carburant utilisable par les moteurs existants. Il est produit par la fermentation de matière organique végétale par des levures, de la même manière que les alcools que nous consommons (avec modération). Le plus souvent, ce sont des céréales, cultivés spécialement dans cet objectif, qui sont utilisés ; toutefois, le coût financier et environnemental est alors très important. Il est beaucoup plus intéressant de profiter des déchets végétaux issus des activités agricoles et industrielles, tels que la paille ou la sciure de bois ; cette approche est ainsi largement utilisée au Brésil, où 50% des voitures individuelles roulent avec un mélange de carburants contenant du bioéthanol issu des cultures de canne à sucre.

La difficulté réside alors dans la dégradation de la lignocellulose, principal composant de ces matières végétales, en glucose, qui sera à son tour fermenté en éthanol (voir Figure 7.15). Actuellement, le processus industriel comprend plusieurs étapes : un traitement des déchets végétaux en milieu acide concentré afin de libérer la cellulose, puis l'addition d'un cocktail d'enzymes, les cellulases, pour cliver les liaisons glycosidiques et produire du glucose, qui sera enfin lui-même transformé par des levures. Pour abaisser les coûts de production, il serait très intéressant de combiner ces deux dernières étapes, notamment en modifiant les levures de manière à ce qu'elles sécrètent de la cellulase.[341]

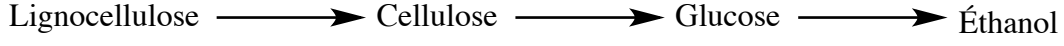


FIGURE 7.15 : Voie de production de bioéthanol à partir de lignocellulose issue de déchets végétaux.

L'introduction de l'activité cellulolytique pour obtenir des levures performantes nécessite de pouvoir mesurer précisément cette activité. Il sera ainsi possible de sélectionner, au sein de nombreux clones générés par exemple par mutagénèse dirigée, celui qui dégradera le plus efficacement la cellulose.[342] La quantification de l'activité cellulase est habituellement réalisée à l'aide de substrats chromogènes et fluorogènes mimant la cellulose[343] ; toutefois, la diffusion de ceux-ci nécessite d'isoler les levures identiques les unes des autres en les cultivant en microplaques. Le nombre de clones pouvant être étudiés dans une même expérience est donc plutôt réduit (il est de l'ordre de 10^3 voire 10^4), ce qui ralentit la découverte de levures très performantes. Nos sondes fluorogènes précipitantes, qui garantissent une très bonne localisation du signal produit, seraient un atout considérable pour le criblage : en quantifiant l'activité de levures uniques dans un échantillon contenant de nombreuses cellules différentes, il

devient possible d'analyser un très grand nombre de clones facilement. La culture de levures en micro-gouttes suivie de la mesure de la fluorescence indépendamment pour chacune à l'aide d'un dispositif de microfluidique permettrait en effet de traiter jusqu'à 10^{10} clones en une seule expérience.[344]

Le groupe de Gaël Yvert a obtenu d'une équipe de microbiologistes irlandaise trois souches de la levure *Saccharomyces pastorianus*, chacune exprimant une des trois sous-activités cellulases isolées du champignon *Trichoderma reesei*.[345] Les chercheurs ont identifié cette levure, employée pour la fabrication du pain, comme plus efficace que son homologue *Saccharomyces cerevisiae* utilisée dans le brassage de la bière. Les trois enzymes considérées sont les suivantes (voir Figure 7.16) :

— La β-glucosidase clive une seule unité glucose au bout de la chaîne de cellulose.

— La cellobiosidase retire un groupement cellobiose, soit un ensemble de deux glucoses.

— L'endoglucanase coupe au milieu de la chaîne osidique (quelques résidus glucose en amont et en aval sont nécessaires pour observer une activité).

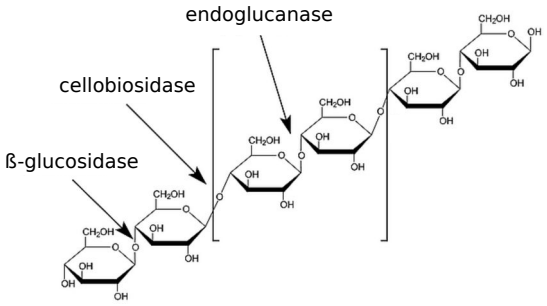


FIGURE 7.16 : Différentes activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de la cellulose en glucose.

Nos collaborateurs désirent dans un premier temps identifier la sous-activité avec laquelle la dégradation de la cellulose sera la plus efficace, puis générer une banque de mutants qui sera criblée pour isoler des variants dont l'activité sera plus grande. Pour cela, Jens Hasserodt a choisi de concevoir une sonde dont le déclencheur sera une unité cellobiose. Il s'agit du meilleur compromis entre les différents impératifs :

— Un déclencheur diosidique permettra de cibler à la fois la β-glucosidase (via un double clivage enzymatique) et la cellobiosidase (ce qui ne nécessitera qu'une seule réaction).

— En termes de synthèse organique, la complexité de la préparation (notamment en ce qui concerne les purifications) augmente avec le nombre de glucoses que la molécule finale contiendra. Notre expérience de la synthèse de la sonde **62a** ciblant la β-galactosidase et possédant un seul glucose nous amène à penser qu'au-delà de deux voire trois unités glucose, il deviendra difficile d'obtenir, à l'issue de toutes les étapes, de grandes quantités de sonde.

J'ai donc préparé les sondes **63a** et **63b** (Figure 7.6) ; les rendements sont corrects, mais néanmoins plus faibles que dans le cas des molécules précédentes, ce qui confirme nos prévisions.

4.2 Résultats préliminaires obtenus avec la sonde 63a

Une première expérience a consisté à cultiver chacune des trois souches de levure exprimant une des activités cellulase, ainsi qu'une souche non modifiée servant de contrôle négatif, durant 86 heures. La sonde **63a** a ensuite été incubée avec le surnageant issu de la culture, et la fluorescence a été mesurée toutes les heures. Un bruit de fond très important est observé : le milieu de culture des levures, riche en différents nutriments, génère une fluorescence importante. De plus, la différence de signal entre les quatre souches est très peu marquée. Il semble que la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon est trop importante pour qu'il soit possible de discriminer entre les différentes situations à l'aide de la sonde.

Dans une deuxième expérience, Gérard Triqueneaux a incubé **63a** non plus directement dans le

surnageant issu de la culture, mais dans du tampon phosphate auquel un petit volume de surnageant a été ajouté. Il apparaît alors clairement que la souche exprimant la β-glucosidase entraîne une fluorescence importante, alors que les deux autres souches ne génèrent pas plus de signal que la levure non modifiée. Des expériences complémentaires ont permis de déterminer les conditions grâce auxquelles il est possible d'obtenir un écart de signal maximal entre la souche sécrétant la β-glucosidase et la souche témoin.

De ces expériences, on peut conclure que la sonde **63a** permet la génération d'une fluorescence importante lorsque la β-glucosidase est présente en grande quantité dans le surnageant de culture. Ce signal important permet un très bon rapport signal sur bruit (jusqu'à 480) lorsque l'on compare la levure sécrétant l'enzyme à une souche contrôle. L'objectif de quantifier précisément l'activité cellulase sécrétée par des levures afin de sélectionner les clones les plus performants pour dégrader la cellulose semble donc réalisable.

Toutefois, le seul renseignement que l'on peut extraire de la deuxième expérience est que la souche exprimant la β-glucosidase est la plus efficace pour activer la sonde. Il est impossible à ce stade de préciser si cette enzyme est la plus à même de cliver les deux liaisons glycosidiques nécessaires à la génération de la fluorescence : il faudrait pour cela connaître l'activité enzymatique présente dans les surnageants des différentes cultures. Il est en effet possible que les deux souches exprimant la cellobiosidase et l'endoglucanase ne sécrètent que de faibles niveaux d'enzyme comparativement à celle sécrétant la β-glucosidase, expliquant ainsi les faibles valeurs de fluorescence observées pour ces deux souches. Cependant, si les niveaux de sécrétion sont partout comparables, seule la β-glucosidase est capable de transformer la sonde, ce qui a deux conséquences :

— La sonde n'est pas adaptée au ciblage des trois sous-activités cellulase ; en particulier, elle n'est pas capable d'être transformée par la cellobiosidase, comme nous l'avions supposé, et malgré le déclencheur cellobiose. Une molécule activable par la cellobiosidase et l'endoglucanase devrait donc comprendre plus de deux sucres.

— Si l'on se concentre sur la seule activité β-glucosidase, il sera utile de raccourcir le déclencheur à une seule unité de glucose. En effet, la transformation de **63a** par l'enzyme nécessite deux coupures successives, ce qui ralentit la génération de la fluorescence et complexifie inutilement la cinétique (voir page 23). La synthèse d'une telle sonde sera aussi plus aisée.

Nous sommes donc ici à un carrefour : selon la direction que l'équipe de Gaël Yvert prendra par rapport aux enzymes à cibler, nous préparerons et testerons différentes molécules comportant des déclencheurs osidiques de taille variable.

5 Conclusions

Les sondes **51** et **52** avaient montré que l'utilisation d'un tandem d'espaceurs auto-effondrables en lieu et place du simple espaceur cyclisant utilisé au sein de **50** permettait de concevoir des sondes à la fois stables et générant un signal rapidement. J'ai commencé par appliquer cette approche pour cibler la leucine aminopeptidase, en préparant les sondes **53a-c** ; toutefois, elles se sont montrées inadaptées car instables à l'état solide. La sonde **50** demeure donc notre meilleur outil pour la détection *in vitro* et *in cellulo* de cette peptidase.

L'utilisation d'un tandem d'espaceur s'est par contre avérée payante pour le ciblage de glycosidases. Les sondes **62a-b** et **63a-b** présentent une très grande stabilité et répondent à leur activité enzymatique respective dans un délai très court, bien inférieur à celui de la molécule précédente **51**. Alors qu'elle était auparavant inenvisageable, une application *in cellulo* devient maintenant possible : **62a** a permis le marquage de l'activité β-galactosidase avec une très bonne sensibilité, comme nous l'avons mis en évidence par microscopie sur culture cellulaire et cytométrie en flux. **63a** a quant à elle été utilisée pour quantifier avec succès l'activité cellulase sécrétée par des levures, dans le cadre d'un projet qui n'en est encore qu'à ses balbutiements mais qui s'annonce très prometteur. Ces résultats dans l'ensemble positifs font actuellement l'objet d'une demande de protection intellectuelle pour ce qui concerne les structures moléculaires et les applications décrites ci-dessus. Dans ce cadre, il sera utile de prouver que la stratégie de tandem d'espaceurs permet de cibler d'autres activités glycosidase que celles étudiées ici et de libérer d'autres fluorophores que l'ELF®-97.

S

Conclusion générale

Conclusion générale

Au cours de ce manuscrit, j'ai présenté l'essentiel des résultats que j'ai pu acquérir durant les trois années qu'ont duré ma thèse de doctorat. J'ai travaillé sur deux projets de chimie biologique, et plus précisément d'imagerie moléculaire, dont la mise en œuvre est totalement différente, mais qui ont exactement la même finalité : parvenir à visualiser, de la façon la plus résolue et la mieux quantifiée possible, des activités enzymatiques d'intérêt dans un organisme vivant, avec comme perspective le diagnostic de pathologies comme le cancer. L'imagerie par fluorescence nécessitant des fluorophores, et l'IRM des molécules paramagnétiques, les molécules que j'ai préparées puis étudiées n'ont rien en commun, sinon le déclencheur enzymatique et les espaceurs éliminants qui permettent leur transformation ; cependant, les défis imposés par l'utilisation *in vivo* de nos molécules demeurent identiques dans les deux cas. Stabilité, rapidité de la réponse enzymatique, précision de la localisation du signal, absence de toxicité, parmi d'autres, sont des caractéristiques essentielles que nos molécules doivent posséder sous peine de ne jamais être appliquées un jour dans un contexte biologique. Et les atteindre toutes est un challenge très difficile que nous devons cependant relever.

En ce qui concerne les sondes fluorogènes précipitantes, de nombreuses difficultés avaient déjà été résolues, notamment grâce au travail de Maxime Prost. L'utilisation du fluorophore précipitant ELF®-97 avait permis une détection *in cellulo* rapide et précise de la leucine aminopeptidase ; grâce à une stratégie inspirée des sondes précédentes, j'ai pu concevoir de nouvelles molécules fluorogènes répondant à des activités glycosidases. L'écueil à surmonter ici était d'ordre cinétique ; avec les sondes de nouvelle génération, cette difficulté est levée, ce qui a permis des applications pour la détection *in cellulo* de la β-galactosidase et *in vitro* de la cellulase. Reste toutefois à améliorer la précision du marquage cellulaire en ajoutant des dispositifs ciblants à nos molécules, et à réduire la toxicité qu'elles génèrent.

La situation était moins florissante du côté des sondes magnétogènes. Si deux avancées considérables avaient été réalisées par Fayçal Touti, les molécules obtenues souffraient encore de nombreux défauts. D'un côté, le complexe comportant une amidine était stable et de fragmentation rapide, mais incompatible avec le milieu biologique. De l'autre, la sonde basée sur l'architecture Katritzky fonctionne en conditions physiologiques, mais est instable, de réponse lente, et inadaptable en sonde pour une activité enzymatique. J'ai travaillé à lever certaines de ces difficultés : la modification de la molécule modèle contenant une amidine a mené à des sondes enzymatiques qui serviront bientôt, je l'espère, pour réaliser le diagnostic *in vitro* de pathologies. Le remplacement d'une amidine par une guanidine a quant à lui mené à un rapprochement vers une utilisation *in vivo*, sans qu'elle soit encore possible. Enfin, la rapidité de la réponse des complexes Katritzky a été améliorée. Mais les indications que nous avons sur la toxicité de nos molécules sont pour l'instant peu réjouissantes et nous font penser qu'il sera nécessaire de prendre des mesures particulières pour la limiter.

J'ai ainsi rencontré de nombreuses difficultés dans la conception de sondes répondant efficacement à des activités enzymatiques : alors que certaines demeurent sans solution concrète à l'issue de mes travaux, j'ai pu en résoudre d'autres, et enfin m'affranchir des dernières en appliquant mes molécules à de nouveaux objectifs non moins intéressants. Quels que soient les réalisations et les échecs que j'ai accomplis et essuyés, le plaisir que j'ai eu et les déceptions que j'ai éprouvées, j'ai appris beaucoup pendant ces trois années, sur le plan scientifique bien sûr, mais aussi et surtout sur le plan humain ; c'est une expérience très formatrice que je ne regrette pas du tout. Et j'espère profondément qu'en

retour ces travaux bénéficieront à l'équipe, à la communauté, à l'humanité qui sait, ou qu'au moins ils ne serviront pas uniquement à garnir une étagère et remplir un congélateur.

Je souhaite enfin de tout cœur bonne chance à Jens et à mes successeurs, que les esprits de la chimie et de la biologie soient de leur côté tout au long de leurs travaux et les mènent à de nombreux succès.

Partie expérimentale

Considérations générales

General notes about chemistry

Available reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich Co., Acros Organics, Alfa Aesar and Tokyo Chemical Industries and used without further purification. All solvents used for complexation were dried by thermally activated molecular sieves (3 Å for ethanol, methanol and acetonitrile, 4 Å for others, sieves activated by 24 h heating at 315 °C) and degassed with the "freeze-pump-thaw" method immediately before use. Dry solvents for other uses were obtained by passing commercially available solvents through a column containing activated alumina and kept over molecular sieves under argon atmosphere. Column chromatography was performed using Merck silica gel Si-60 (40-63 μm), Acros activated neutral alumina (Brockmann I, 60 Å, 50-200 μm), Acros activated basic alumina (Brockmann I, 60 Å, 50-200 μm) or Agilent Bond Elute C18 cartridge (20 mL of immobilized phase).

Unless stated otherwise, all NMR spectra were acquired at 297 K on a Bruker AVANCE 300 (300 MHz and 75 MHz for ^{1}H and ^{13}C, respectively) or 500 instrument (500 MHz and 125 MHz for ^{1}H and ^{13}C, respectively) as indicated. Chemical shifts δ are reported in ppm (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quadruplet, m=multiplet, br=broad) and referenced to the solvent peak. NMR coupling constants J are reported in Hertz and refer to (H,H) coupling.

Low resolution mass spectra were measured at 297 K by direct injection of diluted samples into the mass analyzer of an Agilent Technologies 1260 Infinity LC-MS system running in electrospray ionization (ESI) positive mode. High Resolution Mass Spectra were acquired by the "Centre Commun de Spectrométrie de Masse" of the Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire, Villeurbanne, France. Elemental analyses were performed by Robertson Microlit Laboratories, Ledgewood, New Jersey, United States of America. UV/Vis spectra were recorded with a UV-670 UV/Vis spectrophotometer (JASCO Inc.).

X-Ray Diffractometry experiments were realized by the "Centre de Diffractométrie Henri Longchambon" of the Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne, France. Monocrystals were selected and mounted on a Gemini kappa-geometry diffractometer (Agilent Technologies UK, Ltd.) equipped with an Atlas CCD detector and a Mo-Kα graphite-monochromated radiation source (λ = 0.7107 Å). The intensities were collected at low temperature with the CrysAlisPro software to a maximum 2θ value of 59.2°.[346] Reflection indexing, unit-cell parameter refinement, Lorentz polarization correction, peak integration, and background determination were performed. An analytical absorption correction was applied by using the modeled faces of the crystal.[347] The crystal parameters and details of the data collection are summarized for each compound in the corresponding section. The structures were solved by direct methods with SIR97[348] and the least-square refinement on F^2 was achieved with the CRYSTALS software.[349] All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. The hydrogen atoms were all located in a difference map, but those attached to carbon atoms were repositioned geometrically. The H atoms were initially refined with soft restraints on the bond lengths and angles to regularize their geometry (C-H in the range 0.93-0.98 and N-H in the range 0.86-0.89 Å) and U_{iso}(H) values (1.2-1.5 times the U_{eq} values of the parent atom), after which the positions were refined with riding constraints. Cambridge Crystallographic Database Center accession # 989146 (for **15**) and 989147 (for **18**) contain the supplementary crystallographic data for these molecules.

The solution-phase magnetic moments of complexes were determined by the Evans method with the Schubert refinement.[199, 200] For each complex, a pure sample was dissolved in H_2O/D_2O (90 :10) containing an additional 2% *t*BuOH. The frequency shift of the *t*BuOH ^{1}H-NMR signal between this solution and that of a reference was measured *in situ* by using a coaxial NMR tube ; the corresponding magnetic moments of the complexes were calculated from the frequency shifts. The formulas, calculation parameters, and additional information are summarized on page S16.

The longitudinal relaxation times T_1 of the protons of the water molecules in aqueous solutions of complexes were determined by ^{1}H-NMR spectroscopy on a Bruker AVANCE 300 (7 T, 300 MHz for ^{1}H) spectrometer. For each complex, a pure sample was dissolved in the indicated solvent containing an additional drop of D_2O. The ^{1}H-NMR spectra of the solution were acquired by using an inversion-recovery sequence with increasing recovery times τ. The area of the NMR signal of the water protons, α, is proportional to the total magnetization of the water protons in the solution and was extracted for each spectrum and plotted against τ. The T_1 values were calculated by fitting this curve with the exponential function $\alpha(\tau) = \alpha_0\,(1 - 2\,e^{-\tau/T_1})$.

Cell culture and biology experiments

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Corp.) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen Corp.), 50 U.mL^{-1} penicillin, and 50 μg.mL^{-1} streptomycin (Invitrogen Corp.) in a humidified incubator containing 5% CO_2 in air at 37°C.

Enzymatic *in vitro* kinetics

10 mM stock solutions of probes in MeOH were diluted with PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Invitrogen Corp.) to obtain clear solutions with a range of concentration between 50 μM and 1 mM. 10 μL aliquots of each of these solutions were added to 80 μL PBS in a 96-well black plate, and heated to 37 °C before adding 10 μL of a solution of enzyme. Final concentration of probe is in a range of concentrations between 5 μM and 100 μM ; final concentration of enzyme is as indicated. The plate was then incubated at 37 °C and fluorescence was recorded over the course of time by a fluorescence plate reader (EnSpire, Perkin Elmer). Acquisition wavelengths : λ_{ex} = 355 nm, λ_{em} = 530 nm. The resulting curves are the mean of duplicates.

Fluorescence microscopy of cells

10^5 C17.2 or HeLa cells were seeded in 1 mL of supplemented DMEM in a clear 24-well plate (Corning Costar). After 24 hours of incubation, the medium was removed, cells were washed with PBS and the medium was replaced by an appropriate volume of opti-MEM (Invitrogen Corp.) or DMEM without phenol red. Solutions of probe in a range of concentrations between 5 μM and 100 μM in 1 mL final volume with 1% (v/v) of MeOH were prepared. Cells were then incubated with these solutions for 24 hours before images were taken. The medium was then removed from the wells, cells were washed with PBS and 1 mL of fresh opti-MEM was added.

Fluorescence images were captured using a Zeiss AxioObserver Z1 instrument with EC Plan Neofluar 10X or an Achroplan 40X objective lens. The light source was metal halide fluorescence HPX 100. The Zeiss filter set 21HE was used with λ_{ex} = 325 - 355 nm and λ_{em} = 470 - 555 nm. Images were acquired with an AxioCam MRm3 S/N 5762. Exposure time was around 200 ms for fluorescence images and 20 ms for brightfield images.

Flow cytometry experiments (FACS)

70 000 cells are seeded per well in 24-well plates 24 hours prior to transfection. Cells are transfected (50 to 70% confluenced) by jetPEI reagent (polyplus transfection) using a ratio of 1 μl per 500 ng of DNA by well (mammalian expression vector β-galactosidase human under CMV control promotor).

After an incubation of 20 minutes at room temperature, the mix jetPEI/DNA/NaCl is added to the cells.

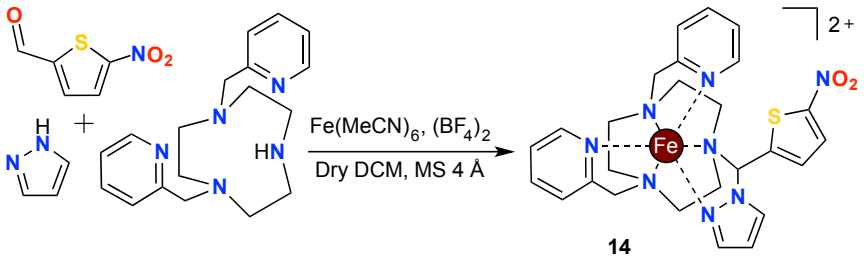
After 48 hours of incubation post transfection, the cells are washed 3 times by PBS and the β-galactosidase probe is added to the cells. When incubation time is over, cells are washed with PBS and trypsinised to put them in flow cytometry tubes. The cells' fluorescence is analysed in a BD LSRII flow cytometer with UV laser (4 lasers : 355, 488, 561 or 633 nm) after the change of adapted filters (525 nm emission) and the optimization of setting voltages for optimal sensitivity.

Viability tests

10^3 HeLa cells were seeded in 100 μL of supplemented DMEM in a clear 96-well plate (Corning Costar). After 24h of incubation the medium was removed, cells were washed with PBS and medium was replaced by an appropriate volume of DMEM (Invitrogen Corp.). A desired volume of stock solutions of molecule (in PBS) was added to create a range of concentrations in 150 μL final volume. Cells were then incubated for 24h. The supernatent was subsequently removed, cells were washed with PBS ; 100 μL of DMEM and 20 μL of the MTS reagent (CellTiter 96 AQueous NonRadioactive Cell Proliferation Assay, Promega) were added. Cells were incubated for another 4h period and absorbance at 490 nm was measured with a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer). The percentage of viable cells is calculated by dividing the absorbance at a given concentration by the absorbance at 0 μM. The given results are the mean of two independent experiments performed in triplicate.

Données expérimentales du chapitre 3

Synthesis of complexes 14-18



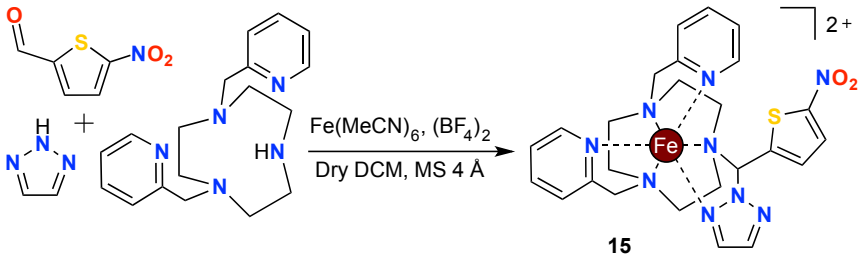
14

In a 50 mL flask, activated 4 Å molecular sieves (2.5 g), 1*H*-pyrazole (131 mg, 1.93 mmol, 1.5 eq.), and 5-nitrothiophene-2-carbaldehyde (303 mg, 1.93 mmol, 1.5 eq.) were added to a solution of 1,4-bis(pyridin-2-ylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane (400 mg, 1.28 mmol, 1.0 eq.) in dry dichloromethane (15 mL). This mixture was stirred under an inert atmosphere for 15 h at room temperature. An anhydrous acetonitrile solution of $[Fe(BF_4)_2,(CH_3CN)_6]$[192] (1.28 mmol, 1.0 eq.) was then added in a titration-like manner. The resulting solution was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in a minimal volume of water/MeCN (95/5 v/v) ; the resulting solution was subjected to reversed-phase column chromatography with a preconditioned C18 cartridge. The fractions were analyzed by mass spectrometry, the purest ones were collected, and the solvents were removed *in vacuo* to yield a red resin. The resin was recrystallized by the liquid/liquid diffusion of diethyl ether into a saturated MeCN solution at 4 °C to yield red-brown microcrystals (0.13 g, 14%).

^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O) : peaks are too broad to be significant (spectrum is disclosed later).

LRMS (ESI) : m/z (%) = 287.1 (100) $[M]^{2+}$.

Elemental analysis : $C_{26}H_{33}B_2F_8FeN_8O_{3.5}S$ (775.1) : calculated C 40.2, H 4.2, N 14.4 ; found C 40.4, H 3.8, N 14.1.



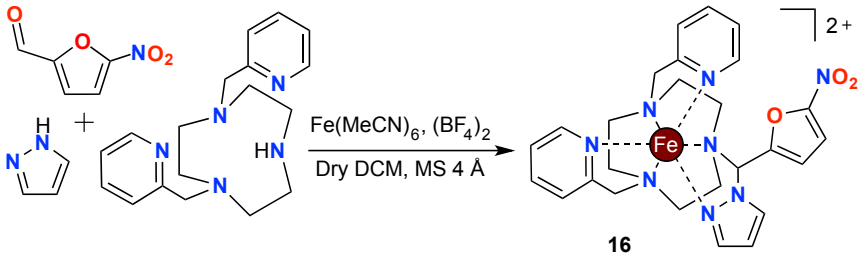
15

The same procedure was applied with 2*H*-1,2,3-triazole and 5-nitrothiophene-2-carbaldehyde to yield red-brown crystals (0.12 g, 12.5%) suitable for X-ray diffraction analysis.

^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O) : peaks are too broad to be significant (spectrum is disclosed later).

LRMS (ESI) : m/z (%) = 287.5 (100) $[M]^{2+}$.

Elemental analysis : $C_{25}H_{34}B_2F_8FeN_9O_{4.5}S$ (794.1) : calculated C 37.8, H 4.3, N 15.8 ; found C 37.7, H 4.0, N 15.5.



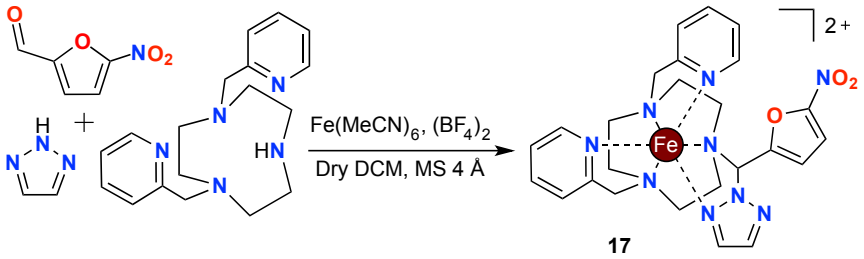
16

The same procedure was applied with 1*H*-pyrazole and 5-nitrofuran-2-carbaldehyde to yield a red-brown microcrystalline powder (90 mg, 10%). Attempts to crystallize the powder from MeCN solutions were unsuccessful ; the powder was used for subsequent studies.

^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O) : peaks are too broad to be significant (spectrum is disclosed later).

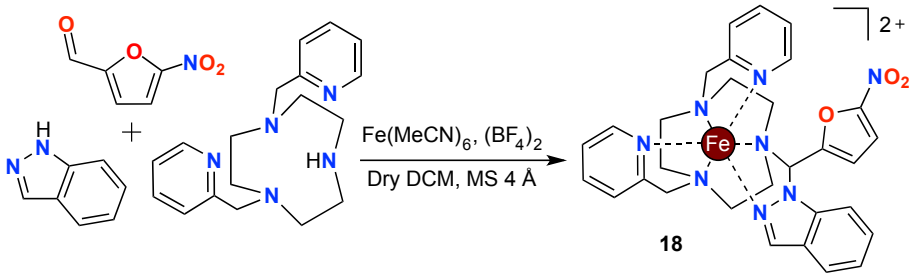
LRMS (ESI) : m/z (%) = 279.1 (100) $[M]^{2+}$.

Elemental analysis : $C_{26.5}H_{32.5}B_2Cl_{1.5}F_8FeN_8O_4$ (809.7) : calculated C 39.3, H 4.0, N 13.8 ; found C 39.1, H 3.7, N 13.5.



17

The same procedure was applied with 2*H*-1,2,3-triazole and 5-nitrofuran-2-carbaldehyde ; unfortunately no product could be isolated.



18

The same procedure was applied with 1,2-benzopyrazole and 5-nitrofuran-2-carbaldehyde to yield red-brown crystals (0.10 g, 10%) suitable for X-ray diffraction analysis.

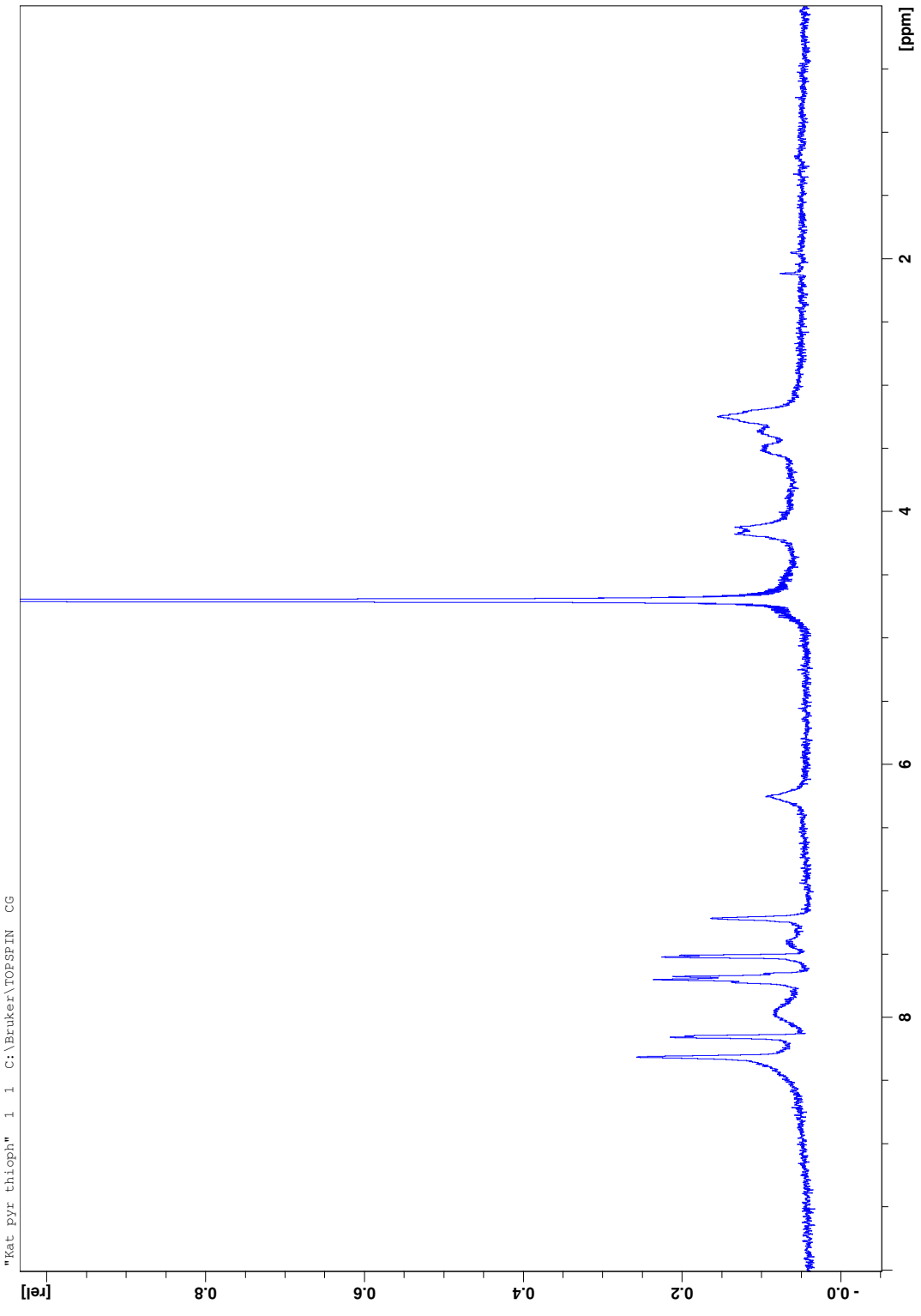
^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O) : peaks are too broad to be significant (spectrum is disclosed later).

LRMS (ESI) : m/z (%) = 304.1 (100) $[M]^{2+}$.

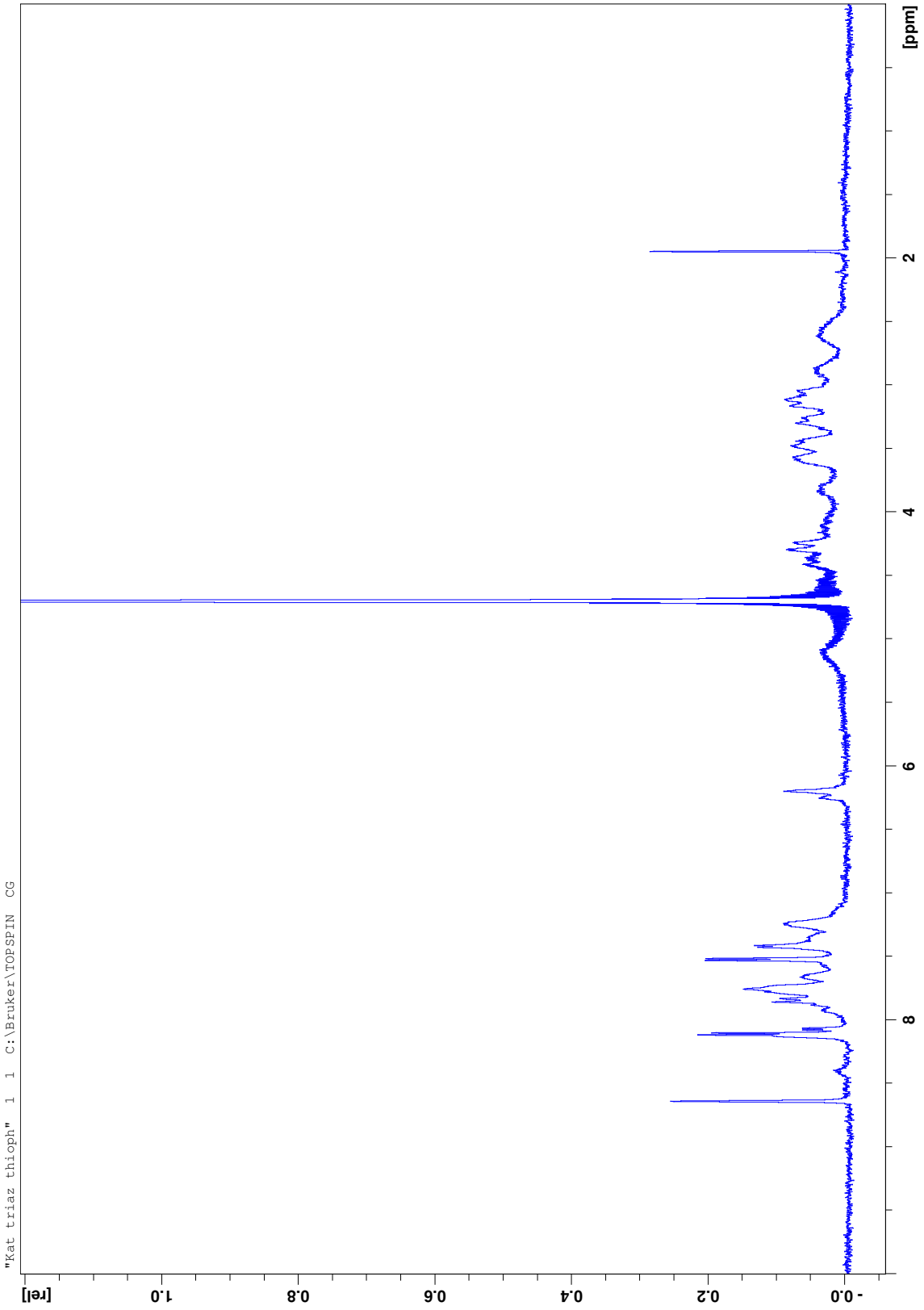
Elemental analysis : $C_{34}H_{38}B_2F_8FeN_{10}O_3$ (864.2) : calculated C 47.3, H 4.4, N 16.2 ; found C 47.2, H 4.2, N 16.4.

^{1}H-NMR spectra

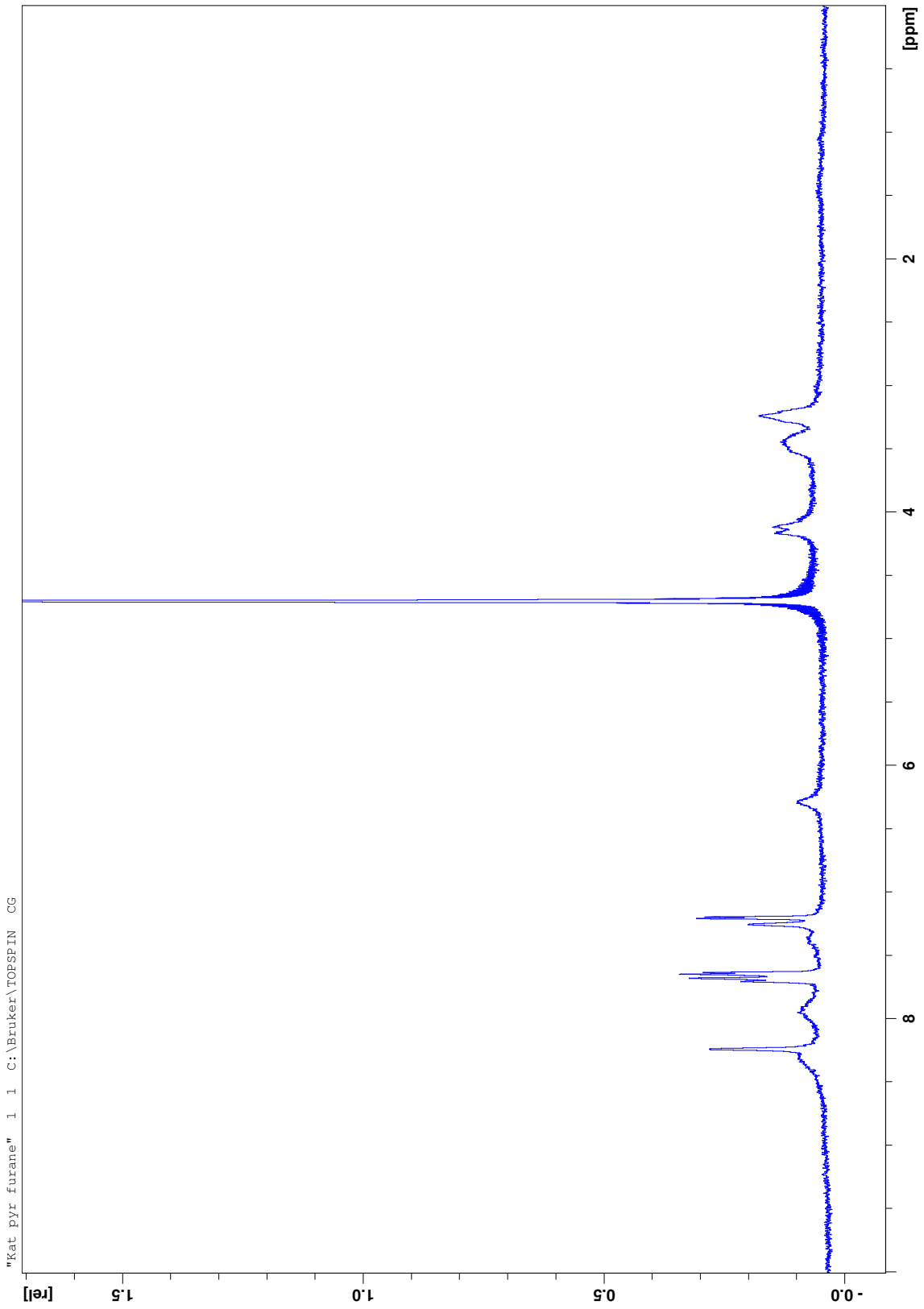
Complex 14 (dissolved crystals)



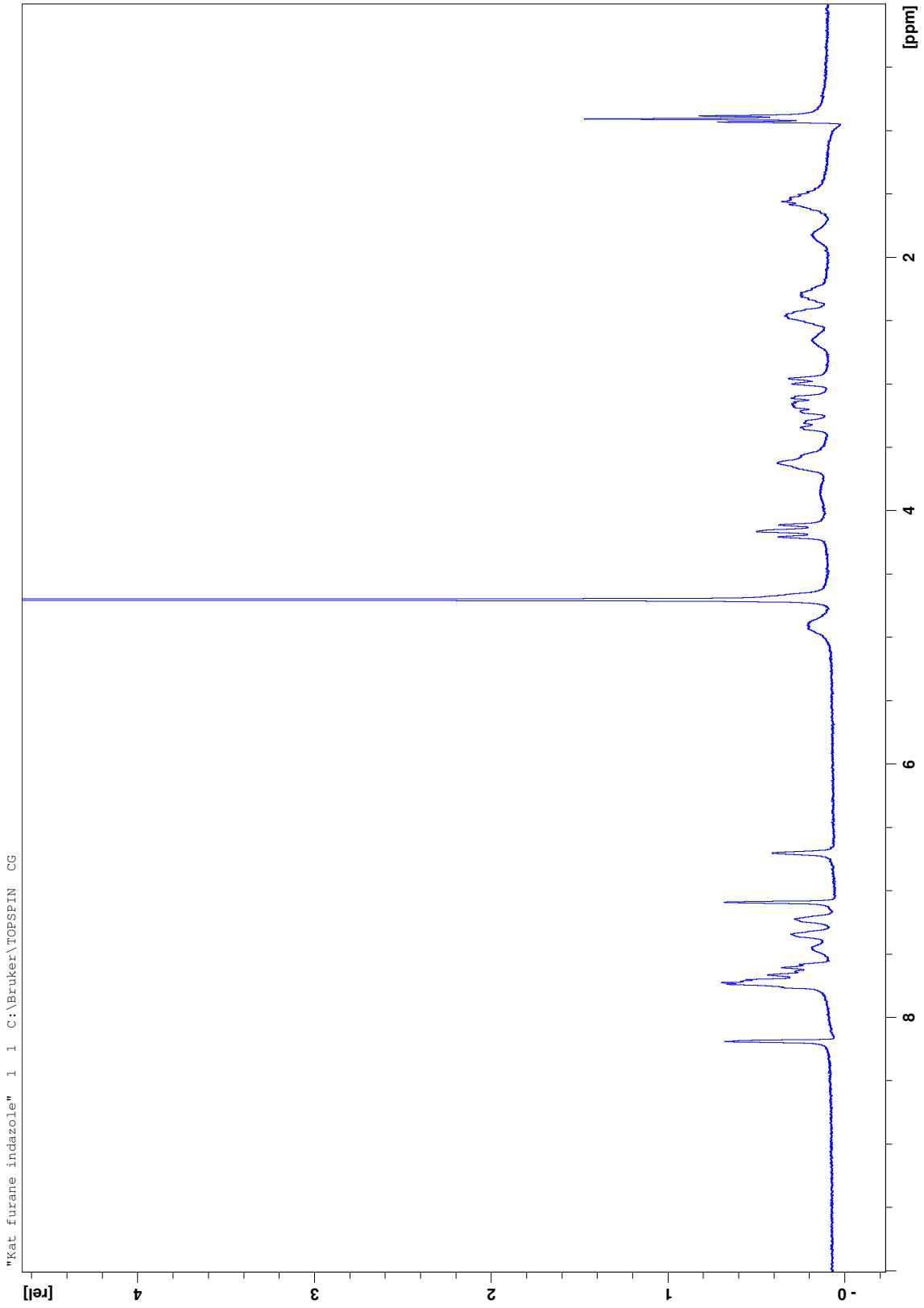
Complex 15 (dissolved crystals)



Complex 16 (dissolved powder)

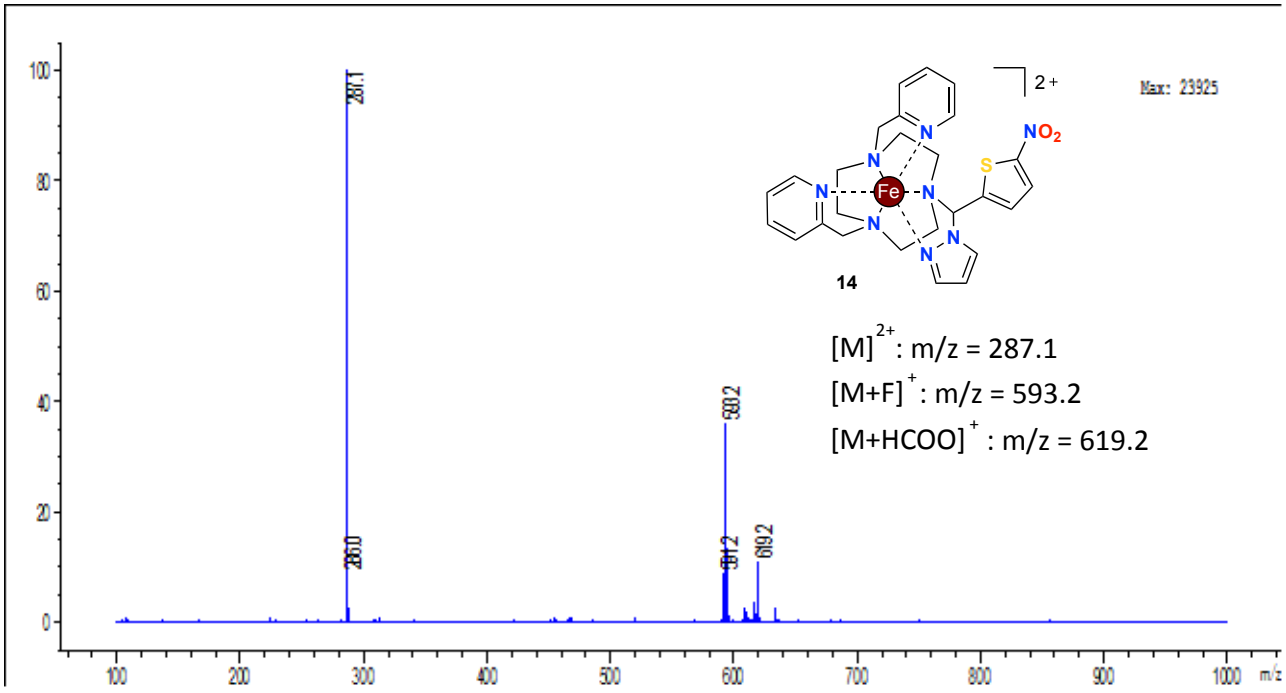


Complex 18 (dissolved crystals)

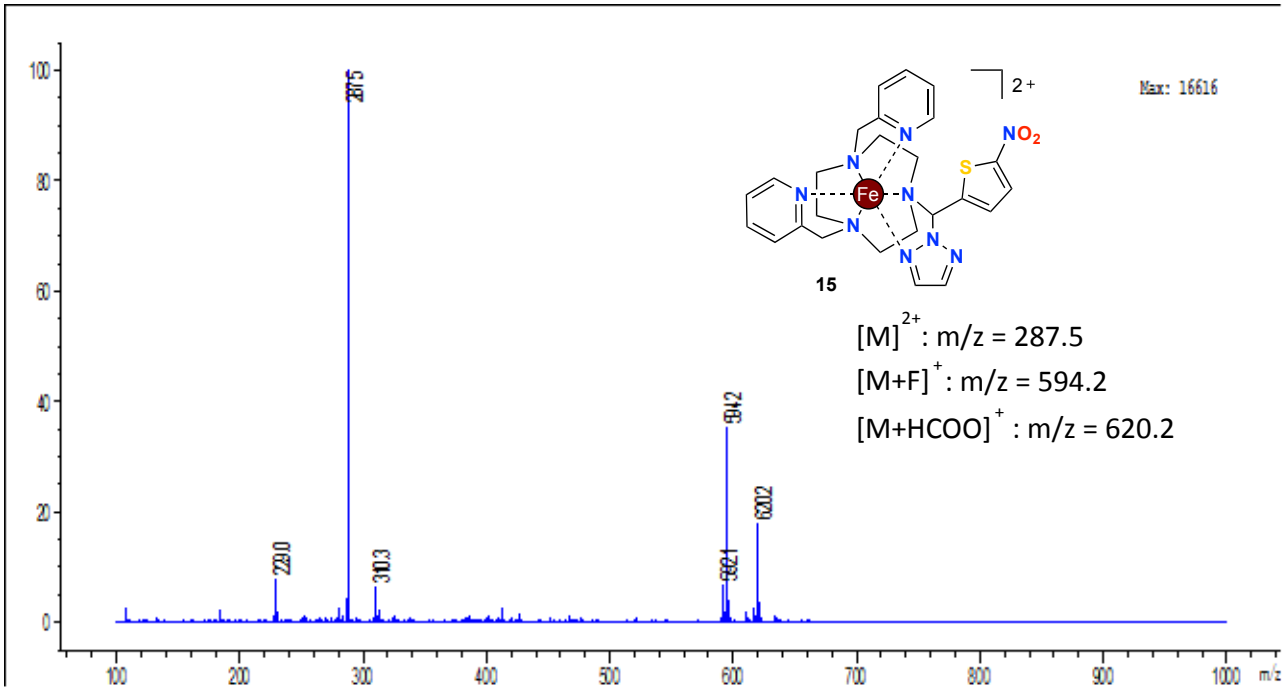


Low resolution mass spectra

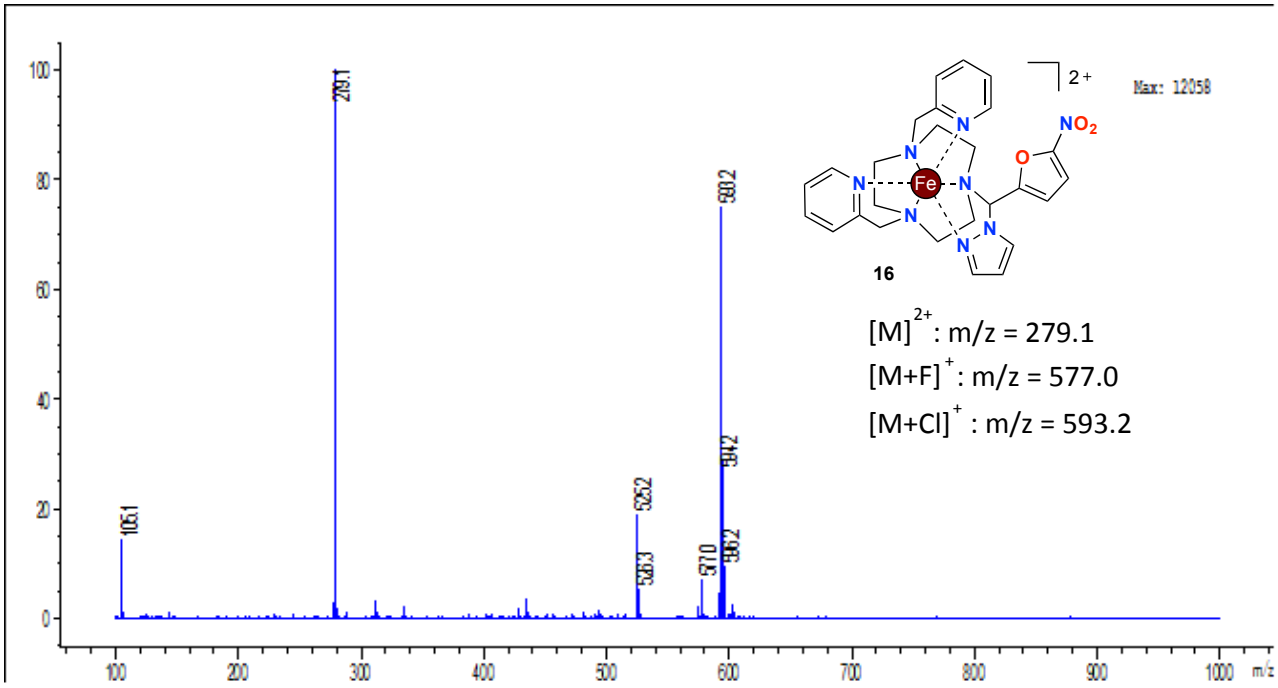
Complex 14 (dissolved crystals)



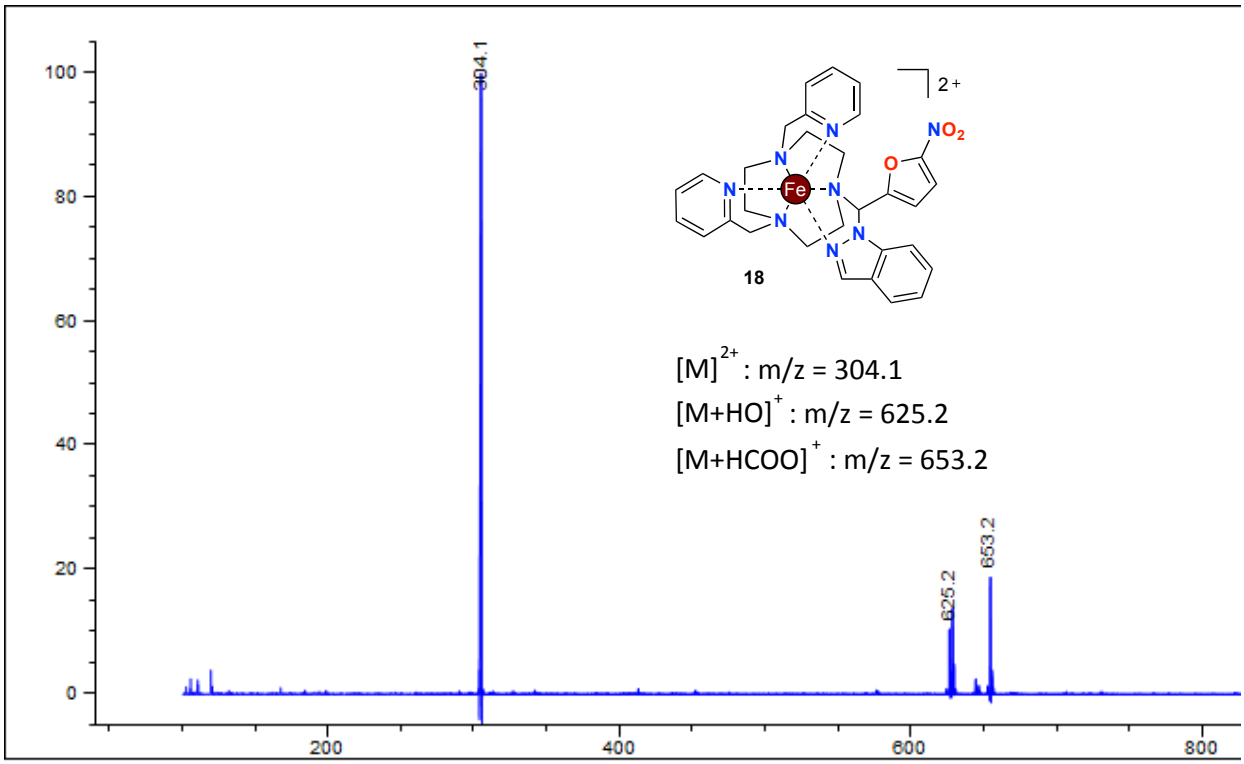
Complex 15 (dissolved crystals)



Complex 16 (dissolved powder)



Complex 18 (dissolved crystals)



X-ray structural analyses

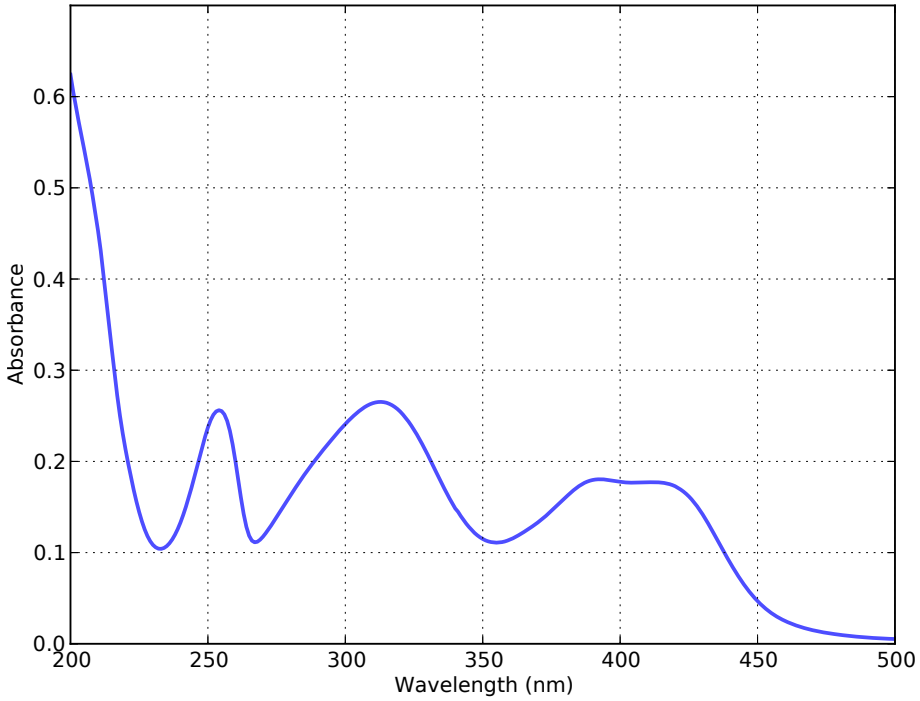
	15	**18**
Empirical formula	$C_{29}H_{35}B_2F_8FeN_{11}O_2S$	$C_{30}H_{32}FeN_8O_3.2(BF_4).2(C_2H_3N)$
M/g.mol	831.19	864.19
crystal system	Triclinic	Triclinic
space group	P-1	P-1
a/Å	10.172(5)	10.2079(5)
b/Å	13.010(5)	11.8829(7)
c/Å	13.391(5)	16.7582(9)
α/°	108.368(5)	71.628(5)
β/°	100.879(5)	77.202(5)
γ/°	92.709(5)	88.687(5)
V/Å^3	1706.9(12)	1878.81(19)
Z	2	2
T/K	293	100
λ/Å	0.71069	0.7107
D_{calc}/g.cm^3	1.617	1.528
M(Mo Kα)/mm	0.596	0.49
no. of data measured	42213	28985
unique data (R_{int})	8691(0.048)	9153(0.041)
observed data [$I > 2(\sigma)I$]	7556	7442
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]^a$	0.0578	0.054
$wR(F^2)^b$	0.0843	0.171
$\Delta\rho_{min}$, $\Delta\rho_{max}$/e.Å^3	-0.96, 0.99	-1.12, 1.14

$^a : R = \sum(|F_0| - |F_c|)/\sum|F_0|$. $^b : R' = [\sum w(|F_0| - |F_c|)^2/\sum F_0^2]^{1/2}$ where $w = [\sigma^2(F_0)]^{-1}$

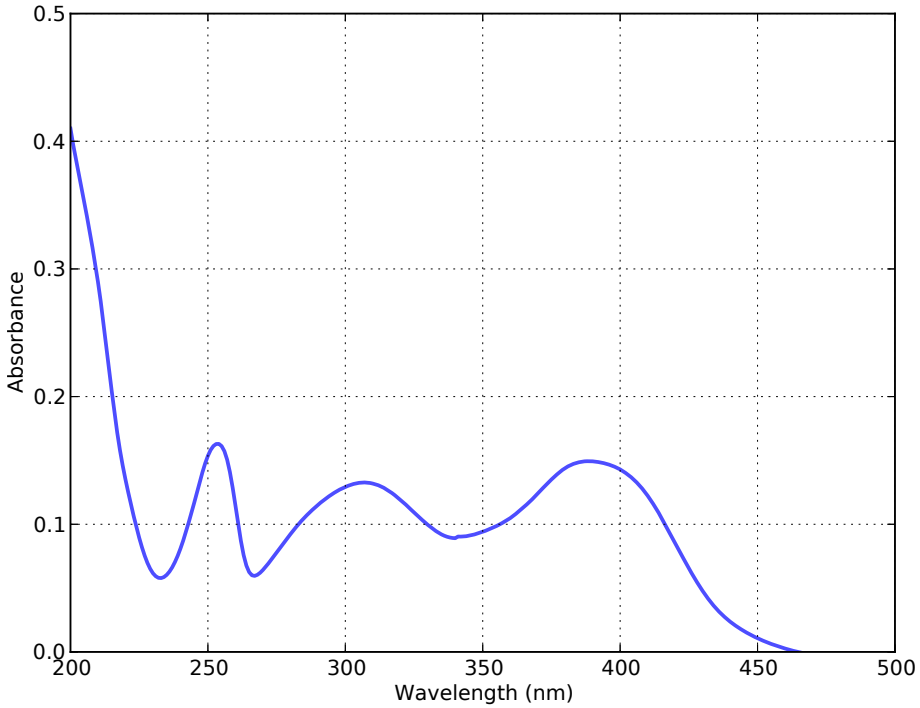
UV-visible absorption spectra

Solvent : PBS 50 mM ; concentration : 0.02 mM

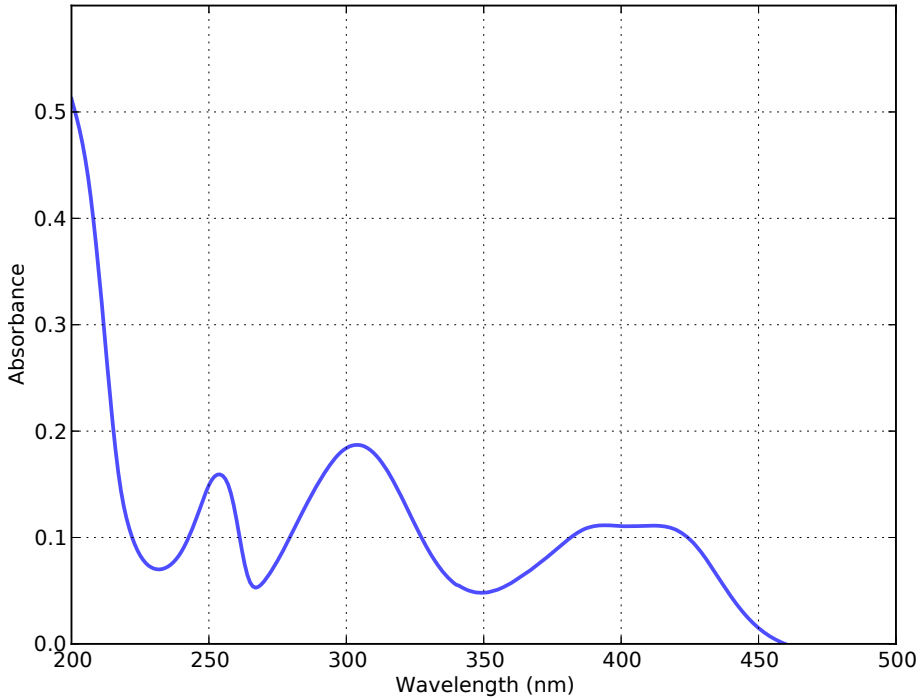
Complex 14 (dissolved crystals)



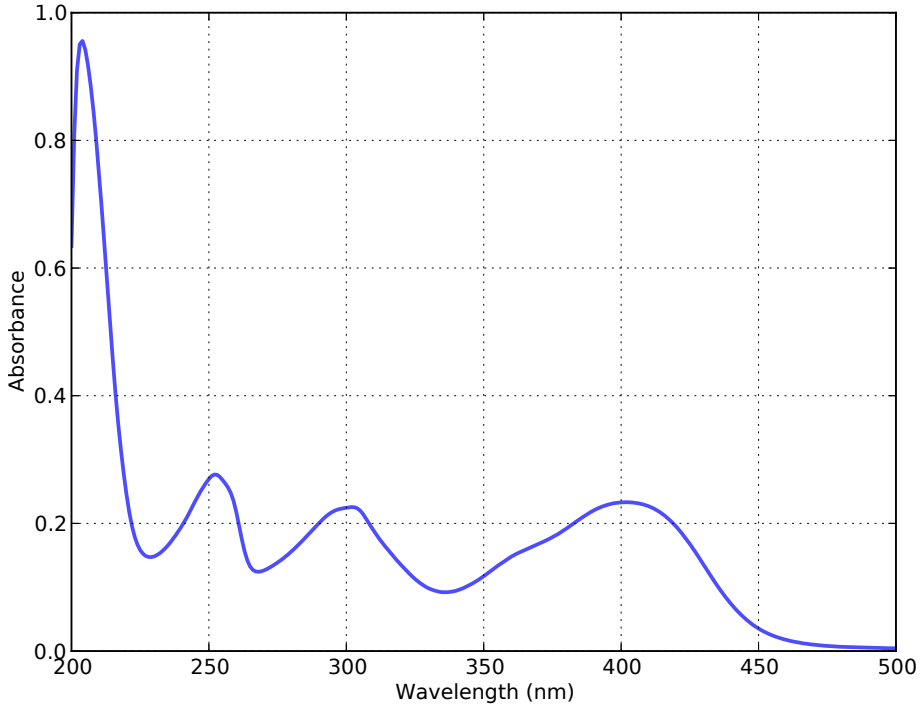
Complex 15 (dissolved crystals)



Complex 16 (dissolved powder)

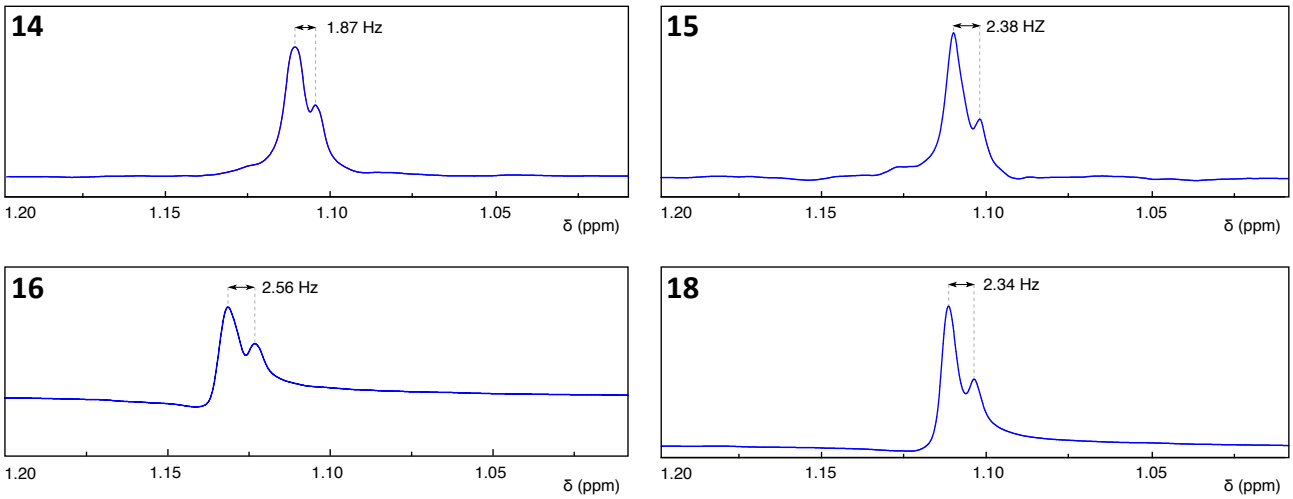


Complex 18 (dissolved crystals)



Solution-phase magnetic moment measurements (Evans's method)

Determination of frequency shifts of the *t*BuOH ^{1}H-NMR signal :



The following equation is used by the Evans' method to calculate the magnetic moment μ_{eff} :

$$2.828\sqrt{\frac{T\,\delta\nu}{\nu_0\,S_f\,C}} = \mu_{\text{eff}} \tag{7.1}$$

where T is the temperature (K), S_f is the symmetry factor of the coil (4/3 for a cylindrical sample in a superconducting magnet with sample axis parallel to the magnetic field), C is the molar concentration (mol.cm^{-3}), ν_0 is the ^{1}H-NMR spectrometer frequency and δ is the frequency shift (Hz) compared to the reference.
No diamagnetic correction was introduced into the calculations for paramagnetic compounds. However, they can be evaluated either 1.) by using this same procedure to also determine the diamagnetic contribution for the corresponding diamagnetic complex with a different metal ion[350] or 2.) by use of Pascal's constants.
Calculation of magnetic moments :

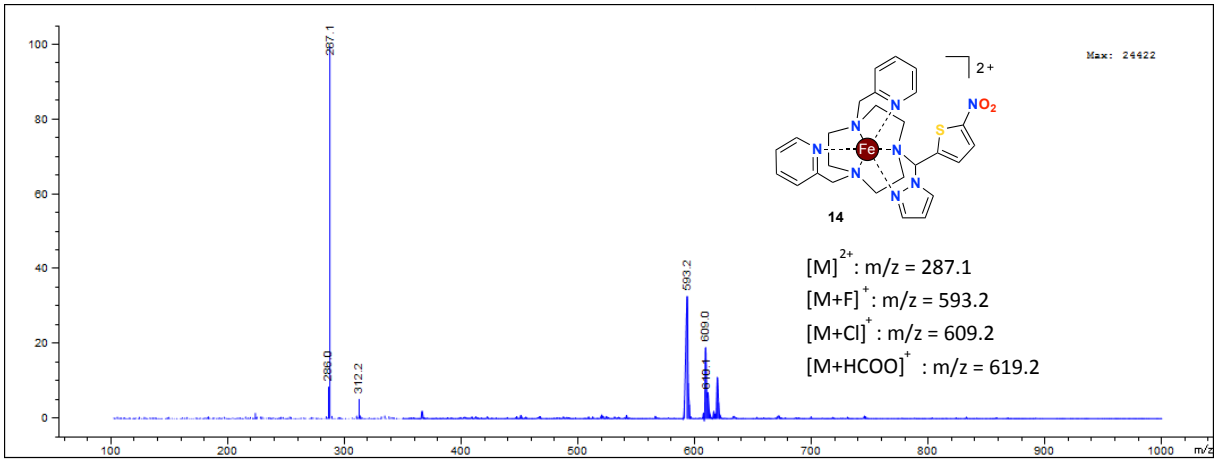
	frequency shift (Hz)	concentration (mM)	μ_{eff}/μ_B
14	1.87	6.54	0.74
15	2.38	5.73	0.89
16	2.56	8.65	0.75
18	2.34	10.1	0.66

Experimental parameters : T = 293 K ; ν_0 = 300 MHz.

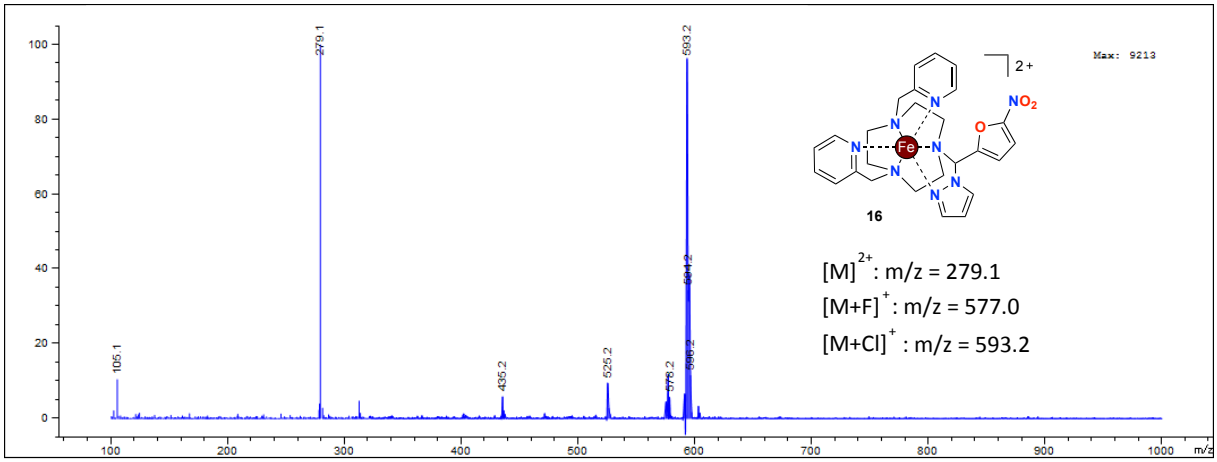
Low resolution mass spectral monitoring of robustness (14-16, 18)

Solvent : PBS 50 mM ; concentration : 4 mM

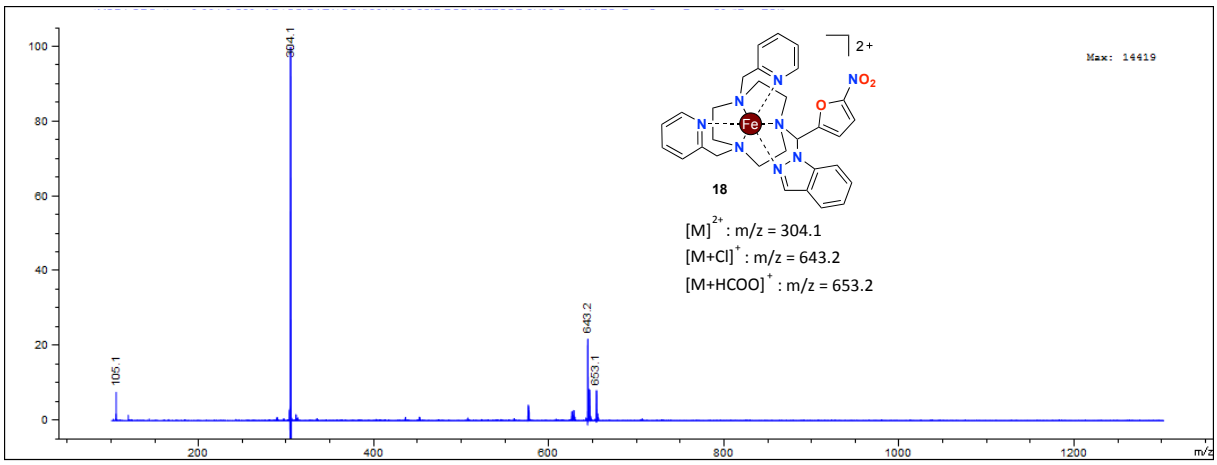
Robustness of 14 (dissolved crystals) after 2 hours



Robustness of 16 (dissolved powder) after 2 hours

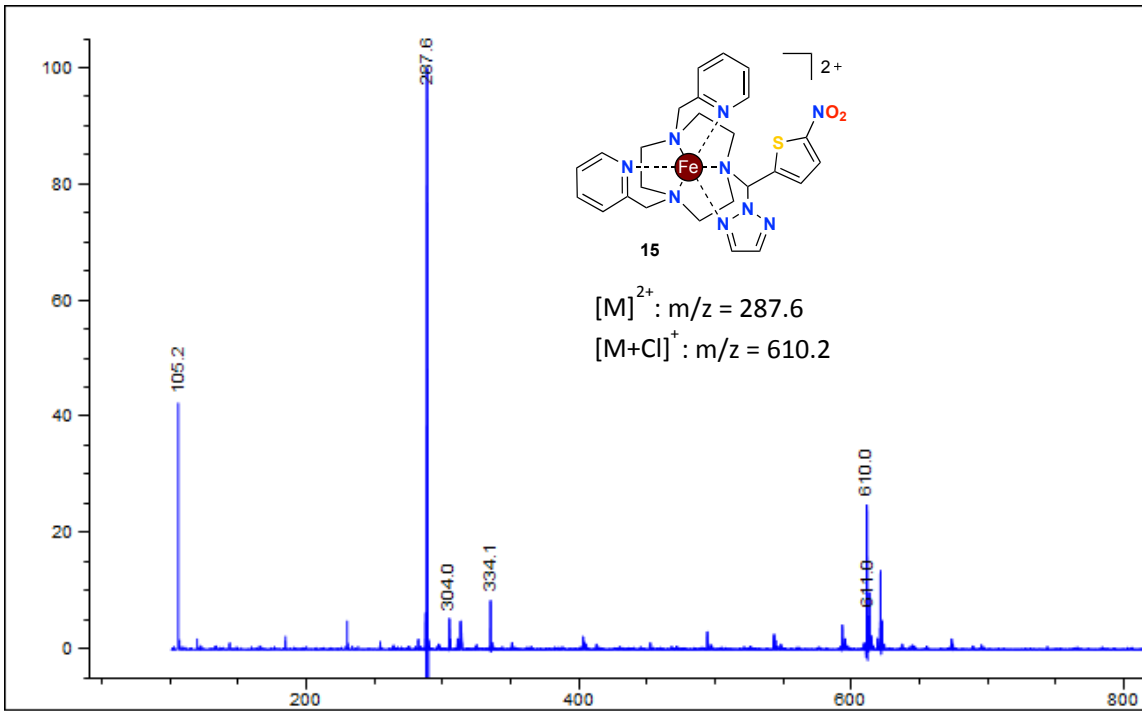


Robustness of 18 (dissolved crystals) after 2 hours

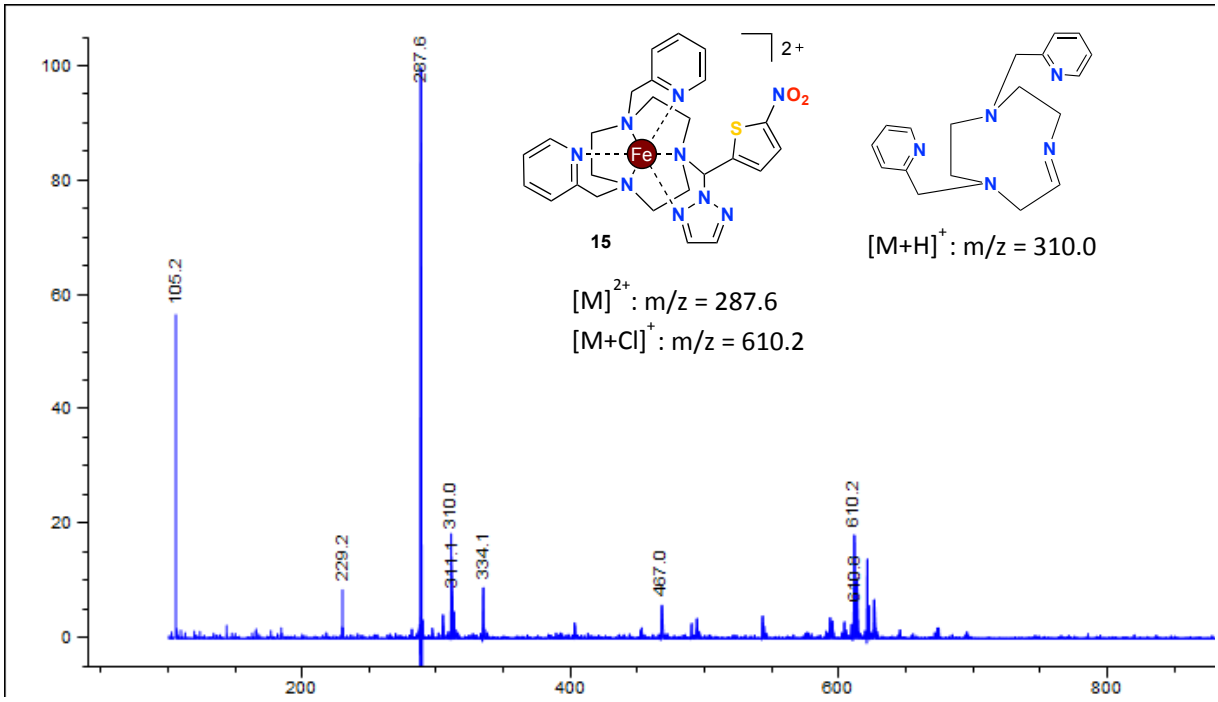


Absence of robustness of 15 (dissolved crystals)

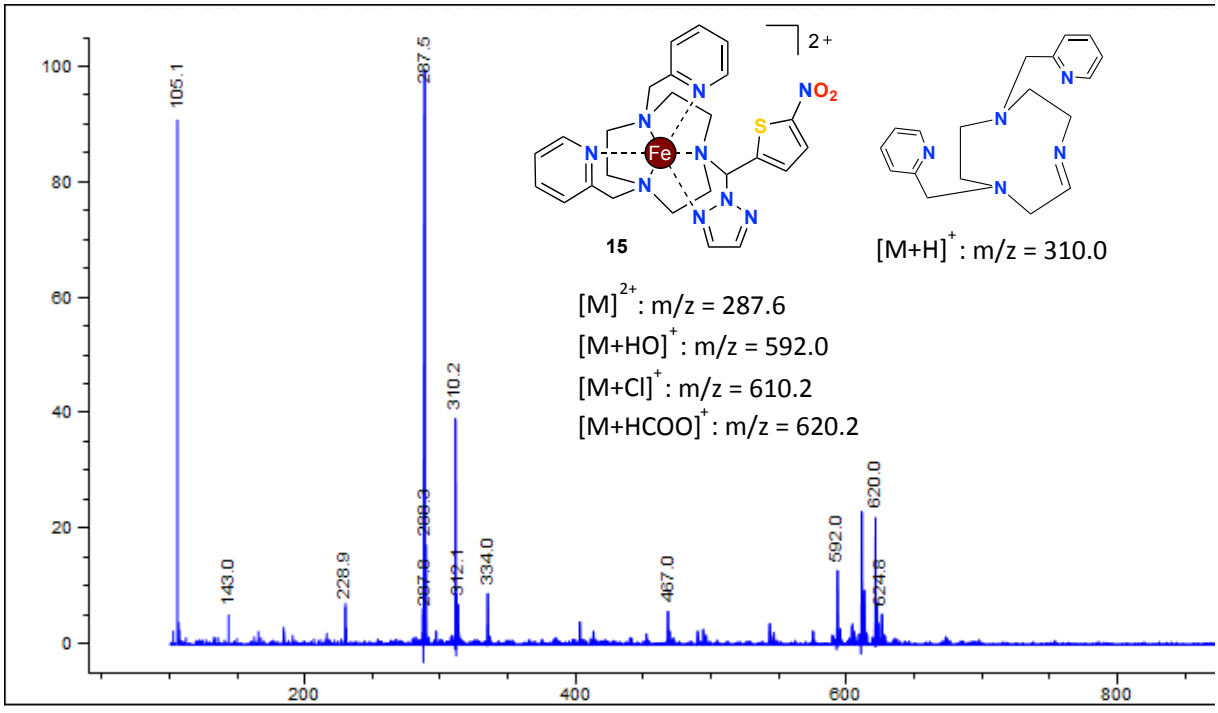
t = 0 h



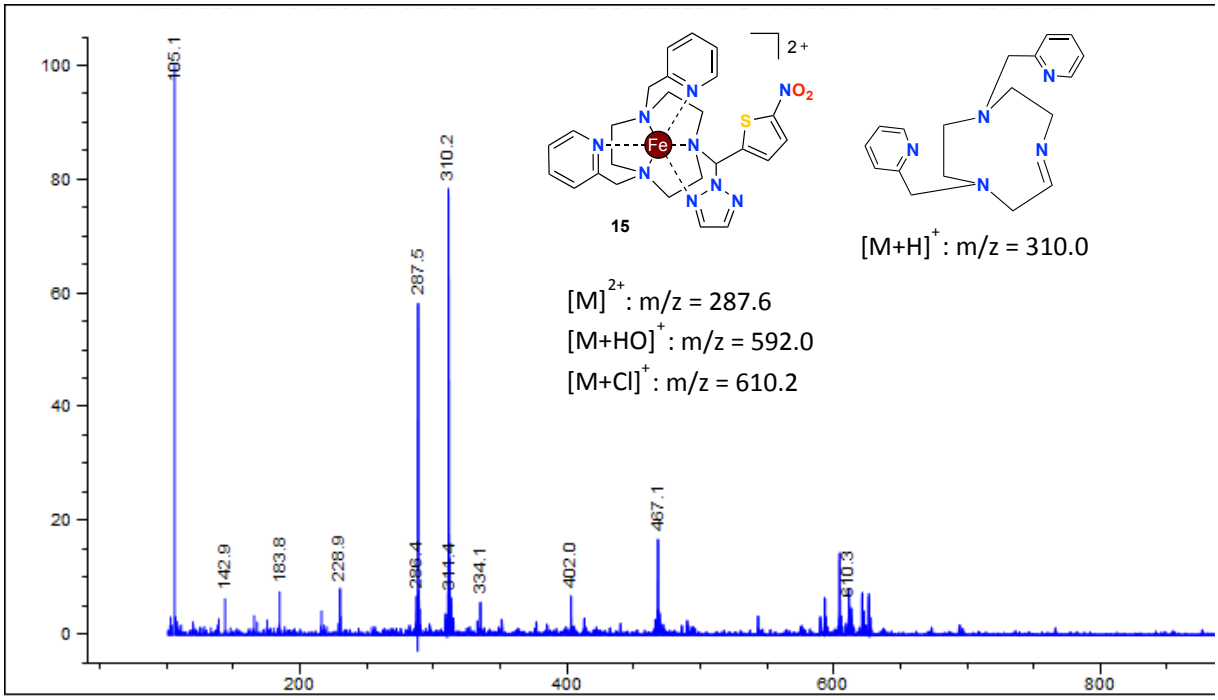
t = 1 h


105.2
267.6
229.2
310.0
311.1
334.1
467.0
610.2
610.8
2+
NO2
S
Fe
15
[M+H]+ : m/z = 310.0
[M]2+ : m/z = 287.6
[M+Cl]+ : m/z = 610.2

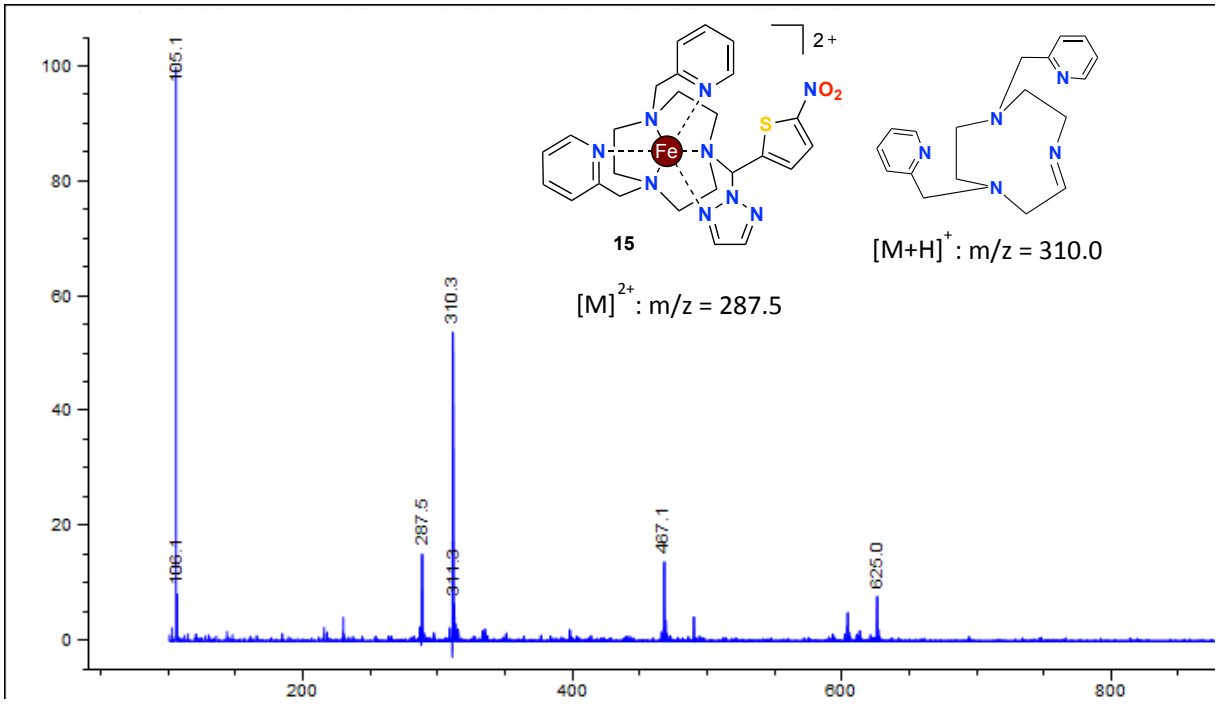
t = 2 h


105.1
267.5
143.0
228.9
288.3
287.8
310.2
312.1
334.0
467.0
592.0
620.0
624.8
2+
NO2
S
Fe
15
[M+H]+ : m/z = 310.0
[M]2+ : m/z = 287.6
[M+HO]+ : m/z = 592.0
[M+Cl]+ : m/z = 610.2
[M+HCOO]+ : m/z = 620.2

t = 4 h


105.1
310.2
287.5
142.9
183.8
228.9
286.4
311.4
334.1
402.0
467.1
610.3
100
80
60
40
20
0
200
400
600
800
2+
NO2
S
Fe
15
[M+H]+ : m/z = 310.0
[M]2+ : m/z = 287.6
[M+HO]+ : m/z = 592.0
[M+Cl]+ : m/z = 610.2

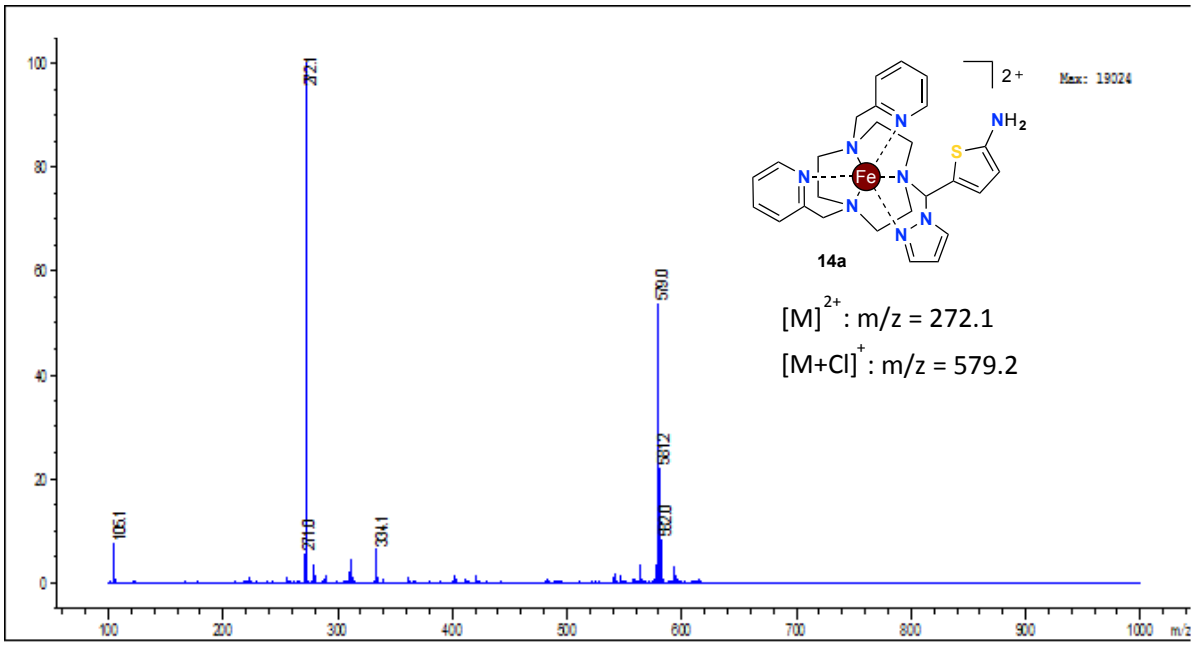
t = 7 h


105.1
310.3
287.5
106.1
311.3
467.1
625.0
100
80
60
40
20
0
200
400
600
800
2+
NO2
S
Fe
15
[M+H]+ : m/z = 310.0
[M]2+ : m/z = 287.5

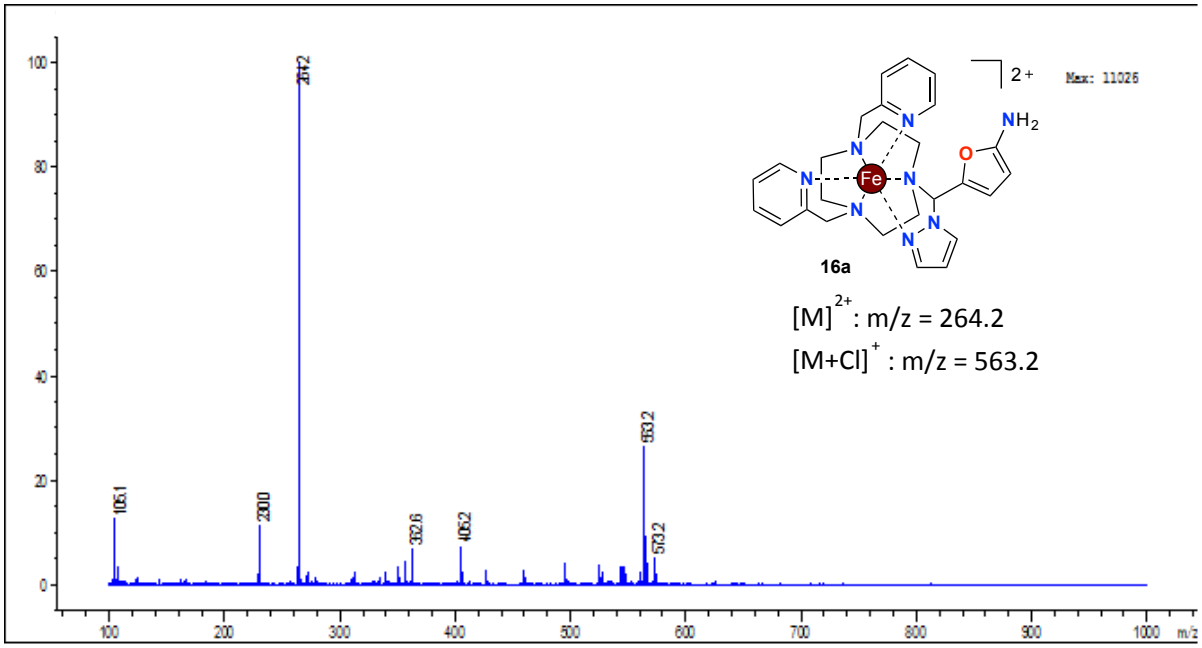
Low resolution mass spectral monitoring of conversion (14, 16, 18)

For all measurements, a pure sample of complex was dissolved in PBS to yield a 4 mM solution, which Pd/C was added to. Mass spectra were realized immediately after 10 min bubbling of hydrogen gas into the mixture and filtering.

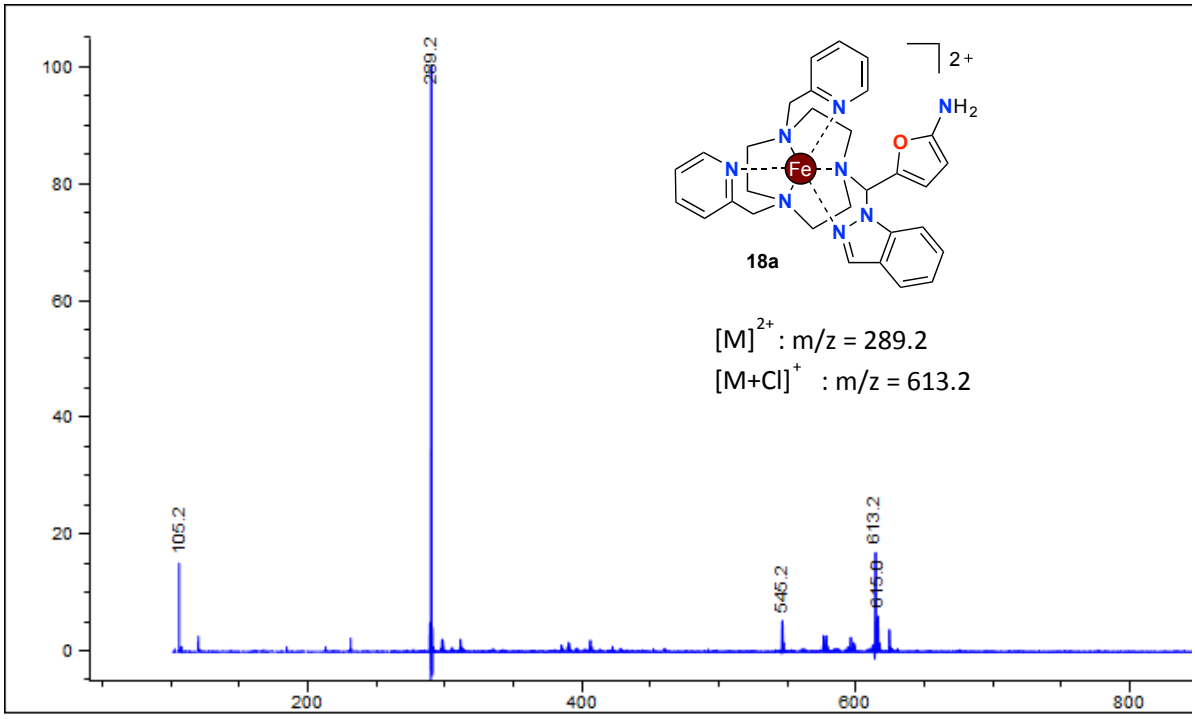
Conversion of 14 (dissolved crystals)



Conversion of 16 (dissolved powder)



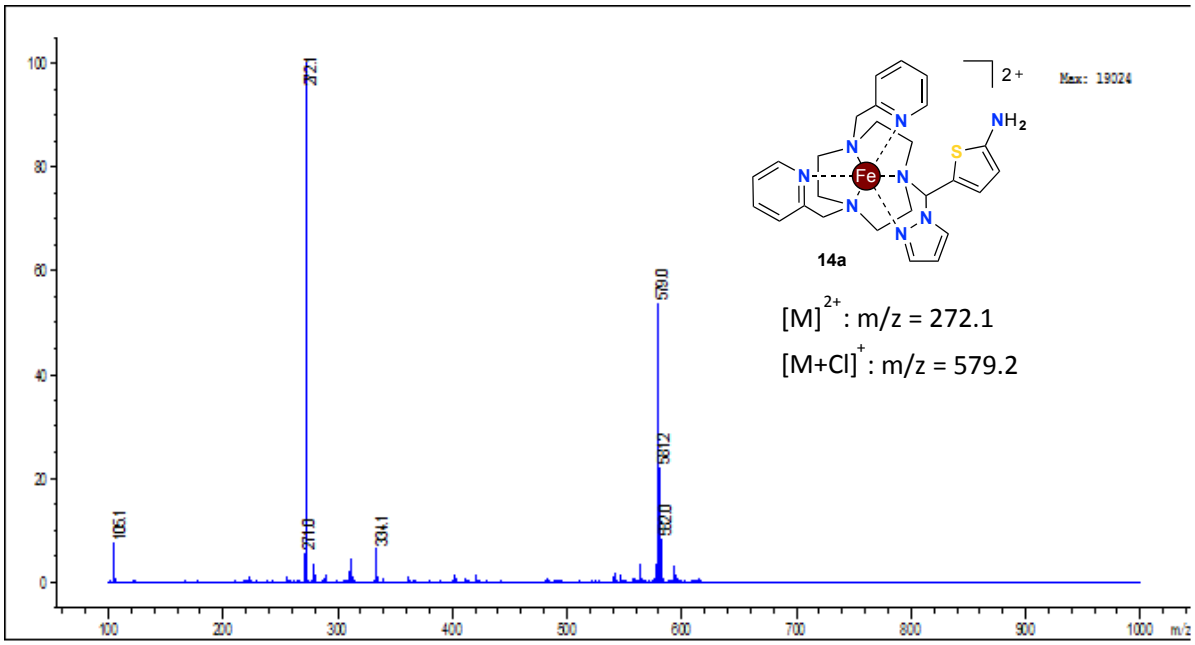
Conversion of 18 (dissolved crystals)



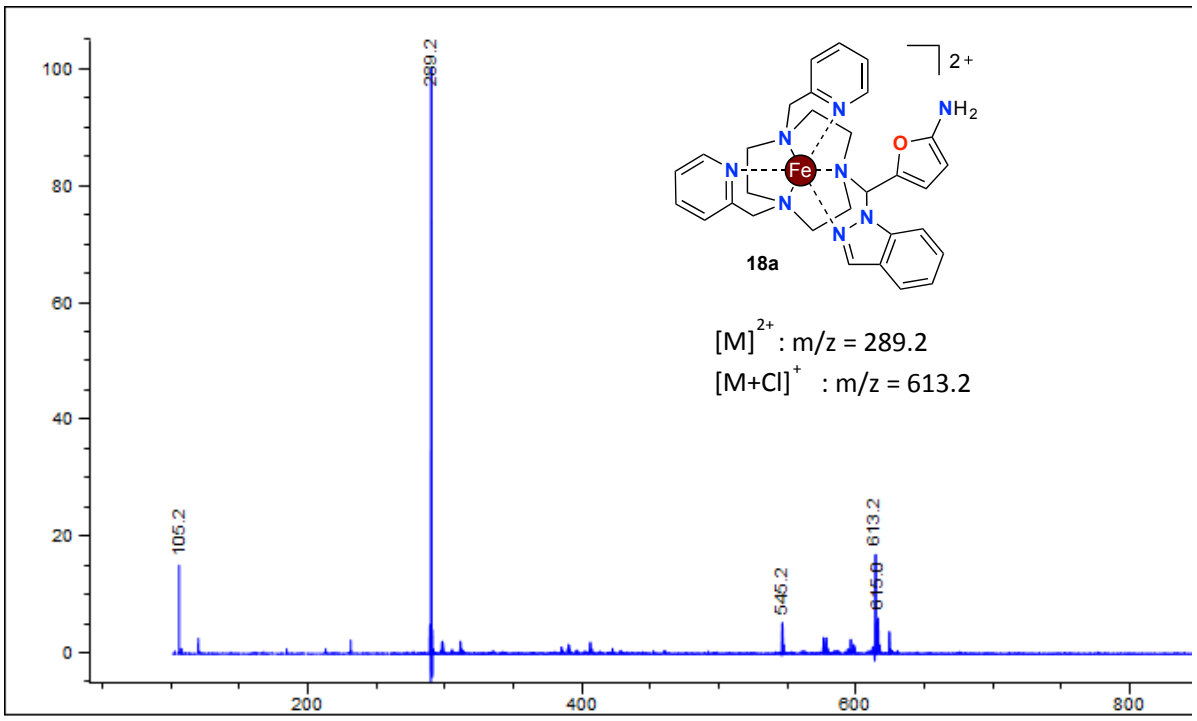
Low resolution mass spectral monitoring of fragmentation (14a, 16a, 18a)

Complexes **14a**, **16a**, **18a** were incubated in PBS at 37 °C during the indicated time.

Absence of fragmentation of 14a after 2 h

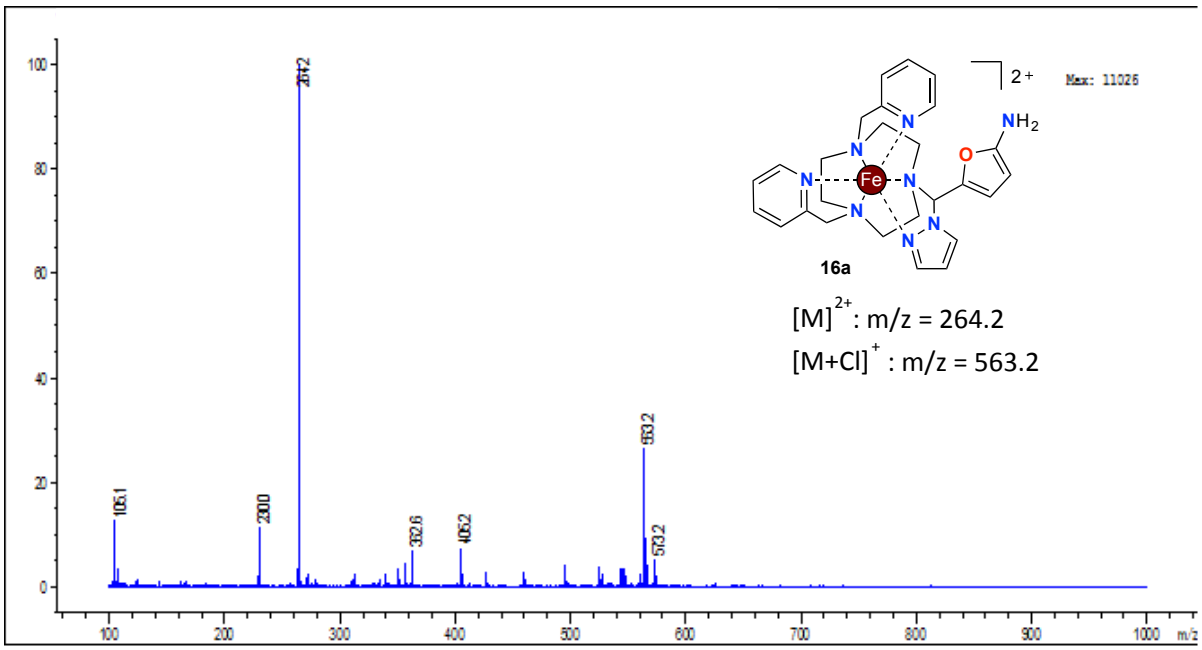


Absence of fragmentation of 18a after 2 h

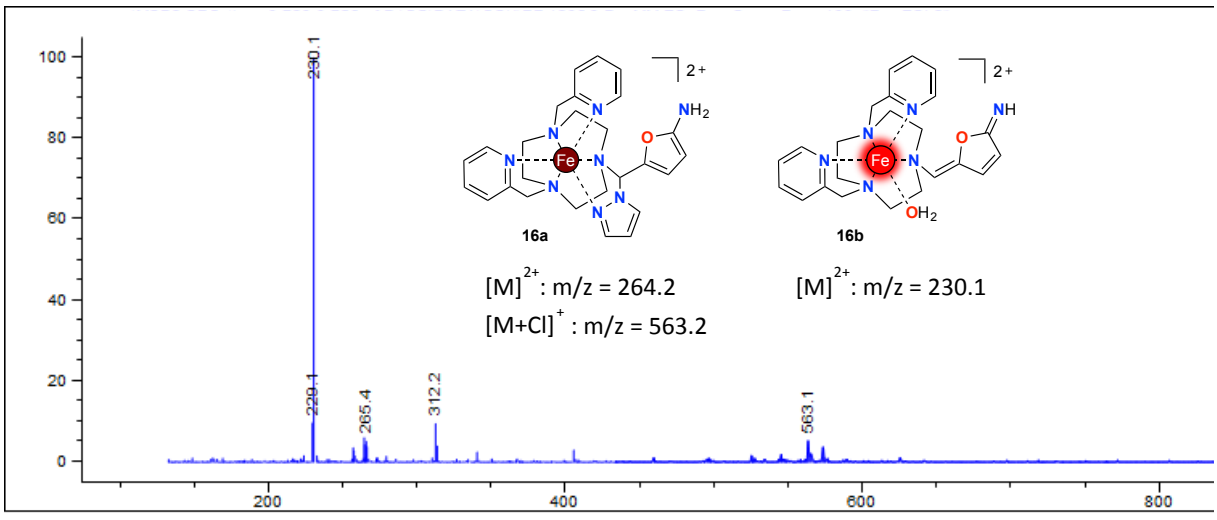


Fragmentation of 16a

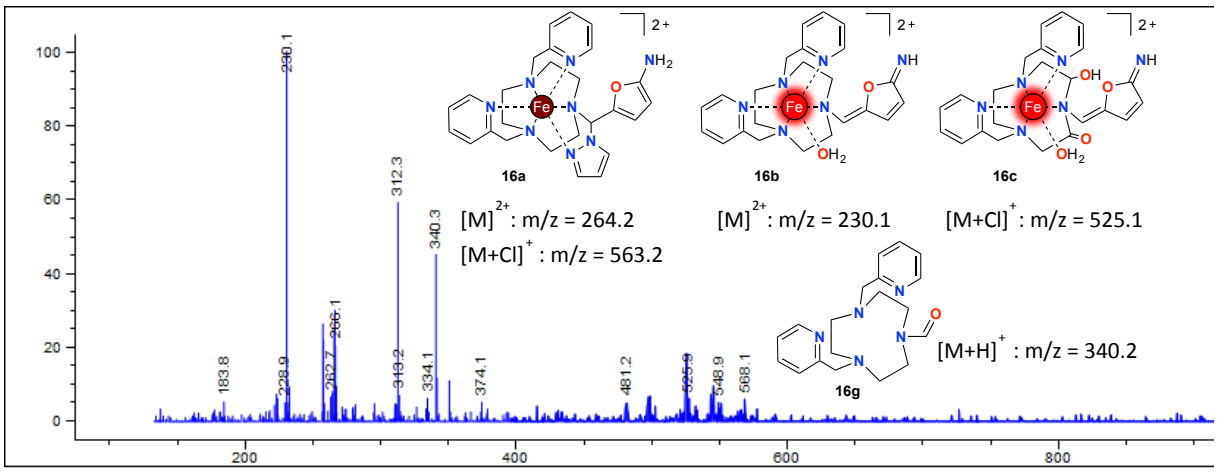
t = 0 min



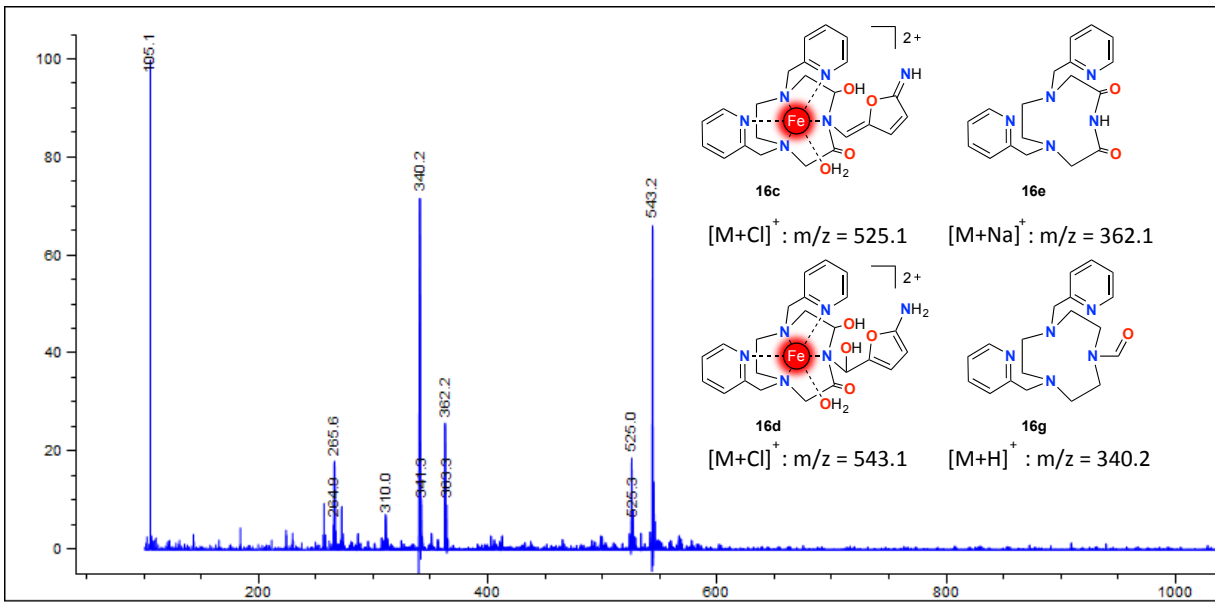
t = 10 min



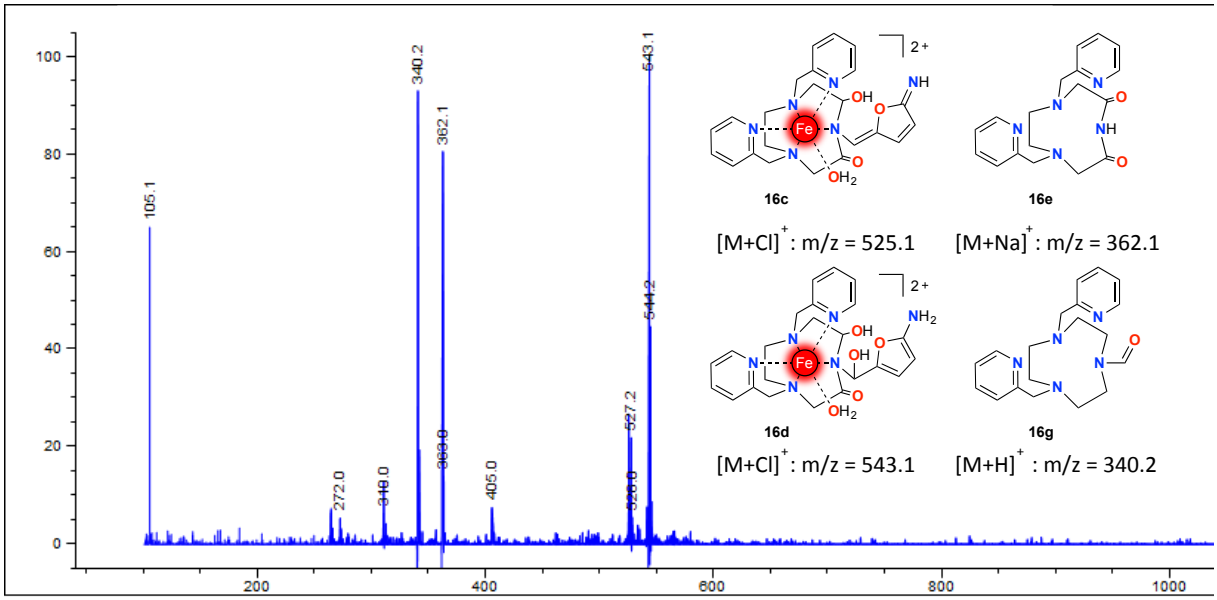
t = 20 min



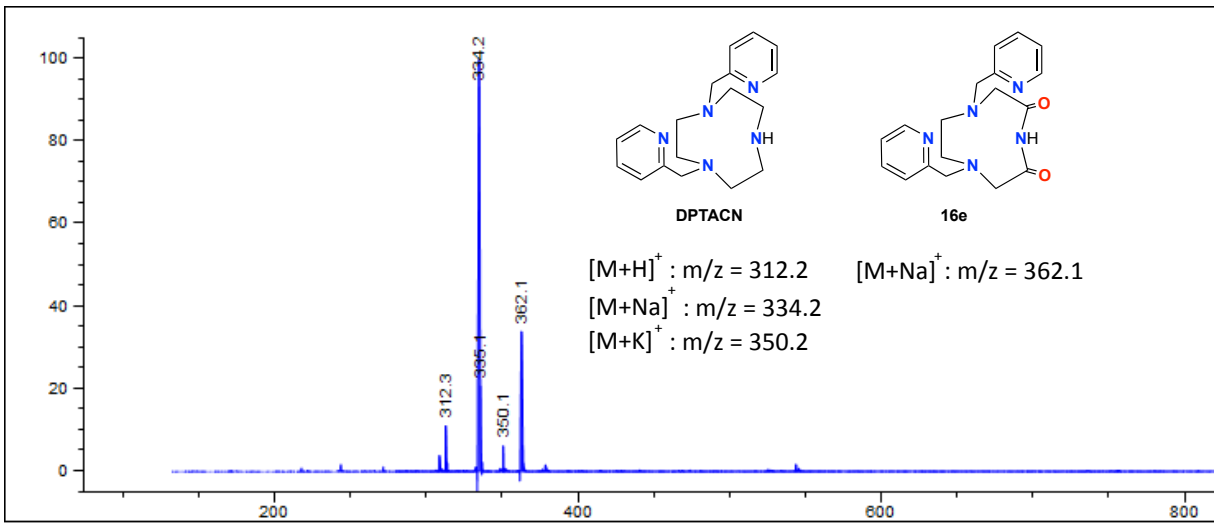
t = 40 min



t = 1 h



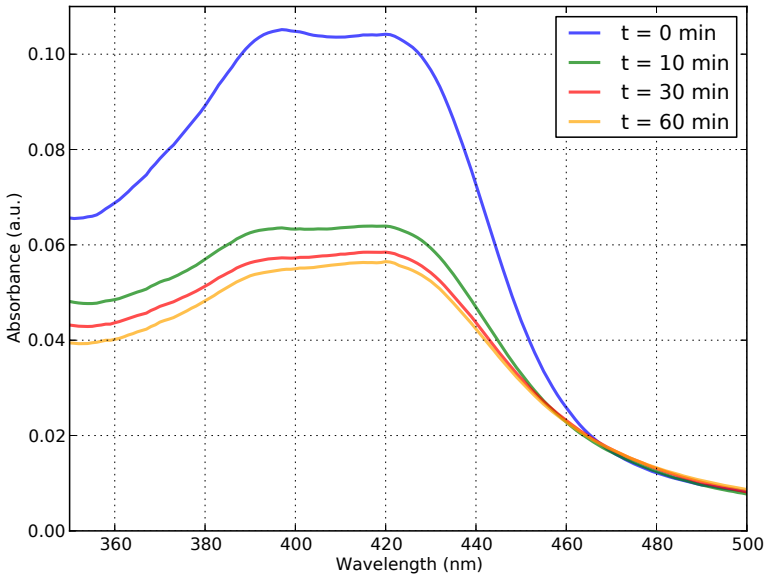
After addition of NaOH 1M



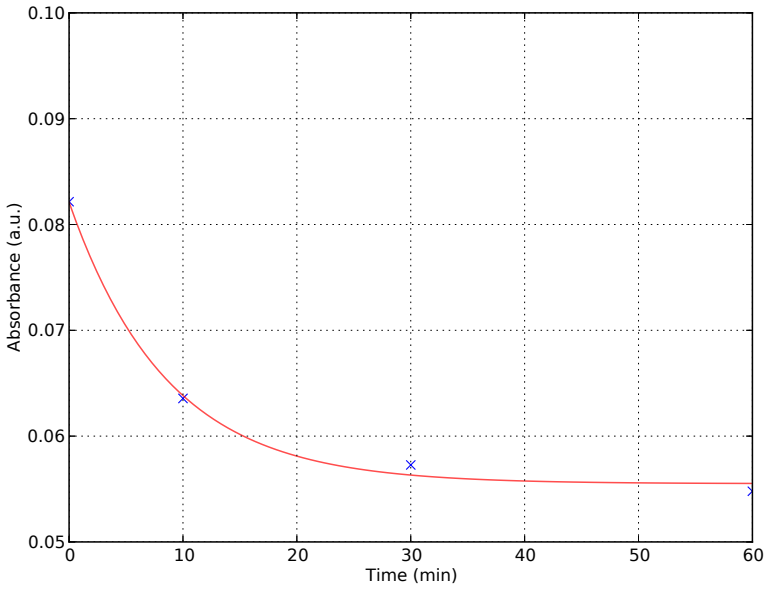
UV-visible absorption spectroscopy monitoring of fragmentation of 16a

Solvent : PBS ; concentration : 0.05 mM ; temperature : 37°C

UV spectra of 16a



Evolution of 16a UV absorbance maximum

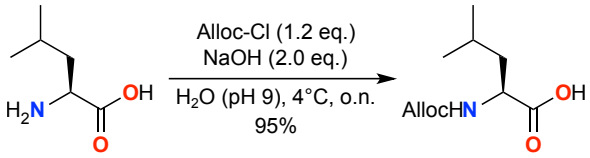


Absorbance A at 397 nm (the wavelength where absorbance is the highest) for the UV spectra was plotted with respect to time and fitted with the exponential function $A(t) = A.e^{-t/t_{1/2}} + B$, where $t_{1/2}$ is the half-time of the fragmentation process : t = 8.61 ± 1.93 min. ; $R^2 = 0.997$.

Données expérimentales du chapitre 4

Synthesis of molecules

Synthesis of alcohol 24



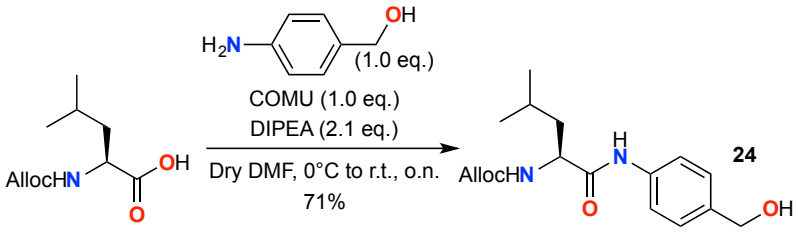
This compound was prepared according to literature procedure.[351] L-leucine (5 g, 38 mmol, 1.0 eq.) was suspended in 25 mL of distilled water. The L-leucine was completely dissolved by adding 4 M NaOH (9.5 mL, 38 mmol, 1.0 eq.). The solution was cooled down in an ice bath and allyl chloroformate (4.96 mL, 46.7 mmol, 1.2 eq.) was added to the vigorously stirred solution along with additional 4 M NaOH (in order to retain a pH 9) over a period of an hour. Once equilibrated, the solution was stored in the refrigerator overnight. The solution was acidified to a pH $\simeq$ 2-3 using concentrated H_2SO_4. The product was extracted using ethyl acetate (3X), combined organic extracts were dried using anhydrous sodium sulfate and filtered. Solvent was removed *in vacuo* and the product was isolated as a light yellow oil (7.782 g, 36.2 mmol, 95%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.80 (s, 1H), 5.94 (m, 1H), 5.36-5.17 (m, 2H), 4.60 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.45-4.23 (m, 1H), 1.85-1.54 (m, 3H), 0.98 (d, J = 5.0 Hz, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 177.12, 156.33, 132.50, 117.75, 65.92, 52.37, 41.24, 24.68, 22.81, 21.57.

HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 238.1053, calc. 238.1055.

Spectral data were in accordance with literature.[351]



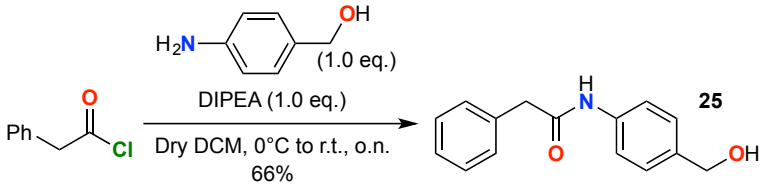
In a 50 mL flask placed in an ice bath, Alloc-L-leucine (971 mg, 4.51 mmol, 1.0 eq.), COMU (1.932 g, 4.96 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (1,65 mL, 9.47 mmol, 2.1 eq.) were added. After 20 minutes, PABA (556 mg, 4.51 mmol, 1.0 eq.) was added portionwise and the mixture was stirred at 0°C for 1 h before ice bath was removed. The day after, solvent was evaporated and diethyl ether was added. Organic phase was washed with saturated sodium hydrogenocarbonate solution and 1 M hydrochloric acid solution, then dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated *in vacuo*. The product was isolated as a light orange powder (1.020 g, 3.19 mmol, 71%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$) : δ (ppm) = 9.30 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.54 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 5.94 (m, 1H), 5.31 (dd, J = 17.1 Hz, J = 1.6 Hz, 1H), 5.17 (dd, J = 10.5 Hz, J = 0.8 Hz, 1H), 4.60-4.52 (m, 4H), 4.34 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 1.85-1.65 (m, 3H), 0.96 (t, J = 6.1 Hz, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $(CD_3)_2CO$) : δ (ppm) = 171.40, 156.32, 137.74, 133.44, 127.07, 119.43, 116.50, 65.05, 63.52, 54.33, 41.26, 24.62, 22.65, 21.13.

HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 343.1629, calc. 343.1634.

Synthesis of alcohol 25

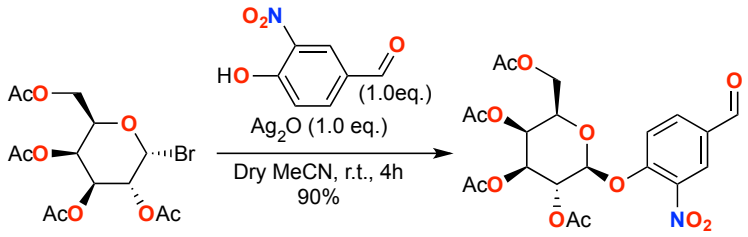


In a 100 mL flask placed in an ice bath, PABA (845 mg, 6.86 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (40 mL) and DIPEA (1.20 mL, 6.86 mmol, 1.0 eq.) was added. Phenylacetyl chloride (910 μL, 6.86 mmol, 1.0 eq.) was added dropwise over 1 h, then ice bath was removed and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was then washed with saturated sodium hydrogenocarbonate solution and 1 M hydrochloric acid solution, then dried with anhydrous sodium sulfate and evaporated *in vacuo*. The product was isolated as a light yellow powder (1.091 g, 4.53 mmol, 66%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.46-7.29 (m, 9H), 4.66 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.77 (s, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 170.95, 137.59, 137.23, 135.43, 128.80, 128.24, 127.27, 126.60, 119.89, 63.48, 43.32.

Synthesis of alcohol 26

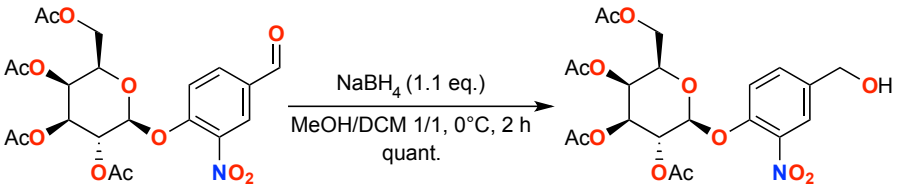


Acetobromo-α-D-galactose (2 g, 4.86 mmol, 1.0 eq.), 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde (813 mg, 4.86 mmol, 1.0 eq.) and Ag_2O (1.240 g, 5.35 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in acetonitrile and stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was then filtered over a pad of Celite and concentrated in vacuo. The resulting oil was purified via column chromatography on silica gel (EP/EtOAc 4/6 v/v) to yield the product as a light yellow solid (2.173 g, 4.37 mmol, 90 %).

^{1}H-NMR (300 MHz, $(CD_3)_2SO$) : δ (ppm) = 9.98 (s, 1H), 8.45 (d, J = 2 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.80 (d, J = 8 Hz, 1H), 5.40 (bs, 1H), 5.30-5.27 (m, 2H), 4.55 (td, J = 6 Hz, J = 1 Hz, 1H), 4.15 (d, J = 6 Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.96 (s, 3H).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 188.55, 170.24, 170.07, 169.16, 153.45, 141.25, 133.96, 131.48, 126.84, 118.80, 100.09, 71.82, 70.35, 67.59, 66.58, 61.36, 20.66, 20.61, 20.59, 20.55.

HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 520.1052, calc. 520.1067.

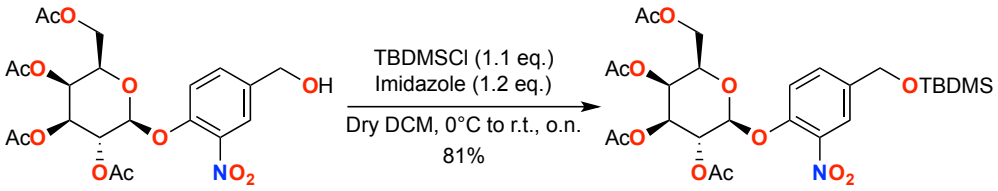


To a solution of aldehyde (2.173 g, 4.37 mmol, 1.0 eq.) in DCM (50 mL) on an ice bath was added a solution of sodium borohydride (182 mg, 4.81 mmol, 1.1 eq.) in MeOH (50 mL). The reaction was stirred for 1 h and quenched by adding saturated NH_4Cl aqueous solution. After 5 minutes stirring, both layers were separated and the aqueous layer was extracted twice using dichloromethane. Combined organic extracts were dried with Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure to give the product as a white powder (2.182 g, 4.37 mmol, quantitative yield) which was used in the next reaction without further purification.

^{1}H-NMR (300 MHz, $(CD_3)_2SO$) : δ (ppm) = 7.80 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.56 (d, J = 7 Hz, 1H), 5,43 (t, J = 6 Hz, 1H), 5.37 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.31-5.19 (m, 2H), 4.53-4.45 (m, 3H), 4.19-4.08 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.04 (s, 6H), 1.95 (s, 3H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $(CD_3)_2SO$) : δ (ppm) = 170.54, 170.46, 170.13, 169.47, 147.70, 140.84, 138.90, 132.41, 122.80, 118.30, 99.34, 71.35, 70.54, 68.34, 67.72, 61.94, 61.87, 21.10, 20.98, 20.92.

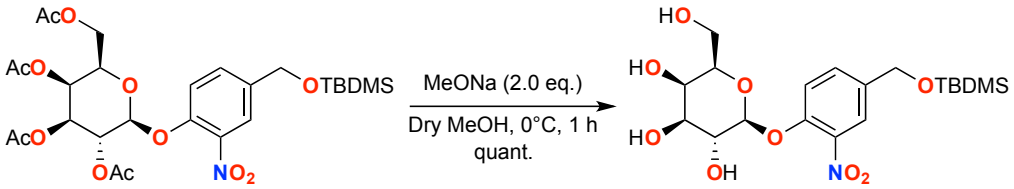
HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 522.1209, calc. 522.1224.



In a 100 mL flask, TBDMSCl (636 mg, 4.22 mmol, 1.1 eq.) and imidazole (314 mg, 4.61 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in dry DCM (20 mL). The mixture was placed in an ice bath, then the alcohol (1.917 g, 3.84 mmol, 1.0 eq.) dissolved in dry DCM (10 mL) was added dropwise ; ice bath was removed and the solution was stirred overnight. Reaction mixture was washed by water and aqueous phase was extracted by DCM. Combined organic extracts were dried with Na_2SO_4, filtered and evaporated *in vacuo*. The resulting oil was purified via column chromatography on silica gel (EP/EtOAc 8/2 v/v) to give the product as a light yellow powder (1.908 g, 3.11 mmol, 81%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.77 (br s, 1H), 7.40 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.57 (d, J = 10.2 Hz, J = 8.2 Hz, 1H), 5,49 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.12 (dd, J = 10.2 Hz, J = 3.2 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.32-4.26 (m, 1H), 4.21-4.13 (m, 1H), 4.10-4.04 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 0.96 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

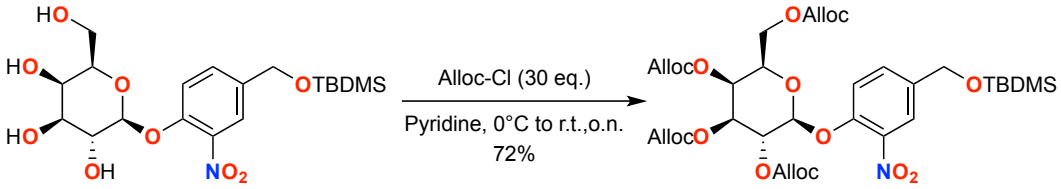
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : 170.09, 170.05, 169.85, 169.19, 148.04, 140.97, 137.48, 130.90, 122.20, 119.28, 100.51, 71.27, 70.49, 67.87, 66.89, 63.22, 61.37, 25.73, 20.42, 20.36, 18.17, -5.47.



To a solution of reagent (1.908 g, 3.11 mmol, 1.0 eq.) in dry methanol (30 mL) in an ice-bath was added sodium methoxide (102 mg, 1.872 mmol, 3.5 eq.). The mixture was stirred 1 h at 0°C and quenched using Dowex 50X8-100 resin, then filtered and concentrated *in vacuo*. The product was obtained as a white powder (1.460 g, 3.11 mmol, quantitative yield).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 8.56 (s, 1H), 7.78 (br s, 1H), 7.56 (dd, J = 8.5 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 5.04 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.92 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.83-3.80 (m, 1H), 3.79-3.72 (m, 3H), 3.60 (dd, J = 9.8 Hz, J = 3.3 Hz, 1H), 0.97 (s, 9H), 0.14 (s, 6H).

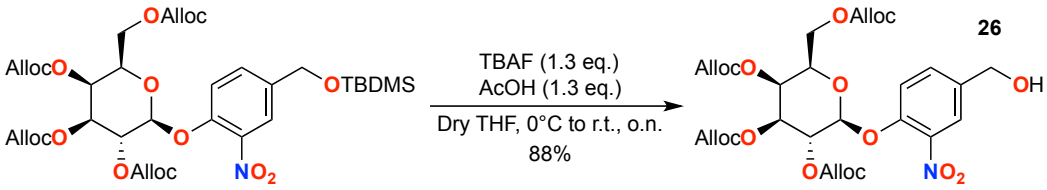
^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 149.23, 139.27, 135.96, 131.93, 122.56, 118.22, 102.30, 74.68, 72.79, 70.66, 68.68, 63.38, 60.91, 25.92, 18.32, -5.32.



In a 50 mL flask, the alcohol (1.440 g, 3.60 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry pyridine (15 mL). The mixture was cooled at 0°C and allyl chloroformiate (11.5 mL, 108 mmol, 30 eq.) was added dropwise over 2 h. Ice bath was removed and the mixture was stirred overnight at room temperature. Solution was further hydrolyzed with aqueous 1 M hydrochloric acid (45 mL). The mixture was extracted three times with ethyl acetate and the combined organic layers were dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (EP/EtOAc 9/1 v/v) to give the purified product (1.915 g, 2.59 mmol, 72%) as a light yellow oil.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.25 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.02-5.87 (m, 4H), 5.46-5.26 (m, 10H), 5.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.99 (dd, J = 10.2 Hz, J = 3.2 Hz, 1H), 4.73-4.61 (m, 10H), 4.41 (dd, J = 11.2 Hz, J = 6.8 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 11.2 Hz, J = 5.8 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 0.95 (s, 9H), 0.11 (s, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 155.87, 154.54, 154.40, 153.80, 136.23, 131.64, 131.47, 131.39, 131.29, 131.12, 127.24, 118.84, 118.80, 118.68, 118.57, 116.88, 98.27, 74.39, 72.62, 70.66, 69.01, 68.91, 68.74, 68.64, 68.26, 64.98, 64.35, 25.86, 18.27, -5.34.

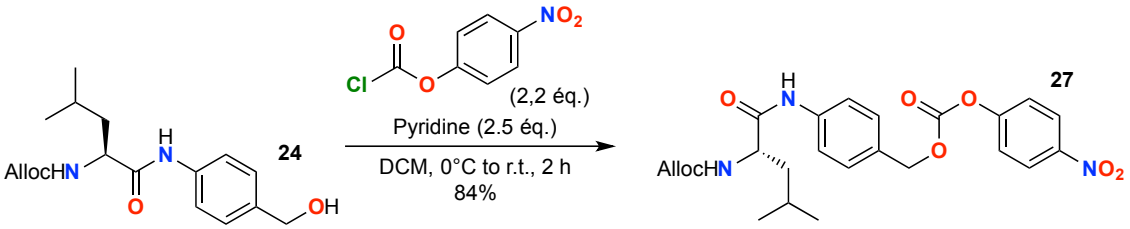


In a 100 mL flask, the protected reagent (1.080 g, 1.47 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry THF at 0°C. Acetic acid (106 μL, 1.91 mmol, 1.3 eq.) was added dropwise, then TBAF (1 M solution in THF, 1.9 mL, 1.91 mmol, 1.3 eq.) was added dropwise. Ice bath was removed and the reaction was stirred overnight. Reaction mixture was washed with saturated NaCl solution, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (EP/EtOAc 4/6 v/v) to give the purified product (805 mg, 1.29 mmol, 88%) as a yellow solid.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.31 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.01 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.03-5.88 (m, 4H), 5.46-5.26 (m, 10H), 5.07 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.98 (dd, J = 10.6 Hz, J = 3.3 Hz, 1H), 4.73-4.61 (m, 10H), 4.41 (dd, J = 11.2 Hz, J = 6.9 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 11.2 Hz, J = 5.8 Hz, 1H), 4.09 (t, J = 6.5 Hz, 1H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 156.30, 154.93, 154.46, 131.38, 131.13, 130.04, 129.37, 119.20, 118.87, 116.53, 97.51, 75.57, 73.31, 69.26, 68.88, 68.53, 67.80, 67.66, 67.55, 65.84.

Synthesis of *p*-nitrophenyl carbonate 27



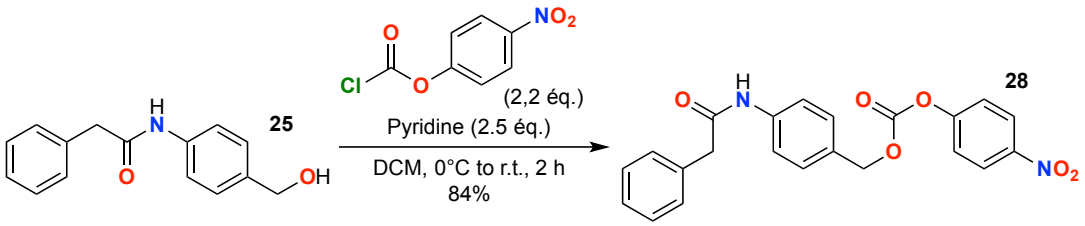
To an ice-cold solution of alcohol **24** (500 g, 1.56 mmol, 1.0 eq.) in dry DCM (20 mL) was added successively 4-nitrophenyl chloroformate (693 mg, 3.43 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (315 μL, 3.90 mmol, 2.5 eq.) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0°C during 30 min and at r.t. for 2 h. After the completion of the reaction, the mixture was quenched using 1 M HCl aqueous solution and the layers were separated. Organic layer was washed with 1 M HCl, and combined aqueous layers were extracted with DCM. Organic layers were dried with Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified via column chromatography on silica gel (EP/EtOAc 8/2 v/v) to obtain **27** as a white solid (638 mg, 1.32 mmol, 84%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.30 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.43-7.37 (m, 4H), 5.97-5.86 (m, 1H), 5.38-5.14 (m, 5H), 4.63 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.36-4.28 (m, 4H), 1.87-1.58 (m, 3H), 0.96 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 172.74, 156.99, 155.50, 152.43, 145.31, 139.12, 132.51, 129.65, 129.47, 125.26, 121.77, 119.88, 117.80, 70.69, 65.99, 54.69, 41.21, 24.78, 23.09, 21.70.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 486.1876, calc. 486.1856.

Synthesis of *p*-nitrophenyl carbonate 28

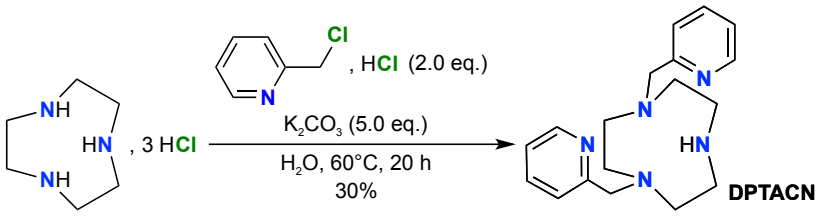


Same procedure as for **27** was used starting from **25** (1.090 g, 4.50 mmol, 1.0 eq.), 4-nitrophenyl chloroformate (1.86 g, 9.9 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (850 μL, 11.25 mmol, 2.5 eq.) to obtain **28** as a white powder (1.315 g, 3.23 mmol, 77%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.29 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.51-7.35 (m, 11H), 7.12 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 4.63 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.36-4.28 (m, 4H), 1.87-1.58 (m, 3H), 0.96 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $(CD_3)_2CO$) : δ (ppm) = 169.23, 156.00, 152.49, 140.20, 135.96, 129.49, 129.21, 128.36, 126.67, 125.20, 122.32, 119.20, 115.69, 70.39, 43.89.

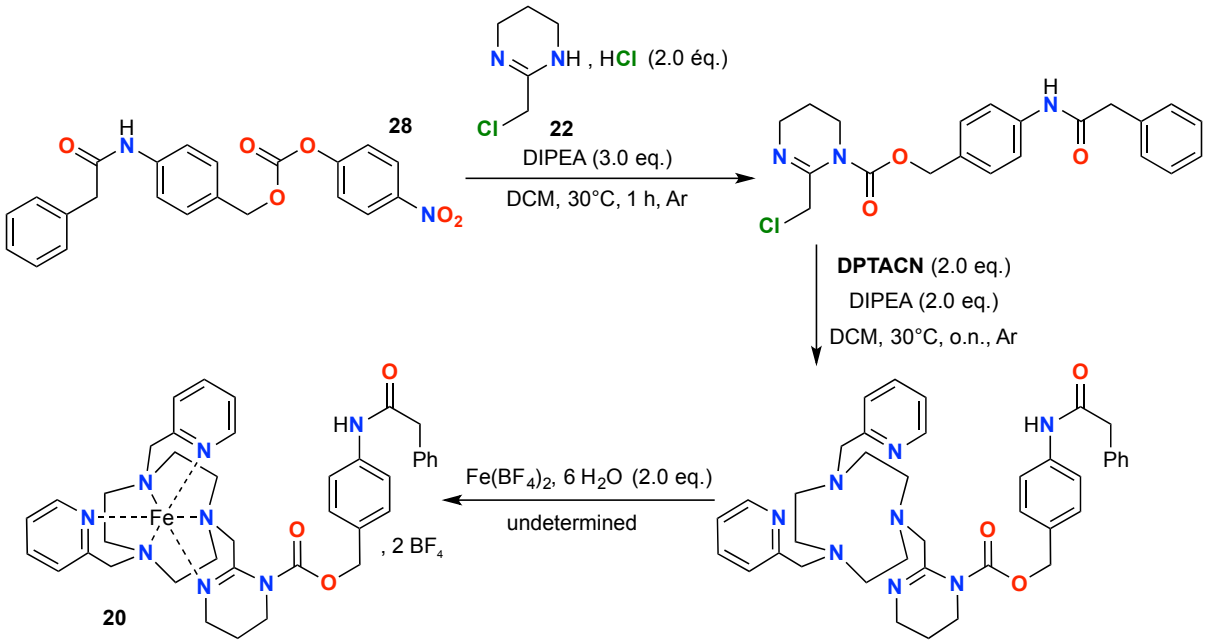
Synthesis of DPTACN



In a 500 mL flask, TACN, 3 HCl (2.0 g, 8.4 mmol, 1.0 eq.) and picolyl chloride hydrochloride (2.756 g, 16.8 mmol, 2.0 eq.) were dissolved in water (60 mL). Potassium carbonate (5.8 g, 42 mmol, 5.0 eq.) dissolved in water (40 mL) was added dropwise over 20 h on the reaction mixture heated to 60°C. The solution was further concentrated under reduced pressure. The solid residue was triturated in DCM and filtered ; solid was washed with DCM. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude oil was purified via column chromatography on basic alumina gel (DCM/MeOH 99/1 v/v) to yield DPTACN as a red oil (784 mg, 2.52 mmol, 30%).

Spectral data were in good agreement with the literature.[183]

Synthesis of complex 20

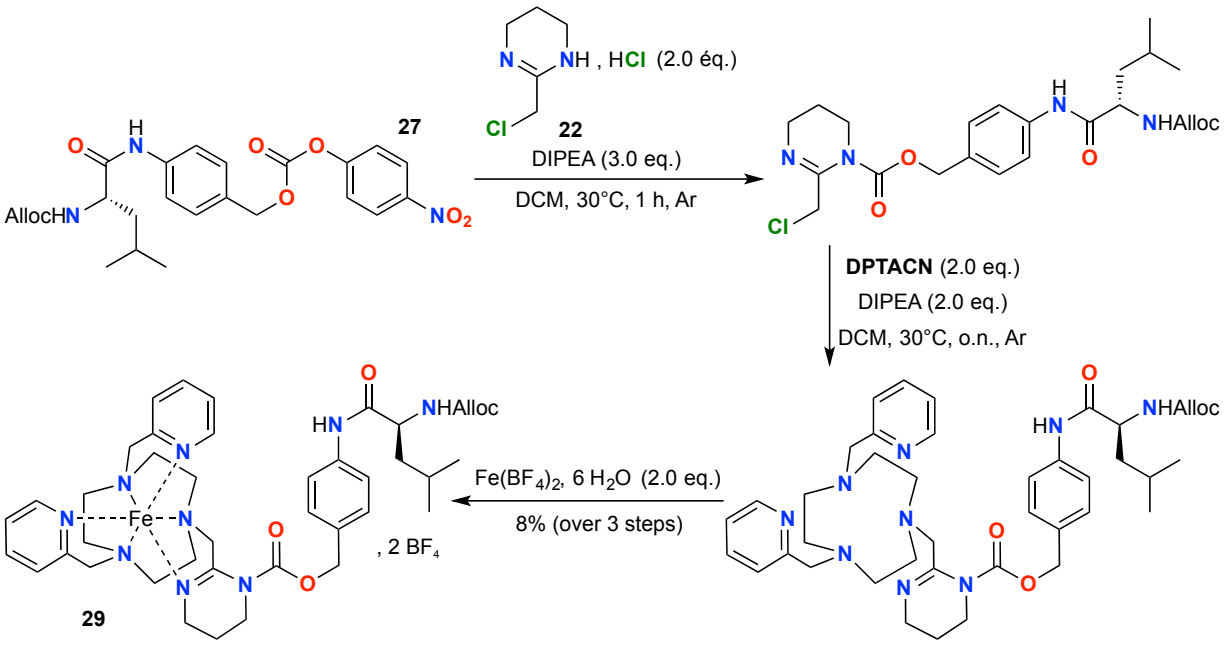


In a two-neck flask, **22**[197] (250 mg, 1.48 mmol, 2.0 eq.) and DIPEA (260 μL, 1.48 mmol, 2.0 eq.) were added to dry DCM (2 mL) under argon flux ; **28** (300 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq.) dissolved in dry DCM (1 mL) was added dropwise over 30 minutes to the reaction mixture heated at 30°C. The solution was stirred 30 more minutes and monitored by ^{1}H-NMR spectroscopy analysis. When the first step was completed, DPTACN (460 mg, 1.48 mmol, 2.0 eq.) dissolved in dry DCM (2 mL) and DIPEA (390 μL, 2.22 mmol, 3.0 eq.) were added and the mixture was stirred under argon at 30°C overnight. Solvent was then evaporated under vacuum and the residue was dissolved in dry acetonitrile. After degassing the solution via a "freeze-pump-thaw" procedure, iron(II) tetrafluoroborate hexahydrate salt (540 mg, 1.48 mmol, 2.0 eq.) was added and the mixture was stirred overnight under argon. The solvent was further evaporated and the residue dissolved in distilled water ; purification via reverse-phase column chromatography (H_2O/MeCN 97/3 v/v) yielded the complex **20** in small amount (around 20 mg) but with a low purity which precluded further analyses.

^{1}H-NMR spectroscopy analysis was not realized because the product was too unpure.

LRMS (ESI) : m/z (%) = 365.1 (100) $[M]^{2+}$.

Synthesis of complex 29

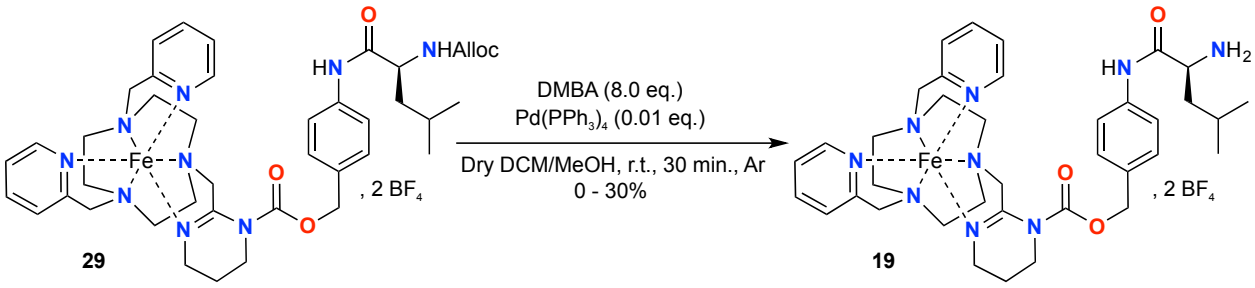


Same procedure as for **20** was used starting from **27** (350 mg, 0.72 mmol, 1.0 eq.), **22** (244 mg, 1.44 mmol, 2.0 eq.), DIPEA (630 μL, 3.6 mmol, 5.0 eq.), DPTACN (448 mg, 1.44 mmol, 2.0 eq.) and $Fe(BF_4)_2$, 6 H_2O (526 mg, 1.44 mmol, 2.0 eq.) to yield **29** as a shiny dark red powder (57 mg, 0.058 mmol, 8%).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3CN) : peaks are too broad to be significant (spectrum is disclosed later).

LRMS (ESI) : m/z (%) = 404.8 (100) $[M]^{2+}$.

Synthesis of complex 19



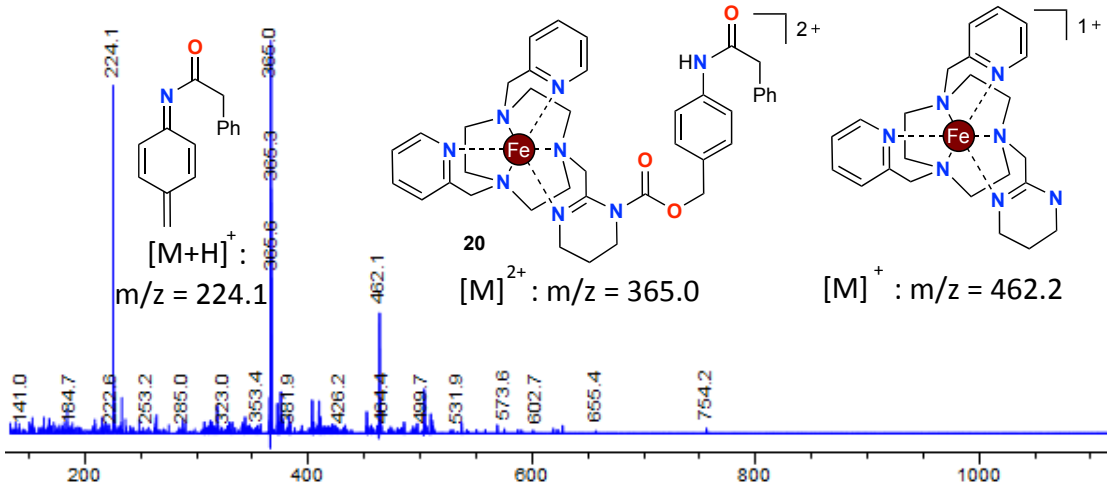
In a 50 mL flask, **29** (30 mg, 0.031 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry DCM (15 mL) with a minimal volume of dry methanol (1 mL) ; DMBA (46 mg, 0.296 mmol, 8.0 eq.) was added and the solution was degassed over 15 minutes using an argon flux. $Pd(PPh_3)_4$ (0.43 mg, 0.037 μmol, 0.01 eq.) was added and the mixture was kept under argon. Monitoring was realized by low resolution mass spectral analysis ; when completion of the reaction was reached, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was dissolved in distilled water. Purification via reverse-phase column chromatography (H_2O/MeCN 97/3 v/v) yielded the complex **19** as a dark red powder (9 mg, 0.010 mmol, 30%).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : peaks are too broad to be significant (spectrum is disclosed later).

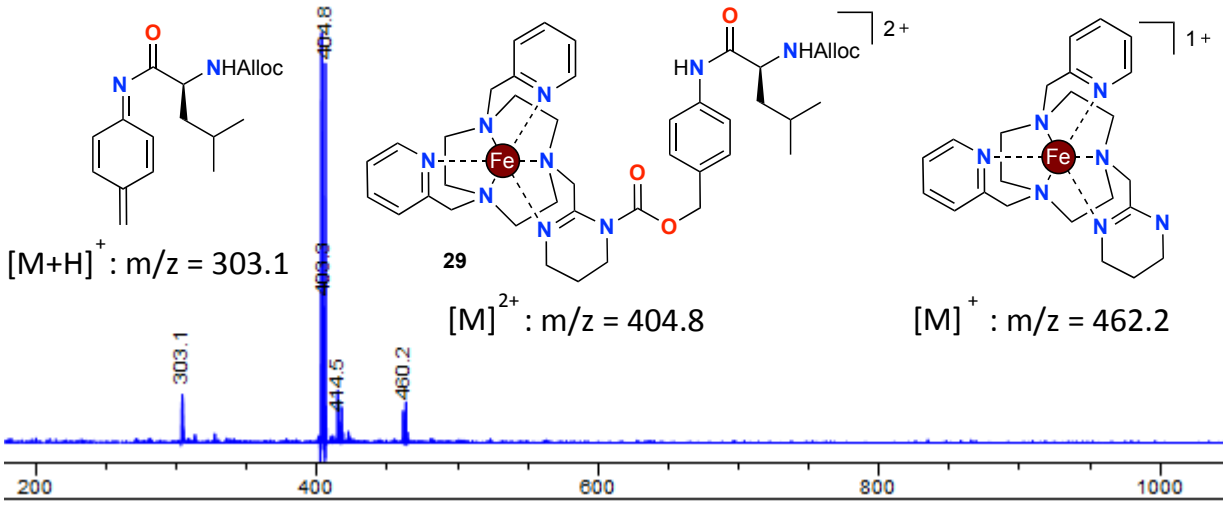
LRMS (ESI) : m/z (%) = 362.8 (100) $[M]^{2+}$.

Low resolution mass spectra of 20, 29 and 19

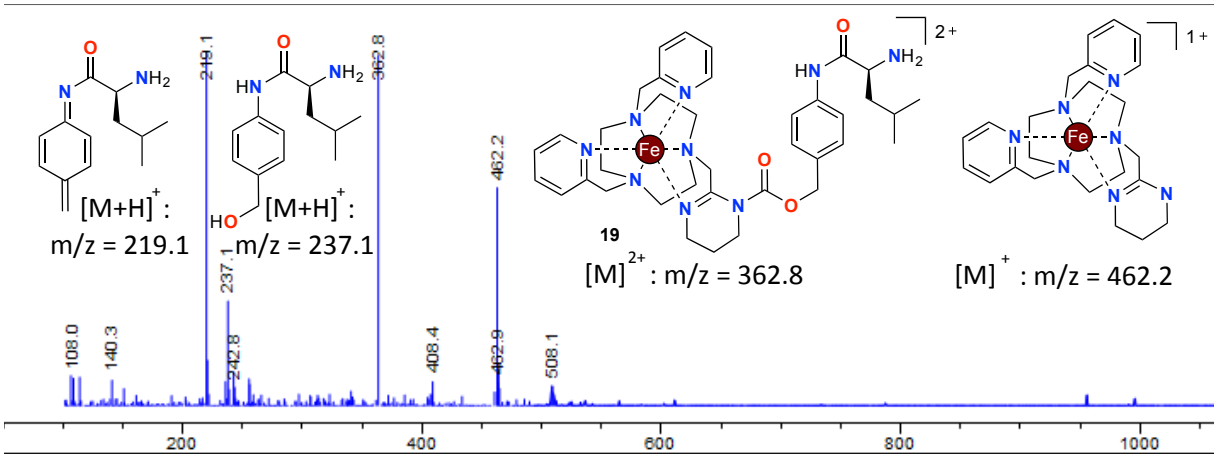
Complex 20



Complex 29

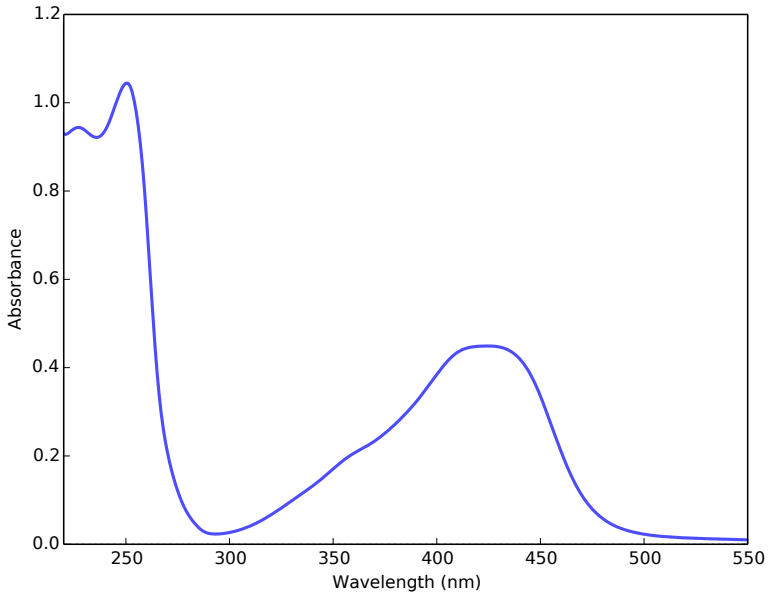


Complex 19



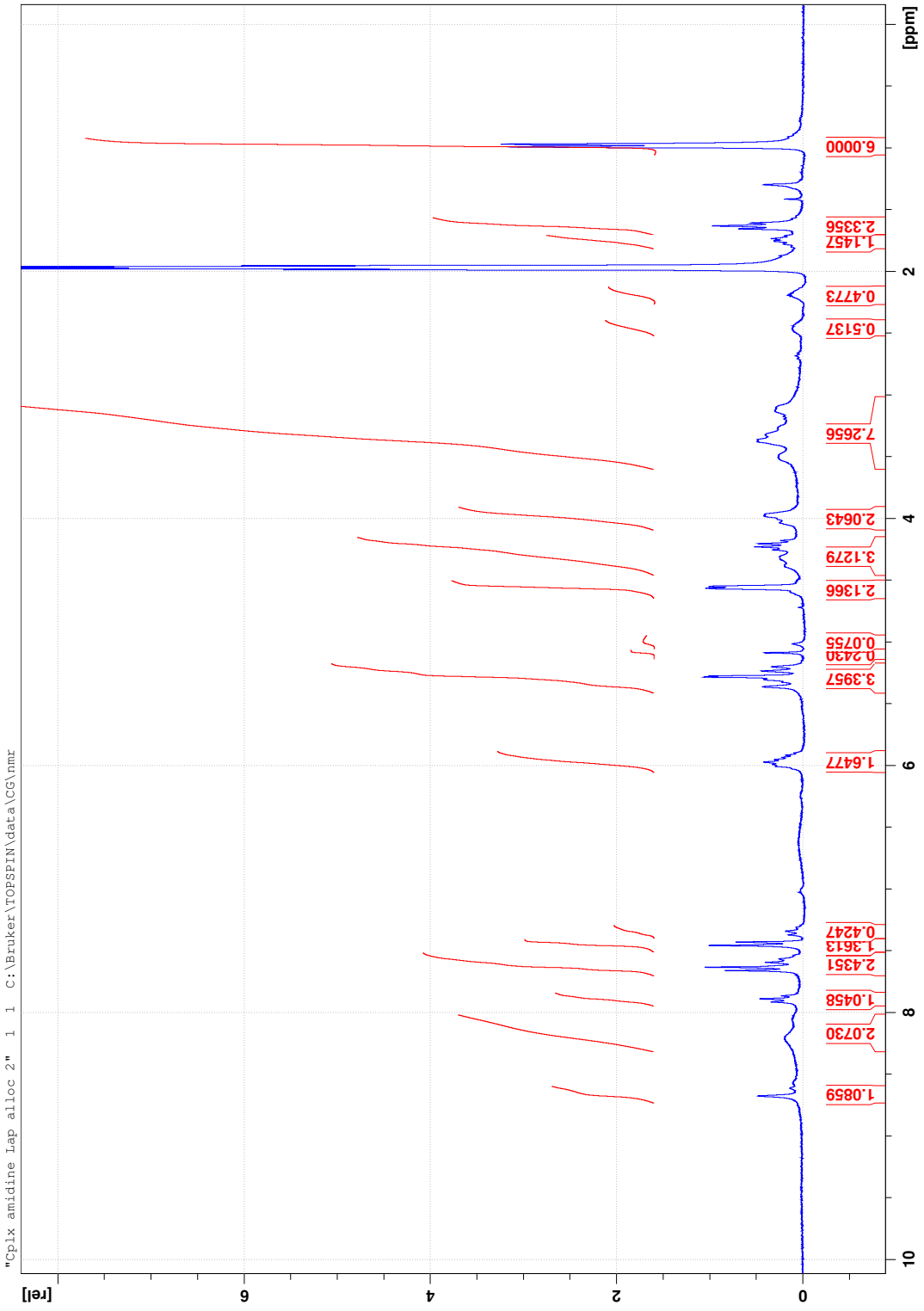
UV-visible absorption spectrum of 19

Solvent : PBS ; concentration : 0.1 mM ; room temperature.

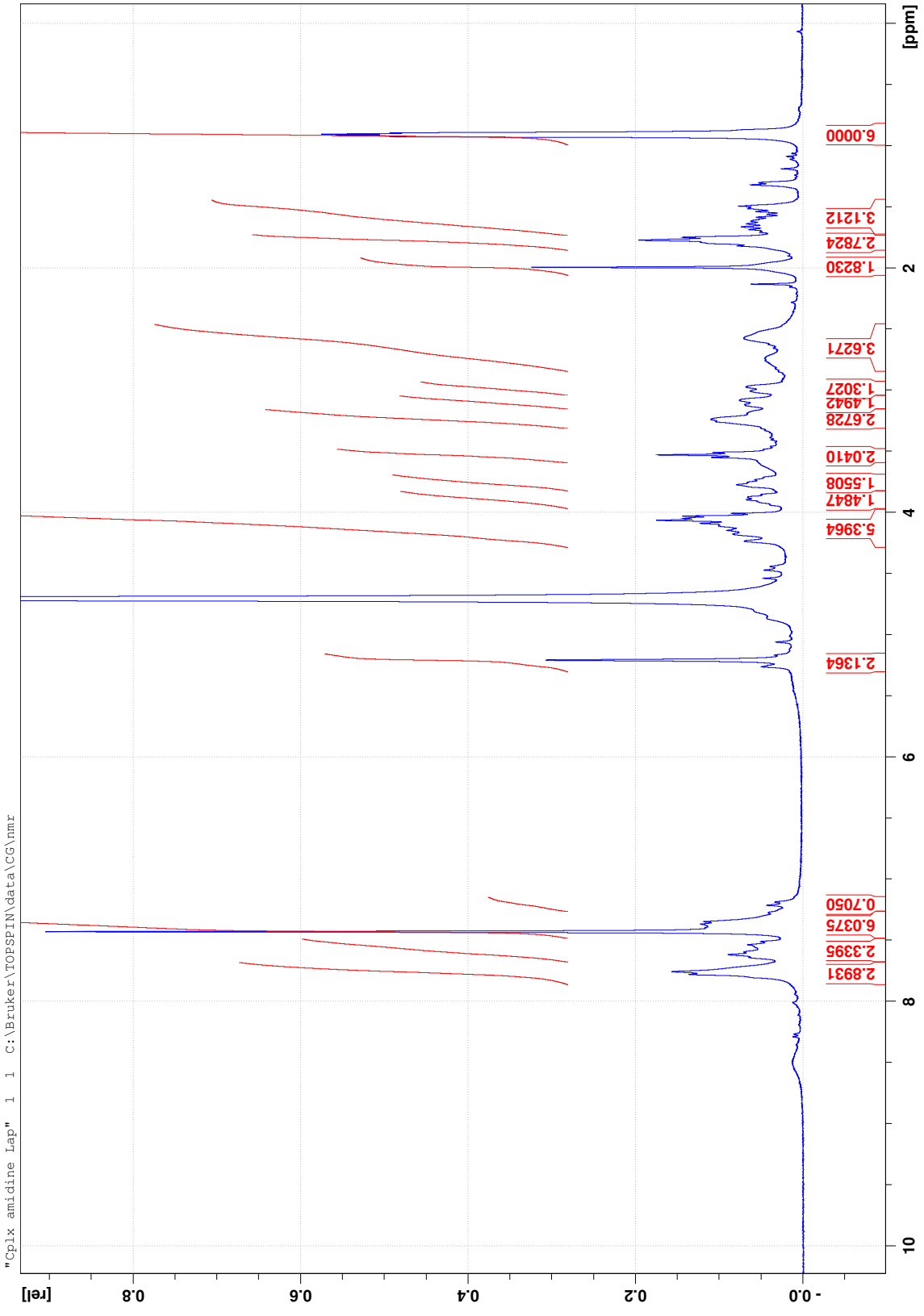


^{1}H-NMR spectra of complexes 29 and 19

Complex 29 (dissolved powder)

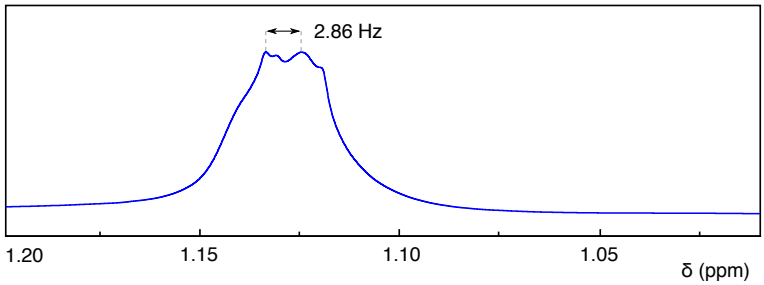


Complex 19 (dissolved powder)



Solution phase magnetic moment measurement for 19 (Evans' method)

Determination of frequency shift of the *t*BuOH ^{1}H-NMR signal :



According to the equation disclosed on page S16, with the following parameters :

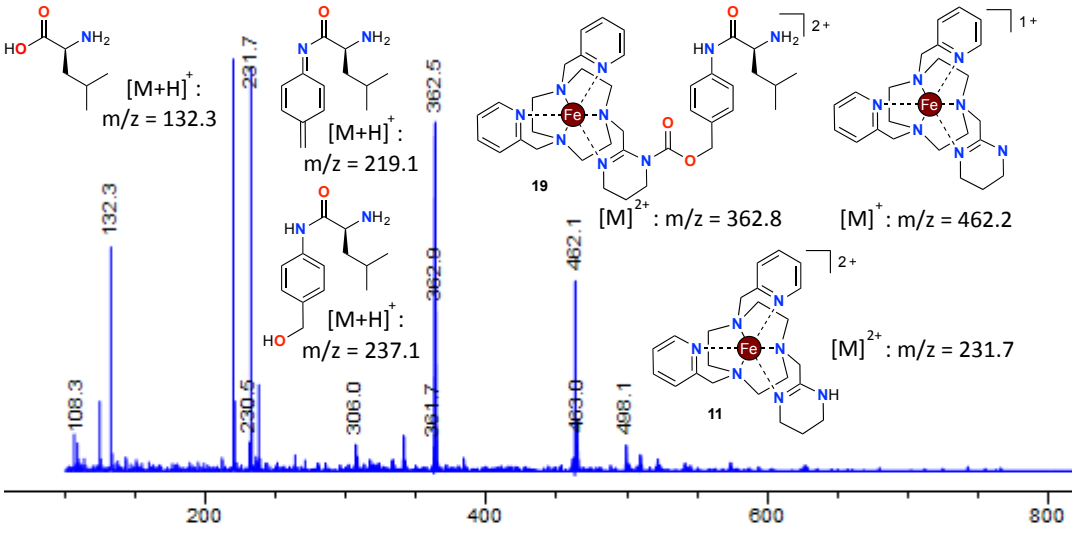
frequency shift $\delta\nu$ (Hz)	2.86 Hz
concentration C	5.20 mM
temperature T (K)	293
ν_0	300 MHz

μ_{eff} is equal to 1.01 μ_B.

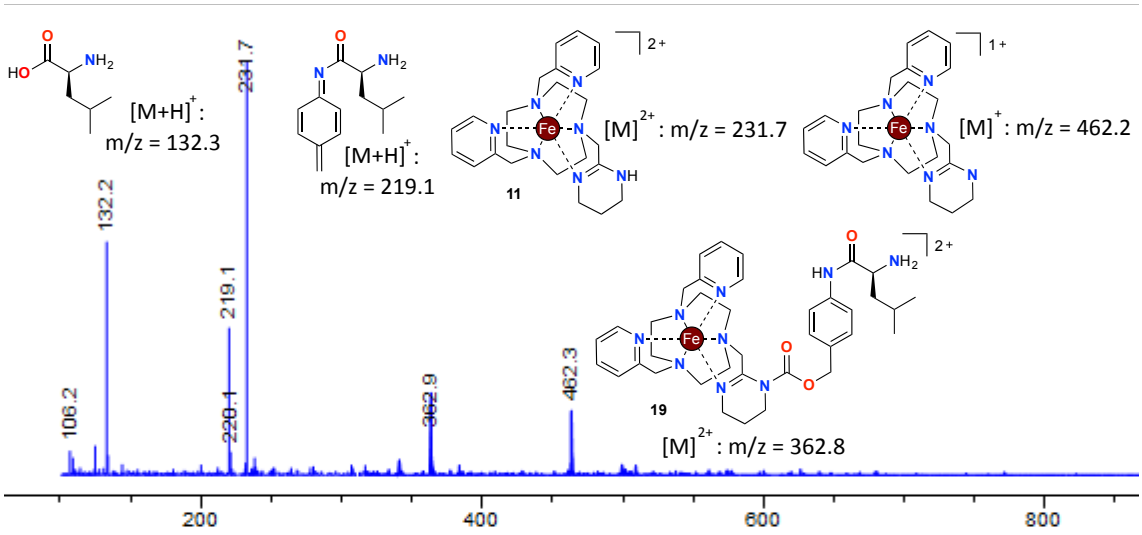
Low resolution mass spectroscopy monitoring of activation of 19

0.4 μmol of **19** were incubated in PBS at 37°C with 1 U of purified Leucine aminopeptidase (microsomal from porcine kidney, Type IV-S, Sigma-Aldrich).

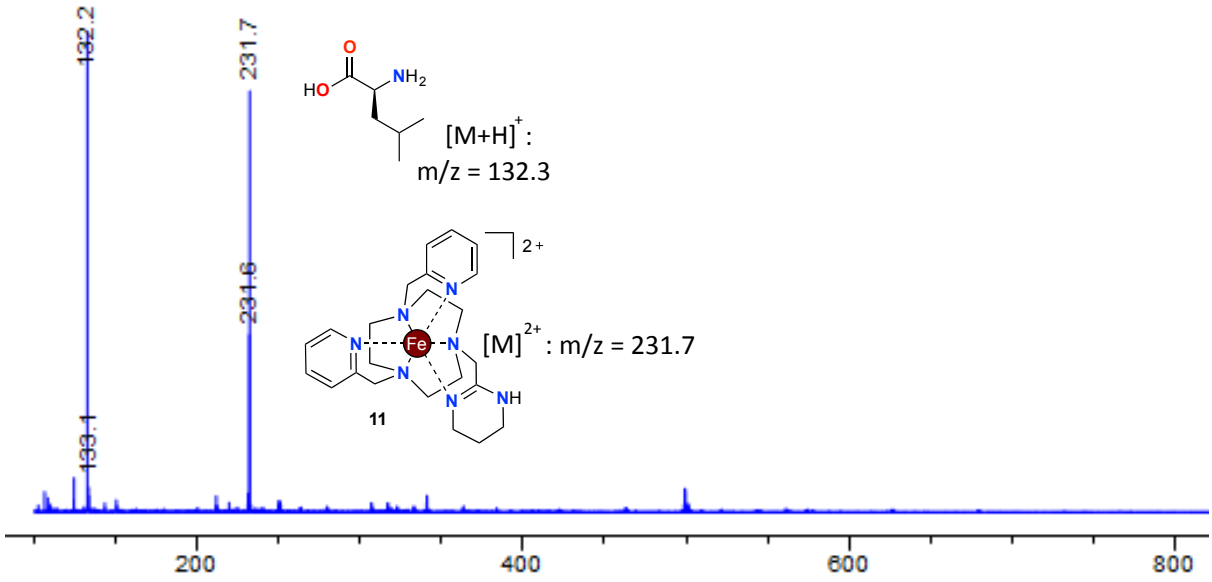
t = 5 min



t = 10 min

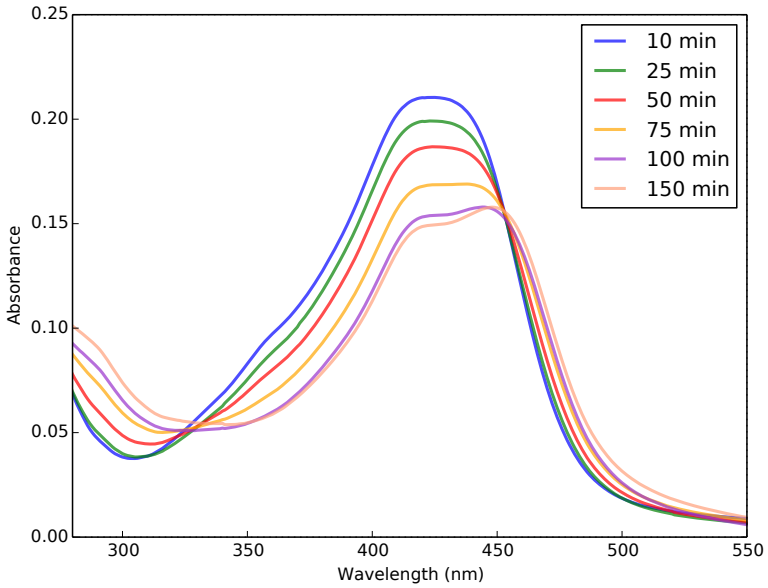


t = 20 min



UV-visible absorption spectroscopy monitoring of activation of 19

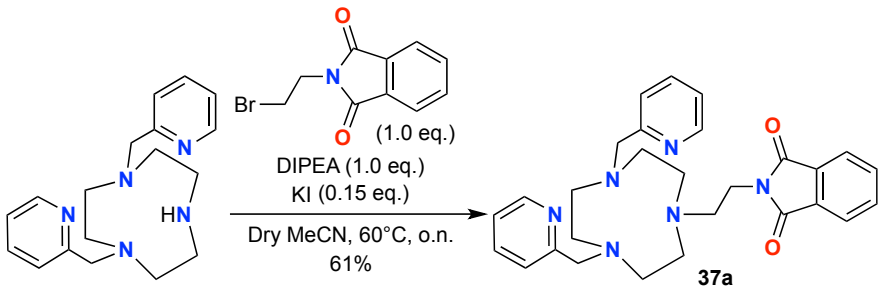
19 (0.05 mM in PBS) was incubated with purified enzyme (1 U) at 37°C.



Données expérimentales du chapitre 5

Synthesis of ligands

Synthesis of 40a and 40b

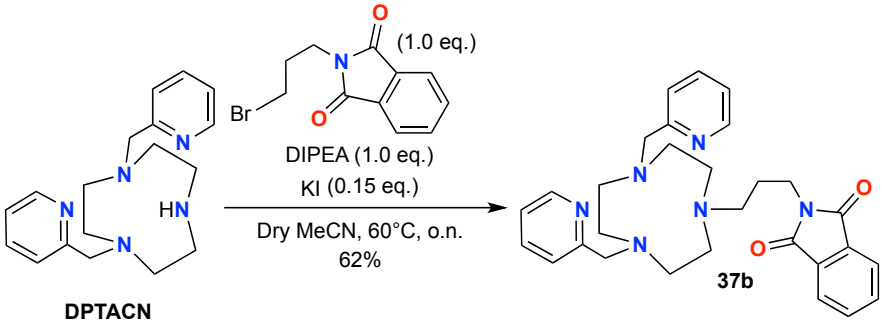


In a 25 mL flask, DPTACN (980 mg, 3.12 mmol, 1.0 eq.), *N*-(2-bromoéthyl)phthalimide (792 mg, 3.12 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (540 μL, 3.12 mmol, 1.0 eq.) and KI (78 mg, 0.47 mmol, 0.15 eq.) were dissolved in dry acetonitrile. The reaction mixture was heated at 60°C and stirred overnight. Solvent was removed *in vacuo* and the resulting oil was purified by column chromatography using neutral alumina (DCM/MeOH 99.5/0.5 v/v) to yield **37a** (923 mg ,1.90 mmol, 61%) as a brown oil.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.49 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.76-7.72 (m, 4H), 7.68-7.62 (m, 2H), 7.53-7.50 (m, 2H), 7.20-7.16 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 4.43-3.78 (m, 4H), 3.61 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.49-3.00 (m, 6H), 2.95-2.81 (m, 3H), 2.77 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.70-2.47 (m, 3H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 167.86, 149.27, 136.99, 134.19, 131.47, 123.97, 123.15, 123.04, 122.85, 67.54, 60.53, 59.16, 55.09, 53.29, 51.74, 50.40, 49.23, 40.41, 35.16.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 485.2660, calc. 485.2665.



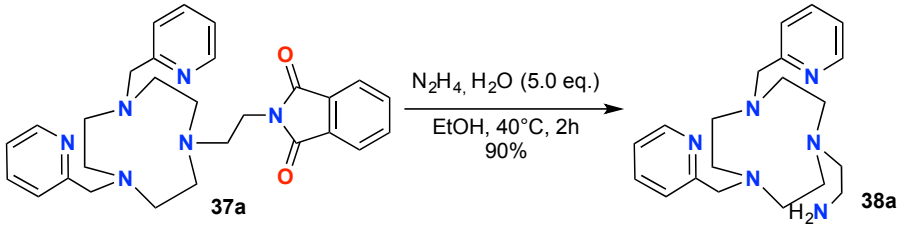
Same procedure as for **37a** was used starting from DPTACN (977 mg, 3.14 mmol, 1.0 eq.), *N*-(3-bromopropyl)phthalimide (842 mg, 3.14 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (550 μL, 3.14 mmol, 1.0 eq.) and KI (78 mg, 0.47 mmol, 0.15 eq.) in dry MeCN (10 mL) to obtain **37b** as a brown oil (971 mg, 1.95 mmol, 62%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.57 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 7.90-7.86 (m, 2H), 7.80-7.74 (m,

2H), 7.67 (td, J = 7.5 Hz, J = 1.8 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.20 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.30 (s, 2H), 3.74 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.33-2.75 (m, 14H), 1.85 (quintuplet, J = 7.1 Hz, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 167.98, 159.68, 148.86, 136.37, 133.94, 131.73, 123.30, 122.93, 122.11, 63.37, 53.32, 52.26, 35.92, 26.25.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 499.2804, calc. 499.2821.

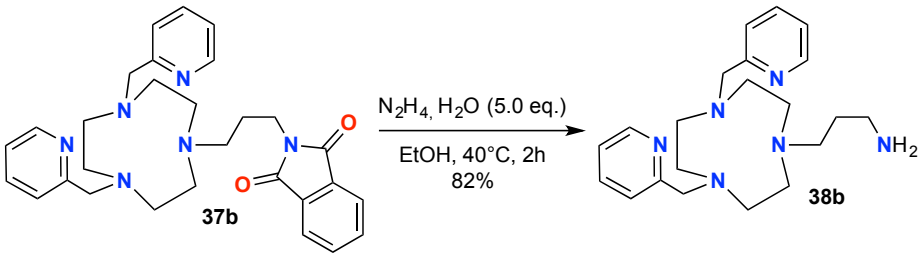


In a 25 mL flask, **37a** (1.04 g, 2.15 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in EtOH (10 mL) and hydrazine hydrate (520 μL, 10.8 mmol, 5.0 eq.) was added ; the mixture was heated at 40°C during 2 hours. Then it was filtered and the solvent evaporated *in vacuo*. The oily residue was dissolved in DCM and the organic phase was washed using 2 M sodium hydroxide aqueous solution. After that it was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated *in vacuo* to yield **38a** (687 mg, 1.94 mmol, 90%) which was used without any other purification under the form of a dark orange oil.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.14 (br s, 2H), 7.25-7.22 (m, 2H), 7.03 (br s, 2H), 6.75 (s, 2H), 4.10 (br s, 1H), 3.42 (br s, 4H), 2.42-2.25 (m, 15H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 159.20, 148.68, 136.29, 123.31, 121.79, 77.21, 63.90, 54.57, 54.37, 54.03, 38.91.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 355.2609, calc. 355.2610.

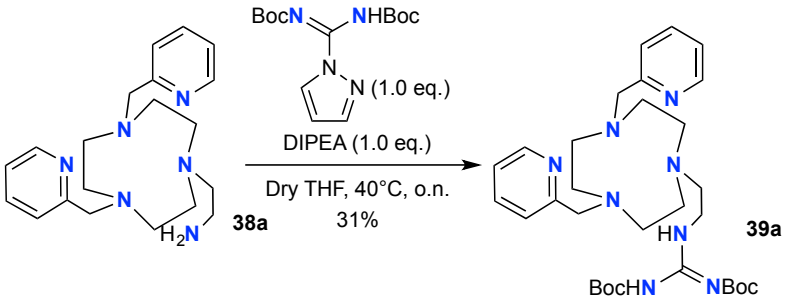


Same procedure as for **38a** was used starting from **37b** (819 mg, 1.64 mmol, 1.0 eq.) and hydrazine hydrate (400 μL, 8.2 mmol, 5.0 eq.) in EtOH (8 mL) to obtain **38b** as an orange oil (495 mg, 1.34 mmol, 82%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.53 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 7.64 (td, J = 7.7 Hz, J = 1.8 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.16-7.12 (m, 2H), 3.82 (s, 4H), 2.89-2.86 (m, 4H), 2.81-2.75 (m, 6H), 2.72-2.68 (m, 4H), 2.52 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.59 (quintuplet, J = 7.0 Hz, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 159.69, 148.56, 136.23, 123.18, 121.75, 77.75, 64.20, 56.34, 55.35, 55.10, 40.02, 30.39.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 369.2750, calc. 369.2767.

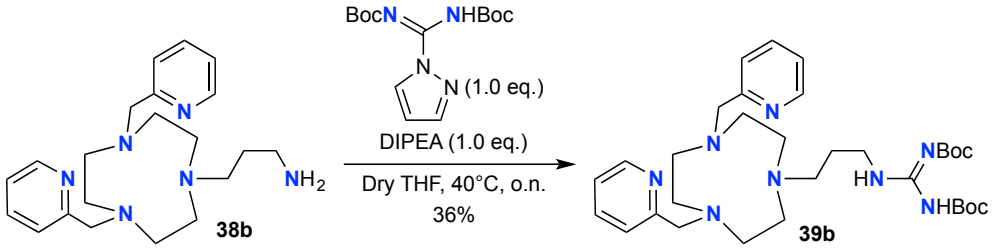


In a 50 mL flask, **38a** (580 mg, 1.64 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (290 μL, 1.64 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in dry THF (10 mL) ; *N,N'*-di-(*t*-butyloxycarbonyl)-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine (508 mg, 1.64 mmol, 1.0 eq.) dissolved in dry THF (10 mL) was added dropwise and the reaction mixture was heated at 40°C and stirred overnight. Solvent was then removed under reduced pressure and the resulting oil was purified by column chromatography over neutral alumina (DCM/MeOH 99.5/0.5 v/v) to yield **39a** (303 mg, 0.51 mmol, 31%) as a light yellow oil.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.77 (br s, 1H), 8.52 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 7.67 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.86 (s, 4H), 3.48 (br s, 2H), 2.98-2.89 (m, 8H), 2.77 (m, 4H), 2.67 (br s, 2H), 1.53 (s, 9H), 1.47 (s, 9H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 163.41, 160.37, 155.90, 152.64, 148.66, 136.06, 123.04, 121.60, 82.50, 78.86, 64.43, 57.43, 56.26, 55.58, 55.30, 39.19, 28.17, 27.87.

LRMS (ESI) : m/z (%) = 597.2 (100) $[M+H]^+$.

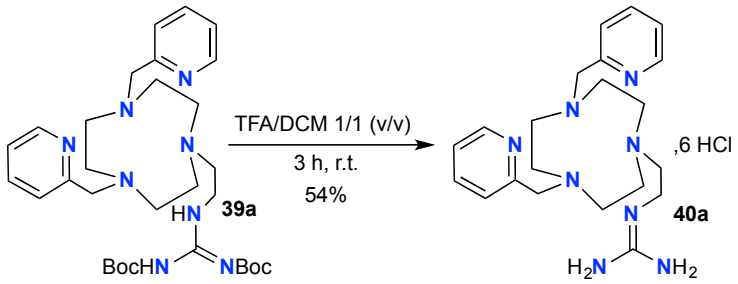


Same procedure as for **39a** was used starting from **38b** (340 mg, 0.92 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (160 μL, 0.92 mmol, 1.0 eq.) and *N,N'*-di-(*t*-butyloxycarbonyl)-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine (286 mg, 0.92 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (20 mL) to obtain **39b** as an orange oil (200 mg, 0.33 mmol, 36%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.40 (br s, 2H), 8.30 (br s, 1H), 7.55 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.03 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.73 (s, 4H), 3.37 (br s, 2H), 2.80-2.67 (m, 12H), 2.43 (br s, 2H), 1.60 (br s, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 9H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 163.55, 160.39, 156.01, 153.12, 148.75, 136.19, 123.13, 121.71, 82.82, 78.97, 64.63, 55.82, 55.65, 53.42, 39.00, 30.27, 28.44, 27.98, 27.41.

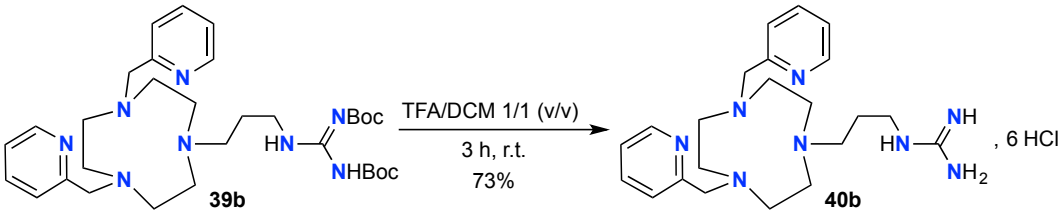
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 611.4018, calc. 611.4033.



In a 20 mL flask, **39a** (300 mg, 0.503 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (2 mL) ; trifluoroacetic acid (2 mL) was added dropwise and the mixture was stirred for 3 hours. Solvent and acid were then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in a minimal amount of ethanol (1 mL) and concentrated HCl aqueous solution (1 mL) was added dropwise. Addition of diethyl ether (5 mL) led to the precipitation of a solid which was filtered and triturated in diethyl ether to yield **40a** (167 mg, 0.27 mmol, 54%) as a light yellow and very hygroscopic powder which was kept under argon atmosphere.

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 8.75 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.60-8.55 (m, 2H), 8.06-7.97 (m, 4H), 4.33 (s, 4H), 3.71 (br s, 2H), 3.51 (br s, 6H), 3.18 (br s, 4H), 2.78 (br s, 4H).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 158.95, 151.42, 147.43, 141.70, 127.81, 126.57, 56.15, 54.04, 52.31, 50.25, 48.02, 36.37.
LRMS (ESI) : m/z (%) = 397.2 (100) $[M+H]^+$.



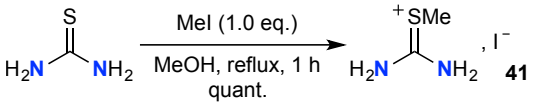
Same procedure as for **40a** was used starting from **39b** (200 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq.) and TFA (2 mL) in dry DCM (2 mL) to obtain **40b** (150 mg, 0.24 mmol, 73%) as a light yellow and very hygroscopic powder which was kept under argon atmosphere.

^{1}H-NMR (300 MHz, D_2O) : δ (ppm) = 8.65 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 8.49 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 7.96-7.88 (m, 4H), 4.19 (s, 4H), 3.38 (br s, 4H), 3.32-3.17 (m, 4H), 3.06 (br s, 4H), 2.64 (br s, 4H), 1.97 (br s, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, D_2O) : δ (ppm) = 156.47, 150.25, 147.42, 141.67, 128.02, 126.71, 55.96, 53.91, 51.49, 49.87, 47.78, 38.06, 23.35.

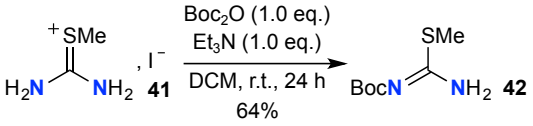
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 411.2979, calc. 411.2985.

Synthesis of 45a and 45b



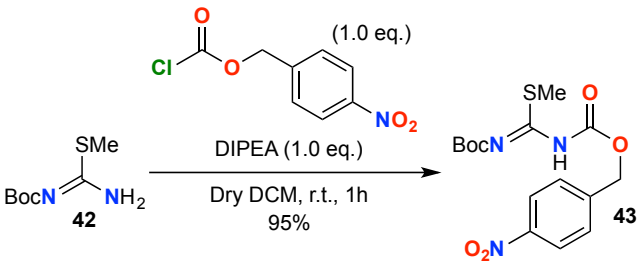
41 was synthetized according to literature procedure.[352] Thiourea (5 g, 65.7 mmol, 1.0 eq.) and methyl iodide (4,1 mL, 65.7 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (50 mL) were refluxed for 1 h. After evaporation, the crude product was taken up in diethyl ether, sucked off and washed twice with diethyl ether to yield **41** as a white solid (14.161 g, 65.6 mmol, 99%). The crude product was used in the next step without further purification.

Spectral data were in accordance with the literature.[352]



42 was synthetized according to literature procedure.[352] **41** (14.161 g, 65.7 mmol, 1.0 eq.), di-(*tert*-butyl)-dicarbonate (14.9 mL, 65.7 mmol, 1.0 eq.) and triethylamine (8.77 mL, 65.7 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in DCM and stirred at r.t. for 24 h. The mixture was subsequently washed with water and brine and the organic phase dried over anhydrous sodium sulfate. After removing the solvent under reduced pressure, the crude product was subjected to flash chromatography (PE/EtOAc 90/10 v/v) yielding **42** as a white solid (7.950 g, 41.8 mmol, 64%).

Spectral data were in accordance with the literature.[352]

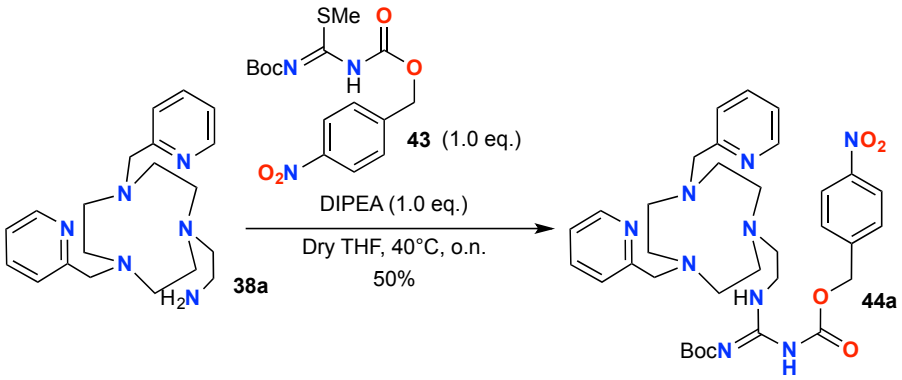


To a solution of **42** (500 mg, 2.63 mmol, 1.0 eq.) in dry DCM (20 mL) placed in an ice bath were added *p*-nitrophenyl chloroformate (567 mg, 2.63 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (460 μL, 2.63 mmol, 1.0 eq.) dropwise. Ice bath was removed and the mixture was stirred for 1 hour, after which solvent vas evaporated under reduced pressure. The oily residue was purified by column chromatography over silica gel (PE/EtOAc 95/5 v/v) to yield **43** (1.085 g, 2.97 mmol, 95%) as a white solid.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.25 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.53 (s, 9H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 173.97, 160.68, 150.35, 147.66, 143.42, 128.28, 123.74, 83.74, 66.29, 27.91, 14.58.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 370.1075, calc. 370.1073.

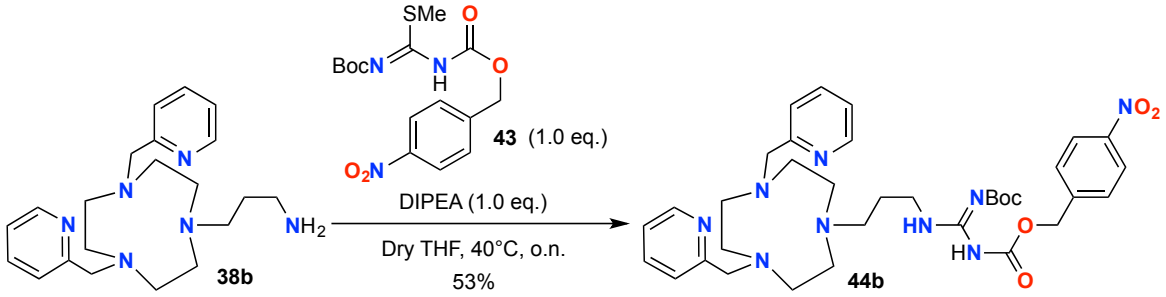


Same procedure as for **39a** was used starting from **38a** (264 mg, 0.75 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (130 μL, 0.75 mmol, 1.0 eq.) and **43** (275 mg, 0.75 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (5 mL) to yield **44a** as a yellow oil (254 mg, 0.38 mmol, 50%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 11.21 (s, 1H), 8.87 (br s, 1H), 8.51 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.64 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.58-7.48 (m, 4H), 7.14 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.87 (s, 4H), 3.48 (br s, 2H), 3.01-2.67 (m, 14H), 1.43 (s, 9H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 163.02, 159.85, 156.44, 152.53, 148.82, 147.31, 144.61, 136.25, 127.96, 123.52, 123.25, 121.85, 83.22, 65.38, 64.14, 57.07, 55.83, 55.37, 55.03, 39.41, 27.87.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 676.3554, calc. 676.3571.

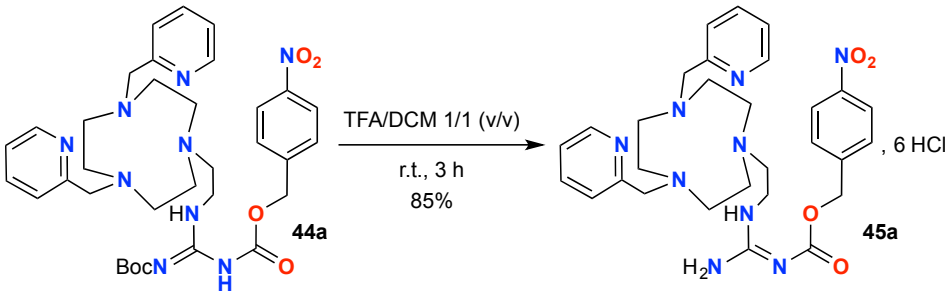


Same procedure as for **39a** was used starting from **38b** (411 mg, 1.12 mmol, 1.0 eq.), DIPEA (200 μL, 1.12 mmol, 1.0 eq.) and **43** (411 mg, 1.12 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (5 mL) to yield **44b** as a yellow oil (410 mg, 0.59 mmol, 53%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 11.15 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.43 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.57 (td, J = 7.6 Hz, J = 1.8 Hz, 2H), 7.49-7.41 (m, 4H), 7.06 (br s, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.76 (s, 4H), 3.42 (br s, 2H), 2.87-2.68 (m, 12H), 2.47 (br s, 2H), 1.66 (br s, 2H), 1.40 (s, 9H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 163.21, 160.51, 156.68, 152.97, 148.94, 147.45, 144.68, 136.31, 128.05, 123.68, 123.27, 121.88, 83.55, 65.51, 64.73, 55.79, 39.36, 28.16, 28.02, 27.38.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 690.3703, calc. 690.3728.

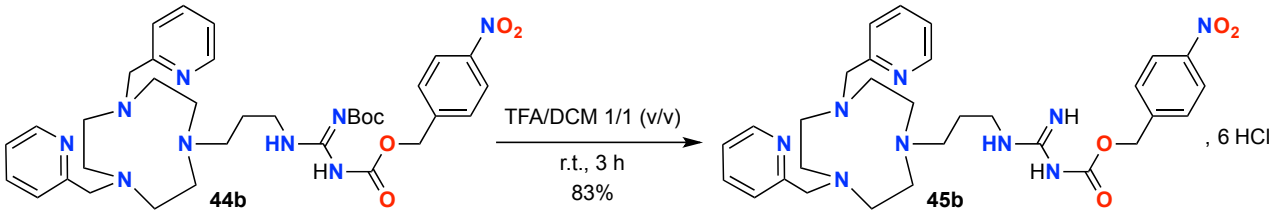


Same procedure as for **40a** was used starting from **44a** (254 mg, 0.38 mmol, 1.0 eq.) and TFA (2 mL) in dry DCM (2 mL) to yield **45a** (250 mg, 0.32 mmol, 85%) as a light yellow and very hygroscopic powder which was kept under argon atmosphere.

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 8.60 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 8.44 (td, J = 7.9 Hz, J = 1.4 Hz, 2H), 7.96-7.82 (m, 6H), 7.39 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.15 (s, 4H), 3.83 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.56 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.47 (br s, 4H), 3.07 (br s, 4H), 2.59 (br s, 4H).

^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 154.25, 152.68, 150.93, 147.86, 147.04, 142.33, 142.14, 128.59, 128.24, 126.72, 123.41, 66.98, 56.74, 55.05, 52.89, 51.24, 49.88, 37.00.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 576.3028, calc. 576.3047.



Same procedure as for **40a** was used starting from **44b** (410 mg, 0.59 mmol, 1.0 eq.) and TFA (2 mL) in dry DCM (2 mL) to yield **45b** (396 mg, 0.49 mmol, 83%) as a light yellow and very hygroscopic powder which was kept under argon atmosphere.

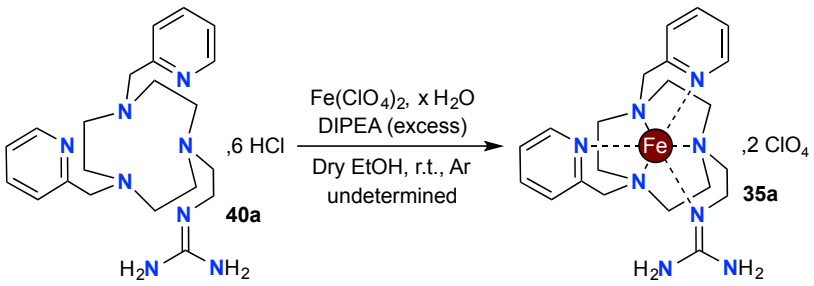
^{1}H-NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$) : δ (ppm) = 9.00 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 8.58 (td, J = 7.7 Hz, J = 1.5 Hz, 2H), 8.26 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 8.03 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.47 (s, 2H), 4.45 (s, 4H), 3.72 (br s, 4H), 3.62-3.59 (m, 4H), 3.37 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 2.93 (br s, 4H), 2.36 (m, 2H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $(CD_3)_2CO$) : δ (ppm) = 1535.33, 154.48, 154.07, 148.72, 146.49, 144.52, 143.77, 129.23, 128.22, 127.00, 124.40, 67.37, 58.10, 55.13, 53.15, 52.33, 50.49, 39.66, 23.75.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 590.3181, calc. 590.3203.

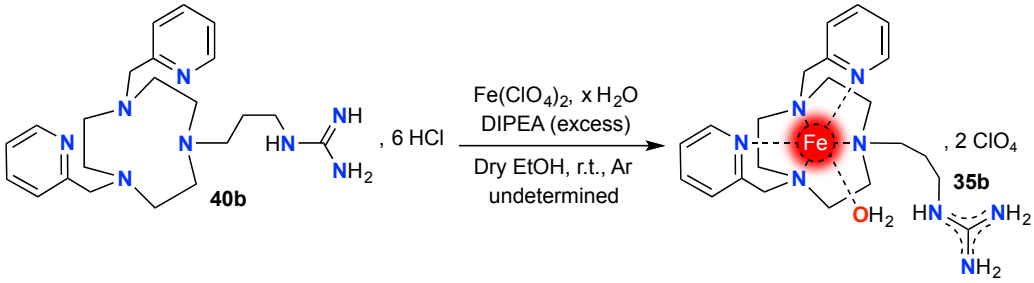
Synthesis of complexes

Complex 35a



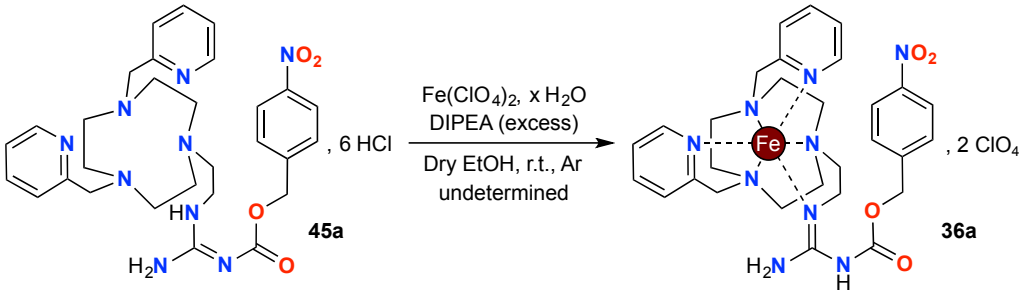
In a schlenk, **40a** (167 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in dry ethanol (2 mL). The solution was degassed via a "freeze-pump-thaw" procedure and hydrated iron perchlorate (97 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) was added in one portion. DIPEA (300 μL, 0.28 mmol, 6.5 eq.) was added dropwise ; a solid formed, it was filtered, washed with dry isopropanol and diethyl ether and dissolved in dry acetonitrile. After evaporation of the solvent *in vacuo*, the solid residue was triturated with isopropanol and chloroform. **35a** was crystallized by liquid/liquid diffusion of a concentrated solution in diethyl ether and yielded monocrystals suitable for X-ray diffraction experiments (10 mg, 6% assuming the complex is pure).

Complex 35b



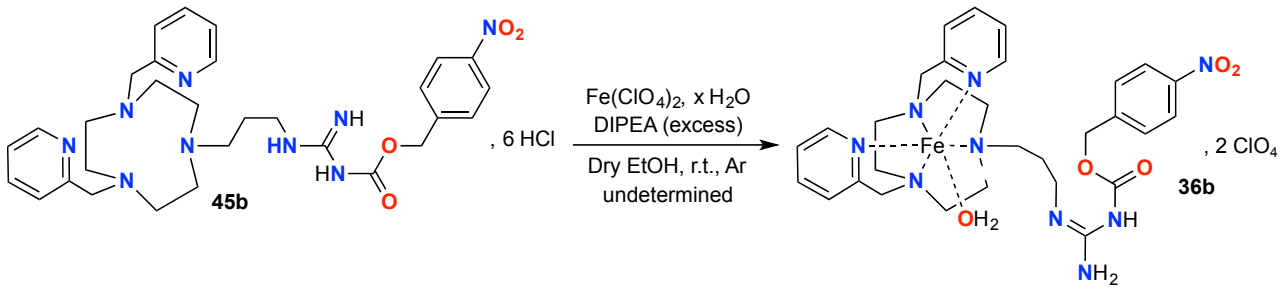
Same procedure as for **35a** was used starting from **40a** (50 mg, 0.079 mmol, 1.0 eq.), hydrated iron perchlorate (29 mg, 0.079 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (90 μL, 0.51 mmol, 6.5 eq.) in dry ethanol (1 mL). However **35b** could not be isolated.

Complex 36a



Same procedure as for **35a** was used starting from **45a** (100 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.), hydrated iron perchlorate (45 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (135 μL, 0.78 mmol, 1.0 eq.) in dry ethanol (2 mL). **36a** could be isolated in small amount (10 mg) ; however all attempts to obtain microcrystals were unsuccessful.

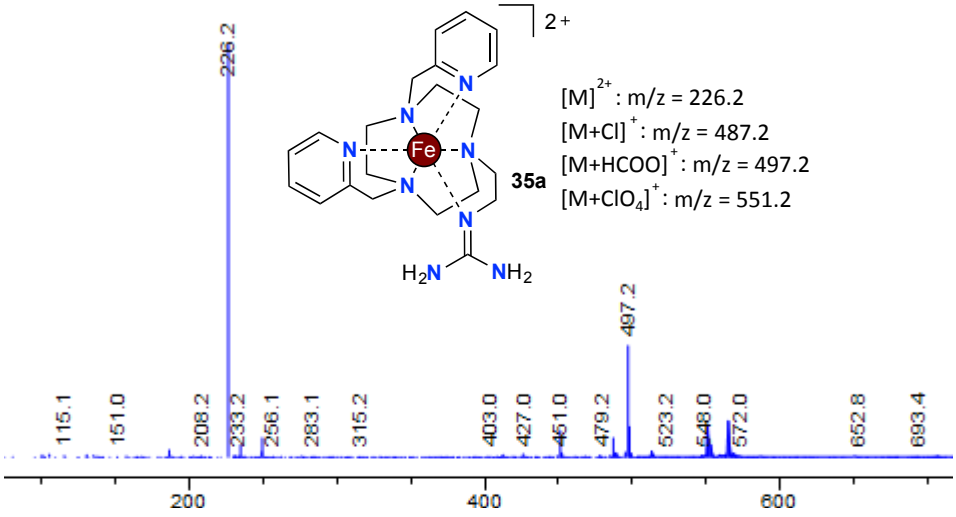
Complex 36b



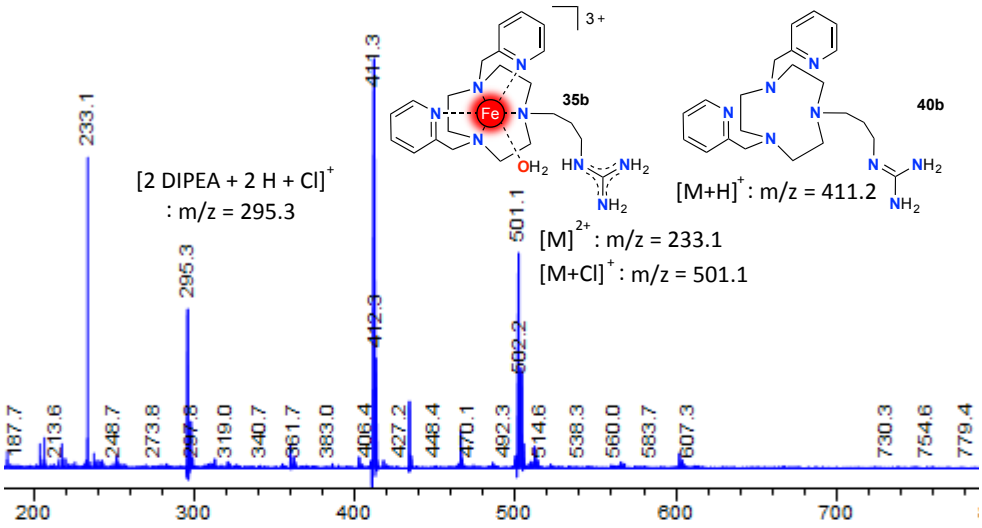
Same procedure as for **35a** was used starting from **45b** (110 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.), hydrated iron perchlorate (49 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (150 μL, 0.88 mmol, 1.0 eq.) in dry ethanol (2 mL). **36b** could be isolated in small amount (13 mg) ; however all attempts to obtain microcrystals were unsuccessful.

Low resolution mass spectra of complexes

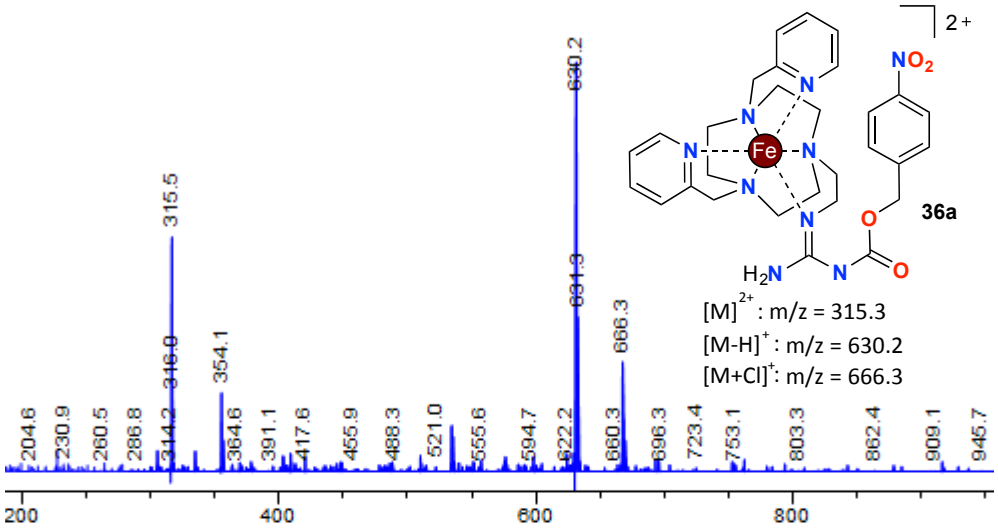
Complex 35a



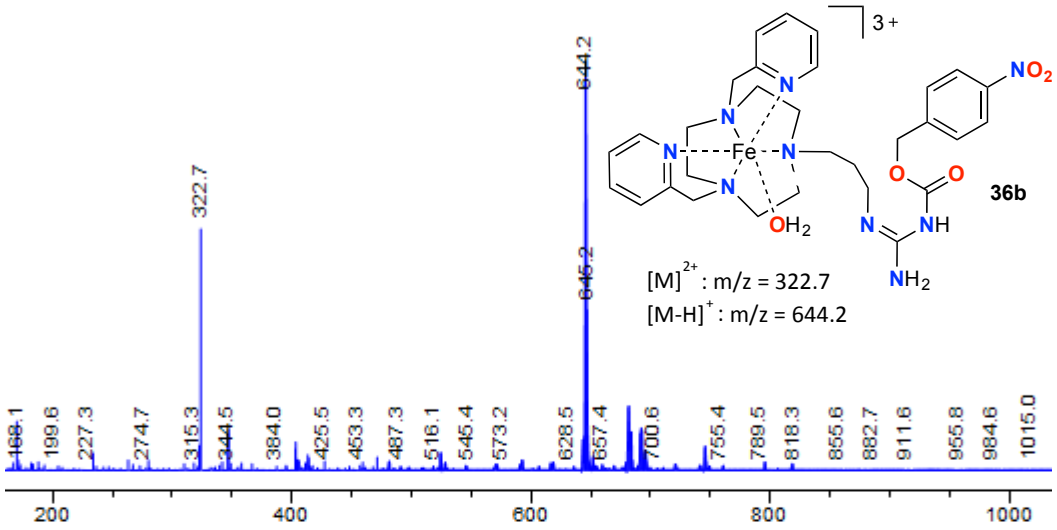
Complex 35b



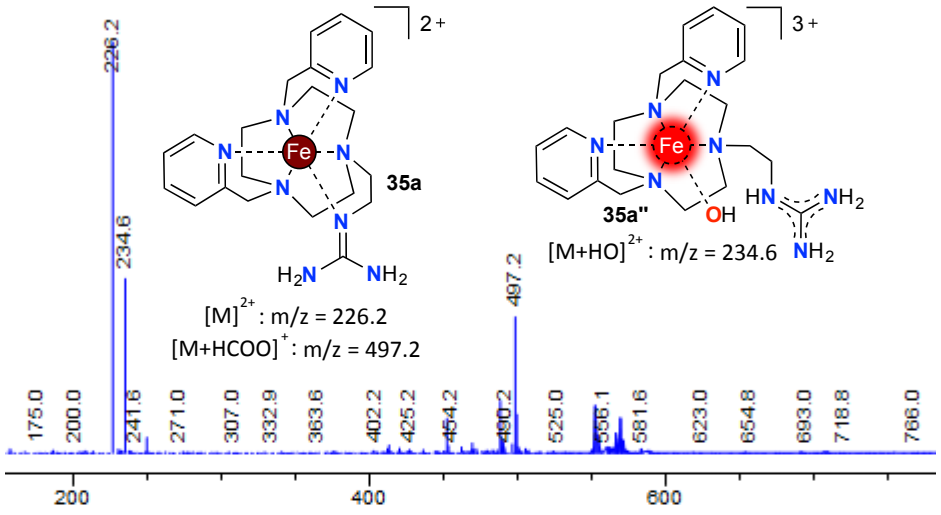
Complex 36a



Complex 36b



Oxidation of complex 35a

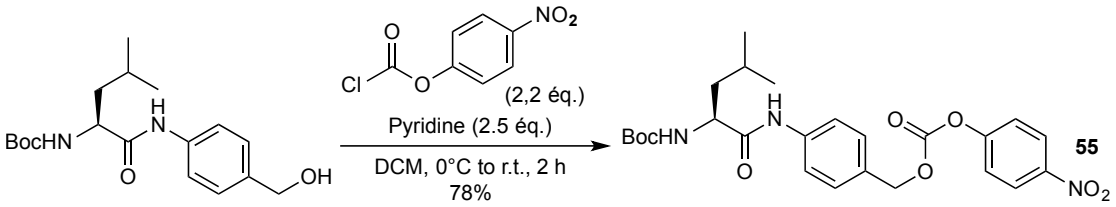


X-ray structural analysis of 35a

Empirical formula	$C_{21}H_{32}FeN_8.2(ClO_4)$
M/g.mol	651.29
crystal system	monoclinic
space group	P21/c
a/Å	17.7606(5)
b/Å	8.8612(3)
c/Å	17.6739(6)
β/°	107/721(3)
V/Å^3	2649.54(15)
Z	4
ρ_{calc}/mg.m^3	1.633
T/K	150
λ/Å	0.7107
μ.mm	0.83
no. of measured reflections	45664
no. of independant reflections	6939
R_{int}	0.065
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]^a$	0.048
$wR(F^2)^b$	0.095
$\Delta\rho_{min}$, $\Delta\rho_{max}$/e.Å^3	-0.90, 1.28

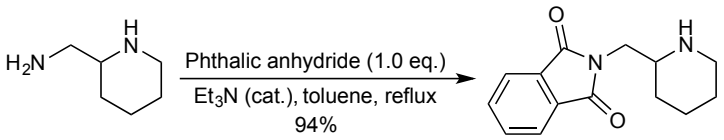
Données expérimentales du chapitre 7

Synthesis



Same procedure as for **27** was used starting from alcohol (500 mg, 1.49 mmol, 1.0 eq.), 4-nitrophenyl chloroformate (0.659 g, 3.27 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (300 μL, 3.73 mmol, 2.5 eq.) to obtain **55** as a white powder (581 mg, 1.16 mmol, 78%).

Spectral data were in accordance with the literature.[353]

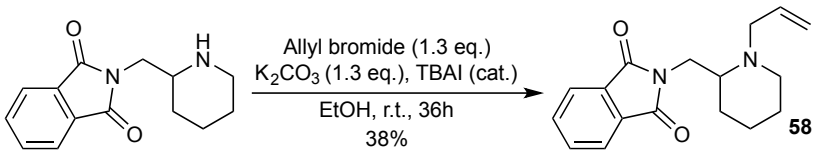


To a solution of 2-aminomethylpiperidine (3.0 g, 26.3 mmol, 1.0 eq.) in toluene (50 mL) was added portionwise phthalic anhydride (3.89 g, 26.3 mmol, 1.0 eq.) and dropwise triethylamine (550 μL, 3.95 mmol, 0.15 eq.). The mixture was then refluxed during 2 h using a Dean-Stark apparatus. Then the mixture was filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. The product (6.605 g, 24.7 mmol, 94%) was obtained as a light yellow solid and used without further purification.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.89-7.82 (m, 2H), 7.75-7.68 (m, 2H), 3.68 (d, J = 4 Hz, 2H), 3.13-3.05 (m, 1H), 2.98-2.88 (m, 1H), 2.64-2.54 (m, 1H), 1.87-1.78 (m, 1H), 1.76-1.68 (m, 1H), 1.63-1.54 (m, 1H), 1.45-1.34 (m, 2H), 1.30-1.15 (m, 1H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 168.4, 133.7, 131.9, 123.0, 55.5, 46.4, 43.4, 30.6, 26.1, 24.1.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 245.1290, calc. 245.1290.



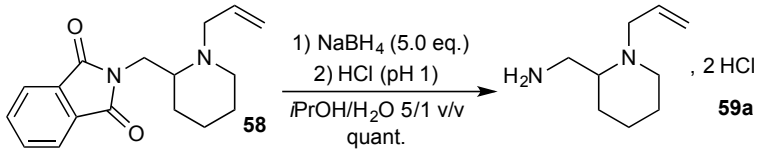
To an ice-cold solution of reagent (6.605 g, 24.7 mmol, 1.0 eq.) in ethanol (80 mL), potassium carbonate (4.36 g, 31.6 mmol, 1.3 eq.), tetra-*n*-butylammonium iodide (912 mg, 2.47 mmol, 0.10 eq.) and allyl bromide (2.73 mL, 31.6 mmol, 1.3 eq.) were added. Cooling was removed and the mixture was stirred for 36 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered off over a pad of Celite and evaporated *in vacuo*. The residual oil was dissolved in EtOAc and a saturated aqueous solution of NH_4Cl ; both layers were separated and organic extract was washed twice with saturated aqueous

NH_4Cl. Combined aqueous washings were extracted 3 times with EtOAc. Combined organic extracts were dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness. The crude oil was purified via column chromatography on silica gel to yield **58** (2.822 g, 9.92 mmol, 38%) as a light yellow solid.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.84-7.78 (m, 2H), 7.72-7.65 (m, 2H), 5.95-5.81 (m, 1H), 5.22-5.08 (m, 2H), 3.93 (dd, 1H, J = 13 Hz, J = 5 Hz), 3.73 (dd, 1H, J = 13 Hz, J = 8 Hz), 3.42 (dd, 1H, J = 14 Hz, J = 6 Hz), 3.21 (dd, 1H, J = 14 Hz, J = 6 Hz), 2.88-2.76 (m, 2H), 2.37-2.28 (m, 2H), 1.74-1.47 (m, 4H), 1.40-1.25 (m, 2H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 168.3, 135.5, 133.8, 132.0, 123.0, 117.2, 57.6, 57.3, 50.3, 38.4, 28.1, 24.7, 22.0.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 285.1595, calc. 285.1603.

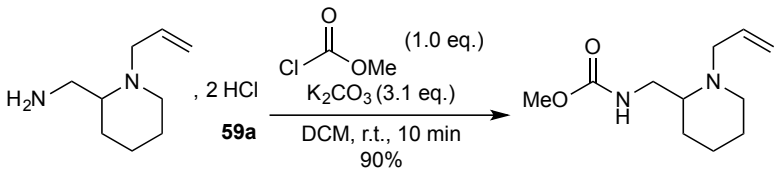


In an ice-cold solution of **58** (1.000 g, 3.52 mmol, 1.0 eq.) in iPrOH/H_2O 6/1 v/v (50 mL) was added portionwise sodium borohydride (665 mg, 17.58 mmol, 5.0 eq.). After stirring overnight at room temperature the pH was acidified to 1 using concentrated HCl aqueous solution ; the mixture was filtered and then heated to 80°C during 2 h. iPrOH was removed *in vacuo* and the resulting aqueous solution was washed 5 times with diethyl ether and then freeze-dried. Product **59a** was obtained as a white powder (1.045 g, 4.6 mmol, quantitative yield).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 5.99-5.86 (m, 1H), 5.24-5.13 (m, 2H), 3.41 (ddt, 1H, J = 14 Hz, J = 5.7 Hz, J = 1.5 Hz), 3.04-2.90 (m, 3H), 2.74 (dd, 1H, J = 13 Hz, J = 3.3 Hz), 2.21 (tt, 2H, J = 9.6 Hz, J = 3.3 Hz), 1.80-1.71 (m, 1H), 1.68-1.43 (m, 2H), 1.39-1.25 (m, 3H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 134.93, 116.87, 61.47, 56.23, 51.93, 42.97, 28.28, 24.95, 23.66.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 155.1543, calc. 155.1548.

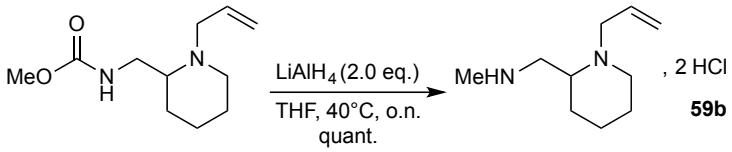


In a solution of **59a** (335 mg, 1.48 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL) was added potassium carbonate (636 mg, 4.6 mmol, 3.1 eq.) and methyl chloroformate (115 μL, 1.48 mmol, 1.0 eq.). After stirring 10 minutes at room temperature, the mixture was evaporated. The crude oil was purified via column chromatography on silica gel to obtain the product as a light yellow oil (282 mg, 1.33 mmol, 90%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 5.96-5.82 (m, 1H), 5.24-5.16 (m, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.41-3.30 (m, 3H), 3.01-2.91 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 2.23-2.17 (m, 1H), 1.75-1.70 (m, 1H), 1.60-1.56 (m, 2H), 1.54-1.40 (m, 2H), 1.37-1.24 (m, 1H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 157.34, 134.50, 117.71, 58.62, 56.29, 51.90, 42.31, 28.85, 24.92, 23.58.

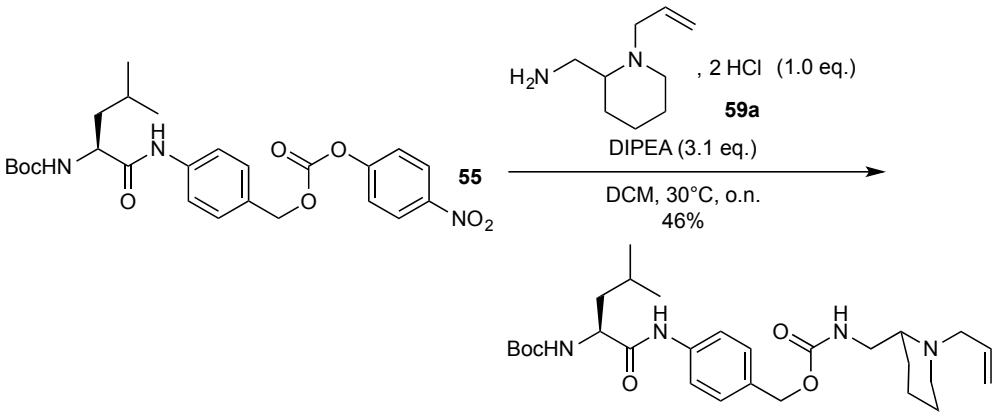
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 213.1601, calc. 213.1603.



In a solution of lithium aluminium hydride (1,1 mL, 2,4 M solution in dry THF, 2.64 mmol, 2.0 eq.) in dry THF, carbamate (280 mg, 1.32 mmol, 1.0 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred overnight at 40°C. Solvent was evaporated under vacuum and the amine was used without further purification.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 5.97-5.82 (m, 1H), 5.24-5.08 (m, 2H), 3.43-3.33 (m, 1H), 2.98-2.84 (m, 2H), 2.71-2.53 (m, 3H), 2.46-2.30 (m, 3H), 2.23-2.12 (m, 2H), 1.83-1.23 (m, 8H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 127.43, 124.84, 61.65, 58.05, 55.71, 52.99, 52.19, 50.49, 48.26, 45.28, 34.14, 27.96, 26.19, 21.68, 21.43, 20.96, 20.02.

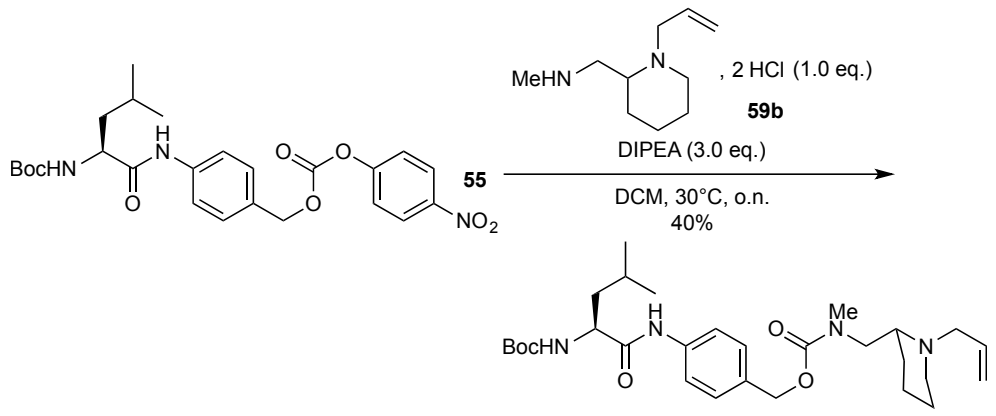


To a suspension of **59a** (57 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) in DCM (20 mL) was added **55** (126 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) ; the mixture was put in an ice-bath and DIPEA (131 μL, 0.78 mmol, 3.0 eq.) was added. After 5 minutes, ice bath was removed and the solution was heated at 30°C overnight. The mixture was then washed using saturated Na_2CO_3 and $NaHCO_3$ aqueous solutions, dried with Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude oil was purified via column chromatography on silica gel to obtain the product as a white foam (60 mg, 0.12 mmol, 46%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.70 (br s, 1H), 7.50 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 5.97-5.84 (m, 1H), 5.66 (br s, 1H), 5.32-5.03 (m, 5H), 4.31 (br s, 1H), 3.52-2.90 (m, 5H), 2.61 (br s, 1H), 2.34 (br s, 1H), 1.82-1.51 (m, 8H), 1.46 (s, 9H), 1.38-1.24 (m, 2H), 0.98 (t, J = 5.5 Hz, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 171.61, 156.89, 156.35, 138.03, 132.45, 132.02, 128.76, 119.74, 118.54, 80.23, 66.35, 59.31, 56.06, 53.87, 51.87, 42.14, 41.18, 28.33, 24.78, 24.23, 23.13, 23.04, 21.80.

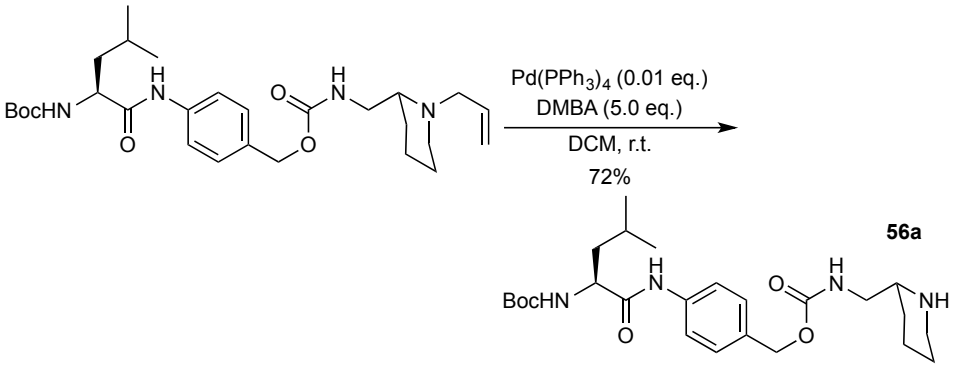
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 517.3381, calc. 517.3390.



Same procedure as for **56a** was used starting from **55** (66 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.), **59b** (22 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.) and DIPEA (68 μL, 0.39 mmol, 3.0 equiv.) to obtain the product as a light yellow oil (28 mg, 0.05 mmol, 40%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.55 (br s, 1H), 7.52 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.99-5.78 (m, 1H), 5.23-5.05 (m, 4H), 4.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.24 (br s, 1H), 3.69-3.53 (m, 1H), 3.42-3.22 (m, 1H), 3.18-2.98 (m, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.89-2.74 (m, 1H), 2.72-2.53 (m, 1H), 2.37-2.23 (m, 1H), 1.86-1.53 (m, 7H), 1.48 (s, 9H), 1.40-1.13 (m, 3H), 0.99 (t, J = 5.5 Hz, 6H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 171.60, 156.58, 156.43, 137.98, 132.26, 128.98, 128.53, 119.79, 119.79, 80.23, 66.81, 57.87, 56.96, 53.86, 51.42, 49.50, 41.13, 36.06, 28.34, 24.78, 24.38, 23.02, 21.88.

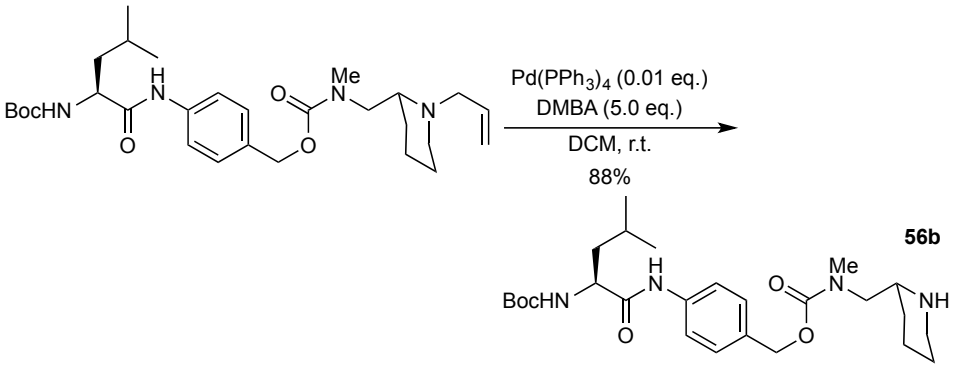


A solution of allylamine (150 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq.) and 1,3-dimethylbarbituric acid (226 mg, 1.45 mmol, 5.0 eq.) in dry DCM (5 mL) was degassed using an argon flux, then tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.01 eq.) was added. After completion of the reaction, the reaction mixture was evaporated to dryness and purified via column chromatography on silica gel to obtain **56a** as a light yellow oil (100 mg, 0.21 mmol, 72%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.80 (br s, 1H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.56 (br s, 1H), 5.32-5.27 (m, 1H), 5.01 (br s, 2H), 4.33 (br s, 1H), 3.32-3.22 (m, 1H), 3.10-3.01 (m, 2H), 2.76-2.57 (m, 2H), 2.30 (br s, 1H), 1.85-1.55 (m, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.42-1.31 (m, 2H), 1.23-1.10 (m, 1H), 0.97 (t, J = 5.8 Hz, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 171.98, 156.94, 156.49, 137.97, 131.96, 128.65, 119.77, 80.11, 66.28, 59.31, 56.30, 53.91, 46.40, 41.26, 29.89, 28.35, 26.00, 24.76, 24.12, 23.06, 21.70.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 477.3065, calc. 477.3077.

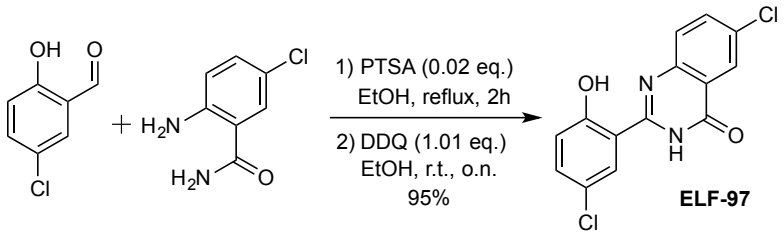


Same procedure as for **56a** was used starting from the allylamine (95 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.), 1,3-dimethylbarbituric acid (140 mg, 0.90 mmol, 5.0 eq.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.01 eq.) to obtain **56b** as a light yellow oil (77 mg, 0.16 mmol, 88%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.96 (br s, 1H), 7.41 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.37 (br s, 1H), 4.95 (br s, 2H), 4.29 (br s, 1H), 3.12 (br s, 2H), 2.97 (br s, 1H), 2.87 (br s,

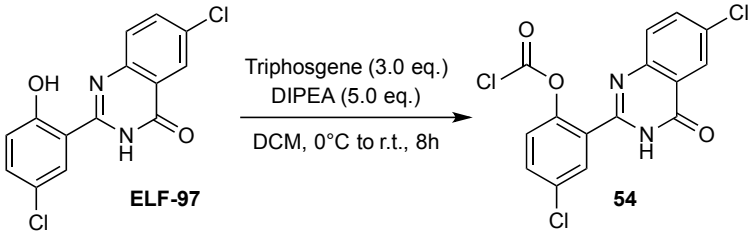
3H), 2.76-2.62 (m, 1H), 2.54-2.45 (m, 1H), 1.73-1.60 (m, 3H), 1.57-1.46 (m, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.31-0.95 (m, 4H), 1.23-1.10 (m, 1H), 0.87 (dd, J = 10.5 Hz, J = 6.2 Hz, 6H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 171.46, 156.71, 156.40, 137.87, 132.42, 128.68, 119.78, 80.31, 66.78, 55.69, 55.19, 53.85, 46.74, 41.03, 36.21, 35.90, 30.51, 28.35, 26.31, 24.78, 23.01, 21.90.

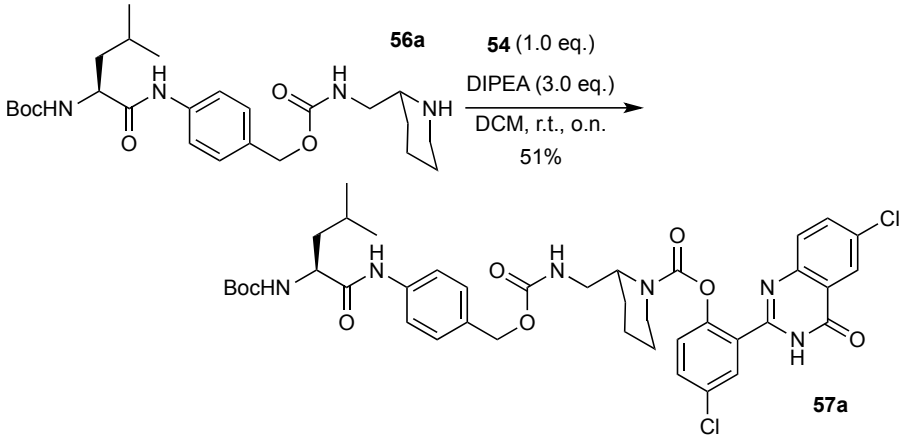


To a solution of anthranilamide (2.000 g, 11.7 mmol, 1.0 eq.) in dry EtOH (20 mL) was added 5-chlorosalicylaldehyde (1.831 g, 11.7 mmol, 1.0 eq.), the mixture was refluxed during 30 min. PTSA (40 mg, 0.234 mmol, 0.02 eq.) was then added before an additional 1 hour reflux. The reaction mixture was then cooled to r.t. and DDQ (2.678 g, 11.8 mmol, 1.01 eq.) was added portionwise, the mixture was stirred overnight at r.t.. The resulting crude was filtered and the obtain solid was washed two times with EtOH and two times with diethyl ether. ELF®-97 (3.41 g, 11.11 mmol, 95%) was obtain as a light beige powder and used without further purification.

Spectral data were in accordance with literature.[209]



To an ice-cold suspension of ELF®-97 (1.0 eq.) in dry DCM under an argon atmosphere was added dropwise DIPEA (5.0 eq.) followed by a solution of triphosgene (3.0eq.) in dry DCM. This solution was stirred at 0°C for 1 h and overnight at r.t.. The resulting mixture was then evaporated to dryness under reduced pressure and the volatiles were trapped in a liquid nitrogen trap. The resulting solid residue was used without further purification.



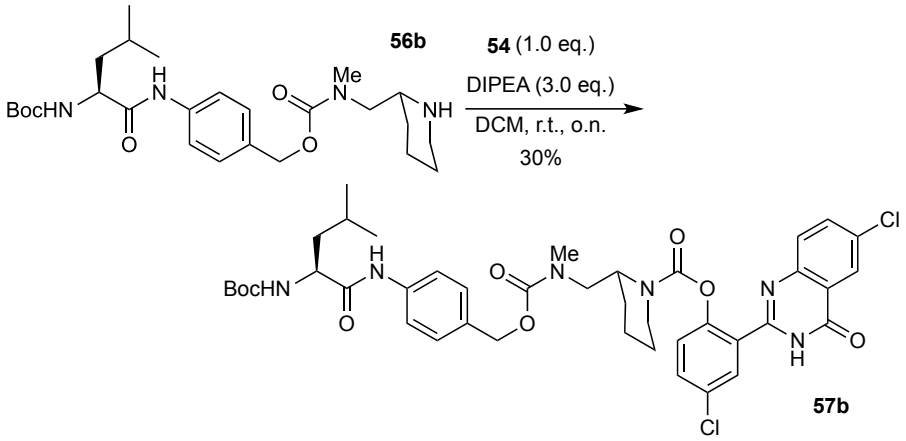
To an ice-cold suspension of **56a** (50 mg, 0.105 mmol, 1.0 eq.) in dry DCM (5 mL) under argon was added dropwise a clear solution of **54** (93 mg, 0.105 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (60 μL, 0.32 mmol, 3.0 eq.). After the addition, the reaction mixture was stirred at 0°C for 30 min and at r.t. overnight. The reaction mixture was then washed three times with $NaHCO_3$ sat. and the organic layer was dried with

Na_2SO_4, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified via column chromatography on silica gel to obtain **57a** as a white foam (43 mg, 0.05 mmol, 51%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.88 (br s, 0.5H), 8.22 (br s, 1H), 7.94-7.85 (m, 1H), 7.70 (br s, 2H), 7.33-7.26 (m, 3H), 7.12-6.97 (m, 3H), 6.04 (br s, 0.5H), 5.67 (br s, 0.5H), 5.37 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.84 (br s, 2H), 4.59 (br s, 0.5H), 4.36 (br s, 1.5H), 4.14-3.98 (m, 1H), 3.53 (br s, 1H), 3.36-3.11 (m, 1.5H), 3.04-2.91 (m, 0.5H), 1.81-1.53 (m, 9H), 1.44 (s, 9H), 0.97 (t, J = 6.5 Hz, 6H).

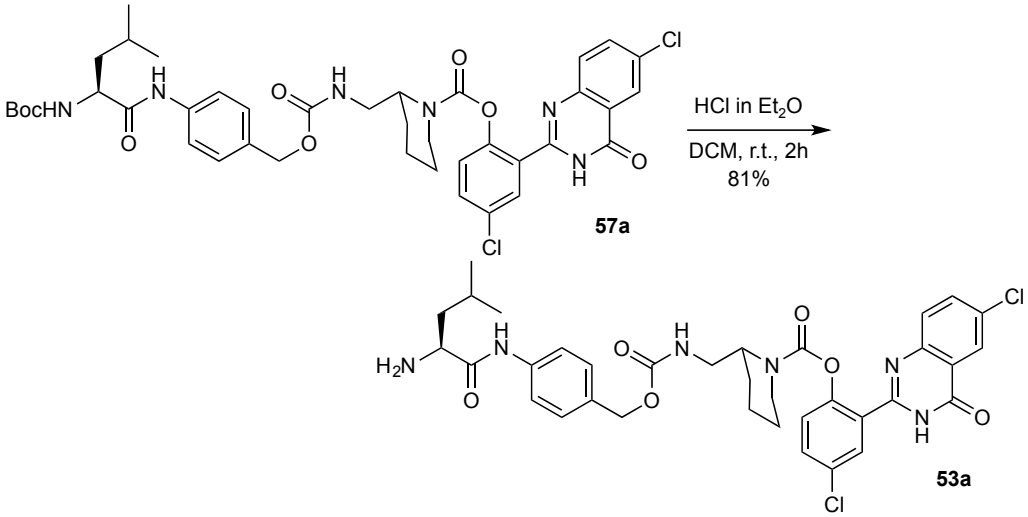
^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 171.59, 161.32, 156.84, 156.45, 153.81, 152.88, 149.48, 147.54, 137.89, 135.17, 133.08, 131.96, 131.45, 130.41, 129.58, 128.79, 128.61, 127.84, 127.43, 125.83, 124.94, 124.68, 122.08, 119.72, 82.78, 80.38, 66.49, 66.25, 53.88, 51.88, 51.52, 40.91, 40.71, 40.41, 40.16, 33.82, 28.34, 26.36, 25.76, 25.19, 25.01, 24.78, 23.88, 23.07, 21.76, 20.85, 18.82, 17.50, 17.29, 14.65.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 809.2824, calc. 809.2832.



Same procedure as for **57a** was used starting from amine (17 mg, 0.035 mmol, 1.0 eq.), **54** (13 mg, 0.035 mmol, 1.0 eq.), and DIPEA (20 μL, 0.11 mmol, 3.0 eq.) to obtain the product as a white powder (8.6 mg, 0.011 mmol, 30%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.42 (br s, 0.5H), 8.28 (s, 1H), 7.98-7.88 (m, 1H), 7.74 (br s, 2H), 7.53-7.37 (m, 2H), 7.26-7.17 (m, 2H), 7.10-7.01 (m, 1H), 5.18-4.85 (m, 3H), 4.82-4.69 (m, 0.5H), 4.65-4.46 (m, 1H), 4.26 (br s, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.81-3.62 (m, 1H), 3.47-3.21 (m, 1H), 3.11-2.86 (m, 4H), 1.82-1.52 (m, 9H), 1.47 (s, 9H), 0.99 (br s, 6H).



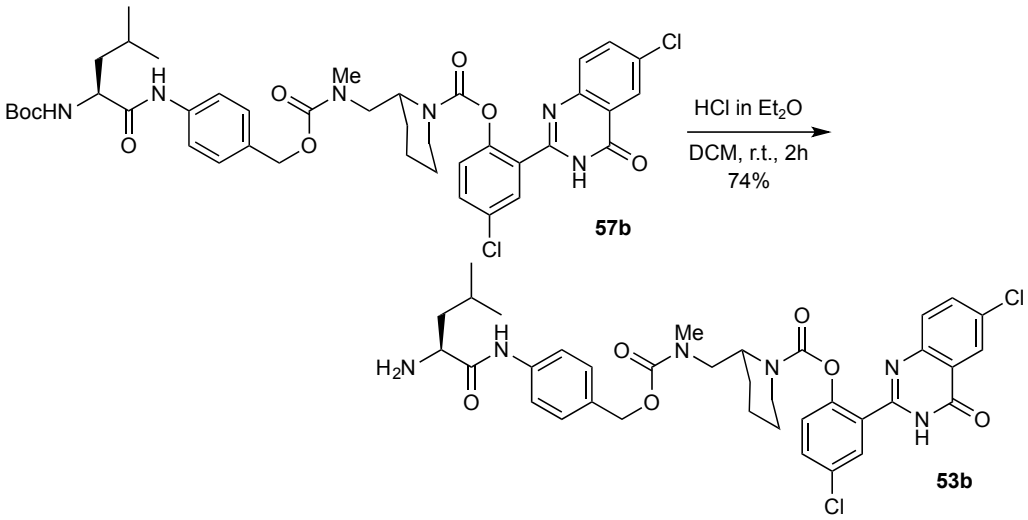
To a solution of **57a** (43 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) in DCM (0.5 mL) under an argon atmosphere was added a solution of 2M HCl in Et_2O (2 mL) at r.t. and the reaction mixture was stirred at this temperature until the reaction was complete. A white precipitate appears, it is filtered off, washed

twice with diethyl ether and dried to yield **53a** as a light grey powder (32 mg, 0.04 mmol, 81%)

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 8.21 (br s, 1H), 7.92-7.84 (m, 2H), 7.81-7.75 (m, 1H), 7.71-7.57 (m, 2.5H), 7.52-7.44 (m, 1H), 7.43-7.38 (m, 0.5H), 7.31-7.24 (m, 1H), 4.65-4.55 (m, 1H), 4.42-4.15 (m, 1H), 4.14-4.06 (br s, 1H), 3.95-3.78 (m, 0.5H), 3.65-3.53 (m, 0.5H), 3.26-2.93 (m, 2H), 1.89-1.38 (m, 9H), 1.10-1.03 (m, 6H).

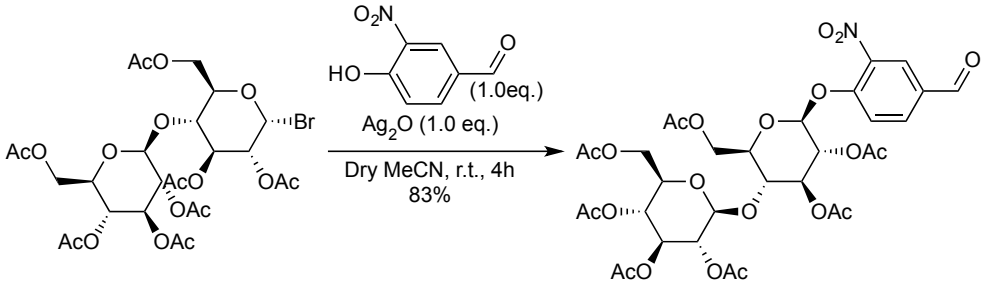
^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 157.49, 153.41, 152.86, 152.05, 147.81, 144.70, 137.73, 135.40, 134.35, 133.44, 132.46, 131.07, 129.64, 129.08, 128.32, 127.04, 125.45, 121.76, 119.92, 65.61, 52.39, 51.80, 50.02, 45.14, 40.37, 38.88, 24.77, 24.15, 21.91, 20.79, 18.45.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 709.2298, calc. 709.2308.



Same procedure as for **53a** was used starting from **57b** (8.6 mg, 0.011 mmol, 1.0 eq.) and HCl in Et_2O (1 mL) to obtain the product as a white powder (5.6 mg, 0.008 mmol, 74%).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 8.25 (s, 1H), 7.96-7.85 (m, 2H), 7.82-7.69 (m, 2H), 7.67-7.54 (m, 2H), 7.44-7.27 (m, 2H), 4.76-4.63 (m, 1H), 4.48-3.50 (m, 4H), 3.25-2.91 (m, 3H), 2.87-2.67 (m, 2H), 1.89-1.41 (m, 9H), 1.11-1.01 (m, 6H).



Same procedure as for **26** was used starting from acetobromo-D-cellobiose (2 g, 2.86 mmol, 1.0 eq.), 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde (478 mg, 2.86 mmol, 1.0 eq.) and Ag_2O (729 mg, 3.15 mmol, 1.1 eq.) to obtain the product as a light yellow solid (1.864 g, 2.37 mmol, 83%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 9.98 (s, 1H), 8.30 (d, J = 2 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.35-5.05 (m, 5H), 4.95 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.64-4.57 (m, 2H), 4.38 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.16-3.98 (m, 3H), 3.94-3.87 (m, 1H), 3.74-3.67 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 189.23, 170.88, 170.54, 170.46, 170.11, 169.71, 169.68, 169.47, 153.68, 141.40, 134.58, 131.65, 127.10, 118.64, 101.22, 98.98, 76.24, 73.60, 73.19, 72.39, 71.93, 70.97, 68.11, 61.91, 21.02, 20.88, 20.86.

HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 808.1874, calc. 808.1912.

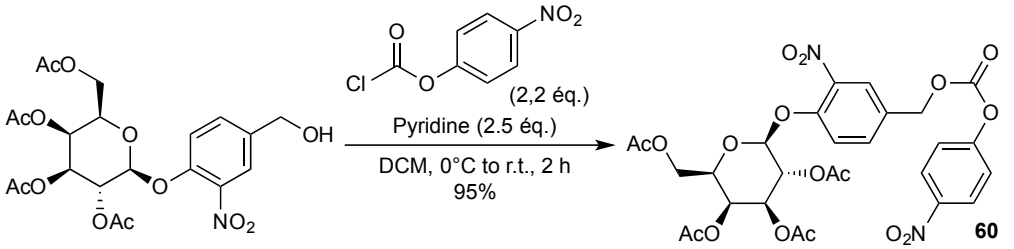


Same procedure as for **26** was used starting from the aldehyde (1.855 g, 2.36 mmol, 1.0 eq.) and $NaBH_4$ (99 mg, 2.60 mmol, 1.1 eq.) to obtain the product as a white powder (1.860 mg, 2.36 mmol, quantitative yield) which was used in the next reaction without further purification.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.82 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.31-5.06 (m, 5H), 4.97 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 6 Hz, 1H), 4.64-4.57 (m, 2H), 4.40 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.15-4.07 (m, 2H), 4.01-3.95 (m, 1H), 3.84-3.78 (m, 1H), 3.74-3.68 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.87 (t, J = 6 Hz, 1H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.48, 170.20, 170.12, 169.79, 169.54, 169.32, 169.11, 148.15, 141.10, 137.49, 131.78, 123.00, 119.23, 100.71, 99.61, 76.01, 73.04, 72.86, 72.23, 71.95, 71.60, 70.85, 67.83, 63.04, 61.63, 61.57, 20.60, 20.54, 20.41.

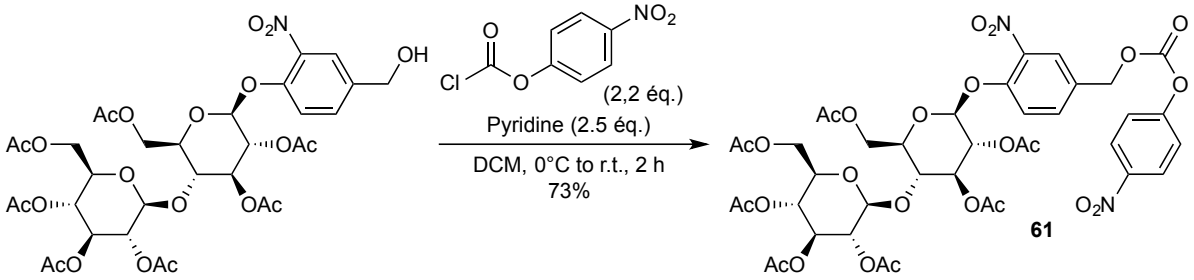
HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 810.2022, calc. 810.2069.



Same procedure as for **27** was used starting from the alcohol (2.427 g, 4.86 mmol, 1.0 eq.), 4-nitrophenyl chloroformate (2.157 g, 10.70 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (978 μL, 12.15 mmol, 2.5 eq.) to obtain **60** as a white powder (3.069 g, 4.62 mmol, 95%)

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.32 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.94 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.44-7.39 (m, 3H), 5.59 (dd, J = 10 Hz, J = 8 Hz, 1H), 5,52 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 5.17-5.14 (m, 2H), 4.30 (dd, J = 11 Hz, J = 7 Hz, 1H), 4.23-4.14 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 687.1263, calc. 687.1286.

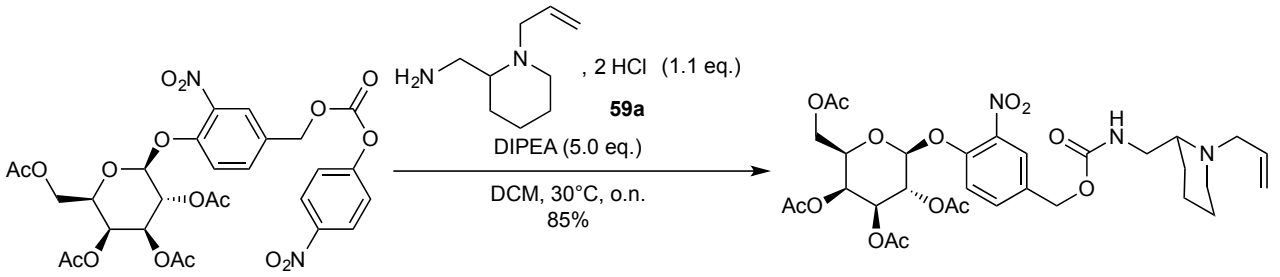


Same procedure as for **27** was used starting from the alcohol (1.860 g, 2.36 mmol, 1.0 eq.), 4-nitrophenyl chloroformate (1.047 g, 5.19 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (475 μL, 5.90 mmol, 2.5 eq.) to obtain **61** as a white powder (1.693 g, 1.72 mmol, 73%)

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.32 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.63 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 9 Hz, 2H), 5.32-5.07 (m, 5H), 4.97 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.67-4.58 (m, 2H), 4.64-4.57 (m, 2H), 4.40 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.15-4.06 (m, 2H), 4.03-3.97 (m, 1H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.74-3.68 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.51, 170.07, 170.05, 169.68, 169.33, 169.28, 169.03, 155.27, 152.18, 149.47, 145.42, 140.92, 133.94, 130.03, 125.35, 125.29, 121.71, 119.05, 100.75, 99.22, 75.98, 73.09, 72.80, 72.09, 71.91, 71.54, 70.70, 68.81, 67.74, 61.56, 61.53, 20.60, 20.55, 20.42.

HRMS (ESI) : $[M+Na]^+$: m/z found 975.2103, calc. 975.2131.

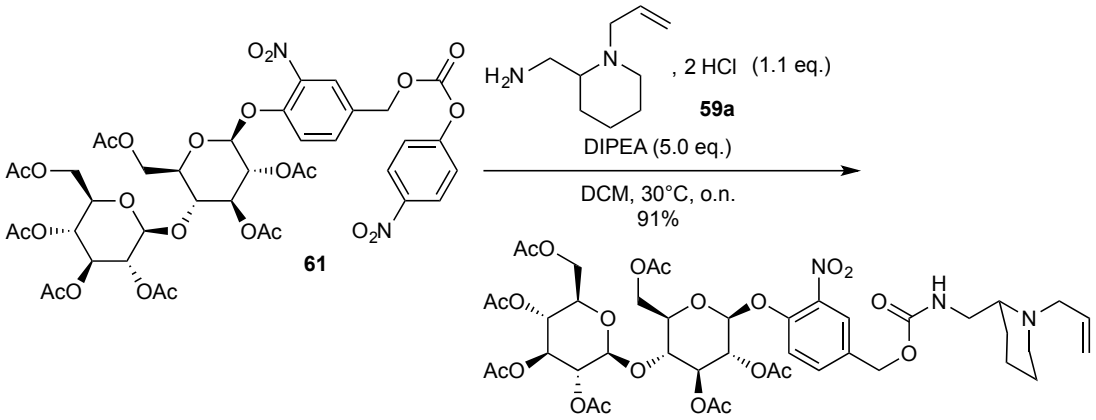


Same procedure as for **56a** was used starting from **60** (1.022 g, 1.54 mmol, 1.0 eq.), **59a** (261 mg, 1.69 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (1.474 mL, 7.70 mmol, 5.0 eq.) to obtain the product as a light yellow solid (887 mg, 1.31 mmol, 85%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.82 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.93-5.75 (m, 1H), 5.56 (dd, J = 10 Hz, J = 8 Hz, 1H), 5,48 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.32 (br s, 1H), 5.22-5.06 (m, 6H), 4.29-4.14 (m, 2H), 4.11-4.06 (m, 1H), 3.43-3.22 (m, 3H), 2.99-2.88 (m, 2H), 2.43-2.36 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.76-1.25 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.31, 170.19, 170.13, 169.40, 156.26, 148.92, 141.30, 134.68, 133.19, 133.14, 124.59, 119.83, 117.75, 100.82, 71.47, 70.57, 67.85, 66.75, 64.74, 61.37, 58.30, 56.36, 51.99, 42.51, 28.97, 25.00, 23.73, 20.70, 20.67, 20.59.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 680.2683, calc. 680.2667.

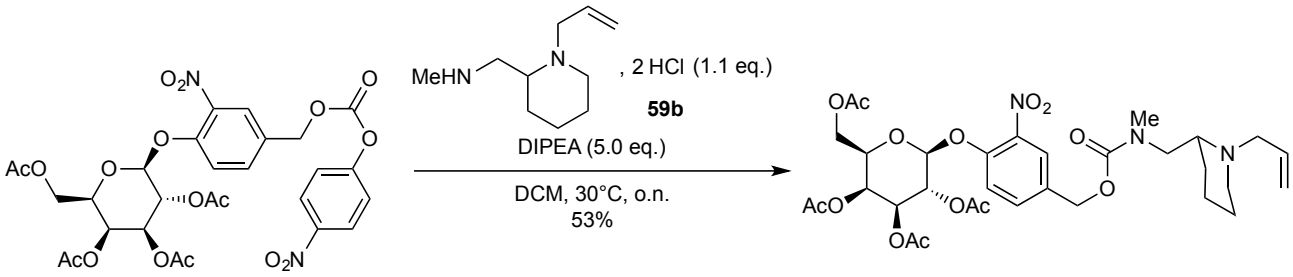


Same procedure as for **56a** was used starting from **61** (1.345 g, 1.41 mmol, 1.0 eq.), **59a** (261 mg, 1.69 mmol, 1.2 eq.) and DIPEA (1.23 mL, 7.06 mmol, 5.0 eq.) to obtain the product as a light yellow solid (1.241 g, 1.28 mmol, 91%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.82 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.94-5.80 (m, 1H), 5.44-5.06 (m, 9H), 4.96 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.64-4.56 (m, 2H), 4.40 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.15-4.06 (m, 2H), 4.01-3.95 (m, 1H), 3.84-3.78 (m, 1H), 3.73-3.67 (m, 1H), 3.44-3.24 (m, 3H), 3.05-2.91 (m, 2H), 2.42 (br s, 1H), 2.22 (t, J = 11 Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.77-1.26 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.49, 170.18, 170.12, 169.72, 169.47, 169.29, 169.02, 156.20, 148.73, 141.14, 134.66, 133.19, 132.93, 124.56, 119.18, 117.69, 100.80, 99.37, 75.94, 73.01, 72.86, 72.18, 72.06, 71.59, 70.84, 67.74, 64.64, 61.51, 61.48, 58.28, 56.31, 51.93, 42.47, 28.93, 24.94, 23.67, 20.69, 20.64, 20.54, 20.52.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 968.3545, calc. 968.3512.

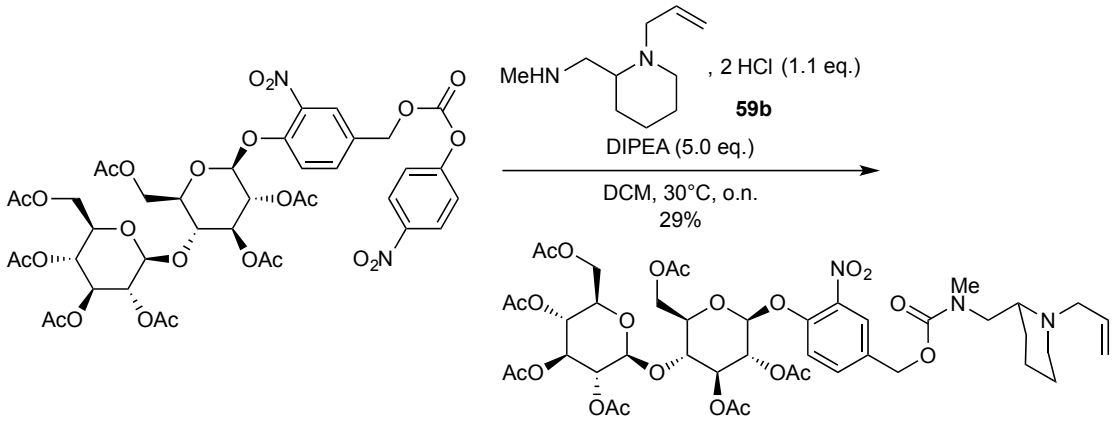


Same procedure as for **56a** was used starting from **60** (150 mg, 0.23 mmol, 1.0 equiv.), **59b** (100 mg, 0.42 mmol, 1.8 equiv.) and DIPEA (300 μL, 1.72 mmol, 7.6 equiv.) to obtain the product as a light yellow solid (84 mg, 0.12 mmol, 53%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.75 (s, 1H), 7.48 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.90-5.72 (m, 1H), 5.50 (dd, J = 10 Hz, J = 8 Hz, 1H), 5,42 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.14 (d, J = 6 Hz, 1H), 5.12-4.99 (m, 6H), 4.25-4.11 (m, 2H), 4.11-4.01 (m, 1H), 3.58-3.47 (m, 1H), 3.35-3.19 (m, 2H), 3.09-2.96 (m, 1H), 2.88 (d, J = 3 Hz, 3H), 2.81-2.71 (m, 1H), 2.68-2.58 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.70-1.36 (m, 6H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.29, 170.18, 170.11, 169.38, 156.04, 148.92, 141.16, 135.08, 133.27, 133.23, 124.60, 119.66, 117.51, 100.69, 71.41, 70.53, 67.81, 66.74, 65.25, 61.36, 57.46, 57.10, 51.26, 49.88, 35.68, 30.92, 29.67, 28.20, 24.90, 22.60, 20.64.

LRMS (ESI) : m/z (%) = 694.2 (100) $[M+H]^+$

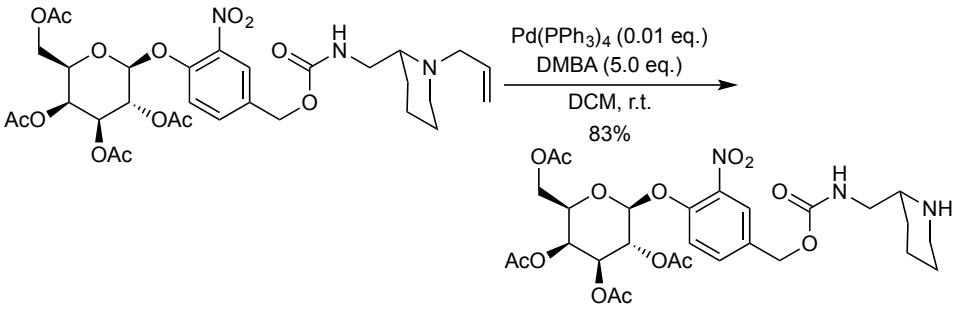


Same procedure as for **56a** was used starting from **61** (200 mg, 0.21 mmol, 1.0 equiv.), **59b** (168 mg, 0.70 mmol, 3.3 equiv.) and DIPEA (100 μL, 0.57 mmol, 2.7 equiv.) to obtain the product as a light yellow solid (59 mg, 0.06 mmol, 29%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.75 (d, J = 3 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.89-5.74 (m, 1H), 5.23-5.02 (m, 9H), 4.90 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.56 (dd, J = 12 Hz, J = 2 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.08-4.01 (m, 2H), 3.94-3.89 (m, 1H), 3.78-3.75 (m, 1H), 3.66 (dq, J = 10 Hz, J = 2 Hz, 1H), 3.56-3.50 (m, 1H), 3.32-3.24 (m, 2H), 3.09-2.98 (m, 1H), 2.88 (d, J = 5 Hz, 3H), 2.82-2.73 (m, 1H), 2.61-2.52 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 6H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.69-1.25 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.57, 170.26, 170.19, 169.80, 169.55, 169.37, 169.10, 156.07, 148.83, 141.14, 135.07, 133.34, 133.04, 124.67, 119.21, 117.61, 100.87, 99.43, 76.00, 73.06, 72.91, 72.21, 72.10, 71.63, 70.85, 67.76, 65.29, 61.55, 61.53, 57.53, 57.14, 51.33, 49.92, 35.74, 28.24, 24.94, 22.64, 20.77, 20.72, 20.62, 20.59.

HRMS (ESI) : $[M+H+Na]^{2+}$: m/z found 502.6781, calc. 502.6778.

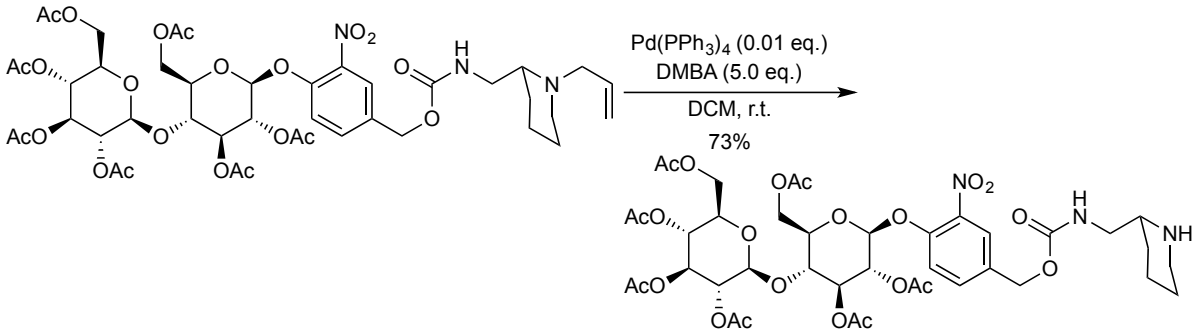


Same procedure as for **56a** was used starting from the allylamine (887 mg, 1.31 mmol, 1.0 eq.), 1,3-dimethylbarbituric acid (1.019 g, 6.53 mmol, 5.0 eq.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (15 mg, 0.0131 mmol, 0.01 eq.) to obtain the product as a light yellow solid (694 mg, 1.09 mmol, 83%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.82 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.56 (dd, J = 10 Hz, J = 8 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.32-5.26 (m, 1H), 5.14-5.06 (m, 4H), 4.30-4.15 (m, 2H), 4.11-4.06 (m, 1H), 3.29-3.20 (m, 1H), 3.11-3.00 (m, 2H), 2.72-2.58 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.87-1.77 (m, 1H), 1.68-1.59 (m, 2H), 1.42-1.34 (m, 2H), 1.31-1.26 (m, 1H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.32, 170.19, 170.14, 169.40, 156.15, 148.92, 141.30, 133.14, 133.10, 124.59, 119.84, 100.82, 71.48, 70.57, 67.85, 66.73, 64.73, 61.36, 56.03, 46.88, 46.68, 30.26, 26.47, 24.26, 20.70, 20.67, 20.59.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 640.2337, calc. 640.2354.

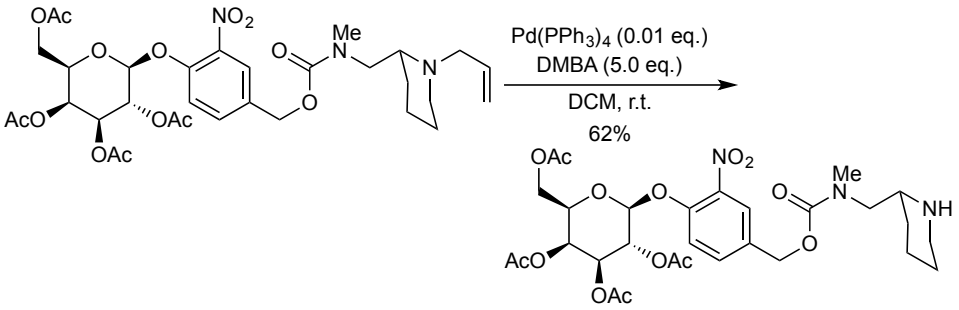


Same procedure as for **56a** was used starting from the allylamine (1.241 g, 1.28 mmol, 1.0 eq.), 1,3-dimethylbarbituric acid (1.001 g, 6.41 mmol, 5.0 eq.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (15 mg, 0.0128 mmol, 0.01 eq.) to obtain the product as a white solid (868 mg, 0.935 mmol, 73%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.79 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9 Hz, J = 2 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.49-5.42 (m, 1H), 5.29-5.04 (m, 7H), 4.95 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.63-4.55 (m, 2H), 4.39 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 4.00-3.93 (m, 1H), 3.84-3.78 (m, 1H), 3.73-3.67 (m, 1H), 3.30-3.21 (m, 1H), 3.12-3.02 (m, 2H), 2.70-2.62 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.85-1.12 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.50, 170.20, 170.12, 169.72, 169.48, 169.30, 169.02, 156.10, 148.74, 141.15, 133.18, 132.84, 124.56, 119.20, 100.82, 99.36, 75.93, 73.02, 72.87, 72.19, 72.08, 71.60, 70.85, 67.75, 64.68, 61.53, 61.47, 56.00, 46.83, 46.63, 30.22, 26.42, 24.22, 20.70, 20.66, 20.55, 20.53.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 928.3230, calc. 928.3199.

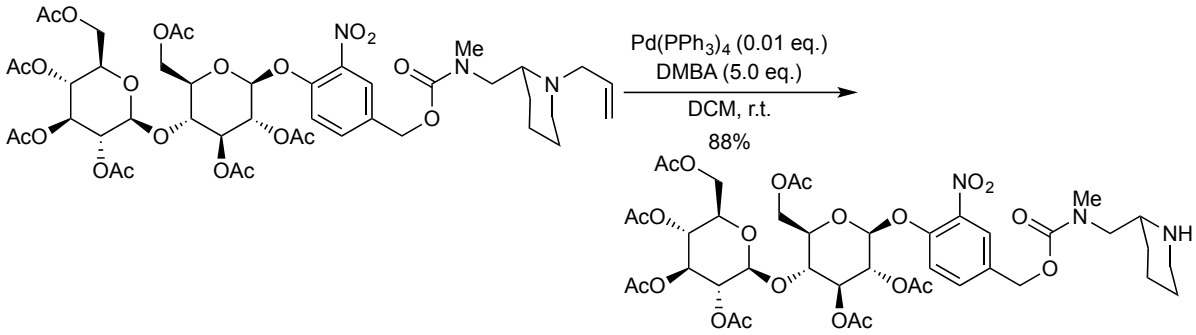


Same procedure as for **56a** was used starting from the allylamine (84 mg, 0.12 mmol, 1.0 eq.), 1,3-dimethylbarbituric acid (95 mg, 0.61 mmol, 5.0 eq.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (1 mg, 0.0012 mmol, 0.01 eq.) to obtain the product as a white solid (49 mg, 0.07 mmol, 62%).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.78 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 9 Hz, 1H), 5.51 (dd, J = 10 Hz, J = 8 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.32-5.26 (m, 1H), 5.13-4.98 (m, 4H), 4.24-4.19 (m, 1H), 4.16-4.10 (m, 1H), 4.08-4.03 (m, 1H), 3.26-3.19 (m, 1H), 3.18-3.12 (m, 1H), 3.06-3.01 (m, 1H), 2.93 (d, J = 7 Hz, 3H), 2.82-2.68 (m, 1H), 2.61-2.51 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.79-1.75 (m, 1H), 1.61-1.50 (m, 2H), 1.42-1.20 (m, 3H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.34, 170.22, 170.16, 169.42, 156.23, 148.93, 141.26, 133.30, 133.20, 124.59, 119.74, 100.77, 71.47, 70.57, 67.86, 66.77, 65.28, 61.39, 55.55, 55.12, 46.80, 36.00, 30.56, 26.30, 24.35, 20.72, 20.70, 20.62.

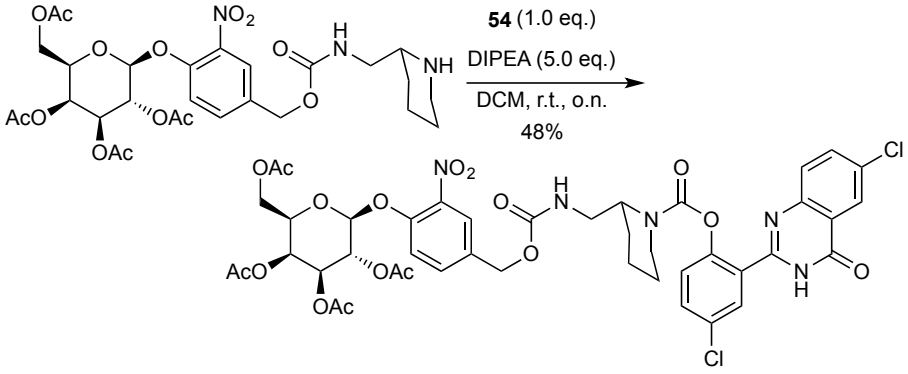
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 654.2484, calc. 654.2504.



Same procedure as for **56a** was used starting from the allylamine (59 mg, 0.060 mmol, 1.0 eq.), 1,3-dimethylbarbituric acid (47 mg, 0.30 mmol, 5.0 eq.) and tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (1 mg, 0.0006 mmol, 0.01 eq.) to obtain the amine as a white solid (50 mg, 0.053 mmol, 88%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.81 (s, 1H), 7.53 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 2 Hz, 1H), 5.30-5.03 (m, 7H), 4.95 (t, J = 9 Hz, 1H), 4.65-4.53 (m, 2H), 4.39 (dd, J = 12 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.16-4.02 (m, 2H), 4.00-3.92 (m, 1H), 3.86-3.76 (m, 1H), 3.74-3.64 (m, 1H), 3.32-3.18 (m, 1H), 3.12-3.02 (m, 2H), 3.01-2.91 (s, 3H), 2.88-2.69 (m, 1H), 2.66-2.52 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.07 (s, 6H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.87-1.23 (m, 6H).

HRMS (ESI) : $[M+H+Na]^{2+}$: m/z found 482.6640, calc. 482.6621.

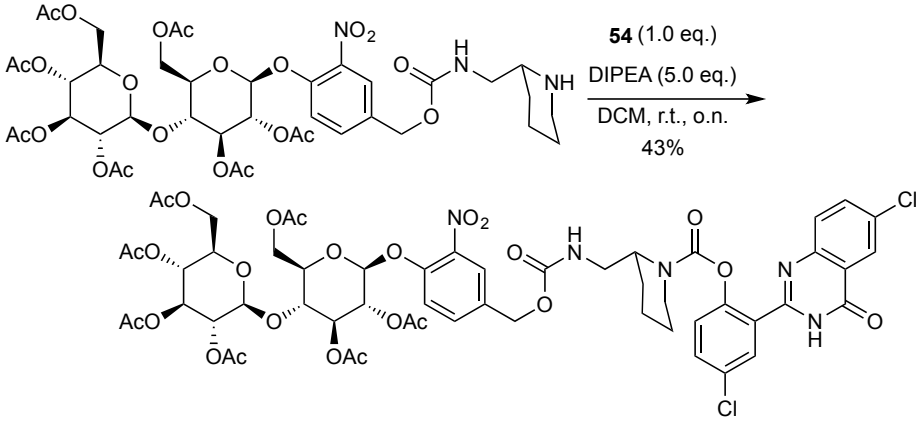


Same procedure as for **57a** was used starting from amine (694 mg, 1.09 mmol, 1.0 eq.), **54** (333 mg, 1.09 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (945 μL, 5.42 mmol, 5.0 eq.) to yield the product as a white powder (520 mg, 0.52 mmol, 48%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 10.41-10.29 (m, 1H), 8.24 (br s, 1H), 8.16-8.05 (m, 1H), 7.85-7.63 (m, 2.5H), 7.57-7.46 (m, 2H), 7.45-7.37 (m, 0.5H), 7.25-7.08 (m, 2H), 6.23-6.10 (m, 0.5H), 5.83-5.75 (m, 0.5H), 5.57 (dd, J = 10 Hz, J = 8 Hz, 1H), 5.49 (d, J = 3 Hz, 1H), 5.17-4.96 (m, 2H), 4.94-4.69 (m, 1H), 4.58 (br ss, 1H), 4.33-3.99 (m, 4H), 3.79-3.63 (m, 1H), 3.39-3.01 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.82-1.24 (m, 6H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.36, 170.20, 170.14, 169.39, 161.09, 156.42, 152.66, 149.05, 147.37, 140.98, 139.32, 135.29, 133.30, 132.64, 132.37, 130.70, 129.72, 127.87, 125.88, 125.39, 125.04, 124.39, 124.03, 122.30, 119.77, 114.09, 100.76, 71.43, 70.62, 67.84, 66.73, 64.44, 61.31, 40.84, 29.72, 29.40, 25.38, 22.72, 20.69, 20.60, 18.89.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 972.2077, calc. 972.2109.



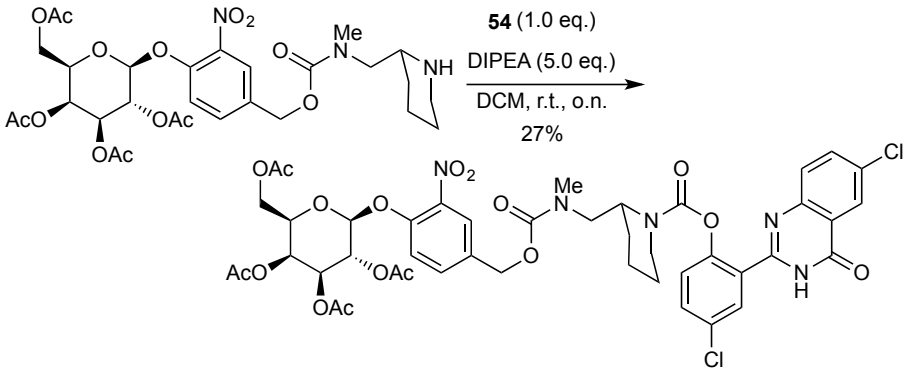
Same procedure as for **57a** was used starting from amine (49 mg, 0.053 mmol, 1.0 eq.), **54** (17 mg, 0.053 mmol, 1.0 eq.) and DIPEA (50 μL, 0.26 mmol, 5.0 eq.) to yield the product as a light yellow oil (29 mg, 0.023 mmol, 43%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 10.52 (br s, 1H), 8.21 (br s, 1H), 8.10-7.97 (m, 1H), 7.76-7.64 (m, 2.5H), 7.56 (m, 0.5H), 7.50-7.43 (m, 2H), 7.18-7.09 (m, 2H), 6.17-6.07 (m, 0.5H), 5.76 (br s, 0.5H), 5.30-5.04 (m, 5H), 4.95 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.91-4.72 (m, 2H), 4.63-4.48 (m, 3H), 4.40 (dd, J = 13 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.19-4.04 (m, 3H), 4.00-3.93 (m, 1H), 3.83-3.57 (m, 3H), 3.37-3.18 (m, 1.5H), 3.11-2.98 (m, 0.5H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.81-1.44 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.52, 170.21, 170.18, 169.74, 169.50, 169.31, 169.04, 161.13, 156.33, 154.23, 152.63, 149.11, 147.57, 147.34, 140.89, 135.28, 133.22, 132.80, 132.24, 130.59, 129.54, 127.82, 126.91, 125.85, 125.24, 124.84, 124.17, 122.22, 119.11, 100.85, 99.30, 75.97, 72.98, 72.90, 72.24, 72.20, 72.08, 71.61, 70.85, 67.76, 64.47, 61.53, 61.48, 51.46, 40.79, 26.03, 25.27, 20.70, 20.67, 20.54,

18.84.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 1260.2914, calc. 1260.2954.

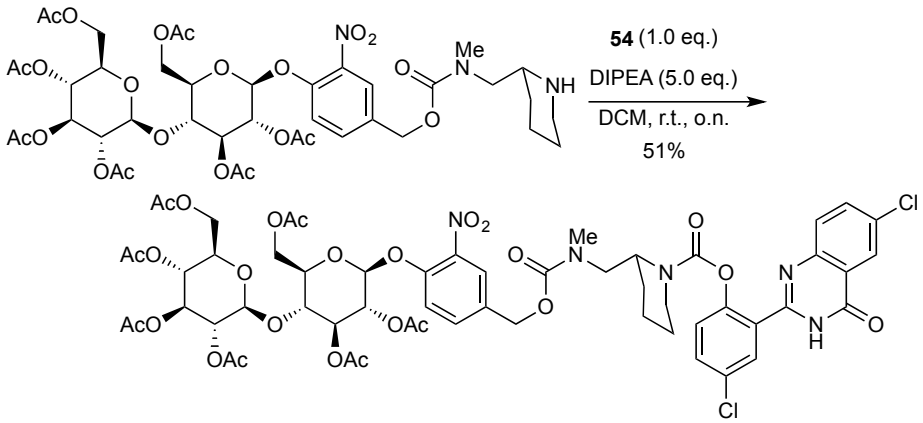


Same procedure as for **57a** was used starting from amine (25 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq.), **54** (12 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq.), and DIPEA (33 μL, 0.19 mmol, 5.0 eq.) to obtain product as a white powder (10 mg, 0.01 mmol, 27%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 10.65-10.32 (m, 1H), 8.27-8.14 (m, 1H), 8.06-7.90 (m, 1H), 7.86-7.67 (m, 3H), 7.57-7.46 (m, 1H), 7.46-7.34 (m, 1H), 7.34-7.21 (m, 1H), 7.11-7.03 (m, 1H), 5.56-5.49 (m, 1H), 5.46 (br s, 1H), 5.13-4.98 (m, 2H), 4.98-4.67 (m, 1H), 4.55 (br s, 1H), 4.31-3.97 (m, 4H), 3.93-3.78 (m, 1H), 3.28-3.03 (m, 2H), 3.01-2.88 (m, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.78-1.23 (m, 6H).

^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.41, 170.30, 170.25, 169.52, 160.53, 156.49, 153.10, 149.15, 147.52, 141.32, 139.29, 135.29, 133.31, 132.92, 132.28, 130.79, 129.79, 127.87, 126.09, 125.49, 125.13, 124.45, 124.38, 122.55, 119.83, 114.28, 100.84, 71.54, 70.67, 67.94, 66.82, 65.99, 61.42, 40.78, 29.83, 29.46, 26.68, 25.40, 20.78, 20.70, 20.54, 19.04.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 986.2219, calc. 986.2260.



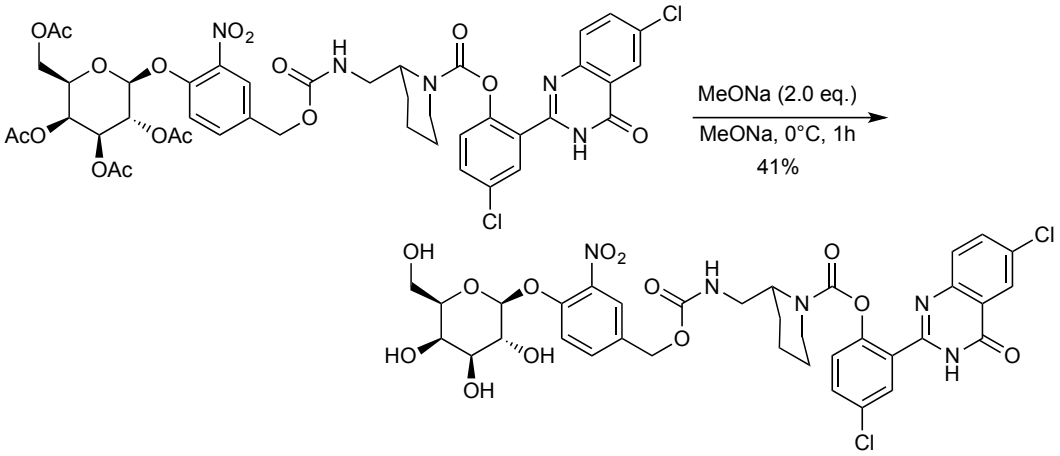
Same procedure as for **57a** was used starting from amine (22 mg, 0.02 mmol, 1.0 eq.), **54** (7 mg, 0.02 mmol, 1.0 eq.), and DIPEA (20 μL, 0.12 mmol, 5.0 eq.) to obtain the product as a white powder (15 mg, 0.01 mmol, 51%).

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 10.45 (br s, 1H), 8.24 (br s, 1H), 8.01-7.93 (m, 1H), 7.81-7.66 (m, 3H), 7.54-7.35 (m, 2H), 7.24-7.01 (m, 2H), 5.27-5.22 (m, 1H), 5.20-5.13 (m, 2H), 5.12-5.02 (m,3H), 4.94 (t, J = 8 Hz, 1H), 4.63-4.53 (m, 3H), 4.37 (dd, J = 12 Hz, J = 4 Hz, 1H), 4.16-4.03 (m, 3H), 4.00-3.92 (m, 1H), 3.83-3.65 (m, 3H), 3.42-3.01 (m, 2H), 2.99-2.92 (m, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.05 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.80-1.45 (m, 6H).

^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 170.66, 170.35, 170.33, 169.87, 169.64, 169.44, 169.16, 160.63, 156.45, 153.82, 153.07, 149.04, 147.76, 147.51, 141.17, 135.28, 133.39, 132.72, 132.24, 130.56, 129.77,

127.86, 126.07, 125.35, 125.10, 124.82, 124.40, 122.51, 119.34, 100.96, 99.44, 76.03, 73.13, 73.00, 72.29, 72.21, 72.04, 71.73, 70.95, 67.87, 65.66, 61.65, 61.57, 49.51, 48.77, 41.11, 26.65, 25.38, 20.83, 20.80, 20.68, 19.02.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 1274.3050, calc. 1274.3105.

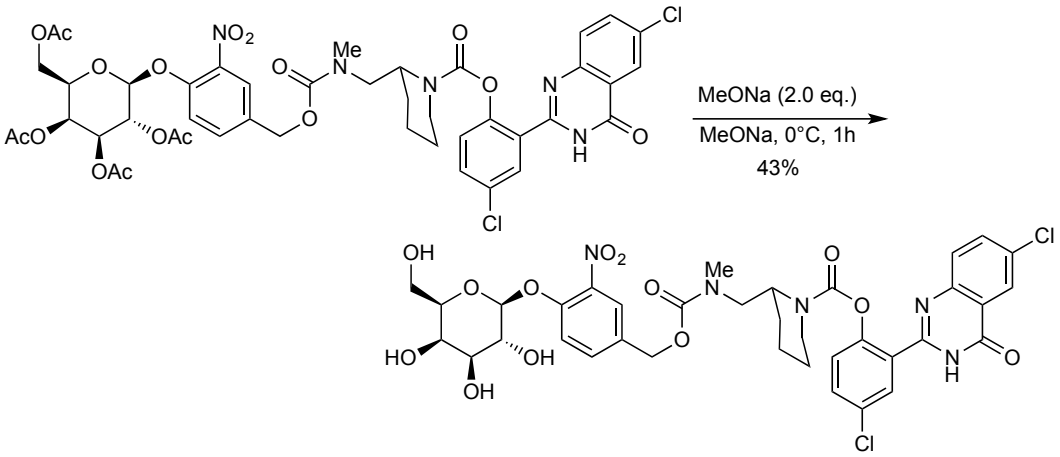


To a solution of protected reagent (520 mg, 0.52 mmol, 1.0 eq.) in dry methanol (20 mL) in an ice-bath was added sodium methoxide (102 mg, 1.872 mmol, 3.5 eq.). The mixture was stirred 1 h at 0°C and quenched using Dowex 50X8-100 resin, then filtered and concentrated *in vacuo*. The product **62a** was obtained as a white resin. High purity was obtained using preparative-reverse phase C18 column (gradient of ACN/H_2O 0/100 to 50/50 v/v) to give **62a** as a white powder (171 mg, 0.21 mmol, 41%).

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 8.07 (m, 1H), 7.73-7.69 (m, 2H), 7.67-7.60 (m, 2H), 7.50-7.31 (m, 2H), 7.31-7.23 (m, 1H), 7.13-7.05 (m, 1H), 5.02-4.93 (m, 1H), 4.93-4.82 (m, 2H), 4.51-4.40 (m, 1H), 4.13-4.03 (m, 1H), 3.83-3.78 (m, 1H), 3.77-3.71 (m, 1H), 3.68-3.58 (m, 3H), 3.53-3.44 (m, 2H), 3.12-3.01 (m, 1H), 2.94-2.83 (m, 1H), 1.59-1.25 (m, 6H).

^{13}C-NMR (125 MHz, CD_3OD) : δ (ppm) = 163.06, 158.56, 154.58, 152.42, 151.11, 149.16, 148.62, 141.78, 136.22, 134.26, 134.07, 132.97, 132.68, 132.09, 131.01, 130.43, 129.97, 126.45, 126.12, 125.42, 125.22, 123.48, 118.91, 103.10, 96.37, 77.36, 74.86, 71.96, 70.10, 65.76, 62.32, 53.19, 52.68, 41.16, 27.00, 26.27, 19.86.

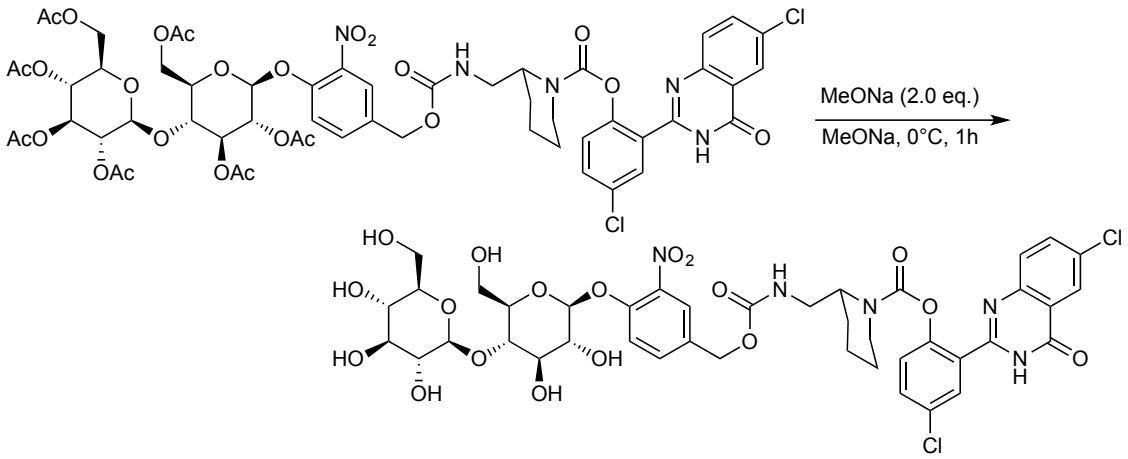
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 804.1671, calc. 804.1687.



To a solution of protected reagent (10 mg, 0.01 mmol, 1.0 eq.) in dry methanol (3 mL) in an ice-bath was added sodium methoxide (2 mg, 0.04 mmol, 3.5 eq.). The mixture was stirred 1 h at 0°C and quenched using Dowex 50X8-100 resin, then filtered and concentrated *in vacuo*. The product **62b** was obtained as a white resin. High purity was obtained using HPLC (isocratic : ACN/H_2O 50/50 v/v) to give **62b** as a white powder (3.57 mg, 0.004 mmol, 43%).

The NMR spectra were too complicated to be attributed.

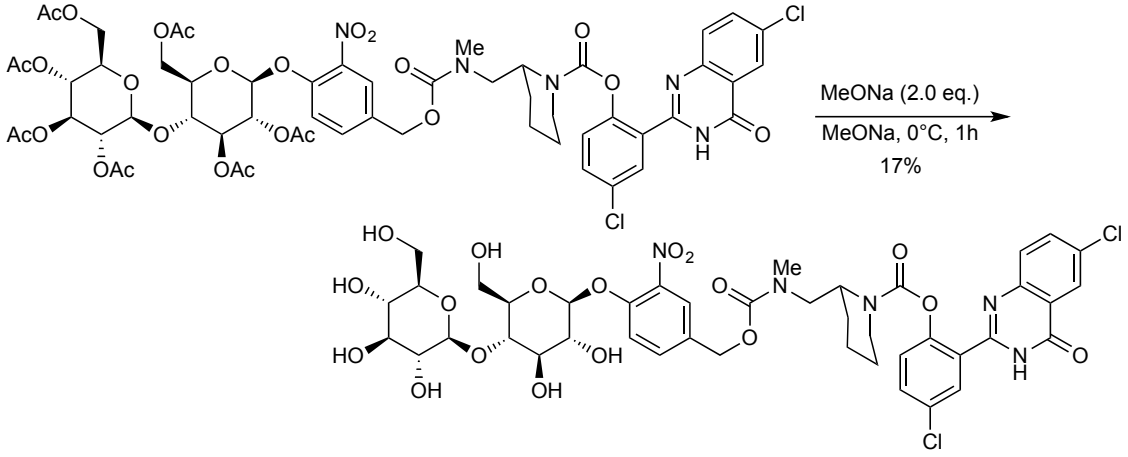
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 818.1838, calc. 818.1838.



Same procedure as for **62a** was used starting from protected reagent (23 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.) and sodium methoxide (1 mg, 0.036 mmol, 2.0 eq.) to obtain **63a** as a white powder.

The NMR spectra were too complicated to be attributed.

HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 966.2201, calc. 966.2215.



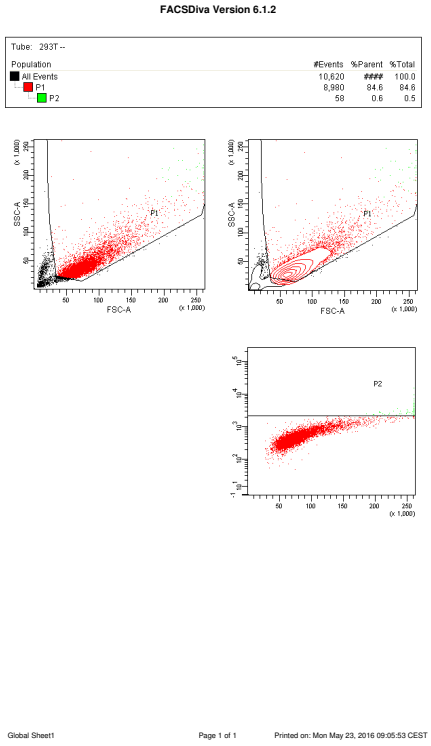
Same procedure as for **62a** was used starting from protected reagent (15 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.) and sodium methoxide (2 mg, 0.04 mmol, 2.0 eq.) to obtain **63b** as a white powder (2 mg, 0.002 mmol, 17%).

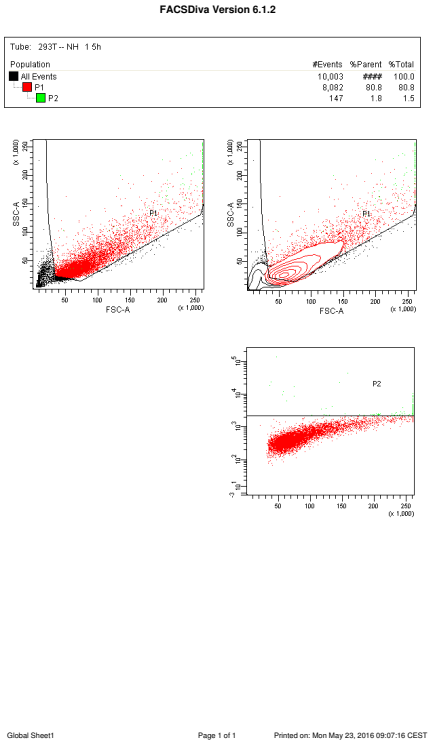
The NMR spectra were too complicated to be attributed.

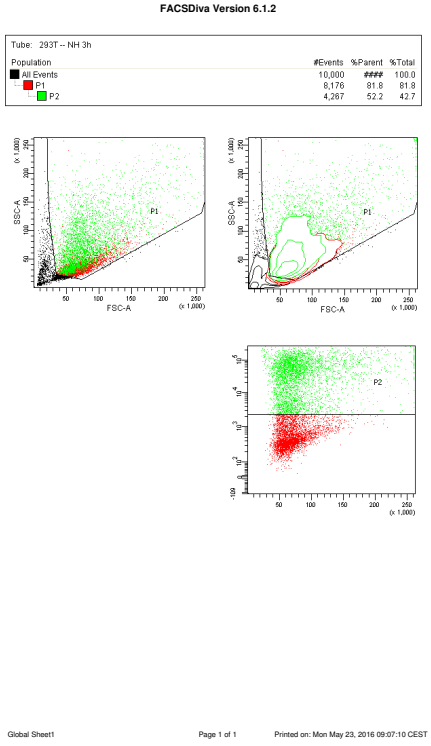
HRMS (ESI) : $[M+H]^+$: m/z found 980.2352, calc. 980.2366.

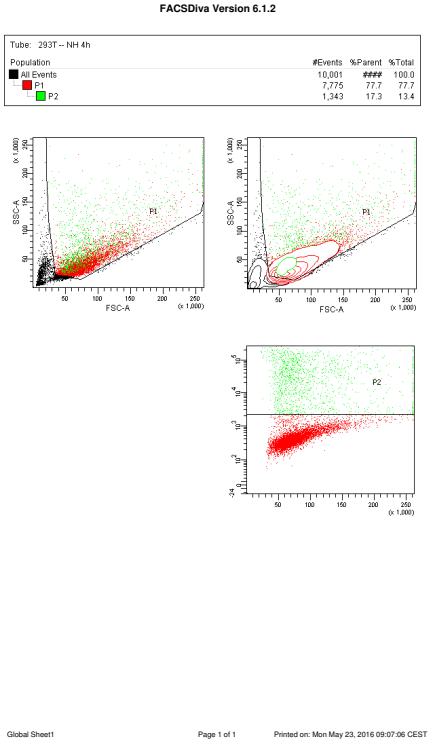
FACS analyses

Dot plots for non-transfected HEK 293 cells after 0, 1.5 (up), 3 and 4h (bottom) :

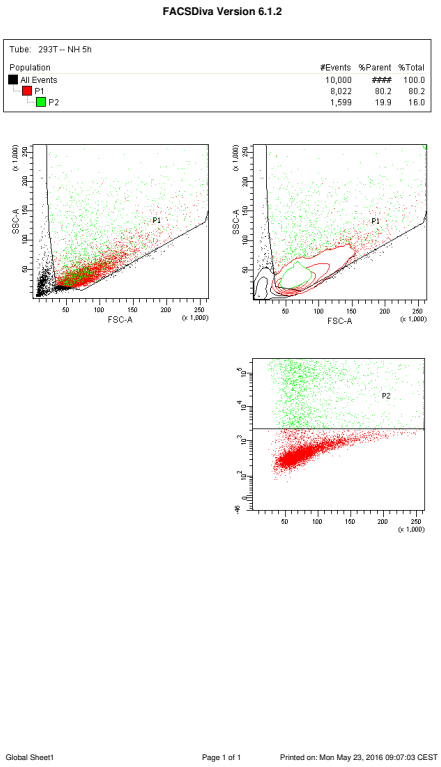


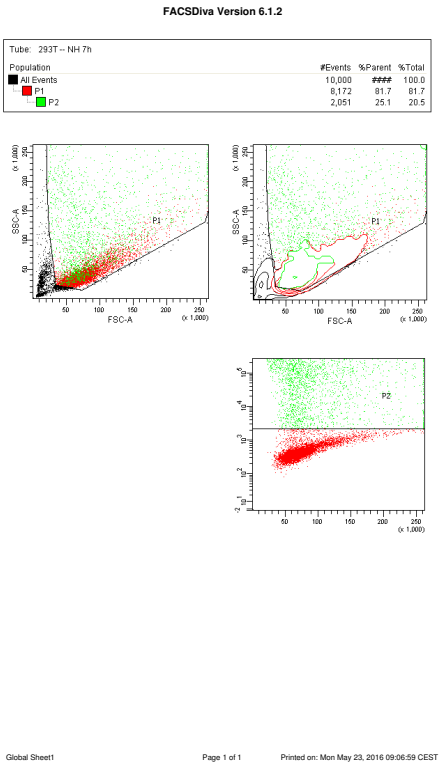


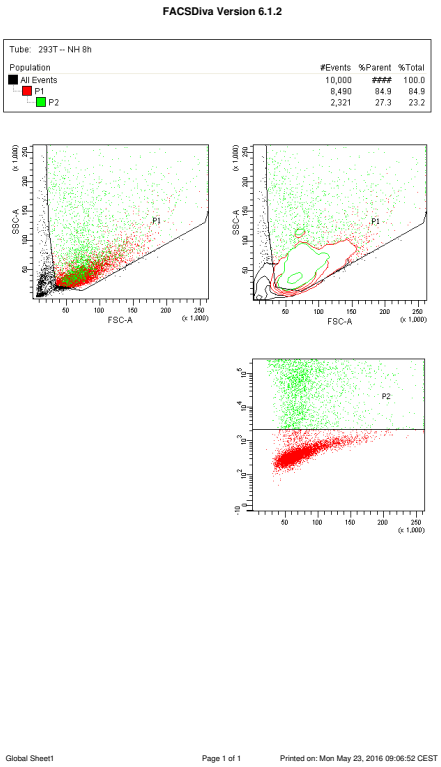


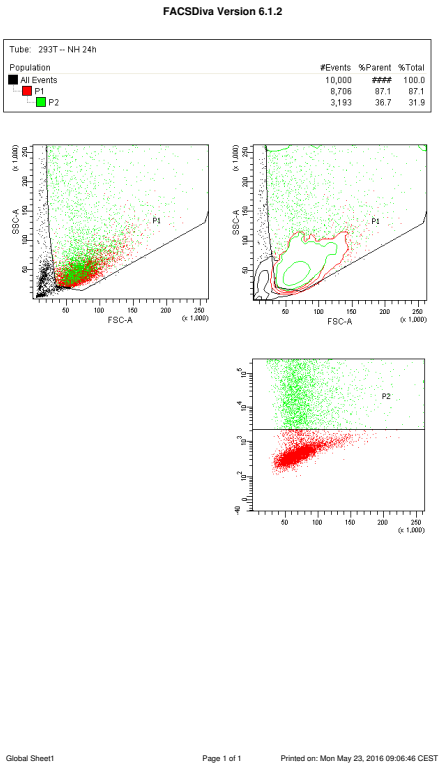


Dot plots for non-transfected HEK 293 cells after 5, 7 (up), 8 and 24h (bottom) :

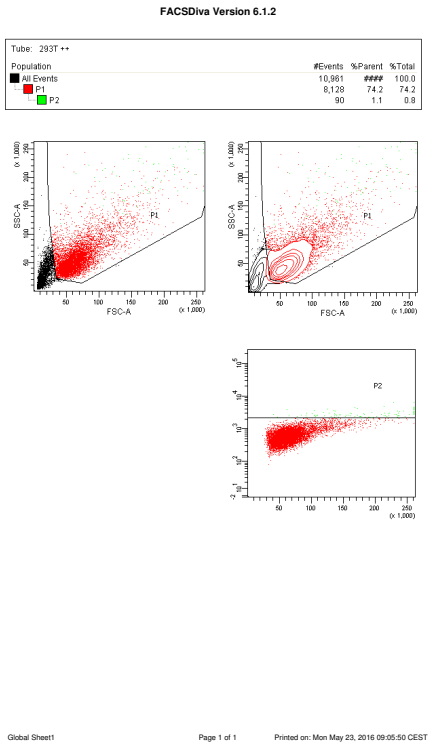


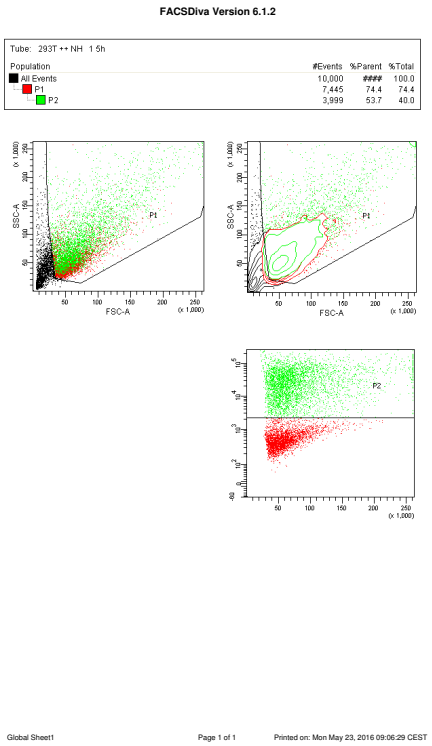


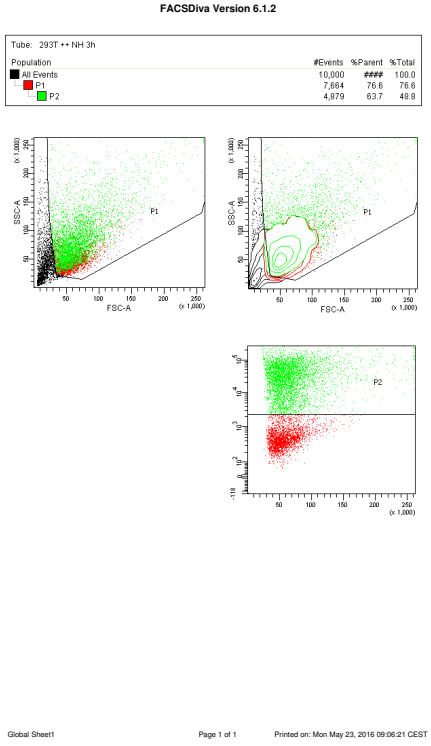


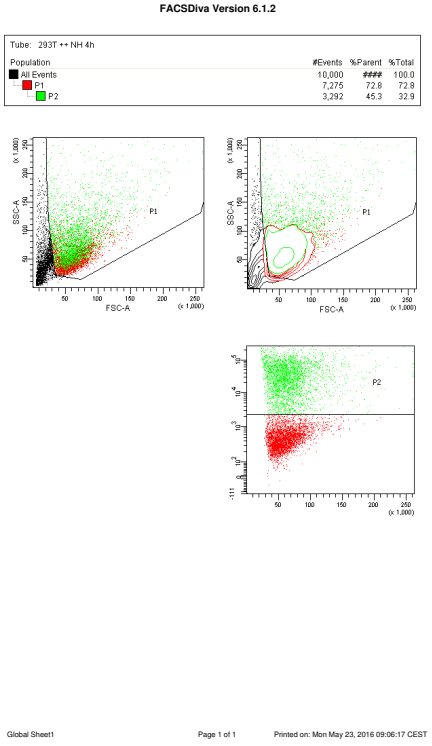


Dot plots for transfected HEK 293 cells after 0, 1.5 (up), 3 and 4h (bottom) :

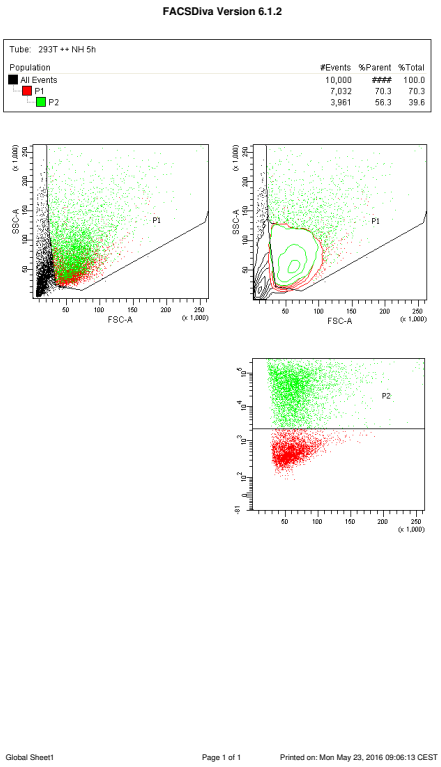


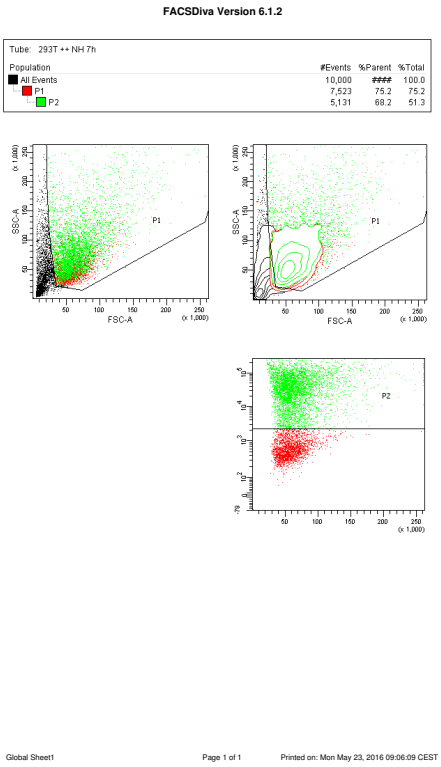


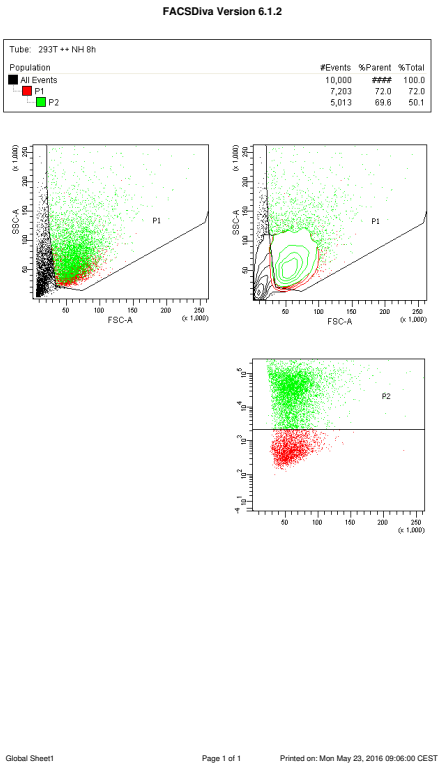


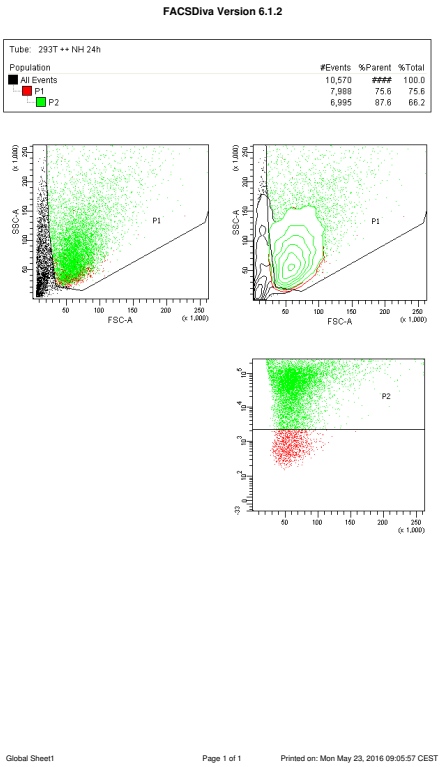


Dot plots for transfected HEK 293 cells after 5, 7 (up), 8 and 24h (bottom) :









Bibliographie

[1]W. Kosack, *Der medizinische Papyrus Edwin Smith*, sous la dir. de C. Brunner (The New York Academy of Medicine, Basel, 2012).

[2]A. C. Celsus, *De medicina* (20).

[3]K. Murphy et C. Weaver, *Janeway's Immunobiology*, 9th (Garland Science, 2016).

[4]W. Röntgen, « Uber eine neue Art von Strahlen », Science **3**, 227–231 (1895).

[5]R. Millis, R. Davis et A. J. Stacey, « The detection and significance of calcifications in the breast : a radiological and pathological study », Br. J. Radiol. **49**, 12–26 (1976).

[6]J.-M. Cosset et R. Huynh, *La fantastique histoire du Radium* (Ouest-France, 2011).

[7]G. N. Hounsfield, « Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system », Br. J. Radiol. **46**, 1016–1022 (1973).

[8]P. C. Lauterbur, « Image Formation by Induced Local Interactions : Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance », Nature **242**, 190–191 (1973).

[9]D. J. Lomas et A. K. Dixon, « Radiology. 100 years and running : the medical imaging revolution », Lancet **346** (1995).

[10]D. D. Stark, « Clinical indications for MRI », Ann. N. Y. Acad. Sci. **649**, 332–334 (1992).

[11]R. Hooke, *Micrographia : or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*, sous la dir. de J. Martyn et J. Allestry (London, 1665).

[12]R. May et L. Grünwald, « Uber Blutfarbungen », Zentralbl. Inn. Med. **23**, 265–270 (1902).

[13]G. Giemsa, « Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. », Cent. für Bakteriol. **37**, 308–311 (1904).

[14]J. H. Wright, « A Rapid Method for the Differential Staining of Blood Films and Malarial Parasites », J. Med. Res. **7**, 138–144 (1902).

[15]J. C. Petithory, F. Ardoin et L. R. Ash, « Rapid and inexpensive method of diluting giemsa stain for diagnosis of malaria and other infestations by blood parasites », J. Clin. Microbiol. **43**, 528 (2005).

[16]*L'imagerie médicale*, Rapport de la Cour des Comptes (2016).

[17]B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts et P. Walter, *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, 2014).

[18]S. Chen et G. Parmigiani, « Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance », J. Clin. Oncol. **25**, 1329–1333 (2007).

[19]J. D. Rowley, « A Story of Swapped Ends », Science **340**, 1412–1413 (2013).

[20]M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein et C. Harris, « P53 mutations in human cancers », Science **253**, 49–53 (1991).

[21]A. Mudher et S. Lovestone, « Alzheimer's disease - Do tauists and baptists finally shake hands ? », Trends Neurosci. **25**, 22–26 (2002).

[22]M. R. Cookson, « alpha-Synuclein and neuronal cell death », Mol. Neurodegener. **4**, 9 (2009).

[23]M. Rudin et R. Weissleder, « Molecular imaging in drug discovery and development. », Nat. Rev. Drug Discov. **2**, 123–131 (2003).

[24]*Visualizing Chemistry : The Progress and Promise of Advanced Chemical Imaging* (The National Academies Press, 2006).

[25]M. Baker, « The whole picture », Nature **463**, 977–980 (2010).

[26]D. Alcantara, M. P. Leal, I. Garcia-Bocanegra et M. L. Garcia-Martin, « Molecular imaging of breast cancer : present and future directions », Front. Chem. **2**, 1–11 (2014).

[27]C. Gondrand et M. Bossennec, *Actions de la protéine virale Tax dans la modulation de la physiologie cellulaire par le virus HTLV-1*, Rapport de travaux pratiques d'infectiologie (Ecole Normale Supérieure de Lyon, 2012).

[28]T. F. Massoud et S. S. Gambhir, « Molecular imaging in living subjects : seeing fundamental biological processes in a new light », Genes Dev., 545–580 (2003).

[29]R. Weissleder, B. D. Ross, A. Rehemtulla et S. S. Gambhir, *Molecular Imaging : principles and practice* (PMPH USA Ltd., 2010).

[30]R. Weissleder, « Molecular Imaging in Cancer », Science **312**, 1168–1171 (2006).

[31]R. Weissleder et M. J. Pittet, « Imaging in the era of molecular oncology », Nature **452**, 580–589 (2008).

[32]J. L. Snoep et H. V. Westerhoff, « From isolation to integration, a systems biology approach for building the Silicon Cell », in *Systems biology* (Springer-Verlag, Berlin, 2005) chap. 13, p. 13–30.

[33]P. K. Kreeger et D. A. Lauffenburger, « Cancer systems biology : a network modeling perspective », Carcinogenesis **31**, 2–8 (2010).

[34]A. J. Gentles et D. Gallahan, « Systems biology : Confronting the complexity of cancer », Cancer Res. **71**, 5961–5964 (2011).

[35]S. A. Ramsey, E. S. Gold et A. Aderem, « A systems biology approach to understanding atherosclerosis », EMBO Mol. Med. **2**, 79–89 (2010).

[36]M. E. Phelps, E. J. Hoffman, N. A. Mullani et M. M. Ter-Pogossian, « Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. », J. Nucl. Med. **16**, 210–224 (1975).

[37]A. Kjaer, « Molecular imaging of cancer using PET and SPECT », Adv. Exp. Med. Biol. **587**, 277–284 (2006).

[38]S. L. Pimlott et A. Sutherland, « Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease », Chem. Soc. Rev. **40**, 149–162 (2011).

[39]L. Farde, C. Halldin, S. Stone-Elander et G. Sedvall, « PET analysis of human dopamine receptor subtypes using 11C-SCH 23390 and 11C-raclopride », Psychopharmacology **92**, 278–284 (1987).

[40]J. E. Cyr, D. A. Pearson, C. A. Nelson, B. A. Lyons, Y. Zheng, J. Bartis, J. He, M. V. Cantorias, R. C. Howell et L. C. Francesconi, « Isolation, Characterization, and Biological Evaluation of Syn and Anti Diastereomers of [99m]Technetium Depreotide : a Somatostatin Receptor Binding Tumor Imaging Agent », J. Med. Chem. **50**, 4295–4303 (2007).

[41]S. Poty, P. Désogère, J. Šimeček, C. Bernhard, V. Goncalves, C. Goze, F. Boschetti, J. Notni, H. J. Wester et F. Denat, « MA-NOTMP : A Triazacyclononane Trimethylphosphinate Based Bifunctional Chelator for Gallium Radiolabelling of Biomolecules », ChemMedChem **10**, 1475–1479 (2015).

[42]A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism* (Oxford University Press, Oxford, 1994).

[43]A. E. Merbach et É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging* (Wiley, Chichester, 2001).

[44]P. A. Bottomley, T. H. Foster, R. E. Argersinger et L. M. Pfeifer, « A review of normal tissue hydrogen NMR relaxation times and relaxation mechanisms from 1-100 MHz : Dependence on tissue type, NMR frequency, temperature, species, excision, and age », Med. Phys. **11**, 425 (1984).

[45]P. Mansfield, *NMR Imaging in Biomedicine* (Academic Press, 1982).

[46]J. N. Maraire et I. A. Awad, « Intracranial cavernous malformations : Lesion behavior and management strategies », Neurosurgery **37**, 591–605 (1995).

[47]J. L. Major et T. J. Meade, « Bioresponsive, Cell-Penetrating, and Multimeric MR Contrast Agents », Acc. Chem. Res. **42**, 893–903 (2009).

[48]B. Drahoš, I. Lukeš et É. Tóth, « Manganese(II) Complexes as Potential Contrast Agents for MRI », Eur. J. Inorg. Chem. **2012**, 1975–1986 (2012).

[49]E. Boros, E. M. Gale et P. Caravan, « MR imaging probes : design and applications », Dalton Trans. **44**, 4804–4818 (2015).

[50]C. F. G. C. Geraldes et S. Laurent, « Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. », Contrast Media Mol. Imaging **4**, 1–23 (2009).

[51]P. C. Lauterbur, M. H. M. Dias et A. M. Rudin, « Augmentation of tissue Water Proton Spin-lattice Relaxation Rates by in vivo Addition of Paramagnetic Ions », in *Electrons to tissues*, t. I (Elsevier, 1978), p. 752–759.

[52]M. R. Prince, « Gadolinium enhanced MR aortography », Radiology **191**, 155–164 (1994).

[53]K. Ward, A. Aletras et R. Balaban, « A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST) », J. Magn. Reson. **143**, 79–87 (2000).

[54]P. C. M. Van Zijl et N. N. Yadav, « Chemical exchange saturation transfer (CEST) : What is in a name and what isn't ? », Magn. Reson. Med. **65**, 927–948 (2011).

[55]S. Zhang, M. Merritt, D. E. Woessner et A. D. Sherry, « PARACEST Agents : Modulating MRI Contrast via Water Proton Exchange », Acc. Chem. Res. **36**, 783–790 (2003).

[56]N. Long et W.-T. Wong, éds., *The Chemistry of Molecular Imaging* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2014).

[57]R. B. Lauffer, D. J. Parmelee, S. U. Dunham, H. S. Ouellet, R. P. Dolan, S. Witte, T. J. McMurry et R. C. Walovitch, « MS-325 : albumin-targeted contrast agent for MR angiography. », Radiology **207**, 529–538 (1998).

[58]P. Caravan, « Protein-Targeted Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents : Design and Mechanism of Action », Acc. Chem. Res. **42**, 851–862 (2009).

[59]S. Zhang, P. Winter, K. Wu et A. D. Sherry, « A Novel Europium(III)-Based MRI Contrast Agent », J. Am. Chem. Soc. **123**, 1517–1518 (2001).

[60]S. J. Dorazio, P. B. Tsitovich, K. E. Siters, J. A. Spernyak et J. R. Morrow, « Iron(II) PARACEST MRI contrast agents. », J. Am. Chem. Soc. **133**, 14154–14156 (2011).

[61]S. J. Dorazio et J. R. Morrow, « The development of iron(II) complexes as ParaCEST MRI contrast agents », Eur. J. Inorg. Chem., 2006–2014 (2012).

[62]P. B. Tsitovich, J. A. Spernyak et J. R. Morrow, « A Redox-Activated MRI Contrast Agent that Switches Between Paramagnetic and Diamagnetic States », Angew. Chem. Int. Ed. **52**, 13997–14000 (2013).

[63]A. O. Olatunde, S. J. Dorazio, J. A. Spernyak et J. R. Morrow, « The NiCEST approach : nickel(II) paraCEST MRI contrast agents. », J. Am. Chem. Soc. **134**, 18503–18505 (2012).

[64]H.-J. Weinmann, W. Ebert, B. Misselwitz et H. Schmitt-Willich, « Tissue-specific MR contrast agents », Eur. J. Radiol. **46**, 33–44 (2003).

[65]E. T. Ahrens, U. Rothbächer, R. E. Jacobs et S. E. Fraser, « A model for MRI contrast enhancement using T1 agents », Proc. Natl. Acad. Sci. **95**, 8443–8448 (1998).

[66]D. A. Sipkins, D. A. Cheresh, M. R. Kazemi, L. M. Nevin, M. D. Bednarski et K. C. Li, « Detection of tumor angiogenesis in vivo by alpha_nu beta_3 -targeted magnetic resonance imaging », Nat. Med. **4**, 623–626 (1998).

[67]P. Winter, S. D. Caruthers, A. Kassner, T. D. Harris, L. K. Chinen, J. S. Allen, E. K. Lacy, H. Zhang, J. D. Robertson, S. A. Wickline et G. M. Lanza, « Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha _nu beta _3 -targeted nanoparticle and 1.5 Tesla magnetic resonance imaging », Cancer Res. **63**, 5838–5843 (2003).

[68]J. Lee, J. E. Burdette, K. W. MacRenaris, D. Mustafi, T. K. Woodruff et T. J. Meade, « Rational design, synthesis, and biological evaluation of progesterone-modified MRI contrast agents. », Chem. Biol. **14**, 824–34 (2007).

[69]B. Gustafsson, S. Youens et A. Y. Louie, « Development of Contrast Agents Targeted to Macrophage Scavenger Receptors for MRI of Vascular Inflammation », Bioconjug. Chem. **17**, 538–547 (2006).

[70]P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry et R. B. Lauffer, « Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents : Structure, Dynamics, and Applications », Chem. Rev. **99**, 2293–2352 (1999).

[71]P. Caravan, C. T. Farrar, L. Frullano et R. Uppal, « Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T 1 contrast agents », Contrast Media Mol. Imaging **4**, 89–100 (2009).

[72]H. Matsushita, S. Mizukami, F. Sugihara, Y. Nakanishi, Y. Yoshioka et K. Kikuchi, « Multifunctional Core-Shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive 19F Magnetic Resonance Imaging », Angew. Chem. Int. Ed. **53**, 1008–1011 (2014).

[73]M. Srinivas, A. Heerschap, E. T. Ahrens, C. G. Figdor et I. J. M. de Vries, « 19F MRI for quantitative in vivo cell tracking », Trends Biotechnol. **28**, 363–370 (2010).

[74]B. Valeur et M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence* (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2012).

[75]J. Boudon, J. Paris, Y. Bernhard, E. Popova, R. A. Decréau et N. Millot, « Magneto-optical nanomaterials : a SPIO-phthalocyanine scaffold built step-by-step towards bimodal imaging », Chem. Commun. **49**, 7394–6 (2013).

[76]V. Placide, A. T. Bui, A. Grichine, A. Duperray, D. Pitrat, C. Andraud et O. Maury, « Two-photon multiplexing bio-imaging using a combination of Eu- and Tb-bioprobes », Dalton Trans. **44**, 4918–4924 (2015).

[77]X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung et S. Nie, « In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots », Nat. Biotechnol. **22**, 969–976 (2004).

[78]A. Buffard, B. Nadal, H. Heuclin, G. Patriarche et B. Dubertret, « ZnS anisotropic nanocrystals using a one-pot low temperature synthesis », New J. Chem. **39**, 90–93 (2015).

[79]L. D. Lavis et R. T. Raines, « Bright Ideas for Chemical Biology », ACS Chem. Biol. **3**, 142–155 (2008).

[80]S. Pascal, A. Haefele, C. Monnereau, A. Charaf-Eddin, D. Jacquemin, B. Le Guennic, C. Andraud et O. Maury, « Expanding the polymethine paradigm : Evidence for the contribution of a bis-dipolar electronic structure », J. Phys. Chem. A **118**, 4038–4047 (2014).

[81]A. Romieu, C. Massif, S. Rihn, G. Ulrich, R. Ziessel et P.-Y. Renard, « The first comparative study of the ability of different hydrophilic groups to water-solubilise fluorescent BODIPY dyes », New J. Chem. **37**, 1016 (2013).

[82]C. Guérin, L. Jean-Gérard, G. Octobre, S. Pascal, O. Maury, G. Pilet, A. Ledoux et B. Andrioletti, « Bis-triazolyl BODIPYs : a simple dye with strong red-light emission », RSC Adv. **5**, 76342–76345 (2015).

[83]H. Kobayashi, M. R. Longmire, M. Ogawa et P. L. Choyke, « Rational chemical design of the next generation of molecular imaging probes based on physics and biology : mixing modalities, colors and signals », Chem. Soc. Rev. **40**, 4626–4648 (2011).

[84]R. Weissleder et V. Ntziachristos, « Shedding light onto live molecular targets », Nat. Med. **9**, 123–128 (2003).

[85]J. V. Frangioni, « In vivo near-infrared fluorescence imaging », Curr. Opin. Chem. Biol. **7**, 626–634 (2003).

[86]Y. Urano, M. Sakabe, N. Kosaka, M. Ogawa, M. Mitsunaga, D. Asanuma, M. Kamiya, M. R. Young, T. Nagano, P. L. Choyke et H. Kobayashi, « Rapid Cancer Detection by Topically Spraying a gamma-Glutamyltranspeptidase-Activated Fluorescent Probe », Sci. Transl. Med. **3**, 110–119 (2011).

[87]N. Harlaar, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. Bart, G. Themelis, G. van Dam et V. Ntziachristos, « Real-time near infrared fluorescence (NIRF) intra-operative imaging in ovarian cancer using an alpha _nu beta _3 -integrin targeted agent », Gynecol. Oncol. **128**, 590–595 (2013).

[88]N. Uedo, H. Iishi, R. Ishihara, K. Higashino et Y. Takeuchi, « Novel Autofluorescence Videoendoscopy Imaging System for Diagnosis of Cancers in the Digestive Tract », Dig. Endosc. **18**, S131–S136 (2006).

[89]Z. Guo, S. Park, J. Yoon et I. Shin, « Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. », Chem. Soc. Rev. **43**, 16–29 (2014).

[90]U Reinhold, E Hennig, S Leiblein, D Niederwieser et M. W. N. Deininger, « FISH for BCR-Abl on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white cells correlates with bone marrow cytogenetics in CML patients treated with imatinib. », Leukemia **17**, 1925–1929 (2003).

[91]C.-H. Tung, Y Lin, W. K. Moon et R. Weissleder, « A receptor-targeted near-infrared fluorescence probe for in vivo tumor imaging », ChemBioChem **3**, 784–786 (2002).

[92]A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science : A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, sous la dir. de W. H. Freeman, 3e éd. (1999).

[93]J. M. Berg, J. L. Tymoczko et L. Stryer, *Biochemistry*, 7e éd. (Palgrave MacMillan, 2011).

[94]C. J. F. Van Noorden, « Imaging Enzymes at Work : Metabolic Mapping by Enzyme Histochemistry », J. Histochem. Cytochem. **58**, 481–497 (2010).

[95]A. Baruch, D. A. Jeffery et M. Bogyo, « Enzyme activity - It's all about image », Trends Cell Biol. **14**, 29–35 (2004).

[96]J. Rollason, G. Pincherle et D. Robinson, « Serum gamma glutamyl transpeptidase in relation to alcohol consumption », Clin. Chim. Acta **39**, 75–80 (1972).

[97]F. H. Schröder, J. Hugosson, M. J. Roobol, T. L. J. Tammela, M. Zappa, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, L. Määttänen, H. Lilja, L. J. Denis, F. Recker, A. Paez, C. H. Bangma, S. Carlsson, D. Puliti, A. Villers, X. Rebillard, M. Hakama, U.-H. Stenman, P. Kujala, K. Taari, G. Aus, A. Huber, T. H. van der Kwast, R. H. N. van Schaik, H. J. de Koning, S. M. Moss et A. Auvinen, « Screening and prostate cancer mortality : results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up », Lancet **384**, 2027–2035 (2014).

[98]P. E. Carson, C. L. Flanagan, C. E. Ickes et A. S. Alving, « Enzymatic Deficiency in Primaquine-Sensitive Erythrocytes », Science **124**, 484–485 (1956).

[99]A. L. Peters et C. J. F. Van Noorden, « Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria : cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. », J. Histochem. Cytochem. **57**, 1003–1011 (2009).

[100]J. H. Kang et J.-K. Chung, « Molecular-Genetic Imaging Based on Reporter Gene Expression », J. Nucl. Med. **49**, 164S–179S (2008).

[101]A. S. Harney et T. J. Meade, « Molecular imaging of in vivo gene expression. », Future Med. Chem. **2**, 503–519 (2010).

[102]K. D. Bagshawe, « Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer », Expert Rev. Anticancer Ther. **6**, 1421–1431 (2006).

[103]Z. Karjoo, X. Chen et A. Hatefi, « Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy », Adv. Drug Deliv. Rev. **99**, 113–128 (2016).

[104]P. Mina-Osorio, « The moonlighting enzyme CD13 : old and new functions to target », Trends Mol. Med. **14**, 361–371 (2008).

[105]R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain, J. Lahdenranta, M. Sakamoto, A. Stryhn, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro, W. Arap et E. Ruoslahti, « Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. », Cancer Res. **60**, 722–727 (2000).

[106]R. E. Wang, Y. Niu, H. Wu, M. N. Amin et J. Cai, « Development of NGR peptide-based agents for tumor imaging. », Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging **1**, 36–46 (2011).

[107]R. E. Wang, Y. Niu, H. Wu, Y. Hu et J. Cai, « Development of NGR-Based Anti-Cancer Agents for Targeted Therapeutics and Imaging », Anticancer Agents Med. Chem. **12**, 76–86 (2012).

[108]E. L. Que et C. J. Chang, « Responsive magnetic resonance imaging contrast agents as chemical sensors for metals in biology and medicine. », Chem. Soc. Rev. **39**, 51–60 (2010).

[109]A. K. Srivastava, D. K. Kadayakkara, A. Bar-Shir, A. A. Gilad, M. T. McMahon et J. W. M. Bulte, « Advances in using MRI probes and sensors for in vivo cell tracking as applied to regenerative medicine », Dis. Model. Mech. **8**, 323–336 (2015).

[110]G. Grynkiewicz, M. Poenie et R. Y. Tsien, « A new generation of Ca(2+) indicators with greatly improved fluorescence properties », J. Biol. Chem. **260**, 3440–3450 (1985).

[111]J. Yu, A. F. Martins, C. Preihs, V. Clavijo Jordan, S. Chirayil, P. Zhao, Y. Wu, K. Nasr, G. E. Kiefer et a. D. Sherry, « Amplifying the Sensitivity of Zinc(II) Responsive MRI Contrast Agents by Altering Water Exchange Rates », J. Am. Chem. Soc. **137**, 14173–14179 (2015).

[112]M. Ipuy, C. Billon, G. Micouin, J. Samarut, C. Andraud et Y. Bretonnière, « Fluorescent push-pull pH-responsive probes for ratiometric detection of intracellular pH », Org. Biomol. Chem. **12**, 3641–3648 (2014).

[113]A. Nadler et C. Schultz, « The Power of Fluorogenic Probes », Angew. Chem. Int. Ed. **52**, 2408–2410 (2013).

[114]J. B. Grimm, L. M. Heckman et L. D. Lavis, « The chemistry of small-molecule fluorogenic probes », Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. **113**, 1–34 (2013).

[115]E. Boonacker et C. J. F. Van Noorden, « Enzyme cytochemical techniques for metabolic mapping in living cells, with special reference to proteolysis. », J. Histochem. Cytochem. **49**, 1473–1486 (2001).

[116]J. Hasserodt, J. L. Kolanowski et F. Touti, « Magnetogenesis in Water Induced by a Chemical Analyte », Angew. Chem. Int. Ed. **53**, 60–73 (2014).

[117]P. Gatti-Lafranconi et F. Hollfelder, « Flexibility and Reactivity in Promiscuous Enzymes », ChemBioChem **14**, 285–292 (2013).

[118] *The Molecular Probes Handbook*, ThermoFisher Scientific (2013).

[119]C. E. Housecroft et A. G. Sharpe, *Chimie inorganique*, 1re éd. (De Boeck, 2010).

[120]F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa et A. Warnecke, « Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. », ChemMedChem **3**, 20–53 (2008).

[121]F. Danhier, A. L. Breton et V. Préat, « RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis », Mol. Pharm. **9**, 2961–2973 (2012).

[122]H. Bundgaard, « The double prodrug concept and its applications », Adv. Drug Deliv. Rev. **3**, 39–65 (1989).

[123]P. M. Loadman, M. C. Bibby, J. A. Double, W. M. Al-Shakhaa et R. Duncan, « Pharmacokinetics of PK1 and doxorubicin in experimental colon tumor models with differing responses to PK1 », Clin. Cancer Res. **5**, 3682–3688 (1999).

[124]F. Schmidt et C. Monneret, « In vitro fluorine-19 nuclear magnetic resonance study of the liberation of antitumor nitrogen mustard from prodrugs », J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 **4**, 1302–1308 (2002).

[125]L. W. Dittert et T. Higuchi, « Rates of Hydrolysis of Carbamate and Carbonate Esters in Alkaline Solution », J. Pharm. Sci. **52**, 852–857 (1963).

[126]E. Bakina, Z. Wu, M. Rosenblum et D. Farquhar, « Intensely cytotoxic anthracycline prodrugs : Glucuronides », J. Med. Chem. **40**, 4013–4018 (1997).

[127]F. M. H. de Groot, W. J. Loos, R. Koekkoek, L. W. A. van Berkom, G. F. Busscher, A. E. Seelen, C. Albrecht, P. de Bruijn et H. W. Scheeren, « Elongated Multiple Electronic Cascade and Cyclization Spacer Systems in Activatible Anticancer Prodrugs for Enhanced Drug Release », J. Org. Chem. **66**, 8815–8830 (2001).

[128]G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch et P. A. Trail, « Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates : Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity », Bioconjug. Chem. **13**, 855–869 (2002).

[129]D. Shabat, R. J. Amir, A. Gopin, N. Pessah et M. Shamis, « Chemical Adaptor Systems », Chem. Eur. J. **10**, 2626–2634 (2004).

[130]P. L. Carl, P. K. Chakravarty et J. A. Katzenellenbogen, « A novel connector linkage applicable in prodrug design », J. Med. Chem. **24**, 479–480 (1981).

[131]M. Wakselman, « 1,4- and 1,6-eliminations from hydroxy- and amino-substituted benzyl systems : chemical and biochemical applications », Nouv. J. Chim. **7**, 439–447 (1983).

[132]E. E. Weinert, R. Dondi, S. Colloredo-Melz, K. N. Frankenfield, C. H. Mitchell, M. Freccero et S. E. Rokita, « Substituents on Quinone Methides Strongly Modulate Formation and Stability of Their Nucleophilic Adducts », J. Am. Chem. Soc. **128**, 11940–11947 (2006).

[133]A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, I. Aujard, S. Dubruille, F. Schmidt et L. Jullien, « Light activation for the versatile and accurate kinetic analysis of disassembly of self-immolative spacers », Chem. Eur. J. **19**, 11717–11724 (2013).

[134]A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt et L. Jullien, « Disassembly kinetics of quinone-methide-based self-immolative spacers that contain aromatic nitrogen heterocycles », Chem. Asian J. **9**, 1334–1340 (2014).

[135]J. Alsarraf, E. Péraudeau, P. Poinot, I. Tranoy-Opalinski, J. Clarhaut, B. Renoux et S. Papot, « A dendritic beta-galactosidase-responsive folate-monomethylauristatin E conjugate », Chem. Commun. **51**, 15792–15795 (2015).

[136]F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker et H. W. Scheeren, « Cascade-Release Dendrimers Liberate All End Groups upon a Single Triggering Event in the Dendritic Core », Angew. Chem. Int. Ed. **42**, 4490–4494 (2003).

[137]N. Karton-Lifshin et D. Shabat, « Exponential diagnostic signal amplification via dendritic chain reaction : the dendritic effect of a self-immolative amplifier component », New J. Chem. **36**, 386–393 (2012).

[138]E. Modica, R. Zanaletti, M. Freccero et M. Mella, « Alkylation of Amino Acids and Glutathione in Water by o-Quinone Methide. Reactivity and Selectivity », J. Org. Chem. **66**, 41–52 (2001).

[139]T. Monks et D. Jones, « The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers », Curr. Drug Metab. **3**, 425–438 (2002).

[140]S. Milstien et L. A. Cohen, « Stereopopulation control. I. Rate enhancement in the lactonizations of o-hydroxyhydrocinnamic acids », J. Am. Chem. Soc. **94**, 9158–9165 (1972).

[141]R. B. Greenwald, Y. H. Choe, C. D. Conover, K. Shum, D. Wu et M. Royzen, « Drug Delivery Systems Based on Trimethyl Lock Lactonization : Poly(ethylene glycol) Prodrugs of Amino-Containing Compounds », J. Med. Chem. **43**, 475–487 (2000).

[142]M. E. Jung et G. Piizzi, « gem-Disubstituent Effect : Theoretical Basis and Synthetic Applications », Chem. Rev. **105**, 1735–1766 (2005).

[143]P. Gomes, N. Vale et R. Moreira, « Cyclization-activated Prodrugs », Molecules **12**, 2484–2506 (2007).

[144]F. Touti, « Synthèse et caractérisation d'agents magnétogéniques à base de Fe(II) pour l'IRM moléculaire », Thèse de doctorat (Ecole Normale Supérieure de Lyon, 2013).

[145]M. Prost, « Sondes moléculaires comprenant des espaceurs auto-effondrables multifonctionnels pour la détection d'activités enzymatiques », Thèse de doctorat (Ecole Normale Supérieure de Lyon, 2014).

[146]A. Razgulin, N. Ma et J. Rao, « Strategies for in vivo imaging of enzyme activity : an overview and recent advances », Chem. Soc. Rev. **40**, 4186–4216 (2011).

[147]D. V. Hingorani, B. Yoo, A. S. Bernstein et M. D. Pagel, « Detecting Enzyme Activities with Exogenous MRI Contrast Agents », Chem. Eur. J. **20**, 9840–9850 (2014).

[148]D. V. Hingorani, A. S. Bernstein et M. D. Pagel, « A review of responsive MRI contrast agents : 2005-2014 », Contrast Media Mol. Imaging **10**, 245–265 (2015).

[149]R. B. Lauffer, « Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging : theory and design », Chem. Rev. **87**, 901–927 (1987).

[150]L. M. Manus, R. C. Strauch, A. H. Hung, A. L. Eckermann et T. J. Meade, « Analytical methods for characterizing magnetic resonance probes. », Anal. Chem. **84**, 6278–6287 (2012).

[151]M. Botta, « Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes : Implications for MRI Contrast Agents », Eur. J. Inorg. Chem. **31**, 399–407 (2000).

[152]A. Borel, L. Helm et A. E. Merbach, « Molecular dynamics simulations of MRI-relevant Gd(III) chelates : Direct access to outer-sphere relaxivity », Chem. Eur. J. **7**, 600–610 (2001).

[153]A. D. Sherry et Y. Wu, « The importance of water exchange rates in the design of responsive agents for MRI », Curr. Opin. Chem. Biol. **17**, 167–174 (2013).

[154]C. S. Bonnet et É. Tóth, « Smart Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging », Chimia **70**, 102–108 (2016).

[155]C.-T. Yang et K.-H. Chuang, « Gd(III) chelates for MRI contrast agents : from high relaxivity to "smart", from blood pool to blood-brain barrier permeable », MedChemComm **3**, 552–565 (2012).

[156]E. Terreno, D. D. Castelli et S. Aime, « Encoding the frequency dependence in MRI contrast media : the emerging class of CEST agents », Contrast Media Mol. Imaging **5**, 78–98 (2010).

[157]M. C. Heffern, L. M. Matosziuk et T. J. Meade, « Lanthanide probes for bioresponsive imaging », Chem. Rev. **114**, 4496–4539 (2014).

[158]J. Costa, É. Tóth, L. Helm et A. E. Merbach, « Dinuclear, bishydrated Gd III polyaminocarboxylates with a rigid xylene core display remarkable proton relaxivities », Inorg. Chem. **44**, 4747–4755 (2005).

[159]E. J. Werner, S. Avedano, M. Botta, B. P. Hay, E. G. Moore, S. Aime et K. N. Raymond, « Highly soluble tris-hydroxypyridonate Gd(III) complexes with increased hydration number, fast water exchange, slow electronic relaxation, and high relaxivity », J. Am. Chem. Soc. **129**, 1870–1871 (2007).

[160]R. A. Moats, S. E. Fraser et T. J. Meade, « A "Smart" Magnetic Resonance Imaging Agent That Reports on Specific Enzymatic Activity », Angew. Chem. Int. Ed. **36**, 726–728 (1997).

[161]A. Y. Louie, M. M. Hüber, E. T. Ahrens, U. Rothbächer, R. A. Moats, R. E. Jacobs, S. E. Fraser et T. J. Meade, « In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging », Nat. Biotechnol. **18**, 321–325 (2000).

[162]M. M. Alauddin, A. Y. Louie, A. Shahinian, T. J. Meade et P. S. Conti, « Receptor mediated uptake of a radiolabeled contrast agent sensitive to beta-galactosidase activity », Nucl. Med. Biol. **30**, 261–265 (2003).

[163]L. M. Urbanczyk-Pearson, F. J. Femia, J. Smith, G. Parigi, J. A. Duimstra, A. L. Eckermann, C. Luchinat et T. J. Meade, « Mechanistic Investigation of beta-Galactosidase-Activated MR Contrast Agents », Inorg. Chem. **47**, 56–68 (2008).

[164]J. A. Duimstra, F. J. Femia et T. J. Meade, « A gadolinium chelate for detection of beta-glucuronidase : a self-immolative approach. », J. Am. Chem. Soc. **127**, 12847–12855 (2005).

[165]M. Giardiello, M. P. Lowe et M. Botta, « An esterase-activated magnetic resonance contrast agent », Chem. Commun., 4044–4046 (2007).

[166]A. L. Nivorozhkin, A. F. Kolodziej, P. Caravan, M. T. Greenfield, R. B. Lauffer et T. J. McMurry, « Enzyme-activated Gd(3+) magnetic resonance imaging contrast agents with a prominent receptor-induced magnetization enhancement », Angew. Chem. Int. Ed. **40**, 2903–2906 (2001).

[167]K. Hanaoka, K. Kikuchi, T. Terai, T. Komatsu et T. Nagano, « A Gd(3+)-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Sensitive to beta-Galactosidase Activity Utilizing a Receptor-Induced Magnetization Enhancement (RIME) Phenomenon », Chem. Eur. J. **14**, 987–995 (2008).

[168]F. Arena, J. B. Singh, E. Gianolio, R. Stefanìa et S. Aime, « beta-Gal Gene Expression MRI Reporter in Melanoma Tumor Cells. Design, Synthesis, and in Vitro and in Vivo Testing of a Gd(III) Containing Probe Forming a High Relaxivity, Melanin-Like Structure upon beta-Gal Enzymatic Activation », Bioconjug. Chem. **22**, 2625–2635 (2011).

[169]M. Querol, J. W. Chen, R. Weissleder et A. Bogdanov, « DTPA-bisamide-based MR sensor agents for peroxidase imaging », Org. Lett. **7**, 1719–1722 (2005).

[170]E. Rodríguez, M. Nilges, R. Weissleder et J. W. Chen, « Activatable magnetic resonance imaging agents for myeloperoxidase sensing : mechanism of activation, stability, and toxicity. », J. Am. Chem. Soc. **132**, 168–177 (2010).

[171]J. W. Chen, M. Querol Sans, A. Bogdanov et R. Weissleder, « Imaging of myeloperoxidase in mice by using novel amplifiable paramagnetic substrates. », Radiology **240**, 473–481 (2006).

[172]R. Lebel, B. Jastrzebska, H. Therriault, M. M. Cournoyer, J. O. McIntyre, E. Escher, W. Neugebauer, B. Paquette et M. Lepage, « Novel solubility-switchable MRI agent allows the noninvasive detection of matrix metalloproteinase-2 activity in vivo in a mouse model », Magn. Reson. Med. **60**, 1056–1065 (2008).

[173]B. Yoo et M. D. Pagel, « A PARACEST MRI contrast agent to detect enzyme activity », J. Am. Chem. Soc. **128**, 14032–14033 (2006).

[174]T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B. T. Doan, F. Noury, B. Badet, J. C. Beloeil et É. Tóth, « Detection of enzymatic activity by PARACEST MRI : A general approach to target a large variety of enzymes », Angew. Chem. Int. Ed. **47**, 4370–4372 (2008).

[175]T. Chauvin, S. Torres, R. Rosseto, J. Kotek, B. Badet, P. Durand et É. Tóth, « Lanthanide(III) Complexes That Contain a Self-Immolative Arm : Potential Enzyme Responsive Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging », Chem. Eur. J. **18**, 1408–1418 (2012).

[176]J. He, C. S. Bonnet, S. V. Eliseeva, S. Lacerda, T. Chauvin, P. Retailleau, F. Szeremeta, B. Badet, S. Petoud, É. Tóth et P. Durand, « Prototypes of Lanthanide(III) Agents Responsive to Enzymatic Activities in Three Complementary Imaging Modalities : Visible/Near-Infrared Luminescence, PARACEST-, and T 1-MRI », J. Am. Chem. Soc. **138**, 2913–2916 (2016).

[177]H. Shi, R. T. K. Kwok, J. Liu, B. Xing, B. Z. Tang et B. Liu, « Real-Time Monitoring of Cell Apoptosis and Drug Screening Using Fluorescent Light-Up Probe with Aggregation-Induced Emission Characteristics », J. Am. Chem. Soc. **134**, 17972–17981 (2012).

[178]J. Hasserodt, *Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging, WO 2005/094903 A2*, 2005.

[179]J. Hasserodt, « Magnetogenic probes that respond to chemical stimuli in an off-on mode », New J. Chem. **36**, 1707–1712 (2012).

[180]O. Kahn et C. Jay Martinez, « Spin-Transition Polymers : From Molecular Materials Toward Memory Devices », Science **279**, 44–48 (1998).

[181]M. A. Halcrow, éd., *Spin-Cross-over Materials* (Wiley, Oxford, 2013).

[182]H. Toftlund, « Spin equilibria in iron(II) complexes », Coord. Chem. Rev. **94**, 67–108 (1989).

[183]V. Stavila, M. Allali, L. Canaple, Y. Stortz, C. Franc, P. Maurin, O. Beuf, O. Dufay, J. Samarut, M. Janier et J. Hasserodt, « Significant relaxivity gap between a low-spin and a high-spin iron(II) complex of structural similarity : an attractive off-on system for the potential design of responsive MRI probes », New J. Chem. **32**, 428–435 (2008).

[184]K. Wieghardt, E. Schoeffmann, B. Nuber et J. Weiss, « Syntheses, properties and electrochemistry of transition-metal complexes of the macrocycle 1,4,7-tris(2-pyridylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane. », Inorg. Chem. **25**, 4877–4883 (1986).

[185]L. Christiansen, D. N. Hendrickson, H. Toftlund, S. R. Wilson et C. L. Xie, « Synthesis and structure of metal complexes of triaza macrocycles with three pendant pyridylmethyl arms », Inorg. Chem. **25**, 2813–2818 (1986).

[186]L. Spiccia, G. D. Fallon, M. J. Grannas, P. J. Nichols et E. R. Tiekink, « Synthesis and characterisation of mononuclear and binuclear iron(II) complexes of pentadentate and bis(pentadentate) ligands derived from 1,4,7-triazacyclononane », Inorganica Chim. Acta **279**, 192–199 (1998).

[187]F. Q. Schafer et G. R. Buettner, « Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple », Free Rad. Biol. Med. **30**, 1191–1212 (2001).

[188]A. E. Martell et R. D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solutions* (Plenum Press, New York, 1996).

[189]V. Stavila, Y. Stortz, C. Franc, D. Pitrat, P. Maurin et J. Hasserodt, « Effective Repression of the Fragmentation of a Hexadentate Ligand Bearing an Auto-Immolable Pendant Arm by Iron Coordination », Eur. J. Inorg. Chem., 3943–3947 (2008).

[190]F. Touti, P. Maurin et J. Hasserodt, « Magnetogenesis under Physiological Conditions with Probes that Report on (Bio-)Chemical Stimuli », Angew. Chem. Int. Ed. **52**, 4654–4658 (2013).

[191]A. R. Katritzky, B. Rachwal et S. Rachwal, « Reactions of N-Alkyl-N-phenyl-1H-benzotriazole-1-methanamines with N-Vinylamides and N-Vinylcarbazole. A Convenient Synthesis of 4-(Dialkylamino)tetrahydroquinolines », J. Org. Chem. **60**, 3993–4001 (1995).

[192]D. Coucouvanis, *Inorganic Syntheses* (Wiley, New York, 2002), p. 33.

[193]C. Gondrand, F. Touti, E. Godart, Y. Berezhanskyy, E. Jeanneau, P. Maurin et J. Hasserodt, « Spring-Loaded Iron(II) Complexes as Magnetogenic Probes Reporting on a Chemical Analyte in Water », Eur. J. Inorg. Chem., 1376–1382 (2015).

[194]C. Gondrand, *Synthèse et évaluation biologique de sondes moléculaires bio-activables basées sur le fer(II) pour l'Imagerie par Résonance Magnétique*, Rapport de stage bibliographique de Master 2 (Ecole Normale Supérieure de Lyon, 2012).

[195]K. Matsumoto et H. Rapoport, « Preparation and properties of some acyl-guanidines », J. Org. Chem. **33**, 552–558 (1968).

[196]P. L. Barker, P. L. Gendler et H. Rapoport, « Acylation of dibasic compounds containing amino amidine and aminoguanidine functions », J. Org. Chem. **46**, 2455–2465 (1981).

[197]F. Touti, P. Maurin, L. Canaple, O. Beuf et J. Hasserodt, « Awakening of a ferrous complex's electronic spin in an aqueous solution induced by a chemical stimulus. », Inorg. Chem. **51**, 31–33 (2012).

[198]M. P. Coles, « Application of neutral amidines and guanidines in coordination chemistry », Dalton Trans., 985–1001 (2006).

[199]D. F. Evans, « The determination of the paramagnetic susceptibility of substances in solution by nuclear magnetic resonance », J. Chem. Soc., 2003–2005 (1959).

[200]E. M. Schubert, « Utilizing the Evans method with a superconducting NMR spectrometer in the undergraduate laboratory », J. Chem. Educ. **69**, 62 (1992).

[201]M Valko, H Morris et M. T. Cronin, « Metals, Toxicity and Oxidative Stress », Curr. Med. Chem. **12**, 1161–1208 (2005).

[202]J. L. Pierre et M Fontecave, « Iron and activated oxygen species in biology : The basic chemistry », BioMetals **12**, 195–199 (1999).

[203]W. S. Szulbinski, « Fenton reaction of Iron Chelates Involving Polyazacyclononane. The Ligand Structure Effect », Polish J. Chem. **74**, 109–124 (2000).

[204]Z. Li, X. Li, X. Gao, Y. Zhang, W. Shi et H. Ma, « Nitroreductase Detection and Hypoxic Tumor Cell Imaging by a Designed Sensitive and Selective Fluorescent Probe, 7-[(5-Nitrofuran-2-yl)methoxy]-3H-phenoxazin-3-one », Anal. Chem. **85**, 3926–3932 (2013).

[205]J. D. Chapman, A. P. Reuvers, J. Borsa, A. Petkau et D. R. McCalla, « Nitrofurans as radiosensitizers of hypoxic mammalian cells. », Cancer Res. **32**, 2616–2624 (1972).

[206]J. M. Berry, C. Y. Watson, W. J. D. Whish et M. D. Threadgill, « 5-Nitrofuran-2-ylmethyl group as a potential bioreductively activated pro-drug system », J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1147–1156 (1997).

[207]N. P. Mahmud, S. W. Garrett et M. D. Threadgill, « The 5-nitrofuran-2-ylmethylidene group as a potential bioreductively activated prodrug system for diol-containing drugs », Anticancer Drug Des. **13**, 655–662 (1998).

[208]R. F. Borch, J. Liu, J. P. Schmidt, J. T. Marakovits, C. Joswig, J. J. Gipp et R. T. Mulcahy, « Synthesis and evaluation of nitroheterocyclic phosphoramidates as hypoxia-selective alkylating agents », J. Med. Chem. **43**, 2258–2265 (2000).

[209]M. Prost, L. Canaple, J. Samarut et J. Hasserodt, « Tagging live cells that express specific peptidase activity with solid-state fluorescence », ChemBioChem **15**, 1413–1417 (2014).

[210]J. Hasserodt et M. Prost, *Water-soluble Activatable Molecular Probes, Intermediates for the Synthesis Thereof and Associated Detection Methods, WO 2015/197981*, 2015.

[211]J. Hasserodt, *Fluorogenic Glycosidase Substrate and Associated Detection Method, US 2015/0299762*, 2015.

[212]F. Touti, A. K. Singh, P. Maurin, L. Canaple, O. Beuf, J. Samarut et J. Hasserodt, « An Electroneutral Macrocyclic Iron(II) Complex That Enhances MRI Contrast in Vivo », J. Med. Chem. **54**, 4274–4278 (2011).

[213]E. Danieli, B. Blümich et F. Casanova, « Mobile Nuclear Magnetic Resonance », eMagRes **1**, 849–862 (2012).

[214]S. S. Zalesskiy, E. Danieli, B. Blümich et V. P. Ananikov, « Miniaturization of NMR Systems : Desktop Spectrometers, Microcoil Spectroscopy, and NMR on a Chip for Chemistry, Biochemistry, and Industry », Chem. Rev. **114**, 5641–5694 (2014).

[215]V. Badilita, R. C. Meier, N. Spengler, U. Wallrabe, M. Utz et J. G. Korvink, « Microscale nuclear magnetic resonance : a tool for soft matter research », Soft Matter **8**, 10583 (2012).

[216]R. C. Meier, J. Höfflin, V. Badilita, U. Wallrabe et J. G. Korvink, « Microfluidic integration of wirebonded microcoils for on-chip applications in nuclear magnetic resonance », J. Micromech. Microeng. **24**, 045021 (2014).

[217]N. Spengler, J. Höfflin, A. Moazenzadeh, D. Mager, N. MacKinnon, V. Badilita, U. Wallrabe et J. G. Korvink, « Heteronuclear Micro-Helmholtz Coil Facilitates micrometer-Range Spatial and Sub-Hz Spectral Resolution NMR of nL-Volume Samples on Customisable Microfluidic Chips », PLoS One **11**, e0146384 (2016).

[218]G. A. McLachlan, G. D. Fallon, R. L. Martin, B. Moubaraki, K. S. Murray et L. Spiccia, « Binuclear Nickel Complexes with Single Azide Bridges. », Inorg. Chem. **33**, 4663–4668 (1994).

[219]J. E. Richman et T. J. Atkins, « Nitrogen Analogs of Crown Ethers », J. Am. Chem. Soc. **96**, 2268–2270 (1974).

[220]G. Gros et J. Hasserodt, « Multigram four-step synthesis of 1,4,7-triazacyclononanes with 2Ra/Rb N-functionalization pattern by starting from diethylenetriamine », Eur. J. Org. Chem., 183–187 (2015).

[221]F. Denat, C. Bernhardt, F. Boschetti, P. Désogère et Y. Rousselin, *Synthesis of Imidazo [1,2-a]pyrazin-4-ium Salts for the Synthesis of 1,4,7-triazacyclononane (TACN) and N- and/or C-functionalized Derivatives Thereof, WO 2014/079953*, 2014.

[222]P. Désogère, Y. Rousselin, S. Poty, C. Bernhard, C. Goze, F. Boschetti et F. Denat, « Efficient Synthesis of 1,4,7-Triazacyclononane and 1,4,7-Triazacyclononane-Based Bifunctional Chelators for Bioconjugation », Eur. J. Org. Chem., 7831–7838 (2014).

[223]L. Cotarca et H. Eckert, *Phosgenations - A Handbook* (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2003).

[224]A. El Alaoui, F. Schmidt, C. Monneret et J.-C. Florent, « Protecting Groups for Glucuronic Acid : Application to the Synthesis of New Paclitaxel (Taxol) Derivatives », J. Org. Chem. **71**, 9628–9636 (2006).

[225]B. Renoux, T. Legigan, S. Bensalma, C. Chadéneau, J.-M. Muller et S. Papot, « A new cyclopamine glucuronide prodrug with improved kinetics of drug release. », Org. Biomol. Chem. **9**, 8459–64 (2011).

[226]H. Lepaumier, S. Martin, D. Picq, B. Delfort et P.-L. Carrette, « New Amines for CO2 Capture. III. Effect of Alkyl Chain Length between Amine Functions on Polyamines Degradation », Ind. Eng. Chem. Res. **49**, 4553–4560 (2010).

[227]P. G. M. Wuts, éd., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2014).

[228]H. Kunz et C. Unverzagt, « The Allyloxycarbonyl (Aloc) Moiety - Conversion of an Unsuitable into a Valuable Amino Protecting Group for Peptide Synthesis », Angew. Chem. Int. Ed. **23**, 436–437 (1984).

[229]H. Tsukamoto, T. Suzuki et Y. Kondo, « Facile Removal Strategy for Allyl and Allyloxycarbonyl Protecting Groups Using Solid-Supported Barbituric Acid under Palladium Catalysis », Synlett, 1105–1108 (2003).

[230]R. N. Muller, L. V. Elst, P. A. Rinck, P. Vallet, F. Maton, H. Fischer, A. Roch et Y. Van Haverbeke, « The Importance of Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion (NMRD) Profiles in MRI Contrast Media Development », Invest. Radiol. **23**, S229–S231 (1998).

[231]J. Wang, C. Gondrand, F. Touti et J. Hasserodt, « A pair of highly biotolerated diamagnetic and paramagnetic iron(II) complexes displaying electroneutrality », Dalton Trans. **44**, 15391–15395 (2015).

[232]R. Kimmich, « Field cycling in NMR relaxation spectroscopy : Applications in biological, chemical and polymer physics », Bull. Magn. Reson. **1**, 195–218 (1979).

[233]R. Kimmich et E. Anoardo, « Field-cycling NMR relaxometry », Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **44**, 257–320 (2004).

[234]A. M. Funk, P. H. Fries, P. Harvey, A. M. Kenwright et D. Parker, « Experimental measurement and theoretical assessment of fast lanthanide electronic relaxation in solution with four series of isostructural complexes », J. Phys. Chem. A **117**, 905–917 (2013).

[235]M. Moula Karimdjy, G. Tallec, P. H. Fries, D. Imbert et M. Mazzanti, « Confinement of a tris-aqua Gd(III) complex in silica nanoparticles leads to high stability and high relaxivity and supresses anion binding », Chem. Commun. **51**, 6836–6838 (2015).

[236]I. Bertini, C. Luchinat et G. Parigi, « 1H NMRD Profiles of Paramagnetic Complexes and Metalloproteins », Adv. Inorg. Chem. **57**, 105–172 (2005).

[237]V. Gubala, L. F. Harris, A. J. Ricco, M. X. Tan et D. E. Williams, « Point of care diagnostics : Status and future », Anal. Chem. **84**, 487–515 (2012).

[238]H. Lee, T.-H. Shin, J. Cheon et R. Weissleder, « Recent Developments in Magnetic Diagnostic Systems », Chem. Rev. **115**, 10690–10724 (2015).

[239]H. Shao, C. Min, D. Issadore, M. Liong, T.-J. Yoon, R. Weissleder et H. Lee, « Magnetic Nanoparticles and microNMR for Diagnostic Applications. », Theranostics **2**, 55–65 (2012).

[240]D Issadore, Y. I. Park, H Shao, C Min, K. Lee, M Liong, R Weissleder et H Lee, « Magnetic sensing technology for molecular analyses », Lab Chip **14**, 2385–2397 (2014).

[241]C. M. Castro, A. A. Ghazani, J. Chung, H. Shao, D. Issadore, T.-J. Yoon, R. Weissleder et H. Lee, « Miniaturized nuclear magnetic resonance platform for detection and profiling of circulating tumor cells », Lab Chip **14**, 14–23 (2014).

[242]H. Lee, E. Sun, D. Ham et R. Weissleder, « Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells », Nat. Med. **14**, 869–874 (2008).

[243]H. Lee, T.-J. Yoon, J.-L. Figueiredo, F. K. Swirski et R. Weissleder, « Rapid detection and profiling of cancer cells in fine-needle aspirates. », Proc. Natl. Acad. Sci. **106**, 12459–64 (2009).

[244]D Issadore, C Min, M Liong, J Chung, R Weissleder et H Lee, « Miniature magnetic resonance system for point-of-care diagnostics », Lab Chip **11**, 2282–2287 (2011).

[245]J. B. Haun, C. M. Castro, R. Wang, V. M. Peterson, B. S. Marinelli, H. Lee et R. Weissleder, « Micro-NMR for rapid molecular analysis of human tumor samples. », Sci. Transl. Med. **3**, 71ra16 (2011).

[246]A. A. Ghazani, S. McDermott, M. Pectasides, M. Sebas, M. Mino-Kenudson, H. Lee, R. Weissleder et C. M. Castro, « Comparison of select cancer biomarkers in human circulating and bulk tumor cells using magnetic nanoparticles and a miniaturized micro-NMR system », Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. **9**, 1009–1017 (2013).

[247]H. J. Chung, T. Reiner, G. Budin, C. Min, M. Liong, D. Issadore, H. Lee et R. Weissleder, « Ubiquitous Detection of Gram-Positive Bacteria with Bioorthogonal Magnetofluorescent Nanoparticles », ACS Nano **5**, 8834–8841 (2011).

[248]M. Liong, M. Fernandez-Suarez, D. Issadore, C. Min, C. Tassa, T. Reiner, S. M. Fortune, M. Toner, H. Lee et R. Weissleder, « Specific Pathogen Detection Using Bioorthogonal Chemistry and Diagnostic Magnetic Resonance », Bioconjug. Chem. **22**, 2390–2394 (2011).

[249]G. Budin, H. J. Chung, H. Lee et R. Weissleder, « A Magnetic Gram Stain for Bacterial Detection », Angew. Chem. Int. Ed. **51**, 7752–7755 (2012).

[250]H. J. Chung, C. M. Castro, H. Im, H. Lee et R. Weissleder, « A magneto-DNA nanoparticle system for rapid detection and phenotyping of bacteria », Nat. Nanotechnol. **8**, 369–375 (2013).

[251]L. R. Skewis, T. Lebedeva, V. Papkov, E. C. Thayer, W. Massefski, A. Cuker, C. Nagaswami, R. I. Litvinov, M. A. Kowalska, L. Rauova, M. Poncz, J. W. Weisel, T. J. Lowery et D. B. Cines, « T2 magnetic resonance : A diagnostic platform for studying integrated hemostasis in whole blood - Proof of concept », Clin. Chem. **60**, 1174–1182 (2014).

[252]G. Liang, L. Xiao, H. Chen, Q. Liu, S. Zhang, F. Li et J. Kong, « Label-free, nucleotide-mediated dispersion of magnetic nanoparticles for "non-sandwich type" MRI-based quantification of enzyme », Biosens. Bioelectron. **41**, 78–83 (2013).

[253]T. Ishikawa, *Superbases for Organic Synthesis : Guanidines, Amidines, Phosphazenes and Related Organocatalysts*, sous la dir. de T. Ishikawa (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2009).

[254]P. J. Bailey et S. Pace, « The coordination chemistry of guanidines and guanidinates », Coord. Chem. Rev. **214**, 91–141 (2001).

[255]M. P. Coles, « Application of neutral amidines and guanidines in coordination chemistry », Dalton Trans., 985–1001 (2006).

[256]A. A. Trifonov, « Guanidinate and amidopyridinate rare-earth complexes : Towards highly reactive alkyl and hydrido species », Coord. Chem. Rev. **254**, 1327–1347 (2010).

[257]F. T. Edelmann, « Recent Progress in the Chemistry of Metal Amidinates and Guanidinates. Syntheses, Catalysis and Materials », Adv. Organomet. Chem. **61**, 55–374 (2013).

[258]L. Tjioe, T. Joshi, C. M. Forsyth, B. Moubaraki, K. S. Murray, J. Brugger, B. Graham et L. Spiccia, « Phosphodiester cleavage properties of copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands bearing single alkyl guanidine pendants. », Inorg. Chem. **51**, 939–953 (2012).

[259]L. Tjioe, T. Joshi, J. Brugger, B. Graham et L. Spiccia, « Synthesis, Structure, and DNA Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Featuring Pairs of Guanidine Pendants », Inorg. Chem. **50**, 621–635 (2011).

[260]S. Aoki, K. Iwaida, N. Hanamoto, M. Shiro et E. Kimura, « Guanidine Is a Zn(II)-Binding Ligand at Neutral pH in Aqueous Solution », J. Am. Chem. Soc. **124**, 5256–5257 (2002).

[261]L. Tjioe, A. Meininger, T. Joshi, L. Spiccia et B. Graham, « Efficient plasmid DNA cleavage by copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands featuring xylyl-linked guanidinium groups. », Inorg. Chem. **50**, 4327–4339 (2011).

[262]S. Tahir, A. Badshah et R. A. Hussain, « Guanidines from 'toxic substances' to compounds with multiple biological applications - Detailed outlook on synthetic procedures employed for the synthesis of guanidines », Bioorg. Chem. **59**, 39–79 (2015).

[263]T. Joshi, B. Graham et L. Spiccia, « Macrocyclic Metal Complexes for Metalloenzyme Mimicry and Sensor Development », Acc. Chem. Res. **48**, 2366–2379 (2015).

[264]C. Alonso-Moreno, A. Antiñolo, F. Carrillo-Hermosilla et A. Otero, « Guanidines : from classical approaches to efficient catalytic syntheses », Chem. Soc. Rev. **43**, 3406 (2014).

[265]A. R. Katritzky, B. V. Rogovoy, X. Cai, N. Kirichenko et K. V. Kovalenko, « Efficient synthesis of polysubstituted acylguanidines and guanylureas. », J. Org. Chem. **69**, 309–313 (2004).

[266]W.-X. Zhang, L. Xu et Z. Xi, « Recent development of synthetic preparation methods for guanidines via transition metal catalysis », Chem. Commun. **51**, 254–265 (2015).

[267]M. Baeten et B. U. W. Maes, « Guanidine Synthesis : Use of Amidines as Guanylating Agents », Adv. Synth. Catal. **358**, 826–833 (2016).

[268]M. S. Bernatowicz, Y. Wu et G. R. Matsueda, « Urethane protected derivatives of 1-guanylpyrazole for the mild and efficient preparation of guanidines », Tet. Lett. **34**, 3389–3392 (1993).

[269]X. Sheng, X.-M. Lu, Y.-T. Chen, G.-Y. Lu, J.-J. Zhang, Y. Shao, F. Liu et Q. Xu, « Synthesis, DNA-binding, cleavage, and cytotoxic activity of new 1,7-dioxa-4,10-diazacyclododecane artificial receptors containing bisguanidinoethyl or diaminoethyl double side arms. », Chem. Eur. J. **13**, 9703–9712 (2007).

[270]M. J. Belousoff, L. Tjioe, B. Graham et L. Spiccia, « Synthesis, X-ray crystal structures, and phosphate ester cleavage properties of bis(2-pyridylmethyl)amine copper(II) complexes with guanidinium pendant groups. », Inorg. Chem. **47**, 8641–8651 (2008).

[271]A. Draksharapu, Q. Li, H. Logtenberg, T. A. van den Berg, A. Meetsma, J. S. Killeen, B. L. Feringa, R. Hage, G. Roelfes et W. R. Browne, « Ligand Exchange and Spin State Equilibria of FeII(N4Py) and Related Complexes in Aqueous Media », Inorg. Chem. **51**, 900–913 (2012).

[272]G. D. Fallon, G. A. McLachlan, B. Moubaraki, K. S. Murray, L. O'Brien et L. Spiccia, « Mononuclear chromium(III), manganese(II) and iron(III) complexes of the pentadentate ligand 1,4-bis(2-pyridylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane », J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2765–2770 (1997).

[273]E. B. Getz, M. Xiao, T. Chakrabarty, R. Cooke et P. R. Selvin, « A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry », Anal. Biochem. **273**, 73–80 (1999).

[274]N. Pluym, A. Brennauer, M. Keller, R. Ziemek, N. Pop, G. Bernhardt et A. Buschauer, « Application of the guanidine-acylguanidine bioisosteric approach to argininamide-type NPY Y2 receptor antagonists. », ChemMedChem **6**, 1727–1738 (2011).

[275]C.-H. Lin, T.-C. Chang, A. Das, M.-Y. Fang, H.-C. Hung, K.-C. Hsu, J.-M. Yang, M. von Itzstein, K. K. T. Mong, T.-A. Hsu et C.-C. Lin, « Synthesis of acylguanidine zanamivir derivatives as neuraminidase inhibitors and the evaluation of their bio-activities. », Org. Biomol. Chem. **11**, 3943–3948 (2013).

[276]X. Li, X. Gao, W. Shi et H. Ma, « Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes », Chem. Rev. **114**, 590–659 (2014).

[277]M. Ipuy, *Déplacement de l'émission d'un fluorophore basé sur l'effet ESIPT vers le rouge et l'infrarouge.* Rapport de stage bibliographique de Master 2 (Ecole Normale Supérieure de Lyon, 2011).

[278]Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng et F. Li, « Luminescent chemodosimeters for bioimaging », Chem. Rev. **113**, 192–270 (2013).

[279]A. Heller et D. L. Williams, « Intramolecular proton transfer reactions in excited fluorescent compounds », J. Phys. Chem. **74**, 4473–4480 (1970).

[280]J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo et P. Yang, « Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) : from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials », Phys. Chem. Chem. Phys. **14**, 8803–8817 (2012).

[281]S. Goswami, S. Das, K. Aich, B. Pakhira, S. Panja, S. K. Mukherjee et S. Sarkar, « A chemodosimeter for the ratiometric detection of hydrazine based on return of ESIPT and its application in live-cell imaging », Org. Lett. **15**, 5412–5415 (2013).

[282]Y. Urano, « Novel live imaging techniques of cellular functions and in vivo tumors based on precise design of small molecule-based 'Activatable' fluorescence probes », Curr. Opin. Chem. Biol. **16**, 602–608 (2012).

[283]J. D. Sellars, M. Landrum, A. Congreve, D. P. Dixon, J. a. Mosely, A. Beeby, R. Edwards et P. G. Steel, « Fluorescence quenched quinone methide based activity probes–a cautionary tale. », Org. Biomol. Chem. **8**, 1610–1618 (2010).

[284]S. Serim, U. Haedke et S. H. L. Verhelst, « Activity-Based Probes for the Study of Proteases : Recent Advances and Developments », ChemMedChem **7**, 1146–1159 (2012).

[285]M. Garland, J. Yim et M. Bogyo, « A Bright Future for Precision Medicine : Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application », Cell Chem. Biol. **23**, 122–136 (2016).

[286]T. Komatsu, K. Kikuchi, H. Takakusa, K. Hanaoka, T. Ueno, M. Kamiya, Y. Urano et T. Nagano, « Design and synthesis of an enzyme activity-based labeling molecule with fluorescence spectral change », J. Am. Chem. Soc. **128**, 15946–15947 (2006).

[287]M. Hu, L. Li, H. Wu, Y. Su, P.-y. Yang, M. Uttamchandani, Q.-h. Xu et S. Q. Yao, « Multicolor, One- and Two-Photon Imaging of Enzymatic Activities in Live Cells with Fluorescently Quenched Activity-Based Probes (qABPs) », J. Am. Chem. Soc. **133**, 12009–12020 (2011).

[288]D. C. Thompson, K Perera, E. S. Krol et J. L. Bolton, « o-Methoxy-4-alkylphenols that form quinone methides of intermediate reactivity are the most toxic in rat liver slices », Chem. Res. Toxicol. **8**, 323–7 (1995).

[289]S. E. Rokita, éd., *Quinone Methides* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009).

[290]B Pearson, P. L. Wolf et J Vasquez, « A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize beta-galactosidase in tissues », Lab. invest. **12**, 1249–1259 (1963).

[291]J. P. Horwitz, J. Chua, R. J. Curby, A. J. Tomson, M. A. Da Rooge, B. E. Fisher, J. Mauricio et I. Klundt, « Substrates for Cytochemical Demonstration of Enzyme Activity. I. Some Substituted 3-Indolyl-beta-D-glycopyranosides », J. Med. Chem. **7**, 574–575 (1964).

[292]S. Orenga, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry et D. H. Pincus, « Enzymatic substrates in microbiology », J. Microbiol. Methods **79**, 139–155 (2009).

[293]J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules* (Wiley, London, 1970).

[294]Y. Hong, J. W. Y. Lam et B. Z. Tang, « Aggregation-induced emission : phenomenon, mechanism and applications », Chem. Commun., 4332 (2009).

[295]Y. Hong, J. W. Y. Lam et B. Z. Tang, « Aggregation-induced emission », Chem. Soc. Rev. **40**, 5361 (2011).

[296]D. Ding, K. Li, B. Liu et B. Z. Tang, « Bioprobes based on AIE fluorogens », Acc. Chem. Res. **46**, 2441–2453 (2013).

[297]J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam et B. Z. Tang, « Aggregation-Induced Emission : Together We Shine, United We Soar ! », Chem. Rev. **115**, 11718–11940 (2015).

[298]G. O. W. Lins, L. F. Campo, F. S. Rodembusch et V. Stefani, « Novel ESIPT fluorescent benzazolyl-4-quinolones : Synthesis, spectroscopic characterization and photophysical properties », Dye. Pigment. **84**, 114–120 (2010).

[299]M. A. Satam, R. D. Telore, A. B. Tathe, V. D. Gupta et N. Sekar, « A combined theoretical and experimental investigation on the solvatochromism of ESIPT3-(1,3-benzothiazol-2-yl)-2-hydroxynaphthalene-1-carbaldehyde », Spectrochim. Acta Part A **127**, 16–24 (2014).

[300]J. J. Naleway, C. M. J. Fox, D. Robinhold, E. Terpetschnig, N. A. Olson et R. P. Haugland, « Synthesis and use of new fluorogenic precipitating substrates », Tet. Lett. **35**, 8569–8572 (1994).

[301]Z. Diwu, D. H. Klaubert et R. P. Haugland, « Spectral properties and biological applications of ELF Enzyme substrates that yield fluorescent precipitates at teh enzymatic activity sites », SPIE Conf. Adv. Fluoresc. Sens. Technol. IV, 265–274 (1999).

[302]R. P. Haugland, *Enzymatic analysis using substrates that yield fluorescent precipitates, WO 93/04077*, 1993.

[303]V. B. Paragas, J. A. Kramer, C. Fox, R. P. Haugland et V. L. Singer, « The ELF-97 phosphatase substrate provides a sensitive, photostable method for labelling cytological targets », J. Microsc. **206**, 106–119 (2002).

[304]K. D. Larison, R. BreMiller, K. S. Wells, I. Clements et R. P. Haugland, « Use of a new fluorogenic phosphatase substrate in immunohistochemical applications », J. Histochem. Cytochem. **43**, 77–83 (1995).

[305]Z. Huang, E. Terpetschnig, W. You et R. P. Haugland, « 2-(2'-Phosphoryloxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone derivatives as fluorogenic precipitating substrates of phosphatases », Anal. Biochem. **207**, 32–39 (1992).

[306]Z Huang, W You, R. P. Haugland, V. B. Paragas et N Olson, « A novel fluorogenic substrate for detecting alkaline phosphatase activity in situ. », J. Histochem. Cytochem. **41**, 313–317 (1993).

[307]M. Zhou, R. H. Upson, Z. Diwu et R. P. Haugland, « A fluorogenic substrate for beta-glucuronidase : Applications in fluorometric, polyacrylamide gel and histochemical assays », J. Biochem. Biophys. Methods **33**, 197–205 (1996).

[308]Z. Diwu, Y. Lu, R. H. Upson, M. Zhou, D. H. Klaubert et R. P. Haugland, « Fluorescent molecular probes I. The synthesis and biological properties of an ELF beta-glucuronidase substrate that yields fluorescent precipitates at the enzymatic activity sites », Tetrahedron **53**, 7159–7164 (1997).

[309]J. Aw, Q. Shao, Y. Yang, T. Jiang, C. Ang et B. Xing, « Synthesis and characterization of 2-(2'-hydroxy-5'- chlorophenyl)-6-chloro- 4(3H)-quinazolinone-based fluorogenic probes for cellular imaging of monoamine oxidases », Chem. Asian J. **5**, 1317–1321 (2010).

[310]L. Wick, T. Mayer et U. Spitz, *Non-hydrolytic microbial probes, WO 2010/049450A1*, 2010.

[311]A. Rukavishnikov, K. R. Gee, I. Johnson et S. Corry, « Fluorogenic cephalosporin substrates for beta-lactamase TEM-1 », Anal. Biochem. **419**, 9–16 (2011).

[312]W. G. Telford, W. G. Cox et V. L. Singer, « Detection of endogenous and antibody-conjugated alkaline phosphatase with ELF-97 phosphate in multicolor flow cytometry applications », Cytometry **43**, 117–125 (2001).

[313]F. van Ommen Kloeke, A. M. Baty, C. C. Eastburn, Z Diwu et G. G. Geesey, « Novel method for screening bacterial colonies for phosphatase activity », J. Microbiol. Methods **38**, 25–31 (1999).

[314]C. Kragelund, J. L. Nielsen, T. R. Thomsen et P. H. Nielsen, « Ecophysiology of the filamentous Alphaproteobacterium Meganema perideroedes in activated sludge », FEMS Microbiol. Ecol. **54**, 111–122 (2005).

[315]M. Dignum, H. L. Hoogveld, H. C. P. Matthijs, H. J. Laanbroek et R. Pel, « Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry », FEMS Microbiol. Ecol. **48**, 29–38 (2004).

[316]S. Dyhrman, « Ectoenzymes in Prorocentrum minimum », Harmful Algae **4**, 619–627 (2005).

[317]V. B. Paragas, Y.-Z. Zhang, R. P. Haugland et V. L. Singer, « The ELF-97 Alkaline Phosphatase Substrate Provides a Bright, Photostable, Fluorescent Signal Amplification Method for FISH », J. Histochem. Cytochem. **45**, 345–357 (1997).

[318]W. G. Cox et V. L. Singer, « A High-resolution, Fluorescence-based Method for Localization of Endogenous Alkaline Phosphatase Activity », J. Histochem. Cytochem. **47**, 1443–1455 (1999).

[319]M. Matsui, J. H. Fowler et L. L. Walling, « Leucine aminopeptidases : Diversity in structure and function », Biol. Chem. **387**, 1535–1544 (2006).

[320]N. Strater et W. N. Lipscomb, « Leucyl Aminopeptidase (Animal) », Handb. Proteolytic Enzym. **2**, 1465–1470 (2013).

[321]S. Mizutani, K. Shibata, F. Kikkawa, A. Hattori, M. Tsujimoto, M. Ishii et H. Kobayashi, « Essential role of placental leucine aminopeptidase in gynecologic malignancy », Expert Opin. Ther. Targets **11**, 453–461 (2007).

[322]X.-B. Zhang, M. Waibel et J. Hasserodt, « An autoimmolative spacer allows first-time incorporation of a unique solid-state fluorophore into a detection probe for acyl hydrolases. », Chem. Eur. J. **16**, 792–795 (2010).

[323]O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon et J. Hasserodt, « A robust, high-sensitivity stealth probe for peptidases. », Chem. Commun. **48**, 6253–6255 (2012).

[324]J. Hasserodt et O. Thorn-Seshold, *Fluorogenic peptidase substrate, WO 2013/045854A1*, 2013.

[325]J. A. Richard, Y. Meyer, V. Jolivel, M. Massonneau, R. Dumeunier, D. Vaudry, H. Vaudry, P. Y. Renard et A. Romieu, « Latent fluorophores based on a self-immolative linker strategy and suitable for protease sensing », Bioconjug. Chem. **19**, 1707–1718 (2008).

[326]K. K. Sadhu, E Lindberg et N Winssinger, « In cellulo protein labelling with Ru-conjugate for luminescence imaging and bioorthogonal photocatalysis », Chem. Commun. **51**, 16664–16666 (2015).

[327]E. Lindberg et N. Winssinger, « High Spatial Resolution Imaging of Endogenous Hydrogen Peroxide in Living Cells by Solid-State Fluorescence », ChemBioChem **17**, 1612–1615 (2016).

[328]M. Prost et J. Hasserodt, « "Double gating" - a concept for enzyme-responsive imaging probes aiming at high tissue specificity. », Chem. Commun. **50**, 14896–14899 (2014).

[329]J. O. Osby, M. G. Martin et B. Ganem, « An exceptionally mild deprotection of phthalimides », Tet. Lett. **25**, 2093–2096 (1984).

[330]F. Dasgupta et P. Garegg, « Reductive Dephthalimidation : A Mild and Efficient Method for The N-Phthalimido Deprotection During Oligosaccharide Synthesis », J. Carbohydr. Chem. **7**, 701–707 (1988).

[331]A. Millet, D. Dailler, P. Larini et O. Baudoin, « Ligand-Controlled alpha- and beta-Arylation of Acyclic N-Boc Amines », Angew. Chem. Int. Ed. **53**, 2678–2682 (2014).

[332]A. K. Ghosh, S. Khan, F. Marini, J. A. Nelson et D. Farquhar, « A daunorubicin beta-galactoside prodrug for use in conjunction with gene directed enzyme prodrug therapy », Tet. Lett. **41**, 4871–4874 (2000).

[333]T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel et S. Papot, « The First Generation of beta-Galactosidase-Responsive Prodrugs Designed for the Selective Treatment of Solid Tumors in Prodrug Monotherapy », Angew. Chem. Int. Ed. **51**, 11606–11610 (2012).

[334]E. Bouvier, S. Thirot, F. Schmidt et C. Monneret, « First enzymatically activated Taxotere prodrugs designed for ADEPT and PMT », Bioorg. Med. Chem. **12**, 969–977 (2004).

[335]T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, J.-M. Berjeaud, F. Guilhot et S. Papot, « Synthesis and Antitumor Efficacy of a beta-Glucuronidase-Responsive Albumin-Binding Prodrug of Doxorubicin », J. Med. Chem. **55**, 4516–4520 (2012).

[336]T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, C. Jayle, J. Alsarraf, M. Thomas et S. Papot, « Synthesis and biological evaluations of a monomethylauristatin E glucuronide prodrug for selective cancer chemotherapy », Eur. J. Med. Chem. **67**, 75–80 (2013).

[337]S. Papot, I. Tranoy, F. Tillequin, J.-C. Florent et J.-P. Gesson, « Design of Selectively Activated Anticancer Prodrugs : Elimination and Cyclization Strategies », Curr. Med. Chem. Agents **2**, 155–185 (2002).

[338]G. P. Dimri, X Lee, G Basile, M Acosta, G Scott, C Roskelley, E. E. Medrano, M Linskens, I Rubelj et O Pereira-Smith, « A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. », Proc. Natl. Acad. Sci. **92**, 9363–9367 (1995).

[339]E. Schenborn et D. Groskreutz, « Reporter Gene Vectors and Assays », Mol. Biotechnol. **13**, 29–44 (1999).

[340]M. Azoulay, F. Chalard, J.-P. Gesson, J.-C. Florent et C. Monneret, « 2-Nitro and 4-nitro-quinone-methides are not irreversible inhibitors of bovine beta-glucuronidase », Carbohydr. Res. **332**, 151–156 (2001).

[341]C. Laluce, A. C. G. Schenberg, J. C. M. Gallardo, L. F. C. Coradello et S. R. Pombeiro-Sponchiado, « Advances and Developments in Strategies to Improve Strains of Saccharomyces cerevisiae and Processes to Obtain the Lignocellulosic Ethanol - A Review », Appl. Biochem. Biotechnol. **166**, 1908–1926 (2012).

[342]W. Liu, J. Hong, D. R. Bevan et Y. H. P. Zhang, « Fast identification of thermostable beta-glucosidase mutants on cellobiose by a novel combinatorial selection/screening approach », Biotechnol. Bioeng. **103**, 1087–1094 (2009).

[343]L.-X. Wang, N. V. Pavlova, S.-C. Li, Y.-T. Li et Y. C. Lee, « A fluorometric assay of ceramide glycanase with 4-methylumbelliferyl beta-d-lactoside derivatives », Glycoconj. J. **13**, 359–365 (1996).

[344]L Boitard, D Cottinet, C Kleinschmitt, N Bremond, J Baudry, G Yvert et J Bibette, « Monitoring single-cell bioenergetics via the coarsening of emulsion droplets », Proc. Natl. Acad. Sci. **109**, 7181–7186 (2012).

[345]J. Fitzpatrick, W. Kricka, T. C. James et U. Bond, « Expression of three Trichoderma reesei cellulase genes in Saccharomyces pastorianus for the development of a two-step process of hydrolysis and fermentation of cellulose », J. Appl. Microbiol. **117**, 96–108 (2014).

[346]*CrysAlisPro*, version 1.171.34.49, Agilent Technologies (2011).

[347]R. C. Clark et J. S. Reid, « The analytical calculation of absorption in multifaceted crystals », Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr. **51**, 887–897 (1995).

[348]A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. Moliterni, G. Polidori et R. Spagna, « SIR97 : a new tool for crystal structure determination and refinement », J. Appl. Crystallogr. **32**, 115–119 (1999).

[349]P. W. Betteridge, J. R. Carruthers, R. I. Cooper, K. Prout et D. J. Watkin, « CRYSTALS version 12 : software for guided crystal structure analysis », J. Appl. Crystallogr. **36**, 1487–1487 (2003).

[350]C. Piguet, « Paramagnetic Susceptibility by NMR : The "Solvent Correction"Removed for Large Paramagnetic Molecules », J. Chem. Educ. **74**, 815–816 (1997).

[351]B. J. Sparks, J. G. Ray, D. A. Savin, C. M. Stafford et D. L. Patton, « Synthesis of thiol-clickable and block copolypeptide brushes via nickel-mediated surface initiated polymerization of α-amino acid N-carboxyanhydrides (NCAs) », Chem. Commun. **47**, 6245–6247 (2011).

[352]A. Kraus, P. Ghorai, T. Birnkammer, D. Schnell, S. Elz, R. Seifert, S. Dove, G. Bernhardt et A. Buschauer, « N(G)-acylated aminothiazolylpropylguanidines as potent and selective histamine H(2) receptor agonists. », ChemMedChem **4**, 232–240 (2009).

[353]T. D. Harris, S. P. Robinson, R. R. Cesati et P Yalamanchili, *Hydrazide conjugates as imaging agents, WO 2007/005491A1*, 2007.

Annexes

Publications issues de ces travaux à la date du 01/10/2016

[1] C. Gondrand, F. Touti, E. Godart, Y. Berezhanskyy, E. Jeanneau, P. Maurin, J. Hasserodt, "Spring-Loaded Iron(II) Complexes as Magnetogenic Probes Reporting on a Chemical Analyte in Water", *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 1376-1382.

[2] J. Wang, C. Gondrand, F. Touti, J. Hasserodt, "A pair of highly biotolerated diamagnetic and paramagnetic iron(II) complexes displaying electroneutrality", *Dalton Trans.* **2015**, 15391-15395.

[3] C. Gondrand, M. Prost, J. Hasserodt, "Tandem of Self-Immolative Spacers for Fluorescence Enzyme Labelling", brevet en préparation.

Curriculum Vitæ

Corentin Gondrand

PhD student in Chemical Biology

Born on 07/25/1990 in France
French citizenship
corentin.gondrand@ens-lyon.fr

Education

PhD degree in Chemical Biology (defence on November 10, 2016) 2013-2016
École Normale Superieure de Lyon (ÉNS de Lyon, France) ; Advisor: Prof. Jens Hasserodt

Master degree in Chemistry, with high honors 2010-2013
ÉNS de Lyon (France)

Bachelor degree in Biology, with honors 2011-2012
ÉNS de Lyon (France)

Bachelor degree in Chemistry, with high honors 2009-2010
ÉNS de Lyon (France)

Classes préparatoires PCSI - PC* 2007-2009
Lycée Hoche, Versailles (France)

Baccalauréat Général Scientifique, with honors 2007
Lycée Saint-Jean Hulst, Versailles (France)

Research expertise

Research interests

- *Subjects at the chemistry - biology interface on cancer and auto-immune diseases*
- *Design and synthesis of molecules of biological interest*
- *In vitro, in cellulo and in vivo evaluation of molecules for medical purposes*

Chemistry

Organic and inorganic syntheses, purifications and characterizations including NMR, IR, UV, fluorescence, LCMS, electrochemistry, relaxometry

Biology

Cell biology (transfection, microscopy, immunofluorescence staining, flow cytometry, viability assay, reactive oxygen species assay), molecular biology (cloning, Western blotting), biochemistry (protein production and purification, enzymology studies)

Computing

C, Python, Gnuplot, MySQL, LaTeX, Inkscape, Adobe Creative Suite (Photoshop, Illustrator, Dreamweaver), Office Suite, LibreOffice Suite

Research experience

PhD degree in Chemical Biology 2013-2016
ÉNS de Lyon (France); Advisor: Prof. Jens Hasserodt *3 years*
"*Design and in vivo evaluation of magnetogenic and fluorogenic probes for enzyme labelling*"

Research internship in Chemical Biology 2013
ÉNS de Lyon (France); Advisor: Prof. Jens Hasserodt *5 months*
"*Design of iron(II)-based complexes as magnetogenic probes for in vivo enzyme imaging*"

Research internship in Medicinal Chemistry 2012
University of St-Andrews (United Kingdom); Advisor: Terry Smith, PhD *2 months*
"*Design and evaluation of inhibitors of Trypanosoma brucei's metabolic pathway*"

Research internship in Organic Chemistry 2011
University of California, Los Angeles (United States); Advisor: Prof. Ohyun Kwon *3 months*
"*Optimization of transition metals-catalyzed cross-couplings for the synthesis of nitrodienes*"

Research internship in Organic Chemistry 2010
École Polytechnique, Palaiseau (France); Advisor: Fabien Gagosz, PhD *2 months*
"*Gold(I)-catalyzed intramolecular hydride transfers to alkynes derivatives*"

Teaching experience

Research internship supervision of master students 2013-2016
ÉNS de Lyon (France) *1 student per year*

Teaching assistant in Chemistry and Biology, undergraduate and Master level 2013-2016
ÉNS de Lyon (France) *64h/year*

Tutorials for undergraduate students ("Classes Préparatoires") 2013
Lycée La Martinière Diderot, Lyon (France) *60h*

Peer-reviewed scientific publications

1. C. Gondrand, M. Prost and J. Hasserodt, "Tandem of Self-Immolative Spacers for Fluorescence Enzyme Labelling", *Patent in preparation.*

2. C. Gondrand, F. Touti, E. Godart, Y. Berezhanskyy, E. Jeanneau, P. Maurin and J. Hasserodt, "Spring-Loaded Iron(II) Complexes as Magnetogenic Probes Reporting on a Chemical Analyte in Water", *Eur. J. Inorg. Chem.* **7**, 1376-1382 (2015).

3. J. Wang, C. Gondrand, F. Touti and J. Hasserodt, "A pair of highly biotolerated diamagnetic and paramagnetic iron(II) complexes displaying electroneutrality", *Dalton Trans.* **44**, 15391-15395 (2015).

Awards and prizes

Best flash oral communication Award, *23th Young Researchers Meeting of the SCT*, **2016**.

Best poster presentation Award, *49th International Meeting on Medicinal Chemistry*, **2013**.

Rank 16/144, *French selection for the International Chemistry Olympiads*, **2008**.

Conferences communications

List of Oral communications

1. *Workshop of the Canceropole Grand-Ouest*, **2016**, Bono (France).
2. *GPOL Conference (Research Group on Cyclic and Linear Polyamines)*, **2016**, Klingenthal (France).

List of Flash Oral communications and Poster presentations

1. *23th Young Researchers Meeting of the SCT (Medicinal Chemical Society)*, **2016**, Lille (France).
2. *International Chemical Biology Society Conference*, **2015**, Berlin (Germany).

List of Poster presentations

1. *52th International Meeting on Medicinal Chemistry (invited)*, **2016**, Caen (France).
2. *Medicinal flavor of Metal Complexes: diagnostic and therapeutic applications*, **2015**, Orleans (France).
3. *6th EuCheMS Conference on Nitrogen Ligands*, **2015**, Beaune (France).
4. *ÉNS de Lyon & Goethe-Universität Frankfurt Summer School*, **2015**, Frankfurt (Germany).
5. *22th Young Researchers Meeting of the SCT*, **2015**, Paris (France).
6. *50th International Meeting on Medicinal Chemistry (invited)*, **2014**, Rouen (France).
7. *21th Young Researchers Meeting of the SCT*, **2014**, Montpellier (France).
8. *16th International Conference on BioInorganic Chemistry*, **2013**, Grenoble (France).
9. *49th International Meeting on Medicinal Chemistry*, **2013**, Nice (France).

References

Prof. Jens HASSERODT (PhD advisor), ÉNS de Lyon, jens.hasserodt@ens-lyon.fr

Christophe BUCHER, PhD (Collaborator), ÉNS de Lyon, christophe.bucher@ens-lyon.fr

Gaël YVERT, PhD (Collaborator), ÉNS de Lyon, gael.yvert@ens-lyon.fr

Philippe MAURIN, PhD (Former professor), Consulate of France in Wuhan (China), philippe.maurin@gmail.com