THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de « l'Université de Rouen Normandie »

Synthèse de sondes IRM pour la théranostique

Présentée et soutenue par
Sandra SEMBO-BACKONLY

Thèse soutenue publiquement le 30 juin 2021 devant le jury composé de		
Mme Véronique BONNET	Maître de Conférences, HDR Université Picardie Jules Vernes	Rapportrice
Mr Bernold HASENKNOPF	Professeur Sorbonne Université	Rapporteur
Mr Sébastien PAPOT	Professeur Université de Poitiers	Examinateur
Mr Samuel VALABLE	Directeur de Recherche CNRS Université de Caen Basse-Normandie	Examinateur
Mme Hélène CASTEL	Directrice de Recherche Université de Rouen Normandie	Examinatrice
Mr François ESTOUR	Professeur Université de Rouen Normandie	Codirecteur de thèse
Mme Géraldine GOUHIER	Professeure Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse

Thèse dirigée par Géraldine GOUHIER et François ESTOUR, laboratoire COBRA

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : Professeur Sébastien Papot, Professeur Bernorld Hasenknopf, la Docteure Véronique Bonnet, la Docteure Hélène Castel et le Docteur Samuel Valable, d'avoir accepté de rapporter et d'examiner mon travail de thèse. Que ces personnes sachent qu'elles ont toute ma reconnaissance.

Cette thèse a été effectuée au laboratoire de « Chimie Organique, Bio-organique, Réactivité et Analyse (COBRA), UMR-6014 » au sein de l'équipe « Chimie Bio-Organique » dirigée respectivement par les Professeurs Géraldine Gouhier et François Estour que je voudrais remercier pour m'avoir accueillie au sein de leur institut et de leur équipe.

Soyez assurés tous les deux de ma vive reconnaissance, car vous m'avez permis de réaliser cette thèse à vos côtés.

A la « meilleure » directrice de thèse, Mme Géraldine Gouhier, merci de m'avoir accueillie dans son laboratoire, avoir dirigée cette thèse, pour m'avoir transmis le goût de la recherche, ses conseils, sa bonne humeur, sa patience et son engagement dans ce projet malgrés les difficultés et les péripéties.

Un GRAND merci à Mr. François Estour pours ses conseils avisés, sa patience et son soutien tout au long des difficultés rencontrées lors de cette thèse.

Je tiens à remercier Sébastien Balieu pour ses précieux conseils dans le plan professionnel, pour l'enseignement. Merci pour ton aide, pour ta gentillesse.

La liste des personnes que je souhaite remercier est longue, et réussir à exprimer toute ma gratitude envers ces personnes avec les mots justes me semble aujourd'hui compliqué mais je vais faire de mon mieux.

Un grand merci à mes collègues de palliasse. Tout particulièrement, au Docteure Sophie Mohamed (aïe, excusez nous ☺) pour tous les bons moments passés, pour les discussions fructueuses, pour ta bonne humeur et tous tes bons conseils. Un GRAND merci à mes andiprésseurs, Isaak et Imad, mes futurs maris. Merci à mon « beau papa », merci beaucoup Hadji, pour ta bonne humeur, tes conseils, tes blagues. "Jazak Allah Khairan".

Je tiens à remercier Abdelmalik (Abdel 2) pour son aide, sa gentillesse. Même si tu nous as donné mal à tête car tu es trop têtu. On a bien rigolé, Vachette Internationale.

Je tiens à remercier Gaspard Levet (bientôt Docteur), pour la bonne humeur, ses conseils, nos discussions sur les cyclodextrines. C'est bientôt la fin pour toi aussi, bon courage.

Un GRAND mais très GRAND merci à Mme Claudette Martin, la mamie du laboratoire, pour ses délicieux gâteaux, crêpes, chocolats etc… et sa gentillesse, toujours prête à nous défendre.

A toi ma sœur tunisienne, Khouloud merci beaucoup pour tes conseils, pour ton soutien. Tu es parti trop tôt mais on rattrapera le temps.

Un grand merci à Capucine, merci pour ton aide, pour ta gentillesse et ta douceur. Bon courage pour la suite de ta thèse.

Merci beaucoup à Nicolas Probst, merci pour ta disponibilté, pour ton aide avec ma chimie. Tu as toujours été présent pour m'aider et me guider.

Merci à Niko, pour ta bonne humeur, ta simplicité, tu es un chef au top. Tes étudiants ont de la chance. Merci à Laura, Mariia, Iyanu, Ruifang et Huijun. Les cellules sont plus vivantes et animées grâce à vous.

Je tiens à remercier Laetitia Bailly, pour sa disponibilité et son aide précieuse sur la mise au point des conditions de purifications de cyclodextrines. Désolée, je sais que tu t'es un peu arraché les cheveux avec ces cyclodextrines ☺. Je n'aurai pas russi à m'en sortir sans ton aide. Merci également à Emilie Petit pour son aide et sa gentillesse.

Je tiens à remercier Albert Marcual pour son travail et son aide pour les analyses HRMS.

Je remercie Mélanie Mignot pour sa disponibilité et son aide pour les analyses ICP.

Je remercie Renaud Parment pour son travail et les résultats des tests in vitro et in vivo.

A toi mon âme sœur, ma partenaire de piscine Mélissa, que dire……. Merci, tu es une de mes plus belles rencontres à Rouen. Merci pour ta joie, pour ton soutien, des conseils et ta motivation.

Merci aux merveilleuses rencontres faites au détour d'un couloir, d'un café, d'un repas…. Merci à Amaury (Mr. Chevron 😊), Seydou, Batoul, Dorra, Katia, Aurélien, Steven, Asmaa, Abdel 1. Merci pour vos conseils, votre aide et votre soutien. J'ai enfin eu une date !!!!

Merci à Margot, Alexis, Mr. Fabien PC et sa femme Hana, Thibaul, Thi, Mathieu, Ludovic, Laura (la petite stagiaire), Alexandre, Emilie. Merci pour votre joie, nos discussions et fou rire.

Merci à Madame Auriella, merci pour ton authenticité, pour ton soutien.

Merci à Ophélie, loin des yeux, près du cœur. Merci pour ton soutien et tes encouragements.

Un grand merci aux Docteures (Faustine, Diana, Melody). Merci les filles pour votre soutien, vos messages d'encouragements.

Merci à la grande italienne, Marianna, merci pour ton soutien, tes encouragements.

A la « Milkshake Team », à mes sœurs de cœurs (Panou, Caroline, Xiaolin, Mouna), merci les filles, merci pour votre soutien sans faille et vos messages de motivation. GIRL POWER !!!

Enfin, plus personnellement, je voudrais remercier ma famille, pour leur soutien durant tout le long de mon doctorat. Merci à mes parents d'être toujours présent, de m'avoir poussée à aller toujours plus loin. Merci à mes frères (Yannick, Even, Wany et Fred). Merci aussi à Papy.

Merci à Pela, Mlle GK, Jordy, Ya Kamissa, Ya Carole, Clarenne, Laurène, Tantine Emma, Tonton Jonathan, Tantine Mimi. Merci beaucoup pour tout.

A toi, la femme de ma vie, ma mère de cœur, ma maman Claudia. Les mots ne suffisent pas pour te dire merci. Je te dis merci pour ton amour, merci pour tout. Tu es la personne la courageuse et l'une des plus généreuses que je connaisse.

Merci à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de cette thèse merci c'est grâce à vous que je vais réussir.

« La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte. »

Marie Sklodowska- Curie

Remerciements **1**
Liste des Abbréviations **15**
Introduction générale **19**
Etude Bibliographique **23**
Partie 1 : La Thérapie **25**
I. Le cancer du cerveau 27
I.1 Le glioblastome multiforme *27*
I.2 Diagnostic du glioblastome *29*
I.3 Traitement du glioblastome *29*
I.3.1 Les médicaments actifs par voie injectable 30
I.3.1.1 La doxorubicine (Adriamycine™) 30
I.3.1.2 Le *Cis*platin 31
I.3.1.3 L'Irinotecan 33
I.3.2 Les médicaments actifs par voie orale 33
I.3.2.1 Les Nitrosourées 33
I.3.2.2 Le témolozomide (Temodal™) 35
I.3.3 Autres modalités d'administration 36
I.4 Choix de l'anticancéreux pour cette étude *36*
II. Références 39
Partie 2 : Le diagnostic **43**
I. Techniques d'imagerie médicale 45
I.1 Les rayons X *45*
I.2 L'échographie *46*
I.3 L'imagerie nucléaire *46*
I.4 L'imagerie par fluorescence *47*
II. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) 47
II.1 Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) *48*
II.2 Les agents de contraste (ACs) *51*
II.2.1 Les agents de contraste positifs 51
II.2.2 Les agents de contraste négatifs 52
II.3 Toxicité des agents de contraste *53*
II.4 La relaxivité *55*
II.4.1 Relaxivité de la sphère interne 57
II.4.1.1 Le nombre d'hydratation « q » 58

II.4.1.2 Le temps de corrélation rotationnel (τ_r) 59
II.4.1.3 La distance gadolinium-proton (r_{Gd-H}) 59
II.4.1.4 Le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne (τ_m) 60
II.5 Les avantages de l'IRM *60*
III. Exemples de médicaments théranostiques commercialisés 62
III.1 Naissance du théranostique : Herceptin® et HercepTest® *62*
III.2 Zevalin™ *63*
III.3 NETSPOT™ *63*
III.4 ^{131}I MIBG *64*
III.5 AGuIX® (Activation et Guidage de l'Irradiation X) *65*
IV. Conclusion 66
V. Les Cyclodextrines 67
V.1 Généralités sur les cyclodextrines *67*
V.1.1 Historique 67
V.1.2 Structure des CDs 68
V.1.3 Caractérisations des CDs 69
V.1.4 Propriétés des CDs 69
V.1.5 Applications des complexes d'inclusion de cyclodextrines 70
V.1.6 Fonctionnalisation des cyclodextrines 71
V.2 Agents de contraste à base de cyclodextrine *73*
V.2.1 Cyclodextrine fonctionnalisée par un agent de contraste 73
V.2.1.1 Monofonctionnalisation de la CD par un agent de contraste 74
V.2.1.2 Bifonctionnalisation de la CD par un agent de contraste 75
V.2.1.3 Polyfonctionnalisation de la β-CD par des agents de contraste 75
V.3 Complexes « hôte-invité » *79*
VI. La barrière hémato-encéphalique (BHE) 80
VI.1 Vecteur peptidique : l'Angiopep *82*
VII. Conclusion 85
VIII. Références 87
Partie 3 : Vectorisation et Libération contrôlée de principes actifs 93
I. Introduction 95
II. Vectorisation de médicaments 96
II.1 Cyclodextrines, vecteurs de médicaments *96*
II.2 Ancre chimique à base d'adamantane *98*

III. *Linkers* clivables pour l'administration de chimiothérapie 100
IV. Clivage des liens sensibles au pH 102
IV.1 Acidité des cellules tumorales 102
IV.2 Mécanisme de libération d'un système pH sensible au sein d'une cellule cancéreuse .. 102
V. Exemples de systèmes d'administration de chimiothérapie à base des linkers clivables sélectionnés 104
V.1 Les linkers hydrazones 104
V.2 Les linkers imines 107
V.3 Le peptide SGRSANA 109
V.4 Conclusion 112
VI. Plateformes théranostiques à base de cyclodextrine 112
VII. Objectifs de la thèse : Médicament/Vectorisation/IRM 117
VIII. Références 120
Résultats 127
Partie 1 : Synthèse des composés 131
I. Introduction 133
I.1 Fonctionnalisation en position 8 133
I.2. Fonctionnalisation en position 3 134
II. Stratégie de synthèse des sondes 136
III. Synthèse de l'ancre chimique modèle : ADA-H-Chro **29** 138
IV. Synthèse des composés modèles Adamantane-Hydrazone-Coumarine 139
*IV.1 Synthèse du composé ADA-H-Cou1 **34** et **35** 139*
IV.1.1 Généralités sur la synthèse des hydrazones 139
IV.1. 2 Synthèse de la coumarine ADA-H-Cou1 **34** et **35** 140
*IV.2 Synthèse du composé ADA-H-Cou2 **41** 142*
*IV.3 Synthèse du composé ADA-H-Cou3 **43** 143*
*IV.4 Synthèse du composé ADA-H-Cou4 **49** 144*
V. Synthèse du composé Adamantane-Imine-Coumarine 145
V.1 Généralités sur les imines 145
*V.2 Synthèse du composé ADA-I-Cou5 **50** 146*
*V.3 Synthèse du composé ADA-I-Cou6 **52** 148*
VI. Synthèse des ancres ADA-P-Cou **59** et ADA-P-TMZ **60** 148
VII. Différentes stratégies de synthèse du témozolomide 151
VII.1 Synthèse du témozolomide fonctionnalisée en position 3 151
VII.2 Synthèse du témozolomide fonctionnalisé en position 8 153

VII.2.1 Voie de synthèse de Svec *et al.* 153
VII.2.2 Voie de synthèse d'Hummersone *et al.* 157
VIII. Synthèse des composés Adamantane-Hydrazone-Témozolomide 158
*VIII.1 Synthèse des composés ADA-H-TMZ **89** et **90*** *158*
*VIII.2 Synthèse du ADA-H-TMZ **91*** *159*
*VIII.3 Synthèse des composés hydrazines **104** et **105*** *160*
IX. Synthèse du composé Adamantane-Imine-Témozolomide **106** 162
X. Conclusion 162
XI. Monofonctionnalisation de la cyclodextrine 164
XI.1 Synthèse de la cyclodextrine fonctionnalisée par le Gd-DOTA par chimie « click » *164*
XI.1.1 La chimie « click » 165
XI.1.2 Synthèse de la β-CD-N_3 **111a** 167
XI.1.3 Synthèse de la cyclodextrine-Ln-DOTA **121** et **122** 169
XI.1.3.1 Généralités 169
XI.1.3.2 Synthèse des complexes de Ln-DOTA **119** et **120** 170
XI.1.3.3 Synthèse des composés CD-Ln-DOTA **121** et **122** 171
*XI.2 Synthèse de la cyclodextrine **129** complexée par le Gd* *173*
XI.2.1 Synthèse de la β-CD **129** 173
XI.2.2 Synthèse des agents de contraste **130**, **131** et **132** 175
XI.3 Synthèse de la cyclodextrine fonctionnalisée par l'angiopep *176*
XI.3.1 Généralités 176
XI.3.2 Synthèse de la cyclodextrine β-CD-Angiopep **134** 178
XI.4 Conclusion *180*
Partie 2 : Préparation des Complexes d'Inclusion et leurs Caractérisations 183
I. Techniques de préparation du complexe d'inclusion CD/invité 185
I.1 Inclusion par cristallisation de la solution (co-précipitation) *185*
I.2 Inclusion par mélange à sec (dry mixing) *185*
I.3 Inclusion par pétrissage (paste/kneading) *186*
I.4 Inclusion par scellage (sealing) *186*
I.5 Inclusion par évaporation de solvant *186*
II. Caractérisation des complexes d'inclusion 187
II.1 La Résonance Magnétique Nucléaire *187*
II.2 Spectroscopie Infrarouge (IR) *190*
II.3 Spectrophotométrie UV-Visible *190*
II.4 Fluorescence *192*

II.5 Dichroïsme circulaire *193*
II.6 ITC (Titrage isotherme calorimétrique) *194*
III. Différents complexes d'inclusion et leurs caractérisations 196
*III.1 Complexe d'inclusion du composé **135*** *197*
*III.2 Complexe d'inclusion **136*** *199*
III.2.1 Préparation du complexe d'inclusion **136** 199
III.2.2 Caractérisation du complexe d'inclusion **136** 201
III.2.2.1 Par la méthode Job Plot 201
III.2.2.2 Détermination de la constante de stabilité du complexe **136** 203
III.1.3 Complexe d'inclusion **138** 204
III.1.3.1 Préparation du complexe d'inclusion **138** 204
III.1.3.2 Caractérisation du complexe d'inclusion **138** 206
III.1.4 Complexe d'inclusion **139** 207
III.1.5 Complexe d'inclusion **140** 208
III.1.6 Complexe d'inclusion **141** 209
III.1.6.1 Préparation du complexe d'inclusion **141** 209
III.1.6.2 Caractérisation du complexe d'inclusion **141** 211
III.1.7 Complexe d'inclusion **143** 212
III.1.7.1 Préparation du complexe d'inclusion **143** 212
III.1.7.2 Caractérisation du complexe d'inclusion **143** 213
III.1.8 Complexes d'inclusion à base des cyclodextrines modifiées **121**, **122**, **132** et **134** 214
III.1.9 Conclusion *217*
IV. Cinétique d'hydrolyse des fonctions imines et hydrazones 220
V.1 Généralités *220*
*V.2 Cinétique d'hydrolyse du complexe d'inclusion **141*** *222*
V.2.1 Hydrolyse à pH 5,5 223
V.2.2 Hydrolyse à pH 6,45 224
V.2.3 Hydrolyse à pH 7 225
V.2.4 Analyse par spectrométrie de masse des composés d'hydrolyse 227
Partie 3 : Synthèse du tripode 229
I. Synthèse du Tripode 231
I.1 Généralités *233*
I.1.1 Exemples de tripodes 233
I.1.2 Tripode et cyclodextrine 235

I.2 Synthèse de tripodes utilisés pour notre étude *237*
II. Préparation des complexes d'inclusion du tripode 242
II.1 Préparation du complexe dans un mélange DMSO/H_2O *242*
II.2 Préparation du complexe dans un mélange ACN/H_2O *244*
III. Conclusion 245
Partie 4 : Test *in vitro* et *in vivo* **247**
I. Relaxivité des agents de contraste 249
I.1 Relaxivité des agents de contraste à 20 MHz *249*
I.1.1 Relaxivité du composé alcyne-Gd-DOTA **119** 249
I.1.2 Relaxivité du composé CD-Gd-DOTA **121** 250
I.1.3 Relaxivité des composés **130**, **131**, **132** 251
I.1.4 Relaxivité des composés **145** et **146** 252
I.2 Relaxivité des agents de contraste à 280 MHz *254*
II. Passage de la BHE 258
III. Etude de l'effet cytotoxique du témozolomide 262
IV. Conclusion 265
Conclusion Générale Perspectives **269**
Experimental Part **277**
General Considerations **279**
Materials and methods **357**
Références Bibliographiques **363**

Liste des Abbréviations

AC	Agent de contraste
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADA	Adamantane
AGuIX	Activation et Guidage de l'Irradiation X
APTES	3-Aminopropyltriéthoxysilane
α-CD	Alpha-Cyclodextrine
β-CD	Béta-Cyclodextrine
BCNU	BisChloroéthylNitrosoUrée
BER	Réparation par excision de base (Base Excision Repair)
BHE	Barrière hématoencéphalique
Boc	*tert*-Butoxycarbonyle
CD	Cyclodextrine
CDMT	2-Chloro-4,6-diméthoxy-1,3,5-triazine
CPT	Campthothécine
CuAAC	Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition
Cy5.5	Cyanine-5.5
Cy7	Cyanine-7
DCM	Dichlorométhane
DEAC	Acide 7-diéthylaminocoumarine-3-carboxylique
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
DOTAGA	Acide 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triyl)triacétique
DO3A	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique
DIPEA	*N*, *N*-Di*iso*propyléthylamine
DI water	Deionized water
DMAP	4-(Diméthylamino)pyridine
DM-β-CD	Diméthyl-β-Cyclodextrine
DMEM	Milieux de Eagle Modifiés de Dulbecco
DMF	Diméthylformamide
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
EtOH	Ethanol
EtOAc	Acétate d'éthyle
eq	Equivalent
FDA	Autorité de santé américaine « Food and Drug Administration »
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FSN	Fibrose Systémique Néphrogénique
GBCA	Gadolinium Based Contrast Agents : produits à base de Gadolinium
GBM	Glioblastome multiforme
Gd	Gadolinium
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale (Glial fibrillary acidic protein)
GSH	Glutathion
HA	Acide Hyaluronique
HOBt	Hydroxybenzotriazole

HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétramethyluronium hexafluorophosphate
HP-β-CD	Hydroxypropyl-β-cyclodextrine
HPLC	High performance liquid chromatography - chromatographie en phase liquide à haute performance
ICD	Dichroïsme Circulaire Induit
IRM	Imagerie par résonance nucléaire
IR	Infra-Rouge
ITC	Titrage calorimétrique isotherme
M	Molaire
M-β-CD	Méthyl-β-Cyclodextrine
MALDI-TOF	Spectroscopie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (Matrix-Assisted Laser Desorption IonizationTime Of Flight)
NaH	Hydrure de sodium
Nap	Naphthalimide
NET	Tumeurs NeuroEndocrines
NeuN	Neuronal Nuclei Antigen (antigène nucléaire neuronal)
NIR	Near-Infrared (proche Infra-Rouge)
MeOH	Méthanol
MP	Métoclopramide
MGMT	6-*O*-Méthylguanine-ADN méthyltransférase ou MethylGuanine MethylTransferase
MMAE	MonoMéthyl Auristatine E
MMR	Système de réparation des mésappariements de l'ADN (MisMatch-Repair)
MVK	Methyl Vinyl Ketone (Méthylvinylcétone)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
nm	Nanomètre
PA	Principe Actif
PEG	Polyéthylène glycol
PMDTA	*N*,*N*,*N*′,*N*″,*N*″-Pentamethyldiethylenetriamine
ppm	Partie Par Million
Ka	Constante d'association
Kd	Constante de dissociation
Rdt	Rendement
RGD	Acide Arginylcylaspartique
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rt	Température Ambiante (Room Temperature)
SBE-β-CD	Sulfobutyléther-β-Cyclodextrine
SMC	Microcapsules supramoléculaires
SNP	Supramolecular Nanoparticles (Nanoparticules supramoléculaires)
t.a.	Température ambiante
TEMP	Tomographie d'Emission Monophotonique
TEOS	Tétraéthylorthosilicate
TEP	Tomographie à Emission de Positrons
TFA	Acide trifluoroacétique
TMZ	Témozolomide
TMe-β-CD	Per-*O*-methylated β-Cyclodextrin

TPPS	Acide *méso*-tétraphenylporphine-tétrasulfonique
UA	Unité arbitraire
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator

Introduction générale

Le 16 mars 2004, la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis a publié un rapport important sur le ralentissement des thérapies médicales innovantes intitulé : « Innovation / Stagnation : Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products ». Ce rapport décrit le besoin urgent de moderniser les processus de développement pour les rendre plus prévisibles et moins coûteux.

La recherche de nouvelles technologies pour administrer des médicaments est principalement motivée par l'incapacité de nombreux agents thérapeutiques à atteindre les cellules malades et à visualiser leur efficacité. Cette efficacité peut être évaluée *in vivo* à l'aide de sondes d'imagerie appropriées qui permettent de générer une réponse détectable. En effet, les grands progrès réalisés au cours de la dernière décennie dans le domaine de l'imagerie moléculaire a permis la conception de nouvelles sondes pouvant réaliser un suivi thérapeutique en imageant les compartiments vasculaires, extracellulaires et intracellulaires. Le succès de cette combinaison simultanée entre l'imagerie moléculaire, la libération contrôlée et le suivi de traitement a donné naissance à un nouveau domaine de recherche hautement interdisciplinaire (chimie, biologie, médecine, nanotechnologie, imagerie) appelé théranostique (Thérapie + Diagnostic).

Le terme « Théranostique » a été utilisé pour la première fois par John Funkhouser, PDG de PharmaNetics, en août 1998 lors d'un communiqué de presse de la société Cardiovascular Diagnostics. Ce concept est défini par « la capacité d'affecter la thérapie ou le traitement d'un état pathologique ». La théranostique est basée sur une double stratégie : *1)* la mise au point d'un traitement personnalisé permettant une thérapie ciblée et efficace ; *2)* l'optimisation de la sélection des médicaments grâce à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires. Ainsi, la théranostique vise à surveiller la réponse au traitement, à accroître l'efficacité et l'innocuité des médicaments et à éliminer le traitement inutile pour certains patients, ce qui se traduit par des économies significatives pour l'ensemble du système de santé.

Pour cela, nous souhaitons, mettre au point un agent théranostique intégrant une nouvelle sonde d'imagerie intracellulaire en se basant sur un motif β-cyclodextrine. L'objectif est de développer une sonde capable de passer la BHE grâce à un peptide transporteur

spécifique, l'angiopep et de vectoriser un principe actif, le témozolomide, pour traiter le glioblastome. Il sera ainsi possible de suivre l'efficacité du traitement par IRM grâce à un agent de contraste au gadolinium (Figure 1). Pour pouvoir être véhiculé, le TMZ sera lié par l'intermédiaire d'un bras espaceur à une molécule d'adamantane servant d'ancre chimique. L'adamantane est, en effet, connu pour former des complexes d'inclusion relativement stables avec la cavité oligosaccharidique de la β-cyclodextrine. La libération du TMZ pourra être contrôlée par le clivage du bras espaceur sous l'action d'une enzyme spécifique ou d'un changement de pH, plus acide au voisinage des cellules cancéreuses (thérapie). Cette variation structurale de l'agencement supramoléculaire engendrera conjointement une variation du signal IRM (diagnostic).

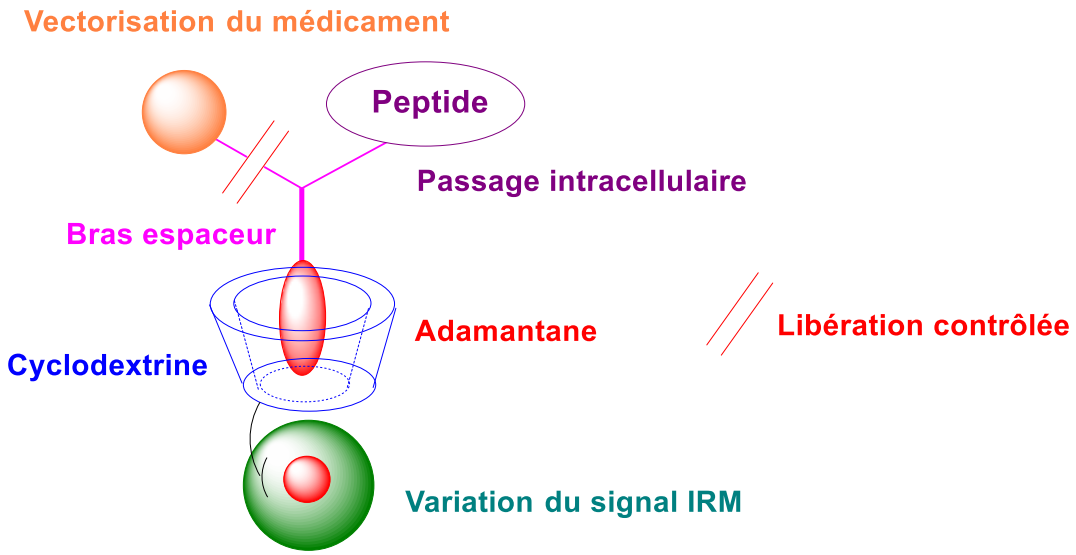


Figure 1: Structure d'une sonde théranostique à base de cyclodextrine

Dans ce manuscrit, une étude bibliographique présentera le contexte et les enjeux de ce projet. Le traitement des glioblastomes pour la thérapie (Partie 1) et le diagnostic par IRM (Partie 2) seront abordés. L'intérêt des cyclodextrines comme support pour développer de nouveaux agents de contraste sera illustré dans ces chapitres. Les méthodologies permettant la libération contrôlée d'un médicament seront présentées (Partie 3). Ensuite, les travaux de synthèse réalisés au cours de cette thèse seront exposés. Enfin, les protocoles expérimentaux des produits synthétisés seront décrits.

Etude Bibliographique

Partie 1 : La Thérapie

I. Le cancer du cerveau

Les tumeurs cérébrales sont un trouble relativement rare, avec une incidence de 2 à 10 cas pour 100 000 habitants (20 000 cas/an en Europe).[1] La majorité des tumeurs cérébrales sont d'origine neuroépithéliale et sont appelées gliomes. Celles-ci sont classées en fonction de leur agressivité, de I à IV. Les gliomes de grade IV, ou glioblastome multiforme (GBM), sont les gliomes les plus courants et les plus agressifs chez l'adulte[2] avec une prédominance chez l'homme.[3]

I.1 Le glioblastome multiforme

Le cerveau, véritable chef d'orchestre de notre organisme coordonne la plupart de nos fonctions :

- les fonctions vitales (battements du cœur, mouvement musculaire, respiration),
- les fonctions intellectuelles (émotions, réflexion, mémoire, personnalité, apprentissage),
- la perception des cinq sens : la vue, l'ouïe, l'odorat, le toucher et le goût.

Le cerveau est composé de neurones qui sont responsables du traitement de l'information. Ces neurones sont entourés de cellules nourricières, les cellules gliales qui représentent 90% de la composition du cerveau. Parmi ces cellules gliales, les astrocytes assurent notamment la gestion des connexions interneuronales.

Le glioblastome multiforme (GBM) ou «astrocytome de grade IV» est la tumeur cérébrale primitive maligne la plus répandue et la plus agressive chez l'adulte (Hulleman et Helin, 2005).[4] En effet, environ 2000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. Cette forme tumorale se développe généralement entre 45 et 70 ans et se localise, le plus souvent, dans un hémisphère (droit ou gauche) du cerveau. Néanmoins, cette tumeur peut se développer à bien d'autres endroits du cortex cérébral. Le traitement de ces glioblastomes requiert une approche pluridisciplinaire car malgré l'arsenal thérapeutique associant le progrès de la chirurgie, la radiothérapie combinée à la chimiothérapie, ce cancer reste incurable et progresse dans les six mois qui suivent son diagnostic.

Il existe différents types de glioblastomes : les primaires et les secondaires, issus de la transformation d'une tumeur initialement inoffensive en tumeur maligne. Ces GBMs sont

nourris par un apport sanguin abondant et anormal de vaisseaux tumoraux. La tumeur est principalement composée de cellules astrocytaires anormales. Les glioblastomes sont infiltrants et envahissent les régions voisines du cerveau. Ils peuvent aussi parfois se répandre du côté opposé du cerveau par le biais de fibres de connexion (corps calleux).

Généralement, le glioblastome se développe sans cause connue et identifiée. Il semblerait cependant que l'irradiation de l'encéphale lors de traitement d'autres pathologies telles que des tumeurs bénignes, malformations artério-veineuses, la maladie de Parkinson, l'épilepsie, ou la névralgie du trijumeau puisse favoriser son apparition quelques années plus tard. Des anomalies génétiques et moléculaires ont, par ailleurs, été mises en avant, que ce soit pour les glioblastomes primaires ou secondaires.

Le GBM a été identifié pour la première fois en 1863 par le Dr Rudolf Virchow[5] et représente 15% des tumeurs cérébrales primaires.

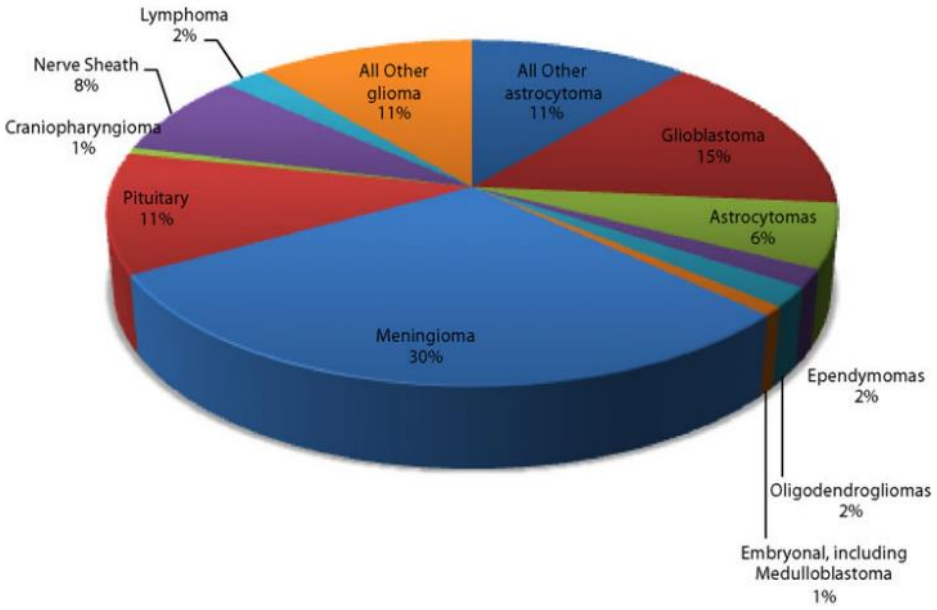


Figure 2 : Répartition en pourcentage des différents types de tumeurs du cerveau

L'évolution et l'étendue du glioblastome est, dans la majorité des cas, rapide : entre 2 et 3 mois. Troisième cause de décès par cancer chez le jeune adulte (entre 15 et 35 ans), ne représentant que 1 à 2% des tumeurs (cancer du côlon, cancer de la prostate, leucémie etc…), cette tumeur incurable est associée à une survie très limitée. La durée de vie moyenne du traitement entre le diagnostic et le décès avec traitement est de 14 mois avec un taux de survie

à 5 ans après le diagnostic pour 14% chez les 20-44 ans et pour 1% chez les 55-64 ans selon l'OMS.

Les symptômes de cette maladie ne sont pas spécifiques et vont différer en fonction de la localisation et de la taille de la tumeur. Ils sont la conséquence de l'augmentation de la pression intracrânienne due à la croissance de la tumeur. Les signes évocateurs sont :

- maux de tête,
- nausées et vomissements,
- faiblesse d'un membre,
- troubles affectant la parole, la vision, le comportement, l'humeur, la mémoire.

Ces symptômes s'installent en quelques jours à quelques semaines avec une progression de l'intensité avec le temps.

I.2 Diagnostic du glioblastome

En cas de suspicion de tumeur, un examen neurologique complet permet d'évaluer le niveau de fonctionnement du système nerveux à l'aide de différents tests (réflexes, exercices musculaires, tests de langages …). Le diagnostic du glioblastome est principalement effectif grâce à un scanner crânien ou encore une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) qui vont confirmer et permettent de localiser l'emplacement de la tumeur. Ensuite, un examen anatomopathologique (biopsie) peut être effectué après localisation de cette dernière si elle est accessible à un prélèvement. C'est le seul examen qui permette d'affirmer le diagnostic. Dans le cadre d'une infection neurologique sous-jacente, un diagnostic différentiel peut également être réalisé afin de mettre en évidence l'agent pathogène à l'origine de l'infection.

I.3 Traitement du glioblastome

La première chirurgie de résection du GBM remonte à 1920 et malgré l'ablation de l'hémisphère atteint par la tumeur, les deux patients opérés ont été vaincus par la récidive de la tumeur qui avait infiltré l'hémisphère sain, confirmant son caractère hautement invasif.[5]

Différents traitements existent et peuvent être proposés seuls ou combinés. Le traitement standard du GBM implique, autant que possible, une résection tumorale suivie d'une

radiothérapie et d'une chimiothérapie.[6] Ce traitement synergique améliore l'espérance de vie de quelques mois (18,9 *vs* 9,8 mois)[7] mais ces résultats restent faibles comparés aux progrès réalisés dans le traitement d'autres cancers.

Malgré l'efficacité de la résection de la tumeur, près de 100% des cas de GBM sont de type passif[8] et récidivent. La récidive de la tumeur se situant à 80-90% à moins de deux centimètres de la cavité de la zone de résection dans laquelle on retrouve des cellules tumorales invasives. Des études précliniques ont montré que cette invasivité associée à la radio et/ou chimiorésistance intrinsèque ou acquise par les cellules de gliome ainsi que par la présence de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) limitaient l'acheminement des agents anti-néoplasiques et justifiaient le développement de nouvelles stratégies.

Il existe plusieurs traitements de chimiothérapie sur le marché pour traiter le GBM.

I.3.1 Les médicaments actifs par voie injectable

I.3.1.1 La doxorubicine (Adriamycine™)

La doxorubicine, anticancéreux, isolé en Italie en 1965, est le chef de file de la famille des anthracyclines. Elle est commercialisée sous le nom d'Adriamycine et est produit par une souche bactérienne d'actinomycètes que l'on trouve sur les rivages de la mer Adriatique. Elle est utilisée pour le traitement des carcinomes du sein, des sarcomes des os et des parties molles, des lymphomes de Hodgkin, lymphomes non hodgkiniens. La doxorubicine s'intercale entre deux paires de bases azotées de l'ADN et agit avec la topo-isomérase II. Il se forme des complexes ADN-topo-isomérase II-doxorubicine qui fixent les coupures de l'ADN, bloquent ses fonctions et entraînent la mort cellulaire. La doxorubicine favorise aussi la formation de radicaux libres qui coupent l'ADN et endommagent les membranes, ce qui explique la toxicité cardiaque de ce produit.



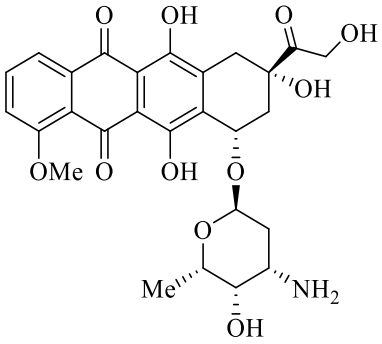


Figure 3 : Structure de l'Adriamycine™

I.3.1.2 Le *Cis*platin

Le cisplatine ou *cis*-diaminedichloroplatine(*II*) (CDDP) est un complexe à base de platine utilisé dans le traitement de différents cancers tels que les sarcomes, carcinomes, cancer de l'ovaire, cancer du testicule, cancer du cerveau et appartient à la famille des agents alkylants de l'ADN. Il a été synthétisé pour la première fois en 1844 par Michele Peyrone[9], et sa structure chimique identifiée en 1893 par Alfred Werner. En 1965, au cours de l'étude des effets des courants électriques sur les cellules, Rosenberg *et al*.[10] ont découvert, par hasard, que les cellules d'*Escherichia coli* formaient de longs filaments, mais qu'elles ne se divisaient pas dans des conditions opératoires. Il a été ainsi démontré que l'inhibition de la division cellulaire bactérienne était due aux traces de *cis*platine, générées par la présence des électrodes de platine et le chlorure d'ammonium présent dans les milieux.

Le *cis*platine a obtenu son autorisation de mise sur le marché en 1978 aux États-Unis et en 1983 en France. Depuis son approbation en 1978, le *cis*platine (Platinol®) est devenu un intermédiaire important dans la stratégie de chimiothérapie pour le traitement des cancers. Cependant, son utilisation continue est fortement limitée par des effets secondaires sévères et, une résistance intrinsèque ou acquise à ce traitement. Ces effets secondaires incluent la néphrotoxicité, la neurotoxicité et l'ototoxicité.[11]

Le *cis*platine est un complexe plan carré, contenant deux chlores labiles et deux molécules d'ammoniac relativement inertes coordonnées à l'atome central Pt(II) dans une configuration *cis*. Quand le composé pénètre dans la cellule, il réagit avec l'eau pour donner les espèces actives chargées positivement (numérotées **5,65** et surtout **5,66,** Figure 4), un processus

qui est favorisé par la concentration en chlorure intracellulaires relativement faible. Ces espèces pénètrent dans le noyau et sont responsables de la formation de complexes d'ADN-Pt qui représentent l'activité antitumorale (Figure 5).[11] La désactivation cytoplasmique du *cis*platine est possible et est principalement due à sa réaction avec les groupes mercapto présents dans le glutathion du fait de l'affinité entre le Pt et le soufre. Dans le plasma, la concentration élevée en chlorure empêche cette réaction, mais l'hydrolyse extracellulaire du *cis*platine suivie de la formation d'adduits du Pt avec des groupes mercapto des résidus cystéines, présents dans l'albumine sérique, et d'autres protéines permet de désactiver jusqu'à 98% du médicament après son administration intraveineuse.

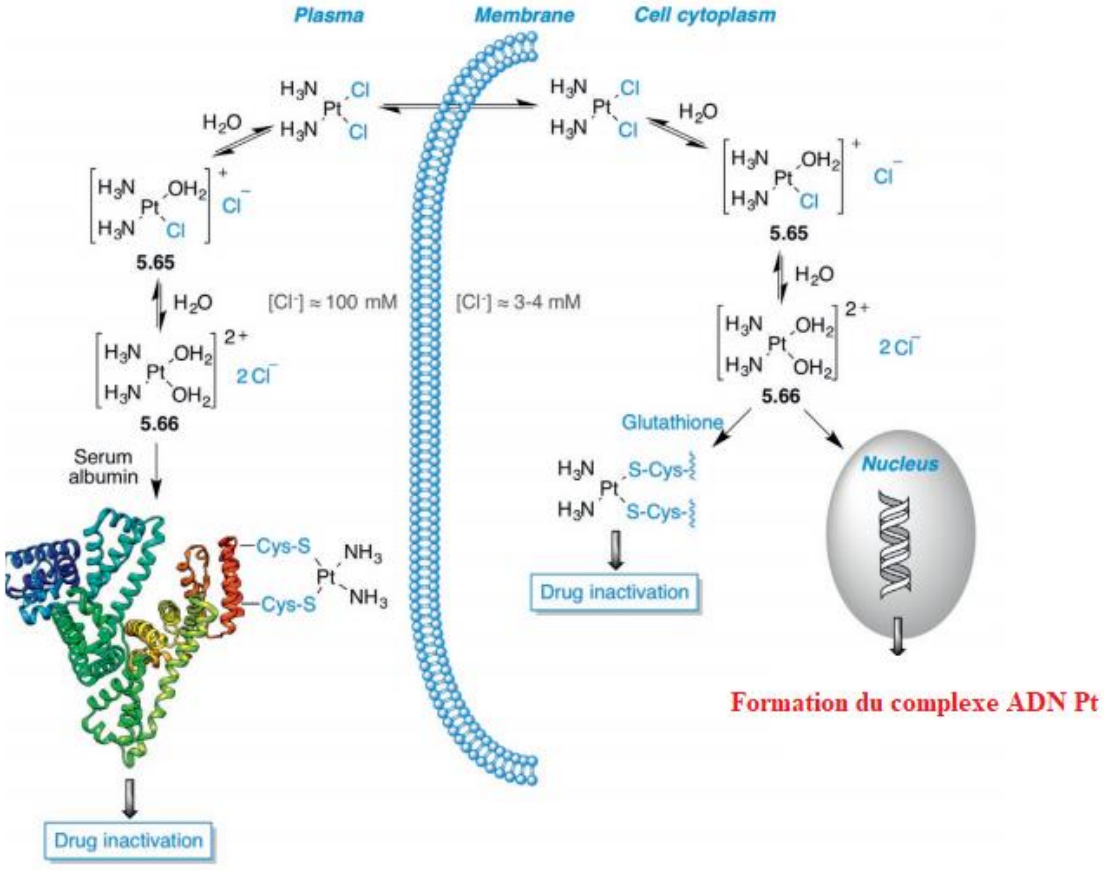


Figure 4 : Mécanisme d'activation de Cisplatine intra et extracellulaire[11]

Bien que, strictement parlant, la coordination du Pt avec les bases d'ADN ne puisse pas être considérée comme une réaction d'alkylation, le *cis*platine et ses analogues sont normalement considérés comme des agents d'alkylation en raison de l'électrophilicité des espèces actives.

I.3.1.3 L'Irinotecan

L'irinotécan était un promédicament qui est métaboliquement activé dans le corps en 7-éthyl-10-hydroxycamptothécine (SN-38) par la carboxylestérase. Il est utilisé pour le traitement de la leucémie, le lymphome mais aussi les cancers du colorectum, du poumon, des ovaires, du col de l'utérus, du pancréas, de l'estomac, du sein et du cerveau. Les principaux effets indésirables cliniques du traitement à l'irinotécan sont la neutropénie et la diarrhée. Le SN-38 inhibe la topoisomérase I. Cette inhibition entraine des cassures de l'ADN simple brin bloquant la réplication de l'ADN. L'irinotécan est actuellement approuvé pour le traitement du cancer colorectal métastatique et utilisé en France depuis 1995.

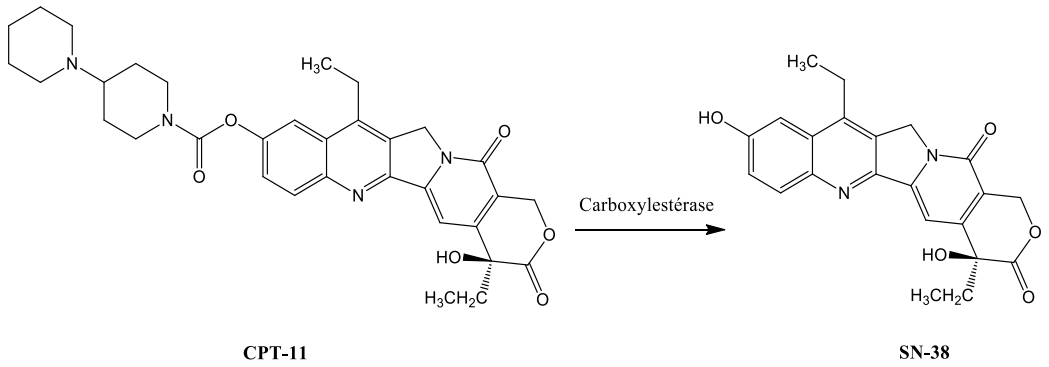


Schéma 1 : Métabolisme de l'irinotécan (CPT-11) par la carboxylestérase en son métabolite actif, la 7-éthyl-10-hydroxycamptothécine (SN-38)[12]

I.3.2 Les médicaments actifs par voie orale

I.3.2.1 Les Nitrosourées

En 1959, lors d'un dépistage aléatoire effectué par le National Cancer Institute, la 1-méthyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine a montré une faible activité antileucémique. Plus tard, des essais sur des analogues de ce composé ont conduit à la découverte de l'activité antitumorale de la 1-méthyl-1-nitrosourée. Il a été découvert que l'introduction d'une chaîne 2-chloroéthyle sur l'atome d'azote portant le groupe nitroso entraînait une activité beaucoup plus importante. En effet, ces dérivés chloroéthyliques sont suffisamment lipophiles pour traverser la barrière hématoencéphalique et sont donc utiles dans le traitement des tumeurs cérébrales. Ces résultats ont conduit à la synthèse d'un grand nombre de composés nitrosourées, comme la lomustine (CCNU), la carmustine (BCNU), la fotémustine, la bélustine, la nimustine (ACNU) (Figure 6).[11]

Actuellement, les nitrosourées les plus utilisées sur le plan clinique sont la lomustine, le BCNU et l'ACNU.

- La lomustine (CCNU, CeeNU®) est utilisée dans les tumeurs cérébrales, le cancer du sein, du pancréas, du poumon, le Lymphome de Hodgkin, le myélome multiple et le cancer de l'ovaire.

- La carmustine (BiCNU®) est utilisée dans plusieurs types de cancer du cerveau (notamment le gliome, le glioblastome multiforme, le médulloblastome, et astrocytome), le myélome multiple et le lymphome (lymphome hodgkinien et non hodgkinien). Une nouvelle formulation de carmustine à toxicité systémique réduite a été développée pour le traitement local des tumeurs cérébrales. Formulée sous forme de « plaquette » à libération lente (Gliadel Wafer® ; Polifeprosan 20 avec carmustine), elle est implanté dans la cavité de résection laissée après l'ablation chirurgicale de la tumeur.[13] Ce traitement a été approuvé par la FDA en 1997 pour être utilisé en chirurgie pour prolonger la survie des patients atteints de GBM récidivante.

- La nimustine est utilisée en association avec le téniposide comme chimiothérapie de deuxième ou de troisième ligne pour le glioblastome récurrent.[14]

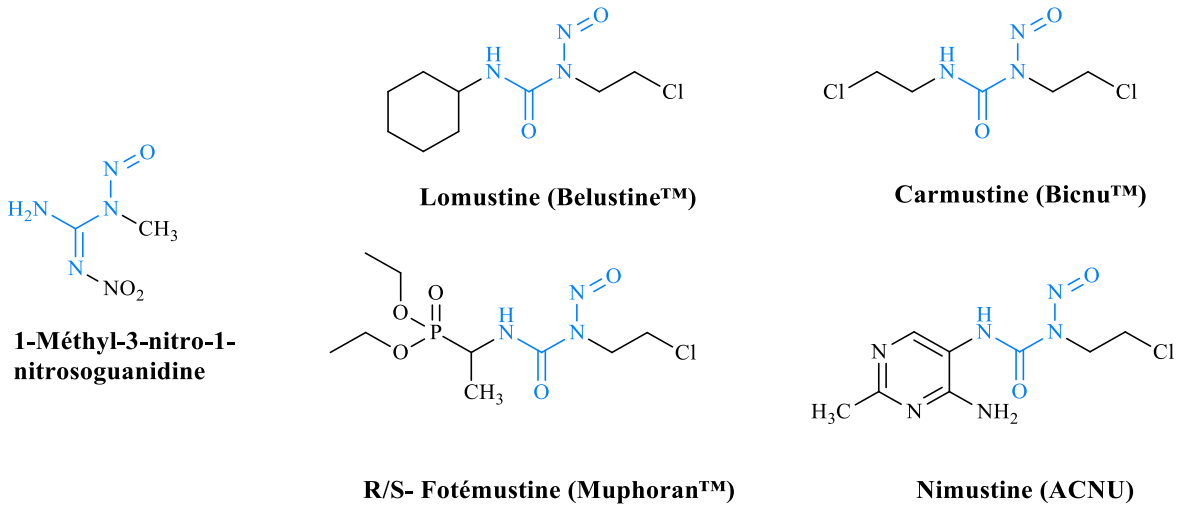


Figure 5 : Structure des médicaments de la famille des Nitrosourées

Les nitrosourées ont été largement étudiées d'un point de vue mécanistique.

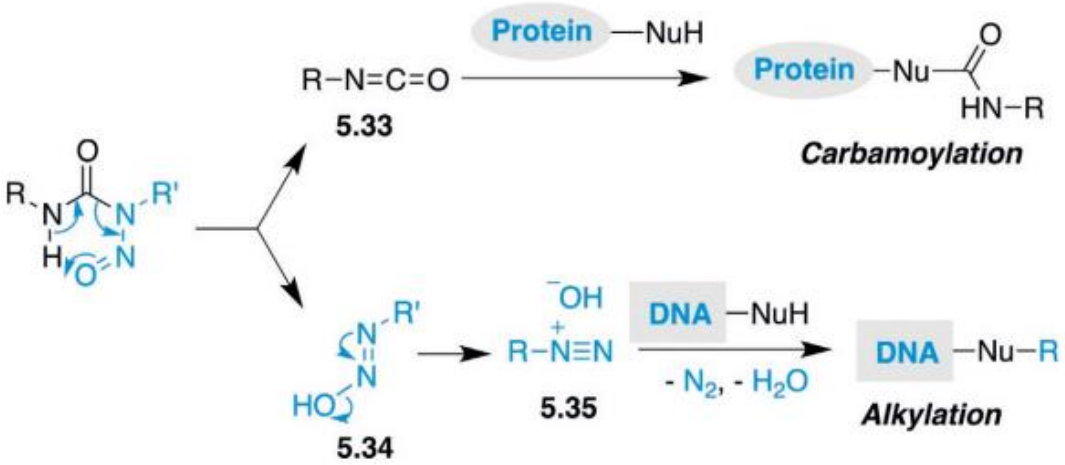


Schéma 2: Mécanisme d'action des médicaments nitrosourées[11]

L'instabilité du groupe nitroso, conduit à une décomposition spontanée en deux électrophiles : un isocyanate noté **5.33** et un diazène hydroxyde **5.34**. L'intermédiaire **5.34**, génère un sel de diazonium **5.35** (Schéma 2).[15] L'alkylation semble être la principale réaction responsable de l'activité antitumorale, tandis que la carbamoylation a lieu principalement sur les groupes amino dans les protéines, conduisant à l'inhibition de l'ADN.

I.3.2.2 Le témolozomide (Temodal™)

Le témozolomide est un agent alkylant de seconde génération, actif par voie orale, plus puissant et efficace que les médicaments traditionnels. C'est une prodrogue. Contrairement aux produits plus anciens, cette molécule passe la barrière hématoméningée, elle peut donc pénétrer dans le tissu cérébral et ainsi détruire les cellules tumorales. Le Témodal™ gélules est homologué, en France, pour le traitement des GBMs depuis 20 ans.



Figure 6 : Structure du Temodal™

I.3.3 Autres modalités d'administration

L'implant anti-cancéreux, le Gliadel®, constitué d'un polymère biodégradable imprégné d'une nitrosourée (Carmustin, Figure 5) est placé par le neurochirurgien pendant l'opération, à l'emplacement de la tumeur extraite dans le cerveau. La pose de ce gel apporte une amélioration mais n'affecte pas significativement la survie des patients en raison de la persistance de récidives du cancer. Le traitement n'est pas spécifique, la libération de la chimiothérapie est rapide et peu pénétrante dans les cellules cancéreuses.[16]

I.4 Choix de l'anticancéreux pour cette étude

Le traitement de référence des GBMs associe l'exérèse chirurgicale et la radiothérapie. La chimiothérapie est réalisée après la chirurgie, en complément de la radiothérapie ou seule, mais son efficacité reste limitée devant la difficulté de franchir la barrière hématoencéphalique. L'avancée remarquable de ces dernières années dans la prise en charge thérapeutique des GBM a été réalisé en 2005 avec un essai clinique à base de témozolomide (Temodal®), agent alkylant de dernière génération, associé à une radiothérapie concomitante également appelé « protocole Stupp ».

Le Témodal® est un agent alkylant proche de la dacarbazine. Le bénéfice de cette association a été démontré lors d'une étude réalisée par l'Organisation Européenne de recherche et traitement du cancer (EORTC) et l'Institut national du cancer au Canada (NCIC), en mettant en évidence une réduction du risque de décès de 37%.[17] Depuis le traitement par TMZ et radiothérapie est devenu le nouveau standard pour tout patient atteint d'un glioblastome.

En 2005, Stupp *et al.*[18] ont étudié 573 patients, âgés de 18 à 70 ans avec un diagnostic de GBMs. Ils ont été randomisés après le traitement chirurgical en deux groupes :

- Les patients du premier groupe ont reçu une radiothérapie seule à raison de 60 grays en 30 fractions.
- Les patients du second groupe ont reçu la même radiothérapie avec du témozolomide à 75 mg/m^2/jour, suivie d'une interruption d'un mois puis 6 cycles de témozolomide à 150-200 mg/m^2/jour à raison de 5 jours par mois.

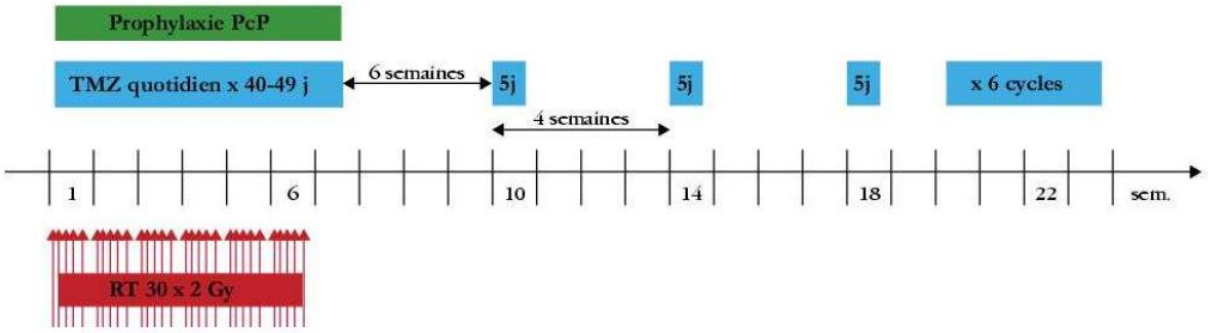


Figure 7 : Traitement combiné des glioblastomes selon EORTC-NCIC

Cette étude a montré que quelque soit l'âge du patient, le taux de survie à 2 ans est plus élevé dans le groupe combinant les deux traitements, 26,5 *versus* 10,4%. La survie médiane est de 14,6 versus 12,1 mois pour une même qualité de vie.

Pour ces raisons, nous avons sélectionné, dans un premier temps, en collaboration avec le Dr. Hélène Castel, biologiste dans l'unité de recherche (INSERM U1239, Université Rouen Normandie), le témozolomide (TMZ) dans notre étude.

Le témozolomide est un antinéoplasique, il appartient au groupe des agents alkylants (Figure 8). Sa structure est un bicycle aromatique, une imidazotétrazine.

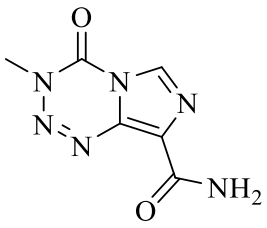


Figure 8 : Structure du témozolomide (TMZ)

Le TMZ est un agent de méthylation de l'ADN, passé en essai clinique en 1985[19] et mis sur le marché par Schering-Plough en 1999 sous les appellations Temodal® en Europe et Temodar® aux Etats Unis. Il existe 5 grands fournisseurs de témozolomide : Merck Sl Pharme,

Sun Pharma, Mayne Pharma, Schering-Plough et Cipla. En 2013, les ventes ont rapporté 1 milliards de $ sur l'année. Le TMZ a été largement utilisé en association avec la radiothérapie comme traitement du glioblastome en première intention et en situation de récidive. Le TMZ se présente sous une forme solide et commercialisée en présence d'excipients (lactose anhydre, silice colloïdale anhydre, carboxyméthylamidon sodique type A, acide tartrique et acide stéarique). Il est stable en milieu acide (pH inférieur à 5) et sa nature lipophile rend possible la pénétration de la barrière hémato-encéphalique (BHE) permettant une biodisponibilité par voie orale. Les principaux effets secondaires du témozolomide sont l'alopécie, l'asthénie, les nausées et vomissements, l'anorexie, les troubles digestifs et la toxicité hématologique (plaquettes et leucocytes essentiellement). Son administration est simple en comparaison à d'autres traitements anticancéreux. La concentration plasmatique maximale du TMZ est atteinte entre 0,33 et 2 heures. Sa biodistribution est excellente (Vd = 17 $L.m^{-2}$).[20] En 2010, le TMZ a atteint le statut de médicament « vedette » pour traiter les différents types de cancer du cerveau car il agit directement sur les cellules tumorales contrairement à d'autres agents chimiothérapeutiques qui exigent une activation métabolique pour exercer leurs effets et, par conséquent, engendrent une activité clinique variable d'un patient à un autre.

II. Références

[1] M. L. Bondy, M. E. Scheurer, B. Malmer, J. S. Barnholtz-Sloan, F. G. Davis, D. Il'yasova, C. Kruchko, B. J. McCarthy, P. Rajaraman, J. A. Schwartzbaum, S. Sadetzki, B. Schlehofer, T. Tihan, J. L. Wiemels, M. Wrensch, P. A. Buffler, On behalf of the Brain Tumor Epidemiology Consortium, *Cancer* **2008**, *113*, 1953–1968.

[2] H. Ohgaki, P. Kleihues, *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1445–1453.

[3] R. Stupp, M. Brada, M. J. van den Bent, J.-C. Tonn, G. Pentheroudakis, *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, iii93–iii101.

[4] E. Hulleman, K. Helin, *Adv. Cancer Res.* **2005**, *94*, 1–27.

[5] S. Agnihotri, K. E. Burrell, A. Wolf, S. Jalali, C. Hawkins, J. T. Rutka, G. Zadeh, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **2013**, *61*, 25–41.

[6] T. M. Kauer, J.-L. Figueiredo, S. Hingtgen, K. Shah, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 197–204.

[7] O. P. Erpolat, M. Akmansu, F. Goksel, H. Bora, E. Yaman, S. Büyükberber, *Tumori J.* **2009**, *95*, 191–197.

[8] M. S. Lesniak, H. Brem, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 499–508.

[9] M. Peyrone, *Ann. Chem. Pharm.* **1844**, *51*, 1–29.

[10] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.

[11] C. Avendaño, J. C. Menéndez, *Med. Chem. Anticancer Drugs* **2015**, 197–241.

[12] M. Yamamoto, A. Kurita, T. Asahara, A. Takakura, K. Katono, M. Iwasaki, S. Ryuge, M. Wada, S. Onoda, T. Yanaihara, M. Yokoba, H. Mitsufuji, Y. Nishii, T. Fukui, N. Masuda, *Oncology reports* **2008,** *20*, 727-730.

[13] A. Della Puppa, M. Rossetto, P. Ciccarino, L. Denaro, A. Rotilio, D. d'Avella, R. Scienza, *World Neurosurg.* **2011**, *76*, 156–159.

[14] M. Glas, T. Hundsberger, M. Stuplich, D. Wiewrodt, D. Kurzwelly, B. Nguyen-Huu, K. Rasch, U. Herrlinger, *Oncology* **2009**, *76*, 184–189.

[15] J. A. Montgomery, R. James, G. S. McCaleb, T. P. Johnston, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 668–674.

[16] M. Westphal, D. C. Hilt, E. Bortey, P. Delavault, R. Olivares, P. C. Warnke, I. R. Whittle, J. Jääskeläinen, Z. Ram, *Neuro-Oncol.* **2003**, *5*, 79–88.

[17] T. Gorlia, M. J. van den Bent, M. E. Hegi, R. O. Mirimanoff, M. Weller, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, K. Belanger, A. A. Brandes, A. Allgeier, D. Lacombe, R. Stupp, *Lancet Oncol.* **2008**, *9*, 29–38.

[18] R. Stupp, M. Weller, K. Belanger, U. Bogdahn, S. K. Ludwin, D. Lacombe, R. O. Mirimanoff, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *10*, 987-996.

[19] M. D. Threadgill, *Chem. Antitumour Agents* **1990**, 187–201.

[20] S. D. Baker, M. Wirth, P. Statkevich, P. Reidenberg, K. Alton, S. E. Sartorius, M. Dugan, D. Cutler, V. Batra, L. B. Grochow, R. C. Donehower, E. K. Rowinsky, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 309–317.

Partie 2 : Le diagnostic

I. Techniques d'imagerie médicale

Les progrès récents en imagerie médicale sont basés sur l'utilisation de rayonnements électromagnétiques pour obtenir les informations désirées, en évitant tout prélèvement sur l'organisme. Ces techniques utilisent des rayonnements répartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique : les rayons gamma dans le cas de l'imagerie nucléaire, les rayons X, les ondes radio et microondes dans le cas de l'échographique et l'IRM (en complément de l'application d'un champ magnétique) et enfin les rayonnements infrarouges dans le cas de l'imagerie de fluorescence *in vivo* (Figure 9).

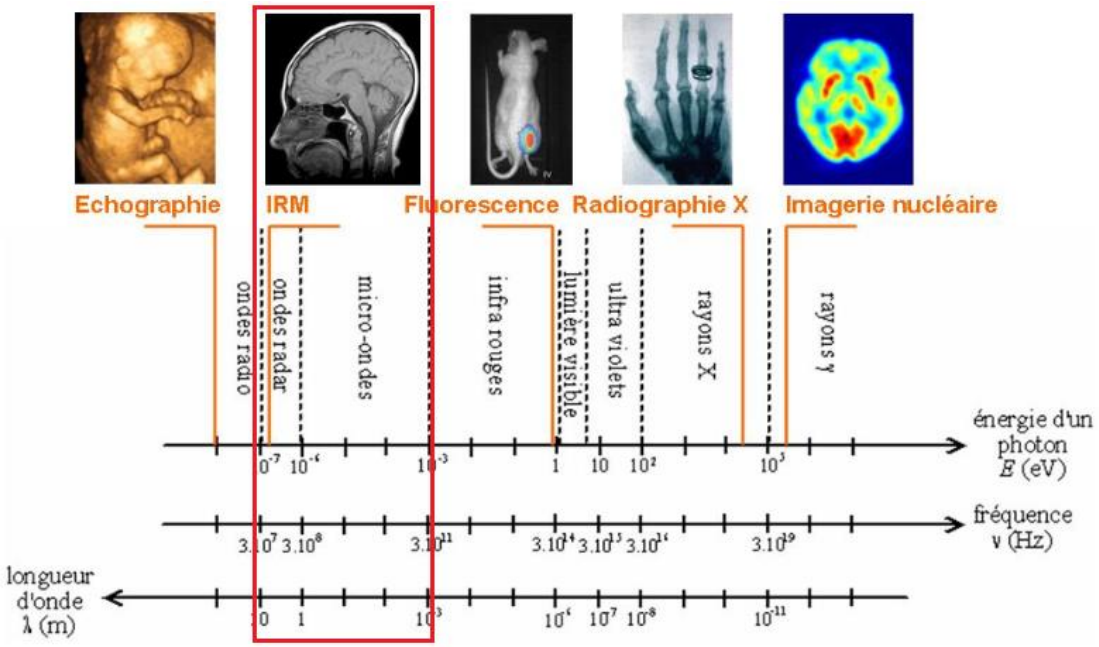


Figure 9 : Représentation des différentes modalités d'imagerie en fonction de la nature des ondes électromagnétiques[21]

Nous allons présenter de manière succincte chaque type d'imagerie médicale et biomédicale existante avec ses avantages et ses inconvénients. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), méthode utilisée lors de cette thèse.

I.1 Les rayons X

La radiographie par rayons X est la plus ancienne technique d'imagerie médicale découverts à la fin du XIXème siècle par le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen. C'est une technique d'imagerie structurelle, rapide et efficace offrant une résolution de quelques

dizaines de micromètres (10 à 100 µm)[22] sans limite de profondeur. Cependant, si cette technique offre un excellent contraste entre les os et les tissus mous, le contraste entre les différents tissus mous est faible et rend difficile la localisation de certaines tumeurs comme les tumeurs du sein. L'utilisation d'un agent de contraste à base d'iode, qui a la propriété d'absorber les rayons X, permet d'améliorer ce contraste. Cependant, ce pouvoir contrastant reste faible et nécessite l'injection d'une forte quantité d'agent de contraste. De plus, les rayons X sont des rayonnements ionisants et leur utilisation nécessite des précautions et l'analyse ne peut pas être répétée trop souvent.

I.2 L'échographie

L'échographie est une technique d'imagerie en coupe utilisant les ultrasons et permet de réaliser de l'imagerie structurelle dédiée à l'analyse des tissus « mous » tels que les viscères abdominaux, les seins, la thyroïde, les articulations (tendons et ligaments), la prostate. Ces ultrasons peuvent également servir dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle, notamment pour la mesure des flux sanguins grâce à l'échographie Doppler. L'utilisation d'un agent de contraste (microbulles d'air ou d'un autre gaz) permet d'améliorer le contraste de l'imagerie ultrasonore. L'utilisation des ultrasons est sans danger, c'est pourquoi cette modalité d'imagerie est particulièrement employée pour imager les fœtus. Cette technique est rapide, peu coûteuse et peu encombrante. La résolution peut être très précise (10 à 500 µm selon la sonde)[22], mais elle diminue lors de l'observation de zones profondes, tels que les os qui ne laissent pas passer les ondes ultrasonores.

I.3 L'imagerie nucléaire

La médecine nucléaire repose sur la détection de la désintégration de traceurs radioactifs injectés dans le corps. Ces traceurs se décomposent en photons γ qui sont détectés. Ce type d'imagerie nécessite donc l'utilisation d'un « radiotraceur » c'est-à-dire une molécule fonctionnelle, dont on cherche à connaître le trajet ou les sites de fixation, et dont l'un des atomes est radioactif. Deux technologies basées sur des radioéléments différents sont actuellement utilisées : la tomographie à émission de positrons (TEP, ou PET en anglais pour « Positron Emission Tomography ») et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP, ou SPECT en anglais pour « Single Photon Emission Tomography »). Les agents de contraste utilisés sont le plus souvent des radiopharmaceutiques (molécules substituées par un

radioélément). La TEP utilise des isotopes émettant des positrons, comme le fluor 18 (^{18}F), l'oxygène15 (^{15}O), le carbone 11 (^{11}C) et l'azote 13 (^{13}N). Tous ces éléments ont une durée de vie inférieure à deux heures. La TEMP utilise des traceurs émetteurs gamma ou émettant des photons X comme le technétium 99m (^{99m}Tc), l'indium 111c (^{111c}In) et l'iode 123 (^{123}I). Ces techniques sont très sensibles et elles présentent de bonnes résolutions spatiales (1-2 mm). Cependant, elles nécessitent l'injection de radiopharmaceutiques qui doivent être synthétisés juste avant l'analyse du fait de leur courte durée de vie (de l'ordre de quelques dizaines de minutes). Un radiopharmaceutique couramment utilisé est l'iode radioactif qui se fixe sur la thyroïde et permet d'obtenir des images de cet organe. Le fluoro-désoxyglucose dont un hydroxyle a été remplacé par un atome de fluor radioactif permet d'étudier l'activité cérébrale ou certaines tumeurs dont le métabolisme glucidique est déréglé.[23]

I.4 L'imagerie par fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une technique non invasive, fréquemment utilisée dans le domaine biomédical, notamment à l'échelle moléculaire (ADN ou protéine) ou cellulaire. C'est une méthode très sensible mais qui présente une faible résolution spatiale et une profondeur de détection limitée (1-2 cm)[22] liée à la mauvaise diffusion du rayonnement lumineux lors de la traversée des tissus et à l'absorption des tissus. La gamme spectrale optimale est le proche IR (900 à 6650 nm) là où l'hémoglobine et l'eau absorbe le moins et où la diffusion des tissus est moindre. C'est une méthode rapide, peut coûteuse pour imager des molécules ou des cellules chez le petit animal. Elle constitue, ainsi, une méthode complémentaire à l'IRM ou à la médecine nucléaire.[24] De plus, son faible temps d'acquisition en fait la technique d'imagerie moléculaire la mieux adaptée aux méthodes de « screening ».

II. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Le traitement de référence du GBM repose sur l'association radiothérapie + témozolomide administrés concomitamment et en adjuvant par le radiothérapeute. L'objectif est donc d'irradier le volume cible de la tumeur avec une très forte précision et une dose adaptée tout en épargnant au maximum les régions avoisinantes considérées comme saines. Aujourd'hui, les volumes cibles sont définis à l'aide de l'IRM cérébrale en coupes fines, de séquences en T1 après injection d'agent de contraste au gadolinium et de séquences en T2, appelées aussi T2/FLAIR.

II.1 Principe de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Basée sur les propriétés magnétiques de la matière, l'IRM est une technique moderne qui a révolutionné le monde de l'imagerie médicale en offrant des possibilités d'exploration du corps humain très complètes, avec une grande précision anatomique dans toutes les directions, et avec des conséquences limitées pour le patient. L'IRM est cependant utilisé en second recours après des explorations préalables plus accessibles telles que l'échographie (ultrasons), la radiographie standard ou bien le scanner (rayons X). Le principe de fonctionnement de l'IRM est basé sur un phénomène physique qui exploite les propriétés magnétiques intrinsèques des atomes caractérisés notamment par un vecteur de magnétisation à l'image de l'aiguille d'une boussole (Figure 10).

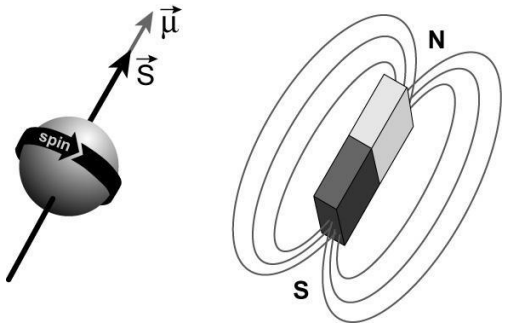


Figure 10 : Représentation d'un atome sous un champ magnétique

Ce vecteur, qui a une orientation aléatoire dans l'espace, lorsqu'il est soumis à un champ magnétique élevé, s'oriente parallèlement au champ magnétique et se maintient ainsi dans une position d'équilibre. Lorsqu'il est excité par une onde radio (onde de radiofréquence RF) à une fréquence particulière (fréquence de Larmor) qui dépend du type d'atome et du champ magnétique, l'atome excité (phénomène de résonance) bascule son vecteur d'aimantation d'un certain angle. L'intensité et la durée de l'onde RF influencent l'angle de basculement. A l'arrêt de l'onde RF, le vecteur des atomes revient à sa position d'équilibre (phénomène de relaxation) tout en émettant un signal qui est recueilli par des antennes réceptrices. Ce phénomène physique trouve deux domaines principaux d'application, la spectroscopie par résonance magnétique (RMN) et l'imagerie médicale, l'IRM.

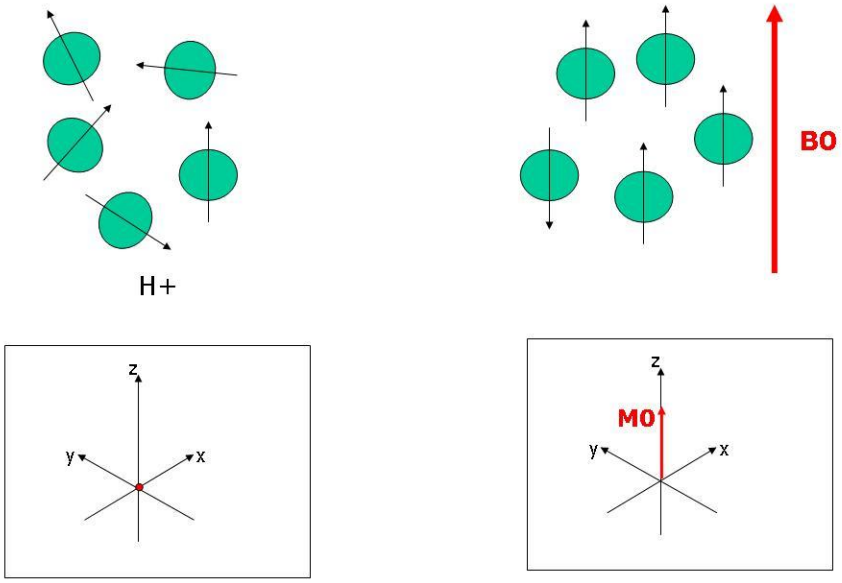


Figure 11 : Orientation des protons en absence (gauche) et en présence (droite)

Lors d'une IRM, des impulsions brèves et variées d'ondes de radiofréquences (RF) sont envoyées par des antennes disposées à proximité de la zone à analyser. L'atome excité est le proton, principal constituant de la molécule d'eau, élément présent à environ 65 % dans le corps. Les signaux recueillis par l'appareil vont être analysés afin de reconstruire une image en coupes. Les images peuvent être acquises soit directement par des techniques de coupes en 2 dimensions (2D), soit par acquisition d'emblée d'un volume 3D avec reconstructions secondaires de coupes 2D (Figure 12).

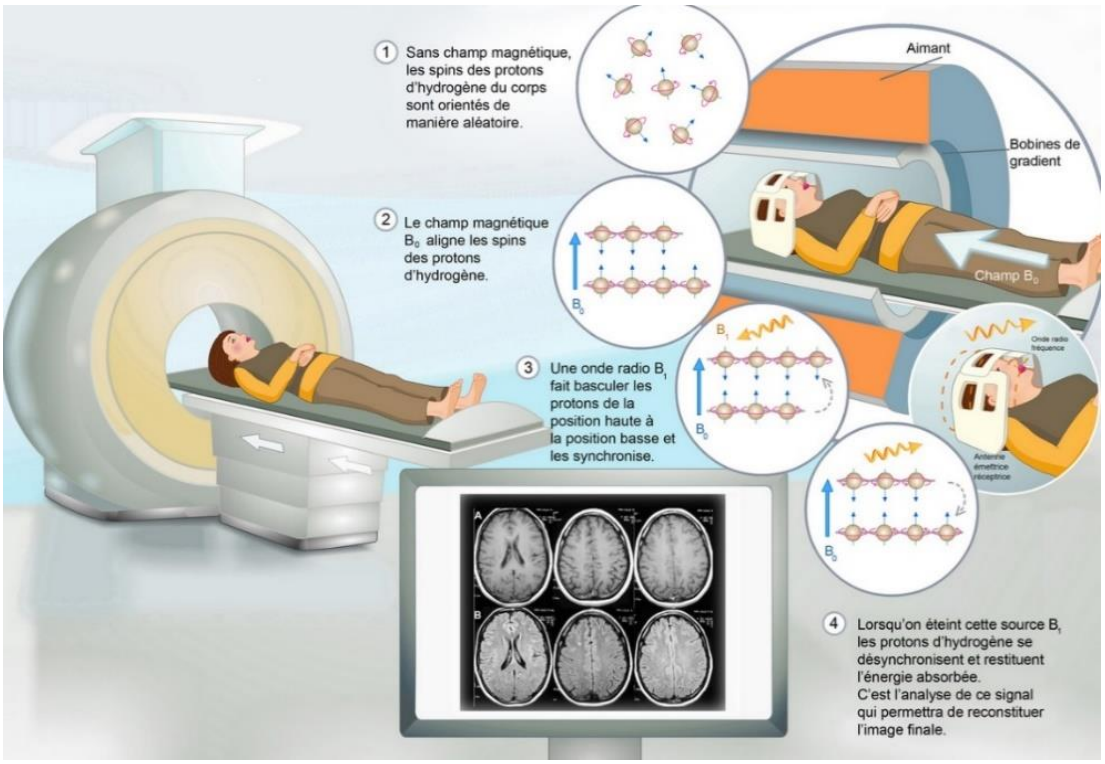


Figure 12 : Les différentes étapes d'une analyse IRM[25]

Plus le signal en provenance d'un point donné du corps est intense, plus le point correspondant de l'image est blanc et inversement. L'intensité du signal dépend des paramètres physiques magnétiques propres à chaque tissu. Ces paramètres appelés temps de relaxation correspondent à la période de retour à l'équilibre (relaxation) des atomes d'hydrogène après leur excitation (résonance) par l'onde de radiofréquence. Les temps de relaxation varient en fonction des interactions entre le proton et les molécules qui l'environnent. L'IRM est fondée sur le codage en niveaux de gris du temps de relaxation des protons de l'eau.

On peut obtenir des images complémentaires codées/pondérées en T1 et T2. Le codage des images en T1 implique que plus le temps de relaxation est court, plus l'image est claire. Le codage T2 implique que plus le temps de relaxation est court, plus l'image est sombre.[26]

Les différentes séquences d'excitation (pondération T1, T2, ou densité de protons), permettent de différencier facilement des structures liquides, solides, la graisse, les tissus tumoraux. Cependant, les éléments contenant du calcium (os et calcifications) étant dépourvus d'eau n'émettent pas de signal et restent noirs.

L'imagerie IRM est l'une des méthodes les plus largement utilisée pour le diagnostic et la recherche médicale. En effet, elle présente plusieurs avantages : une très haute résolution spatiale et temporelle, une pénétration tissulaire importante, elle n'utilise pas de rayons ionisants et elle est non invasive.

II.2 Les agents de contraste (ACs)

Les agents de contraste (ACs) sont des molécules utilisées en IRM pour mieux visualiser certaines lésions, augmenter la sensibilité et ainsi obtenir des images mieux résolues. Le premier agent de contraste est apparu en 1988 sous forme de complexe de Gadolinium (III), développé et commercialisé par le laboratoire Bayer Schering sous le nom de Magnevist®. Depuis, ces agents de contraste sont devenus des outils indispensables pour le diagnostic et sont utilisés dans 40% des analyses cliniques en IRM. L'injection des ACs a permis d'améliorer le contraste c'est-à-dire la qualité des images anatomiques du corps et en particulier, la différenciation entre les tissus sains et malades.[27,28]

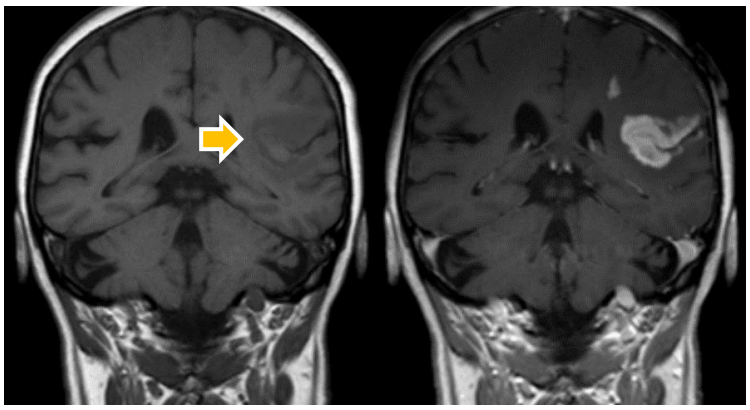


Image 1 : Coupe de cerveau par IRM sans (gauche) et avec (droite) injection intraveineuse d'un agent de contraste à base de gadolinium (DOTAREM®, 0,1 mmol/kg). Image issue du site internet[29]

Les ACs sont classés suivant deux grandes familles qui se distinguent par leur capacité à diminuer soit le T1 (agents T1 ou agents de contraste positifs), soit le T2 (agents T2 ou agents de contraste négatifs).

II.2.1 Les agents de contraste positifs

Ces agents de contraste ont pour rôle de réduire le temps de relaxation T1 du proton. Ils sont caractérisés par une valeur appelée relaxivité r_1. Plus leur concentration et leur relaxivité sont importantes, plus les zones où se retrouvent ces agents apparaissent claires. Du fait de ses

propriétés paramagnétiques, l'ion gadolinium (Gd^{3+}) a été retenu depuis les années 1980 pour la conception d'agents de contraste T1.[30] Le gadolinium est le 8ème élément de la famille des lanthanides. Il est très utilisé en IRM pour ses propriétés paramagnétiques, car il possède sept électrons non appariés. Le gadolinium sous sa forme libre est très toxique. En effet, son rayon ionique (107,8 pm) est proche de celui de l'ion calcium Ca^{2+} (114,0 pm), il peut alors entrer en compétition avec ce dernier qui est essentiel dans de nombreux processus biologiques. En effet, le calcium est connu pour être un bloqueur inorganique des canaux calciques et un inhibiteur de l'activité des certaines enzymes telles que les ATPases, les kinases.

L'utilisation de l'agent de contraste nécessite donc la coordination de l'ion Gd^{3+} par un ligand organique multidenté et chargé pour former un complexe thermodynamiquement stable et cinétiquement inerte. De nombreux agents de contraste cycliques sont commercialisés (Figure 13).

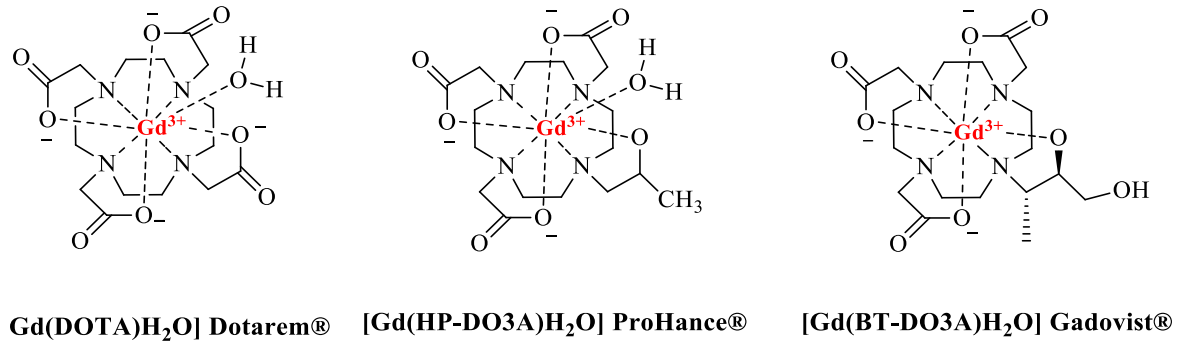


Figure 13 : Structure d'agents de contraste T1 cycliques commercialisés

L'AC le plus utilisé en clinique est le Gd-DOTA (acide 1,4,7,10-tétraacétique-1,4,7,10-tétraazacyclododécane) commercialisé sous le nom de DOTAREM par le laboratoire Guerbet (Figure 13). Dix millions d'injections d'AC pour le diagnostic sont réalisées chaque année en France.

II.2.2 Les agents de contraste négatifs

Les agents de contraste négatifs, de type T2 sont composés de nanoparticules d'oxyde de fer Fe_3O_4 qui leur confèrent des propriétés particulières en IRM. Ces nanoparticules sont obtenues par précipitation de chlorure ferreux ($FeCl_2$) et de chlorure ferrique ($FeCl_3$) à pH basique, ou de maghémite (γFe_2O_3) provenant de l'oxydation de la magnétite dans l'acide nitrique en présence d'ions nitrates.

Après synthèse, les nanoparticules sont dispersées dans une solution tampon à pH physiologique en présence d'un agent stabilisant. Ces agents stabilisants sont adsorbés à la surface des nanoparticules et assurent soit une stabilisation stérique (c'est le cas pour le dextrane, l'aminosilane, la gélatine, les phospholipides), soit une stabilisation électrostatique (en présence d'ions citrate).

On peut classer les nanoparticules d'oxyde de fer en trois catégories :

- Les SPIO (*Super-Paramagnetic Iron Oxides*) qui possèdent une taille comprise entre 50 nm et 3,5 µm.
- Les USPIO (*Ultrasmall Super-Paramanetic Iron Oxides*) qui mesurent entre 3 et 50 nm.
- Les MPIO (Micron-Sized Iron Oxyde Particule) dont la taille se situe entre 10 et 30 nm.

Dans la famille des SPIO, deux composés dont la taille moyenne est d'environ 60 nm sont commercialisés : Endorem® par le laboratoire Guerbet stabilisé par du dextrane, et le Resovist® par le laboratoire Schering, stabilisé par du carboxydextrane. Les applications cliniques utilisant ces produits concernent la détection de tumeurs hépatiques.

Dans la famille des USPIO, des nanoparticules stabilisées par du dextrane sont commercialisées (Ferumoxtran®/Sinerem®/Combidex®) pour l'imagerie du système lymphatique.

II.3 Toxicité des agents de contraste

Le gadolinium sous sa forme libre Gd^{3+} présente une toxicité accrue pour l'organisme. Les agents de contraste actuellement commercialisés provoque cependant des phénomènes d'allergies chez certains patients comme l'urticaire, l'angioedème, le bronchospasme, l'hypotension, un choc anaphylactique ou l'hypocalcémie.

En 2006, Grobnera *et al*.[31] ont évoqué, pour la première fois, le lien entre la présence de Gd^{3+} dans le corps et l'apparition d'une maladie appelée Fibrose Systémique Néphrogénique (FSN). Cette maladie apparait majoritairement chez des personnes souffrant d'insuffisance rénale qui éliminent alors difficilement l'agent de contraste. La FSN devient mortelle lorsque la fibrose atteint des tissus du cœur tels que le myocarde et péricarde ou les poumons.

De nombreuses études ont montré que la toxicité de ces ACs était directement liée à la libération du Gd^{3+} libre dans l'organisme qui se dépose alors dans les os, mais aussi dans les organes tels que le foie, les reins, la peau mais aussi le cerveau.[32] McDonald *et al.*[33] ont observé la présence de gadolinium dans le cerveau humain, après des administrations répétées d'agents de contraste à base de gadolinium (GBCA). Ils ont effectué 13 autopsies sur des échantillons, provenant de patients avec un taux de filtration glomérulaire de 49 ml/m/1,73 m^2 ou plus, qui avaient reçu au moins quatre administrations de gadodiamide (chélate linéaire non ionique). Ils ont trouvé du gadolinium à l'intérieur du tissu nerveux, dans le globus pallidus, dans le thalamus et démontré une relation directe entre la quantité de gadolinium retenu dans le cerveau et le nombre d'injections de GBCA. La plupart des dépôts de gadolinium ont été observés dans les couches endothéliales des vaisseaux cérébraux et une partie variable d'entre eux (18–42%) a été localisée dans l'interstitium extracellulaire.

En conséquence, en 2017, la Comité de pharmacovigilance et d'évaluation des risques (PRAC) de l'European Medicines Agency (EMA) a demandé la suspension des autorisations de mise sur le marché des agents de contraste possédant des ligands de structure linéaire. Leurs études ont apporté des preuves convaincantes de l'accumulation du gadolinium dans les tissus cérébraux *via* des zones d'intensité de signal plus élevées observées sur les images IRM plusieurs mois après la dernière injection.

Les produits concernés sont :

- Omniscan® (gadodiamide)
- Optimark® (gadoversetamide)
- Magnevist® (gadopentate)
- Multihance® (acide gadobénique)

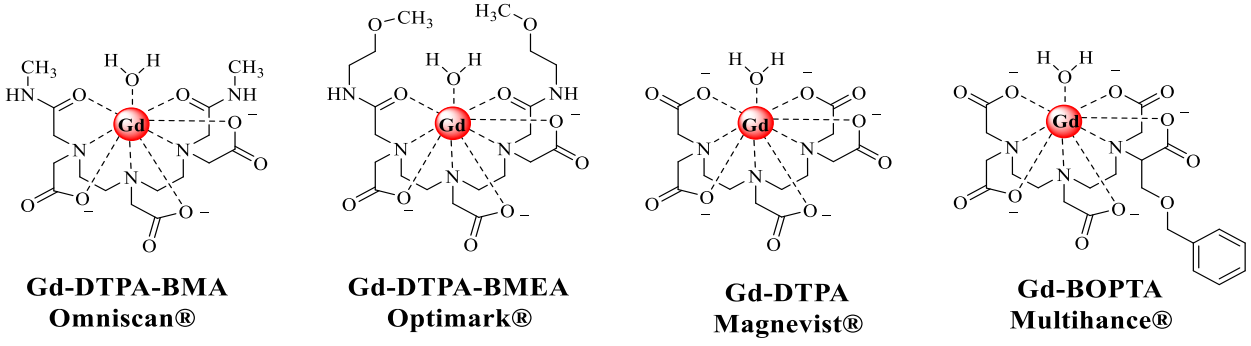


Figure 14 : Structure d'agents de contraste T1 linéaires interdits

Afin de pallier ce problème, il est indispensable de mettre au point des agents possédant des ligands plus coordinants, limitant la libération du gadolinium libre dans l'organisme. La conception de ces agents de contraste plus efficaces et moins toxiques représente un vrai défi. En effet, 'augmentation des concentrations en agent de contraste lors de l'injection aux patients permet certes, d'améliorer la qualité de l'image, mais peut entraîner un risque de toxicité aigüe.

L'efficacité d'un agent de contraste est caractérisée par une valeur appelée « relaxivité » notée r, reflétant sa capacité à augmenter les vitesses de relaxation des protons des molécules d'eau environnantes. Un agent de contraste est d'autant plus efficace que la valeur de la relaxivité est élevée. Plusieurs paramètres déterminant la relaxivité sont influencés par la structure du complexe. Afin de les mettre en évidence, nous allons détailler les mécanismes à l'origine de l'efficacité des complexes de Gd^{3+} en IRM.

II.4 La relaxivité

L'efficacité des agents de contraste T1 et T2 est exprimée par des valeurs appelées relaxivité, notées r_1 et r_2, respectivement. Ces valeurs doivent être les plus élevées possible et sont proportionnelles à la concentration du complexe en solution et inversement proportionnelle au temps de relaxation.[34,35] D'une manière générale, on peut définir la relaxivité de la façon suivante :

$$1/T_{n(obs)} = 1/T_{n,d} + 1/T_{n,p} \qquad \textit{Equation (I)}$$

$1/T_{n(obs)}$: vitesse de relaxation longitudinale (n=1) ou transversale (n=2) observée

$1/T_{n,d}$: vitesse de relaxation longitudinale (n=1) ou transversale (n=2) diamagnétique

$1/T_{n,p}$: vitesse de relaxation longitudinale (n=1) ou transversale (n=2) paramagnétique

La relaxivité de la sphère interne (inner sphere = IS), r^{IS}, est due à la molécule d'eau directement liée au cation métallique, c'est ce paramètre qui gouverne la relaxivité de l'agent de contraste.

$$r\,[AC] = (1/T_{n,p}) \qquad \textit{Equation (II)}$$

r : relaxivité

[AC] : concentration en agent de contraste

$1/T_n$: vitesse de relaxation longitudinale (n = 1) ou transversale (n = 2)

La relaxation des protons d'une solution contenant des complexes de gadolinium est dominée par l'interaction dipolaire entre le spin paramagnétique nucléaire des protons des molécules d'eau et le spin paramagnétique électronique des ions Gd^{3+}. Cette interaction varie avec la distance entre les deux spins.

La relaxivité dépend principalement de l'environnement aqueux autour du gadolinium. On peut ainsi définir plusieurs sphères d'hydratation autour du complexe métallique (la sphère interne, la seconde sphère et la sphère externe) (Figure 15).

$$(1/Tn)_{para} = (1/Tn)^{IS} + (1/Tn)^{OS} + (1/Tn)^{2S} \quad (n = 1,2) \qquad \textit{Equation (III)}$$

$$r_{n\,(n=1,2)} = r^{IS} + r^{OS} + r^{2S} \qquad \textit{Equation (IV)}$$

r_n : relaxivité longitudinale (n = 1) ou transversale (n = 2)

r_n^{IS} : relaxivité longitudinale (n = 1) ou transversale (n = 2) de la sphère interne

r_n^{OS} : relaxivité longitudinale (n = 1) ou transversale (n = 2) de la sphère externe

r_n^{2S} : relaxivité longitudinale (n = 1) ou transversale (n = 2) de la seconde sphère

La relaxivité de la sphère externe (outer sphere = OS), r^{OS} est engendrée par la diffusion translationnelle aléatoire des molécules d'eau dans l'environnement indirect du complexe.

Enfin, la relaxivité de la seconde sphère (2S), r^{2S} est générée par les molécules d'eau qui interagissent par liaisons hydrogène avec certaines fonctions du ligand ou de la sphère interne. Cette dernière est souvent négligée ou est inclue dans la contribution de la sphère externe, car elle est considérée comme bien plus faible que les deux autres.[36]

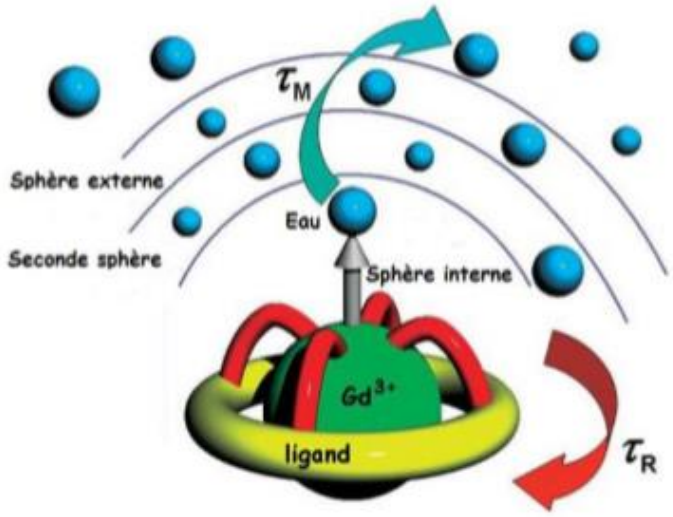


Figure 15 : Représentation d'un complexe de gadolinium en solution[30]

La contribution de chacune des sphères sur la relaxivité globale dépend de la structure du complexe, incluant des paramètres tels que sa taille et la présence d'accepteur de liaisons hydrogène. Cependant, le principal mécanisme de relaxivité résulte de la contribution des molécules d'eau de la sphère d'hydratation interne (inner sphere IS).

II.4.1 Relaxivité de la sphère interne

La relaxivité due à la contribution de la sphère d'hydratation interne dépend de quatre facteurs tels que le nombre des molécules d'eau de la sphère d'hydratation interne (q), le temps de corrélation rotationnel qui caractérise la réorientation du vecteur ion métallique-proton (τ_r), la distance gadolinium-proton (r_{Gd-H}) et le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne (τ_m) (Figure 15). La relaxivité de cette sphère est décrite par l'équation (V) suivante :

$$r^{IS} = q / [H_2O] \times (T_{lm} + \tau_m) \qquad \textit{Equation (V)}$$

r^{IS} : relaxivité de la Sphère Interne

q : nombre de molécule d'eau liées directement au Gd(III)

$[H_2O]$: concentration de l'eau en millimolaire (mM)

T_{lm} : temps de relaxation longitudinal de l'atome d'hydrogène des molécules d'eau liées

τ_m : temps de résidence de la molécule d'eau dans la sphère interne

II.4.1.1 Le nombre d'hydratation « q »

Le nombre d'hydratation q correspond au nombre de molécules d'eau directement coordinées au gadolinium. Le gadolinium est nonacoordiné. Etant toxique à l'état libre, son utilisation implique sa chélation par des ligands assurant ainsi sa stabilité thermodynamique. Un nombre important de molécules d'eau liées à l'ion métallique (q = 2, 3) influence positivement la valeur de la relaxivité, mais peut diminuer la stabilité du complexe et, par conséquent, entraîner une libération du Gd^{3+} paramagnétique toxique. Pour ces raisons, seuls des agents de contraste comportant uniquement une molécule d'eau (q = 1) dans leur sphère interne sont utilisés actuellement en clinique.

Par exemple, un bras carboxylate du DOTA a été éliminé pour former le DO3A (Figure 16). Le nombre de molécules d'eau a ainsi été doublé dans la sphère interne mais une diminution de la stabilité du complexe a été observée.[37] En effet, ce nouvel agent de contraste (Gd-DO3A) a montré une stabilité thermodynamique à 25˚C (log K = 21,0) inférieure à celle du Gd-DOTA (log K = 25,3).

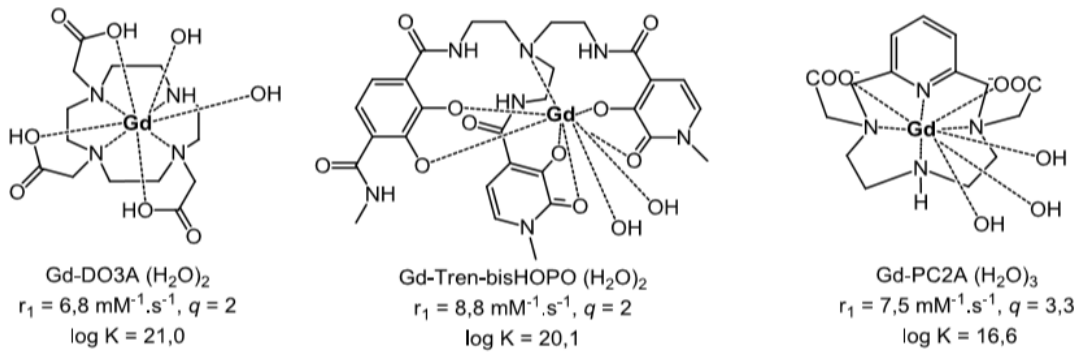


Figure 16 : Influence des molécules d'eau sur la relaxivité des complexes

Tableau 1 : Valeurs des constantes de stabilité des différents complexes de Gd

	Gd-DTPA (H_2O)	**Gd-DOTA (H_2O)**[38]	**Gd-DO3A (H_2O)$_2$**	**Gd-Tren-bisHOPO (H_2O)$_2$**	**Gd-PC2A (H_2O)$_2$**
Log K	22,2	25,3	21,0	20,1	16,6

Ce nombre d'hydratation ou degré d'hydratation q peut être calculé à partir de plusieurs techniques. La méthode la plus fréquemment utilisée repose sur la mesure du temps de vie de luminescence des complexes d'europium (Eu^{3+}) ou de terbium (Tb^{3+}) dans l'eau et dans le D_2O *via* l'équation Horrocks et Supkowski :

$$q = 1.11 \times (\tau^{-1}_H - \tau^{-1}_D - 0{,}31) \qquad \textit{Equation (VI)}$$

τ_H : temps de vie de luminescence dans l'eau
τ_D : temps de vie de luminescence dans du D_2O
q : nombre d'hydratation

II.4.1.2 Le temps de corrélation rotationnel (τ_r)

Plus ce temps de corrélation τ_r est long, meilleure est la relaxivité. En IRM, la fréquence de Larmor des appareils se situe entre 40 et 65 MHz. Une augmentation du temps de corrélation permet de s'approcher de cette fréquence de Larmor permettant ainsi une diminution de T1. L'augmentation du temps de corrélation peut être obtenue par l'utilisation de macromolécules comme les polymères,[39,40] les protéines,[41,42] les dendrimères,[43] les nanoparticules.[44] L'augmentation du poids moléculaire engendre une augmentation de la relaxivité jusqu'à une certaine limite.[45] La vitesse de rotation très élevée des complexes Gd(III) représente un facteur limitant pour obtenir de fortes relaxivités aux champs magnétiques utilisés à l'heure actuelle en IRM (1,5 – 3 T). Les efforts de recherche se sont donc concentrés pour réduire cette vitesse de rotation en fonctionnalisant le complexe avec des macromolécules encombrantes (cyclodextrines, polymères, dendrimères) empêchant ainsi sa libre rotation.[46]

II.4.1.3 La distance gadolinium-proton (r_{Gd-H})

La relaxivité de la sphère interne d'un agent de contraste est fortement liée à la distance Gd-H selon le terme (1/r6). Une diminution de 0,1 Å de cette distance entraîne une augmentation de 20% de la relaxivité de sphère interne.[35] Pour influencer la relaxivité, il faut donc diminuer la distance Gd-H *via* une diminution de l'angle d'inclinaison entre la molécule

d'eau liée et la liaison métal-oxygène. Cependant, la réalisation et l'efficacité de telles modifications structurales sont difficiles à évaluer car la détermination exacte de la distance Gd-H reste complexe.[47] Dans la littérature, les valeurs de ces distances se situent entre 2,7 et 3,3 Å.[48]

II.4.1.4 Le temps moyen de résidence des molécules d'eau dans la sphère interne (τ_m)

Le temps moyen de résidence τ_m caractérise la vitesse d'échange de la molécule d'eau dans la sphère de coordination du métal avec les molécules extérieures (solvant). Plus la vitesse d'échange est rapide, plus le temps de résidence est court et meilleure sera la relaxivité.

Cet échange rapide est un paramètre clé car il permet de propager le phénomène de relaxation nucléaire vers les molécules d'eau du solvant. L'échange doit être rapide pour qu'un maximum de molécules soit affecté. Cependant, un échange trop rapide peut avoir un effet négatif car si le contact entre le spin nucléaire du proton et le spin électronique du métal est trop court, il conduit à une diminution de la relaxivité.

Le temps de résidence de la molécule d'eau dans la sphère pour une efficacité optimale se situe entre 10 et 100 nanosecondes. En effet, en 1962, Swift et Connick[49] ont montré que la vitesse d'échange des molécules d'eau pouvait être déduite de la mesure de la vitesse de relaxation transversale de l'^{17}O sur des solutions diluées à base d'ions paramagnétiques. Ce paramètre a été étudié sur une large gamme de complexes de Gd^{3+}.

II.5 Les avantages de l'IRM

Comparée aux autres modalités d'imagerie (Tableau 2), l'IRM offre de meilleurs images anatomiques et fonctionnelles à haute résolution spatiale et temporelle.

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques des différentes techniques d'imagerie

Techniques	**Rayon X**	**Echographie**	**IRM**	**Médecine nucléaire**	**Imagerie par fluorescence**
Détection	Rayon X	Ultrasons	RMN ^{1}H	Photons γ	Lumière visible, proche infrarouge
Résolution spatiale	1 mm	50 µm	1 0-100 µm	1-2 mm (SPECT) 1-2 mm (PET)	2-3 mm
Profondeur	Pas de limite	cm	Pas de limite	Pas de limite	2-5 cm
Agent de contraste	Iode	Micro-bulles	Gd^{3+} Nanoparticules d'oxyde de fer (SPIO, USPIO)	PET (^{11}C, ^{18}F, ^{64}Cu) SPECT (^{99m}Tc, ^{123}I, ^{111}In)	Protéines fluorescentes et fluorophores
Temps d'acquisition d'une image	30 ms (radiologie)	25 ms 50 ms (Doppler)	1 min (image 3D)	15 min (SPECT) 45 min (PET)	Quelques secondes
Coût d'un appareil	Moins d'1 million	40 000 à 150 000 euros	1,5 millions	Cyclotron 2 millions	Environ 100 000 euros

Pour un diagnostic spécifique du cancer, un agent de contraste ciblé est nécessaire pour aider à distinguer les tissus malins des tissus normaux. Il convient de noter que les agents de contraste en IRM produisent un contraste d'image en affectant les propriétés de relaxation des protons des molécules d'eau, alors que pour les autres modalités d'imagerie telles que le PET, le SPECT et la fluorescence, la détection est liée directement aux sondes d'imagerie à base d'agents radioactifs ou d'ondes électromagnétiques de haute énergie est directe.

III. Exemples de médicaments théranostiques commercialisés

La médecine personnalisée connaît un essor fulgurant, depuis l'approbation, en 1998 par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, des agents théranostiques. Un avantage significatif pour la théranostique est la meilleure tolérance des patients à ces nouveaux agents comparés à la chimiothérapie. En effet, ces composés ont un impact significatif sur de nombreux cancers, non seulement en améliorant la qualité de vie du patient, mais aussi en termes de survie. Dans cette partie, nous allons présenter quelques agents théranostiques approuvés par la FDA et des agents actuellement en phase clinique.

III.1 Naissance du théranostique : Herceptin® et HercepTest®

Le 25 septembre 1998, jour clé pour la théranostique, la FDA a approuvé la combinaison de l'Herceptin® de Genentech avec l'HercepTest® de DakoCytomation pour le traitement du cancer du sein de stade IV et pour le diagnostic de la surexpression de HER2, respectivement.

L'Herceptin® cible la protéine HER2, qui est surexprimée dans 25% à 30% des cancers du sein. L'Herceptin® ou le Trastuzumab est un anticorps monoclonal humanisé contre HER2 qui est efficace en se liant à HER2 exprimée à la surface cellulaire des cellules tumorales. Les médecins utilisent le HercepTest® pour détecter les tumeurs sensibles, ce qui permet de sélectionner uniquement les patients susceptibles de réagir correctement à la prescription du médicament.

Depuis son lancement, Herceptin® est devenu un produit important pour Genentech et son partenaire Roche avec des ventes atteignant 346 millions de dollars en 2002. Ce protocole de sélection de médicaments personnalisé pour cibler un cancer *via* un test de diagnostic fait désormais partie des stratégies thérapeutiques les plus utilisées aujourd'hui pour le traitement des cancers du sein.

D'autres exemples de médicaments théranostiques couplant thérapie et imagerie médicale approuvés par la FDA sont présentés dans la partie suivante.

III.2 Zevalin™

Les anticorps conjugués font l'objet d'essais cliniques depuis plus de 30 ans. Zevalin™ est le premier anticorps conjugué pour le traitement du lymphome non hodgkinien et la première radio-immunothérapie pour le cancer approuvé par la FDA américaine le 19 février 2002. Il s'agit d'un cancer du tissu lymphatique (partie du système immunitaire) qui affecte un type de globules blancs appelés lymphocytes B. Il est administré dans le cadre d'une « thérapie de consolidation » pour améliorer la rémission des patients pour lesquels le Rituximab (autre traitement) n'est plus efficace ou pour ceux qui rechutent. Le Zevalin™ (^{90}Yttrium ibritumomab tiuxetan, IDEC Pharmaceuticals) est un anticorps monoclonal conçu pour cibler un antigène, le CD20, qui est présent à la surface de tous les lymphocytes B. Le médicament radiomarqué est injecté au patient, l'anticorps monoclonal transporte la radioactivité jusqu'à la cible antigène CD20 sur les lymphocytes B. Une fois l'anticorps lié à l'antigène, la radiation peut agir localement (diagnostic) et détruire les lymphocytes B du lymphome (thérapie).[50]

Plusieurs études ont été menées, y compris un essai randomisé de phase III qui a montré une supériorité sur le Rituximab. En effet, les patients traités avec Zevalin radiomarqué ont bénéficié d'une période de sursis moyenne de 37 mois contre 14 mois pour les patients sans traitement.[50]

III.3 NETSPOT™

En 1994, la scintigraphie des récepteurs de la somatostatine avec ^{111}In-pentetreotide (Octreoscan®) a été approuvé par la FDA pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines (NET).[51] Bien que ces scintigraphies à l'octréotide présentent l'avantage de la visualisation de tout le corps, elles ont également des limites, notamment une faible résolution spatiale, l'absorption du radiotraceur dans les organes sains et une charge accrue pour les patients.

Le 1er juin 2016, la FDA a approuvé, la commercialisation d'un nouveau kit unidose pour l'injection de ^{68}Ga-DOTA-TATE, un agent théranostique radioactif pour l'imagerie TEP pour localiser les tumeurs neuroendocrines positives aux récepteurs de la somostatine chez les patients jeunes et adultes (Figure 17). Ce produit est fabriqué par Advanced Accelerator Applications de Saint Genis-Pouilly, France, sous le nom commercial NETSPOT™.

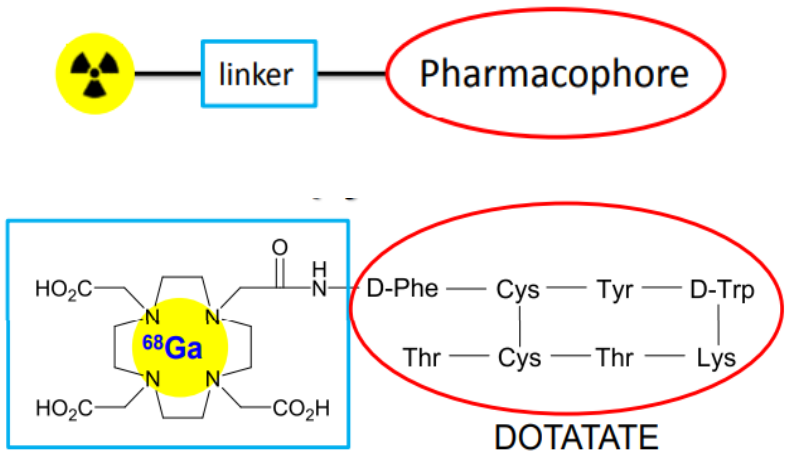
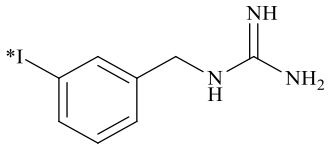


Figure 17 : Structure du ^{68}Ga-DOTATATE

Il a été démontré que la TEP ^{68}Ga-DOTA-TATE pouvait considérablement améliorer la résolution spatiale et la détection des lésions par rapport à la scintigraphie Octreoscan®. En termes de qualité de traitement, le ^{68}Ga-DOTA-TATE représente un avantage majeur pour les patients car l'analyse peut être complété en moins de 2 heures contre 2 jours pour l'imagerie Octreoscan®. Le ^{68}Ga-DOTA-TATE implique également une exposition moindre aux radiations.[52]

III.4 ^{131}I MIBG

Le docteur Donald Wieland et ses collègues de l'Université de Michigan Medical School ont développé la méta-iodobenzylguanidine (MIBG) radiomarquée dans les années 1970 en tant qu'agent de diagnostic pour l'imagerie de la médullosurrénale (Figure 18).



***I = ^{131} I / ^{123} I / ^{124} I**

meta-Iodobenzylguanidine (MIBG)

Figure 18 : Structure de MIBG

En 1994, ^{131}I MIBG, connu sous le nom d'iobenguane I-131 intraveineux, a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) en tant qu'agent d'imagerie pour la localisation de sites spécifiques de phéochromocytomes et de neuroblastomes. En 2008, l'injection de ^{123}I- MIBG a également été approuvée par la FDA comme agent d'imagerie des

tumeurs. En Europe et au Japon, ^{123}I-MIBG et ^{131}I-MIBG sont utilisés pour l'imagerie tumorale depuis plus de 10 ans.

En juillet 2018, la FDA a approuvé une formulation à haute activité spécifique de ^{131}I-MIBG commercialisé sous le nom d'Azedra® par Progenics Pharmaceuticals Inc.. Pryma *et al*.[51] ont récemment publié des résultats de phase II et ont montré que le traitement était sûr et efficace, et permettait un contrôle de l'hypertension induite par les catécholamines chez 25% des patients et un effet anti-tumoral soutenu chez 22% des patients.

D'autres agents théranostiques radiomarqués ont été approuvés par la FDA tels que Lutathera® (^{177}Lu) en 2018 et Xofigo® (Ra 223) en 2013.[53]

III.5 AGuIX® (Activation et Guidage de l'Irradiation X)

En 2019, l'AGuIX®, une nanoparticule bimodale à base de gadolinium développée par la société française NH TherAGuIX pour ses propriétés théranostiques combine la thérapie (effet radiosensibilisant) et le diagnostic (visible en IRM). D'une part, le magnétisme du gadolinium permet une meilleure imagerie IRM, d'autre part son numéro atomique élevé lui permet d'interagir avec le faisceau de rayons X.

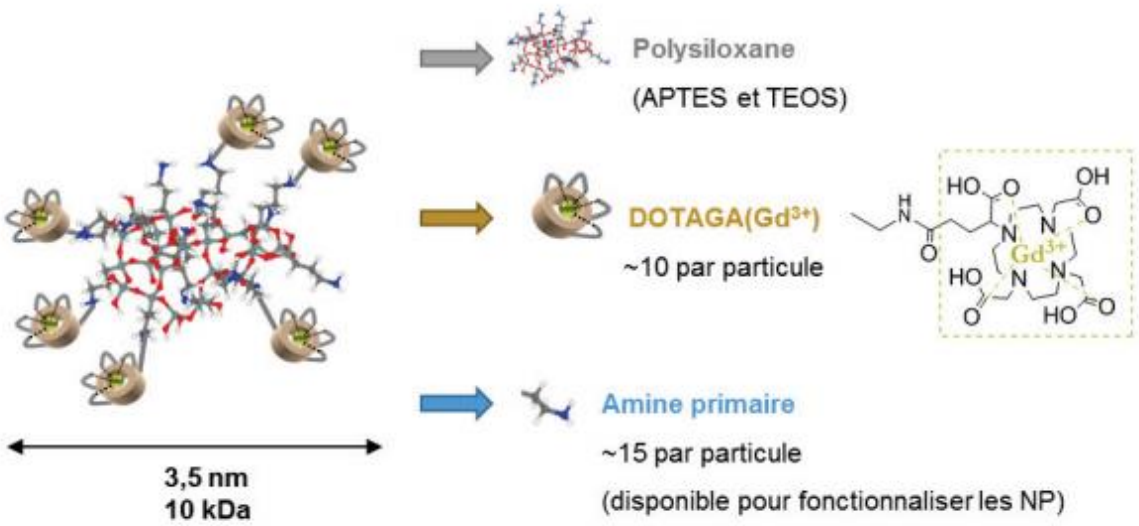


Figure 19 : Structure de la nanoparticule théranostique AGuIX®, extrait de la thèse d'Eloise Thomas[54], APTES = 3-Aminopropyl)triéthoxysilane et TEOS = Tétraéthylorthosilicate, DOTAGA(Gd^{3+}) = Agent de contraste

De taille inférieure à 5 nm, permettant une clairance rénale, l'AGuIX® est constituée d'une matrice de polysiloxane, à la surface de laquelle sont greffés de manière covalente des ligands Gd-DOTAGA. L'injection de cette nouvelle nanoparticule a donc trois actions clés contre les tumeurs : le ciblage, l'imagerie et le traitement. L'agent de contraste permet d'améliorer la localisation de la tumeur lors de l'IRM. Associé à la radiothérapie, le rayonnement local dans la tumeur est amplifié. Cette technologie permet de traiter les cancers radiorésistants et de minimiser les effets secondaires de la radiothérapie en diminuant l'exposition des tissus sains et le niveau des radiations.

AGuIX® peut pénétrer sélectivement la tumeur après une injection systémique grâce à la différence de la perméabilité vasculaire et de l'effet de rétention dus aux composés polysiloxanes. Les nanoparticules restent à l'intérieur de la tumeur pendant une période de temps importante (environ 72 heures) avant d'être éliminées par les reins. Les études précliniques menées sur divers modèles de tumeurs ont démontré que l'injection d'AGuIX® par voie intraveineuse avait un effet thérapeutique significatif à de faibles concentrations, et que la nanoparticule était non toxique.[55] De plus, sa relaxivité longitudinale élevée r_1 = 12,5 $mM^{-1}.s^{-1}$/Gd permet d'obtenir un meilleur contraste en IRM par rapport aux agents de contraste commerciaux (Dotarem®).

L'effet radiosensibilisant de l'AGuIX® a été démontré chez l'animal sur différents types de tumeurs (pancréas, poumons, cou) et particulièrement sur des tumeurs cérébrales (métastases cérébrales, glioblastome). AGuIX® est actuellement en phase II d'évaluation clinique chez des patients atteints du cancer.

IV. Conclusion

Aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique est confrontée à un défi majeur : le coût très élevé et la baisse de la productivité de la recherche et du développement imputables, dans une large mesure aux besoins toujours croissants de prouver l'efficacité clinique et la rentabilité des nouveaux médicaments. La nécessité de satisfaire ces demandes avant le lancement du produit a pour effet d'augmenter les temps de développement. La théranostique peut répondre à ces défis, en réduisant ces risques et ces coûts. De plus en plus de médicaments théranostiques sont donc approuvés par la FDA pour le traitement de différentes maladies (obésité, dépression, diabète, cancers du sein, de la prostate et neuroblastomes). Parmi ces médicaments, les

radiomarqueurs représentent l'essentiel des médicaments théranostiques utilisés aujourd'hui en clinique. Cependant, en parallèle de nombreuses plateformes théranostiques ont été développées combinant la thérapie et le diagnostic par IRM[56–61].

Les recherches dans le domaine de l'IRM sont consacrées au développement de sondes plus efficaces. Pour cela, des macromolécules à hautes masses moléculaires sont utilisées afin d'augmenter leur temps de corrélation rotationnelle et donc leur relaxivité. Plusieurs agents de contraste oligosaccharidiques ont ainsi été développés et rapportés ces dernières années par de nombreuses équipes. Tous ces composés ont montré une relaxivité très élevée comparée aux agents de contraste commerciaux.[62–65]

Comme les cyclodextrines s'avèrent être des molécules prometteuses, elles ont été sélectionnées, pour la suite de cette étude, comme scaffold de choix pour la conception de nouveaux agents de contraste pour l'IRM. Nous souhaitons en effet, mettre au point un agent théranostique intégrant une nouvelle sonde d'imagerie intracellulaire basée sur le motif de la β-cyclodextrine. Cette sonde devra être capable de passer la BHE et de vectoriser le témozolomide. La prochaine partie de cette étude bibliographique porte ainsi sur les nombreuses propriétés des cyclodextrines et plus particulièrement sur leurs utilisations dans la conception de nouveaux agents pour l'IRM.

V. Les Cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs), molécules cages naturelles sont des oligosaccharides cycliques de forme tronconique issues de la dégradation de l'amidon par la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase). Les cyclodextrines peuvent contenir six à douze unités de glucose. Chaque unité de D-glucose en conformation chaise est liée par son carbone anomérique à l'unité adjacente par des liaisons glucosidiques α-(1-4).

V.1 Généralités sur les cyclodextrines

V.1.1 Historique

En 1891, Villiers[66] a isolé pour la première fois un groupe d'oligosaccharides provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon produite par différents bacilles dont *Bacillus macerans* et constitué de plusieurs unités de formule chimique $(C_6H_{10}O_5)_2.3H_2O$ qu'il nomma « cellulosine » pour leurs propriétés physico-chimiques proches de celles de la

cellulose. Au début du XXème siècle, Schardinger[67] parvint à isoler plusieurs composés qu'il appela cyclodextrines. Il a fallu attendre l'apparition des analyses aux rayons X pour obtenir les structures exactes des cyclodextrines.

V.1.2 Structure des CDs

Trois familles de CDs sont principalement étudiées et utilisées : les α-, β- et γ-cyclodextrines formées respectivement de 6, 7 ou 8 unités glucoses (Figure 20). La taille de la cavité varie en fonction de la cyclodextrine. Ces macrocycles ont une forme de cône tronqué comportant deux faces différentes.

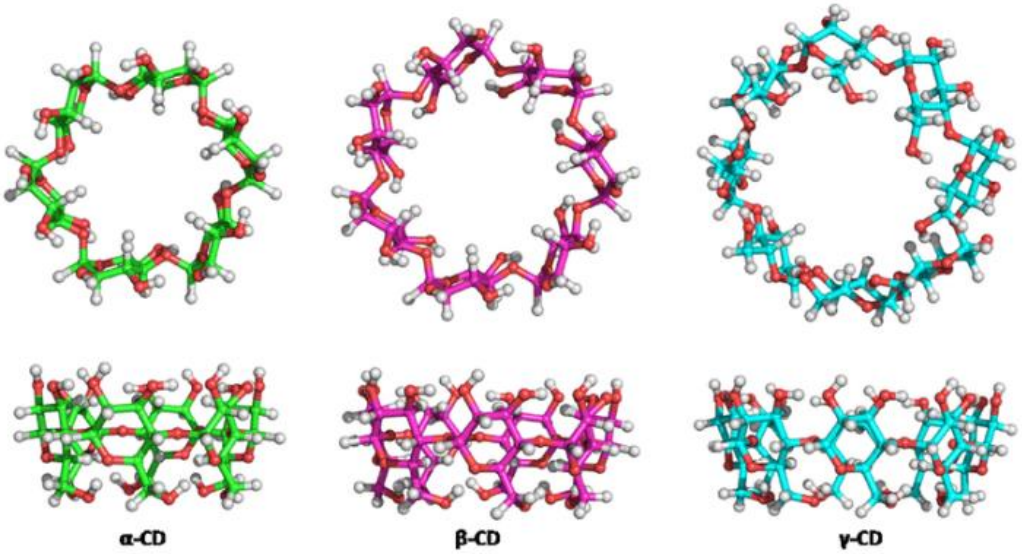
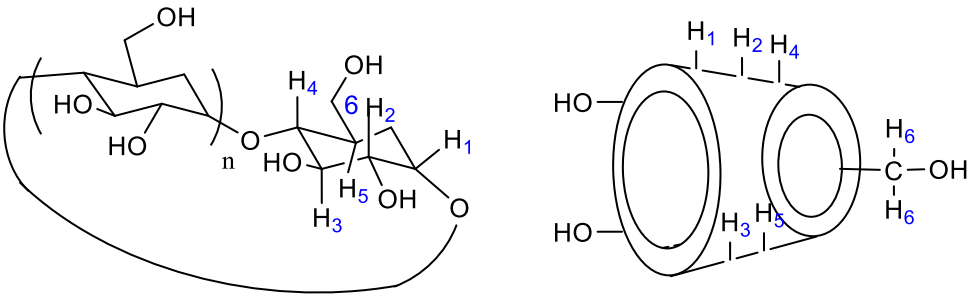


Figure 20 : Structures des différentes CDs

La face secondaire est représentée par le bord le plus large, occupé par les hydroxyles secondaires (en positions 2 et 3) alors que la face primaire est constituée par le bord le plus étroit, occupé par les hydroxyles primaires (position 6). Les hydroxyles secondaires sont tous orientés vers l'extérieur des unités glucose. Les protons (H-3) et (H-5) sont situés à l'intérieur de la cavité tandis que les protons (H-2), (H-4) et (H-6) se positionnent à l'extérieur. La surface externe est lipophile tandis que la cavité interne est plus hydrophobe (Figure 21).



n = 5, 6, 7

Figure 21 : Nomenclature des CDs

V.1.3 Caractérisations des CDs

Les cyclodextrines possèdent des propriétés hydrophiles grâce aux fonctions alcools primaires et secondaires qui favorisent la présence de nombreuses molécules d'eau autour de la structure. Les CDs sont solubles dans l'eau et dans les solvants polaires aprotiques tels que le diméthylsufoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF). Les principales caractéristiques physicochimiques des trois CDs les plus étudiées sont regroupées dans le tableau suivant :[68]

Tableau 3 : Caractéristiques des CDs

Types	Nombre d'unités glucose	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Diamètre interne(Å)	Diamètre externe (Å)	Hauteur de la cavité (Å)	Solubilité à 25°C (g/100 mL d'eau)
α	6	973	4,7-5,3	14,6	7	14,5
β	7	1135	6,0-6,5	15,4	7	1,85
γ	8	1297	7,5-8,3	17,5	7	23,9

V.1.4 Propriétés des CDs

Les cyclodextrines possèdent une structure tronconique délimitant une cavité au centre de la molécule. Cette cavité présente un environnement interne hydrophobe capable d'accueillir des molécules lipophiles dans un environnement externe hydrophile. Cette bipolarité des cyclodextrines est l'une des caractéristiques les plus importantes de la molécule. En effet, cette propriété permet aux CDs de former des complexes d'inclusion soit à l'état solide ou en solution, avec une large variété d'invités organiques.[69]

Une ou plusieurs molécules peuvent être encapsulées dans une ou deux cyclodextrines. La stœchiométrie la plus fréquemment rencontrée est de type 1 : 1, mais d'autres associations peuvent exister avec des stœchiométries plus élevées telles que 2 : 1 ou 2 : 2 (Figure 22).

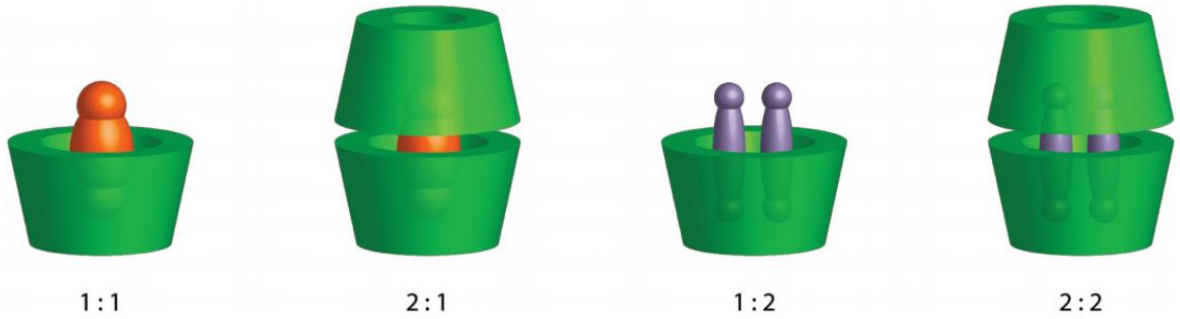


Figure 22 : Formation de complexe d'inclusion avec la CD

En 1955, le terme complexe d'inclusion est utilisé par Schlenk, pour désigner l'inclusion totale ou partielle d'un ou plusieurs composés (la molécule invitée) dans la cavité d'une molécule comme la cyclodextrine appelée alors hôte. La formation de ce complexe hôte-invité suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule invitée et celle de la cyclodextrine, c'est-à-dire le meilleur remplissage possible de l'espace. Les molécules trop hydrophiles ou trop petites ne pourront être complexées. Ce complexe est stabilisé par des interactions non covalentes à l'intérieur de la cavité de la CD.

V.1.5 Applications des complexes d'inclusion de cyclodextrines

La capacité des CDs (hôte) à former des complexes d'inclusion hôte-invité est exploitée depuis plusieurs années et ceux dans divers domaines.

Dans le domaine pharmaceutique, les cyclodextrines sont utilisées comme excipient pour améliorer la solubilité des molécules faiblement hydrosolubles et ainsi permettre une délivrance rapide et massive du principe actif, une amélioration de sa biodisponibilité et de sa stabilité.[70] Les principales CDs utilisées, à l'heure actuelle, par l'industrie pharmaceutique sont les β-CD natives ou modifiées. Dans l'industrie alimentaire, les cyclodextrines sont utilisées comme stabilisants d'arômes et pour améliorer le goût et masquer les odeurs désagréables. En cosmétique, elles sont des supports et stabilisants de parfums. Dans l'agriculture, l'inclusion d'insecticides, de fongicides ou d'herbicides dans leurs cavités, peut

protéger ces substances de la décomposition rapide par la lumière ou l'oxygène, prolongeant ainsi leur efficacité.

V.1.6 Fonctionnalisation des cyclodextrines

Plusieurs stratégies de synthèse existent pour fonctionnaliser les cyclodextrines, nous détaillerons la monofonctionnalisation de la cyclodextrine native en position 6 qui sera utile pour ce projet.

Pour modifier les propriétés des cyclodextrines (solubilité, toxicité, biodégradabilité) et leur capacité d'inclusion pour élargir leur potentiel d'applications, des modifications chimiques de l'ensemble des hydroxyles primaires et/ou secondaires sont nécessaires. Les méthodes permettant de fonctionnaliser sélectivement la cyclodextrine reposent sur la différence d'acidité entre les hydroxyles de la petite couronne (pKa = 15) et ceux de la grande couronne (pKa = 12-13).

Contrairement aux hydroxyles en positions 2 et 3, l'absence d'interaction entre les hydroxyles primaires en position 6 rend possible une libre rotation de la liaison, limite la gêne stérique et augmente donc leur réactivité. Les hydroxyles en position 3 pointent vers l'intérieur de la cavité alors que les hydroxyles en position 2 sont orientés vers la face externe de la cyclodextrine. Ces derniers sont donc plus accessibles. De plus, ils sont les plus acides et par conséquent, plus facilement déprotonables.

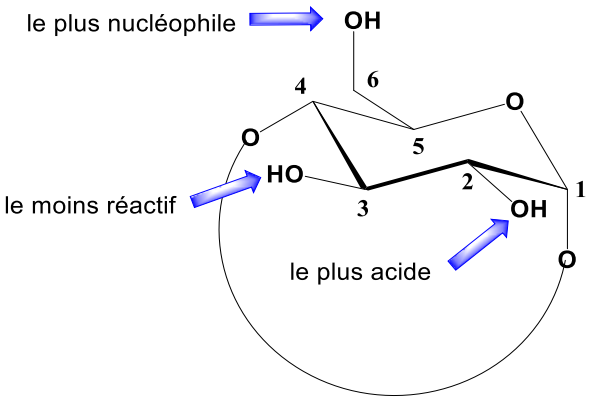


Figure 23 : Réactivités des différents hydroxyles de la cyclodextrine

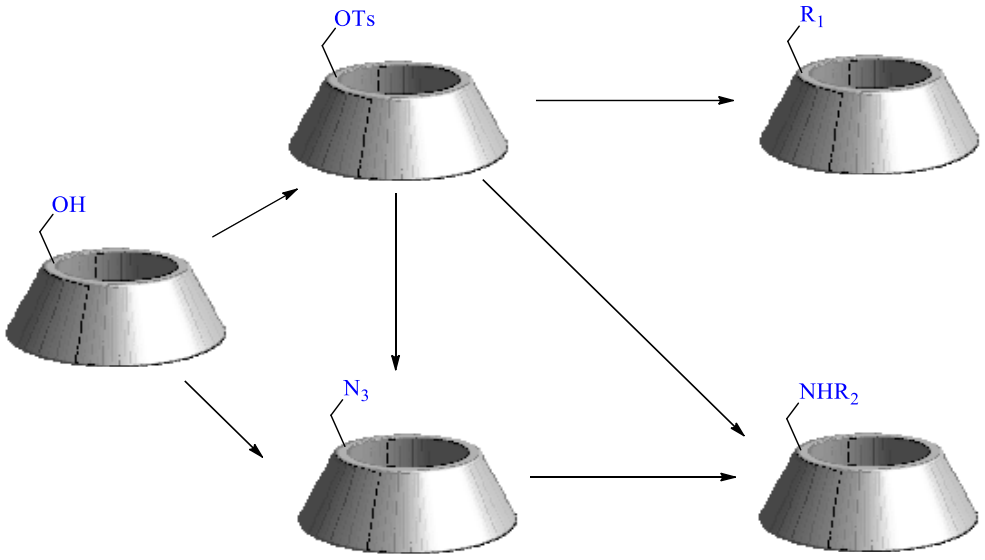
Les groupes hydroxyles primaires sont plus nucléophiles que ceux de la face secondaire. La per-modification de tous les hydroxyles primaires est alors plus facile que la mono-, di- ou

la tri-substitution. Dans notre cas, nous allons nous intéresser à la monofonctionnalisation de la β-CD.

Plusieurs types d'électrophiles comme les halogénures d'alkyle, de phosphoryle, de silyle et de sulfonyle, ou les chlorures d'acide, peuvent réagir avec cet alcohol primaire. On utilise généralement une base car la cyclodextrine est plus stable en milieu alcalin et se décompose en milieu très acide.

- Monosubstitution de cyclodextrines en position 6

La monosubstitution de cyclodextrine en position 6 se fait généralement par attaque nucléophile d'un précurseur, la mono-6-sulfonylcyclodextrine. La monotosylation de β-cyclodextrine peut être obtenue par réaction d'un équivalent de chlorure de *p*-toluène sulfonyle ou de chlorure de benzènesulfonyle avec la cyclodextrine dans la pyridine ou le diméthylformamide contenant une base (NaOH). Cette monotosylation est un processus non sélectif et produit un mélange de cyclodextrines di- ou tri-tosylées aussi bien en face primaire qu'en face secondaire. C'est pourquoi, la méthode généralement choisie est de faire réagir un équivalent de chlorure de tosyle avec une β-cyclodextrine dans un milieu aqueux alcalin pendant 2 à 4 heures. La mono-6-*O*-tosylcyclodextrine est ainsi obtenue avec un bon rendement, le produit est purifié par cristallisation ou par chromatographie. Ensuite, le groupement tosyle peut être facilement substitué par d'autres groupements nucléophiles comme l'azoture (Schéma 3).



R_1 = I, Br, N_3 , $SCOCH_3$, alkyl
R_2 = H, DOTA

Schéma 3 : Méthodes de substitution de la position 6 de la cyclodextrine

V.2 Agents de contraste à base de cyclodextrine

La structure et les propriétés particulières des cyclodextrines ont été largement exploitées en IRM ces dernières années. En effet, elles peuvent, par exemple, former des complexes d'inclusion avec une structure DOTA-Gd modifiée ou bien être fonctionnalisées par des ligands chélatants. Dans tous les cas, ces nouveaux agents de contraste présentent des relaxivités plus importantes que les agents commerciaux et ceux principalement grâce à leur poids moléculaire relativement élevé et leurs importantes sphères d'hydratation contribuant à diminuer le temps de corrélation rotationnel et donc à améliorer l'échange des molécules d'eau au sein de la sphère d'hydratation interne du gadolinium.[71]

V.2.1 Cyclodextrine fonctionnalisée par un agent de contraste

Les cyclodextrines sont connues pour être de bons supports d'agents de contraste *via* des liaisons covalentes (triazole, amide, ester) avec la partie inférieure du cône (alcools primaires en position 6, Figure 20). Dans la littérature, de nombreux exemples décrivent la monofonctionnalisation ou polyfonctionnalisation de CDs avec différents ligands tels que les agents de contraste commerciaux comme le DTPA[72], DOTA[73] [74,75] et des groupements carboxylates ou iminodiacétates.

V.2.1.1 Monofonctionnalisation de la CD par un agent de contraste

Skinner *et al.*[76] en 2000 ont développé un agent de contraste par une réaction d'amidation entre le DOTA et un dérivé de β-cyclodextrine (Figure 24). Ce conjugué présente une relaxivité de 8,5 $mM^{-1}.s^{-1}$ supérieure à celle de l'agent de contraste Gd-DOTA (3,8 $mM^{-1}.s^{-1}$). L'augmentation de la masse molaire de la structure engendre une augmentation du temps de corrélation rotationnel τ_r et donc de la relaxivité r_1.

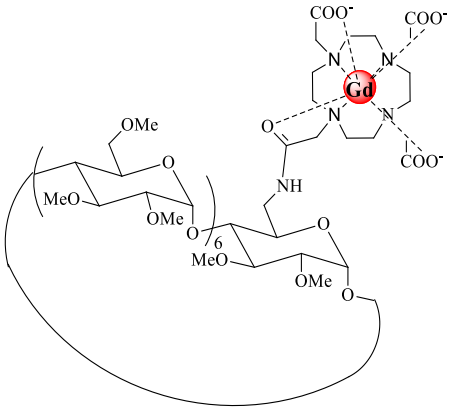


Figure 24 : Structure de l'AC de Skinner

La monofonctionnalisation d'une α-CD avec le DOTA par chimie « click » été décrit par Hasenknopf *et al.*[75] en 2017 (Figure 25). Ce composé possède une relaxivité de 7,5 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 20 MHz et 37°C, supérieure au Gd-DOTA.

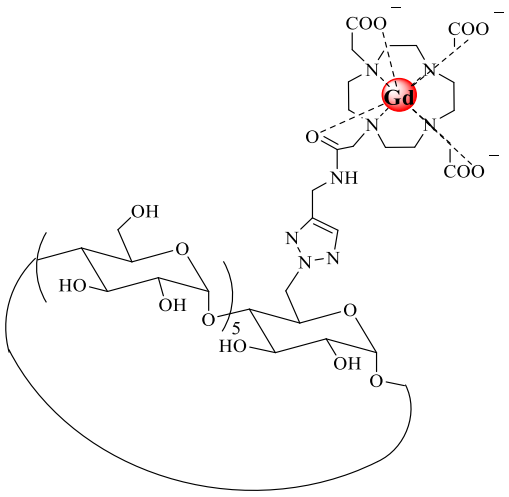
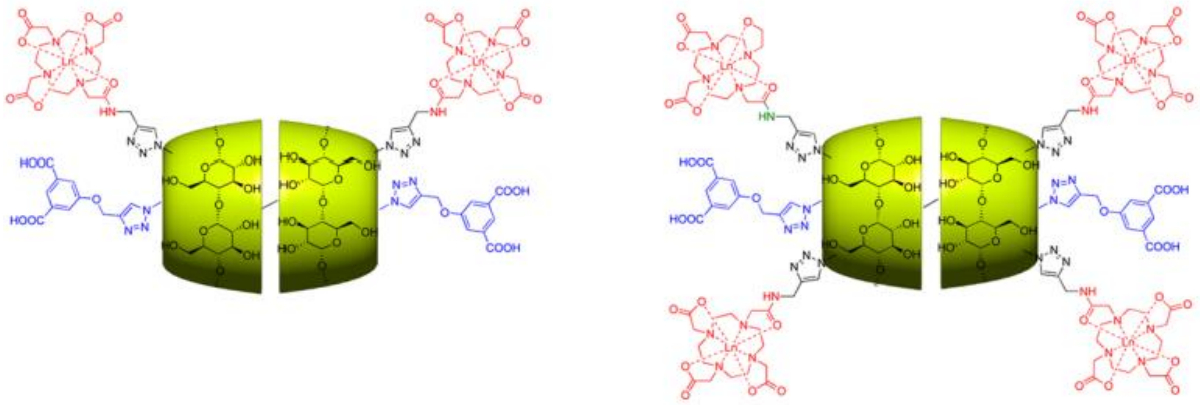


Figure 25 : Structure de l'agent de contraste de Hasenknopf

V.2.1.2 Bifonctionnalisation de la CD par un agent de contraste

Un exemple intéressant de bi-fonctionnalisation de la CD par le DOTA a été décrit par Fredy et ses collaborateurs.[74,75] Ils ont développé des rotaxanes de CDs fonctionnalisées par le Gd-DO3A-MA (RotGd2 et RotGd4). Ces rotaxanes ont montré une forte relaxivité par Gd, de r_1 = 12,30 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour RotGd2 et de r_1 = 15,70 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour RotGd4 à 20 MHz, respectivement. Ces rotaxanes présentent un potentiel important pour des applications en IRM.



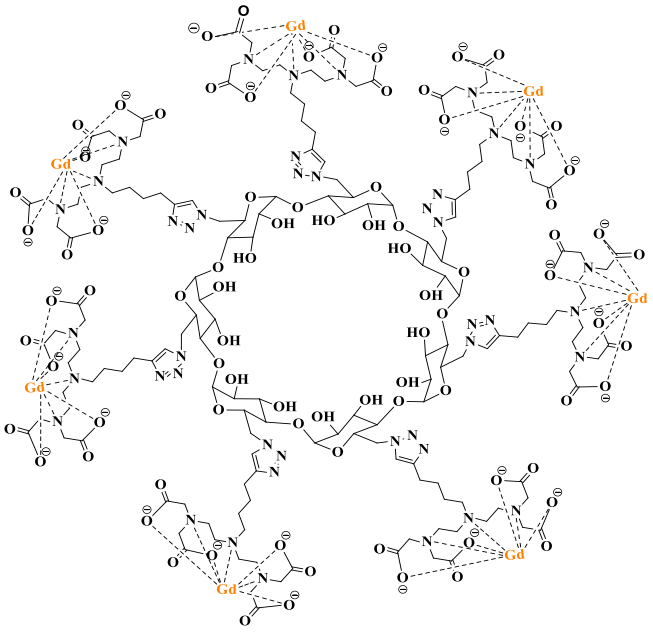
RotGd2 **RotGd4**

Figure 26 : Structure de rotamères de CDs intéressants pour l'IRM

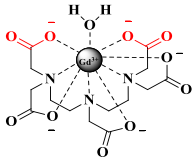
Cette fonctionnalisation par chimie « click » a été utilisée pour polyfonctionnaliser une β-CD par différents chélates de gadolinium.

V.2.1.3 Polyfonctionnalisation de la β-CD par des agents de contraste

En 2008, Reineke *et al.*[72] ont développé un cluster de β-cyclodextrine paramagnétique en utilisant un couplage par chimie click avec sept bras paramagnétiques (DTPA-Gd) (Figure 27). Cet agent de contraste possède un profil de relaxivité très élevé (r_1 = 43,4 $mM^{-1}.s^{-1}$/molécule soit r_1 = 6,2 $mM^{-1}.s^{-1}$/Gd à 9,4 T) et un meilleur contraste comparé à l'agent commercial, Magnevist® (3,2 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 9,4 T).

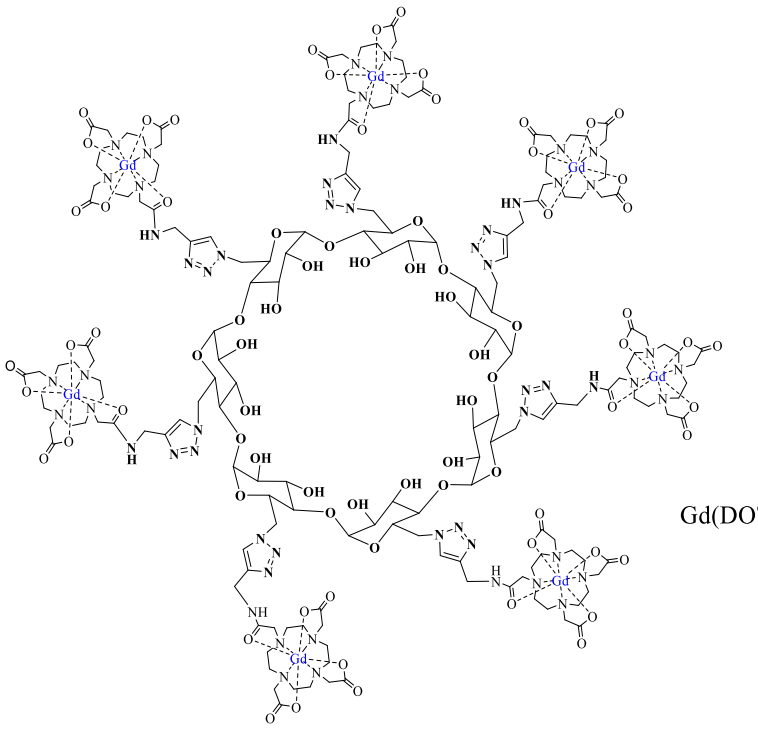


$r_1 = 43.4\ mM^{-1}s^{-1}$
$6.2\ mM^{-1}s^{-1}$ / Gd

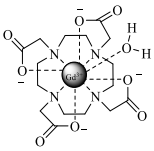


$[Gd(DTPA)H_2O]^{2-}$ Magnevist®
$r_1 = 3.2\ mM^{-1}s^{-1}$

Figure 27 : Cyclodextrine de Reineke (Magnevist)



$r_1 = 85.4\ mM^{-1}s^{-1}$
$12.2\ mM^{-1}s^{-1}$ / Gd



Gd(DOTA)H_2O] **Dotarem®**
$r_1 = 3.9\ mM^{-1}s^{-1}$

Figure 28 : Cyclodextrine de Meade (DOTAREM)

La même année Meade *et al.*[73] ont publié, en utilisant la même stratégie de synthèse, un nouvel agent de contraste à base de β-cyclodextrine paramagnétique, couplé avec sept ligands DOTA (Figure 28). Cet agent de contraste possède un profil de relaxivité très élevé (r_1 = 85,4 $mM^{-1}.s^{-1}$/ molécule soit r_1 = 12,2 $mM^{-1}.s^{-1}$/Gd à 9,4 T).

Ensuite, Delangle et Fries[77] ont reporté un agent de contraste à base d'une α-cyclodextrine fonctionnalisée par six fonctions carboxylates en position 2 (Figure 29). Ils ont observé une relaxivité de 22,4 mM^{-1} s^{-1} soit 11,2 $mM^{-1}.s^{-1}$ par gadolinium. Ce complexe a ensuite été testé pour quantifier le volume sanguin cérébral de rats atteint de tumeurs. Les résultats ont montré un confinement du gadolinium dans l'espace vasculaire contrairement au DOTA qui pénètre dans la tumeur. De plus, aucune néphrotoxicité, ni hémolyse n'ont été observées contrairement aux cyclodextrines natives.

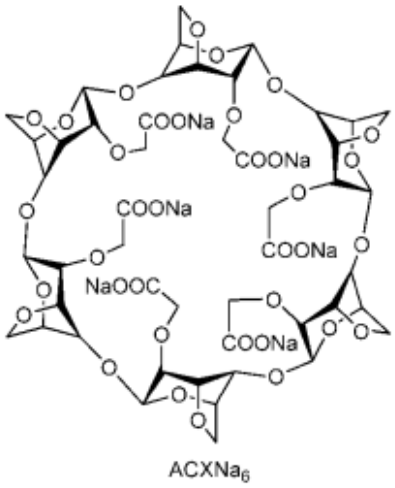


Figure 29 : Structure de la CD de Delangle et Fries[77]

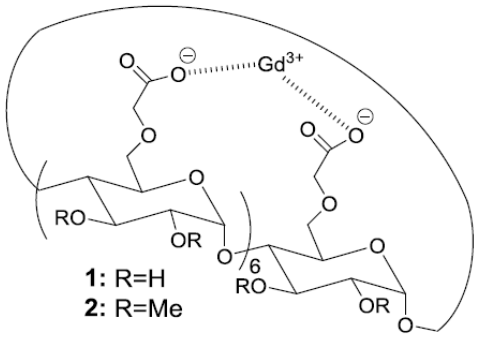


Figure 30 : Structure de la CD développée au laboratoire[71]

De nouvelles méthodologies de synthèse ont été mises au point au laboratoire pour fonctionnaliser des cyclodextrines avec divers ligands possédant des ligands carboxylates[62,64], DOTA[95] et phosphonates[78] (Figure 30). L'efficacité des complexes au gadolinium obtenus avec les fonctions carboxylates a été testée avec succès *in vitro* et *in vivo* chez la souris au niveau cardiaque.[64] Une meilleure relaxivité a été obtenue pour la cyclodextrine native r_1 = 6,90 $mM^{-1}.s^{-1}$ comparée à la cyclodextrine perméthylée r_1 = 4,70 $mM^{-1}.s^{-1}$ dûe à une contribution plus importante de la seconde sphère d'hydratation.

En 2018, de nouveaux agents de contraste au gadolinium immobilisés sur une β-cyclodextrine utilisant non plus un ligand DOTA mais des ligands iminodiacétates (IDA) *via* un bras espaceur introduit par chimie « click » ont été développés en collaboration avec l'équipe du Pr. Ling.[65] Cette nouvelle sonde IRM possède des relaxivités remarquables, r_1 = 12,66 $mM^{-1}.s^{-1}$ en présence d'1-Gd ; r_1 = 27,69 $mM^{-1}.s^{-1}$ en présence de 2-Gd et r_1 = 42,14 $mM^{-1}.s^{-1}$ en présence de 3-Gd, correspondant à une augmentation de la qualité du signal de + 260% à +1000% supérieure à celle du DOTA commercial.

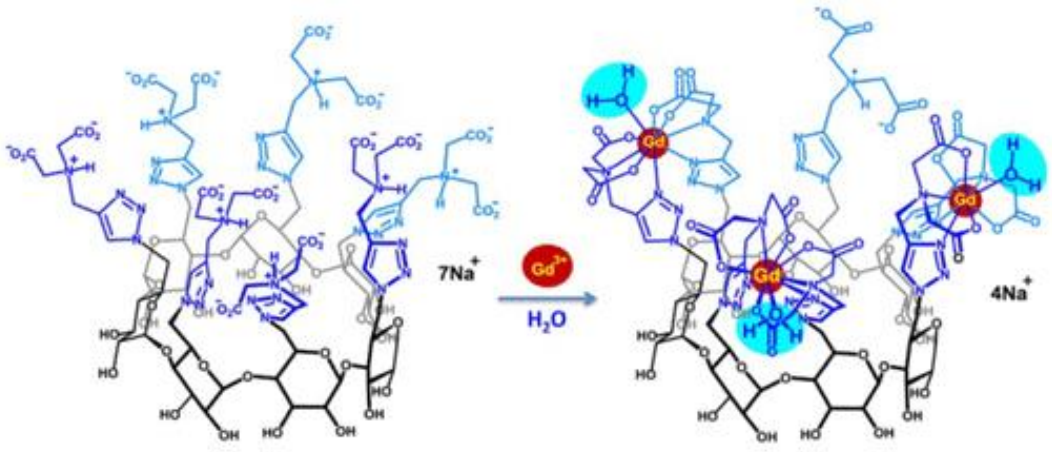


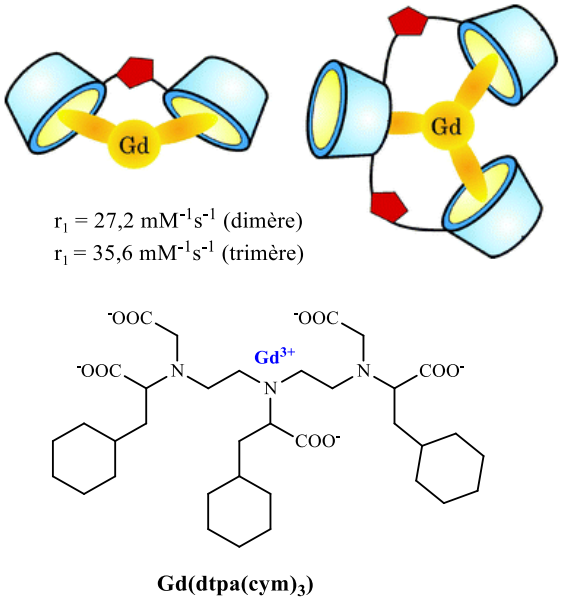
Figure 31 : Structure de l'agent de contraste de l'équipe de C.C. Ling et G. Gouhier

La stabilité de ces nouveaux complexes de gadolinium a été étudiée. Le pGd a été calculé en fonction du pH pour un ensemble de conditions standard (concentration initiale : [Gd] = 1 mM, [L] = 10 mM où pGd = -log [Gd] libre). La valeur du pGd doit être aussi élevée que possible pour assurer une dissociation négligeable du Gd qui est toxique sous forme libre. Dans le cas du complexe ligand 1-Gd, la valeur du pGd de 23 a été obtenue à un pH de 7,4. Cette valeur est nettement supérieure aux valeurs de pGd référencées dans la littérature pour les complexes Gd-DTPA (18,9) et Gd-DOTA (19,1). Ce complexe ligand 1-Gd est donc plus stable que le complexe commercial à base de DOTA-Gd. Ce résultat souligne le potentiel des ligands iminodiacétates associés à une cyclodextrine pour la conception de meilleurs agents de contraste. Ces deux propriétés, fortes stabilité et relaxivité, ouvrent un large potentiel d'application future en médecine.

V.3 Complexes « hôte-invité »

La cyclodextrine, grâce à sa cavité hydrophobe, est souvent utilisée comme molécule hôte. Elle forme un complexe d'inclusion avec un ligand hydrophobe qui peut être lié à un agent de contraste au gadolinium qui joue alors le rôle d'invité.

En 2009, Aime *et al.*[79] ont préparé différents complexes d'inclusion avec deux ou trois cyclodextrines. Cet agent de contraste a été modifié par des groupements cyclohexyles, lipophiles pour permettre la formation du complexe d'inclusion. Ils ont montré que ces dimères et ces trimères de CD pouvaient être de bons candidats pour des applications en IRM (Figure 44). Les relaxivités obtenues sont beaucoup plus élevées que les valeurs rapportées pour les agents de contraste actuellement utilisés.



Gd(dtpa(cym)$_3$)

Figure 32 : Structure des dimères et trimères de CDs avec une constante d'association de Ka = 3,0 x 10^3 ± 10^3 M^{-1} pour le dimère et Ka = 6,1 x 10^3 ± 112 M^{-1} pour le trimère

Notre équipe a également observé une augmentation significative du signal IRM (+58%) lors de la formation d'un complexe d'inclusion inter et intramoléculaire avec une molécule d'acide hydrocynnamique **G1** et une molécule d'adamantane acide **G2** (Figure 33). En effet, dans ces conditions, les modifications des sphères d'hydratation, de la masse moléculaire et de la symétrie du complexe supramoléculaire engendrent une perturbation du signal.[62,63] Ce résultat permet d'envisager la visualisation de la modification d'un complexe hôte-invité en IRM *via* la variation de la valeur de relaxivité engendrée.

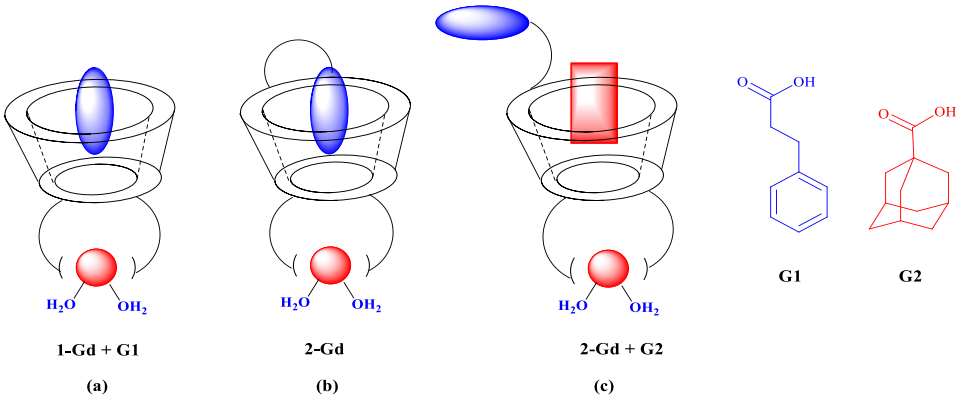


*Figure 33 : Agents de contraste **1-Gd** et **2-Gd** en présence d'un complexe d'inclusion hôte-invité : (a) et (c) intermoléculaire et (b) intramoléculaire. Boule rouge = atome de Gd avec deux molécules d'eau remplissant la sphère interne. **G1** et **G2** les deux molécules invitées pour la formation des complexes d'inclusion*[63]

Cependant, les cyclodextrines ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, il est donc indispensable de les fonctionnaliser avec des transporteurs spécifiques, tel que l'Angiopep.

VI. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique est une barrière physique et métabolique qui isole le cerveau du reste de l'organisme. Elle intervient quotidiennement dans la régulation de l'homéostasie cérébrale. Chez l'adulte, elle est associée aux 650 km de capillaires cérébraux et est plus particulièrement localisée au niveau des cellules endothéliales cérébrales (CEC) qui la composent (Figure 34).

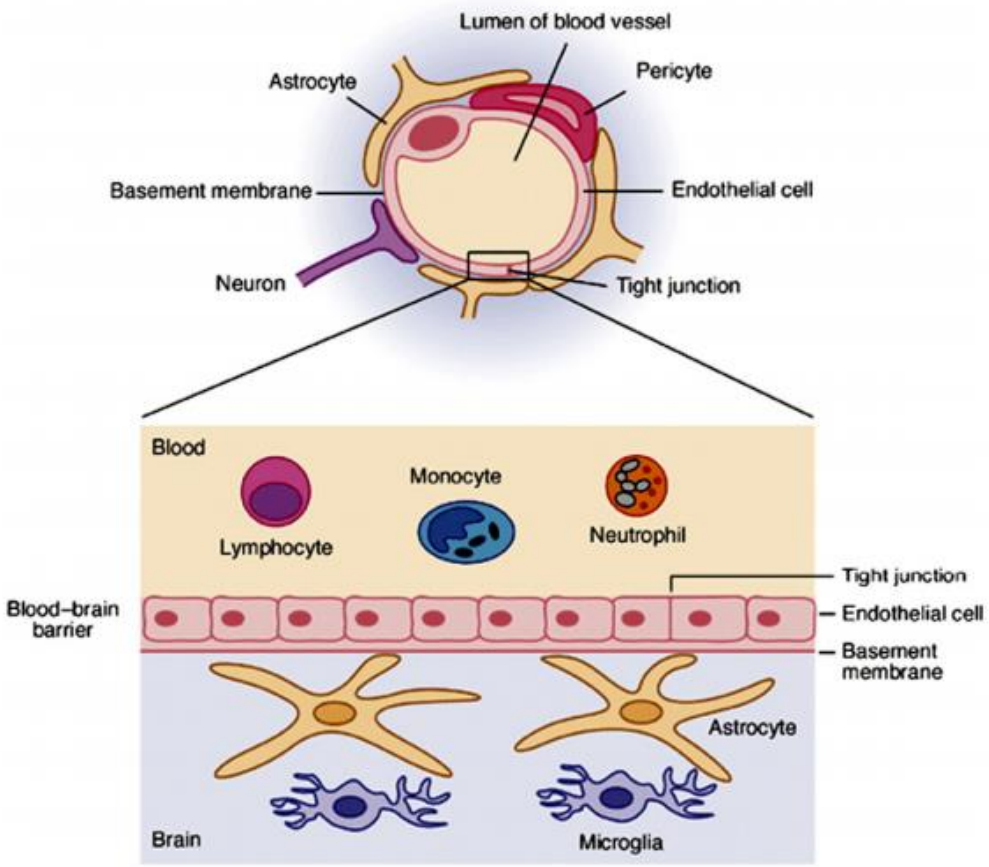


Figure 34 : Schéma de la BHE[80]

Le BHE agit pour protéger le système nerveux central contre les substances toxiques et les microorganismes pathogènes. Cette fonction de protection du cerveau complique le traitement médicamenteux d'un grand nombre de maladies neurologiques, car de nombreuses molécules actives ne peuvent pas traverser la barrière. Le passage de cette barrière hémato-encéphalique est un défi aujourd'hui à relever.

L'existence d'une telle barrière fut découverte par le médecin Allemand Paul Ehrlich (1854-1915). En 1885, cherchant à rendre des cellules et des tissus visibles au microscope, il a testé différents colorants dont l'aniline, dérivé de l'indigo. Les échantillons de tissu d'animaux testés ont été colorés en bleu, sauf le cerveau et la moelle épinière qui restèrent incolores, démontrant ainsi la non-perméation de ces organes.

Aujourd'hui, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été envisagées pour permettre aux médicaments de traverser la BHE et de guérir les maladies du cerveau (cancer, Alzheimer etc…) comme l'utilisation de mécanismes osmotiques ou d'ultrasons pour perturber la BHE,[81,82] la confection d'agents pharmacologiques aux propriétés favorables à ce passage, l'utilisation de nanoparticules, de plus en plus populaire, ou l'utilisation de vecteurs peptidiques comme l'Angiopep.[83] En plus de réussir à traverser la BHE, l'objectif est également de cibler efficacement les cellules malades et éviter toute cytotoxicité envers les cellules saines environnantes.

VI.1 Vecteur peptidique : l'Angiopep

L'Angiopep est un peptide conçu par l'équipe du Dr. Béliveau, qui agit comme un cheval de Troie, permettant de vectoriser le médicament au cerveau. Cette stratégie novatrice est basée sur l'utilisation d'un peptide transporteur sur lequel il est possible de combiner une chimiothérapie. L'angiopep (peptide de 19 acides aminés) a été conjugué au Paclitaxel, un agent de blocage de la mitose nommé Ang1005 et a été approuvé dernièrement pour des essais cliniques de phase III par la FDA américaine. L'Angiopep a également été conjugué à la Doxorubicine, un agent intercalant de l'ADN (Ang1007, Figure 35) et à l'Étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase (Ang1009).[84]

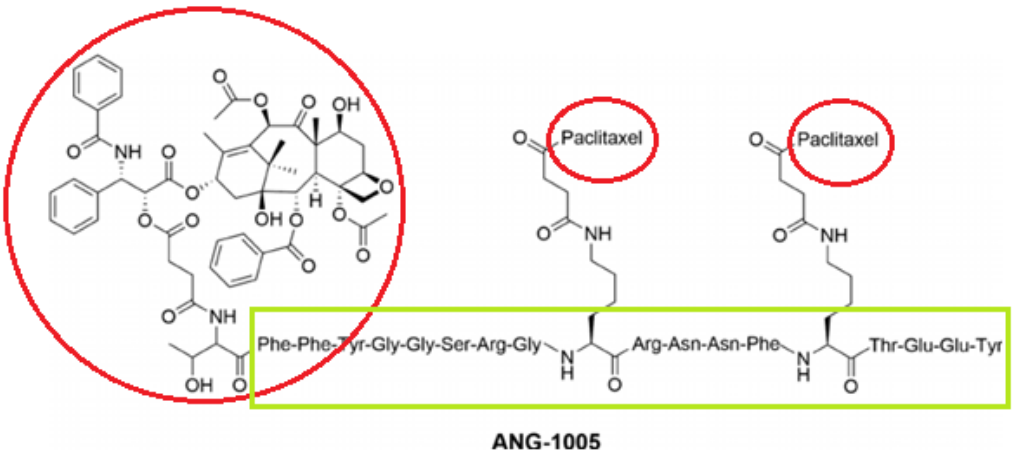


Figure 35 : Structure de l'Ang1005 (angiopep en vert et Paclitaxel en rouge)

Le passage au travers de la BHE se fait principalement via le récepteur LRP1, capable de reconnaître efficacement et d'internaliser les molécules d'Angiopep.[85] De plus, le récepteur

LRP1 se trouve souvent surexprimé dans les cancers.[86] L'Angiopep, chargé positivement, interagit avec la surface cellulaire endothéliale, se lie au récepteur LRP1 en traversant les capillaires par transcytose (Figure 36), puis il est libéré de l'autre côté de la barrière.[87] Dans le cas de l'Ang1005, une fois internalisé dans les lysosomes, l'ester de l'Ang1005 est hydrolysé en acide carboxylique par des estérases aboutissant à la libération contrôlée intracellulaire des molécules actives de Paclitaxel.

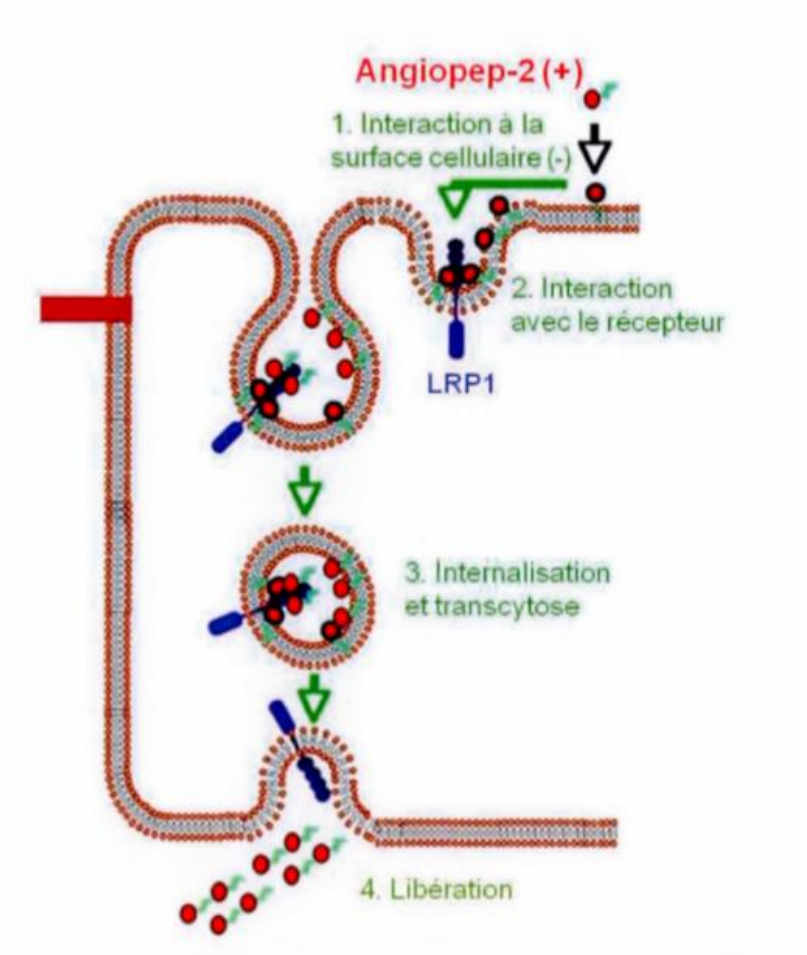


Figure 36 : Transcytose de l'Angiopep via LRP1

En 2009, Ke Weilun, *et al.*[88] ont synthétisé avec succès, un système de délivrance de gènes ciblant le cerveau *in vitro* et *in vivo* : le PAMAM-PEG-Angiopep. Les dendrimères de polyamidoamine (PAMAM) ont été modifiés avec de l'angiopep *via* un polymère PEG bifonctionnel, puis complexés avec de l'ADN, donnant des nanoparticules PAMAM-PEG-Angiopep / ADN (NP). Ils ont observé que les NPs modifiées par l'angiopep étaient intériorisées par les cellules endothéliales capillaires du cerveau (BCEC) par une endocytose dépendante de l'énergie de la clathrine et les cavéoles. Ces nanoparticules ont montré une meilleure efficacité pour traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB) et une plus forte

accumulation *in vivo*. Ces NPs modifiés possèdent également une plus grande efficacité dans l'expression des gènes dans le cerveau. Ces résultats démontrent que l'utilisation de l'Angiopep offre un grand potentiel dans la conception de système d'administration de médicaments ciblant le cerveau.

D'autres exemples d'utilisation de l'Angiopep ont été décrits dans la littérature. En 2014, Suksrichavalit *et al.*[89] ont synthétisé un acide *p*-coumarique conjugué à l'angiopep, en utilisant la chimie click (Schéma 4) en tant qu'antioxydant potentiel pour la protection du cerveau en cas de stress oxydatif. Les résultats ont confirmé que la présence du peptide permettait d'améliorer fortement le passage à travers les cellules endothéliales du cerveau en fournissant l'effet protecteur contre le stress oxydatif, tout en ayant une faible toxicité vis-à-vis des cellules endothéliales du cerveau (BEC).

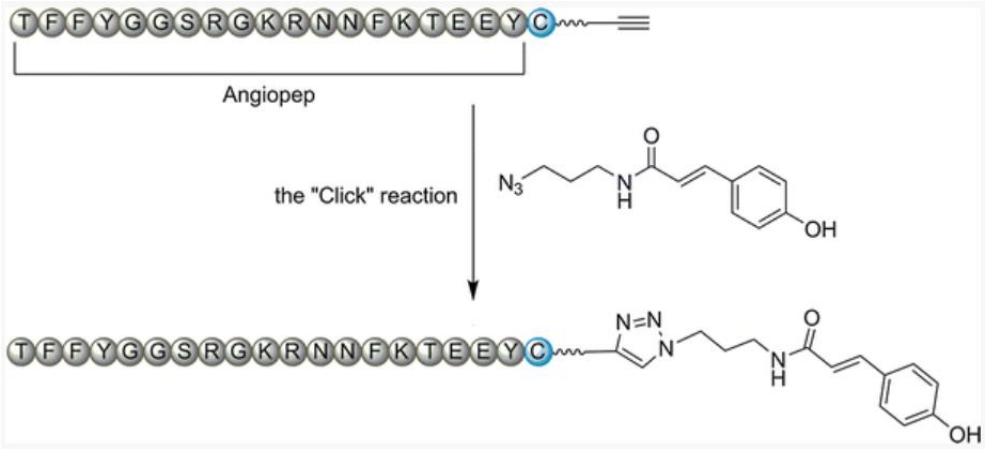


Schéma 4 : Réaction par chimie Click entre l'Angiopep et un azoture[89]

L'utilisation de ce peptide fonctionnalisé offre également un grand potentiel thérapeutique pour le développement de nouveaux composés bioactifs en permettant une pénétration cérébrale accrue.

Figueiredo *et al.*[90] ont développé un nanosystème de distribution ciblée de médicaments pour traiter le glioblastome multiforme (GBM) basé sur des polymersomes (Ps) composés de polydiméthylsiloxane-poly-2-méthyloxazoline (PDMS-PMOXA). L'Angiopep2 a été conjugué à la surface du Ps préformé pour cibler la protéine liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité qui est surexprimée dans la barrière hémato-encéphalique (BBB) et les cellules de gliome. Le Ps fonctionnalisé par l'angiopep2 n'a montré aucune toxicité

cellulaire après 24 heures et a augmenté l'absorption cellulaire d'un facteur 5 dans les cellules de glioblastome U87MG par rapport au Ps non ciblé.

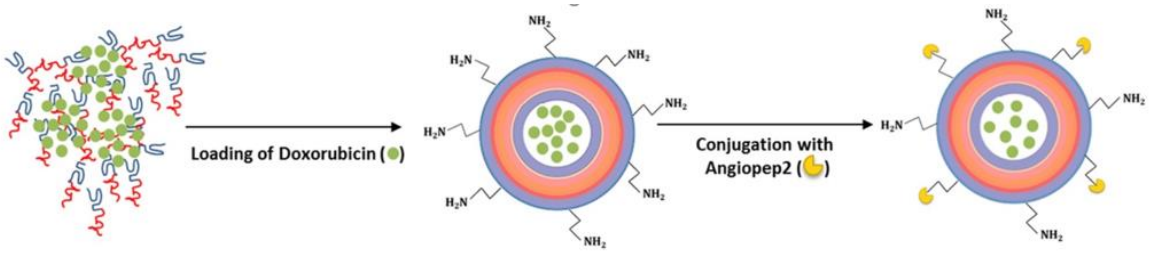


Schéma 5 : Structure du nanosystème de vectorisation de la doxorubicine dans le cerveau[90]

De nombreuses autres études confirment que l'utilisation de l'Angiopep permet de traverser la barrière hémato-encéphalique[91,92] ouvrant la porte à de nouvelles molécules thérapeutiques pour traiter les maladies du cerveau comme Parkinson[93] ou le glioblastome[90,94].

VII. Conclusion

Depuis plusieurs années, les cyclodextrines sont présentes dans certaines formulations pharmaceutiques. Leur capacité à former des complexes d'inclusion permet d'augmenter la biodisponibilité de médicaments. En effet, beaucoup de principes actifs ont une solubilité modérée dans l'eau, ce qui limite leur concentration et donc leur activité *in vivo*. De plus, le complexe formé devient, alors, moins sensible à la dégradation, en particulier à l'oxydation comparé à la molécule seule.

De plus, les cyclodextrines sont des supports efficaces pour la conception de nouveaux agents de contraste performants en IRM puisque les valeurs de relaxivité de ces nouveaux complexes de gadolinium, liés de façon covalente ou non, sont amplifiées par rapport aux agents de contraste commerciaux.

Notre stratégie consiste donc à développer de nouvelles sondes théranostiques intelligentes permettant de traverser la barrière hématoencéphalique (BHE), de libérer de manière contrôlée une chimiothérapie limitant les effets secondaires et de visualiser l'évolution du traitement *in vivo* par IRM.

Nous allons maintenant nous intéresser, dans la partie suivante, à détailler les moyens de vectorisation et libération contrôlée de principes actifs de médicaments.

VIII. Références

[21] "II.1. Les différentes techniques d'imagerie – 2020 Docteur de l'université pierre et marie curie," http://m.20-bal.com/buhgalteriya/10083/index.html?page=7.

[22] M. A. Pysz, S. S. Gambhir, J. K. Willmann, *Clin. Radiol.* **2010**, *65*, 500–516.

[23] D. C. Sullivan, G. Kelloff, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 292–296.

[24] J. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626–634.

[25] CEA, "L'imagerie médicale," 2020 http://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx par Corinne Beurtey.

[26] W. T. Yuh, J. D. Engelken, M. G. Muhonen, N. A. Mayr, D. J. Fisher, J. C. Ehrhardt, *Am. J. Neuroradiol.* **1992**, *13*, 335–345.

[27] I. R. Young, G. J. Clarke, D. R. Baffles, J. M. Pennock, F. H. Doyle, G. M. Bydder, *J. Comput. Tomogr.* **1981**, *5*, 543–547.

[28] D. H. Carr, J. Brown, G. M. Bydder, H.-J. Weinmann, U. Speck, D. J. Thomas, I. R. Young, *The Lancet* **1984**, *323*, 484–486.

[29] https://docteurimago.fr/actualites/produits/lansm-suggere-substitution-produits-lineaires-macrocycliques/ par Hellerhoff **(accédé en mars 2020).**

[30] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2008**, *23*, 3027-3047.

[31] T. Grobner, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21*, 1104–1108.

[32] B. B. Zobel, C. C. Quattrocchi, Y. Errante, R. F. Grasso, *Radiol. Med.* **2016**, *121*, 478–481.

[33] R. J. McDonald, J. S. McDonald, D. F. Kallmes, M. E. Jentoft, D. L. Murray, K. R. Thielen, E. E. Williamson, L. J. Eckel, *Radiology* **2015**, *275*, 772–782.

[34] I. Solomon, N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.* **1956**, *25*, 261–266.

[35] N. Bloembergen, L. O. Morgan, *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 842–850.

[36] M. Botta, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *2000*, 399–407.

[37] R. M. Supkowski, W. DeW. Horrocks, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5616–5619.

[38] É. Tóth, R. Király, J. Platzek, B. Radüchel, E. Brücher, *Inorganica Chim. Acta* **1996**, *249*, 191–199.

[39] P. F. Sieving, A. D. Watson, S. M. Rocklage, *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 65–71.

[40] E. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur, *Magn. Reson. Med.* **1994**, *31*, 1–8.

[41] É. Tóth, F. Connac, L. Helm, K. Adzamli, A. E. Merbach, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 606–613.

[42] S. G. Zech, H. B. Eldredge, M. P. Lowe, P. Caravan, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3576–3584.

[43] J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, K. I. Hardcastle, I. Lukeš, S. Aime, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 975–987.

[44] W. J. Rieter, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9024–9025.

[45] V. S. Vexler, O. Clément, H. Schmitt-Willich, R. C. Brasch, *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, *4*, 381–388.

[46] A. S. Merbach, L. Helm, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, **2013**.

[47] P. Caravan, A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3972–3974.

[48] A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring, P. Caravan, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 1990–2001.

[49] T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307–320.

[50] A. J. Grillo-López, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2002**, *2*, 485–493.

[51] D. A. Pryma, B. B. Chin, R. B. Noto, J. S. Dillon, S. Perkins, L. Solnes, L. Kostakoglu, A. N. Serafini, M. H. Pampaloni, J. Jensen, T. Armor, T. Lin, T. White, N. Stambler, S. Apfel, V. A. DiPippo, S. Mahmood, V. Wong, C. Jimenez, *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 623–630.

[52] R. C. Walker, G. T. Smith, E. Liu, B. Moore, J. Clanton, M. Stabin, *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 855–860.

[53] L. B. Solnes, R. A. Werner, K. M. Jones, M. S. Sadaghiani, C. R. Bailey, C. Lapa, M. G. Pomper, S. P. Rowe, *J. Nucl. Med.* **2020**, *61*, 311–318.

[54] Eloïse Thomas, Thèse soutenue le 17/07/2017, Université Claude Bernard (Lyon)**.**

[55] L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. Van der Sanden, J.-P. Klein, B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros, O. Tillement, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2477–2488.

[56] Y. Ling, K. Wei, F. Zou, S. Zhong, *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 266–275.

[57] F. Lux, L. Sancey, A. Bianchi, Y. Crémillieux, S. Roux, O. Tillement, *Nanomed.* **2015**, *10*, 1801–1815.

[58] A. Sour, S. Jenni, A. Ortí-Suárez, J. Schmitt, V. Heitz, F. Bolze, P. Loureiro de Sousa, C. Po, C. S. Bonnet, A. Pallier, É. Tóth, B. Ventura, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 4545–4554.

[59] Z. M. Bhujwalla, S. Kakkad, Z. Chen, J. Jin, S. Hapuarachchige, D. Artemov, M.-F. Penet, *J. Magn. Reson.* **2018**, *291*, 141–151.

[60] Y. Xiang, N. Li, L. Guo, H. Wang, H. Sun, R. Li, L. Ma, Y. Qi, J. Zhan, D. Yu, *Carbon* **2018**, *136*, 113–124.

[61] Y. Yang, L. Xu, W. Zhu, L. Feng, J. Liu, Q. Chen, Z. Dong, J. Zhao, Z. Liu, M. Chen, *Biomaterials* **2018**, *156*, 121–133.

[62] H. Idriss, F. Estour, I. Zgani, C. Barbot, A. Biscotti, S. Petit, C. Galaup, M. Hubert-Roux, L. Nicol, P. Mulder, G. Gouhier, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 4531.

[63] I. Zgani, H. Idriss, C. Barbot, F. Djedaïni-Pilard, S. Petit, M. Hubert-Roux, F. Estour, G. Gouhier, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 564–569.

[64] A. Biscotti, C. Barbot, L. Nicol, P. Mulder, C. Sappei, M.-H. Roux, I. Déchamps-Olivier, F. Estour, G. Gouhier, *Polyhedron* **2018**, *148*, 32–43.

[65] P.-L. Champagne, C. Barbot, P. Zhang, X. Han, I. Gaamoussi, M. Hubert-Roux, G. E. Bertolesi, G. Gouhier, C.-C. Ling, *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 8964–8977.

[66] A. Villiers, **1891**, 536–538.

[67] F. Schardinger, *Zbl Bakteriol Parasitenkd Infekt. Hyg Abt II* **1905**, *14*, 772–781.

[68] D. Duchene, *Search PubMed* **1987**, 134–136.

[69] H. Schlenk, D. M. Sand, J. A. Tillotson, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3587–3590.

[70] S. Gould, R. C. Scott, *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1451–1459.

[71] A. Biscotti, Thèse soutenue le 11/07/2016, Université de Rouen.

[72] J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1505–1509.

[73] Y. Song, E. K. Kohlmeir, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6662–6663.

[74] J. W. Fredy, J. Scelle, A. Guenet, E. Morel, S. Adam de Beaumais, M. Ménand, V. Marvaud, C. S. Bonnet, E. Tóth, M. Sollogoub, G. Vives, B. Hasenknopf, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 10915–10920.

[75] J. W. Fredy, J. Scelle, G. Ramniceanu, B.-T. Doan, C. S. Bonnet, É. Tóth, M. Ménand, M. Sollogoub, G. Vives, B. Hasenknopf, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1136–1139.

[76] P. J. Skinner, A. Beeby, R. S. Dickins, D. Parker, S. Aime, M. Botta, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 1329–1338.

[77] C. S. Bonnet, P. H. Fries, A. Gadelle, S. Gambarelli, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10401–10413.

[78] Célia Sappei, Thèse soutenue le 25/05/2018, Université de Rouen.

[79] S. Aime, E. Gianolio, F. Arena, A. Barge, K. Martina, G. Heropoulos, G. Cravotto, *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 370–379.

[80] P. Blasi, S. Giovagnoli, A. Schoubben, M. Ricci, C. Rossi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 454–477.

[81] C. M. C. Tempany, N. J. McDannold, K. Hynynen, F. A. Jolesz, *Radiology* **2011**, *259*, 39–56.

[82] O. Al-Bataineh, J. Jenne, P. Huber, *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 346–353.

[83] R. K. Oberoi, K. E. Parrish, T. T. Sio, R. K. Mittapalli, W. F. Elmquist, J. N. Sarkaria, *Neuro-Oncol.* **2016**, *18*, 27–36.

[84] C. Ché, G. Yang, C. Thiot, M.-C. Lacoste, J.-C. Currie, M. Demeule, A. Régina, R. Béliveau, J.-P. Castaigne, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2814–2824.

[85] M. Demeule, J.-C. Currie, Y. Bertrand, C. Ché, T. Nguyen, A. Régina, R. Gabathuler, J.-P. Castaigne, R. Béliveau, *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 1534–1544.

[86] P. Xing, Z. Liao, Z. Ren, J. Zhao, F. Song, G. Wang, K. Chen, J. Yang, *Chin. J. Cancer* **2016**, *35*, 1-8.

[87] Y. Bertrand, J.-C. Currie, M. Demeule, A. Régina, C. Ché, A. Abulrob, D. Fatehi, H. Sartelet, R. Gabathuler, J.-P. Castaigne, D. Stanimirovic, R. Béliveau, *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2827–2839.

[88] W. Ke, K. Shao, R. Huang, L. Han, Y. Liu, J. Li, Y. Kuang, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6976–6985.

[89] T. Suksrichavalit, S. Prachayasittikul, C. I. Na Ayudhya, V. Prachayasittikul, *J. Mater. Sci.* **2014**, *49*, 8204–8213.

[90] P. Figueiredo, V. Balasubramanian, M.-A. Shahbazi, A. Correia, D. Wu, C. G. Palivan, J. T. Hirvonen, H. A. Santos, *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 794–803.

[91] A. Zarebkohan, F. Najafi, H. R. Moghimi, M. Hemmati, M. R. Deevband, B. Kazemi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *78*, 19–30.

[92] C. Velasco-Aguirre, F. Morales-Zavala, E. Salas-Huenuleo, E. Gallardo-Toledo, O. Andonie, L. Muñoz, X. Rojas, G. Acosta, M. Sánchez-Navarro, E. Giralt, E. Araya, F. Albericio, M. J. Kogan, *Nanomed.* **2017**, *12*, 2503–2517.

[93] R. Huang, H. Ma, Y. Guo, S. Liu, Y. Kuang, K. Shao, J. Li, Y. Liu, L. Han, S. Huang, S. An, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2549–2559.

[94] W. Han, G. Yin, X. Pu, X. Chen, X. Liao, Z. Huang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2017**, *28*, 1695–1712.

Partie 3 : Vectorisation et Libération contrôlée de principes actifs

I. Introduction

Chaque année, le développement de molécules d'intérêt thérapeutique est abandonné en raison de propriétés physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaire, etc.) peu favorables au passage du principe actif à travers les barrières biologiques, à la présence d'effets secondaires ou à une dégradation trop importante du composé avant qu'il n'atteigne sa cible thérapeutique. Dans ce contexte, l'utilisation de systèmes capables de véhiculer le médicament jusqu'à sa cible est une approche très attractive.

La chimiothérapie souffre d'un manque de sélectivité puisqu'elle détruit également les cellules saines et l'efficacité des quantités injectées n'est pas toujours optimale. Dans ce cas, les principes actifs sont pris en charge par un vecteur, puis délivrés de façon contrôlée, conduisant ainsi à une augmentation de leur efficacité après administration et à une diminution des effets secondaires.

L'objectif est donc de cibler chaque cellule cancéreuse et surtout de doser la quantité efficace de médicament à administrer. Ainsi, la conception d'un vecteur doit répondre aux paramètres suivants :

- être biocompatible pour l'organisme,
- transporter la molécule d'intérêt de manière efficace,
- franchir les barrières biologiques et protéger la molécule jusqu'à son acheminement sur la cible,
- permettre de libérer le principe actif de manière contrôlée.

Les recherches sur la vectorisation ont fait des progrès considérables et de nombreux types de vecteurs sont désormais proposés. Ces vecteurs peuvent être d'origine biologique tels que l'hémoglobine, les lipoprotéines, d'origine naturelle mais non biologique (virus modifiés, bactéries), d'origine synthétique (nanoparticules, liposomes) ou encore d'origine moléculaire tels que les polymères conjugués, les anticorps ou les complexes d'inclusion de cyclodextrines qui sera le vecteur selectionné pour cette étude. En effet, parmi ces molécules hôtes, les cyclodextrines ont un potentiel important pour les raisons suivantes :

- molécules issues par conversion enzymatique simple de l'amidon qui est une source naturelle renouvelable,
- production industrielle en milliers de tonnes par an *via* des technologies respectueuses de l'environnement,
- prix faible de l'ordre de quelques dollars/kg,[95]
- modifications chimiques industrialisées (Roquette, Cyclolab, ex : CD-N_3, CD-NH_2),
- formation de complexes d'inclusion avec des médicaments modifiant leurs biodisponibilités,
- utilisation industrielle en pharmacie approuvée par la FDA (HP-β-CD, β-CD, SBE-β-CD),
- Toxicité souvent nulle dépendant de la stucture de la CD

Le principe actif encapsulé dans le vecteur est un élément clé. Sa nature varie selon le type de thérapie envisagée.

II. Vectorisation de médicaments

La recherche de médicaments innovants pour la chimiothérapie sans compromettre la santé des patients représente un grand défi. Au cours des dernières décennies, de nombreux médicaments anticancéreux ont été découverts et développés comme le paclitaxel, le docétaxel, le *cis*platine, etc. Cependant, ces médicaments présentent une lipophilie élevée et une faible hydrosolubilité. Ceci constitue un frein à leur développement et leur utilisation clinique nécessitant, par conséquent, de nouvelles formulations *via*, par exemple, la formation de complexes d'inclusion avec les cyclodextrines.

II.1 Cyclodextrines, vecteurs de médicaments

Les cyclodextrines se caractérisent par leur capacité à former des complexes d'inclusion avec une très large gamme de molécules. Ainsi, l'α-CD et la β-CD sont couramment utilisées dans la conception de structures supramoléculaires dans le but de vectoriser des médicaments insolubles en phase aqueuse. Des exemples d'applications sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Exemples de systèmes de vectorisation de médicament à base de CD

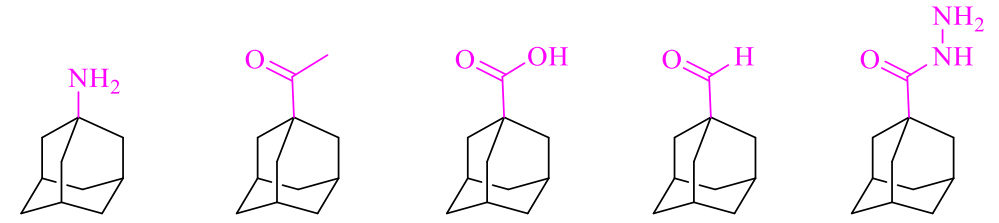
Médicaments	**Traitements**	**Cyclodextrines**	**Améliorations apportées par la CD**
Paclitaxel	Cancer du sein et de l'ovaire, Leucémie	M-β-CD[96]	Amélioration de la solubilité (de ~ 0,3 µg/mL à 5 mg/mL) et de la stabilité
Méthotrexate	Cancer du sein et de la peau	β-CD[97]	Augmentation de la solubilité et de la vitesse de dissolution, amélioration de la biodisponibilité et de l'activité anticancéreuse
Camptothécine	Leucémie	DM-β-CD[98]	Amélioration de la solubilité (171 fois), de la stabilité, amélioration de la cytotoxicité
		HP-β-CD[98,99]	Augmentation de la solubilité et de la cytotoxicité
Doxorubicine	Lymphome et leucémie	HP-β-CD[100]	Amélioration de la stabilité et réduction de la photodégradation
*Cis*platine	Cancer du testicule, cancer de l'ovaire, cancer du sein	HP-β-CD[101]	Augmentation de la solubilité et de la vitesse de dissolution, amélioration de la stabilité
5-Fluorouracile	Cancer du côlon rectal et du sein	α-CD et β-CD[102]	Amélioration de la solubilité et augmentation de l'activité anticancéreuse
		β-CD et HP-*β*-CD[103]	Amélioration de la solubilité
Lapatinib	Cancer du sein	SBE-β-CD[104]	Amélioration significative de la solubilité (plus de 600 fois)
Curcumine	Cancer du cou	HP-β-CD[105]	Amélioration de la solubilité et de la stabilité Amélioration de la cytotoxicité
		β-CD[106]	Augmentation de la stabilité à la lumière, au pH et au chauffage

D'après Qui *et al.*[107]

Dans l'objectif de former des complexes d'inclusion encore plus stables, il est nécessaire de chercher des couples cyclodextrine / invité avec une constante d'association élevée. Dans la littérature, de nombreux exemples de constantes d'affinité entre les cyclodextrines et les petites molécules lipophiles ont été répertoriés. Le système β-cyclodextrine / adamantane constitue l'un d'entre eux (Ka > 10^4 M^{-1}). Ainsi, la forte stabilité du complexe avec le groupement adamantyle en fait un bon outil d'ancrage pour l'élaboration de systèmes macromoléculaires.

II.2 Ancre chimique à base d'adamantane

L'adamantane est un hydrocarbure cristallin, incolore de formule brute $C_{10}H_{16}$. L'adamantane a été isolé du pétrole brut en 1933[108] et la première synthèse d'adamantane a été réalisée en 1941 par Prelog et Seiwerth.[109] Cependant, ce n'est qu'en 1957 que Schleyer a découvert le réarrangement catalysé par un acide de Lewis conduisant à la formation de la cage d'adamantane.[110] Cet adamantane est alors devenu un échafaudage pour de nombreuses transformations *via* l'insertion de fonctionnalités variées (acide, amine, hydrazine, aldéhyde, cétone…) (Schéma 6).



Adamantane Amine | **Adamantane Cétone** | **Adamantane Acide** | **Adamantane Aldéhyde** | **Adamantane Hydrazine**

Schéma 6 : Exemples des différentes fonctionnalisations de l'adamantane

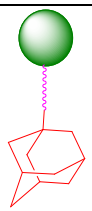
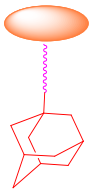
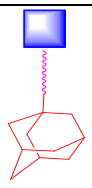
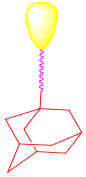
Les adamantanes (amine, cétone, acide, aldéhyde) sont commerciales et l'adamantane hydrazine peut être synthétisée selon la méthode de Luo et al.[111]

Le squelette de carbone de l'adamantane est analogue à un réseau cristallin de diamant. Son diamètre d'environ 7 Å et son volume de 180 $Å^3$ sont très proches du volume de la cavité non polaire de la β-CD (d = 7 Å, V = 270 $Å^3$) facilitant ainsi la formation d'un complexe stable d'inclusion (1 : 1) avec une constante Ka de 5.10^4 M^{-1}.[112] La γ-CD ayant une cavité légèrement plus grande, la constante de stabilité Ka diminue (5.10^3 M^{-1}). Cependant, l'adamantane ne peut pas être complètement enveloppé dans la cavité d'une α-CD en raison de sa petite taille. Cette

cyclodextrine a donc tendance à former un complexe d'inclusion 2 : 1 (2 CDs pour une molécule d'adamantane) avec une constante de stabilité Ka plus faible autour de 10^2 M^{-1}.[113–115]

En raison de cette constante d'association élevée, les complexes d'inclusion entre les dérivés de l'adamantane et la β-cyclodextrine ont souvent été utilisés pour concevoir des complexes supramoléculaires pour diverses applications (capteurs chimiques d'ions Cu^{2+}/ Zn^{2+}/ CN^-, traitement de cancers, agents de contraste). En effet, l'adamantane peut être couplé à des principes actifs de médicaments, des sondes fluorescentes, des agents de contraste ou des polymères (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemples des différents systèmes à base d'adamantane

Ancre adamantane fonctionnalisée	**Références**
 ADA-Fluorophore	Rhodamine[116,117] Fluorescéine[118,119] Cyanine[120,121] Bodipy[122]
 ADA-Médicament	Doxorubicine[111,123–133] Ciprofloxacine[notre équipe] Comptotécine[134] Paclitaxel[135] *Cis*platine[136]
 ADA-Agent de Contraste	Gd-DOTA[137,138] Gd-DTPA[139]
 ADA-Polymères	PEG[140,141]

Nous nous sommes inspirés de ces résultats pour développer notre concept avec différents modèles : ADA-Agent de contraste (DOTA), ADA-Fluorophore (Coumarine) et ADA-Médicament (TMZ).

Pour obtenir une chimiothérapie efficace, de nombreux systèmes d'administration de médicaments ont été développés. Les complexes d'inclusion cyclodextrine-adamantane-médicament sont de plus en plus utilisés en thérapie tumorale. Pour préparer ces systèmes, une activation spécifique sous l'action d'enzymes, du pH, d'une photo-irradiation ou bien encore d'ultrasons peut être utilisée pour libérer la molécule active liée soit directement, soit par le biais d'un bras espaceur fonctionnalisé, appelé *linker*, permettant ainsi sa libération contrôlée. Ces *linkers* peuvent être de nature très différente, allant de molécules de petites tailles (peptides, sucres, …) à des macromolécules (anticorps, nanoparticules, …). Dans la littérature, il existe plusieurs types de *linkers* qui sont répartis en deux catégories : clivables et non-clivables. Nous nous intéressons, dans ce manuscrit, aux *linkers* clivables.

III. *Linkers* clivables pour l'administration de chimiothérapie

La structure du bras espaceur peut donc être modulée pour améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du principe actif. Ce *linker* joue un rôle primordial et doit présenter deux caractéristiques essentielles. Il doit être suffisamment stable pour éviter la libération précoce du principe actif, qui conduirait à la perte de son activité et à l'apparition d'éventuels effets indésirables. En parallèle, il doit permettre de délivrer l'agent cytotoxique de manière contrôlée et sélective dans la cellule tumorale. Le choix du *linker* est donc crucial lors de l'étape de planification de la stratégie de synthèse. Les différents types de *linkers* clivables sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Exemples des différents linkers clivables et leurs applications

Conditions de coupure	**Fonctions hydrolysables**	**Applications**
Enzymatique	Trypsine[142,143], Thrombine[144], Cathepsine B[145], Cathespine D[146], Cathepsine K[147], Caspase 1[148], Ester[149], **SGRSANA**	Purification des protéines **Administration de médicaments** Séquençage d'ADN
Milieu Basique	Malondialdéhyde (MDA)-Dérivé d'indole[150], Hydrazone[151], Acylhydrazone[152], Alkyl thioester[153]	Modification et purification des protéines Imagerie Synthèse d'oligonucléotides
Milieu réducteur	Ponts disulfures[154–157] Composés azoïques[158–160]	Modification et purification des protéines Ciblage tumoral Imagerie Administration de médicaments
Photo-irradiation	Dérivés de 2-nitrobenzyle[161,162] Ester phénylique[163], Coumarine[164,165], Phosphotriester[166]	Purification des protéines Imagerie de l'activité des protéines Administration de médicaments Séquençage d'ADN
Milieu acide	Acétal[167,168], **Hydrazone**[133-143], **Imine**[169–172], Trityle[173], Oxime[174–176]	Purification des protéines, **Administration de médicaments**

De nombreux systèmes d'administration de médicaments présentant une activation pH-dépendante ont été développés. Différentes fonctions chimiques clivables en milieu acide (Tableau 6) par hydrolyse ont ainsi été étudiées. C'est le cas des fonctions imines et hydrazones. En effet, elles présentent des propriétés physico-chimiques adaptées à une telle application à savoir une excellente stabilité à pH physiologique associée à une acidolyse rapide à partir de pH 5. La combinaison de ces différents partenaires représente un grand défi, qui en cas de

succès, peut conduire à de réelles avancées dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer. Dans ce projet, nous allons nous concentrer sur trois *linkers* clivables : l'hydrazone, l'imine et le peptide SGRSANA.

IV. Clivage des liens sensibles au pH

L'utilisation de systèmes d'administration sensibles au pH a été explorée par plusieurs groupes afin de permettre une thérapie ciblée.[177–179] Dans la littérature, une libération spécifique au niveau des tumeurs est possible en jouant sur le gradient de pH qui diffère entre les cellules saines et cancéreuses.

IV.1 Acidité des cellules tumorales

Dans une stratégie anticancéreuse, la suracidité d'une tumeur est utilisée pour l'hydrolyse spécifique de composés pH-sensibles. En 1956, Otto Warbrug[180] a été le premier à présenter le métabolisme particulier des cellules cancéreuses avec la conversion du glucose en acide lactique *via* la glycolyse de 90% du pyruvate en présence d'oxygène. Il en résulte une concentration d'acide lactique anormalement haute dans le cytoplasme. Pour maintenir un pH intracellulaire normal, l'acide formé est alors excrété vers le milieu extracellulaire. Cependant, le débit sanguin d'une tumeur étant faible, cet acide tend à s'accumuler dans l'espace intratumoral plutôt que d'être éliminé, entrainant un pH-intratumoral anormalement bas par rapport à un tissu sain. Cette différence est de l'ordre de 0,5 à 1,5 unités de pH selon les tumeurs étudiées.[181]

IV.2 Mécanisme de libération d'un système pH sensible au sein d'une cellule cancéreuse

A proximité de la tumeur, les principes actifs liés au vecteur doivent être libérés pour exercer leur activité antitumorale. Les systèmes d'administration de médicaments qui contiennent un ligand approprié peuvent pénétrer dans la cellule tumorale par un phénomène d'endocytose *via* des récepteurs (Figure 37).

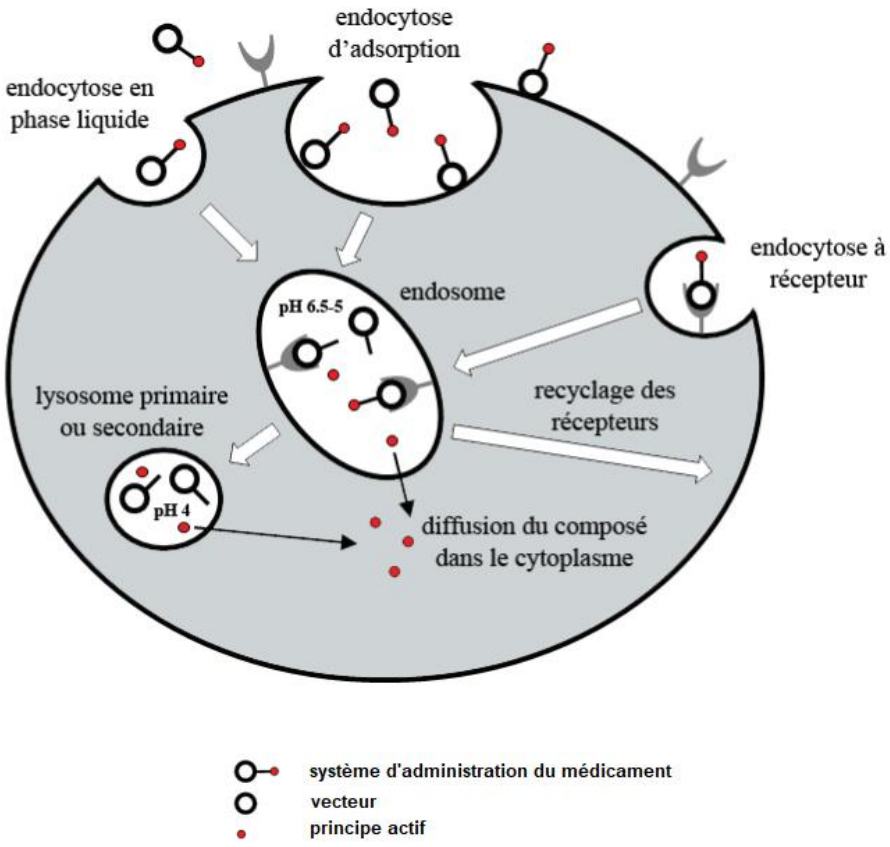


Figure 37 : Exemple de libération d'un composé actif pH-sensible[182]

Une fois reconnu par les récepteurs, le système est ensuite internalisé. Des endosomes se forment et ces sous-compartiments de la cellule ou organites, sur lesquels les vésicules d'endocytose s'accrochent, fusionnent pour libérer leur contenu qui migrent alors dans le cytoplasme. Durant, ce transport, le pH des vésicules formées diminue et passe de pH 7,2-7,4 dans l'espace extracellulaire à pH 6,5-5,0 dans les endosomes et à environ pH 4,5-4,0 dans des lysosomes primaires et secondaires. Ces lysosomes sont des vésicules golgiennes contenant des hydrolases acides telles que des estérases, des protéases et des lipases qui favorisent la coupure de la liaison pH-sensible dans le cytoplasme cellulaire et donc la libération du principe actif.

V. Exemples de systèmes d'administration de chimiothérapie à base des linkers clivables sélectionnés

V.1 Les *linkers* hydrazones

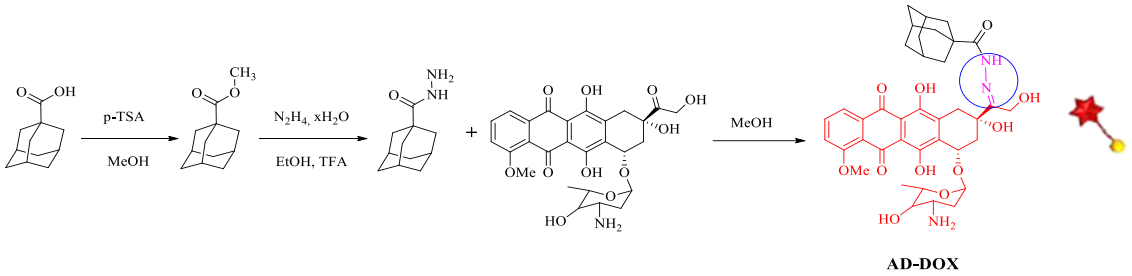
La formation d'hydrazone résulte de la condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone avec une hydrazine. Le principe de libération est basé sur la stabilité du *linker* à pH sanguin (pH 7,3 - 7,5), mais sensible au pH acide des cellules tumorales (pH 5,5 - 6,5).

La doxorubicine (DOX) est une chimiothérapie hydrophobe fréquemment administrée comme traitement dans plus de dix types de tumeurs cancéreuses comprenant le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon et du pancréas.[183–186] Pour traiter de façon efficace certains cancers agressifs, il est souvent nécessaire de traiter le patient avec une forte dose d'agent anticancéreux sur une longue période. Cependant, la doxorubicine est particulièrement cytotoxique pour le cœur, le cerveau, le foie et les reins, mais également pour des tissus sains entourant l'environnement tumoral lorsqu'ils sont prescrits à des doses élevées.

En 2012, une nouvelle classe de microcapsules supramoléculaires (SMC) intelligentes a été conçue et fabriquée par Luo *et al.*[111] pour administrer des médicaments à pH contrôlé. Les SMCs ont été construits sur la base d'auto-assemblages entre des polyaldéhydes dextrane-adamantane (PAD-g-AD), du carboxyméthyl-dextrane lié à la β-CD (CMD-g-β-CD) sur des particules de $CaCO_3$ *via* une interaction hôte-invité (Schéma 7). Les SMCs préparées ont présenté une stabilité élevée vis-à-vis de stimuli environnementaux (température, pH).

La molécule active, la doxorubicine, a été modifiée avec l'adamantane (AD-Dox) par des liaisons hydrazones sensibles au pH. Une fois le coating formé, le carbonate est dissous, libérant une cavité et formant une microcapsule. L'étude de la libération du médicament *in vitro* a été réalisée à pH 5,5 et 7,4. A pH acide, les SMCs sont détruites entraînant une libération contrôlée du médicament (80% après 13 heures) pour induire l'apoptose des cellules tumorales. A pH 7,4 seulement 18% du médicament chargé a été libéré dans les 13 heures.

(a)



(b)

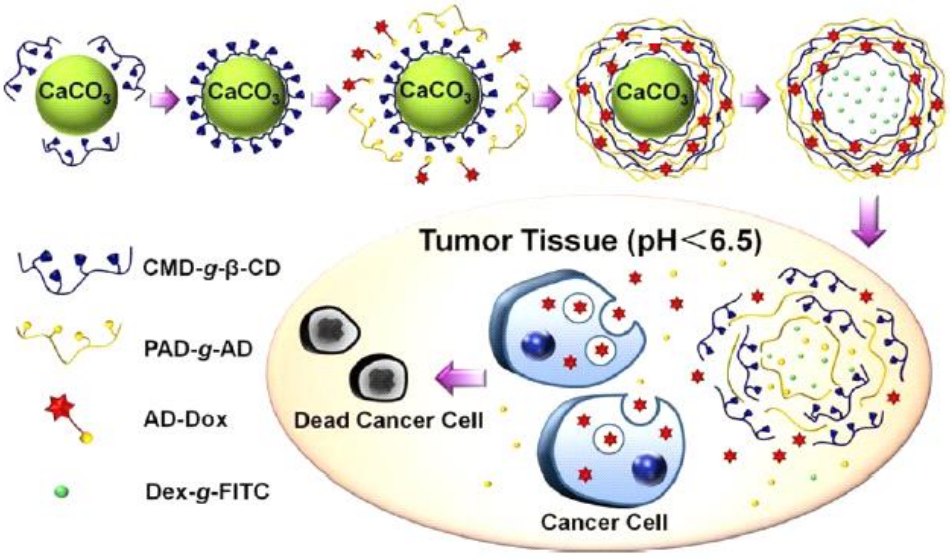


Schéma 7 : (a) Voie de synthèse du composé AD-DOX ; (b) Libération du médicament à pH acide à partir d'une microcapsule chargée de doxorubicine

En 2017, Zhao *et al.* ont[187] développé *des* nanotiges d'or (GNR), incorporées dans des réseaux d'hydrogels formés par copolymérisation à base de *N-iso*propylacrylamide (NIPAm) et de poly-β-cyclodextrines méthacrylées (NRC) (Schéma 8). Le même dérivé AD-DOX est ensuite lié à l'hydrogel par interaction hôte-invité. L'hydrogel nanocomposite libère de manière lente et régulière l'anticancéreux (DOX) pendant plus d'un mois.

Les tests *in vivo* sur les tumeurs ont confirmé l'impact positif du nanocomposite hydrogel lors d'une thérapie synergique chimiophotothermique, avec des effets indésirables réduits en raison de la rétention prolongée du médicament dans la région de la tumeur.

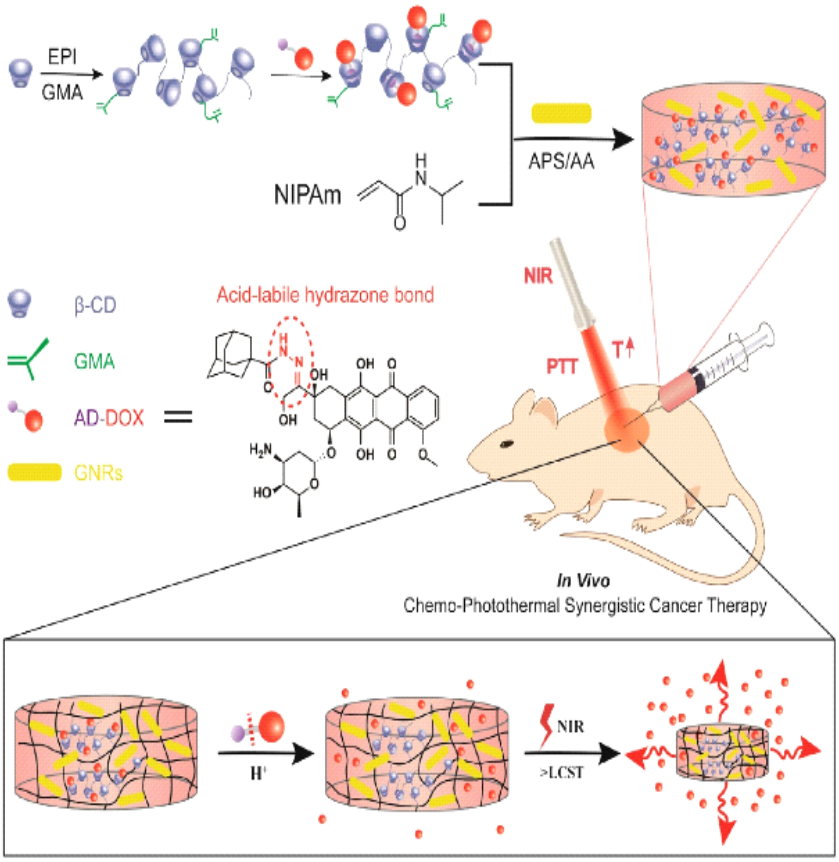


Schéma 8 : Illustration de la formation d'un hydrogel nanocomposite injectable

La même année, Cyphert *et al.*[124] ont développé un système d'administration de la doxorubicine à base de polymères de cyclodextrine (pCD). Les résultats ont démontré une libération lente du médicament à des taux appropriés permettant ainsi de réduire la toxicité de la doxorubicine. À pH 5,0, environ 90% du médicament chargé sont libérés contre seulement 40% à pH 7 au bout de 30 jours.

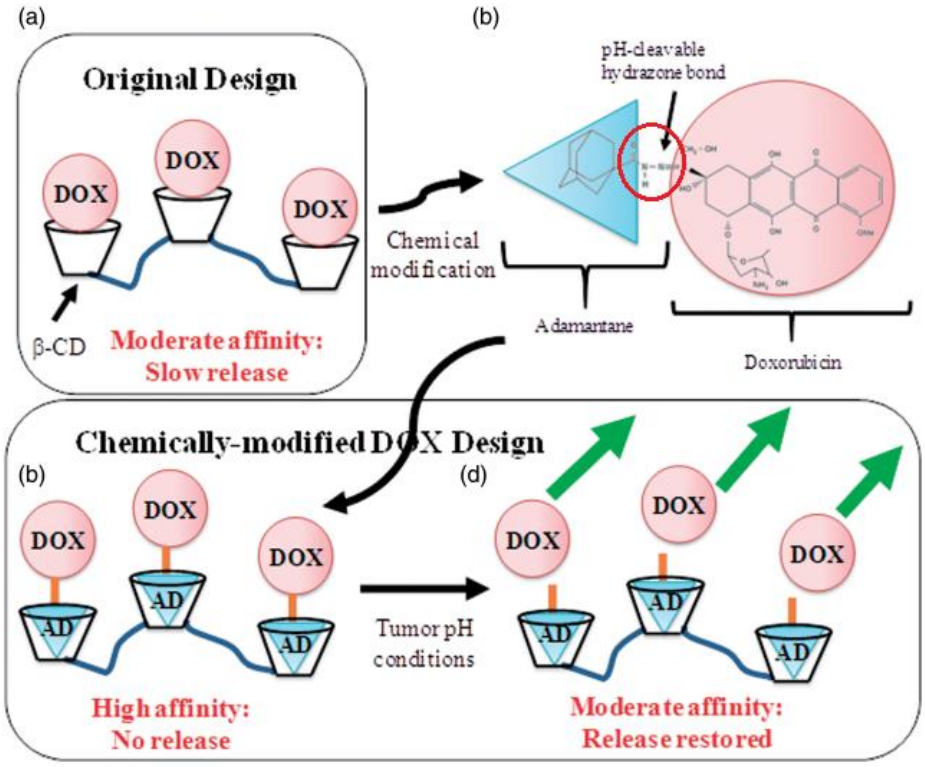


Schéma 9 : Représentation schématique des systèmes d'administration de la doxorubicine
DOX : Doxorubicine ; AD : Adamantane ; β-CD : β-cyclodextrine

V.2 Les *linkers* imines

Les *linkers* contenant une fonction imine tout comme les *linkers* hydrazones sont sensibles aux pH acides de 3 à 6,5.

Sheng *et al.*[172] en 2017 ont synthétisé des conjugués CD-PEG de type dendritique avec un noyau CD et plusieurs bras PEG terminés par des acrylates. Ces hydrogels PEG peuvent incorporer la doxorubicine modifiée par l'adamantane *via* une interaction hôte-invité. Après injection, la doxorubicine est libérée de l'hydrogel par le clivage de la liaison benzoïque-imine (liaison entourée en bleu sur le Schéma 10) sur l'environnement tumoral acide pour tuer sélectivement les cellules cancéreuses des tumeurs malignes. A pH = 7,4, environ 40% de doxorubicine sont libérés de l'hydrogel après 24 heures. Par contre, dans des conditions acides à pH = 6,8, 80% de doxorubicine sont relargués en 5 heures. Cette sélectivité aux cellules cancéreuses protège les cellules saines.

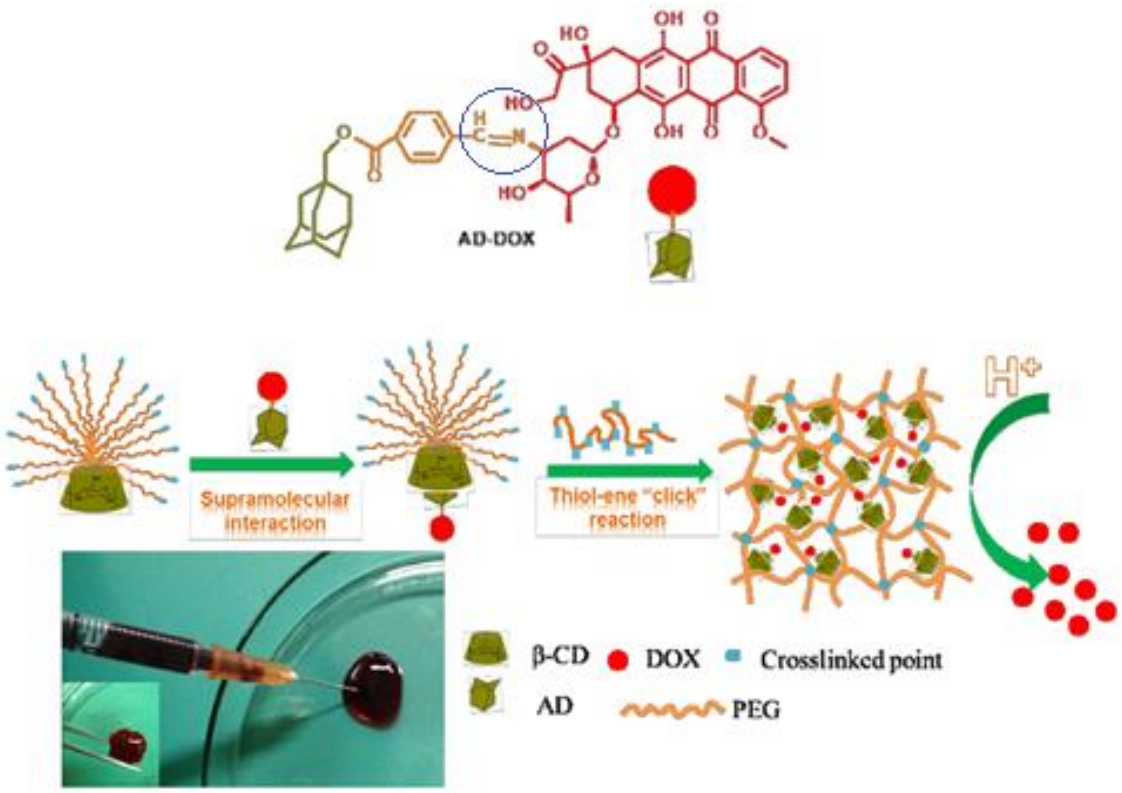


Schéma 10 : Préparation d'hydrogel injectable chargé de doxorubicine par réaction de click thiolène et interaction supramoléculaire hôte-invité

Cette étude fournit une nouvelle stratégie pour améliorer la stabilité, la solubilité dans l'eau et la biocompatibilité du médicament en utilisant des hydrogels PEG injectables pour une chimiothérapie ciblée.

Des données cinétiques sont disponibles dans la littérature pour chaque groupement hydrolysable précédemment cité. Les composés sont caractérisés en solution et à l'aide de temps de demi-vie mesurés à différents pH 5, 6,5 et 7,4. Ces pH sont généralement utilisés comme des modèles de variation du pH, pH 7,4 au niveau du sang et pH 5-6,5 au voisinage d'une tumeur. A partir de ces résultats, il est donc possible d'évaluer la cinétique et la sélectivité de l'hydrolyse en milieu acide du système. L'hydrolyse du lien clivable s'effectue souvent en solution dans différents milieux tamponnés, suivie d'une analyse par spectrophotométrie UV-Visible, par RMN, par HPLC ou bien par fluorescence.

V.3 Le peptide SGRSANA

Afin de pouvoir contrôler le relargage du TMZ, une autre stratégie non plus chimique (en présence de pH acide) mais biologique a été envisagée *via* une coupure par une enzyme spécifique l'urokinase (uPA). Cet activateur du plasminogène est une protéase à sérine qui a pour fonction de cliver des protéines ou des peptides en hydrolysant leurs liaisons peptidiques. Son site actif contient un résidu de sérine qui joue un rôle essentiel dans la catalyse. Elles participent à une grande variété de processus biologiques, tels que la digestion, la réponse immunitaire, la coagulation sanguine, ou encore la maturation des virus. L'urokinase a été, à l'origine, isolée de l'urine humaine, mais elle est aussi présente dans le sang ou dans la matrice extracellulaire. Son substrat physiologique est le plasminogène qui est la forme inactive de la plasmine qui est une peptidase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques situées préférentiellement après un résidu de lysine ou un résidu d'arginine. L'activation de la plasmine déclenche une cascade protéolytique, qui en fonction de l'environnement participe à la thrombolyse ou la dégradation de la matrice extracellulaire.

En cancérologie, l'urokinase issue des cellules tumorales est impliquée à la fois dans la prolifération par interaction avec les voies de signalisation des facteurs de croissance, la néoangiogenèse, la mobilité cellulaire et la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant les métastases. Ces enzymes sont caractérisées par la présence d'une triade catalytique composée des chaînes latérales de trois acides aminés : His 57, Asp 102 et Ser 195. Ces résidus sont en interaction et forment un relai de charge qui rend nucléophile la sérine du site actif et permet l'attaque du groupe carbonyle de la liaison peptidique à hydrolyser.

La surexpression de uPA est présente dans divers types de cancers[188], tels que le sein[189], la prostate[190], les reins[191], les ovaires[192], cervicale[193], le pancréas[194], les gliomes[195]. En particulier pour le cancer du sein, la surexpression de l'uPA et de son inhibiteur naturel, l'urokinase plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), est associée à un mauvais pronostic de la patiente.[189]

L'activateur du plasminogène urokinase (uPA) joue donc un rôle important dans la protéolyse associée aux tumeurs. L'enzyme amorce la conversion catalytique du plasminogène zymogène inactif en plasmine active. Cette conversion est facilitée en présence de métastases cancéreuses en dégradant la matrice extracellulaire et la membrane basale.[196]

Dans ce contexte à partir de 2004, l'équipe de Law a immobilisé sur divers supports (gel (2005), copolymère (2004), nanofibre hydrophobe (2007, 2011)) un heptapeptide très réactif et

sélectif, synthétisé en 1997 par Madison *et al.*, H-Ser-Gly-Arg-Ser-Ala-Asn-Ala-OH (SGRSANA), substrat de l'uPA. Le motif SGRSA est coupé 840 fois plus efficacement que la séquence native du plasminogène (Kcat/Km = 1200 $M^{-}1.s^{-1}$).

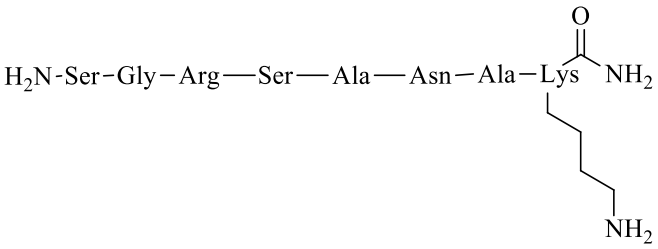


Figure 38 : Structure de l'heptapeptide

Ce peptide est substitué par un polyéthylène glycol (PEG) hydrophile et des agents fluorescents (FITC, Cy5.5, Cy7, NIR664) engendrant après coupure entre l'Argénine et la Sérine un signal spécifique. L'activité enzymatique a été étudié par incubation en présence d'uPA (250 nM) pendant 24 heures. Une forte augmentation de l'intensité du signal de fluorescence apparait dépendante de la concentration enzymatique. Un plateau apparait entre 2 à 8 heures de digestion selon le support. Ce phénomène disparait en présence d'un inhibiteur de l'uPA (amiloride, 1 mM). Ce support biosensible et sélectif à l'uPA trouve des applications comme détecteur d'activité enzymatique par zymographie (2005), comme sonde pour le diagnostique par fluorescence ou infrarouge *ex vivo* (2007, 2011) et *in vivo* (2006) et comme vecteur de principe actif par encapsulation dans une matrice biodégradable (2006). En 2014, l'équipe de Pierre-Yves Renard (COBRA, UMR 6014, Université Rouen Normandie) a fonctionnalisé ce marqueur biologique du plasminogène pour obtenir une nouvelle sonde FRET (Figure 39).[197]

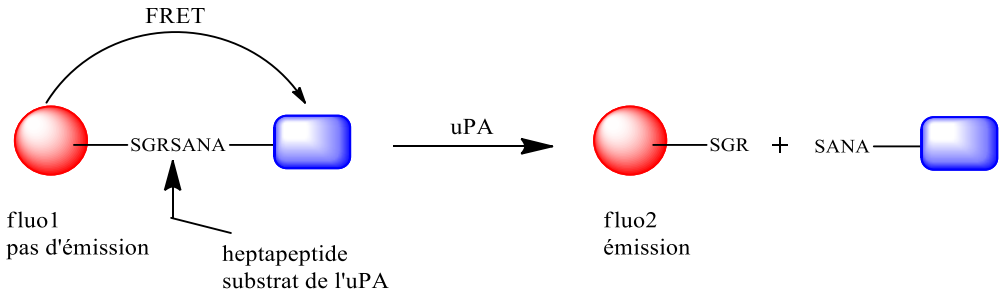


Figure 39 : Clivage de l'heptapeptide par l'uPA[197]

Ainsi, la surexpression de cette enzyme impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses et des métastases a pu être visualisée par fluorescence *in vitro* dans de l'urine

humaine. Une coupure quantitative et une forte augmentation de la fluorescence ont été observées en 20 minutes. Ce test a été ensuite réalisé sur des cellules vivantes de cancer de la prostate (PC3) après une incubation de 2 heures à une concentration de 20 μM. La fluorescence est apparue dans les cellules validant l'efficacité de la sonde optique.

En 2018, Cheng *et al.* ont développé, avec succès, une sonde optique fluorescente dans le proche infrarouge permettant de guider les chirurgiens lors de leurs interventions chirurgicales de cancer du cerveau de souris afin de distinguer les cellules malades autour de 3 mm de profondeur. En suivant le même principe, dans ce cas, un autre peptide nommé AE105, utilisé chez l'humain en imagerie et spécifique du récepteur du plasminogène a été sélectionné.

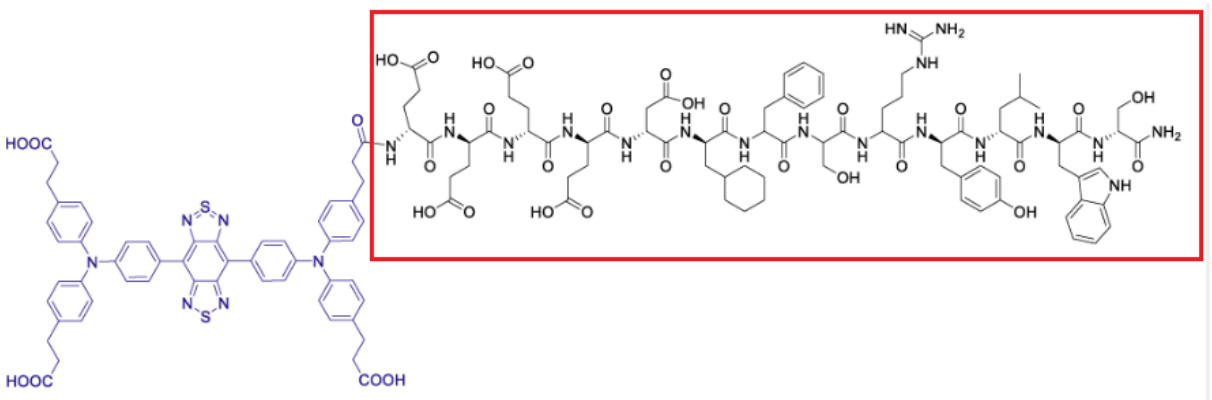


Figure 40 : Structure du peptide AE105 encadré en rouge

V.4 Conclusion

Nous souhaitons, mettre au point un agent théranostique intégrant une nouvelle sonde d'imagerie intracellulaire sur la base de β-cyclodextrine. Cette sonde sera capable de passer la BHE, de vectoriser le temozolomide sur la cible à traiter. Il sera ainsi possible de suivre l'efficacité du traitement par IRM grâce à un agent de contraste au gadolinium. Pour pouvoir être véhiculé, le TMZ sera lié par l'intermédiaire d'un bras espaceur, à une molécule d'adamantane servant d'ancre chimique. L'adamantane est en effet connu pour former des complexes d'inclusion relativement stables avec la cavité oligosaccharidique de la β-cyclodextrine. La libération du TMZ sera contrôlée par le clivage du bras espaceur sous l'action d'une enzyme spécifique ou bien du pH plus acide au voisinage des cellules cancéreuses. Pour atteindre ces objectifs, nous avons choisi de travailler avec les liens hydrazones et imines qui sont pH dépendants et le peptide SGRSANA qui peut être clivé par l'urokinase. Nous souhaitons donc obtenir trois différentes briques pour le suivi IRM, pour le passage de la BHE et pour la libération contrôlée du principe actif, permettant un assemblage modulable pour obtenir la sonde théranostique.

VI. Plateformes théranostiques à base de cyclodextrine

Au cours des dernières décennies, de nombreuses équipes de recherche se sont concentrées sur le développement de plateformes basées sur différents vecteurs (liposomes, polymères, micelles, cyclodextrines, nanoparticule, anticorps) pour la délivrance de chimiothérapie associée à l'imagerie médicale pour une thérapie ciblée (Figure 41). Dans cette partie nous allons vous présenter quelques plateformes théranostiques existantes, devéloppées à base de cyclodextrine.

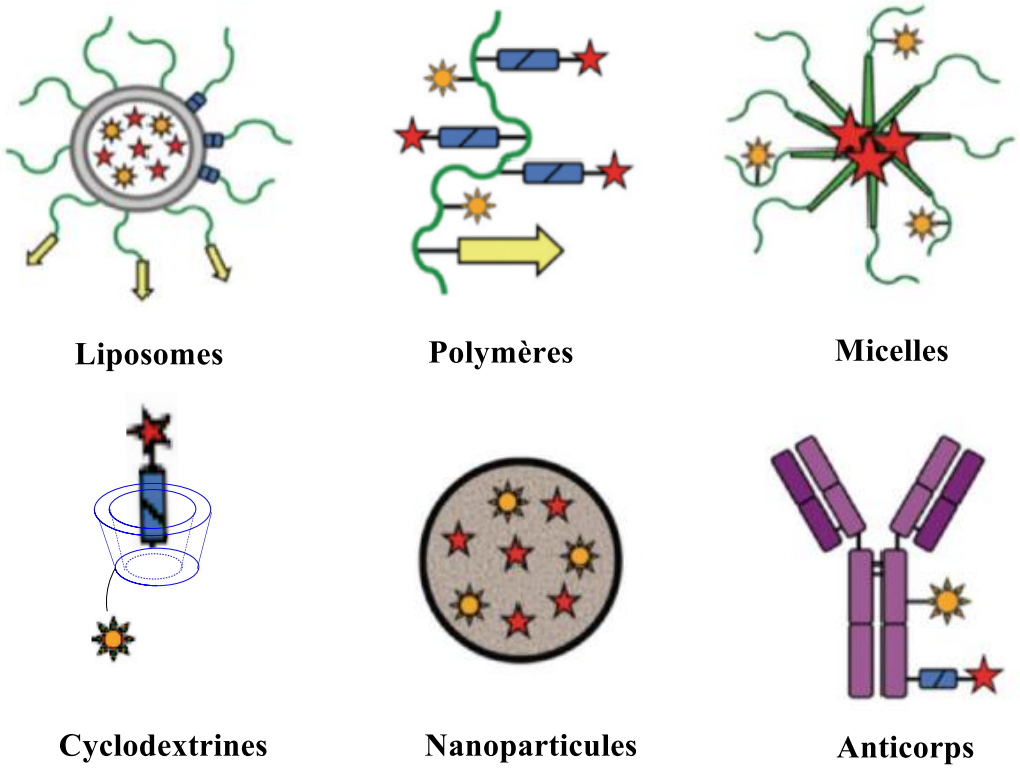


Figure 41 : Exemples de plateformes théranostiques[198]
En bleu : les linkers permettant la libération de médicaments,
en orange : les agents d'imagerie et en rouge les agents thérapeutiques

Les cyclodextrines présentent des avantages inégalés dans le diagnostic et le traitement des maladies grâce à leurs propriétés de complexation hôte-invité. La nature dynamique des interactions non covalentes et l'inclusion sélective confèrent aux plateformes résultantes des propriétés intéressantes, présentant des potentiels prometteurs pour une application théranostique.

En 2012, Liu *et al.*[199] ont publié la synthèse de nanoparticules micellaires multifonctionnelles pH dépendantes (clivage *via* des liaisons carbamates) préparées à partir de copolymères étoilés à base de β-cyclodextrine fonctionnalisée disymétriquement de manière covalente avec la doxorubicine (DOX), l'acide folique (FA) sur des monomères du *N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA) et des fragments Gd-DOTA pour l'administration ciblée de médicaments sur les cellules cancéreuses et l'amélioration du contraste par IRM (Figure 42).

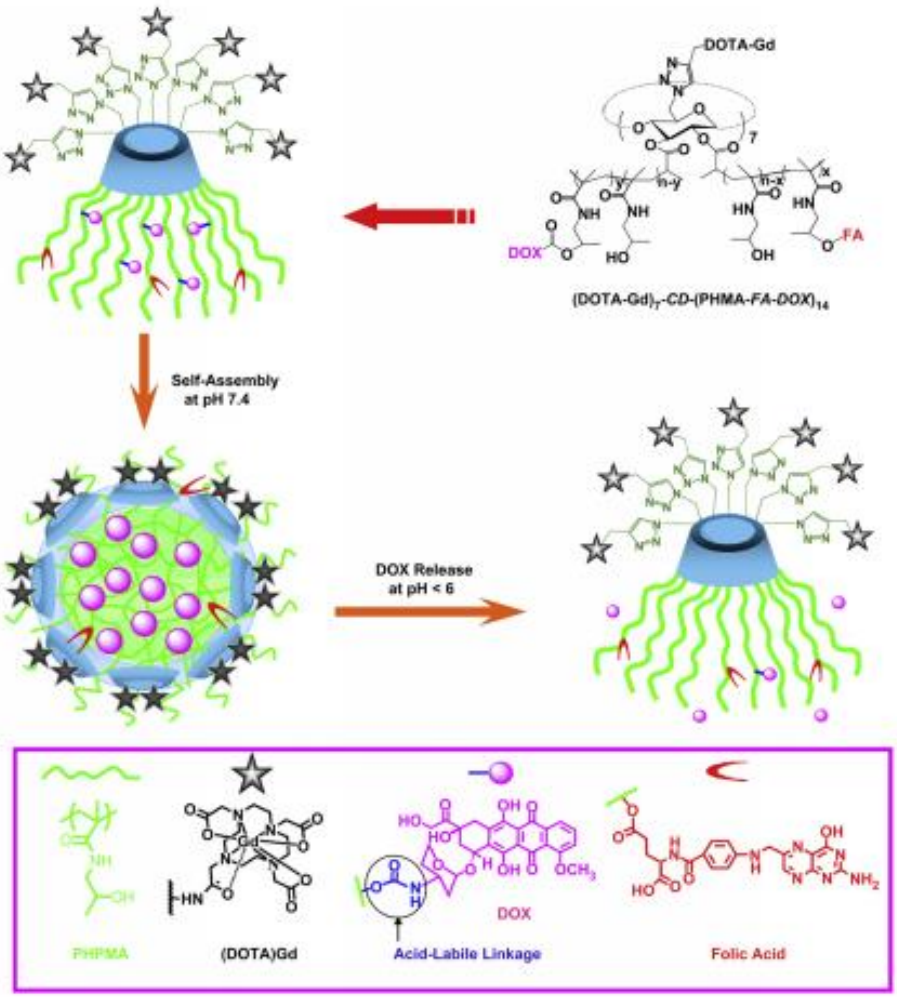


Figure 42 : Illustration schématique pour la fabrication de nanoparticules micellaires multifonctionnelles pour la théranostique à base de copolymères étoiles de β-CD, (DOTA-Gd)$_7$-CD-(PHPMA-FA-DOX)$_{14}$ conjuguées de manière covalente avec les fragments doxorubicine (DOX), d'acide folique (FA) et de DOTA-Gd. La libération de la DOX est effectuée par le pH via le clivage des liaisons carbamates entre les bras DOX et HPMA.

Dans des conditions neutres (pH 7,4), les nanoparticules micellaires présentent une libération de DOX négligeable, tandis que dans les milieux légèrement acides (pH 4,0 et 5,0), le lien carbamate s'hydrolyse plus rapidement et libère la DOX à 89% et 53%, respectivement pendant 42 heures. Les tests de viabilité cellulaire *in vitro* ont révélé que le copolymère (DOTA-Gd)$_7$-CD-(PHPMA$_{15}$)$_{14}$ était non cytotoxique jusqu'à une concentration de 0,5 g/L, tandis que les nanoparticules micellaires conjuguées DOX de (DOTA-Gd)$_7$-CD-(PHPMA-FA-DOX)$_{14}$ pouvaient pénétrer et tuer efficacement les cellules HeLa à une concentration supérieure (80 mg/L). Les expériences d'imagerie *in vitro* ont indiqué une relaxivité améliorée (r_1 = 11,4 $mM^{-1}.s^{-1}$) pour les nanoparticules micellaires par rapport au précurseur DOTA-Gd alcyne (r_1 = 3,1 $mM^{-1}.s^{-1}$). Un test d'imagerie IRM *in vivo* chez le rat a révélé une accumulation considérable de

nanoparticules micellaires dans le foie et les reins de rat avec une forte amélioration du contraste.

En 2018, Chen *et al.*[200] ont développé une plateforme théranostique à base de polymère supramoléculaire en utilisant une cyclodextrine CD-SS-CPT comme monomère supramoléculaire dans lequel l'hôte β-CD et CPT sont connectés par un groupe disulfure (SS) sensible au glutathion (GSH) (Figure 43).

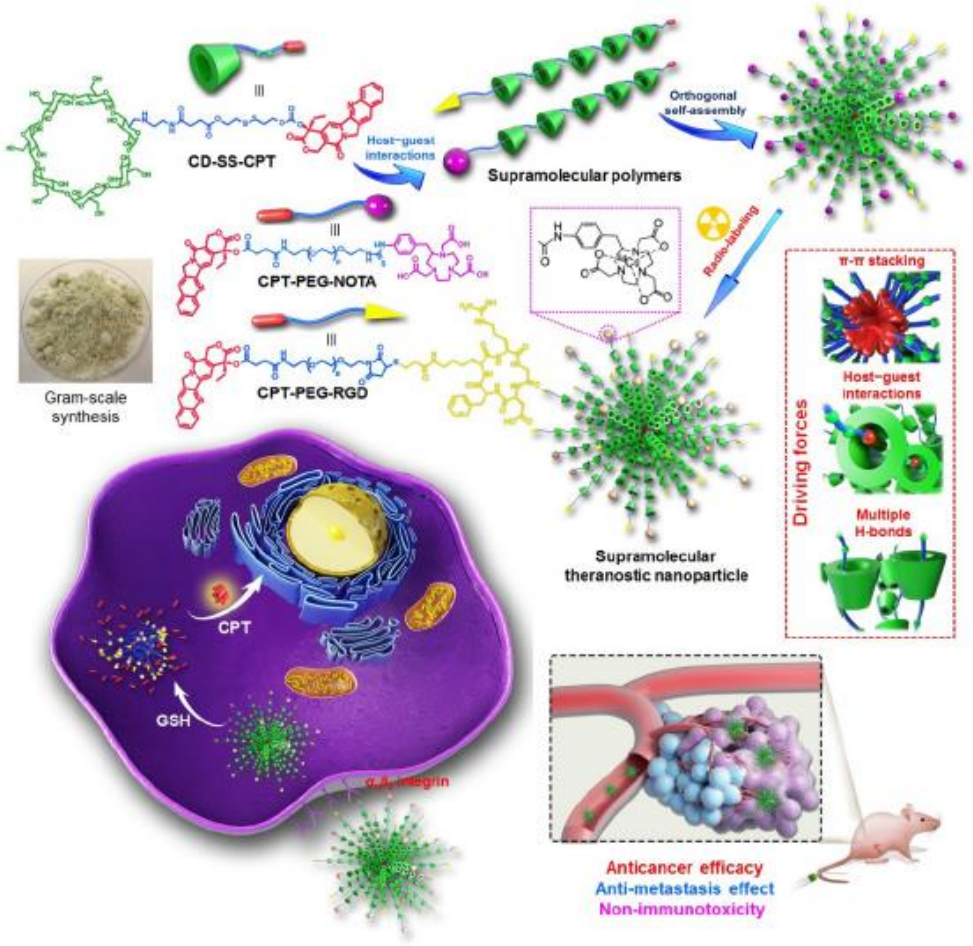


Figure 43 : Polymères supramoléculaires construits à partir des complexes hôte-invité entre la CPT et la β-CD par auto-assemblage orthogonale pour la théranostique du cancer

Le ligand de ciblage RGD (tripeptide Arg-Gly-Asp) et l'agent de contraste (NOTA) sont incorporés dans les nanoparticules par auto-assemblage orthogonal en solution aqueuse en utilisant le CPT-PEG-RGD ou le CPT-PEG-NOTA. En optimisant le rapport entre CD-SS-CPT et CPT-PEG-RGD dû à la nature dynamique des interactions hôte-invité, des nanoparticules supramoléculaires (SNP) avec une stabilité relativement élevée et une taille appropriée ont été préparées. En raison des différentes concentrations de GSH dans la circulation sanguine (1−10 μM) et à l'intérieur des cellules (1−10 mM), les SNPs sont stables pendant la circulation, tandis

que le CPT actif est libéré par la GSH intracellulaire. Grâce à cette stratégie supramoléculaire, la solubilité du CPT est significativement améliorée par un facteur 232, et la forme lactone du CPT est maintenue grâce à la formation d'un complexe d'inclusion. L'imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP) a été utilisée pour surveiller l'administration et la distribution des SNPs. Une activité antitumorale a été observée contre les modèles de xénogreffe sous-cutanée HeLa et les tumeurs du sein orthotopique. De plus, cette plateforme présente un excellent effet anti-métastase. Le sous-produit après la libération du médicament a été efficacement éliminé par voie rénale, réduisant ainsi la toxicité systémique et l'immunotoxicité à long terme.

Y. Zhang *et al.*[201] ont publié, en 2018, la synthèse d'un tripode intéressant possédant trois fonctionnalités (Figure 44).

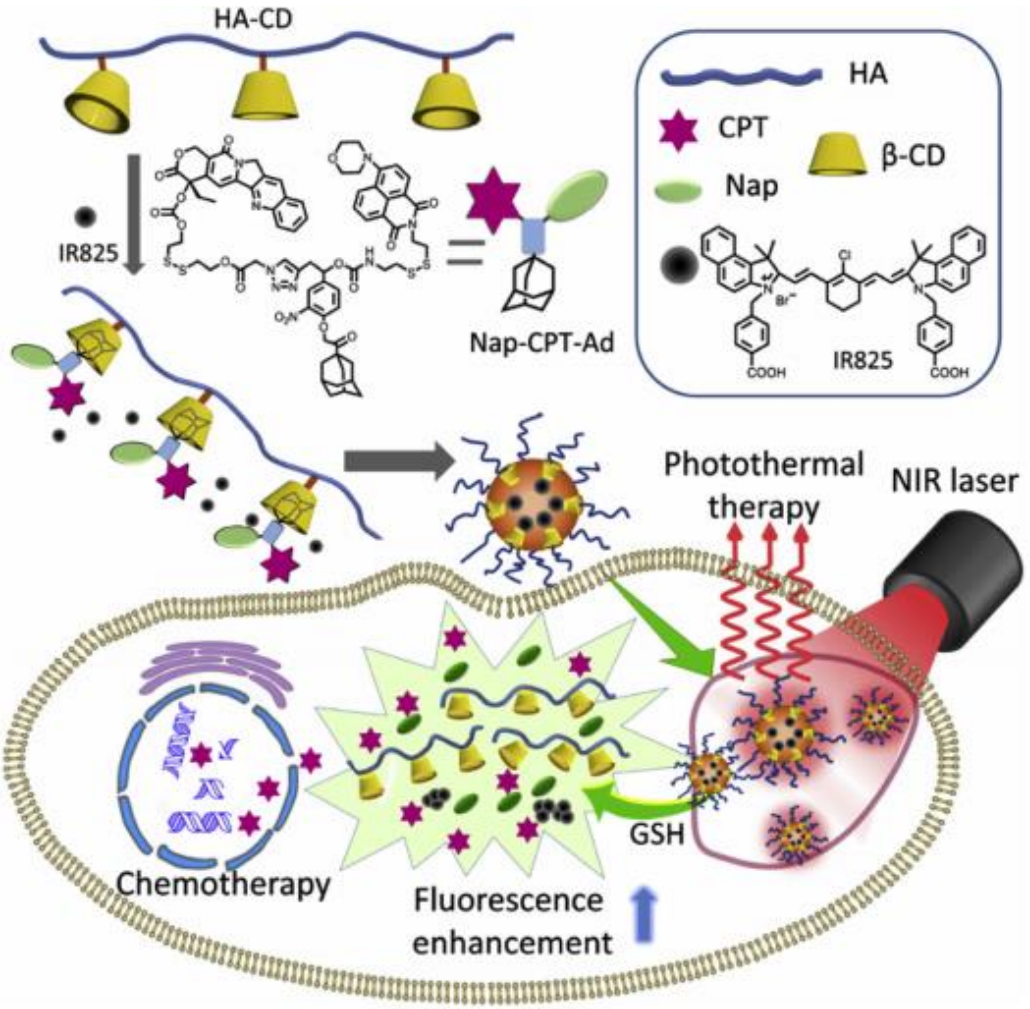


Figure 44 : Illustration schématique de nanoparticules supramoléculaires sensibles à la réduction et chargées en colorant IR825 pour la photothermalchimiothérapie combinatoire du cancer
HA : Acide Hyaluronique, CPT : Camptothécine, Nap : Naphthamimide

Dans cette étude, ce système d'administration de médicament polymérique supramoléculaire sensible à la réduction *via* des ponts disulfures a été développé pour la chimiothérapie photothermique combinatoire du cancer. Le système multifonctionnel a été auto-assemblé par complexation entre l'acide hyaluronique fonctionnalisé à la β-cyclodextrine hydrophile et le conjugué camptothécine / naphthalimide (Nap-CPT-Ad) lié à l'adamantane, en présence d'un colorant absorbant IR825 proche infrarouge (NIR). L'enveloppe en acide hyaluronique hydrophile confère à l'ensemble une excellente stabilité colloïdale et une excellente biocompatibilité. La liaison disulfure intégrée dans le conjugué camptothécine / naphthalimide est clivée dans un environnement réducteur (GSH), conduisant à la libération de la camptothécine et à la récupération de l'émission de fluorescence. Pendant ce temps, le colorant IR825 transfère localement et efficacement la lumière absorbée en chaleur, créant ainsi un système efficace de thérapie photothermique. Ce système a été rapidement internalisée par les cellules cancéreuses HeLa, MCF-7 et U14 et a permis la libération du médicament à l'intérieur des cellules. Les tests de viabilité cellulaire *in vitro* ont confirmé que les cellules cancéreuses étaient efficacement détruites sous irradiation à la lumière proche Infra-Rouge. Une régression tumorale significative a également été observée chez les souris porteuses de tumeurs lors de l'administration du système. Ce système théranostique innovant présente un grand potentiel pour la chimiothérapie photothermique combinée spécifique au site de la tumeur.

VII. Objectifs de la thèse : Médicament/Vectorisation/IRM

L'acidité intratumorale étant un état pathologique, la stratégie d'utiliser un motif hydrolysable dans ces conditions permet de libérer sélectivement un composé dans cet environnement. De nombreuses études se sont inspirées de ces résultats pour proposer différents systèmes de distribution de chimiothérapie. Cependant, bien qu'il existe de nombreux exemples de système de vectorisation de la doxorubicine, aucune étude n'a été rapportée, à ce jour, sur le témozolomide.

L'objectif de ce travail est de mettre au point des stratégies de diagnostic et de thérapie *via* un système de libération contrôlée de chimiothérapie pour traiter les glioblastomes. Ainsi, nous proposons de développer de nouvelles sondes théranostiques d'imagerie intracellulaires à base d'une β-cyclodextrine capable de passer la BHE et visualiser par IRM la vectorisation du témozolomide sur les cellules cancéreues.

Pour mettre au point notre sonde théranostique, nous nous sommes inspirés des travaux de Zhang précédemment présentés. Une cyclodextrine sera fonctionnalisée par un agent de contraste, le DOTA, pour l'IRM. La cavité de la cyclodextrine libre permettra l'inclusion d'une molécule d'adamantane servant d'ancre chimique à un agent anticancéreux (le témozolomide) qui sera lié par un bras espaceur à l'angiopep (peptide transporteur spécifique des cellules cancéreuses pour traverser la BHE). Le bras espaceur lui-même comportera une fonction hydrazone, imine ou peptidique susceptible d'être clivée pour une libération contrôlée du principe actif. Les variations de la structure, de la masse du complexe et des sphères d'hydratation devraient engendrer une variation du signal IRM qui permettra une visualisation et, à terme, une quantification de l'efficacité du traitement.

Enfin, des tests *in vitro* et *in vivo* seront réalisés en collaboration avec le Dr. Hélène Castel du laboratoire INSERM U1239, Université Rouen Normandie et de l'imagerie IRM *in vivo* en collaboration avec le Dr. Samuel Valable du centre Cycéron, CNRS, Université Caen Normandie.

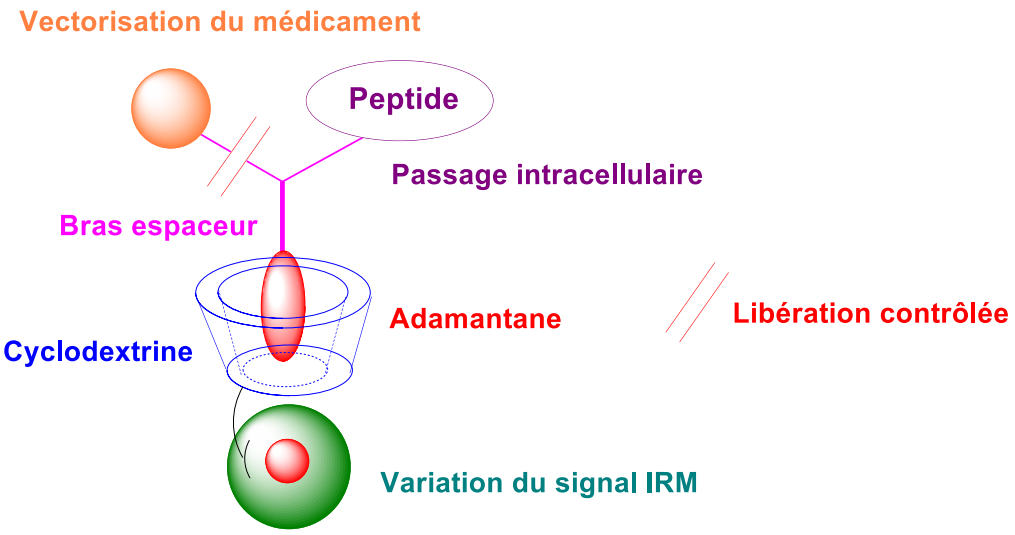


Figure 45: Structure d'une sonde théranostique à base de cyclodextrine

Pour aller jusqu'à la preuve de concept de sonde théranostique (Thérapie + Diagnostic), trois modèles de sondes seront synthétisés (Figure 45) avec des combinaisons différentes donnant accès à des informations spécifiques afin de valider chaque étape.

- Le modèle de sonde (a) nous permettra de valider la libération contrôlée du médicament + la variation du signal IRM.
- Le modèle (b) nous permettra de valider la variation du signal IRM + le passage de la BHE.
- Le modèle (c) nous permettra de valider la libération contrôlée du médicament + le passage de la BHE.

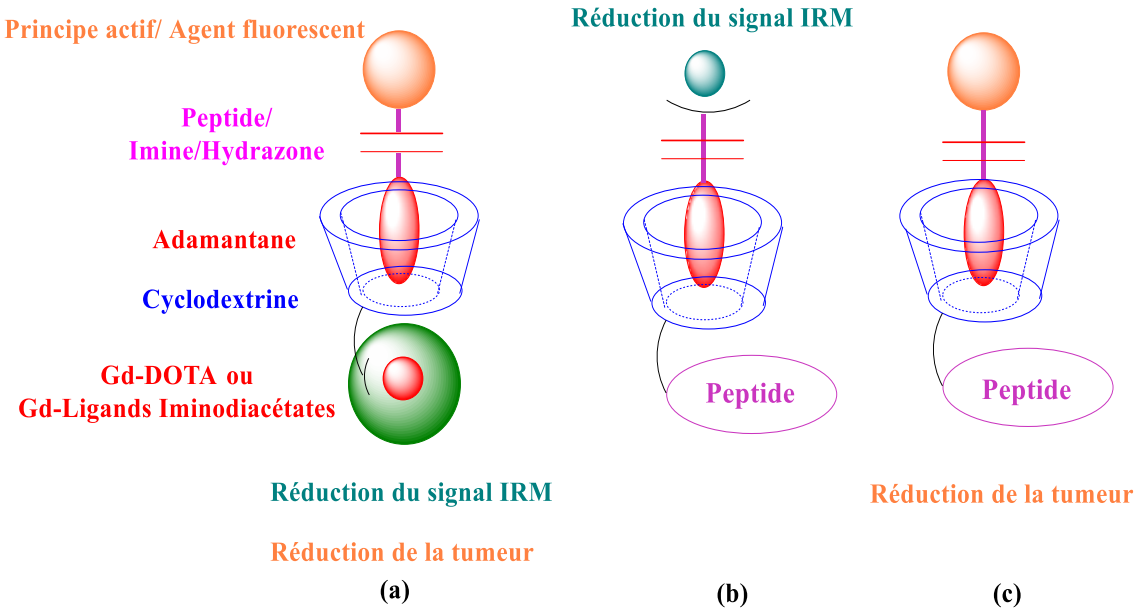


Figure 46 : Sondes diagnostique et théranostique modèles

Ce projet de recherche porte donc sur le développement d'un nouvel outil théranostique impliquant une chimiothérapie associée à l'imagerie IRM pour réduire les effets secondaires et visualiser l'efficacité du traitement. Ce projet s'inscrit pleinement dans les objectifs du plan cancer 2014-2019. L'augmentation des dépenses de santé incite les pouvoirs publics à dérembourser les médicaments à faible efficacité thérapeutique. Dans un tel contexte, prédire en amont par des tests compagnons diagnostiques et théranostiques l'efficacité d'un traitement, permettrait de renforcer le développement de la médecine dite personnalisée. L'utilisation de l'imagerie *in vivo*, très tôt dans le processus d'évaluation des candidats médicaments, accélèrerait par ailleurs le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. L'imagerie moléculaire permettant de visualiser *in vivo* le fonctionnement cellulaire et les processus moléculaires (vitaux ou non, intra ou intercellulaires…), ces nouveaux outils démontreraient que le candidat médicament atteint effectivement sa cible.

VIII. Références

[95] J. Szejtli, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1825–1845.

[96] W. Bouquet, W. Ceelen, B. Fritzinger, P. Pattyn, M. Peeters, J. P. Remon, C. Vervaet, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 391–397.

[97] U. V. Singh, K. S. Aithal, N. Udupa, **1997**, *3*, 573–577.

[98] J. Kang, V. Kumar, D. Yang, P. R. Chowdhury, R. J. Hohl, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 163–170.

[99] A. Satern, N. Nguyen, A. Bauerbrandl, M. Brandl, *Int. J. Pharm.* **2004**, *284*, 61–68.

[100] M. Peng, Y. Liu, H. Zhang, Y. Cui, G. Zhai, C. Chen, *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 1291–1295.

[101] A. Balaji, V. P. Pandey, M. S. Srinath, R. Manavalan, *Pharmacologyonline* **2009**, *1*, 1135-1143.

[102] C. Di Donato, M. Lavorgna, R. Fattorusso, C. Isernia, M. Isidori, G. Malgieri, C. Piscitelli, C. Russo, L. Russo, R. Iacovino, *Molecules* **2016**, *21*, 1644-pages.

[103] E. Bilensoy, Y. Çırpanlı, M. Şen, A. L. Doğan, S. Çalış, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 363–370.

[104] G. Tóth, Á. Jánoska, G. Völgyi, Z.-I. Szabó, G. Orgován, A. Mirzahosseini, B. Noszál, *J. Chem.* **2017**, *2017*, 1–9.

[105] C. Jantarat, P. Sirathanarun, S. Ratanapongsai, P. Watcharakan, S. Sunyapong, A. Wadu, *Trop. J. Pharm. Res.* **2014**, *13*, 1215-pages.

[106] C. S. Mangolim, C. Moriwaki, A. C. Nogueira, F. Sato, M. L. Baesso, A. M. Neto, G. Matioli, *Food Chem.* **2014**, *153*, 361–370.

[107] N. Qiu, X. Li, J. Liu, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2017**, *89*, 229–246.

[108] S. Landa, V. Macháček, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1933**, *5*, 1–5.

[109] V. Prelog, R. Seiwerth, *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1941**, *74*, 1644–1648.

[110] P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3292–3292.

[111] G.-F. Luo, X.-D. Xu, J. Zhang, J. Yang, Y.-H. Gong, Q. Lei, H.-Z. Jia, C. Li, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 5317–5324.

[112] D. Harries, D. C. Rau, V. A. Parsegian, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2184–2190.

[113] W. C. Cromwell, K. Bystrom, M. R. Eftink, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 326–332.

[114] J. Voskuhl, M. Waller, S. Bandaru, B. A. Tkachenko, C. Fregonese, B. Wibbeling, P. R. Schreiner, B. J. Ravoo, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4524-pages.

[115] M. Novo, D. Granadero, J. Bordello, W. Al-Soufi, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *70*, 259–268.

[116] Y. Zhang, W. Wang, Q. Li, Q. Yang, Y. Li, J. Du, *Talanta* **2015**, *141*, 33–40.

[117] D. Granadero, J. Bordello, M. J. Pérez-Alvite, M. Novo, W. Al-Soufi, *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 173–188.

[118] Q. Li, Y. Zhang, Y. Jin, Q. Yang, J. Du, Y. Li, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 68815–68821.

[119] X.-H. Yang, F. Zhao, L.-L. He, K.-M. Wang, J. Huang, Q. Wang, J.-B. Liu, M. Yang, *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 1318–1322.

[120] G. Liu, Y.-M. Zhang, X. Xu, L. Zhang, Q. Yu, Q. Zhao, C. Zhao, Y. Liu, *Adv. Opt. Mater.* **2017**, *5*, 1700770-page.

[121] M. Sun, H.-Y. Zhang, Q. Zhao, X.-Y. Hu, L.-H. Wang, B.-W. Liu, Y. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 8170–8179.

[122] Q. Zhang, Y. Cai, X.-J. Wang, J.-L. Xu, Z. Ye, S. Wang, P. H. Seeberger, J. Yin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 33405–33411.

[123] G. D. Stefano, M. Lanza, F. Kratz, L. Merina, L. Fiume, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 393–397.

[124] E. L. Cyphert, A. S. Fu, H. A. von Recum, *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242*, 692–699.

[125] I. González-Méndez, J. D. Solano, P. Porcu, A. Ruiu, Y. Rojas-Aguirre, E. Rivera, *J. Mol. Struct.* **2019**, *1177*, 143–151.

[126] S.-Y. Li, L.-H. Liu, H.-Z. Jia, W.-X. Qiu, L. Rong, H. Cheng, X.-Z. Zhang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11852–11855.

[127] W. She, K. Luo, C. Zhang, G. Wang, Y. Geng, L. Li, B. He, Z. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 1613–1623.

[128] W. She, D. Pan, K. Luo, B. He, G. Cheng, C. Zhang, Z. Gu, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 964–978.

[129] L. Wang, K. Ren, H. Wang, Y. Wang, J. Ji, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *125*, 127–133.

[130] Y. Wang, H. Wang, Y. Chen, X. Liu, Q. Jin, J. Ji, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7123.

[131] W.-L. Ye, Y.-P. Zhao, R. Na, F. Li, Q.-B. Mei, M.-G. Zhao, S.-Y. Zhou, *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 2293–2303.

[132] S. Ruan, M. Yuan, L. Zhang, G. Hu, J. Chen, X. Cun, Q. Zhang, Y. Yang, Q. He, H. Gao, *Biomaterials* **2015**, *37*, 425–435.

[133] H. R. Krüger, I. Schütz, A. Justies, K. Licha, P. Welker, V. Haucke, M. Calderón, *J. Controlled Release* **2014**, *194*, 189–196.

[134] H. Chen, H. Jia, H. P. Tham, Q. Qu, P. Xing, J. Zhao, S. Z. F. Phua, G. Chen, Y. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 23536–23543.

[135] Y. Chen, Y. Huang, D. Qin, W. Liu, C. Song, K. Lou, W. Wang, F. Gao, *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0150877-page.

[136] Y. Yang, Y.-M. Zhang, Y. Chen, J.-T. Chen, Y. Liu, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9725–9736.

[137] Z. Zhou, Z. Han, Z.-R. Lu, *Biomaterials* **2016**, *85*, 168–179.

[138] E. Battistini, E. Gianolio, R. Gref, P. Couvreur, S. Fuzerova, M. Othman, S. Aime, B. Badet, P. Durand, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 4551–4561.

[139] F. Wan, L. Wang, W. Xu, C. Li, Y. Li, C. Zhang, L. Jiang, *Polyhedron* **2018**, *145*, 141–146.

[140] K.-J. Chen, S. M. Wolahan, H. Wang, C.-H. Hsu, H.-W. Chang, A. Durazo, L.-P. Hwang, M. A. Garcia, Z. K. Jiang, L. Wu, Y.-Y. Lin, H.-R. Tseng, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2160–2165.

[141] Q.-D. Hu, G.-P. Tang, P. K. Chu, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2017–2025.

[142] E. E. Carlson, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 429–435.

[143] D. C. Dieterich, A. J. Link, J. Graumann, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 9482–9487.

[144] M. Tanihara, Y. Suzuki, Y. Nishimura, K. Suzuki, Y. Kakimaru, *Peptides* **1998**, *19*, 421–425.

[145] K. A. Ajaj, M. L. Biniossek, F. Kratz, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 390–396.

[146] C.-H. Tung, U. Mahmood, S. Bredow, R. Weissleder, *Cancer research* **2000**, *60*, 4953–4958.

[147] F. A. Jaffer, D.-E. Kim, L. Quinti, C.-H. Tung, E. Aikawa, A. N. Pande, R. H. Kohler, G.-P. Shi, P. Libby, R. Weissleder, *Circulation* **2007**, *115*, 2292–2298.

[148] S. M. Messerli, S. Prabhakar, Y. Tang, K. Shah, M. L. Cortes, V. Murthy, R. Weissleder, X. O. Breakefield, C.-H. Tung, *Neoplasia* **2004**, *6*, 95–105.

[149] L. Yi, L. Cao, L. Liu, Z. Xi, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8947–8951.

[150] M. Sturm, A. Leitner, W. Lindner, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 211–217.

[151] A. Dirksen, S. Yegneswaran, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2067–2071.

[152] K. D. Park, R. Liu, H. Kohn, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 763–772.

[153] T. W. Muir, P. E. Dawson, M. C. Fitzgerald, S. B. H. Kent, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 817–825.

[154] H. Sun, B. Guo, R. Cheng, F. Meng, H. Liu, Z. Zhong, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6358–6366.

[155] Y. Su, Y. Hu, Y. Du, X. Huang, J. He, J. You, H. Yuan, F. Hu, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1193–1202.

[156] M. Xu, J. Qian, X. Liu, T. Liu, H. Wang, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *50*, 341–347.

[157] S. Santra, C. Kaittanis, O. J. Santiesteban, J. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16680–16688.

[158] G. Leriche, G. Budin, L. Brino, A. Wagner, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 4360–4364.

[159] J. M. Hooker, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3718–3719.

[160] G. Budin, M. Moune-Dimala, G. Leriche, J.-M. Saliou, J. Papillon, S. Sanglier-Cianférani, A. Van Dorsselaer, V. Lamour, L. Brino, A. Wagner, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2359–2361.

[161] N. Hammond, P. Koumi, G. J. Langley, A. Lowe, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1878–1885.

[162] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3462–3463.

[163] R. Orth, S. A. Sieber, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8476–8479.

[164] S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2443–2452.

[165] K. Katayama, S. Tsukiji, T. Furuta, T. Nagamune, *Chem. Commun.* **2008**, *42*, 5399–5401.

[166] M. W. Gardner, L. A. Vasicek, S. Shabbir, E. V. Anslyn, J. S. Brodbelt, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4807–4819.

[167] M. C. Parrott, J. C. Luft, J. D. Byrne, J. H. Fain, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17928–17932.

[168] C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzer, P. Mailhe, D. Scherman, M. Bessodes, *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 423–434.

[169] Y.-L. Zhao, Z. Li, S. Kabehie, Y. Y. Botros, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13016–13025.

[170] Y. Jia, J. Fei, Y. Cui, Y. Yang, L. Gao, J. Li, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1175–1177.

[171] J. Liao, H. Zheng, R. Hu, J. Cao, X. Wei, D. Li, H. Zheng, Y. Yin, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2018**, *14*, 496–509.

[172] J. Sheng, Y. Wang, L. Xiong, Q. Luo, X. Li, Z. Shen, W. Zhu, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 1680–1688.

[173] V. F. Patel, J. N. Hardin, J. M. Mastro, K. L. Law, J. L. Zimmermann, W. J. Ehlhardt, J. M. Woodland, J. J. Starling, *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7*, 497–510.

[174] Y. Jin, L. Song, Y. Su, L. Zhu, Y. Pang, F. Qiu, G. Tong, D. Yan, B. Zhu, X. Zhu, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3460–3468.

[175] B. Liu, H. Chen, X. Li, C. Zhao, Y. Liu, L. Zhu, H. Deng, J. Li, G. Li, F. Guo, X. Zhu, *RSC Adv* **2014**, *4*, 48943–48951.

[176] I. Szabó, M. Manea, E. Orbán, A. Csámpai, S. Bősze, R. Szabó, M. Tejeda, D. Gaál, B. Kapuvári, M. Przybylski, F. Hudecz, G. Mező, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 656–665.

[177] Y. Wang, J. G. Klijn, Y. Zhang, A. M. Sieuwerts, M. P. Look, F. Yang, D. Talantov, M. Timmermans, M. E. Meijer-van Gelder, J. Yu, T. Jatkoe, E. M. Berns, D. Atkins, J. A. Foekens, *The Lancet* **2005**, *365*, 671–679.

[178] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 1590–1598.

[179] M. Verbrugghe, S. Verhaeghe, K. Lauwaert, D. Beeckman, A. Van Hecke, *Cancer Treat. Rev.* **2013**, *39*, 610–621.

[180] S. Weinhouse, O. Warburg, D. Burk, A. L. Schade, *Science* **1956**, *124*, 267–272.

[181] L. Tian, Y. H. Bae, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *99*, 116–126.

[182] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20–53.

[183] O. Tacar, P. Sriamornsak, C. R. Dass, *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 157–170.

[184] D. Lu, X. Wen, J. Liang, Z. Gu, X. Zhang, Y. Fan, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *89B*, 177–183.

[185] C. Du, D. Deng, L. Shan, S. Wan, J. Cao, J. Tian, S. Achilefu, Y. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3087–3097.

[186] L. Dong, S. Xia, K. Wu, Z. Huang, H. Chen, J. Chen, J. Zhang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6309–6316.

[187] X. Xu, Z. Huang, Z. Huang, X. Zhang, S. He, X. Sun, Y. Shen, M. Yan, C. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 20361–20375.

[188] Duffy, M. J., Maguire, T. M., McDermott, E. W., & O'Higgins, N, *J. Surg. Oncol.* **1999**, *71*, 130–135.

[189] M. J. Duffy, C. Duggan, H. E. Mulcahy, E. W. McDermott, N. J. O'Higgins, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1177–1183.

[190] S. F. Shariat, C. G. Roehrborn, J. D. McConnell, S. Park, N. Alam, T. M. Wheeler, K. M. Slawin, *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 349–355.

[191] R. Swiercz, J. D. Wolfe, A. Zaher, J. Jankun, *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 869–877.

[192] W. Kuhn, B. Schmalfeldt, U. Reuning, L. Pache, U. Berger, K. Ulm, N. Harbeck, K. Späthe, P. Dettmar, H. Höfler, F. Jänicke, M. Schmitt, H. Graeff, *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1746–1751.

[193] H. Kobayashi, S. Fujishiro, T. Terao, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 6539–6548.

[194] S. R. Harvey, T. C. Hurd, G. Markus, M. I. Martinick, R. M. Penetrante, D. Tan, P. Venkataraman, N. DeSouza, S. N. J. Sait, D. L. Driscoll, J. F. Gibbs, **2003**, *9*, 4935–4943.

[195] D. W. Hsu, J. T. Efird, E. T. Hedley-Whyte, *Am. J. Pathol.* **1995**, *147*, 114–123.

[196] D. A. Waltz, L. R. Natkin, R. M. Fujita, Y. Wei, H. A. Chapman, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 58–67.

[197] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353–10366.

[198] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1029–1038.

[199] T. Liu, X. Li, Y. Qian, X. Hu, S. Liu, *Biomaterials* **2012**, *33*, 2521–2531.

[200] G. Yu, X. Zhao, J. Zhou, Z. Mao, X. Huang, Z. Wang, B. Hua, Y. Liu, F. Zhang, Z. He, O. Jacobson, C. Gao, W. Wang, C. Yu, X. Zhu, F. Huang, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 8005–8019.

[201] Y. Zhang, D. Yang, H. Chen, W. Q. Lim, F. S. Z. Phua, G. An, P. Yang, Y. Zhao, *Biomaterials* **2018**, *163*, 14–24.

Résultats

La deuxième partie de ce manuscrit présente les travaux entrepris pendant cette thèse et les résultats obtenus et se divise en quatre chapitres.

- Le premier décrira la fonctionalisation du témozolomide avec les différentes « linkers » liés à l'ancre adamantane et la synthèse d'une β-CD 6-monosubstituée par un dérivé du DOTA, par l'angiopep et d'une nouvelle cyclodextrine fonctionnalisée par 7 ligands iminodiacétates.

- Le deuxième présentera la préparation des différents complexes d'inclusion, leurs caractérisations, la détermination des constantes d'association et les études cinétiques d'hydrolyse des fonctions hydrazones.

- Le troisième introduira la synthèse du tripode, le complexe d'inclusion et les analyses physicochimiques correspondantes.

- Le quatrième rapportera les résultats préliminaires des tests d'efficacité *in vitro* par fluorescence et *in vivo* pour l'activité biologique du témozolomide et *in vitro* pour imagerie IRM.

Partie 1 :
Synthèse des composés

I. Introduction

Pour introduire le TMZ sur une sonde, sa structure doit être modifiée et par conséquent sa réactivité peut en être altérée. Les synthèses d'analogues de TMZ ont été rapportées dans la littérature dans le but d'améliorer leurs propriétés anticancéreuses. Le TMZ peut être modifié en position 3 ou en position 8 (Figure 47). Les publications portent majoritairement sur la modification de la position 3. Dans tous les cas, aucune modification structurale permettant un relargage contrôlé n'a été, à ce jour, publié. Notre objectif est donc innovant.

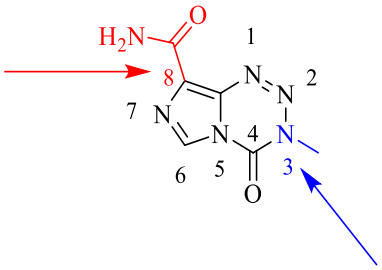


Figure 47 : Différents sites de fonctionnalisation du TMZ

I.1 Fonctionnalisation en position 8

Des analogues de TMZ ont été synthétisés avec différentes fonctions en position 8 tels que des amides, cétones et esters.[202] La dérivatisation du TMZ commercial est obtenue par traitement avec de l'acide nitrosulfurique (formé *in situ*) pour hydrolyser le fragment amide en acide carboxylique. La conversion en chlorure d'acide en utilisant du chlorure de thionyle au reflux fournit l'activation nécessaire pour une réaction sélective avec des nucléophiles, sans attaque destructive au niveau du carbonyle endocyclique (Schéma 11).

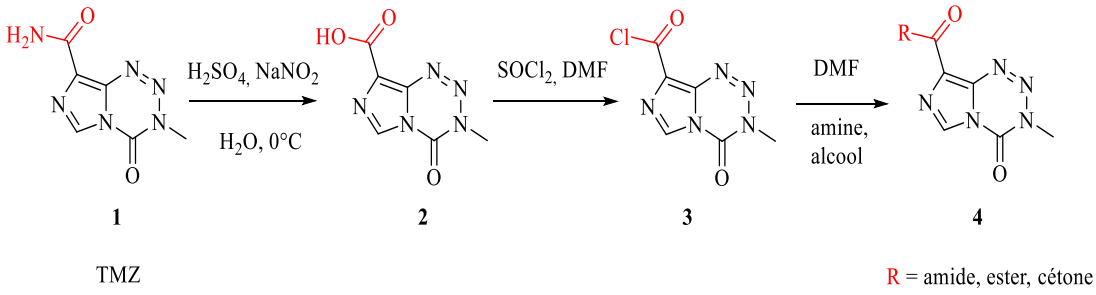


Schéma 11 : Voie de synthèse d'analogues amide/ester/cétone du TMZ[202]

De cette manière, un grand nombre d'analogues d'ester et d'amide alkylées de TMZ a été synthétisé.[203,204] Ces composés ont montré une large gamme d'activités dans la lignée

cellulaire de lymphome TLX5 mais aucune relation structure-activité claire n'a pu être, cependant, déterminée. Les esters possèdent une solubilité dans l'eau 60 fois supérieure à celle du TMZ, ainsi qu'une activité anti-tumorale plus puissante dans la lignée de cellules leucémiques HL-60.[204] La cétone ($R=CH_3$) possède une activité comparable au TMZ ($R=NH_2$) *in vivo* avec un ratio de perméabilité cerveau/sérum supérieur (69/31 contre 8/92 pour le TMZ), ce qui engendre moins d'effets secondaires.

I.2. Fonctionnalisation en position 3

La substitution en position 3 des composés imidazotétrazines est cruciale. L'objectif est de délivrer une espèce réactive qui devra se lier à l'ADN de telle sorte que l'efficacité thérapeutique soit augmentée. Un grand nombre d'imidazotétrazines 3-*N*-substitués a été synthétisé.[205,206] Ces analogues ont été développés à partir de l'intermédiaire isocyanate pour former le cycle tétrazine. Cependant, des contraintes liées à l'encombrement stérique du dérivé isocyanate lors de la réaction de couplage avec le diazo-IC ont été observées (Schéma 12).

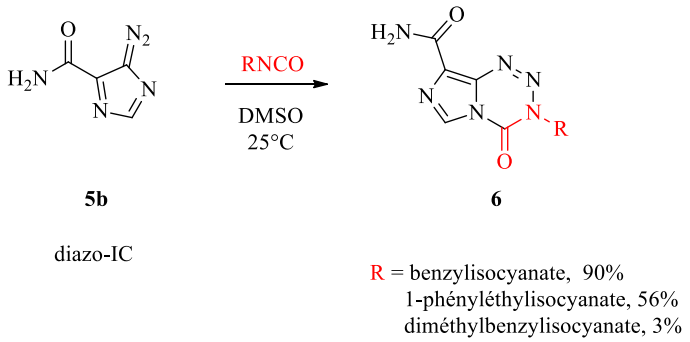


Schéma 12 : Synthèse des différents dérivés du témozolomide

En 2012, Cousin *et al.*[205] ont développé une nouvelle voie de synthèse aboutissant au Nortémozolomide **11** (Schéma 13).

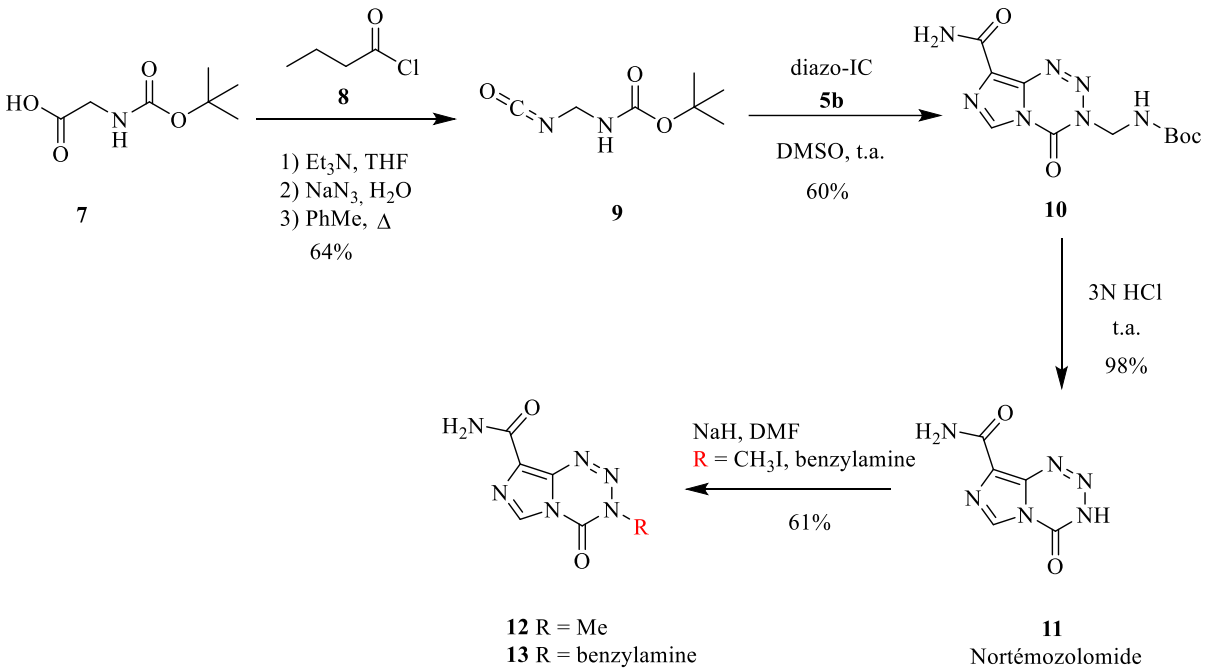


*Schéma 13:Voie de synthèse du Nortémozolomide **11***

Cette voie de synthèse nécessite l'utilisation du diazo-IC **5** et de l'isocyanate **9** dérivé de la glycine pour former le cycle tétrazine **10**. Après formation de l'imidazotétrazine **10**, la déprotection de la fonction amine entraîne l'élimination spontanée du formaldéhyde imine, conduisant ainsi à la formation du Nortémozolomide **11** (Schéma 13).[205] L'accès à ce nouveau composé d'imidazotétrazine **11** a ouvert des perspectives pour de nouvelles voies de synthèse d'analogues substitués **12** et **13** par déprotonation sélective du composé **10,** suivie d'une alkylation en milieu basique.

D'autres dérivés de témozolomide ont été rapportés par Wheelhouse *et al.*[207], et présentent un mécanisme d'action biologique différent (Schéma 14). La synthèse du précurseur de l'aziridinium imidazotétrazine **18** est présentée dans le Schéma 14. La fermeture du cycle d'imidazotétrazine est obtenue par réaction de l'azoture **17** avec l'isocyanate **5** dans du DMSO à température ambiante pendant 2 jours pour obtenir le composé **18** avec un rendement faible de 14%.

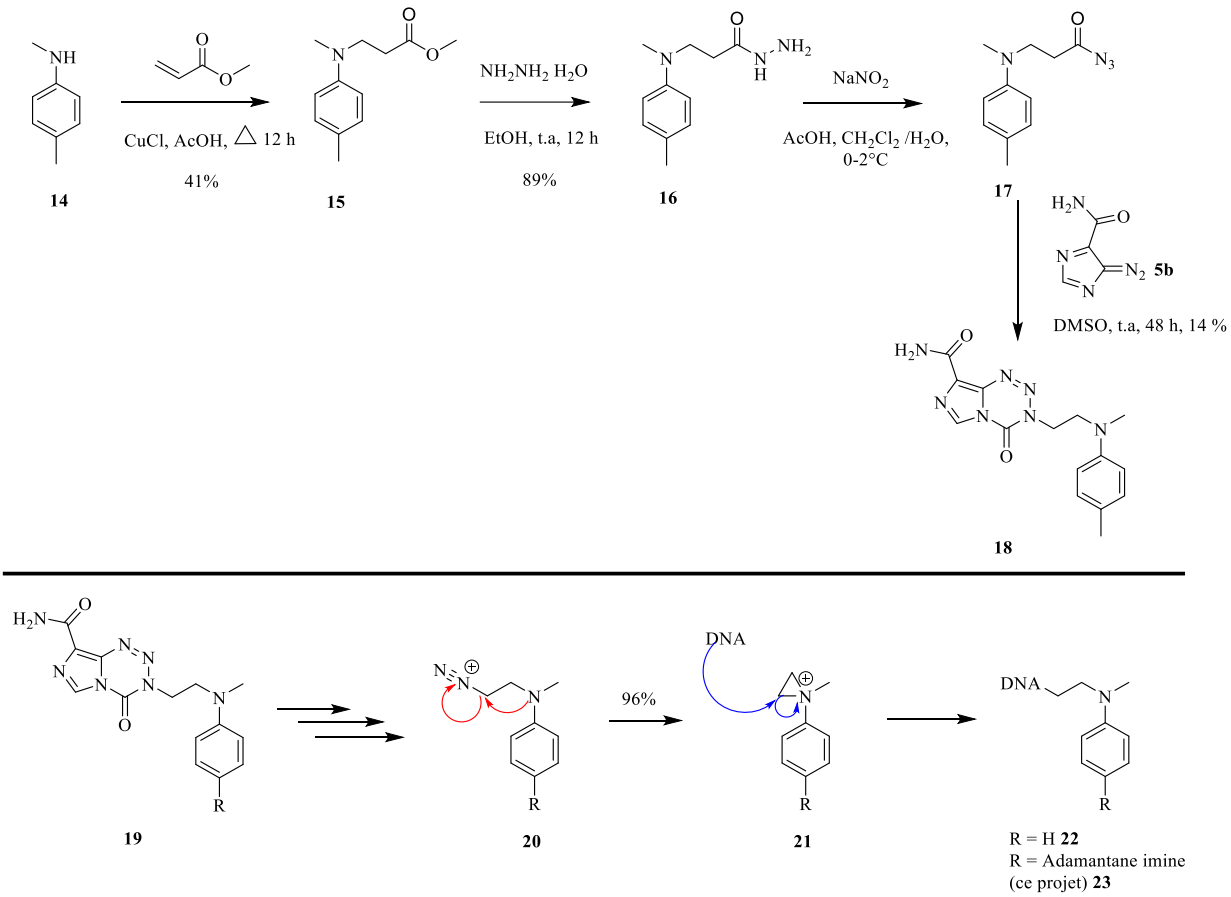


Schéma 14 : Formation de l'ion aziridinium

Le cycle imidazotétrazine **18** est un précurseur stable en milieu acide, un promédicament d'alkyl diazoniums hautement réactifs générant en milieu aqueux des ions arylaziridinium avec une efficacité de 96%. Ces composés sont de puissants alkylants des sites guanine de l'ADN et possèdent une forte activité anticancéreuse.

Nous nous sommes inspirés de tous ces travaux pour établir trois stratégies pour fonctionnaliser les positions 3 ou 8 du témozolomide avec un bras espaceur clivable lié à l'ancre chimique adamantane (Figure 47).

II. Stratégie de synthèse des sondes

Trois stratégies ont été envisagées pour vectoriser le témozolomide à l'intérieur de la cellule (Schéma 15). Le TMZ sera fonctionnalisé pour donner accès aux composés : **ADA-X-TMZ** avec X = H, I, P représentant les fonctions hydrazone, imine et peptidique, respectivement. Les fonctions hydrazone et imine sont susceptible de s'hydrolyser plus rapidement en raison du pH légèrement acide à proximité des cellules cancéreuses. Le peptide

sera clivé par l'enzyme urokinase. Ces coupures spécifiques libèreront le principe actif de manière contrôlée.

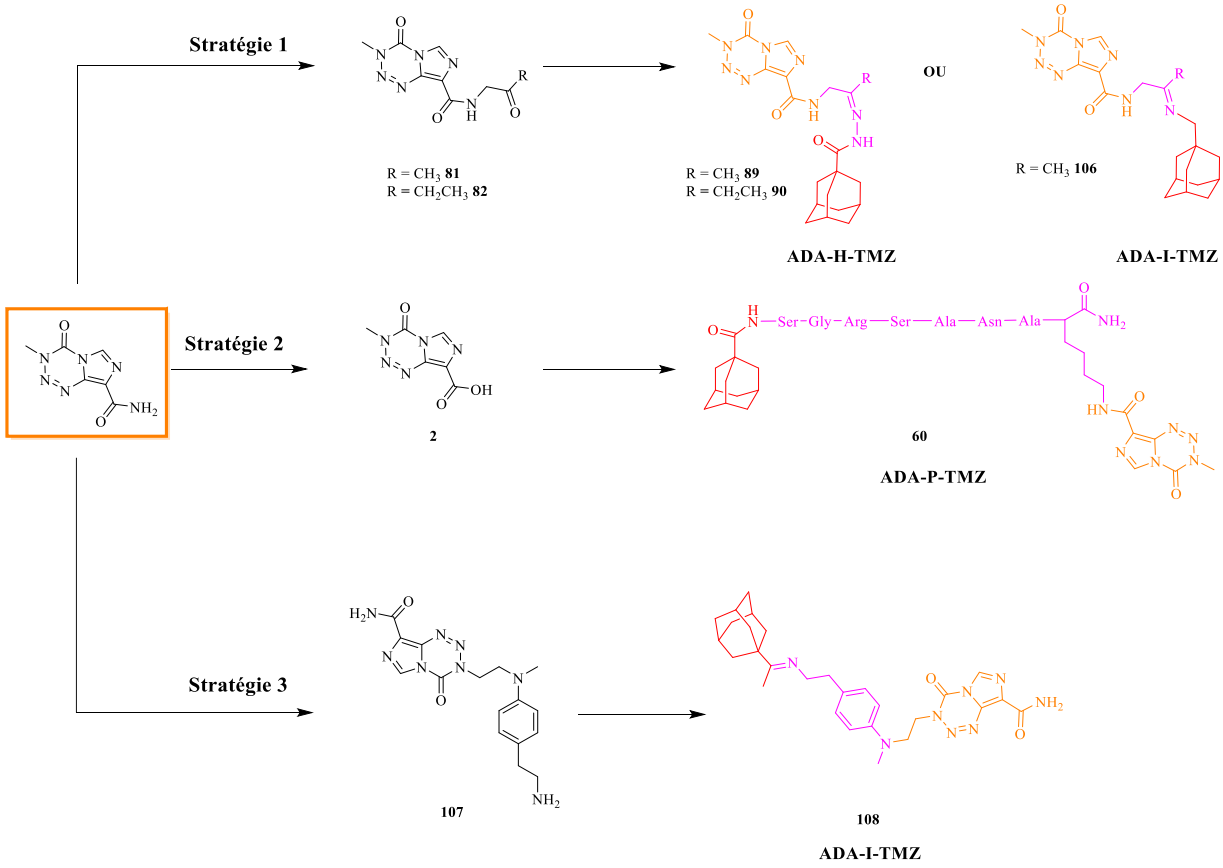


Schéma 15 : Trois différentes stratégies de vectorisation du composé témozolomide

Avant de synthétiser la sonde avec le principe actif TMZ (produit toxique, sensible et cher), nous avons décidé de travailler sur des molécules plus accessibles, dans un premier temps, pour optimiser les conditions expérimentales et pour valider les deux premières stratégies. Nous avons donc utilisé des coumarines, composés modèles peu chers et accessibles en grande quantité, mais surtout fluorescentes pour suivre à terme la vectorisation *in vitro*. Deux coumarines, de solubilités aqueuses différentes, ont été sélectionnées. La coumarine aldéhyde **40** permettra de valider la stratégie **1** et l'aminocoumarine **53** permettra de valider la stratégie **2** (Schéma 16).

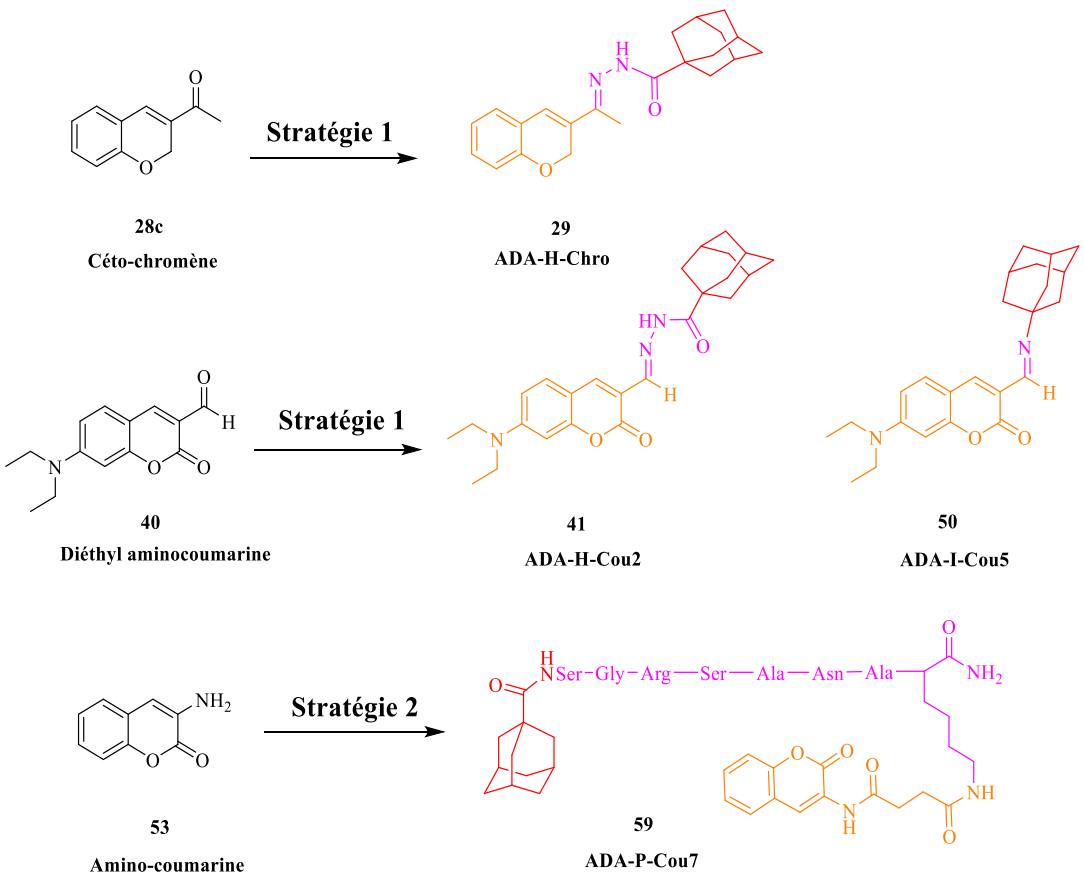


Schéma 16 : Structure des composés coumarines modèles à base d'adamantane

III. Synthèse de l'ancre chimique modèle : ADA-H-Chro 29

L'ancre adamantane-cétochromène ADA-H-Chro **29**, non décrite dans la littérature a été obtenue en quatre étapes (Schéma 17). La première étape est une estérification de l'acide **24** par le méthanol anhydre en présence d'acide *para*-toluènesulfonique **25** à reflux du solvant pendant 24 heures. La réaction est quantitative. Ensuite, le chauffage de l'ester à reflux de l'éthanol en présence d'hydrate d'hydrazine (50-60%) et de triéthylamine pendant 24 heures conduit au produit **27** avec un rendement de 85% après précipitation dans l'eau. La synthèse du composé **29** a été réalisée par un couplage entre l'hydrazine **27** et le composé **28c** (préalablement préparé par condensation de 2-hydroxybenzaldehyde **28a** sur la but-3-èn-2-one **28b**) en présence de TFA comme catalyseur. Une purification sur gel de silice a permis d'obtenir le produit ADA-H-Chro **29** avec un rendement de 52%.

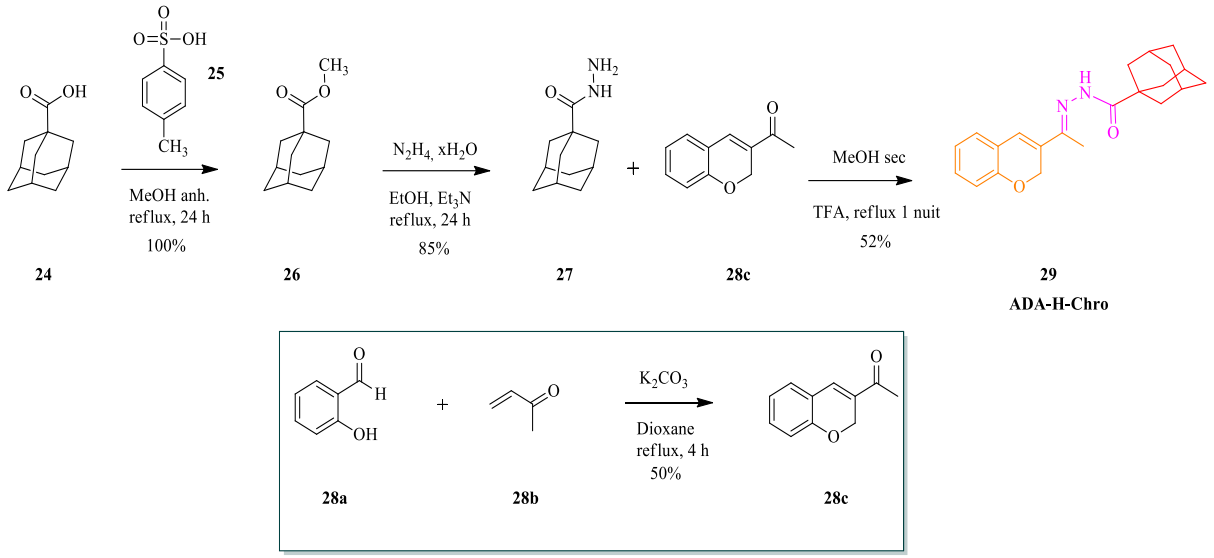


*Schéma 17 : Synthèse du composé ADA-H-Chro **29***

Les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **29** ont révélé l'apparition des signaux correspondant aux protons du groupe adamantane vers 1,7-2,0 ppm et à ses carbones dans la zone 28-40 ppm. La structure a été confirmée par spectrométrie de masse avec un pic à *m/z* = 351,228 correspondant à l'adduit $[M+H]^{+}$.

Malheureusement, le composé ADA-H-Chro **29** s'est avéré non fluorescent donc inadapté aux futurs tests *in vitro*. Nous avons donc décidé de changer de coumarine en travaillant avec la diéthyl aminocoumarine fluorescente.

IV. Synthèse des composés modèles Adamantane-Hydrazone-Coumarine

IV.1 Synthèse du composé ADA-H-Cou1 34 et 35

IV.1.1 Généralités sur la synthèse des hydrazones

Les hydrazones sont connues pour leurs activités anti-microbiennes[208], anti-tuberculose[209], anti-tumorales[210,211] et constituent une classe importante de composés pour le développement de nouveaux médicaments. Les hydrazones peuvent être assimilées par leur structure à deux groupes fonctionnels :

- Des imines *N*-substituées par une amine, cette fonction leur confère un caractère électrophile similaire à celui d'une imine.

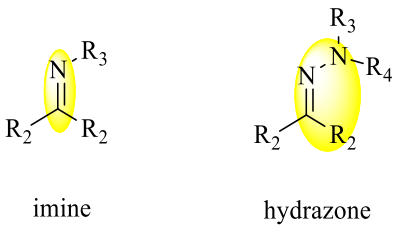


Figure 48 : Structure hydrazone similaire à l'imine

- Des aza-énamines, équivalents azotés des énamines, possédant un caractère nucléophile. Les énamines possédent un atome d'hydrogène sur l'azote (énamines primaires et secondaires), ils sont peu stables et se réarrangent en imines.

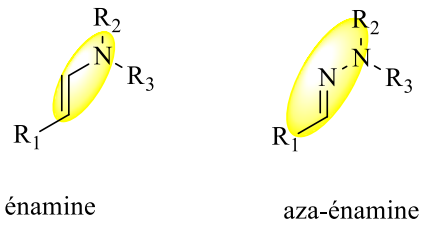


Figure 49 : Structure hydrazone similaire à une énamine

La méthode la plus connue pour synthétiser une hydrazone est la condensation d'une hydrazine avec un carbonyle, aldéhyde ou cétone.

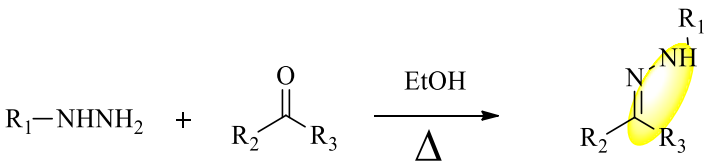
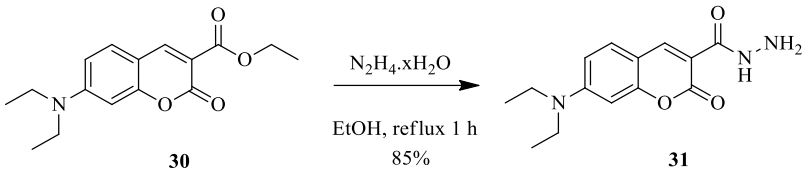


Schéma 18 : Synthèse d'hydrazone par condensation sur un carbonyle

IV.1. 2 Synthèse de la coumarine ADA-H-Cou1 34 et 35

Pour synthétiser les composés ADA-H-Cou1 **34** et **35**, non décrits dans la littérature, nous avons envisagé le schéma réactionnel décrit ci-dessous, à partir de la coumarine ester en deux étapes, en formant, tout d'abord, la coumarine hydrazine, puis l'hydrazone (Schéma 19).

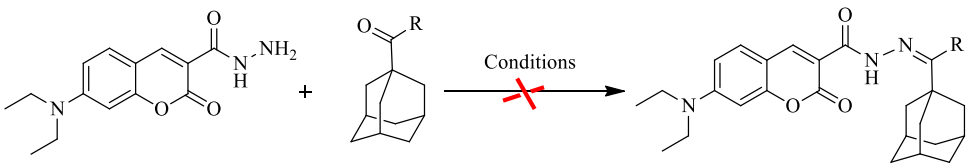
La préparation du composé **31** a été réalisée à partir de l'ester **30** fournit par Kevin Renault (doctorant 3ème année) en présence d'hydrazine hydratée en excès, dans l'éthanol à reflux durant 1 heure. Après purification sur une colonne chromatographique (gel de silice), le produit **31** est obtenu avec un rendement de 85% (Schéma 19).[212]



30 **31**

*Schéma 19 : Synthèse du composé **31***

Deux conditions opératoires ont été testées à partir de la coumarine **31** afin de former les composés **34** et **35.**



31 **32** R = H, **33** R = CH_3 **34** R = H, **35** R = CH_3

ADA-H-Cou1

Conditions: 1) EtOH, CH_3COOH cat., reflux 1 nuit, 2) MeOH, TFA cat.,reflux, 1 nuit

*Schéma 20 : Synthèse des composés **34** et **35***

Dans un premier temps, nous avons condensé le composé **31** avec les dérivés d'adamantane commerciaux **32** et **33** en présence d'une quantité catalytique d'acide acétique à reflux de l'éthanol, sans succès. Seuls les produits de départ sont obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice. Un autre essai a été tenté en condensant le composé **31** avec les adamantanes **32** et **33** dans du méthanol anhydre en présence de TFA. Cette nouvelle méthode, de nouveau, ne nous a permis d'obtenir les deux composés.

Malgré nos tentatives, nous n'avons pu obtenir les composés **34** et **35**. Une autre voie de synthèse a donc alors été envisagée en partant du diéthylaminocoumarine aldéhyde **40.**

IV.2 Synthèse du composé ADA-H-Cou2 41

La synthèse de la coumarine **40** est décrite dans la littérature par Tateishi *et al.*[213] La coumarine **40** est obtenue en trois étapes de synthèse (Schéma 21). Dans un premier temps, le 4-(diéthylamino)-2-hydroxybenzaldéhyde 36 réagit avec l'acide de Meldrum **37** en présence de pipéridine, d'acide acétique et d'éthanol à 90°C pendant 1 nuit. La coumarine acide **38** a été obtenue avec un rendement de 71% après recristallisation dans l'éthanol. Son hydrolyse a été effectuée en présence d'acide chlorhydrique 18% à reflux. Après précipitation dans l'eau, la coumarine est isolée avec un bon rendement de 90%. Enfin, une réaction de Vilsmeier-Haack, nous a permis d'accéder à la coumarine aldéhyde **40** avec un rendement de 65%.

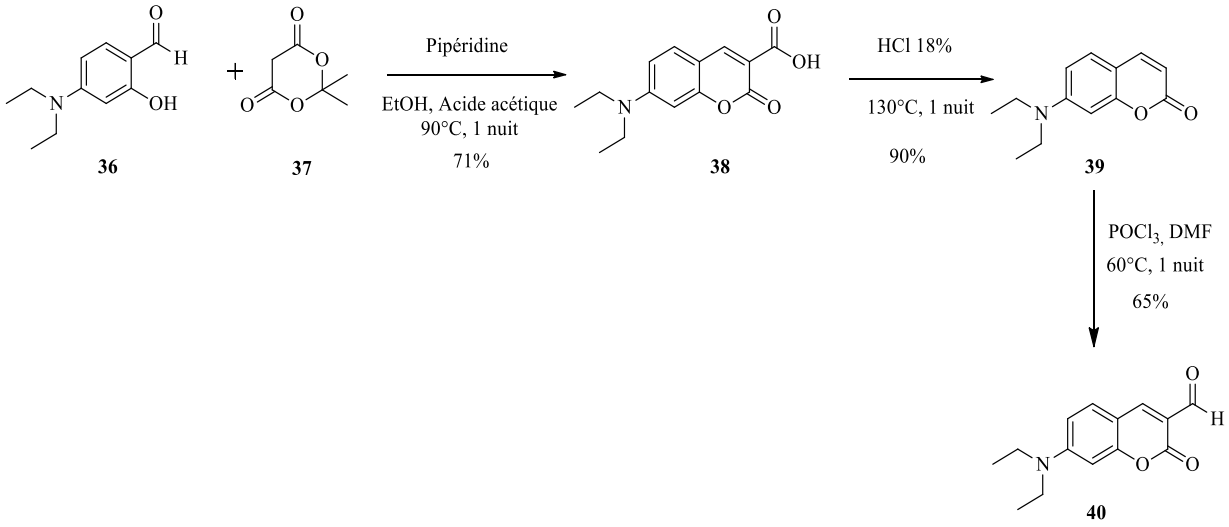


*Schéma 21 : Voie de synthèse de la coumarine **40***

Une fois la fonction aldéhydique obtenue, nous nous sommes intéressés à la synthèse de la fonction hydrazone.

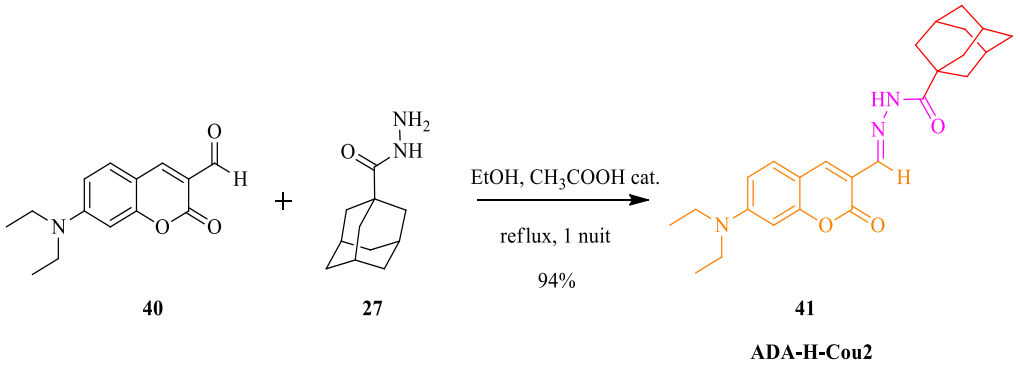


*Schéma 22 : Synthèse du composé ADA-H-Cou2 **41***

Le composé ADA-H-Cou2 **41**, non décrit dans la littérature, a été obtenu par réaction entre la coumarine aldéhyde **40** et l'adamantane hydrazine **27** à reflux dans l'éthanol. Le produit a été ensuite filtré et lavé avec de l'éthanol froid pour donner la coumarine **41** très propre avec un bon rendement de 94%, soit un rendement global de 39% en 4 étapes. Le spectre proton ^{1}H du composé **40** a révélé la disparition des protons de l'amine du composé **27** vers 4 ppm. Nous avons observé le déblindage du proton aldéhydique du composé **40** de 9,90 ppm à 10,89 ppm et le blindage du carbone aldéhydique de 186,90 ppm à 130,74 ppm démontrant la formation de l'hydrazone. Ces résultats et l'apparition d'un pic moléculaire à *m/z* = 422,249 $[M+H]^{+}$ en MALDI/MS ont confirmé l'obtention du composé ADA-H-Cou2 **41**.

Cependant, nous avons rencontré des difficultés de solubilité du composé ADA-H-Cou2 **41** dans certains solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétonitrile ou même dans le DMSO. Afin de limiter ce problème, de nouveaux modèles de coumarine ont été développés.

IV.3 Synthèse du composé ADA-H-Cou3 43

Le composé **43** a été préparé par condensation de la coumarine aldéhyde **40** sur l'hydrazine **42d**, préalablement préparée selon la procédure décrite par Kalinowski *et al.*[214] dans de l'éthanol à reflux pendant 1 nuit (Schéma 23). Le composé **43** a été obtenu avec un rendement de 84%. La structure du composé a été confirmée par spectrométrie de masse et par analyse des spectres ^{1}H et ^{13}C.

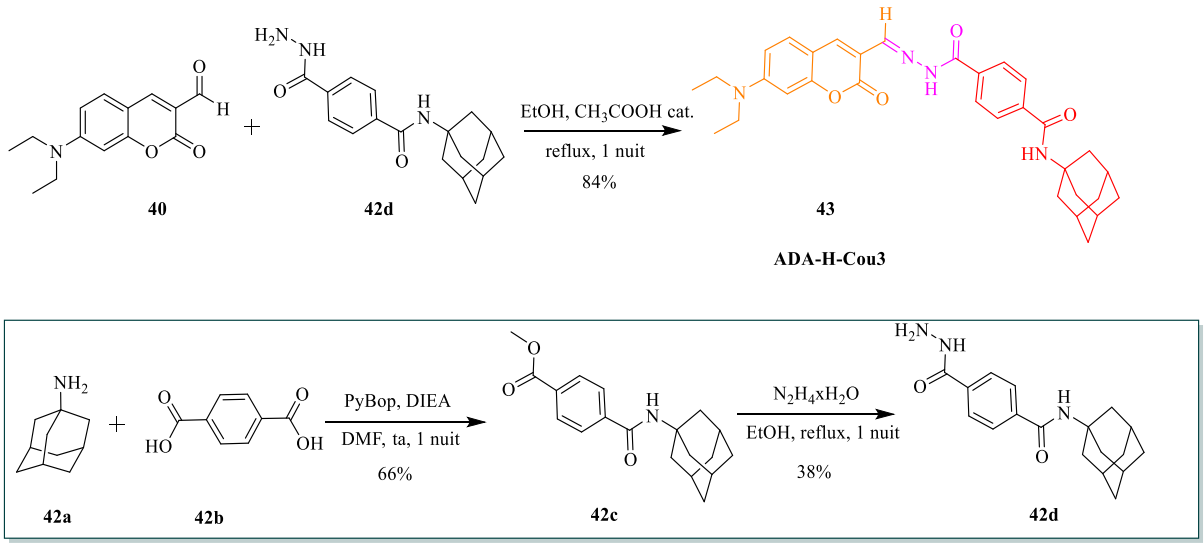


*Schéma 23 : Synthèse de la coumarine ADA-H-Cou3 **43***

Avec cette nouvelle coumarine, nous avons également rencontré des problèmes de solubilité dans les solvants organiques tels que l'acétonitrile, l'éthanol ou le DMSO. Une

dernière synthèse de coumarine a été envisagée en fonctionnalisant la coumarine par un ligand pipérazine dans le but d'augmenter la solubilité du composé.

IV.4 Synthèse du composé ADA-H-Cou4 49

Nous avons alors envisagé la synthèse de la nouvelle coumarine **48** en partant du dérivé **47** préparé selon la procédure décrite par Ge *et al*.[215]. Le composé 4-fluorobenzaldéhyde **44** a été couplé avec la pipérazine **45** en présence de 2-méthoxyéthanol **46** dans de l'eau à reflux durant 1 nuit. Après une extraction au dichlorométhane, le composé **47** a été obtenu avec un rendement de 73%. Ensuite, la synthèse du composé **48** a été réalisée par couplage peptidique entre l'amine **47** et la coumarine acide **38**.

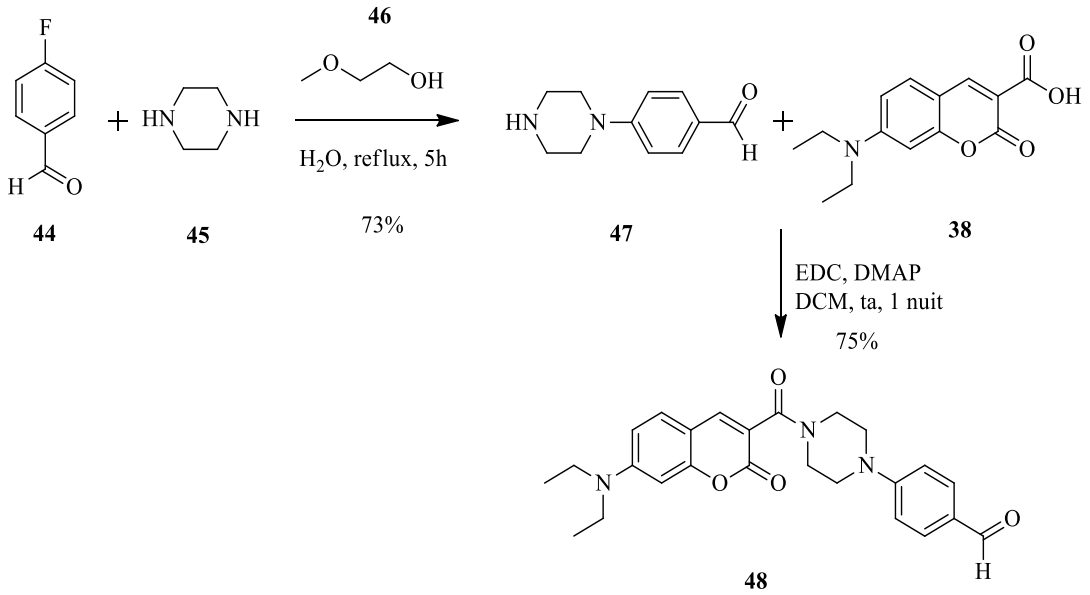
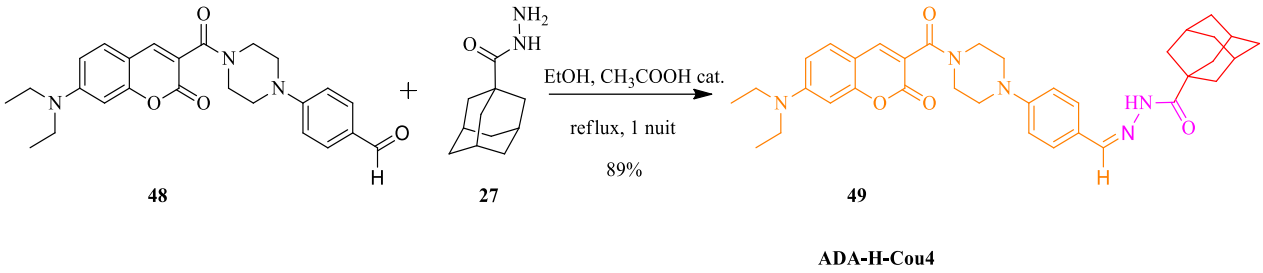


*Schéma 24 : Synthèse de la coumarine aldéhyde **48***

Ensuite, la coumarine aldéhyde **48** a été condensée sur l'hydrazine **27** dans de l'éthanol à reflux pendant 1 nuit. Après purificaton sur gel de silice le composé ADA-H-Cou4 **49** a été isolé avec un rendement de 89%. La structure du composé a été confirmée par RMN ^{1}H et ^{13}C ainsi que par spectrométrie de masse.



48 27 49

ADA-H-Cou4

Schéma 25 : Synthèse du composé ADA-H-Cou4 ***49***

Le choix du ligand pipérazine a été efficace car la nouvelle coumarine ADA-H-Cou4 **49** présente une meilleure solubilité dans les solvants organiques tels que l'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol et le DMSO.

V. Synthèse du composé Adamantane-Imine-Coumarine

V.1 Généralités sur les imines

La condensation de composés carbonylés avec des amines primaires pour produire les imines correspondantes a été découverte en 1864 par Hugo Schiff. C'est pourquoi, les imines sont souvent appelées bases de Schiff ou azométhines. La formation d'imine est l'une des réactions les plus importantes en chimie organique et médicinale. Ainsi, les imines possèdent un large éventail d'activités biologiques, anti-inflammatoires, anti-cancereuses[216], antibactériennes et antifongiques. Les imines sont formées classiquement par condensation d'un aldéhyde ou d'une cétone avec une amine primaire en conditions acides ou neutres (Schéma 26).[217]

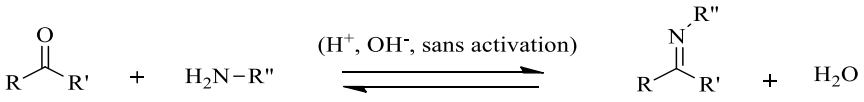


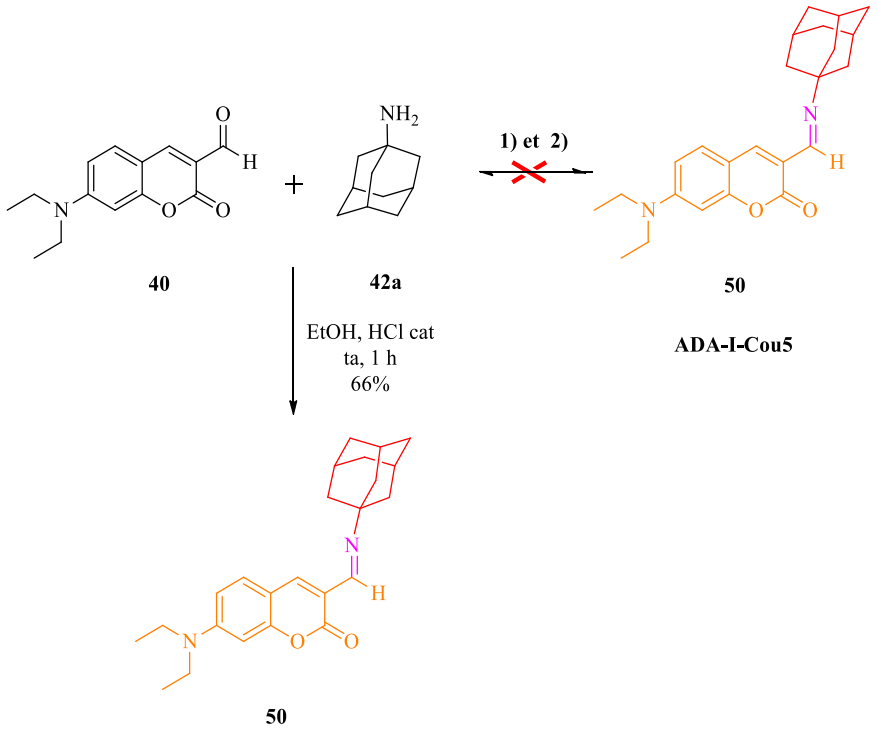
Schéma 26 : Formation d'une imine par condensation entre une cétone ou un aldéhyde et une amine primaire

En termes mécanistique, ces réactions se produisent via une addition nucléophile donnant un intermédiaire hémiaminal -C(OH)(NHR)-, suivie d'une élimination d'une molécule d'eau pour former l'imine. Cette synthèse est bien connue et permet, dans la plupart des cas, l'obtention presque complète de l'imine.

Il existe de nombreuses méthodes de préparation des imines dans la littérature depuis les travaux d'Hugo Schiff. Les imines peuvent être préparées par oxydation *in situ*[218], par condensation des amines avec les composés nitrosés[219] ou par déshydratation des composés de type hémiaminal.[220]

V.2 Synthèse du composé ADA-I-Cou5 50

Des essais ont été tentés en condensant une amine **42a** sur un aldéhyde **40** à reflux pour obtenir la coumarine ADA-I-Cou2 **50**, mais ils se sont révélés infructeux (Schéma 27). Cependant, lors du suivi dans la réaction par CCM, nous avons observé l'apparition d'un nouveau produit lors des deux essais. En étudiant le spectre proton du brut réactionnel, les deux produits de départ ont été identifiés probablement résultant de l'hydrolyse dans le milieu réactionnel de la fonction imine.



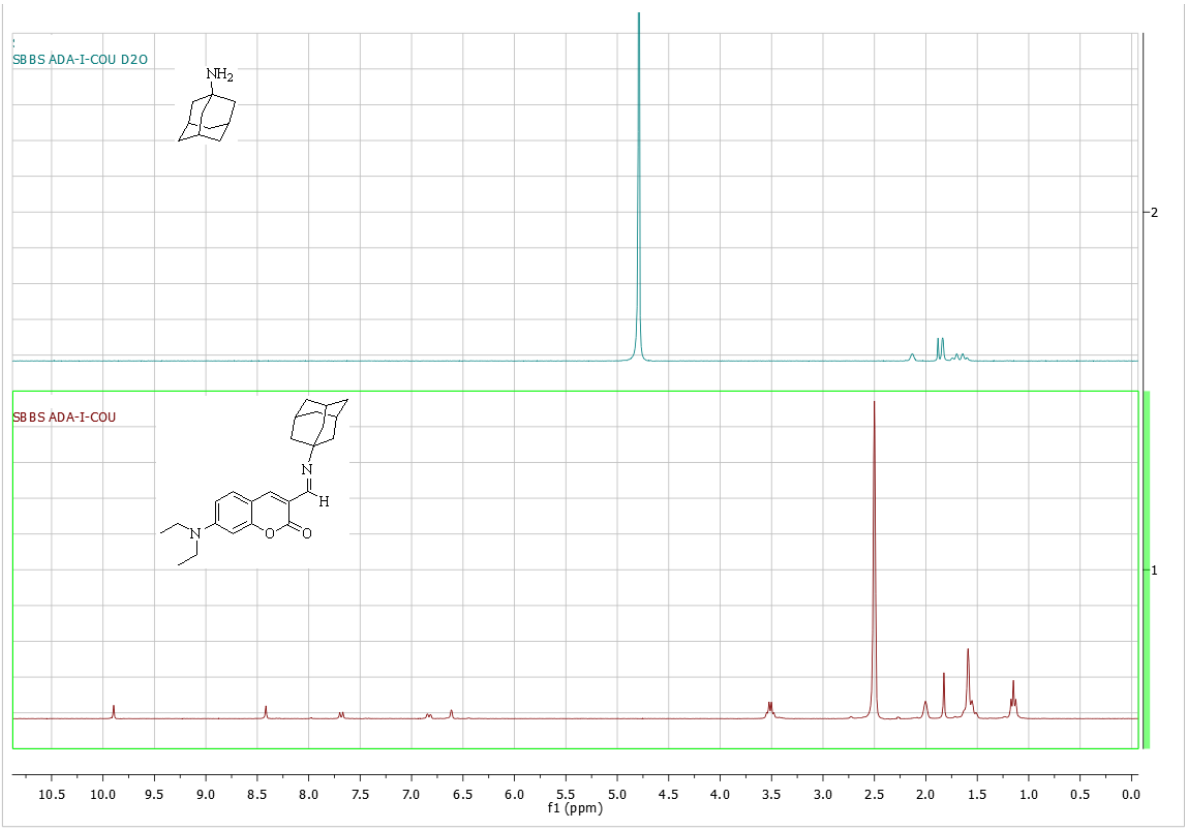
Conditons : 1) EtOH, CH_3COOH cat., reflux 85°C, 1 nuit, 2) MeOH sec, TFA reflux, 85°C, 1 nuit

Schéma 27 : Synthèse de l'ADA-I-Cou5 ***50***

Nous avons donc modifié les conditions réactionnelles pour exclure toute trace d'eau afin d'inhiber la réaction d'hydrolyse. En effet, les imines sont sensibles à l'hydrolyse, ce qui les rend, dans la plupart du temps, difficile à isoler. Nous avons donc envisagé d'effectuer la

réaction sans chauffage et d'utiliser un Dean Stark pour éliminer l'eau formée au cours de la réaction.

Le composé **50** a pu être obtenu par condensation de l'aldéhyde **40** sur l'amine **42** sans chauffage en présence d'une quantité catalytique d'acide chlorydrique avec un rendement de 66%. La structure du composé a été confirmée par RMN ^{1}H dans du DMSO-*d6* avec l'apparition des pics de l'adamantane de 2,00-1,51 ppm et par spectrométrie de masse haute résolution avec un pic moléculaire à *m/z* = 379,2396 correspondant à l'adduit $[M+H]^{+}$. La RMN ^{1}H du même composé **50** dans du D_2O a été effectuée, cependant une hydrolyse instantanée de la fonction imine a été observée. En effet, seuls les pics de l'adamantane sont détectés, les signaux correspondant à la partie coumarine disparaissent car le composé est insoluble dans le D_2O (Spectre 1).



*Spectre 1 : Spectre ^{1}H RMN du composé **50** dans du DMSO (rouge) et du D_2O (vert)*

Afin de limiter le problème d'hydrolyse, nous avons choisi de préparer le composé **52** avec une amine comportant un atome de carbone supplémentaire (Figure 50).

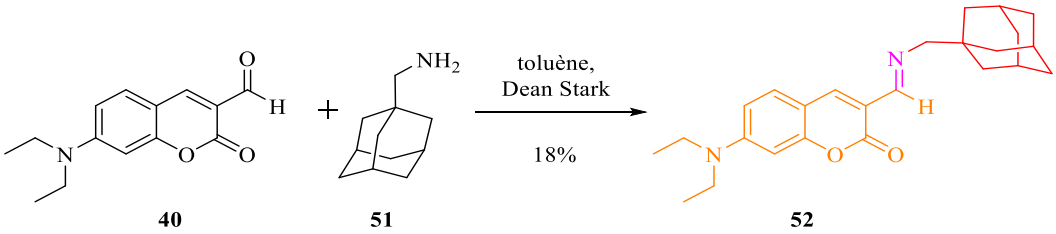


42a **51**

Figure 50 : Structures des adamantanes amines

V.3 Synthèse du composé ADA-I-Cou6 52

Le composé **52** a été obtenu avec un rendement faible de 18% par condensation de l'aldéhyde **40** et de l'adamantane **51** dans du toluène avec un Dean Stark après précipitation par l'éthanol froid.



40 **51** **52**

ADA-I-Cou6

*Schéma 28 : Synthèse de composé ADA-I-Cou6 **52***

Le composé **52** s'est avéré plus stable que le composé **50** (Schémas 27 et 28). En effet, aucune hydrolyse instantanée du composé n'a été observée dans du D_2O. Ce résultat peut être expliqué par la présence du carbone supplémentaire sur la fonction adamantane.

VI. Synthèse des ancres ADA-P-Cou 59 et ADA-P-TMZ 60

Avant de coupler la coumarine **55** avec le peptide **58** (*cf.* chapitre V.3 « Le peptide SGRSANA », p.109), l'introduction d'un bras espaceur comportant une fonction acide a été nécessaire pour effectuer le couplage peptidique à partir d'une fonction amine activée (Schéma 29). Ainsi, la coumarine **55** a été obtenu avec un rendement de 22% en faisant réagir l'aminocoumarine **53** avec l'anhydride succinique **54** dans de l'acétone à température ambiante pendant 18 heures. Tout le produit de départ **53** n'ayant pas réagi, il faudra optimiser les conditions de synthèse en allongeant le temps de réaction.

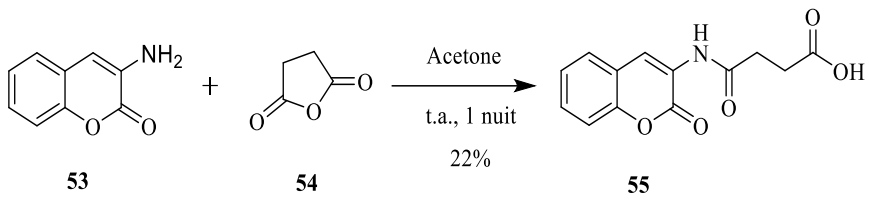


*Schéma 29 : Synthèse de la coumarine **55***

Le composé **58** a été préparé en suivant une méthodologie développée par l'équipe de P. Y. Renard.[197] La première étape de la synthèse du nouveau dérivé adamantane-peptide **58** a consisté à réaliser un couplage peptidique entre l'adamantane acide **24** et le peptide **56**, en présence des agents de couplage HOBt, HBTU et de la DIPEA dans du DMF (Schéma 30). Ensuite, une étape de déprotection de l'amine et couplage peptique avec la coumarine **55** nous a permis d'obtenir le produit ADA-P-Cou **59**.

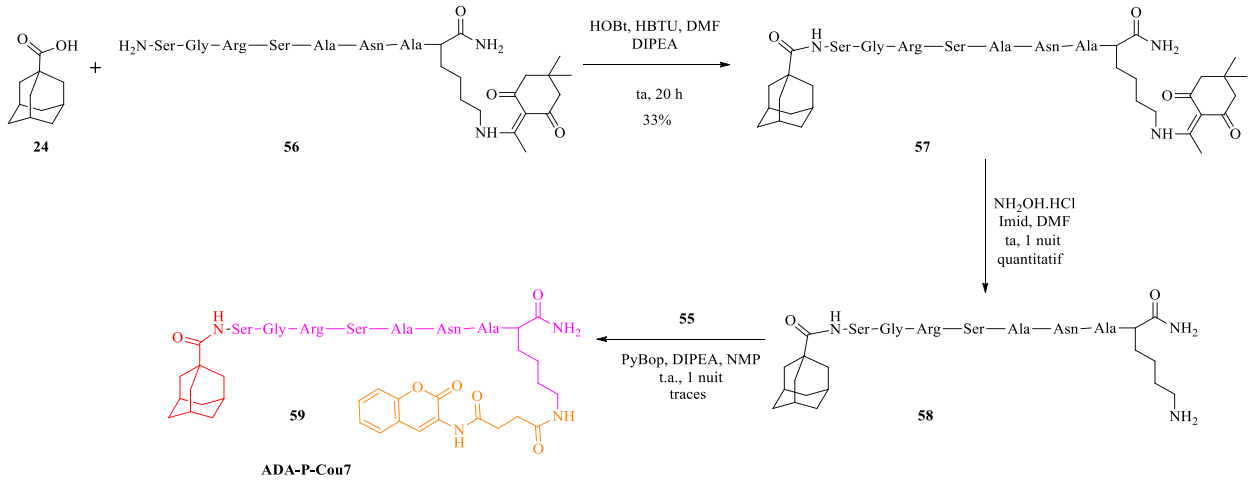


*Schéma 30 : Synthèse du produit ADA-P-Cou7 **59***

Le rendement de la dernière étape n'a pas été calculé car de très petites quantités (2 mg) ont été obtenues. La structure du composé **59** a été confirmée par spectrométrie de masse avec un pic à *m/z* = 1194,850 correspondant à l'adduit $[M+H]^+$.

Une fois, la méthodologie de synthèse mise au point sur la coumarine, nous nous sommes intéressés à la synthèse du composé ADA-P-TMZ **60**. Le composé **58** a été à nouveau, préparé sur un synthétiseur peptidique, en collaboration avec Jérôme LEPRINCE (Inserm U1239).

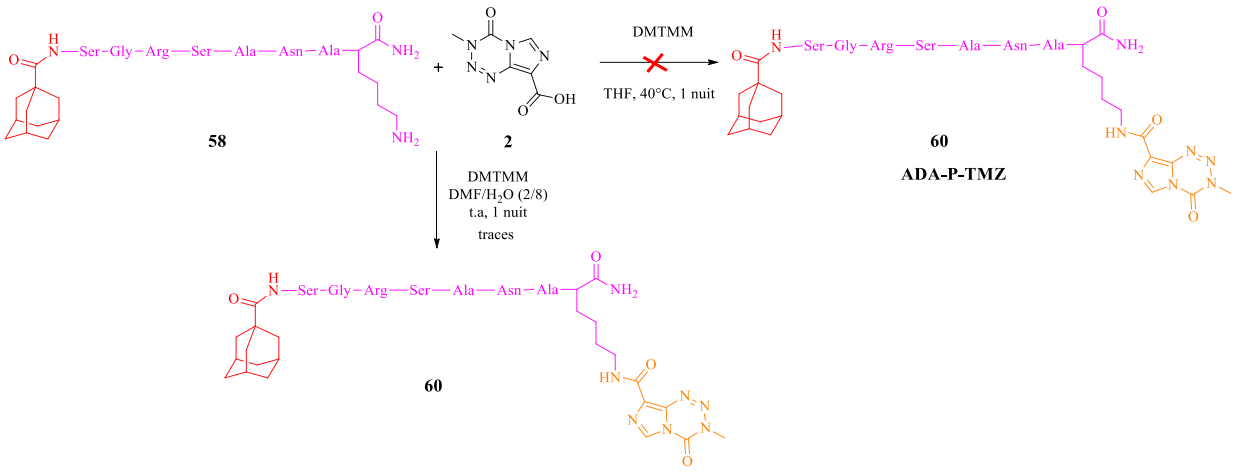


*Schéma 31 : Synthèse du produit ADA-P-TMZ **60***

Une réaction de couplage peptidique entre le composé **58** et le témozolomide acide **2** dans du THF, en présence d'un agent de couplage le DMT-MM a été réalisée. Cependant, après analyse, la formation du produit **60** n'a pas été observée. La totalité du produit de départ **58** a été obtenue probablement dû à l'insolubilité du composé dans le THF, ce qui constitue un frein pour le couplage. Le composé **58** étant uniquement soluble dans l'eau, un couplage peptidique en présence d'eau a été envisagé. Un second couplage peptique a donc été effectué entre le composé **58** et le composé **2** dans un mélange DMF/H_2O en présence de DMT-MM. A nouveau, le couplage n'a pas donné le résultat escompté. Nous avons essentiellement récupéré le composé **58** avec des traces du composé **60**, l'analyse par spectrométrie de masse révélant un pic à *m/z* = 1128.5645 correspondant à l'adduit $[M+H]^+$. Un changement d'agent de couplage pourrait être envisagé pour optimiser cette réaction (EDC, HOBt, HBTU).

Les synthèses de ces différentes ancres nous ont permis d'accéder aux composés ADA-H-Chro **29**, ADA-H-Cou2 **41,** ADA-H-Cou3 **43,** ADA-H-Cou4 **49** avec de bons rendements, aux composés ADA-I-Cou5 **50,** ADA-I-Cou6 **52** et ADA-P-Cou7 **59** avec de plus faibles rendements. La fonctionnalisation du témozolomide a été donc ensuite poursuivie.

VII. Différentes stratégies de synthèse du témozolomide

VII.1 Synthèse du témozolomide fonctionnalisée en position 3

Deux grandes stratégies ont été développées pour préparer différents dérivés de témozolomide. Dans cette partie nous allons nous intéresser à la fonctionnalisation en position 3. La synthèse du composé a été décrite par Cousin *et al.*[205] en 7 étapes (*cf.* partie fonctionnalisation précédemment présentée p. 134-135).

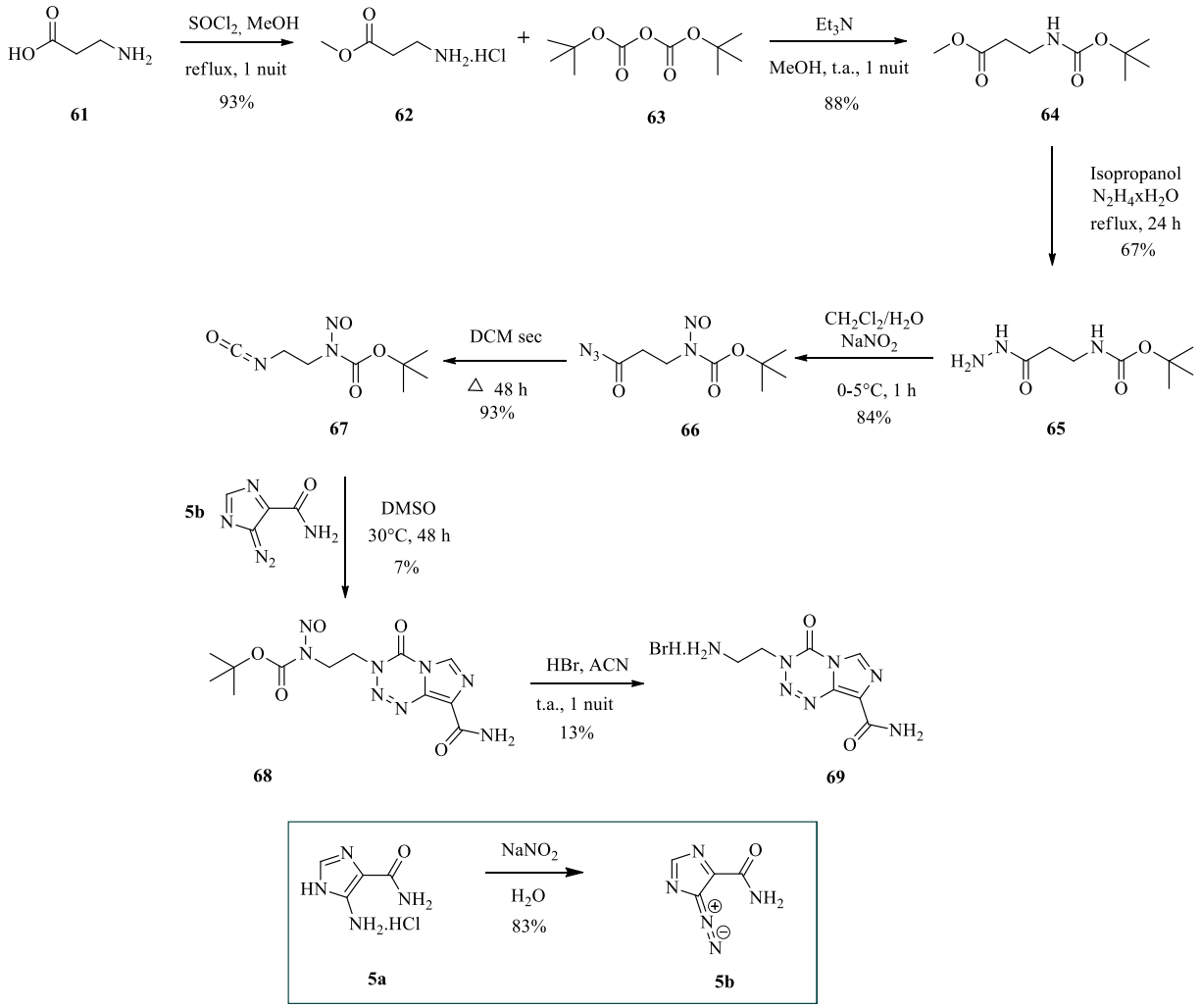


*Schéma 32 : Synthèse du témozolomide **69***

L'ester de la β-alanine **62** a été obtenu par estérification de l'acide correspondant **61** avec un rendement de 93% (Schéma 32). Ensuite, l'amine de l'ester a été protégée par un groupement Boc pour donner le produit **64** avec un rendement de 88%. L'hydrazine **65** est obtenue en faisant réagir l'ester avec de l'hydrazine monohydratée en excès. Ce dernier a été transformé en azoture dans du nitrite de sodium, suivi d'un réarrangement de Curtius dans du

DCM sec pendant 48 heures, pour obtenir l'isocyanate **67** avec un rendement de 93%. Un couplage avec le diazo IC **5b** et l'isocyanate **67** donne le produit **68** avec un rendement faible de 7%. Une déprotection du groupement Boc en milieu acide a conduit à l'obtention du TMZ amine **69** avec un faible rendement de 13%, ce rendement est comparable au rendement obtenu par l'équipe de Cousin.

Malgré l'accès au produit **69**, nous avons rencontré des difficultés pour reproduire le couplage entre le diazo-IC **5b** et l'isocyanate **67** dans les conditions décrites par Cousin *et al.* (Schéma 32). Un essai de couplage avec le 1-*iso*cyanato-4-méthoxybenzène commercial **70** ayant donné un bon rendement (90%) (Schéma 33), la difficulté provient probablement de l'instabilité du composé de l'isocyanate **67**.

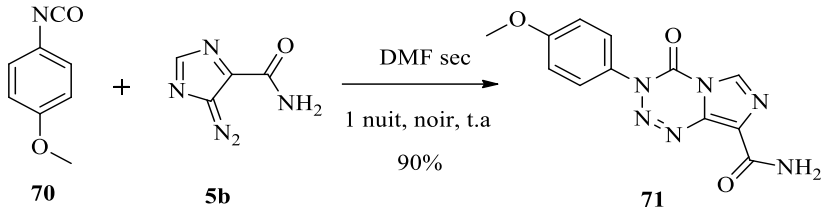


*Schéma 33 : Synthèse du témozolomide **71***

En effet, les résultats d'analyse par spectrométrie de masse ont mis en évidence la formation d'une structure dimèrique d'isocyanate avec un pic moléculaire à *m/z* = 430 (Schéma 34). La formation de ce dimère inhibe donc la réaction de l'isocyanate avec le diazo-IC **5**.

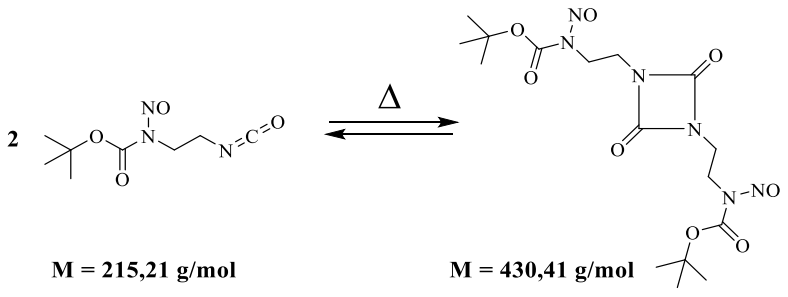


Schéma 34 : Dimérisation de l'isocyanate 67[221]

La synthèse du composé **69** étant non reproductible, à ce stade, nous avons donc décidé de changer de stratégie et de fonctionnaliser le TMZ commercial, non plus en position 3, mais en position 8 pour avoir accès à de nouveaux dérivés de TMZ.

VII.2 Synthèse du témozolomide fonctionnalisé en position 8

La préparation des composés **81** et **82** ont été effectuées en suivant les protocoles de Svec *et al.*[202] et Hummersone *et al.*[222] (Brevet 2009) (Schéma 35).

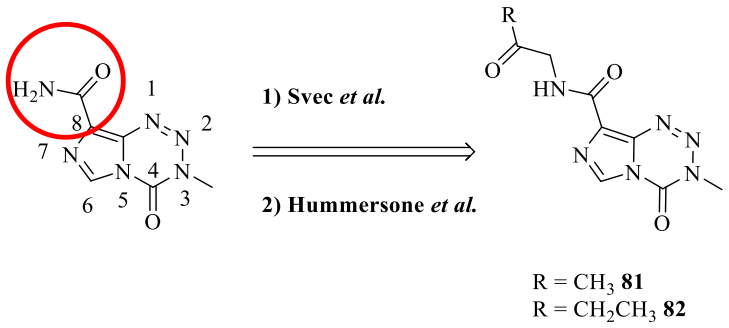


Schéma 35 : Différentes stratégies de synthèse du témozolomide fonctionnalisée en position 8

VII.2.1 Voie de synthèse de Svec et al.

Cette voie de synthèse nous a permis d'accéder au composé **81** et **82** en 4 étapes en utilisant l'intermédiaire témozolomide **3** chlorure d'acyle (Schéma 36).

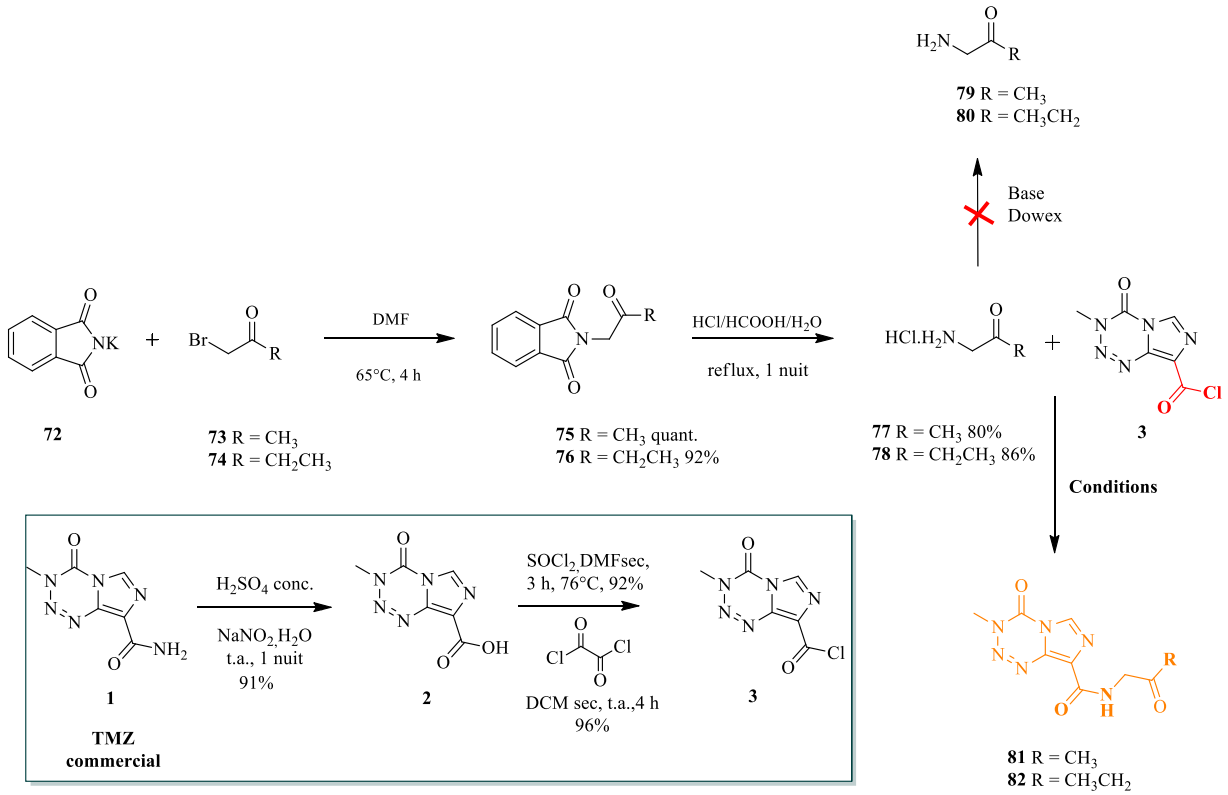


*Schéma 36 : Voie de synthèse des composés **81** et **82***

Les composés **75** et **76** ont été obtenus avec des bons rendements (92%) selon la méthode de Chandrashaker *et al*., par réaction de Gabriel entre le phtalimide **72** et les composés **73** et **74** en chauffant dans du DMF pendant 4 heures (Schéma 36).[223]

Ensuite, une déprotection en milieu acide nous a permis d'obtenir les ammoniums **77** et **78** avec un rendement de 80% et 86% respectivement. La condensation des ammoniums sur le TMZ **3** a dû être optimisée pour obtenir les composés **81** et **82** (Schéma 36).

Le composé **3** a été obtenu en 2 étapes à partir du témozolomide commercial **1**. La première étape a consisté à réduire la fonction amide en acide en présence d'acide sulfurique concentré, de nitrite de sodium à température ambiante une nuit. Ensuite, une précipation à l'eau, nous a permis d'obtenir le composé **2** avec un rendement de 91%. L'étape suivante a consisté à activer la fonction acide du composé **2** par un chlorure soit en présence de chlorure de thionyle, soit par le chlorure d'oxalyle. Ainsi, le composé **3** a été obtenu avec de très bons rendements dans les deux cas et a été immédiatement engagé dans la réaction suivante sans traitement.

Les essais d'amidation en présence de THF ou DCM secs, ne nous ont pas permis d'obtenir les composés désirés (Entrées 1 et 2, Tableau 7). En présence de DMF et de pyridine en conditions anhydres, les composés **81** et **82** ont été obtenus avec de très faibles rendements de 8% et 5% respectivement, probablement en raison de la faible réactivité de l'ammonium. En effet, malgré la présence d'une base, une probable dégradation de l'amine *in situ* a été observée par RMN empêchant ainsi le couplage.[224] Les résultats des tests sont réunis dans le tableau 7 ci-dessous.

*Tableau 7 : Synthèse des composés **81** et **82***

Entrée	**Conditions Réactionnelles**	**Rdt** **R = CH_3**	**Rdt** **R = CH_2CH_3**
1	THF sec, t.a., 3 h	Produit de départ	Produit de départ
2	DCM sec, t.a., 1 nuit	Produit de départ	Produit de départ
3	DMF sec, pyridine, 1 nuit	8%	5%
4	DMF sec, Et_3N, 1 nuit	Traces	Traces

Nous avons tenté à plusieurs reprises de transformer au préalable l'ammonium en amine libre soit en présence de base (K_2CO_3, NaOH, Pyridine, Et_3N) ou en utilisant une résine

échangeuse d'ion (DOWEX H^+) dans le but d'améliorer la réactivité des composés **77** et **78**, sans succès.

Une autre alternative a donc été tentée pour accéder à l'amine en protégeant la fonction cétone *via* une fonction acétal (composés **86** et **87**) (Schéma 37).

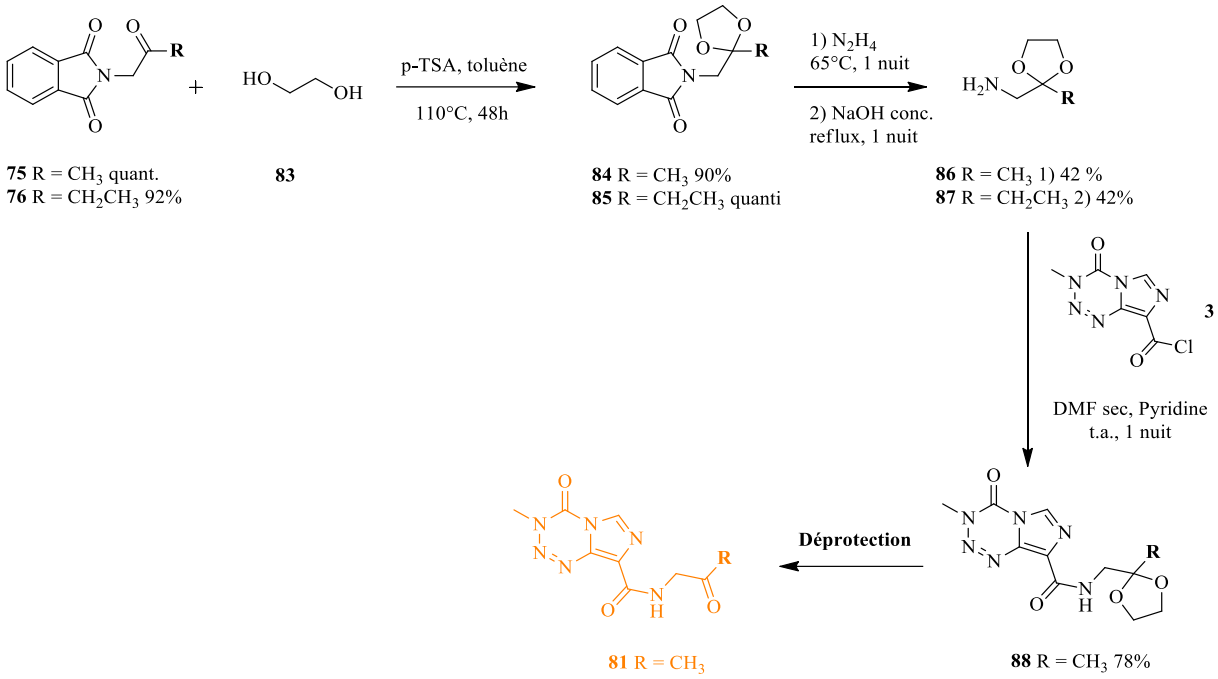


*Schéma 37 : Nouvelle voie de synthèse du composé TMZ **81***

Les composés **84** et **85** ont été obtenus en faisant réagir l'éthylène glycol **83** en présence de toluène à l'aide d'un Dean-Stark sur les composés **75** et **76** (R = Me ou Et) préablement préparés avec de très bons rendements de 90% et 100%. Les spectres RMN ^1H montrent l'apparition de signaux vers 4,50 ppm caractéristiques des protons méthyléniques de l'acétal. Une déprotection en présence d'hydrazine à 65°C ou en présence de NaOH concentrée à reflux fournit les produits **86** et **87** avec le même rendement de 42%. Le produit **86** a été ensuite couplé avec le chlorure d'acyle du TMZ **3** pour donner le TMZ acétal **88** (R = Me) avec un bon rendement de 78%. L'étape de déprotection du groupement acétal s'est avérée plus délicate du fait de la forte sensibilité de la structure du TMZ. Pour cela, différentes conditions ont été testées.

Diverses méthodes ont été décrites dans la littérature pour la déprotection des acétals utilisant des acides (HCl, H_2SO_4, HBr).[225–227] Par exemple, nous avons tenté d'obtenir la cétone **81** par hydrolyse acide de l'acétal en présence d'HCl 3N à reflux (110°C) pendant 1

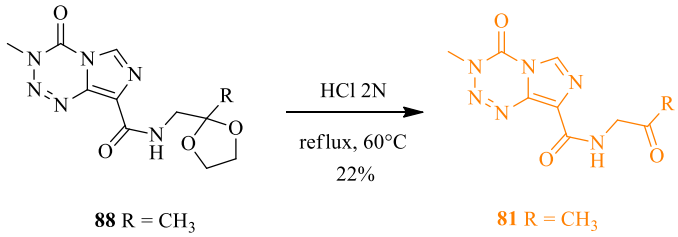
nuit. Même si une déprotection a été confirmée par la disparition des protons méthylèniques à 4,50 ppm sur le spectre ^{1}H RMN, le produit **81** n'a pas été obtenu car ces conditions drastiques ont également entrainé une dégradation du témozolomide. Un autre essai de déprotection de l'acétal en présence de LiCl dans un mélange de solvant DMSO/H_2O à 95°C durant 5 heures a également été tenté sans succès.

La stabilité du témozolomide dans ces conditions n'étant pas décrite, des tests ont été réalisés en présence d'acide chlorydrique. Ces études sont primordiales pour déterminer les conditions limites pour contrôler l'étape d'hydrolyse. Pour cela, le TMZ commercial **1** a été dissous dans une solution d'HCl 2N. La solution a été ensuite chauffée à reflux à différentes températures. Après 24 heures, le solvant a été évaporé sous pression réduite et une analyse RMN ^{1}H a été effectuée pour visualiser la dégradation du témozolomide. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 8).

*Tableau 8 : Etudes de stabilité du témozolomide **1** en milieu acide*

Entrée	Température	Observation
1	20°C	Pas de dégradation
2	40°C	Pas de dégradation
3	**60°C**	**Pas de dégradation**
4	80°C	Dégradation
5	100°C	Dégradation

Comme tenu des résultats, nous avons pu déterminer les conditions optimales pour hydrolyser la fonction acétal.



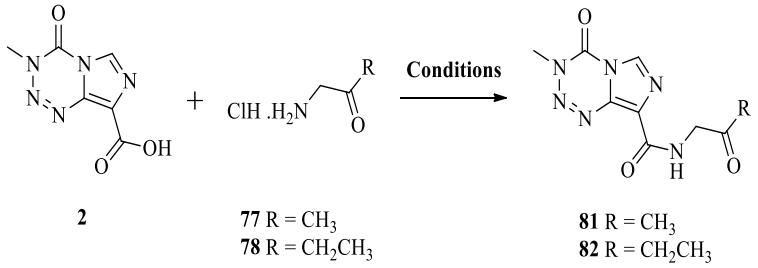
88 R = CH_3 **81** R = CH_3

*Schéma 38 : Synthèse du composé TMZ **81***

Finalement, le composé **23** a été obtenu avec un rendement de 22% par hydrolyse acide en présence d'HCl 2N à reflux (60°C) pendant 1 nuit. Cette étape reste à optimiser pour améliorer le rendement.

VII.2.2 Voie de synthèse d'Hummersone et al.

En 2009, Hummersone *et al.*[222] ont breveté différentes voies de synthèse du témozolomide. Une de ces synthèses permet d'obtenir le composé **23** à partir d'un couplage entre la fonction acide du témozolomide et une amine (Schéma 39).



2 **77** R = CH_3, **78** R = CH_2CH_3 **81** R = CH_3, **82** R = CH_2CH_3

*Schéma 39 : Nouvelle voie de synthèse des composés **81** et **82***

*Tableau 9 : Synthèse des composés **81** et **82** par couplage entre le TMZ acide **2** et les amines **77** et **78***

Entrée	Conditions	Rdt, R = CH_3	Rdt, R = CH_2CH_3
1	HBTU, DIPEA (4 éq), DMF sec, t.a., 2 h	8%	15%
2	HBTU, DIPEA, (1 éq), DMF sec, t.a. 1 nuit	20%	24%
3	DCC, HOBt, DMF, t.a., 1 nuit	5%	-
4	CDMT, NMM, DMF sec, t.a. 1 nuit	83%	81%

La synthèse des composés **81** et **82** a été réalisée, selon la procédure décrite, (Schéma 39) à l'aide de HBTU dans le DMF anhydre en présence de DIPEA (4 éq) comme base. Après purification sur une colonne sur gel de silice, nous avons obtenu les produits **81** et **82** avec un rendement de 8% et 15% respectivement (Entrée 1, Tableau 9). Ces rendements sont faibles comparés à celui décrit dans le brevet (51%). En faisant varier la quantité de DIPEA de 4 équivalents à un équivalent, nous avons augmenté légèrement les rendements de 20% et 24% pour les produits **81** et **82** respectivement (Entrée 1, Tableau 9).

En plus de l'inefficacité des systèmes de couplage, la difficulté de la réaction peut également s'expliquer par la sensibilité du témozolomide en milieu basique (Schéma 40). *In vivo,* à un pH supérieur à 7, le TMZ s'hydrolyse rapidement en 5-(3-méthyltriazén-1-yl) imidazole-4-carboxamide (MTIC) par dégradation chimique sans catalyse enzymatique. Le MTIC se décompose spontanément en présence d'eau pour former le 5-aminoimidazole-4-

carboxamide (ACI) et l'ion méthyldiazonium libéré méthyle l'ADN provoquant la destruction cellulaire.

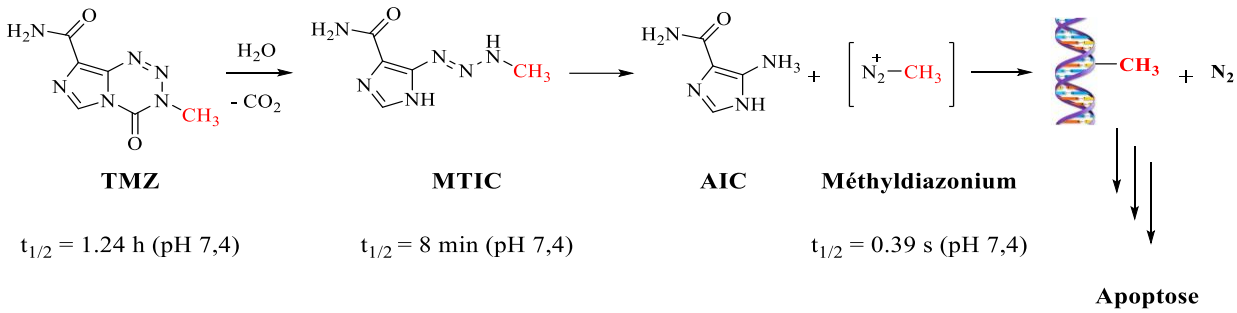


Schéma 40 : Mécanisme d'action du TMZ[228–230]

Pour cette raison, un couplage DCC/HOBt sans base a été testé (Entrée 3, Tableau 9). Cette méthode nous a permis d'obtenir le composé **81** avec un rendement faible de 5%. Ce couplage n'ayant pas donné le résultat escompté, cette nouvelle voie a été abandonnée. Ces résultats montrent, cependant, que la présence d'une base est nécessaire pour obtenir de meilleurs rendements. Nous avons alors envisagé une autre alternative en utilisant le couple CDMT/NMM.[231] Cette méthode s'est avérée plus efficace (Entrée 4, Tableau 9). En effet, le produit **81** a été obtenu après purification sur gel de silice, avec un bon rendement de 83%, supérieur aux résultats publiés. De même pour le composé **82**, un bon rendement de 81% a été également observé.

Une fois les composés **81** et **82** obtenus, nous nous sommes intéressés à la synthèse des dérivés de type hydrazones et imines.

VIII. Synthèse des composés Adamantane-Hydrazone-Témozolomide

VIII.1 Synthèse des composés ADA-H-TMZ 89 et 90

La méthode la plus connue pour synthétiser une hydrazone est la condensation d'une hydrazine sur un dérivé carbonylé, aldéhyde ou cétone. Nous avons réussi à synthétiser les hydrazones **89** et **90**, en faisant réagir les cétones **81** et **82** avec l'adamantane hydrazine **27** en présence d'éthanol à reflux (Schéma 41).

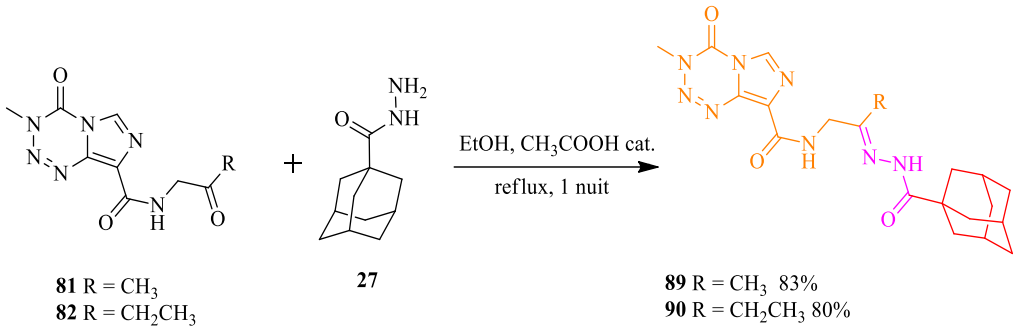


*Schéma 41 : Synthèse des hydrazones Ada-H-TMZ **89** et **90***

Les composés **89** et **90** ont été obtenus avec des rendements satisfaisants de 83% et 80%, respectivement. Leurs structures ont été confirmées par analyse des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C, ainsi que par HRMS. Par exemple pour le composé **89**, nous avons observé l'apparition du NH de l'hydrazone à 9,43 ppm et un pic moléculaire sur le spectre de masse à *m/z* = 427,2214 correspondant à l'adduit $[M+H]^{+}$.

VIII.2 Synthèse du ADA-H-TMZ 91

Un autre exemple de dérivé de témozolomide, le composé ADA-H-TMZ **91** a été obtenu par condensation de la cétone **81** avec l'hydrazine plus soluble synthétisée **42d** avec un rendement faible de 27% (Schéma 42). Les conditions de synthèse restent à optimiser pour obtenir un meilleur rendement.

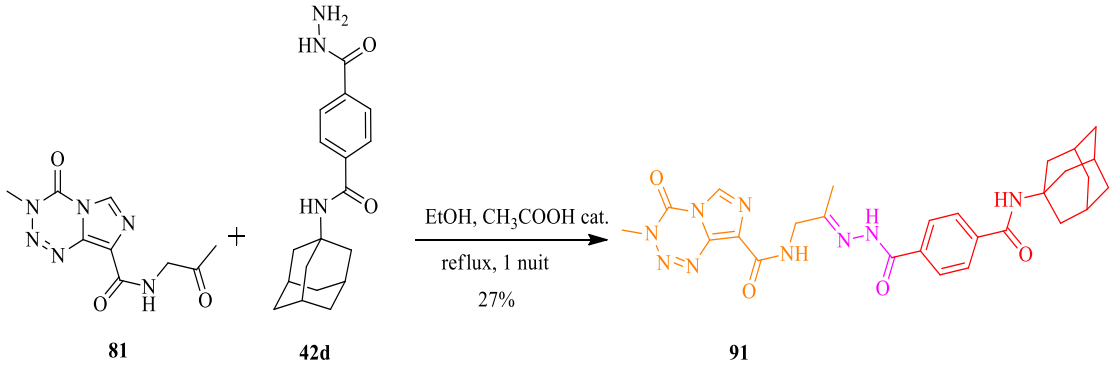
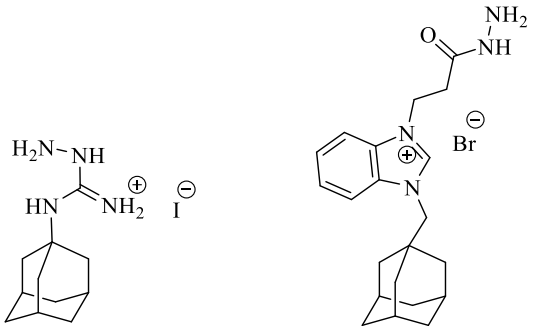


*Schéma 42 : Synthèse du composé ADA-H-TMZ **91***

Nous avons, cependant à nouveau, rencontré des difficultés avec ces composés hydrazones solides du fait de leur insolubilité dans l'eau, l'éthanol, et de leur faible solubilité dans le DMSO, le MeOH. Face à ce problème, de nouveaux sels d'hydrazine ont été préparés

afin d'améliorer cette dissolution importante pour former les futurs complexes d'inclusion dans la cavité des cyclodextrines (Schéma 43).

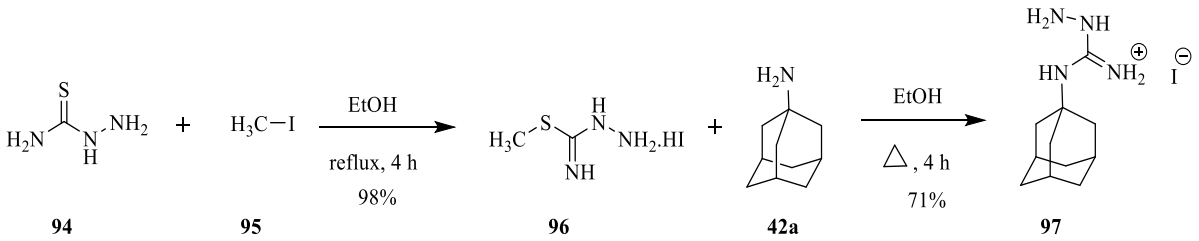


92 **93**

*Schéma 43 : Structures des hydrazines **92** et **93***

VIII.3 Synthèse des composés hydrazines 104 et 105

L'hydrazine **97** a été obtenu en deux étapes d'après les protocoles de Frkanec *et al.*[232]. A partir de l'hydrazine **94**, l'intermédiaire **96** a été isolé avec un rendement de 98% par action d'iodure de méthyle **95** à reflux dans l'éthanol. Ensuite, la réaction du composé **96** sur le 1-adamantylamine **42a** dans l'éthanol à reflux a donné le composé **97** avec un rendement de 71% (Schéma 44).



94 **95** **96** **42a** **97**

*Schéma 44 : Synthèse de l'hydrazine **97***

La synthèse de l'hydrazine **103** a été effectuée en trois étapes. Premièrement le benzimidazole **98** a été couplé à l'adamantane **99b** en présence d'hydrure de sodium dans du DMF à reflux pendant 5 jours selon le protocole de Vicha *et al.*[233] La réaction a été suivie par CCM (chromatograhie sur couche mince) jusqu'à la disparition complète du composé **99b**. Après purification par colonne sur gel de silice, le composé **100** a été obtenu avec un rendement de 88%. Le composé **100** a été ensuite couplé au dérivé bromé **101** à reflux dans de l'acétonitrile sec pendant 2 jours pour donner le composé **102** avec un rendement de 71%. Enfin, un traitement du composé **102** en présence d'hydrazine en excès nous a permis d'obtenir le composé **103** avec un rendement de 88% (Schéma 45).

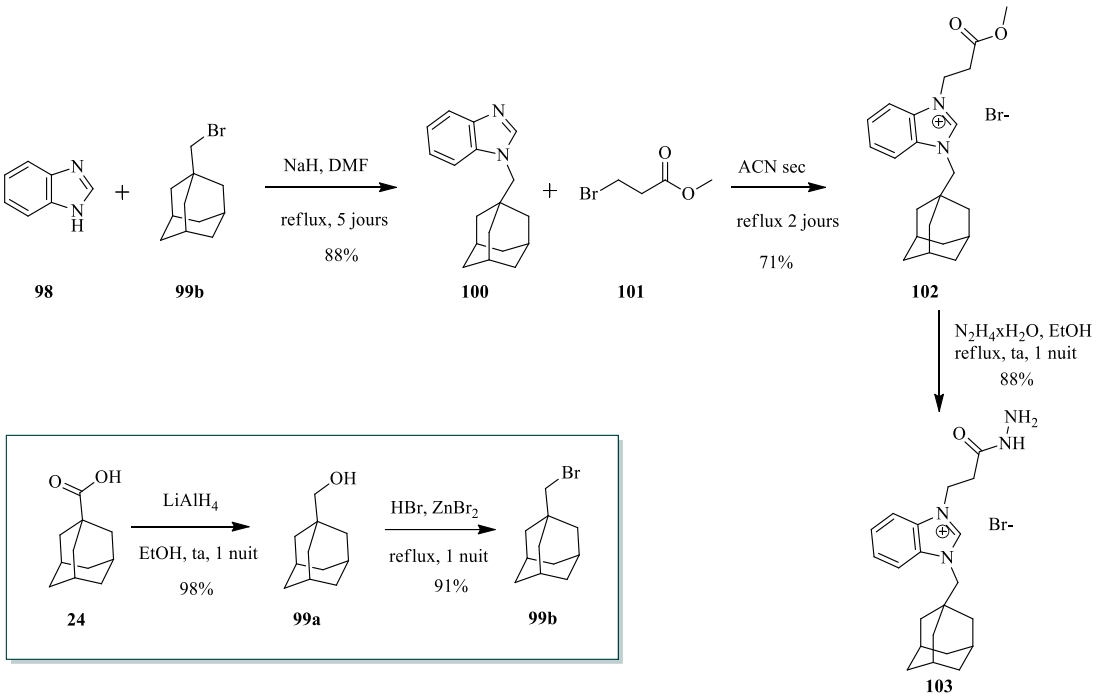


*Schéma 45 : Synthèse de l'hydrazine **103***

La structure des hydrazines a été confirmée par RMN ^{1}H, ^{13}C et par spectrométrie de masse. Ensuite, les hydrazines **97** et **103** ont été condensées sur le témozolomide **81** dans l'éthanol à reflux, en présence d'une quantité catalytique d'acide acétique, mais les hydrazones **104** et **105** n'ont pas pû être formées (Schéma 46).

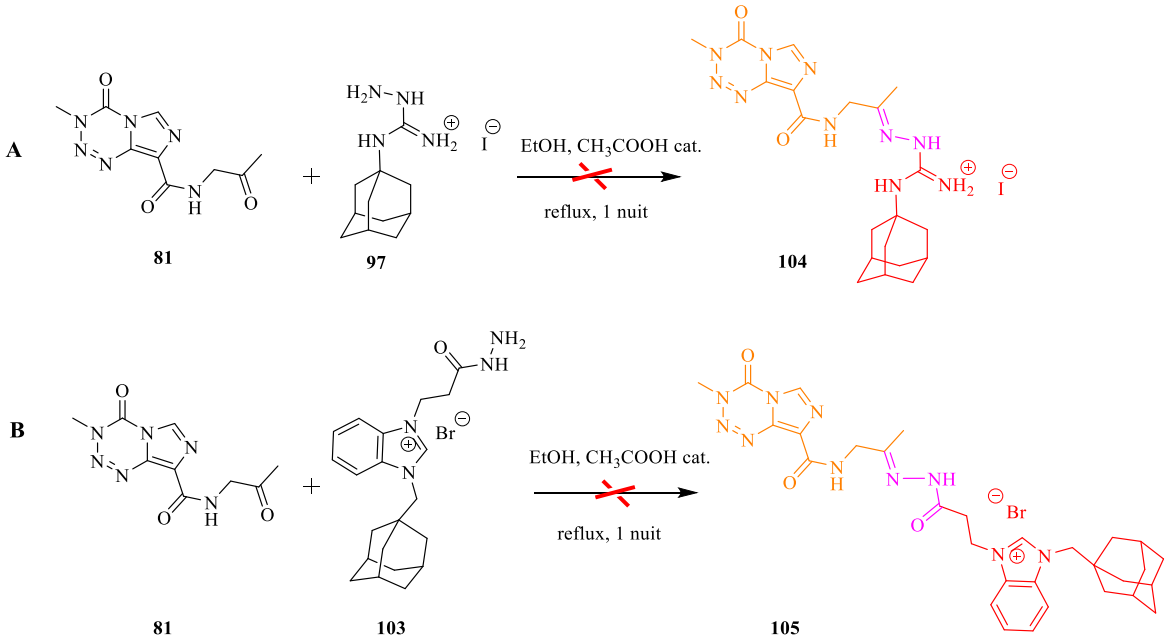
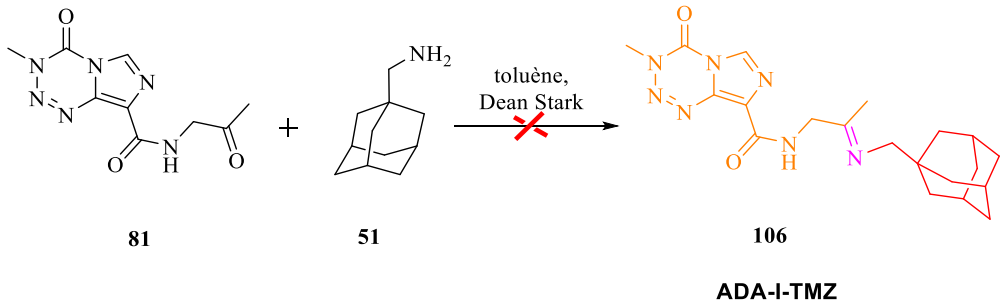


*Schéma 46 : Synthèses des hydrazones **104** et **105***

En effet, après purification et analyses, seuls les produits de départ ont été récupérés après nos différentes tentatives de synthèse. A ce stade, par manque de temps, nous avons choisi d'abandonner cette stratégie.

IX. Synthèse du composé Adamantane-Imine-Témozolomide 106

Nous avons tenté d'obtenir le composé **106** par condensation de la cétone **81** sur l'amine **51** dans du toluène en présence de Dean-Stark sans succès. En effet, nous avons observé après analyse la dégradation du produit de départ **81**. Une autre voie de synthèse a été envisagée par condensation de la cétone **81** en présence de l'adamantane amine **51** dans du MeOH anhydre à reflux pendant 2 heures sans succès.



81 **51** **106**

ADA-I-TMZ

*Schéma 47 : Synthèse du composé ADA-I-TMZ **106***

X. Conclusion

Notre objectif est de développer de nouvelles sondes d'imagerie intracellulaires à base de la β-cyclodextrine capables de passer la BHE, et permettant de visualiser la vectorisation du témozolomide. La cavité de la cyclodextrine permettra l'inclusion d'une molécule d'adamantane, cette dernière servant ainsi d'ancre grâce, à sa liaison par un bras espaceur à l'agent anticancéreux. Le bras espaceur lui-même comportera un peptide, mais également une fonction hydrazone ou imine susceptible d'être clivée pour libérer le principe actif. Trois stratégies ont été envisagées pour vectoriser la molécule active à l'intérieur de la cellule (Schéma 15).

A ce stade, nous avons préparé différentes molécules « invitées » portant un groupe adamantane, c'est-à-dire les composées modèles coumarines suivants (Figure 51) :

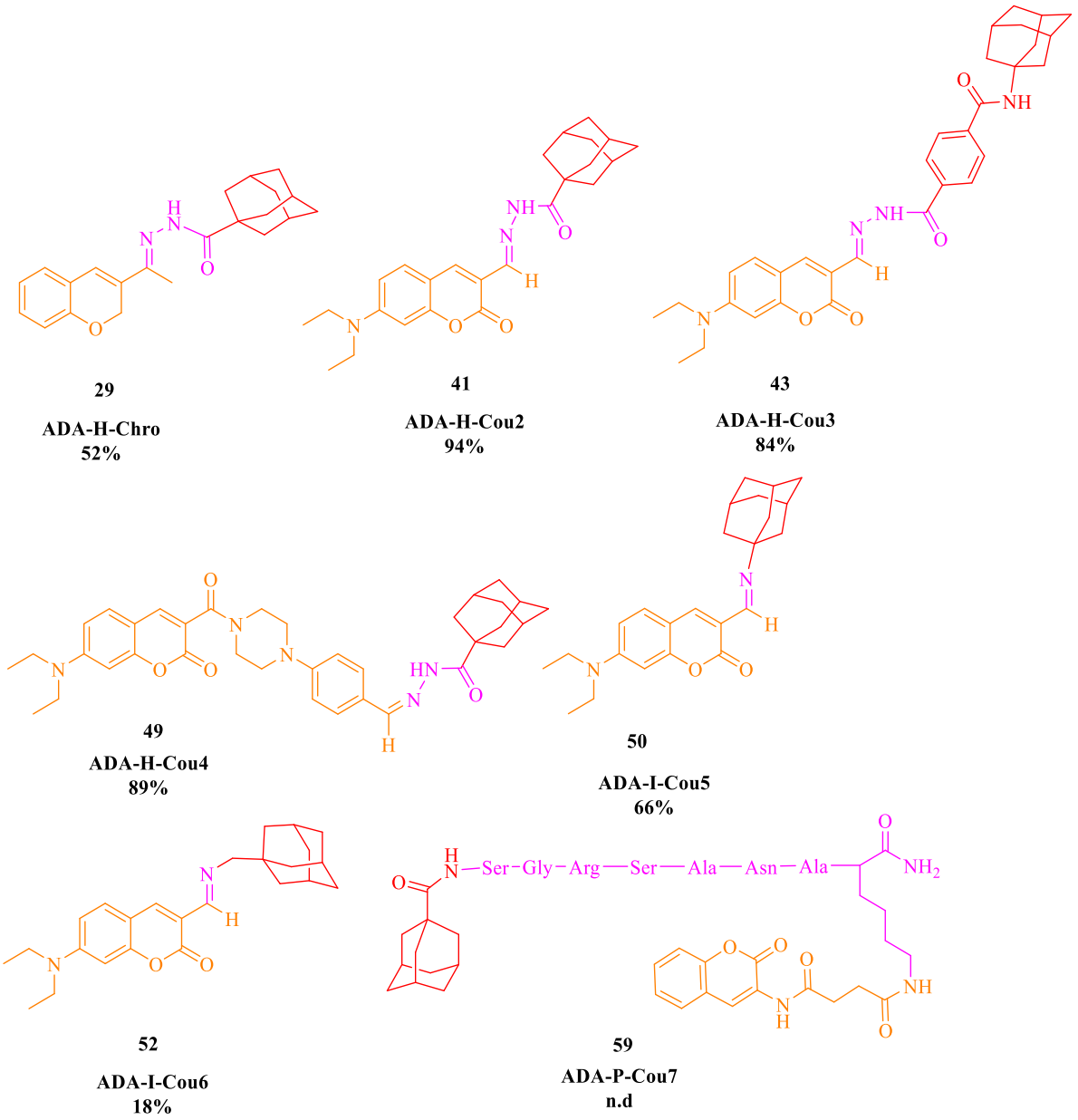
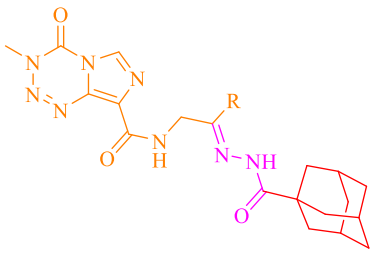
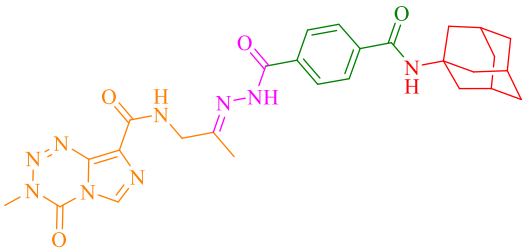


Figure 51 : Structures des différents composés modèles coumarines synthétisés. Les rendements présentés sont les rendements de la dernière étape de synthèse.

Après avoir mis au point les protocoles expérimentaux sur les coumarines, nous avons pu préparer les molécules invitées à base de témozolomide. Ainsi, nous avons pu obtenir les ADA-H-TMZ **89, 90** et **91** (Figure 52).



89 R = CH_3 83%
90 R = CH_2CH_3 80%



91
27%

Figure 52 : Structure des composés à base de témozolomide synthétisés

XI. Monofonctionnalisation de la cyclodextrine

Dans la partie suivante, nous allons présenter la synthèse des différents dérivés de β-cyclodextrine.

XI.1 Synthèse de la cyclodextrine fonctionnalisée par le Gd-DOTA par chimie « click »

Afin d'accéder à une cyclodextrine fonctionnalisée par l'agent de contraste, nous avons adopté la rétrosynthèse représentée sur le Schéma 48. La monofonctionnalisation d'une α-cyclodextrine perméthylée par le DOTA a été décrite par Hasenknopf *et al.*[75] par chimie « click ». Nous avons préparé dans un premier temps, séparément la cyclodextrine N_3 et le complexe Gd-DOTA pour les coupler dans un second temps au moyen d'une catalyse par l'ion cuivreux selon la cycloaddition de Huisgen (CuAAC = Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition).

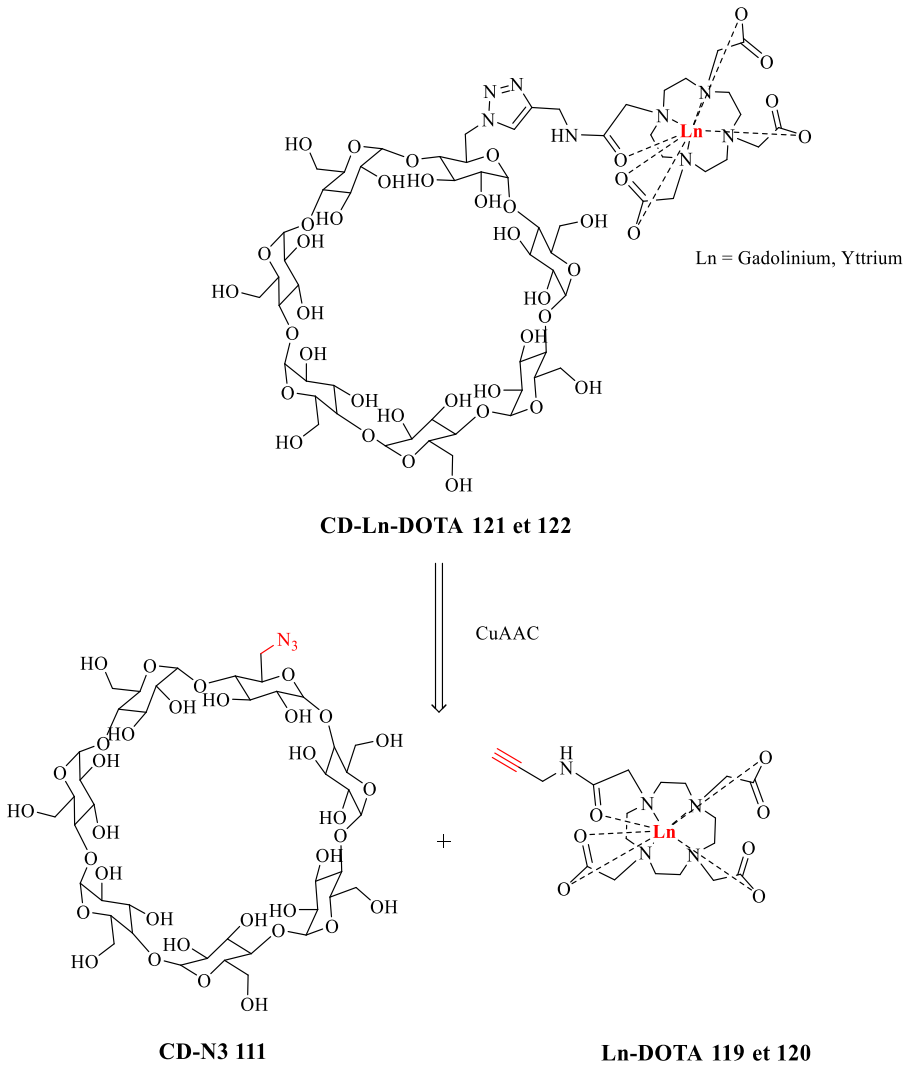


Schéma 48 : Rétrosynthèse de la formation du composé CD-Ln-DOTA ***121 (Gd)*** *et* ***122 (Y)***

XI.1.1 La chimie « click »

La réaction 1,3-dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture est la réaction la plus répandue pour les réactions de chimie « click », cette terminologie s'applique à une synthèse chimique, à la fois modulable et efficace. Ce concept a été introduit par Sharpless *et al*. et a pour objectif de développer une grande gamme de blocs sélectifs et modulables pour une grande variété d'application.[234]

La chimie click englobe donc toutes les réactions répondant aux critères suivants :

- Purification simple
- Bon rendement
- Utilisation de solvant bénin
- Produits stables
- Stéréospécificité
- Réactifs facilement disponibles
- Conditions expérimentales simples

Ainsi, selon Sharpless, plusieurs classes de transformations chimiques peuvent être considérées telles que des cycloadditions d'espèces insaturées (Diels-Alder), additions sur liaisons C-C (époxydation), les réactions sur les carbonyles comme la formation d'hydrazones, d'oximes, d'urées et de thiourées. Cependant ces réactions sont détronées par la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu (I) entre un alcyne et un azoture rapportée en parallèle par les groupes de Sharpless[235] et Meldal[223].

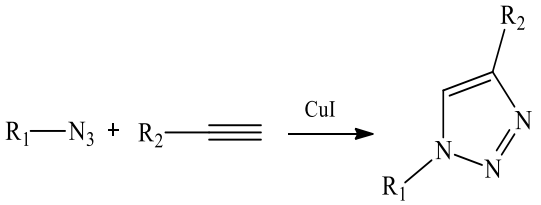


Schéma 49 : Exemple d'une réaction de click chemistry

La catalyse au Cu (I) augmente la cinétique de la réaction. De plus, plusieurs sources de cuivre (I) peuvent être utilisées comme les sels de cuivre (iodure, bromure, chlorure et acétate). L'espèce Cu (I) peut être générée en partant du cuivre (II) (sulfate de cuivre ou acétate de cuivre) en utilisant l'ascorbate de sodium comme réducteur. Le choix du système catalytique dépend des produits de départ, mais également du solvant nécessaire à la synthèse. Différents ligands peuvent être ajoutés pour optimiser les réactions notamment les amines polydentates tels que le PMDETA (*N*, *N*, *N′*, *N″*, *N″*-Pentaméthyldiéthylènetriamine), le TBTA (Tris(benzyltriazolylmethyl)amine) qui ont pour rôle d'aider à la déprotonation de l'alcyne terminal, empêchant ainsi la formation d'espèces non réactives polynucléaires de cuivre, en facilitant la coordination des azotures au cuivre et en s'opposant à la complexation du Cu par la cyclodextrine.

Un exemple de mécanisme de la réaction est proposé sur le Schéma 50. La première étape est la formation de l'acétylure de cuivre (I), étape exothermique. Ensuite, l'azoture se coordine au cuivre. La première liaison C-N est formée à l'étape suivante avec la formation du cycle métallocatalysé. La formation du cycle triazole de cuivre s'en suit. Finalement, le produit est obtenu par élimination et régénération du cuivre (II).

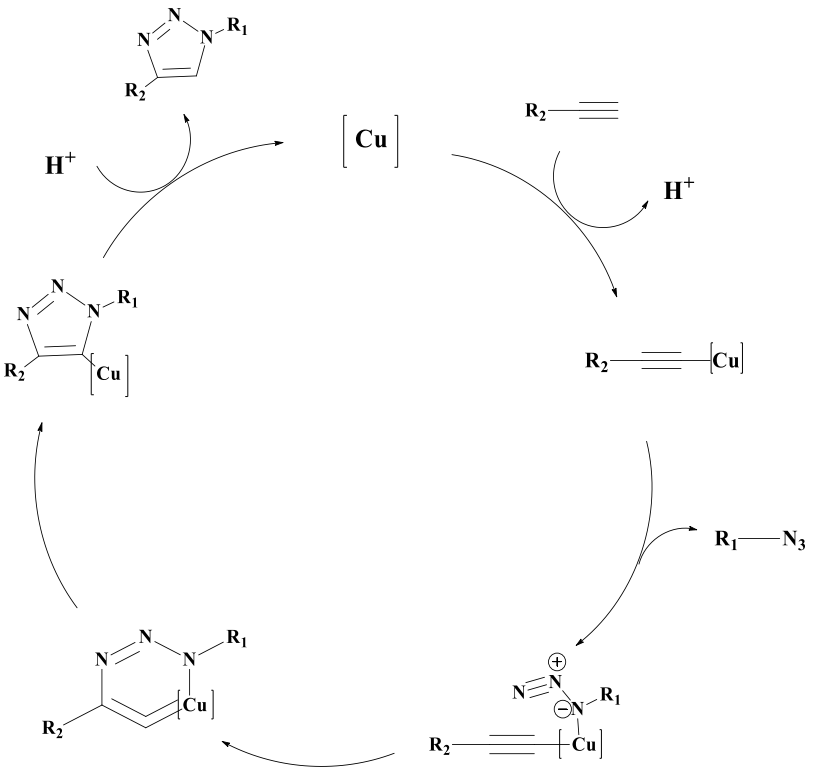


Schéma 50 : Exemple mécanisme supposé de CuAAC

Nous avons choisi la réaction CuAAC pour introduire l'agent de contraste sur la β-CD car elle offre de meilleurs rendements. Nous allons nous intéresser maintenant à la fonctionnalisation de la β-CD.

XI.1.2 Synthèse de la β-CD-N_3 111a

Plusieurs stratégies de synthèse existent pour fonctionnaliser sélectivement la cyclodextrine native. Elles reposent sur la différence de réactivité et de position des fonctions alcools. L'hydroxyle secondaire en position 2 est le plus acide en raison de l'effet inductif attracteur exercé par les atomes d'oxygène environnants. L'hydroxyle en position 3 est le plus encombré pour des raisons géométriques et l'hydroxyle primaire en position 6 est le plus nucléophile (Figure 21).

La β-CD-N_3 **111a** a été obtenue en 4 étapes (Schéma 51). La première étape est une tosylation du groupement hydroxyle en position 6 en présence de soude. Après agitation à 0°C pendant 4 heures, suivie d'une précipitation dans l'acétone, le produit **110** est obtenu avec un rendement de 79%. La cyclodextrine monoazoture **111a** est ensuite formée en présence d'azoture de sodium NaN_3 dans l'eau pendant 2 jours. La purification de la cyclodextrine **111a** étant difficile en phase normale, une étape de protection a été nécessaire. Après protection des groupements hydroxyles avec de l'anhydre acétique dans la pyridine, et une très longue et difficile purification sur silice due à la forte polarité de la cyclodextrine, le produit **112** est obtenu avec un rendement de 75%. Une étape de déprotection en présence de méthanoate de sodium en excès a permis d'obtenir la β-cylodextrine 6-monoazoture désirée **111a** avec un rendement quantitatif.

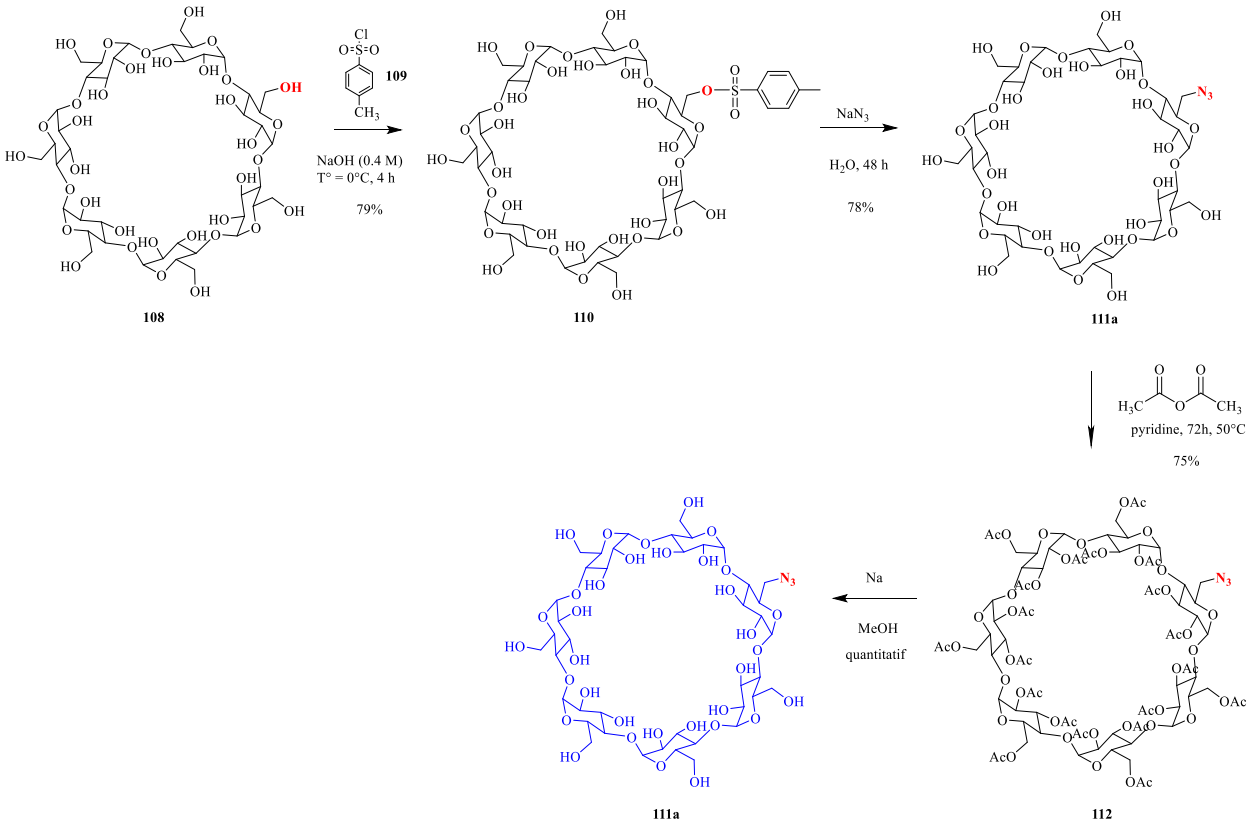


Schéma 51 : Voie de synthèse du précurseur β-CD(OH)-N_3 ***111a***

XI.1.3 Synthèse de la cyclodextrine-Ln-DOTA 121 et 122

XI.1.3.1 Généralités

Afin d'accéder à l'agent de contraste pour l'IRM, la synthèse d'un dérivé de l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique (DOTA) est nécessaire (Figure 53). Le DOTA fait partie des ligands macrocycliques qui ont une plus grande stabilité thermodynamique, ce qui évite ainsi la libération du Gd^{3+} dans l'organisme et l'échange avec les ions calcium.

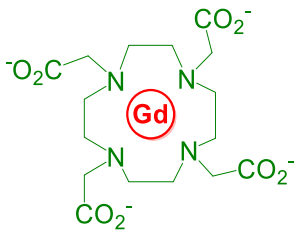


Figure 53 : Structure du Gd-DOTA

Le ligand DOTA est le ligand de référence couramment utilisé dans de nombreuses techniques d'imagerie qui dépendent de la nature du métal coordiné, le Gd pour l'IRM, l'europium et le terbium pour la luminescence, l'yttrium pour la RMN, le cuivre et le gallium pour la PET.[236] La première synthèse du DOTA a été réalisée en 1976 par Stetter et Franck[237]. Plusieurs voies de synthèse existent pour préparer des dérivés du DOTA. [225] La fonctionnalisation du DOTA par des petites fonctions (acide aminé, amine, aldéhyde, alcool, alcyne, azoture) sur le quatrième azote du cycle est réalisée à partir du cyclène selon deux voies de synthèse (Schéma 52).

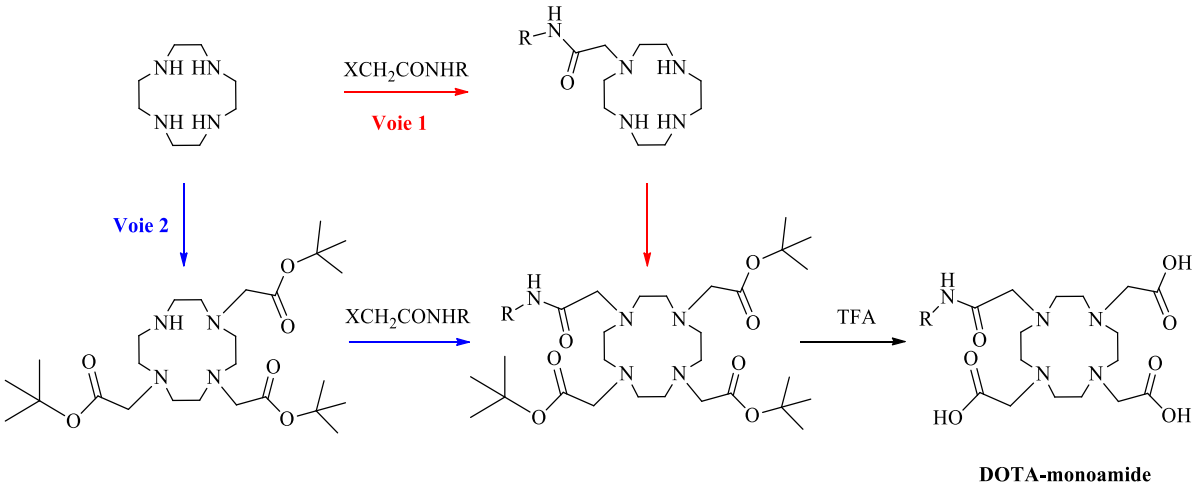


Schéma 52 : Deux voies de synthèse du DOTA-monoamide

Compte tenu des données bibliographiques et de l'expérience acquise au laboratoire dans la préparation de dérivés de DOTA, nous avons choisi la voie 2 (Schéma 52) introduisant le bras alcyne en deuxième étape pour la fonctionnalisation du DOTA (Figure 54).

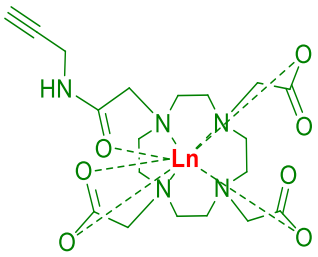


Figure 54 : Complexes de Ln-DOTA : Gadolinium, Yttrium

Le complexe avec l'Yttrium sera utile pour les études RMN. En effet, le Gd étant paramagnétique, les signaux apparaissent éclatés en RMN.

XI.1.3.2 Synthèse des complexes de Ln-DOTA 119 et 120

Les composés Gd-DOTA 119 et Y-DOTA 120 ont été obtenus selon la synthèse décrite par Prasuhn *et al.*[238] Le cyclène **113** réagit avec le bromoacétate de *tertio*butyle **114** dans l'acétonitrile sec en présence de K_2CO_3 pour donner le cyclène trisubstitué **115** avec un rendement de 60% (Schéma 53).

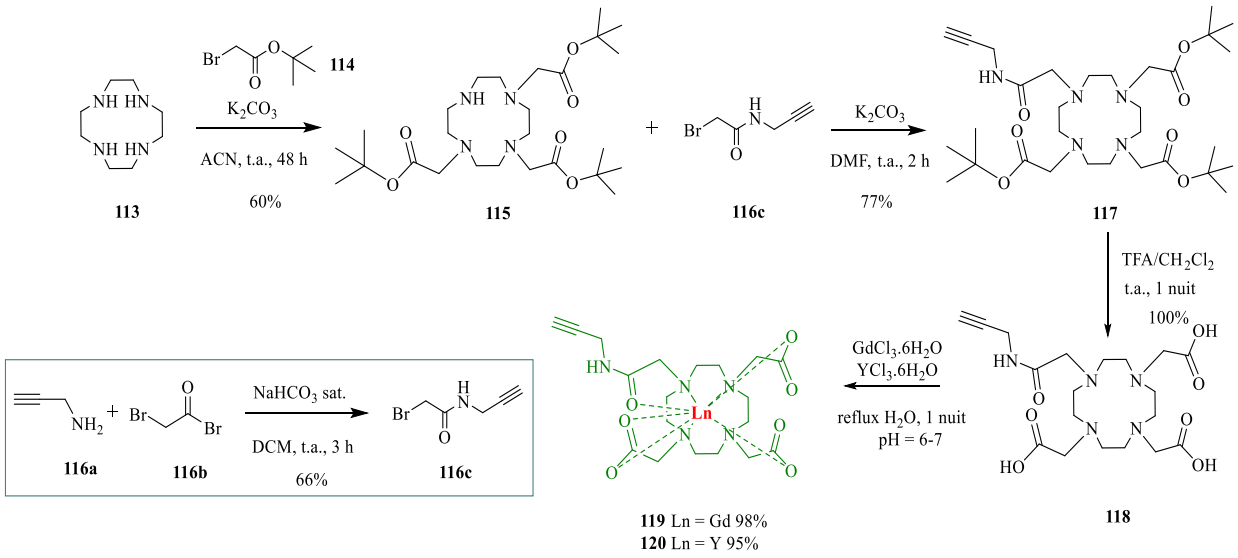


*Schéma 53 : Synthèse du Ln-DOTA **119** et **120***

La deuxième étape consiste à faire réagir le DO3A-*t*-Bu-ester 115 avec le 2-bromo-*N*-2-propyn-1-ylacétamide 116c préalablement préparé en présence de K_2CO_3 dans du DMF à

température ambiante pendant 2 heures pour donner le DOTA 117 après purification sur gel de silice (Schéma 53). L'alcyne **117** obtenu avec un rendement de 77%, a ensuite été engagé dans une réaction de déprotection en milieu acide pour conduire au composé **118** avec un rendement quantitatif. Une étape de complexation avec du $GdCl_3.6H_2O$ ou de l'$YCl_3.6H_2O$ en milieu aqueux pH 6,5, fournit les composés **119** et **120** avec un rendement de 98% et 95%, respectivement après dialyse (membrane de 500Da) pour éliminer le lanthanide résiduel et lyophilisation.

XI.1.3.3 Synthèse des composés CD-Ln-DOTA 121 et 122

Les cyclodextrines **121** et **122** ont été obtenues par réaction de chimie-click à partir de la cyclodextrine **111a** et des Ln-DOTA **119** et **120,** en présence de sulfate de cuivre, de l'ascorbate de sodium, dans un mélange 1/1 DMSO/H_2O et du ligand PMDTA, pour activer le cuivre et empêcher sa complexation par la cyclodextrine (Schéma 54). Après dialyse, pour éliminer le cuivre et l'ascorbate de sodium, une purification difficile sur colonne en phase inverse avec une détection DEDL est nécessaire car la cyclodextrine ne porte pas de groupement chromophore. Ensuite, les produits obtenus sont passés sur CHELEX (résine échangieuse d'ions) pour éliminer le reste de cuivre complexé par la cyclodextrine. Les CD-Ln-DOTA **121** et **122** ont été obtenues avec de bons rendements de 82% et 80%, respectivement.

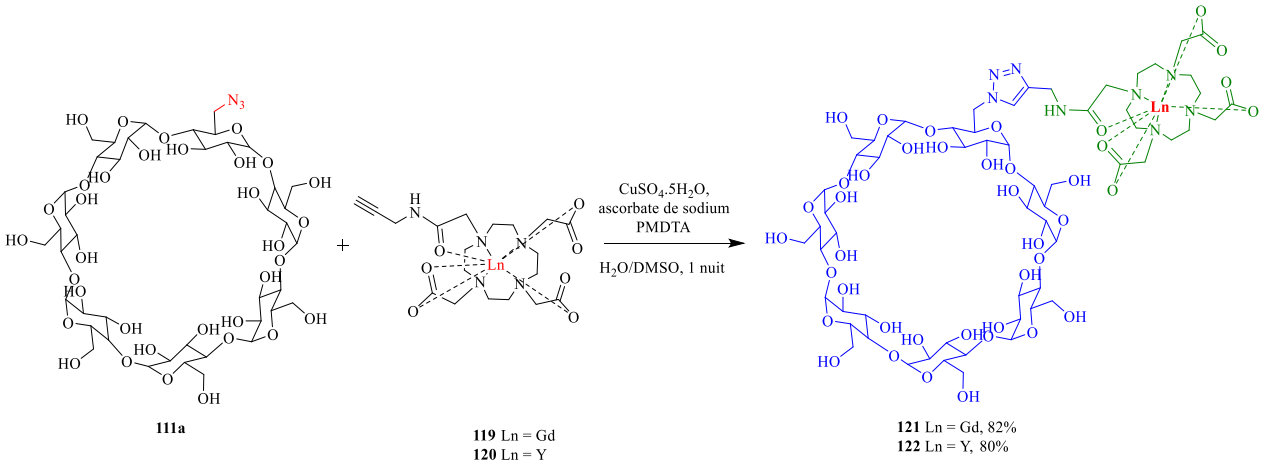
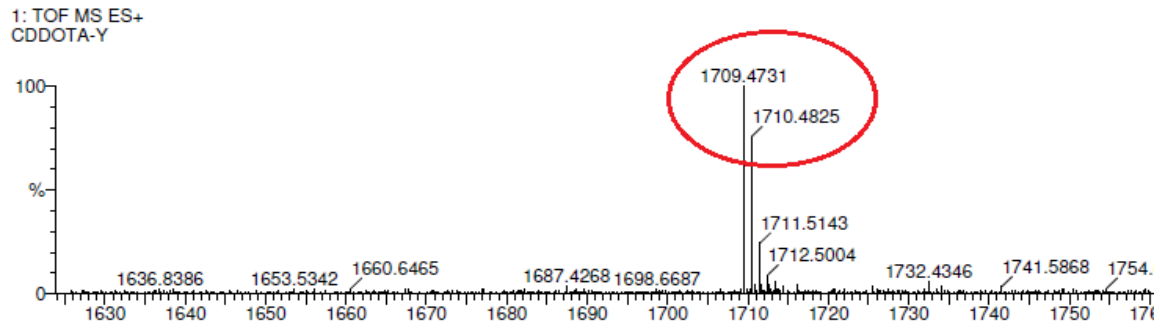


*Schéma 54 : Synthèse de la CD-Ln-DOTA **121** et **122***

L'analyse des produits obtenus a été réalisé par spectrométrie TOF MS ESI+ pour les composés **121** et **122**. Ces spectres de masse confirment le profil isotopique spécifique de l'yttrium (a) et du gadolinium (b) (Figure 55).

(a)



(b)

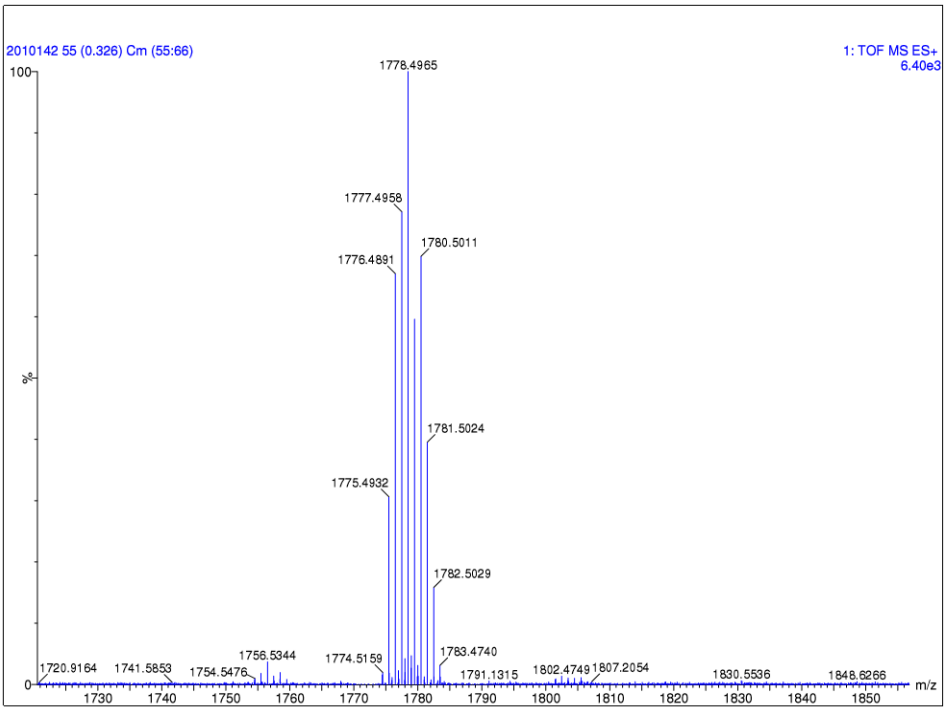


*Figure 55 : Spectres de masse des composés **121 (b)** et **122 (a)***

Nous avons également tenté d'effectuer la CuAAc entre la CD-N_3 **111a** et le ligand DO3A libre **118** (non complexé par un ion lanthanide) afin de pouvoir introduire le lanthanide en dernière étape (Schéma 55).

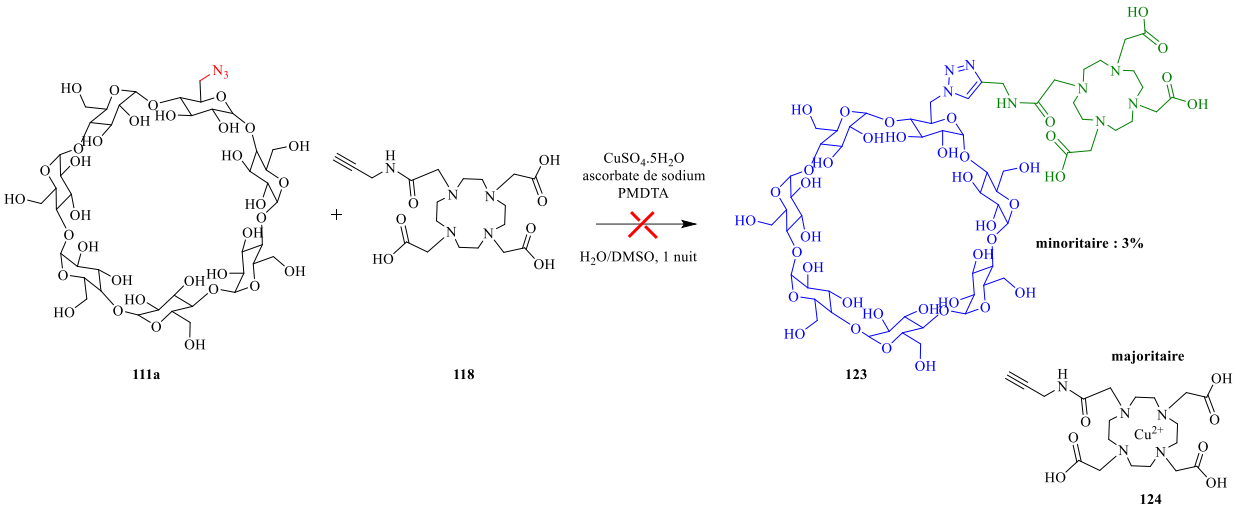


*Schéma 55 : Synthèse de la CD-DOTA **123***

Dans ce cas, le ligand DO3A **118** complexe les ions cuivre présents et inhibe leur activité catalytique (Schéma 55) en empêchant la réaction de « click ». A la fin de la réaction, nous avons obtenu le produit **123** sous forme de traces, la cyclodextrine-N_3 **111a** et le composé Cu-DOTA **124.**

XI.2 Synthèse de la cyclodextrine 129 complexée par le Gd

XI.2.1 Synthèse de la β-CD 129

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Professeur Chang Chun Ling de l'Université de Calgary (*cf.* V.2.1.3 p.73), nous avons développé une nouvelle sonde IRM à base d'une β-CD, décorée de 7 groupements iminodiacétates connectés aux positions C6 de la cyclodextrine *via* un bras espaceur issu de la chimie click. Ces travaux ont été initiés au laboratoire par le Dr. Issam Gaamoussi.

La cyclodextrine a été efficacement fonctionnalisée en 4 étapes[239] (Schéma 56).

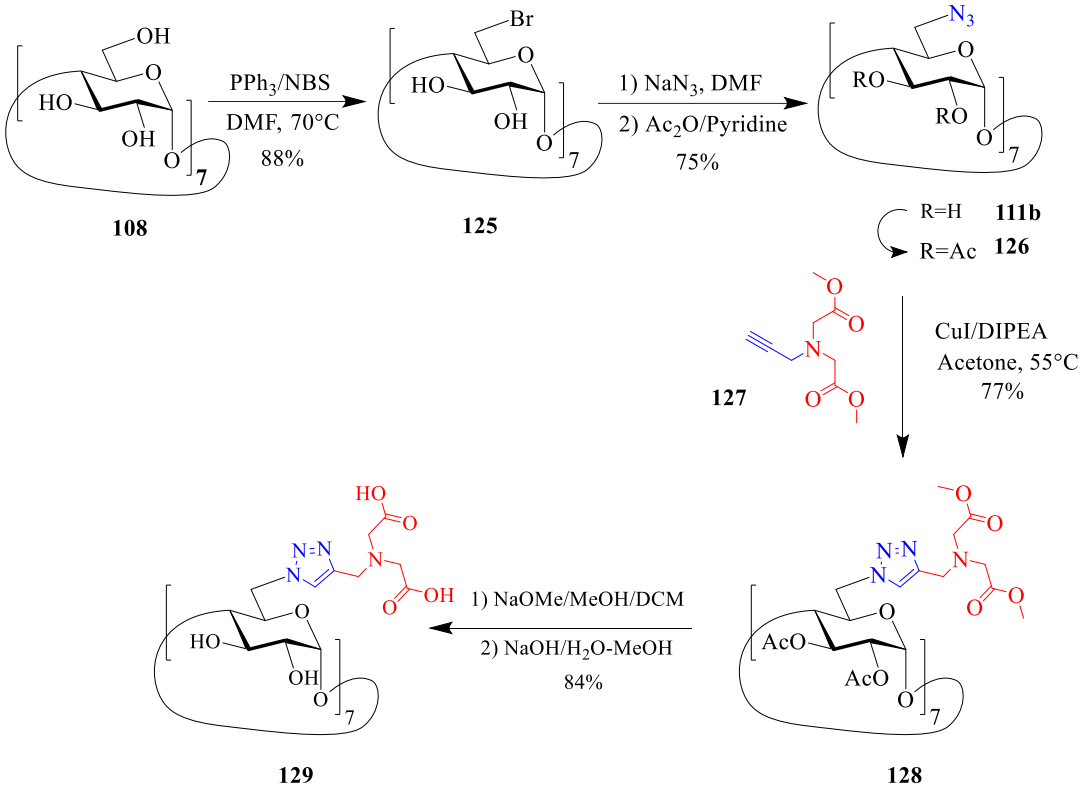


*Schéma 56 : Synthèse de la cyclodextrine **129***

La première étape est une bromation du groupement hydroxyle en position 6 en présence de PPh_3 et du NBS dans du DMF à 70°C. L'intermédiaire **125** a été obtenu avec un rendement de 88%. La cyclodextrine mono azoture est formée par l'action de NaN_3 dans du DMF. La purification du produit en phase normale étant difficile, une étape de protection a été nécessaire. Après protection des groupements hydroxyles avec de l'anhydre acétique dans la pyridine, et purification, le produit **126** a été obtenu avec un rendement de 75%. Une cycloaddition 1,3-dipolaire a été réalisée en utilisant 1,5 équivalents d'alcyne par azide dans de l'acétone au reflux en utilisant une quantité catalytique d'iodure de cuivre (I) en tant que catalyseur en présence de DIPEA. La réaction a donné le composé **128** recherché per-6-substitué, isolé avec un rendement de 77%. Une déprotection nous a permis d'obtenir le ligand cible **129** souhaité avec un rendement de 84%.

XI.2.2 Synthèse des agents de contraste 130, 131 et 132

Les différents complexes avec le gadolinium ont été obtenus selon la méthode décrite précédemment (Schéma 53).

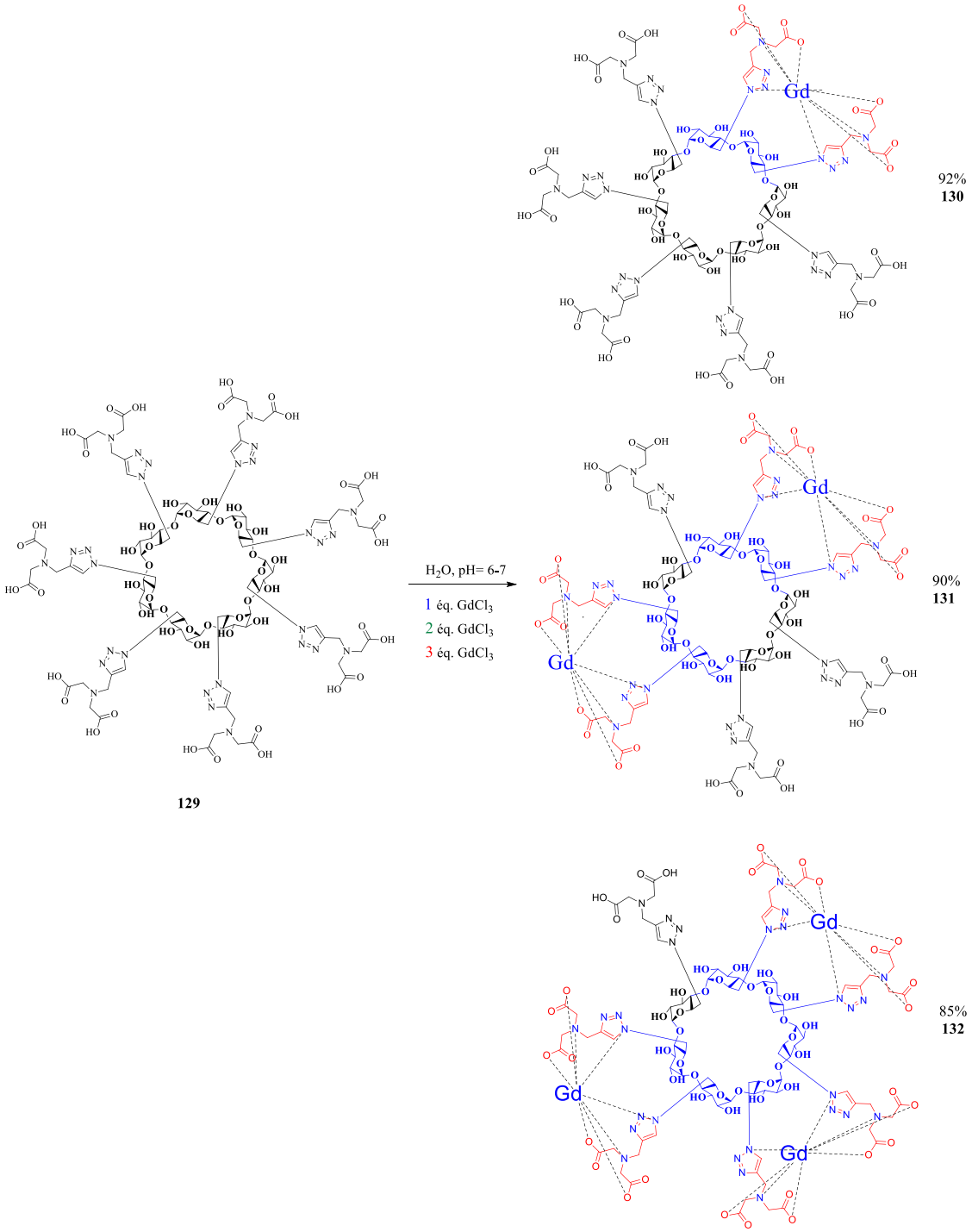


*Schéma 57 : Synthèse des agents de contraste **130**, **131**, **132***

Le ligand **129** a été avec complexé avec un à trois équivalents de $GdCl_3(H_2O)$ dans l'eau à pH 6-7 pour donner les complexes **130**, **131** et **132** avec des rendements respectifs de 92%, 90% et 85%.

Nous avons ensuite étudié la stabilité des complexes. Le pGd = -log [Gd] libre a été calculé en fonction du pH. La valeur de pGd doit être la plus élevée possible pour assurer une dissociation négligeable du métal, car le Gd (III) libre est toxique. Dans le cas du complexe **130,** à un pH de 7,4, le pGd mesuré est de 15,60. Cette valeur est nettement supérieure aux valeurs de pGd du Gd-DOTA (12,1). Ce complexe ligand **130** est donc plus stable que le complexe Gd-DOTA. Ce résultat illustre le fort potentiel de l'utilisation de ces agents de contraste pour des applications biomédicales.

XI.3 Synthèse de la cyclodextrine fonctionnalisée par l'angiopep

Dans le but de passer la BHE, une cyclodextrine fonctionnalisée par le peptide angiopep a été mise au point.

XI.3.1 Généralités

Les cyclodextrines ne traversant pas les membranes cellulaires, il est donc indispensable de les fonctionnaliser avec des transporteurs spécifiques, par exemple, l'angiopep pour passer la BHE (*cf*. Partie 2 du manuscrit).

En 2013, Kitagishi *et al*.[240] ont étudié la complexation supramoléculaire de la tétraarylporphyrine substituée d'une chaîne peptidique d'octaarginine (TPPS-R8) avec la TMe-β-CD. Des expériences de fluorescence sur les cellules HeLa ont révélé que la porphyrine modifiée TPPS-R8 en présence de deux cyclodextrines formait un complexe stable qui traversait la membrane pour se disperser dans le cytosol.

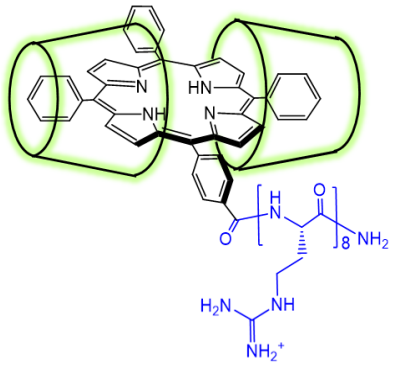


Figure 56 : Structure du complexe TPPS-R8/CD

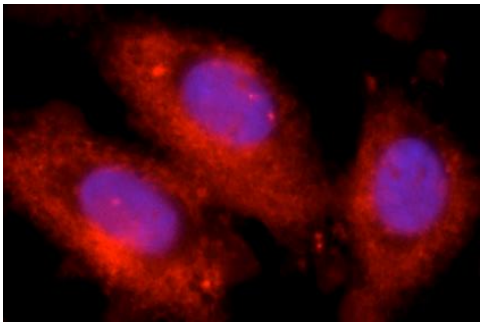


Image 2 : Fluorescence sur des cellules HeLa du complexe TPPS-R8/CD

Deux ans plus tard, l'absorption cellulaire du complexe TPPS/CD-R8 a été étudiée sur les cellules HeLa. Kitagishi *et al.* ont confirmé que le complexe d'inclusion restait stable dans la cellule grâce à la forte affinité entre la CD et TPPS-R8CD. En présence d'un complexe simple porphyrine cyclodextrine, seule la fluorescence du contrôle en bleu est observée, indiquant l'absence d'internalisation du complexe dans la cellule (Image 3). Cependant, en présence du peptide octaarginine fonctionnalisée sur la CD, une forte fluorescence est détectée en rouge (Image 4) démontrant l'internalisation de la porphyrine grâce au transporteur R8-CD.

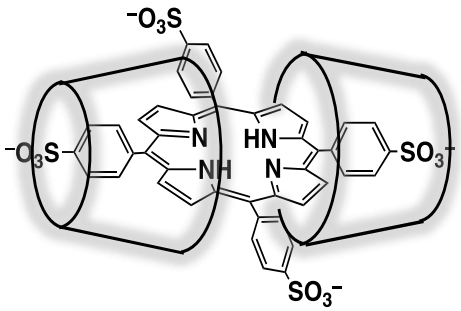


Figure 57 : Structure du complexe TPPS-CD

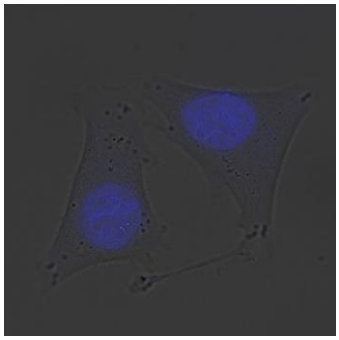


Image 3 : Fluorescence sur des cellules HeLa du complexe TPPS/CD

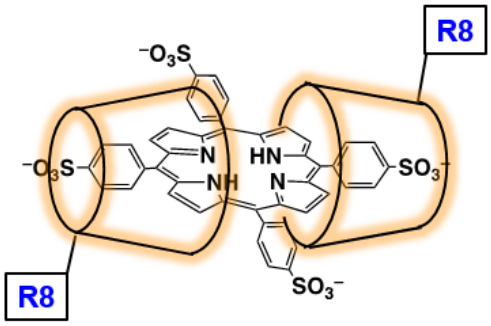


Figure 58 : Structure du complexe TPPS /CD-R8

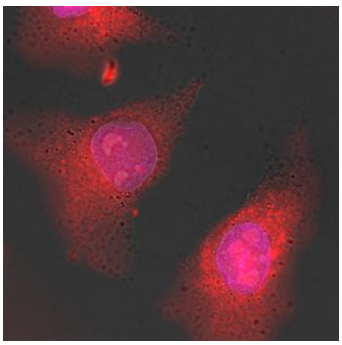


Image 4 : Fluorescence sur des cellules HeLa du complexe TPPS/CD-R8

Notre stratégie consiste à monofonctionnaliser la β-cyclodextrine (CD) par un peptide transporteur capable de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). Pour cela une approche modulaire a été envisagée en utilisant, de nouveau, une réaction de type « click ». La fonction alcyne terminale est donc portée par l'angiopep et la fonction azoture par la β-CD.

XI.3.2 Synthèse de la cyclodextrine β-CD-Angiopep 134

Nous nous sommes inspirés des travaux de Kitagishi *et al.*[241] précédemment présentés. En effet, ils ont décrit un couplage par chimie « click » entre la β-CD-N_3 **111a** et le peptide R8 avec un rendement de 52%. Cette méthode a été appliquée pour la synthèse du composé **134** avec un rendement de 71%. La β-cyclodextrine mono azoture **111a** et l'angiopep **133** (synthétisé et fourni par l'équipe de Marc-André Bonin de l'Université de Sherbrook au Canada), ont été dissous dans un mélange 1/1 (H_2O/DMSO) en présence de cuivre, d'ascorbate de sodium et de TBTA (Schéma 58). Le TBTA étant insoluble dans l'eau, la présence de DMSO est indispensable. De plus, ce solvant permet de préserver l'activité du cuivre en évitant une complexation avec la cyclodextrine ou avec le peptide. Le composé **134** a été obtenu après purification par HPLC sur une colonne Kinetex éluée par un mélange eau/ACN avec un gradient de 0% à 60% avec un rendement de 71%, soit sur une quantité de 20 mg.

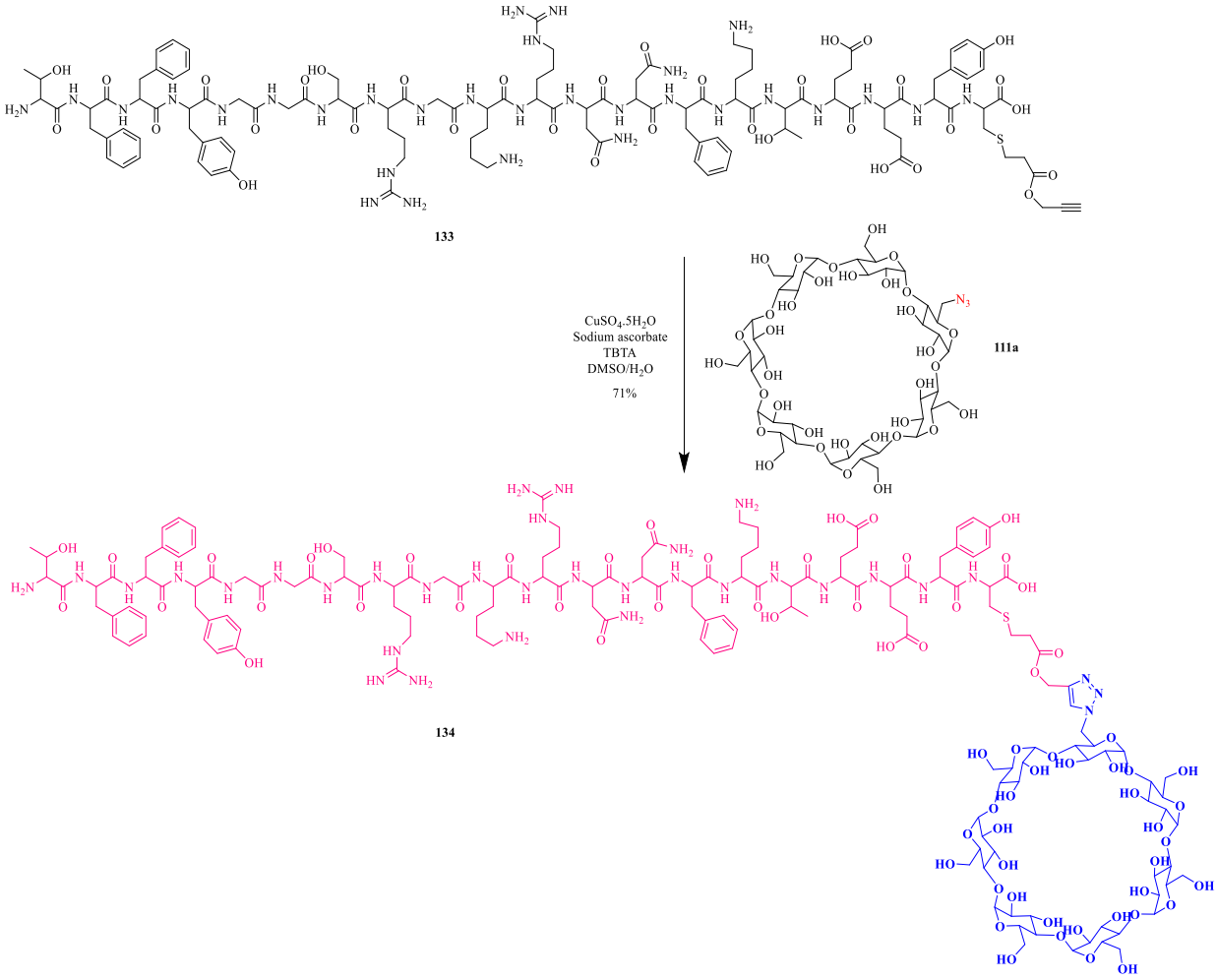


*Schéma 58 : Voie de synthèse de la CD-Angiopep **134***

Une analyse par spectrométrie de masse MS-MALDI a confirmé la structure du produit β-CD-angiopeptine **134** avec deux pics caractéristiques à *m/z* = 3673,415 pour l'adduit $[M+H]^+$, et *m/z* = 3695,359 pour l'adduit $[M+Na]^+$.

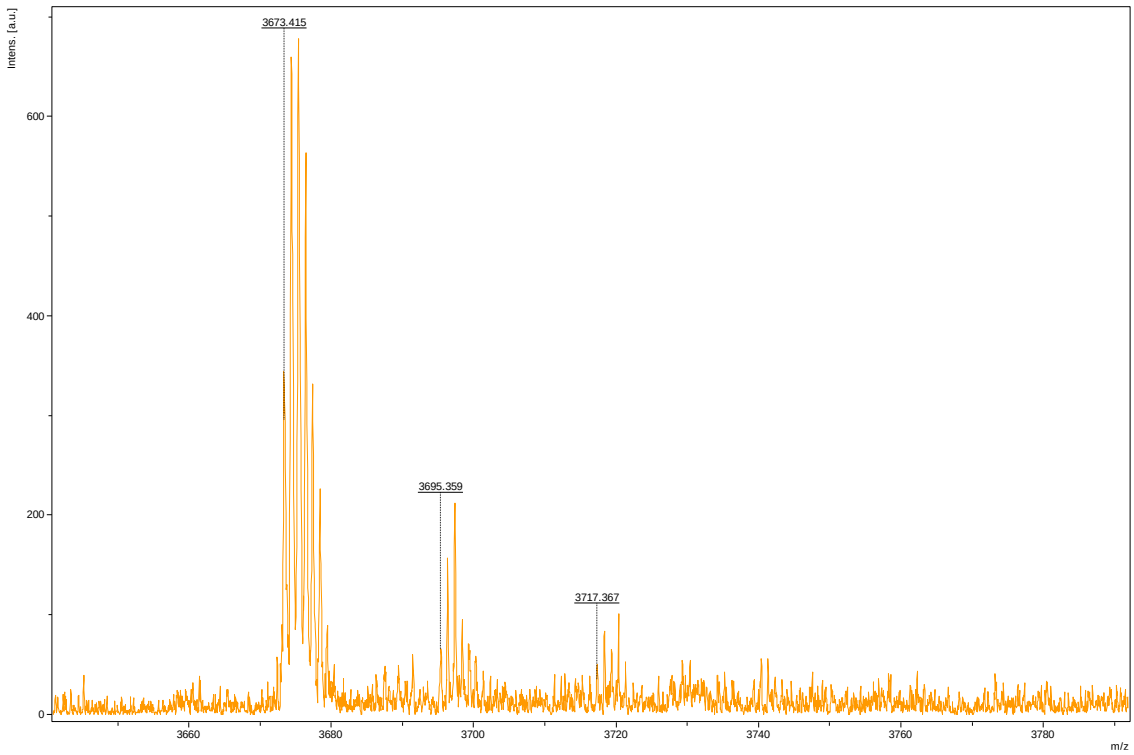


*Figure 59: Spectre MS-MALDI du composé **134***

XI.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté la synthèse de différentes cyclodextrines fonctionnalisées soit par un agent de contraste pour l'IRM la CD-Gd-DOTA **121**, et les cyclodextrines fonctionnalisées par 7 ligands iminodiacétates **130**,**131**,**132,** soit fonctionnalisée par l'angiopep la CD-Angiopep **134**. La fonctionnalisation de la cyclodextrine par la chimie « click » a été rapide, simple à effectuer et offre de bons rendements, malgré les difficultés de purification.

Ainsi, avec les différentes « briques moléculaires » en main, nous nous sommes intéressées à la préparation des différents complexes d'inclusion et leurs caractérisations.

Partie 2 : Préparation des Complexes d'Inclusion et leurs Caractérisations

La capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusion permet d'améliorer la solubilité des composés ainsi que leur stabilité. Différents complexes d'inclusion ont, tout d'abord, été préparés avec la β-cyclodextrine native, comme modèle pour obtenir une meilleure solubilité dans l'eau des molécules invitées.

I. Techniques de préparation du complexe d'inclusion CD/invité

Il existe différentes méthodes pour préparer des complexes d'inclusion. La préparation peut s'effectuer soit en milieu liquide ou solide. Le but est de dissoudre la CD en présence de la molécule invitée et laisser un équilibre s'établir. Une fois l'équilibre obtenu, le complexe est récupéré sous forme solide. Quelques méthodes sont présentées dans le paragraphe suivant.

I.1 Inclusion par cristallisation de la solution (co-précipitation)

La méthode de co-précipitation est la méthode la plus largement utilisée en laboratoire. Cette méthode consiste à agiter à une température comprise entre 40°C et 60°C une solution aqueuse de CD à laquelle l'invité (dissout dans l'eau, l'acétone, l'éthanol, le méthanol ou l'acétonitrile) est ajouté. Ensuite, le mélange est refroidi pour permettre la co-précipitation du complexe formé. Le précipité est collecté par décantation, centrifugation ou filtration, puis lavé dans le but d'éliminer l'excès de la molécule invitée non encapsulée.[242]

Le précipité peut parfois être lavé avec une petite quantité d'eau ou un autre solvant miscible à l'eau tel que le méthanol, l'éthanol ou l'acétone.[243] Cependant, l'utilisation de solvants organiques en tant que précipitants peut interférer et inhiber la complexation.

I.2 Inclusion par mélange à sec (dry mixing)

Lors du mélange à sec, l'invité est ajouté à la CD et leur simple contact provoque la complexation. En 2007, Parlati *et al.*[244] ont préparé des complexes solides de colorants avec un procédé de mélange à sec modifié en broyant les réactifs dans un rapport molaire de 2 : 1 pendant 3 jours. Ensuite, le complexe a été analysé par thermo-gravimétrie (TGA) et par température différentielle (DTA).[245]

Cette méthode est plus particulièrement adaptée pour des huiles ou des molécules invitées sous forme liquide. Le principal avantage est qu'il n'est pas nécessaire d'ajouter d'eau,

sauf si une étape de lavage est requise. Par contre, il existe un risque de formation d'agglomérat lors de la montée en échelle conduisant à une complexation incomplète et le besoin d'une durée de mélange prolongée.

I.3 Inclusion par pétrissage (paste/kneading)

Le complexe d'inclusion de la molécule invitée avec la CD est préparé en mouillant le mélange hôte-invité dans un mortier avec un volume minimum d'eau. Le mélange est ensuite malaxé soigneusement avec un mortier-pilon pour obtenir une pâte qui est ensuite séchée sous vide à température ambiante et analysée.

I.4 Inclusion par scellage (sealing)

Les complexes solides invité-cyclodextrine peuvent être formés en broyant une quantité déterminée de chaque ingrédient dans un tube scellé qui est alors chauffé à une température de 60 à 90°C.

I.5 Inclusion par évaporation de solvant

Cette méthode nécessite l'utilisation de solvant organique et donc, après formation du complexe, leur évaporation. En 2014, Jantarat *et al*.[105] ont préparé un complexe d'inclusion par évaporation de solvant en utilisant de la curcumine et de la HP-β-CD (Hydroxypropyl-β-cyclodextrine) pour un rapport molaire de 1 : 1.

La curcumine est ajoutée doucement à une solution de cyclodextrine dans l'éthanol jusqu'à obtention d'une solution limpide. Après 24 heures d'évaporation lente à température ambiante sous hotte (25°C), la poudre de complexe d'inclusion résultante est alors conservée dans un dessiccateur à 25°C pour analyse.

II. Caractérisation des complexes d'inclusion

La formation d'un complexe d'inclusion entre une CD et une molécule invitée peut être vérifiée à l'aide de différentes méthodes d'analyse. On trouve dans la littérature des exemples de caractérisations par fluorimétrie, diffraction de rayons X, spectroscopie UV-visible, spectroscopie InfraRouge (IR), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), Analyse Calorimétrique Différentielle (ACD ou DSC), ThermoGravimétrie (TG), le dichroïsme ou bien l'ITC. Ces techniques ont des approches qualitatives, c'est-à-dire qu'ils permettent de mettre en évidence l'inclusion, ou bien quantitatives en déterminant la constante d'association Ka et la stœchiométrie du complexe formé. Ces méthodes sont décrites succintement ci-dessous en illustrant leurs utilisations avec des exemples de molécules fluorescentes dérivées de coumarine, notre modèle.

II.1 La Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une méthode importante utilisée pour analyser la structure des composés. Le principe de l'étude des complexes d'inclusion repose sur le fait qu'une molécule invitée présente dans la cavité de la cyclodextrine interagit avec les atomes d'hydrogène situés à l'intérieur de la cavité (H-3 et H-5) perturbant le signal, la surface externe (H-2, H-4 et H-6) n'est, dans ce cas, pas influencée.[68,246,247]

Cette variation de la fréquence de résonance des protons met en évidence la formation d'un complexe mais permet également d'en proposer la géométrie. Les signaux des déplacements chimiques des protons de la CD sont généralement décalés vers les champs forts. Deux techniques complémentaires 2D peuvent être utilisés, les séquences ROESY et NOESY, toutes deux permettant d'identifier soit des protons qui sont proches entre eux dans l'espace (entre 2 à 5 Å), soit un échange chimique.[248] Ces interactions internucléaires résultent du phénomène de relaxation dipolaire lié aux mouvements moléculaires. Les pics de corrélation (hors diagonale) provenant de l'effet ROE sont alors de signes opposés aux pics de la diagonale et de même signe pour un échange chimique. Par conséquent, cette expérience permet de distinguer les contributions dipolaires des contributions d'échange.

En 2016, Zhao *et al.*[249] ont étudié la complexation de la daidzine avec la β-cyclodextrine dans D_2O par spectroscopie RMN. Un complexe 1 : 1 a été formé avec la partie flavonoïde de la daidzine entrant dans la cavité de la CD.

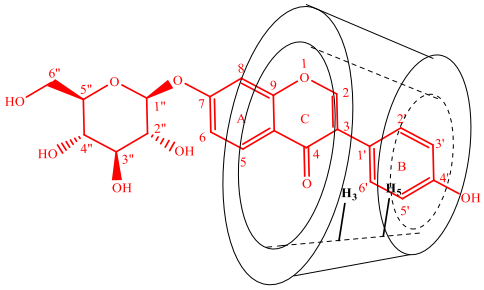
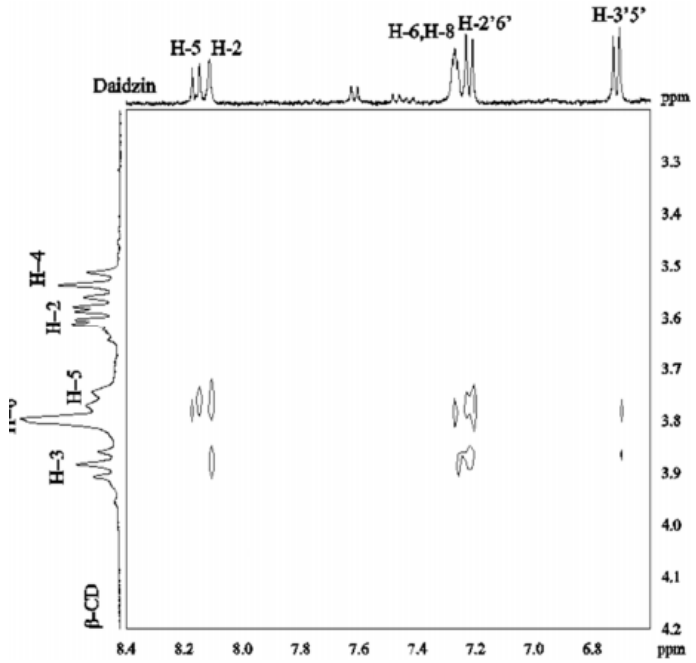


Figure 60 : Structure du complexe d'inclusion de la daidzine avec la β-CD

Les inclusions de la daidzine dans la cavité de la β-CD a été mise en évidence par les changements de déplacement chimique observés sur les spectres RMN ^1H. Les signaux H-3 et H-5 de la β-CD positionnés à l'intérieur de la cavité ainsi que le signal H-6 situé à l'extérieur de la cavité ont montré des déplacements vers les champs forts. Le blindage des signaux des protons H-5, H-3 et H-6 de la β-CD et des protons H-2, H-2', H-6'de la daidzine indique la formation du complexe d'inclusion.

Ensuite, l'analyse ROESY 2D a été réalisée dans une solution de D_2O contenant des quantités équimolaires de β-CD / daidzine (C = 2 mM). Le spectre du complexe daidzine / β-CD (Spectre 2) montre des corrélations moyennes de ROE entre les protons H-2, H-2', H-6' de la daidzine et H-5 de la β-CD. De faibles ROEs sont apparus entre H-5, H-3', H-5' de la daidzine et H-5 de la β-CD, entre H-2, H-8 et H-2', H-6' de la daidzine et H-3 de la β-CD. Ces interactions indiquent que les parties A, B et C de la daidzine sont inclues profondément dans la cavité de la β-CD.



Spectre 2 : Spectre ROESY 2D de la daidzine / β-CD (1 : 1) dans D_2O à 30°C

La stœchiométrie du complexe avec la β-CD a été déterminée en utilisant la méthode de variation continue (méthode de Job). La molécule invitée et hôte ont été réparties entre neuf tubes RMN, en faisant varier le rapport molaire de 1 : 9 à 9 : 1 à une concentration totale constante de 2 mM. Les déplacements de H-5 de la β-CD induits par l'inclusion sont illustrés sur le graphique de Job de la Figure 61 où le sommet à 0,5 indique la formation d'un complexe 1 : 1 entre la β-CD et la daidzine.

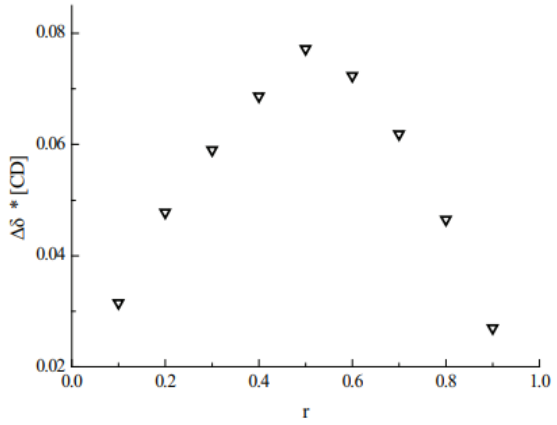


Figure 61 : Tracé de Job Plot : le complexe de la daidzine avec la β-CD ; "r" est la fraction molaire de β-CD dans le mélange invité / β-CD

II.2 Spectroscopie Infrarouge (IR)

L'infrarouge est une technique qualitative utilisée pour caractériser les complexes d'inclusion. Selon les résultats, la bande OH caractéristique des cyclodextrines est influencée par la formation du complexe et les bandes de la partie incluse de la molécule invitée sont généralement déplacées ou leur intensité diminuée suite à la modification de l'environnement de l'invité.

Sur ces bases, Pralhad et Rajendrakumar[250] ont étudié la formation d'un complexe d'inclusion entre la quercétine (QURC), la 2-hydroxypropylcyclodextrine (HP-β-CD) et la β-cyclodextrine à l'état solide et en solution (lyophilisation). Les constantes de stabilité et les stœchiométries du complexe ont été déterminées par la méthode de solubilité de phase.[251] Cette méthode permet d'apporter des informations sur la constante d'association, sur l'augmentation de la solubilité des invités et l'efficacité de complexation ou de solubilisation des CDs. Ainsi les constantes d'association ont été déterminées à Ka = 402 M^{-1} pour le complexe QURC-β-CD 1 : 1, et Ka = 532 M^{-1} pour le complexe QURC-HP-β-CD 1 : 1. La formation des complexes d'inclusion a été confirmée par spectroscopie infrarouge.

II.3 Spectrophotométrie UV-Visible

La spectroscopie d'absorption UV/visible permet d'accéder à la constante d'équilibre d'association des complexes qui absorbent dans le domaine UV/visible. La CD ne disposant pas de chromophore, cette méthode ne s'applique qu'aux invités possédant un chromophore.

La formation d'un complexe produit souvent des modifications du spectre d'absorption de la molécule invitée en fonction de la concentration en cyclodextrine. Ces modifications se manifestent sous la forme d'un déplacement et/ou d'un élargissement de bande. L'ajout d'une quantité connue d'invité à la solution contenant la CD provoque une perturbation de l'équilibre présent et par conséquence une différence spectrale de l'absorption. Cette différence spectrale étant dépendante des concentrations totales de chaque molécule, mais également des affinités relatives des complexes, elle permet d'évaluer la stabilité du composé d'inclusion CD/invité.

Barman *et al.*[252] ont effectué un titrage spectrophotométrique pour déterminer le comportement d'encapsulation du Métoclopramide (MP) avec des CDs en solution aqueuse. L'intensité d'absorption du MP augmente progressivement avec l'addition de cyclodextrine (Figure 63) due à la protection des groupes chromophores de MP dans la cavité de la CD.[253]

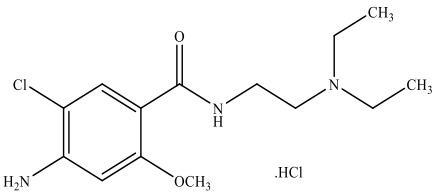


Figure 62 : Structure du Métoclopramide

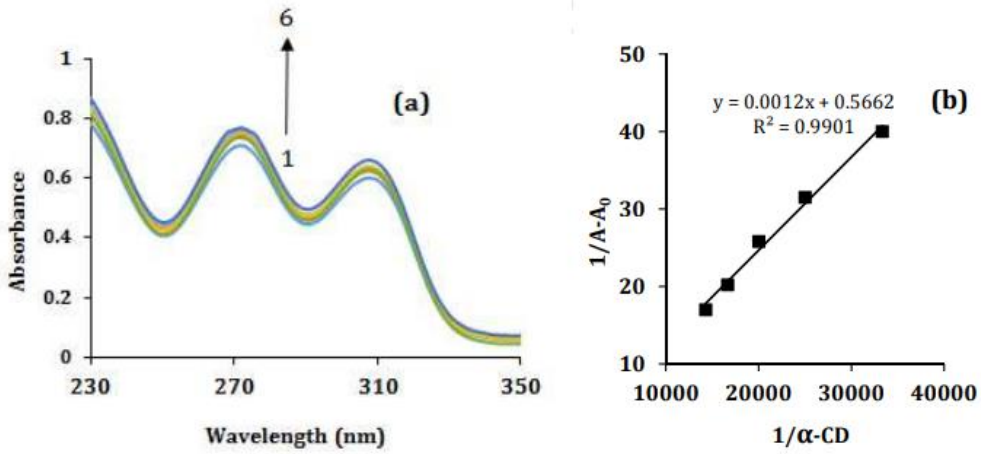


Figure 63 : (a) Spectre d'absorption du MP (50 µM) à différentes concentrations de α-CD (µM) : 1) sans α-CD ; 2) 30 µM ; 3) 40 µM ; 4) 50 µM ; 5) 60 µM ; 6) 70 µM. b) Tracé de Benesi - Hildebrand de 1 / A-A0 vs. 1 / [α-CD] pour la complexation 1 : 1 de MP avec α-CD

Dans ce cas, la constante d'association du complexe MP : CD est déterminée en analysant les modifications de l'absorbance de MP avec l'augmentation de la concentration en CD. La constante d'association Ka et la stœchiométrie du complexe d'inclusion peut être déterminée par l'équation de Benesi-Hildebrand[254] :

$$\frac{1}{A - A_0} = \frac{1}{\Delta\varepsilon[MP]K_a}.\frac{1}{[CD]} + \frac{1}{\Delta\varepsilon[MP]}$$

- [CD] et [MP] désignent respectivement la concentration totale de la cyclodextrine et du métoclopramide
- Δϵ est la variation du coefficient d'extinction molaire du chromophore MP lorsque les molécules de MP passent de l'environnement aqueux polaire à la cavité apolaire de l'α-CD
- A-A_0 indique les changements d'absorption du MP sur l'ajout de CD.

Les valeurs de Ka pour le complexe ont été évaluées en divisant l'ordonnée à l'origine par la pente de la droite du double tracé réciproque (Figure 63b). Le changement d'absorbance ($A-A_0$) a été mesuré en fonction de la concentration de l'α-CD pour déterminer la constante d'association (Ka = 472 M^{-1}). La bonne linéarité démontre la formation d'un complexe stœchiométrique 1 : 1 entre MP et CD.

II.4 Fluorescence

Les techniques spectroscopiques consistent à suivre l'intensité de fluorescence de la molécule complexée. Le passage d'une molécule de la phase aqueuse vers la cavité de la cyclodextrine modifie la polarité de son microenvironnement. Cette modification provoque alors une augmentation ou une atténuation de son intensité. Cela permet de suivre l'avancement de la complexation et de déterminer la constante de stabilité du complexe. La constante de stabilité est également déterminée par la méthode de Benesi - Hildebrand.[254] La concentration de la molécule organique hydrophobe est généralement maintenue constante, alors que celle de la concentration de la molécule invitée varie.

Cette approche permet de déterminer graphiquement la constante d'association Ka à condition que l'espèce non observée soit en large excès (d'au moins un facteur 10) par rapport à l'espèce observée. La relation correspond à l'équation d'une droite de type y = a x + b, où a représente la pente. Par extrapolation à l'origine, on peut déterminer la valeur permettant le calcul de Ka.

Des études de complexation ont été effectuées par Wagner et *al*.[255] entre la coumarine 7MC et différentes β- et γ-CD modifiées en solution aqueuse. Une réduction de l'intensité de fluorescence de la coumarine a été observée.

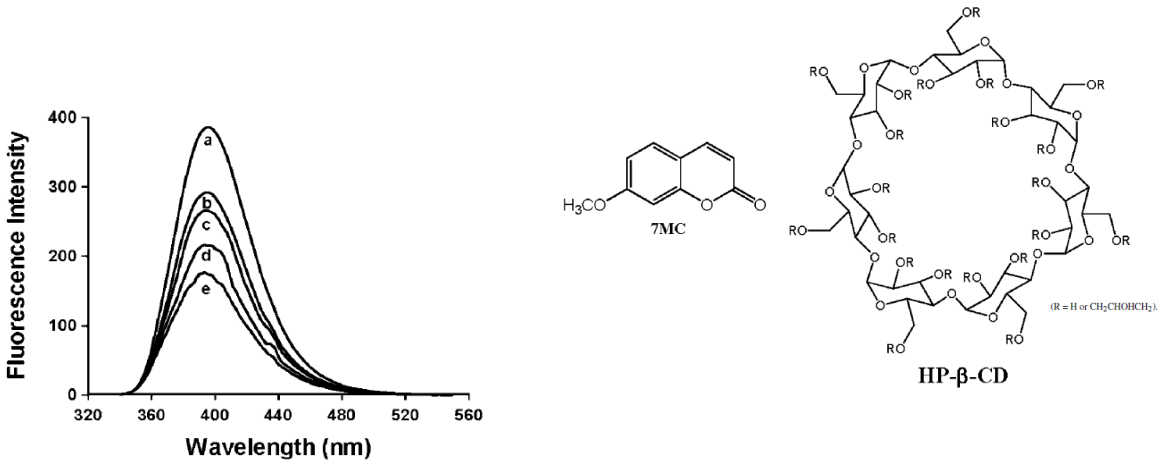


Figure 64 : Spectre de fluorescence de la 7-méthoxycoumarine à différentes concentrations d'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (a) 0 M ; (b) 4,8 mM ; (c) 9,7 mM ; (d) 24 mM ; e) 48 mM

Une mesure quantitative de la suppression de la fluorescence F / Fo de la fluorescence totale en présence et en absence de la CD fournit la constante d'association Ka pour le processus d'inclusion. Les valeurs de constante d'association pour les différentes sont les suivantes :

Tableau 10 : Valeurs des constantes d'association des différents complexes d'inclusion entre le 7MC et les différentes CDs

Cyclodextrines	Ka (M^{-1})
***β*-CD**	128 ± 32
HP-*β*-CD	120 ± 20
***γ*-CD**	41 ± 8
HP-*γ*-CD	42 ± 6

II.5 Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique d'analyse couramment utilisée pour étudier l'effet de l'environnement sur la structure d'une molécule (pH, dénaturation par les détergents, température, effet de ligand, interactions moléculaires).

En présence de cyclodextrines, les composés achiraux peuvent présenter un signal dichroïque induit dû à l'interaction asymétrique au sein de la cavité. Le dichroïsme circulaire est essentiellement un phénomène d'absorption, mais il permet d'apporter des informations supplémentaires concernant le transfert de chiralité et les changements conformationnels se produisant pendant la complexation.[256]

En 2017, une étude de dichroïsme circulaire a été réalisée au sein de notre équipe avec un agent de contraste nommé **3(Gd)**. Nous avons observé une bande de transition négative dans la gamme de longueurs d'onde de 200–230 nm (Figure 65) démontrant une inclusion intramoléculaire orthogonale vers l'axe de la cavité de la cyclodextrine. L'addition d'un équivalent d'acide adamantanecarboxylique **5** dans le milieu a conduit à une modification du signal qui devient positif (Figure 65, courbe rouge). Ce changement a révélé une variation de l'environnement de la cavité. En raison de son affinité plus élevée pour la cavité hydrophobe de la cyclodextrine, le dérivé d'adamantane **5** perturbe l'équilibre initial et force la formation d'une inclusion intermoléculaire. La bande positive indique que l'acide carboxylique **5** est parallèle à l'axe de la cyclodextrine **3(Gd)**.[63]

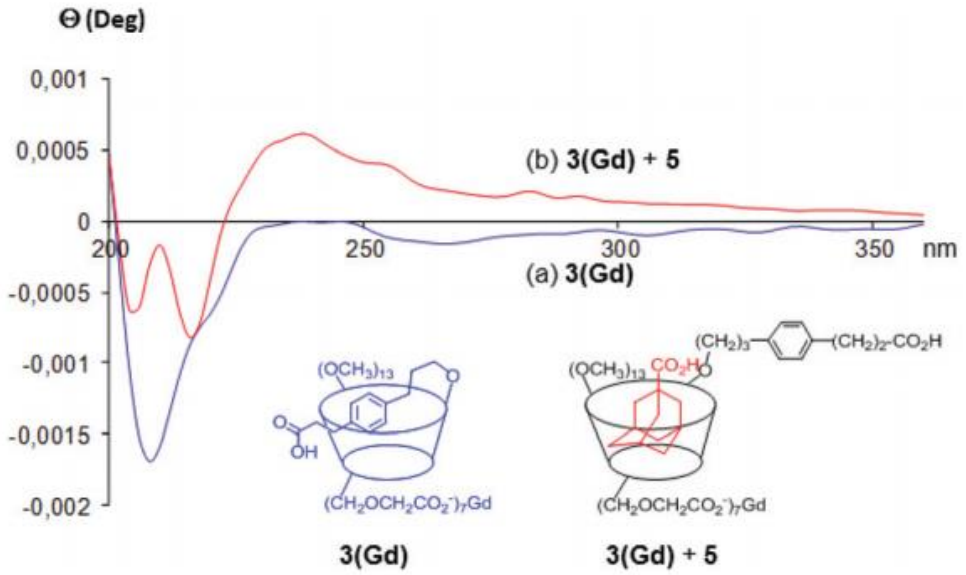


*Figure 65 : Mesure du dichroïsme circulaire de l'AC **3(Gd)** en l'absence (courbe a) et en présence de 1 eq. d'adamantane acide **5** (courbe b), dans l'eau à 25 °C et C = 0,2 mM*

II.6 ITC (Titrage isotherme calorimétrique)

Le titrage isotherme calorimétrique (ITC) repose sur la mesure des variations de chaleur lorsqu'une molécule hôte et un invité sont mélangés. Cette mesure permet de déduire les paramètres thermodynamiques principaux de l'assemblage étudié. Nous présenterons la technique dans le cadre d'un système A+B classique.

L'appareil se compose de deux cellules isolées (référence et échantillon) au sein d'une boîte calorifugée (Figure 66). La première cellule est remplie d'une solution à une concentration

donnée de l'hôte (la macromolécule) et l'autre cellule servant de référence est remplie de solvant. La température et la pression des deux cellules sont maintenues constantes par l'appareil.

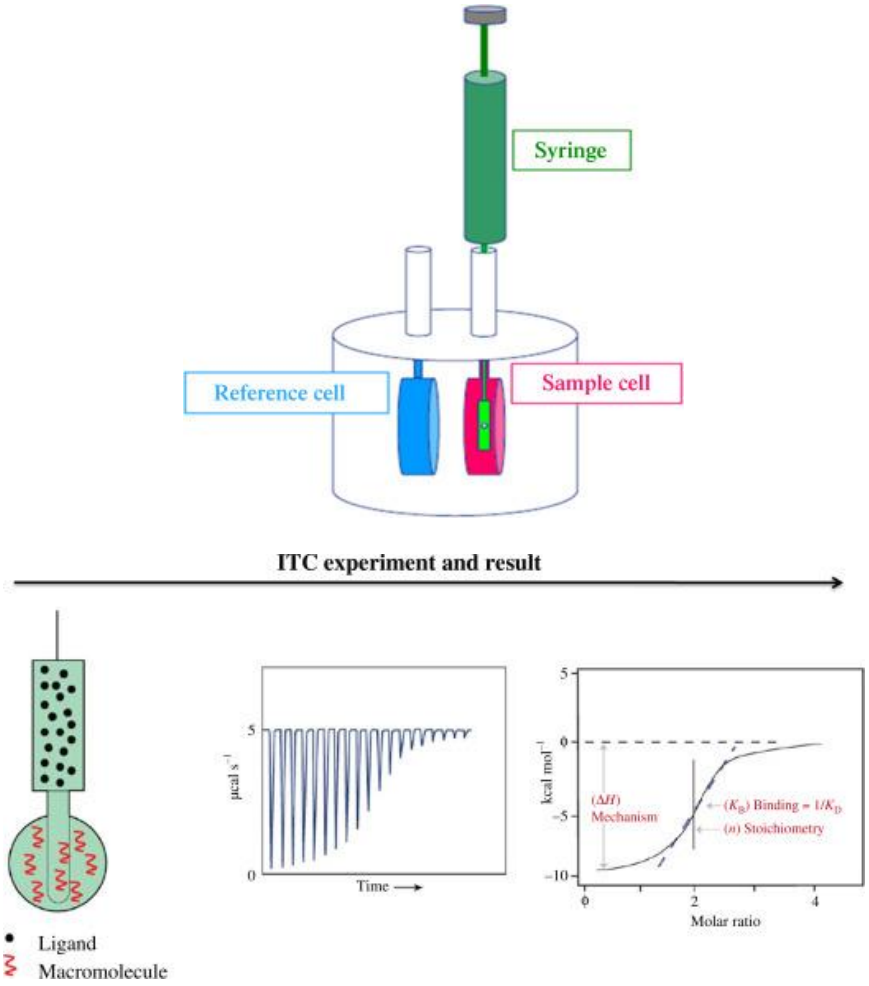


Figure 66 : Schéma d'une expérience d'ITC et variation de la chaleur en fonction du temps[257]

Une micro-seringue située au-dessus de la cellule contenant l'hôte permet l'injection d'un volume V (quelques microlitres) d'une solution concentrée d'invité. Chaque injection va induire la formation du complexe d'inclusion au sein de la chambre, et donc une variation de chaleur au sein de la cellule. En analysant les variations de ce courant au cours du titrage (qu'on relie ensuite à des variations de chaleur), il est possible de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'assemblage.

Par exemple, des mesures d'ITC ont été réalisées par Maity *et al.*[258,259] pour étudier la formation du complexe hôte-invité entre la coumarine 7-DCCAE et différentes CDs. Ces études

ont démontré la formation d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1 avec la β-CD et la γ-CD avec une constante d'association de Ka = 4410 ± 460 M^{-1} et 8350 ± 385 M^{-1} respectivement, et d'un complexe 1 : 2 avec la 2-hydroxypropyl-γ-cyclodextrine avec une constante de Ka = 65 ± 37 M^{-1}.

III. Différents complexes d'inclusion et leurs caractérisations

Dans les parties suivantes, nous aborderons la préparation des différents complexes d'inclusion et leur caractérisation à partir des structures obtenues Figure 67.

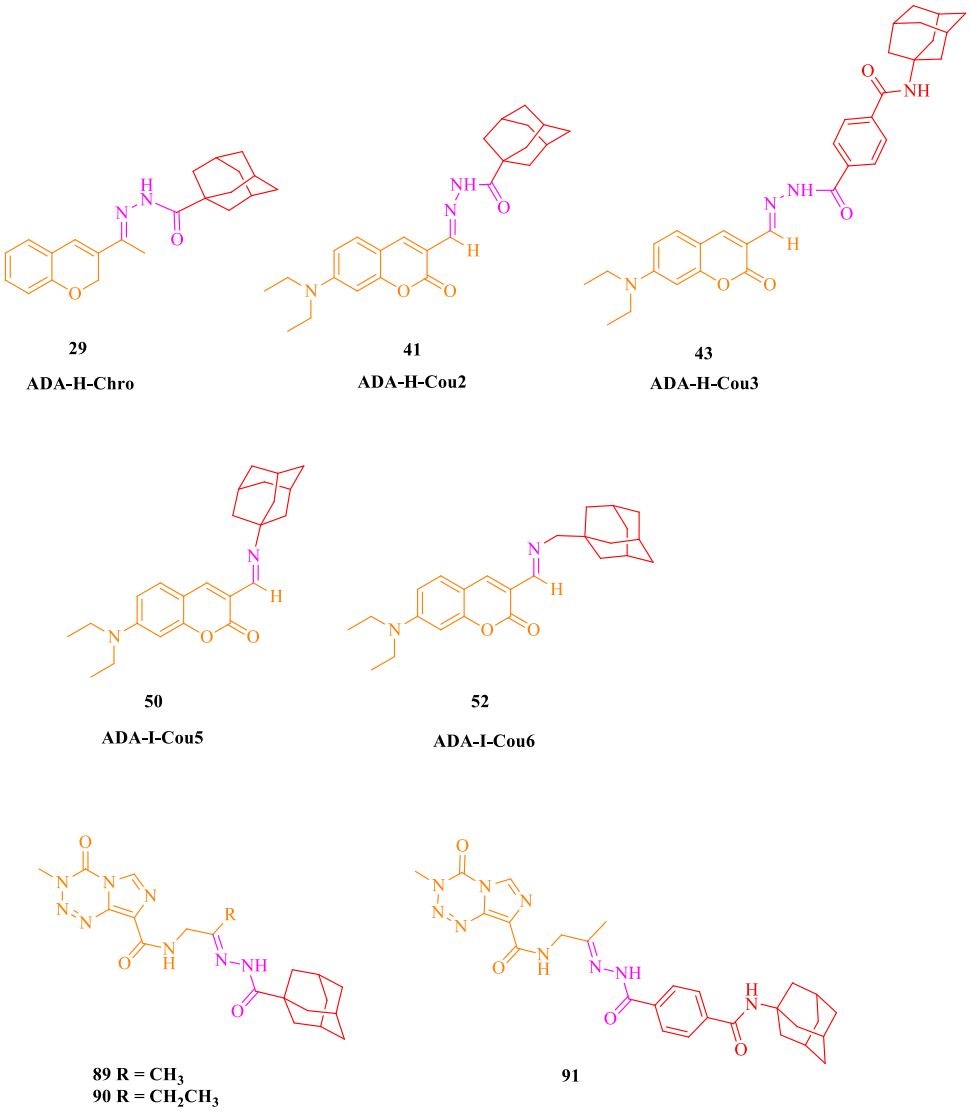


Figure 67 : Structures des molécules invitées pour la préparation des complexes d'inclusion

III.1 Complexe d'inclusion du composé 135

Les études de complexation hôte-invité ont été effectuées selon les conditions décrites par l'équipe de Jaime.[260] Dans la littérature, de nombreux complexes d'inclusion avec l'adamantane ont été préparés en solution aqueuse. Nous avons testé toutes ces méthodes et nos différentes tentatives de formation du complexe d'inclusion du modèle **29**/β-cyclodextrine native ont échoué (sonication, broyage, co-précipitation) du fait de l'insolubilité de l'invité dans l'eau (Schéma 59). Les résultats ont été confirmé par RMN NOESY.

Pour obtenir le complexe d'inclusion, d'autres conditions de préparation ont été envisagées (Tableau 11). Différents mélanges de solvant ont été utilisés en faisant varier la proportion de la molécule invitée de 1 à 12 équivalents, les températures (ambiante, 37°C, 40°C, 50°C) et les temps de complexation.

*Tableau 11 : Différents tests de complexation du composé **29** en solution à différentes températures (ambiante, 37°C, 40°C, 50°C)*

CD /29	**EtOH /H_2O**	**MeOH/H_2O**	**ACN/H_2O**	**DMSO/H_2O**	**DMSO/H_2O**
% Eau	50%	50%	50%	50%	25%
Temps	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h
1/1	Pas de complexe	Pas de complexe	Pas de complexe	Pas de complexe	Pas de complexe
1/12	Pas de complexe	Pas de complexe	Pas de complexe	Pas de complexe	Complexe d'inclusion

Après plusieurs essais, le complexe d'inclusion s'est formé dans un mélange H_2O-DMSO (75%-25%) par chauffage à 40°C pour aider à la solubilisation de l'invité **29** pendant 48 heures. D'après l'analyse du spectre NOESY, la complexation n'a pas lieu après 24 heures d'agitation, 48 heures sont nécessaires pour obtenir le complexe d'inclusion désiré. Ensuite, une dialyse de 24 heures élimine le DMSO présent. Enfin, une lyophilisation de la phase aqueuse, nous a permis d'obtenir le complexe **135** sous la forme d'un solide blanc, stable, soluble dans l'eau preuve physique de la formation du complexe.

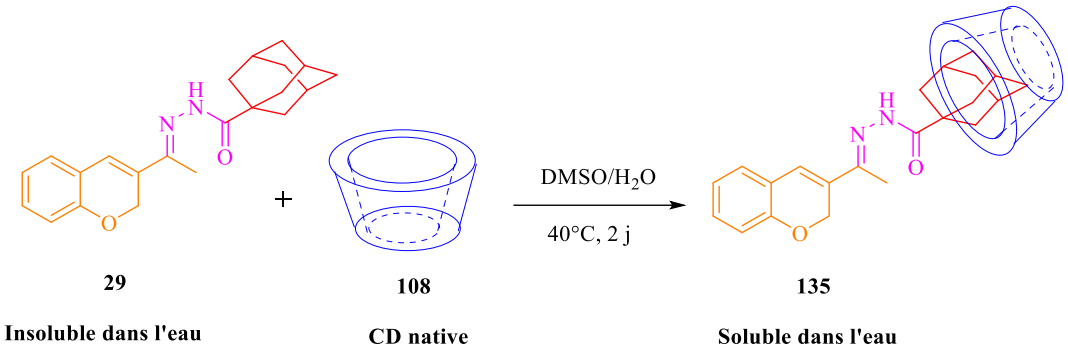
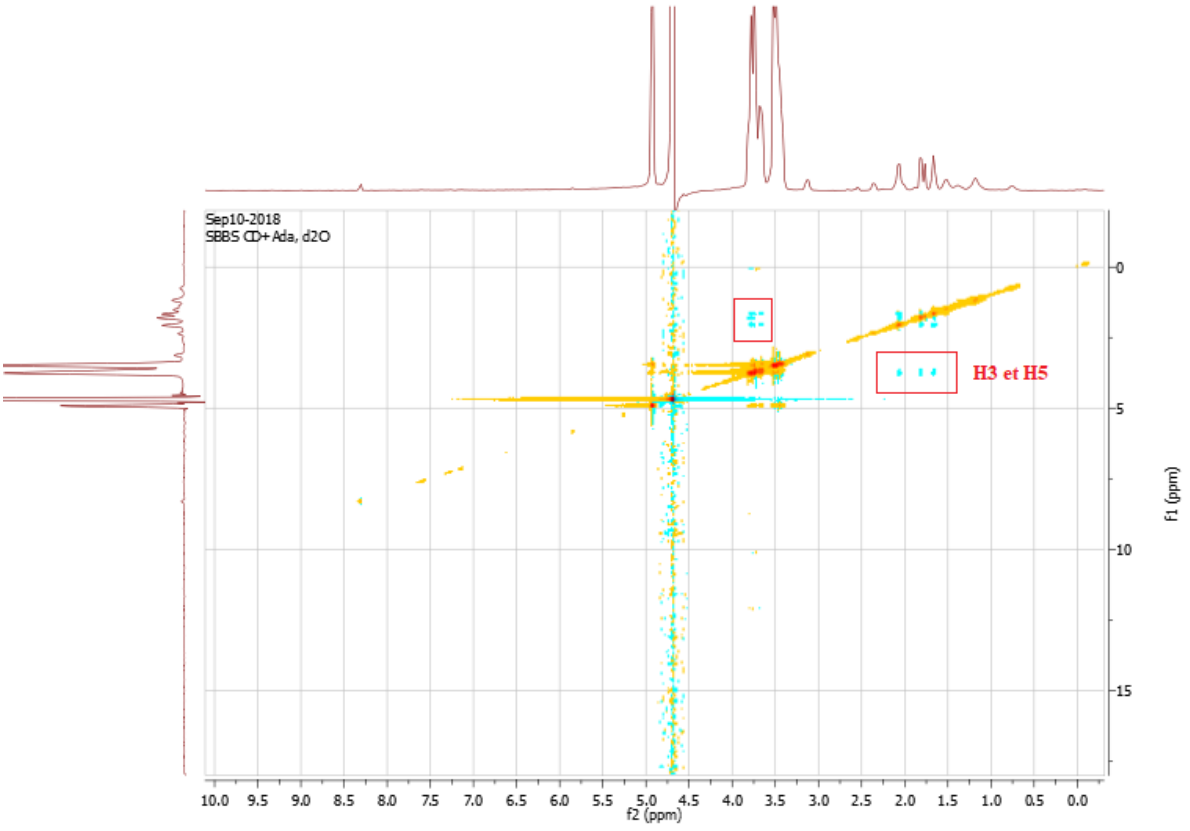


*Schéma 59 : Complexe d'inclusion du composé ADA-H-Chro **29***

Le spectre ^{1}H RMN à 300 MHz du complexe **135** ne montre aucune différence appréciable des déplacements chimiques des signaux correspondant aux protons de l'adamantane, ni ceux des protons H-3 et H-5 de la cyclodextrine, par comparaison avec les spectres des produits seuls.



*Spectre 3 : NOESY Complexe d'inclusion **135** dans le D_2O*

Les analyses NOESY indiquent cependant l'existence d'un complexe d'inclusion. En effet, nous avons pu observer des interactions entre les H-3 et H-5 de la β-cyclodextrine et les pics de l'adamantane démontrant la formation du complexe (Spectre 3).

III.2 Complexe d'inclusion 136

III.2.1 Préparation du complexe d'inclusion 136

Après de nombreux essais, la formation du complexe d'inclusion de la coumarine insoluble dans l'eau **41** a été possible dans un mélange ACN/H_2O et THF/H_2O (Tableau 12). Dans un mélange ACN/H_2O la coumarine **41** se complexe par la partie diamine tandis que dans un mélange THF/H_2O la partie adamantane est incluse (Schéma 60). Ces résultats ont été confirmés par une séquence NOESY et sont présentés dans le Tableau 12. En 2017, l'équipe de Seth a publié une étude sur la complexation en présence d'urée de la coumarine 7-DCCAE (7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylic acid *N*-succinimidyl ester) par la β-cyclodextrine au niveau de la partie diamine.[258,259] Compte tenu de ces observations, une compétition entre l'adamantane et la partie diamine de la coumarine est donc possible.

*Tableau 12 : Différents tests de complexation de la coumarine **41**, ratio CD/**41**, 1/1*

Mélange de solvant	**ACN/H_2O**	**MeOH/H_2O**	**DMSO/H_2O**	**DMSO/H_2O**	**THF/H_2O**
Température	50°C	50°C	50°C	50°C	50°C
Temps	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
%Eau	50%	50%	50%	30%	50%
Résultat	Complexe au niveau de la diamine	Pas de complexe	Pas de complexe	Pas de complexe	Complexe avec l'adamantane

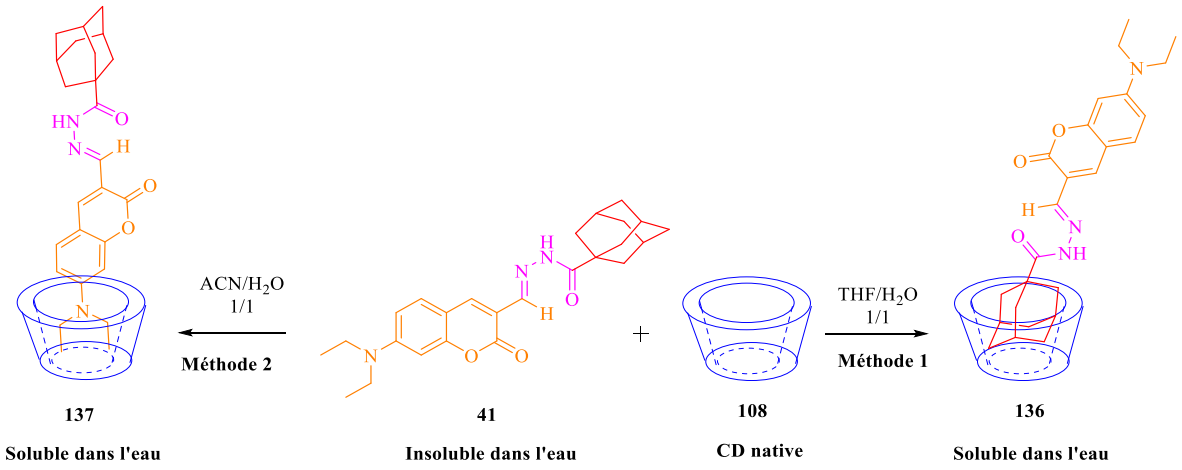


*Schéma 60 : Complexes d'inclusion de la coumarine **41** avec la CD native **108***

La méthode de préparation de ce complexe fut donc la suivante (Schéma 61). La quantité requise de cyclodextrine est dissoute dans le volume d'eau adéquat. Ensuite, une solution de l'invité dissout dans le solvant organique est ajoutée goutte à goutte sous sonication pendant environ 15 minutes (Méthode 1). Le mélange est chauffé à 60°C pendant 10 minutes et toute la nuit à 40°C. Le solvant organique est éliminé sous pression réduite et la solution aqueuse a été lyophilisée pour obtenir le complexe d'inclusion. Lorsque le DMSO est utilisé, une étape de dialyse est nécessaire pour l'éliminer avant lyophilisation.

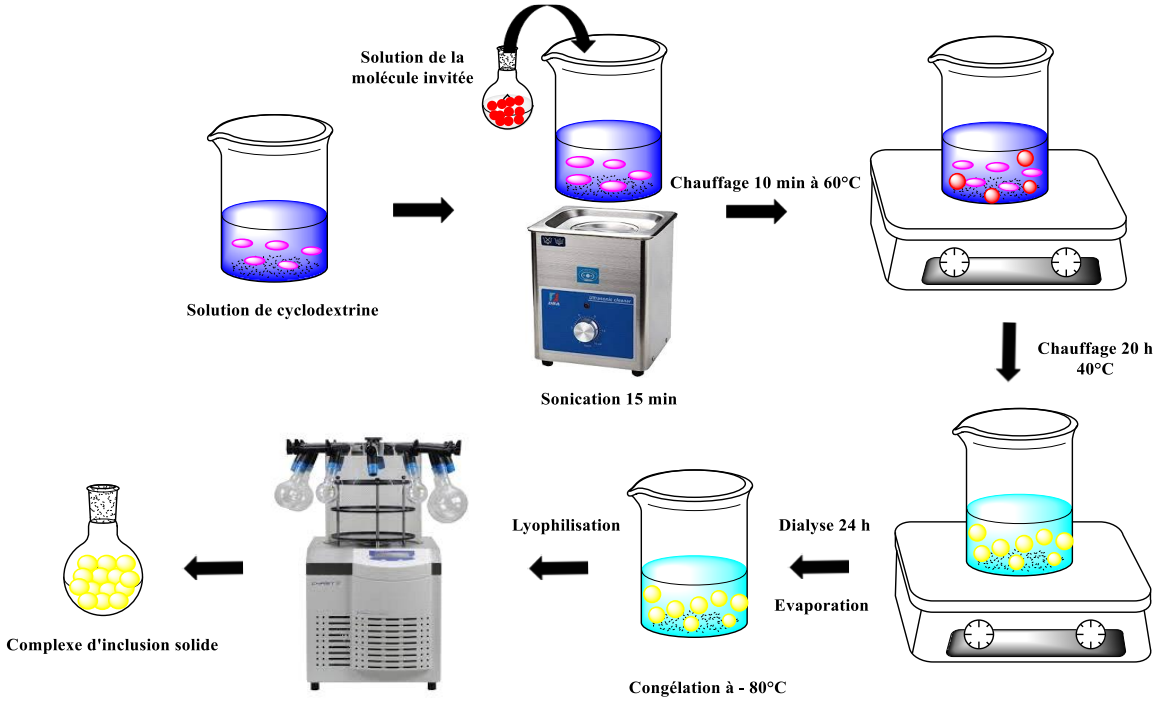


Schéma 61 : Procédure pour la préparation de complexe d'inclusion avec la β-CD native. Méthode 1 : avec sonication, Méthode 2 : sans sonication.

III.2.2 Caractérisation du complexe d'inclusion 136

III.2.2.1 Par la méthode Job Plot

Nous avons choisi de travailler avec la spectroscopie d'absorption UV/visible en utilisant la méthode de Job. Cette méthode nécessite le mélange de solutions de molécule invité et de cyclodextrine à des concentrations molaires totales constantes. Nous avons donc préparé une série de solutions à partir de solutions mères de β-cyclodextrine et de coumarine (chacune de concentration 50 µM) dans un mélange THF/H_2O millQ (1/1) avec des proportions en CD/Invité allant de 10/0, 8/2, 6/4, 5/5, 4/6, 2/8 à 0/10. Les mélanges sont laissés sous agitation (200 tr/min) pendant une nuit, ensuite analysés par spectrophotométrie UV-Visible. Pour chaque solution préparée, un spectre UV-visible est enregistré entre 200 et 600 nm avec un pas de 1 nm.

Tableau 13 : Données pour le Job Plot par spectroscopie UV-Visible

Coumarine (mL)	**β-CD (mL)**	**Coumarine (µM)**	**β-CD (µM)**	**C**	**Absorbance (A)**	**ΔA**	**ΔA*C**
0	3	0	50	0	0,0003	1,9092	0
0,3	2,7	5	45	0,1	0,2288	1,6804	0,1680
0,6	2,4	10	40	0,2	0,3660	1,5432	0,3086
0,9	2,1	15	35	0,3	0,5633	1,3459	0,4037
1,2	1,8	20	30	0,4	0,7904	1,1187	0,4475
1,5	1,5	25	25	0,5	0,9645	0,9447	0,4723
1,8	1,2	30	20	0,6	1,1534	0,7557	0,4534
2,1	0,9	35	15	0,7	1,3763	0,5328	0,3730
2,4	0,6	40	10	0,8	1,5608	0,3483	0,2787
2,7	0,3	45	5	0,9	1,7038	0,2053	0,1848
3	0	50	0	1	1,9092	0	0

C = [coumarine 41 / [coumarine 41] + [β-CD]

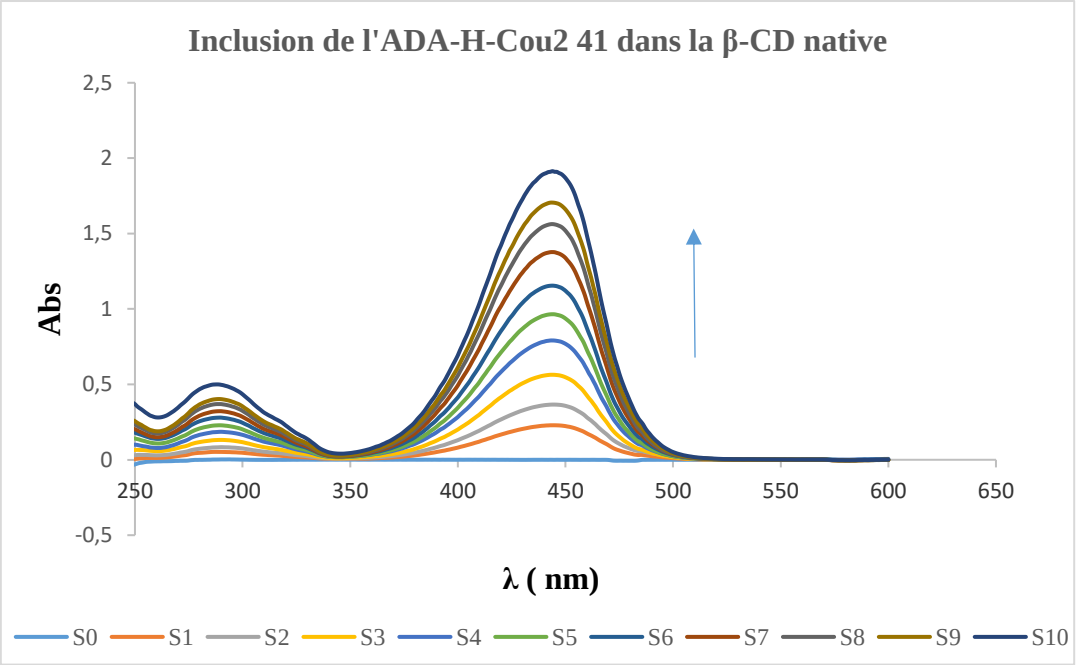


*Figure 68 : Spectre UV d'absorbance de la coumarine **41** en présence de différentes concentrations de β-cyclodextrine native*

En prenant en compte l'évolution de l'absorbance reçue à une longueur d'onde spécifique du complexe formé, il est possible de tracer une courbe de tendance par hyperbole en fonction de la fraction molaire de CD. Cette courbe de tendance possède une intersection au maxima de l'hyperbole caractéristique de la stœchiométrie majoritaire du complexe.

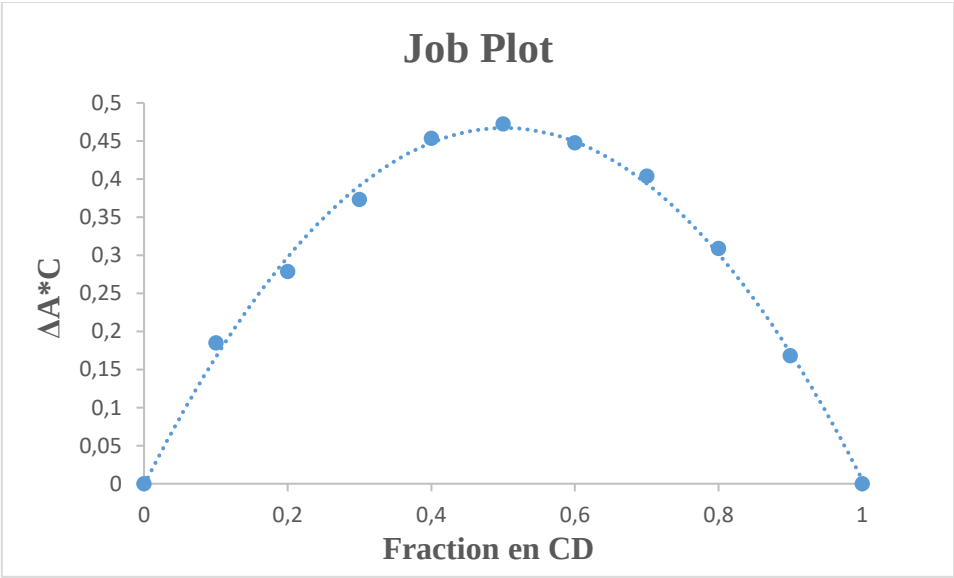


*Figure 69 : Méthode de Job Plot pour le complexe **136***

En traçant la représentation graphique, on obtient une hyperbole centrée sur la valeur de rmax :

$$rmax = \frac{1}{(1 + \mathrm{n})}$$

Ainsi pour nos valeurs, nous avons obtenu un rmax de 1,5, soit un n égal à 1 (Figure 69). Par conséquent, une molécule de cyclodextrine encapsule une molécule de coumarine **41**.

III.2.2.2 Détermination de la constante de stabilité du complexe 136

La stabilité d'un complexe d'inclusion formé entre une cyclodextrine et la molécule invitée est caractérisée par sa constante de stabilité Ka. Cette constante est un paramètre thermodynamique important et largement utilisé. En spectrophotométrie, la constante de stabilité (d'association) des complexes d'inclusion avec la CD peut être déterminée par la méthode développée par Benessi et Hildebrand.[254]

Dans cette méthode, la concentration de l'invité est généralement maintenue constante, alors que celle de la cyclodextrine varie dans une gamme donnée de concentrations. Cette approche permet de déterminer graphiquement Ka. Dans ces conditions, on établit la relation qui correspond à l'équation d'une droite de type y = a x + b, où a représente la pente. Par extrapolation à l'origine, on peut déterminer ainsi la valeur permettant le calcul de Ka.

*Tableau 14 : Données pour la méthode de Benessi-Hildebrand par spectroscopie UV-Visible du complexe **136***

Coumarine (µM)	**β-CD (µM)**	**A0**	**A**	**A-A0**	**1/β-CD (µM)**	**1/A-A0**
1,00E-05	0	0,3713				
1,00E-05	5,00E-06		0,4295	0,0581	200000	17,1947
1,00E-05	1,00E-05		0,4366	0,0653	100000	15,3113
1,00E-05	1,50E-05		0,4422	0,0709	66666	14,1025
1,00E-05	3,00E-05		0,4453	0,0740	33333	13,5095

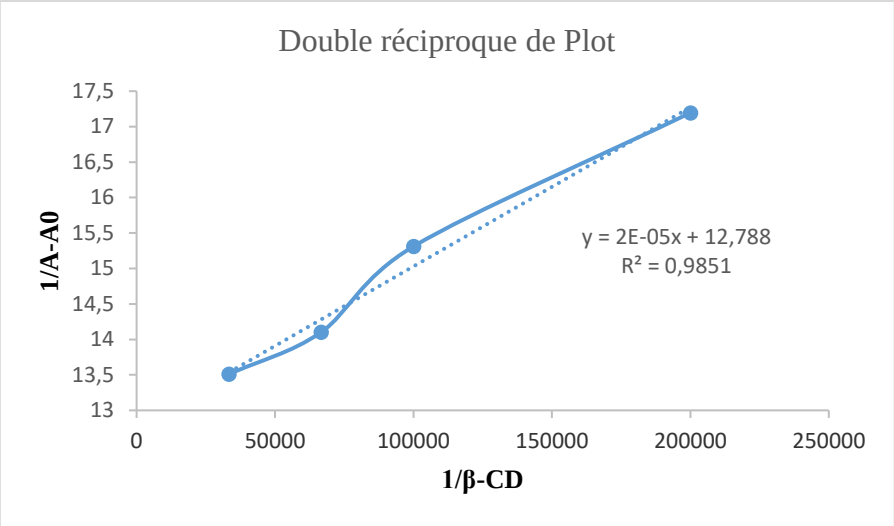


Figure 70 : Benesi-Hildebrand, double réciproque de Plot pour les interactions entre la CD ***108*** *et la coumarine* ***41*** *à 37°C et à 446 nm*

La bonne linéarité de la droite démontre la formation d'un complexe stœchiométrique 1:1 entre la coumarine **41** et la β-CD **108** avec une constante d'association élevée de Ka = 639400 M^{-1} confirmant une bonne stabilité du complexe.

III.1.3 Complexe d'inclusion 138

III.1.3.1 Préparation du complexe d'inclusion 138

Comme précédemment le complexe d'inclusion **138** de la coumarine ADA-H-Cou3 **43** a été réalisé dans un mélange ACN/H_2O (1/1) et MeOH/H_2O (1/1) selon la procédure (Schéma 61, Méthode 2) sans l'étape de sonication pour éviter l'hydrolyse de la fonction hydrazone, à 50°C pendant 24 heures. Après élimination du solvant organique méthanol ou acétonitrile, la fraction aqueuse est lyophilisée pour donner le complexe **138** sous forme d'un solide jaune soluble dans l'eau.

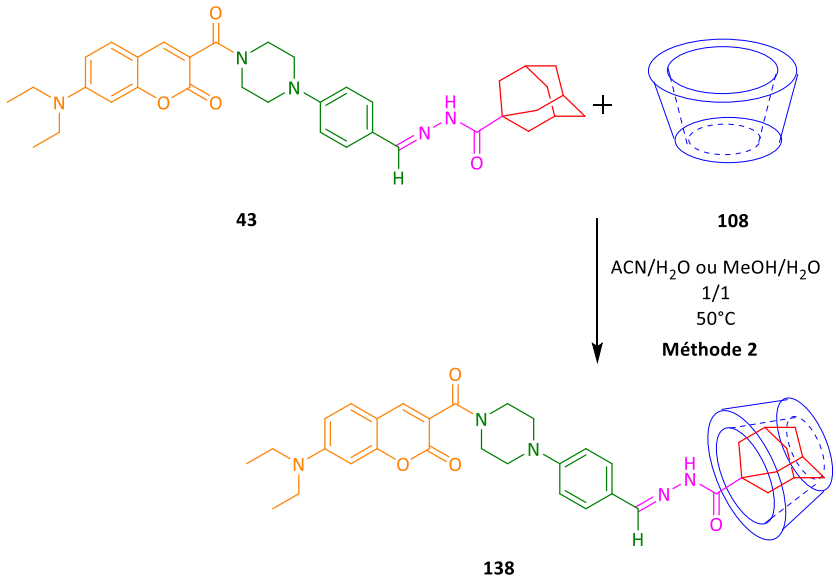
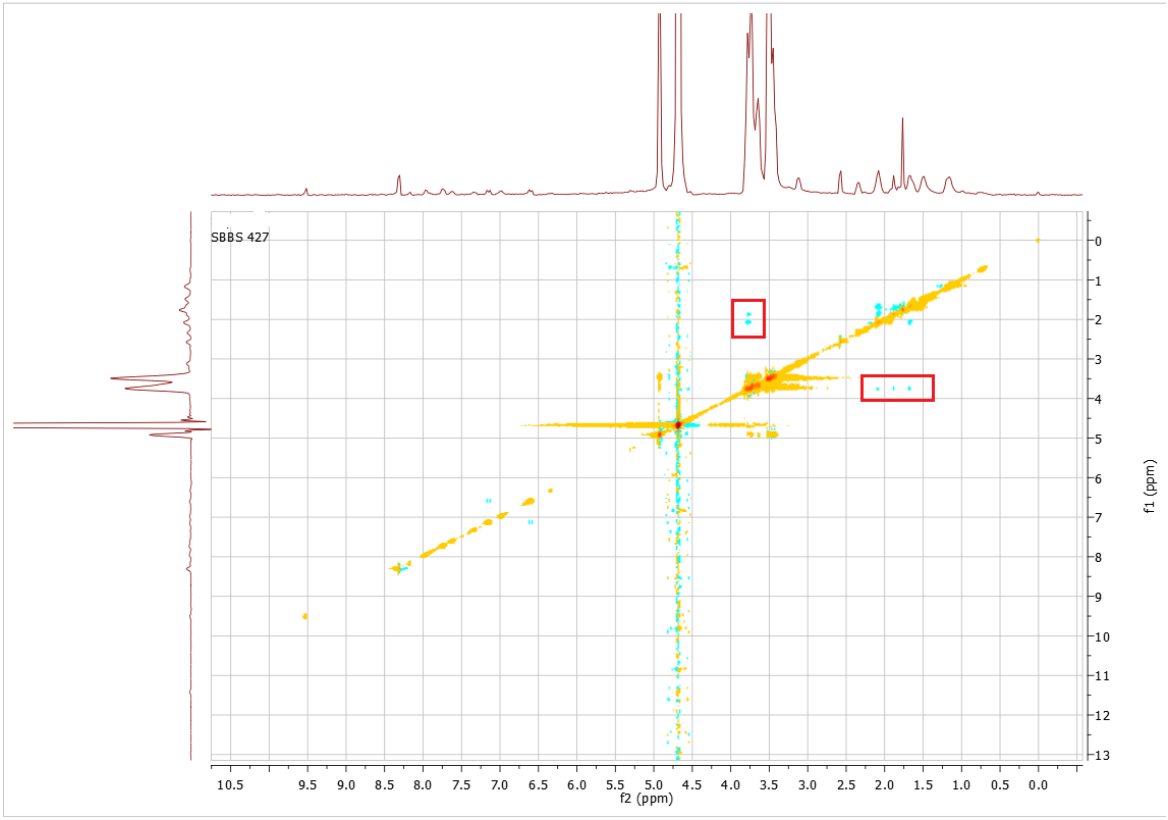


*Schéma 62 : Synthèse du complexe d'inclusion de la coumarine **43** avec la CD native*

La structure du complexe a été confirmée par RMN NOESY (Spectre 4)



*Spectre 4 : Spectre NOESY du complexe d'inclusion **138** dans le D_2O.*

L'analyse du spectre a confirmé l'existence d'un complexe d'inclusion. En effet, des interactions entre les H-3 et H-5 de la β-cyclodextrine et les pics de l'adamantane ont pu être observées (point bleu encadré en rouge sur le spectre), démontrant la formation du complexe.

III.1.3.2 Caractérisation du complexe d'inclusion 138

La coumarine **43** se complexe de la même façon que la coumarine **41**. D'après le spectre NOESY réalisé, seules les interactions entre les pics adamantane et H3 et H5 ont été observées. De ces résultats, nous en avons déduit la stœchiométrie du complexe d'inclusion à 1 : 1.

Par la suite, nous avons appliqué la méthode de Benessi et Hildebrand pour déterminer la constante d'association du complexe d'inclusion entre la CD **108** et la coumarine **43**. Le spectre d'absorbance diminue faiblement lors de l'ajout de la CD à la solution de coumarine indiquant la formation du complexe hôte-invité.

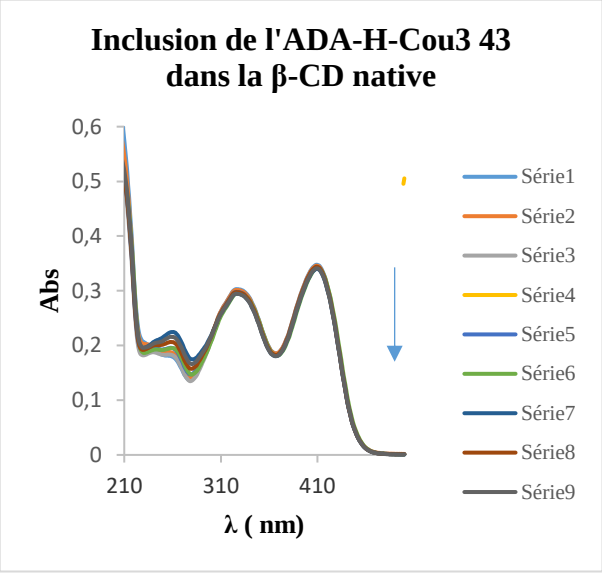


*Figure 71 : Spectre UV d'absorbance de la coumarine **43** en présence de différentes concentrations de β-cyclodextrine native*

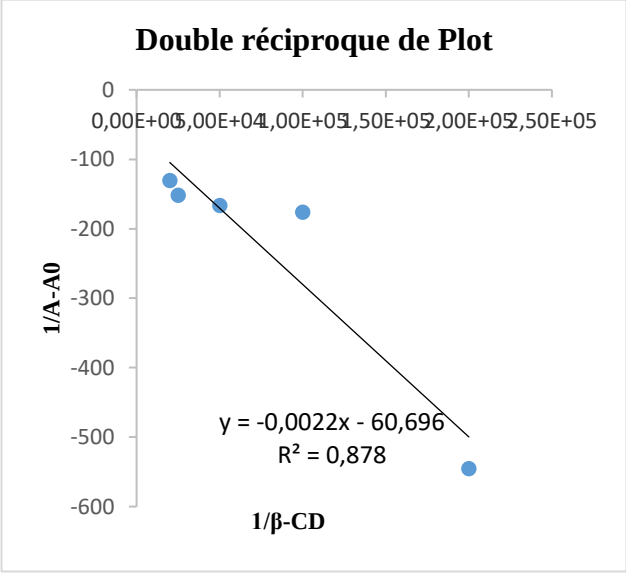


*Figure 72 : Benesi-Hildebrand, double réciproque de Plot pour les interactions entre la β-CD 113 et la coumarine **43***

Une constante de Ka = 27589 M^{-1} a été déterminée démontrant une forte stabilité du complexe d'inclusion.

III.1.4 Complexe d'inclusion 139

Nous avons essayé de préparer le complexe d'inclusion **139** entre la β-CD et l'imine **50** dans un mélange 1 : 1 ($MeOH/H_2O$) à 50°C pendant 24 heures. Après évaporation du méthanol, la fraction aqueuse a été lyophilisée. Ensuite, un spectre ^1H RMN du solide obtenu a été réalisé.

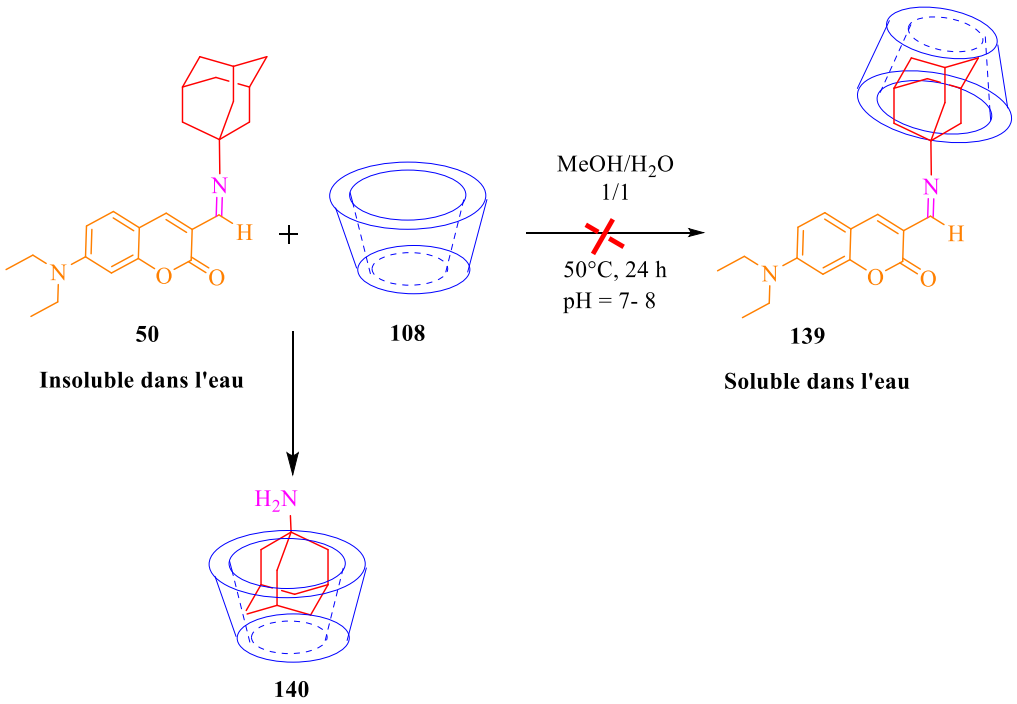
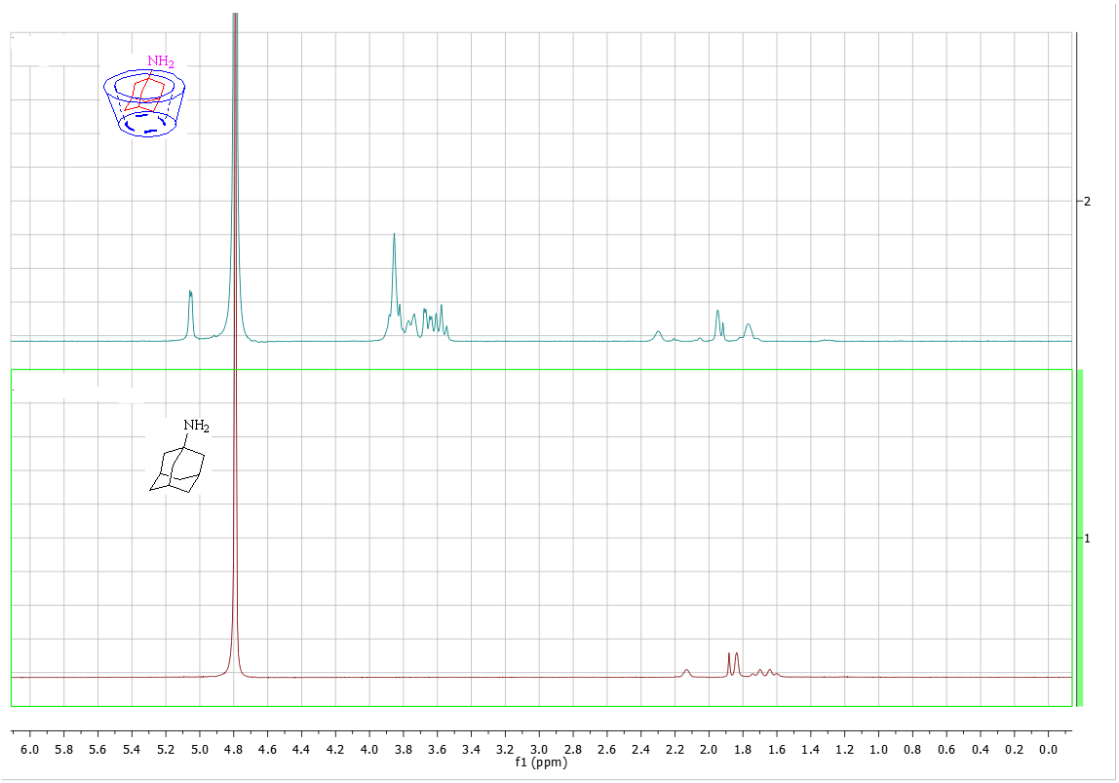


*Schéma 63 : Synthèse du complexe d'inclusion **139***

L'analyse du spectre ^1H RMN du composé **139** montre l'inclusion de la partie adamantane dans la cavité de la cyclodextrine. En effet, un déplacement de pics de l'adamantane passant de 1,60-2,13 ppm à 1,77-2,30 ppm en présence de β-cyclodextrine a été observé prouvant l'inclusion. Cependant à nouveau, une hydrolyse de la fonction imine a été confirmée par l'absence des pics caractéristiques de la partie coumarine à 6,5 ppm et 10 ppm (Spectre vert 5).



*Spectre 5 : Spectre ^{1}H de l'adamantane **42a** seule dans du D_2O (rouge), spectre du complexe d'inclusion **139** dans du D_2O (en vert)*

Pour des raisons d'instabilité, nous n'avons pû determiner de la constante d'association du complexe **139.**

III.1.5 Complexe d'inclusion 140

Le complexe d'inclusion **140** a été préparé selon la même procédure (Schéma 61, Méthode 2) dans un mélange MeOH/H_2O (1/1) à 50°C pendant 24 heures. Après élimination du méthanol et lyophilisation, le complexe **140** a été obtenu sous forme d'un solide jaune.

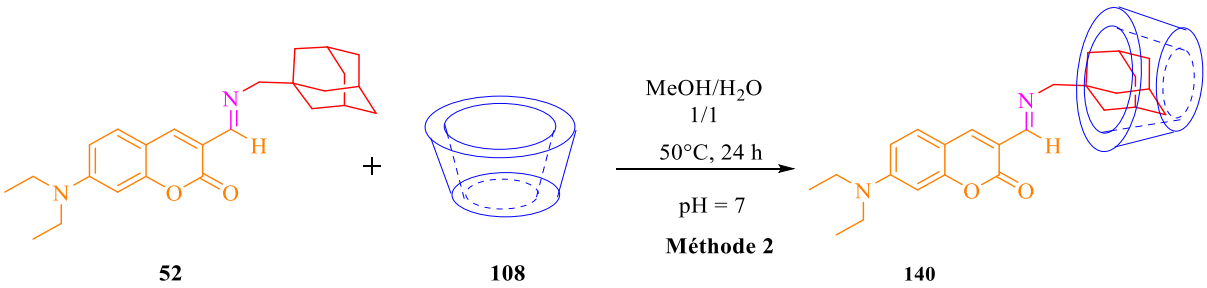


*Schéma 64 : Synthèse du complexe d'inclusion **140***

Nous avons ensuite réalisé un spectre NOESY du composé dans du D_2O. Ces résultats ont montré des interactions entre l'adamantane et les protons H3 et H5 présents dans la cavité de la cyclodextrine confirmant la présence du complexe d'inclusion sans hydrolyse de la fonction imine. Nous n'avons pas eu le temps de déterminer la constante d'association du complexe **140**, cependant la constante est probablement très proche de celle déterminée pour le complexe **136.**

III.1.6 Complexe d'inclusion 141

III.1.6.1 Préparation du complexe d'inclusion 141

La formation du complexe d'inclusion du composé ADA-H-TMZ **89** avec la β-cyclodextrine **108** a été étudiée selon la procédure mise au point précédemmment (Méthode 1, Schéma 61). Cependant, avec cet invité les tentatives n'ont pas été concluantes. Les ratios de solvant ont donc été modifiés en augmentant la quantité d'eau pour faciliter la complexation. Finalement, la quantité optimale d'eau a été estimée à 80% pour 20% de DMSO à 40°C et 50°C. Dans ces nouvelles conditions, à une nouvelle température, le complexe d'inclusion a été obtenu.

Cependant, nous avons remarqué une hydrolyse de la fonction hydrazone sur la moitié de nos échantillons avec une récupération du complexe ADA-CD **142**. Une adaptation de la procédure pour éviter la coupure du lien clivable a donc été mise en place. Pour cela, nous avons éliminé l'étape de sonication (Méthode 2, Schéma 61).

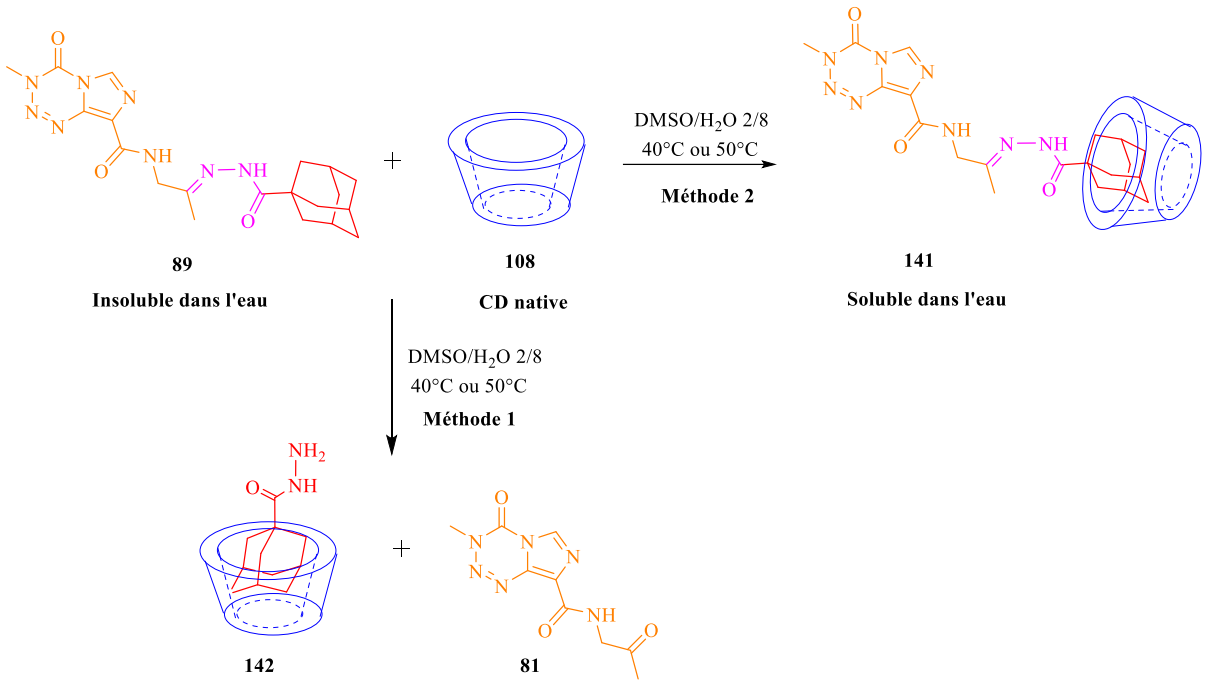
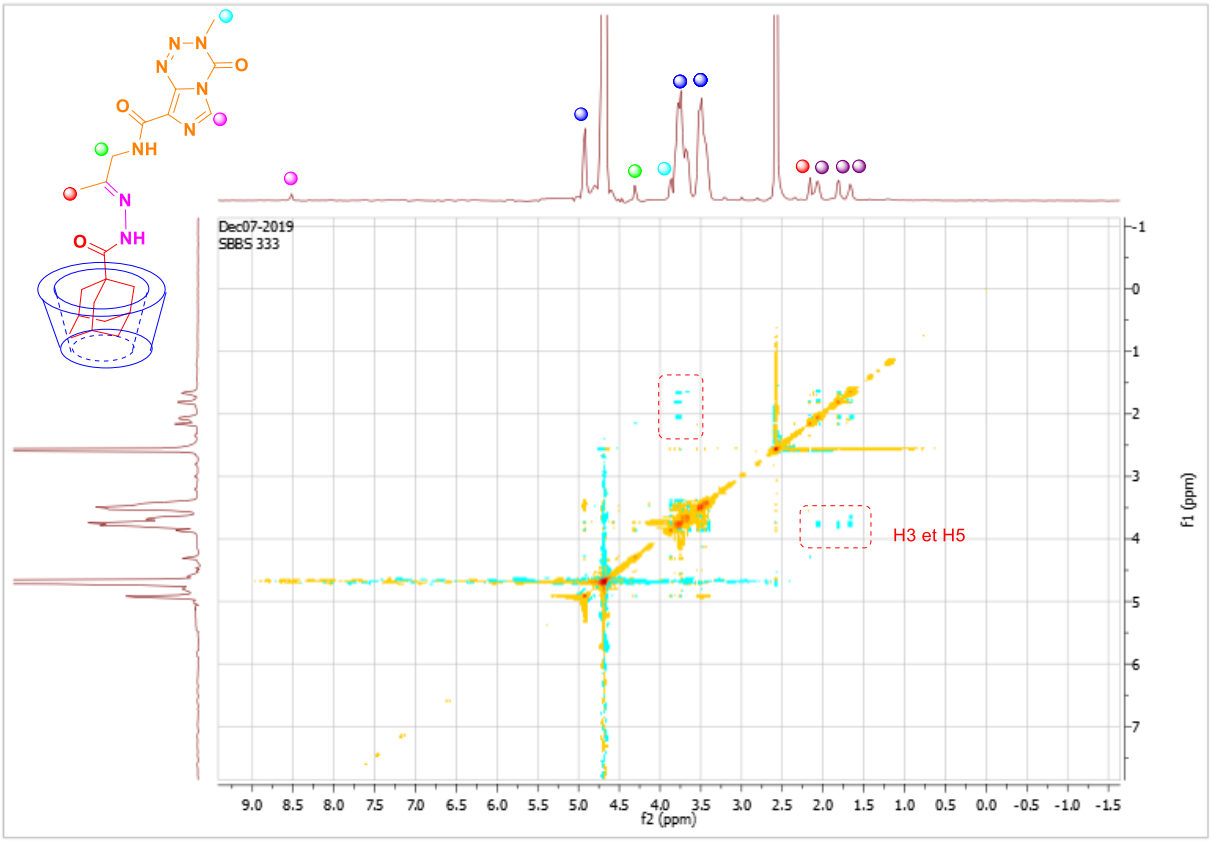


Schéma 65 : Complexe d'inclusion du composé ADA-H-TMZ ***89***

Sous ces conditions plus douces, tous les complexes d'inclusion ont été préparés sans hydrolyse de la fonction hydrazone.

Un spectre NOESY dans du D_2O a été effectué et les analyses ont confirmé l'existence d'un complexe d'inclusion. En effet, des interactions entre les H-3 et H-5 de la β-cyclodextrine et les pics de l'adamantane ont pu être observées, démontrant la formation du complexe qui devient, dans ces conditions, soluble dans l'eau (Spectre 6).



*Spectre 6 : NOESY, Complexe d'inclusion du composé ADA-H-TMZ **89** avec la β-CD dans le D_2O*

III.1.6.2 Caractérisation du complexe d'inclusion 141

L'étude de la détermination de la constante d'association du complexe **141** a été réalisée comme précédemment. Plusieurs essais ont été effectués et les valeurs obtenues pour la constante de stabilité du complexe ont été très différentes et non reproductibles. Ces résultats peuvent être expliqués par la faible solubilité du composé ADA-H-TMZ **141** dans les solvants (DMSO/H_2O).

III.1.7 Complexe d'inclusion 143

III.1.7.1 Préparation du complexe d'inclusion 143

Le complexe d'inclusion **143** a été préparé dans les mêmes conditions que précédemment (Méthode 2, Schéma 61).

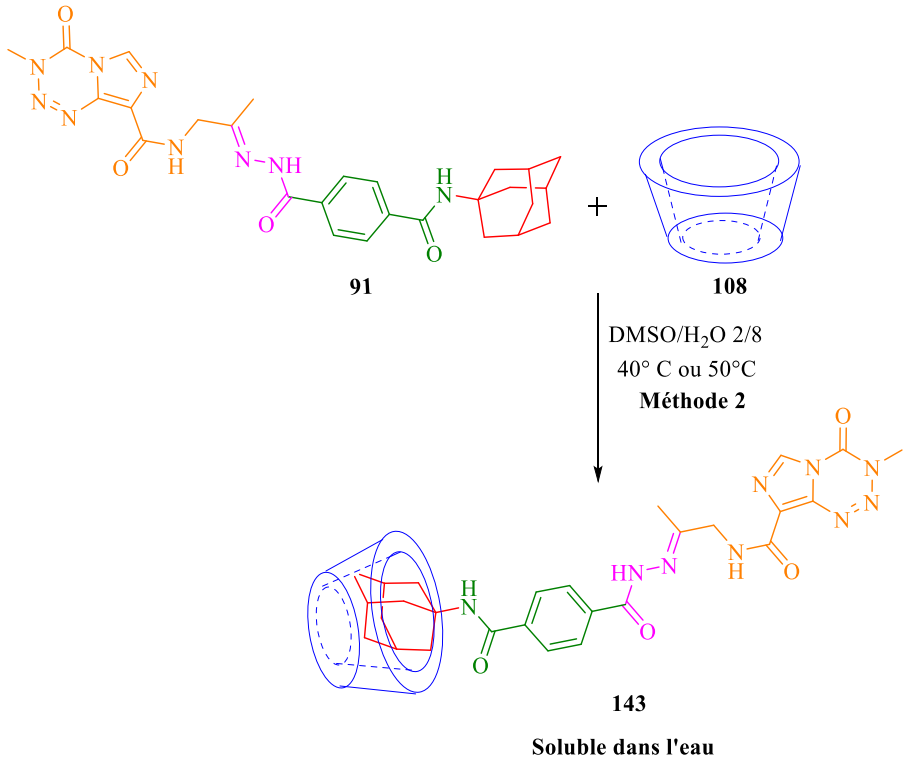
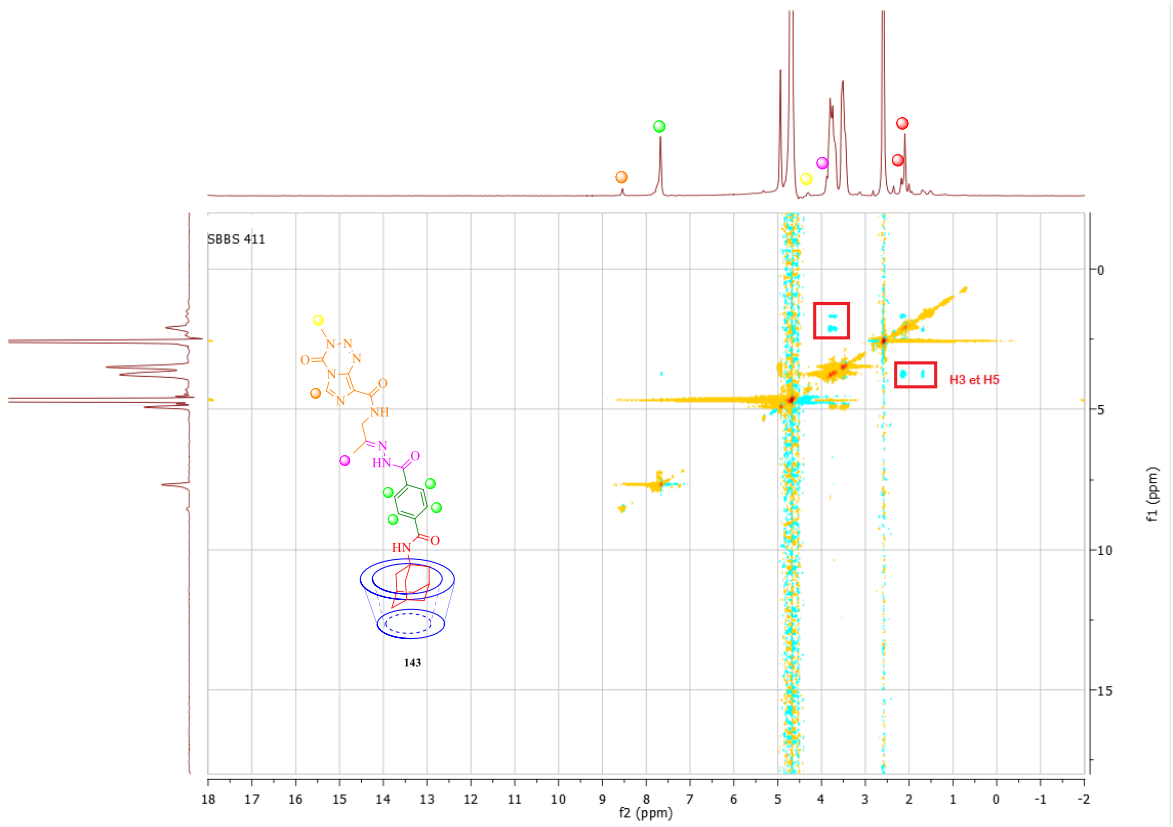


*Schéma 66 : Synthèse du complexe d'inclusion **143***

Un spectre NOESY dans du D_2O a été effectué et les analyses ont confirmé l'existence d'un complexe d'inclusion **143** par la présence de tâches de corrélation entre l'adamantane du composé **91** et les protons H3 et H5 de la cyclodextrine **108**.



*Spectre 7 : NOESY, Complexe d'inclusion du composé ADA-H-TMZ **91** dans la β-CD dans le D_2O*

III.1.7.2 Caractérisation du complexe d'inclusion 143

Comme précédemment, la détermination de la constante d'association du complexe **143** a été réalisée selon la méthode de Benessi et Hildebrand par UV-Visible.

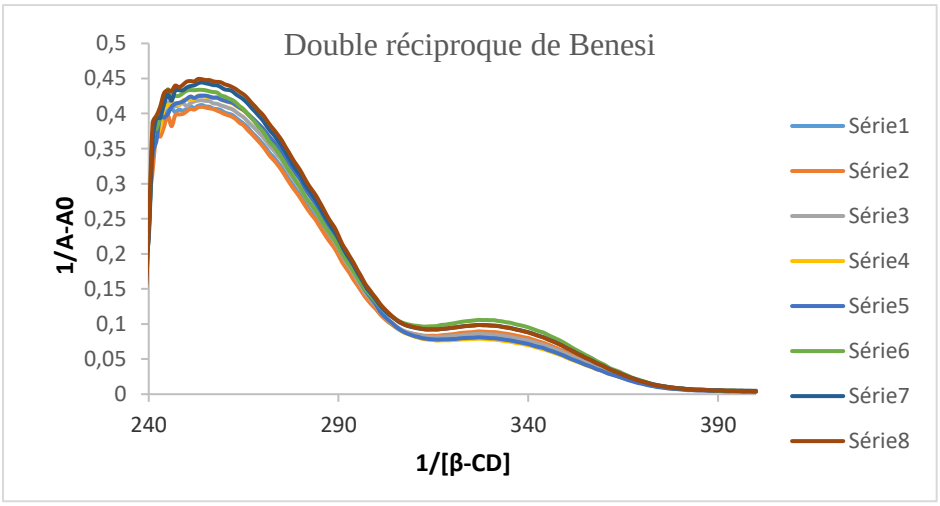


*Figure 73: Spectre UV d'absorbance du composé **91** en présence de différentes concentrations de β-cyclodextrine native*

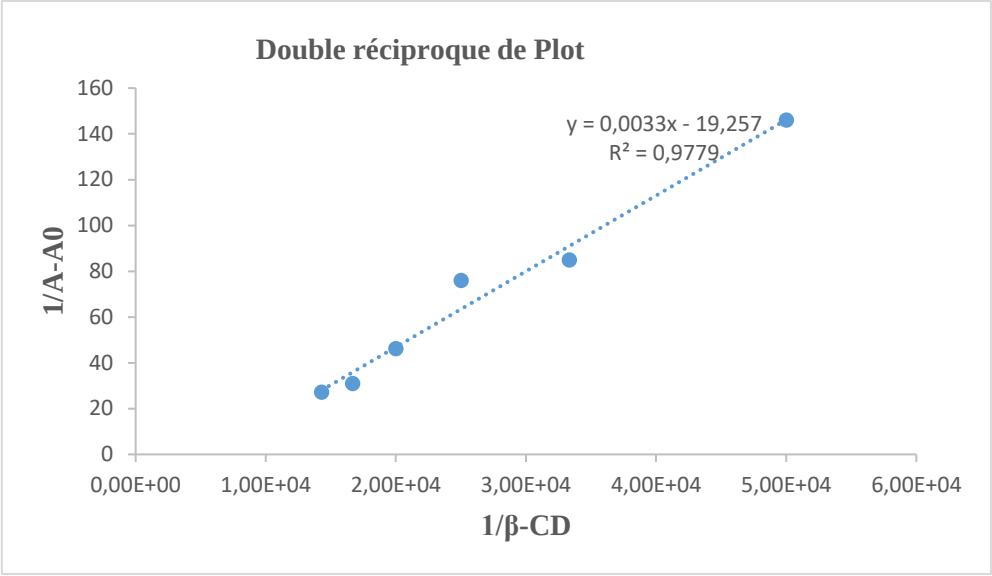


Figure 74 : Benesi-Hildebrand, double réciproque de Plot pour les interactions entre la CD ***108*** *et le composé* ***91***

La valeur de la constante a été déterminée à déterminer à Ka = 5835,45 M^{-1}.

III.1.8 Complexes d'inclusion à base des cyclodextrines modifiées 121, 122, 132 et 134

La méthode de préparation des complexes a été mise au point sur une β-cyclodextrine native **108** et a ensuite été étendue avec succès avec les cyclodextrines **121**, **122**, **132** et **134**. A partir de la procédure (Schéma 61, méthode 2), nous avons pû préparer, dans un premier temps, le complexe d'inclusion **144** entre la cyclodextrine **122** et le composé **91**. Ce complexe permet d'effectuer une analyse RMN en présence de l'yttrium pour confirmer l'inclusion.

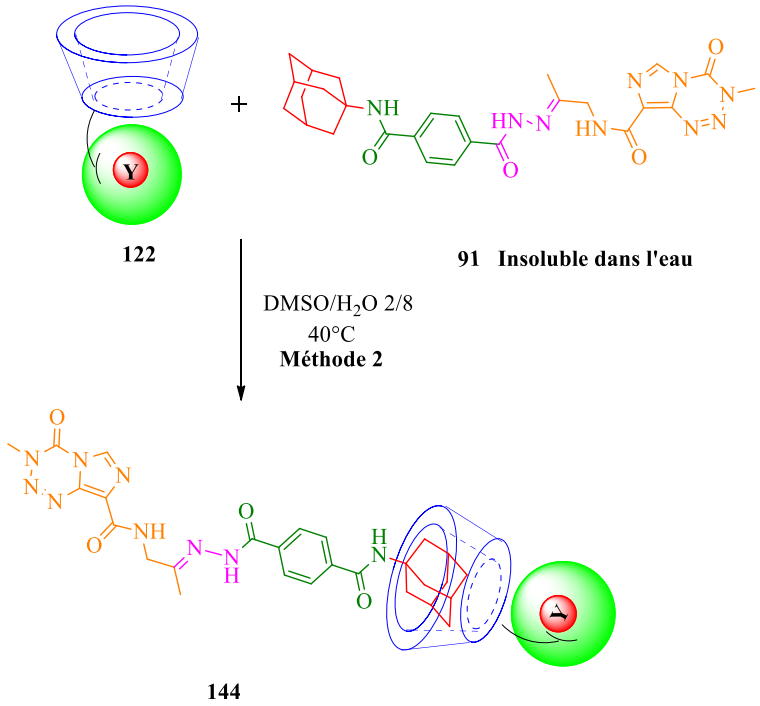
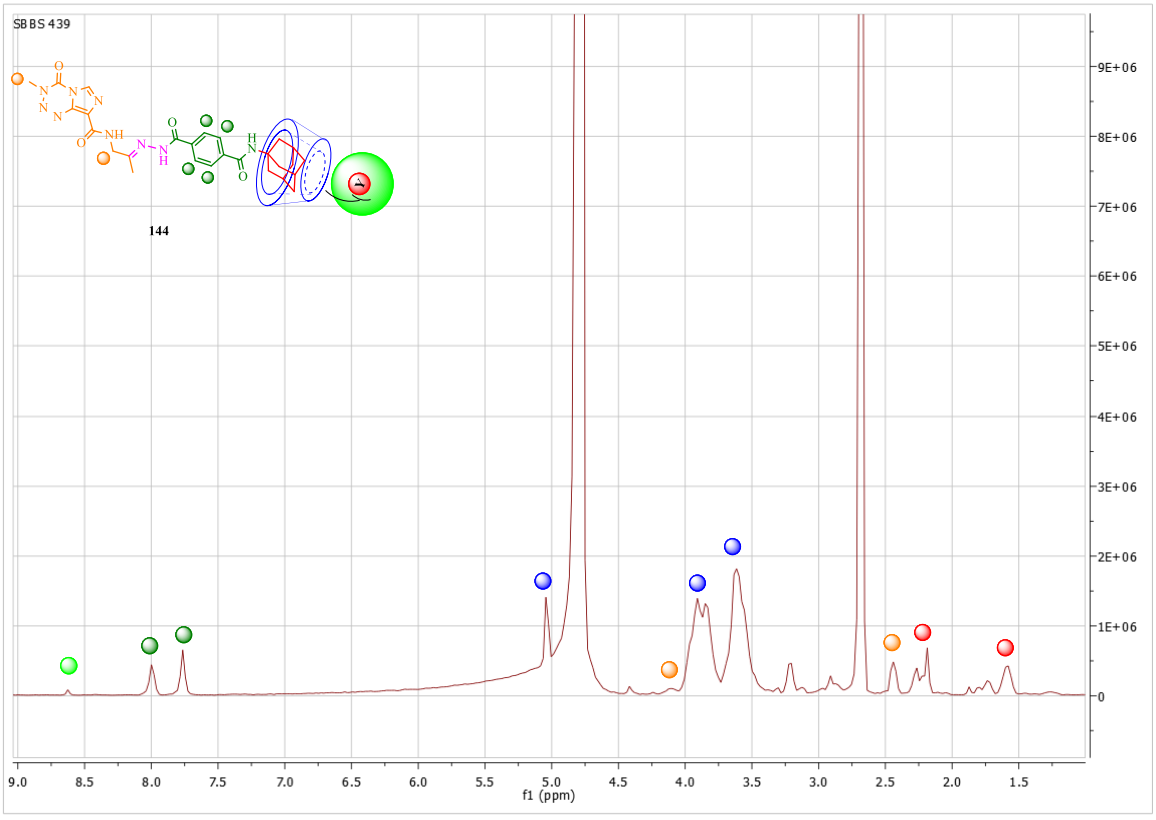


*Schéma 67 : Synthèse du complexe d'inclusion **144***



*Spectre 8 : Spectre ^{1}H du complexe d'inclusion **144** dans le D_2O*

Le spectre ^{1}H présenté (Spectre 8) confirme la formation du complexe d'inclusion **144**. Nous avons observé les pics correspondant au produit **91** (petits cercles vert foncé, orange et

rouge). En effet, la solubilité du composé **91** dans l'eau permet de confirmer la formation du complexe d'inclusion.

En utilisant le même protocole les différents complexes **145**, **146**, **147** et **148** ont été isolés en utilisant un mélange (DMSO/H_2O, 2/8) à 40°C pendant 24 heures avec la cyclodextrine **121**. Le complexe **149** a été obtenu avec la cyclodextrine **132** (Figure 75).

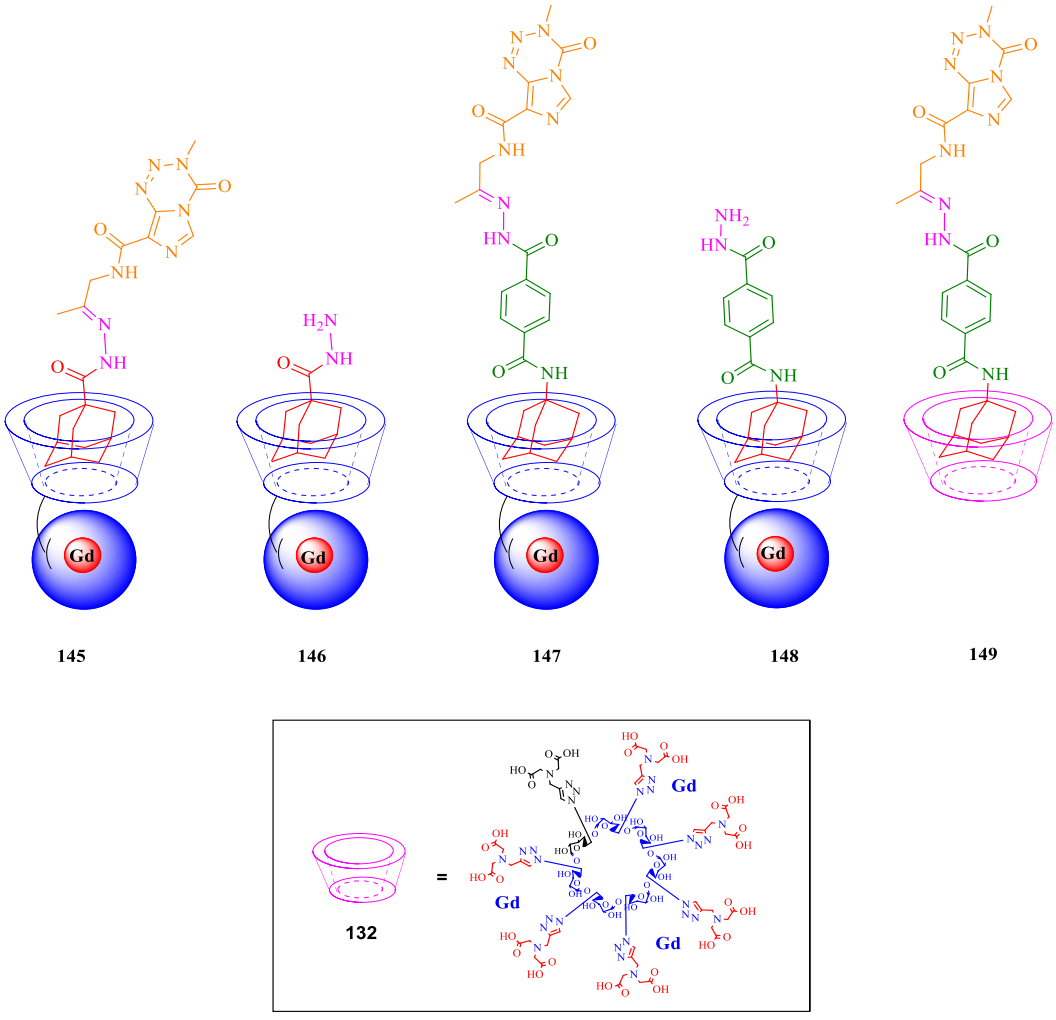


Figure 75 : Structure des complexes d'inclusion pour une application en IRM

Ces complexes seront utilisés par la suite (Partie 4, test *in vitro*) pour évaluer leur efficacité pour une utilisation en IRM.

De la même façon, le complexe **150** a été préparé à partir de la cyclodextrine-angiopep **134** et de la coumarine **91** car elle présentait la meilleure solubilité dans les solvants organiques grâce à son ligand pipérazine (Schéma 68).

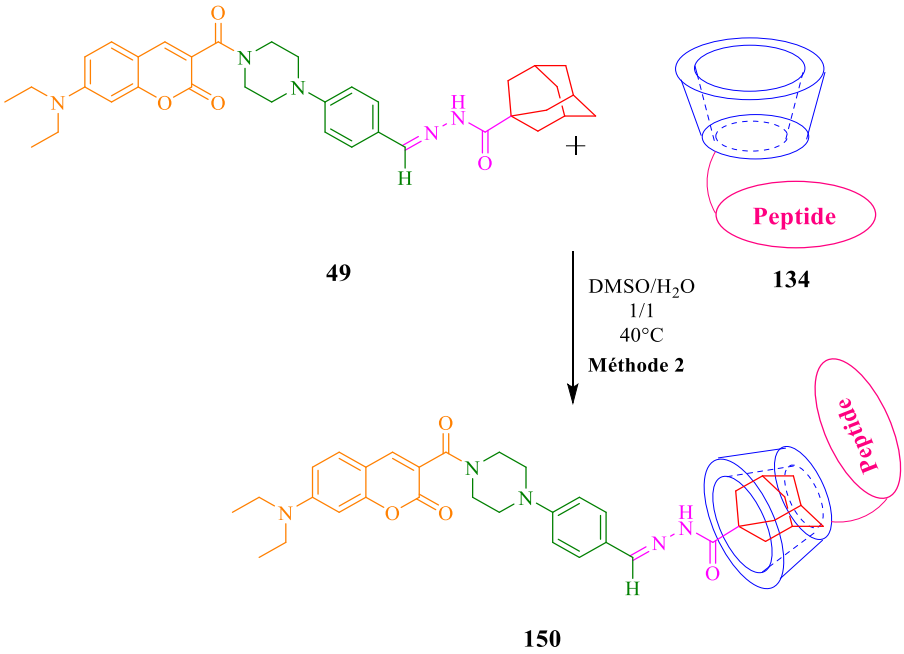


*Schéma 68 : Préparation du complexe d'inclusion **150***

Ce complexe sera utilisé par la suite (Partie 4, test *in vivo*) pour vérifier le passage de la BHE par fluorescence.

III.1.9 Conclusion

Dans cette partie, nous avons donc pu préparer les différents complexes d'inclusion suivants :

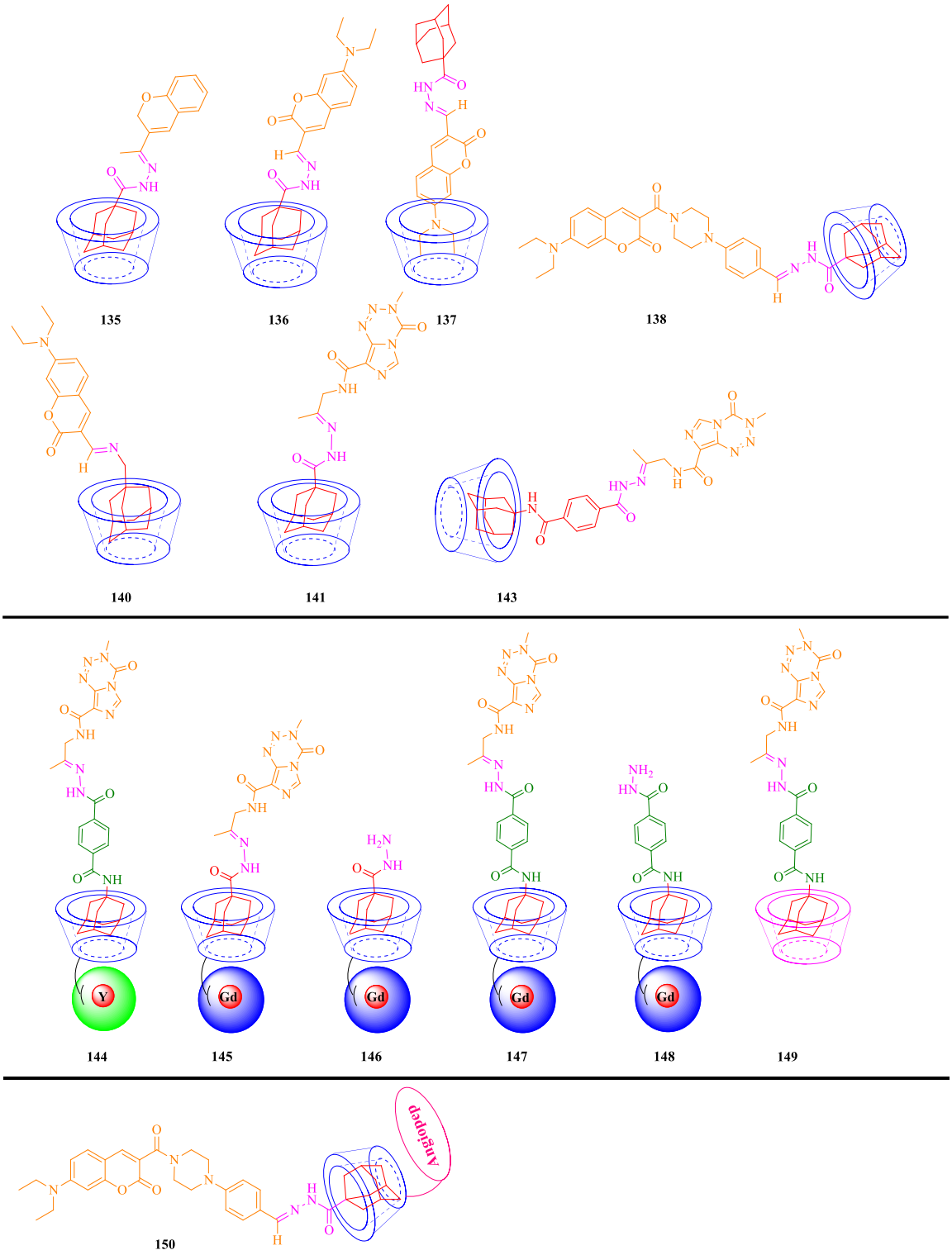


Figure 76: Structures des différents complexes d'inclusion préparés

La structure de ces différents complexes a été confirmée par RMN NOESY pour vérifier les interactions entre les pics de l'adamantane et les protons H3 et H5 présents dans la cavité

de la cyclodextrine. Une fois ces complexes d'inclusion obtenus, nous nous sommes intéressés à leurs caractérisations (stoechiométrie, constante d'association).

Nous avons caractérisé ces complexes par la méthode UV-Visible. Compte tenu de la faible solubililité des molécules invitées **41**, **43**, **50**, **53**, **89** et **91** (Figure 67) dans l'eau et certains solvants organiques (MeOH, ACN, DMSO), seule la caractérisation des complexes **136**, **138** et **143** a été effectuée. Des très fortes constantes d'associations de Ka = 639400 M^{-1}, 27589 M^{-1} et 5835 M^{-1} ont été obtenues respectivement avec des stoechiométries 1 : 1 pour les trois complexes (Figure 77).

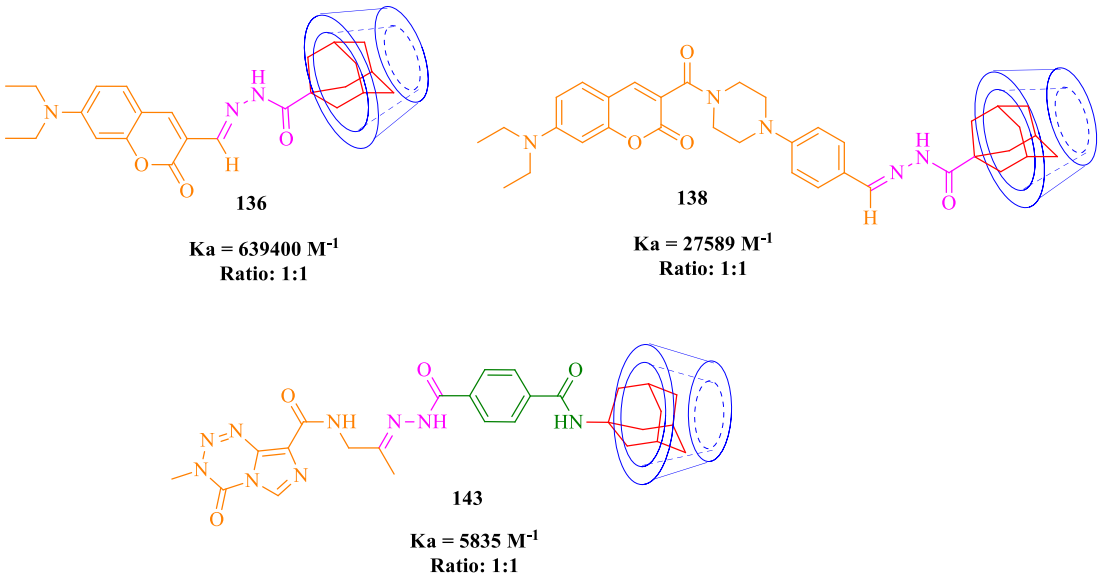


Figure 77 : Structure des complexes d'inclusion et leur constante d'association

Malgré la meilleure hydrosolubilité des complexes **136**, **138** et **143**, les caractérisations des complexes par ITC ou dichroisme circulaire n'ont pas pu être effectuées. En effet, ces techniques d'analyse nécessitent l'utilisation d'un minimun (inférieur à 5%) or un minimun de 20% de solvant organique est nécessaire pour solubiliser les échantillons. Dans ces conditions, il a été impossible d'utiliser ces deux méthodes.

Une fois les complexes d'inclusion formés, permettant ainsi une amélioration de la solubilité des composés dans l'eau, nous nous sommes intéressés à la coupure des liens imines et hydrazones.

IV. Cinétique d'hydrolyse des fonctions imines et hydrazones

V.1 Généralités

Le clivage des fonctions imine ou hydrazone entraine la régénération des fonctions amine et hydrazine et la libération du composé aldéhydique ou cétonique. Différentes structures d'hydrazones ont été synthétisées lors de cette étude, l'étude de la cinétique d'hydrolyse a donc été initiée sur ces composés par spectrophotométrie UV-visible à 37°C.

González-Méndez *et al.*[125] ont ainsi reporté l'hydrolyse du promédicament ADA-hydrazone-doxorubucine. Ils ont démontré que des conditions acides permettaient la coupure chimique et donc sa bioactivation intracellulaire. La cinétique d'hydrolyse du promédicament a été évaluée à pH physiologique 7,4 et à d'autres valeurs de pH, en tenant compte du microenvironnement acide qui caractérise les tumeurs (pH 6,5) et du gradient de pH auquel le promédicament serait exposé s'il était internalisé dans la tumeur. Les résultats ont montré la stabilité du promédicament à pH 6,5 et une hydrolyse à pH 4,5. Le promédicament reste stable pendant le transport dans le corps (pH sanguin 7,4) et une libération du médicament en fonction du changement de pH est observée.

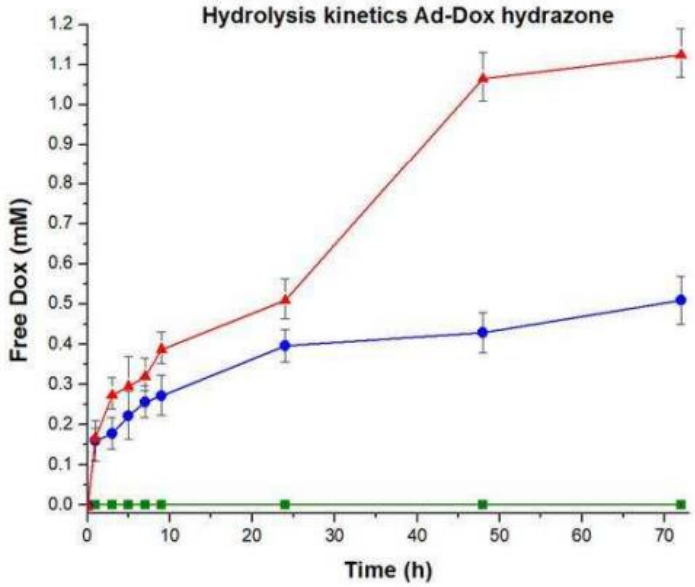


Figure 78 : Cinétique d'hydrolyse du promédicament ADA-hydrazone-Doxorubicine à 37°C à différents pH

■ *pH 7,4 (en vert)* ▲ *pH 3,5(en rouge) et* ● *pH 4,5 (en bleu)*

Ces résultats présentent un potentiel prometteur pour la conception et le développement de système de distribution de chimiothérapie tirant parti des caractéristiques du phénomène tumoral. En effet, les méthodes conventionnelles d'administration du médicament ne délivrent pas de manière lente et contrôlée la thérapie sur les sites cibles, elles ne sont donc pas spécifiques et affectent les tissus sains du corps.

Un autre exemple de libération contrôlée du médicament via un *linker* hydrazone a été développée par Patil *et al.*[261] Dans le but de traiter différents types de cancers, les auteurs ont développé un système composé de la doxorubicine conjuguée à une plate-forme PMLA (poly (acide β-L-malique) via une liaison hydrazone. La libération de la doxorubicine à partir du nanoconjugué a été mesurée par HPLC afin de vérifier une libération efficace à pH 5,0 dans les endosomes / lysosomes matures et idéalement l'absence de libération à pH physiologique (7,4) pendant l'administration systémique. La libération à pH 5,0 fut très efficace avec une libération de 50% après 3 heures et supérieure à > 80% après 40 heures contre 10% à pH physiologique.

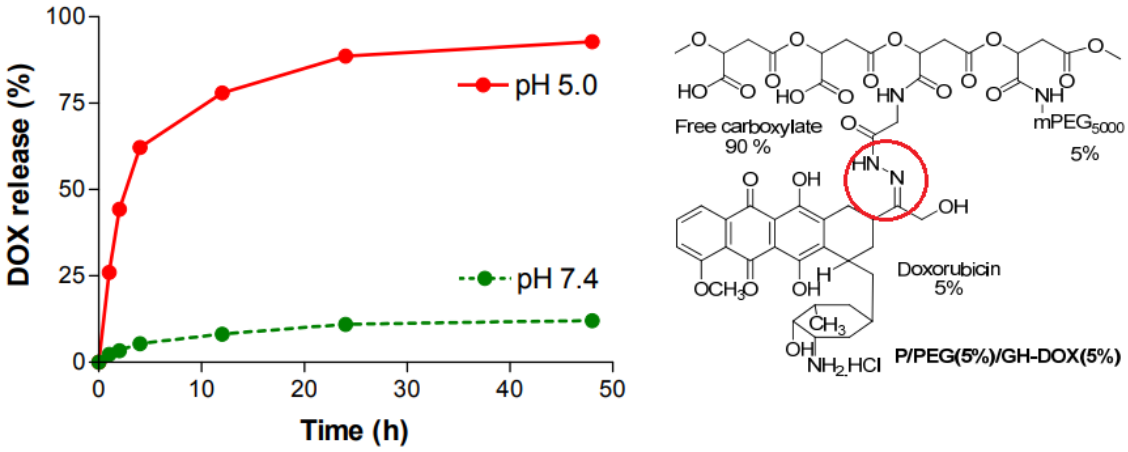


Figure 79 : Cinétique d'hydrolyse du nanoconjugué P / PEG (5%) / GH-DOX (5%) à pH 5 (rouge) et pH 7,4 (vert) à 37° C

L'administration du médicament *in vivo* a été considérée comme efficace et le niveau de cytotoxitité faible en raison de la clairance du nanoconjugué dans le sang pendant le trajet. Le vecteur a montré une réduction significative de la viabilité des cellules tumorales des lignées cellulaires de gliome humain et de cancer du sein, tandis que la plateforme contenant du PEG en l'absence de doxorubicine reste inactive.

V.2 Cinétique d'hydrolyse du complexe d'inclusion 141

Dans la littérature, il n'existe aucune étude sur la libération contrôlée du TMZ. Nous avons donc suivi l'hydrolyse de la fonction hydrazone par ^{1}H RMN, nos essais d'étude par spectroscopie UV-Visible ayant échoués car les composés TMZ, cyclodextrine ou adamantane ne sont pas suffisamment visibles.

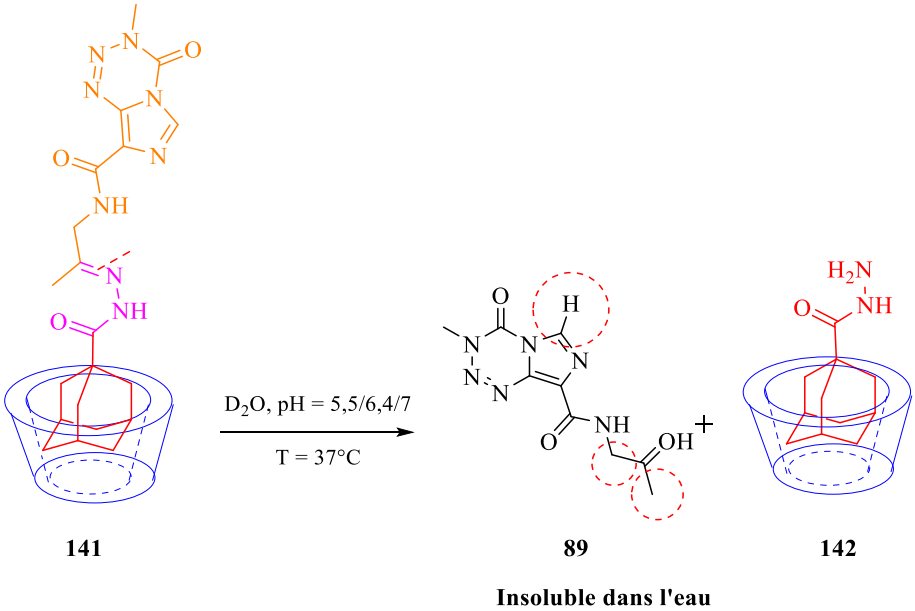


*Figure 80 : Hydrolyse de la fonction hydrazone du complexe **141***

Pour cette étude, le suivi des cinétiques d'hydrolyse a été effectué par RMN ^{1}H dans du D_2O à différents pH (7; 6,4; 5,5) à 37°C. Pour chacun des pH étudiés, une fois le composé mise en solution, le milieu est analysé à intervalle de temps régulier jusqu'à hydrolyse complète. Pour chaque temps t_x, la quantité de produit non hydrolysé a été mesurée par l'intégration du pic du proton des signaux CH_3, CH_2 et H du témozolomide qui disparaissent au fur et à mesure de la coupure de la liaison hydrazone. En effet, une fois le complexe hydrolysé, nous récupérons le témozolomide **89** et le complexe **142**. Le témozolomide n'étant pas soluble dans l'eau, un précipité apparait au fond du tube et ses signaux caractéristiques disparaissent. A partir de ces données, nous pouvons déterminer le pourcentage de produit hydrolysé en fonction du temps.

V.2.1 Hydrolyse à pH 5,5

Cette étude a été réalisée à une concentration fixe dans du D_2O acidifié à pH 5,5 et à 37°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le graphique suivant :

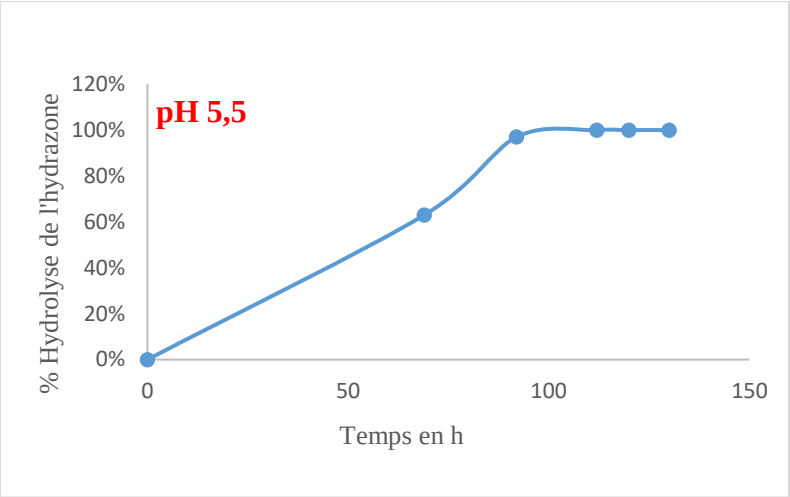
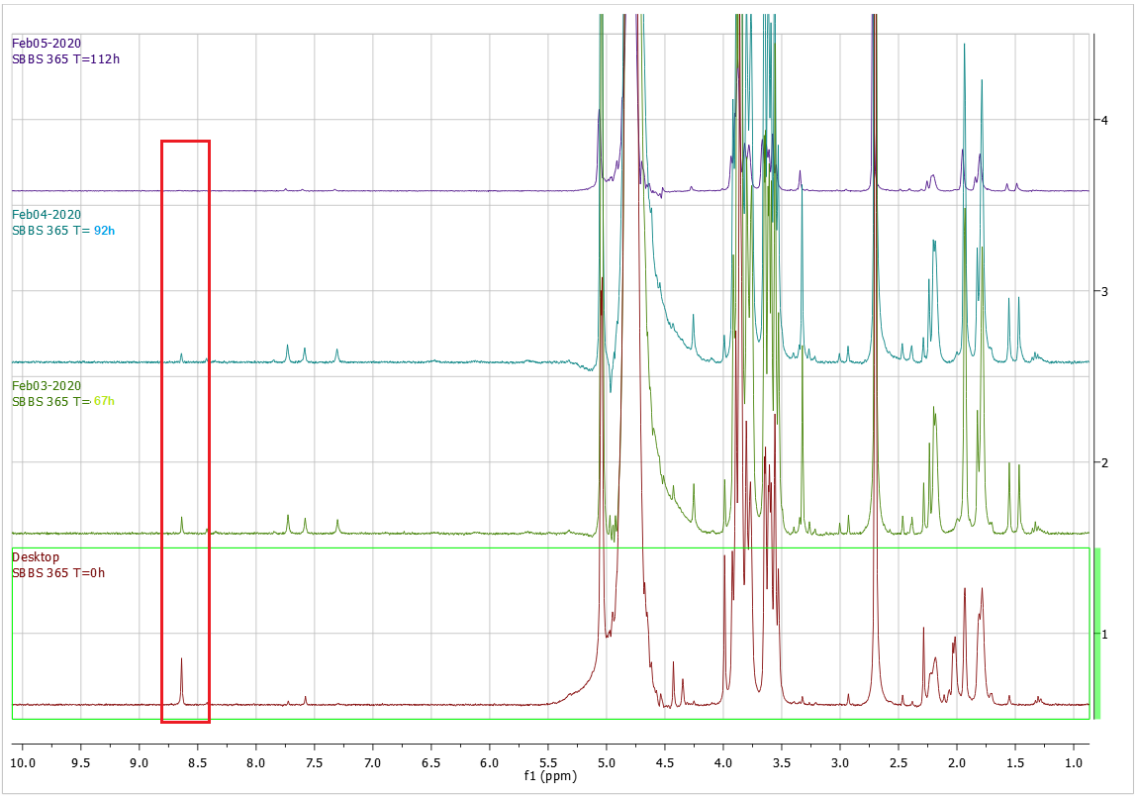


Figure 81 : Cinétique d'hydrolyse de l'ADA-H-TMZ **141** à 37°C à pH 5,5



*Spectre 9 : Spectre ^1H, cinétique d'hydrolyse du composé **141** dans du D_2O à pH 5,5, 37°C, C = 9,6 Mm*

Les signaux encadrés désignent les protons caractéristiques du composé TMZ entourés sur la Figure 80 qui disparaissent au cours du temps. Les graphes montrent que seul 63% du

produit est hydrolysé après 69 heures à pH 5,5, avec une hydrolyse complète au bout de 112 heures (5 jours). Ces résultats sont conformes à nos attentes et comparables à ceux de la littérature. L'hydrolyse reste à optimiser pour les 48 premières heures au cours desquelles nous devons récupérer plus de données.

V.2.2 Hydrolyse à pH 6,45

De façon similaire à pH 5,5, l'hydrolyse à pH 6,45 a été effectuée à une concentration fixe. Les résultats obtenus sont présentés dans le graphique suivant.

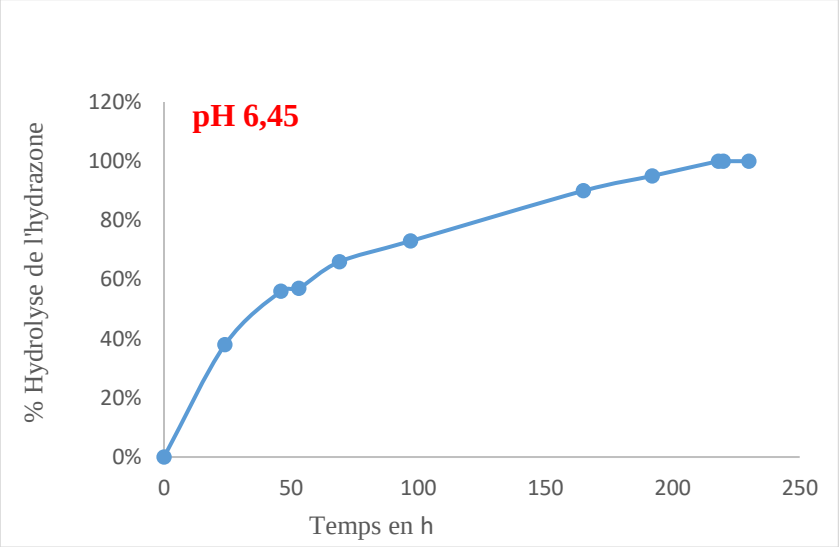
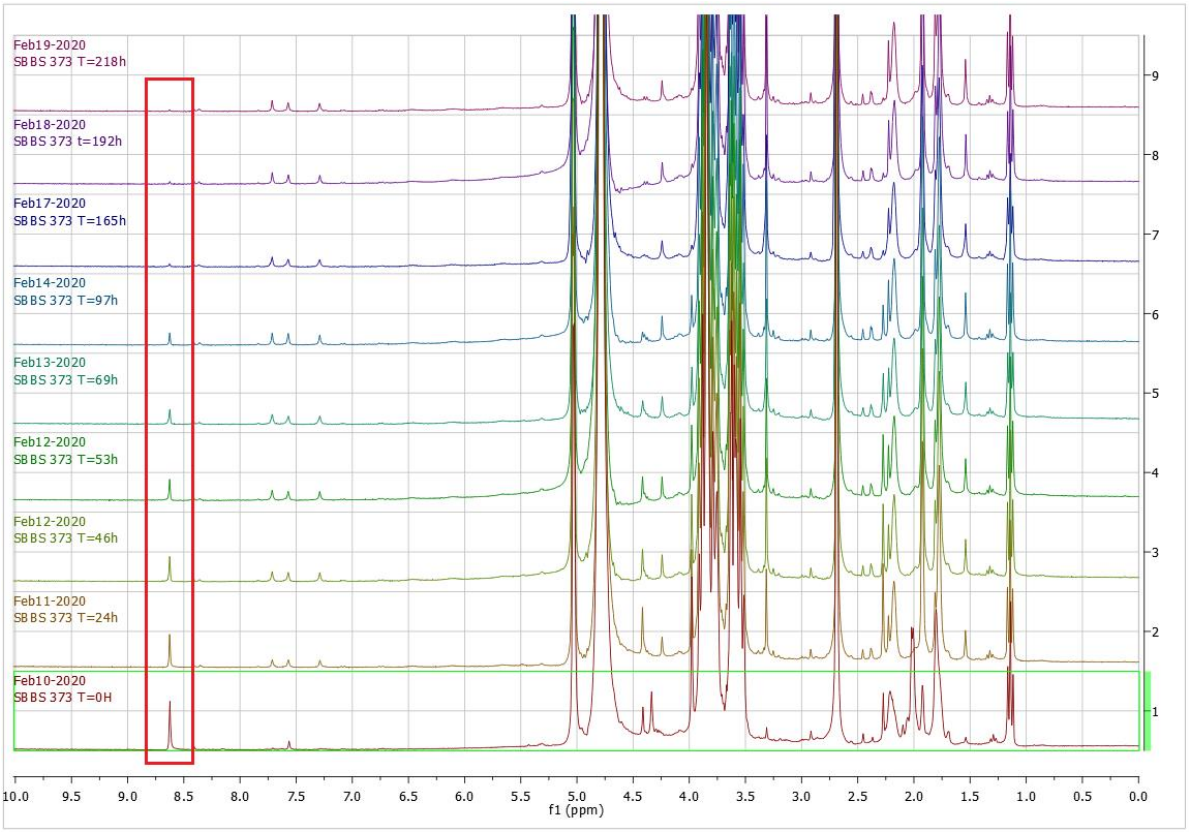


*Figure 82 : Cinétique d'hydrolyse de l'ADA-H-TMZ **141** à 37°C à pH 6.45*



*Spectre 10 : Spectre ^{1}H, cinétique d'hydrolyse du composé **141** dans du D_2O à pH 6,4, à 37°C, C = 16 mM*

A pH 6,45, l'hydrolyse du composé **141** est 1,8 fois plus lente avec une hydrolyse complète au bout de 9 jours. Ce résultat est à nouveau conforme à nos attentes, la fonction hydrazone étant plus stable dans ces conditions.

V.2.3 Hydrolyse à pH 7

De façon similaire à pH 6,45, l'hydrolyse à pH 7 a été effectuée à une concentration fixe. L'hydrolyse du composé **141** est plus lente avec une hydrolyse complète au bout de 14 jours. Cette hydrolyse est donc 3 fois plus lente que la précedente à pH = 6,45. La fonction hydrazone est plus stable dans ces conditions.

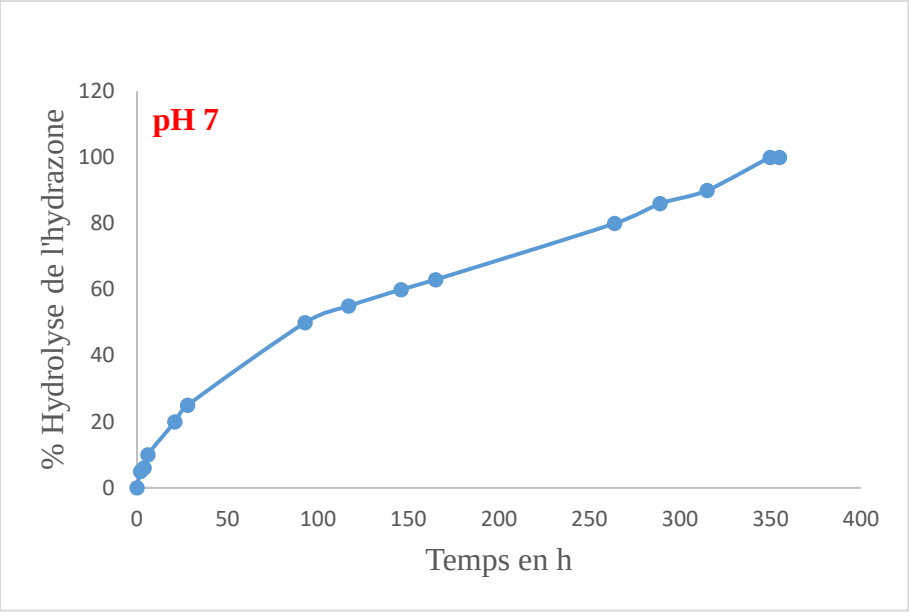
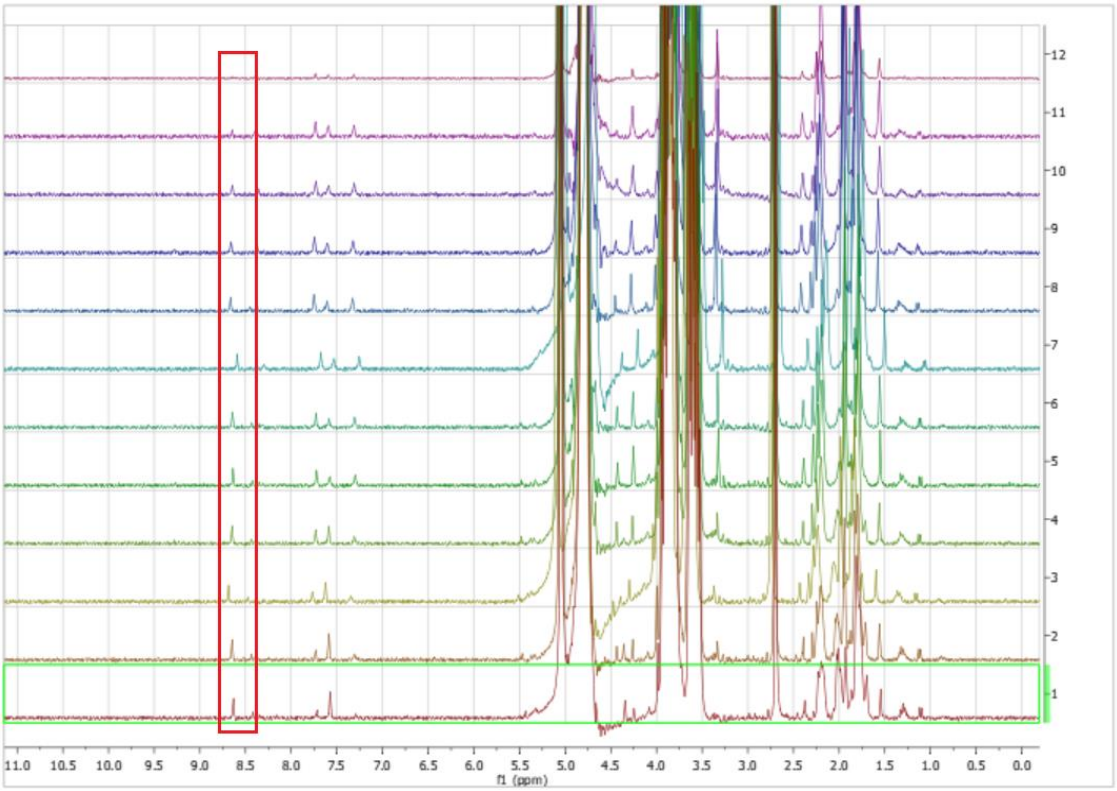


*Figure 83 : Cinétique d'hydrolyse de l'ADA-H-TMZ **141** à 37°C à pH*



*Spectre 11 : Spectre ^{1}H, cinétique d'hydrolyse du composé **141** dans du D_2O à pH = 7, à 37°C, C = 8,2 mM*

A pH 7, l'hydrolyse du composé **141** est 3 fois plus lente avec une hydrolyse complète au bout au bout de 14 jours. Ce résultat est à nouveau conforme à nos attentes, la fonction hydrazone étant plus stable dans ces conditions.

V.2.4 Analyse par spectrométrie de masse des composés d'hydrolyse

L'objectif de cette analyse était de pourvoir s'assurer de la libération de la molécule de témozolomide sous sa forme active et non sous sa forme hydrolysée MTIC (Schéma 37), nous avons donc réalisé un suivi par spectrométrie de masse au cours de l'hydrolyse.

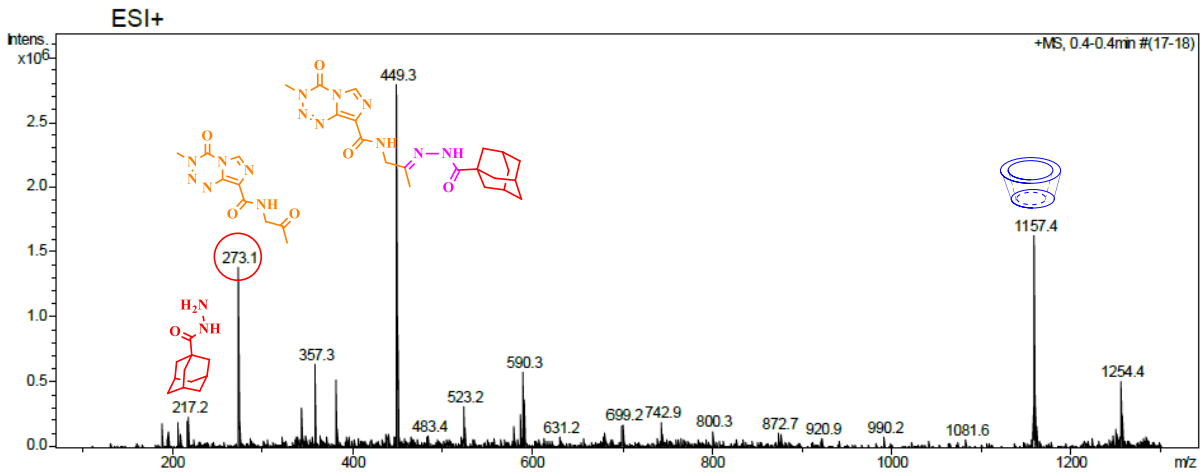


*Figure 84 : Spectre de masse de l'hydrolyse du composé **141** effectué au bout de 69 heures à pH 5,5*

Ces analyses ont confirmé la présence de tous les précurseurs hôte et invité ainsi que les produits d'hydrolyse. Le témozolomide avec son pic moléculaire à *m/z* = 273,1 pour l'adduit ($[M^+ Na]^+$, (Figure 84) est donc libéré sous sa forme stable et peut donc être transporté dans la cellule cancéreuse et y devenir actif.

Cette étude a permis de mettre en place les conditions d'hydrolyse du complexe **141** sensible à pH acide. D'après les résultats, le composé possède une cinétique d'hydrolyse lente à pH moins acide. En effet, ce dernier a démontré une hydrolyse complète au bout de 5 jours à pH 5,5, 9 jours à pH 6,4 et 14 jours à pH 7. Ces résultats sont très satisfaisants et nous permettent de valider un de nos objectifs à savoir la libération, contrôlée du témozolomide.

Partie 3 :
Synthèse du tripode

I. Synthèse du Tripode

Au cours des dernières années, diverses plateformes de nanomédecine ont été développées dans le but d'obtenir une administration ciblée et une libération contrôlée des agents de chimiothérapie afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique tout en minimisant les effets secondaires indésirables.

Ces plateformes sont développées à base d'échaffaudages pour l'encapsulation de médicaments anticancéreux tels que : des dendrimères, des assemblages de polymères, des micelles, des liposomes, des nanoparticules, des cyclodextrines (*cf*. partie 3 du manuscrit).

En plus de l'administration ciblée de médicaments, la surveillance *in vivo* en temps réel, de la biodistribution du principe actif et de sa pharmacocinétique, l'efficacité thérapeutique est également cruciale. Le concept de thérapie anticancéreuse guidée par l'imagerie a ainsi évolué pour répondre à ces problématiques. Des plateformes de médicaments intégrés à des fonctions d'imagerie diagnostique devraient permettre d'accéder à la prochaine génération de protocole thérapeutique anticancéreux dit « personnalisé »

Parmi les diverses techniques d'imagerie diagnostique cliniquement appliquées, la tomographie par ordinateur (TDM), la tomographie par émission de positons (TEP) et la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont été largement utilisées (*cf*. partie Diagnostic du manuscrit).

En particulier, les agents de contraste pour l'IRM peuvent être intégrés de manière covalente avec des polymères ou/et des cyclodextrines pour donner un outil combinant un agent thérapeutique et diagnostique. Plus précisément, l'utilisation de cyclodextrine en tant que vecteur pour la délivrance de médicaments chimiothérapeutiques et d'agents de contraste devrait permettre d'accéder ainsi à une plateforme théranostique avec les avantages combinés tels qu'une meilleure solubilité dans l'eau, une meilleure biocompatibilité *in vivo* et un meilleur contraste en IRM.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet de thèse. Nous proposons, de mettre au point un agent théranostique basé sur un assemblage d'une structure hétérotrifonctionnelle, appelé tripode.

Dans cette partie seront présentés des modèles de tripode et de complexes d'inclusion avec différents dérivés de cyclodextrines (β-CD native, CD-Gd-DOTA **123, 133** et la CD-Angiopep **135**). L'objectif de cette association est d'obtenir une sonde théranostique, capable de passer la barrière BHE, de vectoriser le témozolomide et de suivre la variation du signal IRM lors de la libération de l'anticancéreux. Pour cela, une approche originale est envisagée utilisant une réaction de type « click » (cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre) pour fonctionnaliser le bras droit du tripode avec soit une coumarine, un agent de contraste ou l'angiopep. Le bras gauche du tripode sera fonctionnalisé par le témozolomide. La partie basse du tripode sera fonctionnalisée par une molécule d'adamantane pour permettre l'inclusion dans la cavité de la cyclodextrine.

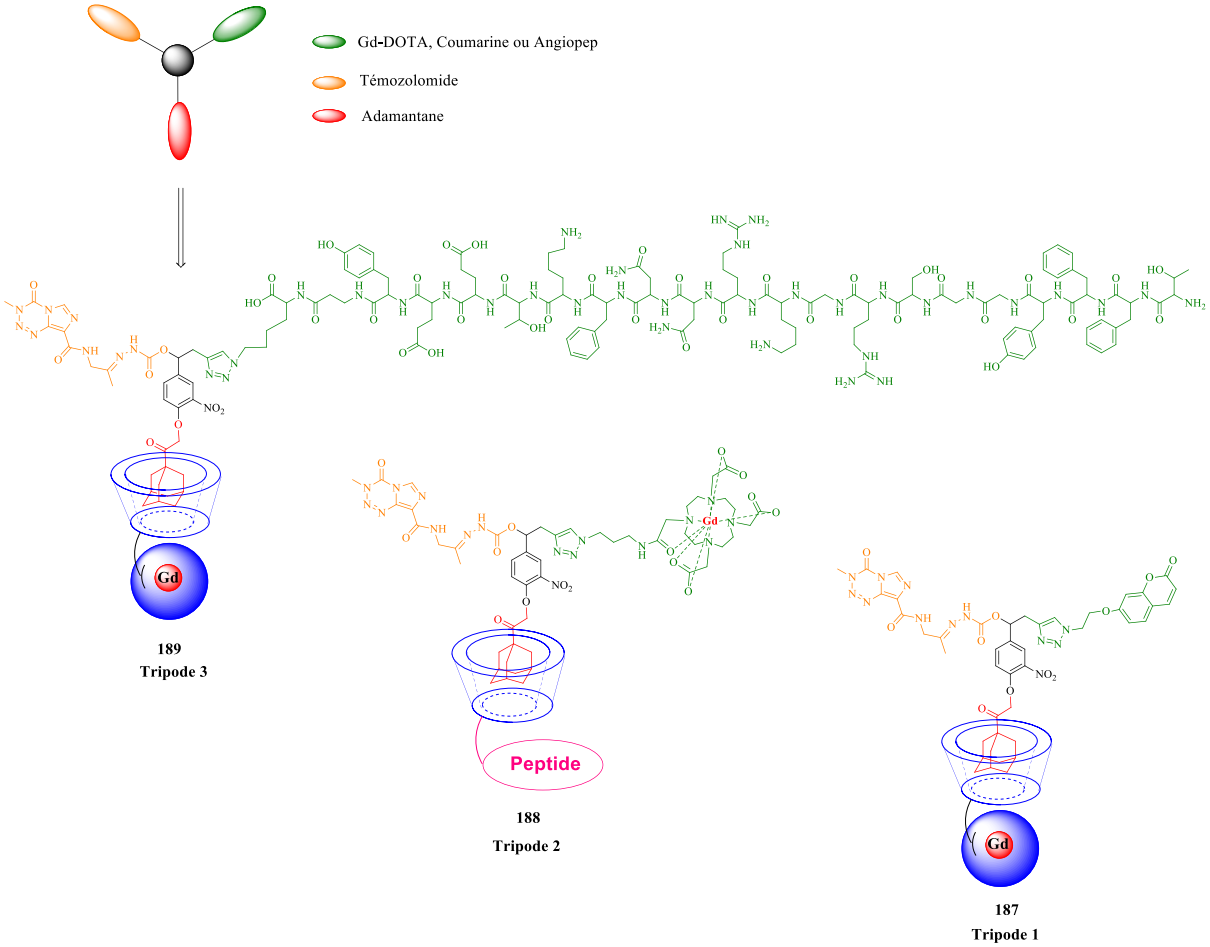


*Figure 85 : Structure des tripodes théranostiques **1-3***

I.1 Généralités

Le développement des molécules hétérofonctionnelles, que ce soit des molécules bifonctionnelles (bipodes)[262], trifonctionnelles (tripodes)[262–265] ou tétrafonctionnelles (tétrapodes)[262] ont apporté une certaine flexibilité dans la stratégie de formation des différentes combinations de molécules. En effet, les synthèses décrites dans la littérature rapportent une large palette d'applications avec l'utilisation de liaisons stables ou clivables (imine, hydrazone, pont disulfure). Ces molécules multifonctionnelles peuvent donc servir pour la libération contrôlée de médicaments sur une cible biologique donnée.

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser à quelques exemples d'assemblage de structure hétérotrifonctionnelle, appelé « tripode » reportés dans la littérature.

I.1.1 Exemples de tripodes

En 2012, Sébastien Papot *et al.*[266] ont décrit la synthèse de la première génération de prodrogues galactosides à base d'une structure tripode pour le traitement des tumeurs solides en ProdrugMonoThérapie (PMT). Ce composé a été préparé en 6 étapes avec un rendement global de 44%. Ce tripode est composé d'un déclencheur galactoside (en vert), d'un ligand de ciblage (en orange, l'acide folique qui est reconnu par les récepteurs FR) et d'un puissant composé cytotoxique (en rouge, la monométhyl Auristatine E, MMAE) articulé autour d'un squelette central aromatique (Figure 86).

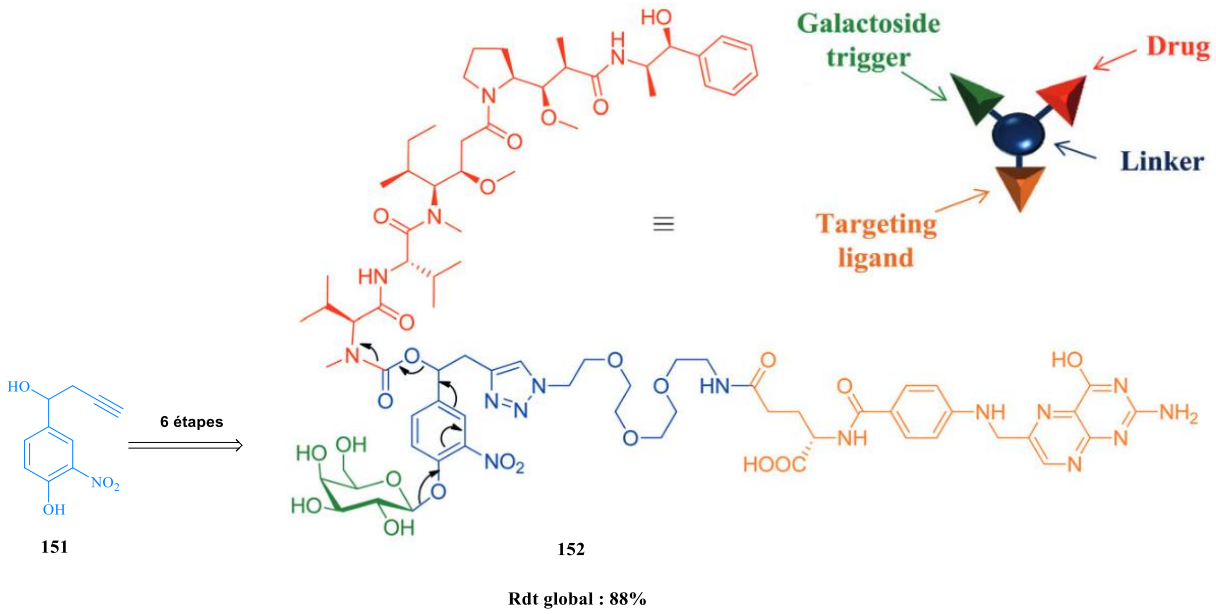


Figure 86 : Structure du Tripode de Sébastien Papot[266]

Cet assemblage est programmé pour être sélectivement activé par la β-galactosidase présente dans le compartiment lysosomal des cellules cancéreuses exprimant un récepteur spécifique associé à la tumeur, le récepteur de l'acide folique (Figure 87). Ainsi, comme le montre le mécanisme, la première étape est une reconnaissance de l'acide folique par les récepteurs FR, ce qui permet d'internaliser l'assemblage dans la cellule tumorale par endocytose. Ensuite, au sein du lysosome, une libération contrôlée du médicament catalysée par la β-galactosidase est effectuée. La dernière étape est la diffusion du médicament dans le noyau ou le cytoplasme des cellules cancéreuses qui peut alors exercer son activité cyctotoxique.

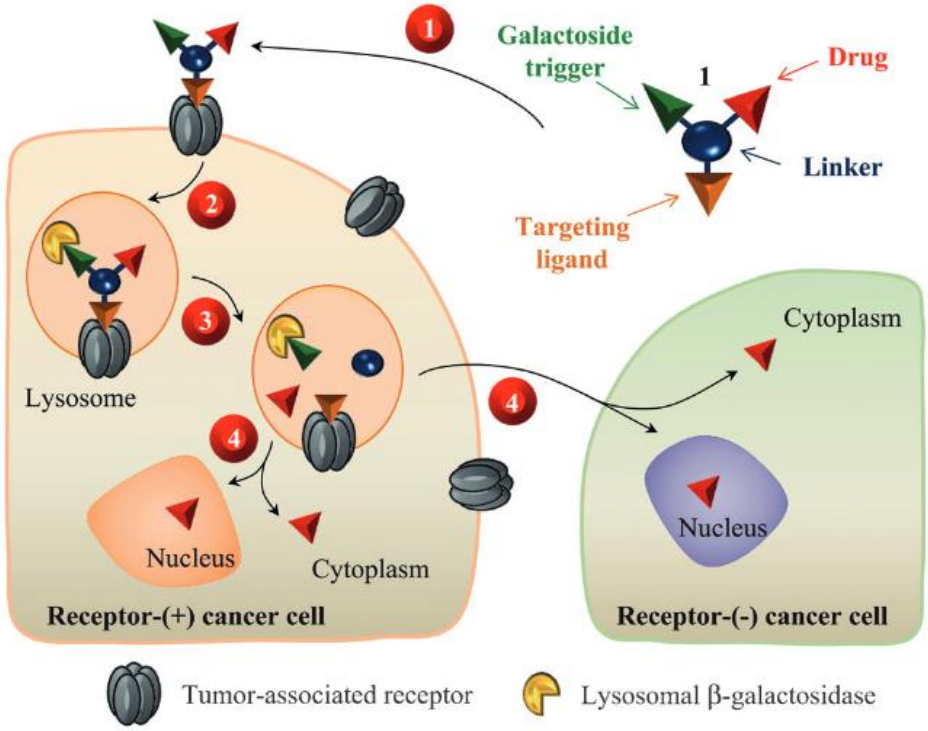


Figure 87 : Mécanisme d'action du tripode de Sébatien Papot[266]

L'efficacité du promédicament a été évaluée *in vitro* sur trois lignées cellulaires : les cellules KB, qui expriment fortement les récepteurs FR, les cellules HeLa très peu et les cellules A549 qui n'expriment pas les récepteurs FR. Cette stratégie a montré un très fort effet antitumoral spécifiquement contre la xénogreffe KB, sans aucun effet secondaire détectable.

I.1.2 Tripode et cyclodextrine

Quelques exemples de structure tripode sont apparus en combinaison avec des cyclodextrines. La complexation hôte-invité est fréquemment employée. Il est bien connu que certains médicaments peuvent former des complexes d'inclusion avec la CD augmentant ainsi considérablement leur solubilité en phase aqueuse. Pour cela, le groupe adamantyle est utilisée comme molécule invitée spécifique et efficace pour se complexer avec la β-CD. Ainsi, certains médicaments ont été fonctionnalisés et les conjugués médicament-adamantane obtenus complexés avec une CD pour des applications de délivrance de médicaments (*cf.* Partie Vectorisation).

En 2016, Yu Liu *et al.*[267] ont publié la synthèse d'un tripode possédant un groupe adamantyle (ADA) et deux bras diamine encapsulés par deux curcurbit[6]uril (CB[6]). La

présence de ces macrocycles CB[6] engendre la formation d'un maximum de fonctions ammoniums et favorise ainsi la condensation de siARN par attraction électrostatique à pH neutre (Schéma 69). Cette stratégie induit un changement de pKa *via* un complexe supramoléculaire. Cette modification de pKa est considérée comme l'un des processus les plus omniprésents dans les événements biochimiques, par exemple lors des réactions catalysées par une enzyme ou lors de la stabilisation conformationnelle des protéines. Le groupe adamantyle a été utilisée pour la complexation dans la cavité d'une β-CD liée à l'acide hyaluronique (Ka = 6.09 x 10^4 M^{-1}) qui est reconnu par les récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses.

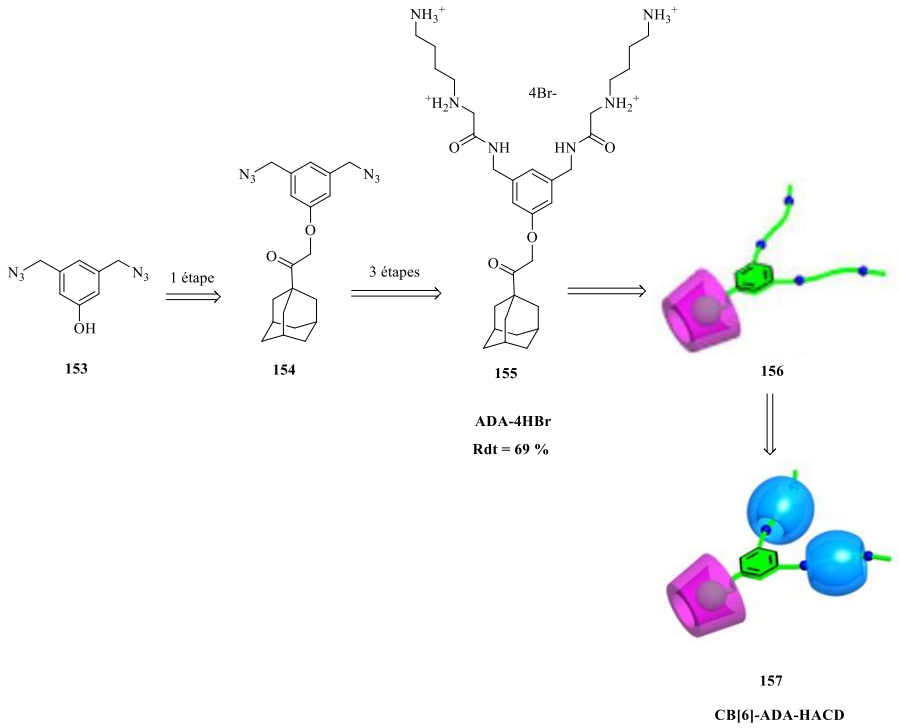


Schéma 69 : Synthèse du Tripode de Yu Liu et al.[267]

Ce tripode a été obtenu en 4 étapes avec un rendement global de 18%. Ils ont démontré que la forte encapsulation des bras diamines par le CB[6] via des interactions ion-dipole (Ka = 10^6 M^{-1}) réduisait la cytotoxicité du véhicule à l'échelle nanométrique et améliorait l'affinité avec le siARN.

Y. Zhang *et al.*[201] ont publié, en 2018, la synthèse d'un tripode intéressant possédant trois fonctionnalités (Figure 44) : une partie chimiothérapie avec la campthothécine, une partie fluorescente avec le napthalimide et une partie adamantane pour le complexe d'inclusion avec la cyclodextrine (Figure 88). Ces travaux sont également inspirés des travaux de l'équipe de Sébastien Papot et sont décrits en détail dans la partie 3, VI. de ce manuscrit.

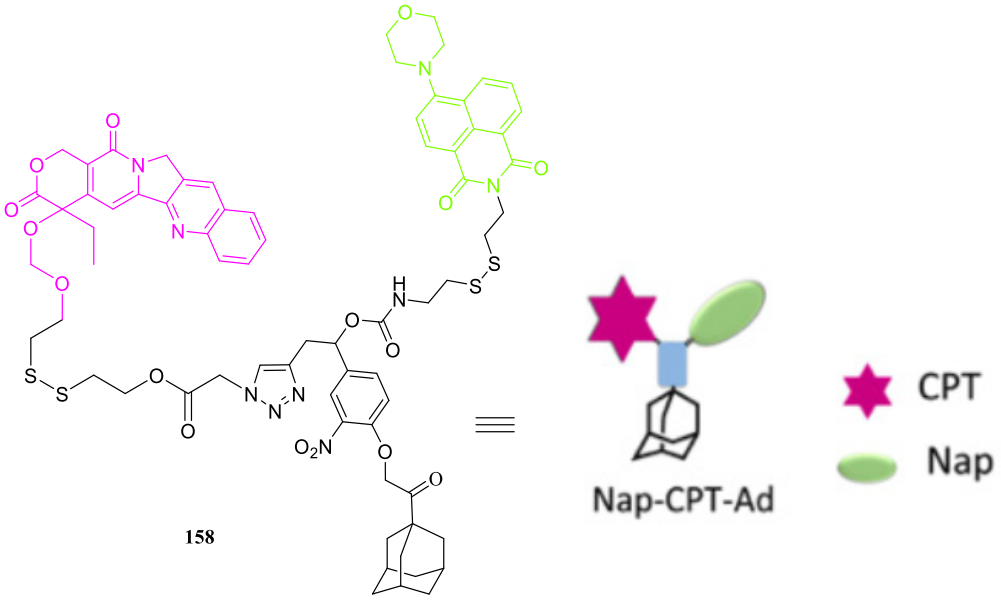


Figure 88 : Structure du Tripode de Zhang et al[201]

I.2 Synthèse de tripodes utilisés pour notre étude

Pour accéder à nos différentes sondes (Figure 85), nous nous sommes inspirés des travaux de Sébastion Papot *et al.*[266] ainsi que ceux de Y. Zhang *et al.*[201].

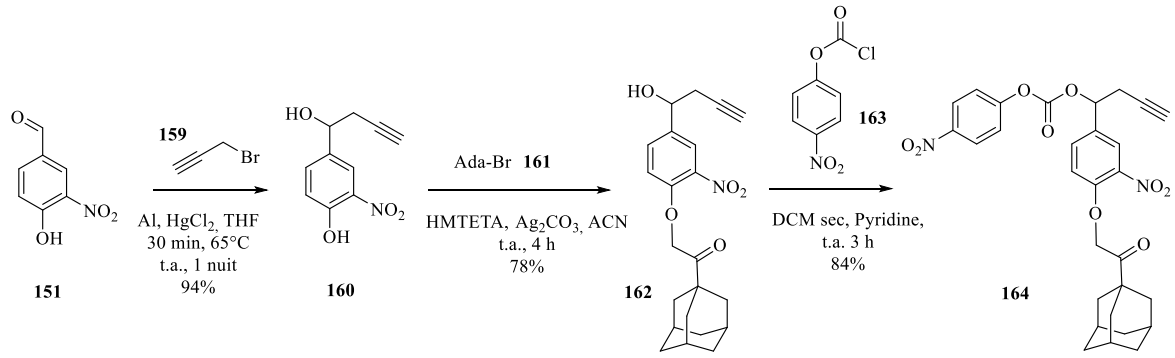


*Schéma 70 : Synthèse du composé **164***

Le composé **164**, squelette de notre tripode a été obtenu en 3 étapes. La première étape est une réaction de type Barbier entre le bromure de propargyle **159** et le 4-hydroxy-3-nitrobenzaldéhyde **151** qui fournit le composé alcool alcyne **160** avec un excellent rendement de 94%. Ensuite un couplage du composé **160** en présence du composé Ada-Br **161** dans de l'acétonitrile à température ambiante durant 3 heures, a donné le composé **162** après purification sur colonne sur gel de silice avec un rendement de 78%. La troisième étape est une activation du composé **162** avec le chloroformiate de *para*-nitrophényle commercial **163** en présence de

pyridine. L'activation du composé **162** est complète après 3 heures et le composé **164** est obtenu après purification sur colonne avec 84% de rendement.

Afin d'ajouter une fonction hydrazine sur le bras gauche du tripode pour former la fonction hydrazone avec le témozolomide, nous avons effectué un couplage peptidique entre le composé activé **164** et le chlorhydrate d'ester de méthyle et de glycine **165** (Schéma 71).

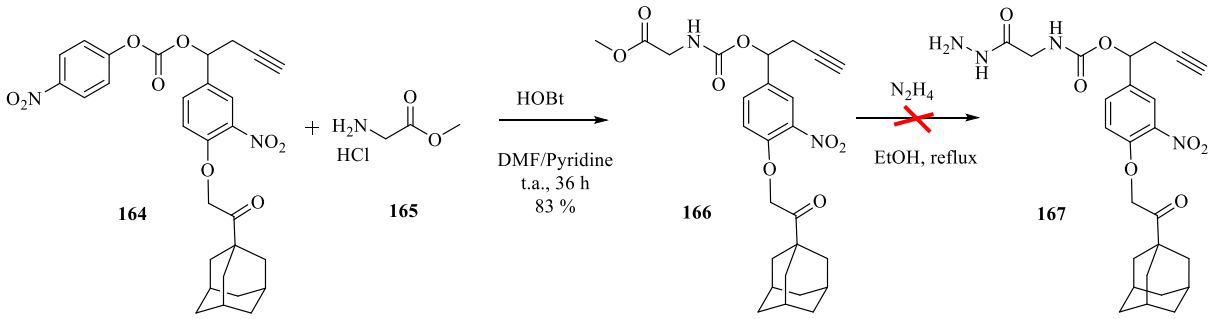


*Schéma 71 : Synthèse du composé **167***

Le couplage peptidique a été réalisé à l'aide de l'agent de couplge HOBt dans un mélange DMF/Pyridine anhydre (4/1) en présence de DIPEA comme base. Après purification nous avons obtenu le composé **166** avec un rendement de 83%. Cependant, le traitement suivant par l'hydrazine en excès au reflux de l'éthanol ne nous a pas permis d'obtenir l'hydrazine désirée **167**. En effet, après plusieurs lavages à l'eau pour éliminer l'excès de réactif, le spectre RMN du proton revèle la disparition attendue du pic de l'ester (en jaune, Spectre 12) démontrant la substitution par l'hydrazine mais également une dégradation du produit final avec la disparition de certains pics tels que NH à 5,34 ppm, CH_2 à 5,02 ppm et CH_2 à 3,96 ppm.



*Spectre 12 : RMN ^{1}H du composé **166** (en rouge) et brut obtenu **167** (en vert) dans du $CDCl_3$*

Une autre stratégie a donc été utilisée en partant d'une fonction hydrazine protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyle **(**Boc) (Schéma 72).

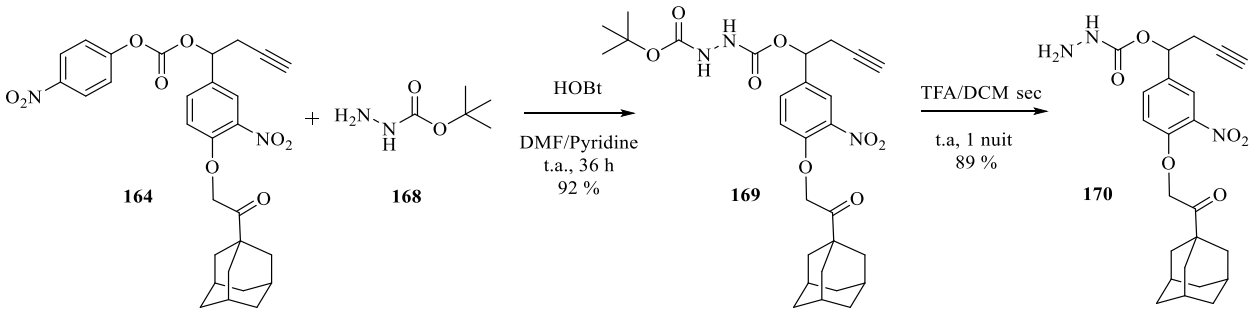


*Schéma 72 : Synthèse du composé **170***

La réaction de couplage peptidique entre le composé **164** et le carbazate de *tert*-butyle **168** a été réalisée suivant le même mode opératoire décrit précédemment. Dans ces conditions, le composé **169** a été obtenu avec un rendement de 92%, aucune dégradation n'a été observée. Ensuite, le composé **169** a été déprotégé par l'acide trifluoroacétique en présence de dichlorométhane anhydre avec un rendement de 89%, validant ainsi la méthologie. Le spectre

RMN ^{1}H du composé **170** confirme la disparition des signaux du groupement *tert*-butyle à 1,45 ppm.

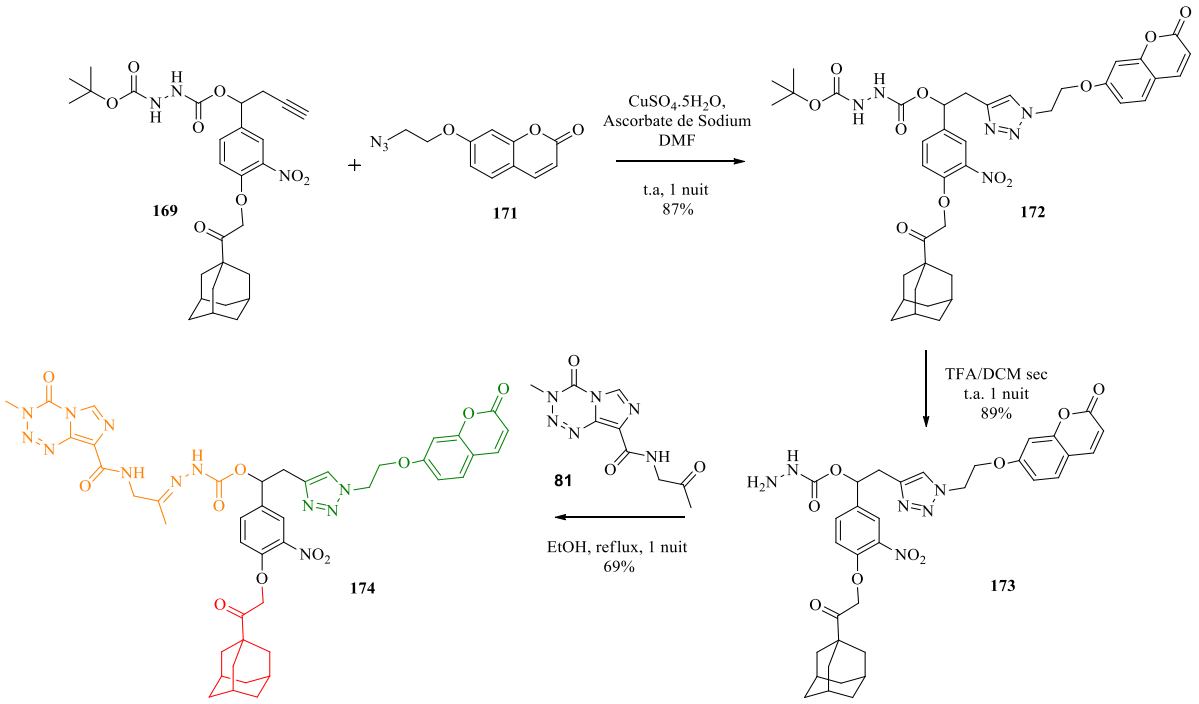


*Schéma 73 : Synthèse du tripode **174***

Le composé **172** a été obtenu par chimie click en présence d'ascorbate de sodium, de sulfate de cuivre dans du DMF anhydre entre l'alcyne porteur de l'hydrazine protégée **169** et la coumarine azoture **171** (fourni par Alexis Lossouarn, doctorant) avec un rendement de 87% après purification sur colonne. Une coupure du groupement Boc en milieu acide donne le composé **173** avec un rendement de 89%. Une dernière étape de condensation du témozolomide **81** avec l'hydrazine **173**, nous a permis d'obtenir notre premier modèle de tripode **174** avec un rendement de 79%. La structure du composé **174** a été confirmée par spectrométrie de masse avec un pic à *m/z* = 927,3137 correspondant à l'adduit $[M+Na]^{+}$.

Une fois ce premier modèle de tripode obtenu, nous nous sommes intéressés à la synthèse des tripodes **178** et **182**.

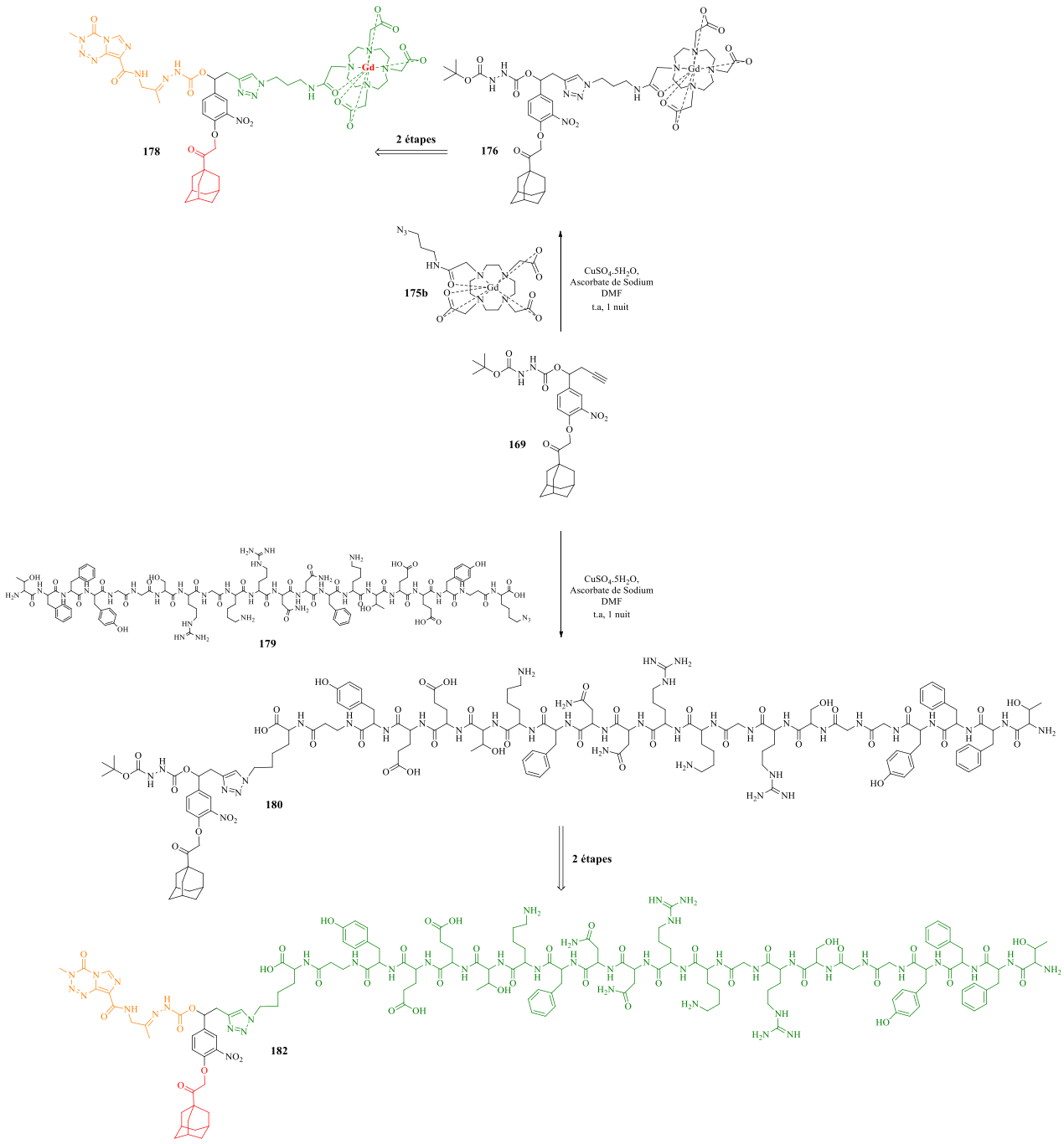


*Schéma 74 : Synthèse des composés **178** et **182***

Dans un premier temps, nous avons préparé le composé **176** dans les mêmes conditions de chimie click décrites précédemment (Schéma 73) à partir du composé **169** et le Gd-DOTA azoture **175b** préalablement préparé. Le composé **175b** a été obtenu à partir du composé **175a** commercial par complexation avec du $GdCl_3.H_2O$ dans l'eau à pH 6-7 (Schéma 75).

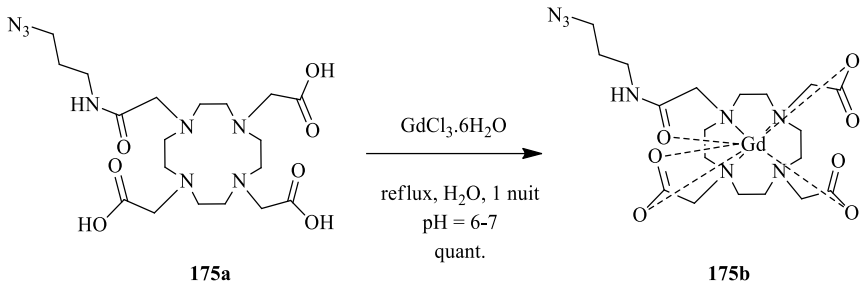


*Schéma 75 : Synthèse du Gd-DOTA azoture **175b***

Ensuite, de la même façon, le composé **180** a été préparé à partir du composé **164** et de l'angiop azoture **179** (fourni par Marc-André Bonin) (Schéma 74). Les composés **176** et **180** sont encore en cours de purification en phase normale. Cette tâche s'est averée difficile en raison de la faible solubilité des composés à la fois dans l'eau, et dans des solvants organiques tels que le méthanol, l'acétonitrile, le dichlorométhane, ou l'acétate d'éthyle.

II. Préparation des complexes d'inclusion du tripode

II.1 Préparation du complexe dans un mélange DMSO/H_2O

Dans cette partie nous nous intéresserons à la préparation des complexes d'inclusion du tripode **174**. Comme nous l'avons vu dans la Partie 2 « Préparation des complexes », il existe différentes méthodes pour former des complexes d'inclusion.

Dans un premier temps, nous avons tenté l'inclusion du composé **174** dans une β-CD, d'après les conditions décrites Schéma 61, Méthode 2 (Schéma 76).

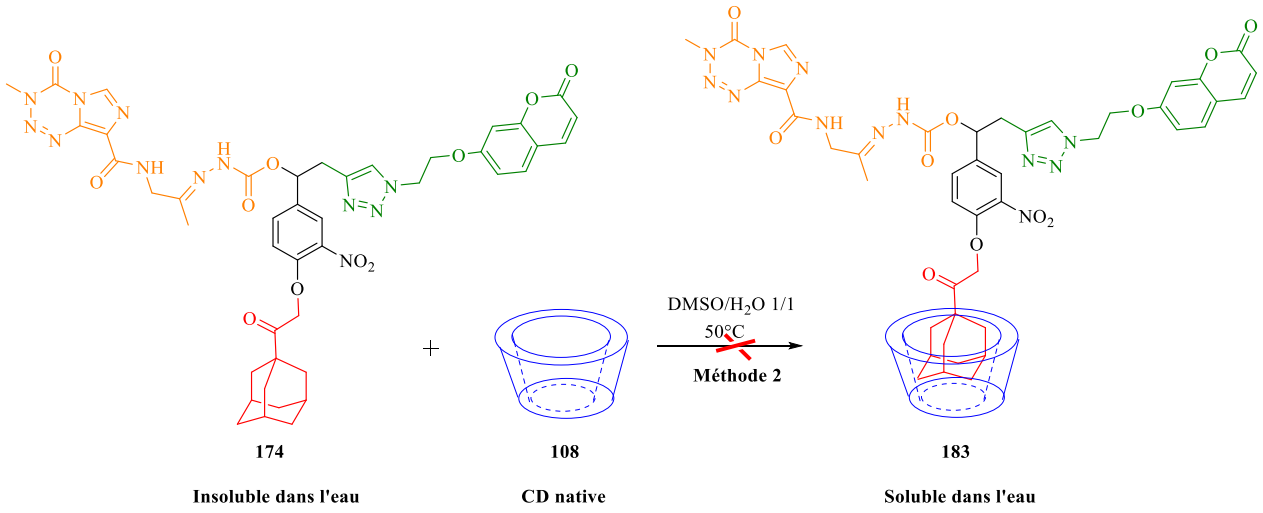


*Schéma 76 : Formation du complexe d'inclusion entre la β-CD et le tripode **174***

La β-CD **108** a été, tout d'abord, solubilisée dans l'eau millQ. Ensuite, une solution du composé **174** dans le DMSO a été préparée. La solution de DMSO est ajoutée à la solution de CD goutte à goutte. Le mélange limpide est chauffé à 50°C pendant la nuit. Une étape de dialyse pendant 24 heures permet d'éliminer le DMSO. La solution aqueuse ainsi obtenue est lyophilisée en un solide blanc. Un spectre NOESY du composé dans du D_2O a été effectué et a montré l'absence de complexation mais surtout une disparition du composé **174**. Le composé **174** insoluble, aurait dû potentiellement précipiter lors de l'étape de dialyse. Or, aucun précipé n'a été observé. Nous avons alors tenté d'encapsuler les précurseurs **162**, **169** et **172** selon le même protocole pour déterminer si la structure du tripode final était la source du problème (Schéma 77).

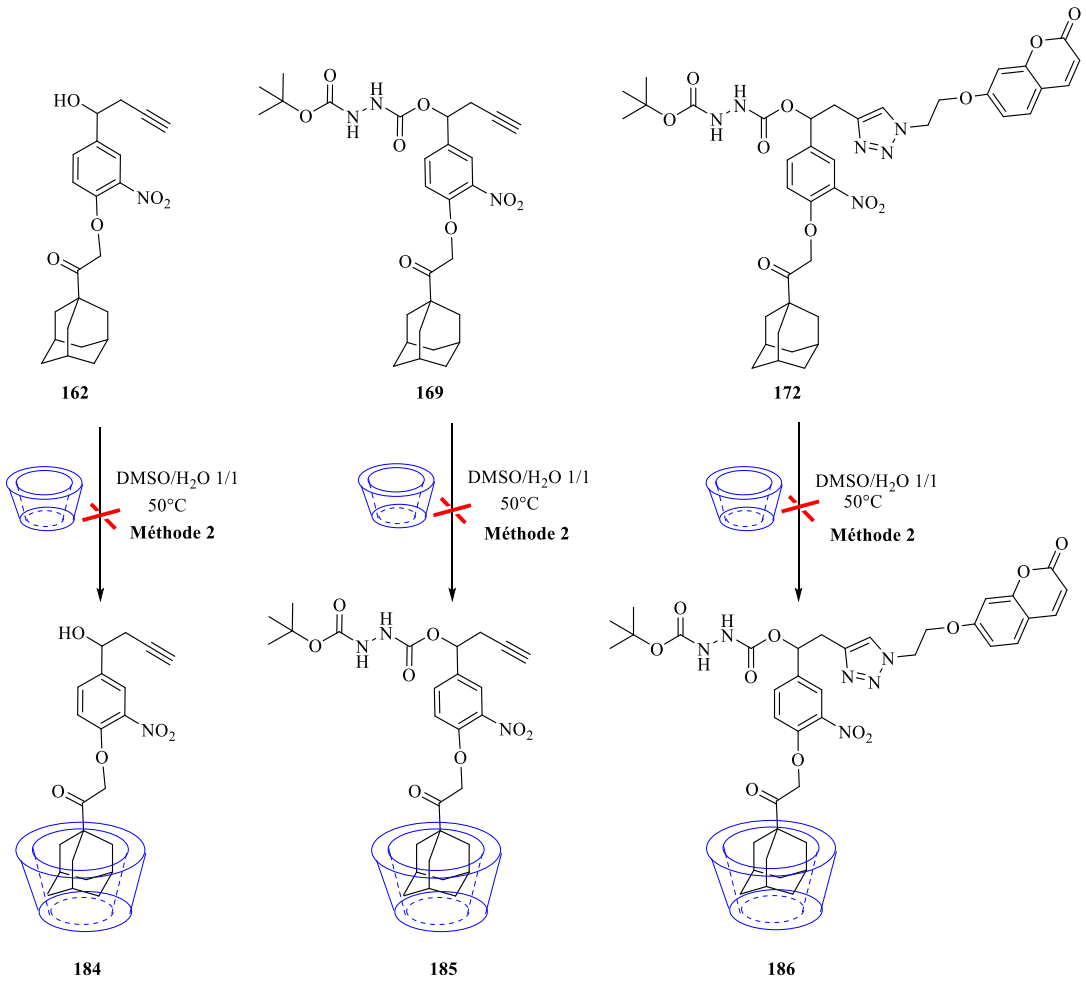


*Schéma 77 : Conditions de formation des complexes d'inclusion entre la β-CD et les précurseurs **162**, **169**, **172***

Les spectres NOESY dans du D_2O identiques ont été obtenus confirmant l'absence de complexes d'inclusion avec, de nouveau, une disparition des composés **162**, **169**, et **172**. Seule la β-CD est récupérée en fin de traitement. Au cours de la dialyse, les précurseurs solubles dans

le DMSO semblent être entraînés hors de la membrane. Les conditions expérimentales ne permettant pas de former les complexes d'inclusion, un mélange ACN/H_2O (1/1) a été testé dans lequel l'hôte et l'invité sont tout deux solubles.

II.2 Préparation du complexe dans un mélange ACN/H_2O

Dans un mélange ACN/H_2O (1/1) à 50°C pendant la nuit, les complexes d'inclusion **184** et **186** ont été obtenus selon la procédure décrite dans le Schéma 61 (*cf.* p. 200, Méthode 2). Nous avons ensuite réalisé un spectre NOESY des composés dans le D_2O. Ces résultats ont montré des interactions entre l'adamantane et les protons H3 et H5 de la cyclodextrine confirmant la formation d'un complexe d'inclusion.

Une tentative de complexation du composé **174** en suivant le même protocole a été effectuée, sans succès (Schéma 78).

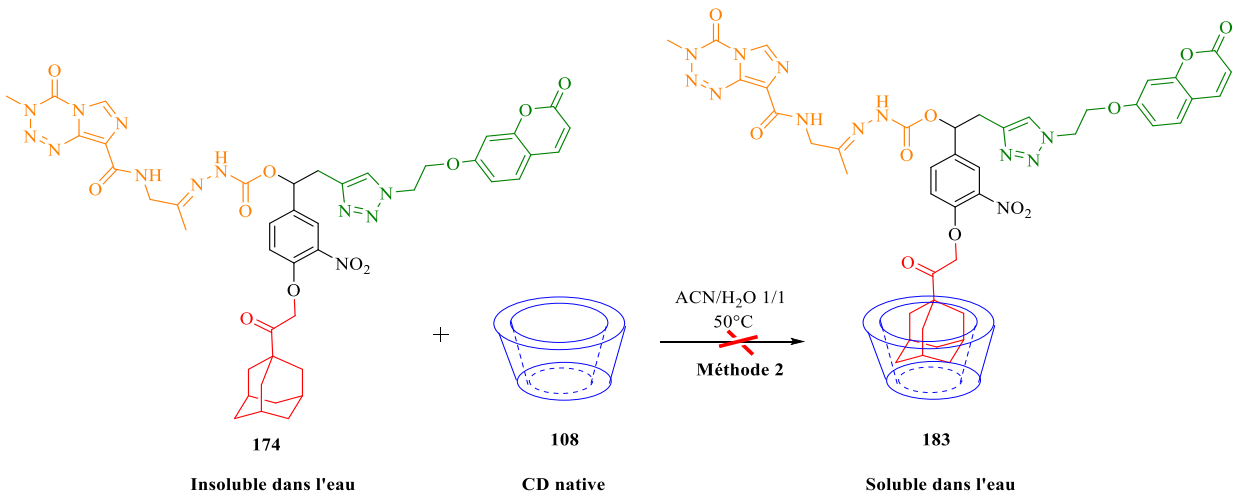


*Schéma 78 : Synthèse du complexe d'inclusion du composé **174** dans le mélange ACN/H_2O (1/1)*

Une autre tentative de complexation du composé **174,** dans les mêmes conditions, en faisant varier la proportion d'acétonitrile/eau à 80/20 a été tentée en vain. Compte-tenu de ces résultats, d'autres approches comme l'utilisation d'un mélange DMF/H_2O ou en faisant varier les températures seront envisagées.

III. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté, la synthèse du premier modèle de tripode **174** en 7 étapes avec un rendement global de 30% (Figure 89). Ce tripode a été fonctionnalisé par un bras gauche témozolomide avec une fonction hydrazone et un bras droit par une coumarine. La synthèse de deux autres modèles de tripode fonctionnalisés soit par un bras droit agent de contraste **178** ou un bras angiopep **182** a été également présenté. Ces deux composés sont en cours de purification.

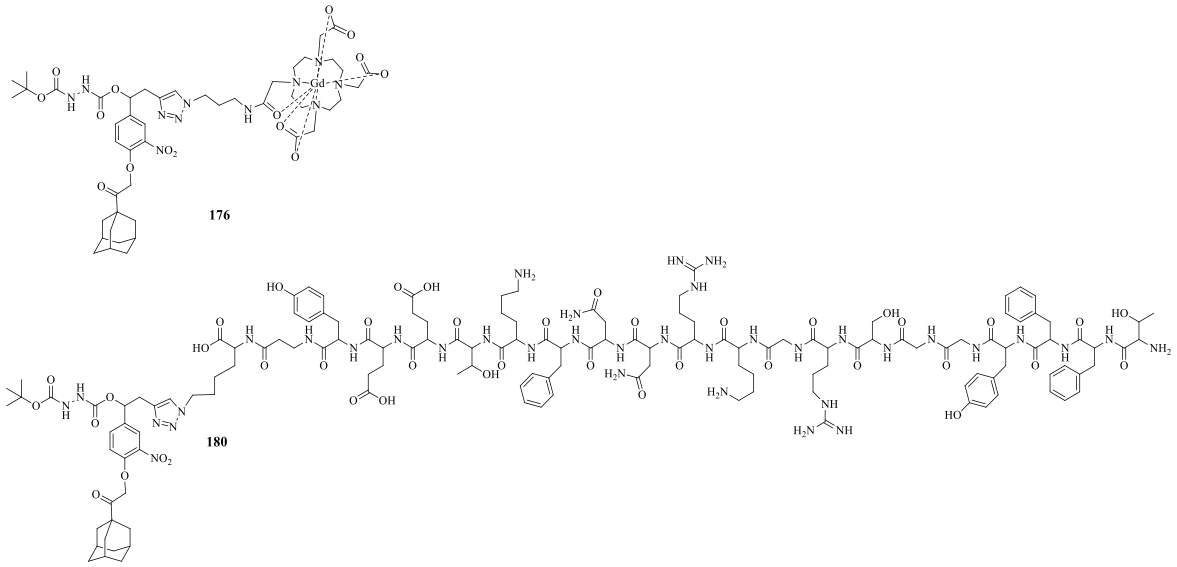


*Figure 89 : Structure des composés **176** et **180***

De plus, nous avons synthétisé les complexes d'inclusion entre la β-CD et les précurseurs de tripode **162** et **172**. Le complexe d'inclusion avec le tripode **174** n'a cependant pas été obtenu en raison de la faible solubilité du produit dans les solvants organiques (ACN, DMSO). L'étude doit donc être approfondie pour identifier des conditions optimales d'inclusion.

Partie 4 :

Test *in vitro* et *in vivo*

I. Relaxivité des agents de contraste

I.1 Relaxivité des agents de contraste à 20 MHz

L'efficacité des complexes de gadolinium en tant qu'agents de contraste pour l'IRM est communément décrite par leur relaxivité r_1. Celle-ci représente l'augmentation paramagnétique du temps de relaxation longitudinale des protons de l'eau pour une concentration en agent de contraste donnée (*cf*. Partie 2).

La détermination de la concentration précise en gadolinium est réalisée par spectrométrie à plasma induit et émission optique (ICP-OES : *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry).* Ce dosage s'est avéré très important du fait de la forte hydroscopie des complexes Gd-CD. Un séchage méticuleux est donc nécessaire (sous pompe à vide, au dessicateur).

Afin d'étudier leur efficacité, nous avons mesuré leur relaxivité.

Les mesures de la relaxivité ont été effectuées sur un Brucker mq20 Minispec à 37°C et 0,47 T (20 MHz).

La relaxivité a été mesurée en traçant la droite représentant l'inverse de la vitesse de relaxation longitudinale (1/T1) en fonction de la concentration en Gd. En effet, le coefficient directeur de la droite ainsi tracée est égale à la relaxivité selon l'équation

$$\left(\frac{1}{T1}\right) obs = \left(\frac{1}{T1}\right) dia + \mathrm{r1}[Gd] \qquad \textit{Equation (VII)}$$

Où r_1 est la relaxivité de l'AC en $mM^{-1}.s^{-1}$, [Gd] est la concentration en Gd de l'agent de contraste en $mmol.L^{-1}$, (1/T1)dia est la relaxation en l'absence d'agent de contraste (composante diamagnétique).

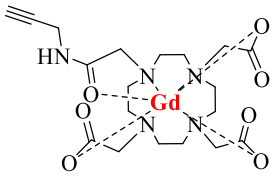
I.1.1 Relaxivité du composé alcyne-Gd-DOTA 119

Une solution du composé alcyne-Gd-DOTA **119** ([Gd] = 0,694 mM) a été préparée dans de l'eau MillQ et a été diluée à différentes concentrations (Tableau 15). À partir des valeurs de T1 observées, une droite a été tracée (Figure 90).

Les droites résultantes ont été ajustées à une fonction monoexponentielle pour obtenir la valeur de la relaxivité r_1. Les valeurs de relaxation ont été mesurées trois fois et la moyenne a été calculée.

*Tableau 15 : Mesure de 1/T1 en fonction des différentes concentrations de l'alcyne-Gd-DOTA **119***

Concentration (M)	T1 (s)	1/T1 (s^{-1})
69,4286 E-5	0,281	3,55872
34,7143 E-5	0,480	2,08333
17,3571 E-5	0,710	1,40845
8,67857 E-05	0,930	1,07527
4,33928 E-05	1000	1



119

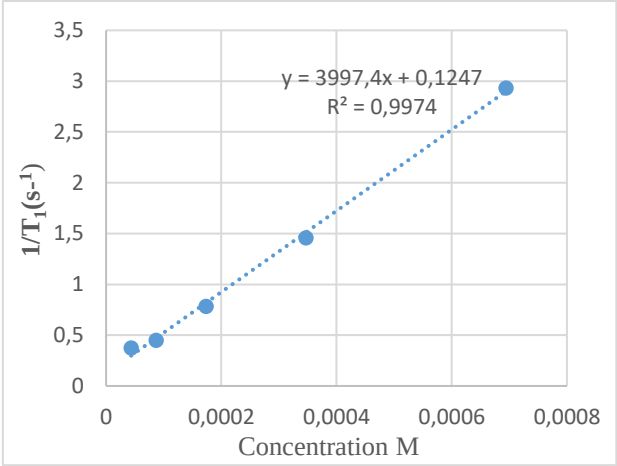


*Figure 90 : Représentation graphique de l'inverse du temps de relaxation en fonction de la concentration du composé **119***

La relaxivité du composé alcyne-Gd-DOTA **119** a été déterminée à r_1 = 3,99 $mM^{-1}.s^{-1}$.

I.1.2 Relaxivité du composé CD-Gd-DOTA 121

De manière similaire, nous avons déterminé la relaxivité du composé **121**, la CD-Gd-DOTA à cinq concentrations différentes (Tableau 16).

*Tableau 16 : Mesure de 1/T1 en fonction des différentes concentrations de CD-Gd-DOTA **121***

Concentration (M)	T1 (s)	1/T1 (s^{-1})
115,4127 E-5	0,0894	11,18568
57,7063 E-5	0,172	5,813953
28,8532 E-5	0,316	3,16455
14,4266 E-5	0,563	1,77619
7,21329 E-05	0,910	1,09890

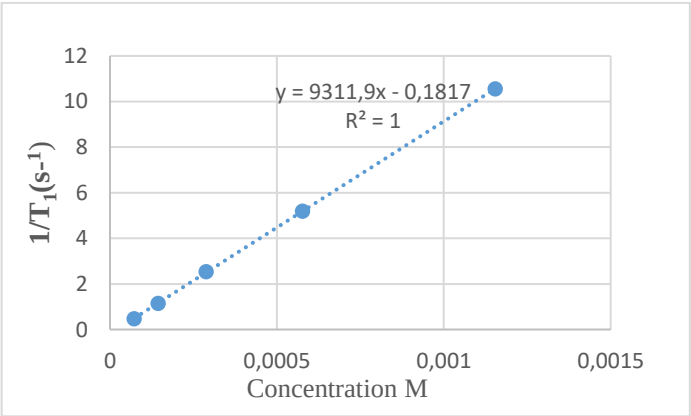


*Figure 91 : Représentation graphique de l'inverse du temps de relaxation en fonction de la concentration de composé **121***

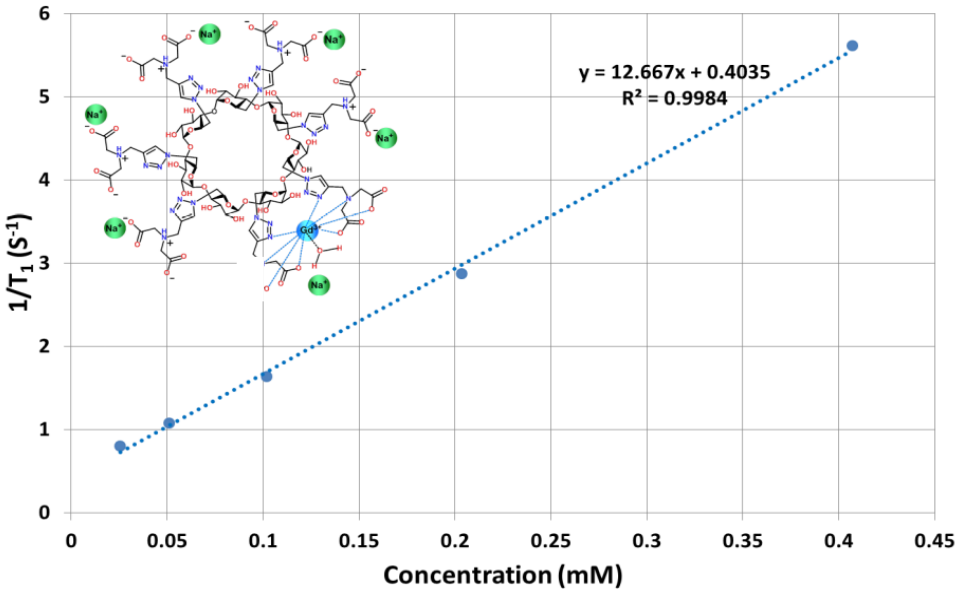
La relaxivité du composé **121** a été déterminée à r_1 = 9,31 $mM^{-1}.s^{-1}$, soit environ 2,5 fois supérieure à celle du dérivé **119** alcyne Gd-DOTA (r_1 = 3,99 $mM^{-1}.s^{-1}$). La cyclodextrine contribue donc à améliorer significativement la relaxivité r_1. Cet accroissement est lié en partie à l'augmentation de la masse moléculaire du complexe de gadolinium, qui peut ainsi ralentir la

vitesse de rotation corrélationnelle en favorisant l'échange de molécules d'eau entre les différentes sphères de coordination du complexe de gadolinium.[62]

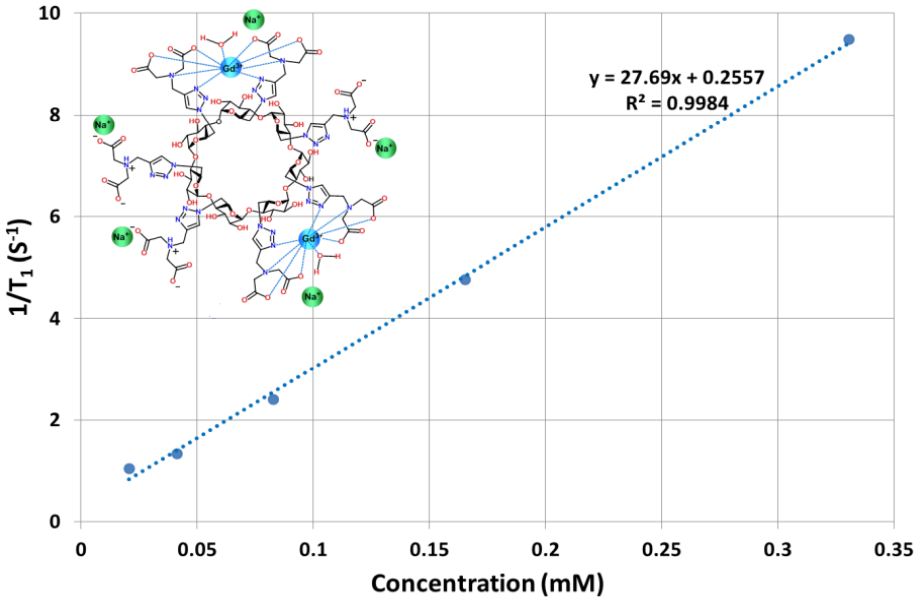
I.1.3 Relaxivité des composés 130, 131, 132

Comme pour les composés précédents, les valeurs de relaxivité des composés **130**, **131** et **132** ont été mesurées (Figure 92).

A



B



C

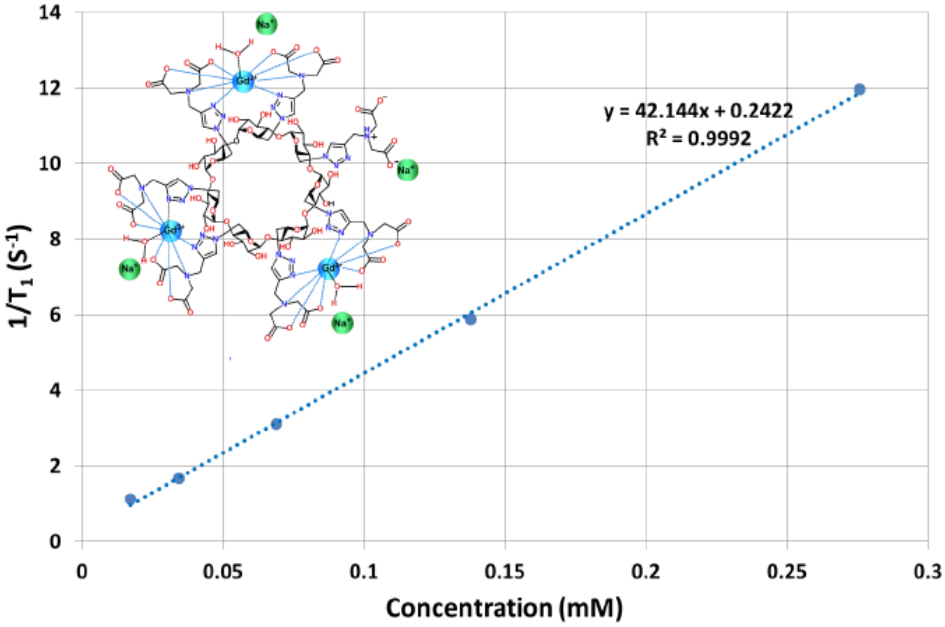


Figure 92 : Représentation graphique de l'inverse du temps de relaxation en fonction de la concentration de composé : A) ***131****, B)* ***132****, C)* ***133***

Pour les ligands **130**, **131** et **132**, des valeurs de relaxivité de 12,67 $mM^{-1}.s^{-1}$, 27,69 $mM^{-1}.s^{-1}$ (soit 13,84 $mM^{-1}.s^{-1}$ par Gd) et 42,14 $mM^{-1}s^{-1}$ (soit 14,05 $mM^{-1}s^{-1}$ par Gd) correspondant à la présence d'un à trois atomes de gadolinium ont été obtenues, respectivement.[239]

I.1.4 Relaxivité des composés 145 et 146

Pour les complexes d'inclusion **145** et **146** (Figure 95), des solutions de concentrations [Gd] = 0,48 mM et 0,84 mM ont été préparées. Nous avons mesuré le T1 à cinq concentrations (Figure 96). Le complexe d'inclusion **146** correspond à l'inclusion du produit d'hydrolyse de la fonction hydrazone du complexe d'inclusion **145**. Cette analyse est en effet importante pour évaluer l'impact de la libération du principe actif sur les valeurs de relaxivité. Une variation de 10% entre les deux relaxivités est suffisante pour des applications IRM *in vivo*.

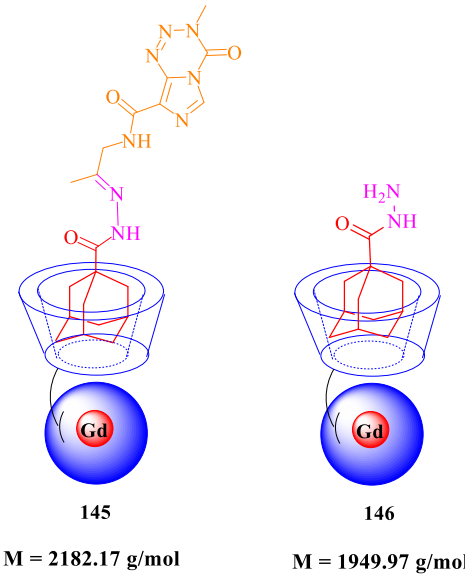
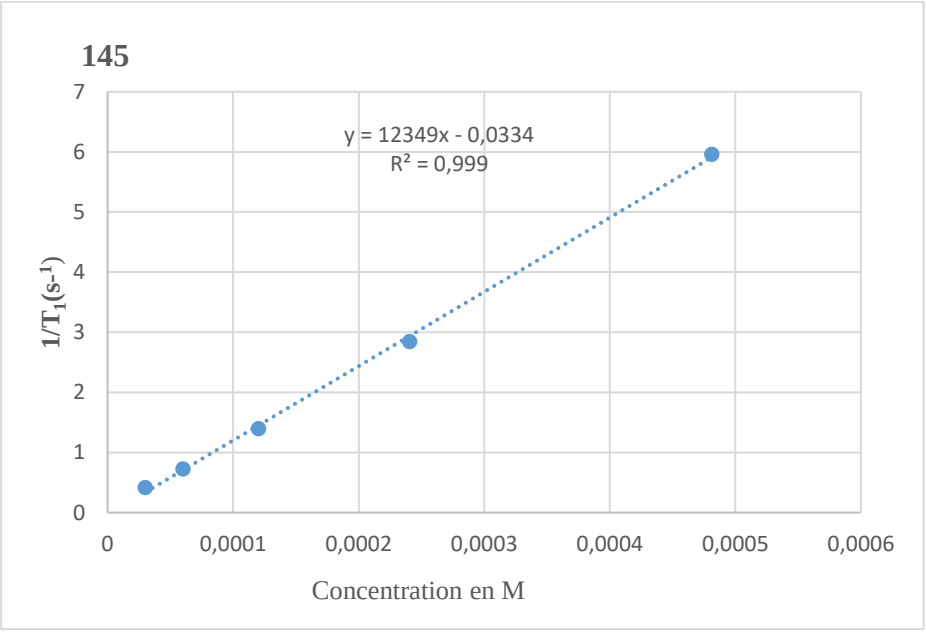


*Figure 93 : Structures des agents de contraste **145** et **146***



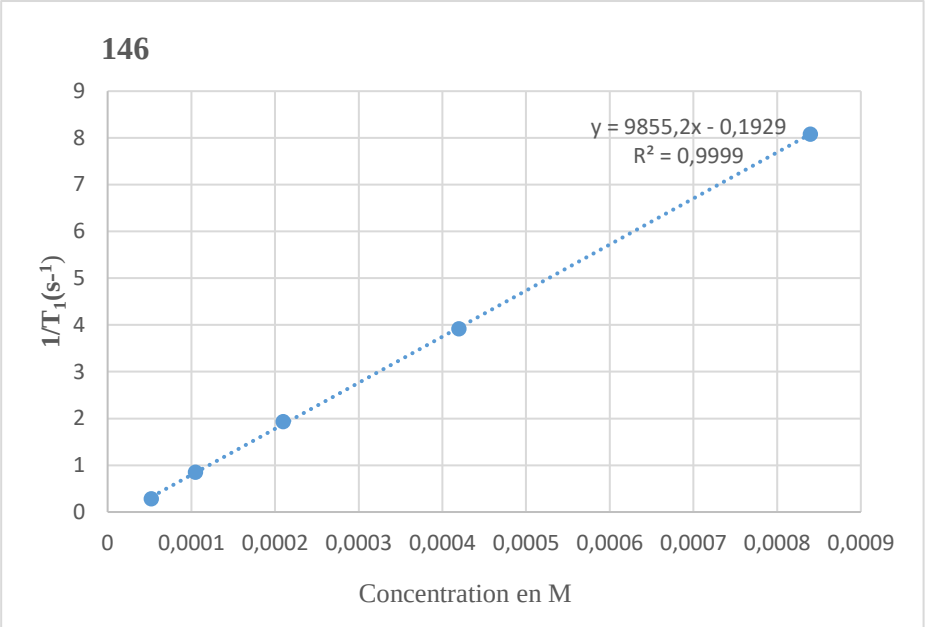


*Figure 94 : Représentation graphique de l'inverse du temps de relaxation en fonction de la concentration de composé **145** et **146***

Nous avons obtenu une relaxivité de r_1 = 12,34 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour le complexe **145** et r_1 = 9,85 $mM^{-1}.s^{-1}$ pour le complexe **146**. Les complexes hôte-invité **145** et **146** sont plus rigides et ont une rotation plus lente en solution, ce qui engendre une relaxivité plus importante (temps de corrélation rotationnel τ_r plus grand). Le complexe **145** qui est plus lourd (masse moléculaire de 2182 g/mol), possède une relaxivité plus importante que celle du complexe **146** (1949 g/mol), ce qui représente une variation de 20% entre les deux relaxivités mesurées.

Ces résultats confirment les observations précédemment rapportées[62,63] et sont encourageants pour espérer observer par IRM une variation de la relaxivité lors de la libération du TMZ par hydrolyse *in vivo*.

I.2 Relaxivité des agents de contraste à 280 MHz

Des tests préliminaires *in vitro* ont été également réalisés en collaboration avec Samuel Valable de l'équipe CERVOxy (Cycéron, Caen). Nous avons choisi de tester les agents de contraste suivants : **121**, **132**, **130**, **148**, **147** et **149** nommés respectivement **CA1**, **CA2**, **CA3**, **CA4**, **CA5** et **CA6** (Figure 95). L'efficacité de ces six agents de contraste ont été évaluées sur un aimant horizontal Biospec 70/30 (Bruker, Ettlingen), 7 T à 37°C. Les relaxivités obtenues ont été comparées avec celle du Gd-DOTA.

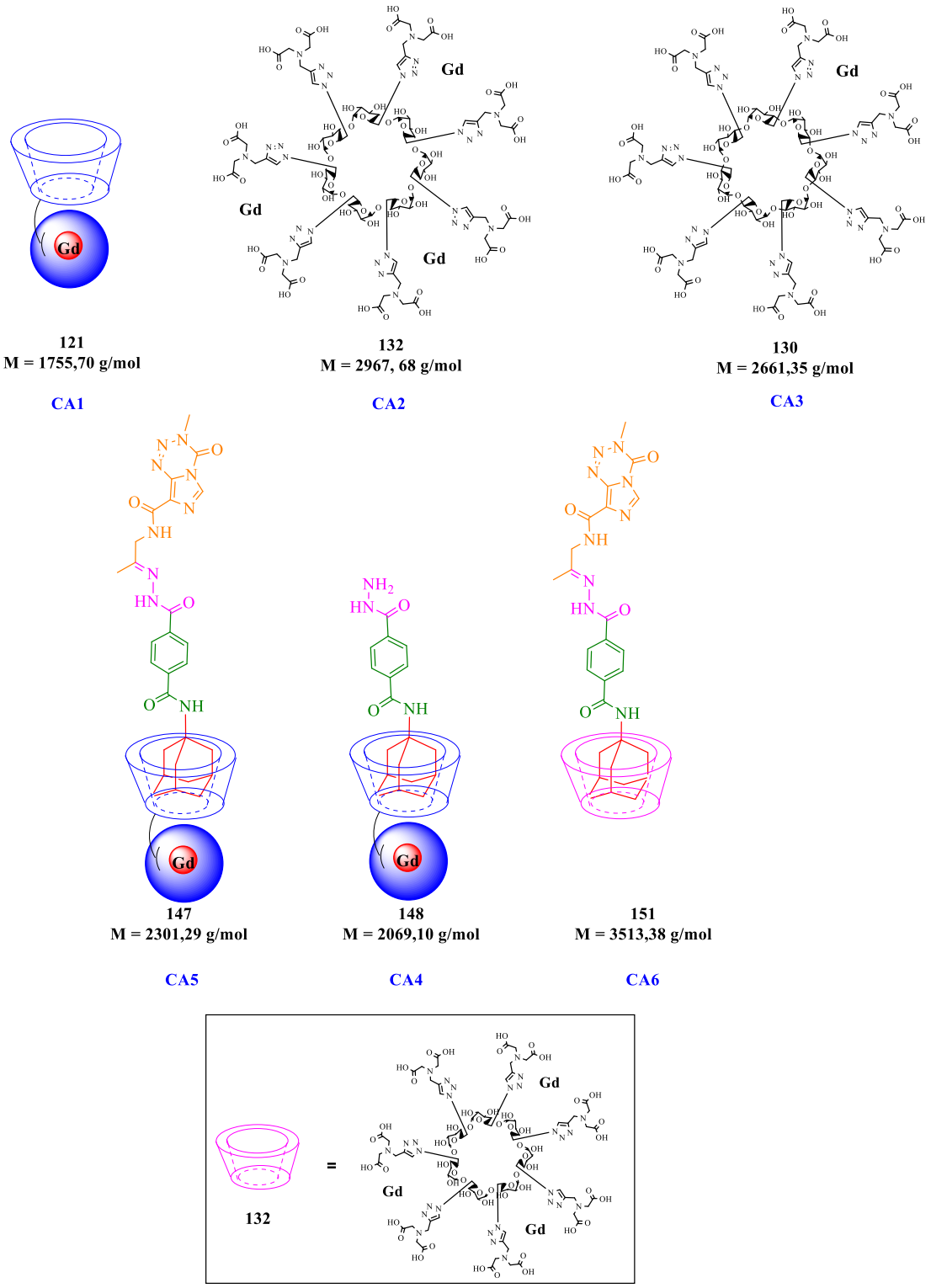


Figure 95 : Structures des agents de contraste testés à 7 T

Tout d'abord, nous avons mesuré le signal avec tous les agents de contraste à une concentration similaire de 0,05 mM. Aucune image pondérée en T2w ne fut observée (Figure 96, panel de gauche). En revanche, la cartographie T1 a confirmé un effet remarquable pour

certains échantillons. L'eau est caractérisée par une valeur T1 de 2683 msec, le Dotarem à 1 mM a donné une valeur de T1 égale à 219 msec. Les valeurs T1 pour les différents agents de contraste dans l'eau, présentés dans le tableau suivant peuvent être classés selon l'ordre croissant **CA6** < **CA2** < **CA3** < **CA4** < **CA1** < **CA5**.

Tableau 17 : Valeurs T1 des différents ACs

Composés (mM)	Valeur T1 (msec)
Eau	2683
Gd-DOTA 1	219
CA1 0,05	1460
CA2 0,05	482
CA3 0,05	1161
CA4 0,05	1446
CA5 0,05	1509
CA6 0,05	445

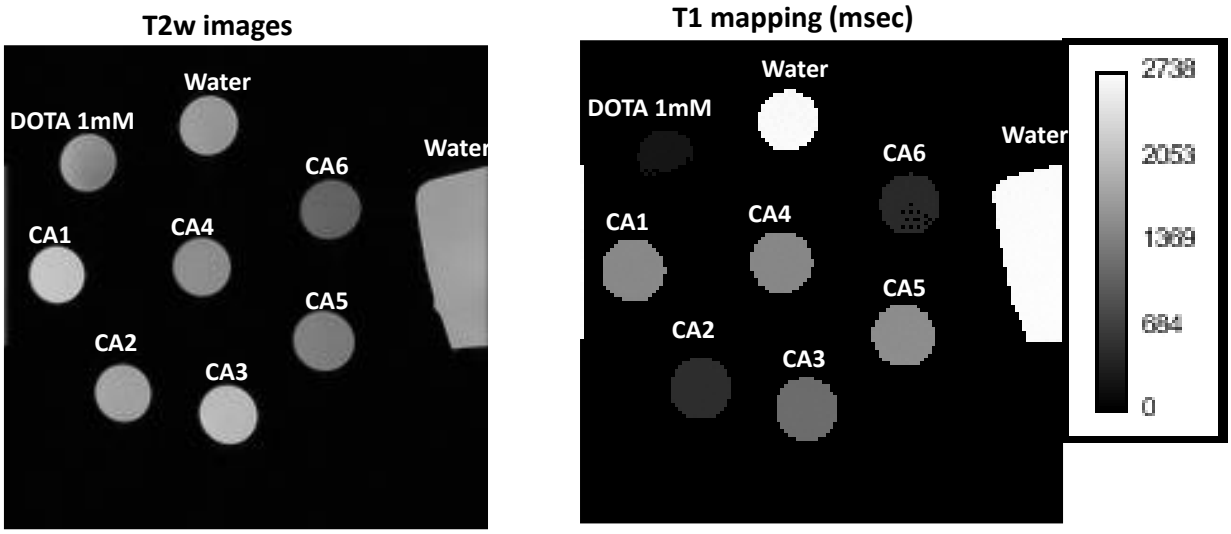


Figure 96 : Images du signal T1 en fonction du temps d'inversion pour chaque agent de contraste à 0,05 mM, eau et Dotarem à 1 mM

Chaque agent de contraste a ensuite été dilué en série dans un milieu tamponné TRIS à pH = 7 et nous avons tracé un graphique sur les valeurs (1/T1) en fonction de la concentration. Le classement des performances par ordre décroissant a été confirmé : **CA6** > **CA2** > **CA3** > **CA1** > **CA4** > **CA5**. Dans cette configuration expérimentale, la relaxivité du Dotarem a été mesurée à 1,98 $mM^{-1}.s^{-1}$.

Tableau 18 : Relaxivités des ACs à 7 T

	Relaxivité $mM^{-1}.s^{-1}$ à 7 T	**Relaxivité $mM^{-1}.s^{-1}$ à 0,5 T**
CA1	6,18	9,31
CA2	33,82	42,14
CA3	11,39	12,66
CA4	6,00	-
CA5	5,28	-
CA6	37,17	-

En termes de relaxivité, les agents de contraste **CA6**, **CA2** et **CA3** à base de ligands iminoacétate ont montré de forts effets T1. Par contre, pour les composés **CA1**, **CA4** et **CA5** à base de ligand DOTA, les relaxivités ne sont pas en adéquation avec celles observées à 0,5 T. En effet, d'après les résultats obtenus sur le minispec, les relaxivités devraient suivre l'ordre suivant : **CA5** > **CA4** > **CA1**. Or ces agents de contraste ont montré dans ces conditions un comportement inverse à celui pré-évalué sur minispec à 0.5 T : **CA1** > **CA4** > **CA5.**

Ces valeurs de relaxivité enregistrées lors des études *in vitro* à 7 T sur les composés **CA1**, **CA4** et **CA5** pourraient être faussées par une sous-évaluation de la concentration exacte en Gd, en raison du caractère hygroscopique relativement important de ces agents de contraste. Pour ces échantillons, l'intervalle entre le dosage exact de la quantité de Gd, et l'analyse IRM à 280 MHz ayant été important et les quantités analysées faibles (1 mg), ces incertitudes peuvent expliquer cette différence de résultats. Un protocole de préparation des échantillons incluant des tâches supplémentaires a donc depuis été mis en place pour pallier ce problème technique (séchage, dosage, envoi des produits en solution).

II. Passage de la BHE

L'un de nos objectifs lors de ces travaux de thèse était de vectoriser le témozolomide sur les sites cancéreux après passage de la BHE. Pour cela, des tests *in vivo* ont été réalisés sur les complexes d'inclusion **3** et **4** porteurs d'une fonction hydrazone (Figure 97). Ces études ont été réalisées par Renaud Parment (Doctorant) sous la direction du Dr. Hélène Castel de l'équipe « Astrocytes and Vascular Niche - Cancer and Cognition Platform link », Unité Inserm de l'Université de Rouen.

Les composés **138** et **150** ont été sélectionnés car ils portent un motif coumarine, fluorescent, utile pour suivre le passage de la BHE. Le composé **43** a été complexé par une cyclodextrine native comme molécule témoin pour former le complexe d'inclusion **3.** Ensuite, le même composé **43** a été complexé par une cyclodextrine fonctionnalisée par l'angiopep **134** pour suivre le passage potentiel de la BHE (complexe d'inclusion **4**, Figure 97).

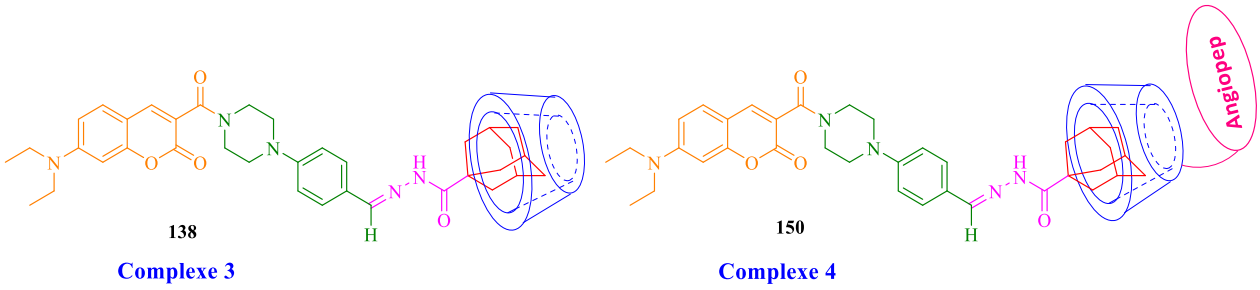


Figure 97 : Structures des complexes d'inclusion testés in vivo

Pour réaliser ce test, les complexes d'inclusion **3** et **4** ont été injectés par voie rétro-orbitaire sur des souris C57Bl/6 âgées, mâles (15 µg / 100 µl NaCl). Les souris contrôles n'ont pas reçu d'injection. Après 4 heures d'incubation, les souris ont été sacrifiées et les cerveaux collectés, puis congelés. Les cerveaux ont été coupés en sections coronales de 20 µm d'épaisseur. Les coupes de cerveau ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires : anti-NeuN pour la détection des neurones matures, anti-GFAP pour la détection des astrocytes, anti-CD31 et anti-podocalyxin, pour le marquage de l'endothélium vasculaire (Figure 98).

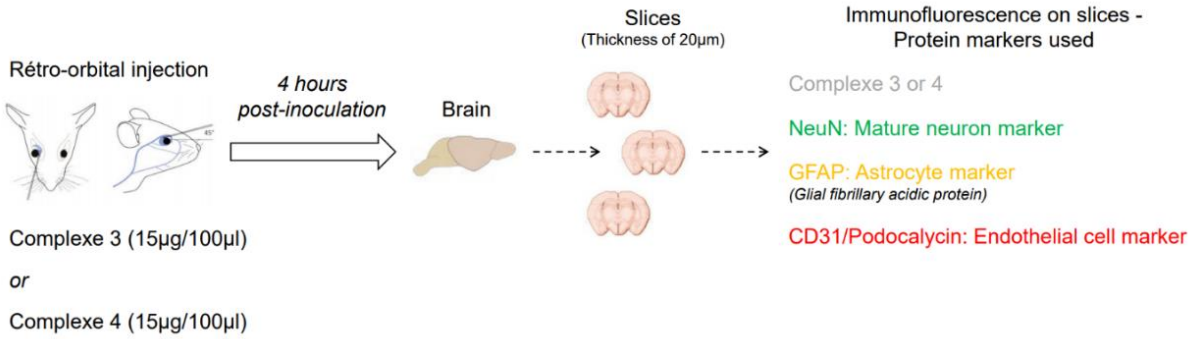


*Figure 98 : Protocole du test in vivo sur les complexes d'inclusion **3** et **4***

Ensuite, des images des différentes régions du cerveau ont été capturées à l'aide d'un microscope confocal Leica SP8.

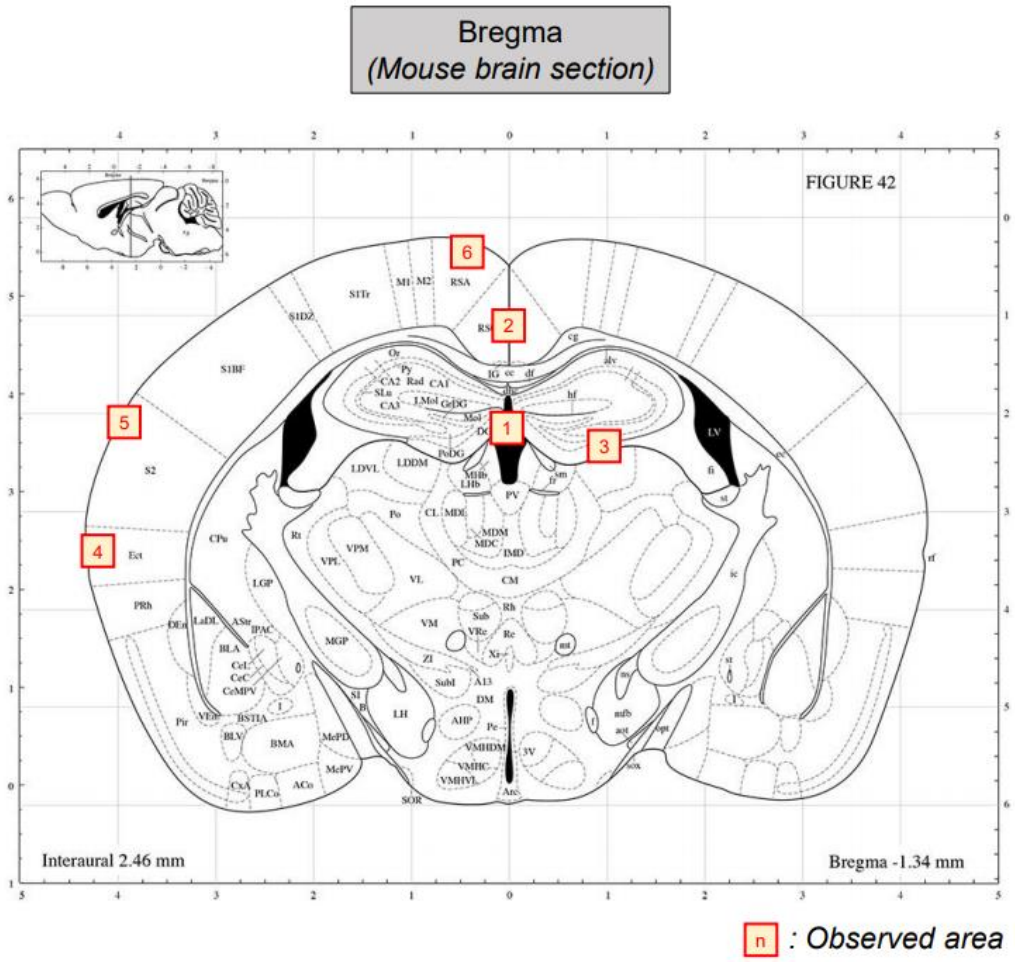


Figure 99 : Atlas du cerveau d'une souris[268]

Les résultats des images obtenues sont présentés dans la Figure 100.

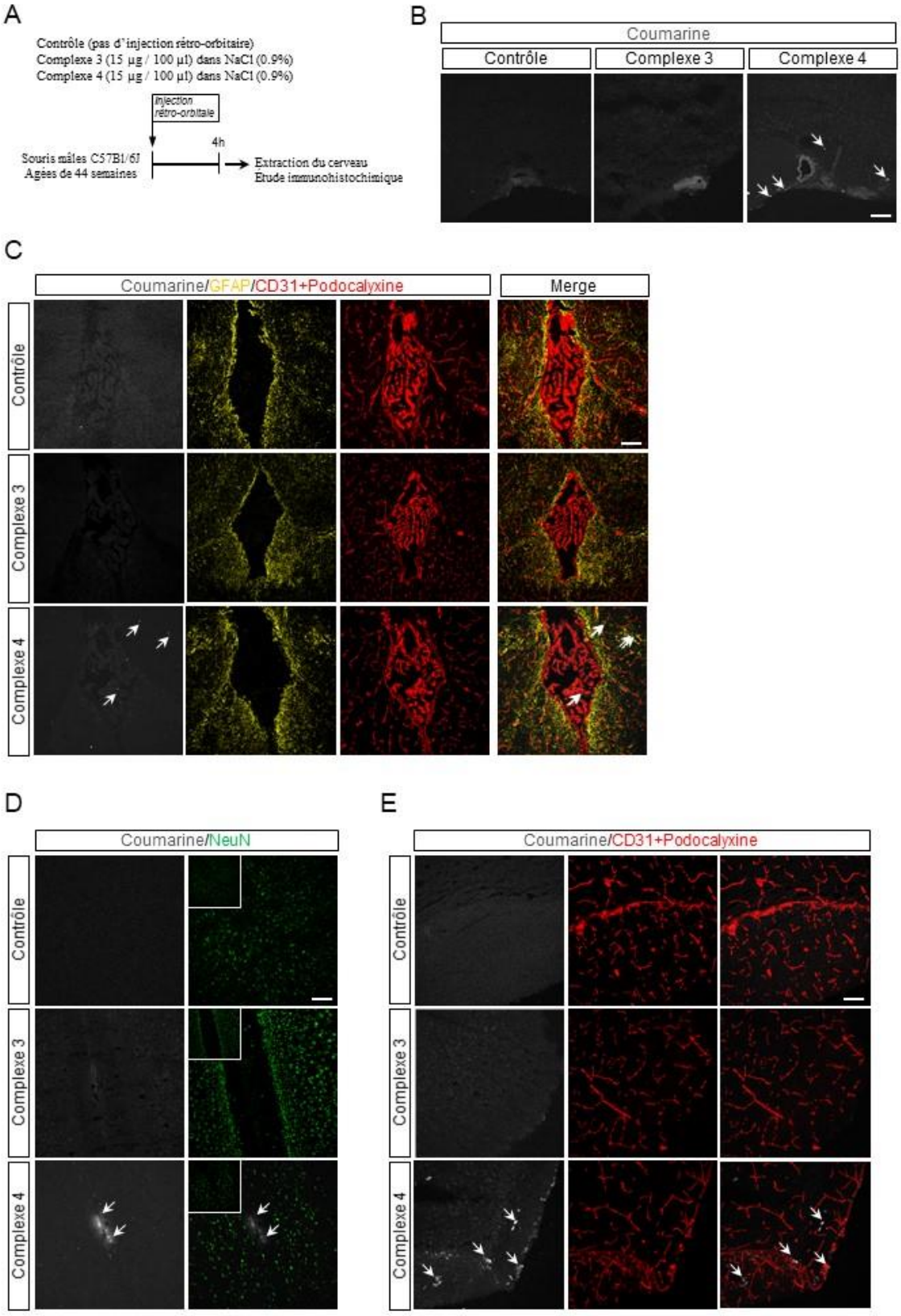


*Figure 100 : Détection dans le cerveau des complexes d'inclusion **3** et **4** après injection rétro-orbitaire chez la souris. Échelle : 100 µm.*

Le schéma **A** montre la chronologie entre l'injection rétro-orbitaire et le prélèvement du cerveau permettant d'évaluer la présence des complexes **3** et **4** dans la structure cérébrale (Figure 100). Quatre heures après l'unique injection, les souris ont été sacrifiées et les cerveaux ont été récupérés pour étude immunohistochimique.

Le schéma **B** sont des images représentatives de la détection de la coumarine au niveau de vaisseaux cérébraux. La coumarine (en gris) est uniquement détectable à proximité de vaisseaux cérébraux chez les souris ayant uniquement reçues l'injection rétro-orbitaire du complexe **4** (flèche blanche).

Le schéma **C** présente des images de la détection de la coumarine au niveau du troisième ventricule. La coumarine (en gris) est observable à proximité de structures endothéliales (détectées à l'aide de deux anticorps anti-CD31/anti-Podocalyxine, rouge) et astrocytaires (marquées par un anti-GFAP (*Glial fibrillary acidic protein)*, jaune) au niveau du troisième ventricule de cerveau des souris injectées par le complexe **4** (flèche blanche).

Le schéma **D** montre la détection de la coumarine au niveau de la jonction interhémisphérique. La fluorescence émise par la coumarine (en gris) est visible à proximité de cellules neurales (marquées par un anti-NeuN (*Neuronal Nuclei Antigen)*, vert) au niveau de la jonction interhémisphérique des souris injectées par le complexe **4** uniquement (flèche blanche).

Enfin, le schéma **E** montre la détection de la coumarine dans le cortex cérébral. La coumarine (en gris) est observée au niveau de cellules endothéliales (CD31/Podocalyxine, rouge) dans le cortex des souris injectées par le complexe **4** uniquement (flèche blanche).

Sur des coupes de cerveau de souris contrôle ou sur les coupes de cerveau de souris euthanasiée après 4 heures, après une injection rétro-orbitaire du complexe d'inclusion **3**, aucun marquage de la molécule à la longueur de 405 nm (coumarine) n'est détecté. En revanche, 4 heures après l'injection rétro-orbitaire du complexe d'inclusion **4**, des signaux de fluorescence sont détectés dans certaines zones cérébrales des animaux traités, c'est à dire au niveau de la jonction inter-hémisphérique, des vaisseaux, du cortex et à proximité de cellules astrocytaires (GFAP+) et endothéliales (CD31/Podocalyxin+) (Figure 103). Ces résultats sont prometteurs et démontrent un premier passage de la BHE par le complexe **4** et par conséquent l'efficacité de l'angiopep. La présence de la CD ne semble donc pas perturber les propriétés transmembranaires du peptide.

III. Etude de l'effet cytotoxique du témozolomide

Afin de tester les propriétés cytotoxiques du témozolomide, deux lignées tumorales humaines ont été utilisées : les cellules U87 et 8 MG, provenant de glioblastomes humains. Les tests *in vitro* ont été effectués sur les composés **138** (complexe **3**), **141** (complexe **2**), **143** (complexe **1**) et **150** (complexe **4**) (Figure 101). Les complexes d'inclusion (complexes **1** et **2**) sont deux dérivés de témozolomide liés à l'adamantane par une fonction hydrazone. Ces deux composés ont été sélectionnés pour leurs meilleures solubilités dans l'eau, le témozolomide seul étant insobuble en milieu aqueux.

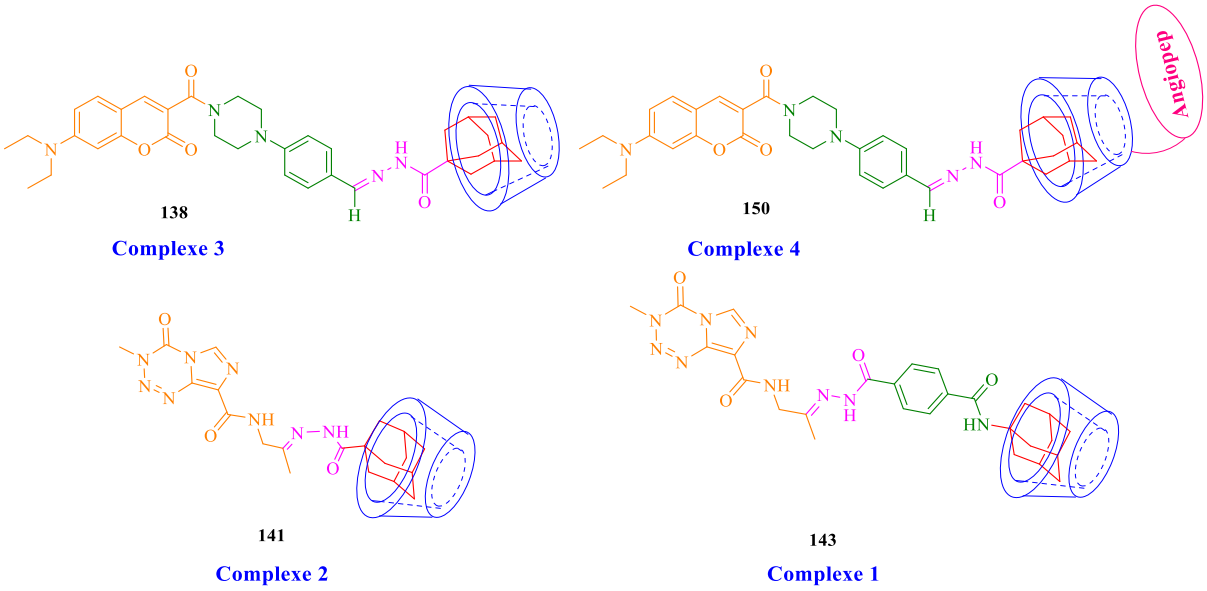


Figure 101 : Structures des complexes testés in vitro

Pour réaliser ce test, les deux lignées cellulaires ont été cultivées. Les lignées cellulaires de glioblastome (GBM) humain U87MG ou 8MG ont été ensemencées dans un milieu DMEM (Milieux de Eagle Modifiés de Dulbecco) dans des chambres 8 puits coatées et incubées dans un incubateur en atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO_2. Les complexes d'inclusion **1**, **2**, **3** et **4** ont été incubés avec les cellules à une concentration de 100 µM, pendant 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 3 heures et 6 heures. Les cellules ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-lamin A/C capables de détecter la membrane des noyaux. Les images ont été capturées à l'aide d'un microscope confocal Leica SP8 et les résultats obtenus sont présentés Figure 102.

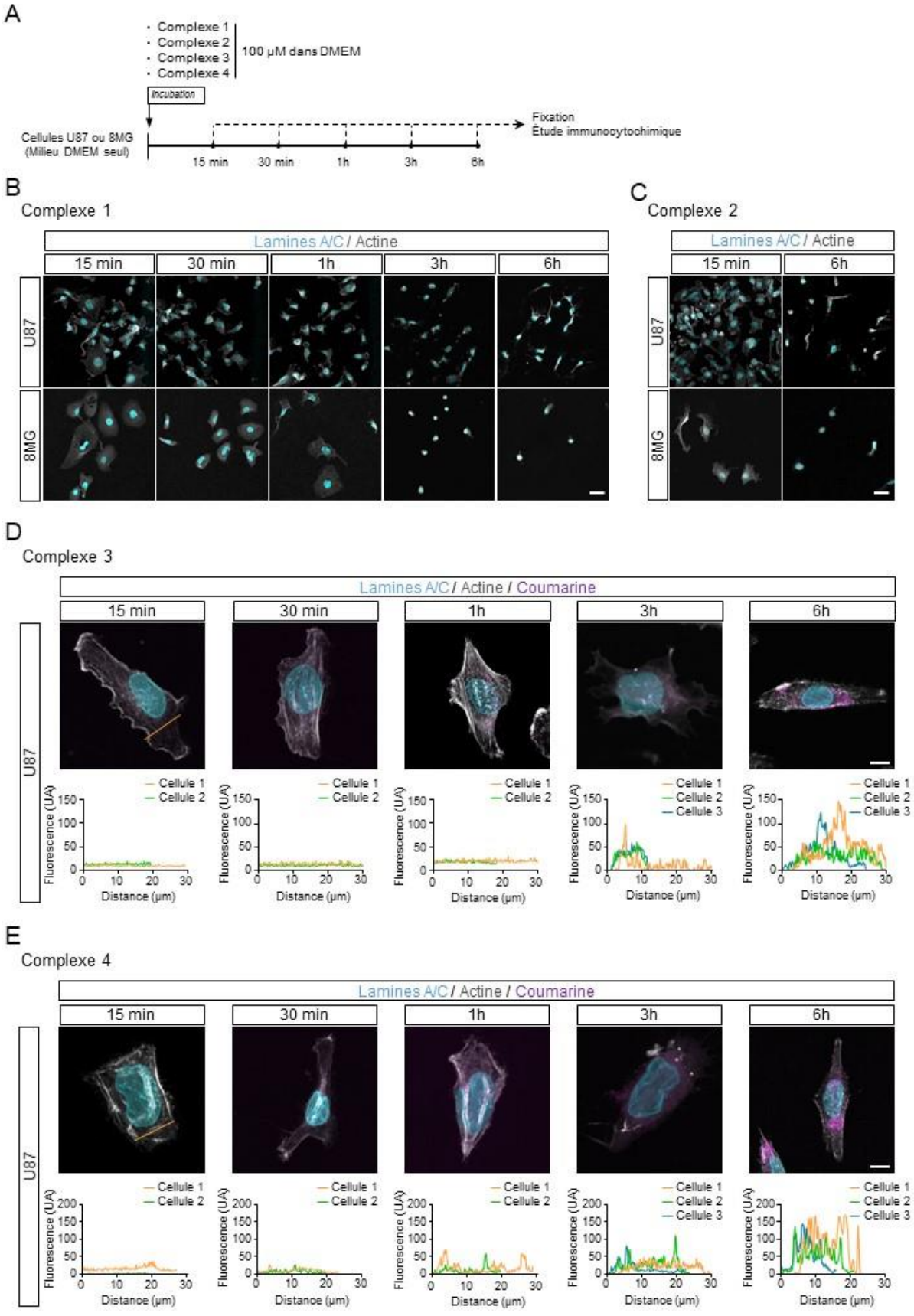


Figure 102 : Évaluation de l'impact cytotoxique et/ou de la pénétration des différents complexes. Échelle : 50 µm pour C, Échelle : 10 µm pour D et E.

Le schéma **A** montre la chronologie entre l'incubation des complexes **1**, **2**, **3** ou **4** et la fixation des cellules de humaines de glioblastome (GBM) U87MG et 8MG pour évaluer l'impact cytotoxique et/ou pénétrant des complexes. Des cellules de GBM cultivées dans du milieu DMEM ont été incubées avec les 4 composés durant 15 et 30 minutes, 1, 3 et 6 heures, puis fixées pour étude immunocytochimique.

Le schéma **B** montre l'impact cytotoxique du complexe **1** sur les cellules U87MG et 8MG. Le complexe **1** induit une déformation progressive de la structure des cellules U87MG et 8MG, observable par la rétractation cytoplasmique des cellules dont l'actine est marquée (en gris) jusqu'à 6 heures post-incubation.

Le schéma **C** montre l'impact cytotoxique du complexe **2** sur les cellules U87MG et 8MG. L'incubation du complexe **2** provoque aussi une rétraction cytoplasmique.

Le schéma **D** montre la pénétration au cours du temps du complexe **3** dans les cellules U87 observable grâce à l'augmentation significative de l'intensité de fluorescence de la coumarine (en violet). Les graphiques d'intensité de fluorescence de la coumarine (en violet) correspondant à l'internalisation du complexe **3** dans le cytosol à travers la région cellulaire définie par la ligne orange. Une augmentation de l'intensité de fluorescence dans le soma des cellules est marquée dès 3 heures post-incubation et devient plus forte à 6 heures post-incubation, traduisant une internalisation croissante du complexe **3** dans le soma cellulaire.

Le schéma **E** montre la pénétration au cours du temps du complexe **4** dans les cellules U87. L'intensité de fluorescence de la coumarine (en violet) liée au complexe **4** augmente significativement au cours du temps dans les cellules U87. Les graphiques d'intensité de fluorescence de la coumarine (en violet) correspondent à l'internalisation du complexe **4** dans le cytosol à travers la région cellulaire délimitée par la ligne orange. L'internalisation du complexe **4**, détectable dès 1 heure post-incubation, se poursuit aux temps 3 et 6 heures post-incubation, visible par une augmentation de la fluorescence de la coumarine (en violet) dans le cytoplasme des cellules.

L'incubation des cellules de GBM humaines U87MG et 8MG en présence de complexes d'inclusion **1** et **2** qui porte le Temolozomide entraîne une rétraction du cytoplasme et de la membrane (marquage actine) des cellules au cours du temps, observable dès 1 heure post-incubation. Après 6 heures de traitement, très peu de cellules sont restées adhérentes, démontrant le caractère cytotoxique des complexes **1** et **2** à cette concentration.

Ensuite, l'incubation des complexes d'inclusion **3** et **4** fluorescents à la longueur d'onde de 405 nm sur les cellules U87MG et 8MG ne semblent pas altérer la survie cellulaire jusqu'à 6 heures d'incubation. Une endocytose moléculaire par suivi de fluorescence est observée pour les complexes d'inclusion **3** et **4**, au cours du temps, principalement à partir de 30 minutes, avec un marquage intense dans l'espace péri-nucléaire (marquage noyau par un anticorps anti-lamin A/C) après 6 heures d'exposition.

Nous avons observé que l'effet du témozolomide était très fort, après 1 h d'incubation (cinétique lente au bout de 24 h normalement). Cet effet peut être dû à la concentration utilisée, trop élévée. D'autres études avec des concentrations plus faibles pour visualiser l'effet du TMZ et aussi de la limite de toxicité de nos sondes sont en cours.

IV. Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les résultats des tests *in vitro* des composés coordinés avec du gadolinium. Ces composés ont été testés afin d'évaluer leurs potentiels pour une application en IRM. Nous avons observé des valeurs de relaxivités très élévées pour les composés **121**, **130**, **131** et **132**, soit de 9,31 $mM^{-1}.s^{-1}$, 12,67 $mM^{-1}.s^{-1}$, 27,69 $mM^{-1}.s^{-1}$ et 42,14 $mM^{-1}.s^{-1}$, respectivement à 37°C et 20 MHz. Celles-ci représentent une augmentation respective de 2,6, 3,6, 7,9 et 12 fois par rapport à la relaxivité du Gd-DOTA commercial (~ 3,5 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 20 MHz). La présence de la cyclodextrine conduit à de plus fortes relaxivités dues à l'augmentation du poids moléculaire. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues dans la littérature.

Nous avons obtenu une relaxivité pour les complexes d'inclusion **145** et **146** de 12,34 $mM^{-1}.s^{-1}$ et 9,85 $mM^{-1}.s^{-1}$ à 37°C et 20 MHz. Le complexe **145**, de masse moléculaire plus importante, présente une relaxivité 20% supérieure à celle du complexe **146**. Ces résultats sont encourageants pour suivre par IRM la libération du TMZ par variation de la relaxivité lors de l'hydrolyse *in vivo*. En effet, une variation de 10% est suffisante pour l'analyse IRM *in vivo*.

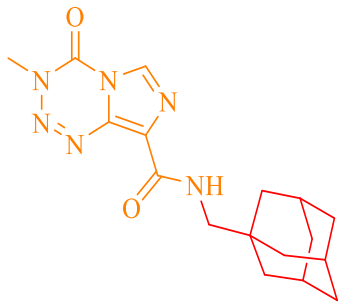
Des études ont été réalisés sur une IRM à 7 T. De très bonnes valeurs de relaxivités ont également été obtenues pour les agents de contraste **AC6**, **AC2** et **AC3** (Tableau 18). Cependant, pour les agents de contraste, **AC1**, **AC4** et **AC5** des résultats contraires à nos attentes ont été observés dus probablement à une hydratation des complexes lors de leur stockage et par conséquent une erreur sur la pesée lors de la préparation des échantillons. Il sera

nécessaire de réaliser, de nouveau, ces analyses à partir d'une solution mère dosée au préalable en ICP-OES pour confirmer la variation de signal observée à 0,5 T.

Un premier passage de la BHE par le complexe d'inclusion **4** contenant la cyclodextrine angiopep et une coumarine a été observé *in vivo*. Des signaux de fluorescence de la coumarine ont été détectés dans la jonction, inter-hémisphérique, les vaisseaux et dans le cortex.

Puis un effet cytotoxique de témozolomide des complexes **1** et **2** a été mise en évidence sur des lignées de glioblastome dès 1 heure et après 6 heures d'incubation.

En perspectives de ces travaux, nous allons étendre le temps des tests *in vitro* (24 et 48 heures) et travailler avec des concentrations faibles pour déterminer la limite de toxicité. Des tests *in vivo* peuvent également être poursuivis pour suivre la diminution des tumeurs cérébrales par IRM. Enfin, une étude de cytotoxicité avec un composé sans linker hydrazone **190** pour étudier l'influence du bras hydrazone et par conséquent valider la libération contrôlée observée au laboratoire est envisagée.



190

*Figure 103 : Structure du composé **190***

Conclusion Générale
Perspectives

Ces travaux de thèse avaient pour objectif de synthétiser des sondes permettant d'établir un diagnostique mais aussi de contrôler la libération d'un principe actif anti-cancéreux suite à un processus de vectorisation. Ces deux propriétés permettent d'accéder à de nouvelles sondes théranostiques pour traiter le glioblastome dont le cahier des charges est le suivant :

1) Contenir un agent de contraste pour effectuer le diagnostic,
2) Être capable de franchir la BHE et atteindre le cerveau,
3) Pouvoir vectoriser le principe actif pour une thérapie ciblée.

Pour cela, trois types de sondes sont visés pour permettre de valider le concept :

- d'une β-cyclodextrine capable de passer la BHE grâce à un peptide transporteur (l'angiopep)
- de réaliser un relargage contrôlé du témozolomide par trois méthodes différentes (hydrazone, imine, peptide) sur un site cancéreux
- de visualiser cette vectorisation par variation de l'intensité de l'imagerie IRM grâce à un agent de contraste au gadolinium

Différents modèles ont été développés permettant une avancée et une validation étape par étape (Figure 46).

Dans un premier temps, nous avons synthétisé différentes molécules invitées portant un groupe adamantane lié à un agent fluorescent, la coumarine, par l'intermédiaire d'un bras clivable intégrant une fonction hydrazone (Figure 104, composés **29**, **41**, **43**, **49**), imine (Figure 104, composés **50**, **52**), ou bien une séquence peptidique (Figure 104, composé **59**). Enfin, trois modèles de molécules invitées incluant le motif témozolomide relié à l'adamantane par un lien de type hydrazone (Figure 104, composés **89**, **90**, **91**) ont été développés.

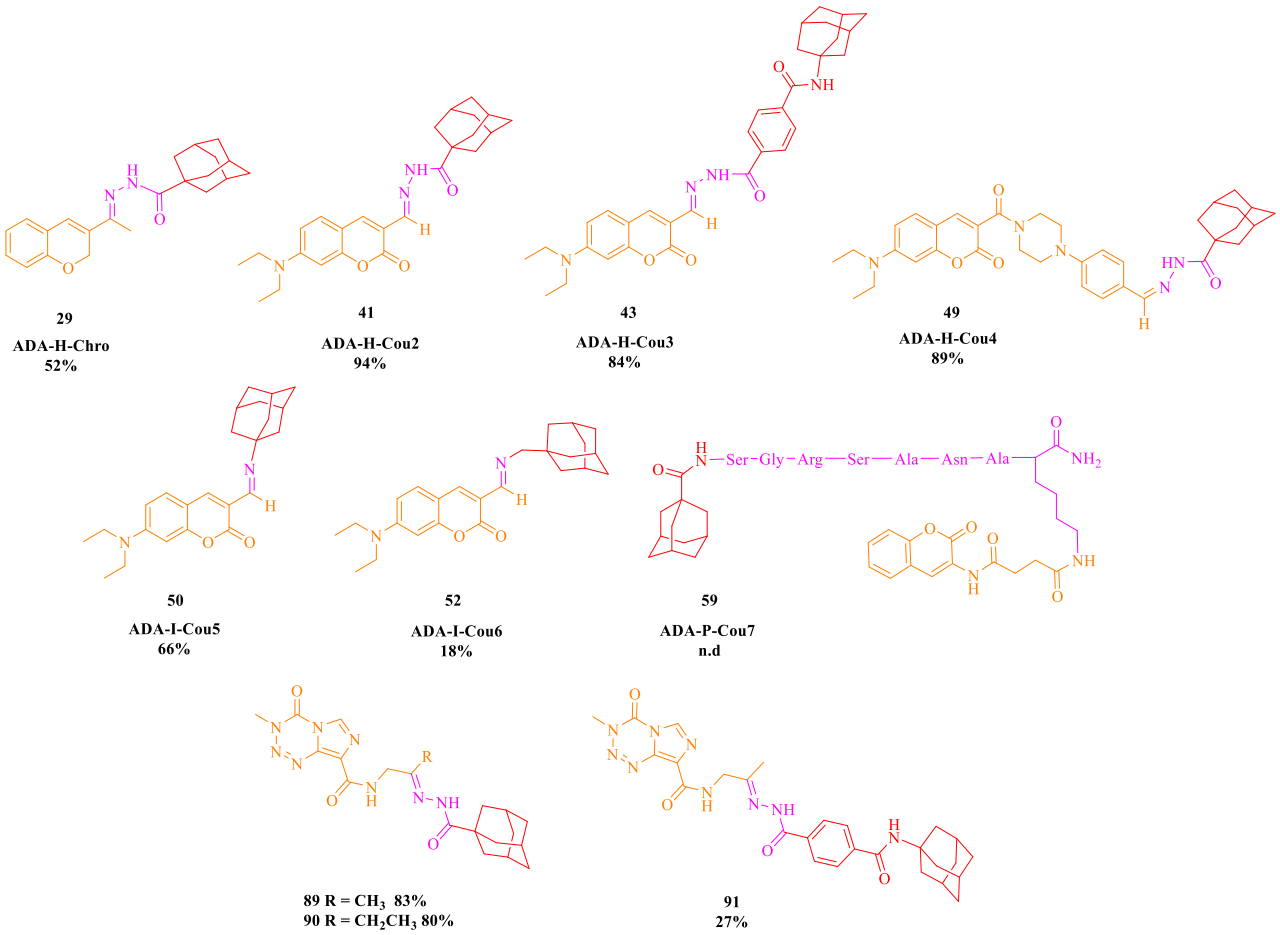


Figure 104 : Structures des molécules invitées pour la préparation des complexes d'inclusion. Les rendements présentés sont les rendements de la dernière étape de synthèse

Ensuite, les dérivés de cyclodextrines nécessaires pour effectuer les complexes d'inclusion ont été synthétisés. La mono-fonctionnalisation sélective d'une cyclodextrine en position 6 a été réalisée soit par un agent de contraste pour obtenir le composé **121**, soit par l'angiopep pour obtenir le composé **134**. Ces réactions ont été effectuées par chimie click. La relaxivité du composé **121** a été mesurée à $r_1 = 9{,}31$ $mM^{-1}.s^{-1}$, soit une valeur 3 fois supérieure à celle du Gd-DOTA commercial ($r_1 = 3.5$ $mM^{-1}.s^{-1}$). D'autres agents de constraste ont été développées à l'aide d'une β-cyclodextrine fonctionnalisée par 7 ligands iminodiacétates. Ainsi, les complexes **130**, **131** et **132** ont été obtenus et leurs relaxivités mesurées à $r_1 = 12{,}66$ $mM^{-1}.s^{-1}$, 22,6 $mM^{-1}.s^{-1}$ et 42,14 $mM^{-1}.s^{-1}$, conformément à l'augmentation du nombre d'ions gadolinium de 1 à 3. Nous avons montré que les complexes **130**, **131** et **132** présentaient des constantes de stabilité remarquablement élevées (comparables au DOTA-Gd commercial). Le pGd mesuré pour le complexe **130** est de 15,60. Cette valeur est nettement supérieure aux valeurs de pGd du Gd-DOTA (12,1).

Dans un second temps, nous avons préparé des complexes d'inclusion entre les molécules invitées préparées et les différents dérivés de cyclodextrines en mettant, tout d'abord, au point un protocole à partir d'une β-cyclodextrine native. Une fois optimisée, la méthode a été élargie à l'ensemble des composés (Figure 76). Ces complexes ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible et de fortes constantes d'association (Ka = 639400 M^{-1} pour le composé **136**, Ka = 27589 M^{-1} pour le composé **138** et Ka = 5835 M^{-1} pour le composé **143**) ont été obtenues (Figure 77).

Pour des raisons de trop faibles solubilités des composés dans l'eau, leurs analyses et caractérisations par dichroisme et par ITC n'ont pu être effectuées.

Des études d'hydrolyse (à différents pH) par RMN ^{1}H ont été mises en œuvre avec succès sur le complexe **141**. Il a été ainsi démontré qu'une libération contrôlée et lente du témozolomide était possible à pH 5,5 en 4 jours, à pH 6,5 en 9 jours et à pH 7 sur un temps supérieur à 14 jours, et qu'il était toujours sous sa forme active.

Dans un troisième temps, nous avons préparé et obtenu un modèle de tripode, le composé **174** et travaillons actuellement sur la formation des complexes d'inclusion hôte-invité à partir des différents modèles obtenus. Seuls les complexes d'inclusion des précurseurs **184** et **186** ont pu être formés. Pour des raisons de solubilité, le complexe d'inclusion du tripode **174** n'a pas pu être isolé actuellement.

Des études de complexation avec la cyclodextrine **121** (Figure 105) ont démontré une variation de relaxivité de 20%, lors de la libération du témozolomide, paramètre clé pour une visualisation du relargage du principe actif. Ces résultats préliminaires sur les modèles sont donc conformes à nos attentes et permettent de valider les points essentiels de notre concept.

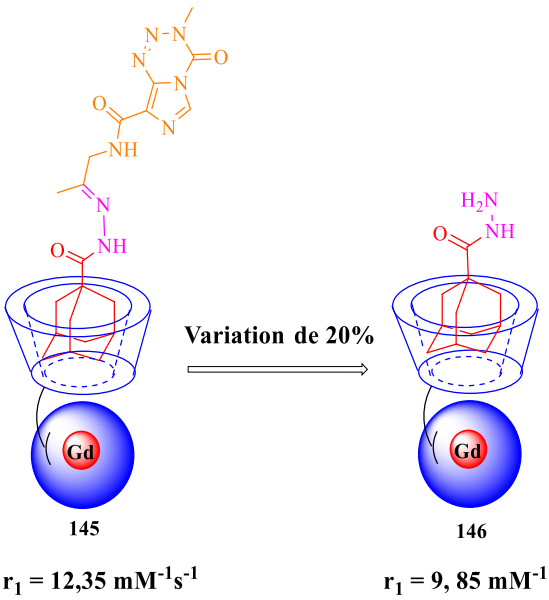


*Figure 105 : Structures des complexes d'inclusion **145** et **146***

Afin de finaliser ce projet, des tests *in vitro* et *in vivo* ont été effectués en collaboration avec le Dr. Hélène Castel du laboratoire INSERM U1239. *In vivo*, le passage de la BHE a été observé sur le complexe d'inclusion **4** (Figure 101). Ensuite, des tests *in vitro* sur les lignées cellulaires de glioblastome humain U87MG ou 8MG ont été effectués. Un effet cytotoxique du témozolomide des complexes d'inclusion **1** et **2** (Figure 101) a été mise en évidence.

Les objectifs de cette thèse ont donc été atteints. Nous avons développé des modèles de sondes capables de franchir la BHE, de vectoriser de façon contrôlée le témozolomide et d'induire une variation suffisante du signal IRM. Ces résultats démontrent la viabilité du concept pour accéder à des sondes théranostiques originales.

Dans la suite de ce projet, nous envisageons des tests *in vitro* pour valider la coupure enzymatique du lien peptidique SGRSANA du composé **60** (Schéma 31). Des analyses IRM (à 1,5 T et 3 T) sur petit animal seront effectuées pour les composés **121**, **147**, **148** et **149**. Ensuite, une fois les tripodes **178** et **182** obtenus, nous pourrons préparer les complexes d'inclusion des tripodes **1**, **2** et **3**. A l'issue de ces travaux et en fonction des résultats obtenus, les tripodes complexés seront testés à nouveau *in vitro* sur les lignées cellulaires de GBM, *in vivo* pour le passage de la BHE, à la suite de quoi des essais visant à suivre l'évolution d'une tumeur par IRM sur petit animal seront engagés.

Cette stratégie permettra à terme de réaliser des combinaisons thérapie/cible/imagerie modulables à façon. D'autres associations pourront être ainsi réalisées à partir des synthons obtenus afin d'optimiser l'efficacité clinique de ces nouveaux outils et permettre ainsi de les étendre au suivi et au traitement d'autres pathologies.

Experimental Part

General Considerations

1. Solvents and reagents

- **All reagents** were purchased from commercial sources and used without further purification.
- **Anhydrous solvents:** DMF, MeOH, ACN, Pyridine and DMSO were purchased from Sigma Aldrich.
- **β-Cyclodextrin** was dried at 80°C under vacuum for 48 hours before use.

2. Reaction monitoring and purification

- **Reactions were monitored** by thin-layer chromatography (TLC) on a plate of silica gel 60 F254 (E. Merck, Darmstadt, Germany) and detection using 8% sulfuric acid solution in ethanol stain, Vanillin.
- **Column chromatographies** were performed on silica gel 60 (0.063-0.200 mm, E. Merck).
- **HPLC purifications** were performed on a Kinetex 5µm XB-C18 100Å (LC Column 250*4.6 nm).

3. Analysis

- **^{1}H (300 MHz)** and **^{13}C (75 MHz) NMR spectra** were recorded on Bruker AVANCE 300 at 23°C. Chemical shifts are referenced from tetramethylsilane (TMS) and are reported in parts per million (ppm). Coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). The following abbreviations were used for the signals: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), (qt) quintuplet, m (multiplet), (bm) broad multiplet and (bs) broad singlet.

- **IR spectra** were recorded on a Perkin-Elmer IRFT 1650 spectrometer.

- **Melting point** were measured on a Stuart SMP3.

- **MALDI-TOF/MS** experiments were performed with an Autoflex III (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) equipped with a Nd: YAG laser emitting at 355 nm.

- **ESI-MS** data were acquired using a HCT Ultra Ion Trap mass spectrometer (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) or using a LCT Premier XE (Waters, Manchester, UK) for the complexes.

- **Accurate mass measurements (HRMS)** were realized using a Synapt G2 HDMS (Waters, Manchester, UK) equipped with a lockspray electrospray (ESI) source. Experiments were achieved in positive or negative ion. The column used in column waters Acquity BEH C181.7 µm 2.1-50 mm. The gradient used is 98% H_2O/2%ACN to 100% ACN in 4 minutes and 100% ACN for 1.3 minutes at flow rate of 0.6 $mL.min^{-1}$.

- **Elementary analyses** were performed by the Service of Microanalyses of Institut de Recherche en Chimie Organique Fine of Mont-Saint-Aignan.

- **The UV measurements** were conducted on a Agilent technologies Cary 60 UV-Visible spectrophotometer (190-1100 nm, bandwidth 1 nm) using 10×10 mm quartz cuvettes from Hellma Analytics.

4. Relaxivity measurements

ICP-OES Measurements. The exact contents in Gd^{3+} ion of the solutions used for the relaxivity profiles were determined by Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES, iCAP Series 6000, Thermofisher) at 336.2 nm. Calibration was done in 2% HNO_3 solutions with Gd concentrations ranging from 0.1 to 2.0 mg/L. Gd-complex was diluted in 2% HNO_3 before analysis by ICP-OES.

Relaxivity measurements were performed on a Bruker mq20 Minispec at 37 °C and 0.47 T (20 MHz). The relaxation time T1 of each concentration was determined using the "Inversion Recovery Pulse Sequence". The resulting curves were adjusted to a monoexponential function to obtain T1. Relaxation values were measured three times and the average has been calculated. Gadolinium complexes and host/guest were diluted in millQ. The temperature was kept at 37°C with a Julabo ED Heating Immersion Circulators (uncertainty ± 0.1 °C).

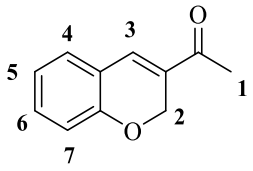
5. Dialysis

Dialysis has been performed on Biotech Cellulose Ester Dialysis Membrane (Biotech CE Tubing MWCO 100-500 D, Nominal Flat Width: 31 mm, Diameter: 20 mm, Vol/Length: 3.1 ml/cm, Length 10 m/33 ft).

6. TMZ Handling Precautions

Toxic product, to be weighed in a closed pillbox

Synthesis of 1-(2H-chromen-3-yl)ethanone (28c)[269]



28c

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{10}O_2}$
Molecular Weight: **174.20**

Salicyldehyde **28a** (2 g, 16.3 mmol, 1 eq) was dissolved in 25 mL of dioxane. Then K_2CO_3 (2.70 g, 19.5 mmol, 1.2 eq) and MVK **28b** (1.37 g, 19.5 mmol, 1.2 eq) were added to a solution. The reaction mixture was refluxed overnight. After cooling, water was slowly added (20 mL). The solid was filtrated and the solution was concentrated on rotavap. The residue was purified by column chromatography (silica gel) eluting with cyclohexane/ethyl acetate (90/10). The compound **28c** was obtained as a white solid (1 g, 35%).

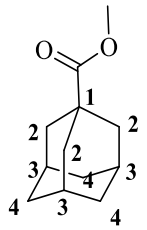
TLC Cyclohexane/ EtOAc, (90/10) Rf = 0.4

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.31 (s, 1H, H3), 7.17 (dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, H4), 7.06 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H, H6), 6.95 (dd, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H, H5), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H7), 5.01 (2H, CH_2), 2.41 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 196.3 (CO), 155.9, 134.3, 132.8, 131.2, 129.5, 122.2, 121.1, 116.7, 64.6 (CH_2), 25.4 (CH_3).

MS (ESI Positive): *m/z* 175.07 $[M+H]^+$.

Synthesis of (3,5,7)-methyl adamantane-1-carboxylate (26)[111]



26

Chemical Formula: $\mathbf{C_{12}H_{18}O_2}$
Molecular Weight: **194.27**

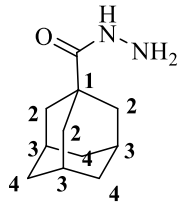
Adamantane-1-carboxylic acid **24** (5.55 mmol, 1 g, 1 eq) was dissolved in 30 mL of dry methanol. Then *p*-toluenesulfonic acid **25** (0.48 mmol, 91 mg, 0.08 eq) was added as dehydrating agent. The mixture was refluxed at 85°C for 24 hours. After completion of the reaction, the solvent was removed. The crude product was dissolved in 25 mL of dichloromethane and washed three times (3x200 mL) with DI water. The organic phase was collected and dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The product **26** was obtained as a colorless cristal (1 g, 100%)

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.64 (s, 3H, OCH_3), 2.01 (s, 3H, adamantane-H3), 1.88 (s, 6H, adamantane-H2), 1.70 (m, 6H, adamantane-H4).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 178.6 (CO), 51.9 (CH_3), 41.1 (C1), 39.2 (C2), 36.9 (C3), 28.3 (C4).

MS (ESI Positive) : *m/z* 217.1 $[M+Na]^+$.

Synthesis of (3,5,7)-adamantane-1-carbohydrazide (27)[111]



27

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{18}N_2O}$
Molecular Weight: **194.27**

Adamantane-1-carboxylate **26** (5.55 mmol, 1 g, 1 eq) was dissolved in 4 mL of ethanol and the hydrazine hydrate (50-60% hydrazine) (0.0206 mol, 1 mL, 4 eq) was added. Then triethylamine (250 µL) as a catalyst was added. The mixture was refluxed at 85°C for 48 hours. Upon the completion of the reaction (checked by TLC), the mixture was poured onto cold water and the precipitate was washed with ethanol and water. The product **27** was obtained as white solid (850 mg, 85%)**.**

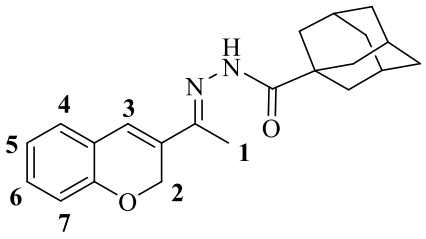
TLC DCM/MeOH (98/2) Rf = 0.2

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 6.98 (s, 1H, NH), 3.86 (s, 2H, NH_2), 2.03 (s, 3H, adamantane-H3), 1.86 (s, 6H, adamantane-H2), 1.80-1.62 (m, 6H, adamantane-H4).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 176.9 (CO), 39.6 (C1), 39.2 (s, C2), 36.7 (C3), 28.2 (C4).

MS (ESI Positive): *m/z* 217.1 $[M+Na]^+$.

Synthesis of *N'*-(1-(2H-chromen-3-yl) ethylidene) adamantane-1-carbohydrazide (29)



29

Chemical Formula: $\mathbf{C_{22}H_{26}N_2O_2}$
Molecular Weight: **350.45**

Adamantane **27** (0.68 mmol, 133 mg, 1 eq) and compound **28c** (0.68 mmol, 120 mg, 1 eq) were dissolved in dry MeOH (35 mL). Then, TFA (35 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed under argon overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel) eluting with cyclohexane/ethyl acetate (90/10) to obtain compound **29** as a yellow solid (260 mg, 52%).

TLC Cyclohexane/ EtOAc, (90/10) Rf = 0.25.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.52 (s, 1H, NH), 7.22 (dd, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1Har), 7.16 (dd, dd, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1Har), 7.11 (s, 1Har), 6.94 (td, *J* = 7.5, 4.2, 1.0 Hz, 1H, H5), 6.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H7), 5.04 (s, 2H, CH_2), 2.11 (s, 3H, CH_3), 2.00 (s, 3H adamantane), 1.90 (s, 6H adamantane), 1.70 (s, 6H adamantane).

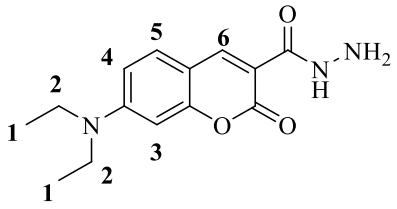
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 178.6, 155.9, 153.6, 130.8, 128.2, 122.5, 121.9, 116.5, 90.0, 65.8, 39.8, 37.0, 28.6.

MS (ESI Positive): *m/z* : 351.228 $[M+H]^+$.

IR ν (cm^{-1}): 3301.2 (N-H), 2902.5 (C-H), 1677.6 (C=O amide).

M.p.: 202.5 °C-203.4 °C.

Synthesis of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide (31)[212]



31

Chemical Formula: $\mathbf{C_{14}H_{17}N_3O_3}$
Molecular Weight: **275.30**

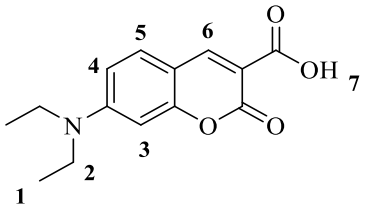
Compound **30** (0.58 mmol, 170 mg, 1 eq) was added with 73 µL of hydrazine hydrate (2.3 mmol, 4 eq). The mixture was and then reacted at room temperature under nitrogen atmosphere in the dark for 1 hour. The crude product was obtained by filtration and washed by cold ethanol twice to obtain the compound **31** as a yellowish solid (135 mg, 85%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 11.83 (s, 1H), 8.45 (s, 1H, H6), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H5), 6.29 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, H4), 6.22 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H3), 3.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, H2), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 161.6, 161.2, 157.0, 152.3, 147.1, 131.4, 110.1, 108.9, 107.6, 95.8, 44.3, 12.3.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{14}H_{18}N_3O_3$ $[M+H]^+$: 276.1343, Found 276.1355.

Synthesis of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxylic acid (38)[213]



38

Chemical Formula: $\mathbf{C_{14}H_{15}NO_4}$
Molecular Weight: **261.27**

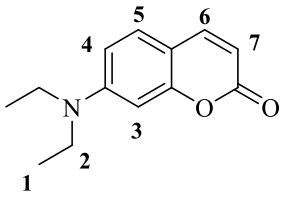
4-Diethylaminosalicylaldehyde **36** (6.72 mmol, 1.3 g, 1 eq) and Merdrum's acid **37** (6.98 mmol, 1 g, 1.04 eq) were dissolved in ethanol (40 mL), piperidine (1 mmol, 0.1 mL, 0.15 eq) and acetic acid (1 mmol, 0.1 mL, eq) were added and the mixture was stirred at 90°C overnight. Then the reaction mixture was cooled on ice bath, a yellow-to-orange precipitate appeared. The precipitate was collected, washed with ice-cold ethanol, and was recrystallized from heated ethanol to afford the compound **38** as an orange solid (1.25 g, 71 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 12.52 (s, 1H, OH), 8.59 (s, 1H, H6), 7.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H5), 6.80 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H, H4), 6.58 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H3), 3.49 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H, H2), 1.14 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 173.8, 164.4, 159.3, 152.7, 149.3, 131.6, 109.8, 107.1, 106.9, 95.7, 44.2, 12.1.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{14}H_{16}NO_4$ $[M+H]^+$: 262.1079, Found 262.1082.

Synthesis of 7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (39) [213]



39

Chemical Formula: $\mathbf{C_{13}H_{15}NO_2}$
Molecular Weight: **217.26**

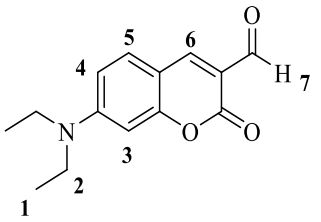
To an aqueous solution of HCl 18% (10 mL), compound **38** (1.33 mmol, 250 mg, 1 eq) was added and the resulting suspension was refluxed at 130°C overnight. After the reaction solution was cooled on ice bath and neutralized with a solution of NaOH (6N), a pale-yellow precipitate was appeared. The precipitate was filtered, washed with water, and dried under reduced pressure to afford the compound **39** as a yellow solid (260 mg, 90%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 7.82 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H6), 7.42 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H3), 6.68 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H, H4), 6.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H3), 5.98 (dd, *J* = 9.3 Hz, 2.2 Hz, 1H, H7), 3.42 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, H2), 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 164.4, 159.3, 152.7, 149.3, 131.6, 109.8, 107.1, 106.9, 95.7, 44.2, 12.1.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{13}H_{16}NO_2$ $[M+H]^+$: 218.1181, Found 218.1181.

Synthesis of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carbaldehyde (40) [213]



40

Chemical Formula: $\mathbf{C_{14}H_{15}NO_3}$
Molecular Weight: **245.27**

$POCl_3$ (1 mL, mol, eq) was carefully added to anhydrous DMF (1 mL) under nitrogen atmosphere and the mixture was stirred at 0 °C for 20 minutes. Then compound **39** (0.69 mmol, 150 mg, 1 eq) dissolved in anhydrous DMF (5 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 30 minutes at 0°C, then 30 minutes at room temperature and finally at 60°C overnight. After ice was added to the mixture an orange precipitate was appeared. The precipitate was collected and washed twice with water and then dried under reduced pressure. The compound **40** was obtained as an orange solid (110 mg, 65%).

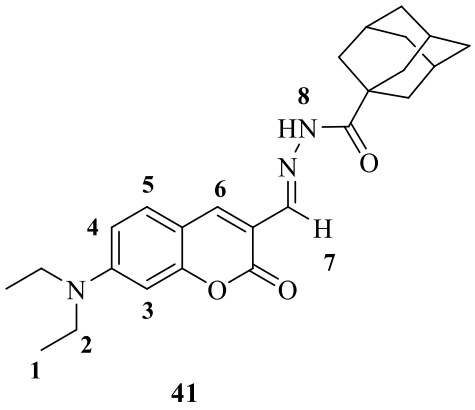
TLC DCM 100 %, Rf = 0.1.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.13 (s, 1H, H7), 8.26 (s, 1H, H6), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H5), 6.63 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H, H4), 6.49 (d, *J* = 2.0 Hz 1H, H3), 3.47 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H, H2), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 186.9, 160.5, 158.2, 153.3, 145.8, 132.9, 112.9, 110.2, 107.4, 96.1, 44.3, 12.1.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{14}H_{16}NO_3$ $[M+H]^+$: 246.1130, Found 246.1119.

Synthesis of *N'*-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl) methylene) adamantane-1-carbohydrazide, ADA-H-Cou2 (41)



41

Chemical Formula: $\mathbf{C_{25}H_{31}N_3O_3}$
Molecular Weight: **421.53**

Adamantane **27** (0.203 mmol, 39 mg, 1 eq) and coumarin **40** (0.203 mmol, 50 mg, 1 eq) were dissolved in EtOH (5 mL). Then, acetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed overnight at 85°C. A precipitate was formed. Then, the precipitate was filtered, washed with cold ehanol and dried under reduced pressure to afford the compound **41** as a yellow solid (83 mg, 94%). **TLC** Cyclohexane/ EtOAc, (60/40) Rf = 0.4.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 10.89 (s, 1H, H7), 8.43 (s, 1H, H6), 8.27 (s, 1H, NH), 7.62 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H5), 6.76 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H, H4), 6.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H3), 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, H2), 2.01 (s, 3H, CHada), 1.88 (s, 6H, CH_2ada), 1.70 (s, 6H, CH_2ada), 1.15 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 172.9, 160.9, 156.4, 151.2, 141.0, 138.2, 130.7, 112.9, 109.7, 108.0, 96.4, 44.2, 36.0, 27.6, 27.4, 12.4.

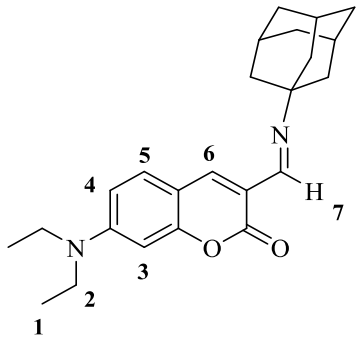
TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{25}H_{31}N_3O_3Na$ $[M+H]^+$: 444.2263, Found 444.2274.

IR ν (cm^{-1}): 3301.5 (N-H), 2903.1 (C-H), 1707.1 (C=O lactone), 1678.8 (C=O amide).

UV-Visible (DMSO/H_2O (2/8)): 296 nm, 446 nm

M.p.: 214.1°C-215.2°C.

Synthesis of 3-adamantan-1-ylimino)methyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (50)



50

Chemical Formula: $\mathbf{C_{24}H_{30}N_2O_2}$
Molecular Weight: **378.51**

Compound **40** (0.16 mmol, 40 mg, 1 eq) and adamantane **42a** (0.41 mmol, 67 mg, 1 eq) were dissolved in ethanol (5 mL). Then, HCl (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The solvent was removed. Then ethanol (10 mL) was added to the residue and was placed at 4 °C overnight. The precipitate was filtered, washed with cold ethanol and dried under reduced pressure to afford the compound **50** as an orange solid (50 mg, 64%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.90 (s, 1H, H7), 8.42 (s, 1H, H6), 7.68 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H5), 6.83 (dd, *J* = 9.3, 2.3 Hz, 1H, H4), 6.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H4), 3.51 (q, *J* = 6.6 Hz, 4H, H2), 2.04 (s, 3H, CH ada), 1.82 (s, 6H, CH_2 ada), 1.76 – 1.46 (m, 6H, CH_2 ada), 1.15 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, H1).

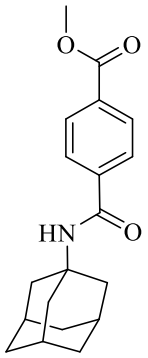
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 161.5, 158.5, 153.5, 151.3, 148.8, 146.2, 139.4, 133.1, 131.1, 114.5, 113.2, 110.5, 109.6, 107.9, 96.4, 44.5, 42.86, 36.0, 35.3, 28.9,12.4.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{24}H_{31}N_2O_2[M+H]^+$: 379.2386, Found 379.2396.

IR ν (cm^{-1}): 2905.9 (C-H), 1711.8 (C=O lactone), 1623.5 (C=N).

M.p.: 134.1°C-134.9 °C.

Synthesis of methyl-4-adamantan-1-ylcarbamoylbenzoate (42c)[214]



42c

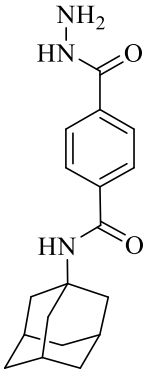
Chemical Formula: $\mathbf{C_{19}H_{23}NO_3}$
Molecular Weight: **313.39**

Monomethyl terephthalate **42b** (3.7 mmol, 0.630 g, 1 eq) and PyBop (3.8 mmol, 2 g, 1.3 eq) were dissolved in DMF (10 mL) and stirred at room temperature. After 20 minutes, 1-adamantylamine **42a** (3.5 mmol, 0.538 g, 1.01 eq) and DIPEA (3.9 mmol, 0.511 g, 1 mL, 1.13 eq) were added and was stirred at room temperature overnight. Water (30 mL) was added, a white precipitate was formed. The precipitate was filtered, washed with large amounts of water and dried under reduced pressure to afford compound **42c** as a white solid (760 mg, 66%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 7.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2xCH), 7.88 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, 2×CH), 7.88 (1H, s, NH), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.07 (s, 9H, 3×CH_2 and 3×CH), 1.65 (s, 6H, CH_2 ada).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 165.8, 165.2, 140.1, 131.2, 128.9, 127.7, 52.3, 51.7, 40.7, 36.0, 28.8.

Synthesis of *N*-(adamantan-1-yl)-4-(hydrazinecarbonyl)benzamide (42d)[214]



42d

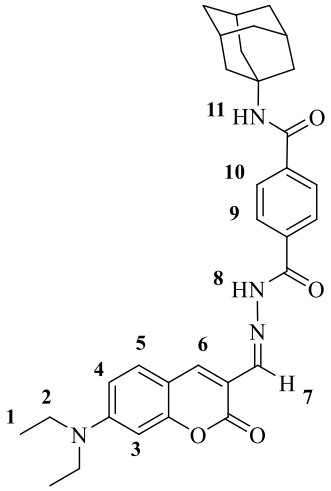
Chemical Formula: $\mathbf{C_{18}H_{23}N_3O_2}$
Molecular Weight: **313.39**

Compond **42c** (1.27 mmol, 400 mg, 1 eq) was refluxed further with an excess of hydrazine hydrate (10.2 mmol, 511 mg, 0.495 mL, 8 eq) in ethanol 20 mL overnight at room temperature. The desired product **42d** was formed as a white light precipitate, and was collected by filtration, washed with copious amounts of ethanol and dried under reduced pressure (150 mg, 38%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.88 (s, 1H, **NH**NH_2), 7.83 (q, *J* = 8.3 Hz, 4H, 4×CH), 7.72 (s, 1H, NH), 4.53 (s, 2H, NH_2), 2.06 (s, 9H, 3×CH_2 and 3×CH), 1.65 (s, 6H, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 165.4, 165.1, 138.1, 135.1, 127.3, 126.6, 51.6, 40.8, 36.1, 28.9.

Synthesis of *N*-adamantan-1-yl) -4-(2-((7-(diethylamino) -2-oxo-2H-chromen-3-yl) methylene) hydrazinecarbonyl) benzamide (43)



43

Chemical Formula: $\mathbf{C_{32}H_{36}N_4O_4}$
Molecular Weight: **540.65**

Adamantane **42d** (0.16 mmol, 51 mg, 1 eq) and coumarin **40** (0.16 mmol, 40 mg, 1 eq) were dissolved in EtOH (5 mL). Then, acetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed overnight at 85°C. A precipitate was formed. Then, the precipitate was filtered, washed with cold ethanol and dried under reduced pressure to afford compound **43** as a light orange solid (74 mg, 84%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 11.97 (s, 1H, H7), 8.53 (s, 1H, NH, H8), 8.39 (s, 1H, H6), 7.97 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H9), 7.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H10), 7.78 (s, 1H, NH, H11), 7.68 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H5), 6.78 (dd, *J* = 9.5, 2.3 Hz, 1H, H4), 6.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H3), 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, H2), 2.08 (s, 9H, 3×CH_2 and 3×CH), 1.67 (s, 6H, CH_2 ada), 1.14 (s, 6H, H1).

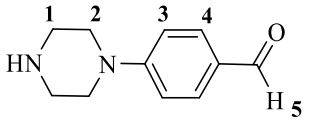
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*) : δ 173.1, 164.1, 158.7, 156.9, 151.8, 151.6, 147.2, 144.3, 130.4, 128.3, 125.2, 116.1, 115.3, 109.7, 107.4, 96.6, 44.5, 36.3, 27.9, 12.6.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{32}H_{37}N_4O_4$ $[M+H]^+$: 541.2815, Found 541.2806.

IR ν (cm^{-1}): 3347 (N-H), 2903.2 (C-H), 1699.4 (C=O lactone), 1653.1 (C=O amide), 1253.5 (C-N tertiary amine).

M.p.: 292.7 °C-293.5 °C.

Synthesis of 4-(piperazin-1-yl) benzaldehyde (47)[215]



47

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{14}N_2O}$
Molecular Weight: **190.24**

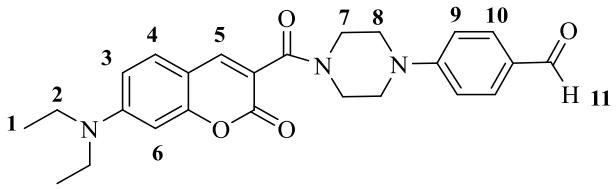
4-Fluorobenzaldehyde **44** (5 mmol, 0.62 g, 1 eq) in 15 mL of 2-methoxyethanol **46** was added dropwise to a solution of piperazine **45** (20 mmol, 1.72 g, 4 eq) in 15 mL of H_2O. The mixture was then refluxed at 124 °C for 5 hours. Water (30 mL) was added and the precipitate was filtered. The solid was dissolved in DCM was washed with brine (30 mL), dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to afford **47** as an orange solid (681 g, 73%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9.78 (s, 1H, H5), 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H4), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H3), 3.46 – 3.34 (m, 4H, H2), 3.13 – 2.99 (m, 4H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 190.8, 155.6, 132.2, 127.5, 113.9, 48.4, 45.9.

M.p.: 179 °C-181 °C.

Synthesis of 4-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)piperazin-1-yl) benzaldehyde (48)[215]



48

Chemical Formula: $\mathbf{C_{25}H_{27}N_3O_4}$
Molecular Weight: **433.50**

The coumarin acid **38** (0.76 mmol, 200 mg, 1 eq) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 ml), and then EDC (1.1 mmol, 220 mg, 1.5 eq) and DMAP (0.15 mmol, 18.7 mg, 0.2 eq) were added. The compound **47** (0.76 mmol, 145 mg, 1 eq) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified on a silica gel column (CH_3OH : CH_2Cl_2 = 1 : 100) to afford pure compound **48** as a yellow solid (250 mg, 75 %).

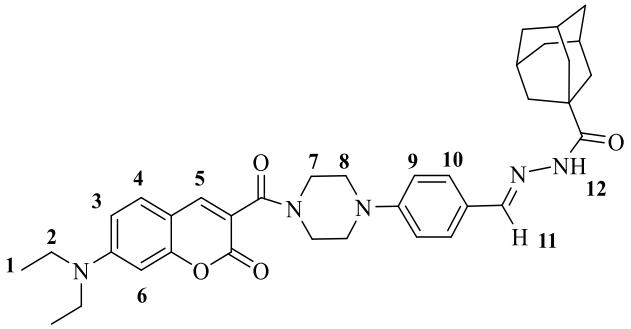
TLC (DCM/MeOH, 100/1), Rf = 0.6.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.73 (s, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, H5), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H10), 7.51 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H4), 7.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H9), 6.76 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, H3), 6.57 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 3.72 (s, 4H, H8), 3.46 (m, 8H, H2, H7), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 190.3, 164.2, 158.4, 156.7, 154.3, 151.3, 144.1, 131.5, 130.2, 126.5, 115.7, 113.5, 109.4, 107.1, 96.3, 59.7, 44.2, 12.3.

M.p.: 194 °C-196 °C.

Synthesis of compound ADA-H-Cou4 (49)



49

Chemical Formula: $\mathbf{C_{36}H_{43}N_5O_4}$
Molecular Weight: **609.76**

Adamantane **27** (0.092 mmol, 18 mg, 1 eq) and coumarin **48** (0.092 mmol, 40 mg, 1 eq) were dissolved in EtOH (5 mL). Then, acetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The mixture was refluxed overnight at 85 °C. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified on a silica gel column (CH_3OH : CH_2Cl_2 = 1 : 100) to afford pure compound **49** as a yellow solid (250 mg, 75 %).

TLC (DCM/MeOH, 100/1), Rf = 0.1.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 10.55 (s, 1H, H11), 8.26 (s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, H5), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H10), 7.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H4), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H9), 6.77 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, H3), 6.57 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 3.73 (s, 2H), 3.46 (m, 10H, H2, H7, H8), 2.00 (s, 3H, CH ada), 1.86 (s, 6H, CH_2 ada), 1.69 (s, 6H, CH_2 ada), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H1).

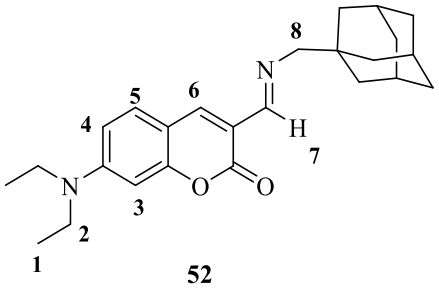
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 172.9, 164.1, 158.5, 156.7, 151.6, 151.3, 146.9, 144.0, 140.6, 130.7, 128.6, 125.0, 115.8, 115.0, 109.4, 107.1, 96.3, 44.1, 36.1, 27.6, 12.3.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{36}H_{44}N_5O_4$ $[M+H]^+$: 610.3393, Found 610.3394.

IR ν (cm^{-1}): 3302 (N-H), 2903.4 (C-H), 1711.8 (C=O lactone), 1596.2 (C=O amide), 1131.7 (C-N tertiary amine).

M.p.: 171.5 °C-172.1 °C.

Synthesis of 3-(adamantan-1-ylmethyl) imino) methyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one-ADA-I-Cou2 (52)



52

Chemical Formula: $\mathbf{C_{25}H_{32}N_2O_2}$
Molecular Weight: **392.53**

Compound **40** (0.41 mmol, 100 mg, 1 eq) and adamantane **51** (0.41 mmol, 67 mg, 1 eq) were dissolved in toluene (5 mL). The reaction mixture was refluxed with a Dean Stark at 110 °C for 4 hours. The solvent was removed. Then ethanol (10 mL) was added to the residue and was placed at 4 °C overnight. The precipitate was filtered, washed with cold ehanol and dried under reduced pressure to afford the compound **52** as an orange solid (30 mg, 18%).

TLC Cyclohexane/ EtOAc, (60/40) Rf = 0.65.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.38 (s, 2H, H6, NH), 7.40 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H5),), 6.61 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H, H4), 6.49 (d, *J* = 2.1 Hz, 3H), 3.45 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, H2), 3.29 (s, 2H, H8), 1.99 (s, 3H, H ada), 1.79 – 1.46 (m, 12H, H ada), 1.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H, H1).

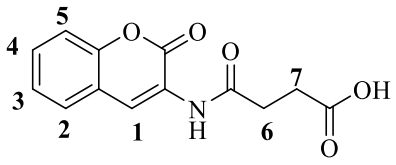
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 163.6,158.5, 157.0, 152.4, 145.1, 130.9, 122.4, 115.7, 114.5, 97.3, 58.6, 45.4, 39.4, 37.2, 36.6, 28.1, 12.6.

TOF HRMS (ESI Positive)*: m/z* Calc. for $C_{25}H_{33}N_2O_2$ $[M+H]^+$: 393.2542, Found 393.2541.

IR ν (cm^{-1}): 2901.2 (C-H), 1712.5 (C=O lactone), 1615.5 (C=N), 1255.9 (C-N tertiary amine).

M.p. : 125.5 °C-126.4 °C.

Synthesis of 4-oxo-4-((2-oxo-2H-chromen-3-yl) amino) butanoic acid (55)[270]



55

Chemical Formula: $\mathbf{C_{13}H_{11}NO_5}$
Molecular Weight: **261.23**

The succinic anhydridre **54** (1.49 mmol, 149 mg, 1.2 eq) and 3-aminocoumarin **53** (1.24 mmol, 200 mg, 1 eq) were dissolved in 6 mL of acetone. The mixture was stirred overnight at room temperature. Then, the precipitate was filtrated and was washed by cold acetone to give the product **55** as a brown solid (70 mg, 22%).

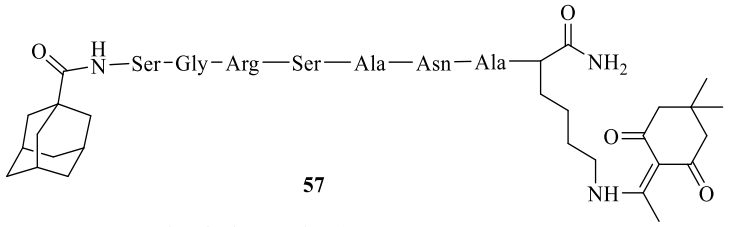
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.86 (s, 1H, NH), 8.63 (s, 1H, Har), 7.69 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Har), 7.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H ar), 7.43 – 7.28 (m, 2H, Har), 2.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): 173.2, 172.1, 158,2, 149.6, 129.5, 127.8, 124.9, 124.5, 119.6, 115.7, 31.9, 29.2.

TOF HRMS (ESI Negative): *m/z* Calc. for $C_{13}H_{10}NO_5$ $[M-H]^-$: 260.0559, Found 260.0557.

M.p.: 223.9 °C-224.8 °C.

Synthesis of ADA-P (57)[197]



57

Chemical Formula: $\mathbf{C_{51}H_{82}N_{14}O_{14}}$
Molecular Weight: **1115.28**

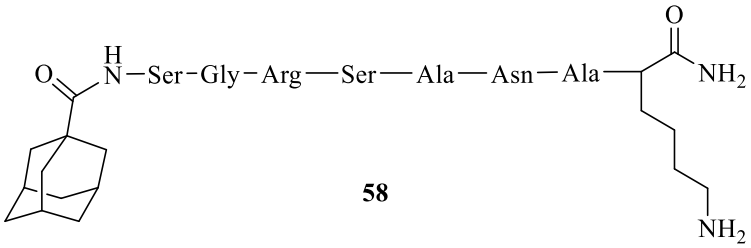
1-Adamantanecarboxylic acid **24** ($1.05x10^{-5}$ mol, 1.58 mg, 1 eq) and peptide **56** ($1.05x10^{-5}$ mol, 10 mg, 1 eq) were dissolved in dry DMF (0.5 mL). DIPEA ($3.15x10^{-5}$ mol, 4.071 mg, 5.5 µL, 3 eq), dry HOBt ($1.05x\ 10^{-5}$, 1.42 mg, 1 eq), HBTU ($1.15x10^{-5}$, 4.4 mg, 1.1 eq) were added to a solution. The mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. The product was purified by preparative HPLC (column KINETEX C_{18} :250×4. 6mm ; 5µm XB-C18 100Å) to afford compound **57** as a white solid (4 mg, 33%).

Conditions :

Times	Debit	%A (water)	%B (acetonitrile)
00 s	19.0	95	5
05 :00	19.0	95	5
40 :00	19.0	00	100

MS (MALDI-TOF) : *m/z* Calc. for $C_{51}H_{82}N_{14}O_{14}$: 1115.280, Found 1115.507.

Synthesis of ADA-P (58)



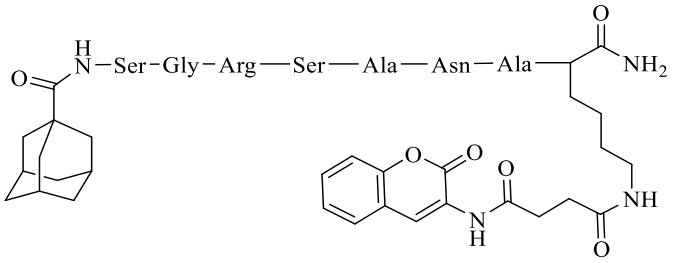
58

Chemical Formula: $\mathbf{C_{41}H_{70}N_{14}O_{12}}$
Molecular Weight: **951.08**

The compound **57** (1.79×10^{-6} mol, 2 mg, 1 eq) was dissolved in dry DMF. Then, $NH_2OH.HCl$ (8.96×10^{-6}, 1 mg, 5 eq) and imidazole (8.96×10^{-6} mol, 1 mg, 5 eq) were added to the solution. The mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. Then, the solvent was removed under reduced pressure to afford the compound **58** as a white solid.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{41}H_{71}N_{14}O_{12}$ $[M+H]^+$: 951.5300, Found 951.5301.

Synthesis of ADA-P-Cou (59)



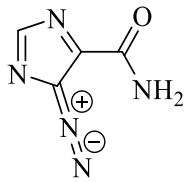
59

Chemical Formula: $\mathbf{C_{54}H_{79}N_{15}O_{16}}$
Molecular Weight: **1194.30**

The compound **58**(1.78×10^{-6} mol, 1.70 mg, 1 eq) and compound **55** (2.1×10^{-6} mol, 0.55 mg, 1.2 eq) were dissolved in NMP (50 µL). Then, PyBOP (1.95×10^{-6} mol, 1.02 mg, 1.1 eq), DIPEA (1.4×10^{-5}, 1.84 mg, 2.5 µL, 8 eq) were added to the solution. The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was analyzed by MS-MALDI.

MS (MALDI-TOF): *m/z* Calc. for $C_{54}H_{79}N_{15}O_{16}$: 1194.300, Found 1194.850.

Synthesis of 4-diazo-4H-imidazole-5-carboxamide (5b)[271]



5b

Chemical Formula: **$C_4H_3N_5O$**
Exact Mass: **137.03**

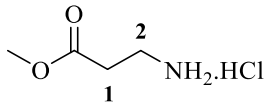
To a stirred solution of $NaNO_2$ (0.098 mol, 6.80 g, 8 eq) in water 15 mL was added dropwise a solution of AICA.HCl **5a** (0.012 mol, 2 g, 1 eq) in 15 mL of HCl (0.1M) at 0° C for 30 minutes. The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Then the precipitate was filtered and washed with water (50 mL) and THF (50 mL). The product **5b** was obtained as a yellow gold solid (1.4 g, 83%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.00 (s, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, NH), 7.61 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 162.6, 160.7, 154.8, 149.2.

TOF HRMS (ESI Negative): *m/z* Calc. for $C_4H_2N_5O$ $[M-H]^-$: 136.0259, Found 136.0257.

Synthesis of methyl 3-aminopropanoate hydrochloride (62)[272]



62

Chemical Formula: $\mathbf{C_4H_{10}ClNO_2}$
Molecular Weight: **139.58**

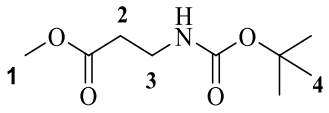
β-Alanine **61** (0.058 mol, 5.20 g, 1 eq) was dissolved in 50 mL of dry MeOH. Thionyl chloride (0.206 mol, 24.58 g, 3.5 eq) was added dropwise to a solution under argon atmosphere at 0°C. The mixture was refluxed for 24 hours at 65 °C. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was tritured by diethyl ether. The precipitate was filtered et was dried to give the product **62** as a beige solid (7.50 g, 93%).

1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.30 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, H2), 2.84 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 172.9, 52.8, 35.2, 31.1.

TOF HRMS (ESI Positive) : *m/z* Calc. for $C_4H_{11}NO_2$ $[M+H]^+$: 104.0712, Found 104.0704.

Synthesis of methyl 3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoate (64)[273]



64

Chemical Formula: $\mathbf{C_9H_{17}NO_4}$
Molecular Weight: **203.24**

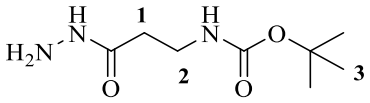
β-Alanine **62** (0.014 mol, 2 g, 1 eq) was dissolved in 3 mL of dry MeOH (6 mL). Distilled triethylamine (2 mL) was added dropwise to a solution at 0 °C under argon. Boc_2O (0.014 mol, 3.13 g, 1 eq) was added in portions to a mixture and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in chloroform (50 mL) and was washed with water (100 mL), with 10% aqueous citric acid (100 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate, evaporated to dryness. The poduct **64** was obtained as a yellowish oil (2.49 g, 88%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 6.86 (s, 1H, NH), 3.58 (s, 3H, OCH_3), 3.15 (q, *J* = 12.9, 6.4 Hz, 2H, CH_2, H3), 2.42 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH_2, H2), 1.36 (s, 9H, $(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 173.0, 155.9, 79.4, 51.4, 36.1, 34.1, 28.2.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_9H_{17}NO_4Na$ $[M+Na]^+$: 226.1054, Found 226.1030.

Synthesis of tert-butyl(3-hydrazinyl-3-oxopropyl)carbamate (65)[274]



65

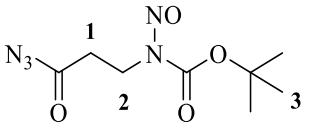
Chemical Formula: $\mathbf{C_8H_{17}N_3O_3}$
Molecular Weight: **203.24**

The compound **64** (0.02 mol, 4.46 g, 1 eq) was dissolved in *iso*propanol (12 mL). Hydrazine hydrate (0.087 mol, 2.81 g, 3 mL, 4 eq) was added. The mixture was heated at reflux for 48 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was washed with diethyl ether (50 mL), water (50 mL) and diethyl ether (50 mL). The product **65** was obtained as a white solid (3 g, 67%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.97 (s, 1H, N**H**NH_2), 6.75 (s, 1H, N**H**Boc), 4.26 (d, *J* = 39.6 Hz, 2H, NH_2), 3.10 (q, *J* = 13.6, 6.7 Hz, 2H, CH_2, H2), 2.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2, H1), 1.37 (s, 9H, H3, $(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 169.2, 154.9, 77.1, 38.1, 36.2, 27.7.

Synthesis of *tert*-butyl(3-azido-3-oxopropyl) (nitroso)carbamate (66)



66

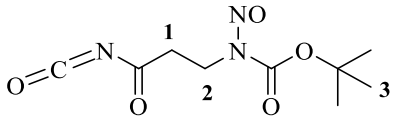
Chemical Formula: $\mathbf{C_8H_{13}N_5O_4}$
Molecular Weight: **243.22**

The compound **65** (0.984 mmol, 200 mg, 1 eq) was dissolved in a mixture CH_2Cl_2/H_2O (2 mL/2 mL). HCl (10M) was added dropwise to a mixture at 0 °C. Then, $NaNO_2$ (5.90 mmol, 407 mg, 6 eq) was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred for 1 hour at 0 °C-5 °C. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the organic phase was washed with water (2*100 mL), dried over sodium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure to give the product **66** as a yellowish oil (200 mg, 84 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 3.90 (q, 2H, **CH_2**NOBoc, H2), 2.45 (t, 2H, **CH_2**CON_3, H1), 1.60 (s, 9H, H3, $(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 169.5, 151.8, 80.3, 55.9, 36.3, 28.4.

Synthesis of *tert*-butyl(3-isocyanato-3-oxopropyl) (nitroso)carbamate (67)



67

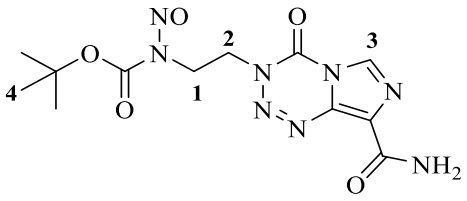
Chemical Formula: $\mathbf{C_9H_{13}N_3O_5}$
Molecular Weight: **243.22**

The compound **66** (5.1 mmol, 1.24 g, 1 eq) was dissolved in dry DCM (30 mL). The mixture was stirred at 30 °C for 48 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure to give the product **67** as an orange oil (1.24 g, 100%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 3.90 (q, 2H, **CH_2**NOBoc, H2), 2.73 (t, 2H, **CH_2**NCO, H1), 1.60 (s, 9H, H3, $(CH_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 151.8, 148.1, 121.8, 85.3, 55. 9, 36.2, 27.4.

Synthesis of *tert*-butyl(2-(8-carbamoyl-4-oxoimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazin-3(4H) -yl) ethyl) (nitroso)carbamate (68)



68

Chemical Formula: $\mathbf{C_{12}H_{16}N_8O_5}$
Molecular Weight: **352.31**

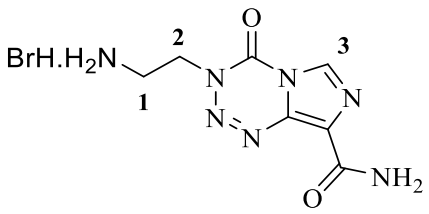
The isocyanate **76** (0.0052 mol, 1.12 g, 1 eq) was added to a suspension of diazo-IC **5b** (0.0052 mol, 713 mg, eq) in dry DMSO (5 mL). The mixture was stirred at 30 °C protected from light under argon atmpshere for 48 hours. Water (15 mL) was added and the mixture was filtered. The residue was washed with copious amounts of water until the washings came through colourless. The solid was washed with propan-2-ol (200 mL) and left to dry on the filter. The solid was suspended in chloroform (100 mL), filtered, and the chloroform filtrate evaporated to dryness to give the imidazotetrazine **78** as a pale yellow solid (133 mg, 7%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.95 (s, 1H, H3), 7.88 (s, 1H, NH), 7.73 (s, 1H, NH), 4.41 – 4.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH_2, H2), 4.18 – 4.06 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH_2, H1), 1.41 (s, 9H, H4 $(CH3)_3$).

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{12}H_{16}N_8O_5Na$ $[M+Na]^+$: 376.1590, Found 376.2256.

M.p.: 155 °C-156 °C

Synthesis of 3-(2-aminoethyl) -4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide hydrobromide (69)



69

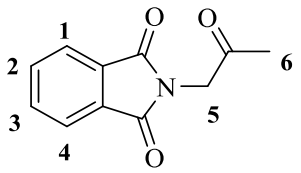
Chemical Formula: $\mathbf{C_7H_{10}BrN_7O_2}$
Molecular Weight: **304.10**

HBr (48%, 9.8 mmol, 794 mg, 0.6 mL, 26 eq) was added over 30 minutes to a stirred solution of BOC-imidazotetrazine **68** (0.37 mmol, 133 mg, 1 eq) in acetonitrile (8 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight and a precipitate was formed. The solid was collected by filtration and dried under reduced pressure. The solid was suspended in chloroform (100 mL), filtered and then dried to give the hydrobromide salt **79** as a beige solid (15 mg, 13%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.94 (s, 1H, H3), 7.89 (s, 3H, NH, NH_2), 7.74 (s, 1H, NH), 4.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH_2, H2), 3.30 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH_2, H1).

M.p.: 145 °C - 146 °C

Synthesis of 2-(2-oxopropyl) isoindoline-1,3-dione (75)[275]



75

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_9NO_3}$
Molecular Weight: **203.19**

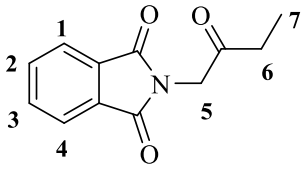
Potassium phthalimide **72** (21 mmol, 3.88 g, 1.5 eq) was dissolved in DMF (20 mL). Then, chloroacetone **73** (14 mmol, 1.12 mL, 1 eq) and the reaction was stirred at 65 °C for 4 hours and monitored by TLC. After the reaction was completed, the reaction mixture was poured into water (250 mL) and extracted with $CHCl_3$ (3×100 mL). The organic layer was washed with NaOH aq 40% (100 mL), water (2×100 mL) and brine (100 mL). The solution was dried over anhydrous $MgSO_4$, evaporated to yield **75** as a colorless crystals (2.80 g,98%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.85 (dd, *J* = 5.2, 3.1 Hz, 2H, H1, H4), 7.72 (dd, *J* = 5.4, 3.0 Hz, 2H, H2, H3), 4.48 (s, 2H, H5), 2.25 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 200.2, 167.8, 134.5, 132.2, 123.7, 47.3, 27.2.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{11}H_{10}NO_3$ $[M+H]^+$: 204.0661, Found 204.0663.

Synthesis of 2-(2-oxobutyl)isoindoline-1,3-dione (76)[223]



76

Chemical Formula: $\mathbf{C_{12}H_{11}NO_3}$
Molecular Weight: **217.22**

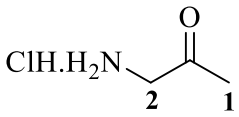
Potassium phthalimide **72** (10.7 mmol, 2 g, 1.5 eq) was dissolved in DMF (20 mL). Then, 1-bromobutan-2-one **74** (7 mmol, 0.724 mL, 1 eq) and the reaction was stirred at 65 °C for 4 hours and monitored by TLC. After the reaction was completed, the reaction mixture was poured into water (250 mL) and extracted with $CHCl_3$ (3×100 mL). The organic layer was washed with NaOH aq 40% (100 mL), water (2×100 mL) and brine (100 mL). The solution was dried over anhydrous $MgSO_4$, evaporated to yield **76** as a colorless crystals (1.4 g, 92%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.85-7.81 (m, 2H, H1, H4), 7.76 – 7.66 (m, 2H, H2, H3), 4.46 (s, 2H, H5), 2.53 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, H6), 1.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, H7).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 203.0, 168.0, 134.5, 132.4, 123.8, 77.0, 46.5, 33.5, 7.7.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{12}H_{12}NO_3$ $[M+H]^+$: 218.0817, Found 218.0815.

Synthesis of aminoacetone hydrochloride (77)[275]



77

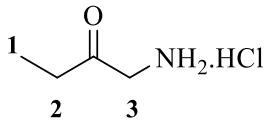
Chemical Formula: **C_3H_8ClNO**
Molecular Weight: **109.55**

N-Acetonylphthalimide **75** (4.9 mmol, 1 g, 1 eq) was dissolved in an aqueous solution of HCl conc./HCOOH/H_2O (6/2/2 mL) and was heated to reflux for 7 hours. The solution was cooled at room temperature and the precipitated phthalic acid was filtered and washed four time with cold water (10 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure to give the desired product **77** as a brown oil, its hydrochloride salt (430 mg, 80%).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O): δ 4.11 (s, 2H, CH_2, H2), 2.30 (s, 3H, CH_3, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 204.3, 47.5. 26.2.

Synthesis of 1-aminobutan-2-one hydrochloride (78)[223]



78

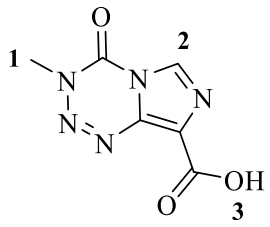
Chemical Formula: **$C_4H_{10}ClNO$**
Molecular Weight: **123.58**

Compound 2-(2-oxobutyl) isoindoline-1,3-dione **76** (4.6 mmol, 1 g, 1 eq) was dissolved in an aqueous solution of HCl conc./HCOOH/H_2O (6/2/2 mL) and was heated to reflux for 7 hours. The solution was cooled at room temperature and the precipitated phthalic acid was filtered and washed four time with cold water (10 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure to give the desired product **78** as a brown oil, its hydrochloride salt (490 mg, 86%).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O): δ 4.04 (s, 2H, CH_2, H3), 2.58 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2, H2), 1.03 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_3, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 206.9, 34.5, 33.0, 6.4.

Synthesis of 3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxylic acid (2)[276]



2

Chemical Formula: $\mathbf{C_6H_5N_5O_3}$
Molecular Weight: **195.14**

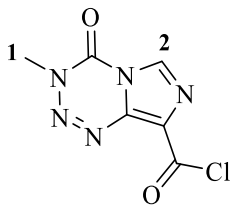
Temozolomide **1** (5.66 mmol, 1.10 g, 1 eq) was dissolved in 5 mL of conc. H_2SO_4. Then, sodium nitrite (18.5 mmol, 1.28 g, 3.6 eq) in 3.2 mL water was added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature overnight in the dark. Cold water (20 mL) was added and the white precipitate was collected. The solid was dried under reduced pressure to give **2** as a white solid (1 g, 91%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 13.33 (s, 1H, OH, H3), 8.81 (s, 1H, H2), 3.87 (s, 3H, H3, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 161.7, 138.9, 136.1, 128.9, 126.0, 36.7.

TOF HRMS (ESI Negative): *m/z* Calc. for $C_6H_4N_5O_3$ $[M-H]^-$: 194.0314, Found 194.0310.

Synthesis of 3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carbonyl chloride (3)[203]

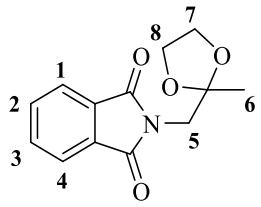


3

Chemical Formula: $\mathbf{C_6H_4ClN_5O_2}$
Molecular Weight: **213.58**

Compound **2** (0.5 mmol, 100 mg, 1 eq), thionyle chloride (1 mL) and DMF (2 drops) was refluxed 3 hours. The excess of thionyl chloride was evaporated under reduced pressure. Toluene (5 mL) was added, and the solution was evaporated to give **3** as a yellow solid which was used without purification in the next step reaction (100 mg, 92%).

Synthesis of 2-((2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl) methyl) isoindoline-1,3-dione (84)



84

Chemical Formula: $\mathbf{C_{13}H_{13}NO_4}$
Molecular Weight: **247.25**

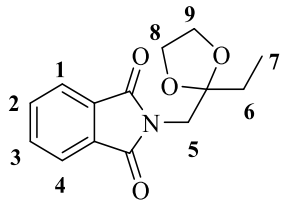
Compound **75** (24.60 mmol, 5 g, 1 eq) was dissolved to 90 mL of toluene. Then, ethylene glycol **83** (150.06 mmol, 3 mL, 6.1 eq) and dry para-toluenesulfonic acid (2.46 mmol, 467 mg, 0.1 eq) were added. The mixture was refluxed for 48 hours with a Dean-Stark. The reaction mixture was cooled to room temperature, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was recrystallized with ethanol to give the compound **84** as a white crystal (5.8 g, 90 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.89–7.80 (m, 2H, H1, H4), 7.80–7.66 (m, 2H, H2, H3), 4.10 – 4.03 (m, 2H, CH_2, H7), 3.99 – 3.92 (m, 2H, CH_2, H8), 3.78 (s, 2H, CH_2, H5), 1.40 (s, 3H, CH_3, H6).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 168.8, 134.8, 124.1, 109.0, 65.6, 43.5, 24.1.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{13}H_{14}NO_4$ $[M+H]^+$: 248.0923, Found 248.0919.

Synthesis of 2-((2-ethyl-1,3-dioxolan-2-yl) methyl) isoindoline-1,3-dione (85)



85

Chemical Formula: $\mathbf{C_{14}H_{15}NO_4}$
Molecular Weight: **261.27**

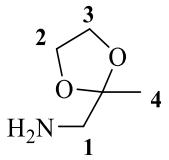
Compound **76** (1.45 mmol, 315 mg, 1 eq) was dissolved to 5 mL of toluene. Then, ethylene glycol **83** (8.8 mmol, 0.5 mL, 6.1 eq) and dry para-toluenesulfonic acid (0.145 mmol, 27.5 mg, 0.1 eq) were added. The mixture was refluxed for 48 hours with a Dean-Stark. The reaction mixture was cooled to room temperature, and water (30 mL), $NaHCO_3$ sat. (5 mL), DCM (30 mL) were added. The aqueous phase was extracted with DCM (3×100 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, and solvent was removed under reduced pressure to give compound **85** as a colorless oil (383 mg, 100 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.86–7.81 (m, 2H, H1, H4), 7.79–7.63 (m, 2H, H2, H3), 4.22–4.08 (m, 2H, CH_2, H9), 4.07–3.92 (m, 2H, CH_2, H8), 3.79 (s, 2H, CH_2, H5), 1.74 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2, H6), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_3, H7).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 167.4, 133.7, 131.8, 123.1, 65.1, 45.9, 32.9, 7.1.

HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{14}H_{16}NO_4$ $[M+H]^+$: 262.1014, Found 262.1087.

Synthesis of (2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)methanamine (86)[277]



86

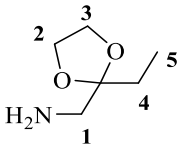
Chemical Formula: $\mathbf{C_5H_{11}NO_2}$
Molecular Weight: **117.15**

Compound **84** (12.1 mmol, 3 g, 1 eq) was dissolved in ethanol (120 mL). Hydrazine monohydrate 1 mL was added and was heated at 65 °C for one hour. Then another 1 mL of hydrazine was added and was heated for 2 hours at 65 °C. The mixture was stirred at room temperature overnight. The resulting precipitate was filtrated and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was suspended in ethanol and was again filtered. After concentration of the filtrate, the residue was dissolved in water (50 mL) and was extracted by DCM (2×100 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate, and solvent was removed under reduced pressure to give compound **86** as a yellow oil (600 mg, 42%). The amine was used directly in the next step.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.03 – 3.90 (m, 4H, CH_2, H2, H3), 2.73 (s, 2H, CH_2, H1), 1.32 (s, 2H, NH_2), 1.28 (s, 3H, CH_3, H4).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 110.1, 66.0, 43.2, 29.6.

Synthesis of (2-ethyl-1,3-dioxolan-2-yl)methanamine (87)[277]



87

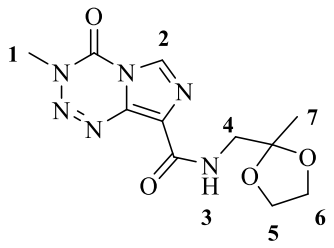
Chemical Formula: $\mathbf{C_5H_{11}NO_2}$
Molecular Weight: **117,15**

Compound **85** (0.76 mmol, 200 mg, 1 eq) was added to 5 mL of deionized water along with 2 g of NaOH. The mixture was refluxed for 1 night. Then, 2 g of NaOH was added slowly over the course of the reflux and was refluxed again for 1 night. Afterward, the reaction mixture was cooled to room temperature and extracted with dichloromethane (3×100 mL). The organic layers were then combined and dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure to yield pure product **87** as a yellow oil (50 mg, 42%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.99 (s, 4H, CH_2, H2, H3), 2.74 (s, 2H, CH_2, H1), 1.65 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_2, H4), 1.40 (s, 2H, NH_2), 0.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, H5).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 110.4, 66.1, 43.5, 29.8, 7.7.

Synthesis of 3-methyl-*N*-((2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)methyl)-4-oxo-3,4 dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide (88)



88

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{14}N_6O_4}$
Molecular Weight: **294.27**

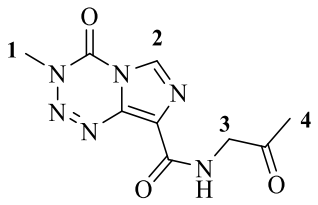
Temozolomide acetyl chloride **3** (0.936 mmol, 200 mg, 1 eq) was dissolved in dry DMF (2.2 mL) under nitrogen atmosphere. Then, compound **86** (0.936 mmol, 110 mg, 1 eq) and dry pyridine (0.4 mL) were added. The mixture was stirred at room temperature overnight. Water (5 mL) was added and extracted with EtOAc (3×100 mL). The organic layers were then combined and dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure to yield pure product **88** as an orange solid (215 mg, 78%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.85 (s, 1H, H2), 8.06 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH, H3), 3.93 (m, 4H, CH_2, H5, H6), 3.87 (s, 3H, CH_3, H1), 3.47 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH_2, H4), 1.29 (s, 3H, CH_3, H7).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 162.4, 159.6, 139.2, 134.6, 130.1, 128.6, 108.1, 64.5, 44.0, 30.9, 22.5.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{11}H_{15}N_6O_4$ $[M+H]^+$: 295.1155, Found 295.1153.

Synthesis of 3-methyl-4-oxo-N-(2-oxopropyl) -3,4-dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide (81)



81

Chemical Formula: $\mathbf{C_9H_{10}N_6O_3}$
Molecular Weight: **250.21**

Method 1 :

Temozolomide **88** (0.18 mmol, 53 mg, 1 eq) was dissolved in HCl 2N (3 mL). The mixture was refluxed at 60 °C overnight was extracted with EtOAc (3×100 mL). The organic layers were then combined and dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure to yield pure product **81** as a white solid (10 mg, 22%).

Method 2 :

CDMT (0.256 mmol, 47 mg, 1.05 eq) and *N*-methylmorpholine (0.300 mmol, 31 mg, 34 µL, 1.2 eq). The mixture was stirred at 0 °C for 1 hour under nitrogen atmosphere. Temozolomide acid **2** (0.256 mmol, 50 mg, 1 eq) was then added and was stirred again 1 hour at 0 °C. Compound **77** (0.28 mmol, 31 mg, 1.2 eq) in dry DMF (1 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue obtained was purified by flash silica gel chromatography (100% ethyl acetate) to afford the compound **81** as a light white solid **(**53 mg, 83%).

TLC (ethyl acetate, 100%), Rf = 0.5.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.86 (s, 1H, H2), 8.58 (s, 1H, NH), 4.16 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH_2, H3), 3.87 (s, 3H, CH_3, H3), 2.14 (s, 3H, CH_3, H4).

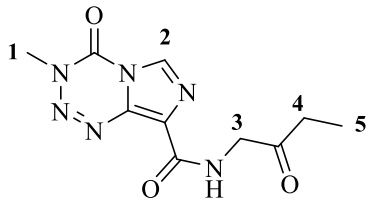
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 204.5, 160.1, 139.6, 135.1, 130.2, 129.1, 49.6, 36.6, 27.5.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_9H_{11}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 251.0893, Found 251.0896.

IR ν (cm^{-1}): 3391 (N-H), 2935.5 (C-H), 1731.1 (C=O ketone), 1675.9 (C=O amide), 1576.6 (N=N).

M.p.: 166.5 °C-166.8°C

Synthesis of 3-methyl-4-oxo-N-(2-oxobutyl) -3,4-dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide (82)



82

Chemical Formula: $\mathbf{C_{10}H_{12}N_6O_3}$
Molecular Weight: **264.24**

Temozolomide acid **2** (1.8 mmol, 356 mg, 1 eq) and DMTMM (2 mmol, 555 mg, 1.1 eq) were dissolved in dry DMF (10 mL) under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 °C for 1 hour. Then, the compound **78** (1.8 mmol, 226 mg, 1 eq) in dry DMF (2 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue obtained was purified by flash silica gel chromatography (cyclohexane/ ethyl acetate : 20% to 100% ethyl acetate) to afford the compound **82** as a light white solid (265 mg, 56%).

TLC (ethyl acetate, 100%), Rf = 0.5.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 8.87 (s, 1H, H2), 8.60 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 4.16 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH_2, H3), 3.87 (s, 3H, CH_3, H1), 0.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_3, H5).

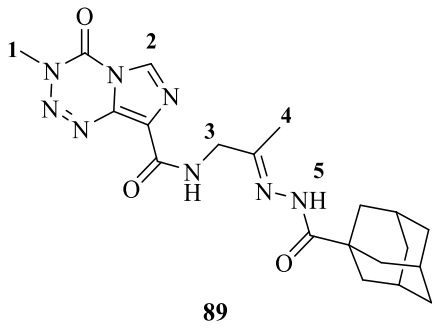
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 206.6, 160.1, 139.9, 128.60, 48.3, 36.2, 32.30, 7.34.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc for $C_{10}H_{13}N_6O_3$ $[M+H]^+$: 265.1054, Found 265.1049.

IR ν (cm^{-1}): 3319 (N-H), 2937.7 (C-H), 1727.7 (C=O ketone), 1654.7 (C=O amide), 1577.7 (N=N).

M.p.: 167.4 °C-167.9°C.

Synthesis of *N*-adamantane-1-carbonyl) hydrazono) propyl) -3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide (89)



89

Chemical Formula: $\mathbf{C_{20}H_{26}N_8O_3}$
Molecular Weight: **426.47**

Adamantane **27** (0.289 mmol, 56 mg, 1 eq) and temozolomide **81** (0.57 mmol, 145 mg, 2 eq) were dissolved in EtOH (10 mL). Then, acetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed overnight at 85°C. A precipitate was formed. Then, the precipitate was filtered, washed with cold ehanol and dried under reduced pressure to afford the compound **89** as a white solid (100 mg, 81%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.44 (s, 1H, H2), 8.68 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H2), 4.14 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H3), 3.87 (s, 3H, H1), 1.97 (s, 3H, Hada), 1.87 (s, 6H, Hada), 1.67 (s, 6H, Hada).

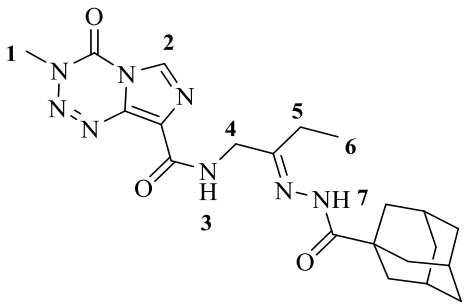
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 177.0, 172.7, 169.1, 160.3, 158.9, 157.9, 151.5, 139.6, 135.1, 130.1, 49.3, 46.8, 39.3, 36.5, 28.4, 27.3.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{20}H_{26}N_8O_3Na$ $[M+Na]^+$: 444.2472, Found 444.2470.

IR ν (cm^{-1}): 3296.2 (N-H), 2888.4 (C-H), 1739.5 (C=O amide), 1651.6 (C=O diamide), 1577.9 (N=N).

M.p.: 228.6 °C-229.5 °C.

Synthesis of *N*-adamantane-1-carbonyl) hydrazono) butyl) -3-methyl-4-oxo-3,4-dihydroimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide (90)



90

Chemical Formula: $\mathbf{C_{21}H_{28}N_8O_3}$
Molecular Weight: **440.50**

Adamantane **27** (77.2 µmol, 15 mg, 1.1 eq) and temozolomide **82** (68.1 µmol, 18 mg, 1 eq) were dissolved in dry methanol (5 mL). Then, trifluoroacetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed overnight at 85 °C. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue obtained was purified by flash silica gel chromatography ($CHCl_3$/ MeOH (9/1)) to afford the compound **90** as a white solid (24 mg, 80%).

TLC ($CHCl_3$/ MeOH (9/1)), Rf = 0.5.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.42 (s, 1H, NH, H7), 8.86 (s, 1H, H2), 8.60 (t, *J* = 4.6 Hz, 1H, NH, H3), 4.20 – 4.15 (m, 2H, CH_2, H4), 3.88 (s, 3H, CH_3, H1), 2.27 (q, *J* = 4.6, 2.8 Hz, 2H, CH_2, H5), 1.98 (s, 3H, CH ada), 1.84 (s, 6H, CH_2 ada), 1.71 (s, 6H, CH_2 ada), 1.01 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, H6).

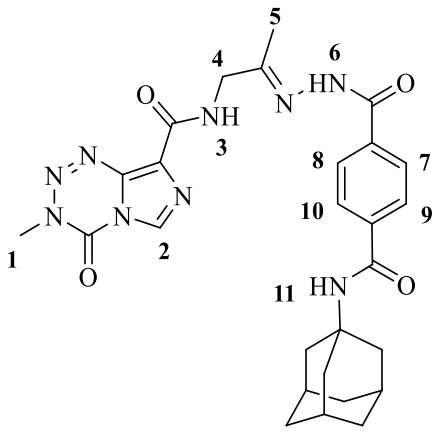
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): for reasons of lack of solubility, we could not obtain the ^{13}C spectrum.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{21}H_{29}N_8O_3$ $[M+H]^+$: 441.2353, Found 441.2363.

IR ν (cm^{-1}): 3307.5 (N-H), 2902.3 (C-H), 1732.9 (C=O amide), 1662.3(C=O diamide), 1576.6 (N=N).

M.p.: 216.2 °C-217.1°C.

Synthesis of *N*-adamantan-1-ylcarbamoyl) benzoyl) hydrazono) propyl) -3-methyl-4-oxo-3,4-dihydropyrrolo[2,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide (91)



91

Chemical Formula: $\mathbf{C_{28}H_{32}N_8O_4}$
Molecular Weight: **544.60**

Adamantane **42d** (0.16 mmol, 50 mg, 1 eq) and temozolomide **81** (0.16 mmol, 40 mg, 1 eq) were dissolved in EtOH (5 mL). Then, acetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed overnight at 85 °C. A precipitate was formed. Then, the precipitate was filtered, washed with cold ehanol and dried under reduced pressure to afford compound **91** as a white solid (24 mg, 27%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 10.71 (s, 1H, NH, H6), 8.89 (s, 1H, H2), 8.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH, H3), 7.86 (s, 4H, 4×CH, H7, H8, H9, H10), 7.74 (s, 1H, NH, H11), 4.20 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH_2, H4), 3.87 (s, 3H, CH_3, H1), 2.26 (s, 3H, CH_3, H5), 2.03 (d, *J* = 20.7 Hz, 9H, 3×CH_2 ada and 3×CH ada), 1.66 (s, 6H, CH_2 ada).

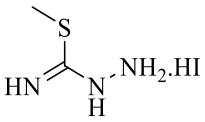
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): for reasons of solubility, we could not obtain the ^{13}C spectrum

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{28}H_{32}N_8O_4Na$ $[M+Na]^+$: 568.2397, Found 568.2388.

IR ν (cm^{-1}): 3394.1 (N-H), 2905.9 (C-H), 1742.4 (C=O amide), 1638.1 (C=O diamide), 1543.9 (N=N).

M.p.: 292.4 °C - 293.3 °C.

Synyhesis of S-methylisothiosemicarbazide hydroiodide (96)[232]



96

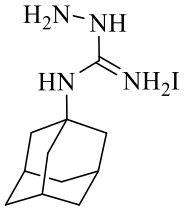
Chemical Formula: $\mathbf{C_2H_8IN_3S}$
Molecular Weight: **233.07**

A mixture of thiosemicarbazide **94** (19.75 mmol, 1.80 g, 1 eq) and methyl iodide **95** (19.75 mmol, 2.80 g, 1 eq) in absolute ethanol (50 mL) was refluxed for 4 hours. Then, the mixture was allowed to cool at room temperature and was evaporated under reduced pressure to afford the compound **96** as a white solid (4.50 g, 98%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 10.55 (s, 1H, NH), 9.12 (s, 1H, NH), 5.18 (s, 2H, NH_2), 2.57 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): 167.9, 13.1.

Synthesis of 1-(3-aminoguanidino)adamantane hydroiodide (97)[232]



97

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{21}IN_4}$
Molecular Weight: **336.22**

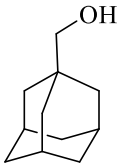
1-Aminoadamantane 42a (2.5 mmol, 378 mg, 1 eq) was dissolved in ethanol (10 mL) and then S-methyl*iso*thiosemicarbazide hydroiodide **96**(2.5 mmol, 583 mg, 1 eq) was added in the solution in one portion. The mixture was refluxed for 4 hours and the solvent was evaporated. The obtained solid was washed with diethyl ether (50 mL) to afford the compound **97** as an orange solid (600 mg, 71%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 7.63 –5.24 (s, 6H), 2.08 (s, 3H, Ad-CH), 1.74 (s, 6H, CH_2 ada), 1.86 – 1.23 (m, 6H, CH_2 ada).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): 151.2, 51.4, 40.7 35.6, 28.7.

M.p.: 224 °C - 226 °C.

Synthesis of adamantane-1-yl-methanol (99a)[278]



99a

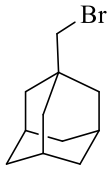
Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{18}O}$
Molecular Weight: **166.26**

Anhydrous diethyl ether 15 mL was stirred at 0 °C, then was added $LiAlH_4$ (1.0 M solution in THF, 12 mmol, 0.5 mL, 1.08 eq) and adamantane-1-carboxylic acid **24** (11.1 mmol, 2.0 g, 1 eq) portionwise. The mixture was stirred at room temperature overnight. The $LiAlH_4$ residual was quenched by water (0.48 mL), NaOH (15% aq., 1.5 mL) and water (0.5 mL). Then Et_2O (20 mL) and $MgSO_4$ were added. The mixture was filtered and evaporated under reduced pressure to afford the compound **99a** as a white solid (1.8 g, 98%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.20 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.99 (s, 3H, CH ada), 1.69 (q, *J* = 12.0 Hz, 6H, CH_2 ada), 1.51 (d, *J* = 2.3 Hz, 6H, CH_2 ada).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 74.0, 39.1, 37.3, 34.6, 28.3.

Synthesis of 1-(bromomethyl)adamantane (99b)[279]



99b

Chemical Formula: $\mathbf{C_{11}H_{17}Br}$
Molecular Weight: **229.16**

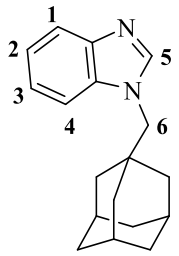
Adamantane-1-yl-methanol **99a** (3 mmol, 0.50 g, 1 eq) and $ZnBr_2$ (7.82 mmol, 1.76 g, 2.6 eq) were suspended in 10 mL of HBr aq. in a Schlenk flask fitted with a reflux condenser. Then, the mixture was refluxed at 125 °C overnight. The flask was cooled to room temperature and distilled water 50 mL was added and extracted with EtOAc (2×100 mL). The organic layer was washed with water (2×100 mL) and brine (100 mL) and dried over anhydrous $MgSO_4$, evaporated to yield **99b** as a yellow oil (625 mg, 91%).

TLC (petroleum ether, 100%), Rf = 0.8.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 3.15 (s, 2H, CH_2), 1.99 (s, 3H, CH ada), 1.72–1.59 (m, 6H, CH_2 ada), 1.55 (br, 6 H, CH_2 ada).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 48.4, 40.5, 36.7, 33.5, 28.3.

Synthesis of 1-adamantan-1-ylmethyl-1H-benzo[d]imidazole (100)[233]



100

Chemical Formula: $\mathbf{C_{18}H_{22}N_2}$
Molecular Weight: **266.38**

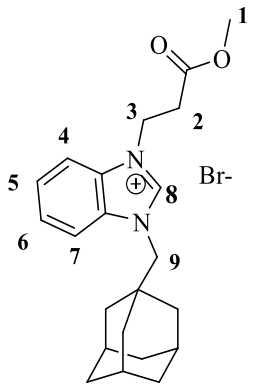
Benzimidazole **98** (4.09 mmol, 483 mg, 1.5 eq) was dissolved in dry DMF (10 mL) and NaH (6.8 mmol, 163 mg, 2.5 eq) in dry DMF (5 mL) was added portionwise at room temperature. This mixture was stirred for 15 minutes and 1-(bromomethyl)adamantane **99b** (2.72 mmol, 625 mg, 1 eq) in dry DMF (2 mL). The mixture was heated at 120 °C for 5 days under nitrogen atmosphere. The mixture was poured into ice and extracted with dichloromethane (3×100 mL). The combined organic phases were washed with water (2×100 mL) and brine (100 mL) and dried over sodium sulfate. The solution was evaporated under reduced pressure and was recrystallized by petroleum ether/EtOAc (1/1) to give the compound **100** as a light white solid (640 mg, 88%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.82 (s, 1H, H5), 7.40 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H1, H4), 7.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 2H, H6), 1.99 (s, 3H, CH ada), 1.83 – 1.50 (m, 12H, CH_2 ada).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 144.4, 143.3, 135.3, 122.8, 121.9, 120.2, 110.5, 57.2, 40.8, 36.7, 35.4, 28.2.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{18}H_{23}N_2$ $[M+H]^+$: 267.1861, Found 267.1852.

Synthesis of 1-adamantan-1-ylmethyl)-3-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (102)[280]



102

Chemical Formula: $\mathbf{C_{22}H_{29}BrN_2O_2}$
Molecular Weight: **433.38**

Compound **100** (0.563 mmol, 150 mg, 1 eq) was dissolvend in dry acetonitrile (2 mL) under nitrogen atmosphere. Then methyl 3-bromopropanoate **101** (2.25 mmol, 0.3 mL, 4 eq) was added and the mixture was refluxed for 2 days. After residual halide compound was removed by precipitation in diethyl ether. The precipitate was dried under reduced pressure and was purified by column chromatography using silica gel, 9:1 (v/v) DCM/MeOH solvents to give the compound **102** as a light white solid (174 mg, 71%).

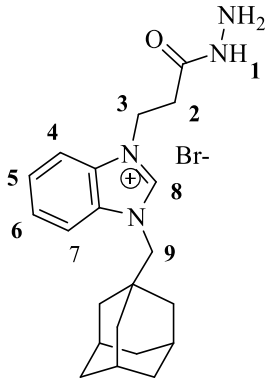
TLC (DCM/MeOH, 9/1), Rf = 0.3.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*): δ 9.68 (s, 1H, H8), 8.13 (dd, *J* = 6.4, 3.1 Hz, 2H, H4, H7), 7.68 (dd, *J* = 6.3, 3.1 Hz, 2H, H5, H6), 4.76 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H3), 4.23 (s, 2H, H9), 3.57 (s, 3H, H1), 3.11 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H2), 1.94 (s, 3H, CH ada), 1.76 – 1.48 (m, 12H, CH_2 ada).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d6*): δ 171.3, 143.4, 132.7, 130.8, 127.1, 114.7, 113.9, 57.6, 52.2, 42.9, 36.2, 34.8, 32.8, 27.8.

TOF MS (MALDI-TOF): *m/z* Calc. for $C_{22}H_{29}BrN_2O_2$: 433.380, Found 353.259.

Synthesis of 1-adamantan-1-ylmethyl) -3-(3-hydrazinyl-3-oxopropyl) -1H-benzo[d]imidazol-3-ium bromide (107)



107

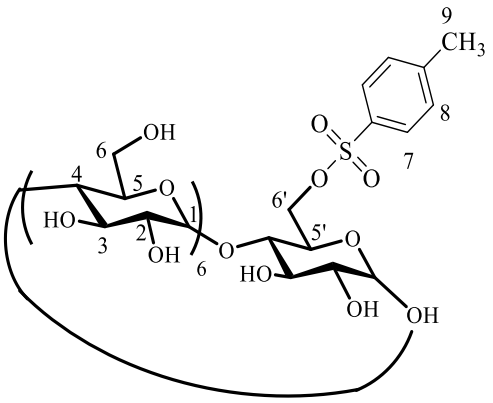
Chemical Formula: $\mathbf{C_{21}H_{29}BrN_4O}$
Molecular Weight: **433.39**

Hydrazine hydrate (2.06 mmol, 0.1 mL, 15 eq) was added to a suspension of compound **106** (0.138 mmol, 60 mg, 1 eq) in 3 mL of EtOH. The mixture was stirred at ambient temperature overnight. The solvent and the excess were removed under reduced pressure to afford the compound **107** as yellow solid (59 mg, 100%) and was used in the next step without purification.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9.65 (s, 1H, H8), 9.17 (s, 1H, NH), 8.11 (dd, *J* = 6.4, 3.1 Hz, 2H, H4, H7), 7.61 (dd, *J* = 6.3, 3.1 Hz, 2H, H5, H6), 7.23 (s, 2H, NH_2), 4.75 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H3), 4.23 (s, 2H, H9), 2.93 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H2), 1.94 (s, 3H, CH ada), 1.76 – 1.53 (m, 12H, CH_2 ada).

TOF MS (MALDI-TOF): *m/z* Calc. for $C_{22}H_{29}N_2O_2$: 433.390, Found 353.263.

Synthesis of 6*O*-monotosyl-β-cyclodextrin (110)



110

Chemical Formula: $\mathbf{C_{49}H_{76}O_{37}S}$
Molecular Weight: **1289.17**

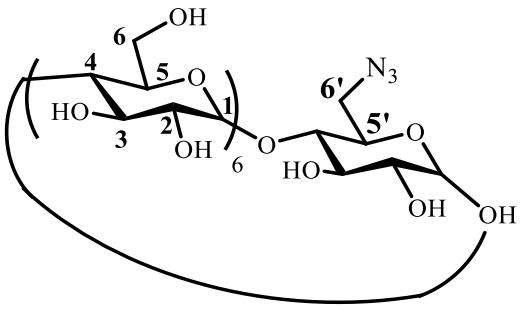
β-cyclodextrin **108** (4.44 mmol, 5 g, 1 eq) was dissolved in water (80 mL). NaOH pellets (10.8 mmol, 435 mg, 2.5 eq) was added. At 0° C, TsCl **109** (4.44 mmol, 846 mg, 1 eq) in 5 mL ACN was added to 80 mL aqueous solution of β-cyclodextrin dropwise over 15 minutes and the mixture was stirred for 4 hours at 0 °C under N_2. Then, the solution was neutralized by adding 0.6 mL of 2N aqueous hydrochloric acid. The product **110** was recrystallized overnight and washed with cold acetone. The final product was dried in a vacuum oven at 60 °C, yielding a white solid (4.5 g, 79%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 7.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-7), 7.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-8), 5.69 (br, 14H, OH-2,3), 4.83 (t, 5H, H-1), 4.77 (t, 2H, H-1), 4.47 (d, *J* = 26.3 Hz, 6H, OH-6), 4.37 (br, 2H, H-6'), 4.35 (br, 1H, H-5'), 3.81-3.08 (br, 26H, H-2,3,4,5,6 overlap with H_2O), 2.43 (s, 3H, H-9).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6): δ 145.2, 132.8, 130.2, 128.5, 127.8, 125.8, 102.2, 97.3, 81.7, 79.4, 73.3, 72.6, 72.3, 69.9, 60.2, 55.1, 48.9, 40.3, 40.1, 39.8, 39.5, 39.2, 38.9, 38.7, 36.2, 31.0, 21.5, 21.1.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{49}H_{76}N_{37}SNa$ $[M+Na]^+$: 1311.3684, Found 1311.3684.

Synthesis of *O*-6-monoazide-β-cyclodextrin (111a)



111

Chemical Formula: $\mathbf{C_{42}H_{69}N_3O_{34}}$
Molecular Weight: **1160.00**

β-Cyclodextrin **110** (2.3 mmol, 3 g, 1 eq) was dissolved in 35 mL of water. NaN_3 (0.0116 mol, 757 mg, 5 eq) was then added. The mixture was refluxed for 48 hours at 80 °C. The product **111a** was then precipitated by 2 L of acetone and filtrated on Buchner. The residue was purified by flash chromatography, using 7:3 v/v acetonitrile/water as eluent to provide **111a** as white solid after freeze-drying (2.1 g, 78 %).

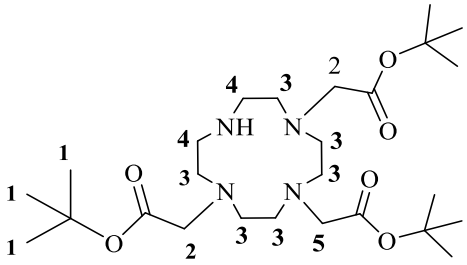
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 5.72 (br, 14H, OH-2,3), 4.88 (s, H, H-1), 4.83 (d, 6H, H-1), 4.57-4.40 (br, 6H, OH-6), 3.86-3.50 (br, 28H, H-3,5,6,6'), 3.32 (br, 14H, H-2,4 overlap with H_2O).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 101.8, 81.0, 73.0, 72.3, 72.2, 71.7, 60.2.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{42}H_{69}N_3O_{34}Na$ $[M+Na]^+$: 1182.3620, Found 1182.3671.

Synthesis of contrast agent for MRI

Synthesis of tri-*tert*-butyl 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (115)[281]



115

Chemical Formula: $\mathbf{C_{26}H_{50}N_4O_6}$
Molecular Weight: **514.70**

Cyclen **113** (2.9 mmol, 500 mg, 1 eq) was dissolved in dry acetonitrile (50 mL) under nitrogen atmosphere. Then K_2CO_3 (3.7 mmol, 1.69 g, 3 eq) was added. The mixture was stirred at room temperature for 48 hours. A precipitate was filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting solid was purified by column chromatography of silica gel ($CHCl_3$/MeOH, 90:10, v/v) to give the compound **115** as a white solid (900 mg, 60%).

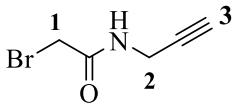
TLC ($CHCl_3$/MeOH, 90/10) Rf = 0.80.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.04 (s, 1H, NH), 3.52-3.35 (m, 4H, H2), 3.30 (s, 2H, H5), 3.09 (s, 4H, H4), 2.91-2.88 (s, 12H, H3), 1.45 (s, 27H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 170.9, 170.0, 82.2, 81.9, 78.0, 65.9, 58.6, 51.7, 49.6, 47.9, 30.1, 28.6.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{26}H_{51}N_4O_6$ $[M + H]^+$: 515.3809, Found 515.3807.

Synthesis of 2-bromo-*N*-(prop-2-ynyl)acetamide (116c)[282]



116c

Chemical Formula: **C_5H_6BrNO**
Molecular Weight: **176.01**

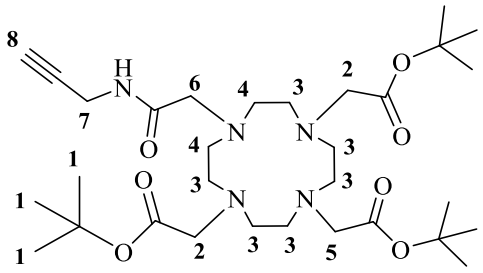
Propargylamine **116a** (1.16 mL, 18.16 mmol, 1 eq) was dissolved in 8 mL of dichloromethane, then cooled to −10 ℃. 8 mL of saturated aqueous sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) was added. The mixture was vigorously stirred and bromoacetyl bromide (1.9 mL, 21.79 mmol, 1.2 eq) was slowly added. The reaction mixture was slowly allowed to warm to room temperature. After 3 hours the reaction mixture was separated. The organic layer was dried by sodium sulfate (Na_2SO_4) and the solvent was removed under reduced pressure to afford the pure product **116c** as a brown solid (2.1 g, 66%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.72 (s, 1H, NH), 4.08 (dd, *J* = 5.1, 2.2 Hz, 2H, H2), 3.90 (s, 2H, H1), 2.28 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 165.1, 78.5, 72.2, 29.9, 28.6.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_5H_6BrNONa$ $[M+Na]^+$: 197.9525, Found 198.0366.

Synthesis of DOTA (117)[238]



117

Chemical Formula: $\mathbf{C_{31}H_{55}N_5O_7}$
Molecular Weight: **609.80**

DO3A-*t*Bu ester **115** (0.583 mmol, 300 mg, 1 eq), **116c** (0.583 mmol, 101 mg, 1 eq) and K_2CO_3 (0.583 mmol, 80 mg, 1 eq) were dissolved in dry DMF. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours under nitrogen. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel) eluting with chloroform / MeOH (98 / 2). The product **117** was obtained as a colorless solid (330 mg, 93%).

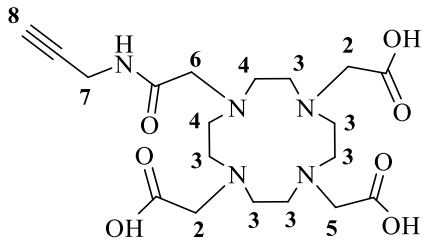
TLC $CHCl_3$/MeOH, (90/10) Rf = 0.2.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.91 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 3.94 (s, 2H, H6), 3.47 (s, 5H, H8 alkyne, H2), 3.09-1.86 (m, 20H, CH_2), 1.45 (s, 27H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 171.7, 171.4, 81.3, 81.0, 80.9, 70.3, 57.9, 56.7, 56.4, 55.4, 53.9, 52.6, 52.3, 28.7, 28.4, 28.4.

MS (ESI Positive): *m/z* 610.407 $[M+H]^+$.

Synthesis of DOTA (118)



118

Chemical Formula: $\mathbf{C_{19}H_{31}N_5O_7}$
Molecular Weight: **441.48**

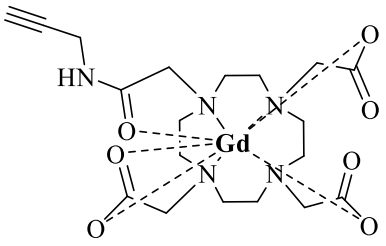
DOTA **117** (0.429 mmol, 262 mg) was dissolved in a mixture of dry CH_2Cl_2/TFA (2.5 mL/2.5mL). The mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved several times (5 ×20 mL) in MeOH and the solvent was removed. The oil obtained was dissolved in the minimum of MeOH (5 mL) and was precipitated by addition of diethyl ether. The precipitate was filtered and was dried to give the product **118** as a white hygroscopic solid (189 mg, 100%).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O): δ 3.85 (d, *J* = 22.4 Hz, 6H), 3.58-3.29 (m, 13H, CH_2 cyclic), 3.06 (m, 9H, CH_2 cyclic), 2.54 (s, 1H, H8).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 175.2, 171.8, 169.9, 163.2, 162.7, 122.0, 118.2, 114.3, 110.4, 79.7, 71.5, 56.4, 55.7, 53.6, 51.5, 50.6, 48.1, 28.8.

MS (ESI Positive): *m/z* 442.265 $[M+H]^+$.

Synthesis of Gd-DOTA (119)



119

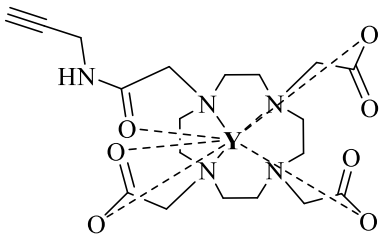
Chemical Formula: $\mathbf{C_{19}H_{28}GdN_5O_7}$
Molecular Weight: **595.70**

A solution of $GdCl_3.6H_2O$ (0.436 mmol, 162 mg, 1.1 eq) in 5 mL of water was added to a solution of compound **118** (0.396 mmol, 175 mg, 1 eq) in water (5 mL) at pH 6.5, adjusted by addition of NaOH (0.1M aq.). The resulting solution was heated at reflux overnight. The water was removed by rotary evaporation and the resulting oil was dissolved in a minimal volume of MeOH. Addition of excess diethyl ether produced an off-white solid **119** (192 mg, 82 %).

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{19}H_{28}GdN_5O_7Na$ $[M+Na]^+$: 619.1128, Found 619.1151.

IR: ν (cm^{-1}) = 1599 (intense, fine, ν C=O)

Synthesis of Y-DOTA (120)



120

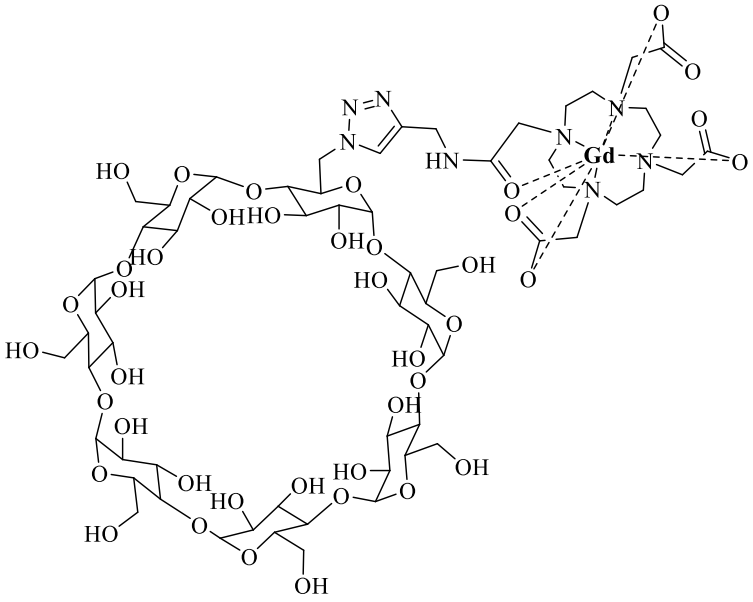
Chemical Formula: $\mathbf{C_{19}H_{28}N_5O_7Y}$
Molecular Weight: **527.36**

A solution of $YCl_3.6H_2O$ (0.12 mmol, 38 mg, 1.1 eq) in 5 mL of water was added to a solution of compound **118** (0.11 mmol, 50 mg, 1 eq) in water (5 mL) at pH =6.5, adjusted by addition of NaOH (0.1M aq.). The resulting solution was heated at reflux overnight. The water was removed by rotary evaporation and the resulting oil was dissolved in a minimal volume of MeOH. Addition of excess diethyl ether produced an off-white solid **120** (30 mg, 52 %).

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O): δ 9.95, (s, NH), 4.01-3.94 (m, 4H), 3.54 – 2.15 (m broad, 23H).

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{19}H_{28}N_5O_7YNa$ $[M+Na]^+$: 550.0945, Found 550.0943.

Synthesis of CD-Gd-DOTA (121)



121

Chemical Formula: $C_{61}H_{97}GdN_8O_{41}$
Molecular Weight: **1755.70**

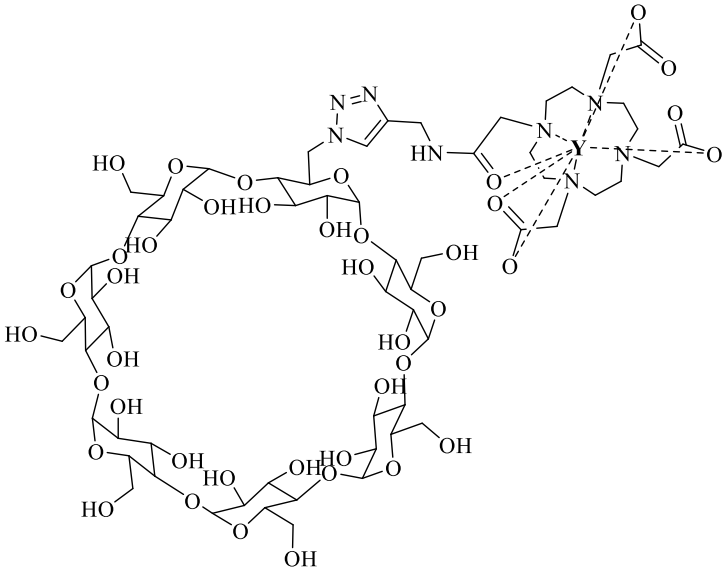
Mono-6-azido-6-deoxy-per-*O*-methyl-β-CD **111a** (86.2 µmol, 100 mg, 1 eq) and Gd-DOTA **119** (94.8 µmol, 56.7 mg, 1.1 eq) were dissolved in 12 mL of DMSO/H_2O (1/1). Then were added $CuSO_4.5H_2O$ (51.7 µmol, 12.9 mg, 0.6 eq), sodium ascorbate (103 µmol, 20.4 mg, 1.2 eq) and PMDTA (51.7 µmol, 8.9 mg, 1 eq). The mixture was stirred for 48 hours at room temperature. The solution was dialyzed and lyophilized to yield a crude product which was purified by HPLC (column Synchronis C_{18}:250×21.2mm). The product **121** was obtained as a white solid (100 mg, 66%).

Conditions :

Times	Flow (mL/min)	%A (water)	%B (acetonitrile)
00 s	19.0	95	5
05 :00	19.0	95	5
40 :00	19.0	00	100

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{61}H_{97}GdN_8O_{41}Na$ $[M+Na]^+$: 1778.4890, Found 1778.4893.

Synthesis of CD-Y-DOTA (122)



122

Chemical Formula: $C_{61}H_{97}N_8O_{41}Y$
Molecular Weight: **1687.36**

Mono-6-azido-6-deoxy-per-*O*-methyl-β-CD **111a** (46 µmol, 53 mg, 1 eq) and Y-DOTA **120** (55 µmol, 27 mg, 1.1 eq) were dissolved in 6 mL of DMSO/H_2O (1/1). Then were added $CuSO_4.5H_2O$ (27 µmol, 6.89 mg, 0.6 eq), sodium ascorbate (55 µmol, 11 mg, 1.2 eq) and PMDTA (27 µmol, 4.6 mg, 5.6 µL, 1 eq). The mixture was stirred for 48 hours at room temperature. The solution was dialyzed and lyophilized to yield a crude product which was purified by HPLC (column Synchronis C_{18}:250×21.2mm). The product **122** was obtained as a white solid (50 mg, 65%)

Conditions :

Times	Flow (mL/min)	%A (water)	%B (acetonitrile)
00 s	19.0	95	5
05 :00	19.0	95	5
40 :00	19.0	00	100

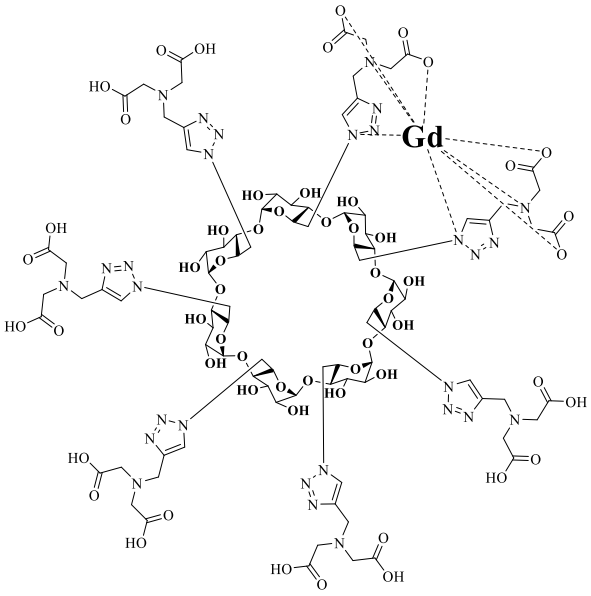
^{1}H NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.03 (s, 1H, H triazole), 5.18 (s, 14H), 5.16 – 4.76 (m, 42H), 2.79 – 2.23 (m, 36H).

^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ 180.0, 101.8, 96.2, 91.2, 81.1, 73.02, 71.9, 71.7, 70, 35.4, 32.9, 31.64, 28.40.

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{61}H_{97}N_8O_{41}YNa$ $[M+Na]^+$: 1709.4806, Found 1709.4731.

M.p.: 333.8 °C – 334.7 °C.

Synthesis of complex (130)



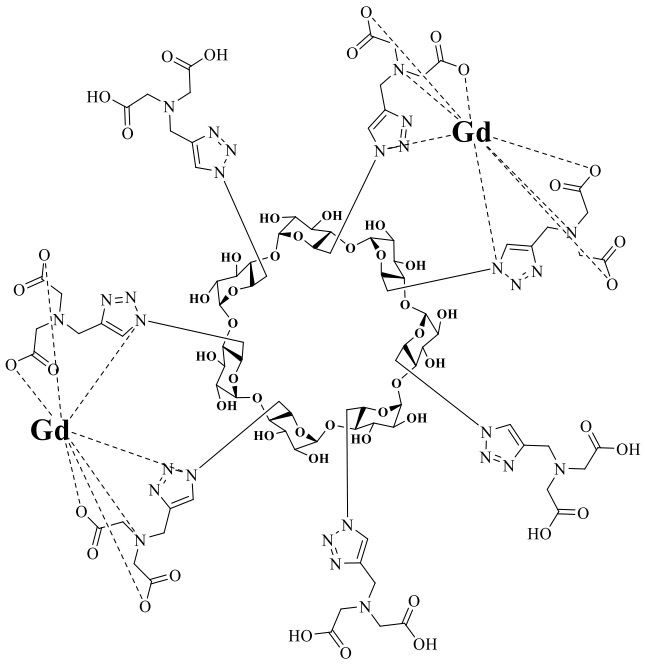
130

Chemical Formula: $\mathbf{C_{91}H_{126}GdN_{28}O_{56}}$
Molecular Weight: **2665.38**

βCD ligand **129** (10.1 mg, 4.029 μmol) was dissolved in milliQ water (3.4 mL) to obtain a solution (1.185 mM concentration). The pH was adjusted between 6 and 7 with a 0.01 M NH_4OH solution. A volume (215 μL) of the $GdCl_3$ solution (18.75 mM, 1 equivalent) was added to the solution of βCD ligand **130**. The pH was adjusted several times to be maintained between 6 and 7 during the reaction. The reaction mixture was stirred for 24 hours. Thereafter, the solution was dialyzed for 24 hours in a dialysis tube closed at both ends by Mohr clamps and suspended in a crystallizer filled with milliQ water (changed regularly every 2 hours). The solution was then lyophilized to afford a white solid **130** (9.8 mg, 92%).

TOF HRMS ESI-MS : *m/z Calc.* for $[M-9H+Gd^{III}]^{6-}$ 442.6072, Found 442.6088.

Synthesis of complex (131)



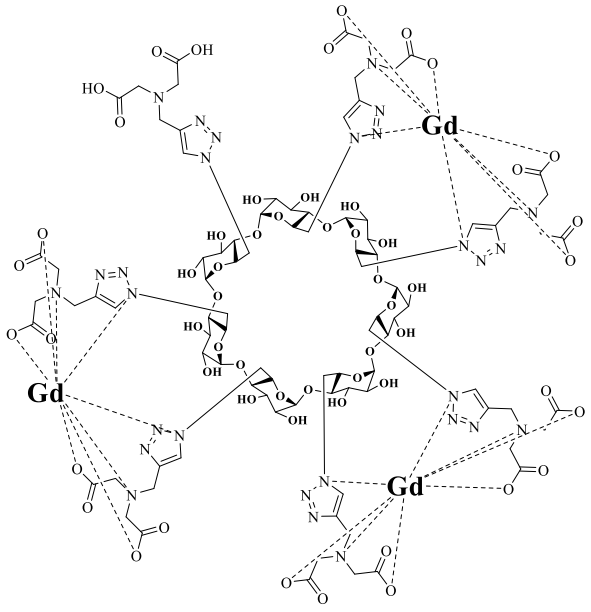
131

Chemical Formula: $\mathbf{C_{91}H_{118}Gd_2N_{28}O_{56}}$
Molecular Weight: **2814.56**

βCD ligand **129** (5.41 mg, 2.07 μmol) was dissolved in MilliQ water (3 mL). A volume (210 μL) of the $GdCl_3$ solution (18.75 mM, 1.90 eq) was added. The complex was obtained similarly as above to afford a white solid after freeze-drying **131** (5.1 mg, 90%).

TOF HRMS ESI-MS : *m/z* Calc. for $[M\text{-}11H+2Gd^{III}]^{5-}$ 562.3105, Found 562.3104.

Synthesis of complex (132)



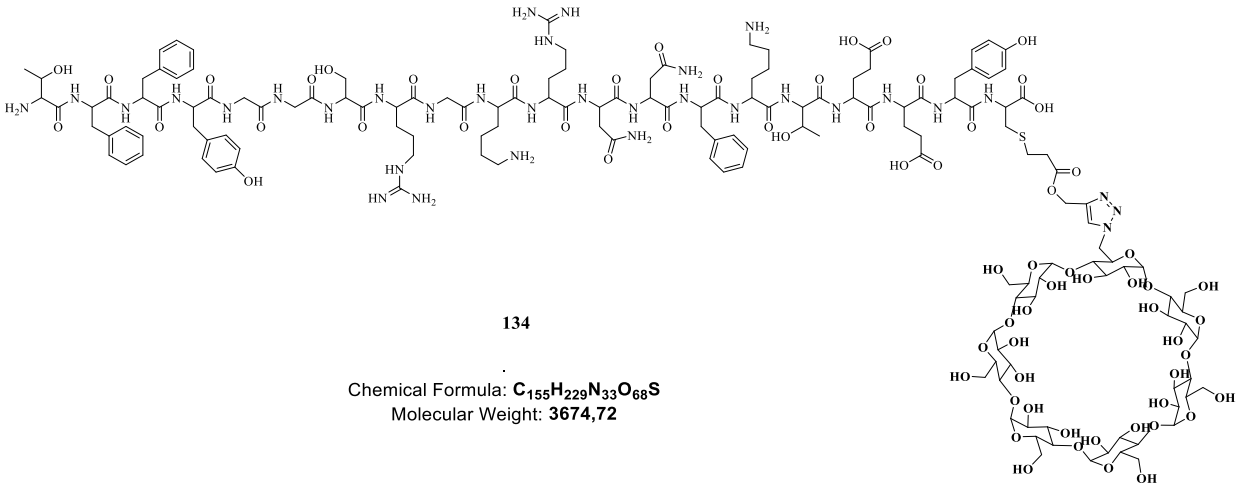
132

Chemical Formula: $C_{91}H_{114}Gd_3N_{28}O_{56}$
Molecular Weight: **2967.78**

βCD ligand **129** (10.05 mg, 4.009 μmol) was dissolved in MillQ water (3.4 mL 1.179 mM). A volume (645 μL) of the $GdCl_3$ solution (18.75 mM, 3.02 equivalents) was added. The same protocol was followed as for the preparation of the complex **130** to afford white solid after freeze-drying.

TOF HRMS ESI-MS*: m/z* Calc. for $[M\text{-}13H\text{+}Na\text{+}3Gd^{III}]^3$ 996.4835, Found 996.4532.

Synthesis of CD-Angiopep (134)



134

.

Chemical Formula: $C_{155}H_{229}N_{33}O_{68}S$
Molecular Weight: **3674,72**

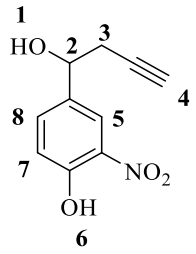
Mono-6-azido-6-deoxy-per-*O*-methyl-β-CD **111a** (2.67 µmol, 3.10 mg, 1 eq) and Angiopep **133** (4 µmol, 10 mg, 1.5 eq) were dissolved in 3 mL of DMSO/H_2O (1/1). Then was added the mixed solution containing $CuSO_4.5H_2O$ (2.67 µmol, 0.66 mg, 1 eq) and TBTA (26.7 µmol, 14.17 mg, 10 eq) in 1 mL of DMSO/H_2O (1/1). To the solution was added the solution of sodium ascorbate (4 µmol, 0.80 mg, 1.5 eq) in 1 mL of DMSO/H_2O (1/1). The mixture was stirred for 24 hours at room temperature. The solution was dialyzed and lyophilized to yield a crude product **134** (7 mg, 71%) which was purified by HPLC.

Conditions :

Times	Flow (mL/min)	%A (water)	%B (acetonitrile)
00 s	10	98	2
05 :00	10	98	0
40 :00	10	00	100

TOF MS (MALDI-TOF): *m/z* Calc. $C_{155}H_{227}N_{31}O_{70}S$: 3672.520, Found 3673.415$[M+H]^+$, 3695.359$[M+Na]^+$.

Synthesis of 4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2-nitrophenol (160)[266]



160

Chemical Formula: $\mathbf{C_{10}H_9NO_4}$
Molecular Weight: **207.18**

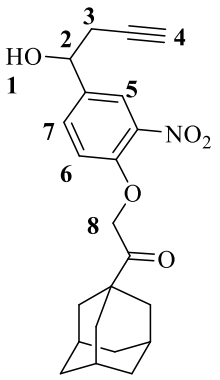
Aluminum powder (0.048 mol, 1.296 g, 6 eq) and anhydrous THF (5 mL) were placed in a three neck round-bottom flask with a condenser and a dropping funnel. Then, catalytic amount of $HgCl_2$ was added and the mixture was stirred for 20 minutes at room temperature. Few drops of a neat solution of propargyl bromide **159** 80% in toluene were added in order to start the formation of the aluminic. Propargyl bromide **159** 80 % in toluene (0.0496 mol, 5.9 g, 5.2 mL, 6.08 eq) was diluted with anhydrous THF (10 mL) and was added dropwise. The reaction mixture was stirring for two hours at room temperature followed by 30 minutes at 65 °C. After cooling down to room temperature, a solution of 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde **151** (0.0077 mol, 1.3 g, 1 eq) in anhydrous THF (20 mL) was added dropwise and the reaction was stirred overnight. The crude mixture was cooled at 0 °C, poured on ice and HCl 1N (20 mL) and extracted with ethyl acetate (3x100 mL). The combined organic layers were washed with H_2O (3x 100 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude brown oil was dissolved in DCM and washed with a solution of NaOH 1N (3x100 mL). The combined aqueous layers were acidified with concentrated HCl to pH 4 and extracted with chloroform (3x100 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **160** as as a dark brown oil (1.5 g, 94%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 10.57 (s, 1H, OH, H6), 8.16 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H1), 7.64 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H, H8), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H7), 4.89 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H2), 2.73–2.56 (m, 3H, OH, H3), 2.10 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H4).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 154.7, 135.3, 135.1, 133.4, 122.4, 120.2, 79.7, 71.9, 70.9, 29.4.

TOF HRMS (ESI Negative): *m/z* Calc. for $C_{10}H_8NO_4$ $[M-H]^-$: 206.0453, Found 206.0457.

Synthesis of 1-adamantan-1-yl) -2-(4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl) -2-nitrophenoxy) ethanone (162)



162

Chemical Formula: $\mathbf{C_{22}H_{25}NO_5}$
Molecular Weight: **383.44**

Compound **160** (4.8 mmol, 1 g, 1 eq) was dissolved in anhydrous ACN (10 mL). K_2CO_3 (4.8 mmol, 0.667 g, 1 eq) was added and the mixture was stirred at room temperature for 20 minutes. 1-adamantyl bromomethyl ketone **161** (4.8 mmol, 1.23 g, 1 eq) was added and the solution was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed and the residue was purified by silica gel column chromatography with eluent of cyclohexane/ethyl acetate (1/1) to afford compound **162** as a white solid (1.4 g, 76%).

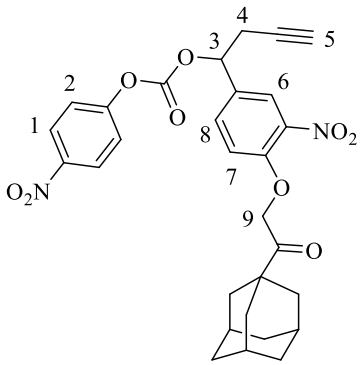
TLC (Cyclohexane/Ethyl acetate (1/1)), Rf = 0.55.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H5), 7.50 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H7), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H6), 5.03 (s, 2H, H8), 4.87 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H2), 2.63 – 2.60 (m, 3H, H3, OH), 2.09 (m, 4H, H4, H ada), 1.91 (s, 6H, H ada), 1.76 (q, *J* = 12.6 Hz, 6H, H ada).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 207.7, 151.2, 139.8, 135.8, 131.3, 123.4, 115.1, 79.6, 71.8, 70.8, 70.2, 45.6, 38.0, 36.3, 29.4, 27.7.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{22}H_{25}NO_5Na$ $[M+Na]^+$: 406.1630, Found 406.1639.

Synthesis of 1-(4-(2-adamantan-1-yl) -2-oxoethoxy) -3-nitrophenyl) but-3-yn-1-yl(4-nitrophenyl) carbonate (164)



164

Chemical Formula: $\mathbf{C_{29}H_{28}N_2O_9}$
Molecular Weight: **548.54**

Compound **162** (0.97 mmol, 375 mg, 1 eq) and *p*-nitrophenyl chloroformate **163** (1.95 mmol, 394 mg, 2 eq) were disssolved in anhydrous DCM (10 mL). Pyridine (2.4 mmol, 193 mg, 0.197 mL, 2.5 eq) was added at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature overnight under nitrogen atmosphere. The mixture was hydrolyzed with a saturated solution of $NaHCO_3$ and was extracted with DCM (3×100 mL). The combined organic layers were dried by Na_2SO_4, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by silica gel column chromatography with the eluent of cyclohexane/ethyl acetate (7/3) to afford compound **164** as a white solid (450 mg, 84%).

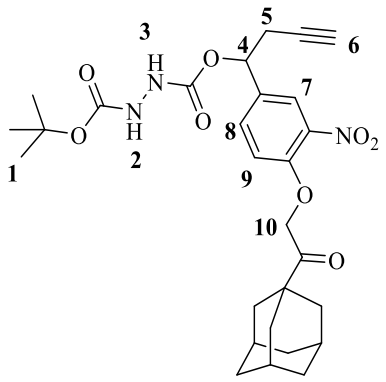
TLC (Cyclohexane/ethyl acetate (6/4)), Rf = 0.7.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.28 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H1), 8.00 (s, 1H, H6), 7.55 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H8), 7.38 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H2), 6.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H7), 5.79 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H3), 5.07 (s, 2H, H9), 2.88 (m, 2H, H4), 2.08 (s, 3H, H ada), 1.92 (s, 6H, H ada), 1.76 (q, *J* = 12.6 Hz, 6H, H ada).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 209.9, 155.8, 152.7, 153.6, 152.7, 151.7, 140.4, 131.1, 125.9, 124.9, 122.3, 115.6, 72.8, 70.5, 46.2, 38.6, 36.9, 28.2, 26.7.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{29}H_{30}N_2O_{10}$ $[M+H_2O]^+$: 566.2139, Found 566.2150.

Synthesis of 1-(1-(4-(2-(adamantan-1-yl) -2-oxoethoxy) -3-nitrophenyl) but-3-yn-1-yl)2-*tert*-butyl hydrazine-1,2-dicarboxylate (169)



169

Chemical Formula: $\mathbf{C_{28}H_{35}N_3O_8}$
Molecular Weight: **541.59**

To a solution of compound **164** (1.29 mmol, 713 mg, 1 eq) and *tert*-Butyl carbazate **168** (1.4 mmol, 190 mg, 1.l eq) in DMF/Pyridine (4/1 v/v 10 mL) was added DIPEA (1.5 mmol, 201 mg, 0.3 mL, 1.2 eq) and HOBt (1.29 mmol, 174 mg, 1 equiv.). The reaction was stirred at room temperature and progress was followed by TLC. After 36 hours solvents were removed under reduced pressure and the crude material was purified by column chromatography over silica gel (cyclohexane/ ethyl acetate: 0 to 50% EtOAc) to give **169** as a white solid (650 mg, 92%).

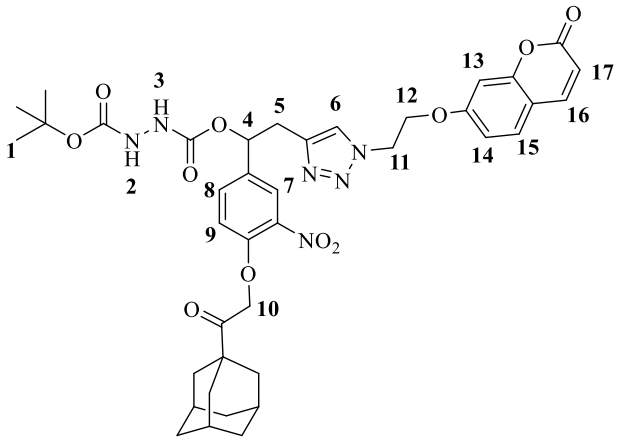
TLC (Cyclohexane/Ethyl acetate (1/1)), Rf = 0.50.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.93 (s, 1H, H7), 7.49 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H8), 6.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H9), 6.56 (s, 1H, NH, H3), 6.26 (s, 1H, NH, H2), 5.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H4), 5.03 (s, 2H, H10), 2.75 (m, 2H, H5), 2.07 (s, 3H, H ada), 1.93 (s, 6H, H ada), 1.76 (q, *J* = 12.9 Hz, 6H, H ada), 1.45 (s, 9H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 207.6, 151.9, 133.5, 132.1, 124.2, 115.1, 78.3, 73.9, 72.1, 70.4, 45.8, 38.1, 36.5 28.3, 27.9, 26.4.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{28}H_{35}N_3O_8Na$ $[M+Na]^+$: 541.2639, Found 564.2650.

Synthesis of Tripode (172)



172

Chemical Formula: $\mathbf{C_{39}H_{44}N_6O_{11}}$
Molecular Weight: **772.81**

A mixture of azide **171** (0.149 mmol, 34.6 mg, 1 eq), and appropriate terminal alkyne **169** (0.149 mmol, 81 mg, 1 eq) were dissolved in dry DMF (2 mL) in the dark. Then, copper sulphate (0.074 mmol, 37.4 mg, 0.5 eq), and sodium ascorbate (0.074 mmol, 29.6 mg, 0.5 eq) were added. The mixture was stirred overnight. After completion of the reaction, solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by column chromatography over silica gel (dichloromethane/ ethyl acetate: 20 to 100% EtOAc) to give **172** as a white bright solid (100 mg, 87%).

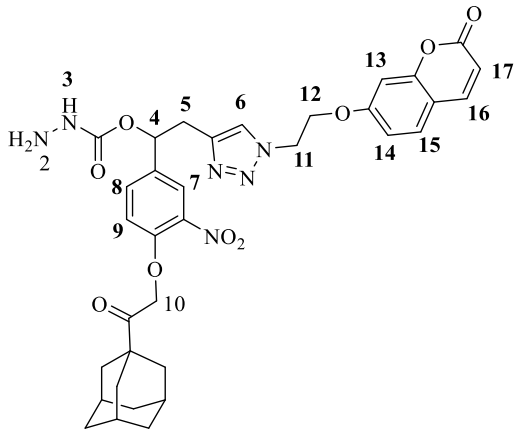
TLC (Dichloromethane/Ethyl acetate (1/1)), Rf = 0.40.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.77 (s, 1H, H7), 7.62 (m, 2H, H15, H16), 7.39 (m, 2H, H6, H8), 7.00 (s, 1H, NH, H3), 6.79 (m, 2H, H13, H14), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H9), 6.46 (s, 1H, NH, H2), 6.25 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H17), 5.94 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H4), 5.01 (s, 2H, H10), 4.75 (s, 2H, 12), 4.41 (s, 2H, H11), 3.28 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H5), 2.06 (s, 3H ada), 1.88 (s, 6H, H ada), 1.76 (q, *J* = 12.9 Hz, 6H, H ada), 1.41 (s, 9H, H1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 207.7, 161.0, 155.8, 151.71, 143.4, 129.2, 123.9, 115.3, 113.9, 113.4, 112.7, 101.9, 82.1, 45.8, 38.1, 36.5, 28.3, 27.9.

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{39}H_{44}N_6O_{11}Na$ $[M+Na]^+$: 795.2952, Found 795.2956.

Synthesis of Tripode (173)



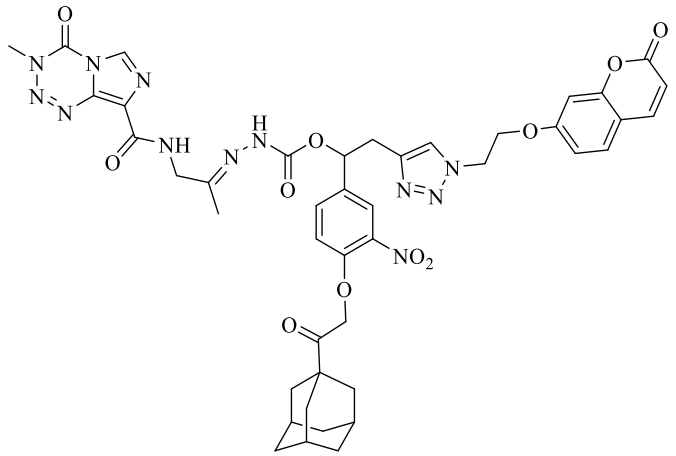
173

Chemical Formula: $\mathbf{C_{34}H_{36}N_6O_9}$
Molecular Weight: **672.70**

Compound **172** (0.065 mmol, 50 mg) was dissolved in a mixture of dry CH_2Cl_2/TFA (1 mL/1 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight under argon atmosphere. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved several times (5 ×20 mL) in MeOH and the solvent was removed. The oil obtained was dissolved in the minimum of MeOH (5 mL) and was precipitated by addition of diethyl ether. The precipitate was filtered and was dried to give the product **173** as a white solid (39 mg, 89%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.01 (s, 1H, H7), 7.97 (m, 2H, H15, H16), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H8), 7.54 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H6), 6.99 (s, 2H, NH, H3), 6.89 (m, 2H, H13, H14), 6.70 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H9), 6.46 (s, 1H, NH, H2), 6.30 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H17), 5.95 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H4), 5.32 (s, 2H, H10), 4.74 (s, 2H, 12), 4.45 (s, 2H, H11), 3.25 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H5), 1.99 (s, 3H ada), 1.83 (s, 6H, H ada), 1.68 (q, *J* = 12.9 Hz, 6H, H ada).

Synthesis of tripode (174)



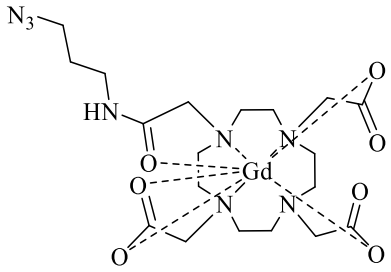
174

Chemical Formula: $\mathbf{C_{43}H_{44}N_{12}O_{11}}$
Molecular Weight: **904.88**

Compound **173** (63.9 µmol, 43 mg, 1 eq) and temozolomide **81** (63.9 µmol, 16 mg, 1 eq) were dissolved in dry ethanol (5 mL). Then, acetic acid (10 µL) was added as a catalyst. The reaction mixture was refluxed overnight at 85°C. A precipitate was formed. Then, the precipitate was filtered, washed with cold ethanol and dried under reduced pressure to afford the compound **174** as a brown solid (40 mg, 69 %).

TOF HRMS (ESI Postive): *m/z* Calc. for $C_{43}H_{44}N_{12}O_{11}Na$ $[M+Na]^+$: 927.3137, Found 927.3137.

Synthesis of compound (175b)



175b

Chemical Formula: **$C_{19}H_{31}GdN_8O_7$**
Molecular Weight**: 640,76**

A solution of $GdCl_3.6H_2O$ (55.37 µmmol, 20.58 mg, 1.1 eq) in 5 mL of water was added to a solution of compound **175a** (50.34 µmmol, 30 mg, 1 eq) in water (5 mL) at pH 6.5, adjusted by addition of NaOH (0.1M aq.). The resulting solution was heated at reflux overnight. The water was removed under reduced pressure and the resulting oil was dissolved in a minimal volume of MeOH. Addition of excess diethyl ether produced an off-white solid **175b** (38 mg, 100 %).

TOF HRMS (ESI Positive): *m/z* Calc. for $C_{19}H_{31}GdN_8O_7Na$ $[M+Na]^+$: 664.1455, Found 664.1457.

Materials and methods

1. Gadolinium/Yttrium assay by ICP-OES

Materials:

- Certified Gadolinium standard 1000 mg/l TRACECERT® Sigma Aldrich (05660-100mL)
- Certified Yttrium standard 1000 mg/l TRACECERT® Sigma Aldrich
- Nitric acid 68% w/w Fisher Scientific (N/2272/PB08)
- Milli Q water (18MΩ) obtained using Millipore Direct-Q

ICP-OES measurement

The determination of Gd/Y was performed on a ICP-OES, iCAP Series 6000, Thermofisher

Calibration range:

Commercial Gadolinium solution is at 1000 mg/L

100 mg/L solution: 2 mL of the commercial solution in 20 mL

HNO_3	Gd 100 mg/L	Gd	Volume total (mL)
mL	mL	mg/L	50
1	0	0	50
1	0.5	1	50
1	1	2	50
1	2.5	5	50
1	3.5	7	50
1	5	10	50

Preparation of samples: 1 mg of product, dissolved in 1 mL of millQ water

If dilution by 20 of the sample (0.5 ml in 10 ml) + 0.2 mL of HNO_3.

2. Methods: Relaxivity at 7 T

All samples **CA1**, **CA2**, **CA3**, **CA4**, **CA5** and **CA6** were diluted to reach a 0.50; 0.25; 0.125 and 0.05 mM working solutions. A 1 and 5 mM Dotarem (Guerbet) solutions was used as a control.

MRI examinations were performed on a 7 teslas Biospec 70/30 horizontal magnet (Bruker, Ettlingen). A 72 mm transmit/receive volume coil was used. After a scout view, a T2w TurboRARE (TR = 5000 msec/ Te = 50 msec; RARE factor = 8) can was used to obtain an anatomical image.

Then, for T1-weighted (T1w) mapping, a flow sensitive alternating inversion recovery and rapid acquisition with relaxation enhancement (FAIR-RARE) sequence (TR: 10200 ms, TE: 4.73 ms, 13 TI: 50; 500; 950; 1400; 1850; 2500; 3300; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 10000, RARE factor of 32, FOV = 40x40mm, image matrix: 128 × 128, 1 slice with a thickness of 3 mm and total acquisition time of 16 min 38 sec) was used. Image analysis with Bruker software Paravision (version PV360), MATLAB R2012b software and was carried out. The r_1 value (inverse of the calculated T1 value) as a function of the Gd concentration for each experimental point was plotted; the slope of the line corresponding to the compound relaxivity ($mM^{-1}.s^{-1}$).

3. Test *in vivo* and *in vitro*

The four complexes were resuspended to a final concentration of 10^{-3} M each:

- Complexe **1**: 4.25 mg / (100 µl DMSO + 2429 µl distilled water)
- Complexe **2**: 2.90 mg / (100 µl DMSO + 1756 µl distilled water)
- Complexe **3**: 1.48 mg / (100 µl DMSO + 748 µl distilled water)
- Complexe **4**: 2.50 mg / (100 µl DMSO + 483 µl distilled water)

In vivo

44-week-old male C57Bl / 6 mice were injected retro-orbital with complex **3** (coumarin), or complex **4** (An2-coumarin) at a dose of 15 µg / 100 µl (NaCl 0.9%). The "control" mice did not receive an injection. 4 hours after injection, the mice were sacrificed and the brains collected, then frozen. The brains were cut into coronal sections 20 µm thick with a cryostat (PRIMACEN platform). The sections were mounted on slides coated with gelatin-chromium alum and stored at -20°C until immunohistochemical experiments. The brain slices were then fixed with 4%

paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered-saline (PBS). After 3 washes of 10 min with PBS, the sections were incubated with 0.1% Triton® X-100 (VWR International, Strasbourg, France) for 5 min, then 1 h with *Normal Donkey Serum* 1:50 (Sigma-Aldrich, St. Quentin, France, D9663-10 mL) in the presence of 0.1% bovine serum albumin (BSA) in PBS (blocking solution). Brain sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: anti-NeuN for detection of mature neurons (1 : 1000, Rabbit, Abcam, Paris, France, ab104225), anti-GFAP for detection astrocytes (1 : 1000, Goat, Abcam, ab53554), anti-CD31 (1 : 200, Rat, Abcam, ab7388) and anti-podocalyxin (1 : 1000, Rat, R&D systems, MAB1556) for the labeling of vascular endothelium in 10% blocking solution. After 3 washes of 10 min, the sections were incubated for 2 h at room temperature with the secondary antibodies (1: 1000): anti-rabbit conjugate Alexa 488 (Invitrogen, Boulogne-Billancourt, France, A21206), anti-goat conjugate Alexa 568 (Invitrogen, A11057) or anti-rat conjugate Alexa 647 (Abcam, ab150155) in PBS. After rinsing, the sections were mounted in Mowiol (supplier). Images were captured using a Leica SP8 confocal microscope (PRIMACEN).

In vitro

The U87MG or 8MG human glioblastoma (GBM) cell lines were cultured in the DCN2 laboratory, in complete DMEM medium (Fisher Scientific, Illkirch, France, 31053-028) supplemented with fetal bovine serum (FBS, 10%, Dominique Dutscher, Bernolsheim, France, S181H-500). They are inoculated in a DMEM medium, in 8-well chambers (Lab-TekII Chamber SlideTM System 154534, Fisher Scientific) coated with fibronectin (Sigma-Aldrich, St. Quentin, France, F0895-5MG) and incubated in an incubator in humid atmosphere at 37°C in the presence of 5% CO_2. The complexes **1**, **2**, **3** or **4** were incubated with the cells at a concentration of 100 µM, for 15 min, 30 min, 1 h, 3 h or 6 h, then rinsed with PBS, fixed in PFA (4%) for 10 min. After 3 washes of 10 min with PBS, the cells were incubated with 0.1% Triton® X-100 (VWR International, Strasbourg, France) for 5 min, then 1 h with Normal Donkey Serum 1 : 50 (Sigma-Aldrich, D9663-10ML) supplemented with BSA (0.1%) in PBS (blocking solution). The cells were incubated overnight at 4°C with the primary anti-lamin A / C antibody capable of detecting the membrane of the nuclei (1 : 500, Mouse, Invitrogen, MA3-1000) in the blocking solution at 10%. After 3 washes of 10 min, the cells were incubated for 2 h at room temperature with the secondary anti-mouse conjugated antibody Alexa 647 (1: 1000, Invitrogen, A31571) and the anti-phalloidin-iFluor 488 (1 : 1000, Abcam, ab176753) which marks the actin stress fibers of the cytoskeleton. After rinsing, the cells were mounted in Mowiol. Images were captured using a Leica SP8 confocal microscope.

Références Bibliographiques

[1] M. L. Bondy, M. E. Scheurer, B. Malmer, J. S. Barnholtz-Sloan, F. G. Davis, D. Il'yasova, C. Kruchko, B. J. McCarthy, P. Rajaraman, J. A. Schwartzbaum, S. Sadetzki, B. Schlehofer, T. Tihan, J. L. Wiemels, M. Wrensch, P. A. Buffler, On behalf of the Brain Tumor Epidemiology Consortium, *Cancer* **2008**, *113*, 1953–1968.

[2] H. Ohgaki, P. Kleihues, *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 1445–1453.

[3] R. Stupp, M. Brada, M. J. van den Bent, J.-C. Tonn, G. Pentheroudakis, *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, iii93–iii101.

[4] E. Hulleman, K. Helin, in *Adv. Cancer Res.* **2005**, *94*, 1–27.

[5] S. Agnihotri, K. E. Burrell, A. Wolf, S. Jalali, C. Hawkins, J. T. Rutka, G. Zadeh, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **2013**, *61*, 25–41.

[6] T. M. Kauer, J.-L. Figueiredo, S. Hingtgen, K. Shah, *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 197–204.

[7] O. P. Erpolat, M. Akmansu, F. Goksel, H. Bora, E. Yaman, S. Büyükberber, *Tumori J.* **2009**, *95*, 191–197.

[8] M. S. Lesniak, H. Brem, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 499–508.

[9] M. Peyrone, *Ann. Chem. Pharm.* **1844**, *51*, 1–29.

[10] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699.

[11] C. Avendaño, J. C. Menéndez, in *Med. Chem. Anticancer Drugs* **2015**, 197–241.

[12] M. Yamamoto, A. Kurita, T. Asahara, A. Takakura, K. Katono, M. Iwasaki, S. Ryuge, M. Wada, S. Onoda, T. Yanaihara, M. Yokoba, H. Mitsufuji, Y. Nishii, T. Fukui, N. Masuda, *Oncology reports* **2008,** *20*, 727-730.

[13] A. Della Puppa, M. Rossetto, P. Ciccarino, L. Denaro, A. Rotilio, D. d'Avella, R. Scienza, *World Neurosurg.* **2011**, *76*, 156–159.

[14] M. Glas, T. Hundsberger, M. Stuplich, D. Wiewrodt, D. Kurzwelly, B. Nguyen-Huu, K. Rasch, U. Herrlinger, *Oncology* **2009**, *76*, 184–189.

[15] J. A. Montgomery, Ruby. James, G. S. McCaleb, T. P. Johnston, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 668–674.

[16] M. Westphal, D. C. Hilt, E. Bortey, P. Delavault, R. Olivares, P. C. Warnke, I. R. Whittle, J. Jääskeläinen, Z. Ram, *Neuro-Oncol.* **2003**, *5*, 79–88.

[17] T. Gorlia, M. J. van den Bent, M. E. Hegi, R. O. Mirimanoff, M. Weller, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, K. Belanger, A. A. Brandes, A. Allgeier, D. Lacombe, R. Stupp, *Lancet Oncol.* **2008**, *9*, 29–38.

[18] R. Stupp, M. Weller, K. Belanger, U. Bogdahn, S. K. Ludwin, D. Lacombe, R. O. Mirimanoff, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *10*, 987-996.

[19] M. D. Threadgill, in *Chem. Antitumour Agents* **1990**, 187–201.

[20] S. D. Baker, M. Wirth, P. Statkevich, P. Reidenberg, K. Alton, S. E. Sartorius, M. Dugan, D. Cutler, V. Batra, L. B. Grochow, R. C. Donehower, E. K. Rowinsky, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 309–317.

[21] "II.1. Les différentes techniques d'imagerie - Docteur de l'université pierre et marie curie," can be found under http://m.20-bal.com/buhgalteriya/10083/index.html?page=7 **(accédé en juin 2020)**

[22] M. A. Pysz, S. S. Gambhir, J. K. Willmann, *Clin. Radiol.* **2010**, *65*, 500–516.

[23] D. C. Sullivan, G. Kelloff, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 292–296.

[24] J. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626–634.

[25] CEA, "L'imagerie médicale," http://www.cea.fr/comprendre/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale.aspx par Corinne Beurtey **(accédé en mars 2020)**.

[26] W. T. Yuh, J. D. Engelken, M. G. Muhonen, N. A. Mayr, D. J. Fisher, J. C. Ehrhardt, *Am. J. Neuroradiol.* **1992**, *13*, 335–345.

[27] I. R. Young, G. J. Clarke, D. R. Baffles, J. M. Pennock, F. H. Doyle, G. M. Bydder, *J. Comput. Tomogr.* **1981**, *5*, 543–547.

[28] D. H. Carr, J. Brown, G. M. Bydder, H.-J. Weinmann, U. Speck, D. J. Thomas, I. R. Young, *The Lancet* **1984**, *323*, 484–486.

[29] https://docteurimago.fr/actualites/produits/lansm-suggere-substitution-produits-lineaires-macrocycliques/ par Hellerhoff **(accédé en mars 2020).**

[30] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.* **2008**, *23*, 3027-3047.

[31] T. Grobner, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2006**, *21*, 1104–1108.

[32] B. Beomonte Zobel, C. C. Quattrocchi, Y. Errante, R. F. Grasso, *Radiol. Med. (Torino)* **2016**, *121*, 478–481.

[33] R. J. McDonald, J. S. McDonald, D. F. Kallmes, M. E. Jentoft, D. L. Murray, K. R. Thielen, E. E. Williamson, L. J. Eckel, *Radiology* **2015**, *275*, 772–782.

[34] I. Solomon, N. Bloembergen, *J. Chem. Phys.* **1956**, *25*, 261–266.

[35] N. Bloembergen, L. O. Morgan, *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 842–850.

[36] Mauro Botta, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, *2000*, 399–407.

[37] R. M. Supkowski, W. DeW. Horrocks, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5616–5619.

[38] É. Tóth, R. Király, J. Platzek, B. Radüchel, E. Brücher, *Inorganica Chim. Acta* **1996**, *249*, 191–199.

[39] P. F. Sieving, A. D. Watson, S. M. Rocklage, *Bioconjug. Chem.* **1990**, *1*, 65–71.

[40] E. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur, *Magn. Reson. Med.* **1994**, *31*, 1–8.

[41] É. Tóth, F. Connac, L. Helm, K. Adzamli, A. E. Merbach, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 606–613.

[42] S. G. Zech, H. B. Eldredge, M. P. Lowe, P. Caravan, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3576–3584.

[43] J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, K. I. Hardcastle, I. Lukeš, S. Aime, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 975–987.

[44] W. J. Rieter, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9024–9025.

[45] V. S. Vexler, O. Clément, H. Schmitt-Willich, R. C. Brasch, *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, *4*, 381–388.

[46] A. S. Merbach, L. Helm, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, **2013**.

[47] P. Caravan, A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3972–3974.

[48] A. V. Astashkin, A. M. Raitsimring, P. Caravan, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 1990–2001.

[49] T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307–320.

[50] A. J. Grillo-López, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2002**, *2*, 485–493.

[51] D. A. Pryma, B. B. Chin, R. B. Noto, J. S. Dillon, S. Perkins, L. Solnes, L. Kostakoglu, A. N. Serafini, M. H. Pampaloni, J. Jensen, T. Armor, T. Lin, T. White, N. Stambler, S. Apfel, V. A. DiPippo, S. Mahmood, V. Wong, C. Jimenez, *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 623–630.

[52] R. C. Walker, G. T. Smith, E. Liu, B. Moore, J. Clanton, M. Stabin, *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 855–860.

[53] L. B. Solnes, R. A. Werner, K. M. Jones, M. S. Sadaghiani, C. R. Bailey, C. Lapa, M. G. Pomper, S. P. Rowe, *J. Nucl. Med.* **2020**, *61*, 311–318.

[54] Eloïse Thomas, Thèse soutenue le 17/07/2017, Université Claude Bernard (Lyon)**.**

[55] L. Sancey, S. Kotb, C. Truillet, F. Appaix, A. Marais, E. Thomas, B. Van der Sanden, J.-P. Klein, B. Laurent, M. Cottier, R. Antoine, P. Dugourd, G. Panczer, F. Lux, P. Perriat, V. Motto-Ros, O. Tillement, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2477–2488.

[56] Y. Ling, K. Wei, F. Zou, S. Zhong, *Int. J. Pharm.* **2012**, *430*, 266–275.

[57] F. Lux, L. Sancey, A. Bianchi, Y. Crémillieux, S. Roux, O. Tillement, *Nanomed.* **2015**, *10*, 1801–1815.

[58] A. Sour, S. Jenni, A. Ortí-Suárez, J. Schmitt, V. Heitz, F. Bolze, P. Loureiro de Sousa, C. Po, C. S. Bonnet, A. Pallier, É. Tóth, B. Ventura, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 4545–4554.

[59] Z. M. Bhujwalla, S. Kakkad, Z. Chen, J. Jin, S. Hapuarachchige, D. Artemov, M.-F. Penet, *J. Magn. Reson.* **2018**, *291*, 141–151.

[60] Y. Xiang, N. Li, L. Guo, H. Wang, H. Sun, R. Li, L. Ma, Y. Qi, J. Zhan, D. Yu, *Carbon* **2018**, *136*, 113–124.

[61] Y. Yang, L. Xu, W. Zhu, L. Feng, J. Liu, Q. Chen, Z. Dong, J. Zhao, Z. Liu, M. Chen, *Biomaterials* **2018**, *156*, 121–133.

[62] H. Idriss, F. Estour, I. Zgani, C. Barbot, A. Biscotti, S. Petit, C. Galaup, M. Hubert-Roux, L. Nicol, P. Mulder, G. Gouhier, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 4531.

[63] I. Zgani, H. Idriss, C. Barbot, F. Djedaïni-Pilard, S. Petit, M. Hubert-Roux, F. Estour, G. Gouhier, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 564–569.

[64] A. Biscotti, C. Barbot, L. Nicol, P. Mulder, C. Sappei, M.-H. Roux, I. Déchamps-Olivier, F. Estour, G. Gouhier, *Polyhedron* **2018**, *148*, 32–43.

[65] P.-L. Champagne, C. Barbot, P. Zhang, X. Han, I. Gaamoussi, M. Hubert-Roux, G. E. Bertolesi, G. Gouhier, C.-C. Ling, *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 8964–8977.

[66] A. Villiers, **1891**, 536–538.

[67] F. Schardinger, *Zbl Bakteriol Parasitenkd Infekt. Hyg Abt II* **1905**, *14*, 772–781.

[68] D. Duchene, *Search PubMed* **1987**, 134–136.

[69] H. Schlenk, D. M. Sand, J. A. Tillotson, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3587–3590.

[70] S. Gould, R. C. Scott, *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1451–1459.

[71] A. Biscotti, Thèse soutenue le 11/07/2016, Université de Rouen.

[72] J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 1505–1509.

[73] Y. Song, E. K. Kohlmeir, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6662–6663.

[74] J. W. Fredy, J. Scelle, A. Guenet, E. Morel, S. Adam de Beaumais, M. Ménand, V. Marvaud, C. S. Bonnet, E. Tóth, M. Sollogoub, G. Vives, B. Hasenknopf, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 10915–10920.

[75] J. W. Fredy, J. Scelle, G. Ramniceanu, B.-T. Doan, C. S. Bonnet, É. Tóth, M. Ménand, M. Sollogoub, G. Vives, B. Hasenknopf, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1136–1139.

[76] P. J. Skinner, A. Beeby, R. S. Dickins, D. Parker, S. Aime, M. Botta, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 1329–1338.

[77] C. S. Bonnet, P. H. Fries, A. Gadelle, S. Gambarelli, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10401–10413.

[78] Célia Sappei, Thèse soutenue le 25/05/2018, Université de Rouen.

[79] S. Aime, E. Gianolio, F. Arena, A. Barge, K. Martina, G. Heropoulos, G. Cravotto, *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 370–379.

[80] P. Blasi, S. Giovagnoli, A. Schoubben, M. Ricci, C. Rossi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 454–477.

[81] C. M. C. Tempany, N. J. McDannold, K. Hynynen, F. A. Jolesz, *Radiology* **2011**, *259*, 39–56.

[82] O. Al-Bataineh, J. Jenne, P. Huber, *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 346–353.

[83] R. K. Oberoi, K. E. Parrish, T. T. Sio, R. K. Mittapalli, W. F. Elmquist, J. N. Sarkaria, *Neuro-Oncol.* **2016**, *18*, 27–36.

[84] C. Ché, G. Yang, C. Thiot, M.-C. Lacoste, J.-C. Currie, M. Demeule, A. Régina, R. Béliveau, J.-P. Castaigne, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2814–2824.

[85] M. Demeule, J.-C. Currie, Y. Bertrand, C. Ché, T. Nguyen, A. Régina, R. Gabathuler, J.-P. Castaigne, R. Béliveau, *J. Neurochem.* **2008**, *106*, 1534–1544.

[86] P. Xing, Z. Liao, Z. Ren, J. Zhao, F. Song, G. Wang, K. Chen, J. Yang, *Chin. J. Cancer* **2016**, *35*, 1-8.

[87] Y. Bertrand, J.-C. Currie, M. Demeule, A. Régina, C. Ché, A. Abulrob, D. Fatehi, H. Sartelet, R. Gabathuler, J.-P. Castaigne, D. Stanimirovic, R. Béliveau, *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2827–2839.

[88] W. Ke, K. Shao, R. Huang, L. Han, Y. Liu, J. Li, Y. Kuang, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6976–6985.

[89] T. Suksrichavalit, S. Prachayasittikul, C. Isarankura Na Ayudhya, V. Prachayasittikul, *J. Mater. Sci.* **2014**, *49*, 8204–8213.

[90] P. Figueiredo, V. Balasubramanian, M.-A. Shahbazi, A. Correia, D. Wu, C. G. Palivan, J. T. Hirvonen, H. A. Santos, *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 794–803.

[91] A. Zarebkohan, F. Najafi, H. R. Moghimi, M. Hemmati, M. R. Deevband, B. Kazemi, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *78*, 19–30.

[92] C. Velasco-Aguirre, F. Morales-Zavala, E. Salas-Huenuleo, E. Gallardo-Toledo, O. Andonie, L. Muñoz, X. Rojas, G. Acosta, M. Sánchez-Navarro, E. Giralt, E. Araya, F. Albericio, M. J. Kogan, *Nanomed.* **2017**, *12*, 2503–2517.

[93] R. Huang, H. Ma, Y. Guo, S. Liu, Y. Kuang, K. Shao, J. Li, Y. Liu, L. Han, S. Huang, S. An, L. Ye, J. Lou, C. Jiang, *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2549–2559.

[94] W. Han, G. Yin, X. Pu, X. Chen, X. Liao, Z. Huang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2017**, *28*, 1695–1712.

[95] J. Szejtli, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1825–1845.

[96] W. Bouquet, W. Ceelen, B. Fritzinger, P. Pattyn, M. Peeters, J. P. Remon, C. Vervaet, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 391–397.

[97] U. V. Singh, K. S. Aithal, N. Udupa, **1997**, *3*, 573–577.

[98] J. Kang, V. Kumar, D. Yang, P. R. Chowdhury, R. J. Hohl, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *15*, 163–170.

[99] A. Satern, N. Nguyen, A. Bauerbrandl, M. Brandl, *Int. J. Pharm.* **2004**, *284*, 61–68.

[100] M. Peng, Y. Liu, H. Zhang, Y. Cui, G. Zhai, C. Chen, *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 1291–1295.

[101] A. Balaji, V. P. Pandey, M. S. Srinath, R. Manavalan, *Pharmacologyonline* **2009**, *1*, 1135-1143.

[102] C. Di Donato, M. Lavorgna, R. Fattorusso, C. Isernia, M. Isidori, G. Malgieri, C. Piscitelli, C. Russo, L. Russo, R. Iacovino, *Molecules* **2016**, *21*, 1644.

[103] E. Bilensoy, Y. Çırpanlı, M. Şen, A. L. Doğan, S. Çalış, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 363–370.

[104] G. Tóth, Á. Jánoska, G. Völgyi, Z.-I. Szabó, G. Orgován, A. Mirzahosseini, B. Noszál, *J. Chem.* **2017**, *2017*, 1–9.

[105] C. Jantarat, P. Sirathanarun, S. Ratanapongsai, P. Watcharakan, S. Sunyapong, A. Wadu, *Trop. J. Pharm. Res.* **2014**, *13*, 1215.

[106] C. S. Mangolim, C. Moriwaki, A. C. Nogueira, F. Sato, M. L. Baesso, A. M. Neto, G. Matioli, *Food Chem.* **2014**, *153*, 361–370.

[107] N. Qiu, X. Li, J. Liu, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2017**, *89*, 229–246.

[108] S. Landa, V. Macháček, *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1933**, *5*, 1–5.

[109] V. Prelog, R. Seiwerth, *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1941**, *74*, 1644–1648.

[110] P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3292–3292.

[111] G.-F. Luo, X.-D. Xu, J. Zhang, J. Yang, Y.-H. Gong, Q. Lei, H.-Z. Jia, C. Li, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 5317–5324.

[112] D. Harries, D. C. Rau, V. A. Parsegian, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2184–2190.

[113] W. C. Cromwell, K. Bystrom, M. R. Eftink, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 326–332.

[114] J. Voskuhl, M. Waller, S. Bandaru, B. A. Tkachenko, C. Fregonese, B. Wibbeling, P. R. Schreiner, B. J. Ravoo, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4524.

[115] M. Novo, D. Granadero, J. Bordello, W. Al-Soufi, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2011**, *70*, 259–268.

[116] Y. Zhang, W. Wang, Q. Li, Q. Yang, Y. Li, J. Du, *Talanta* **2015**, *141*, 33–40.

[117] D. Granadero, J. Bordello, M. J. Pérez-Alvite, M. Novo, W. Al-Soufi, *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 173–188.

[118] Q. Li, Y. Zhang, Y. Jin, Q. Yang, J. Du, Y. Li, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 68815–68821.

[119] X.-H. Yang, F. Zhao, L.-L. He, K.-M. Wang, J. Huang, Q. Wang, J.-B. Liu, M. Yang, *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 1318–1322.

[120] G. Liu, Y.-M. Zhang, X. Xu, L. Zhang, Q. Yu, Q. Zhao, C. Zhao, Y. Liu, *Adv. Opt. Mater.* **2017**, *5*, 1700770.

[121] M. Sun, H.-Y. Zhang, Q. Zhao, X.-Y. Hu, L.-H. Wang, B.-W. Liu, Y. Liu, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 8170–8179.

[122] Q. Zhang, Y. Cai, X.-J. Wang, J.-L. Xu, Z. Ye, S. Wang, P. H. Seeberger, J. Yin, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 33405–33411.

[123] G. D. Stefano, M. Lanza, F. Kratz, L. Merina, L. Fiume, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 393–397.

[124] E. L. Cyphert, A. S. Fu, H. A. von Recum, *Exp. Biol. Med.* **2017**, *242*, 692–699.

[125] I. González-Méndez, J. D. Solano, P. Porcu, A. Ruiu, Y. Rojas-Aguirre, E. Rivera, *J. Mol. Struct.* **2019**, *1177*, 143–151.

[126] S.-Y. Li, L.-H. Liu, H.-Z. Jia, W.-X. Qiu, L. Rong, H. Cheng, X.-Z. Zhang, *Chem Commun* **2014**, *50*, 11852–11855.

[127] W. She, K. Luo, C. Zhang, G. Wang, Y. Geng, L. Li, B. He, Z. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 1613–1623.

[128] W. She, D. Pan, K. Luo, B. He, G. Cheng, C. Zhang, Z. Gu, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 964–978.

[129] L. Wang, K. Ren, H. Wang, Y. Wang, J. Ji, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *125*, 127–133.

[130] Y. Wang, H. Wang, Y. Chen, X. Liu, Q. Jin, J. Ji, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7123.

[131] W.-L. Ye, Y.-P. Zhao, R. Na, F. Li, Q.-B. Mei, M.-G. Zhao, S.-Y. Zhou, *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 2293–2303.

[132] S. Ruan, M. Yuan, L. Zhang, G. Hu, J. Chen, X. Cun, Q. Zhang, Y. Yang, Q. He, H. Gao, *Biomaterials* **2015**, *37*, 425–435.

[133] H. R. Krüger, I. Schütz, A. Justies, K. Licha, P. Welker, V. Haucke, M. Calderón, *J. Controlled Release* **2014**, *194*, 189–196.

[134] H. Chen, H. Jia, H. P. Tham, Q. Qu, P. Xing, J. Zhao, S. Z. F. Phua, G. Chen, Y. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 23536–23543.

[135] Y. Chen, Y. Huang, D. Qin, W. Liu, C. Song, K. Lou, W. Wang, F. Gao, *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0150877.

[136] Y. Yang, Y.-M. Zhang, Y. Chen, J.-T. Chen, Y. Liu, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9725–9736.

[137] Z. Zhou, Z. Han, Z.-R. Lu, *Biomaterials* **2016**, *85*, 168–179.

[138] E. Battistini, E. Gianolio, R. Gref, P. Couvreur, S. Fuzerova, M. Othman, S. Aime, B. Badet, P. Durand, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 4551–4561.

[139] F. Wan, L. Wang, W. Xu, C. Li, Y. Li, C. Zhang, L. Jiang, *Polyhedron* **2018**, *145*, 141–146.

[140] K.-J. Chen, S. M. Wolahan, H. Wang, C.-H. Hsu, H.-W. Chang, A. Durazo, L.-P. Hwang, M. A. Garcia, Z. K. Jiang, L. Wu, Y.-Y. Lin, H.-R. Tseng, *Biomaterials* **2011**, *32*, 2160–2165.

[141] Q.-D. Hu, G.-P. Tang, P. K. Chu, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2017–2025.

[142] E. E. Carlson, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 429–435.

[143] D. C. Dieterich, A. J. Link, J. Graumann, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 9482–9487.

[144] M. Tanihara, Y. Suzuki, Y. Nishimura, K. Suzuki, Y. Kakimaru, *Peptides* **1998**, *19*, 421–425.

[145] K. A. Ajaj, M. L. Biniossek, F. Kratz, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 390–396.

[146] C.-H. Tung, U. Mahmood, S. Bredow, R. Weissleder, *Cancer research* **2000**, *60*, 4953–4958.

[147] F. A. Jaffer, D.-E. Kim, L. Quinti, C.-H. Tung, E. Aikawa, A. N. Pande, R. H. Kohler, G.-P. Shi, P. Libby, R. Weissleder, *Circulation* **2007**, *115*, 2292–2298.

[148] S. M. Messerli, S. Prabhakar, Y. Tang, K. Shah, M. L. Cortes, V. Murthy, R. Weissleder, X. O. Breakefield, C.-H. Tung, *Neoplasia* **2004**, *6*, 95–105.

[149] L. Yi, L. Cao, L. Liu, Z. Xi, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8947–8951.

[150] M. Sturm, A. Leitner, W. Lindner, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 211–217.

[151] A. Dirksen, S. Yegneswaran, P. E. Dawson, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2067–2071.

[152] K. D. Park, R. Liu, H. Kohn, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 763–772.

[153] T. W. Muir, P. E. Dawson, M. C. Fitzgerald, S. B. H. Kent, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 817–825.

[154] H. Sun, B. Guo, R. Cheng, F. Meng, H. Liu, Z. Zhong, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6358–6366.

[155] Y. Su, Y. Hu, Y. Du, X. Huang, J. He, J. You, H. Yuan, F. Hu, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1193–1202.

[156] M. Xu, J. Qian, X. Liu, T. Liu, H. Wang, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *50*, 341–347.

[157] S. Santra, C. Kaittanis, O. J. Santiesteban, J. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16680–16688.

[158] G. Leriche, G. Budin, L. Brino, A. Wagner, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 4360–4364.

[159] J. M. Hooker, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3718–3719.

[160] G. Budin, M. Moune-Dimala, G. Leriche, J.-M. Saliou, J. Papillon, S. Sanglier-Cianférani, A. Van Dorsselaer, V. Lamour, L. Brino, A. Wagner, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2359–2361.

[161] N. Hammond, P. Koumi, G. J. Langley, A. Lowe, T. Brown, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1878–1885.

[162] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3462–3463.

[163] R. Orth, S. A. Sieber, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8476–8479.

[164] S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp, *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2443–2452.

[165] K. Katayama, S. Tsukiji, T. Furuta, T. Nagamune, *Chem. Commun.* **2008**, *42*, 5399–5401.

[166] M. W. Gardner, L. A. Vasicek, S. Shabbir, E. V. Anslyn, J. S. Brodbelt, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4807–4819.

[167] M. C. Parrott, J. C. Luft, J. D. Byrne, J. H. Fain, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17928–17932.

[168] C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzer, P. Mailhe, D. Scherman, M. Bessodes, *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 423–434.

[169] Y.-L. Zhao, Z. Li, S. Kabehie, Y. Y. Botros, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13016–13025.

[170] Y. Jia, J. Fei, Y. Cui, Y. Yang, L. Gao, J. Li, *Chem Commun* **2011**, *47*, 1175–1177.

[171] J. Liao, H. Zheng, R. Hu, J. Cao, X. Wei, D. Li, H. Zheng, Y. Yin, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2018**, *14*, 496–509.

[172] J. Sheng, Y. Wang, L. Xiong, Q. Luo, X. Li, Z. Shen, W. Zhu, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 1680–1688.

[173] V. F. Patel, J. N. Hardin, J. M. Mastro, K. L. Law, J. L. Zimmermann, W. J. Ehlhardt, J. M. Woodland, J. J. Starling, *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7*, 497–510.

[174] Y. Jin, L. Song, Y. Su, L. Zhu, Y. Pang, F. Qiu, G. Tong, D. Yan, B. Zhu, X. Zhu, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3460–3468.

[175] B. Liu, H. Chen, X. Li, C. Zhao, Y. Liu, L. Zhu, H. Deng, J. Li, G. Li, F. Guo, X. Zhu, *RSC Adv* **2014**, *4*, 48943–48951.

[176] I. Szabó, M. Manea, E. Orbán, A. Csámpai, S. Bősze, R. Szabó, M. Tejeda, D. Gaál, B. Kapuvári, M. Przybylski, F. Hudecz, G. Mező, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 656–665.

[177] Y. Wang, J. G. Klijn, Y. Zhang, A. M. Sieuwerts, M. P. Look, F. Yang, D. Talantov, M. Timmermans, M. E. Meijer-van Gelder, J. Yu, T. Jatkoe, E. M. Berns, D. Atkins, J. A. Foekens, *The Lancet* **2005**, *365*, 671–679.

[178] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 1590–1598.

[179] M. Verbrugghe, S. Verhaeghe, K. Lauwaert, D. Beeckman, A. Van Hecke, *Cancer Treat. Rev.* **2013**, *39*, 610–621.

[180] S. Weinhouse, O. Warburg, D. Burk, A. L. Schade, *Science* **1956**, *124*, 267–272.

[181] L. Tian, Y. H. Bae, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *99*, 116–126.

[182] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20–53.

[183] O. Tacar, P. Sriamornsak, C. R. Dass, *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 157–170.

[184] D. Lu, X. Wen, J. Liang, Z. Gu, X. Zhang, Y. Fan, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *89B*, 177–183.

[185] C. Du, D. Deng, L. Shan, S. Wan, J. Cao, J. Tian, S. Achilefu, Y. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3087–3097.

[186] L. Dong, S. Xia, K. Wu, Z. Huang, H. Chen, J. Chen, J. Zhang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6309–6316.

[187] X. Xu, Z. Huang, Z. Huang, X. Zhang, S. He, X. Sun, Y. Shen, M. Yan, C. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 20361–20375.

[188] Duffy, M. J., Maguire, T. M., McDermott, E. W., & O'Higgins, N, *J. Surg. Oncol.* **1999**, *71*, 130–135.

[189] M. J. Duffy, C. Duggan, H. E. Mulcahy, E. W. McDermott, N. J. O'Higgins, *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1177–1183.

[190] S. F. Shariat, C. G. Roehrborn, J. D. McConnell, S. Park, N. Alam, T. M. Wheeler, K. M. Slawin, *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 349–355.

[191] R. Swiercz, J. D. Wolfe, A. Zaher, J. Jankun, *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 869–877.

[192] W. Kuhn, B. Schmalfeldt, U. Reuning, L. Pache, U. Berger, K. Ulm, N. Harbeck, K. Späthe, P. Dettmar, H. Höfler, F. Jänicke, M. Schmitt, H. Graeff, *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 1746–1751.

[193] H. Kobayashi, S. Fujishiro, T. Terao, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 6539–6548.

[194] S. R. Harvey, T. C. Hurd, G. Markus, M. I. Martinick, R. M. Penetrante, D. Tan, P. Venkataraman, N. DeSouza, S. N. J. Sait, D. L. Driscoll, J. F. Gibbs, **2003**, *9*, 4935–4943.

[195] D. W. Hsu, J. T. Efird, E. T. Hedley-Whyte, *Am. J. Pathol.* **1995**, *147*, 114–123.

[196] D. A. Waltz, L. R. Natkin, R. M. Fujita, Y. Wei, H. A. Chapman, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 58–67.

[197] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353–10366.

[198] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1029–1038.

[199] T. Liu, X. Li, Y. Qian, X. Hu, S. Liu, *Biomaterials* **2012**, *33*, 2521–2531.

[200] G. Yu, X. Zhao, J. Zhou, Z. Mao, X. Huang, Z. Wang, B. Hua, Y. Liu, F. Zhang, Z. He, O. Jacobson, C. Gao, W. Wang, C. Yu, X. Zhu, F. Huang, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 8005–8019.

[201] Y. Zhang, D. Yang, H. Chen, W. Q. Lim, F. S. Z. Phua, G. An, P. Yang, Y. Zhao, *Biomaterials* **2018**, *163*, 14–24.

[202] R. L. Svec, L. Furiassi, C. G. Skibinski, T. M. Fan, G. J. Riggins, P. J. Hergenrother, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3206–3216.

[203] D. Liu, J.-G. Yang, J. Cheng, L.-X. Zhao, *Molecules* **2010**, *15*, 9427–9436.

[204] Yongfeng Wang, M. F. G. Stevens, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 185–188.

[205] D. Cousin, M. F. G. Stevens, M. G. Hummersone, *MedChemComm* **2012**, *3*, 1419.

[206] C. Moody, R. Wheelhouse, *Pharmaceuticals* **2014**, *7*, 797–838.

[207] D. Pletsas, E. A. E. Garelnabi, L. Li, R. M. Phillips, R. T. Wheelhouse, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7120–7132.

[208] S. G. Küçükgüzel, S. Rollas, H. Erdeniz, M. Kiraz, *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 153–160.

[209] L. Savini, L. Chiasserini, A. Gaeta, C. Pellerano, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2193–2198.

[210] S. Rollas, S. G. Küçükgüzel, *Molecules* **2007**, *12*, 1910–1939.

[211] J. Pandey, R. Pal, A. Dwivedi, K. Hajela, *Arzneimittelforschung* **2002**, *52*, 39–44.

[212] T. Li, L. Wang, S. Lin, X. Xu, M. Liu, S. Shen, Z. Yan, R. Mo, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2838–2845.

[213] H. Tateishi, A. B. Tsuji, K. Kato, H. Sudo, A. Sugyo, T. Hanakawa, M.-R. Zhang, T. Saga, Y. Arano, T. Higashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4893–4897.

[214] D. Palanimuthu, Z. Wu, P. J. Jansson, N. Braidy, P. V. Bernhardt, D. R. Richardson, D. S. Kalinowski, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 7190–7205.

[215] D. Zhang, A. Liu, R. Ji, J. Dong, Y. Ge, *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1055*, 133–139.

[216] P. Vicini, A. Geronikaki, M. Incerti, B. Busonera, G. Poni, C. A. Cabras, P. La Colla, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4785–4789.

[217] P. Y. Sollenberger, R. B. Martin, in *Amino Group 1968*, John Wiley & Sons **2010**, *1968*, 349–406.

[218] L. Blackburn, R. J. K. Taylor, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1637–1639.

[219] M. G. Kallitsakis, P. D. Tancini, M. Dixit, G. Mpourmpakis, I. N. Lykakis, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 1176–1184.

[220] W. J. Middleton, H. D. Carlson, *Org. Synth.* **1970**, *50*, 81.

[221] E. Querat, L. Tighzert, J. P. Pascault, K. DuZek, *Appl. Macromol. Chem. Phys. Angew Makromol. Chem.* **1996**, *242*, 1-36

[222] M. Stevens, F. Graham, D. Cousin, S. Jennings, A. J. Mc Carroll, J. G. Williams, M. G. Hummersone, J. Zhang *Patent* **2009**, WO 2009/077741 A2.

[223] V. Chandrashaker, M. Ptaszek, M. Taniguchi, J. S. Lindsey, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 8786–8808.

[224] V. Chandrashaker, M. Taniguchi, M. Ptaszek, J. S. Lindsey, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6957–6967.

[225] E. Smolianitski, E. Wolf, J. Almog, *Forensic Sci. Int.* **2014**, *242*, 219–227.

[226] P. T. Kaye, M. J. Mphahlele, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 3677–3684.

[227] M. Gall, B. V. Kamdar, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1575–1585.

[228] S. D. Baker, M. Wirth, P. Statkevich, P. Reidenberg, K. Alton, S. E. Sartorius, M. Dugan, D. Cutler, V. Batra, L. B. Grochow, R. C. Donehower, E. K. Rowinsky, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 309–317.

[229] M. J. Tisdale, *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 457–462.

[230] J. Zhang, M. F.G. Stevens, T. D. Bradshaw, *Curr. Mol. Pharmacol.* **2012**, *5*, 102–114.

[231] O. Michalak, M. M. Gruza, A. Witkowska, I. Bujak, and P. Cmoch, *Molecules* **2015**, *20*, 10004–10031.

[232] M. Šekutor, A. Štimac, K. Mlinarić-Majerski, R. Frkanec, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6005–6013.

[233] J. Černochová, P. Branná, M. Rouchal, P. Kulhánek, I. Kuřitka, R. Vícha, *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18*, 13633–13637.

[234] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

[235] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

[236] G. J. Stasiuk, N. J. Long, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2732.

[237] H. Stetter, W. Frank, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 686–686.

[238] D. E. Prasuhn, Jr., R. M. Yeh, A. Obenaus, M. Manchester, M. G. Finn, *Chem Commun* **2007**, 1269–1271.

[239] P.-L. Champagne, C. Barbot, P. Zhang, X. Han, I. Gaamoussi, M. Hubert-Roux, G. E. Bertolesi, G. Gouhier, C.-C. Ling, *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 8964–8977.

[240] H. Kitagishi, S. Hatada, T. Itakura, Y. Maki, Y. Maeda, K. Kano, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3203.

[241] H. Kitagishi, F. Chai, S. Negi, Y. Sugiura, K. Kano, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2421–2424.

[242] N. P. Sapkal, V. A. Kilor, K. P. Bhursari, A. S. Daud, *Trop. J. Pharm. Res.* **2007**, *6*, 833–840.

[243] T. Loftsson, B. J. Ólafsdóttir, H. Friðriksdóttir, S. Jónsdóttir, *Eur. J. Pharm. Sci.* **1993**, *1*, 95–101.

[244] S. Parlati, R. Gobetto, C. Barolo, A. Arrais, R. Buscaino, C. Medana, P. Savarino, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *57*, 463–470.

[245] P. Guo, Y. Su, Q. Cheng, Q. Pan, H. Li, *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 986–990.

[246] A. Lis-Cieplak, J. Sitkowski, W. Kolodziejski, *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 274–282.

[247] Job, P., *Ann. chim* **1928**, *9*, 113-203.

[248] U. Numanoğlu, T. Şen, N. Tarimci, M. Kartal, O. M. Y. Koo, H. Önyüksel, *AAPS PharmSciTech.* **2007**, *8*, 34–42.

[249] R. Zhao, C. Sandström, H. Zhang, T. Tan, *Molecules* **2016**, *21*, 372.

[250] T. Pralhad, K. Rajendrakumar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 333–339.

[251] Higuchi, T., Connors, K.A., *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **1965**, *4*, 117-211.

[252] S. Barman, B. K. Barman, M. N. Roy, *J. Mol. Struct.* **2018**, *1155*, 503–512.

[253] J. V. Caso, L. Russo, M. Palmieri, G. Malgieri, S. Galdiero, A. Falanga, C. Isernia, R. Iacovino, *Amino Acids* **2015**, *47*, 2215–2227.

[254] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703–2707.

[255] B. D. Wagner, S. J. Fitzpatrick, G. J. McManus, *J. Incl. Phenom.* **2003**, *47*, 187–192.

[256] C. Jones, *FEBS Lett.* **1995**, *367*, 99–99.

[257] V. K. Srivastava, R. Yadav, in *Data Process. Handb. Complex Biol. Data Sources*, Elsevier, **2019**, 125–137.

[258] A. Chatterjee, B. Maity, D. Seth, *J. Phys. Chem. B.* **2014**, *118*, 9768–9781.

[259] B. Maity, A. Chatterjee, S. A. Ahmed, D. Seth, *J. Lumin.* **2017**, *183*, 238–250.

[260] C. Jaime, J. Redondo, F. Sánchez-Ferrando, A. Virgili, *J. Mol. Struct.* **1991**, *248*, 317–329.

[261] R. Patil, J. Portilla-Arias, H. Ding, B. Konda, A. Rekechenetskiy, S. Inoue, K. L. Black, E. Holler, J. Y. Ljubimova, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 11681–11693.

[262] S. Ehrmann, C.-W. Chu, S. Kumari, K. Silberreis, C. Böttcher, J. Dernedde, B. J. Ravoo, R. Haag, *J. Mater. Chem. B.* **2018**, *6*, 4216–4222.

[263] G. S. Reshitko, E. Yu. Yamansarov, S. A. Evteev, E. V. Lopatukhina, D. O. Shkil', I. V. Saltykova, A. V. Lopukhov, S. V. Kovalev, A. N. Lobov, I. V. Kislyakov, O. Yu. Burenina, N. L. Klyachko, A. S. Garanina, O. A. Dontsova, Y. A. Ivanenkov, A. S. Erofeev, P. V. Gorelkin, E. K. Beloglazkina, A. G. Majouga, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 1313–1319.

[264] H. A. Holik, T. Uehara, S. Nemoto, T. Rokugawa, Y. Tomizawa, A. Sakuma, Y. Mizuno, H. Suzuki, Y. Arano, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 2909–2919.

[265] Y. S. Lee, S. Fernandes, V. Kulkarani, A. Mayorov, P. Davis, S. Ma, K. Brown, R. J. Gillies, J. Lai, F. Porreca, V. J. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4080–4084.

[266] T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel, S. Papot, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11774–11778.

[267] Y.-M. Zhang, Y. Yang, Y.-H. Zhang, Y. Liu, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1-11.

[268] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*, Elsevier, **2006**.

[269] E. Brenna, F. G. Gatti, L. Malpezzi, D. Monti, F. Parmeggiani, A. Sacchetti, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4811–4822.

[270] L. Yi, H. Li, L. Sun, L. Liu, C. Zhang, Z. Xi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4034–4037.

[271] K. Ikeuchi, R. Fujii, S. Sugiyama, T. Asakawa, M. Inai, Y. Hamashima, J.-H. Choi, T. Suzuki, H. Kawagishi, T. Kan, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3813–3815.

[272] S. Anantharaj, M. Jayakannan, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2446–2455.

[273] A. A. Dörr, W. D. Lubell, *Can. J. Chem.* **2007**, *85*, 1006–1017.

[274] M. Jansen, H. Rabe, A. Strehle, S. Dieler, F. Debus, G. Dannhardt, M. H. Akabas, H. Lüddens, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4430–4448.

[275] V. Sharma, G. T. Kelly, J. Foulke-Abel, C. M. H. Watanabe, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4006–4009.

[276] P. Suppasansatorn, G. Wang, B. R. Conway, W. Wang, Y. Wang, *Cancer Lett.* **2006**, *244*, 42–52.

[277] M. Patenaude, S. Campbell, D. Kinio, T. Hoare, *Biomacromolecules* **2014,** *15*, 781–790

[278] P. J. Koovits, J. P. Knowles, K. I. Booker-Milburn, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5608–5611.

[279] S. Shahane, L. Toupet, C. Fischmeister, C. Bruneau, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, *2013*, 54–60.

[280] P. Branná, J. Černochová, M. Rouchal, P. Kulhánek, M. Babinský, R. Marek, M. Nečas, I. Kuřitka, R. Vícha, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9595–9604.

[281] F. Wan, M. Liu, J. Zhang, Y. Li, L. Jiang, *Res. Chem. Intermed.* **2015**, *41*, 5109–5119.

[282] L. N. Goswami, Q. Cai, L. Ma, S. S. Jalisatgi, M. F. Hawthorne, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8912–8918.

Résumé

Représentant environ 45% de toutes les tumeurs cérébrales, le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale la plus agressive chez l'adulte. Environ 2000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France et seulement 10% des patients survivent au bout de cinq ans. Le protocole actuel standard de traitement des GBM consiste à une chirurgie ablative complète de la tumeur associée à un traitement combiné de radiothérapie et chimiothérapie. Malgré cette thérapie plus de 95% des tumeurs récidivent. Les glioblastomes envahissent les régions voisines du cerveau. Cette prolifération associée à la radio et/ou chimiorésistance des cellules tumorales ainsi qu'une faible pénétration de la thérapie à travers la barrière hémato-encéphalique limitent l'acheminement des agents anti-cancéreux au cerveau et justifient le développement de nouvelles stratégies. Pour remédier à ce problème, nous proposons un traitement des cancers du cerveau plus efficace, permettant une meilleure pénétration du médicament. Il permettra de réduire les effets secondaires en maîtrisant la libération de l'agent actif tout en augmentant sa durée d'action pour optimiser son efficacité. De plus, nous associons cette thérapie à une imagerie permettant de visualiser son évolution *in vivo* par IRM, accédant ainsi à de nouveaux agents théranostiques.

Mots clés

Cyclodextrines - Administration ciblée de médicaments - IRM - pH labile - Intracellulaire - Théranostique

---

Abstract

Representing about 45% of all brain tumors, glioblastoma (GBM) is the most aggressive brain tumor in adults. About 2,000 new cases are diagnosed each year in France and only 10% of patients survive after five years. The current standard GBM treatment protocol consists of complete ablative surgery of the tumor combined with a combined treatment of radiotherapy and chemotherapy called the Stupp protocol. Despite this therapy more than 95% of tumors reoffend. Glioblastomas infiltrate and invade the surrounding regions of the brain. This proliferation potential associated with radio and / or chemoresistance of tumor cells as well as a low penetration of therapy through the blood-brain barrier (BBB) limit the delivery of anti-cancer agents to the brain and justify the development of new strategies. To remedy this problem, we are proposing new ways of treating brain cancers that are more effective, allowing better penetration of the blood-brain barrier drug. This treatment will reduce side effects by controlling the release of the active agent, while increasing its duration of action, to optimize its effectiveness and visualize its evolution *in vivo* by MRI.

Keywords

Cyclodextrins - Targeted drug delivery - MR imaging - pH-labile – Intracellular - Theranostic