

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien

THÈSE présentée par :

Anli MAHAMOUD

soutenue le : **09 novembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

Complexes de bispidines pour l'imagerie médicale

THÈSE dirigée par :

Dr NONAT Aline

Chargée de recherche, Université de Strasbourg

Dr JAKAB TÓTH Éva

Directrice de recherche, Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans

RAPPORTEURS :

Dr DELANGLE Pascale

Rapportrice externe, Commissariat à l'Energie Atome de Grenoble

Prof. TRIPIER Raphaël

Rapporteur externe, Université de Bretagne Occidentale

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Prof. POLICAR Clotilde

Examinatrice, Ecole Normale Supérieure de Paris

Dr BOSCHETTI Frédéric

Examinateur, Chematech-mdt, Dijon

Invité :

Dr ELHABIRI Mourad

CNRS, Strasbourg

Remerciements

Infiniment reconnaissant envers ma directrice de thèse, Dr Aline Nonat qui m'a tout appris et avec qui j'ai fait la meilleure thèse dans les meilleures conditions possibles. Elle a été bien plus qu'une mentore pour moi, une collègue et une amie avec qui nous avons beaucoup échangé. Ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour sans sa très grande implication dans ce travail, sa motivation, sa joie de vivre au travail et ses précieux conseils m'ont très largement poussé à me surpasser.

Je remercie ma co-directrice de thèse, Dr Éva Jakab Tóth qui m'a accueilli au sein de son équipe au Centre de Biophysique Moléculaire à Orléans. J'ai beaucoup appris avec elle, sa bienveillance, sa gentillesse et sa bonne humeur m'ont grandement permis de travailler dans de très bonnes conditions. Son expertise dans le domaine des agents de contraste m'a permis d'acquérir de solides connaissances et compétences.

Je tiens à remercier le Dr Loïc Charbonnière qui m'a ouvert les portes de son équipe Synthèse pour l'Analyse au sein de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien à Strasbourg où j'ai passé une très grande partie de mon temps de travail.

Je souhaite aussi remercier le professeur Raphaël Tripiet et le Dr Pascale Delangle qui ont accepté d'évaluer mon travail et d'y avoir apporté des commentaires constructifs afin d'en améliorer la qualité. De plus un très grand merci au Dr Clotilde Policar, Dr Mourad Elhabiri et le Dr Frédéric Boschetti d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de ma thèse et d'y avoir apporté leur avis qui me permettra d'améliorer mon travail.

Un très grand merci aux personnes avec qui j'ai collaboré durant ce projet. Dans l'équipe SynPA à Strasbourg, Lucas Petitpoisson, Dr Kévin Lohona Kader Soro et le Dr Léna Godec qui m'ont grandement aidé avec leur expertise et savoir-faire. L'équipe LIMA à Strasbourg, le Dr Mourad Elhabiri et le Dr Valérie Mazan qui m'ont laissé une grande partie de leur matériel à disposition afin d'avancer dans les meilleures conditions. L'équipe du CBM à Orléans, le Dr Daouda Ndiaye avec qui j'ai beaucoup travaillé et bénéficié de son expertise. Agnès Pallier qui m'a tout appris sur l'utilisation des appareils, Dr Zoltan Garda et le Dr Célia Bonnet qui ont apporté leurs expériences aux différents sujets. L'équipe du professeur Clotilde Policar à l'École Normale Supérieure à Paris et Jean Bouvet qui a effectué les analyses nécessaires à l'avancée du travail dans le cadre de nos projets communs. Le Dr Olivier Jeannin à l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes qui a résolu les structures aux rayons X et enfin l'équipe du LSMBO de Strasbourg avec le Dr Jean Marc Strub pour avoir gentiment effectué les spectres de masse de mes composés.

Trois années absolument incroyables que j'ai passées avec des personnes merveilleuses et bienveillantes (Ceci n'est pas un Top) : Léna, avec son rire inégalé et sa joie de vivre absolument incroyable, son animation au travail donne envie de venir tous les jours pour suivre les nouvelles aventures. Gemma, qui doit toujours me ramener de la confiture au bureau, toujours un plaisir de suivre tes nouvelles découvertes #friperie. Kévin, qui continue de noter mes meilleures accroches, un pur bonheur de compter tes couches de vêtements d'hiver. Marie, qui lèche le sol avec la roue ça y est enfin, une gentillesse incroyable. Cyrille, le détenteur des droits d'auteur du mot « Labéro », un vrai comique celui-là. Mohammed, une gentillesse incroyable avec qui on s'entraîne beaucoup. Lucas, qui a toujours le meilleur humour bien placé, on a tellement avancé ensemble durant nos thèses. Alexandre, je n'oublie pas que je n'aurais jamais autant avancé si tu n'avais pas été là et si gentil. Charlotte, avec qui on ne meurt jamais de faim, même si ça colle un peu aux dents. Elsa, son rire et sa gentillesse. Manon, voisine de bureau, tu vas enfin avoir toutes les prises électriques pour toi, j'ai énormément apprécié ces moments. Clémence Cheignon, souriante et joviale, j'espère, tu comprends enfin mes blagues. Mainak, avec qui on a beaucoup échangé au laboratoire, j'ai beaucoup appris avec toi. Chen, un gentilhomme sympathique. Cécilie, avec une joie de vivre un champ agréable créant une atmosphère plaisante au travail.



Pas de longs remerciements car ceci n'est pas un au revoir.

Merci infiniment à vous tous.

Au-delà milieu professionnel, j'ai été soutenu et encouragé par toute ma famille.

Mon père et ma mère ont tout fait pour m'éduquer.

Sommaire

Introduction Générale.....	10
Objectif et contexte de travail.....	12
Chapitre 1 : Les complexes de bispidines, leurs propriétés et leurs applications	15
I. <i>La famille des bispidines</i>	<i>16</i>
A. Synthèse, stéréochimie et réactivité des dérivés 2,4-disubstitués.	17
i. Synthèse et stéréochimie.....	17
ii. Réactivité et fonctionnalisation	19
B. Chimie de coordination des bispidines	21
i. Le Bloc d (métaux de transition)	21
iii. Le bloc f (lanthanides, actinides) et l'indium	27
II. <i>Application dans l'imagerie médicale.....</i>	<i>31</i>
A. La Tomographie par Émission de Positron (TEP)	31
i. Principe	31
ii. L'immuno-TEP	33
iii. Chélate bifonctionnel à base de ⁶⁴ Cu.....	35
B. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	36
i. Principe	36
ii. Théorie de la relaxivité.....	38
iii. Bispidine-Mn pour l'IRM.....	40
III. <i>Introduction des propriétés redox du ⁵⁵Mn^{II/III} dans l'IRM.....</i>	<i>41</i>
A. L'environnement redox dans le vivant.....	41
i. Potentiels redox dans un organisme vivant	41
ii. Déséquilibre redox	42
B. Les sondes IRM redox-activées à base de manganèse	43
IV. <i>Les complexes de bispidine dans la catalyse.....</i>	<i>46</i>
A. Bispidine pour la catalyse	46
i. Catalyseur à base de cuivre	46
ii. Catalyseur à base de fer	48
iii. Catalyseur à base de nickel	49
B. Manganèse pour la catalyse de la superoxyde dismutase (SOD)	49
i. Introduction	49
ii. Mn-Bispidine comme mime des [MnSOD]	51
V. <i>Application à la détection du zinc.....</i>	<i>53</i>
Chapitre 2 : Bispidines octadentates pour la complexation du terbium : vers de nouveaux radiotraceurs pour la TEP.....	57
I. <i>Introduction et contexte de travail</i>	<i>58</i>
II. <i>Synthèse de H₆L1 et H₄L2.....</i>	<i>62</i>
A. Synthèse et caractérisation de H ₆ L1.....	62
i. Synthèse de H ₆ L1	62
ii. Caractérisation de H ₆ L1.....	63
B. Synthèse et caractérisation de H ₄ L2.....	71
i. Synthèse de H ₄ L2	71

ii.	Caractérisation de H ₄ L ₂	72
III.	<i>Etudes potentiométrique et spectrophotométrique de H₆L₁, H₄L₂, [TbL₁] et [TbL₂]</i>	74
A.	Etudes potentiométrique de H ₆ L ₁ , H ₄ L ₂ , [TbL ₁] et [TbL ₂]	74
i.	Titration de H ₆ L ₁ et H ₄ L ₂	74
ii.	Titration de TbL ₂	75
B.	Etudes spectrophotométriques de H ₆ L ₁ , H ₄ L ₂ et TbL ₁	76
i.	Titration de H ₆ L ₁	76
ii.	Titration UV et luminescence de [TbL ₁] à pH 5,5	77
iii.	Titration [TbL ₁] (Figure 58).....	79
C.	Titration et caractérisation RMN de H ₆ L ₁ , [LaL ₁] et [LuL ₁].....	82
i.	Titration de H ₆ L ₁	82
ii.	Titration et caractérisation de [LaL ₁].....	84
a.	Titration de [LaL ₁]	84
b.	Caractérisation de [LaL ₁]	86
iii.	Formation et caractérisation de [LuL ₁]	87
a.	Formation de [LuL ₁]	87
b.	Caractérisation de [LuL ₁].....	88
IV.	<i>Propriétés de luminescence de [TbL₁] et [TbL₂]</i>	91
V.	<i>Inertie cinétique de [TbL₁] et [TbL₂]</i>	92
VI.	<i>Conclusion</i>	93
	Chapitre 3 : Mn^{II/III} – bispidine pyridine phénol : sonde redox-activée pour l'IRM	95
I.	<i>Introduction et contexte de travail</i>	96
II.	<i>Synthèse et caractérisation de H₃L₃ et [Mn^{II}L₃]</i>	98
A.	Première voie de synthèse de H ₃ L ₃	98
B.	Seconde voie de synthèse de H ₃ L ₃	100
C.	Troisième voie de synthèse de H ₃ L ₃	101
i.	Synthèse de P2.....	101
ii.	Synthèse de H ₃ L ₃	102
iii.	Caractérisation de H ₃ L ₃ et de quelques intermédiaires clés	103
D.	Synthèse et caractérisation de [Mn ^{II} L ₃]	107
i.	Synthèse de [Mn ^{II} L ₃].....	107
ii.	Caractérisation de [Mn ^{II} L ₃]	108
III.	<i>Etudes potentiométrique, spectrophotométrique et relaxométrique de H₃L₃, [Zn^{II}L₃] et [Mn^{II}L₃]</i>	111
A.	Etudes potentiométriques de H ₃ L ₃ , [Zn ^{II} L ₃] et [Mn ^{II} L ₃]	111
i.	Titration de H ₃ L ₃ (Figure 88)	111
ii.	Titration de [Mn ^{II} L ₃] et [Zn ^{II} L ₃].....	112
B.	Etudes spectrophotométrique de H ₃ L ₃ , [Zn ^{II} L ₃] et [Mn ^{II} L ₃].....	113
i.	Titration de H ₃ L ₃	113
ii.	Titration de [Zn ^{II} L ₃] et [Mn ^{II} L ₃] à pH 7,06.....	115
a.	[Zn ^{II} L ₃] (Figure 94)	115
b.	[Mn ^{II} L ₃] (Figure 95).....	116
iii.	Titration de [Zn ^{II} L ₃] et [Mn ^{II} L ₃] en fonction du pH.....	117
a.	[Zn ^{II} L ₃] (Figure 96)	117
b.	[Mn ^{II} L ₃] (Figure 97).....	119
C.	Etude relaxométrique de [Mn ^{II} L ₃].....	120
i.	Titration en r ₁	120
IV.	<i>Etude relaxométrique et mesure de l'inertie cinétique de [Mn^{II}L₃]</i>	122
A.	Inertie cinétique	122
i.	Suivi par relaxométrie	122
ii.	Suivi par LC MRM	124

B.	Relaxométrie	125
i.	Mesure de relaxivité	125
ii.	Mesure de RMN de l'oxygène 17	126
iii.	Mesure profil NMRD et les paramètres gouvernants la relaxivité	127
V.	Potentiel redox et stabilité thermodynamique théorique de $[Mn^{III}L3]$	130
VI.	Etude de $[Mn^{III}L3]$	133
A.	Formation du complexe $[Mn^{III}L3]$	133
i.	Première voie de formation	133
ii.	Deuxième voie de formation	136
a.	Oxydation de H_3L3	136
b.	Oxydation de $[Mn^{II}L3]$	137
iii.	Troisième voie de formation	138
a.	Caractérisation par spectroscopie UV-visible	138
b.	Caractérisation par RMN	139
c.	Caractérisation par MALDI.....	141
B.	Stabilité de $[Mn^{III}L3]$	142
VII.	Conclusion	145
Chapitre 4 : Sondes redox-activée pour l'IRM : une nouvelle famille de $Mn^{II/III}$ – bispidine		147
I.	Introduction et contexte de travail	148
II.	Synthèse et caractérisation de H_3L4 , H_3L5 , $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$	149
A.	Synthèse et caractérisation de H_3L4 et H_3L5	149
i.	Voie de synthèse de H_3L4 et H_3L5	149
ii.	Caractérisation de H_3L4 et H_3L5 et quelques intermédiaires clés	152
B.	Synthèse des complexes $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$	156
a.	$Mn^{II}L4$	156
b.	$Mn^{II}L5$	157
III.	Etudes potentiométriques, spectrophométriques et RMN de H_3L4 , H_3L5 et les complexes	159
A.	Etudes potentiométriques de H_3L4 , H_3L5 , $[Zn^{II}L4]$, $[Zn^{II}L5]$, $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$	159
i.	Titrage de H_3L4 et H_3L5 (Figure 134).....	159
ii.	Titrage de $[Zn^{II}L4]$, $[Zn^{II}L5]$, $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$	161
B.	Etude relaxométrique de $[Mn^{II}L5]$	164
C.	Titrage spectrophotométrique de $[Zn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L4]$	164
i.	Titrage de $[Zn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L4]$ à pH 7,06.....	165
ii.	Titrage de $[Mn^{II}L4]$ (Figure 141)	165
D.	Titrage et caractérisation RMN 1H de H_3L4 , H_3L5 , $[Zn^{II}L4]$ et $[Zn^{II}L5]$	166
i.	Titrage de $L4$	167
ii.	Titrage de $L5$	169
iii.	Titrage et caractérisation de $[Zn^{II}L4]$	172
a.	Titrage.....	172
b.	Caractérisation.....	174
iv.	Titrage et caractérisation de $Zn^{II}L5$	176
a.	Titrage.....	176
b.	Caractérisation.....	179
v.	Récapitulatif des constantes thermodynamiques.....	181
IV.	Etude relaxométrique et inertie cinétique de $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$	182
A.	Inertie cinétique	182
B.	Relaxométrie	184
i.	Mesure relaxivité	184
ii.	Mesure oxygène 17.....	184
iii.	Mesure profil NMRD	184

V.	<i>Potentiel redox et stabilité thermodynamique de [Mn^{III}L4] et [Mn^{III}L5].....</i>	185
A.	Etude voltampérométrique de [Mn ^{II} L4]	185
B.	Etude voltampérométrique de [Mn ^{II} L5]	186
C.	Stabilité thermodynamique théorique de [Mn ^{III} L4] et [Mn ^{III} L5].....	187
VI.	<i>Etude de [Mn^{III}L4] et [Mn^{III}L5].....</i>	188
A.	Formation du complexe [Mn ^{III} L4] et [Mn ^{III} L5]	188
i.	Oxydation de [Mn ^{II} L4] et [Mn ^{II} L5]	189
ii.	Formation de Mn ^{III} L4 et Mn ^{III} L5 dans le méthanol.....	189
B.	Stabilité de [Mn ^{III} L4] et [Mn ^{III} L5]	191
VII.	<i>Conclusion</i>	194
Chapitre 5 : Mn^{II/III} – Bispidine, mime de la superoxyde dismutase		195
I.	<i>Introduction et contexte de travail</i>	196
II.	<i>Région d'activité</i>	197
III.	<i>Activité SOD</i>	198
A.	Principe	198
B.	Activité de [MnL3]	199
C.	Activité de [MnL4]	200
D.	Activité de [MnL5]	200
IV.	<i>Cytotoxicité de [Mn^{II}L3], [Mn^{II}L4] et [Mn^{II}L5].....</i>	201
V.	<i>Activité anti-inflammatoire de [Mn^{II}L3], [Mn^{II}L4] et [Mn^{II}L5]</i>	202
VI.	<i>Conclusion.....</i>	204
Chapitre 6 : Mn^{II} – Bispidine, sonde à Zn^{II}		205
I.	<i>Introduction et contexte de travail</i>	206
II.	<i>Synthèse et caractérisation de H₃L6 et [MnL6].....</i>	207
A.	Synthèse et caractérisation de H ₃ L6.....	207
i.	Synthèse de H ₄ L6	207
ii.	Caractérisation de H ₃ L6.....	207
B.	Synthèse de [MnL6]	208
III.	<i>Etudes préliminaires de [MnL6] et sa sélectivité au Zn^{II}</i>	209
A.	Affinité et sélectivité au Zn ^{II}	209
B.	Sélectivité du Zn ^{II} dans l'albumine sérique humaine.....	210
IV.	<i>Conclusion.....</i>	211
Conclusion générale.....		212
Experimental section		215
I.	<i>Measurements and materials.....</i>	215
a.	Solvents and starting materials.	215
b.	Stock solutions.....	215
c.	FPLC	215
d.	HPLC	215
e.	NMR.....	216
f.	Mass spectrometry	216
g.	Elemental analysis	216
h.	Crystallography data	217
i.	Potentiometric titration.....	218
j.	Dissociation kinetics studies	219

k. Relaxometric Measurements.....	219
l. ¹⁷ O NMR measurements.....	219
m. UV-visible absorption, emission, and excitation spectra + lifetime.	220
n. Cyclic voltammetry	221
II. Organic synthesis.....	224
III. Inorganic synthesis	235
Références bibliographiques	239
Liste des abréviations	249
Liste des présentations et publications	251
Annexe	252
I. Détermination de τ par la mesure des temps de vie de luminescence	252
II. Détermination de la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère de coordination	253

Introduction Générale

Face à la hausse de l'espérance de vie de l'humanité depuis le 20ème siècle, on observe une forte croissance des décès liés au cancer dans le monde. Le domaine de l'oncologie a dû s'adapter très rapidement et développer des diagnostics précoces et des traitements personnalisés aux tumeurs. De nos jours, les demandes en agents de contraste pour le diagnostic et l'imagerie médicale sont grandissantes et stimulent de plus en plus l'activité scientifique. En imagerie médicale, un agent de contraste est une substance permettant d'augmenter artificiellement le contraste afin de visualiser une structure anatomique naturellement peu contrastée (tissu, organe, ...) et subséquemment, d'augmenter la sensibilité des techniques d'imagerie. On parle d'agent d'imagerie dans le cas où il ne s'agit pas de l'imagerie par résonance magnétique. Cet agent d'imagerie peut être une nanoparticule, une molécule organique ou encore un complexe de coordination. Différentes techniques d'imagerie médicale ont été développées à ce jour. On y retrouve par exemple la Tomographie par Emission de Positron (TEP), qui est une technique ultrasensible basée sur l'utilisation de radioisotopes émetteurs de positon (β^+ : ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{152}Tb , ^{131}I ...) pour la détection de pathologie. Certaines paires d'isotopes offrent un avantage non négligeable comme la disponibilité de deux isotopes du même élément utilisables l'un en imagerie TEP et l'autre en thérapie (^{161}Tb , ^{67}Cu , ...). On parle alors de théranostique. Cette technique est toutefois limitée par sa faible résolution spatiale (4 - 6 mm). A l'inverse, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie intéressante pour sa haute résolution (0,5 mm – valeur indicative car la résolution dépend de plusieurs paramètres, tels que le champ magnétique ou encore le temps d'acquisition). Elle est basée essentiellement sur les propriétés magnétiques des protons de l'eau qui peuvent être modifiées par l'utilisation des métaux paramagnétiques (Gd^{III} , Mn^{II} , Fe^{II} ...). La limitation majeure de cette technique est sa faible sensibilité (0,1 mM - μM). Les deux techniques d'imagerie TEP et IRM sont donc complémentaires et ont, à ce titre, attiré notre attention. Pour ces deux techniques, des agents d'imagerie à base de complexes de coordination peuvent être utilisés.

Malgré leur intérêt bien spécifique, les métaux utilisés ici peuvent interagir avec le milieu biologique à l'état libre ce qui les rend toxiques. Il est donc indispensable de les utiliser sous forme de complexes stables et inertes. Diverses molécules pouvant complexer des cations métalliques, aussi appelés chélateurs ou ligands sont développés aujourd'hui. Mais peu d'entre elles peuvent former des complexes stables et inertes pour résister aux conditions physiologiques. Afin de répondre à cette demande grandissante, de nouveaux agents de contraste sont en développement. Parmi les chélateurs les plus utilisés, on retrouve la famille des ligands polyazamacrocycliques, dont le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique), formant généralement des complexes à la fois stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement grâce à la préorganisation des ligands.

Néanmoins la famille des ligands de type bispidine est également intéressante pour la coordination de cations grâce à la rigidité de son squelette carboné, c'est pourquoi les travaux de cette thèse porteront sur cette famille de composés (Figure 1). Les bispidines sont caractérisées par l'association de deux cycles pipéridiniques. Initialement étudiées par Mannich pour leurs propriétés analgésiques et leur influence sur le rythme cardiaque, la chimie des bispidines connaît un renouveau dans les années 1990 par la suite de l'introduction de substituants en positions C2 et C4 (Figure 1). A l'issue de la synthèse, une fonction cétone est présente dans le bicyclic en position C9 (Figure 1) ; le composé obtenu est alors nommé **bispidone**. Pour des applications en biologie, cette cétone est réduite en alcool afin d'éviter une ouverture du cycle conduisant à la dégradation du ligand : la molécule finale est alors nommée **bispidole**.

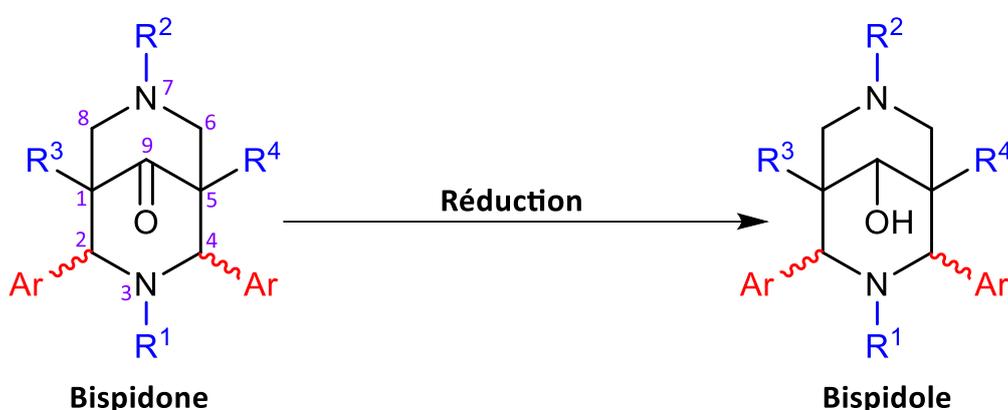


Figure 1 : Squelette bispidone et bispidole. Nomenclature officielle du bicyclic.

L'intérêt du squelette des bispidines réside dans plusieurs aspects :

- Une diversité structurale accessible facilement en modulant les substituants introduits sur le squelette (Ar, R¹ à R⁴, Figure 1).
- Une facilité à complexer divers métaux du fait d'une bonne préorganisation de la molécule.
- Une bonne stabilité en milieu biologique des complexes formés et une inertie cinétique des complexes, issues de la rigidité du squelette.

Remarque : La nomenclature officielle IUPAC présentée ici pour le bicyclic sera celle utilisée pour toute la thèse (Figure 1).

Objectif et contexte de travail

Les objectifs de ce travail de thèse sont schématisés à la Figure 2.

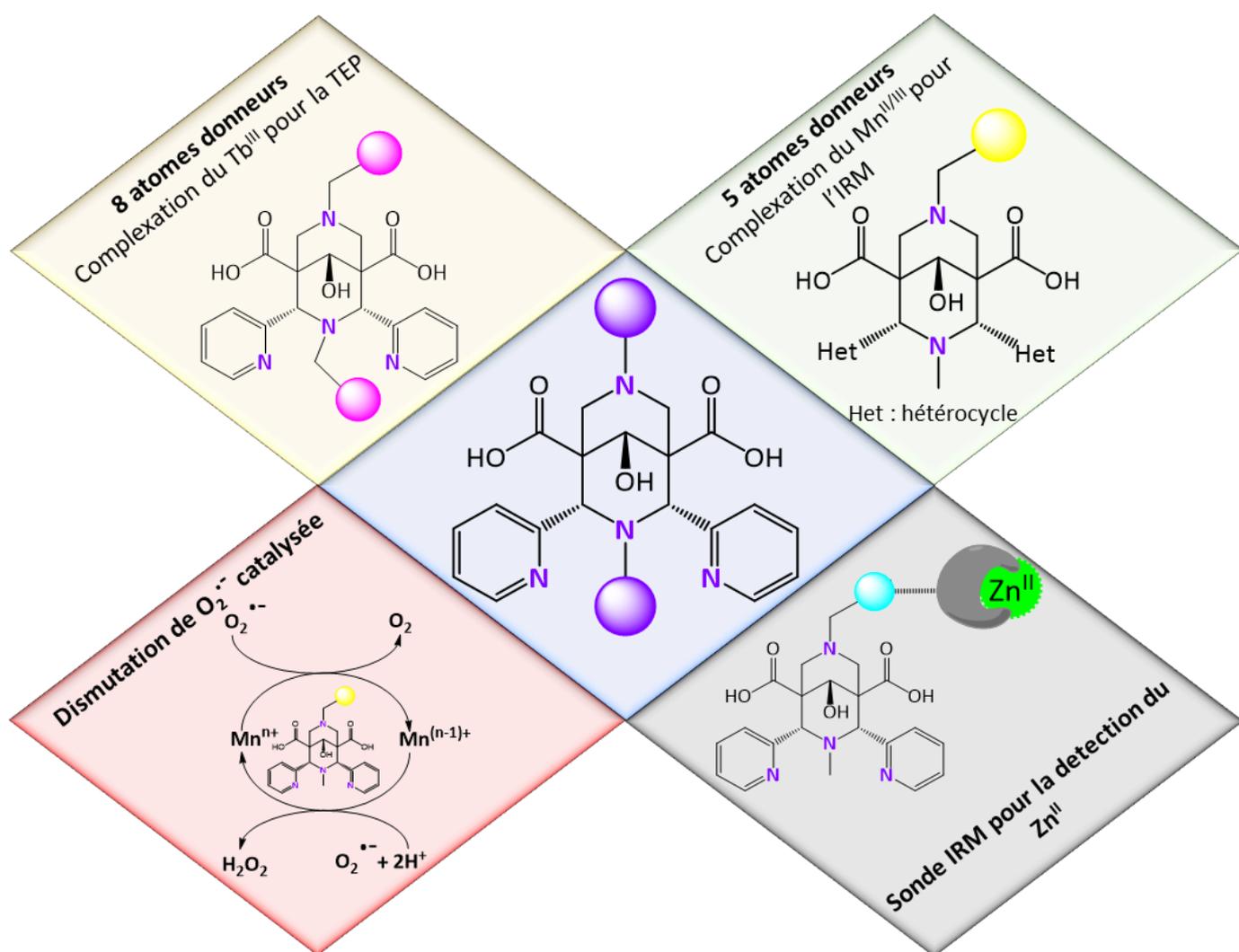


Figure 2 : Schéma général des objectifs de la thèse.

Dans un premier temps, nous étudierons une famille de ligands bispidines octadentates pouvant coordiner le Tb^{III}. La complexation, les études physicochimiques et spectroscopiques seront effectuées sur l'isotope naturel ¹⁵⁹Tb^{III} en vue d'une transposition à l'isotope émetteur de β⁺ (¹⁵²Tb) pour une application à la Tomographie par Emission de Positons (TEP). Les études physicochimiques de cette partie ont été réalisées en collaboration avec les Dr Mourad Elhabiri et le Dr Valérie Mazan du LIMA (UMR 7042, Strasbourg).

Le second travail va se concentrer sur la synthèse d'une famille de ligands pentadentates et leurs complexes de manganèse aux degrés d'oxydation +II et +III. Ce travail a pour objectif d'utiliser les propriétés paramagnétiques du manganèse ainsi que ses propriétés redox afin d'explorer son utilisation pour le développement de sondes d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) intelligentes dont les propriétés de relaxation peuvent être corrélées au potentiel redox du milieu. Des études de complexation, de stabilité et d'inertie cinétique des complexes de Mn^{II} ont été menées avec le Mn^{II} en faisant appel aux techniques physicochimiques usuelles comme la potentiométrie, la spectroscopie UV-visible, la relaxométrie et la résonance magnétique nucléaire. Les potentiels d'oxydoréduction des complexes ont été déterminés par voltampérométrie cyclique en collaboration avec le Pr Clotilde Policar et Jean Bouvet (ENS, Paris). A la suite de ces études, les propriétés de coordination du Mn^{III} ont été appréhendées par les différentes techniques. Il faut noter que cette partie est très exploratoire et très peu documentée. Toutefois, des variations de relaxivité ont été observées en milieu oxydant pour certains complexes, laissant présager une utilisation potentielle de ces systèmes comme sondes redox intelligentes.

Le développement de sondes redox pour l'IRM nous a conduit à une autre application. A savoir, catalyser la dismutation du radical superoxyde (en peroxyde d'hydrogène et en oxygène), neutralisant ainsi ses effets oxydatifs à l'origine de diverses pathologies. Les complexes synthétisés ont fait l'objet de tests d'activités catalytiques et de screening d'activités biologiques à grande échelle conduits par le Pr Clotilde Policar et Jean Bouvet (ENS, Paris). Les complexes de manganèse auront donc deux aspects : une utilisation comme sondes pour appréhender le potentiel redox *in vivo* et une utilisation comme catalyseur visant à réduire les effets néfastes du stress oxydatif.

La dernière partie qui sera abordée dans ce manuscrit est le développement du premier modèle de complexe Mn^{II}-bispidine pour la détection du Zn^{II} par IRM. Il s'agit encore une fois d'un agent de contraste « intelligent » dont la relaxivité est modulée cette fois par la concentration en Zn^{II}. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec les Dr Célia Bonnet et Dr Daouda Ndiaye au CBM (UPR 4301, Orléans).



Chapitre 1 : Les complexes de bispidines, leurs propriétés et leurs applications

I. La famille des bispidines

Une bispidine (3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane) est un composé diazabicyclique formé de deux cycles pipéridiniques. Ces dérivés sont naturellement présents dans les plantes telles que les *alcaloïdes* ([7a-9a]-Spartéine) ou encore les *fabaceae* ([+]-lupanine), qui ont été largement exploitées pour leurs propriétés médicales. La recherche associée à ce type de motif a émergé avec la découverte des propriétés antiarythmiques de la spartéine par Stenhouse en 1851.^[1] En 1935, le motif bispidine a été synthétisé en laboratoire via la condensation de Mannich (Figure 3).^[2]

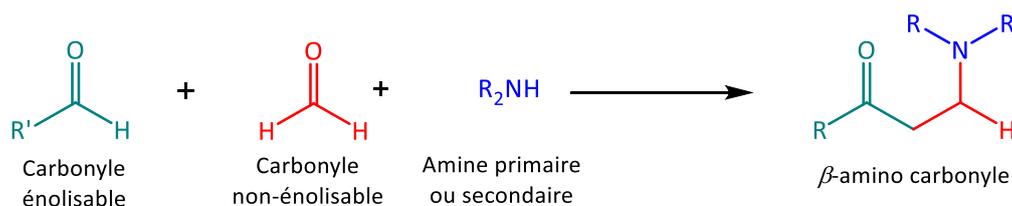


Figure 3 : Réaction générale de Mannich.

Ceci a ouvert la possibilité d'étudier différents analogues pour leur activité biologique.^[3] Les années 90 ont joué un rôle crucial afin de populariser les bispidines notamment avec l'introduction de substituants aryle en position C2 et C4 (plus de 150 articles et 1050 citations sur les dérivés 1,4-disubstitués). On peut citer comme exemple, Holzgrabe *et coll.* qui ont démontré une forte affinité et sélectivité du diméthyle 3,7-méthyl-2,4-di-2-pyridyl-3,7-diazabicyclo[3.3.1] nonan-9-one-1,5-dicarboxylate (Figure 4) pour les κ -opioïdes.^[4] Dans la même période, les travaux de Comba *et coll.* ont démontré que la rigidité du squelette 2,4-disubstitué est idéale pour la coordination de la plupart des métaux de transition.^[5] La particularité de ce motif est de permettre une denticité variable; en effet, celle-ci peut être adaptée afin d'avoir un nombre d'atomes coordinants allant de 5 à 9 ce qui offre un très large éventail de coordination de cations métalliques allant du bloc s aux éléments f du tableau périodique.

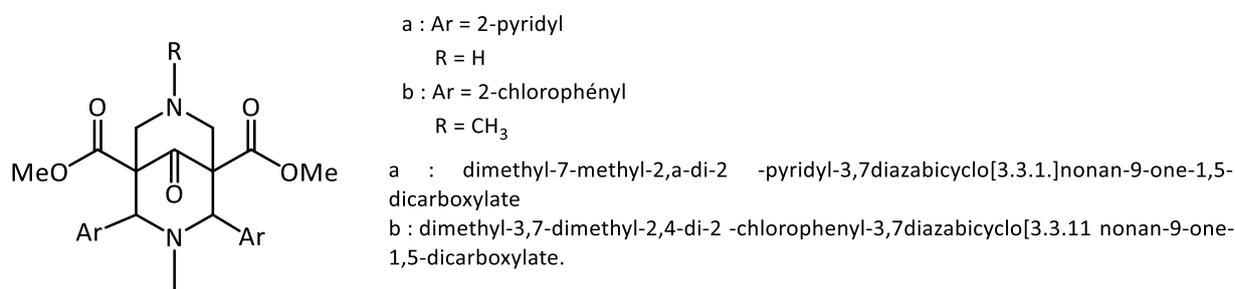


Figure 4 : Structure et nom systématique de bispidones issues de la littérature.

A. Synthèse, stéréochimie et réactivité des dérivés 2,4-disubstitués.

i. Synthèse et stéréochimie

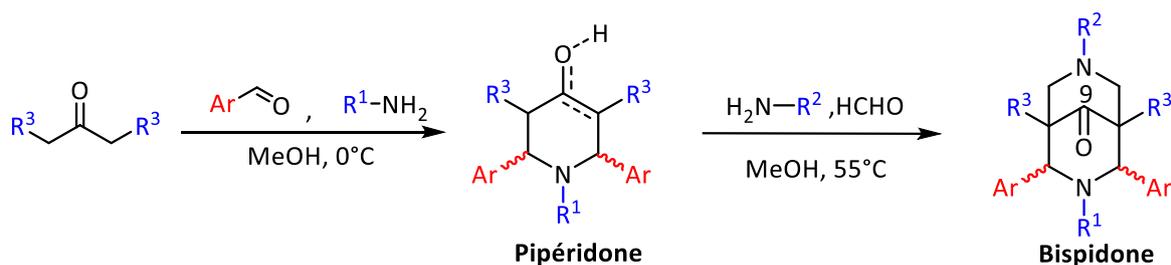


Figure 5 : Voie de synthèse générale des bispidones. R¹, R², R³ : Alkyle, Aryle ; Ar : Hétérocycle.

Les dérivés 2,4-disubstitués peuvent être obtenus en deux étapes avec des difficultés plus ou moins différentes selon les substituants du motif. Chacune des étapes consiste en une réaction de Mannich (Figure 5).^[2] Historiquement, ces dérivés bispidones ont été développés par Haller ^[6] et Caujolle ^[7] dans les années 70. Par la suite, des améliorations ont été apportées par Holzgrabe à la fin des années 90.^[8] La première étape consiste en la formation de l'intermédiaire pipéridone par la double condensation de Mannich de deux équivalents d'aldéhyde et d'une amine primaire. De manière similaire, ce premier intermédiaire est ensuite mis en présence d'une seconde amine primaire en présence de deux équivalents de formaldéhyde pour conduire à la bispidone souhaitée (Figure 5). Il est très important de souligner que les rendements de ces étapes sont très largement dépendants des substituants. Dans la littérature on ressent des rendements allant de 5 à 91 % pour les deux étapes.^[9] Cette grande variabilité vient principalement du fait que les bispidones, ainsi que leurs intermédiaires pipéridones, sont principalement isolés par cristallisation du fait de problèmes de stabilité et/ou d'isomérisation empêchant leur purification par les techniques chromatographiques classiques.

Le précurseur pipéridone peut exister sous différents isomères de conformation, à savoir *cis* et *trans*. De plus, dans des solvants protiques (méthanol, éthanol) un équilibre céto-énolique se met en place ce qui conduit au total à quatre isomères possibles : *cis*-énol, *trans*-énol, *cis*-cétone et *trans*-cétone. Les proportions de ces isomères sont dépendantes des substituants mais aussi du temps d'exposition du produit dans le solvant (Figure 6).

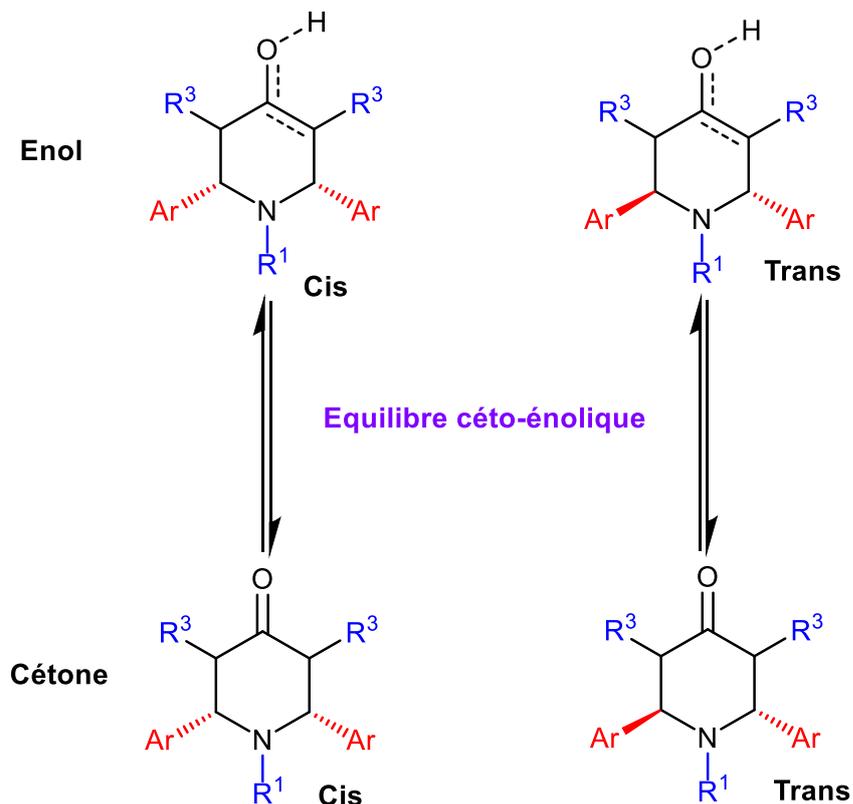


Figure 6 : Potentiels isomères de l'intermédiaire pipéridone.

La seconde étape, conduisant à la formation de la bispidone, est classiquement effectuée à partir d'un mélange d'isomères sans purification. Celle-ci peut être alors isolée sous 3 conformations : chaise-chaise (cc), chaise-bateau (cb) et bateau-chaise (bc). La conformation bateau-bateau (bb) ne peut énergétiquement pas exister (Figure 7). Les configurations *cis* et *trans* des substituants aryles sont également rencontrées mais seule la configuration *cis* et la conformation chaise-chaise sont d'intérêt pour notre étude. Il est à noter que plusieurs études de la littérature insinuent que la stéréochimie de la (ou des) bispidone(s) finale(s) n'est pas directement liée au mélange d'isomère utilisé pour la pipéridone intermédiaire, suggérant ainsi une possible interconversion *cis trans* au cours de la deuxième cyclisation.^[10] Dans l'optique d'améliorer la sélectivité de la réaction en faveur de l'isomère chaise-chaise avec une orientation des substituants en C2 et C4 en *cis*, différents essais ont été conduits à partir de précurseurs purifiés, isolés sous des formes *cis* ou *trans*. Ce point est abordé au Chapitre 3.

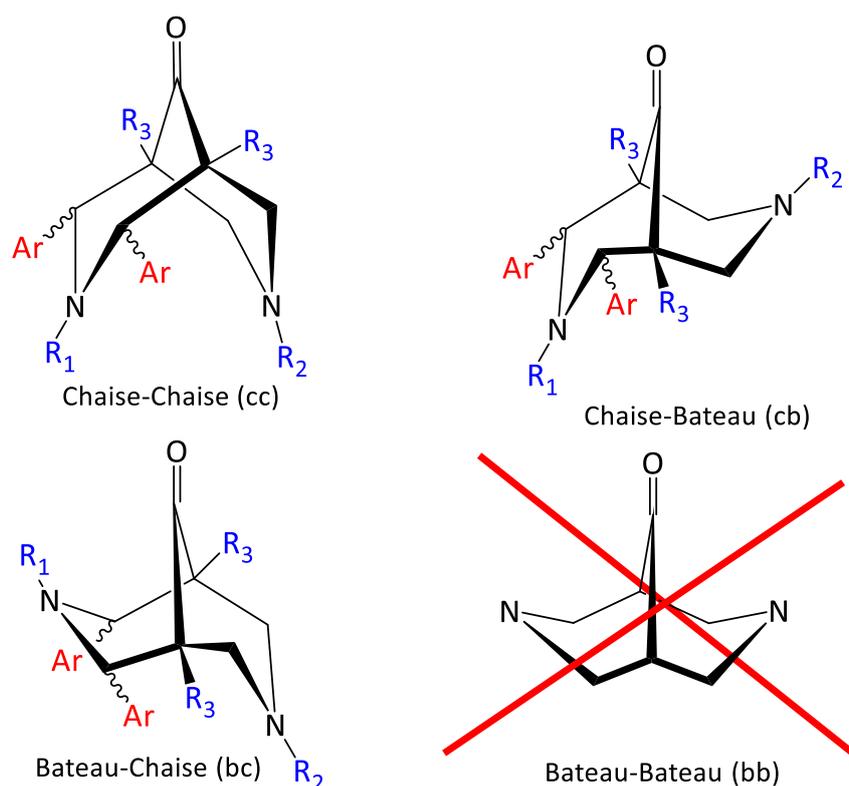


Figure 7 : Illustration des différentes conformations possible de la bispidone.

ii. Réactivité et fonctionnalisation

La fonctionnalisation du squelette bispidine a été ensuite étendue au-delà des positions C2 et C4 et en particulier aux positions N3 et N7, ce qui a permis d'ouvrir un champ d'application très large via la complexation de divers métaux. Ces substituants peuvent être introduits par synthèse directe ou par une substitution nucléophile des amines secondaires en N3 et N7.^[11–14]

Selon les applications visées, la fonction cétone en C9 peut être conservée mais il est préférable de la réduire afin d'éviter une réaction rétro-Mannich, en particulier si le produit a des risques d'exposition à des milieux acides. La première fois que cette réduction a été publiée remonte aux années 1970.^[15] En 2009, cette réaction a été améliorée afin de la rendre plus stéréosélective. Juran *et coll.* ont développé une voie utilisant le borohydrure de sodium dans un mélange eau et dioxane.^[16] On peut s'attendre à ce que des interactions intramoléculaires se produisent entre NaBH₄ et les cycles pyridyles en positions 2 ou 4 qui dirigent l'addition de l'hydrure sur cette face, conduisant majoritairement à la formation de l'épimère *anti*, comme le montre la structure cristalline aux rayons X de la bispidol obtenue. A l'inverse, l'utilisation de méthanol à basse température au lieu d'eau à température ambiante a entraîné une stéréosélectivité opposée avec la formation de l'épimère *syn*, comme l'ont rapporté Roux *et al.* dans une étude conduite au laboratoire. Du fait de la bonne répétabilité et des rendements satisfaisants, nous privilégierons en première intention ce protocole de synthèse.^[17] Cet alcool peut également être utilisé comme un site fonctionnalisé pour l'introduction d'une nouvelle propriété, comme une fonction de ciblage biologique, ce qui est primordial pour une

utilisation en TEP. Par exemple, l'alcool a été fonctionnalisé par la formation de carbonates ou de carbamates comme une plateforme polyvalente pour la réaction ultérieure de dérivés aminés, tels que des acides aminés ou des peptides (Figure 8).^[18] Il a été montré que la formation des éthers d'oxime n'affecte pas la conformation du squelette bicyclique. Ce travail est prometteur pour de nouveaux bioconjugués car la formation de liaisons oxime peut se produire dans des conditions douces.

Le couplage peptidique des bispidoles présentant des fonctions carboxylates ou amines primaires est également possible dans des conditions douces et biocompatibles. Le premier exemple a été rapporté par Stephan et Comba sur les substituants carboxylate en C1 et C5.^[16] Un conjugué bispidine bombésine (un peptide de 14 acides aminés) a alors été obtenu et utilisé pour l'imagerie TEP au ⁶⁴Cu. Par la suite, il a été montré au laboratoire que l'utilisation d'acides aminés, tels qu'une lysine protégée en N7 dans la seconde étape de la formation de la bispidone, permet d'obtenir des bispidines fonctionnalisées et leurs adduits couplés.^[14] Enfin, il faut souligner que la fonctionnalisation de la position C2 et C4 n'est pas seulement effectuée avec des pyridines et leurs dérivés. En effet, Comba *et coll.* ont rapporté l'introduction de cycles de types imidazole.^[19] En particulier, les groupements 1-méthylimidazole en C2 et C4 visés ici ont été utilisés en 2003 pour des applications en catalyse avec du cuivre.^[19]

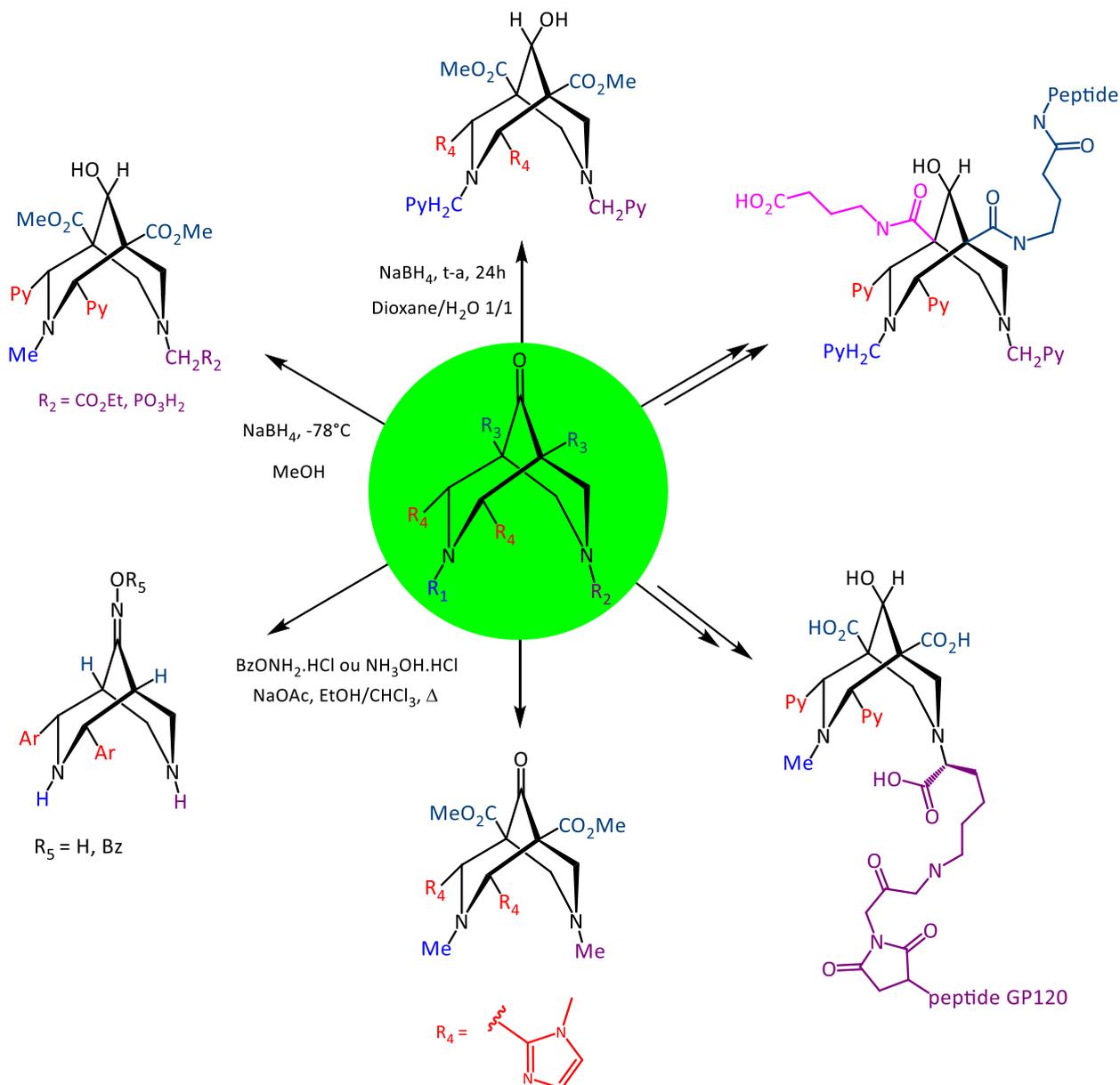


Figure 8 : Différentes stratégies de fonctionnalisation de bispidines

B. Chimie de coordination des bispidines

i. Le Bloc d (métaux de transition)

La chimie de coordination des bispidines avec des métaux de transition a été initiée il y a de cela plus de 55 ans par Haller.^[20] A l'époque, la spectroscopie infrarouge a été un outil indispensable afin de prouver la formation de complexes de coordination entre la bispidone et des métaux tels que le manganèse, le fer, le cobalt ou encore le nickel. Dans cette étude, Haller énonce les deux conditions préalables en termes de stéréochimie, pour utiliser les bispidones comme ligands pour la complexation des métaux :

- ✓ Configuration cis des substituants pyridines en C2 et C4.
- ✓ Conformation chaise/chaise du squelette 3,7-diazabicyclo[3.3.1] nonane (ce qui signifie que les substituants en N3 et N7 sont en position équatoriale).

Les études de Haller ont été reprises trente ans plus tard par Comba, qui a résolu la structure du complexe de cobalt (Figure 9).^[21] $[\text{Co}(\mathbf{B1})(\text{NO}_3)_2]$ présente une géométrie octaédrique déformée dans laquelle deux azotes du cycle 3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane (avec une distance $d(\text{Co} - \text{N}3/7) = 2.137(9) \text{ \AA}$) et deux azote des substituants pyridyles en C2/4 sont coordinées ($d(\text{Co} - \text{Npy}) = 2.09(1) \text{ \AA}$), ainsi qu'un anion nitrate bidenté.^[20] Ce complexe est caractérisé par de courtes distances N–Co en comparaison aux valeurs de la littérature pour les complexes de Co^{II} octaédriques à haut spin et par une forte rigidité du squelette bispidone.

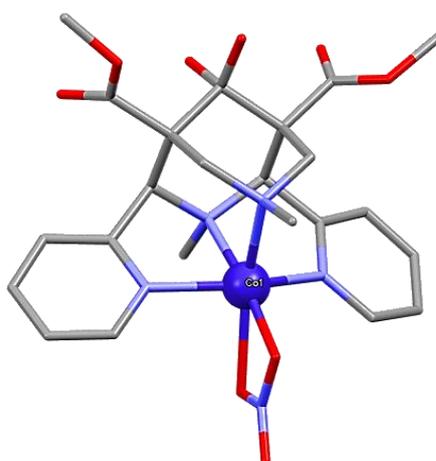


Figure 9 : Structure RX du complexe $[\text{Co}(\mathbf{B1})(\text{NO}_3)_2]$.

Des structures cristallines ont été obtenues plus tard avec $[\text{Mn}(\mathbf{B1})\text{Cl}_2]$,^[22] $[\text{Fe}(\mathbf{B1})\text{X}_2]$ ($\text{X} = \text{MeCN}$)^[23], $[\text{Ni}(\mathbf{B1})(\text{H}_2\text{O})\text{X}_2]$ ($\text{X} = \text{NO}_3^-$, CH_3CO_2^- , CH_3CN).^[24] Cette collection de structures met en évidence la grande similitude entre tous les complexes, malgré leur nombre et géométries de coordination variés. Ceci est dû à la forte rigidité du squelette bicyclique. En particulier, la distance $\text{N}3 \cdots \text{N}7$ étant presque constante ($d(\text{N}3, \text{N}7) = 2.533 \pm 0.025 \text{ \AA}$) sur plusieurs complexes de métaux de transition avec des dérivés tétradentés de **B1** (Figure 10).^[25] La rotation des substituants en 2 et 4 autour des liaisons C–C simples ou des chaînes latérales potentiellement coordinantes en N3 et N7 sont les seuls degrés de liberté de ces ligands bispidine. Cependant, malgré cette forte rigidité, les complexes de bispidine présentent une surface d'énergie plate qui rend accessibles un grand nombre de géométries de coordination (octaédrique *cis*, pyramidale carrée, pentagonale ou même à sept coordinations) en fonction de la denticité du ligand et/ou du nombre de co-ligands.^[5] Du fait de cette particularité, Comba a introduit le terme de sphère de coordination élastique.

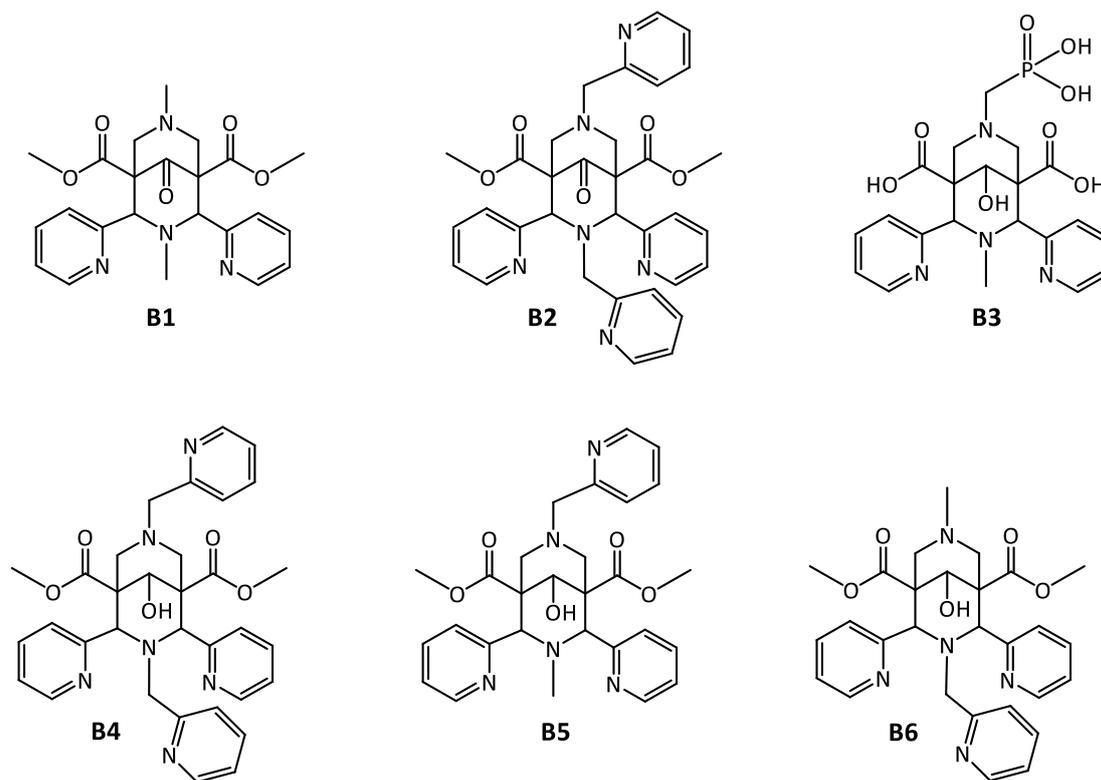
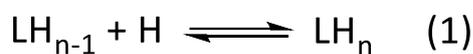


Figure 10 : Ligands bispidine 2,4-disubstitués : bispidones et bispidoles.

Propriétés physico-chimiques : La combinaison de la rigidité du squelette avec une sphère de coordination versatile de ces ligands entraîne des répercussions importantes sur la stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique, la sélectivité pour les ions métalliques, les propriétés redox et la configuration de spin des complexes mononucléaires. Afin de pouvoir corréler les structures des ligands et de leurs complexes avec leurs propriétés physico-chimiques, les propriétés individuelles des ligands (telles que les constantes de protonation définies par les équations (1), (2) et (3)) et des complexes (constantes de stabilité thermodynamique globale, potentiels redox) doivent être déterminées. La méthode utilisée afin de déterminer ces constantes est le titrage potentiométrique. Des exemples de ces constantes pour les ligands représentés à la Figure 10 sont rassemblées dans le Tableau 1.^[26]



$$K_{\text{Hn}} = \frac{[\text{LH}_n]}{[\text{LH}_{n-1}][\text{H}]} \quad (2)$$

$$\text{p}K_{\text{Hn}} = \log K_n^{\text{H}} \quad (3)$$

Tableau 1 : Constantes de protonations de dérivés 2,4-disubstitués : bispidones et bispidoles.

$\log K_{Hn}$	B2 [26]	B3 [17]	B4 [26]	B5 [26]	B6 [26]
$\log K_{H1}$	6,68(8)	11,5(3)	7,58(11)	7,44(8)	8,89(3)
$\log K_{H2}$	4,72(13)	7,2(1)	5,52(13)	3,95(10)	5,21(4)
$\log K_{H3}$	-	3,8(3)	-	1,86(10)	2,50(4)
$\log K_{H4}$	-	2,4(4)	-	-	-
$\log K_{H5}$	-	0,5(1)	-	-	-
$\log K_{H6}$	-	< 0,5	-	-	-

H₂O, $I = 0,1$ M (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$, Les nombres entre parenthèses correspondent aux écarts-types exprimés en tant que dernière décimale significative.

Une comparaison des données de la littérature indique que la première protonation se produit au niveau des amines tertiaires du squelette bispidine dans la gamme $6,6 \leq \log K_{H1} \leq 11,5$ (Tableau 1) et que la valeur de $\log K_{H1}$ suit l'augmentation de la nucléophilie de l'azote en fonction du substituant, dans l'ordre suivant : picolinate < pyridinyle < méthyle < méthane phosphonate. De plus, il est à noter que la réduction de la cétone en C9 entraîne une augmentation de la basicité des amines N3 et N7 comme on peut le voir sur les constantes de protonation de **B2** et **B4**. La protonation du deuxième azote tertiaire n'est que dans certains cas particuliers et il est supposé que les bispidines 2,4-substituées se comportent comme des "éponges à protons" dans lesquelles le proton ammonium est stabilisé à l'intérieur de la cavité par de fortes pseudo-liaisons hydrogène avec N3, N7 et les cycles pyridiniques, conduisant ainsi à une orientation *syn* des pyridines en C2 et C4 à l'intérieur de la cavité.^[9] Ceci est illustré par la structure cristalline du ligand protoné **B3** (Figure 11). Enfin, la position du substituant en N3 ou N7 exerce une forte influence sur les $\log K_H$ de la molécule, le proton à l'intérieur de la cavité étant plus stabilisé lorsqu'un groupe coordinant supplémentaire est introduit en N3 plutôt qu'en N7.

Une autre méthode utilisée pour déterminer les constantes de protonation est basée sur la mesure des spectres d'absorption UV-visible à différents pHs. Des variations spectrales sont observées lorsque le motif bispidine contient des groupements aromatiques en position C2 et C4. Par exemple, la déprotonation de **B3** induit une variation hypochromique de la transition $\pi-\pi^*$ du cycle pyridine à environ 260 nm ($\epsilon(\mathbf{B3}^{4-}) = 16\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$, $\epsilon(\mathbf{H4B3}) = 8000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$, suivie de l'apparition d'une structure hyperfine due à la participation des doublets non liants des azote dans des liaisons hydrogène.^[17]

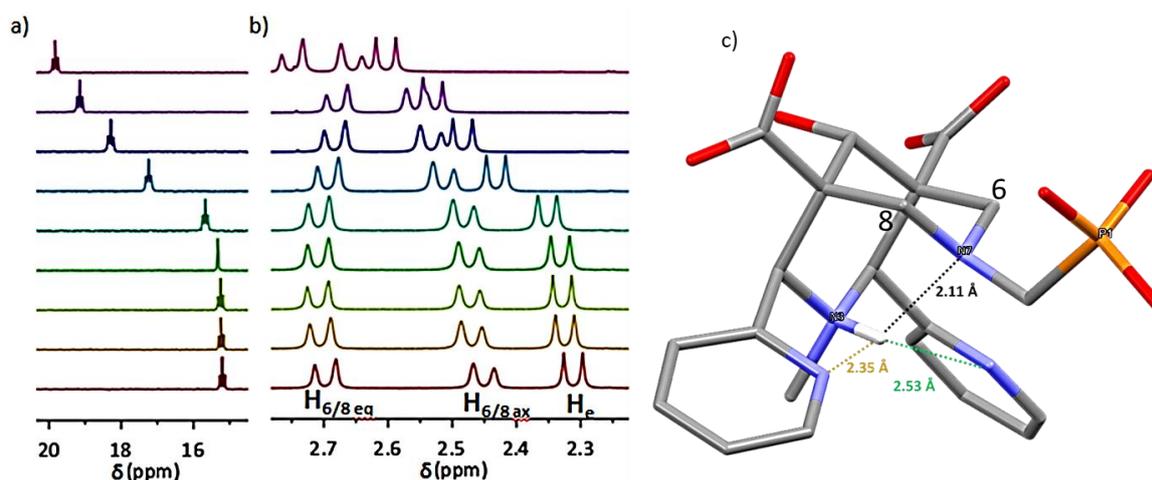


Figure 11 : (a) Spectre RMN ^{31}P de $[\text{ZnB3}]$ en fonction du pD. (b) Zoom spectre RMN ^1H de $[\text{ZnB3}]$ en fonction du pD. (c) Structure cristalline de B3 montrant le comportement d'éponge à proton.

Dans le cas d'ions métalliques diamagnétiques comme le Zn^{II} , leur complexation par les bispidines peut être mise en évidence par la mesure du spectre RMN du ^1H d'un mélange stœchiométrique 1 : 1 de ligand et d'ion métallique. Tandis que les ligands avec une conformation bateau-chaise et une configuration *trans* donnent lieu à des mélanges complexes d'espèces, les conformères chaise-chaise avec une configuration *cis* comme B4 ^[26], ou B3 ^[17] ne donnent qu'une seule espèce.

En pratique et de manière plus générale, les constantes de stabilité thermodynamique globales des complexes de bispidine avec les ions M^{II} (β_{MLH_n}), telles que définies par les équations (4) et (5), sont généralement déterminées par des titrages potentiométriques couplés, dans certains cas, à un titrage spectrophotométrique UV-visible en fonction du pH.



$$\beta_{\text{MLH}_n} = \frac{[\text{MLH}_{n+1}]}{[\text{LH}_n][\text{M}]} \quad (5)$$

Où $n = -1, -2, 0, 1, 2, \dots$, $[\text{H}]$, $[\text{LH}]$, $[\text{M}]$ et $[\text{MLH}]$ sont les concentrations d'équilibre des protons et des autres espèces que ce soit le ligand protoné, ou le complexe protoné.

Afin de comparer différents systèmes, on est amené à utiliser le $\text{pM} = -\log[\text{M}]_{\text{libre}}$. Ce paramètre s'apparente à une constante de stabilité conditionnelle qui permet de quantifier la quantité de métal libre à un pH donné et dans des conditions expérimentales définies (pH, concentration complexe...). Dans notre cas, les études potentiométriques, UV... sont réalisées à une concentration équimolaire en ligand et métal (dans mon cas 1 à 2 mM pour la potentiométrie et 0,05 à 0,8 mM pour l'UV).

Potentiométrie : Le principe de la méthode est de suivre l'évolution de la différence de potentiel d'un électrolyte en fonction d'un volume ajouté de base ou d'acide, en mesurant le potentiel à une électrode de mesure par rapport à une électrode de référence. La valeur du pH en fonction du potentiel est obtenue par l'équation de Nernst (6) :

$$E = E^{\circ} - \frac{2,303RT}{F} \text{pH} \quad (6)$$

Avec : F la constante de Faraday 96485,3 Cmol⁻¹ ; R la constante des gaz parfaits 8,314 J.mol⁻¹K⁻¹ ; T la température en K ; E° paramètre de l'électrode, déterminée via la calibration de l'appareil. L'exploitation des données se fait grâce à l'utilisation du logiciel HyperQuad2008 pour la détermination des constantes de protonation et de stabilité thermodynamique.

Titration spectrophotométrique : Le principe de la méthode est de suivre les variations du spectre d'absorption du ligand/complexe en fonction du pH. En effet, chaque espèce possède un spectre d'absorption propre et se différencie ainsi des autres espèces. En mesurant l'évolution du spectre d'absorption du ligand en fonction du pH, il est possible par une méthode de régression non-linéaire aux moindres carrés, d'attribuer pour chaque forme le spectre qui lui correspond et de connaître les constantes d'équilibre acido-basique des différentes espèces présentes en solution. L'exploitation des données se fait grâce à l'utilisation du logiciel Specfit pour la détermination matricielle du modèle mathématique correspondant aux valeurs expérimentales. Il est important de noter que si les variations spectrales entre deux espèces sont faibles, la détermination de la constante d'équilibre entre ces deux espèces ne sera pas possible. Etant donné la présence, à priori, de quatre équilibres pour le ligand **B3** pour un pH compris entre 2 et 11, il est probable que certaines espèces ne soient pas mis en évidence de manière concluante par cette méthode.

Les valeurs déterminées pour les ligands de la Figure 10 ont été regroupées dans le Tableau 2. Pour les complexes thermodynamiquement les plus stables comme le complexe de Cu^{II} avec le ligand **B3**, un titrage direct n'a pas permis de déterminer la constante de stabilité du complexe car, dans les conditions de l'étude, plus de 95% de complexe était déjà formé à pH 2. La constante a donc été estimée par une expérience de compétition avec l'acide éthylènediaminetetraacétique. Lorsque l'on examine les constantes de stabilité des complexes de Zn^{II}, Co^{II} et Ni^{II}, il apparaît que les valeurs ne suivent que rarement la série d'Irwing-Williams (Cu^{II} > Ni^{II} > Co^{II} > Zn^{II}) et que, pour une majorité de ligands bispidine, la tendance Cu > Zn > Co >> Ni est observée.^[14]

Tableau 2 : Constante de stabilité globale ($\log \beta$) des espèces MLH_n .

		B2 [26]	B3 [17]	B4 [26]	B5 [26]	B6 [26]
Co ^{II}	ML	7,30(6)	11,5(3)	10,60(4)	6,23(5)	13,69(5)
	MLH	-	-	-	-	-
Ni ^{II}	ML	5,02(7)	7,2(1)	7,20(10)	6,10(8)	9,54(6)
	MLH	-	-	-	-	-
Cu ^{II}	ML	16,28(10)	22,5(1)	-	18,31(2)	15,66(3)
	MLH	-	27,4(3)	-	-	-
	MLH ₂	-	30,5(3)	-	-	-
Zn ^{II}	ML	9,18(5)	18,8(1)	12,52(5)	-	13,57(4)
	MLH	-	24,1(2)	-	-	-
	MLH ₂	-	27,2(2)	-	-	-
pCu ^c	-	16,28	-	-	-	19,1

H₂O, I = 0,1 M (KCl), T = 25°C, pM = -log[M_{libre}] avec [M] = 10⁻⁶ M et [L] = 10⁻⁵ M, pH 7,4.

La voltamétrie : La voltampérométrie, ou sous forme contractée voltamétrie, consiste à mesurer la variation du courant en fonction de la différence de potentiel aux bornes d'une cellule électrochimique. A l'état stationnaire, ces courbes appelées voltammogrammes ou vagues voltampérométriques, ont une allure sigmoïde. Dans la plupart des cas, les voltammogrammes sont réalisés avec une solution qui ne contient initialement qu'une des deux espèces l'oxydant ou le réducteur. On rencontre trois cas de figure différent pour un système donné soit il est réversible, quasi-réversible ou irréversible (Figure 12).^[27]

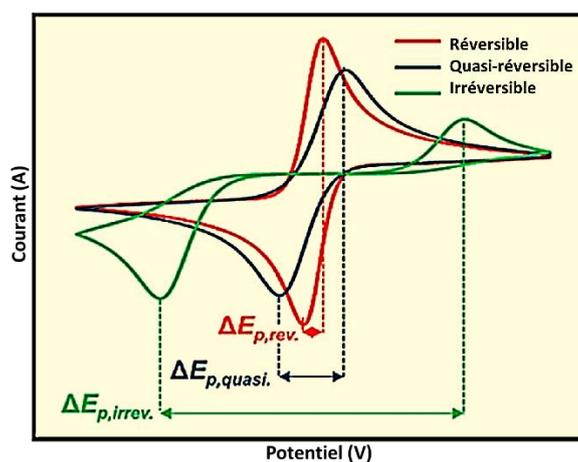


Figure 12 : La réversibilité par voltamétrie cyclique. $\Delta E_{p,rev} = 59/n$ mV, $\Delta E_{p,quasi} \leq 200/n$ mV, $\Delta E_{p,irrev} > 200/n$ mV, où n est le nombre d'électrons transférés dans la réaction redox. Schéma provenant de [27].

iii. Le bloc f (lanthanides, actinides) et l'indium

Dans le but de développer des agents d'imagerie médicale pour la TEP de nouveaux ligands de type bispidine sont en cours de développement pour la complexation de métaux du bloc f tels que le

La^{III}, [28] le Lu^{III}, [28] [11] [29] l'Eu^{III}, [30] le Tb^{III}, [30] le Gd^{III}, [30] l'Yb^{III}, [30] l'Ac^{III} [29] et l'In^{III}. [11] [29] En comparaison avec les ions des métaux de transition, le bloc f et l'indium sont relativement larges, offrant des nombres de coordination typiquement de 7–8 pour les complexes d'In^{III} et 8–9 pour le bloc f. A titre de comparaison, les rayons ioniques effectifs des complexes octacoordinés sont de 92 pm pour l'In^{III}, 98 pm pour le Lu^{III} et 78 pm pour le Fe^{III}. [31] La chimie de coordination classique joue un rôle majeur dans le développement de complexes stables thermodynamiquement et inertes cinétiquement. Différents aspects des ions métalliques, tels que les préférences des atomes donneurs (principe HSAB), [32] la préférence des interactions métal-ligand (série d'Irving-Williams), [33] les facteurs stériques (y compris la préorganisation et la complémentarité des ligands), ainsi que le nombre et la géométrie de coordination, doivent être pris en compte lors de la conception de nouveaux chélateurs. Les azamacrocycles fonctionnalisés avec différentes tailles de cycles et substituants (par exemple, des acides carboxyliques, des acides phosphoniques ou encore picoliniques) sont largement utilisés comme agents chélatants puissants pour différents ions métalliques. [34–37] Le plus petit macrocycle substitué par un acide carboxylique est le **NOTA** (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique acide) (Figure 13). [38] Le **NOTA** en tant que chélateur hexadentate forme des complexes inertes avec des ions métalliques tels que Cu^{II} [39] et Ga^{III}. [40] Le tétraazamacrocycle octadentate **DOTA** (1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique acide) (Figure 13) est bien adapté pour les ions métalliques plus grands et est le ligand commercial de référence pour un certain nombre de radioisotopes tels que ^{86/90}Y^{III}, [41] ¹¹¹In^{III}, [42] ¹⁷⁷Lu^{III} [43] et ²²⁵Ac^{III}. Les complexes formés avec les macrocycles ont généralement une grande stabilité thermodynamique mais une cinétique de formation lente. Par conséquent, ils nécessitent souvent des températures élevées et de longs temps de réaction pour leur formation. Ceci est un inconvénient majeur pour une application en imagerie nucléaire comme la TEP où l'on travaille avec des anticorps sensibles à la chaleur comme vecteur biologique. A l'inverse, les chélateurs acycliques sont capables de marquer quantitativement les ions métalliques radioactifs en quelques minutes à température ambiante mais cela se fait au dépend d'une inertie cinétique beaucoup moins bonne qui est souvent à l'origine du relargage du radioélément dans l'organisme. [44]

Dans ce contexte, les bispidines représentent une famille de ligands émergents qui permettent de concilier une stabilité thermodynamique suffisante, une cinétique de formation rapide et une excellente inertie cinétique. [5] La grande majorité des applications radiopharmaceutiques jusqu'à présent ont été surtout concentrées sur les systèmes de ligands penta- et hexadentates afin de complexer le ^{64/67}Cu^{II}. [13,14,17,45] [12]

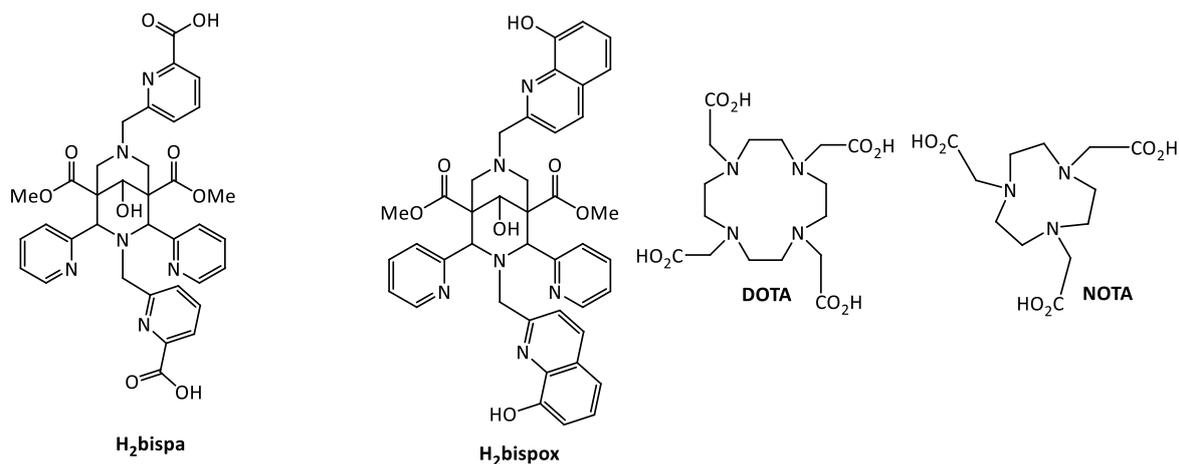


Figure 13 : Structure des ligands discutés.

En 2017, un des premiers systèmes qu'est le **H₂bispa** (Figure 13) a été publié par Comba *et coll.* afin de complexer divers lanthanides (Lu et La) et l'indium.^[28] Le La^{III} a été utilisé ici comme un modèle de l'Ac^{III} qui n'a pas d'isotopes stables^[46] bien qu'il y ait des différences électroniques significatives entre les lanthanides et les actinides.^[47-49] La structure cristallographique de Inbispa a été obtenue (Figure 14). L'ion central est coordonné par huit atomes donneurs (N₆O₂) du ligand doublement déprotoné avec des longueurs de liaison comprises entre 2,200(1) (In-N_{pic3}), 2,486(1) (In-N₃) et 3,1073(11) (In-N_{py}).

A l'issue des bons résultats obtenus avec **H₂bispa**, le ligand **H₂bispoX** a été publié deux ans plus tard pour les mêmes objectifs à savoir, complexer divers lanthanides et l'indium de manière plus efficaces par rapport aux polyazamacrocycles.^[11] Dans cette étude, la synthèse et la caractérisation du ligand bispidine octadentate H₂bispoX et ses complexes avec des radionucléides métalliques d'intérêt médical (¹¹¹In^{III} et ¹⁷⁷Lu^{III}) y sont présentées. ¹¹¹InCl₃ marque le ligand quantitativement à température ambiante (t-a) ([L] = 10⁻⁵ M, t-a, pH 7 en 15 min) et les tests de stabilité dans le sérum humain *in vitro* ont démontré une grande stabilité du complexe [¹¹¹In(bispoX)]⁺ pendant plus de 5 jours. De plus, l'émetteur β ¹⁷⁷Lu marque le ligand à 37°C en 30 min (pH 8). Ces premières investigations révèlent le potentiel du ligand bispidine **H₂bispoX** comme chélateur pour les radiopharmaceutiques à base de ¹¹¹In et ¹⁷⁷Lu.

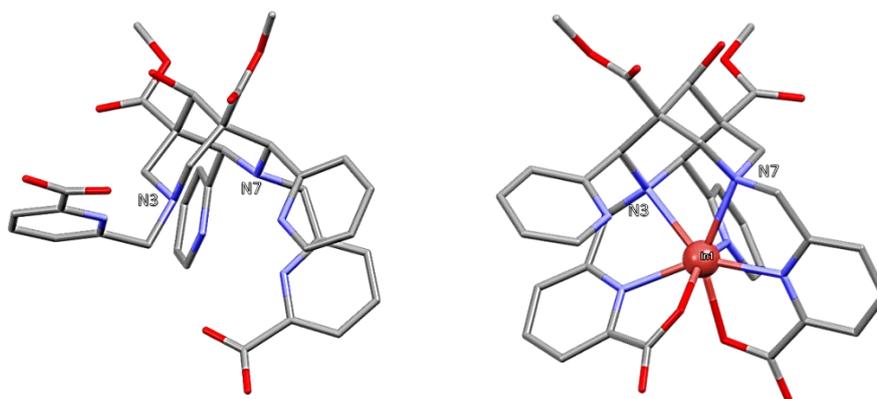


Figure 14 : Structure cristalline de **H₂bispa** (gauche) et **Inbispa** (droite).

Propriétés physico-chimiques : Les constantes de protonation de **H₂bispa** et les complexes associés ont été déterminées par potentiométrie dans l'eau, 25°C avec 0,1 M de KCl.

Tableau 3 : Constantes de protonation de **H₂bispa**.

H₂bispa		La valeur de logK _H la plus élevée de 7,45 est attribuée à la protonation d'une amine tertiaire du squelette bispidine. Une comparaison de différents systèmes bispidines montre que la première protonation se produit généralement dans la gamme de logK _H de 6,68(8) à 9,13(7), ^[26,50,51] où la valeur pour H₂bispa est à l'extrémité inférieure de l'échelle. La déprotonation de protons à l'amine tertiaire est probablement suivie par la protonation des carboxylates des deux groupements acide picoliniques (logK _H de 5,62 et 3,31). Des constantes de protonation supplémentaires du ligand subsistent mais ne sont pas mesurables dans la plage de pHs étudiée (Tableau 3). Les constantes de stabilité des complexes de H₂bispa avec le Lu ^{III} et le La ^{III} ont été mesurées par titrage potentiométrique direct (Tableau 4). La stabilité du complexe d'In ^{III} étant trop élevée, celle-ci a été estimée via une compétition avec de l'EDTA (éthylènediaminetétracétate, H₄EDTA) comme discuté précédemment.
logK _{H1}	7,45(1)	
logK _{H2}	5,62(2)	
logK _{H3}	3,30(3)	

Tableau 4 : Constantes de stabilité des complexes de **H₂bispa** dans H₂O ; 25°C ; 0,1 M KCl.

	In^{III}	Lu^{III}	La^{III}
logK _{ML}	24,29(6)	8,51(3)	11,42(6)
logK _{MHL}	-	4,09(22)	4,07(13)
logK _{MH2L}	-	3,75(11)	-
logK _{MH-1L}	-	-	0,50(4)
pM	25	9,1	12,0

pM calculé pour 10 μM de ligand et 1 μM de métal à pH 7,4 et 25°C.

II. Application dans l'imagerie médicale

Outre la formation de complexes de coordination stable thermodynamiquement et inerte cinétiquement pour assurer la sécurité du patient, il est nécessaire de prendre en compte certains paramètres (présence de molécule d'eau, cinétique de formation...) propres à chacune des techniques d'imagerie. Nous nous intéresserons ici à la TEP et l'IRM.

A. La Tomographie par Émission de Positons (TEP)

i. Principe

La tomographie par émission de positons est une technologie basée sur l'utilisation de traceurs marqués par des radioisotopes émetteurs de positons pour imager des récepteurs biologiques ou suivre des processus biochimiques *in vivo* (Figure 15). Ces traceurs sont des biomolécules de type anticorps ou fragments d'anticorps, peptides ou des petites molécules (comme le glucose ou les neurotransmetteurs) qui ont la particularité d'avoir une affinité spécifique avec un récepteur surexprimé à la surface des cellules cibles ou avec un transporteur biologique. Ces cellules peuvent être des cellules pathologiques (tumeurs dans le cas d'un cancer) ou des cellules saines dont on veut mesurer le métabolisme (exemple du système nerveux central). L'intérêt croissant pour cette technologie se manifeste par le nombre croissant d'articles liés à la TEP publiés dans les revues médicales (1990-2020, plus de 390k revues), par le nombre croissant d'exams cliniques (en France 1,2k/million d'habitant d'après un bulletin officiel 2022 du ministère de la santé) et a pour conséquence un besoin croissant en nouveaux ligands pour chélater les ions métalliques radioactifs dans des conditions douces et avec une cinétique de complexation rapide afin d'obtenir des conditions de radiomarquage compatibles avec l'utilisation de matériel biologique.

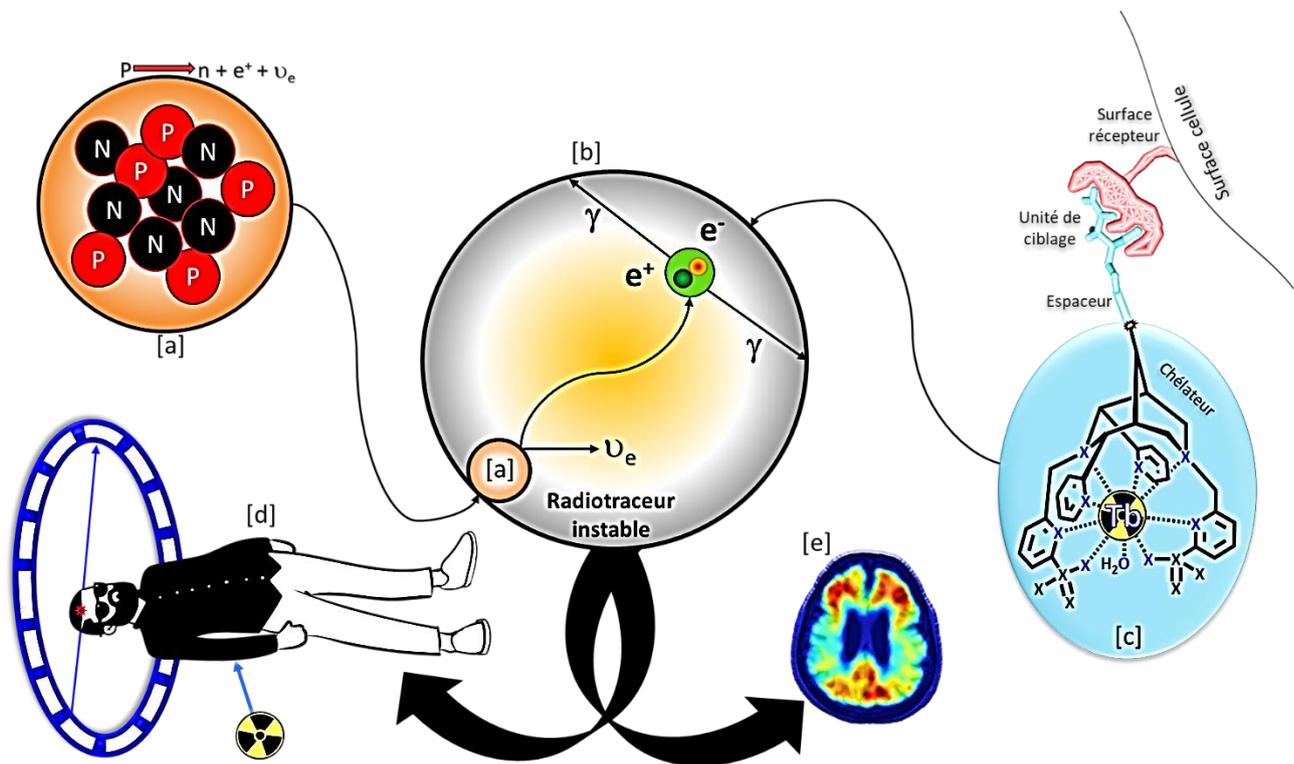


Figure 15 : Schéma du principe de la TEP, incluant (a) la désintégration d'un isotope émetteur de positons déficient en neutrons, (b) la détection dans la coïncidence des photons γ d'annihilation, (c) le radioélément coordonné au sein d'une bispidine vectorisable, (d) l'injection du complexe radioactif et la détection d'une paire de photons d'annihilation par coïncidence par une γ -caméra TEP à anneaux multiples, (e) reconstruction du corps cartographiant l'utilisation du complexe radioactif.

Physique de base de la désintégration du positon et du rayonnement d'annihilation : Le positon est l'antiparticule de l'électron, ayant la même masse mais une charge positive, nommé e^+ ou β^+ . Tous les émetteurs de positons ont une propriété en commun, c'est-à-dire que leurs noyaux sont riches en protons. Dans le but de se stabiliser en se débarrassant des protons en excès et en gagnant des neutrons à la place, ils ont deux options : l'émission de positons ou la capture d'électrons (CE), qui sont tous deux des processus de désintégration isobare (c'est-à-dire que le nombre de masse reste le même dans les noyaux parent et fils). Bien que la première soit plus répandue dans les noyaux de faible poids atomique (par exemple, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F), le mode de désintégration prédominant dans les noyaux de poids atomique plus élevé est la CE.^[52-54] Il se produit une transmutation des éléments avec le noyau fils ayant le même nombre de masse mais un numéro atomique réduit de 1. Ceci s'accompagne de l'émission d'un neutrino (une particule sans masse ni charge), qui s'échappe sans interagir dans le matériel environnant. Le positon étant très interactif (en raison de sa faible masse et de sa charge positive) parcourt une courte distance et est ralenti par les processus de diffusion dans les nuages d'électrons des matériaux environnants (c'est-à-dire le tissu du patient). Lorsque le positon traverse le matériel environnant, il y a une perte continue de son énergie jusqu'à ce qu'il se combine avec un électron pour soit s'annihiler complètement et émettre une paire de photons de 511 keV, soit former une particule très éphémère appelée positonium. Le positonium est instable, et en une fraction de seconde, il se désintègre également en une paire de photons de 511 keV. Dans les deux cas, la paire

de photons de 511 keV émise, appelée photons d'annihilation, a une énergie constante équivalente à la masse au repos combinée d'un électron et d'un positon, et ils sont émis dans des directions opposées à environ 180° l'un de l'autre.^[53]

ii. L'immuno-TEP

L'immuno-TEP est une technique d'imagerie médicale qui utilise des radioéléments conjugués à des biomolécules spécifiques des marqueurs caractéristiques d'une pathologie : les antigènes. Lorsque la biomolécule est un anticorps, on parle d'immuno-conjugués. L'objectif est de visualiser et de quantifier l'expression de ces antigènes dans les tissus sains et pathologiques, notamment les tumeurs (Figure 16). L'immuno-TEP peut ainsi aider à prédire et à évaluer l'efficacité des traitements.^[55]

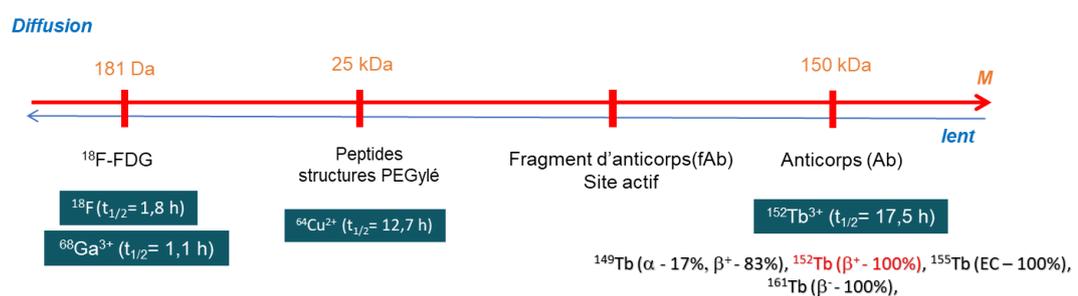


Figure 16 : Corrélation entre le temps de demi-vie radioactif des radioéléments et le temps de circulation de la biomolécule utilisée pour le ciblage (ou vecteur biologique).

L'immuno-TEP utilise des isotopes radioactifs qui possèdent un temps de demi-vie radioactif suffisamment long (comme le ⁶⁴Cu et le ⁸⁹Zr^[56]) pour marquer l'édifice, qui peut être un anticorps, des fragments d'anticorps ou des petites protéines synthétiques. Il s'agit encore d'une technique en développement, qui fait l'objet de nombreuses recherches et essais cliniques pour optimiser ses performances et ses applications.^[57] Les anticorps monoclonaux radiomarqués (mAb) ont montré un potentiel considérable pour le diagnostic et le traitement du cancer.^[58-60] Afin d'être adapté à l'immuno-TEP, un émetteur de positons doit remplir plusieurs exigences. Sa demi-vie radioactive doit être compatible avec le temps nécessaire pour qu'un mAb atteigne des rapports optimaux tumeur/non-tumeur. Concernant les mAbs intacts, actuellement le format le plus utilisé pour cibler les tumeurs solides, ce temps est généralement de 2 à 4 jours.^[61] Parmi la très grande variété de radioéléments disponibles (Tableau 5^[62,63]) nous avons focalisés nos travaux sur le Tb^{III}. En effet, de par ses 4 isotopes radioactifs, le Tb^{III} possède une polyvalence unique en tant que "couteau suisse" pour l'imagerie médicale, le théranostique et la radiothérapie.^[64] Ses propriétés de fluorescence peuvent également être utilisées dans des phases de développement pré-cliniques.

Tableau 5 : Quelques radioisotopes utilisés en médecine (bleu) et en recherche (blanc), CE : capture électronique, IT : transition isomérique.

Radioisotopes	Numéro atomique	Demi-vie	Mode de désintégration	Application
¹⁸ F	9	109,8 min	β ⁺ (97 %)	TEP
⁴⁴ Sc	21	3,9 h	β ⁺ (94 %), CE (6 %)	TEP
⁴⁷ Sc	21	80,2 h	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie
⁶⁴ Cu	29	12,7 h	β ⁺ (18 %), β ⁻ (43 %)	TEP
⁶⁷ Cu	29	61,8 h	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie
⁶⁷ Ga	31	3,3 j	EC (100 %)	TEMP
⁶⁸ Ga	31	68 min	β ⁺ (89 %), CE (11 %)	TEP
⁸⁶ Y	39	14,7 h	β ⁺ (33 %), CE (66 %)	TEP
⁹⁰ Y	39	64,1 h	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie
⁸⁹ Zr	40	78,5 h	β ⁺ (23 %), CE (77 %)	TEP
^{94m} Tc	43	52 min	β ⁺ (72 %), CE (28 %)	TEP
^{99m} Tc	43	6 h	IT (100 %)	TEMP
¹¹¹ In	49	2,8 j	CE (100 %)	TEMP
¹²³ I	53	13,2 h	CE (100 %)	TEP
¹²⁴ I	53	4,2 j	β ⁺ (23 %), CE (77 %)	TEP
¹³¹ I	53	8,02 j	β ⁻ (95 %)	Radiothérapie
¹⁴⁹ Tb	65	4,1 h	β ⁺ (83 %), α (17 %)	Radiothérapie
¹⁵² Tb	65	17,5 h	β ⁺ (100 %)	TEP
¹⁵⁵ Tb	65	5,3 j	EC (100 %)	TEMP
¹⁶¹ Tb	65	7,6 j	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie
¹⁶⁶ Ho	67	26,7 h	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie
¹⁷⁷ Lu	71	6,7 j	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie
¹⁸⁸ Re	75	17 h	β ⁻ (100 %)	Radiothérapie

iii. Chélate bifonctionnel à base de ^{64}Cu

Lorsque l'immuno-TEP fait appel à des radiotraceurs métalliques, le couplage du radiotraceur sur le vecteur biologique se fait grâce à l'utilisation de ligands (ou chélateurs) bifonctionnels (CBFs). Les CBFs possèdent à la fois une fonction de chélation et un groupement permettant la vectorisation de l'édifice à l'antigène. Une grande variété de structures macrocycliques de type cyclam (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane ou cyclen (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane),^[65] de systèmes pontés, en particulier par des ponts éthyléniques comme le CB-TE2A (11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tetraaza-bicyclo[6.6.2]hexadecane),^[66] de cages de type sarcophagine (DiamSar^[67]), de dérivés de la bispidine (3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane)^[9] et de nouveaux chélateurs linéaires^[68] sont en cours de développement afin d'améliorer la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique des complexes du ^{64}Cu . Le site de chélation hautement préorganisé des dérivés de la bispidine leur confère de bonnes propriétés de chélation en termes de stabilité, de sélectivité et de cinétique de complexation pour être utilisés comme chélateur bifonctionnel pour l'imagerie TEP.^[51] En 2017, Roux *et al.* ont rapporté une bispidine très originale, avec un motif lysine comme substituant L_{lys} . Plusieurs analogues de celui-ci ont été étudiés à savoir : (i) un acide aminé L-lysine (L_{lys}), (ii) une biotine à utiliser pour des stratégies de ciblage utilisant des anticorps conjugués à la streptavidine (L_{biot}) et (iii) une fonction réactive maléimide ($L_{\text{malé}}$) pour le couplage covalent de peptides ou d'anticorps via leurs résidus cystéine (Figure 17).^[14]

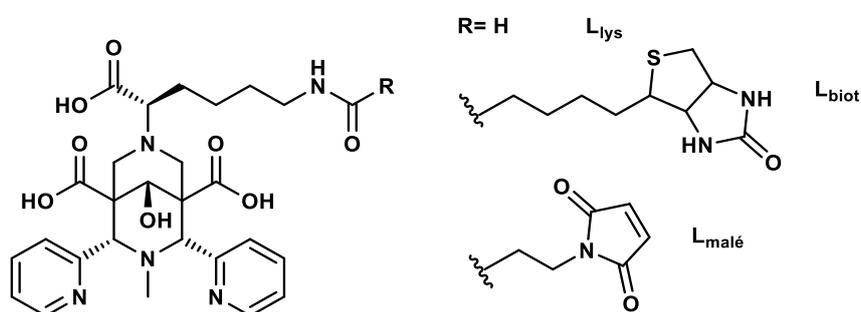


Figure 17 : Structure des bispidoles développées par Roux *et al.* en vue d'un ciblage biologique.

Le peptide ayant été utilisé est le GP120 (Figure 18). Il s'agit d'une protéine de surface du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui se fixe au récepteur des cellules lymphoïdes hôtes. Cette interaction induit un réarrangement structural créant un site de liaison à haute affinité pour un corécepteur chimio-attractant (récepteur ou cellule induisant une attraction chimique). Le peptide GP120 joue un rôle important dans l'entrée du VIH dans les cellules et peut également avoir des effets neurotoxiques.^[69,70]

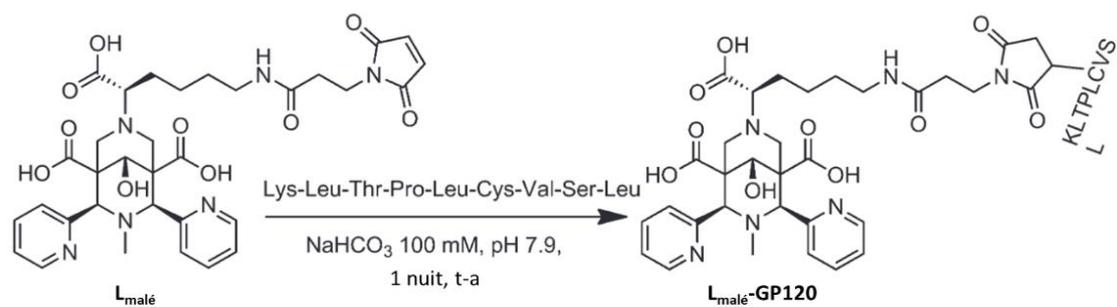


Figure 18 : Couplage de la bispidine avec le peptide GP120.

B. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

i. Principe

L'IRM repose sur les propriétés magnétiques des atomes d'hydrogène ($I = \frac{1}{2}$) et l'utilisation d'un champ magnétique puissant et de radiofréquences pour produire des images. Les protons sont très adaptés pour cette technique car très abondants (99,98%) et possèdent un rapport gyromagnétique important ; ils sont présents dans l'eau qui représente environ plus de 70% du corps humain. Lorsque soumis à un champ magnétique B_0 , Les spins nucléaires des protons s'orientent de manière parallèle ou antiparallèle à celui-ci. D'après l'équation de Boltzmann, la majorité des protons sont orientés de façon parallèle. Cette orientation des moments de spin nucléaires des protons peut être décrite comme une aimantation macroscopique parallèle à B_0 , autrement appelée magnétisation globale M (Figure 19).^[71]

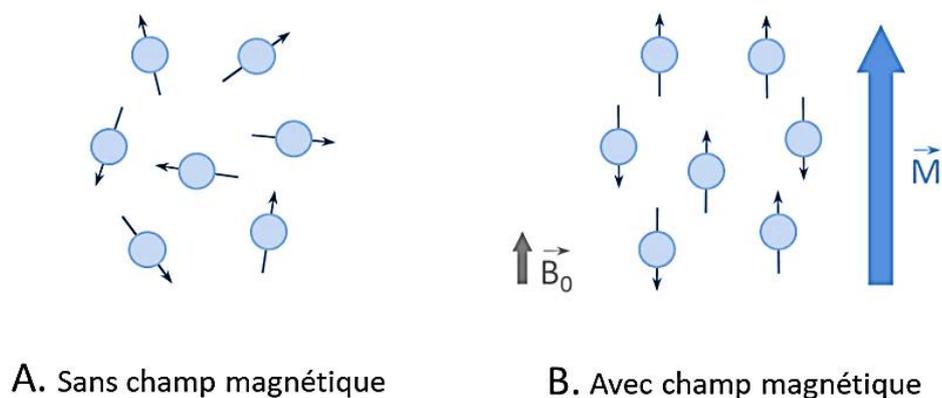


Figure 19 : Comportement des noyaux d'hydrogène en l'absence de champ magnétique (A) et en présence de d'un champ magnétique puissant B_0 (B).

Quand une onde de radiofréquence B_1 est émise perpendiculairement à B_0 , selon l'axe x, elle fait basculer temporairement l'aimantation globale M de l'axe z au plan Oxy (Figure 20). En absence de l'onde de radiofréquence B_1 , l'aimantation globale M reprend progressivement sa position d'équilibre parallèle à B_0 . Ce phénomène de retour à l'équilibre correspond à la relaxation, il suit une loi exponentielle. Ainsi, le temps de relaxation longitudinal T_1 est spécifique du rétablissement de la magnétisation selon l'axe z et le temps de relaxation transversal T_2 est spécifique du rétablissement

selon le plan Oxy. Durant la relaxation, le nucléide libère de l'énergie sous forme d'onde de radiofréquence. Ces ondes de radiofréquence sont utilisées pour produire l'image 3D des tissus par résonance magnétique, après traitement numérique.

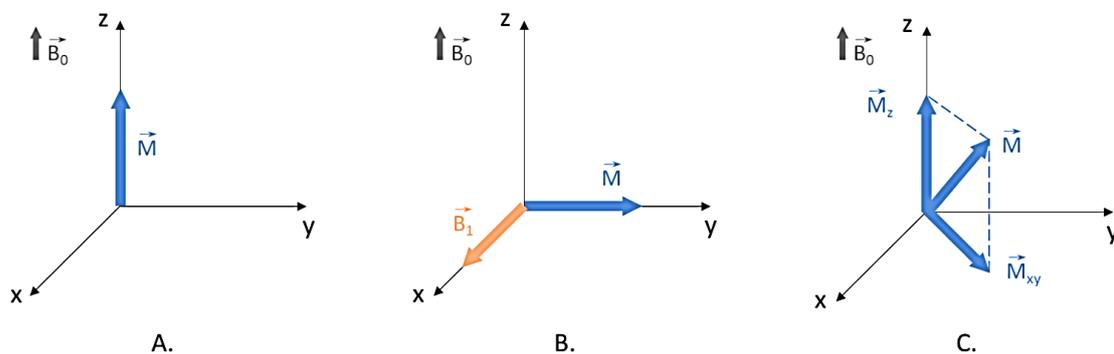


Figure 20 : (A) Magnétisation globale, (B) bascule de la magnétisation dans le plan Oxy sous l'impulsion de B_1 , (C) retour à l'équilibre.

Durant la relaxation, le nucléide libère de l'énergie sous forme d'onde radiofréquence. Ce signal d'onde radiofréquence est capté par l'appareil pour produire l'image 3D des tissus par résonance magnétique, après traitement numérique.

Les constantes de temps sont obtenues selon les équations (7) et (8) :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (7)$$

où :

- $M_z(t)$ est la magnétisation longitudinale à un temps donné t .
- M_0 est la magnétisation longitudinale à l'équilibre, c'est-à-dire lorsque les protons sont alignés avec B_0 à $t = 0$.
- T_1 est le temps de relaxation longitudinale.

$$M_{xy}(t) = M_0(e^{-\frac{t}{T_2}}) \quad (8)$$

où :

- $M_{xy}(t)$ est la magnétisation transversale à un temps donné t .
- M_0 est la magnétisation transversale à l'équilibre, c'est-à-dire lorsque les protons sont en phase dans le plan transversal à $t = 0$.
- T_2 est le temps de relaxation transversale.

Le diagnostic IRM consiste à mesurer les temps de relaxation T_1 et T_2 pour obtenir un contraste relatif à la teneur en eau des tissus et pondéré par ces deux paramètres. Cette technique est employée pour visualiser les anomalies des tissus qui altèrent leur teneur en eau (tumeurs, inflammations, nécroses, ...). Toutefois dans certains cas, il peut être judicieux, voire nécessaire, de renforcer le contraste et donc la sensibilité de cette méthode d'imagerie. Pour cela, la relaxation peut être accrue en utilisant des agents de contraste amplifiant le rapport signal sur bruit. Ces agents de contraste ont

pour objectif d'accélérer la relaxation des protons des molécules d'eau. De manière générale, leur efficacité est définie par leur valeur de la relaxivité. Plus elle est importante, plus l'agent de contraste est priori efficace. Ainsi, en modifiant la nature des agents de contraste, il est possible d'ajuster plusieurs paramètres pour améliorer le signal. En moyenne, 40% des examens IRM requièrent l'utilisation d'agents de contraste, que l'on peut répartir en deux grandes familles : les agents de contraste de type T_1 (à contraste "positif") et les agents de contraste de type T_2 (à contraste "négatif").^[72,73] La famille des agents de contraste de type T_1 est principalement composée de complexes de Gd^{III} et de Mn^{II} , qui ont respectivement 7 et 5 électrons non appariés. Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques sont employées en tant qu'agents T_2 sous le nom USPIO (Ultra-small Superparamagnetic Iron Oxide < 50 nm) ou SPIO (Superparamagnetic Iron Oxide > 50 nm) selon leurs tailles.^[74-76] Ici, nous allons nous focaliser que sur les agents de contraste de type T_1 .

ii. Théorie de la relaxivité

La relaxivité longitudinale (r_1) est la grandeur qui mesure la capacité des agents de contraste à accroître la vitesse de relaxation longitudinale des protons. Elle est définie comme l'accroissement paramagnétique de la vitesse de relaxation longitudinale, rapporté à la concentration de l'agent de contraste, et varie en fonction de certains paramètres comme la température ou le champ magnétique.

$$r_1 = \frac{\Delta\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{1,0}}\right)}{[M]} \text{ avec } [M] : \text{mmol.L}^{-1} \text{ et } r_1 : \text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$$

Durant le développement d'un agent de contraste, divers paramètres sont à prendre en compte afin d'avoir le composé le plus optimal. Ces paramètres sont relatifs à la relaxivité dite de "sphère interne" apportée par les protons de(s) molécule(s) d'eau coordonnée(s) au centre métallique. Ils sont décrits par la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM).^[77] Les lecteurs sont invités à retrouver les équations dans l'annexe (partie III) et les théories dans les revues correspondantes.^[72,78,79]

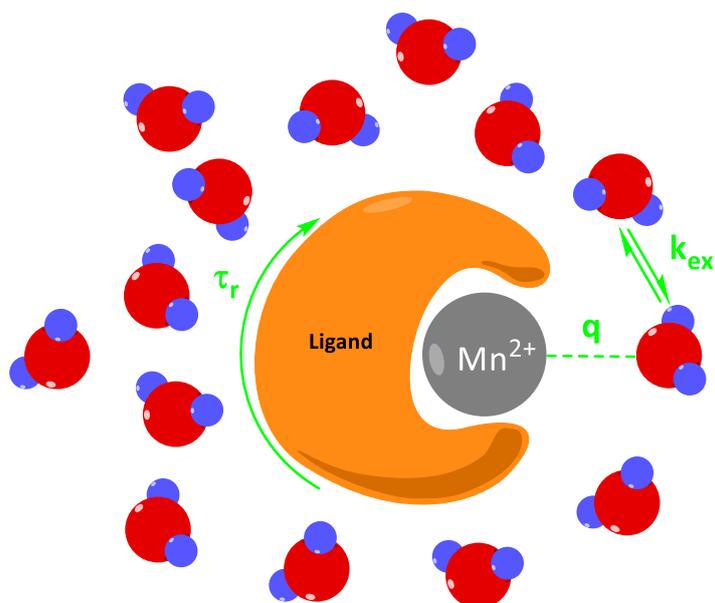


Figure 21 : Représentation schématique des différents paramètres optimisables pour augmenter la relaxivité (r_1) soit q , k_{ex} et τ_r .

- ❖ Le nombre d'hydratation du complexe (q) correspond au nombre de molécules d'eau directement liées au cation métallique. Ce nombre varie selon la structure du complexe, plus il est important et plus la relaxivité l'est aussi. Toutefois, augmenter le nombre d'hydratation suppose de remplacer un site donneur du ligand par une molécule d'eau et entraîne généralement la formation de complexes moins stables et moins inertes. Il est donc essentiel de trouver le bon compromis entre le nombre d'hydratation, la stabilité thermodynamique et l'inertie cinétique du complexe formé.
- ❖ L'effet paramagnétique ne peut se transmettre que si la (les) molécule(s) d'eau de première sphère de coordination s'échange(nt) avec une molécule d'eau voisine. Plus cette vitesse d'échange (k_{ex}) est importante, plus le temps de résidence moyen des molécules d'eau (τ_M) est faible et plus l'accélération de la vitesse de relaxation sera effective.
- ❖ Le temps de corrélation rotationnel (τ_r) est le temps moyen que met une molécule à effectuer une rotation. Plus ce temps est élevé et plus la relaxivité l'est aussi. Ceci nécessite de concevoir des agents de contraste à plus hauts poids moléculaires et suffisamment rigides pour limiter les rotations intramoléculaires.

La relaxivité dépend aussi des interactions entre les espèces paramagnétiques et les molécules d'eau environnantes. Le mécanisme de relaxation de la sphère interne (Inner Sphere - IS) repose sur les interactions entre le spin électronique du métal paramagnétique et le spin nucléaire des molécules d'eau qui lui sont directement liées, tandis que le mécanisme de la sphère externe (Outer Sphere - OS) repose sur des interactions dipolaires entre le spin électronique de l'ion paramagnétique et le spin nucléaire des molécules d'eau environnantes (non liées).^[76] Dans certains cas, un mécanisme de

seconde sphère (SS) qui implique un cortège de molécules d'eau ayant des interactions privilégiées, de type liaison-H avec le complexe paramagnétique, est aussi impliqué.

iii. Bispidine-Mn pour l'IRM

Les complexes de Gd^{III} sont utilisés depuis plus de 35 ans dans des millions d'examens humains et sont considérés comme parmi les médicaments de diagnostic les plus sûrs. Cependant, l'émergence récente de la fibrose systémique néphrogénique et son lien causal avec l'exposition au Gd^{III} , ainsi que les preuves d'accumulation de gadolinium dans le cerveau et les os ont alerté la communauté médicale.^[80] En effet, ces dernières années ont vu un intérêt croissant pour les complexes de Mn^{II} comme agents potentiels d'IRM.^[81-84] De plus, le manganèse possède un radioisotope émetteur de positons, le ^{52}Mn , avec des propriétés de désintégration intéressantes pour la TEP ($t_{1/2} = 5,6$ j, énergie maximale des $\beta^+ = 575$ keV). Étant donné sa faible intensité de désintégration β^+ (29,6 %), une résolution TEP aussi bonne que 1,2 mm pourraient être atteinte, ce qui est particulièrement important dans l'imagerie des petits animaux.^[85] La longue valeur de $t_{1/2}$ rend le ^{52}Mn particulièrement adapté pour l'immuno-TEP. Au total, le Mn^{II} est le seul ion métallique à offrir des capacités de détection à la fois en IRM et en TEP.^[86] Contrairement au gadolinium, les états d'oxydation Mn^{II} et Mn^{III} peuvent exister dans des conditions physiologiques, ce qui permet d'envisager des sondes redox sensible à l'environnement redox.^[87]

En 2020, le complexe de Mn^{II} avec la bispidine L_{lys} (Figure 22) s'est démarqué par une inertie cinétique sans précédent pour un complexe de Mn^{II} .^[88] Depuis, plusieurs autres exemples de complexes de Mn^{II} avec des ligands bispidines ont également montré d'excellentes propriétés. On peut citer quelques un : L_A et L_B ,^[89] L_C ,^[90] L_{carbo} et L_{phosp} ,^[91] ou encore L_{mono} et L_{bis} .^[92]

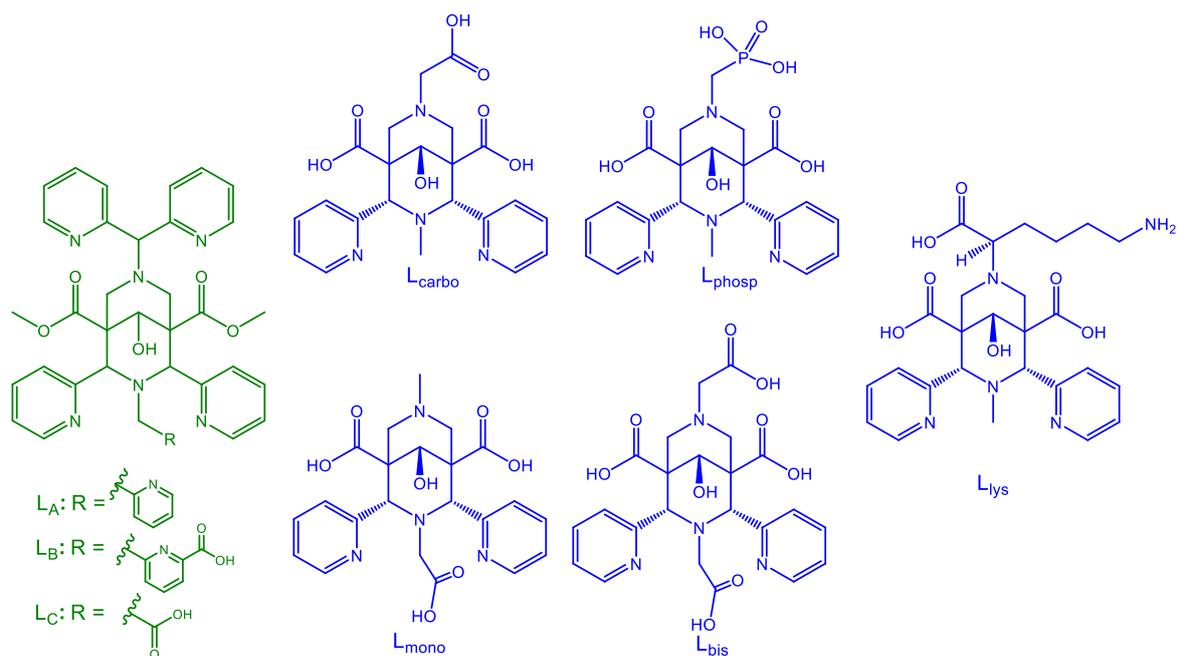


Figure 22 : Les premières familles de bispidines complexant le Mn^{II} . En bleu : Nonat et coll. ; En vert : Comba et coll.

En comparant le complexe $[MnL_{lys}]$ à d'autres analogues de la littérature, cela révèle tout l'intérêt de ces motifs et de l'importance de pousser la recherche d'avantage. Les données de $[MnPyC3A]$ et $[MnPC2A-EA]$ ont été publiées respectivement en 2015^[81] et 2020^[83] (Figure 23).

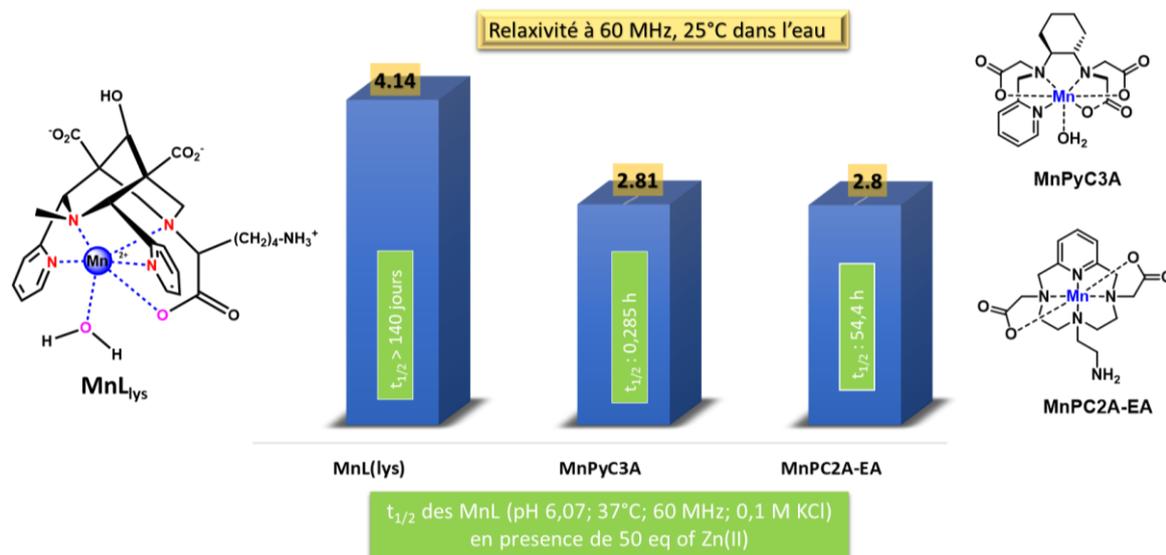


Figure 23 : Comparaison des relaxivités ($mM^{-1}s^{-1}$) et $t_{1/2}$ de MnL_{lys} par rapport à de récents analogues. Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) est obtenu par la transmétallation du Mn^{II} par le Zn^{II} en présence de 50 eq. de Zn^{II} en milieu acide (pH =6).

III. Introduction des propriétés redox du $^{55}Mn^{II/III}$ dans l'IRM

Récemment, de grands efforts ont été faits pour développer et utiliser des agents de contraste IRM dits "bio-activables". Ce sont des sondes moléculaires qui réagissent aux changements de leur micro-environnement en modifiant le signal IRM qu'elles produisent. Par conséquent, elles peuvent être utilisées pour signaler les changements de divers paramètres biologiques tels que la présence de cibles protéiques,^[93] des changements de pH,^[94] l'activité redox,^[95] l'hypoxie,^[96] les flux ioniques,^[97] les neurotransmetteurs,^[98] la nécrose,^[99] et l'activité enzymatique.^[100] Ici nous allons nous intéresser aux sondes redox, plus précisément les sondes redox IRM à base de Manganèse.

A. L'environnement redox dans le vivant

i. Potentiels redox dans un organisme vivant

L'environnement redox dans un fluide biologique, un organe, une cellule ou un tissu est maintenu par un certain nombre de couples redox présents qui sont liés entre eux. Parmi eux, le glutathion (GSH) est le principal tampon redox thiol-disulfure de la cellule avec une concentration moyenne de 1 à 11 mM dans le cytosol, bien plus élevée que celle de la plupart des autres composés redox actifs.^[101] Par conséquent, l'état redox du couple glutathion disulfure-glutathion (GSSG/2GSH) peut servir d'indicateur de l'environnement redox intracellulaire. Les changements du potentiel de réduction à demi-cellule (Ehc) du couple GSSG/2GSH semblent être corrélés avec le statut biologique

de la cellule : prolifération Ehc ~ -484 mV vs SCE (saturated calomel electrode) , différenciation Ehc ~ -444 mV vs SCE ou encore apoptose ~ -414 mV vs SCE.^[87] L'espace extracellulaire est généralement plus oxydé que le cytosol. Dans les extraits cellulaires, les concentrations totales de glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) présents peuvent être évaluées par HPLC ou des tests de fluorescence.^[102,103]

Plusieurs système rédox dans le vivant dépendent du pH. Par conséquent, la concentration en ion H^+ doit être connue (Figure 24).^[101]

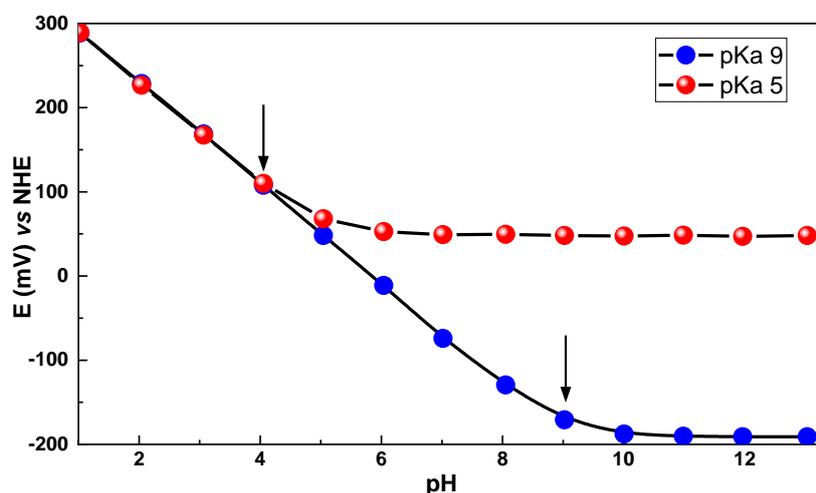


Figure 24 : Le potentiel de réduction des couples redox peut dépendre du pH. L'article montre deux exemples de la variation du potentiel de réduction de deux couples redox différents en fonction du pH. Les deux exemples ont des pKa très différents, mais les potentiels à demi-cellule à pH 0 sont les mêmes. NHE : normal hydrogen electrode.

ii. Déséquilibre redox

Le déséquilibre redox est une caractéristique commune de nombreuses maladies, comme les cancers, l'ischémie et l'inflammation chronique.^[104,105] La perte des mécanismes tampons qui régulent l'activité redox des tissus peut déclencher des cascades biochimiques nocives pour les composants cellulaires ou tissulaires et aggraver l'évolution de la maladie.^[106,107] Le statut redox anormal des tissus peut avoir plusieurs causes. Par exemple, l'hypoxie tissulaire entraîne un microenvironnement très réducteur et aberrant.^[108,109] Alternativement, la reperfusion après des périodes d'ischémie hypoxique provoque un stress oxydatif par une augmentation incontrôlée de la concentration des espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species - ROS).^[110,111] Des concentrations anormales de cofacteurs redox actifs et une oxydation accidentelle sont associées au déclenchement et à la progression de troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington.^[112-115] Des méthodes pour surveiller les changements d'activité redox *in vivo* pourraient être très utiles pour le diagnostic, le pronostic ou comme moyen de suivre la réponse au traitement. Les différentiels redox entre les tissus malades et sains peuvent aussi être exploités comme un mécanisme pour contrôler la délivrance de médicaments d'une manière spécifiée.^[116,117] Dans ce contexte, il est particulièrement opportun de développer des techniques d'imagerie permettant de communiquer des informations sur l'environnement redox des tissus.^[118-121]

Beaucoup d'efforts ont été consacrés au développement de sondes moléculaires capables d'imager l'activité redox. À ce jour, quelques succès cliniques ont été obtenus en utilisant des sondes TEP qui ciblent les tissus hypoxiques. Ces sondes fonctionnent par réaction et rétention irréversibles dans les tissus privés d'oxygène. A ce jour nous pouvons citer le $^{64}\text{Cu}^{\text{II}}$ -diacétyl-bis(N^4 -méthylthiosemicarbazone) [$^{64}\text{Cu}^{\text{II}}$ ATSM] et le ^{18}F -fluoromisonidazole (^{18}F -MISO).^[122–125] Le mécanisme de captation sélective du ^{18}F -MISO par les cellules hypoxiques a également été étendu aux agents de contraste IRM et aux marqueurs fluorescents^[126,127] avec comme but de développer de nouvelles sondes qui réagissent aux stimuli redox d'une manière rapide et réversible afin de suivre la dynamique redox des tissus en temps réel.^[95,128]

B. Les sondes IRM redox-activées à base de manganèse

La littérature récente a vu de nombreux exemples élégants de sondes redox-activées qui fournissent un contraste IRM en utilisant les couples redox quinolinium/1,4-dihydroquinoline,^[129] $\text{Co}^{\text{II/III}}$,^[130] et TEMPO-H/TEMPO (Figure 25).^[131,132] L'isomérisation déclenchée par le redox spiropyran/merocyanine a également été explorée.^[133]

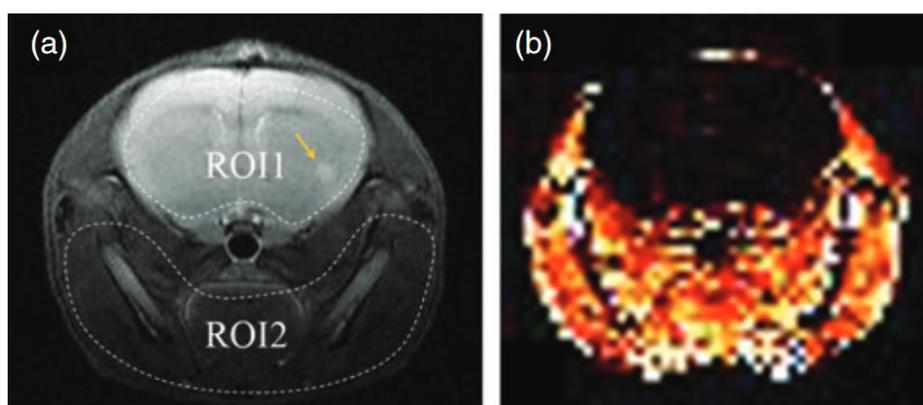


Figure 25 : Souris saines et porteuses de gliomes (stade précoce du développement du cancer). Image IRM typique d'un cerveau de souris porteur d'un gliome au stade précoce du cancer : (a) image IRM d'un cerveau de souris ; (b) extrait du signal IRM amélioré au nitroxyde obtenu 3 minutes après l'injection du nitroxyde.

Le manganèse est un élément biogénique et dans son état d'oxydation +2, il est un agent de relaxation paramagnétique très efficace. Mn^{II} (configuration d^5 – Figure 26), avec des temps de relaxation électronique longitudinale longs (dans la gamme 0,1-1 ns) et un échange d'eau rapide, est une alternative intéressante au Gd^{III} dans les sondes IRM.^[134,135] Le Mn^{III} (configuration d^4 – Figure 26) est également paramagnétique, donnant généralement lieu à des composés à haut spin $S = 2$. Bien que l'échange d'eau soit également rapide,^[136] les temps de relaxation électronique longitudinale sont plus courts (≤ 10 ps), ce qui les rend moins efficaces comme agents de contraste.^[137] Concernant les complexes Mn^{II} à $S = 5/2$, le formalisme classique de Solomon–Bloembergen–Morgan (SBM) décrit bien la relaxation nucléaire, conduisant à une diminution de r_1 à haut champ, pour les complexes Mn^{III} à $S = 2$ l'analyse des vitesses de relaxation des protons de l'eau est beaucoup moins simple.

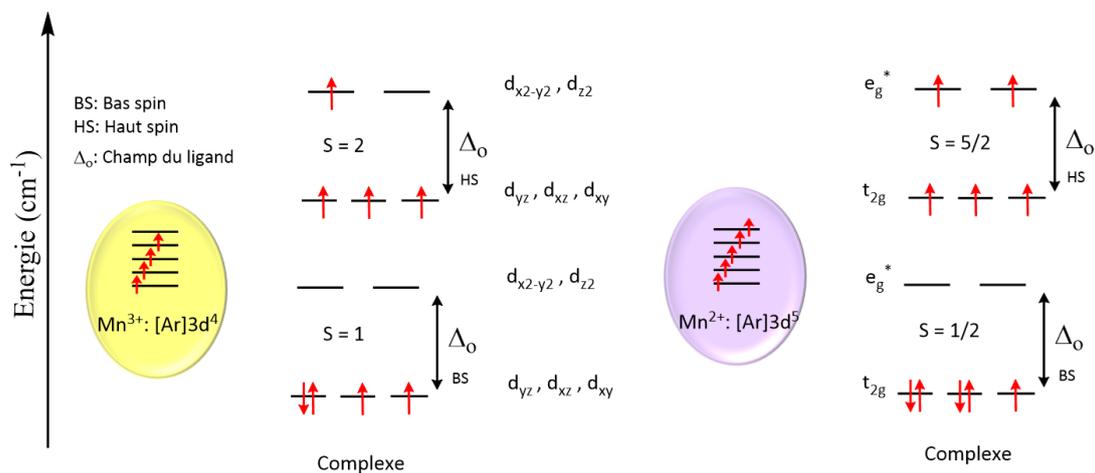


Figure 26 : Diagramme d'énergie schématique des états de spin du $Mn^{II/III}$.

Le premier agent de contraste rédox-actif à base de manganèse $Mn^{II/III}$ a été décrit pour la première fois en 2000. Il s'agit d'un complexe manganèse avec le dérivé 5,10,15,20-tétrakis-(p-sulfonatophényl)porphinate **B7** incorporé dans un hôte β -cyclodextrine (CD) par des interactions supramoléculaires. ^[138] En absence de β -cyclodextrine, les relaxivités de $[Mn^{II}B7]$ et $[Mn^{III}B7]$ (Figure 27) sont équivalentes aux champs moyens à forts (supérieurs à 5 MHz) et la relaxivité de $[Mn^{II}B7]$ est 3.5 fois supérieure à celle de $[Mn^{III}B7]$ aux champs faibles (≤ 5 MHz). Dans une précédente étude, les auteurs avaient montré que la relaxivité de $[Mn^{II}B7]$ était régie par le temps de rotation corrélational du complexe (τ_r), tandis que la relaxivité de $[Mn^{III}B7]$ dépendait principalement du temps de relaxation électronique (τ_s). ^[139] Pour cette raison, la poly- β -CD a été utilisée pour former des adduits supramoléculaires plus rigides avec le complexe MnB7 afin de minimiser les mouvements de rotation. Dans ces conditions, les valeurs de relaxivité mesurées sont de $40,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et $15,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à 0,5 T (pH 7,00 ; 25 °C, respectivement pour $[Mn^{II}B7]$ et $[Mn^{III}B7]$, en présence de poly- β -CD, soit un facteur de 2,6 entre les deux degrés d'oxydation au champ des IRM cliniques usuelles.

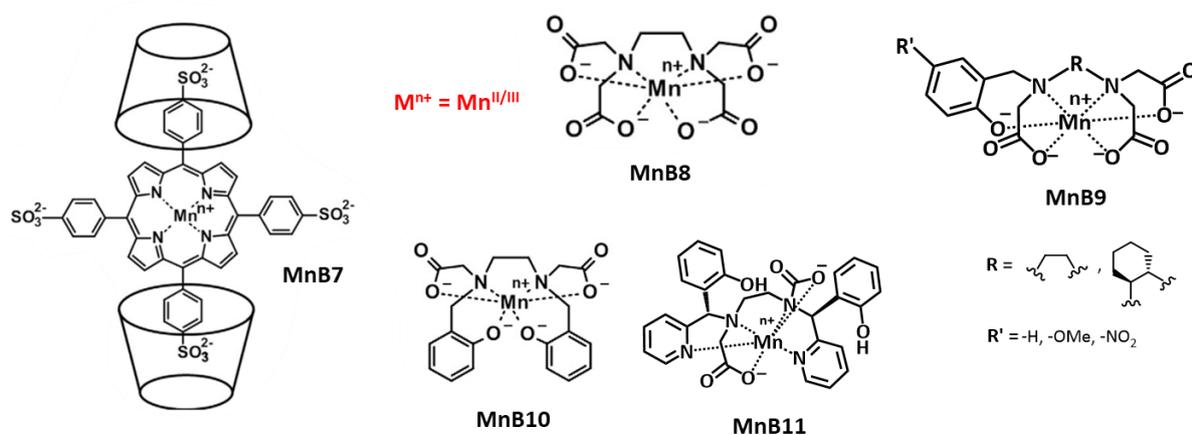


Figure 27 : Agents de contraste $Mn^{II/III}$ redox IRM activés. Les complexes $[MnB7]$ – $[MnB11]$ sont des agents de contraste IRM T_1 redox commutables. H_2O omis pour plus de clarté.

En 2013, Caravan *et coll.* ont publié une toute nouvelle série de complexe de Mn^{II}/Mn^{III} [140] avec une série de ligands à six coordinations **B8–B11** (Figure 27). Dans cette série, **B8** est l'EDTA, tandis que **B9** et **B10** (Figure 27) sont des dérivés de l'EDTA contenant respectivement un et deux groupes donneurs phénolates.^[140] Les complexes **[MnB8]–[MnB10]** sont heptacoordinés avec un site de coordination occupé par une molécule d'eau. Tandis que **B8** favorise l'état d'oxydation Mn^{II} avec $E_{1/2} = 0,389 \text{ V vs SCE}$ (saturated calomel electrode), deux donneurs phénolate de **[MnB10]** favorisent fortement le complexe Mn^{III} avec $E_{1/2} = -0,228 \text{ V vs SCE}$. La substitution d'un seul donneur phénolate a fait de **[MnB9-H]** une sonde IRM redox-active avec $E_{1/2} = 0,112 \text{ V vs SCE}$, qui convient pour les systèmes tampons redox biologiques. Les valeurs de r_1 pour les complexes de manganèse divalents et trivalents étaient respectivement de 2,76 et 1,05 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 4,7 T (TRIS ; pH 7,4 ; 25 °C). Le complexe Mn^{II} de **B9** a été produit en faisant réagir la forme oxydée avec des quantités millimolaires de glutathion (GSH) et caractérisé par relaxométrie et spectroscopie d'absorption UV–visible.^[140]

En 2014, afin d'apporter une meilleure préorganisation à ces systèmes acycliques basés sur l'EDTA, une autre génération a été synthétisée. Il s'agit d'une variation du ligand **[MnB9]** (Figure 27) avec l'espaceur cyclohexylamine.^[136] Les propriétés électroniques du ligand ont aussi été modulées via les substituants R' (-H, -OMe, -NO₂) en position 5 du cycle aromatique, ce qui fait que **B9** se décline en 6 motifs. Sur les six ligands, tous les complexes de Mn^{II} ont pu être isolés ainsi que seulement quatre complexes de Mn^{III}. De cette étude, nous pouvons dégager les conclusions suivantes : Pour ces petits ligands, un changement de r_1 compris entre 2 et 4 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Le changement du squelette ligand de l'éthylènediamine au trans1,2-cyclohexylènediamine ne confère pas l'augmentation de stabilité attendue à pH 7,4. La cinétique d'échange des molécules d'eau du Mn^{II} pour les complexes déprotonés **[ML_x]** est environ 2 ordres de grandeur plus rapide que celle des espèces protonées **[HML_x]** correspondantes. Le potentiel $E_{1/2}$ du couple Mn^{II/III} peut être modulé par des substitutions sur le cycle aromatique du phénol.

En 2016, un nouvel analogue a été publié : **B11**, aussi nommé ligand « **Janus** ». Ce ligand a un substituant "à deux têtes" : une pyridine afin de mieux stabiliser le Mn^{II} et un phénolate pour une meilleure stabilisation du Mn^{III}, dans le but d'échanger les atomes donneurs selon le degré d'oxydation du métal.^[134] Le pari semble avoir été gagné car **Janus** est le seul chélateur capable de stabiliser à la fois Mn^{III} et Mn^{II} dans un milieu physiologique. Il permet une interconversion rapide et réversible entre Mn^{III} (faible r_1) et Mn^{II} (fort r_1) médiée par des processus biochimiques. Le changement de r_1 médié par des processus biochimiques observés avec **[MnB11]** est le plus grand de tous les agents de contraste activables à base de Gd^[141] ou de Mn^[136]. L'oxydation médiée par la peroxydase du **[Mn^{II}B11]** en **[Mn^{III}B11]** fournit un changement de r_1 d'un ordre de grandeur supérieur à celui du capteur à base de Gd sensible à la peroxydase et est réalisée en quelques minutes à des concentrations de peroxydase 1000 fois inférieures.^[141]

Tableau 6 : Récapitulatif des valeurs de r_1 ($mM^{-1}s^{-1}$) à 37°C ; 1,4 T des complexes de $Mn^{2/3}$ et leur $E_{1/2}$ (V vs SCE).

	$r_1(Mn^{II})$	$r_1(Mn^{III})$	$E_{1/2} Mn^{II/III}$	Système redox
[MnB8]	1,76 ^[a]	-	$E^{OX} = 0,389$	Irréversible
[MnB10]	-	-	-0,228	Irréversible
[MnB11]	3,3	0,5	$E^{OX} = 0,666$; $E^{red} = -0,234$	Irréversible
[MnB9-H]	2,8	1,1	0,112	Irréversible
[MnB9-OMe]	3,1	-	0,226	Irréversible
[MnB9-NO ₂]	2,3	0,5	0,316	Irréversible
[Cy-MnB9-H]	3,3	0,4	0,206	Irréversible
[Cy-MnB9-OMe]	3,3	-	0,216	Irréversible
[Cy-MnB9-NO ₂]	2,3	0,5	0,326	Irréversible

[a] : I [NaNO₃] = 0,1 M; 25°C; 128 MHz.

IV. Les complexes de bispidine dans la catalyse

A. Bispidine pour la catalyse

En ce qui concerne le domaine de la catalyse des complexes de bispidines, on retrouve principalement les métaux d pour diverses applications (Figure 28).

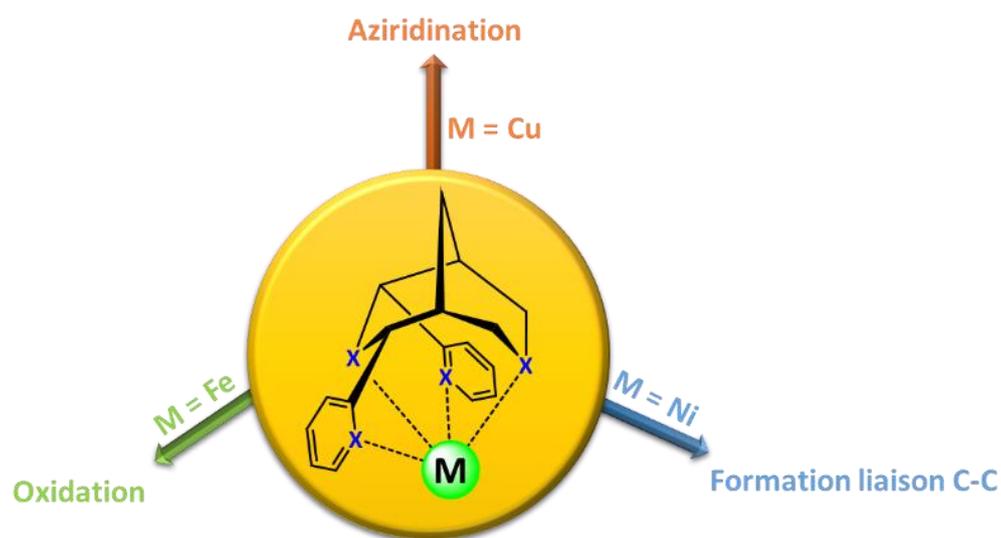


Figure 28 : Applications des complexes de bispidine dans la catalyse ($M = Fe^{II}, Ni^{II}, Cu^{II}$).

i. Catalyseur à base de cuivre

Nous avons vu depuis le début de ce manuscrit que les complexes de bispidines avec le Cu^{II} sont fortement étudiés pour des applications en imagerie TEP. Historiquement, la chimie de

coordination des bispidines avec le cuivre avaient été initiée dès la fin des années 90 avec le Pr Peter Comba, pour des applications en catalyse notamment ^[142] Le ligand **B1** optimisé en 1997 ^[21] et plus particulièrement son complexe de Cu^{II} ont permis de stabiliser le dioxygène, par la formation d'espèces [(CuB1)₂O₂]²⁺.^[142] En 2003, une série de nouveau ligand a été conçue (Figure 29) afin de catalyser la formation de dérivés aziridines (Figure 30).^[19]

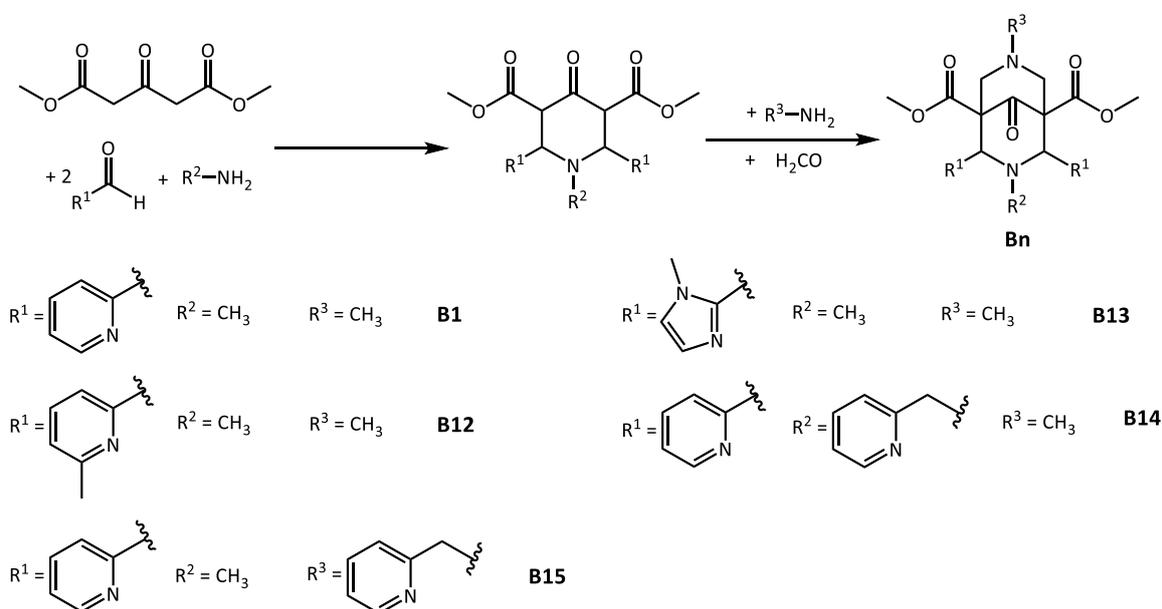


Figure 29 : Série de bispidonnes complexés au cuivre ayant été utilisé comme catalyseur pour la formation de dérivés aziridines.

Les aziridines sont des analogues azotés des époxydes. Ce sont des intermédiaires attractifs en synthèse organique ^[143] et divers produits naturels contenant des aziridines ont des propriétés cytotoxiques. ^[144] La synthèse des aziridines repose généralement sur la réaction de cycloaddition entre un alcène et un nitrene (ou un azoture) en présence d'un catalyseur à base de Cu^I ou Cu^{II} (Figure 30). Il est le plus probable que l'espèce catalytique soit un complexe de Cu^I et dans un cas comme celui-ci où un complexe de Cu^{II} est utilisé, il est supposé que la réduction du cuivre intervienne dans la première étape du cycle catalytique. Depuis leur découverte, les processus catalysés par le cuivre ont été étudiés de manière approfondie et élargis à d'autres métaux de transition comme le fer et le nickel et divers catalyseurs énantiosélectifs ont été développés.

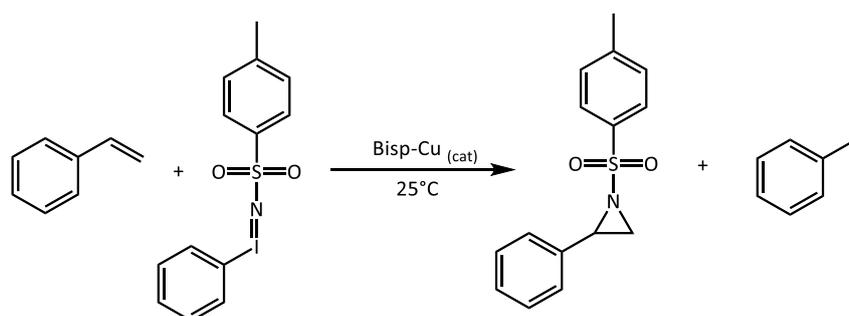


Figure 30 : Réactions catalysée au Cu^{II}-bispidine.

ii. Catalyseur à base de fer

Tout comme les complexes de cuivre, les complexes de bispidines avec les ions fer sont parmi les premiers exemples de complexes avec des bispidines. ^[145] L'oxydation des hydrocarbures catalysée par le fer II a suscité un intérêt considérable au cours des deux dernières décennies. ^[146,147] Des espèces mononucléaires Fe^{III}-peroxyde et hydroperoxyde sont supposées être impliquées dans l'activation biologique de l'oxygène dans des systèmes tels que ceux qui impliquent l'enzyme hème fer cytochrome P450, ^[148] le médicament antitumoral non-hème fer bléomycine, ^[149] et les dioxygénases non-hème Rieske. ^[150] C'est dans ce contexte et dans le but de stabiliser des intermédiaires 'end-on' [Fe^{III}-O₂H], 'side-on' [Fe^{III}(O₂)], et [Fe^{IV}=O] ^[145,147,151] que les complexes de Fe^{II} avec les ligands **B16** et **B17** ont été étudiés (Figure 31).

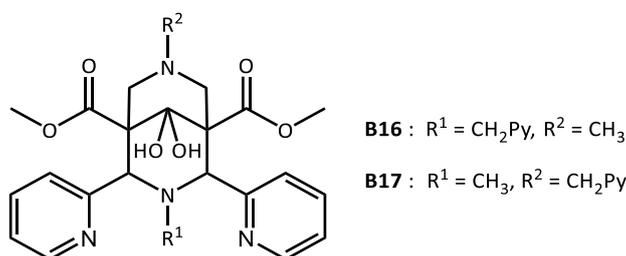


Figure 31 : Bispidine complexant le Fe^{II}.

Les deux complexes de Fe^{II} des ligands **B16** et **B17** ont été caractérisés par des méthodes structurales, spectroscopiques et électrochimiques ^{[152][149] [153]} et utilisés comme catalyseurs dans des réactions d'oxydation des oléfines. ^[154] Sur la base de ces études, ^[154] un mécanisme a été proposé dans lequel un intermédiaire [Fe^{III}-OOH] est formé initialement et subit ensuite une homolyse de la liaison O-O pour former un oxydant [Fe^{IV}=O] et un radical hydroxyle (Figure 32). Ce type de catalyse est effectuée à température ambiante à l'air dans l'acétonitrile avec des taux de conversion allant jusqu'à 90%.

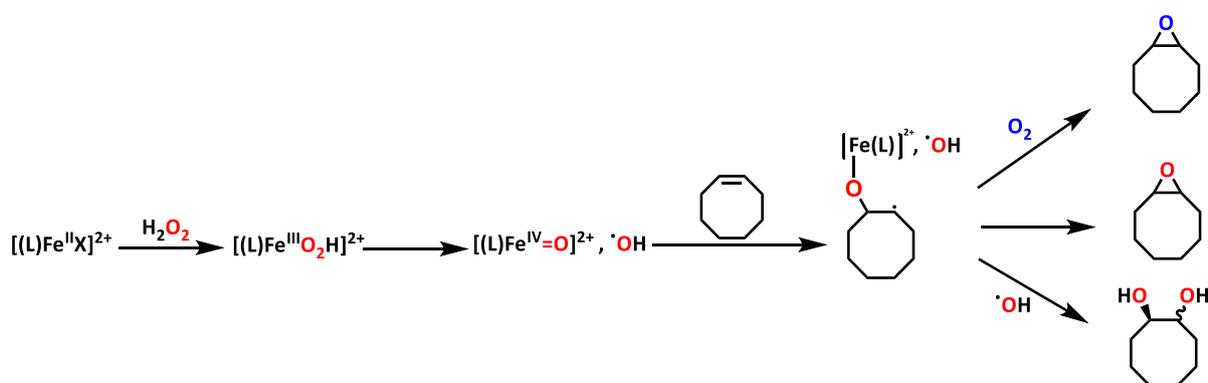


Figure 32 : Mécanisme proposé pour la formation d'époxyde et diol. (X = MeCN, MeOH).

iii. Catalyseur à base de nickel

Les complexes de nickel avec **B1** (Figure 33) ont également été investigués. Ces systèmes ont été initialement utilisés afin de comparer le mode de coordination de divers métaux de transition. Mais c'est vraiment en 2012 où des premières applications des complexes de nickel ont été publiées.^[155]

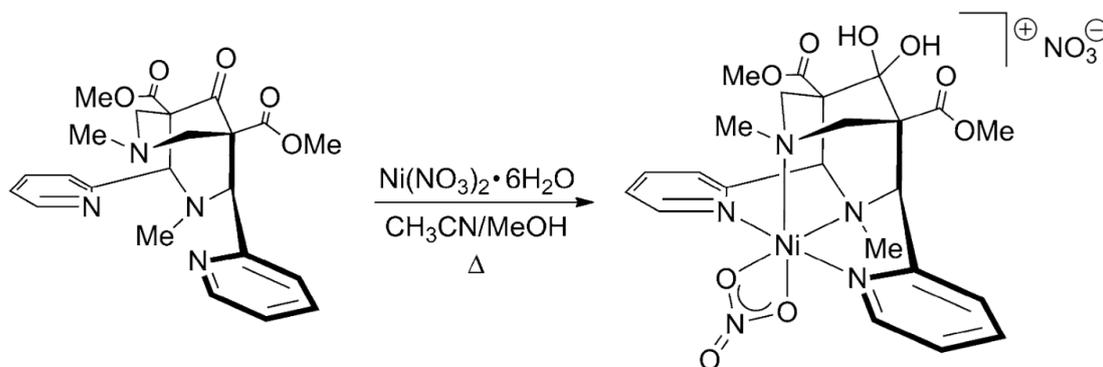


Figure 33 : Voie de synthèse du complexe $[Ni(\mathbf{B1})(NO_3)]NO_3$.

Ce complexe a été utilisé comme catalyseur pour la formation de liaisons carbone-carbone entre un substrat halogénure d'aryle (C_{sp^2} électrophile) et un organozincique (C_{sp^3} nucléophile) afin de former $C(sp^2) - C(sp^3)$.^[156,157] Les taux de conversion varient de 1 à 99% selon l'analogue.

B. Manganèse pour la catalyse de la superoxyde dismutase (SOD)

i. Introduction

Les enzymes de type Superoxyde Dismutase (SOD) sont des oxydoréductases contenant un métal qui catalysent la dismutation du superoxyde en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (Figure 34).^[158] Elles maintiennent la concentration de superoxyde à l'intérieur des cellules à des niveaux très faibles (moins de 50 pM dans *E. coli* ou les cellules mammaliennes).^[159,160] Ce sont des protéines cruciales dans l'arsenal antioxydant protecteur, puisque le superoxyde est la première étape de la cascade des ROS (reactive oxygen species) du dioxygène à l'eau. Les cellules mammaliennes produisent trois **SOD** différentes, impliquant soit des complexes métalliques avec les ions cuivre, zinc ou manganèse (Figure 34) : **[CuZnSOD]** se trouve principalement dans le cytosol, dans les compartiments nucléaires et dans l'espace intermembranaire mitochondrial, **[MnSOD]** est localisée dans la matrice mitochondriale, qui est son emplacement exclusif chez l'être humain et une **[CuZnSOD]** est une protéine extracellulaire et est exprimée dans la matrice extracellulaire des tissus et les fluides extracellulaires (comme le plasma).^[161,162] Les **SOD** sont compartimentées, ce qui signifie qu'elles ne sont pas capables de traverser les membranes, de se déplacer d'un organite à un autre, ni d'entrer/sortir des cellules. La **[MnSOD]** mitochondriale a une importance biologique particulière chez les mammifères : son invalidation est létale pour les souris nouveau-nées^[163,164], ce qui n'est pas le cas pour la **[CuZnSOD]**.

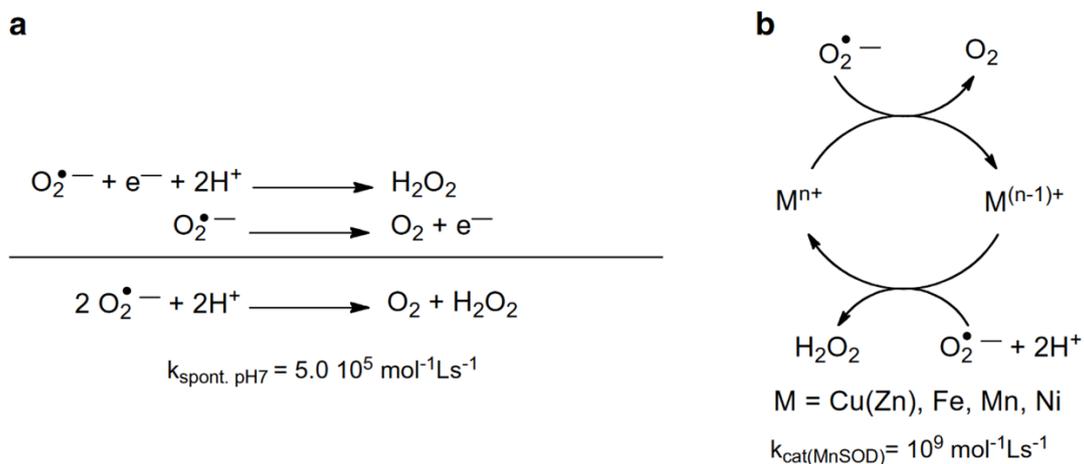


Figure 34 : (a) Dismutation spontanée du superoxyde - ou autodismutation, et (b) mécanisme simplifié de ping-pong pour la catalyse de la dismutation du superoxyde.

De plus, la dérégulation de la **[MnSOD]** ou les mutations naturelles de la **[MnSOD]** - un exemple de polymorphisme des protéines - a été proposée comme étant impliquée dans le cancer.^[165] Les **SOD** ont été trouvées chez presque tous les organismes aérobies, anaérobies facultatifs et même chez certains organismes anaérobies, où elles ont été recherchées. Une exception est le cas des bactéries microaérophiles et anaérobies qui contiennent une superoxyde réductase (SOR), qui détoxifie le superoxyde par sa réduction en H₂O₂. La détoxification du superoxyde par les **SOR** évite la libération d'O₂ qui serait toxique pour les micro-organismes sensibles à l'air.^[162]

Outre le rôle biologique des **SOD** dans le contrôle des conditions de stress oxydant. La compréhension de leurs paramètres physico-chimiques, sélectionnés par l'évolution et responsables de leurs étonnantes efficacités, est d'un intérêt fondamental et peut également servir de guide utile et efficace aux chimistes visant à développer des dérivés antioxydants pour des applications thérapeutiques contre le stress oxydant. Le développement de mimes de **SOD** de faible poids moléculaire constitue un exemple éclatant de cette interaction fructueuse avec la nature. La région d'activité rédox des **SOD** est détaillée sur la Figure 35.

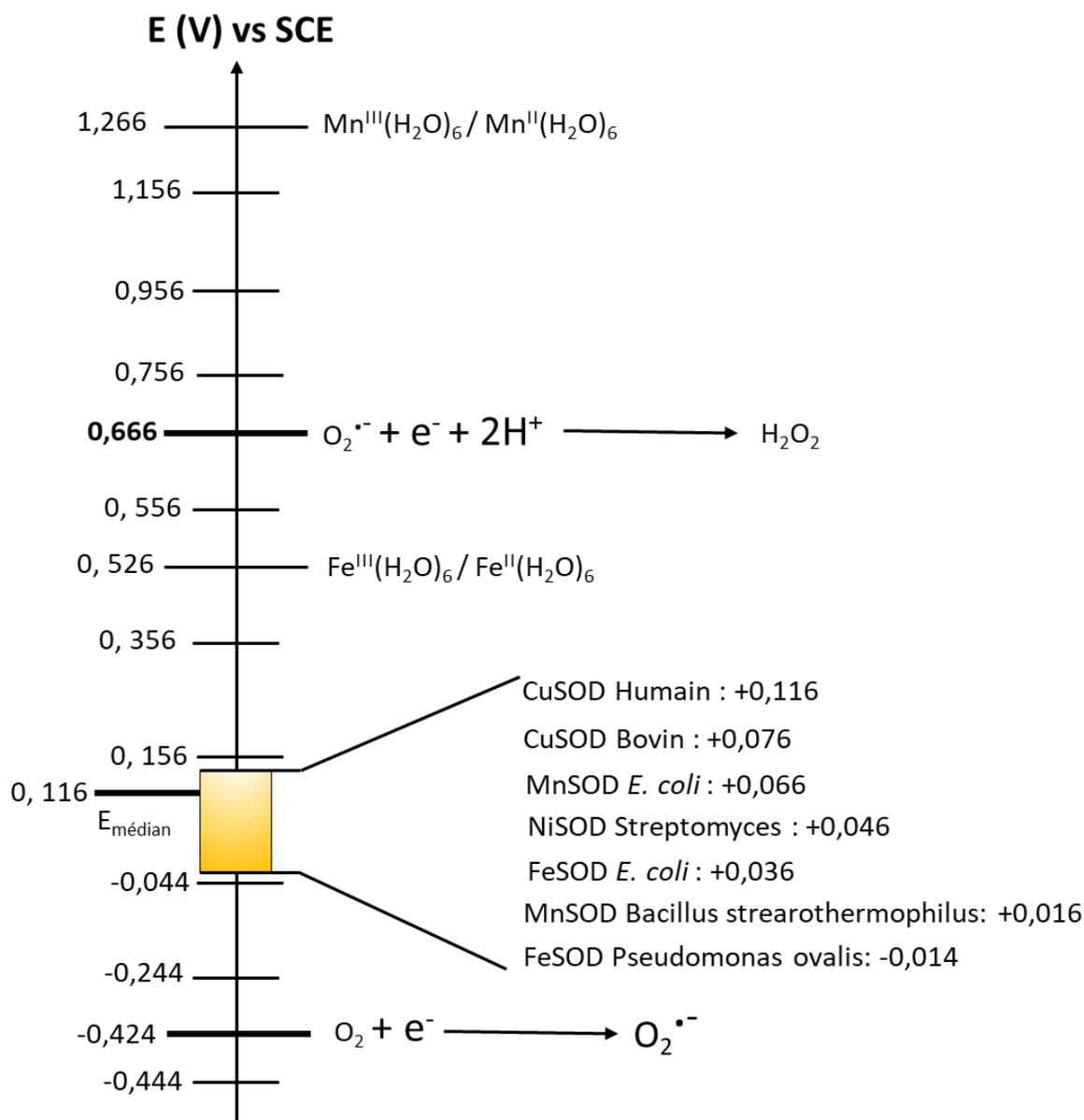


Figure 35 : Potentiels redox standard E° V vs SCE pour le superoxyde à pH 7, potentiel médian optimal pour la catalyse de la dismutation ($E_{\text{médian}}$), potentiels redox rapportés pour plusieurs SOD et pour l'hexaaqua Mn(III)/Mn(II) et l'hexaaqua Fe(III)/Fe(II).

ii. Mn-Bispidine comme mime des [MnSOD]

Le fait que la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) soit la première ligne de défense antioxydante a conduit à développer des mimes de SOD basés sur l'utilisation de complexes de manganèse avec des ligands de faible poids moléculaire. Ces travaux sont largement développés dans l'équipe du Pr Clotilde Policar, à l'ENS de Paris.^[158,158,166–169]

En 2022, Policar *et coll.* ont publié une étude d'inertie cinétique de **[Mn1]** et ses dérivés. Afin d'apporter une meilleure rigidité et préorganisation de **[Mn1]**, celui-ci a été fonctionnalisé avec un groupement cyclohexyle et/ou un groupement propyle (Figure 36).^[170]

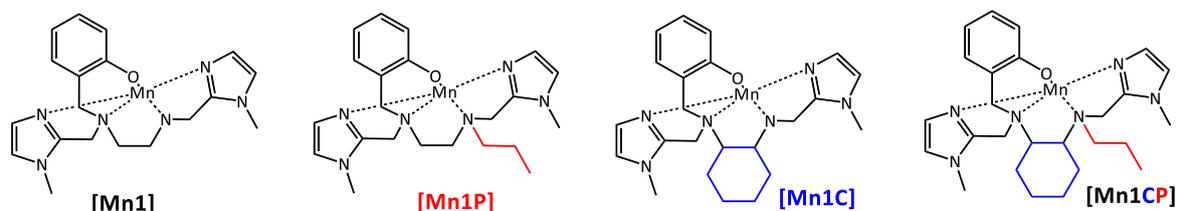


Figure 36 : Les mimes de la SOD **[Mn1]** et ses dérivés.

La dissociation métal-assistée de **[Mn1]** et ses dérivés a été étudié en présence de différent métaux divalents à savoir le zinc, le cuivre, le nickel et le cobalt. Ici nous ne présenterons que les résultats liés au zinc (Tableau 7).

Tableau 7 : Temps de demi-vie ($t_{1/2}$), les constantes catalytiques (k_{cat}) et les potentiels redox de **[Mn1]** et ses dérivés. ^[a] : 1 équivalent Zn^{2+} , $C_{complexe} = 100 \mu M$, (Tris 50 mM ; pH 7,5), $T = 5^\circ C$. ^[b] : HEPES (50 mM ; pH 7,4). ^[c] : $C_{complexe} = 100 \mu M$, Ar, HEPES (50 mM ; pH 7,5 ; force ionique = 12,5 mM), électrode de travail : carbone vitreux, contre électrode : fil de platine, électrode de référence : électrode au calomel saturée (SCE) avec KCl, vitesse de balayage = 500 mV/s. Electrode normale à hydrogène = 0,241 V + SCE. (n.d : non déterminé)

	$t_{1/2}$ (s) – Zn^{2+}	k_{cat} (Mn-L) $\cdot 10^6$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$E_{1/2}$ (V vs SCE)
[Mn1]	n.d ^[a]	$3,40 \pm 0,10$ ^[b]	0,20 ^[c]
[Mn1P]	n.d ^[a]	$4,58 \pm 0,01$ ^[b]	0,23 ^[c]
[Mn1C]	22 ^[a]	$4,38 \pm 0,13$ ^[b]	0,17 ^[c]
[Mn1CP]	188 ^[a]	$5,41 \pm 0,24$ ^[b]	0,24 ^[c]

Comme on peut le voir dans le Tableau 7, l'inconvénient de **[Mn1]** et ses dérivés est leur faible inertie cinétique. Les bispidines sont connues pour former des complexes de manganèse hautement inerte, ce qui en fait un atout si un complexe Mn-bispidine possède une activité catalytique mimant la **SOD**.

Dès 1998, Comba *et coll.* avaient énoncé l'intérêt des complexes de bispidine-Mn tel comme mimes de la SOD à manganèse lors de la caractérisation des complexes de Mn^{II} avec les ligands **B1** et **B18** (Figure 37),^[22] Cependant, aucunes études n'ont été faites en ce sens à l'époque et il n'existe aucun complexe de bispidine ayant une activité **SOD** dans la littérature à ce jour.

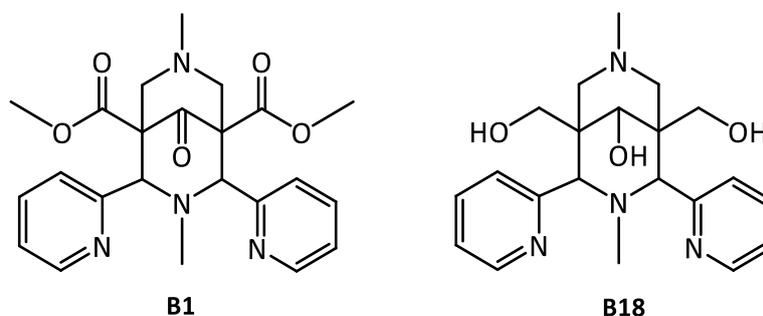


Figure 37 : Structure de B1 et son équivalent triol B18.

Le principal défi pour les chimistes dans ce domaine est la conception de complexes stables et non toxiques, avec un potentiel redox proche du **[MnSOD]** afin de réduire efficacement le superoxyde en milieu intracellulaire. De plus, ce complexe doit présenter une bonne disponibilité cellulaire et éventuellement une accumulation au niveau des mitochondries. Il faut noter que parmi les quatre ions métalliques responsables du processus redox au site actif des **SOD** (Cu, Fe, Mn et Ni), le manganèse est probablement le moins toxique.^[171] C'est pourquoi, bien qu'une neurotoxicité ait été décrite^[172], l'ion divalent manganèse est maintenant le principal ion métallique dans le domaine de la conception de mimes de **SOD** pour un usage thérapeutique.

La stabilité et l'inertie cinétique des complexes sont des paramètres importants à garder à l'esprit lors de la conception de médicaments à base de métaux, car les environnements biologiques sont riches en molécules coordinatrices de métaux. Le Mn^{II} peut être en échange rapide lorsqu'il est coordonné à des ligands monodentés, tandis que des structures plus inertes sont obtenues avec le Mn^{III}. La question de la spéciation des complexes de manganèse dans les environnements biologiques est cruciale pour leur bioactivité.^[91,136] Les bispidines sont de très bons candidats car, même si leur stabilité thermodynamique reste modeste, elles ont prouvé leur très haute inertie cinétique envers les complexes de Mn^{II}.^[88,91] De plus, par soucis de comparaison avec la littérature, il est important de noter que le Mn^{II} étant un ion d⁵, la stabilisation du champ du ligand est faible et les constantes thermodynamiques des complexes correspondants sont situées dans une gamme plus faible que les constantes classiquement observées avec d'autres cations métalliques comme le cuivre et le fer.

V. Application à la détection du zinc

La dernière partie traitée concerne le développement d'une sonde IRM intelligente permettant de communiquer une information sur la concentration locale en ions métalliques, et plus particulièrement en Zn^{II}.^[173] Les cellules régulent l'accumulation, le transport, la distribution et l'exportation des métaux par le biais de transporteurs et de métallochaperons.^[174] La mauvaise régulation des ions métalliques est liée à des maladies aiguës et à long terme peut conduire à des maladies cardiaques, le cancer ou la neurodégénérescence.^[173] On peut citer la surconcentration de zinc, cuivre et fer contribuant à la formation de dépôts d'amyloïde- β dans le cerveau, qui seraient liés à la maladie d'Alzheimer.^[175] L'amyloïde- β étant une petite protéine appartenant à la famille des substances amyloïdes.

Le zinc est le second métal de transition le plus abondant dans le corps humain après le fer ; on estime sa biodistribution dans le corps de 2 à 4 grammes.^[176] Il est principalement lié à des protéines jouant un rôle central dans le contrôle de la transcription des gènes et de la fonction des métalloenzymes.^[177] Le zinc est un acide de Lewis, ce qui en fait un agent catalytique utile dans

l'hydroxylation et d'autres réaction enzymatique. De plus, il est le seul métal présent dans toutes les classes d'enzymes. Le cerveau est l'organe contenant la plus forte concentration de zinc dans le corps, atteignant plus de 300 μM dans les vésicules de certains types de cellules neuronales glutamatergique.^[178,179] Celui-ci est également apparu comme un ion de signalisation important. Par conséquent, l'exposition à une concentration incontrôlée de Zn^{II} peut entraîner une mort neuronale excitotoxique, en particulier pendant une crise d'épilepsie, un traumatisme crânien ou une ischémie cérébrale.^[176]

De la même façon que le calcium, les capteurs de zinc fluorescent représentent la technique majeure utilisée à ce jour pour la détection de ce métal en milieu biologique avec toutes les limitations de la détection optique.^[180] En ce qui concerne les agents de contraste IRM, la stratégie de détection de l'ion Zn^{II} est basée sur une modification du nombre de molécules d'eau directement liée au centre Gd^{III} (dans notre cas le Mn^{II}) d'un agent de contraste. En 2001, Nagano *et coll.* on mis en place le premier système bipartite l'acide diéthylènetriaminepentaacétique Gd^{III} (GdDPA) avec un motif bis-(2-pyridylméthyl)amine (DPA), que nous simplifierons par **[GdDPA]**. (Figure 38).^[181] Ce complexe a été conçu pour avoir une très bonne affinité avec le Zn^{II} , et est difficilement un bon chélateur du Ca^{II} et du Mg^{II} , des cations abondants dans le corps.^[182]

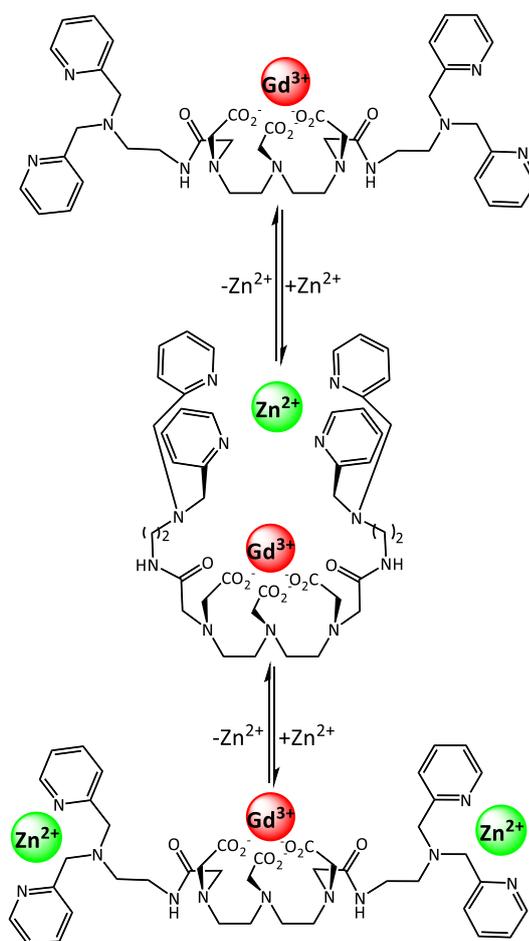
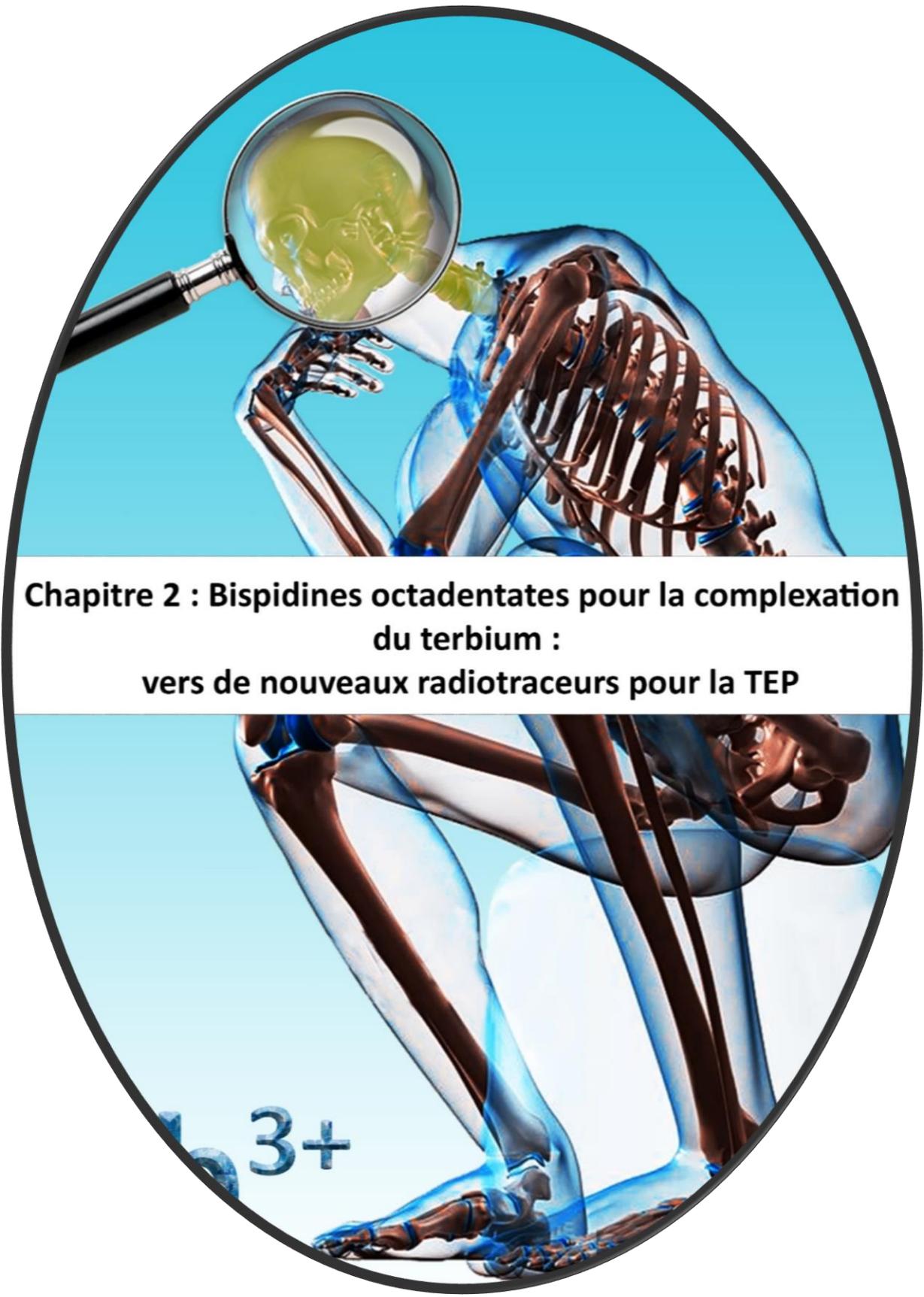


Figure 38 : Représentation schématique du **[GdDTPA]** représentant une conformation avec ou sans Zn^{II} .

L'inconvénient du système est la formation d'adduit Zn : DPA en stœchiométrie 1 : 1 et 2 : 1 conduisant respectivement à une diminution et une augmentation de la relaxivité lors de la complexation de Zn^{II}. Dans le complexe 1 : 1, le Zn^{II} est coordiné par les deux unités DPA, et est vraisemblablement situé au-dessus du site de liaison de l'eau au complexe de Gd^{III}. Cela conduisant à l'élimination de la molécule d'eau de la première sphère ou au moins au blocage complet des échanges d'eau avec les molécules d'eau environnantes. Dans le complexe 2 : 1 les deux ions zinc se coordinent chacun à une seule unité DPA et se retrouve donc aux extrémités de la molécule (Figure 38). Tandis que l'accès de l'eau environnante au Gd^{III} redevient possible. C'est une situation très problématique car on peut atteindre la même valeur de relaxivité pour deux quantités différentes de Zn^{II} (Figure 38). Pour pallier ce problème, le système a été amélioré en substituant une unité pyridine du motif DPA par une fonction carboxylate. En présence de Zn^{II}, la relaxivité diminue de 30%, ce qui s'explique par la diminution des molécules d'eau liées au Gd^{III}. L'hypothèse avancée considère que cela est dû à la géométrie du complexe Zn^{II} empêchant l'accès des molécules d'eau au Gd^{III}. Malgré cela, la sélectivité au Zn^{II} a été totale, car aucune réponse n'est constatée en présence de Mg^{II} et Ca^{II}. A ce jour, plusieurs générations de capteurs de zinc ont été mise en place tels que des unités polyazamacrocycliques couplé à des bras DPA.^[183,184] Les bispidines sont parmi les ligands les mieux adapté pour le manganèse,^[88] il est donc tout à fait envisageable de fonctionnaliser une bispidine avec le motif DPA pour la détection du zinc. Voir chapitre 6



**Chapitre 2 : Bispidines octadentates pour la complexation
du terbium :
vers de nouveaux radiotraceurs pour la TEP**

I. Introduction et contexte de travail

Comme vu dans le chapitre 1, l'essor récent de l'immuno-TEP a conduit les cliniciens et les chercheurs à se tourner vers l'emploi de radioisotopes à demi-vie longues, compatibles avec les pharmacocinétiques de biodistribution lentes des macromolécules telles que les anticorps.^{[59]1} Il devient donc indispensable de développer de nouveaux chélateurs adaptés à ces radiométaux émergents. On peut par exemple citer le ^{152}Tb ou encore le ^{89}Zr ayant respectivement des temps de demi-vie de 17,5 h et 78,5 h, ce qui en fait de bons candidats pour l'immuno-TEP (Figure 39).

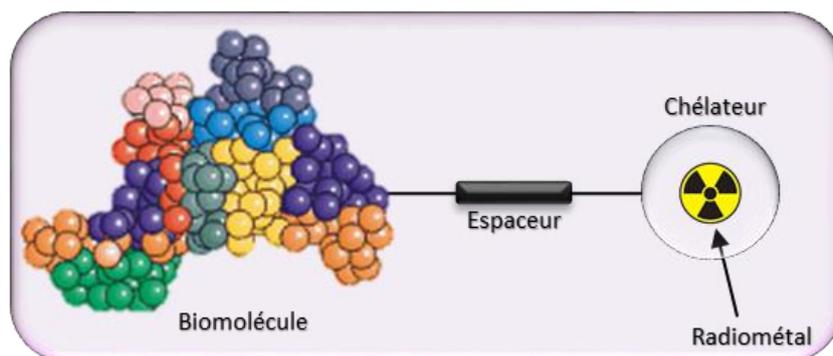


Figure 39 : Radiotracteur pour l'immunoTEP.

Depuis 2001,^[185] les radioisotopes du terbium ont été étudiés pour de potentielles applications en médecine nucléaire.^[186] Les radioisotopes ^{152}Tb et ^{155}Tb sont identifiés comme étant de bons candidats en TEP et en Tomographie par Emission Monophotonique (TEMP). Leurs temps de demi-vie sont respectivement de 17,5 h et 5,3 j. Tandis que les radioisotopes ^{149}Tb et ^{161}Tb sont identifiés comme étant de bons candidats (respectivement émetteur en rayonnement α et β^-) pour la radiothérapie. Ce qui fait de l'élément terbium un bon candidat pour le diagnostic et la thérapie.^[64] On parle alors de sondes théranostiques puisqu'elles permettent d'effectuer une thérapie et un contrôle par imagerie avec un seul chélate.

Le terbium (III) possède le numéro atomique 65 est un lanthanide de configuration électronique $[\text{Xe}] 6s^2 4f^6$. Celui-ci présente une coordination usuelle entre 8 et 10 en solution et jusqu'à 12 à l'état solide.^[187] Différentes géométries sont adoptées selon le nombre de liaisons de coordination. Pour une coordination de 8, les polyèdres les plus courants sont l'antiprisme à base carrée et le dodécaèdre. Pour une coordination de 9, on trouve le prisme trigonal tricapé et pour une coordination de 10, l'antiprisme carré bicapé. Le mode de coordination à 11 est très rare (Figure 40). D'après la classification de Pearson, les ions Ln^{III} (lanthanide(III)) sont des acides durs présentant une forte affinité avec des bases dures, tels que l'eau, les carboxylates ou encore les phosphonates.

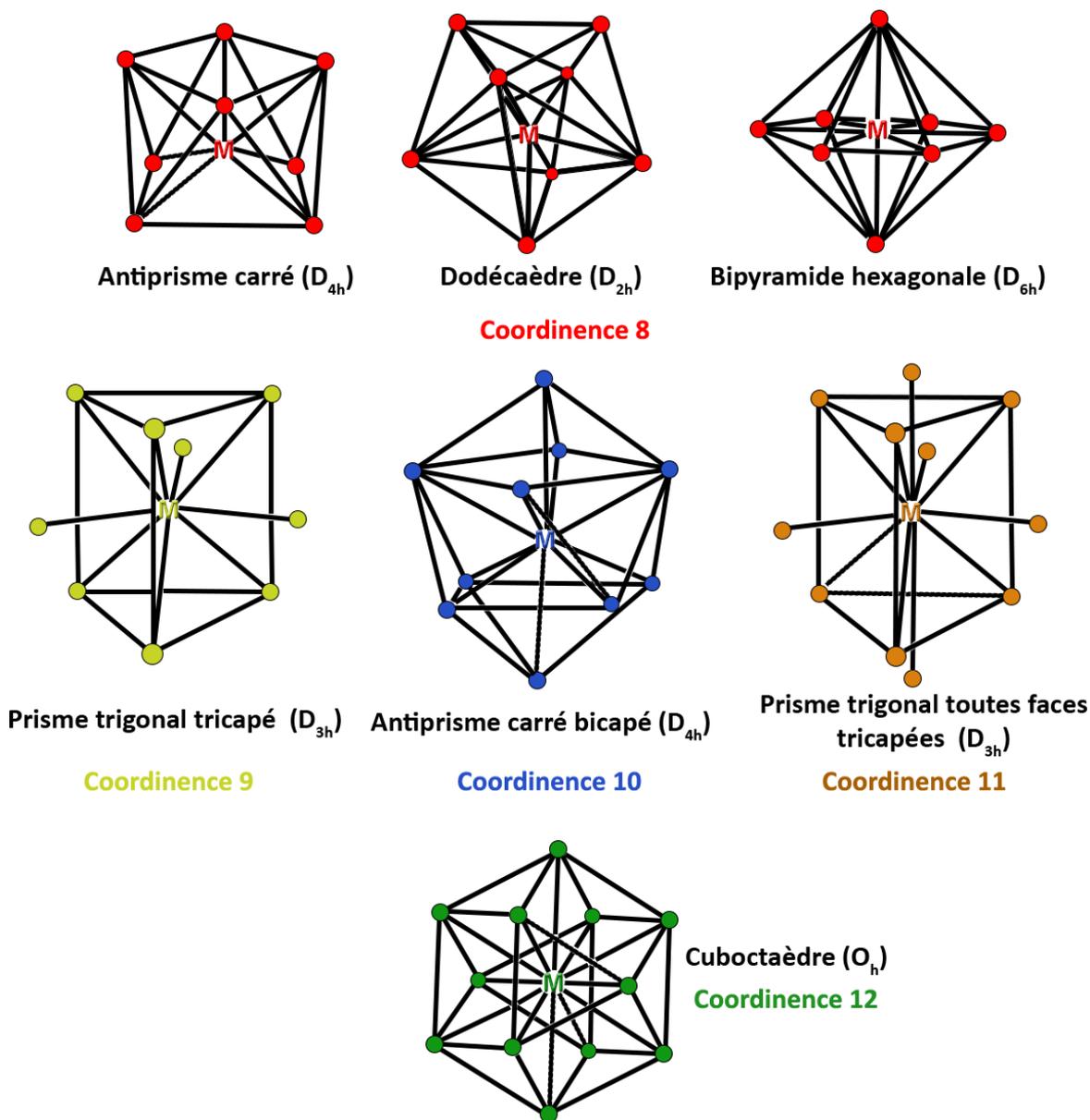


Figure 40 : Différentes géométries en fonction du mode de coordination.

Luminescence du terbium (III) : Les orbitales 4f ont une faible extension radiale et sont très profondes dû aux couches externes $5s^25p^6$ qui les protègent des perturbations extérieures. Les électrons de valence 4f sont donc peu sensibles à leur environnement chimique et la formation d'une liaison chimique par interaction covalente impliquant des électrons 4f est impossible. L'interaction métal-ligand dans les complexes de Tb^{III} est donc décrite par un modèle purement ionique. Une autre conséquence de la profondeur des orbitales f dans le nuage électronique est le faible effet du champ des ligands : autour de 500 cm^{-1} contre 5000 à $30\,000\text{ cm}^{-1}$ pour les métaux d. Contrairement aux métaux de transition, les niveaux d'énergie des complexes de Ln^{III} sont très proches de ceux de l'ion libre. Différentes efficacités de luminescence des ions Ln^{III} sont observées en fonction de la différence d'énergie entre les niveaux excités et le niveau fondamental. Plus la différence d'énergie est faible, plus les processus de désexcitation non radiatifs sont probables^[188] (Figure 41). Le terbium(III) a des temps

de vie (délai de temps entre l'absorption et l'émission) raisonnable (μs - ms) et émet dans le visible ; λ_{em} = 550 nm.

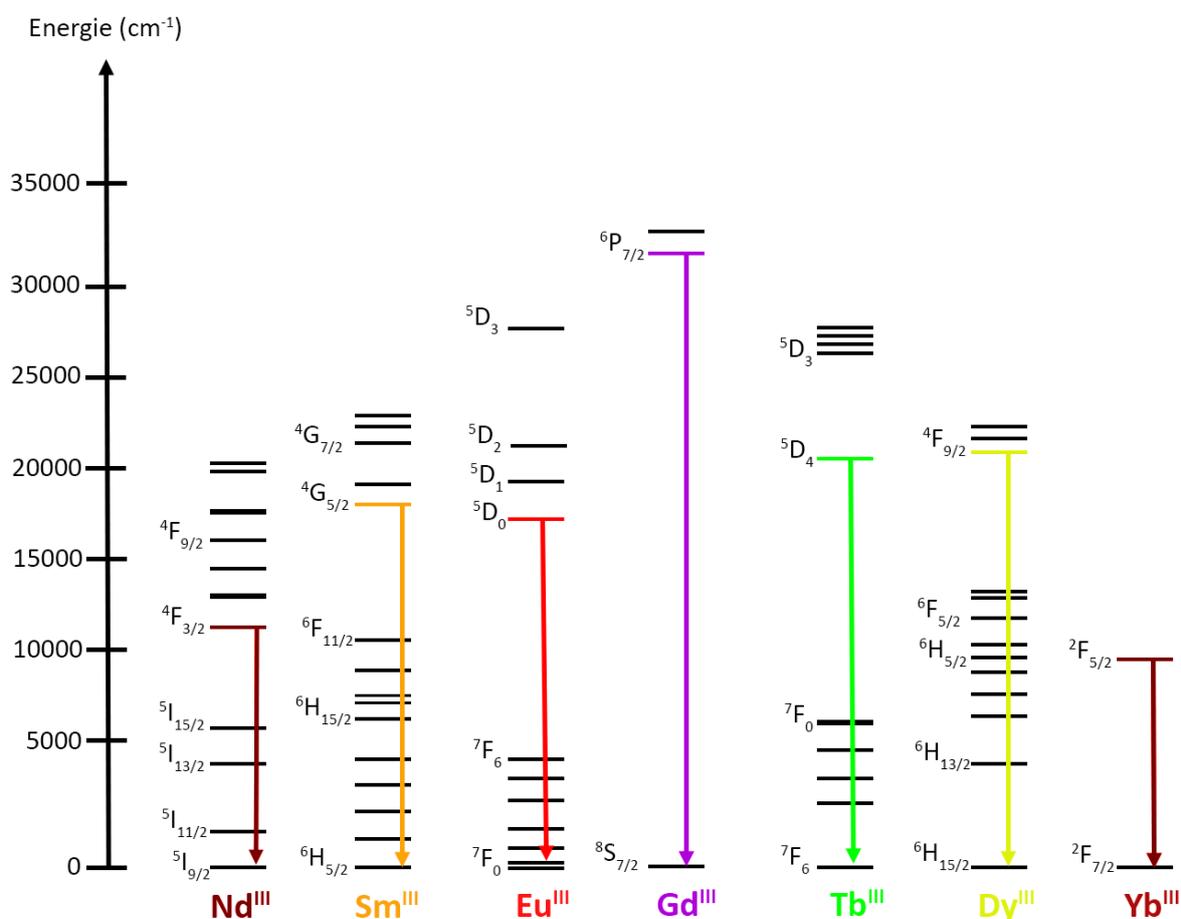


Figure 41 : Diagramme partiel d'énergies pour les ions Ln^{III} aqueux.

Les coefficients d'extinction molaires (ϵ) des ions Ln^{III} étant très faibles, on ne peut les exciter que via des lasers très puissants, ce qui est non compatible avec des applications biologiques. Il est donc nécessaire que l'ion métallique soit incorporé dans un système dont la fonction d'absorption soit distincte du lanthanide jouant le rôle d'émetteur : c'est ce que l'on nomme l'effet d'antenne (Figure 42).

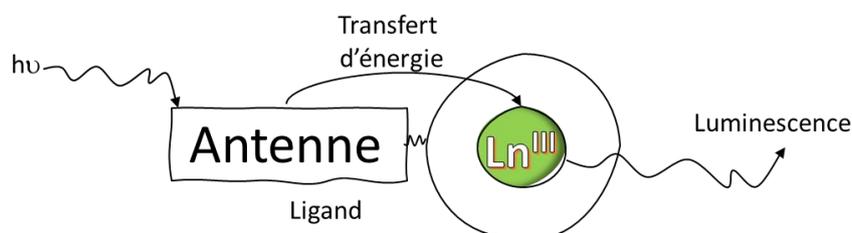


Figure 42 : Principe de l'effet d'antenne.

Dans la littérature, il existe plusieurs exemples de complexation de ligands bispidine avec des lanthanides. Ces molécules ont été développées par le groupe du Pr Comba et ses collaborateurs. Les premiers ^[189] sont des ligands octadentates possédant deux substituants picolinates en N3 et N7.

Ensuite, la sphère de coordination a été étendue en introduisant une fonction bipyridinecarboxylate afin d'augmenter la denticité des ligands à 9 et par conséquent, les propriétés de luminescence.^[30] Les précédents travaux conduits dans l'équipe SynPA avec des ligands phosphonates et plus particulièrement avec des unités pyridinyl phosphonate, ont montré que la substitution des groupements carboxylates par des fonctions phosphonate conduisait en général à une augmentation de la stabilité thermodynamique des complexes.

À titre d'exemples, des augmentations supérieures à 1 unité sur l'échelle pLn ont été observées entre les complexes avec les ligands pyridyl diméthylcarboxylate^[190] et leurs analogues diméthylphosphonates.^[191] De même, une augmentation de 2 unités sur l'échelle pCu a été rapportée pour les complexes de bispidines phosphonates^[12], ce qui s'est avéré concomitant avec une cinétique de radiomarquage favorable pour les complexes ⁶⁴Cu, entraînant des rendements radiochimiques quantitatifs.

En outre, le remplacement des trois substituants picolinate du ligand tripodal **tpaa**^[192] ou du ligand basé sur le **tacn** et **tpatcn**^[193] par des acides pyridylphosphoniques^[194,195] conduit également à augmenter la stabilité thermodynamique des complexes de Ln^{III} correspondants. Par exemple, une augmentation de 7 unités sur l'échelle pGd a été obtenue pour le ligand tripodal phosphonaté.^[194]

Dans ce chapitre, nous avons entrepris une étude comparative des complexes de lanthanides avec les ligands **H₆L1** et **H₄L2** (Figure 43). Afin d'assurer la stabilité des ligands en solutions aqueuses acides et d'éviter leur dégradation par des réactions de rétro-Mannich, nous nous sommes concentrés sur les dérivés réduits sous la forme de bispidoles. Dans la perspective d'une comparaison avec les données de la littérature, il est important de noter que, bien que ces changements puissent sembler mineurs, la réduction de la dégradation est loin d'être insignifiante en termes de propriétés physicochimiques.^[50]

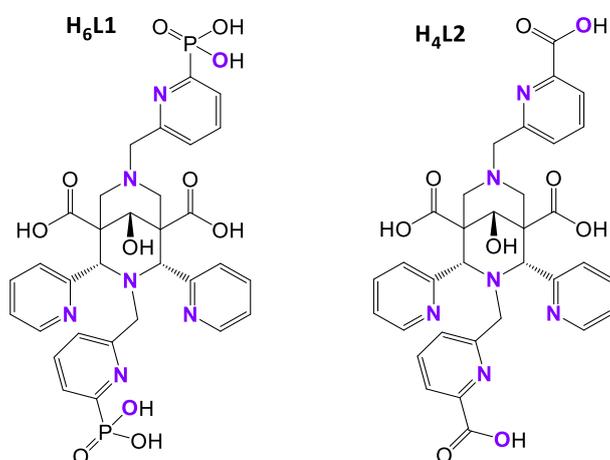


Figure 43 : Première génération de chélateurs du terbium développés durant cette thèse. En violet les groupements coordinants.

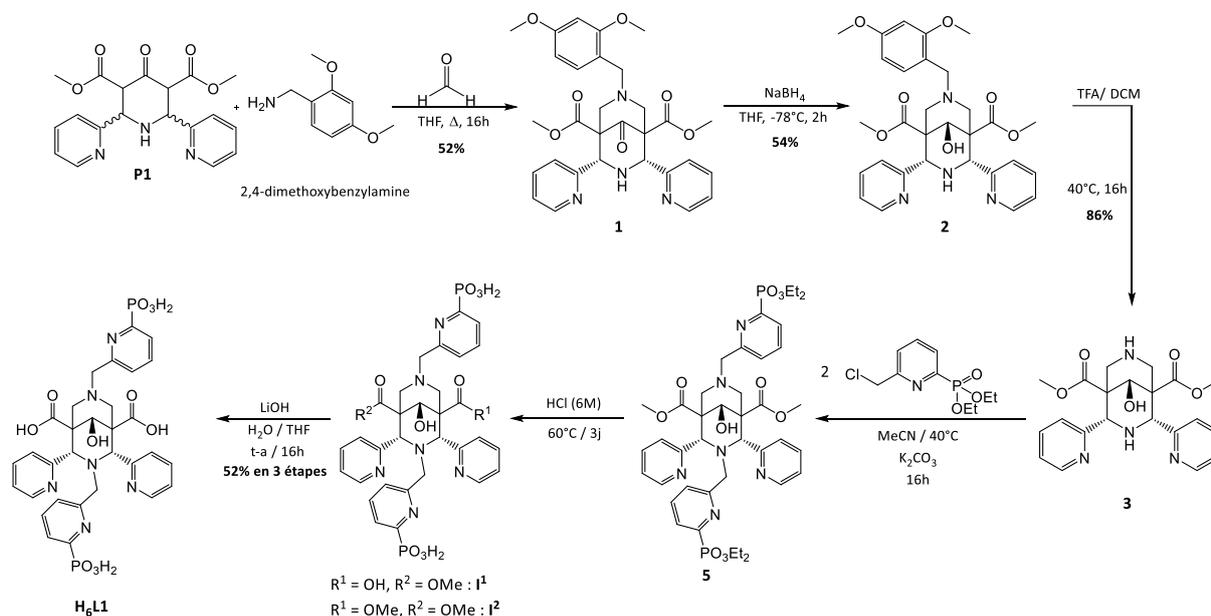
II. Synthèse de H₆L1 et H₄L2

A. Synthèse et caractérisation de H₆L1

i. Synthèse de H₆L1

Toutes les nouvelles molécules présentées dans cette thèse ont été analysé par RMN (¹H, ¹³C, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC et/ou NOESY, ROESY), MALDI et/ou ESI, infrarouge, structure cristallographique (lorsque des cristaux ont été obtenus), HPLC (quand la solubilité le permet) et pour les ligands finaux, une analyse élémentaire. C'est avec toutes ces caractérisations que nous pouvons proposer des attributions exactes et fiables de nos molécules et complexes. De plus, toutes les structures RX qui sont présentés dans cette thèse ont été résolu par le Dr Olivier Jeannin (ISCR – Rennes).

La voie de synthèse des deux ligands commence de la même manière jusqu'à l'obtention de l'intermédiaire **3** sur lequel une substitution nucléophile est ensuite effectuée pour obtenir les ligands finaux associés. La synthèse de **H₆L1** a été effectuée pour la première fois par le Dr Maryame Sy.^[196] Celle-ci a été adaptée au cours de ma thèse pour en améliorer les rendements et la reproductibilité (Figure 44).



La synthèse commence avec le précurseur **P1** (pipéridone ou pipéridinone). Il est obtenu par réaction de Mannich entre le diméthyle 1,3- acetonedicarboxylate avec la 2-pyridine carboxyaldehyde en présence d'acétate d'ammonium dans l'éthanol à 0°C. Le précurseur précipite sous forme de poudre, cette poudre est un mélange de plusieurs conformations. Cependant un réarrangement a lieu

durant la deuxième réaction de Mannich et conduit au bicyclic de conformation chaise-chaise. La pipéridone **P1** obtenue est donc utilisée ainsi sans purification supplémentaire.

La deuxième étape est aussi une condensation de Mannich conduisant à l'intermédiaire **1**. De la même manière, celui-ci précipite sous forme de poudre qui sera utilisée ainsi sans purification supplémentaire. La synthèse mettant en œuvre l'intermédiaire **1** a été développé par Comba *et coll.*^[28] et Hasserodt *et coll.*^[197] et adaptée par le Dr Maryame Sy au laboratoire.^[196] La cétone centrale est très sensible aux milieux acides. En effet, une protonation de la cétone centrale conduit à la formation d'un énol et d'un iminium issus de l'ouverture du cycle par rétro-Mannich.

La troisième étape consiste donc en la réduction de la cétone via du borohydrure de sodium conduisant à l'intermédiaire **2**. La réduction se fait à -78°C car à température ambiante les fonctions esters sont aussi partiellement réduites.

La quatrième étape est la déprotection de l'amine en position N7. Celle-ci est systématiquement protégée car cela nous permet d'utiliser le même intermédiaire pour des ligands mono- ou di-substitués en N3 ou N7. Cette déprotection se fait très aisément avec l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane (DCM) en une nuit avec de très bon rendement.

L'étape suivante est la substitution nucléophile conduisant à l'intermédiaire **5**, dans l'acétonitrile à 40°C. Au bout de 16h on obtient le produit **6** mais il est difficile de confirmer la non-présence de produit de départ **3** dans le milieu. Nous avons donc effectué un spectre de masse (MALDI) pour confirmer la disparition totale du produit de départ. Une hydrolyse acide des esters phosphoniques est effectuée sur le produit **5** et au bout de 3 jours, on confirme la disparition du produit de départ et la présence des intermédiaires **I¹** et **I²**. En effet, l'hydrolyse acide n'étant pas suffisante afin de déprotéger les acides carboxyliques il est nécessaire de saponifier le mélange, puis le purifier par colonne C18 pour obtenir le ligand final **H₆L1**.

Le substituant méthyl 6-(chlorométhyle)picolinate utilisé durant la substitution nucléophile est décrit dans la littérature (Figure 45).^[198]

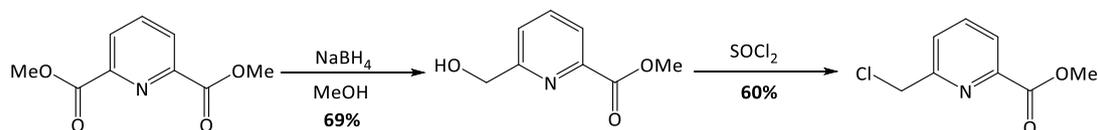
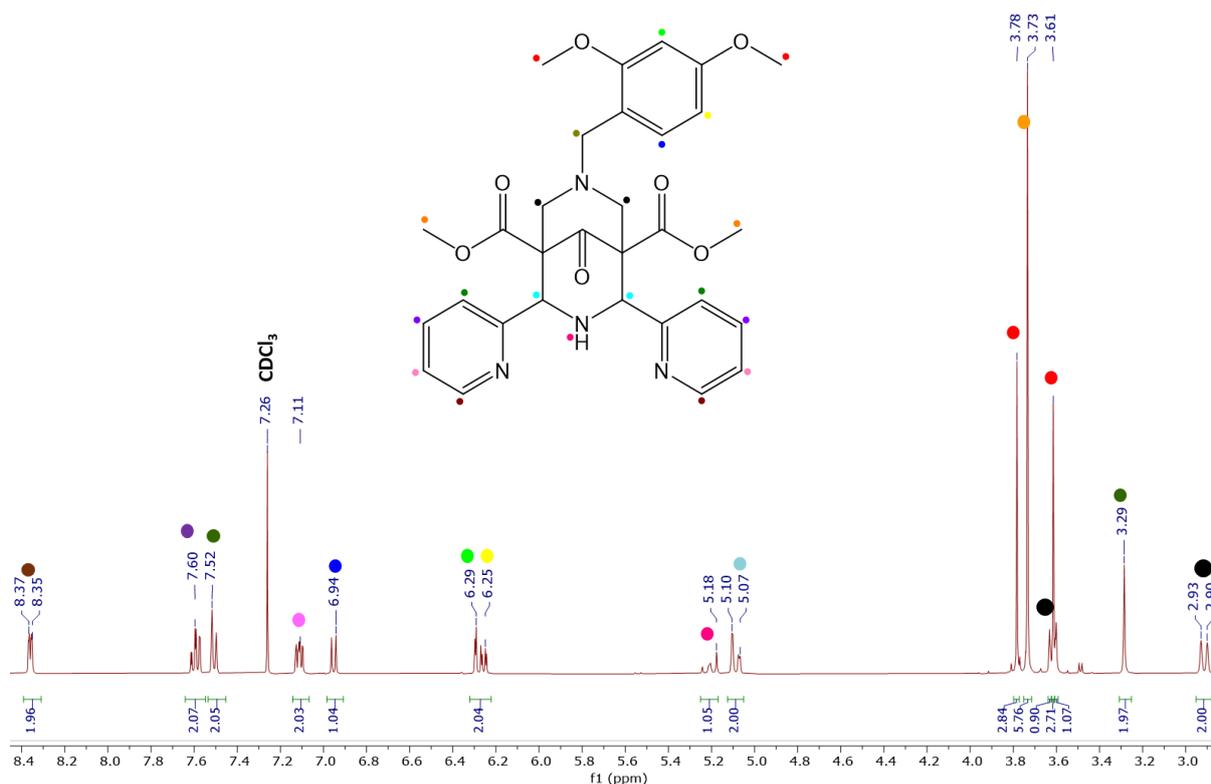


Figure 45 : Voie de synthèse décrite du méthyl 6-(chlorométhyle)picolinate.

ii. Caractérisation de H₆L1

Le spectre RMN ¹H d'une bispidine a plusieurs régions caractéristiques et est relativement simple au vu de la symétrie de la molécule : à savoir les protons des méthylènes (entre 2,90 et 3,6 ppm) portés par les carbones en α de N7, les méthyles des esters qui présentent un singulet pour 6

protons (3,76 ppm), les méthyles des méthoxy portés par le benzyle (à 3,61 et 3,78 ppm), le méthylène du benzyle en α de $N7$ (3,29 ppm), les protons C-H en α du $N3$ (5,10 ppm). Dans la région des protons aromatiques, le groupement protecteur 2,4-diméthoxybenzyle a 3 protons aromatiques caractéristiques (6,25 ; 6,29 et 6,94 ppm) et enfin nous avons les pyridines avec une signature dans la région des aromatiques (au vu de la symétrie de la molécule chaque proton est compté double). On a donc une signature avec 4 multiplets qui intègrent chacun pour 2 protons (7,11 ; 7,52 ; 7,60 et 8,36 ppm) (Spectre 1).



Spectre 1 : RMN ^1H de **1** (CDCl_3 , 400 MHz, 25°C).

Cet intermédiaire **1** a été cristallisé pour en caractériser la structure en diffractométrie des rayons X. Ici, on peut voir la conformation chaise-chaise de la bispidone avec une distance $\text{N3} \cdots \text{N7}$ de 2,840 Å (Figure 46).

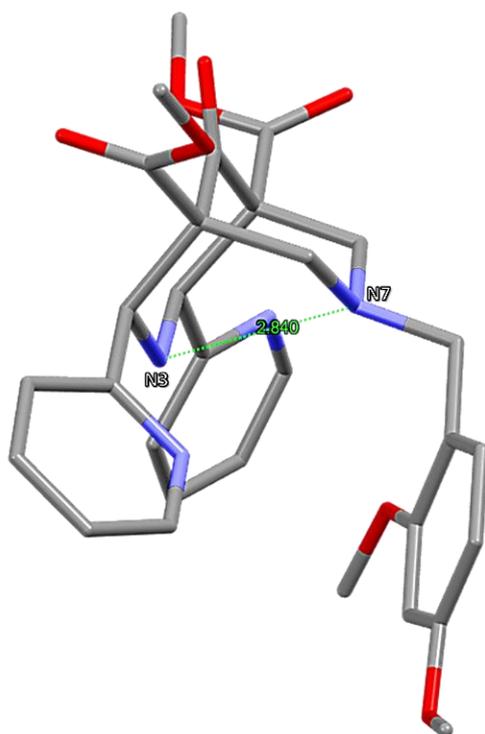
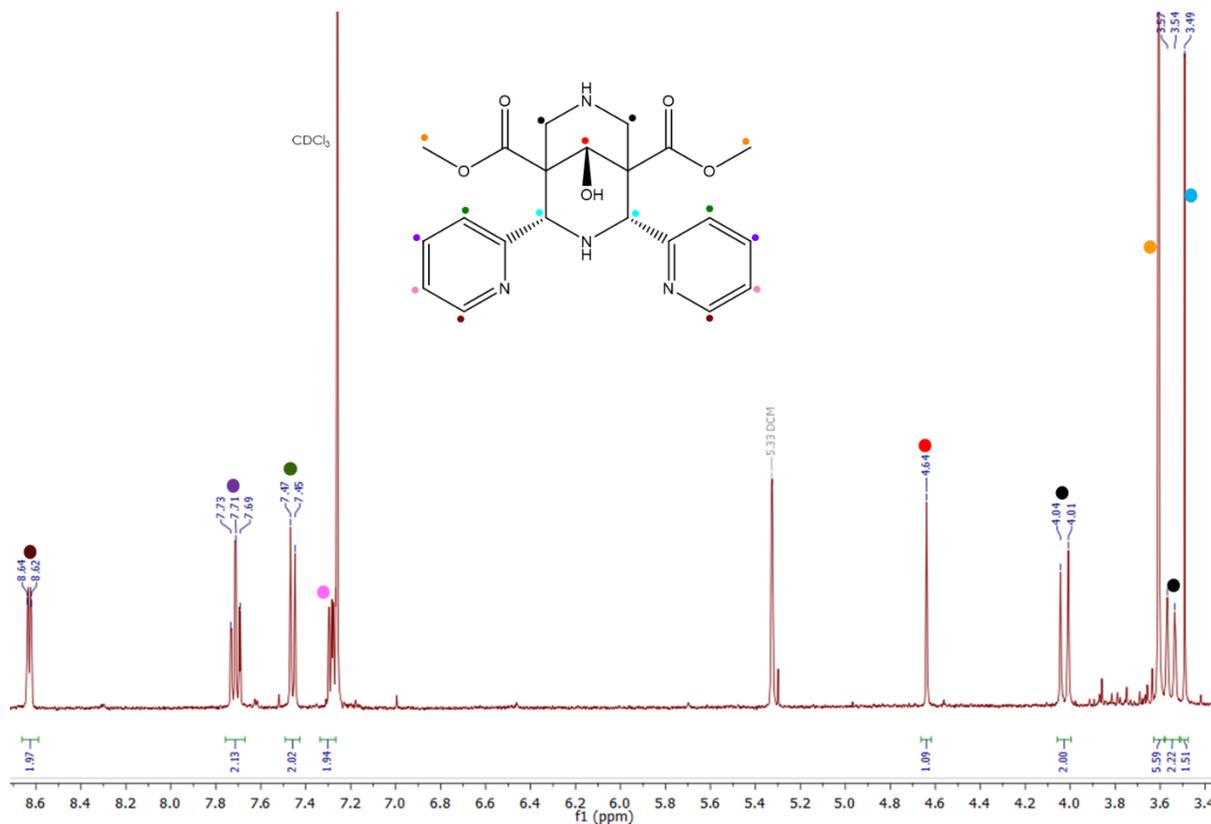


Figure 46 : Structure RX de l'intermédiaire **1**, azote, oxygène, carbone.

Durant cette discussion, j'ai choisi de présenter quelques spectres RMN de certains intermédiaires, l'objectif étant de montrer la signature spectrale de la molécule. Cette signature est toujours la même mise à part la région sur laquelle une réaction chimique est effectuée. Cependant tous les intermédiaires ont été confirmés en RMN ^1H . Les spectres ^{13}C ne sont pas effectués systématiquement sur les intermédiaires déjà obtenus au laboratoire. Pour toutes les nouvelles molécules, une analyse complète est effectuée (RMN ^1H ; ^{13}C ; spectrométrie de masse et analyse élémentaire C, H, N). Toutes les analyses spectrales sont disponibles dans la partie expérimentale. A noter que les déplacements chimiques sont dépendants du solvant et, dans D_2O , ils sont fortement influencés par le pD.

Le spectre de l'intermédiaires **3** révèle un spectre très simple avec des signaux assignables aisément, dû à la symétrie de la structure (Spectre 2).



Spectre 2 : RMN ^1H de **3** (CDCl_3 , 400 MHz, 25°C).

Le produit final est confirmé par toutes les analyses classiques de nos molécules finales (RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P , ^{13}C , spectrométrie de masse, analyse élémentaire et UV-HPLC. Le chromatogramme UV-HPLC du ligand montre un pic avec un temps de rétention de 13.307 min sur colonne phase inverse C18 (Figure 47).

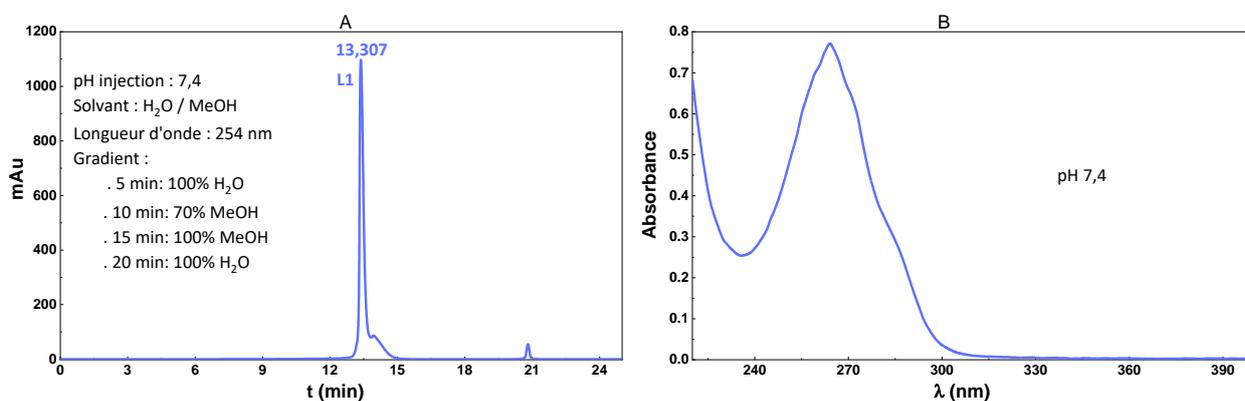


Figure 47 : (A) HPLC de **L1**. (B) Spectre ultraviolet de **H₆L1** à pH 7,4.

Les spectre MALDI du ligand montre clairement un pic à $m/z = 727.348$ correspondant à l'ion monochargé $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figure 48).

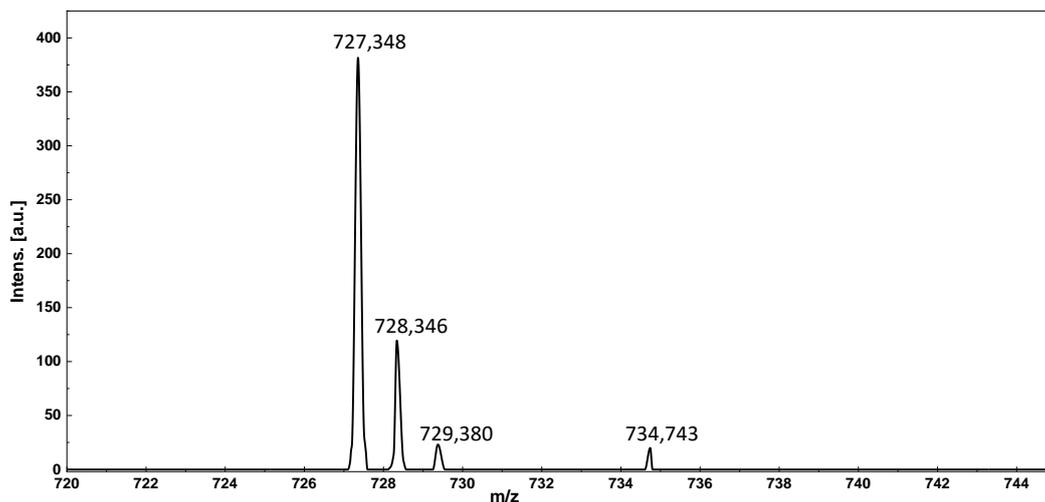
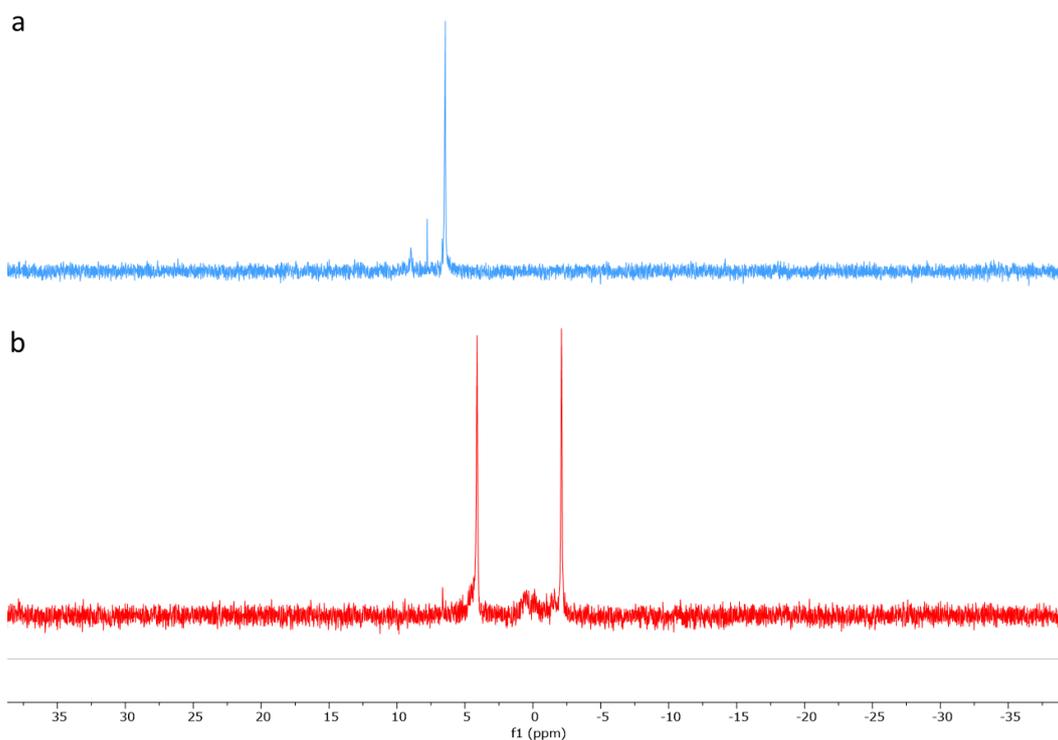


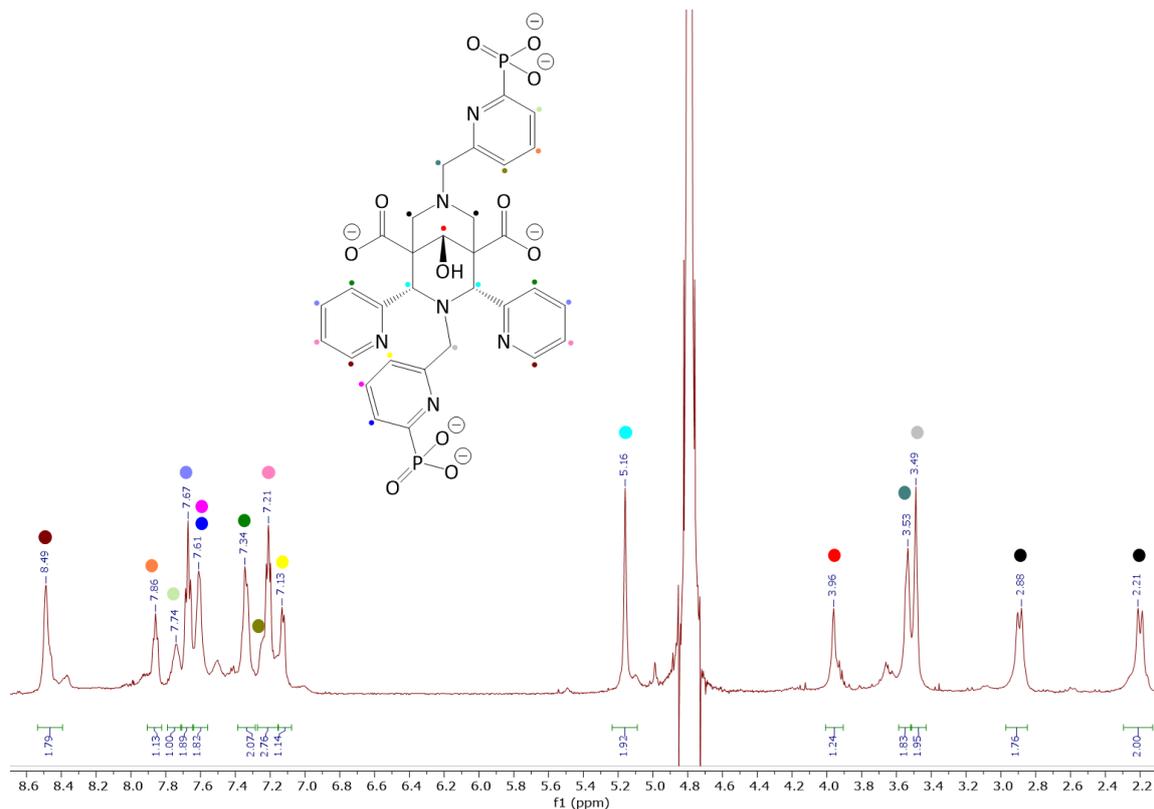
Figure 48 : Spectre de masse MALDI de H_6L1 .

Le spectres RMN ^{31}P en milieu fortement acide (Spectre 3-b – D_2O + TFA) montrent un ensemble unique de deux pics à $\delta P = 4,12$ ppm et $\delta P = -2,11$ ppm avec une intégration équivalente, qui ont été attribués sans ambiguïté aux phosphonates de pyridine à $N3$ et $N7$, respectivement. Le spectre se simplifie en milieu très basique $\delta P = 6,45$ ppm ($pD = 12.1$, Spectre 3-a) pour lequel une espèce largement majoritaire est observée (Spectre 4).



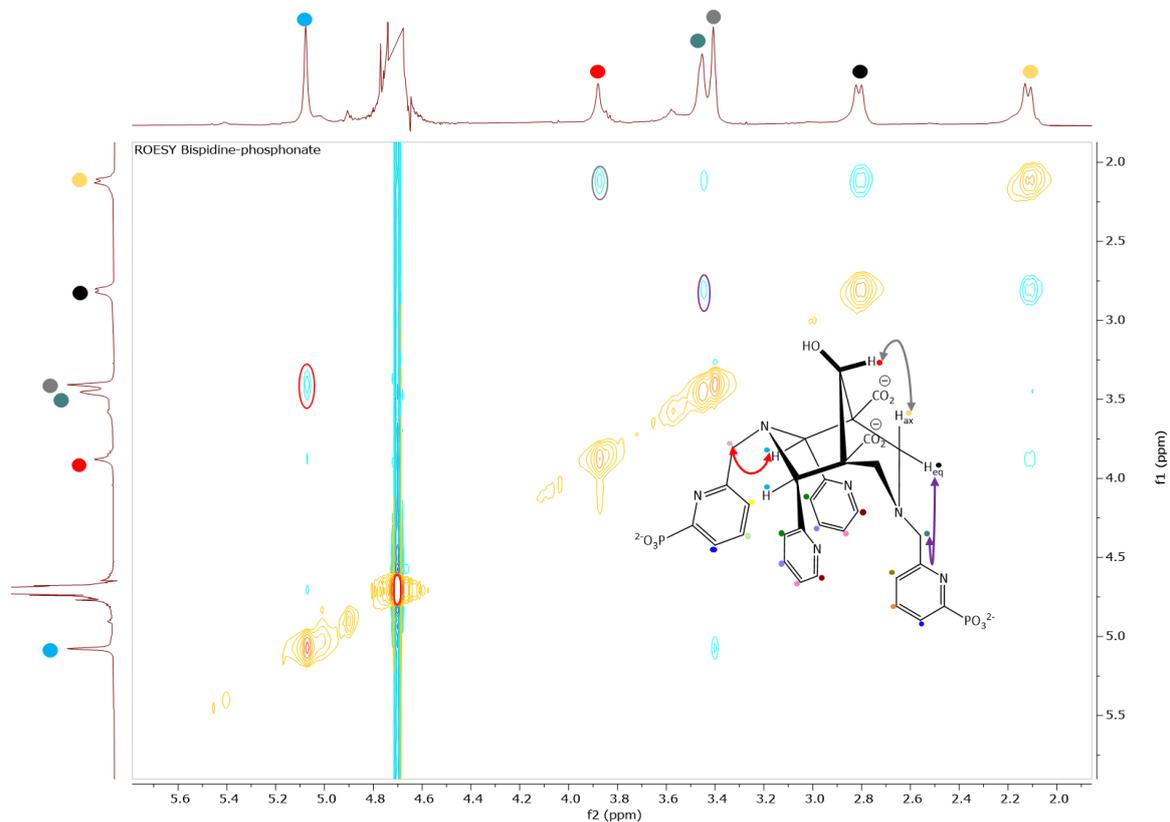
Spectre 3 : Superposition spectre RMN ^{31}P de H_6L1 à différents pD (D_2O , 125 MHz, 25°C). (a) pD 12,1 ; (b) large excès de TFA.

L'attribution des signaux à ce pH a été possible par RMN COSY, HSQC et ROESY.



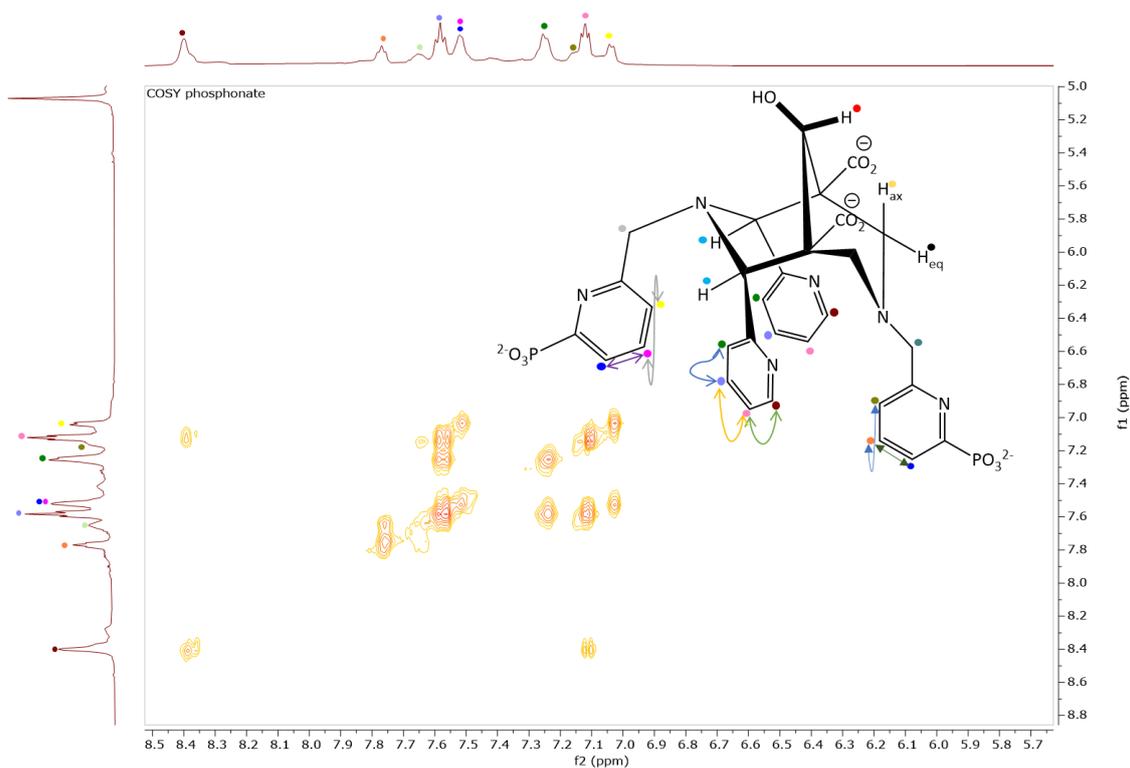
Spectre 4 : RMN ^1H de $\text{H}_6\text{L1}$ (D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; pD 12,1)

En prenant le spectre depuis les plus bas déplacements chimiques, on retrouve à 2,21 ppm les protons axiaux du pseudo système AB, puis les deux autres protons équatoriaux à 2,88 ppm. Les deux méthylènes liant les substituants au motif bispidine peuvent aussi être très bien différencié. En analysant la ROESY (Spectre 5), on voit clairement la corrélation du proton à 3,49 ppm et les CH à 5,16 ppm. De la même manière le second méthylène à 3,53 ppm possède une corrélation avec le pseudo système AB ; la corrélation la plus intense étant observée avec les protons axiaux. L'orientation du proton de réduction à 3,96 ppm s'identifie rapidement avec la RMN ROESY où l'on voit clairement le couplage de celui-ci avec les protons axiaux du pseudo système AB. A 5,16 ppm on sait qu'il s'agit des protons CH en α de N3 (Spectre 5).



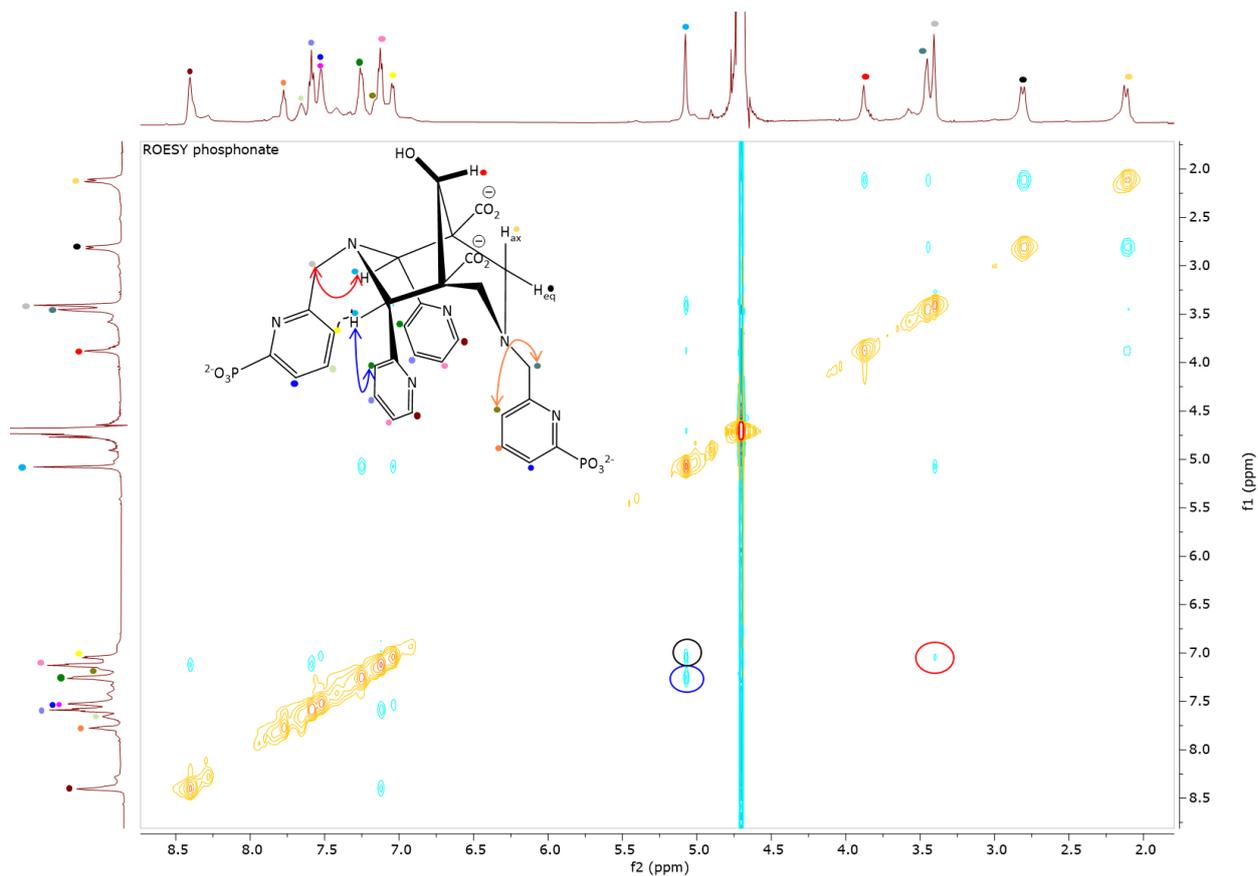
Spectre 5 : RMN ROESY de **H₆L1** (D₂O ; 500 MHz ; 25°C ; pD 12,1), zoom entre 5,6 ppm et 2 ppm.

L'assignation des protons aromatiques a pu être obtenue par la COSY ¹H-¹H. Comme nous avons vu sur toutes les bispidine précédentes l'objectif premier est de trouver tous les signaux du système aromatique du motif bispidine (intégrant pour 2-2-2-2). On sait que le signal le plus déblindé à 8,49 ppm correspond au proton en α de l'azote des pyridines. En utilisant la COSY ¹H-¹H on sait que son voisin se situe à 7,21 ppm, en suivant ce schéma on retrouve tous les signaux aromatiques des pyridines de la bispidine. Concernant les protons aromatiques des substituants en N3 et N7, on sait par avance quel cycle aromatique est lequel grâce à la corrélation en ROESY des protons méthylène à 3,49 ppm et 3,53 ppm. On observe une corrélation en ROESY du proton à 3,49 ppm et un proton aromatique à 7,13 ppm (Spectre 6). Cela permet de confirmer que le proton à 7,13 ppm, et à nouveau, on observe ses corrélations en COSY ¹H-¹H pour remonter à tous les autres protons (Spectre 6). La même opération est effectuée avec le second cycles aromatiques afin de déterminer la position des protons. Toutes ces informations permettent de reconnaître tous protons de la molécule sur le spectre RMN ¹H (Spectre 4). A noter que pour observer la corrélation entre le méthylène à 3,53 ppm et le proton du substituant à 7,25 ppm, il est nécessaire de zoomer d'avantage le spectre ROESY (Spectre 5).



Spectre 6 : RMN COSY ^1H - ^1H de **H₆L1** (D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; pD 12,1). 5,7 ≤ ppm ≤ 8,5.

Le dépouillement du spectre ROESY nous a permis d'avoir une information concernant la conformation du bicyclic. Une corrélation très inattendue est observée entre le proton à 5,16 ppm et le proton à 7,34 ppm. Cette corrélation est très importante car en conformation chaise-chaise elle ne peut exister, cependant avec une conformation bateau-chaise elle est tout à fait pertinente. On en conclut donc que le système est conformation bateau- chaise (Spectre 7). Par ailleurs, nous avons l'habitude d'observer un couplage J_4 en W entre les protons en α de N3 et les protons axiaux du pseudo système AB pour les bispidoles en conformation chaise-chaise.^[92] Il s'avère que la conformation chaise-bateau ne permet pas ce couplage W, ce qui renforce notre hypothèse.



Spectre 7 : RMN ROESY de H_6L1 (D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; pD 12,1).

B. Synthèse et caractérisation de H_4L2

i. Synthèse de H_4L2

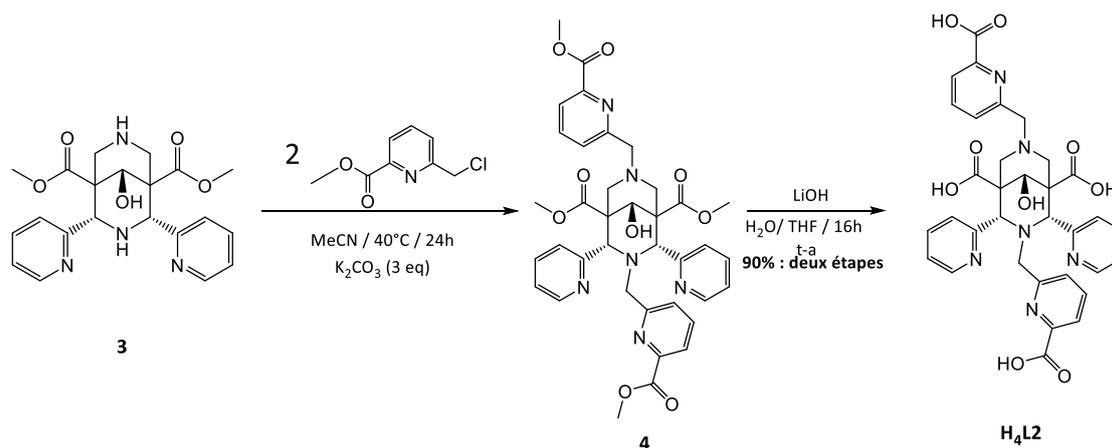


Figure 49 : Voie de synthèse de H_4L2 .

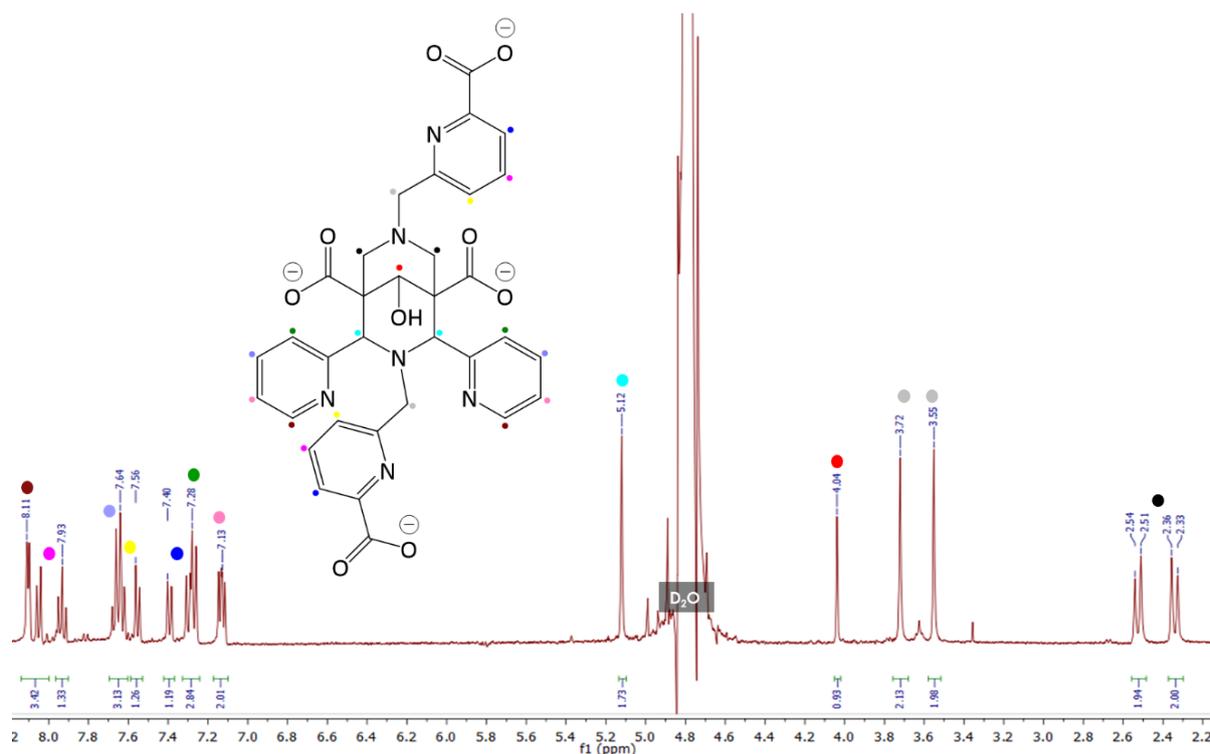
La synthèse débute avec l'intermédiaire **3**, il s'agit d'une substitution nucléophile effectuée dans l'acétonitrile à 40°C en présence du substituant (sensible aux fortes températures) et de carbonate de potassium. Celle-ci est arrêtée au bout de 24h de réaction. Le produit **4** est confirmé par

plaque chromatographique sur couche mince et MALDI, il est utilisé ainsi sans purification supplémentaire (Figure 49).

La dernière étape consiste en la saponification des fonctions esters pour obtenir les fonctions acides carboxyliques **H₄L2** permettent une meilleure solubilité du ligand final en milieu aqueux. Cette étape est effectuée avec l'hydroxyde de lithium dans un mélange H₂O/THF 6/4). Ce mélange de solvants est nécessaire afin de solubiliser **4** et l'hydroxyde de lithium. Le ligand **H₄L2** a été purifié sur colonne chromatographique C18 en phase inverse avec H₂O/CH₃CN et isolé avec un rendement de 90% sur deux étapes (175 mg). Les produits ont été caractérisés par RMN ¹H, HSQC, COSY et spectrométrie de masse. Une synthèse à plus grande échelle a été effectuée en collaboration avec Lucas Petitpoisson, doctorant au laboratoire.

ii. Caractérisation de H₄L2

Le Spectre 8 du ligand **H₄L2**, se dépouille aisément et tous les signaux peuvent être assignés. Les études RMN 2D de ce ligand révèle qu'il est en conformation chaise-chaise. Les études physico-chimiques ont été effectuées pour les deux ligands, j'ai fait le choix de présenter une grande partie des résultats que pour **H₆L1**.



Spectre 8 : RMN ¹H de **H₄L2** (D₂O, 400 MHz, 25°C).

À la suite des études RMN (¹H, COSY, HSQC, HMBC, ROESY et NOESY) nous avons confirmé que **H₄L2** est classiquement en conformation chaise-chaise, tandis que **H₆L1** est en conformation bateau-chaise (Figure 50). Nous savons que concernant la coordination de **H₄L2** la conformation sera conservée, mais l'on ne peut affirmer que **H₆L1** formera un complexe de terbium en conformation

chaise-chaise. Une grande partie du travail sera de confirmer le mode de coordination de **H₆L1** pour le terbium. A défaut de réussir à cristalliser le complexe de terbium nous étudierons des analogues en RMN à savoir le lanthane et le lutétium (les deux extrêmes des lanthanides) afin de prédire la conformation du complexe **[TbL1]**. De plus, la détermination des constantes de protonation du complexe **[TbL1]** peut nous aider dans la mesure où il y aurait une constante de protonation basique associée à une des amines en *N7* ou *N3*.

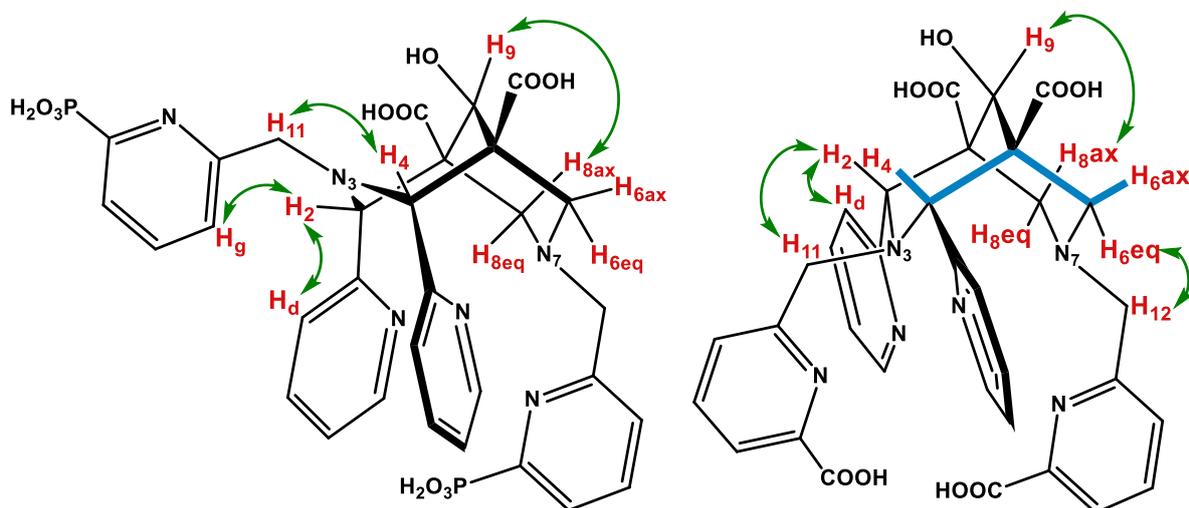


Figure 50 : Représentation schématique de la stéréochimie des ligands **H₆L1** (à gauche) et **H₄L2** (à droite) montrant le couplage *W* dans les expériences de RMN ¹H-¹H COSY (**W**) et Overhauser dans les expériences ROESY RMN ¹H-¹H (**U**).

III. Etudes potentiométrique et spectrophotométrique de H₆L1, H₄L2, [TbL1] et [TbL2]

Les titrages potentiométriques et spectrophotométriques en mode automatique et le traitement des données de ce chapitre ont été fait en collaboration avec l'équipe du Dr Mourad Elhabiri (LIMA – Strasbourg). Les titrages spectrophotométriques en batch et les traitements des données ont été faits avec nos propres équipements.

A. Etudes potentiométrique de H₆L1, H₄L2, [TbL1] et [TbL2]

i. Titrage de H₆L1 et H₄L2

Les constantes de protonation de H₆L1 et H₄L2 ont été déterminées par potentiométrie. Les courbes de titrage et les diagrammes de distribution des espèces sont à la Figure 51.

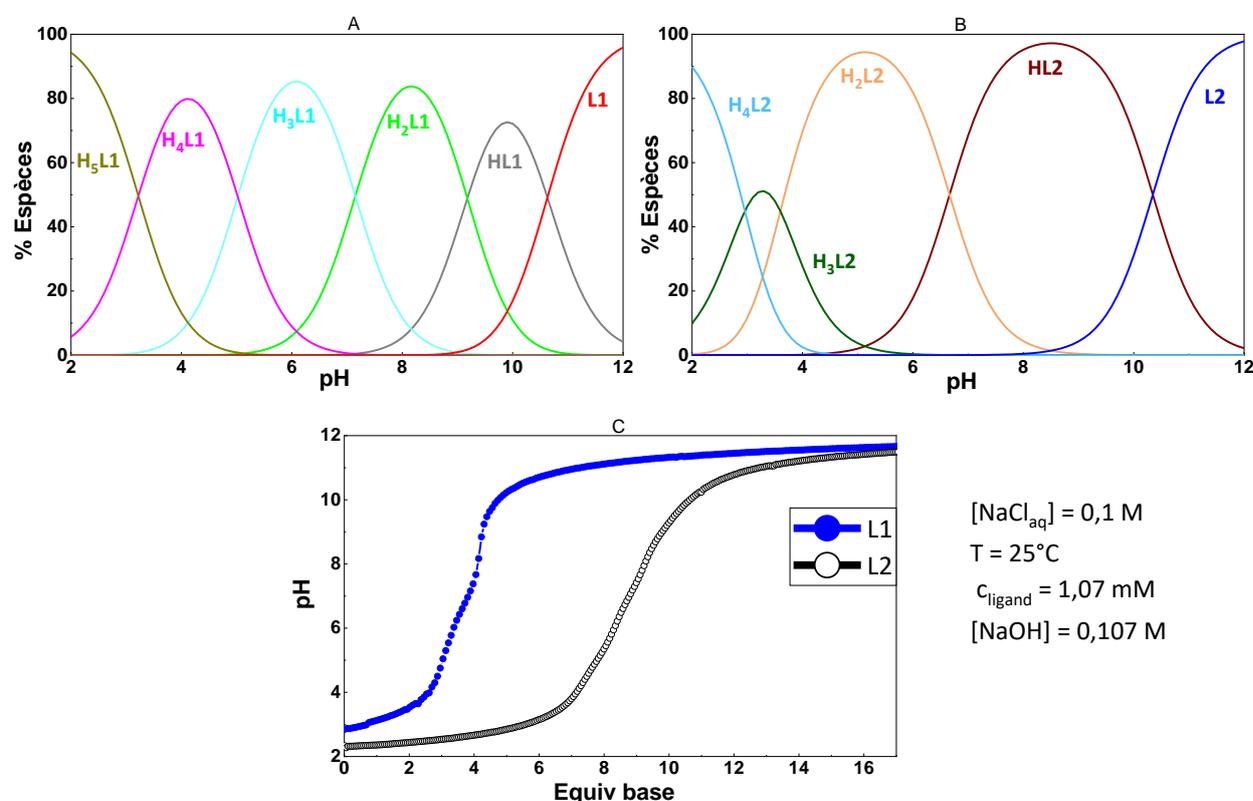


Figure 51 : (A) Diagramme de distribution des espèces de L1, (B) Diagramme de distribution des espèces de L2 et (C) courbes titrages des ligands L1 et L2.

Le ligand L1 possède au total 12 sites de protonation. Le titrage potentiométrique nous a permis de mesurer cinq constantes de protonation : la première $\log K_{H1} = 10,62(4)$ a été attribuée à une amine tertiaire, la seconde $\log K_{H2} = 9,18(8)$ a été attribuée à la protonation de la seconde amine tertiaire, la troisième $\log K_{H3} = 7,2(2)$ a été attribuée à un groupement phosphonate, la quatrième $\log K_{H4} = 5,0(4)$ a été attribuée au second groupement phosphonate, enfin nous avons mesuré une dernière constante de protonation $\log K_{H5} = 3,2(4)$ qui a été associée à un des acides carboxyliques (Figure 51). Concernant L2 nous avons 10 sites de protonation sur le ligand totalement déprotoné et

le titrage potentiométrique nous a permis de déterminer quatre constantes de protonation (Figure 51). Il a été possible de mesurer deux constantes de protonation basiques correspondant aux amines tertiaires *N*3 et *N*7 pour **H₆L1**, tandis que pour **H₄L2** une seule constante de protonation basique a été mesurée. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse conformationnelle par RMN ayant montrée une conformation chaise-chaise pour **H₄L2** et une conformation bateau chaise pour **H₆L1**. Nous avons avancé l'hypothèse que les répulsions électrostatiques liées à la conformation chaise-chaise ne nous permettent pas d'avoir la protonation de *N*3 et *N*7 dans la gamme $2 \leq \text{pH} \leq 12$. Tandis que la conformation bateau-chaise de **H₆L1** limite ces répulsions, permettant une protonation des deux amines tertiaires dans la gamme $2 \leq \text{pH} \leq 12$ (Tableau 8). Ce phénomène est connu (via les titrages potentiométrique d'autres ligands bispidine) et a été décrit dans le cas d'autres bispidines telles que **L_A** et **L_B**,^[89] **L_C**^[90] ou encore **L_{bis}** (Figure 52).^[92]

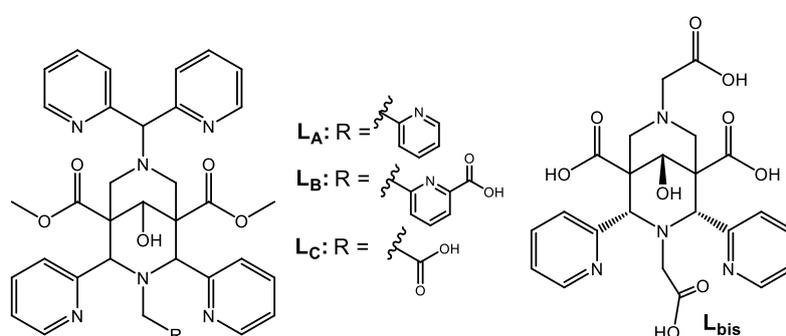


Figure 52 : Ligands de comparaison.

Tableau 8 : Constantes de protonation de différentes bispidines. $I = 0,15 \text{ M NaCl}$ ($0,1 \text{ M}$ dans le cas de **L1** et **L2**), 298 K.

	L1	L2	L_{bis}	L_A	L_B	L_C
Log K_{H1}	10,62(4)	>12	9,91(1)	>11,05	11,90	12,26(3)
Log K_{H2}	9,18(8)	10,63(3)	9,05(1)	6,73	5,44	6,52(2)
Log K_{H3}	7,2(2)	6,56(6)	5,66(2)	5,62	5,28	4,41(2)
Log K_{H4}	5,0(3)	3,38(7)	3,73(2)	5,27	1,36	2,83(3)
Log K_{H5}	3,2(4)	2,65(6)	2,74(1)	2,30		

On peut voir que le schéma de protonation est comparable avec une première protonation sur une amine tertiaire (dans le cas de la conformation chaise-chaise). Par la suite une seconde protonation sur le(s) substituant(s) en *N*7 et/ou *N*3 et enfin les protonations des acides carboxyliques dans le cas où ils ne sont pas protégés sous forme d'ester méthylique.

ii. Titration de **TbL2**

Avant d'effectuer des dosages, la cinétique de formation de **[TbL2]** a été évaluée par spectroscopie UV-visible à 264 nm à différents pH, ce qui a permis de déterminer une cinétique de

formation rapide pour ce complexe. Le titrage potentiométrique de **[TbL2]** a permis de déterminer la constante de stabilité du complexe $\log K_{TbL2} = 9,7(1)$. Aucune constante de protonation n'a été mesurée (Figure 53). A pH 8,3 nous avons observé la déprotonation du complexe. Toutefois, dans la mesure où le complexe est formé à pH 7,4 et que toutes nos études sont faites à ce pH, donc nous n'avons jamais à composer avec la forme déprotonée du complexe.

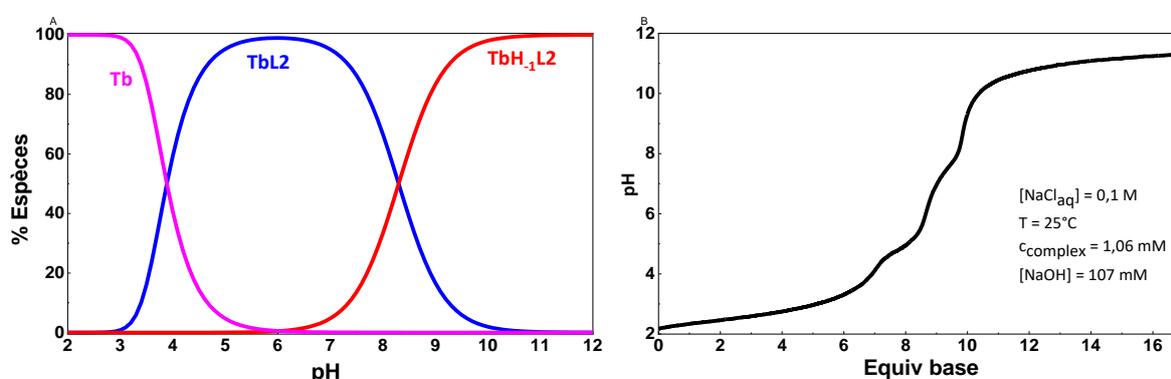


Figure 53 : (A) courbes de distribution des espèces de **L2** et (B) courbes titrages du complexe **[TbL2]**.

Concernant **[TbL1]**, la cinétique de complexation est plus lente à pH 6 et il est nécessaire d'attendre 20 min afin d'atteindre l'équilibre. Le titrage potentiométrique de **[TbL1]** a été effectué dans ces conditions, mais les résultats sont difficilement interprétables (probablement due au fait des nombreux sites de protonation et peut-être d'une mauvaise équilibration). Nous avons donc décidé d'effectuer un titrage spectrophotométrique en fonction du pH, en batch, avec un modèle plus simple afin d'avoir de meilleurs ajustements mathématiques.

B. Etudes spectrophotométriques de H₆L1, H₄L2 et TbL1

i. Titrage de H₆L1

Avant de titrer les complexes, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au ligand libre, afin de comprendre le système et d'en vérifier les constantes de protonation. Le spectre possède une bande d'absorption centrée vers 264 nm caractéristique des cycles pyridines due aux transitions $\pi-\pi^*$.^[12] Le titrage a été effectué à $2,6 \leq \text{pH} \leq 10,9$. Une légère évolution hyperchrome est observée à 264 nm, concomitante avec une évolution hypochrome à 285 nm, ce qui a permis de déterminer une constante de protonation $\log K_H = 9,3(2)$, comparable à la seconde constante de protonation mesurée par potentiométrie $\log K_{H2} = 9,18(8)$. Une seconde constante de protonation a été mesurée à $\log K_{H2} = 4,8(3)$ comparable à la quatrième constante de protonation $\log K_{H4} = 5,0(3)$ (Figure 54).

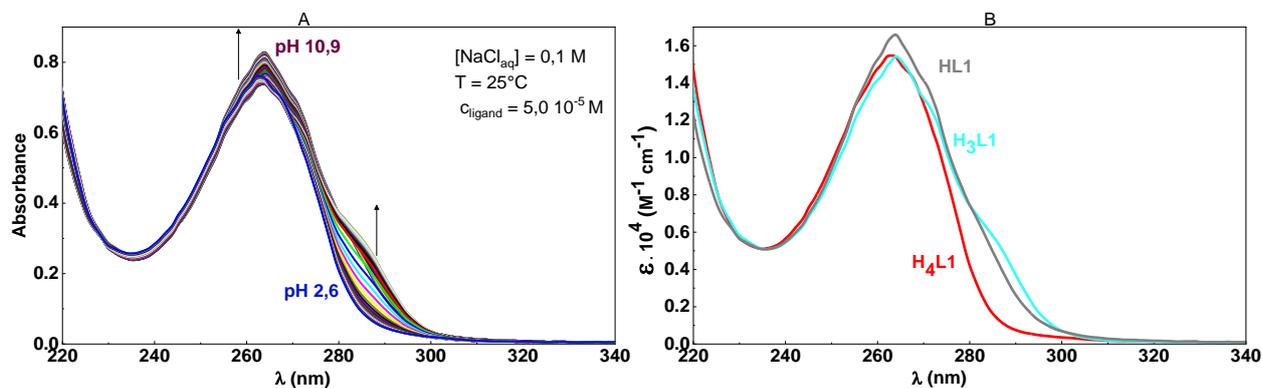


Figure 54 : (A) dosage spectrophotométrique de **L1** en fonction du pH. (B) spectres calculés des espèces de **L1**.

H₅L1, **H₂L1** et **L1** sont des espèces silencieuses au titrage spectrophotométrique, tandis que le titrage potentiométrique permet de mesurer d'avantage d'espèces (Figure 55).

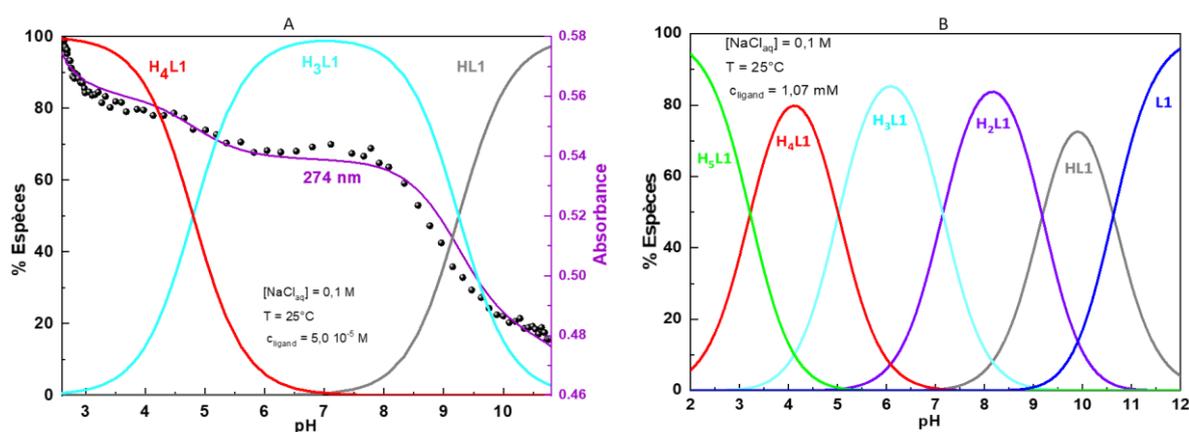


Figure 55 : (A) distribution des espèces de **L1** déterminée par UV, les points expérimentaux et son ajustement à 274 nm. (B) distribution des espèces de **L1** déterminée par potentiométrie.

Concernant le titrage spectrophométrique de **H₄L2**, nous avons mesuré une première constante de protonation $\log K_H = 10,54(7)$ comparable à la première constante de protonation mesurée par titrage potentiométrique $\log K_H = 10,63(3)$. Une seconde constante de protonation a été mesuré à $\log K_{H2} = 6,53(7)$ comparable à la constante de protonation mesurée par potentiométrie à $\log K_{H2} = 6,56(6)$. Enfin nous avons mesuré une dernière constante de pronation par titrage spectrophométrique $\log K_{H3} = 3,33(1)$ comparable à une constante de protonation mesurée par titrage potentiométrique $\log K_{H3} = 3,38(7)$.

ii. Titrage UV et luminescence de [TbL1] à pH 5,5

Afin de déterminer une constante apparente du système nous avons effectué un titrage à pH 5,5 ([MES] = 20 mM, I = 0,1 (NaCl)) en batch avec un temps d'attente de 20 min avant d'effectuer la mesure (Figure 56). A pH 5,5 le complexe est suffisamment déstabilisé pour déterminer une constante de stabilité conditionnelle cohérente.

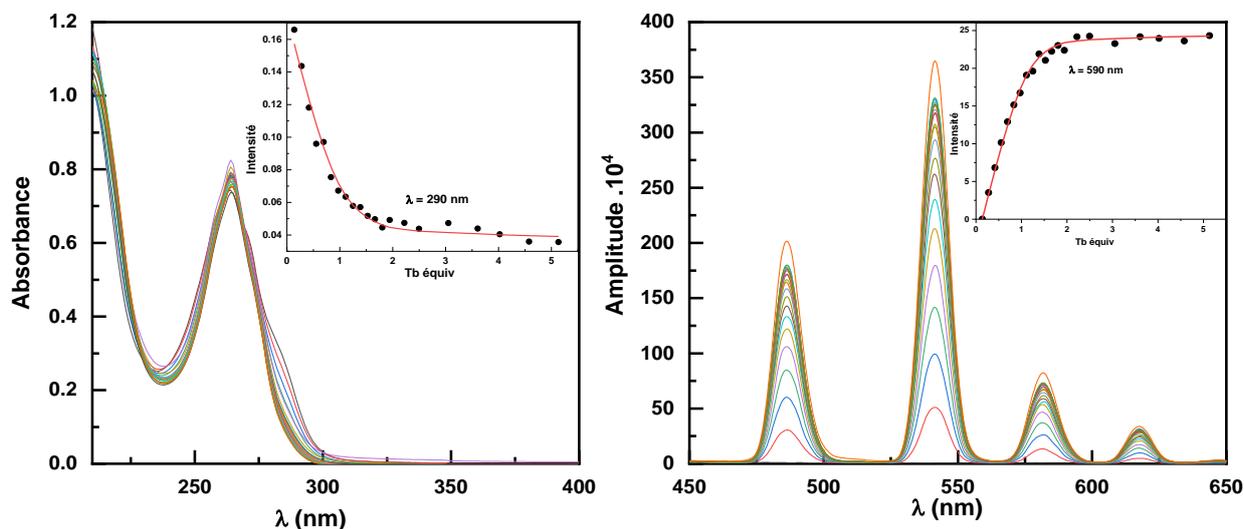


Figure 56 : Spectres d'absorption UV-visible (à gauche) et de luminescence (à droite) d'une solution de $5,25 \cdot 10^{-5}$ M de H_5L1 titrée en batch par des quantités croissantes de $TbCl_3$ dans l'eau ($I = 0,1$ (NaCl) ; tampon pH 5,5 [MES] = 20 mM ; $\lambda_{ex} = 268$ nm). Encadrés : Evolution de l'absorbance à 290 nm et de l'émission à 590 nm en fonction des équivalents de $TbCl_3$ ajoutés et résultat correspondant du traitement specfit.

À la suite du titrage nous avons pu déterminer une constante apparente pour chaque titrage (UV et luminescence). Le titrage UV, a permis de mesurer une constante apparente $\log K_{app} = 5,31(24)$. La mesure de la luminescence permet de déterminer une constante apparente $\log K_{app} = 5,4(1)$ (Figure 57). Nous avons ainsi pu déterminer un diagramme d'existence des espèces qui montre que l'on n'atteint pas 100% de complexe $[TbL1]$ à pH 5,5 et qu'il faut deux équivalents pour atteindre le maximum (Figure 57).

La constante apparente (K_{app}) aussi appelé constante conditionnelle est défini telle que (9) :

$$K_{app} = \frac{[ML_n]}{[L^*]^n [M^*]} \quad (9)$$

Avec $[M^*]$, la concentration totale de l'ion métallique n'ayant pas réagi avec le ligand et $[L^*]$, la concentration totale de ligand n'ayant pas réagi avec l'ion métallique.

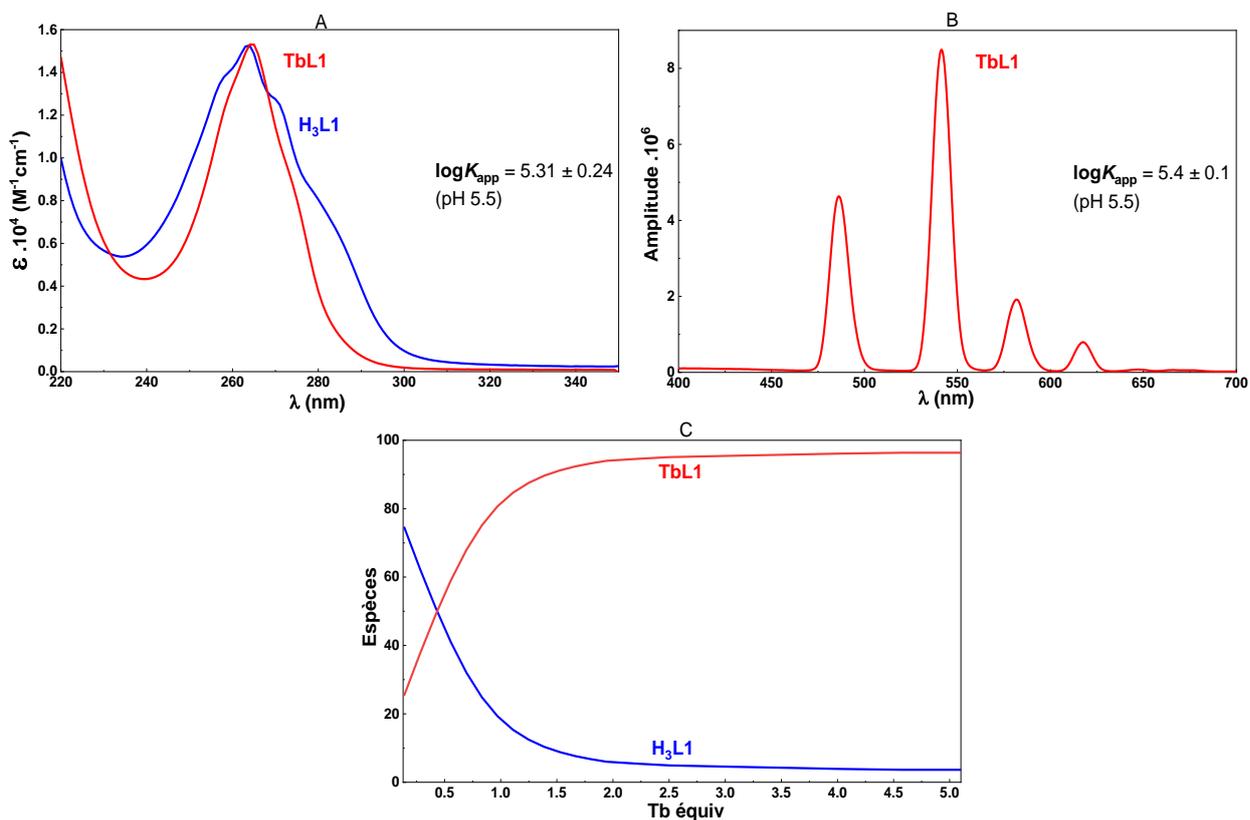


Figure 57 : (A) Spectre d'absorption calculé pour les espèces H₃L1 et [TbL1]. (B) Spectre d'émission calculé de [TbL1]. (C) Diagramme d'existence des espèces H₃L1 et [TbL1] en fonction de la quantité de TbCl₃. $c = 5,25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ (NaCl)}$; tampon pH 5,5 [MES] = 20 mM ; $\lambda_{ex} = 268 \text{ nm}$.

iii. Titrage [TbL1] (Figure 58)

Nous avons effectué le titrage spectrophométrique de [TbL1] en batch avec un temps d'équilibration de 3h. Celui-ci a été effectué $2,2 \leq \text{pH} \leq 11,1$ où l'on observe une évolution hypochromique par spectrophotométrie d'absorption. Afin de déterminer la constante de stabilité, nous avons utilisé les deux constantes de protonation mesurée par spectroscopie précédemment pour avoir un modèle plus simple.

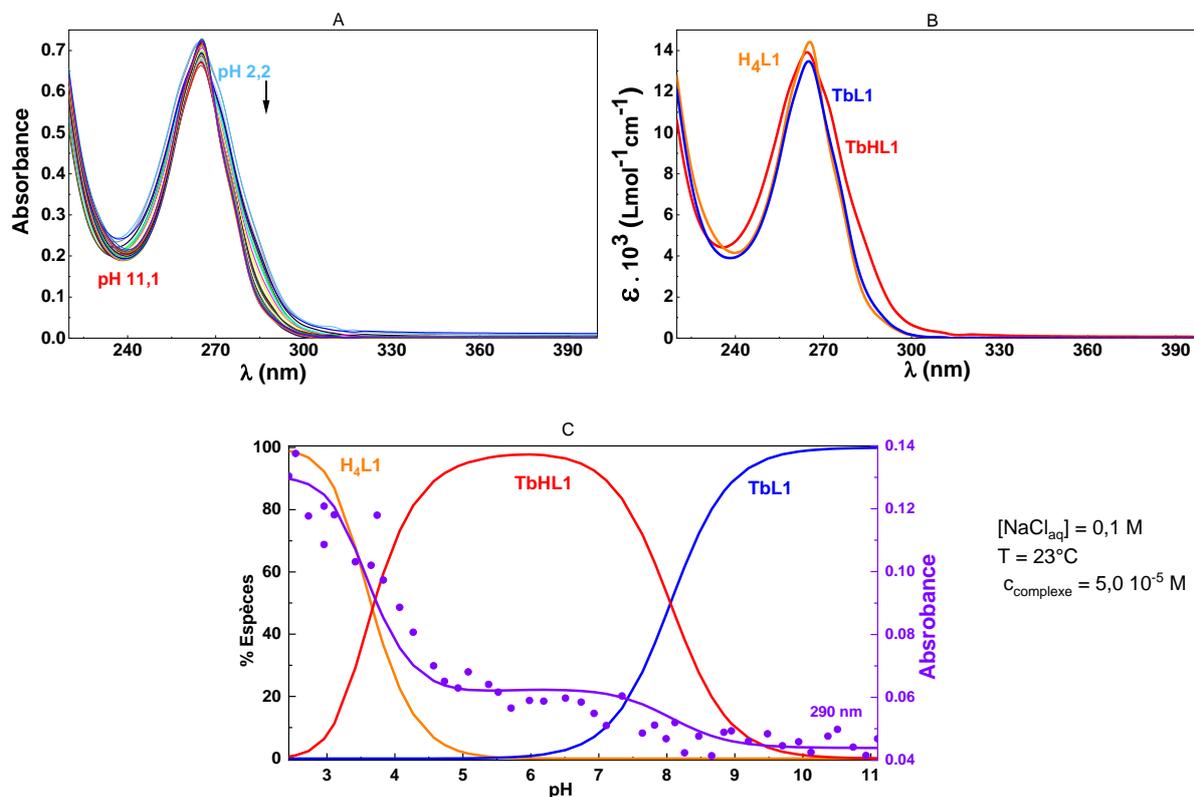


Figure 58 : (A) titrage direct UV de $[TbL1]$ en fonction du pH. (B) spectres calculés des espèces. (C) distribution des espèces en fonction du pH, les points expérimentaux et le fit à 290 nm.

A la suite du titrage nous avons déterminé une constante de stabilité $\log K_{TbL1} = 13,72(2)$ et une constante de protonation $\log K_{TbHL1} = 8,07(1)$ qui peut être attribuée soit à un phosphonate, soit à une amine tertiaire. Dans un souci d'assigner ces constantes de protonation, nous nous sommes intéressés à la mesure des spectres RMN 1H et ^{31}P des ligands et d'analogues diamagnétiques des complexes ($Ln = La, Lu$) à pH variables. Le récapitulatif des différentes constantes est donné dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Récapitulatif des paramètres thermodynamiques de **H₆L1** et **H₄L2**. En violet les données potentiométriques et en rouge les données des titrages spectrophométriques. Les titrages potentiométriques : I = 0,1 M (NaCl) ; T = 25°C ; c = 1,06(1) mM. ^[a] : I = 0,1 M (NaCl) ; T = 25°C (T = 23°C pour **[TbL1]**) ; c = 5,0 .10⁻⁵ M. ^[b] : I = 0,1 M (NaCl) ; T = 25°C ; c = 4,24 .10⁻⁵ M. ^[c] c_M = c_L = 10⁻⁵ M , pH 7,4.

	L1	L2
logK _{H1}	10,62(4)	10,63(3)
	-	10,54(7) ^[b]
logK _{H2}	9,18(8)	6,56(6)
	9,3(2) ^[a]	6,53(7) ^[b]
logK _{H3}	7,2(2)	3,38(7)
	-	3,33(1) ^[b]
logK _{H4}	5,0(3)	2,65(6)
	4,8(3) ^[a]	-
logK _{H5}	3,2(4)	-
∑logK _{Hi}	35,20	23,22
	14,1	20,4
logK _{TbL}	13,72(2) ^[a]	9,7(1)
logK _{TbHL}	8,07(1) ^[a]	-
logK _{Tb(OH)L}	-	-1,7(2)
logK _{app} (pH = 5,5)	5,3(3)	4,8(5)
logK _{app} calculé	5,285	4,1
pTb ^[c]	7,1	6.0

C. Titrage et caractérisation RMN de H₆L1, [LaL1] et [LuL1]

Pour tous les titrages : pD = pH + 0,4.

i. Titrage de H₆L1

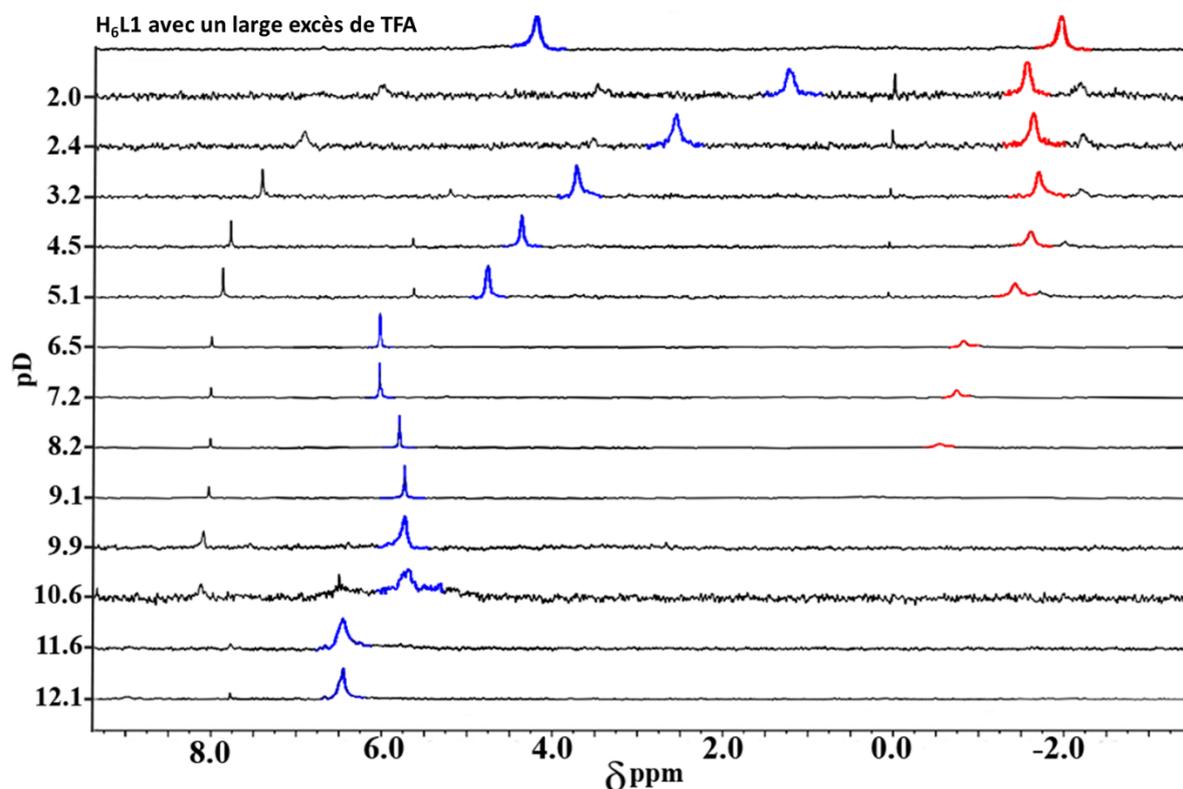


Figure 59 : Titrage RMN ³¹P de L1 en fonction du pD (D₂O ; 202 MHz ; 25°C ; c = 19,2 mM).

Tout d'abord, le spectre RMN ³¹P en milieu fortement acide (Figure 59 - D₂O + TFA) montre un ensemble unique de deux pics à $\delta P = 4,12$ ppm et $\delta P = -2,11$ ppm avec une intégration équivalente, qui ont été attribués sans ambiguïté aux pyridine-phosphonates en N3 et N7, respectivement. À pD = 12,1, ces deux pics se fondent en un seul pic large centré autour de $\delta P = 6,45$ ppm à pD = 12,1 (Figure 59). Entre pD = 12,1 et pD = 8,2, ce pic principal se divise progressivement et l'un des nouveaux signaux subit un déplacement chimique important au cours de l'acidification de l'environnement. Il y a un dédoublement de ce pic principal, l'un des nouveaux pics subissant un déplacement chimique important au cours de l'acidification (Figure 59). Ce déplacement vers les hauts champs est probablement lié à la protonation de l'amine tertiaire N7. On a supposé qu'à des pH acides, la formation d'une liaison hydrogène entre l'ammonium et le substituant pyridine-phosphonate place le groupe phosphonate ³¹P en N7 dans le cône de blindage de la pyridine. Une estimation approximative de la valeur $\log K_H \sim 9,8$ (Figure 60) a pu être évaluée à partir de la variation de δP qui est en bon accord avec la valeur des constantes de protonation mesurée par potentiométrie pure ($\log K_{H2} = 9,18(1)$). Des changements mineurs sont également observés entre pD = 5 et pD = 7, à partir desquels une valeur de $\log K_H \sim 5,6$ (Figure 60) a pu être estimée pour la protonation d'une unité de groupement $-PO_3^{2-}$ à comparer à $\log K_{H4} = 5,02(9)$ mesuré par potentiométrie. Comme prévu, la protonation de N3

exerce une influence négligeable sur le déplacement chimique ^{31}P de l'autre atome de phosphore dont l'interaction avec le substituant pyridyle en C2 et C4 est limitée dans la conformation bateau-chaise. Cependant, une forte variation du déplacement chimique de ce pic est observée entre 4 et 8, qui est attribuée à la protonation de l'autre groupe $-\text{PO}_3^{2-}$. Enfin, des modifications sont également observées dans des conditions très acides dues à la protonation des groupes pyridyle et $-\text{PO}_3\text{H}^-$ ($\log K_{\text{H}} < 2$). L'apparition formation d'espèces mineures ($\sim 10\%$) peut également être observée entre pD = 2 et 12, qui tendent à disparaître dans des conditions fortement acides (TFA) ou fortement basiques, et qui pourraient être attribuées à des arrangements supramoléculaires de formes protonées.

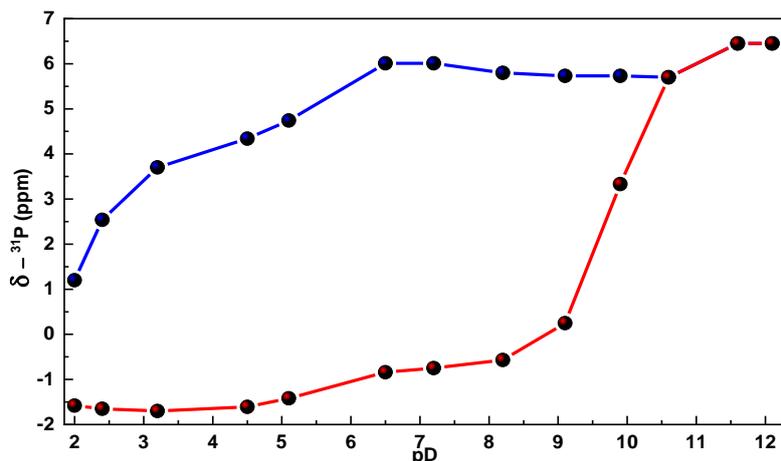


Figure 60 : Déplacement chimique des signaux RMN ^{31}P de **L1** en fonction du pD.

Le titrage ^1H de **L1** est plus difficile à interpréter mais l'on peut voir la présence d'une espèce unique à pD 11 et 12 (Figure 61).

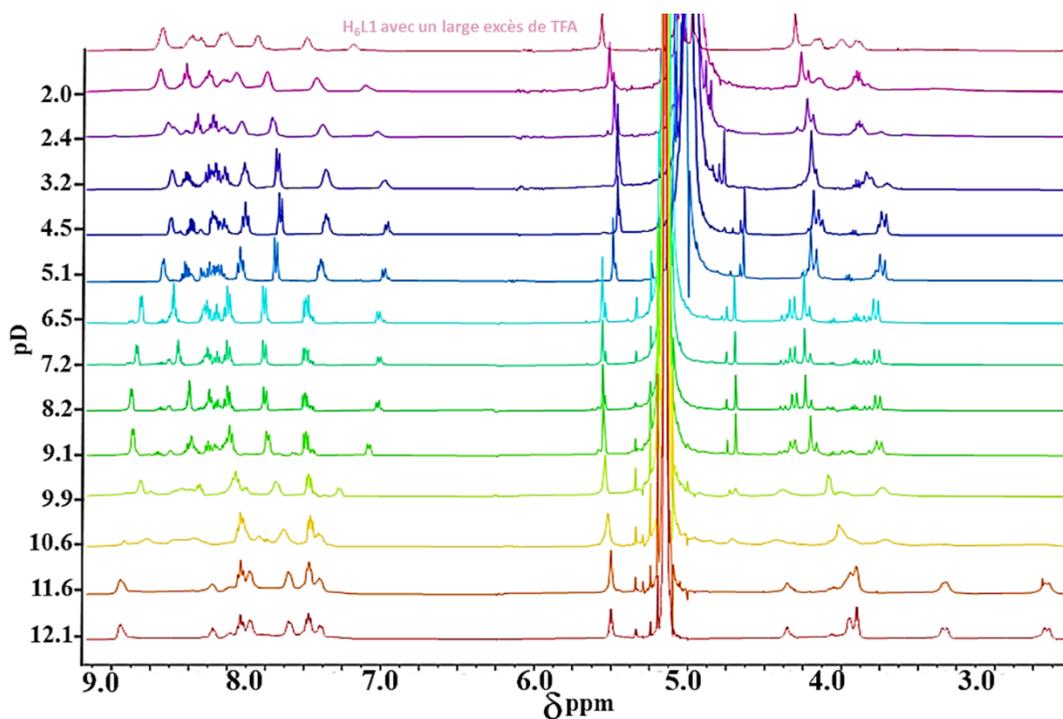


Figure 61 : Titrage RMN ^1H de **L1** en fonction du pD (D_2O ; 400 MHz ; 25°C ; $c = 19,2 \text{ mM}$). Référence : acétone.

ii. Titration et caractérisation de [LaL1]

Afin de connaître la conformation du complexe [TbL1], nous avons étudié d'autres lanthanides diamagnétiques par RMN. Dans le cas du lanthane, un titrage RMN ^{31}P (Figure 62) et ^1H (Figure 63) en fonction du pD a été réalisé afin de déterminer la distribution du complexe et ainsi déterminer le pD optimal pour effectuer les mesures RMN 2D. Le titrage a été effectué dans la gamme $2,18 \leq \text{pD} \leq 12,5$. Il faut noter une précipitation partielle entre 5,33 et 7,22 que nous avons supposée être associée à la formation d'une espèce protonée du complexe [LaL1] insoluble. Afin d'effectuer les mesures RMN entre pD 5,33 et 7,22 nous avons centrifugé et effectué les RMN de la solution sans le précipité. A des pH plus basiques, le culot se solubilise à nouveau. A noter que les mesures RMN de [TbL1] ont été faite mais ne sont pas interprétables.

a. Titrage de [LaL1]

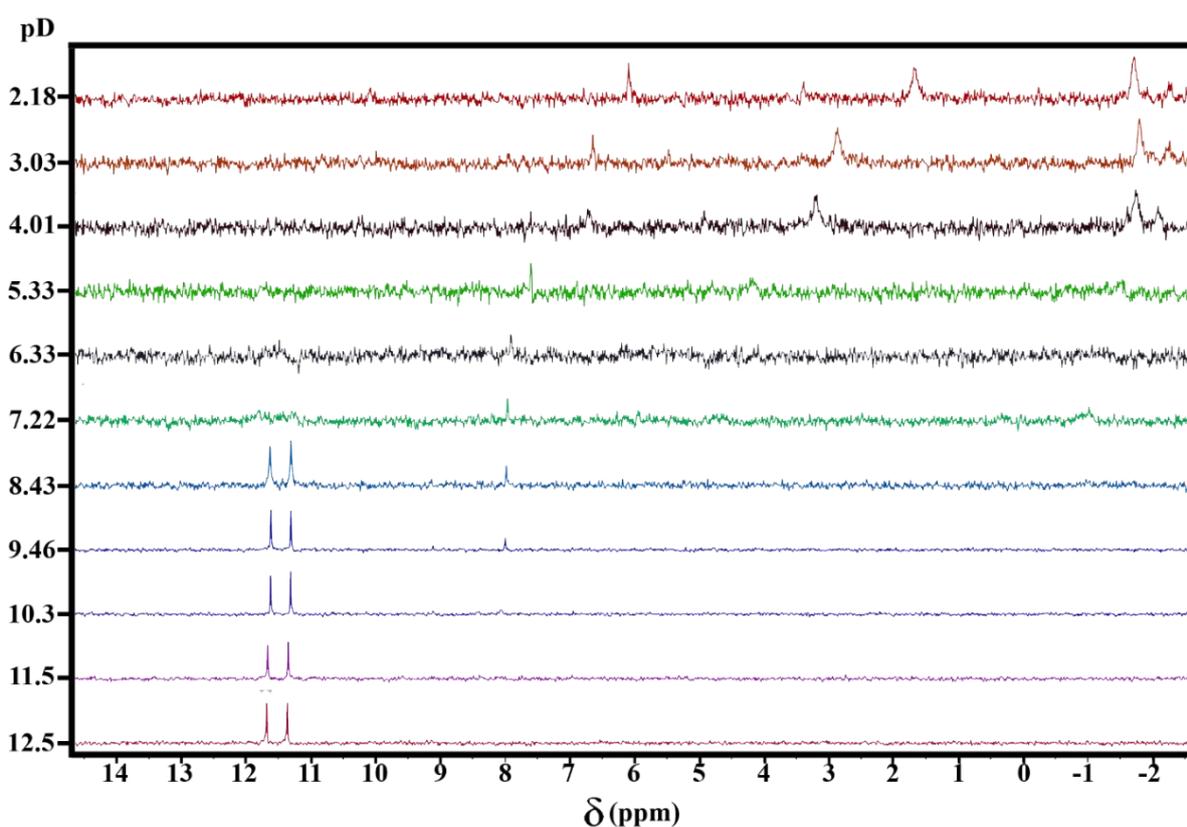


Figure 62 : Titrage RMN ^{31}P de [LaL1] en fonction du pD (D_2O ; 202 MHz ; 25°C ; $c = 9,6 \text{ mM}$).

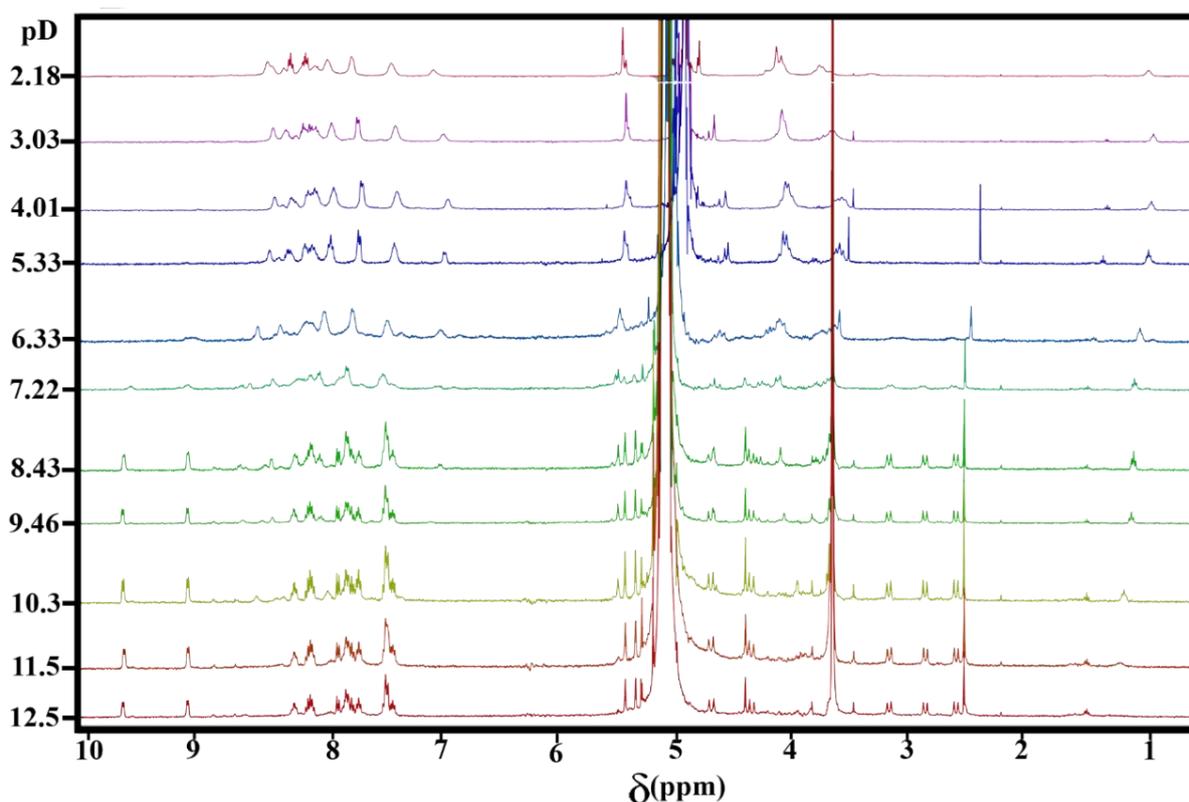


Figure 63 : Titrage RMN ^1H de **[LaL1]** en fonction du pD (D_2O ; 400 MHz ; 25°C ; $c = 9,6 \text{ mM}$). Référence : acétone

Le titrage par RMN proton est difficile à interpréter, mais il est intéressant de noter la disparition progressive du ligand pour conduire au complexe **[LaHL1]** et puis par la suite le complexe final. De plus, la formation du complexe final **[LaL1]** conduit à un dédoublement de tous les pics ; nous avons supposé ici que la coordination de la seconde amine tertiaire rend les protons non équivalents (Figure 63).

En suivant les déplacements chimiques du phosphore en fonction du pD (Figure 64), nous faisons les observations suivantes : (1) Dans la gamme $2,18 \leq \text{pD} \leq 5,33$ on a majoritairement du ligand libre, que l'on peut voir via la superposition des déplacements chimique du phosphore du ligand et du complexe en fonction du pD. (2) Pour les valeurs $5,33 \leq \text{pD} \leq 7,22$ il s'agit d'une région difficile à interpréter en suivant le signal du phosphore qui est très large. Néanmoins les spectres RMN proton permettent une analyse, ce qui permet d'affirmer qu'il ne s'agit pas du ligand libre mais une espèce protonée du complexe **[LaL1]**. (3) A partir de pD 7,22, on observe la formation de l'espèce finale, nous permettant d'estimer une constante de protonation aux alentours de $\log K_{\text{H}} \approx 7,4$. Nous associons cette constante à la seconde amine tertiaire, car conduisant à des protons diastéréotopiques observés par RMN ^1H .

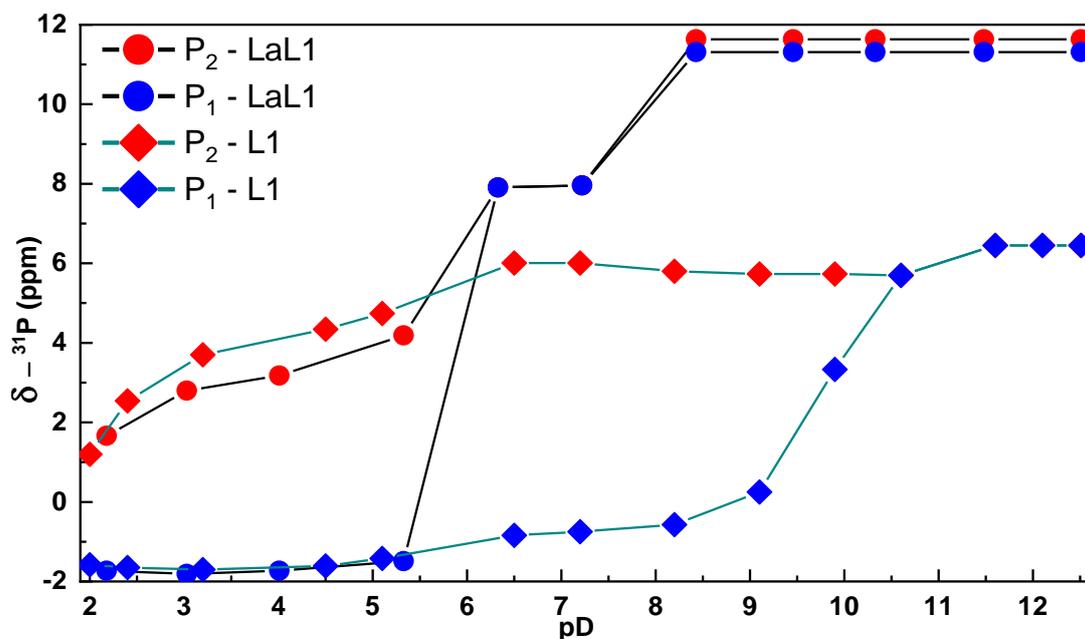


Figure 64 : Déplacement chimique des signaux RMN ^{31}P de **H₆L1** et [**LaL1**] en fonction du pD.

b. Caractérisation de [**LaL1**]

Une fois le titrage achevé, nous avons conservé la solution de complexe afin d'effectuer des études RMN plus approfondies (COSY ^1H - ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, NOESY et ROESY). Cela nous a permis d'attribuer tous les pics (Figure 65).

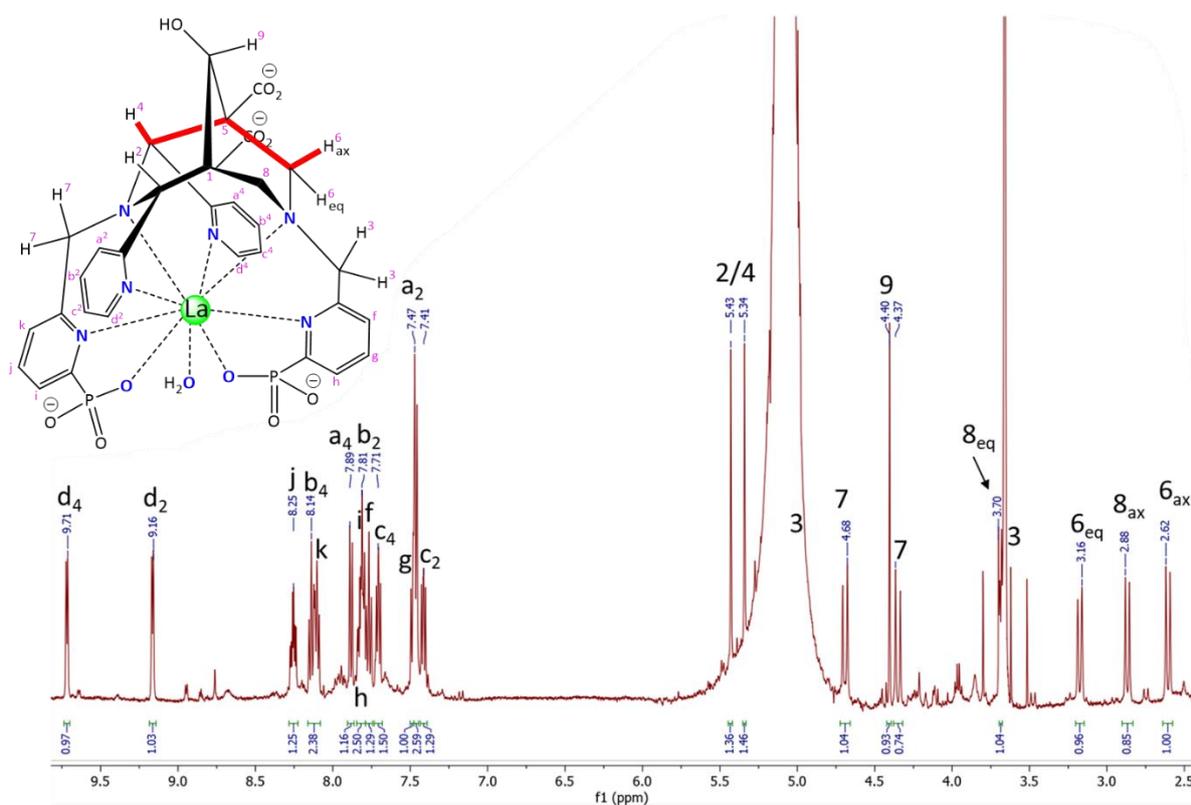


Figure 65 : Caractérisation du spectre RMN ^1H de **LaL1** (D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; c = 9,6 mM).

Une fois le dépouillement du spectre RMN proton effectué, nous avons pu analyser le spectre RMN 2D COSY ^1H - ^1H afin de déterminer la conformation du complexe (Figure 66). Nous avons ainsi pu

confirmer une conformation chaise-chaise de la bispidine au sein du complexe **[LuL1]**, via le couplage scalaire en *W* des protons $H_{2/4}$ avec les protons axiaux de $H_{6/8}$ (Figure 66). Les pics secondaires observés sont attribués à du ligand libre en excès.

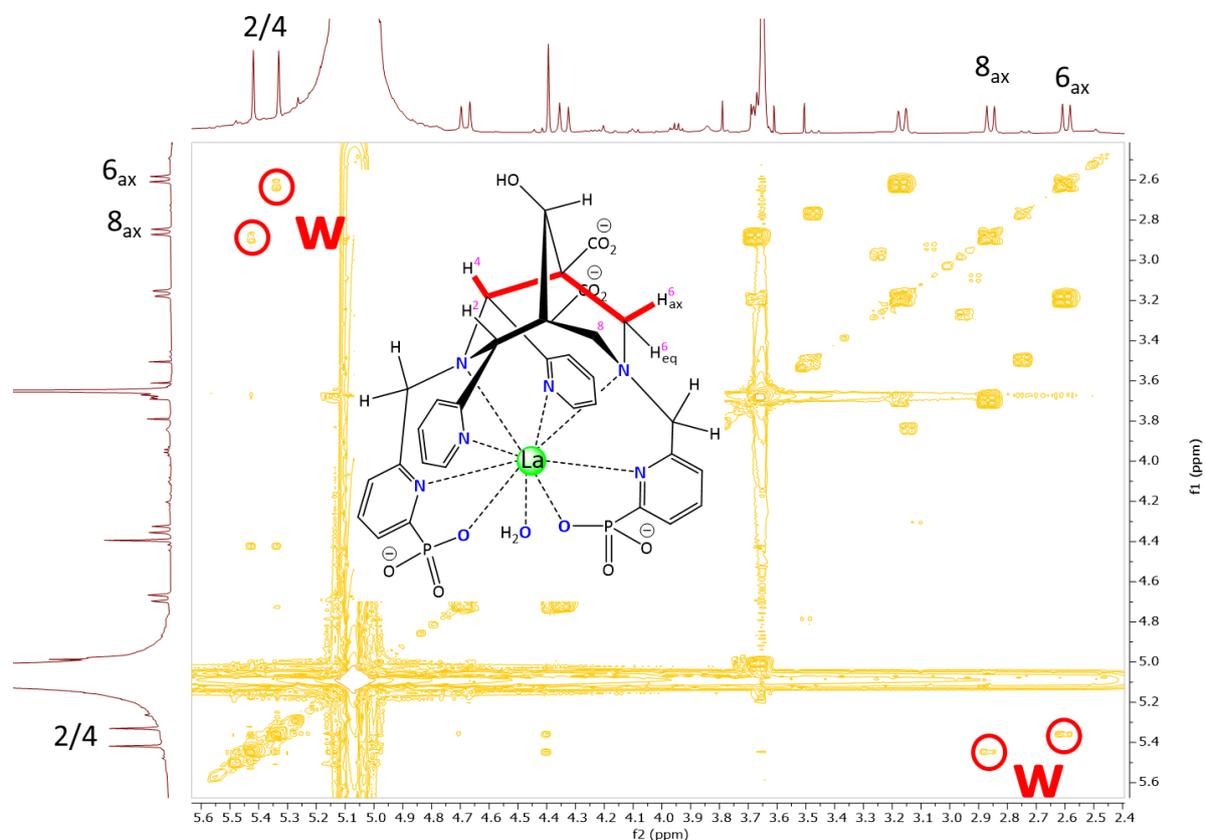


Figure 66 : Couplage scalaire *W* entre $H_{6/8_{ax}}$ et $H_{2/4}$ en RMN COSY 1H - 1H de **[LuL1]** (pD 12,51 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; $c = 9,6$ mM).

iii. Formation et caractérisation de **[LuL1]**

a. Formation de **[LuL1]**

Afin de confirmer la conformation du complexe **[LuL1]** nous avons dans un premier temps cherché la zone de pH optimale pour former le complexe via un suivi par RMN ^{31}P (Figure 67) et 1H .

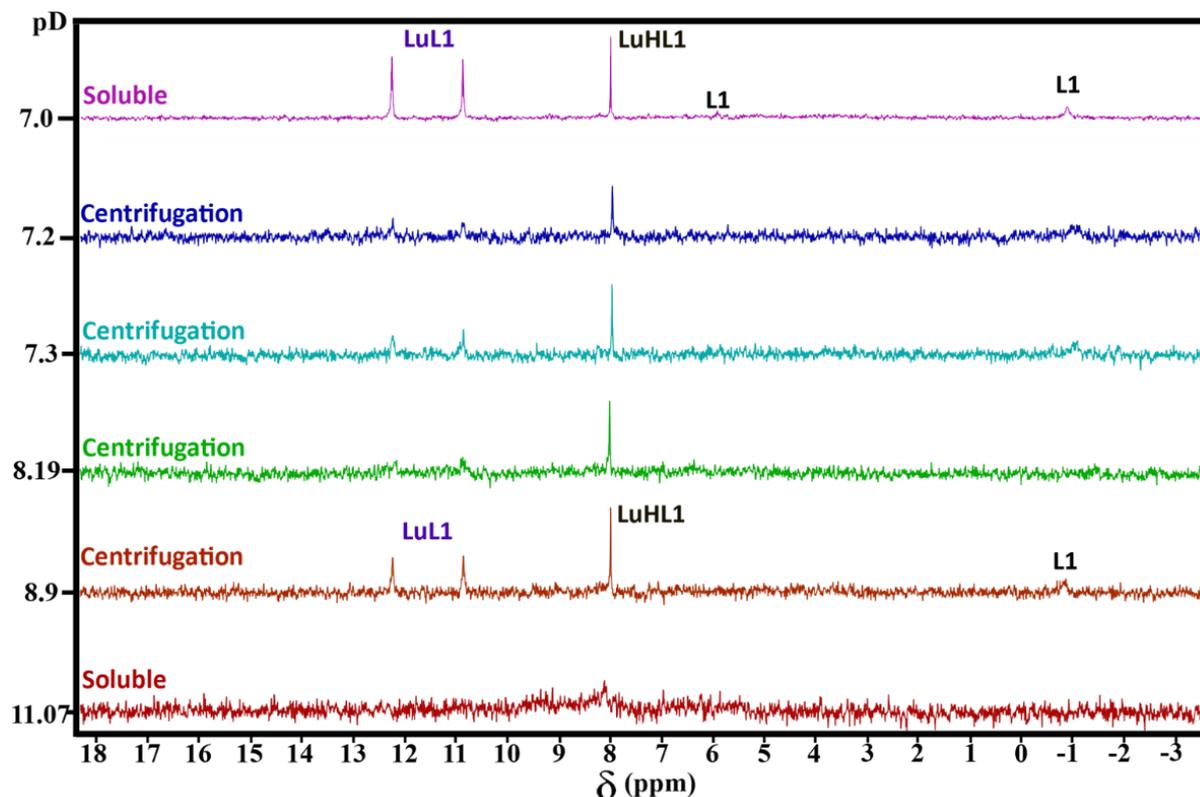


Figure 67 : Formation de $[LuL1]$ en fonction du pD suivie par RMN ^{31}P (D_2O ; 202 MHz ; 25°C ; $c = 14,7$ mM). Centrifugation : il s'agit des régions où l'on a un précipité que l'on a centrifugé, les mesures RMN sont faites avec la solution. Soluble : il s'agit des régions où aucun précipité n'est présent.

Tout d'abord nous avons commencé comme classiquement à former le complexe 1 : 1 à pD 7. Cependant les RMN ^{31}P (Figure 67) et 1H montrent que l'on a à la fois le complexe final (deux singulets), une autre espèce que l'on suppose être $[LuHL1]$ et le ligand libre. La région prédominante des complexes protonés de $[LuL1]$ et $[LaL1]$ est aussi la région de précipitation, il est donc difficile d'étudier ces espèces. Néanmoins, on sait qu'il ne s'agit pas de ligand libre au vu des déplacements chimiques du ^{31}P du ligand libre et des $[LuHL1]$ et $[LaHL1]$ (Tableau 10). Le produit devient à nouveau soluble à partir de pD 11, mais le signal RMN reste très large. Cela est probablement lié à l'hydrolyse du métal ($\log \beta_{Lu(OH)_3} = -7,57(5)$).^[199]

Tableau 10 : Déplacement chimique de ^{31}P des espèces $[LuL1]$, $[LaL1]$ et H_6L1 .

	$\delta[LuL1] - ppm$	$\delta[LaL1] - ppm$	$\delta[LuHL1] - ppm$	$\delta[LuHL1] - ppm$	$\delta(H_6L1) - ppm$
	pD 7	pD 8,4	pD 7	pD 7,2	pD 7
$^{31}P_1$	10,88	11,35	8,00	7,96	6,01
$^{31}P_2$	12,25	11,69	-	-	-0,74

b. Caractérisation de $[LuL1]$

Le meilleur spectre RMN 1H que nous avons obtenu est à pD 7,0 (Figure 68). On peut voir distinctement qu'il y a deux espèces dans le milieu. D'après le spectre RMN ^{31}P , nous en avons conclu

qu'il s'agit d'une espèce protoné, plus précisément une des amines tertiaires. Comme précédemment avec le complexe **[LaL1]**, on peut voir que tous les protons ne sont plus équivalents et donc il y a un dédoublement de tous les signaux pour l'espèce **[LuL1]**. Tandis que pour l'espèce protoné **[LuHL1]** on n'a pas de dédoublement des signaux comme on peut le voir pour les protons H2/4 pour **[LuHL1]** et **[LuL1]** qui sont dédoublés (Figure 68).

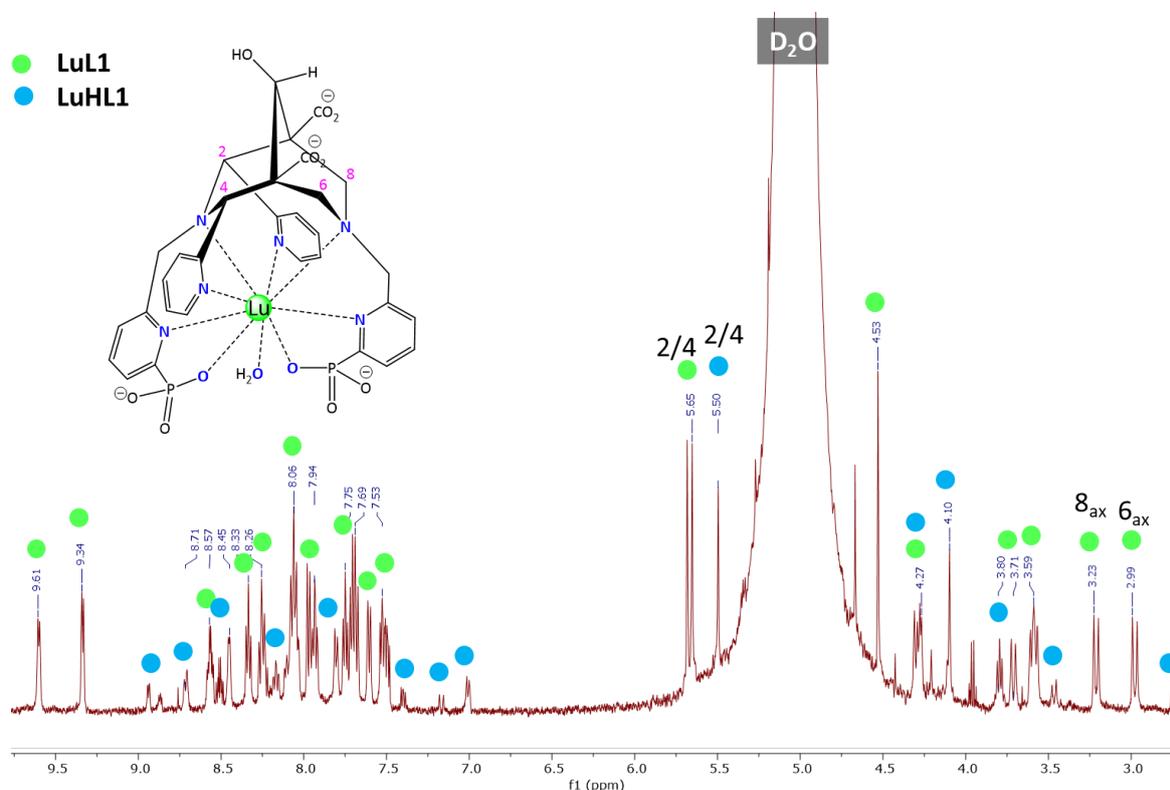


Figure 68 : Caractérisation du spectre RMN ^1H de **[LuL1]** (D_2O ; pD 7,0 ; 500 MHz ; 25°C ; c = 14,7 mM).

Nous avons effectué des mesures RMN COSY ^1H - ^1H au pD où l'on avait le meilleur signal, c'est-à-dire pD = 7,0. Ayant identifié les protons H6/8 axiaux et H2/4 on est à même de trouver s'ils ont des corrélations d'un couplage en W en RMN 2D. Les analyses RMN révèlent qu'il y a bien un couplage en W entre H2 et H8_{ax} mais aussi H4 et H6_{ax} cela confirme que le complexe est en conformation chaise-chaise (Figure 69).

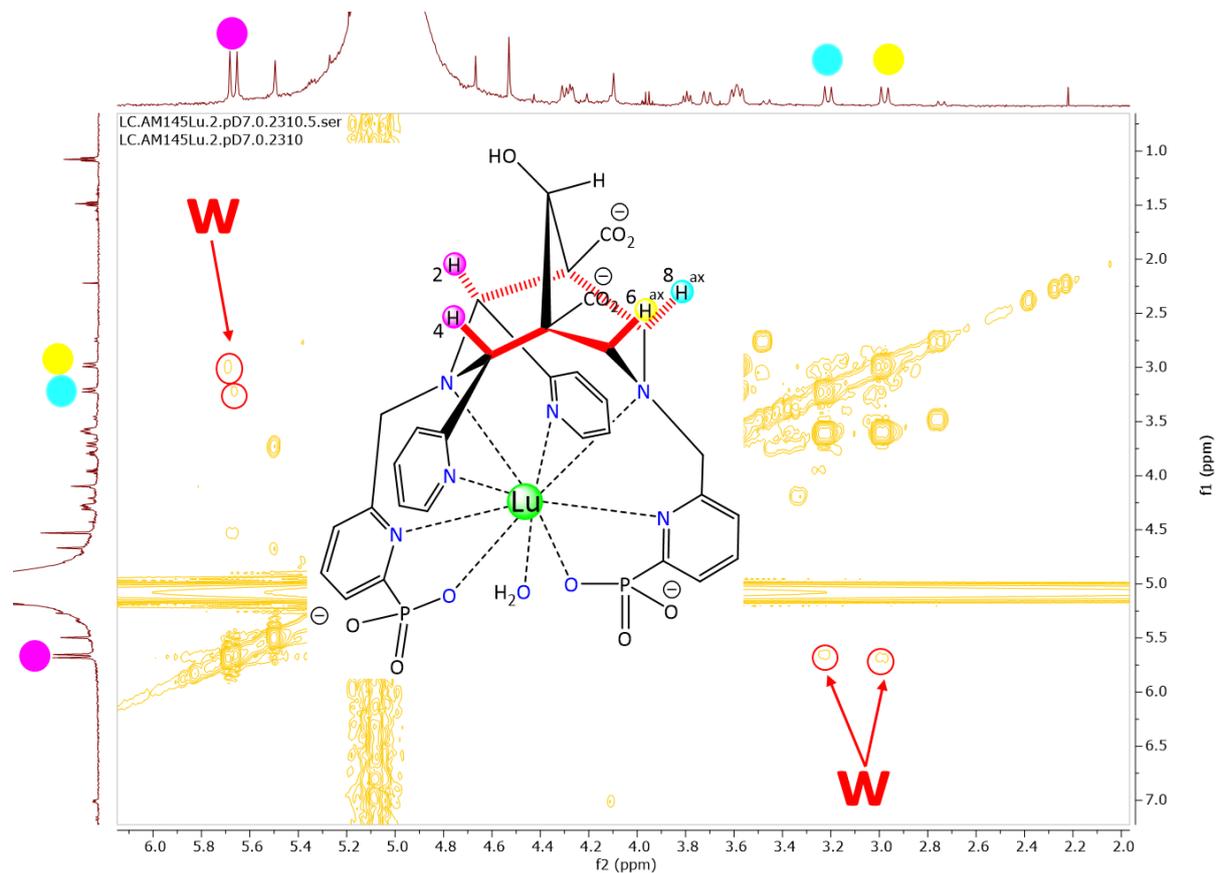


Figure 69 : Couplage W entre $H^{6/8}_{ax}$ et $H^{2/4}$ en RMN COSY 1H - 1H de **[LuL1]** (pD 7,0 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; $c = 14,7$ mM).

Durant ces études RMN nous avons démontré que le lanthane et le lutétium (les deux métaux aux extrémités de la série des lanthanides) forment des complexes en conformation chaise-chaise avec le ligand **H₆L1**. Ce constat a été extrapolé au terbium (qui est au centre de la série des lanthanides), le complexe **[TbL1]** est donc en conformation chaise-chaise.

IV. Propriétés de luminescence de [TbL1] et [TbL2]

Les propriétés spectroscopiques des complexes ont été étudiées dans l'eau et dans D₂O à pH 7, les spectres d'absorption et d'émission correspondants sont présentés à la Figure 70.

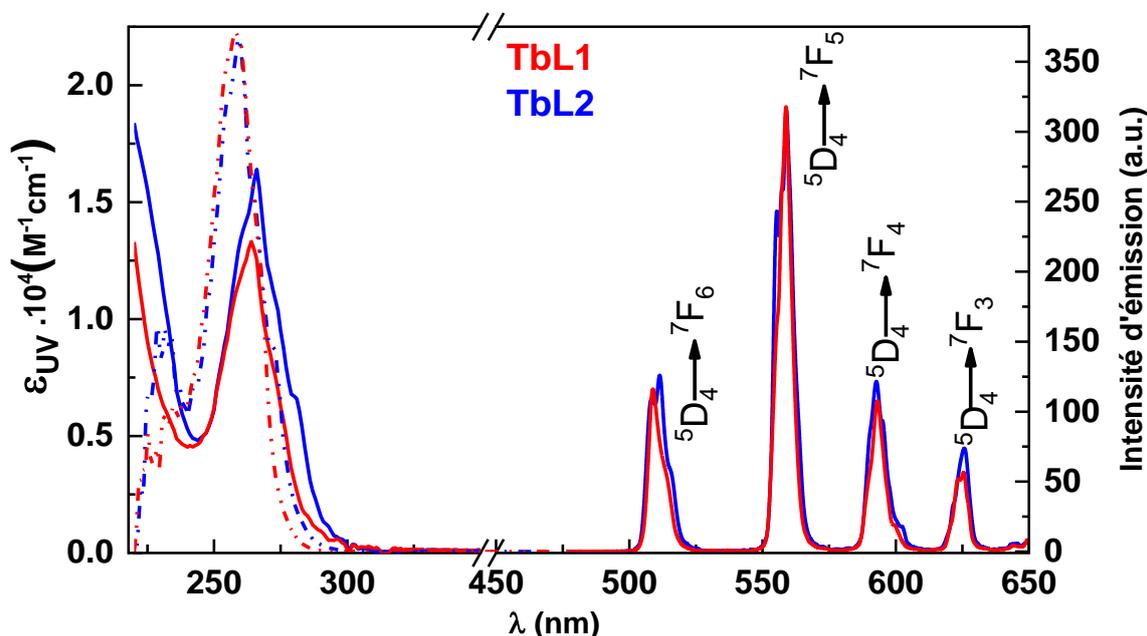


Figure 70 : Excitation normalisée (lignes pointillées, $\lambda_{ex}=545$ nm), absorption UV-visible et émission normalisée ($\lambda_{ex}=263$ nm) d'une solution D₂O de [TbL1] (ligne droite, rouge) et de [TbL2] (ligne droite, bleue).

Des paramètres supplémentaires sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Les principaux paramètres photophysique des complexes **TbL1** et **TbL2** dans H₂O et D₂O à pH = 7,0. λ : longueur d'onde, ϵ : coefficient d'extinction molaire, ϕ : rendement quantique, τ : temps de vie de luminescence, et q : nombre de molécule d'eau lié à l'ion métallique.

	λ_{ex} (nm)	ϵ_{H_2O} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ_{H_2O}	Φ_{D_2O}	τ_{H_2O} (μ s)	τ_{D_2O} (ms)	q
[TbL1]	263	13562	0,15(3)	0,29(6)	1,9(2)	3,3(3)	0,9(2)
[TbL2]	263	13916	0,5(1)	0,6(1)	1,7(2)	2,9(3)	0,9(2)

Comme attendu selon les précédentes études de H₂Bispa (cf. Chapitre 1-I-B) et de ses analogues, ^[30,189] les deux ligands sensibilisent efficacement l'ion Tb^{III}. Pour [TbL1] et [TbL2], les décroissances mono-exponentielles de la luminescence confirment la présence d'une espèce unique en solution avec une coordination octadentate du ligand et une molécule d'hydratation ($q \sim 1$), ce qui en excellent accord avec l'approche physico-chimique. A pH 7, [TbL2] est l'espèce prédominante, tandis que pour [TbL1], il s'agit de l'espèce protoné [TbHL1] (Figure 53 et Figure 58 respectivement). Une telle coordination n'est possible que si les deux ligands sont dans la conformation chaise-chaise lorsqu'ils sont complexés au Tb^{III}. Cela implique un changement de conformation dans le cas du ligand **H₆L1** lors de la complexation avec le Tb^{III} et est en accord avec les études conformationnelles par RMN. En outre, malgré la présence d'une molécule d'eau dans la sphère intérieure, le rendement quantique

($\Phi_{H_2O} = 0,5(1)$) et la durée de vie ($\tau_{H_2O} = 1,7(2)$ ms) de **[TbL2]** sont plutôt élevés, conformément aux données rapportées pour d'autres ligands présentant une antenne picolinate ^[200–202]. En revanche, le rendement quantique mesuré pour **[TbL1]** ($\Phi_{H_2O} = 0,15(3)$) est plutôt modeste malgré des durées de vie de luminescence légèrement plus longues dans les solutions aqueuses ($\tau_{D_2O} = 3,3(3)$ ms et $\tau_{H_2O} = 1,9(2)$ ms), ce qui pourrait être dû à un transfert d'énergie ligand-métal moins efficace dans le cas des antennes pyridylphosphonate. ^[195,203]

Il est intéressant de noter qu'aucune variation significative de ces durées de vie ou de l'intensité de la luminescence n'a été observée sur une large gamme de pH allant de pH = 1 à pH = 12 (Figure 71). Ces caractéristiques indiquent que ces complexes, et plus particulièrement le **[TbL1]**, semblent particulièrement intéressants pour le développement ultérieur de marqueurs luminescents à base de lanthanide. ^[204] Dans ce cas-ci, les complexes ont été formés, isolés et caractérisés par analyse élémentaire. Les mesures des temps de vie ont été faites à partir des poudres des complexes **[TbL1]** et **[TbL2]** à différents pH.

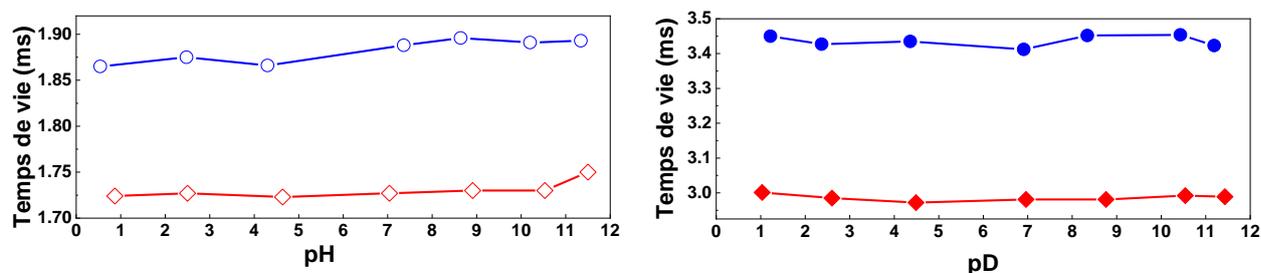


Figure 71 : Temps de vie de **[TbL1]** (bleu) et **[TbL2]** (rouge) en fonction du pH et pD.

V. Inertie cinétique de **[TbL1]** et **[TbL2]**

Outre une bonne stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique d'un complexe métallique est un paramètre essentiel et critique à contrôler dans le cadre d'une application biomédicale, en particulier dans le domaine du diagnostic médical et de la radiothérapie.

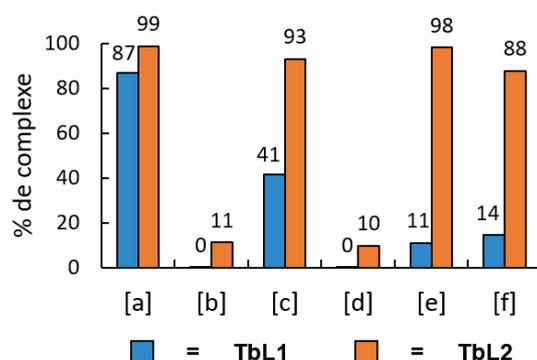


Figure 72 : Le % de complexe après deux mois dans les différents milieux. [a] = H₂O ; pH 7,4 / [b] = H₂O ; pH 2,0 / [c] = 50 equiv Zn ; pH 7,4 / [d] = 50 equiv Zn ; pH 2,0 / [e] = PBS / [f] = sérum de souris / n.d. = non déterminé.

Nous avons mesuré l'inertie cinétique des complexes **[TbL1]** et **[TbL2]** dans différents milieux (Figure 72) : (1) nous avons classiquement commencé par l'eau afin de mesurer l'influence du solvant. On peut voir qu'au bout de deux mois **[TbL2]** ne subit aucune influence, tandis que pour **[TbL1]** nous avons une diminution de 13% du signal. (2) Le second milieu étudié est l'eau à pH 2 (HCl). Dans celui-ci sans grande surprise nous avons la totalité de **[TbL1]** qui est dissocié tandis que pour **[TbL2]** 89% a été dissocié. (3) En présence de 50 équivalents de zinc à pH 7,4, une grande partie de **[TbL1]** est dissociée tandis que **[TbL2]** subit très peu de modifications. (4) En présence de 50 équivalents de zinc à pH 2, il n'y a plus de trace de **[TbL1]** tandis que **[TbL2]** nous avons à mesuré 10%. (5) Dans le tampon PBS **[TbL1]** se dissocie à plus de 89% tandis que **[TbL2]** est très peu influencé. (6) Dans le sérum de souris une large majorité de **[TbL1]** se dissocie tandis que pour **[TbL2]** seulement 12% ont sont dissocié.

VI. Conclusion

Afin de répondre à la demande en agents d'imagerie médicale pour la TEP, en particulier pour le suivi des traitements radiothérapeutiques, nous nous sommes intéressés au terbium. Celui-ci permet via son isotope ^{152}Tb émetteur de positon (β^+) d'effectuer de l'imagerie TEP et possède un isotope émetteur de particules β^- utilisables en radiothérapie, le ^{161}Tb .

Afin de complexer l'ion métallique Tb^{III} , nous avons développé deux ligands octadentates **H₆L1** et **H₄L2**. Les études de complexation ont été effectuées sur l'isotope naturel ^{159}Tb . La cinétique de complexation rapide de **[TbL1]** et **[TbL2]** nous a permis de déterminer leurs constantes de stabilité thermodynamique, à savoir $\log K_{\text{TbL1}} = 12,8(2)$ et $\log K_{\text{TbL2}} = 9,7(1)$. Le ligand **H₆L1** étant en conformation bateau-chaise, nous avons voulu confirmer que le complexe de terbium associé était bien en conformation chaise-chaise. Une vaste étude RMN a été effectuée, pour laquelle nous nous sommes aidé des deux lanthanides diamagnétiques des extrémités de la série lanthanide, à savoir le lanthane et le lutétium. Des titrages RMN en fonction du pD ont été effectués afin de déterminer la région de formation du complexe final. Une fois confirmé, nous avons effectué différentes mesures RMN (^1H , ^{31}P , COSY ^1H - ^1H , HSQC, ^{13}C , HMBC, ROESY et NOESY) afin de nous assurer que les complexes **[LaL1]** et **[LuL1]** étaient en conformation chaise-chaise, et par extension nous en avons conclu que le complexe **[TbL1]** était en conformation chaise-chaise. Les principaux paramètres photophysique des complexes **[TbL1]** et **[TbL2]** ont été étudiés. Dans l'eau, nous avons obtenu des temps de vie de 1,9(2) ms pour **[TbL1]** et 1,7(2) pour **[TbL2]**. La mesure des temps de vie correspondants dans D_2O nous a permis de mettre en évidence la présence une molécule d'eau dans la première sphère de coordination de chaque complexe. L'inertie cinétique des complexes **[TbL1]** et **[TbL2]** a été évaluée dans l'eau à différents pH, avec 50 équivalents de zinc ou encore dans un sérum de souris. Nous avons constaté qu'après deux

mois dans l'eau à pH 2, il reste 0% de **[TbL1]** et 11% de **[TbL2]**. En présence de 50 équivalents de zinc à pH neutre après deux mois, nous avons mesuré 41% de **[TbL1]** et 93% de **[TbL2]**, ce qui permet de dire que le complexe **[TbL2]** est cinétiquement plus inerte que **[TbL1]**. Dans le sérum de souris après deux mois il reste 14% de **[TbL1]** et 88% de **[TbL2]**, ce qui permet de dire que **[TbL2]** est plus pertinent pour des études biologiques que **[TbL1]** et qu'il présente un bon potentiel.

Afin d'envisager de l'imagerie TEP, il est nécessaire d'ajouter une unité de ciblage, pour cela un lien entre le ligand et l'unité de ciblage est nécessaire. Cette première étude a eu pour objectif de développer une première génération de chélateur du terbium à base de bispidine. Nous avons montré que la complexation est possible et rapide dans des conditions douces (20 min pour **[TbL1]** et instantanée pour **[TbL2]**) ce qui est un critère crucial pour de l'imagerie TEP. La seconde étape de ce projet sera de développer des voies de synthèse permettant d'intégrer un lien avec une fonction réactive pour ajouter une unité de ciblage (anticorps, nano-body, peptide, etc.) aux ligands **H₆L1** et **H₄L2**. Plusieurs possibilités s'offrent à nous parmi lesquelles nous pouvons envisager les structures représentées à la Figure 73. Nous pouvons envisager de substituer une ou deux fonctions acides carboxyliques par une ou deux amides. Il est aussi possible d'envisager la fonctionnalisation de l'alcool en C9.

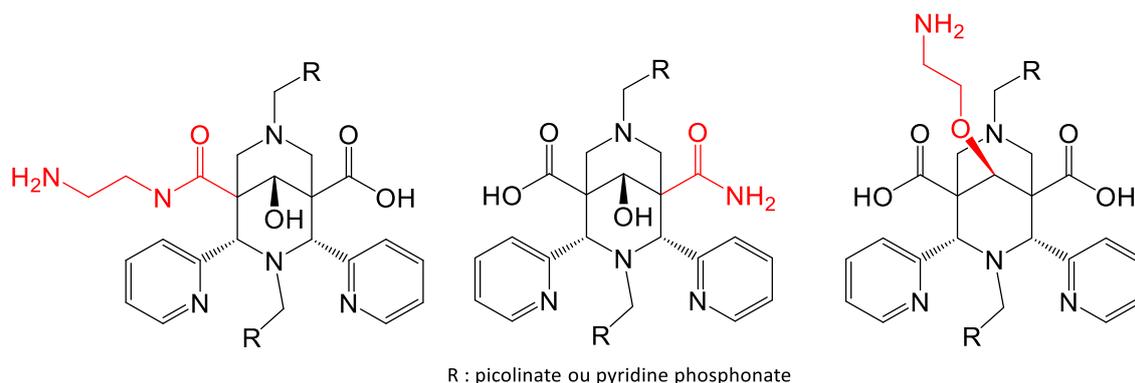
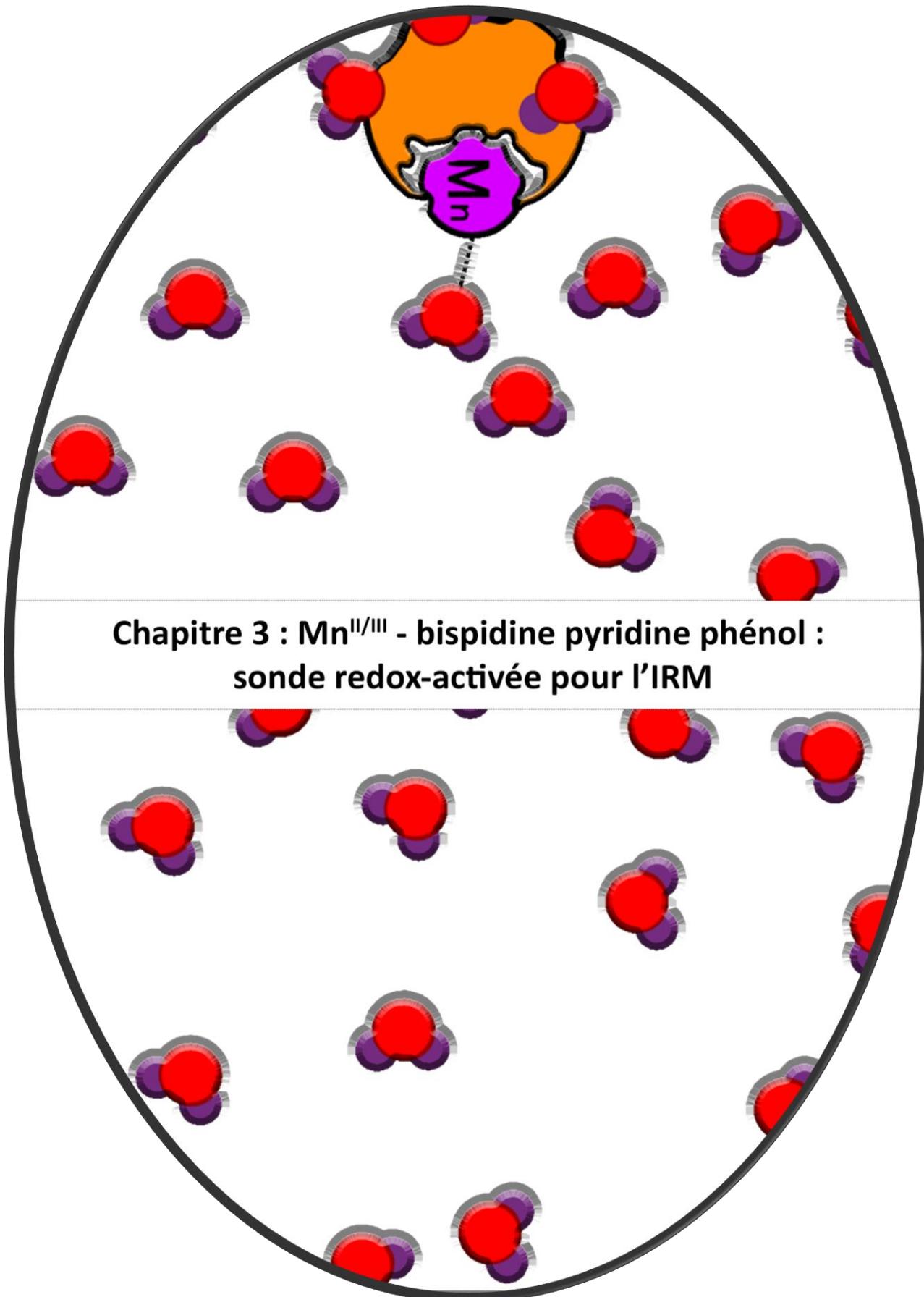


Figure 73 : Quelques liens possibles pour **L1** et **L2**.



**Chapitre 3 : Mn^{II/III} - bispidine pyridine phénol :
sonde redox-activée pour l'IRM**

I. Introduction et contexte de travail

Comme discuté en introduction, chez tout organisme vivant, les environnements redox extra- et intracellulaires sont étroitement régulés et leur dérégulation peut être associée à un large éventail de conditions pathologiques.^[87] Le développement de sondes d'imagerie redox dont la réponse est modulée en fonction du potentiel redox du milieu permettrait d'apporter une information complémentaire pour le diagnostic de certains cancers et des inflammations chroniques. Parmi ces sondes, les agents IRM T_1 à base de complexes de $Mn^{II/III}$ ont montré des premiers résultats prometteurs.^[134,136,140] Au vu de la très bonne inertie cinétique et de la forte relaxivité ($3.51 < r_1 < 4.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, H_2O pH 7, 60MHz) des complexes de Mn^{II} -bispidine préalablement étudiés dans le consortium,^{[88] [91] [92]} il est pertinent d'étudier si ce type de structure peut être utilisé dans ce contexte de sonde redox. Un des premiers prérequis à ce type de développement est de pouvoir stabiliser les complexes de Mn^{II} et de Mn^{III} , et ce avec un potentiel redox suffisamment bas pour induire un changement de degré d'oxydation *in vivo*. Afin de répondre à cette question, les potentiels redox des premiers complexes bispidines conçu au laboratoire ont été mesurés (Figure 74). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Prof. Clotilde Policar et son équipe à l'ENS de Paris pour les mesures des potentiels redox et tous les aspects englobant l'activité **SOD**.

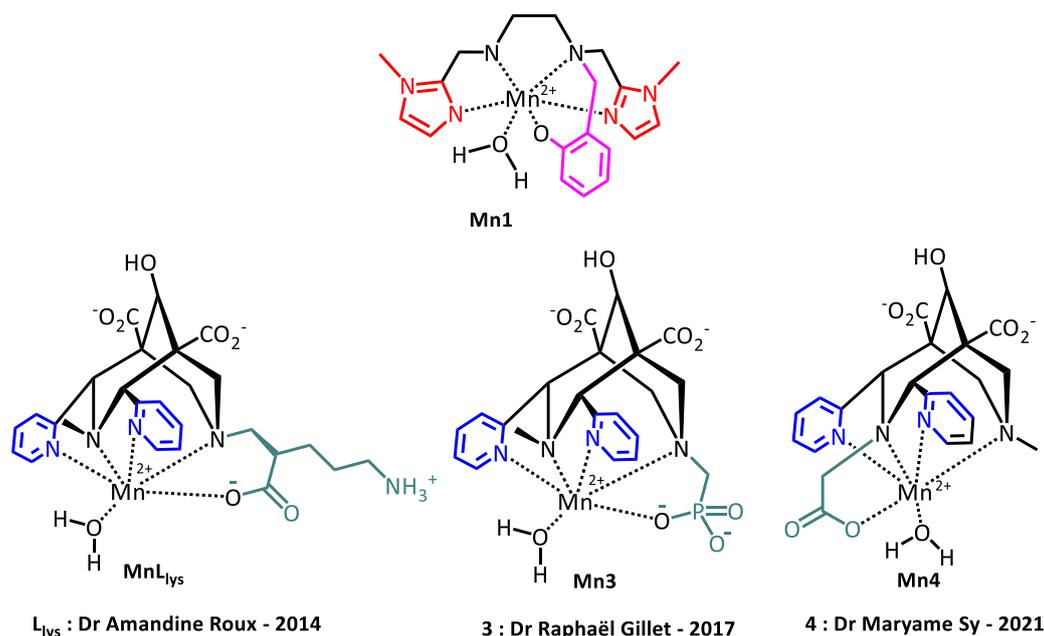


Figure 74 : Première génération de complexes bispidine pour des aspects redox, **[Mn1]** est le meilleur candidat de C. Policar pour son bas potentiel redox.

Dans la discussion qui va suivre, les propriétés d'oxydoréduction des complexes ont été comparées à celles du complexe **[Mn1]**, préalablement développé par le Pr C. Policar et son équipe pour des applications en catalyse tel qu'un mime de **MnSOD**.^[166] Ce qui va nous intéresser dans ce chapitre concernant ce complexe est son potentiel redox qui est $E_{1/2} = 215 \text{ mV vs SCE}$ et quasi-

réversible. En contre-partie, ce ligand a une très faible inertie cinétique.^[170] **L_{lys}** est un ligand qui a été développé durant la thèse du Dr Amandine Roux en 2014^[205] et étudié plus tard pour la complexation du Mn^{II},^[88] le ligand de **[Mn3]** a été développé durant la thèse du Dr Raphaël Gillet en 2017^[206] enfin le ligand de **[Mn4]** a été développé par le Dr Maryame Sy durant sa thèse en 2021.^[196] Pour ces 3 complexes, appelés ici complexes de la première génération, la valeur de leur potentiel redox (vs électrode SCE) est donnée à la Figure 75.

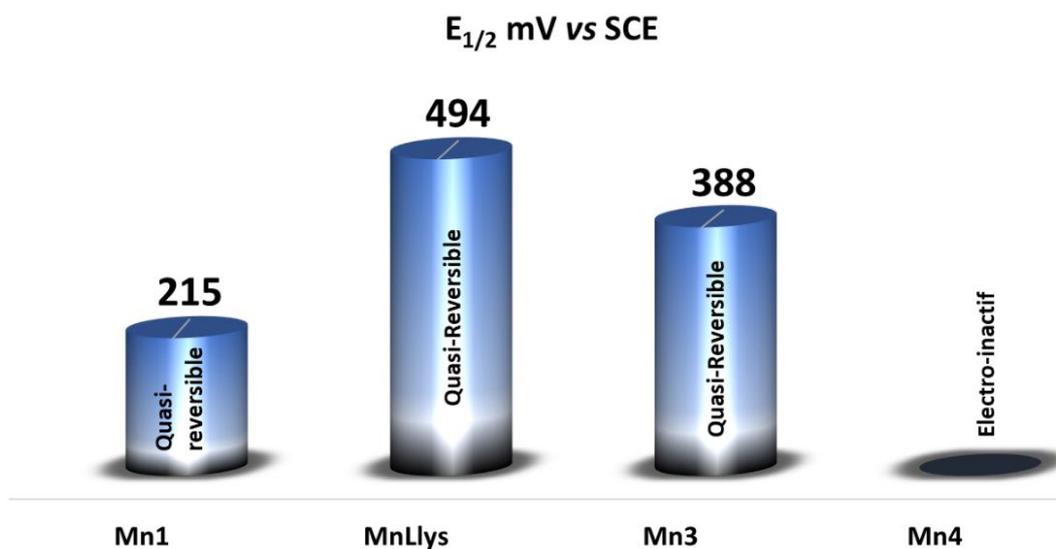


Figure 75 : Potentiels redox de la première génération de complexe Mn^{II}-bispidine et du complexe **Mn1** dans les mêmes conditions. 1mM de complexe dans le tampon MOPS (50mM) à pH 7,5 ; vitesse de balayage 100 mV.s⁻¹ ; électrode de travail : carbone vitreux, contre électrode : platine, électrode de référence : électrode saturée au calomel ; balayage de positif à négatif.

Le premier point à souligner est que les complexes **[MnL_{lys}]** et **[Mn3]** sont électro-actifs et présentent des systèmes quasi-réversibles Mn^{II/III} lors d'un balayage entre -0,7 et 1,1 V vs SCE avec une vitesse de balayage de 100 mV/s. Ce qui n'est pas le cas du complexe **[Mn4]**, qui ne présente pas d'électro-activité dans cette région avec cette vitesse de balayage. Le second point est le fait d'avoir accès au potentiel redox de **[MnL_{lys}]** et **[Mn3]** qui sont respectivement de 0,494 V vs SCE et 0,388 V vs SCE. Ces potentiels sont cependant trop élevés par rapport à la plupart des potentiels redox mesurés dans les organelles qui varient de -150 mV vs électrode normal à hydrogène pour les espaces extracellulaires, -250 mV vs électrode normal à hydrogène pour les mitochondries, le cytoplasme et le noyau.^[207,208] Ils sont également nettement supérieurs à ceux des couples rédox biologiques, des producteurs de ROS, des principaux facteurs de transcription et des messagers secondaires redox actifs.^[207] Ils sont également supérieurs à celui de **[Mn1]** qui, rappelons-le, présente une activité catalytique pour la dismutation du superoxyde. C'est sur la base de **[Mn1]** que nous nous sommes inspirés pour concevoir de nouvelles bispidines. Pr C. Policar et ses collaborateurs ont montré que la combinaison de groupements 1-méthylimidazole et phénolate conduisait à un abaissement des potentiels redox.^{[166] [167]}

A partir de ces résultats, une nouvelle génération de bispidine a été développée au cours de cette thèse (Figure 76) pour la complexation du $Mn^{II/III}$ qui vise à étudier l'influence des groupements 1-méthylimidazole, phénolate et carboxylate sur les propriétés des complexes de $Mn^{II/III}$, leurs potentiels redox et leurs relaxivités. La première partie de ce chapitre va se concentrer sur l'étude du ligand bispidine pyridine phénol **H₃L3** et ses complexes. Les ligands **H₃L4** et **H₃L5** et leurs complexes seront présentés dans le chapitre 4.

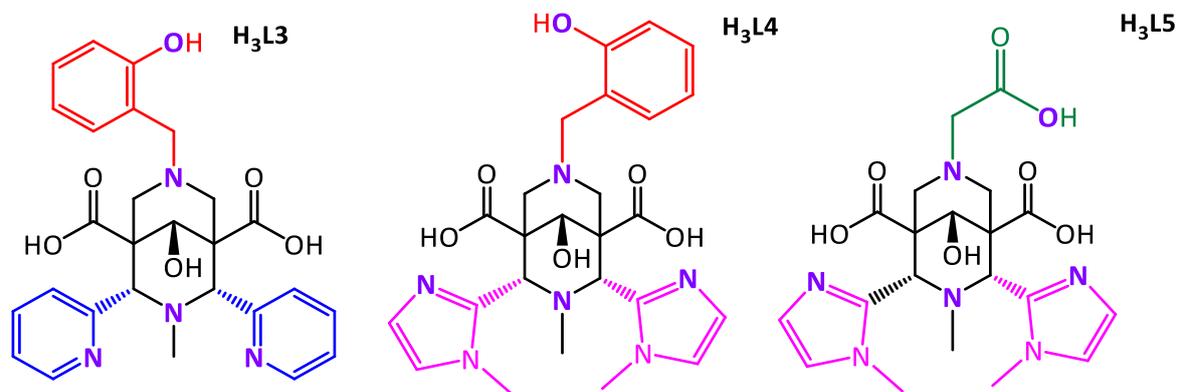


Figure 76 : Chélateurs développés durant ce projet afin de complexer le Mn^{II} et Mn^{III} . En violet les atomes donneurs participant à la coordination de l'ion métallique.

II. Synthèse et caractérisation de **H₃L3** et $[Mn^{II}L3]$

Il existe plusieurs voies de synthèse théoriques pour l'obtention de ce ligand. Parmi la dizaine de voies documentées dans la littérature, cinq d'entre elles ont été testées expérimentalement faisant intervenir : soit la synthèse directe de la bispidine-phénol à partir de la 2-méthoxybenzylamine ou de la 2-aminométhylphénol pour les deux premières étapes, soit une réaction de substitution nucléophile sur l'intermédiaire bispidol-NH {intermédiaire **8**} (voie 3) ou encore via une amination réductrice avec l'intermédiaire **8** avec le 2-aminométhylphénol ou le 2-méthoxyphénylméthanamine {ou 2-méthoxybenzyleamine} (respectivement voies 4 et 5). Une seule a permis d'obtenir le produit final. J'ai choisi de consacrer quelques pages à deux "voies échecs" que je trouvais intéressantes pour finir par une troisième voie qui nous a permis d'obtenir le ligand final. Seule cette dernière voie de synthèse sera détaillée entièrement, la description des voies qui n'ont pas abouties se focalisera sur les étapes qui ont bloquées l'aboutissement de la synthèse globale.

A. Première voie de synthèse de **H₃L3**

La première voie qui a été privilégiée était de partir du précurseur **P2** avec un groupement méthyle en position *N3* afin d'effectuer ensuite une réaction de Mannich avec le 2-méthoxybenzylamine qui contient un phénol protégé sous forme de méthoxy (Figure 77).

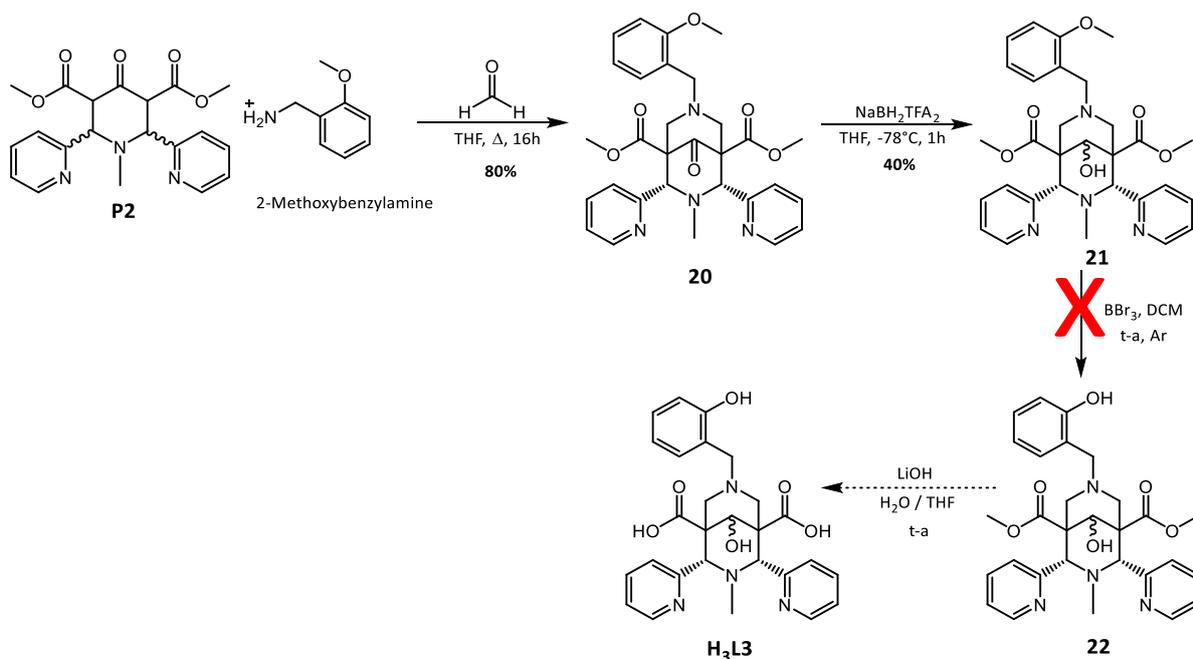


Figure 77 : Première voie supposée de H_3L3 . En pointillé les étapes non effectuées.

La première étape est la formation du précurseur dans les mêmes conditions que décrites au chapitre II avec **P1**. Le précurseur **P2** précipite sous la forme d'une poudre blanche et aucune purification supplémentaire n'est nécessaire. La deuxième étape est également une condensation de Mannich conduisant à l'intermédiaire **20**. De la même manière, celui-ci est obtenu pur par précipitation et sera utilisé ainsi sans purification supplémentaire. L'intermédiaire **20** a été confirmé par toutes les techniques de caractérisation classiques (RMN 1H , ^{13}C et spectrométrie de masse). Mais cette bispidone a aussi été cristallisée sous la forme de monocristaux et la structure cristallographique est présentée à la Figure 78. Cette structure confirme la conformation chaise-chaise de la bispidone avec une distance $N3\cdots N7$ de 2,933 Å.

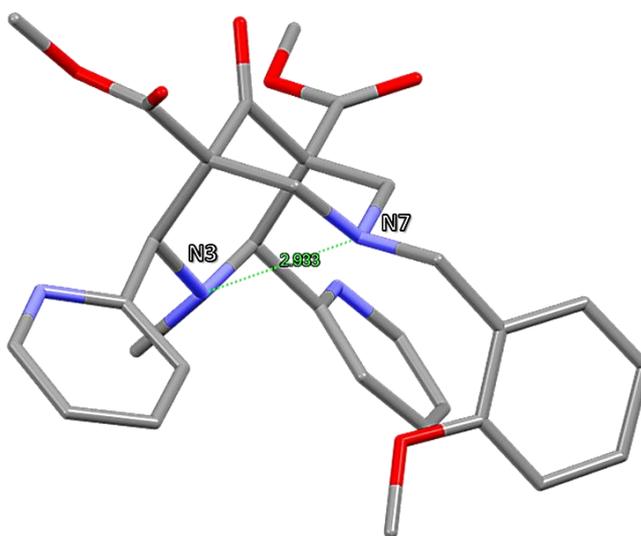


Figure 78 : structure RX de l'intermédiaire **20** et distance $N3\cdots N7$, azote, oxygène, carbone.

La troisième étape est la réduction de la cétone. Celle-ci a été plus difficile que prévue car l'utilisation de NaBH_4 dans les conditions classiques (MeOH , -78°C ; 0,4 équivalent) ^[17] conduit simultanément à la réduction d'un et/ou deux fonctions esters en plus de la cétone centrale en C9. Devant l'impossibilité de contrôler cette réaction de réduction avec NaBH_4 , plusieurs réducteurs plus doux ont été testés dont $\text{NaBH}_2(\text{TFA})_2$, (TFA : trifluoroacetic acid) qui est préparé *in situ*. C'est donc à partir de cette voie qu'il a été possible d'obtenir l'intermédiaire **21** pure.

La quatrième étape est la déprotection du phénol. Celle-ci se fait avec le tribromure de bore (BBr_3) qui est le réactif classique de déprotection de phénol (protégé sous forme la forme d'un méthoxy) dans la littérature.^[209] Cependant cette voie de déprotection n'est pas possible à mettre en place ici car l'intermédiaire **21** n'est soluble que dans le méthanol (précipitation dans le DCM). Le BBr_3 n'est pas stable dans le méthanol, un solvant protique menant à la formation instantanée d'acide borique et d'acide bromhydrique. Cette voie a donc été mise en "standby" pour cause de problèmes de solubilité.

B. Seconde voie de synthèse de $\text{H}_3\text{L3}$

Concernant la seconde voie, il s'agit d'utiliser dès la seconde réaction de Mannich un motif 2-aminométhylphénol (Figure 79) afin d'éviter les problèmes de déprotection. Cette voie a été limitée par la synthèse du réactif 2-aminométhylphénol que nous avons cherché à synthétiser du fait de son prix très coûteux. Pour l'obtention de ce substituant 2-aminométhylphénol, nous avons cherché à effectuer une réaction d'hydrogénation catalytique d'un dérivé nitrile en amine primaire avec du palladium sur charbon (Figure 79).^[210] L'obtention du composé souhaité a été mise en évidence par RMN ^1H par la présence d'un pic caractéristique du CH_2 à 4.07 ppm (CDCl_3 , 400 MHz) et en spectrométrie de masse avec un pic à $m/z = 124.02$ correspondant à l'ion $[\text{M} + \text{H}]^+$. Toutefois, la purification sur gel de silice doit être optimisée. Devant le succès d'une autre voie étudiée en parallèle (voie 3 ci-dessous), cette voie n'a pas été menée à son terme.

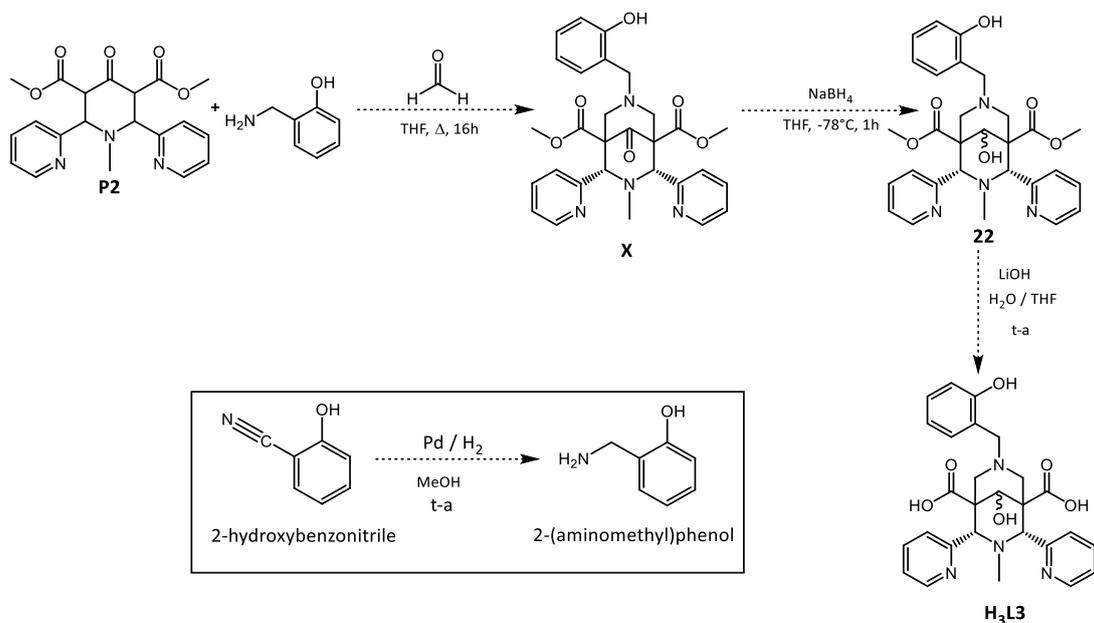


Figure 79 : Seconde voie supposée de H_3L3 .

C. Troisième voie de synthèse de H_3L3

La voie de synthèse finalement adoptée pour la synthèse de H_3L3 est décrite à la Figure 80.

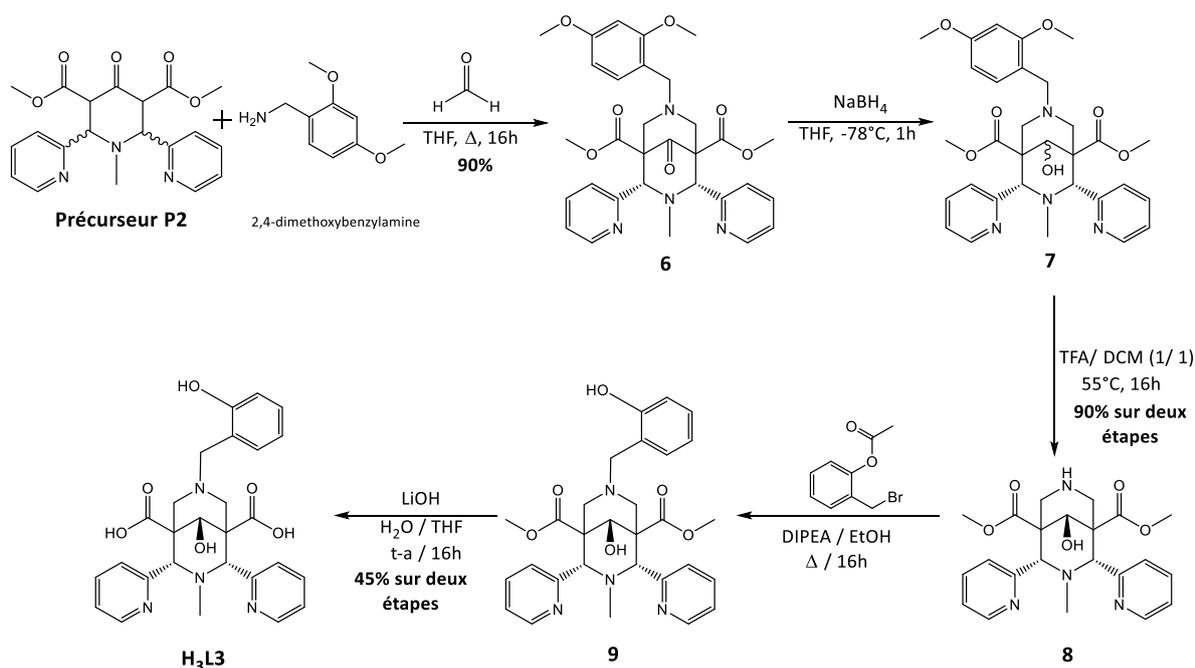


Figure 80 : Voie de synthèse de H_3L3 , DIPEA : *N,N*-Diisopropylethylamine.

i. Synthèse de P2

La synthèse commence avec le précurseur **P2** (pipéridone) qui est issu de la première réaction de Mannich.^[211] Il est obtenu par réaction de condensation du diméthyle 1,3-acetonedicarboxylate avec la 2-pyridine carboxyaldehyde en présence de méthylamine dans le méthanol à 0°C. Le précurseur **P2** dans le méthanol existe sous 2 formes tautomères à savoir cétone et énol. Ces deux

formes se présentent sous un mélange de diastéréoisomères à savoir cis et trans. Dans un mélange donné on a donc 4 formes : Cis-énol, Cis-cétone, Trans-énol et Trans-cétone (Figure 81).

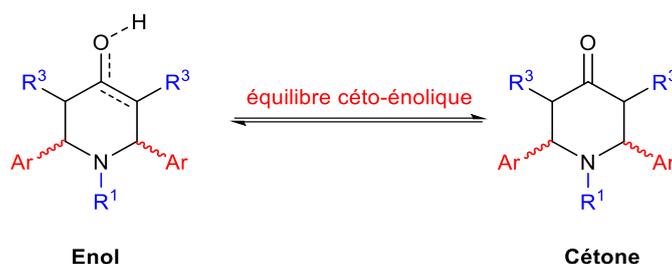


Figure 81 : Équilibre cétone-énolique de **P2**, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{CO}_2\text{CH}_3$, $\text{Ar} = \text{Pyridine}$.

Les proportions de ces isomères dépendent du temps auquel le mélange est laissé dans le méthanol. En général le produit est récolté sous deux jours. Le premier jour les formes majoritaires sont : Cis-énol (30%) et Cis-cétone (57%) ; le deuxième jour les formes majoritaires sont : Trans-énol (19%) et Trans-cétone (64%). Ces pourcentages sont donnés à titre indicatif car ils correspondent à un instant t du milieu, celui-ci étant en constante évolution. Cependant une tendance est présente et l'on sait que plus le précurseur **P2** est dans un solvant protique plus les formes trans sont favorisées. Nous avons par la suite vérifié si le mélange enrichi en formes cis majoritaire ou celui enrichi en formes trans impactait la formation de la bispidone et surtout, le rendement de composé en configuration cis et conformation chaise-chaise. Afin de vérifier cela, nous avons lancé 2 condensations parallèles (toutes les conditions expérimentales étant identiques par ailleurs) sur deux lots distincts. Le premier contient majoritairement les formes cis récoltées le 1^{er} jour et le deuxième des formes trans récoltées le 2nd jour. Le résultat est très surprenant car nous avons obtenu la même molécule finale avec le même rendement (60%), à savoir une bispidone avec les pyridines en position équatoriale et un bicyclic en conformation chaise-chaise. Cela veut dire qu'avec un mélange où les formes trans sont majoritaires, il y a une inversion de configuration avec ouverture de cycle. Nous avons donc démontré par cette expérience que la configuration de la bispidone finale ainsi que son rendement ne sont pas influencés par la composition du mélange des précurseurs **P2**. Ceci était également évoqué dans la littérature ancienne mais aucuns faits expérimentaux n'avaient été donnés pour appuyer cette hypothèse.^[20] En conséquence, nous avons par la suite travaillé avec des mélanges d'isomères de configuration de compositions distinctes.

ii. Synthèse de H₃L3

La seconde étape est aussi une condensation de Mannich conduisant à l'intermédiaire **6**. De la même manière, celui-ci est obtenu sous forme de poudre et sera utilisé sans purification supplémentaire.

La réduction de cet intermédiaire **6** n'est pas aisée car il faut un nombre très faible d'équivalents de NaBH_4 . La réduction des fonctions esters en hémiacétal ou en alcool est observée

dans le cas où NaBH_4 est en excès. Il faut souligner que le nombre d'équivalents n'est pas fixe et varie d'un lot de 6 à un autre (de 0,2 équivalents à 0,8 équivalents avec une moyenne à 0,5 équivalent). La réaction de réduction est donc systématiquement suivie par RMN ^1H en plus des plaques CCM. De plus, cette réduction conduit à la formation de 2 diastéréoisomères (OH en avant vers les pyridyles ou en arrière) systématiquement. Nous avons toutefois choisi de ne pas purifier cet intermédiaire **7** mais plutôt de déprotéger les deux diastéréoisomères puis les séparer par colonne chromatographique, afin de limiter la perte de produit.

Ainsi, la troisième étape est la déprotection de l'amine qui se fait classiquement avec l'acide trifluoroacétique et qui conduit toujours à des rendements supérieurs à 80%. A l'issue de cette déprotection, les deux diastéréoisomères sont séparés par chromatographie sur silice, seul l'intermédiaire **8** (composé majoritaire) est utilisé pour la suite.

L'acétate de 2-bromométhylphényle utilisé pour la substitution nucléophile a été synthétisé en deux étapes selon le protocole décrit dans la littérature (Figure 82).^[212]

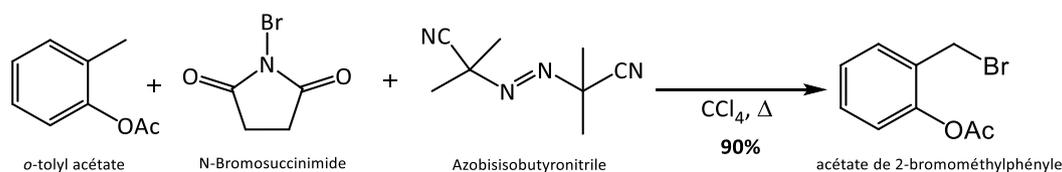


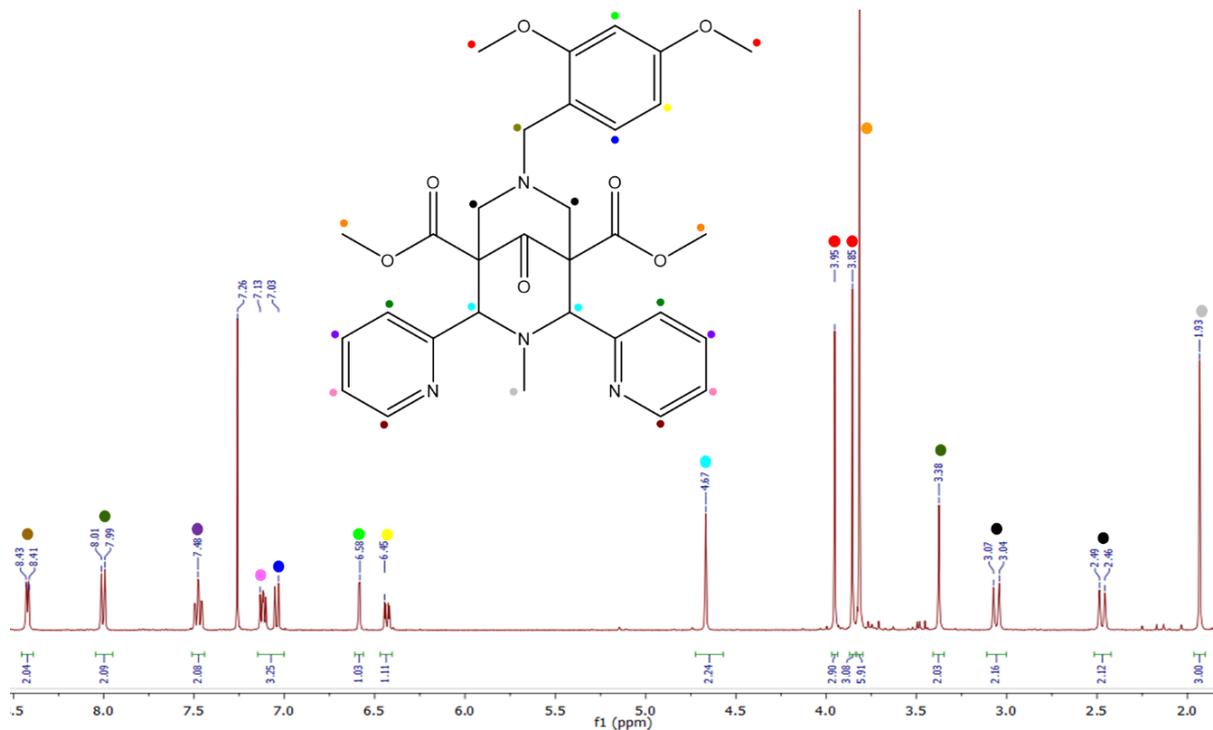
Figure 82 : Voie de synthèse décrite de l'acétate de 2-bromométhylphényle.

La substitution nucléophile est effectuée dans l'éthanol avec la DIPEA au lieu des conditions classiques (acétonitrile, carbonate de potassium) afin d'améliorer la solubilité et d'améliorer le rendement. A l'issue de cette réaction, le produit obtenu n'est pas celui avec le phénol protégé sous forme d'acétate mais le phénol libre. En effet, le mélange contenant **9** a été analysé par MALDI sur plusieurs lots différents et on n'observe jamais une autre masse que celle de **9** ; la RMN ^1H est très en accord avec ces résultats. Deux hypothèses peuvent expliquer cette déprotection : soit les probables traces d'eau présentes dans l'éthanol et l'excès de DIPEA suffisent à déprotéger le phénol, soit la déprotection est causée par une quantité catalytique de chlorure d'éthanoyle possiblement issue de la synthèse du substituant.^[213]

Une saponification des esters méthyliques avec LiOH est ensuite effectuée pour conduire au produit final **H₃L3**. Il est possible d'obtenir plus de 500 mg de produit en une fois avec cette voie de synthèse.

iii. Caractérisation de **H₃L3** et de quelques intermédiaires clés

Le spectre RMN ^1H de l'intermédiaire **6** (Spectre 9) a une signature similaire à celle de la bispidone **1** décrite au chapitre précédent, avec le méthyle (1,93 ppm) en *N*3, et confirme l'obtention d'un composé symétrique avec les pyridyles en cis.



Spectre 9 : RMN ^1H de **6** (CDCl_3 , 400 MHz, 25°C)

Cet intermédiaire **6** a aussi été cristallisé pour caractériser la structure en diffraction aux rayons X. On peut souligner que la distance N3---N7 de 2,922 Å qui est très similaire à celle mesurée pour l'intermédiaire **20**. Cela démontre la rigidité de ces systèmes (Figure 83).

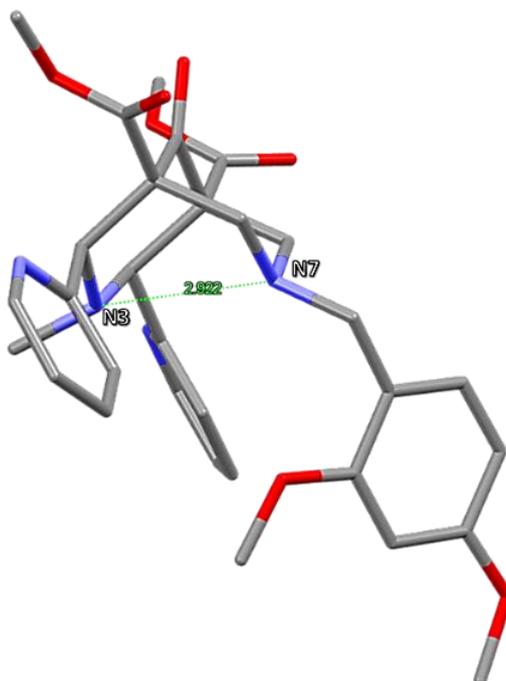
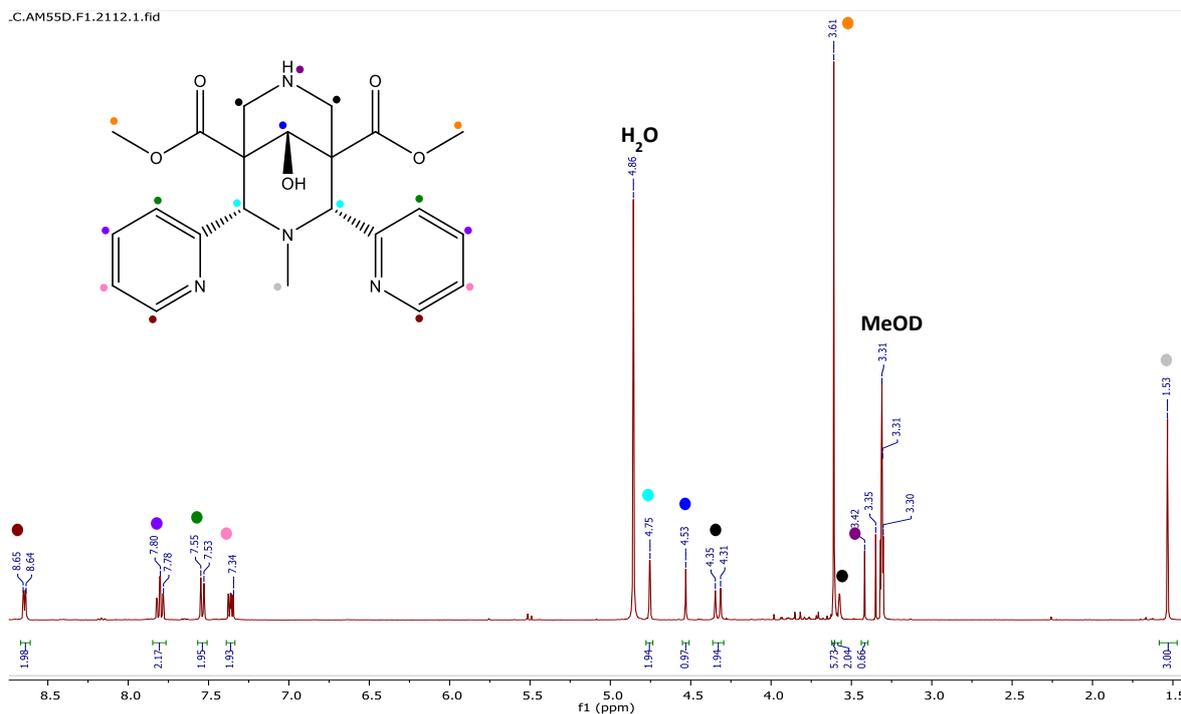


Figure 83 : structure RX de l'intermédiaire **6** et distance N3---N7 ; azote, oxygène, carbone.

Le spectre RMN ^1H de l'intermédiaire **8** (Spectre 10) a quasiment la même signature que la bispidone **6**, sans le groupe protecteur 1,4-diméthoxybenzylamine. La conformation chaise-

chaise, la position des pyridyles en position équatoriale, la stéréochimie de la réduction (épimère syn) a été confirmées par RMN NOESY.



Spectre 10 : RMN ^1H de **8** (MeOD, 400 MHz, 25°C), diastéréoisomère d'intérêt.

Cet intermédiaire **8** a aussi été cristallisé pour caractériser la structure en diffractométrie des rayons X. On remarque ici une distance N3---N7 (2,769 Å) plus courte par rapport à l'intermédiaire **20** et **6** (Figure 84). Cela pourrait s'expliquer par la nouvelle orientation des pyridines pointant cette fois-ci vers la cavité ($d_{\text{N}_{\text{pyr}}\text{---}\text{N}_{\text{pyr}}} = 4,841 \text{ \AA}$) ce qui n'était pas le cas pour les intermédiaires **20** et **6**. Mais aussi par le manque de substituant en N7 qui pourrait contribuer à diminuer la distance N3---N7.

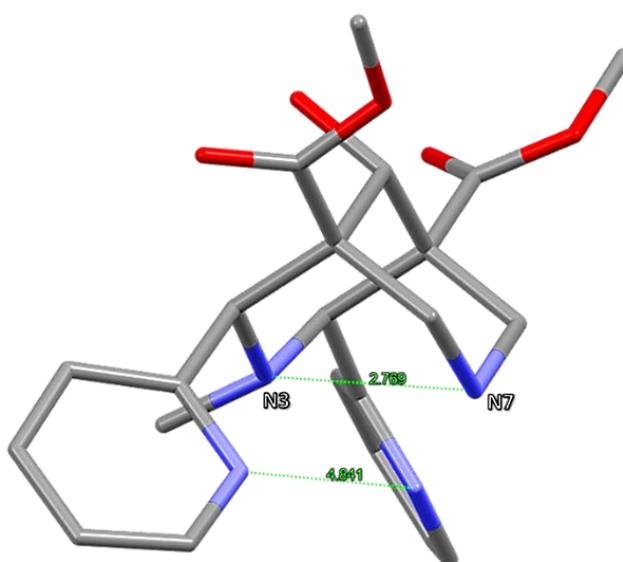
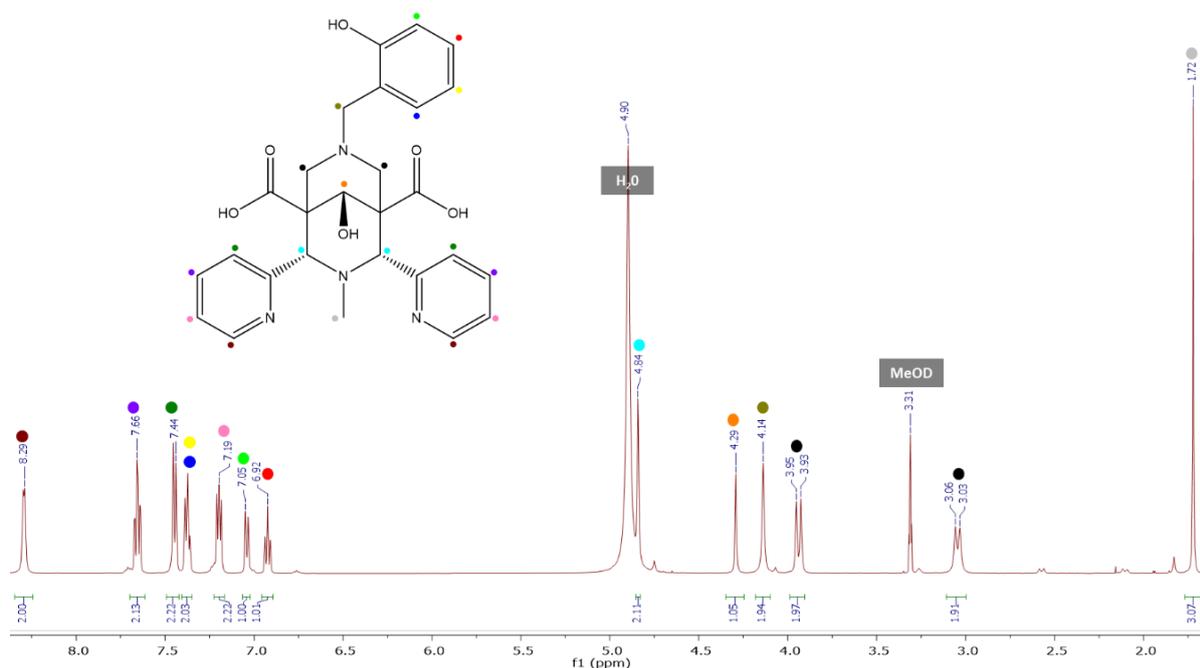


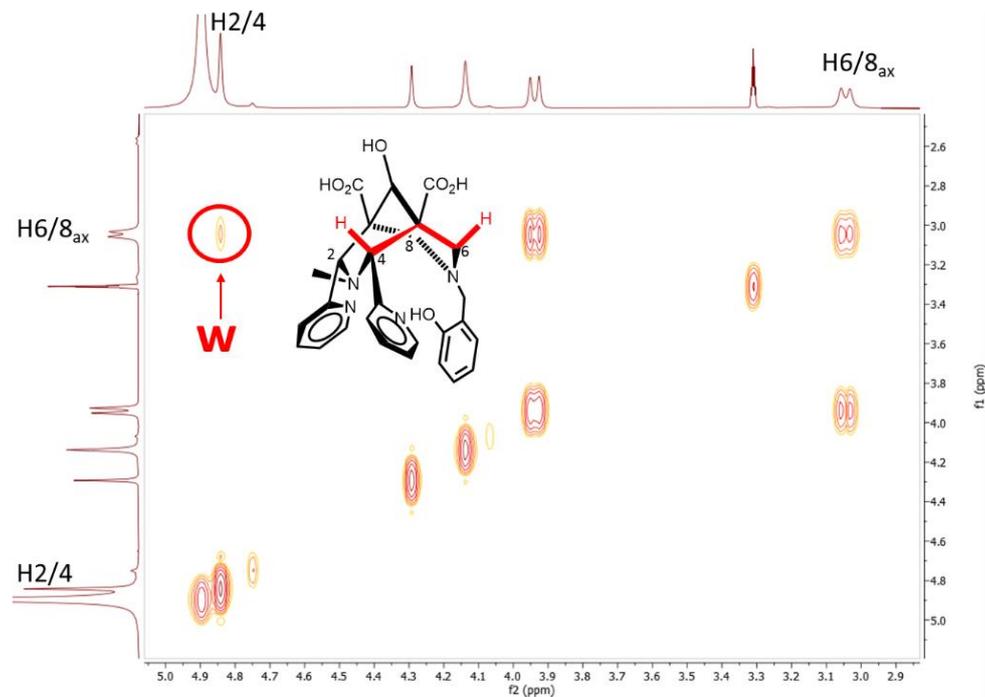
Figure 84 : structure RX de l'intermédiaire **8**, azote, oxygène, carbone.

Le spectre RMN ^1H de **H₃L3** (Spectre 11) comprend un set de 13 signaux assez simple à analyser. La région aromatique comprend le motif classique de la bispidine-pyridine en plus du groupement substitué.



Spectre 11 : RMN ^1H de **H₃L3** (MeOD, 400 MHz, 25°C). Les pics secondaires sont une autre forme de protonation.

La conformation chaise-chaise, la position des pyridyles en position équatoriale, la stéréochimie de la réduction (épimère syn) ont été confirmées par RMN COSY ^1H - ^1H . En particulier, nous pouvons observer des couplages scalaires 4J en W entre les protons 2 et 8 (ou 4 et 6) (Spectre 12). J'ai choisi de ne pas discuter les données RMN NOESY ou ROESY car la structure RX de l'intermédiaire **8** confirme l'orientation du proton de réduction.



Spectre 12 : RMN COSY ^1H - ^1H de $\text{H}_3\text{L3}$ (MeOD, 500 MHz, 25°C).

D. Synthèse et caractérisation de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$

i. Synthèse de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$

La synthèse du complexe débute par le mélange du ligand et MnCl_2 dans l'eau, par la suite le pH est fixé à 7,4 et le milieu est porté à 50°C pour 10 min (Figure 85).

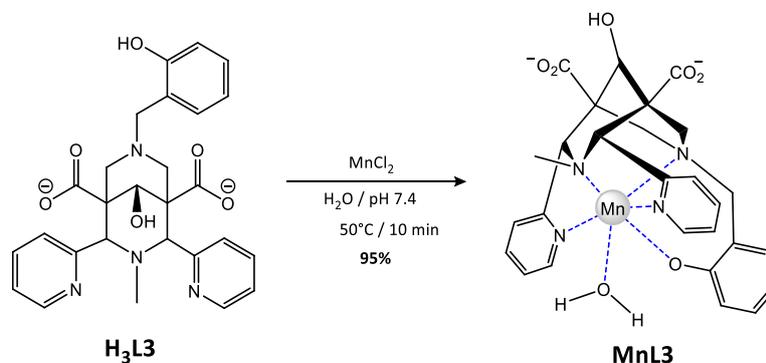


Figure 85 : Synthèse du complexe $[\text{MnL3}]$.

Le suivi de la réaction est effectué par HPLC sur colonne de phase inverse C18 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$), le pH de la solution injectée est ajusté à nouveau à 7,4 si nécessaire pour le ligand libre et le complexe. La méthode est détaillée dans la partie expérimentale. Une fois la disparition complète du ligand observée (Figure 86), le complexe est purifié avec la même méthode par chromatographie flash sur colonne C18. Le complexe est isolé sous la forme d'une poudre après évaporation du solvant avec un rendement de 95%. L'analyse élémentaire révèle que le complexe est obtenu sous la forme $[\text{MnHL3}]\text{Li}$, H_2O .

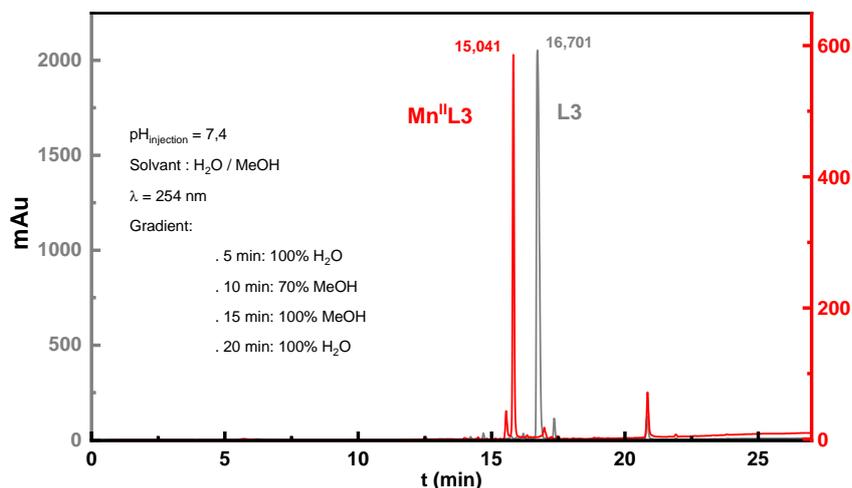
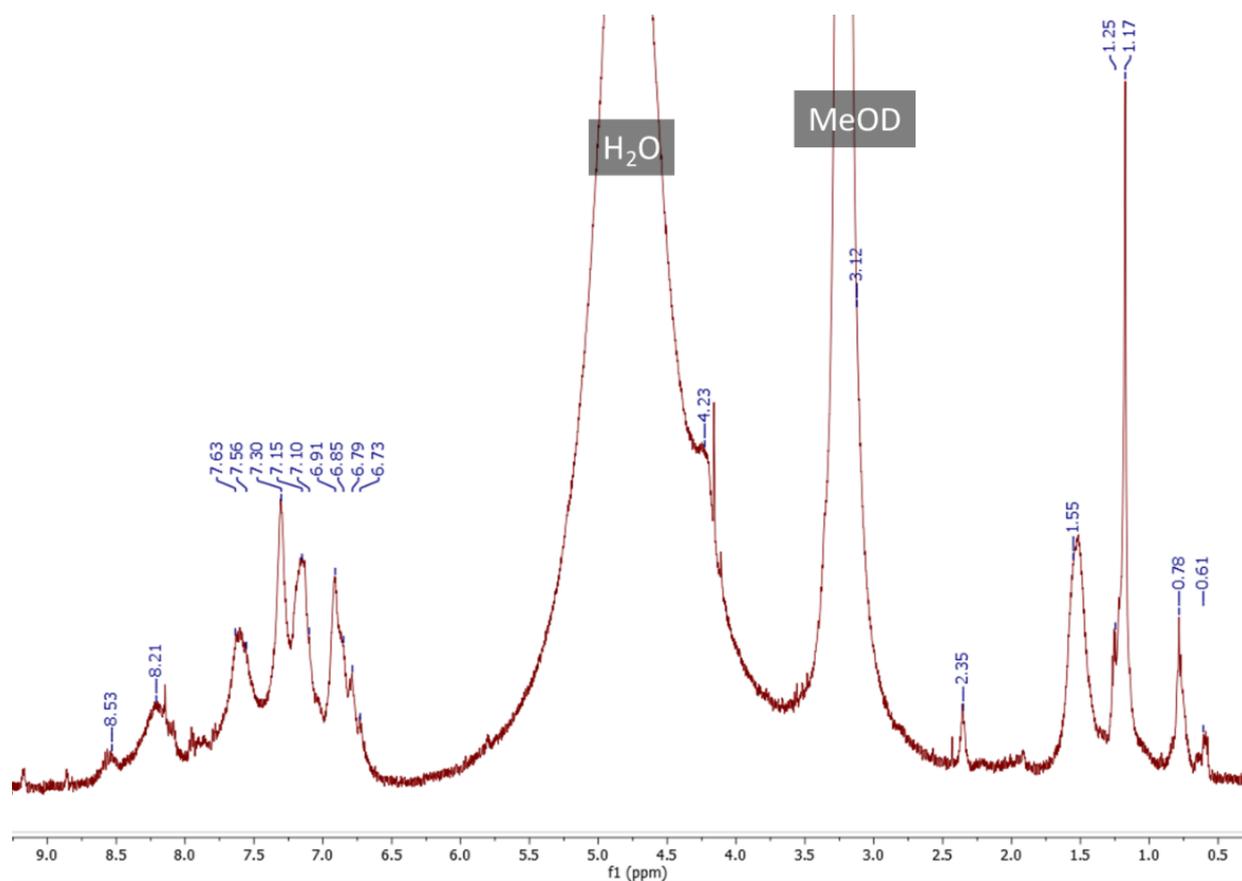


Figure 86 : HPLC de L3 et [Mn^{II}L3] à pH 7,4.

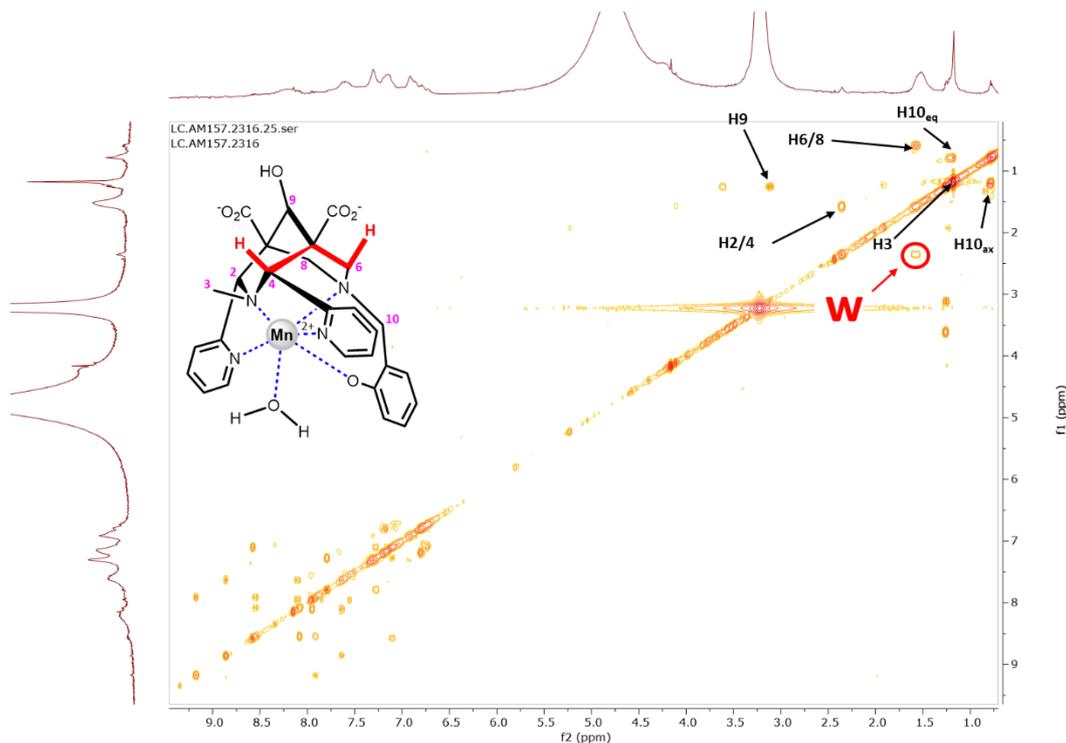
ii. Caractérisation de [Mn^{II}L3]

A l'issus des synthèses de nos complexes nous avons pris l'habitude de faire une tentative de spectre RMN pour apporter une caractérisation supplémentaire (même s'il s'agit d'une espèce paramagnétique). Habituellement les spectres RMN sont faits dans le D₂O, mais nous n'avons jamais réussi à avoir de résultats intéressants (que ce soit le Mn^{II} ou le Tb^{III}). À la suite d'études très récentes que nous avons effectuées sur l'espèce [Mn^{III}L3], nous nous sommes tournés vers le méthanol (Chapitre 3– VI : Etude de [Mn^{III}L3]). C'est donc à partir de là que nous avons décidé de refaire tous les spectres RMN de nos complexes de Mn^{II} dans CD₃OD. Dans le cas de [Mn^{II}L3], nous avons eu des résultats très encourageants (Spectre 13). Le spectre RMN proton seul est très difficile à interpréter ; la RMN 2D COSY ¹H-¹H a été d'une aide indispensable (Spectre 14).



Spectre 13 : RMN ^1H de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ (MeOD, 25°C, 400 MHz).

Tous les signaux n'ont pas pu être attribués, la région des aromatiques est très complexe. Néanmoins, la plupart des pics ont pu être assignés, mettant en évidence la présence de deux espèces : une espèce paramagnétique dont les signaux sont très larges et une espèce diamagnétique en proportion très minoritaire mais dont les signaux sont très résolus et, par conséquent, les couplages intenses. En comparant les déplacements chimiques à ceux d'autres complexes de bispidine, nous pouvons supposer qu'il s'agit d'un complexe diamagnétique avec le ligand $\text{H}_3\text{L3}$, possiblement lié à la présence d'un sel diamagnétique pendant notre synthèse (impureté du MnCl_2 , verrerie...). A l'issue de l'attribution des signaux via la RMN 2D, il nous a été possible d'observer la tache de corrélation correspondant au couplage W entre les protons $\text{H}2/4$ et $\text{H}6/8$, caractéristique de la conformation chaise-chaise du complexe en solution (Spectre 14).



Spectre 14 : RMN COSY ¹H-¹H de [Mn^{II}L₃] montrant le couplage W entre H6/8_{ax} et H2/4.

Le complexe [Mn^{II}L₃] a été confirmé en spectrométrie de masse (ESI) par le Pr Clotilde Policar et son équipe en mode positif et mode négatif (Figure 87). C'est une première pour nos complexes de Mn^{II}, car nos équipements ne nous permettent pas d'obtenir des résultats pertinents de ces complexes.

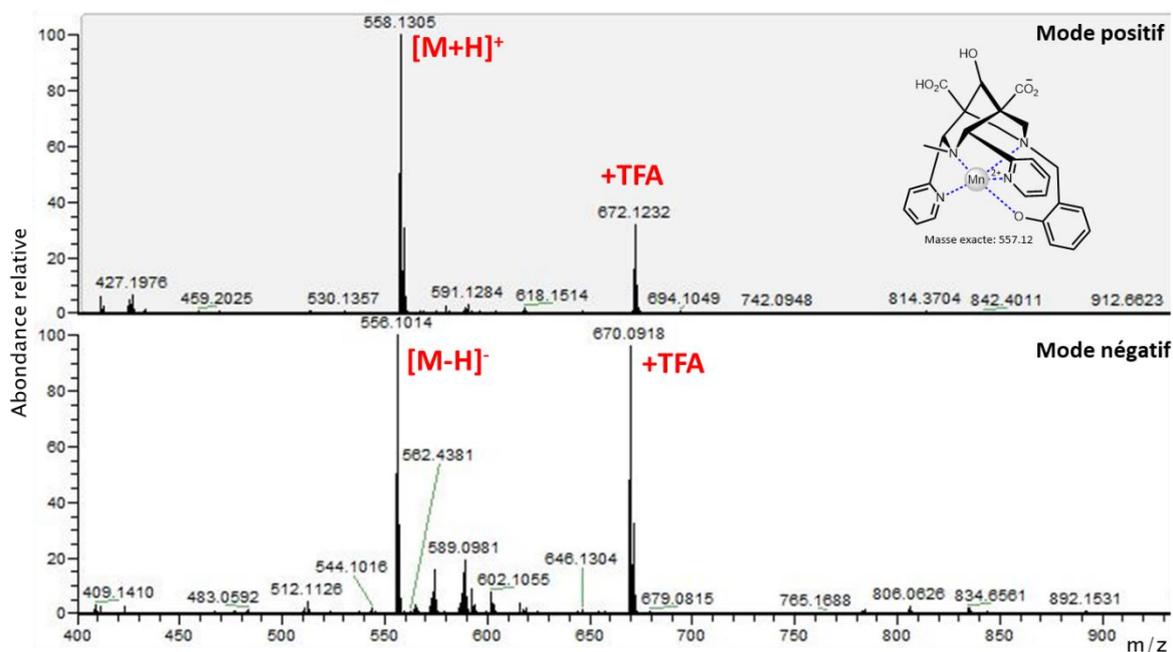


Figure 87 : Spectre de masse de [Mn^{II}L₃].

III. Etudes potentiométrique, spectrophotométrique et relaxométrique de H_3L3 , $[Zn^{II}L3]$ et $[Mn^{II}L3]$

Le but de cette étude est d'investiguer la protonation du ligand et la stabilité thermodynamique des complexes de Zn^{II} et Mn^{II} . Le choix du Zn^{II} comme métal de comparaison repose sur la similarité chimique de ce dernier avec le Mn^{II} et sur son abondance dans les systèmes biologiques. Le Zn^{II} se présente donc comme le compétiteur le plus important de Mn^{II} . Pour les mêmes raisons les études potentiométriques du complexe de Ca^{II} ont aussi été effectuées, mais ne seront pas présentés ici.

A. Etudes potentiométriques de H_3L3 , $[Zn^{II}L3]$ et $[Mn^{II}L3]$

Les titrages potentiométriques, relaxométriques (globalement toutes les études relaxométrique) et le traitement des données de ce chapitre ont été fait sous la direction de ma co-directrice de thèse, Dr Eva Jakab Toth (CBM – Orléans). Les titrages spectrophotométriques direct en mode automatique et le traitement des données ont été fait sous la direction du Dr Mourad Elhabiri (LIMA – Strasbourg). Enfin, les titrages spectrophotométriques en batch et le traitement des données ont été fait avec les équipements de l'équipe sous la supervision de ma directrice de thèse, Dr Aline Nonat (IPHC – Strasbourg).

i. Titrage de H_3L3 (Figure 88)

Le ligand H_3L3 présente cinq sites de protonation, les sites de protonation des pyridines ont généralement des $\log K_H$ trop bas pour être mesurés dans les conditions des titrages potentiométriques ($2 \leq pH \leq 12$).^[12] La première protonation du système est à $\log K_{H1} = 11,45(2)$ que l'on attribue à une des deux amines tertiaires, la seconde ayant un $\log K_H$ hors de la gamme d'étude. La seconde protonation à $\log K_{H2} = 9,51(3)$ est celle du phénolate (le $\log K_H$ du phénolate libre est à 10,0).^[214] La troisième protonation est à $\log K_{H3} = 3,93(4)$ que l'on attribue à un acide carboxylique. Enfin, la dernière protonation du ligand se situe à $\log K_{H4} = 2,26(4)$ attribuée à l'un des acides carboxyliques présent (Figure 88). Ces valeurs sont en accord avec les schémas de protonation décrit très récemment avec d'autres bispidines.^[88,91]

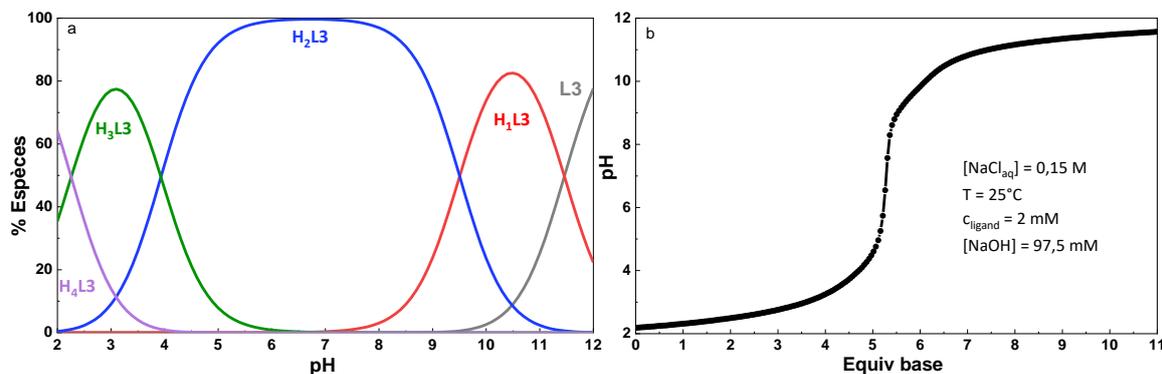


Figure 88 : (a) Courbe de distribution des espèces relatives à L3, (b) courbe de titrage potentiométrique de L3.

ii. Titrage de [Mn^{II}L3] et [Zn^{II}L3]

Quelques points importants à souligner :

- ❖ Concernant le complexe de zinc, le complexe de stœchiométrie Zn : L (1 : 1) étudié dans les conditions de la potentiométrie précipite à partir de pH 3 jusqu'à pH 10. Il n'est donc pas possible d'effectuer des mesures potentiométriques sur ce mélange.

- ❖ Concernant le complexe de manganèse, la cinétique de formation de celui-ci est lente et évidemment dépendante du pH. A pH 4 [tampon diméthyle pipérazine – 50 mM] il faut environ 2h30 pour atteindre l'équilibre, à pH 5 [tampon N-méthyle pipérazine – 50 mM] il faut 1h40 et à pH 6 [acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique – MES – 50 mM] il faut 40 min à 25°C (Figure 89). Un titrage direct ne peut être effectué, nous avons fait le choix de faire des batchs entre pH 2 et 7.

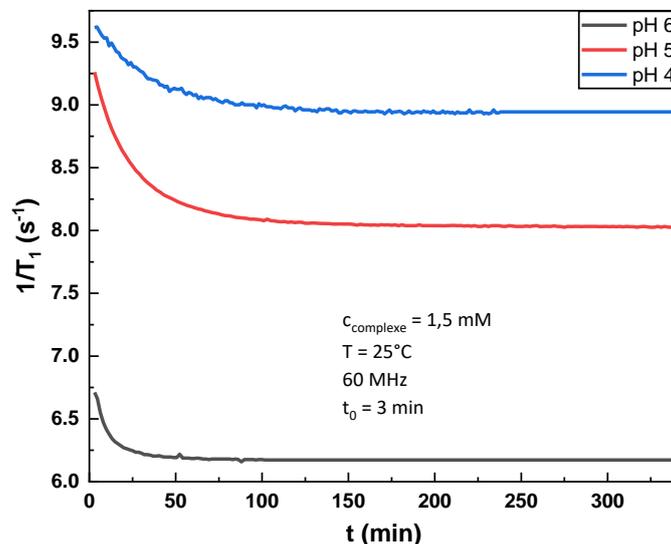


Figure 89 : Cinétique de formation du complexe [Mn^{II}L3] à différents pH suivis par relaxométrie. La première mesure : t₀ = 3 min.

Les batchs de la gamme pH 2 à 4, après 24h d'agitation à température ambiante nous avons observé un précipité blanc non identifié. De plus, au-dessus de pH 10 il y a un précipité brun qui se forme à cette concentration dans les batchs. En résumé, il n'est pas possible d'effectuer de titrage potentiométrique du complexe de manganèse afin d'en déterminer la constante de stabilité. Afin de

compléter ces études, des études spectrophotométriques de H_3L3 , $[Zn^{II}L3]$ et $[Mn^{II}L3]$ ont également été réalisées.

B. Etudes spectrophotométrique de H_3L3 , $[Zn^{II}L3]$ et $[Mn^{II}L3]$

i. Titration de H_3L3

Avant de titrer les complexes, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au ligand libre. Le spectre possède une bande d'absorption centrée vers 262 nm caractéristique des cycles pyridines due aux transitions $\pi-\pi^*$.^[12]

Concernant le phénol, il est très important de distinguer la forme phénol et la forme phénolate qui ont des spectres d'absorption différents : deux bandes de transition centrées vers 238 nm et 290 nm sont caractéristiques du phénolate (220-400 nm).^[214] La Figure 90 montre les spectres d'absorption du phénol et de l'anion phénolate dans l'eau. Les trois premières transitions électroniques sont montrées pour la forme basique tandis que la même gamme spectrale couvre les deux premières transitions électroniques de la forme acide. D'une manière générale, les transitions électroniques de la forme phénol sont décalées vers le bleu par rapport à la transition électronique de la forme phénolate.^[215] Cependant, leur position peut varier en fonction du ligand et de la présence d'un métal.

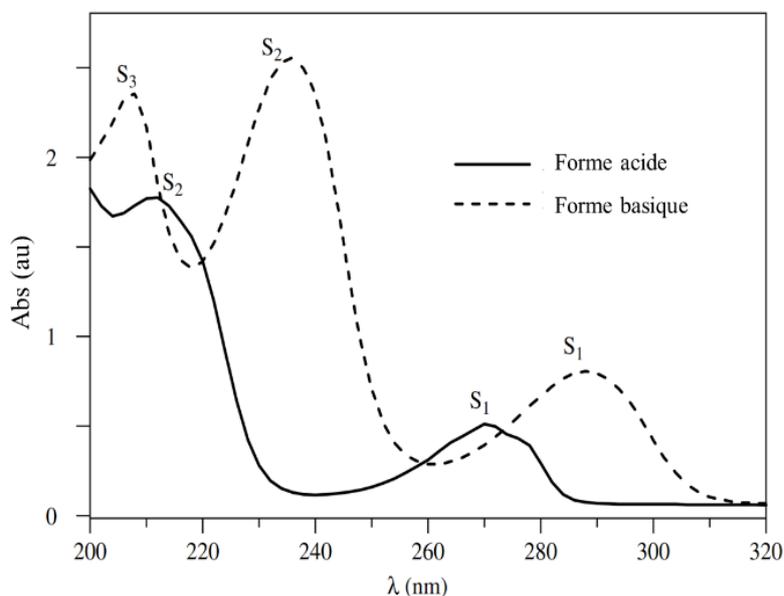


Figure 90 : Spectre d'absorption du phénol (-) et de l'anion phénolate (- -) dans l'eau : forme acide pH = 6 et forme basique pH = 12.

Concernant les titrages spectrophométriques directe en automatique de H_3L3 et ses complexes, nous avons fait le choix d'ajouter 2% de méthanol, qui solubilise le ligand à n'importe quel pH afin d'éviter la précipitation de celui-ci aux pH acides. Le dosage et les spectres reconstitués sont présentés à la Figure 91.

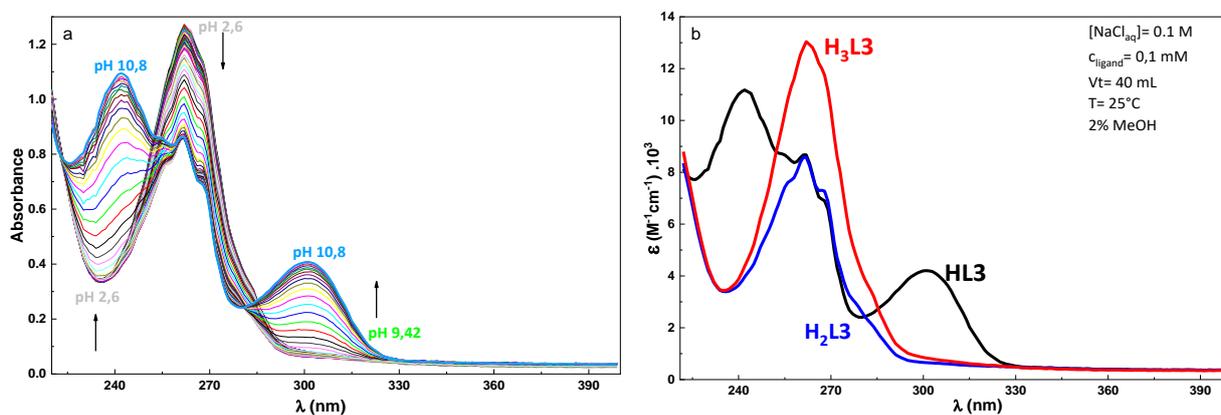


Figure 91 : (a) Dosage spectrophotométrique de **L3** en fonction du pH. (b) Spectres calculés des espèces de **L3**.

Le spectre d'absorption montre une évolution hyperchrome (lorsque le pH augmente jusqu'à pH 10,8) des bandes de transition du phénolate comme décrit dans la littérature ($\lambda = 238$ nm et $\lambda = 290$ nm). Tandis qu'une évolution hypochrome de la bande des pyridines ($\lambda = 262$ nm) est observée lorsque le pH augmente. Dans la gamme $2 \leq \text{pH} \leq 11$ on mesure deux constantes, $\log K_{H1} = 9,36(2)$ et $\log K_{H2} = 3,55(1)$, qui respectivement appartiennent au phénolate et à un carboxylate.

Ces résultats sont en accord avec le titrage potentiométrique du ligand, qui lui permet de déterminer les deux valeurs de $\log K_{H1} = 9,51(3)$ et $\log K_{H2} = 3,93(4)$ ainsi que deux constantes de protonation supplémentaires dans la gamme de pH 2 à 12. Les valeurs ainsi que la distribution des espèces sont représentées à la Figure 92.

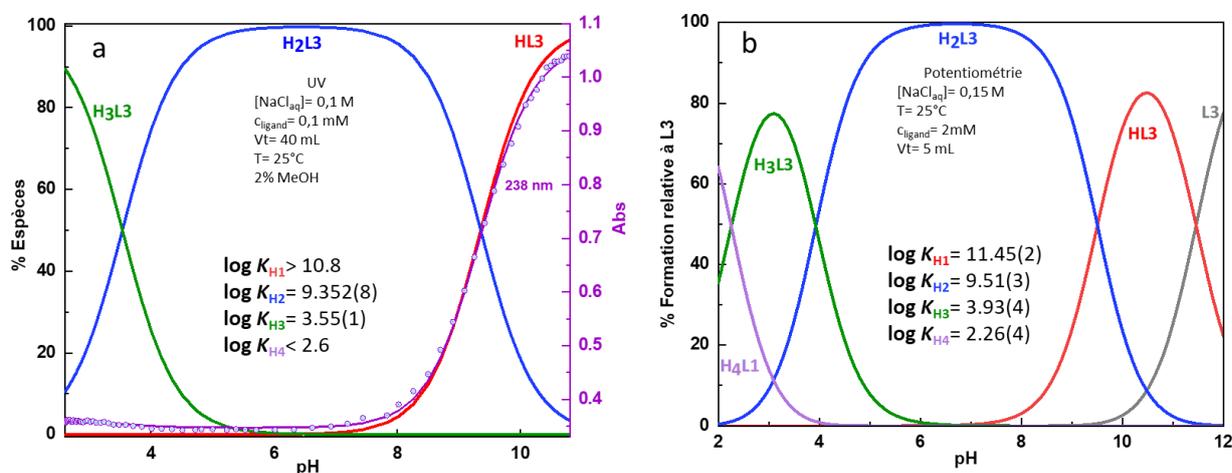


Figure 92 : (a) Distribution des espèces de **L3** déterminée par UV, les points expérimentaux et son ajustement mathématique à 238 nm. (b) Distribution des espèces de **L3** déterminée par potentiométrie.

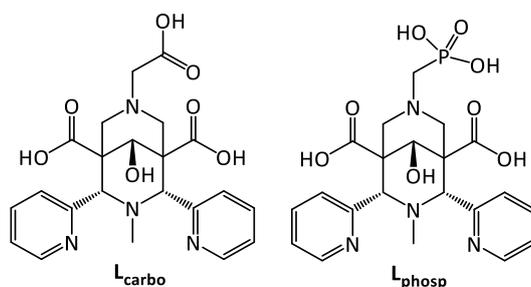


Figure 93 : Ligands de comparaison.

En comparant **H₃L3** avec d'autres ligands bispidines publiés récemment à savoir **L_{carbo}** et **L_{phosp}** (Figure 93) ^[91] on voit une forte similarité sur le schéma de protonation. Avec une première constante de protonation basique correspondant à une amine tertiaire, puis une seconde constante de protonation dépendante du type de substituant en *N7* et enfin un ou deux acides carboxyliques en *C1* et *C5* (Tableau 12).

Tableau 12 : Comparatif de constante de protonation.

	L3	L_{phosp}	L_{carbo}
logK _{H1}	11,45(2)	11,15(1)	9,54(4)
logK _{H2}	9,51(3)	7,35(3)	5,11(6)
logK _{H3}	3,93(4)	3,78(4)	2,99(6)
logK _{H4}	2,26(4)	3,02(3)	-
∑logK _{Hi}	25,1	25,6	17,64

ii. Titrage de [Zn^{II}L3] et [Mn^{II}L3] à pH 7,06

Avant de titrer les complexes en fonction du pH nous avons voulu commencer par un titrage plus simple afin de déterminer les constantes apparentes des complexes à pH 7,06. Ici seul le nombre d'équivalents de métal est varié. Toutes ces mesures ont été effectuées dans le tampon [Tris] = 50 mM à pH 7,06. A l'échelle des concentrations spectrophométriques aucune précipitation n'est observée pour les deux complexes. A pH 7,06 le ligand est très largement sous la forme diprotoné.

a. [Zn^{II}L3] (Figure 94)

Dans le cas du Zn^{II}, on observe très clairement l'évolution hyperchrome des bandes du phénolate et des pyridines, caractéristique de la coordination (Figure 94 a et b). On peut souligner, qu'après ajout d'un équivalent de métal on a déjà formé plus de 98% du complexe, avec un plateau obtenu à 1,25 équivalents de métal (Figure 94 c). A pH 7,06, on peut en conclure que le système est très stable, ce qui est confirmé par cette distribution très abrupte. Avec une constante apparente logK_{app} = 7,6(9), il aurait été intéressant de refaire ce titrage avec un pH plus bas (5-6) afin de déstabiliser d'avantage le système. Néanmoins, cela n'a pas été dans nos priorités.

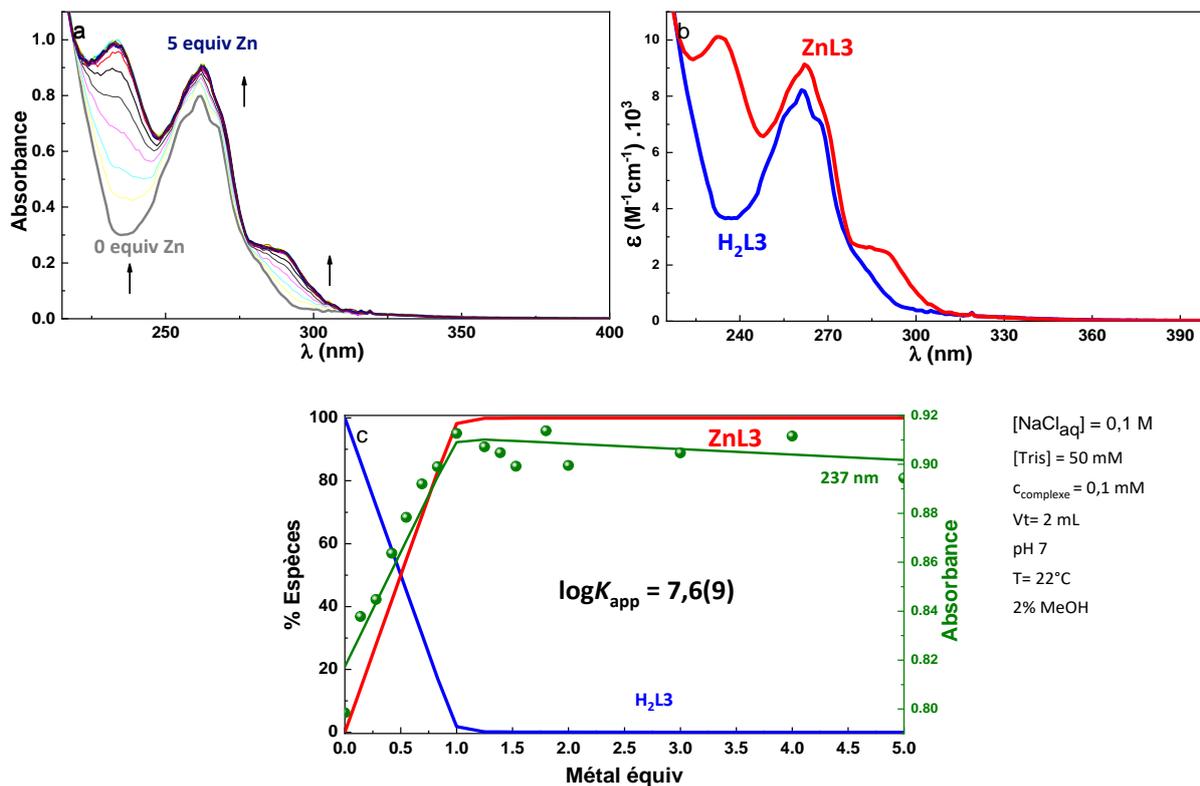


Figure 94 : (a) Titrage UV du ligand H_2L3 en fonction de la concentration de zinc(II). (b) Spectres calculés des espèces H_2L3 et $[ZnL3]$. (c) Distribution des espèces en fonction des équivalents de métal, les points expérimentaux et l'ajustement mathématique à 237 nm (vert).

b. $[Mn^{II}L3]$ (Figure 95)

Le titrage du complexe de Mn^{II} a été fait en batch, étant donné que la formation du complexe à température ambiante n'est pas instantanée. Les mesures sont effectuées 30 minutes après l'ajout du métal dans la solution de ligand. L'évolution des spectres d'absorption UV-visibles en fonction de l'ajout de Mn^{II} est très similaire à ce qui a été observé pour le Zn^{II} (Figure 95 a). De plus, les spectres d'absorption des complexes (Figure 95 b) sont très similaires, ce qui fait conclure à un même mode de coordination pour le Mn^{II} et le Zn^{II} . La différence entre les deux systèmes réside dans la stabilité thermodynamique à pH 7,06. Pour $[Mn^{II}L3]$, celle-ci est de $\log K_{app} = 5,5(1)$, qui est inférieur à celle de $[Zn^{II}L3]$ à pH 7,06. Cela se traduit sur le diagramme de distribution de $[Mn^{II}L3]$, où pour atteindre 98% de complexe il faut au moins 2 équivalents de métal (Figure 95 c).

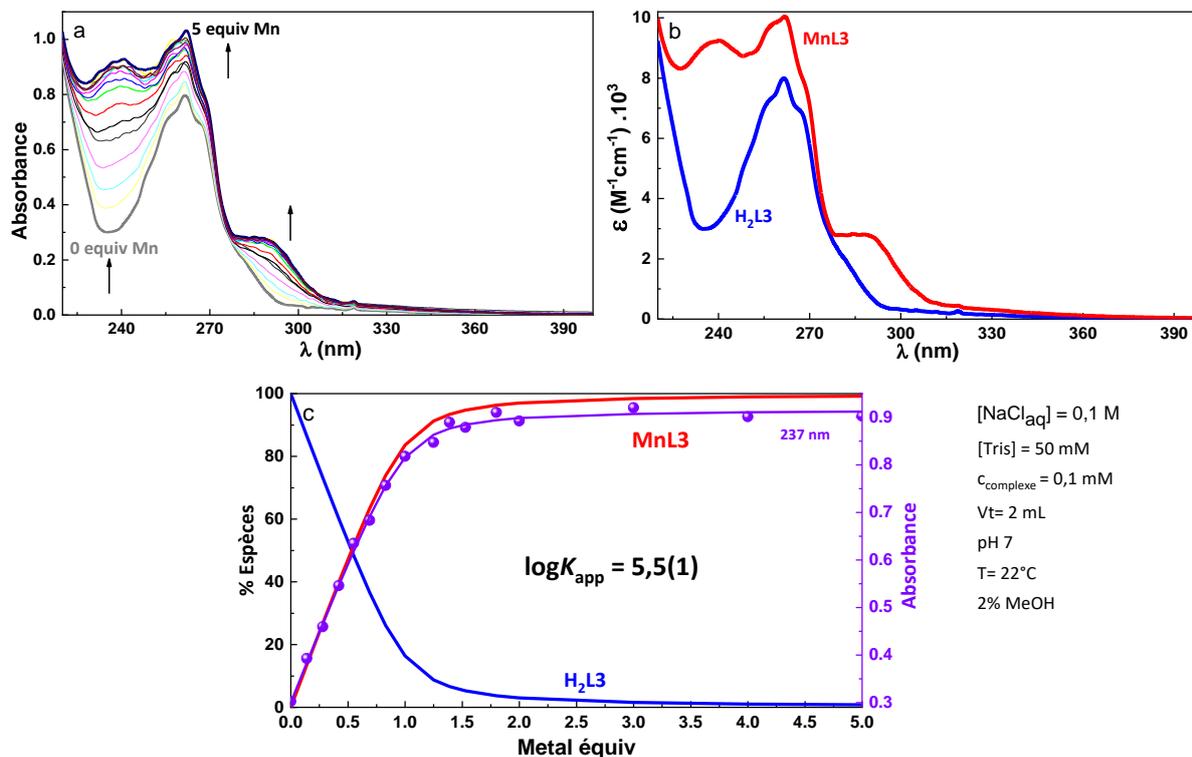


Figure 95 : (a) Titrage UV du ligand en fonction de la concentration du métal. (b) Spectres calculés des espèces L3 et $[MnL3]$. (c) Distribution des espèces en fonction des équivalents de métal, les points expérimentaux et l'ajustement mathématique à 237 nm.

iii. Titrage de $[Zn^{II}L3]$ et $[Mn^{II}L3]$ en fonction du pH

Connaissant les constantes apparentes, nous allons pouvoir sereinement effectuer les titrages des complexes en fonction du pH dans la même gamme que le ligand libre ($2 \leq pH \leq 11$).

a. $[Zn^{II}L3]$ (Figure 96)

Le titrage direct en mode automatique du complexe de Zn^{II} en fonction du pH a été effectué entre pH 2,6 et 11. Les données sont présentées à la Figure 96.

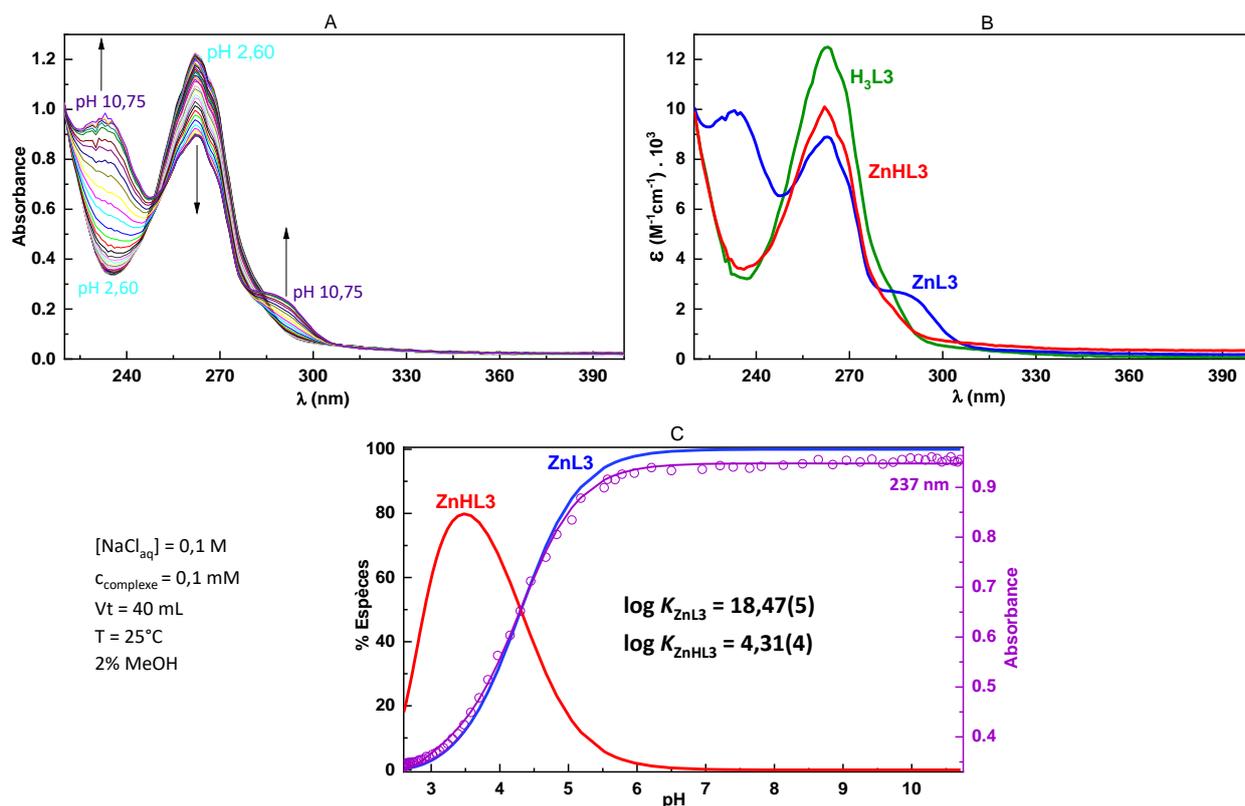


Figure 96 : (A) Titrage direct UV de $[ZnL_3]$ en fonction du pH. (B) Spectres calculés des espèces. (C) Distribution des espèces en fonction du pH, les points expérimentaux et l'ajustement mathématique à 237 nm.

Les spectres obtenus peuvent être déconvolués en 2 espèces majoritaires : $[ZnHL_3]$ et $[ZnL_3]$. Les valeurs de constantes obtenues sont les suivantes : $\log K_{ZnL_3} = 18,47(5)$ et $\log K_{ZnHL_3} = 4,31(4)$ Après analyse des données, nous notons les points suivants :

- Avec l'augmentation du pH, on voit que l'on forme une espèce du complexe protoné dans laquelle le phénol n'intervient pas dans la coordination du métal. C'est seulement à partir de pH 4,31 que l'on voit distinctement les bandes du phénolate intervenir, ce qui permet de conclure que le $\log K_H = 4,31(4)$ mesuré ici est celui du phénolate.
- On observe une diminution de l'absorbance de la bande des pyridines avec l'augmentation du pH. Cette évolution hypochrome de la bande de transition des pyridines est caractéristique de la disparition de l'espèce H_3L_3 avec l'augmentation du pH.
- La constante de stabilité thermodynamique est $\log K_{ZnL_3} = 18,47(5)$ ce qui est similaire à d'autres complexes de Zn^{II} avec des ligands bispidine puisque des valeurs entre 14 et 18 ont été obtenues.^[12,88,91,216]
- Enfin, on peut remonter à une constante apparente calculée afin de pouvoir la comparer à celle obtenue expérimentalement via l'équation (10) de Ringbom.^[217]

$$K_{app} = K_{formelle} * \frac{\alpha_{ZnL}}{\alpha_{LH} * \alpha_{Zn}} \quad (10)$$

Avec K_{app} , la constante apparente et α les coefficients de Ringbom.

- On calcule une constante apparente à pH 7,06 : $\log K_{app}(cal) = 6,58$ ce qui est en accord avec la constante déterminée expérimentalement à pH 7,06 : $\log K_{app}(exp) = 7,6(9)$.

b. $[Mn^{II}L3]$ (Figure 97)

Comme pour le titrage à pH fixe, le dosage du Mn^{II} est aussi réalisé en batch avec les temps d'attentes nécessaires afin d'atteindre l'équilibre du système. De pH 2 à 4 il faut 3h pour atteindre l'équilibre, de pH 4 à 5 il faut 1h40 et de pH 5 à 6 il faut 40 min à 25°C et de pH 6-7 il faut 10 min. Les variations des transitions électroniques en présence de Mn^{II} sont très similaires à celles observées en présence de Zn^{II} . Elles sont représentées aux Figure 97 a et b. Les données ont été analysées avec le même modèle et ont permises de déterminer une constante de stabilité formelle de $\log K_{MnL3} = 16,2(1)$.

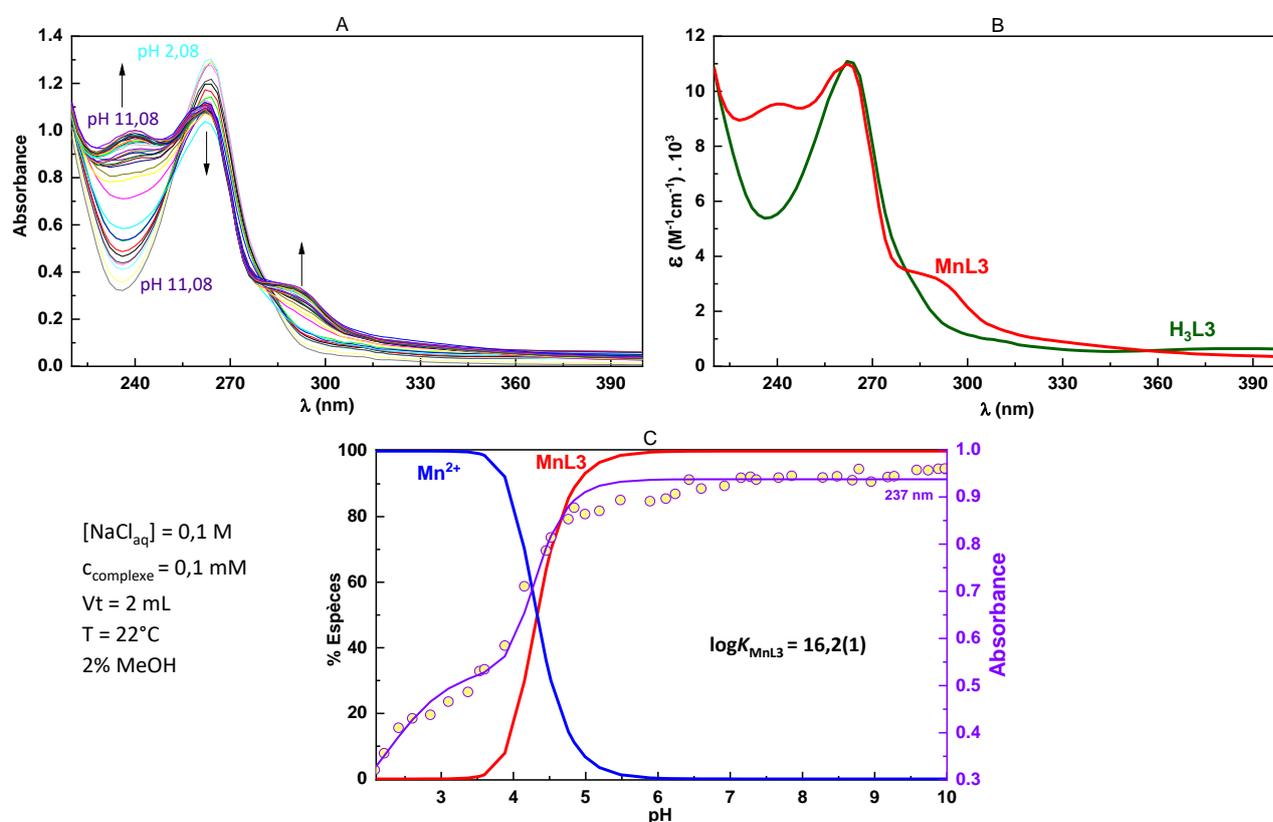


Figure 97 : (A) Titrage direct UV de $[Mn^{II}L3]$ en fonction du pH. (B) Spectres calculés des espèces. (C) Distribution des espèces en fonction du pH, les points expérimentaux et l'ajustement mathématique à 237 nm.

Toutefois ces données doivent être prises avec précaution car une légère déviation de la ligne de base est observée au fil du titrage. Connaissant les problèmes de solubilité, cela est probablement dû à une précipitation partielle même si elle n'est pas visible à l'œil nu. Cette déviation (diffusion) se traduit par une grande incertitude sur les valeurs des epsilon théoriques calculées.

En recalculant la constante apparente via la constante de stabilité formelle obtenue à pH 7,06, la valeur $\log K_{app}(cal) = 4,68$ ce qui est cohérent par rapport à la valeur expérimentale $\log K_{app}(exp) = 5,5(1)$.

C. Etude relaxométrique de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$

i. Titration en r_1

La complexation du Mn^{II} peut être également monitorée par la mesure du temps de relaxation longitudinale d'une solution L : M de stœchiométrie 1 : 1 en fonction du pH. En effet, la disparition de l'ion libre Mn^{II} et la formation du complexe $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ se traduit par un abaissement significatif de la relaxivité. Les relaxivités ont été déterminées dans des échantillons batchs, une fois l'équilibre atteint dans chacun des échantillons. Cette courbe de titrage relaxométrique en fonction du pH a été analysée pour calculer la constante de stabilité thermodynamique du complexe $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$, en tenant compte des constantes de protonation du ligand (Figure 88). La constante obtenue est de $\log K_{\text{MnL3}} = 14.9(2)$ (Figure 98), une valeur plus basse que ce que l'on obtient par le titrage spectrophométrique UV-visible, toutefois les deux titrages sont en accord.

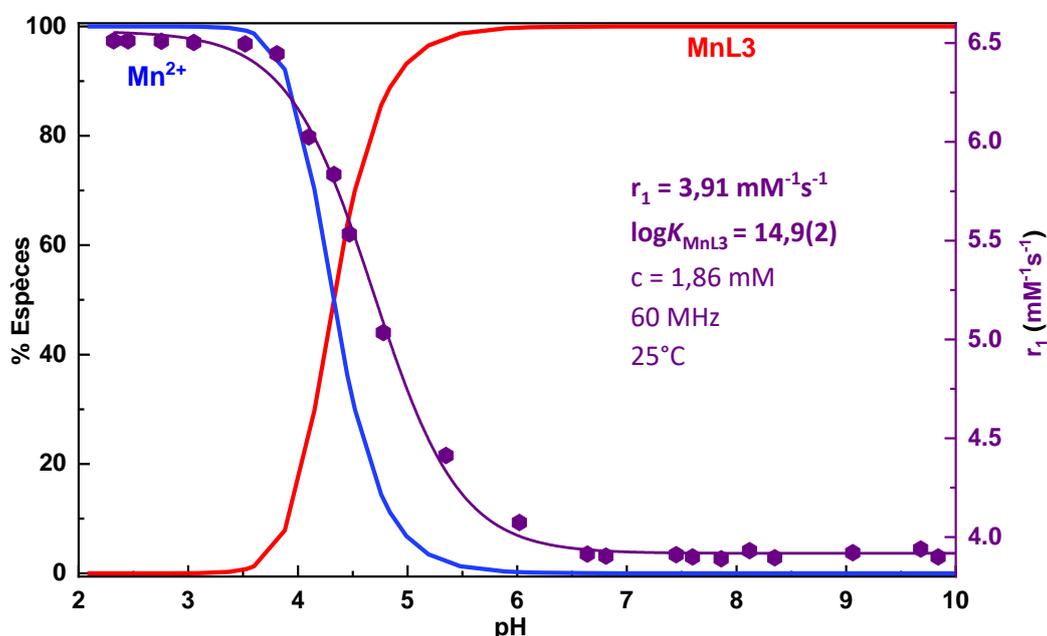


Figure 98 : Superposition des courbes de distribution déterminées par potentiométrie et titrage relaxométrique longitudinal (r_1) et son ajustement mathématique de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ en fonction du pH.

Si l'on compare les complexes manganèse ou de zinc à quelques exemples de bispidines de la littérature, dans le cas de $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{L4}]$ on mesure une constante de protonation que nous avons attribué à un acide carboxylique non lié (Tableau 13). En comparant les stabilités thermodynamiques de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ et $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{L3}]$ à d'autres types de ligands tels que $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{PyC3A}]$ ^[81], $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{PC2A-EA}]$ ^[83] ou des bispidines tels que $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L}_{\text{carbo}}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L}_{\text{phosp}}]$ ^[91] (Figure 99) on voit que celles-ci sont plutôt élevées.

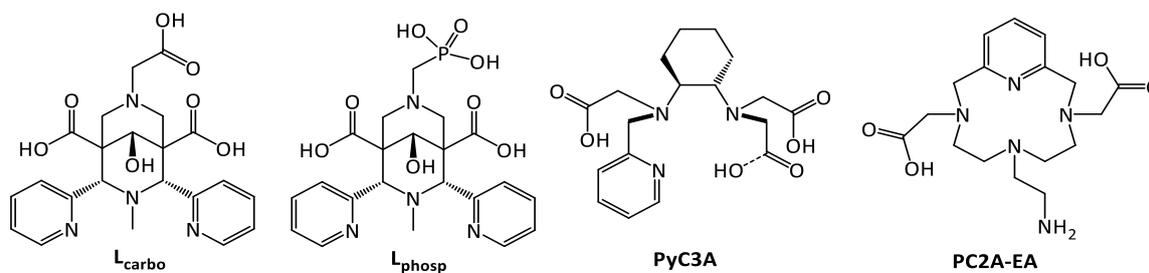


Figure 99 : Structure des ligands.

Tableau 13 : Récapitulatif de constantes obtenues par potentiométrie (violet), par UV (rouge) et par relaxométrie (noir). ^[a]
 $c_M = c_L = 10^{-5} \text{ M}$; pH 7,4.

	L3	L _{phosp}	L _{carbo}	PyC3A	PC2A-EA
logK _{H1}	11,45(2)	11,15(1)	9,54(4)	10,16	11,34
logK _{H2}	9,51(3)	7,35(3)	5,11(6)	6,39	8,93
	9,352(8)				
logK _{H3}	3,93(4)	3,78(4)	2,99(6)	3,13	6,91
	3,55(1)				
logK _{H4}	2,26(4)	3,02(3)	-	-	1,91
logK _{MnL}	16,2(1)	13,72(3)	11,26(4)	14,14	19,01
	14,9(2)				
logK _{MnHL}	-	5,31(2)	3,20(3)	2,43	6,88
logK _{MnH2L}	-	3,90(1)	-	-	2,50
logK _{ZnL}	18,47(5)	16,54(4)	13,72(2)	-	-
logK _{ZnHL}	4,31(4)	5,43(3)	3,26(1)	-	-
logK _{ZnH2L}	-	3,39(2)	-	-	-
pMn ^[a]	7,52	7,28	7,06	8,17	9,27
pZn ^[a]	8,66	8,76	8,29	-	-
K _{app} (MnL) (exp) pH 7	5,5(1)				
K _{app} (MnL) (calc) pH 7	4,68				
K _{app} (ZnL) (exp) pH 7	7,6(9)				
K _{app} (ZnL) (calc) pH 7	6,58				

IV. Etude relaxométrique et mesure de l'inertie cinétique de [Mn^{II}L₃]

A. Inertie cinétique

i. Suivi par relaxométrie

La dissociation des complexes dans les milieux biologiques peut se produire de différentes façons : la dissociation spontanée, acido-catalysée, métallo-assistée ou via un ligand compétiteur.^[216] Afin de comprendre comment les complexes se dissocient, des expériences de transmétallation avec un cation compétiteur sont réalisées à différents pH. Les études sont faites en très large excès d'ion métallique compétiteur afin de s'affranchir des variations de concentrations et de se placer dans des conditions de pseudo premier ordre. Dans ces conditions, la vitesse de la dissociation s'exprime telle que :

$$-\frac{d[\text{MnL}]_t}{dt} = k_{\text{obs}}[\text{MnL}]_t \quad (9)$$

Avec $[\text{MnL}]_t$ la concentration totale de complexe à un temps t .

Pour ces études, le cation Zn^{II} a été choisi, car étant un compétiteur direct du cation Mn^{II} dans les milieux biologiques. Diverses voies vers la dissociation du complexe de Mn^{II} sont possibles, elles ne sont pas toutes impliquées et dépendent du système (Figure 100).

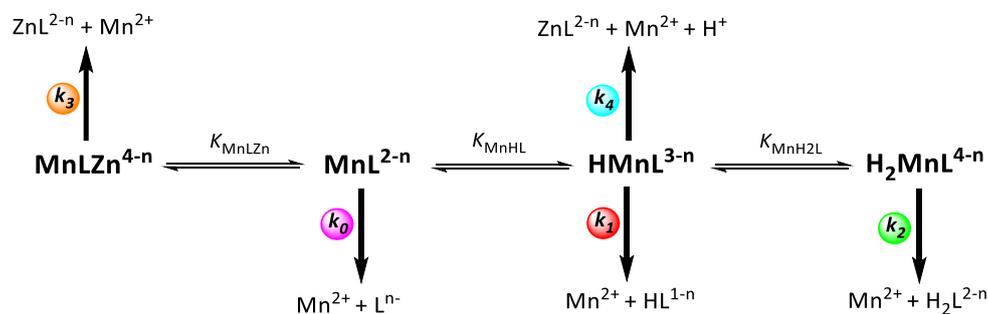


Figure 100 : schéma général des processus de dissociation potentiels des complexes de Mn^{2+} .

La constante de dissociation observée peut être exprimée en fonction des constantes de vitesse caractérisant les différentes voies de dissociation :

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_1[\text{H}^+] + k_2[\text{H}^+]^2 + k_3[\text{Zn}^{2+}] + k_4[\text{Zn}^{2+}][\text{H}^+]}{1 + K_{\text{MnHL}}[\text{H}^+] + K_{\text{MnHL}}K_{\text{MnH}_2\text{L}}[\text{H}^+]^2 + K_{\text{MnZnL}}[\text{Zn}^{2+}]} \quad (10)$$

Avec les constantes de vitesse telles que :

k_0 : dissociation spontanée.

k_1 : de dissociation du complexe monoproté.

k_2 : de dissociation proton-assistée du complexe monoproté.

k_3 : de dissociation métal-assistée.

k_4 : de dissociation métal-assistée du complexe protoné.

K_{MnHL} , K_{MnH_2L} et K_{MnLZn} : constantes de protonation des espèces $[MnHL]$, $[MnH_2L]$ et $[MnLZn]$.

Durant l'étude, le complexe $[Mn^{II}L_3]$ a été mis en présence de 50 équivalents de Zn^{II} à 37°C. La dissociation du complexe a été suivie par relaxométrie à différents pH dans le temps. Notons que l'augmentation de relaxivité traduit la hausse de la concentration du manganèse libre. Les courbes ont été traitées sur MATLAB afin d'en obtenir les meilleurs ajustements mathématiques pour accéder aux k_{obs} et le temps de demi-vie (dans le cas d'un pseudo premier ordre, $t_{1/2} = \ln(2)/k_{obs}$). A 50 équivalents de Zn^{II} et à pH 3 on mesure un temps de demi-vie de 10 min, à pH 3,49 on mesure un temps de demi-vie de 19,2 min et à pH 6 on mesure un temps de demi-vie de 20,3h (Figure 101).

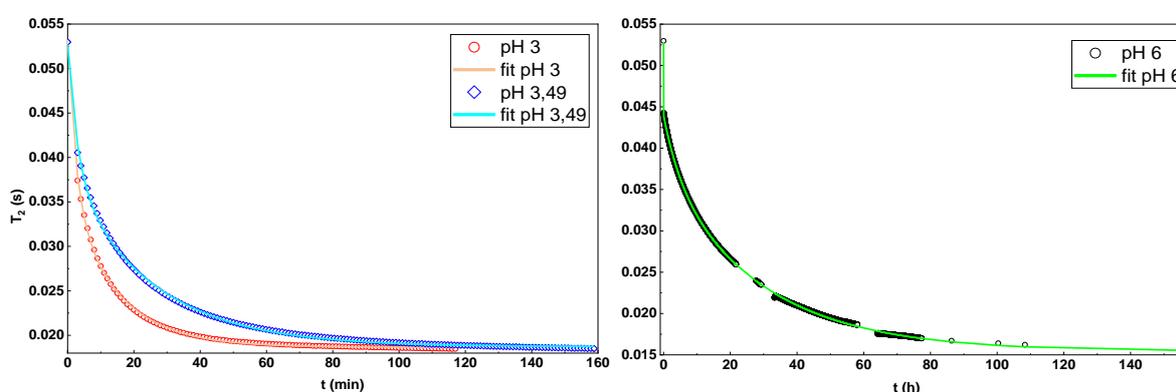


Figure 101 : Variation du temps de relaxation transversale de $[Mn^{II}L_3]$ ($c = 1,1 \text{ mM}$; $I = 0,1 \text{ M NaCl}$; 37°C ; 60 MHz) en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn^{II} . pH3-3,49 : tampon diméthyle pipérazine – 50 mM ; pH6 : MES – 50 mM. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les courbes aux ajustement mathématiques des données expérimentales.

En comparaison $[MnL_{lys}]$: à pH 6 et 50 équivalents de zinc on ne mesure pas de relargage de manganèse libre.^[88] Nous ne savons pas si l'inertie cinétique serait plus faible par rapport à d'autres bispidine^{[91] [92]} mais afin d'abaisser le potentiel redox afin de stabiliser d'avantage le degré d'oxydation manganèse (III) cela est nécessaire.

Tableau 14 : Constante de vitesse de pseudo-premier ordre (k_{obs}) et temps de demi-vie de $[Mn^{II}L_3]$ ($c = 1,1 \text{ mM}$; $I = 0,1 \text{ M NaCl}$; 37°C ; 60 MHz) en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn^{II} . pH3-3,49 : tampon diméthyle pipérazine – 50 mM ; pH 6 : MES – 50 mM.

$k_{obs} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ pH 3,01	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ pH 3,49	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}) / t_{1/2}$ pH 6,02
1,15 10^{-3} / 10 min	6,0 10^{-4} / 19,2 min	9,5 10^{-6} / 20,3 h

Si l'on compare la dissociation de $[Mn^{II}L_3]$ à d'autres complexes de manganèse à pH 6 avec 50 équivalents de zinc on voit que le complexe à un temps de demi-vie correct (Tableau 15).

Tableau 15 : Temps de demi-vie des différents complexes de manganèse avec 50 équivalents de zinc à 37°C. pdd : pas de dissociation. c = 1mM.

	[Mn ^{II} L3]	[Mn ^{II} L _{lys}] ^[86]	[Mn ^{II} PyC3A] ^[80]	[Mn ^{II} PC2A-EA] ^[82]
t _{1/2}	20,3h	pdd	17,1 min	54,4h

ii. Suivi par LC MRM

Nous avons eu l'occasion durant ce projet d'effectuer des mesures d'inertie cinétique et stabilité de H₃L3 et [Mn^{II}L3] à différents pH et dans le plasma humain suivi par LC MRM (Liquid Chromatography Multiple Reaction Monitoring). Ces expériences ont été réalisées par la société PCBIS, dans le cadre d'un projet de maturation de la SATT Connectus (société d'accélération de transfert de technologie). Les résultats sont présentés à la Figure 102.

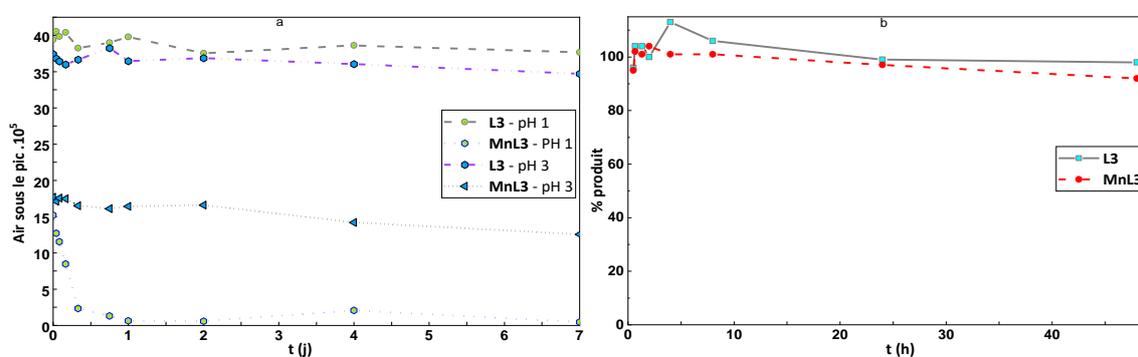


Figure 102 : Suivi de la stabilité de L3 et l'inertie cinétique de [MnL3] dans différentes conditions : (a) différents pH, (b) plasma humain.

Le ligand et le complexe ont été exposés à de pH très acides, pH 1 et 3. Pour le ligand, aucune dégradation n'est constatée à pH 1 ou 3 à une concentration de 1 μM, il est donc stable. Concernant le complexe, à pH 1 on mesure un relargage de métal à partir de 5h ± 1, à pH 3 on mesure un relargage de métal à partir de 362h ± 32. A pH 3 on constate qu'il y a une influence du Zn^{II} dans la dissociation du complexe [Mn^{II}L3] avec un t_{1/2} = 10 min à 37°C avec un concentration de complexe à 1,1 mM. La stabilité du ligand et du complexe a enfin été étudiées dans le plasma humain, aucune évolution n'est observée sur une période de 50 h, ce qui est très prometteur pour une potentielle utilisation en tant qu'agent de contraste. En comparaison concernant [MnL_{lys}] à pH 1 pour 1 mM de complexe on a un temps de demi-vie de 1,5h.^[88]

Tableau 16 : Récapitulatif des résultats de stabilité de **L3** et d'inertie cinétique **[Mn^{II}L3]** par LC MRM et par suivi relaxométrique. [a] : par LC MRM, [b] : par relaxométrie.

Conditions	t _{stabilité} (j) – L3	T _{inertie} ^[a] / ₂ ^[b] – [Mn ^{II} L3]
1 μM ; 20-23°C ; HCl pH 1 ^[a]	Stable, >> 7	5h ± 1
1 μM ; 20-23°C ; HCl pH 3 ^[a]	Stable, >> 7	362 h ± 32
1,1 mM ; 37°C; pH 3; 50 eq Zn ^{II} ^[b]	Stable	10 min
1,1 mM ; 37°C; pH 6; 50 eq Zn ^{II} ^[b]	Stable	20,3 h
1 μM, 37°C ; plasma humain ^[a]	Stable	Inerte

B. Relaxométrie

Pour rappel, le potentiel des agents de contraste à accélérer la relaxation des protons des molécules d'eau environnantes est mesuré par leur relaxivité (r_1). Cette dernière se définit comme l'augmentation paramagnétique de la vitesse de relaxation longitudinale ($1/T_1$), normalisée par la concentration (mM) de l'agent de contraste, et dépend de plusieurs paramètres tels que la température ou le champ magnétique.

i. Mesure de relaxivité

En complément de ces mesures, la relaxivité longitudinale (r_1) du complexe **[Mn^{II}L3]** a été mesurée à 60 MHz à 25°C dans l'eau afin de caractériser son efficacité en tant qu'agent de contraste IRM et de la comparer aux autres systèmes de la littérature. La relaxivité de **[Mn^{II}L3]** est de 3,91 mM⁻¹s⁻¹. Afin de positionner **[Mn^{II}L3]**, nous l'avons comparé aux systèmes à base de manganèse les plus récents tel que **[Mn^{II}PyC3A]** ^[81], **[Mn^{II}PC2A-EA]** ^[83], **[MnL_{lys}]** ^[88] ^[218] et l'agent de contraste le plus utilisé en routine à base de gadolinium le **Dotarem** ^[219] (Figure 103).

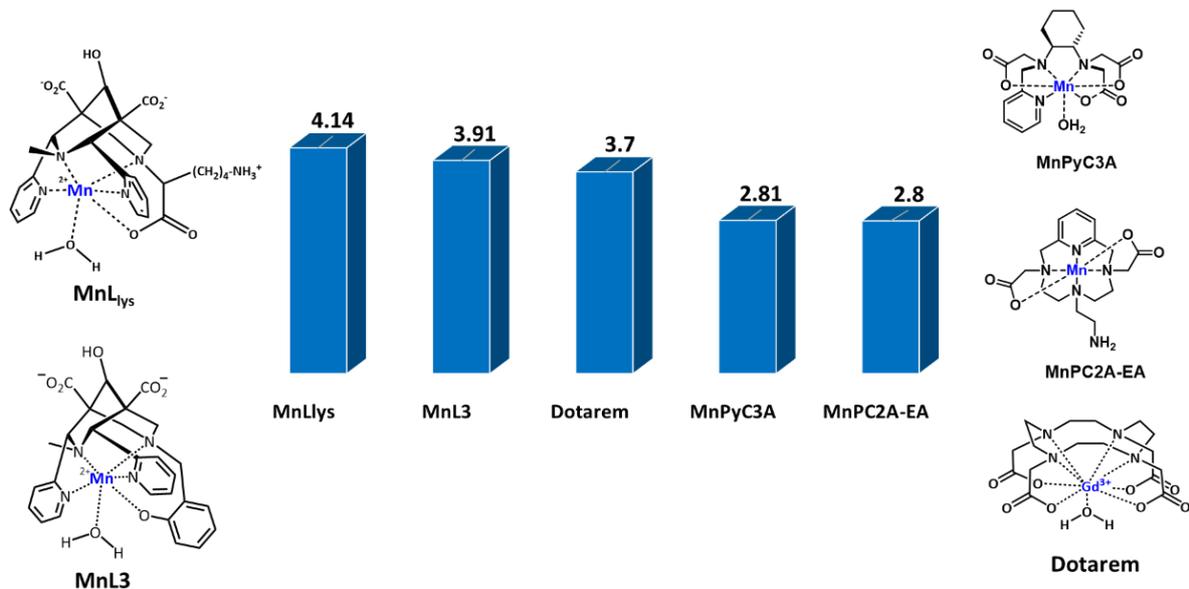


Figure 103 : Relaxivité de $[Mn^{II}L3]$, comparée à d'autres complexes monohydratés existants données en $mM^{-1}s^{-1}$ à 60 MHz, pH 7 dans l'eau à 25°C.

Le complexe $[Mn^{II}L3]$ possède un très bon positionnement, se situant au-dessus des autres complexes de manganèse (hors bispidine). Cette relaxivité s'explique dans un premier temps par la présence d'au moins une molécule d'eau dans la première sphère de coordination. De plus, les fonctions carboxylates non-coordinantes peuvent augmenter la relaxivité par des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau en "seconde sphère". La différence de relaxivité de $[Mn^{II}L3]$ et $[Mn^{II}Llys]$ peut notamment s'expliquer par la présence du motif lysine à l'origine de liaisons hydrogènes intra et/ou intermoléculaire, ainsi augmentant la contribution du mécanisme de deuxième sphère. Les complexes de bispidines sont structurellement différents des autres complexes, les facteurs pouvant expliquer la relaxivité supérieure des complexes de bispidine sont avant tout leur poids moléculaire plus élevé, donc un temps de rotation corrélational plus long, ainsi que la contribution du mécanisme de relaxation de deuxième sphère.

ii. Mesure de RMN de l'oxygène 17

En 2013, Caravan *et al.* ont montré qu'il est possible d'estimer le nombre de molécule d'eau (q) dans la première sphère de coordination du cation Mn^{II} dans un complexe à partir des temps de relaxation transversale de $l^{17}O$ (avec une erreur ~20%) à condition qu'on puisse voir un maximum sur la courbe de $1/T_{2r}$ vs température. ^[220] Pour effectuer des mesures de RMN de $l^{17}O$, il faut enrichir la solution aqueuse avec du $H_2^{17}O$ et mesurer les temps de relaxation transversale à différentes températures. L'équation 11 nous permet par la suite d'estimer le nombre d'hydratation q.

$$q = \frac{r_{2max}^{\circ}}{510} \quad (11)$$

Avec r_{2}° , maximum de la relaxivité transversale de $l^{17}O$.

Dans le cas de $[Mn^{II}L3]$ $r_{2max}^{\circ} = 439 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. En appliquant l'équation 11, on a $q = 0,9$. En considérant une erreur de 20% on peut conclure qu'il y a une seule molécule d'eau dans la première sphère de coordination de $[Mn^{II}L3]$ (Figure 104), en complet accord avec la valeur de la relaxivité de ^1H .

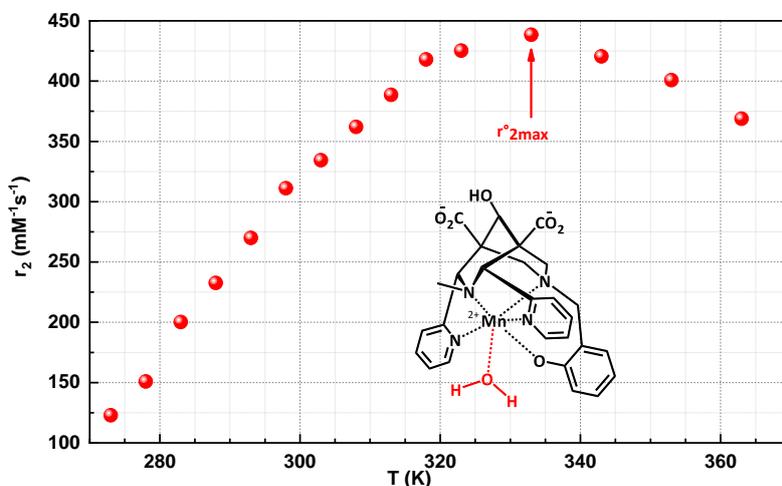


Figure 104 : Mesure de la relaxivité transversale de l'oxygène 17 de $[Mn^{II}L3]$ en fonction de la température. $I = 0,15 \text{ M}$ (NaCl) ; $c = 4,317 \text{ mM}$.

iii. Mesure profil NMRD et les paramètres gouvernants la relaxivité

Le profil NMRD correspond à la variation des relaxivités longitudinales avec la fréquence Larmor du proton et présente pour $[Mn^{II}L3]$ une allure classique des complexes de Mn^{II} monohydratés et de petites tailles. La relaxivité du complexe diminue en passant de 25°C à 37°C. Ceci démontre que la relaxivité est limitée par le temps de rotation corrélacionnelle (τ_r) du complexe et non par la vitesse d'échange de la molécule d'eau dans la première sphère de coordination (Figure 105).^[221]

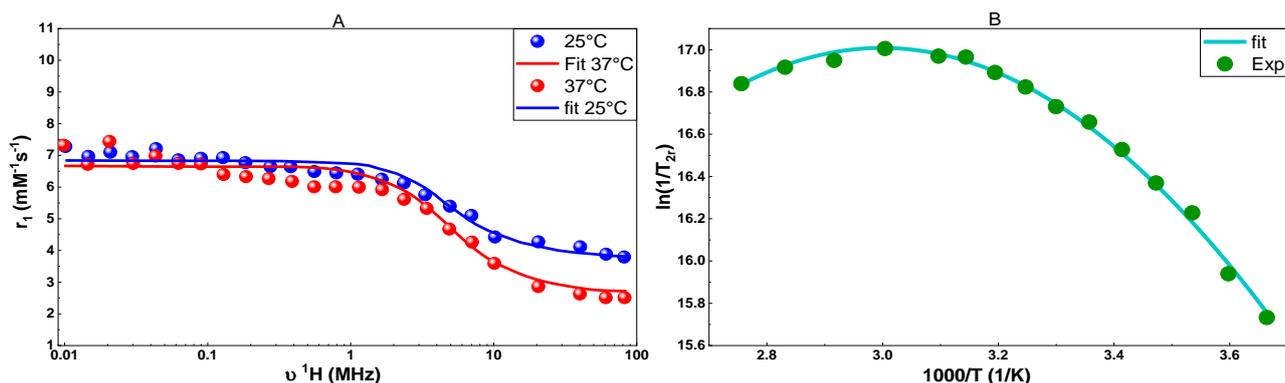


Figure 105 : (A) Mesure du profil NMRD de $[Mn^{II}L3]$ à 25°C et 37°C. $I = 0,15 \text{ M}$ (NaCl) ; $c = 1,1 \text{ mM}$. (B) Mesure de la relaxivité transversale réduite de ^{17}O (400 MHz) de $[Mn^{II}L3]$ en fonction de la température. $I = 0,15 \text{ M}$ (NaCl) ; $c = 4,317 \text{ mM}$. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les lignes aux ajustements mathématiques des données expérimentales.

Les profils NMRD et les temps de relaxation transversale de ^{17}O ont été analysés ensemble selon la théorie de Solomon-Bloembergen-Morgan de la relaxation paramagnétique. Dans cet ajustement mathématique, plusieurs paramètres ont été calculés, comme la constante de vitesse

(k_{ex}^{298}), l'enthalpie (ΔH^\ddagger) et l'entropie (ΔS^\ddagger) de l'échange d'eau, la constante de couplage scalaire de l' ^{17}O (A_0/\hbar) le temps de corrélation (τ_{rH}^{298}) et l'énergie d'activation (E_{rH}) de la rotation, et les paramètres caractérisant la relaxation électronique, comme le temps de corrélation (τ_v^{298}) et l'énergie (Δ^2) du zéro field splitting. Dans le fit, nous n'avons pas inclus de contribution de la deuxième sphère. Il est probable que les molécules d'eau dans la deuxième sphère, essentiellement autour des carboxylates non-coordinants, contribuent aussi à la relaxivité totale, néanmoins, cette contribution est assez difficile à estimer. Il faut noter que le fait de ne pas inclure la relaxivité de 2nd sphère dans l'analyse conduit à une (probablement légère) surestimation du τ_{rH}^{298} .

Le complexe **[Mn^{II}L3]** présente un temps de corrélation rotationnelle $\tau_{\text{rH}} = 93(3)$ ps, une valeur qui reste raisonnable pour la taille du complexe (Tableau 17). Le faible écart de relaxivité observé entre **[Mn^{II}L3]** et **[Mn^{II}HL_{lys}]** est dû à la légère différence dans la dynamique de rotation des deux complexes (liée à leur différent poids moléculaire), mais également à une plus importante contribution de la deuxième sphère pour **[Mn^{II}HL_{lys}]** grâce au substituant L-lysine (Tableau 17).

Les constantes de vitesse d'échange de l'eau en première sphère, k_{ex}^{298} , sont directement obtenues à partir des vitesses de relaxation transversale réduites de ^{17}O , pour **[Mn^{II}L3]** $k_{\text{ex}}^{298} = 1,8 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Parmi les quatre complexes discutés ici on peut voir que **[Mn^{II}HL_{lys}]** [88] et **Mn^{II}L_{carbo}** [91] ont des k_{ex}^{298} très proches, respectivement $5,1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ et $5,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ tandis que pour **[Mn^{II}L3]** l'échange est plus lent, mais reste ~ 1 ordre de grandeur plus rapide que pour **[Mn^{II}L_{phosp}]** [91] ($k_{\text{ex}}^{298} = 0,12 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$). Cette différence peut être liée à la taille du substituant en N7 (Figure 106), qui est plus encombrant dans le cas du **Mn^{II}L3**, ainsi limitant l'entrée d'une deuxième molécule d'eau dans un processus associatif d'échange d'eau. Dans tous les cas, cette vitesse est suffisamment élevée pour ne pas avoir d'influence sur la relaxivité car c'est le temps de corrélation rotationnelle qui est limitant pour ces systèmes.

Tableau 17 : Paramètres obtenus à partir des ajustements mathématiques des mesures ^{17}O et profil NMRD.

	$\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}$	$\text{Mn}^{\text{II}}\text{L}_{\text{carbo}}$ [91]	$\text{Mn}^{\text{II}}\text{L}_{\text{phosp}}$ [91]	$\text{Mn}^{\text{II}}\text{HL}_{\text{lys}}$ [88]
$r_1(\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})/60 \text{ MHz}/25^\circ\text{C}$	3,91	3,66	4,31	4,14
M ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	577,53	529,45	565,41	600,57
$k_{\text{ex}}^{298} (10^7 \text{ s}^{-1})$	1,8 (2)	5,5(1)	0,12(1)	5,1(7)
$\Delta H^\ddagger (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	20,3(5)	14,9 (4)	25,7(7)	10,6 (1)
$\Delta S^\ddagger (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	-38(3)	-96,7	-42(2)	-62(8)
$E_{\text{rH}} (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	25,0(2)	20(1)	19(1)	22(1)
$\tau_{\text{rH}}^{298} (\text{ps})$	93(3)	89(2)	92(2)	100(5)
$\tau_{\text{v}}^{298} (\text{ps})$	25(2)	17(1)	22(1)	24(10)
$\Delta^2 (10^{-19} \text{ s}^{-2})$	0,62(9)	1,64(9)	0,35(1)	0,8(1)
$A_0/\hbar (10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-2})$	36(1)	33,2(2)	30,0(2)	28,0(1)

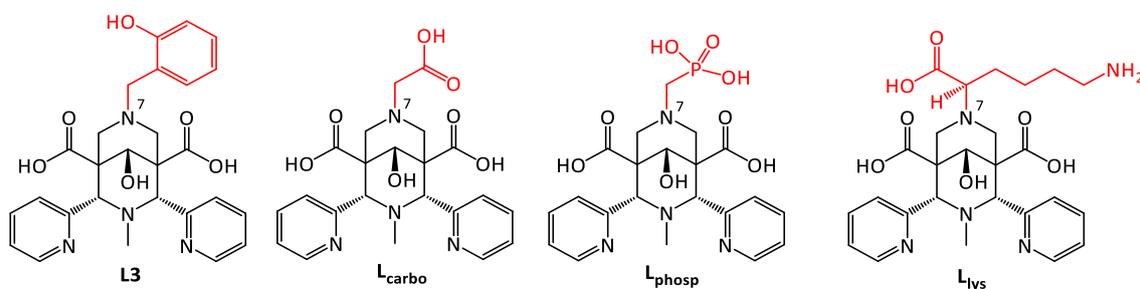


Figure 106 : **L3** et les ligands discutés.

En effet, l'entropie d'activation ΔS^\ddagger permet d'avoir une information sur le mécanisme d'échange des molécules d'eau. Lorsque cette dernière est positive, le processus tend vers un mécanisme dissociatif où le départ de la molécule d'eau liée au métal se fait avant l'arrivée d'une autre molécule d'eau. Inversement, lorsque l'entropie d'activation est négative, le mécanisme tend vers un mécanisme associatif et le départ de la molécule d'eau liée au métal se fait après l'arrivée d'une autre molécule d'eau. Cependant, il faut noter que l'erreur est toujours assez importante sur la valeur d'entropie déterminée à partir des données de RMN de ^{17}O . Néanmoins, la valeur de l'entropie d'activation ΔS^\ddagger de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ est fortement négative $\{-38(3) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\}$, tout comme les trois autres complexes (Tableau 17) et indique avec certitude un mécanisme d'échange d'eau associatif. C'est ce qui est généralement attendu avec des complexes de Mn^{II} hexadentate où le mode d'activation du mécanisme d'échange passe par un état de transition au nombre de coordination de sept tandis qu'un mécanisme dissociatif impliquerait un état de transition avec un nombre de coordination de 5, ce qui est moins probable.^[222]

V. Potentiel redox et stabilité thermodynamique théorique de [Mn^{III}L3]

Pour développer une sonde redox IRM à base de manganèse plusieurs conditions doivent être réunies. Tout d'abord, le système doit avoir un potentiel redox suffisamment bas pour permettre l'existence des états d'oxydation Mn^{II} et Mn^{III}. De plus, le système redox doit être réversible ou à minima quasi-réversible. Ces propriétés ont été étudiées par voltampérométrie cyclique en collaboration avec l'équipe du Pr Clotilde Policar (ENS Paris).

Le potentiel redox de [MnL3] est de $E_{1/2} = 306$ mV vs ESC avec un potentiel de réduction $E_{red} = 226$ mV et un potentiel d'oxydation $E_{ox} = 363$ mV. Le $\Delta E = 137$ mV on a donc un système quasi-réversible dans le cas de [MnL3] (Figure 107-A/B). Le potentiel à demi-vague ($E_{1/2}$) est la moyenne du potentiel du pic anodique et le pic cathodique.

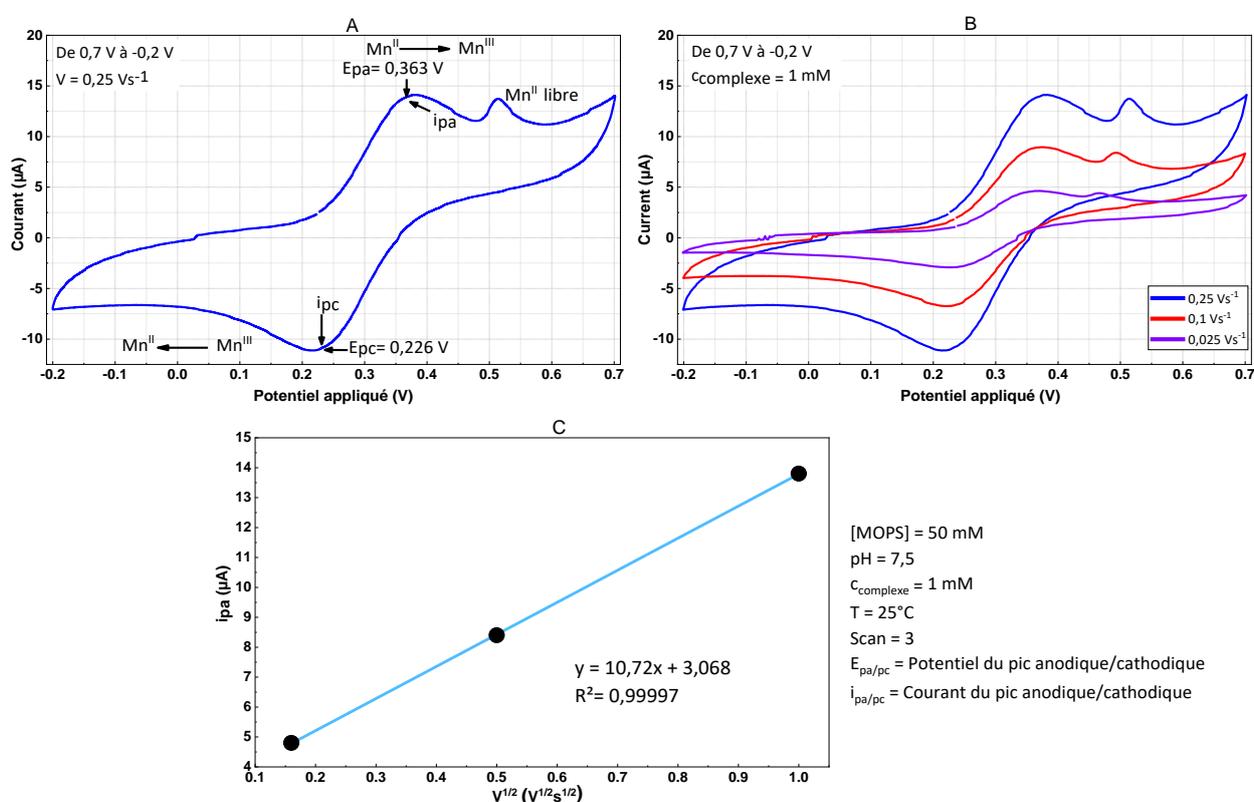


Figure 107 : (A) Voltampérogramme enregistré pour [MnL3]. (B) Voltampérogramme enregistré pour [MnL3] à différentes vitesses de balayage. (C) Influence de la vitesse de balayage puissance 1/2 sur i_{pa} . * : suivi de la vague d'oxydation du manganèse libre.

Un autre critère permettant de vérifier la réversibilité du système est la relation du système i_{pc} ou $i_{pa} = f(v^{1/2})$.^[223] Dans le cas de [MnL3] on a une linéarité (Figure 107-C) avec un $R^2 = 0,99997$, on a ici un réversible.

Dans le cas de [MnL3], on peut voir une sonde vague d'oxydation semblant indiquer du manganèse libre. Cette hypothèse a été confirmée en effectuant le voltampérogramme de MnCl₂ dans les mêmes conditions (Figure 108).

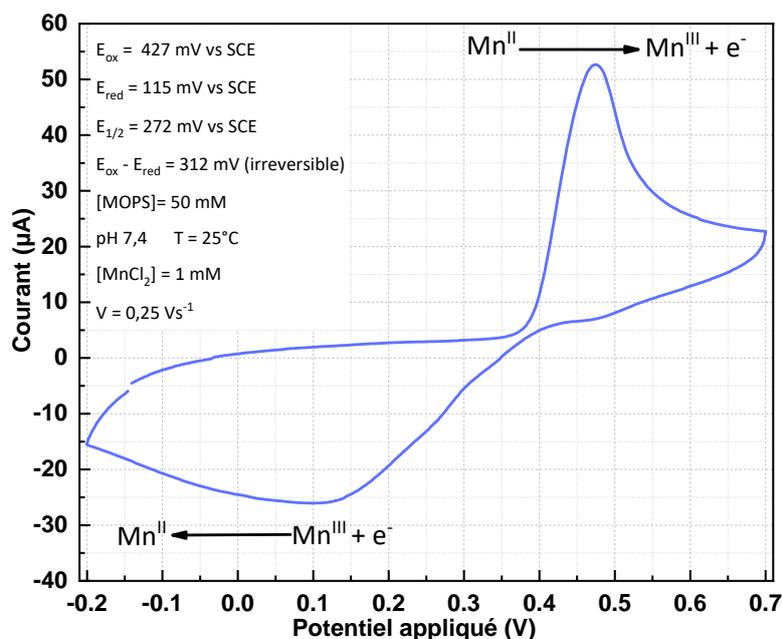


Figure 108 : Voltampérogramme de $MnCl_2$.

La première hypothèse qui a été exploré est le fait qu'il restait du manganèse libre dans la poudre de complexe à suite de la purification. Mais cette hypothèse a rapidement été écartée car si l'on analyse le temps de rétention du complexe **[Mn^{II}L3]**, celui-ci élut au bout de 15 min. La méthode que nous utilisons consiste à commencer la purification avec 100% d'eau durant les 5 premières minutes puis augmenter progressivement le pourcentage de méthanol jusqu'à 100% les 10 minutes suivant. Il est difficile de penser que du manganèse libre persiste dans ces conditions. La seconde hypothèse semblant plus cohérente est que durant le processus d'oxydation du degré d'oxydation +II à +III il y est un relargage de manganèse libre. Afin de confirmer cette supposition, nous avons ajouté 0,5 équivalent de $MnCl_2$ dans la solution contenant le complexe 1-1 et comme attendu nous avons obtenu une très forte augmentation de la vague d'oxydation liée au manganèse libre (Figure 109). En mesurant les aires de la vague d'oxydation du manganèse libre nous avons pu déterminer 3,7% de manganèse libre au bout de 3 cycles oxydation-réduction du complexe **[MnL3]** (Figure 109).

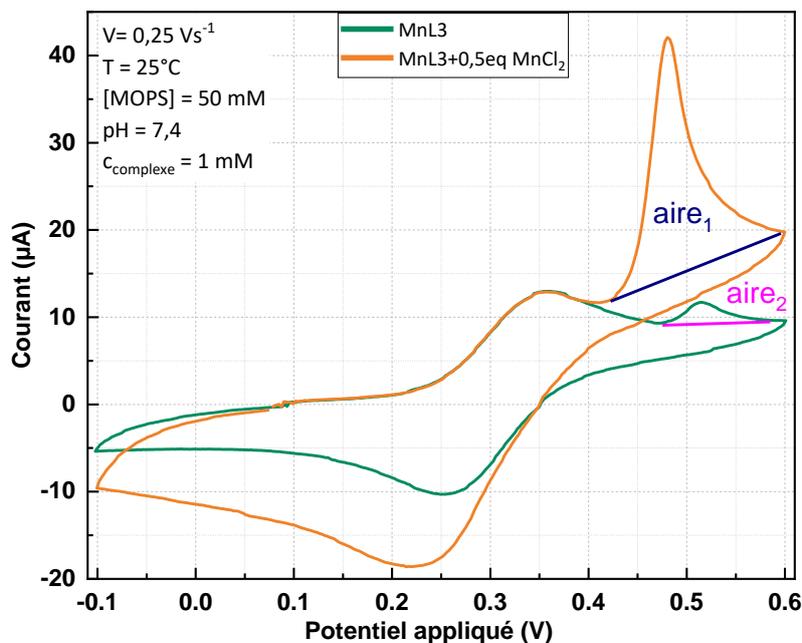


Figure 109 : Voltampérogramme de **[MnL3]** avec et sans ajout de 0,5 équivalent de $MnCl_2$.

A partir de ce potentiel redox et connaissant la constante de stabilité du complexe de Mn^{II} on peut remonter à la stabilité thermodynamique théorique du complexe de Mn^{III} via l'équation 12 et 13.^[224]

$$E'(Mn^{2/3}L) = E^\circ(Mn^{2/3}) - \frac{2.303RT}{nF} \log\left(\frac{K_{Mn^3L}}{K_{Mn^2L}}\right) \quad (12)$$

Soit

$$K_{Mn^3L} = 10^{\frac{-E' + E^\circ(Mn^{2/3})}{\frac{2.303RT}{nF}}} \cdot K_{Mn^2L} \quad (13)$$

Avec R la constante des gaz parfait $8,31 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$; F la constante de Faraday $96485,3 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$; T = 298,15 K; la constante de stabilité du complexe **[Mn^{III}L3]** $K_{Mn(III)L} = 10^{16,2}$; le potentiel redox du complexe **[MnL3]** $E'(Mn^{2/3}L) = 0,306 \text{ V vs SCE}$; le potentiel standard du couple $Mn^{2/3}$ $E^\circ(Mn^{2/3}) = 1,266 \text{ V vs SCE}$. Ce qui permet de déterminer une constante de stabilité du complexe de **[Mn^{III}L3]**: $K_{Mn(III)L} = 10^{32,43}$.

Cette stabilité théorique peut être comparés à diverses stabilités déterminées pour d'autres complexes de manganèse existant dans la littérature tels que : **[Mn(JED)]**,^[134] **[Mn(HBED)]**,^[134] **[Mn(EDTA)]**,^[225] **[Mn(HBET)]**,^[136] **[Mn(CyHBET-NO₂)]**,^[136] **[Mn(NOTA)]**,^[226] **[Mn(15-pyN₃O₂)]** ^[227] ou encore **[Mn(15-pyN₅)]**.^[227] Les données ont été regroupées dans le Tableau 18 où l'on peut voir que **[MnL3]** est plutôt bien placé par rapport à différents complexes existant que ce soit des chaînes linéaires ou macrocycliques.

Tableau 18 : Comparatif des potentiels redox et des stabilités thermodynamiques de différents complexes de Mn^{II/III} par rapport à différents complexes de manganèse existants avec des ligands à chaîne linéaire ou macrocyclique.

Mn-complexe	E _{1/2} (V vs SCE)	Système redox	Mn ^{II} logK	Mn ^{III} logK
[MnL3]	0,306	Réversible	16,2	32,43
[Mn(HBED)]	-0,091	Irréversible	6,3	29,4
[Mn(JED)]	0,22	Irréversible	10,8	28,6
[Mn(CyHBET-NO ₂)]	0,329	Irréversible	10,1	26,0
[Mn(HBET)]	0,219	Irréversible	8,0	25,7
[Mn(NOTA)]	0,50	Réversible	10,5	23,6
[Mn(EDTA)]	0,81	Irréversible	10,5	22,5
[Mn(15-pyN ₅)]	0,89	Quasi-réversible	7,7	14,2
[Mn(15-pyN ₃ O ₂)]	0,79	Quasi-réversible	5,2	13,3

VI. Etude de [Mn^{III}L3]

Pour commencer ce paragraphe, il est important de souligner que ces études sur le Mn au degré d'oxydation +III sont fortement exploratoires. Dans la littérature, peu d'études s'intéressent au degré d'oxydation +III en comparaison des complexes de Mn^{II}, dû à l'instabilité du Mn^{III} en solution.^[228] La première chose que nous nous sommes demandés est : comment former et isoler ces complexes de Mn^{III} ? La première partie va donc être consacrée à la formation du complexe de Mn^{III}. Cette partie a été bien plus difficile que ce que nous pensions. Trois voies de formation différentes ont été explorées ; elles n'ont pas toutes fonctionnés mais je trouvais intéressant de les présenter brièvement dans cette partie. Ensuite, différentes techniques de caractérisation ont été envisagées.

A. Formation du complexe [Mn^{III}L3]

i. Première voie de formation

La première voie de formation du complexe de Mn^{III} a été inspirée d'un protocole de la littérature.^[134] Il s'agit de mélanger à une solution aqueuse de ligand à pH 7,4 une poudre de MnF₃ afin de former le complexe correspondant (Figure 110).

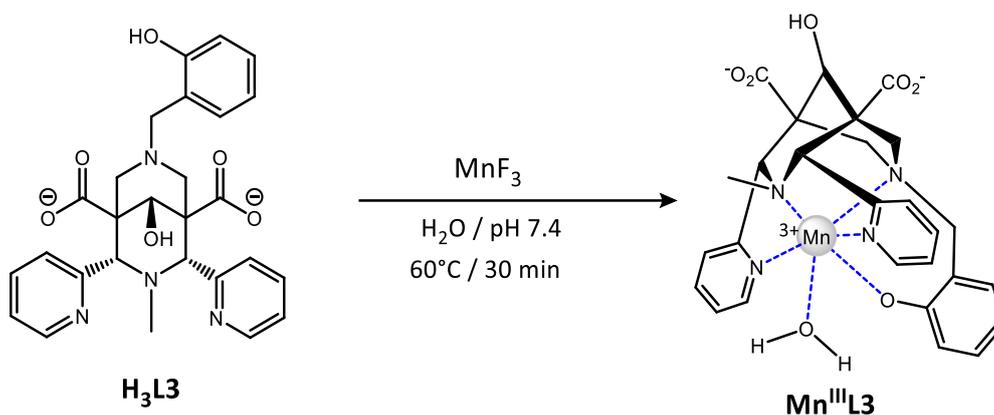


Figure 110 : Première voie de formation du complexe $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$.

La complexation a été suivie par HPLC sur colonne phase inverse C18, dans les conditions classiques ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$). Au bout de 30 min, il ne restait plus de ligand de départ. La comparaison des temps de rétention du ligand $\text{H}_3\text{L3}$, $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ et de ce nouveau complexe ($\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}$) dans les mêmes conditions (pH 7,4 ; même conditions HPLC) est montrée à la Figure 111.

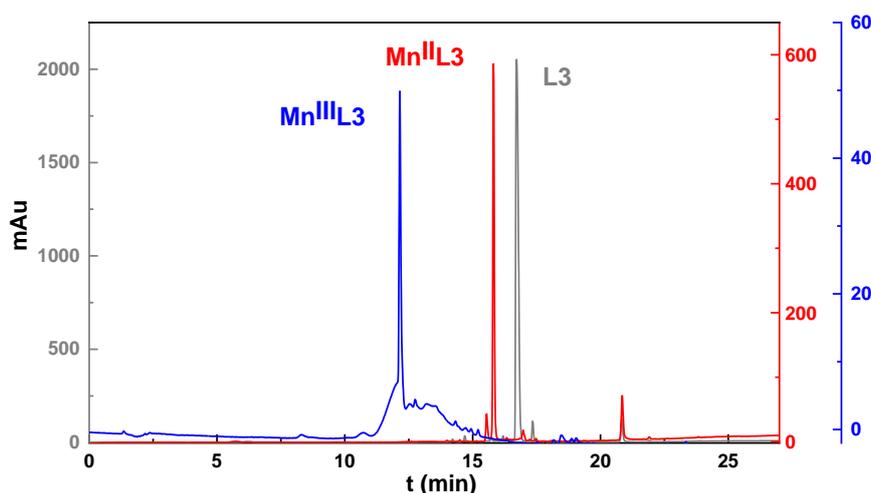


Figure 111 : Temps de rétention de L3 , $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ et $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$.

Une fois la complexation terminée, nous avons effectué une purification sur FPLC et isolé la poudre pour en effectuer l'analyse élémentaire. La suite du travail a été de confirmer l'état d'oxydation. Pour cela, nous avons mesuré le profil NMRD de la poudre de complexe à pH 7, 25°C. Nous avons directement comparé les profils NMRD de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ et de ce nouveau complexe « $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$ » (Figure 112).

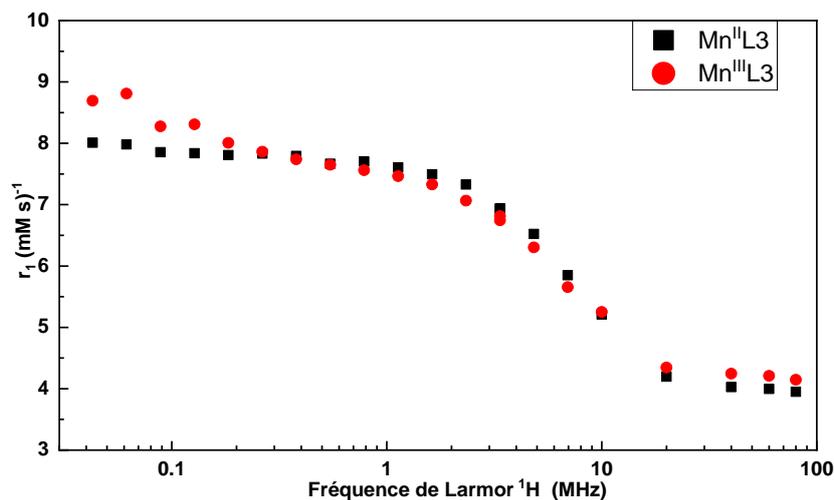


Figure 112 : Profil NMRD de [Mn^{II}L3] et [Mn^{III}L3] dans l'eau à pH 7 ; 25°C ; c = 1,31 mM.

Le résultat ne nous convainc pas car les deux profils NMRD se superposent. Cela est très improbable car les spins électroniques (S) sont différents pour les deux degrés d'oxydation (à haut spin : S(Mn^{II}) = 5/2 et S(Mn^{III}) = 2).

La relaxivité de sphère interne est liée au paramètre T_{1m} (le temps de relaxation longitudinale du proton d'une molécule d'eau dans l'hypothèse d'une coordination infinie de cette molécule d'eau), lequel subit des variations en fonction du champ magnétique décrites par les équations de Solomon-Bloembergen (13) :^[76]

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2\gamma_I^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{15 (r_{MnH})^6} \left[\frac{3\tau_{c1}}{(1 + \omega_I^2 \tau_{c2}^2)} + \frac{7\tau_{c2}}{(1 + \omega_S^2 \tau_{c2}^2)} \right] \quad (14)$$

Avec :

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

Il faut souligner que dans la littérature, tous les profils NMRD connus pour la forme Mn^{III} concernent les complexes de porphyrine, pour lesquels les relaxivités sont généralement considérées « anormales », dues à leur structure et leur relaxation électronique particulières. Les profils NMRD

des Mn^{III} porphyrines sont très différents des profils Mn^{II}, car ils présentent en général une bosse à haut champ, même si la position de cette bosse et sa valeur maximale varient beaucoup en fonction de la structure de porphyrine.^[229]

Les hypothèses les plus probables sont, d'une part, que le complexe synthétisé [Mn^{III}L3] ne soit pas stable en solution aqueuse ou que, d'autre part, la poudre de MnF₃ ait subi une dismutation pour obtenir du Mn^{II} (sous la forme hydratée) et Mn^{IV} (sous la forme MnO₂).

ii. Deuxième voie de formation

La seconde voie que nous avons entreprise afin de former le complexe [Mn^{III}L3], est d'oxyder le complexe [Mn^{II}L3] avec du peroxyde d'hydrogène afin d'obtenir [Mn^{III}L3]. Le potentiel redox du complexe [MnL3] est de 0,306 V vs ESC, tandis que le potentiel redox du couple H₂O₂/H₂O est de 1,106 V vs ESC. L'oxydation a été suivie par spectroscopie UV-visible, les complexes de Mn^{III} ayant des bandes caractéristiques autour de 400-600 nm.^{[208] [230]}

Avant d'oxyder [Mn^{II}L3], nous avons voulu savoir si le ligand libre H₃L3 pouvait lui aussi subir des réactions d'oxydations, en particulier sur le motif phénol^[231] La réaction d'oxydation a été catalysée avec une peroxydase, la horseradish peroxidase (HRP). Les enzymes de types oxydase sont connues dans la littérature pour catalyser les réactions d'oxydation avec le peroxyde d'hydrogène.^[134,232] Toutes les oxydations seront effectuées avec 20 équivalents de H₂O₂ et une quantité catalytique d'enzyme HRP et suivies par spectroscopie d'absorption UV-visible.

a. Oxydation de H₃L3

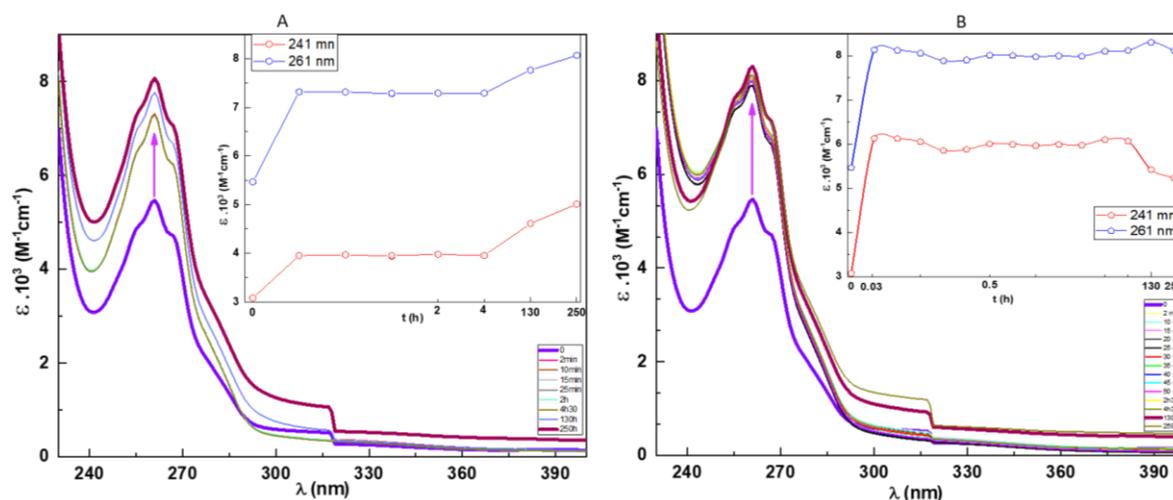


Figure 113 : Suivi de l'oxydation de H₃L3 dans l'HEPES (50 mM ; pH 7,4) + graphique des longueurs d'onde 241 nm et 261 nm suivies en fonction du temps. (A) 20eq H₂O₂, Cligand = 0,2 mM. (B) 20eq H₂O₂, HRP, Cligand = 0,2 mM.

L'oxydation dans les deux cas (avec ou sans HRP) montre une évolution hyperchrome confirmant qu'une réaction a lieu dans le cas du ligand H₃L3 (Figure 113). La réaction d'oxydation sans HRP nécessite une dizaine de jours (250 h) pour s'achever tandis qu'en présence de HRP, elle est terminée en quelques minutes (Figure 114). Nous avons essayé d'identifier les espèces issues de la

réaction d'oxydation par spectrométrie de masse (MALDI et ESI) mais il est très difficile d'interpréter le spectre. Toutefois nous n'avons pas détecté la masse du ligand **H₃L3**.

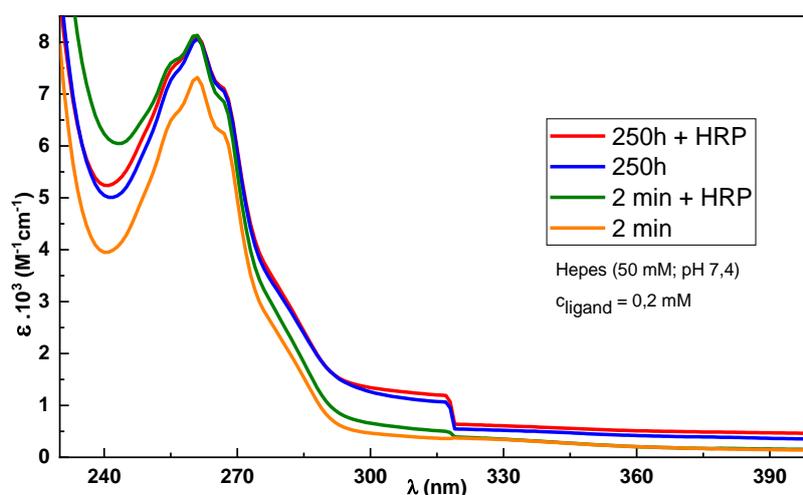


Figure 114 : Superposition des spectres UV-visibles obtenus après oxydation de **H₃L3** par H_2O_2 (20 équiv.) avec ou sans HRP à 2 min et 250 h.

b. Oxydation de $[Mn^{II}L3]$

L'oxydation du complexe de Mn^{II} a été étudiée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le ligand ($c = 0.2 - 1$ mM, 20 équivalents de H_2O_2 , avec ou sans HRP, HEPES 50 mM, pH 7.4) (Figure 115). L'oxydation de $[Mn^{II}L3]$ se traduit par l'apparition d'un épaulement à 530 nm, que ce soit avec ou sans HRP. Pour comparaison, nous pouvons citer les dérivés Mn^{III} -porphyrine présentant une bande d'absorption caractéristique autour de 554 nm avec un epsilon autour de $5000 M^{-1}cm^{-1}$ en solution aqueuse. ^[208] De plus, l'oxydation de $[Mn^{II}L3]$ sans HRP implique un intermédiaire non identifié que l'on peut suivre à 432 nm (Figure 115-A). Au bout de 3h, la bande à 432 nm caractéristique de cet intermédiaire disparaît et le système se stabilise lentement sans atteindre l'équilibre au bout de 24h. L'oxydation de $[Mn^{II}L3]$ en présence de HRP est plus rapide sans état de transition (Figure 115-B).

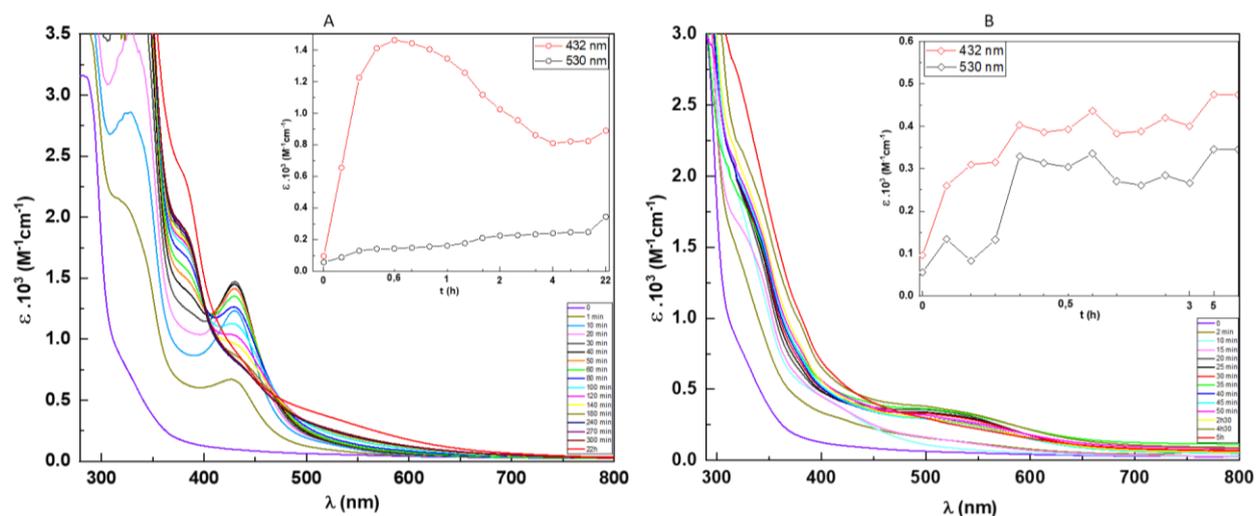


Figure 115 : Suivi de l'oxydation de $[Mn^{II}L3]$ dans l'HEPES (50 mM ; pH 7,4) + graphique des longueurs d'onde 432 nm et 530 nm suivies en fonction du temps. (A) 20eq H_2O_2 , $c_{\text{complexe}} = 1$ mM. (B) 20eq H_2O_2 , HPR, $c_{\text{complexe}} = 1$ mM.

Toutefois, les spectres UV-visibles obtenu en fin d'étude avec ou sans HRP ne sont pas superposables (Figure 116), ce qui rend les études compliquées et nous a conduit à explorer une nouvelle voie.

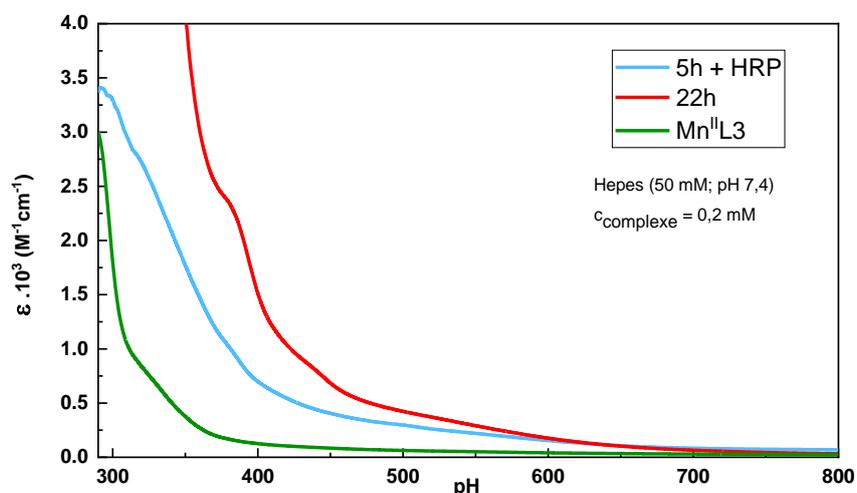


Figure 116 : Superposition des spectres d'oxydation de $[Mn^{II}L3]$ avec ou sans HRP.

iii. Troisième voie de formation

a. Caractérisation par spectroscopie UV-visible

Avec les précédentes expériences nous avons vu que former le complexe $[Mn^{III}L3]$ dans l'eau est très difficile. Nous avons donc fait le choix de trouver des conditions de formation du complexe en milieu non aqueux. Plusieurs solvants ont été testés : MeCN, THF, DMSO, MeOH. Le ligand H_3L3 n'est pas soluble dans le MeCN et le THF tandis que la poudre de MnF_3 n'est pas soluble (ou très peu soluble) dans le MeCN, le THF et le DMSO. Le méthanol s'est avéré être le meilleur compromis afin de former le complexe $[Mn^{III}L3]$. Le complexe $[Mn^{III}L3]$ a donc été formé *in situ* en mélangeant une solution de ligand dans le méthanol, ajouter de la base ($NaOH_{aq}$), évaporer à sec puis remettre du méthanol et ajouter la poudre de MnF_3 . La formation du complexe a été suivie par spectroscopie UV-visible (Figure 117). Nous avons comparé les complexes $[Mn^{II}L3]$ et $[Mn^{III}L3]$ dans le méthanol pur et l'on voit une très grande différence entre les deux, en particulier la bande caractéristique des complexes de Mn^{III} qui se situe entre 400-600 nm (Figure 117). Nous en avons conclu qu'il était possible de former $[Mn^{III}L3]$ dans le méthanol.

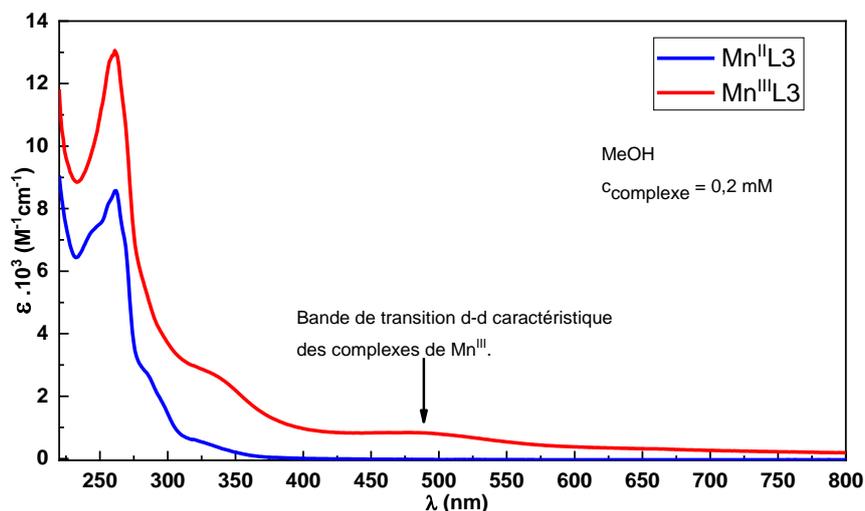
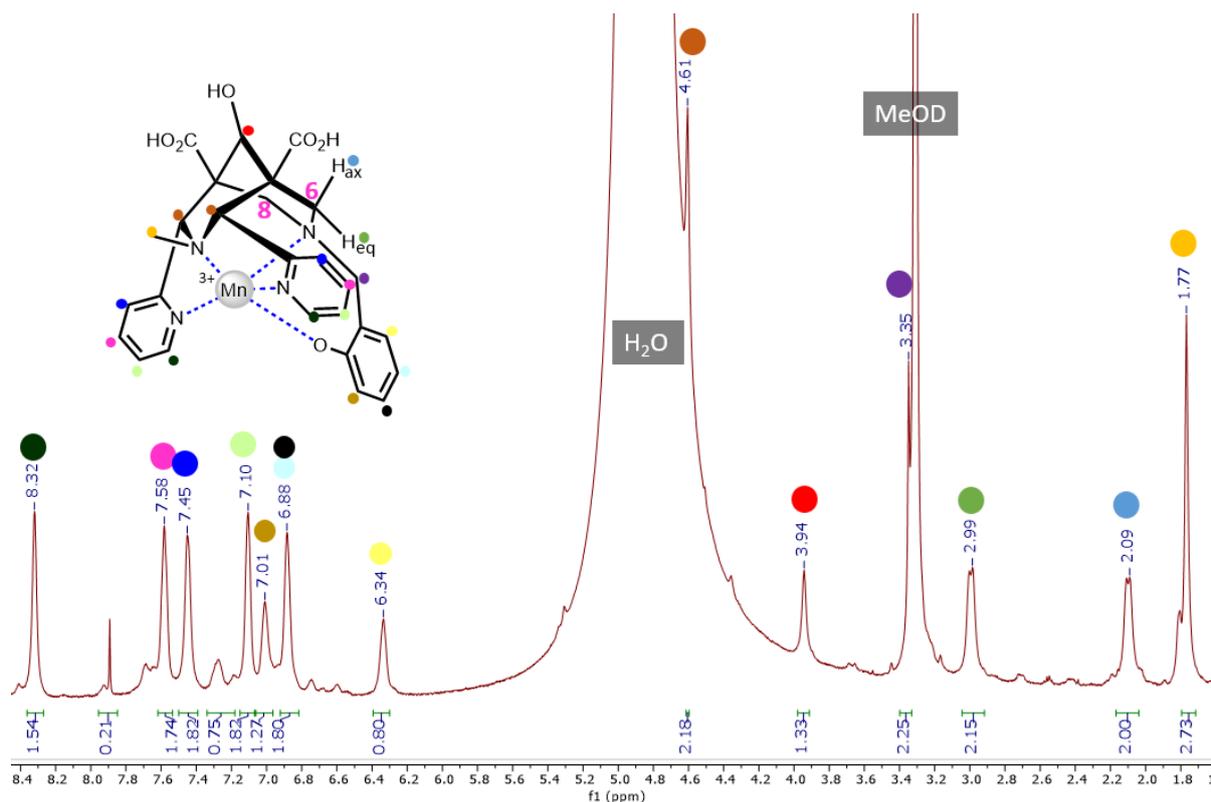


Figure 117 : Coefficient d'extinction molaire des complexes $[Mn^{II}L3]$ et $[Mn^{III}L3]$ formés dans le méthanol.

b. Caractérisation par RMN

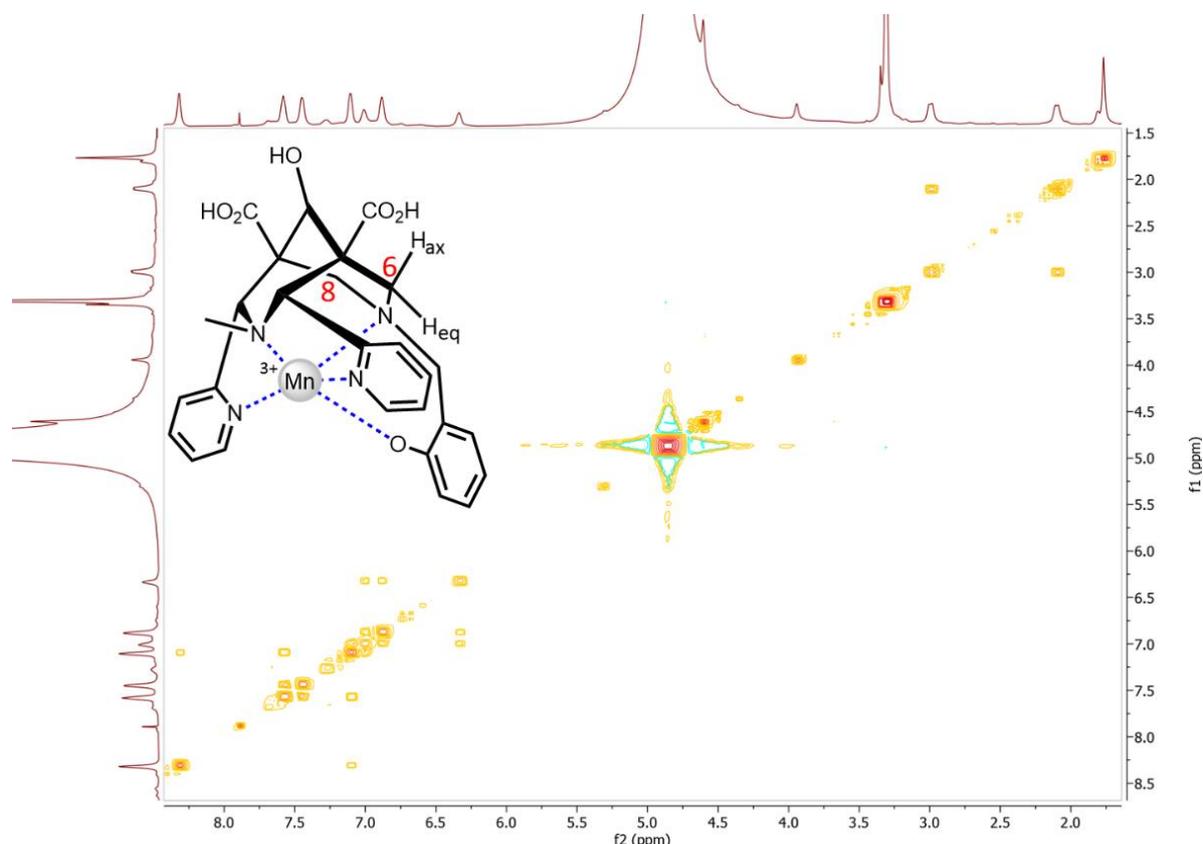
Tout comme le complexe $[Mn^{II}L3]$, nous avons essayé d'obtenir un spectre RMN du complexe $[Mn^{III}L3]$ dans le méthanol deutéré (Spectre 15). La méthode de formation de complexe $[Mn^{III}L3]$ est la même pour l'analyse RMN et la spectroscopie UV-visible.



Spectre 15 : RMN 1H de $[Mn^{III}L3]$ (MeOD, 500 MHz, 25°C, c = 16 mM).

Le spectre RMN 1H de ce nouveau complexe possède un set de 14 signaux assez bien résolus qui peuvent être assignés aux différents protons présents sur le ligand. Les déplacements chimiques sont différents de ceux du ligand et également distincts de ceux obtenus préalablement pour le

complexe de Mn^{II}. On peut également noter une seconde espèce dont les signaux sont plus larges, très minoritaire qui pourrait correspondre à 5% de complexe de Mn^{II}. L'assignation des différents pics a été réalisée par RMN COSY, l'ordre des pics est très cohérent avec celle du ligand libre (Spectre 16).



Spectre 16 : RMN COSY ¹H-¹H de [Mn^{III}L3] (MeOD, 500 MHz, 25°C, c = 16 mM).

Plusieurs marqueurs de la complexation sont observés. Tout d'abord les protons du phénolate et du CH₂ correspondant sont particulièrement affectés. Ensuite, les protons pyridiniques (en α de l'azote) subissent un blindage caractéristique qui est typiquement observé pour les complexes de ligands bispidine avec du Zn^{II} et qui avait été attribué à la rotation des pyridines dans le cône d'anisotropie magnétique des oxygènes des acides carboxyliques.^[17] Enfin, les protons H_{6/8}_{ax/eq} du squelette sont également blindés et très affectés.

Ces protons se situant dans une zone relativement bien définie pour les deux complexes [Mn^{II}L3] et [Mn^{III}L3] dans le méthanol deutéré, nous les avons utilisés comme une sonde de l'état de spin et avons mesuré leurs temps de relaxation longitudinaux (T₁) (Tableau 19).

Tableau 19 : Comparaison des temps de relaxation longitudinaux (T₁) des protons H_{6/8} axiaux et équatoriaux dans le cas de [Mn^{II}L3] et [Mn^{III}L3]. B₀ = 500 MHz.

	T ₁ [Mn ^{II} L3] (ms)	T ₁ [Mn ^{III} L3] (ms)
H ^{6/8} _{ax}	19,5	46
H ^{6/8} _{eq}	19,5	52

Comme attendu, les temps de relaxations de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ pour un même proton sont significativement plus courts que ceux de $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$ confirmant ainsi l'oxydation du Mn^{II} en Mn^{III} et le changement de spin ($S = 5/2$ pour Mn^{II} et $S = 2$ pour Mn^{III} dans le cas d'une configuration haut spin)

En conclusion de ces études exploratoires, nous avons mis en évidence deux voies d'accès aux complexes de Mn^{III} -bispidine : (1) par oxydation du complexe $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ pour obtenir $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$. (2) par la synthèse du complexe $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$ dans le méthanol à partir du ligand et la poudre commerciale de MnF_3 . La formation du complexe dans le méthanol est la voie que nous avons privilégié pour la suite des études. En vue de conduire des études relaxométriques, la suite des études a été de réintroduire l'eau afin d'évaluer l'inertie cinétique du complexe.

c. Caractérisation par MALDI

Nous avons essayé d'analyser le complexe $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$ par spectrométrie de masse et, à notre grande surprise, il a été possible d'identifier le motif isotopique caractéristique du complexe (Figure 118). Cela semblait d'autant plus compromis que nous n'arrivions pas à avoir de signal dans ces mêmes conditions d'acquisition avec les complexes de Mn^{II} sur les différents spectromètres accessibles sur le campus. l'ion monochargé $[\text{M}+\text{H}]^+$ est bien observé ainsi que ses adduits de sodium, toutefois il est attendu à $557.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Un décalage de +2 est observé. Malheureusement, pour des questions pratiques le mode négatif n'est pas fonctionnel sur notre appareil pour compléter les investigations.

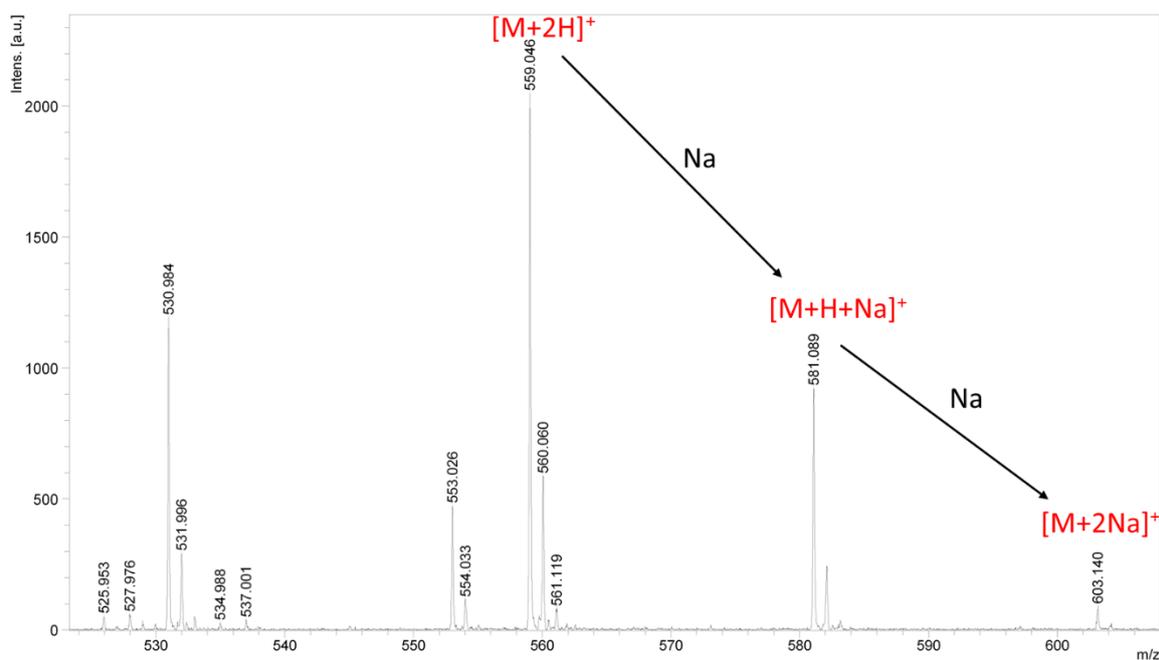


Figure 118 : Spectre de masse de $[\text{Mn}^{\text{III}}\text{L3}]$.

B. Stabilité de $[Mn^{III}L3]$

La stabilité de $[Mn^{III}L3]$ a été étudiée dans des solutions dans un mélange $H_2O/MeOH$. Nous avons choisi de mesurer l'influence de l'eau à différents pourcentages afin de déterminer si le complexe subit des variations. Nous avons suivi différentes longueurs d'onde à savoir 359 nm, 489 nm et 640 nm en fonction du temps en présence d'eau (HEPES ; 50 mM ; pH 7,4) (Figure 119).

Les variations suivantes sont observées (Figure 119) :

- 5% HEPES : on observe une augmentation du coefficient d'extinction molaire (ϵ) durant les deux premières heures : nous supposons qu'il puisse s'agir de la coordination d'une molécule d'eau. Entre 2h et 24h on a une stabilisation de la bande de transition qui après 24h commence à diminuer graduellement, traduisant la disparition du $[Mn^{III}L3]$.
- 20% HEPES : on observe la même augmentation du coefficient d'extinction molaire (ϵ); ici le processus est plus rapide, il se fait durant les 30 premières minutes. Par la suite nous avons une stabilisation de la bande de transition de 30 min à 20h, puis comme précédemment, une diminution graduelle est observée.
- 50% HEPES : la bande est stable la première heure puis subit une diminution rapide.
- 100% HEPES : la diminution du coefficient d'extinction molaire est très rapide, au bout de 5h le signal devient difficile à suivre.

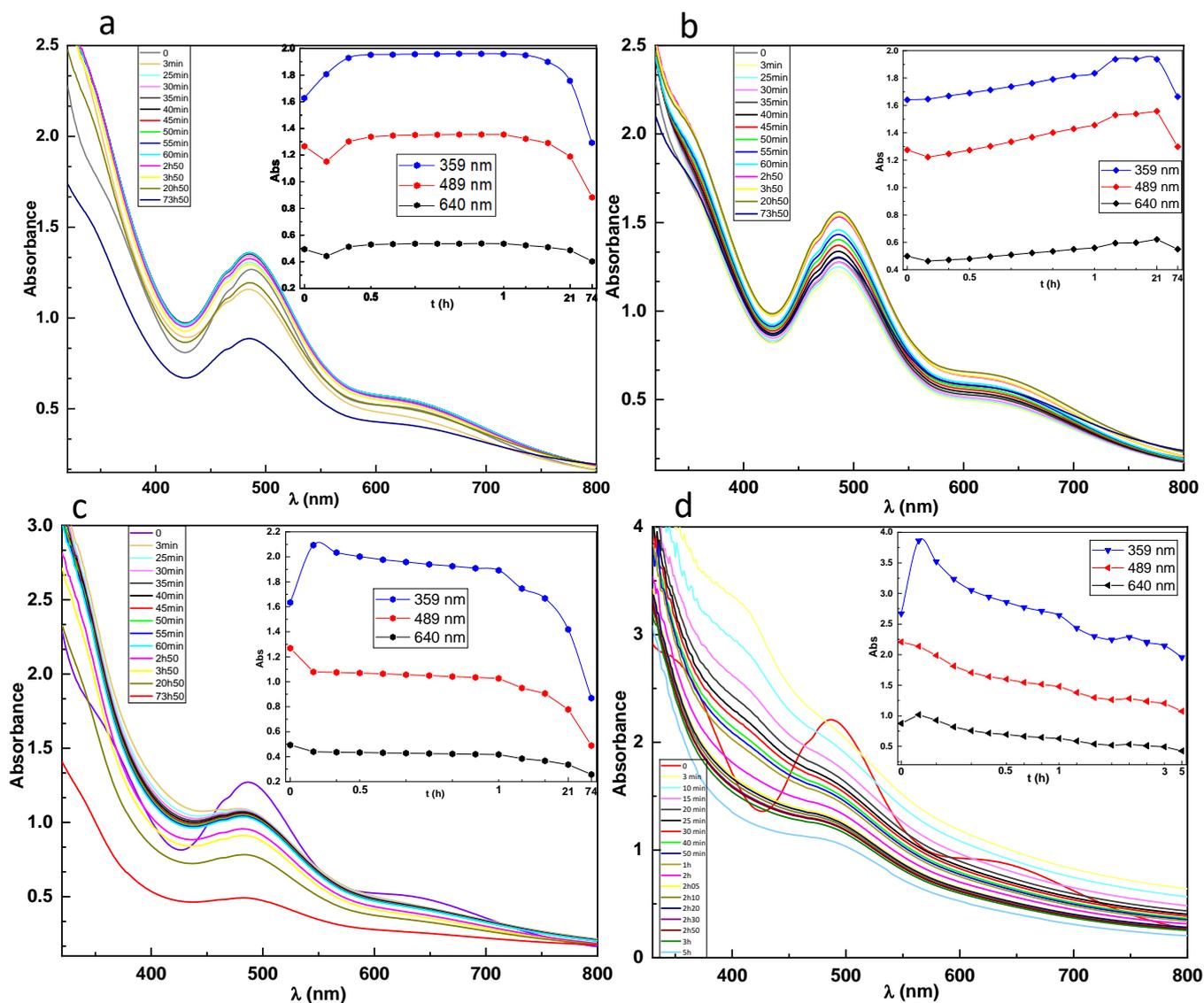


Figure 119 : Stabilité de $[Mn^{III}L3]$ dans différents pourcentages de tampon HEPES et du méthanol : (a) $c = 1$ mM, 5% HEPES ; (b) $c = 1$ mM, 20% HEPES ; (c) $c = 1$ mM, 50% HEPES ; (d) $c = 2$ mM, 100% HEPES. $[HEPES] = 50$ mM à pH 7,4.

Un récapitulatif du suivi de la bande à 489 nm est proposé à la Figure 120.

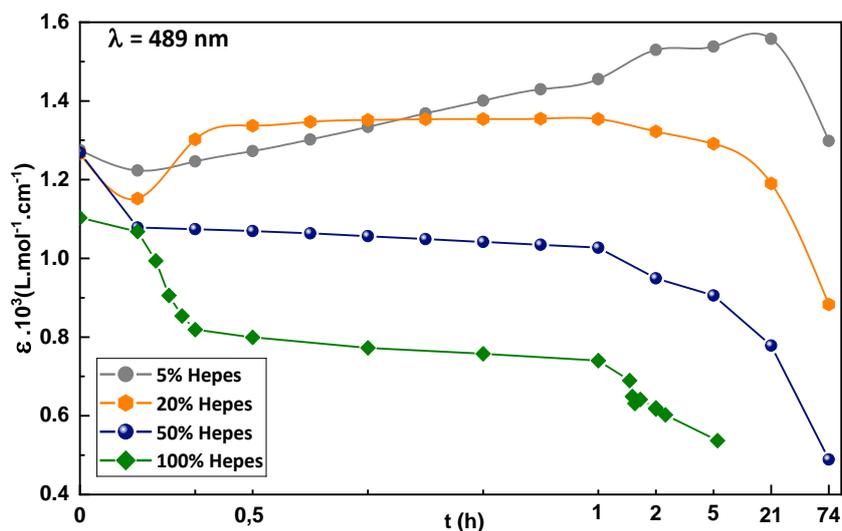


Figure 120 : Récapitulatif du suivi de la bande à 489 nm de $[Mn^{III}L3]$ en fonction du temps ($c_{\text{complexe}} = 1 \text{ mM}$ (100% HEPES $c = 2 \text{ mM}$) ; $[HEPES] = 50 \text{ mM}$; $\text{pH } 7,4$).

Cette expérience démontre l'instabilité de $[Mn^{III}L3]$ dans l'eau. Nous avons voulu comprendre vers quelle espèce tendait l'évolution de $[Mn^{III}L3]$ dans l'eau (Figure 121). S'agit-il de la réduction du complexe pour conduire à $[Mn^{II}L3]$ dans l'eau ou d'une autre espèce ? Pour le savoir, nous avons préparé les complexes $[Mn^{II}L3]$ et $[Mn^{III}L3]$ dans le méthanol à 0,2 mM, puis ajouté 20% de tampon HEPES et suivi dans le temps (Figure 121).

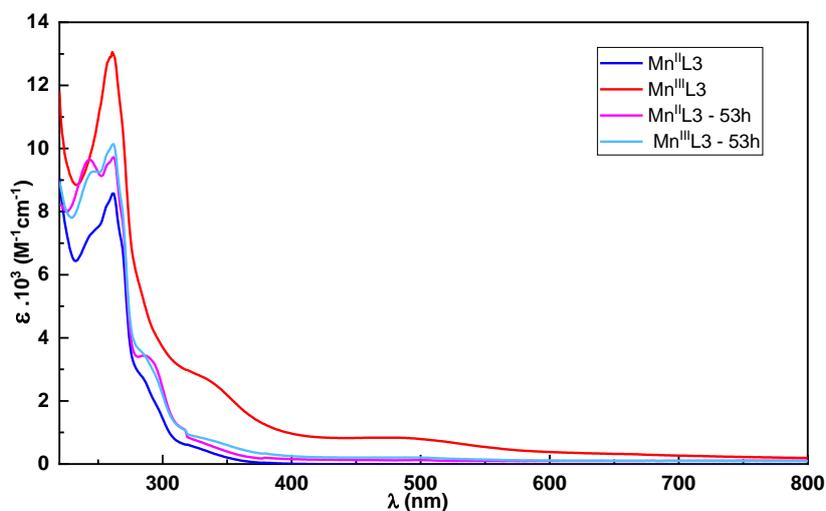


Figure 121 : Suivi de $[Mn^{II}L3]$ et $[Mn^{III}L3]$ dans un mélange MeOH/ HEPES (80/20). $c_{\text{complexe}} = 0,2 \text{ mM}$; $[HEPES] = 50 \text{ mM}$; $\text{pH } 7,4$.

Au bout de 53h on remarque que les deux complexes tendent vers la même espèce. Nous avons donc supposé que le complexe $[Mn^{III}L3]$ est réduit en $[Mn^{II}L3]$.

Nous avons par la suite effectué cette même manipulation suivi cette fois-ci par relaxométrie afin de déterminer la tendance vers laquelle évolue le système (Figure 122). Comme attendu le système évolue vers les faibles temps de relaxation, nous indiquant que l'on forme une espèce fortement paramagnétique, dans notre cas il s'agit du complexe de manganèse (II).

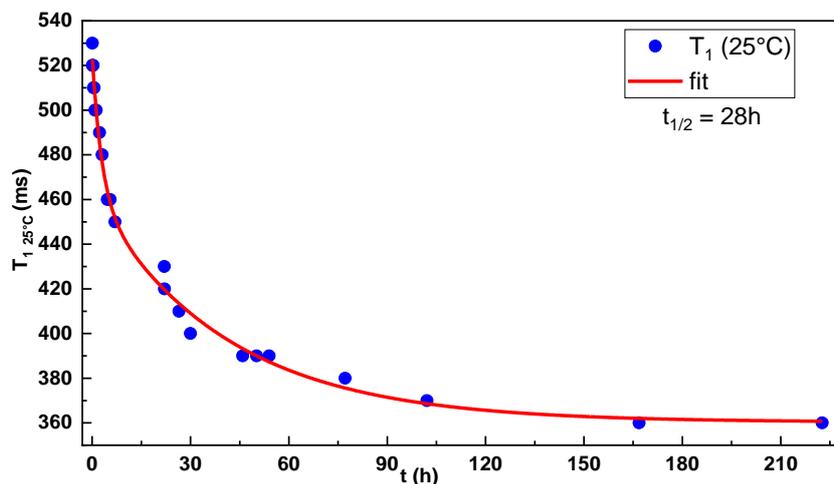


Figure 122 : Suivi relaxométrique de $[Mn^{III}L3]$ dans un mélange MeOH/ HEPES (80/20) en fonction du temps et son ajustement mathématique.

VII. Conclusion

Nous avons développé le ligand H_3L3 pour abaisser le potentiel redox du complexe $[Mn^{II/III}L3]$, afin de mieux stabiliser le Mn^{III} par rapport à la première génération de bispidine existante jusqu'alors. Les propriétés physicochimiques du complexe $[Mn^{II}L3]$ ont été étudiées, à savoir, la stabilité thermodynamique, l'inertie cinétique et les propriétés relaxométriques. Le complexe $[Mn^{II}L3]$ s'est révélé être un bon candidat avec une stabilité thermodynamique à $\log K_{MnL3} = 16,2(1)$, un temps de demi-vie de dissociation de 20,4h en présence de 50 équivalents de zinc à pH 6. Il n'est ni meilleur ni moins bon par rapport à d'autres bispidines, notamment toute la série développée durant la thèse de Maryame Sy.^[196] Le point qui nous intéresse le plus ici est son potentiel redox, qui était le plus grand challenge de ce projet. En effet, celui-ci est nettement plus bas ($E_{1/2}(MnL3) = 306$ mV vs SCE) par rapport à toute la première génération de bispidine [$388 \leq E_{1/2}(mV \text{ vs SCE}) \leq 494$].

C'est à partir de ces informations que nous avons développé le complexe $[Mn^{III}L3]$, nous avons développé une voie de synthèse du complexe de Mn^{III} -bispidine dans le méthanol. Ce complexe a pu être caractérisé par spectroscopie UV-visible et par RMN 1H . Par la suite, nous avons examiné l'influence de l'eau sur le complexe $[Mn^{III}L3]$ et c'est ainsi que nous avons pu déterminer que le complexe n'était pas stable dans l'eau et que la quantité de l'eau et la durée d'exposition influençaient fortement cette stabilité. Il nous faut donc améliorer la stabilisation du complexe de Mn^{III} ; pour cela nous avons deux possibilités : (1) substituer les pyridines par des phénolates afin de mieux stabiliser le degré d'oxydation Mn^{III} (Figure 123 - **C1**). (2) La seconde possibilité est d'utiliser des substituants pouvant stabiliser les deux états rédox (Figure 123 - **C2** et **C3**) comme pour le ligand **Janus** (Figure 123) que l'on a vu dans le chapitre 1-III-B. C'est une stratégie tout à fait élégante mais qui comprend aussi des défauts, comme celui d'avoir une coordination hexadentate du ligand et aucune molécule d'eau

pour la relaxivité. En effet, la stabilisation des deux états redox peut conduire à un système totalement irréversible avec des potentiels redox trop élevés et incohérents vis-à-vis des potentiels redox du vivant.

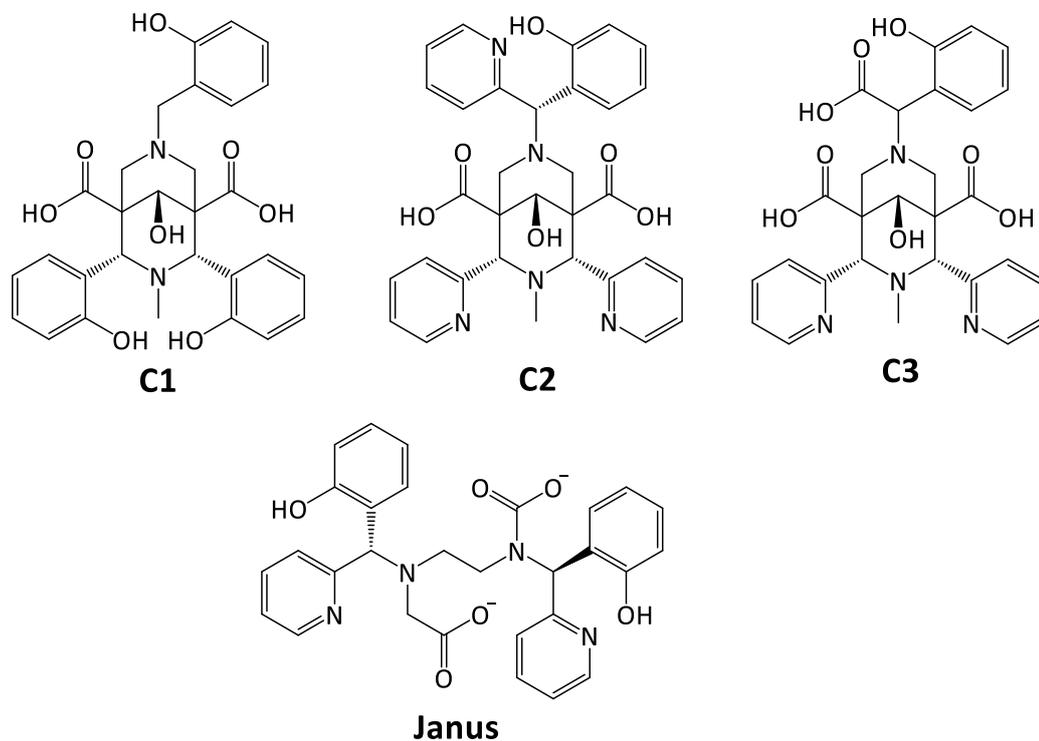
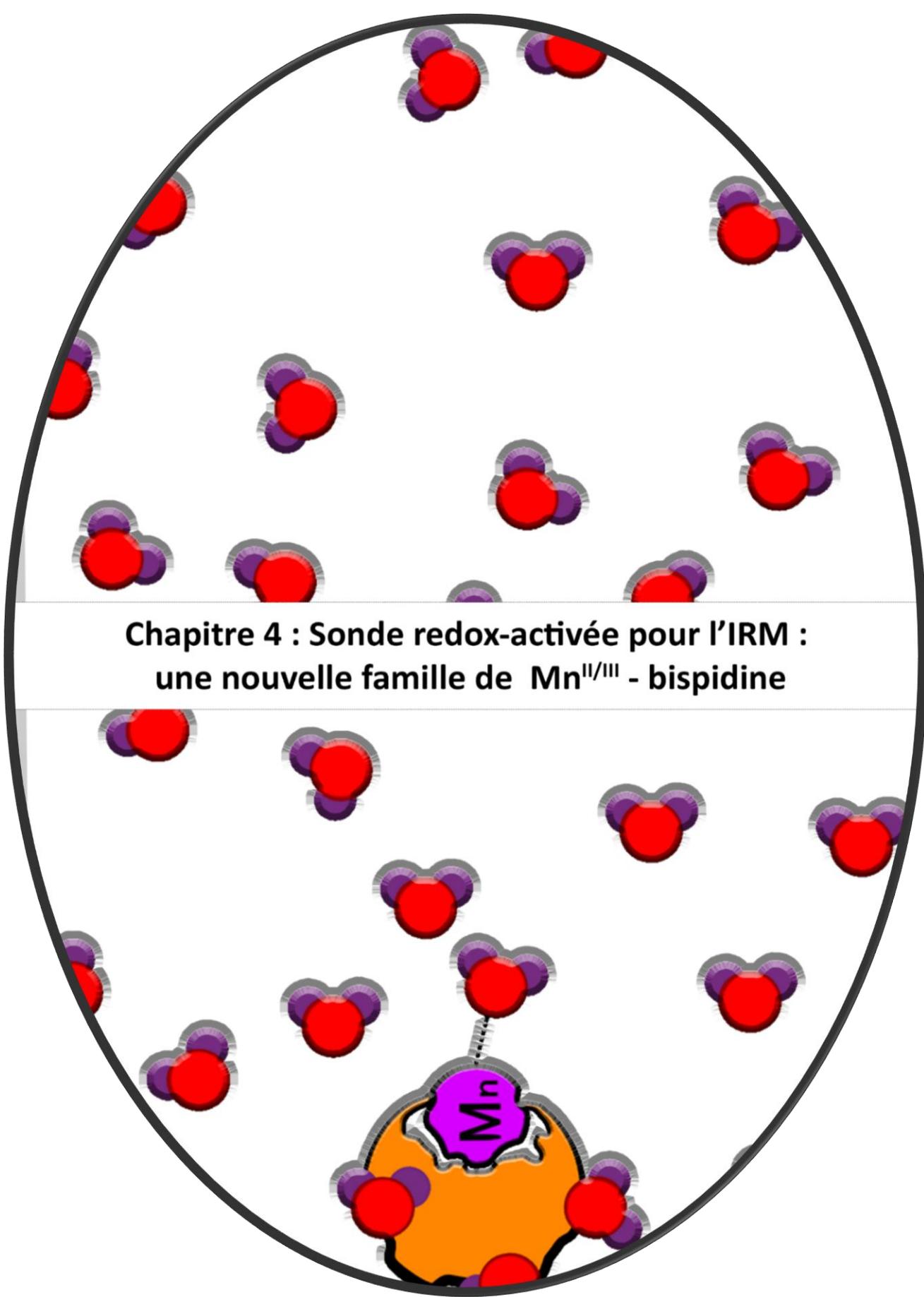


Figure 123 : Troisième génération de ligand bispidine (**C1**, **C2** et **C3**) afin de mieux stabiliser le Mn^{III} et le ligand **Janus**.



**Chapitre 4 : Sonde redox-activée pour l'IRM :
une nouvelle famille de Mn^{II/III} - bispidine**

I. Introduction et contexte de travail

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le nouveau complexe **[Mn^{II}L3]** remplissait les objectifs attendus, c'est-à-dire un potentiel redox plus bas que les complexes de manganèse avec les ligands de "première génération" : **[MnL_{lys}]**, **[Mn3]** et **[Mn4]** (Figure 124). En revanche, le complexe de Mn^{III} n'est pas suffisamment stable en solution aqueuse.

En parallèle de **H₃L3**, nous avons développé le ligand **H₃L4** qui présente davantage de similarité avec le complexe **[Mn1]** développé par le professeur Clotilde Policar et son équipe et qui se démarque par la réversibilité de son système redox avec un potentiel à demi-vague plus bas (215 mV vs ESC). Avec comme objectif de s'approcher de ces propriétés, nous avons introduit un motif phénolate, mais aussi le motif 1-méthylimidazole sur les bispidines. La mise au point de la synthèse des ligands **H₃L4** et **H₃L5** et l'étude des complexes de Mn correspondants (Figure 124) fait l'objet de ce chapitre.

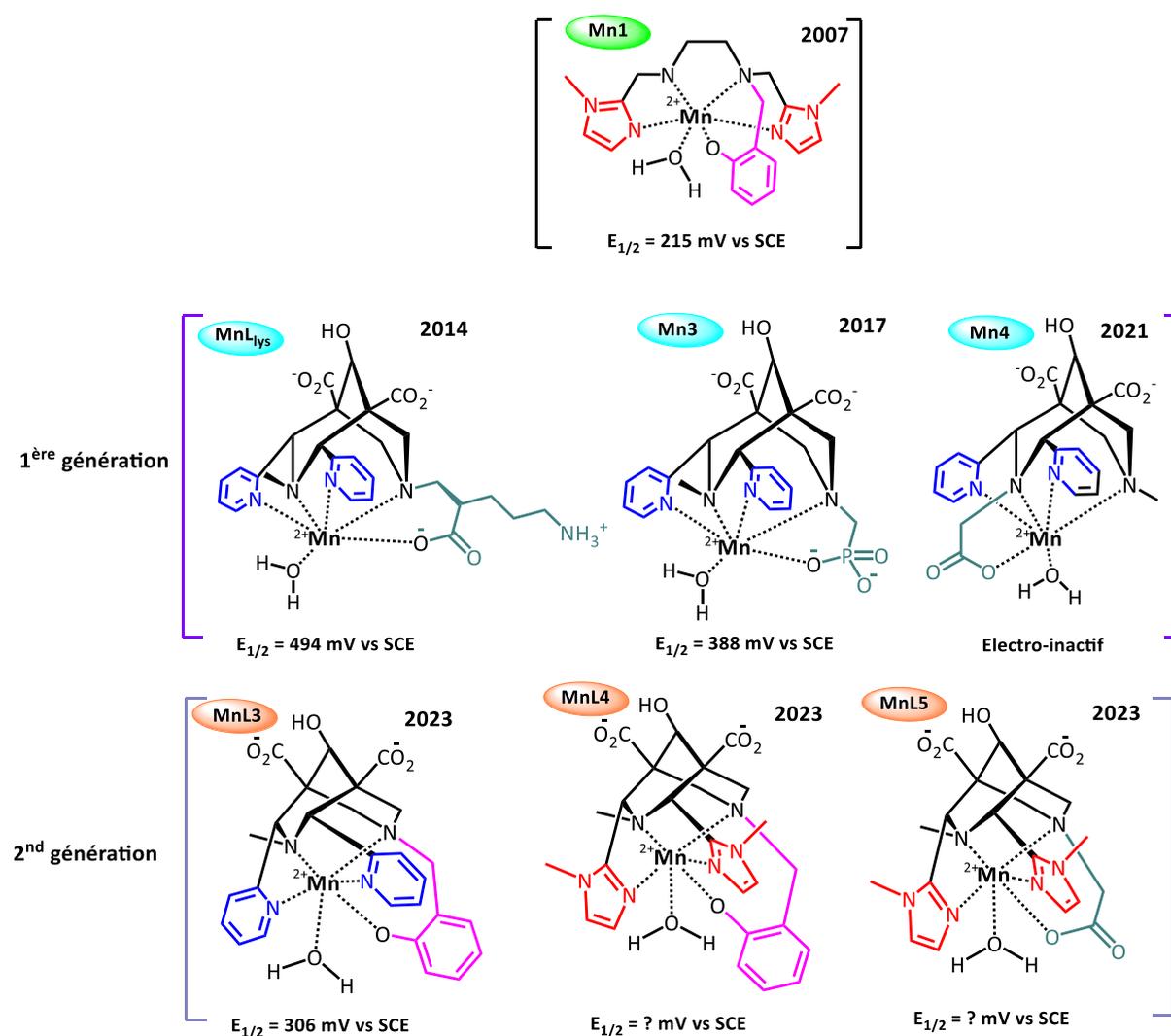


Figure 124 : **[Mn1]** complexe développé par C. Policar, première génération et seconde génération de Mn- bispidine à la recherche du meilleur compromis pour une sonde redox IRM activé.

II. Synthèse et caractérisation de H₃L4, H₃L5, [Mn^{II}L4] et [Mn^{II}L5]

Ici nous ne présenterons pas de voie de synthèse "échec" (même s'il y en a eu), mais il faut savoir que les plus grands défis des bispidine-imidazoles sont leur purification et la solubilité de certains intermédiaires. Ces défis nous ont conduit à adopter la voie de synthèse ci-dessous (Figure 125) à partir du précurseur pipéridone **P3**.

A. Synthèse et caractérisation de H₃L4 et H₃L5

i. Voie de synthèse de H₃L4 et H₃L5

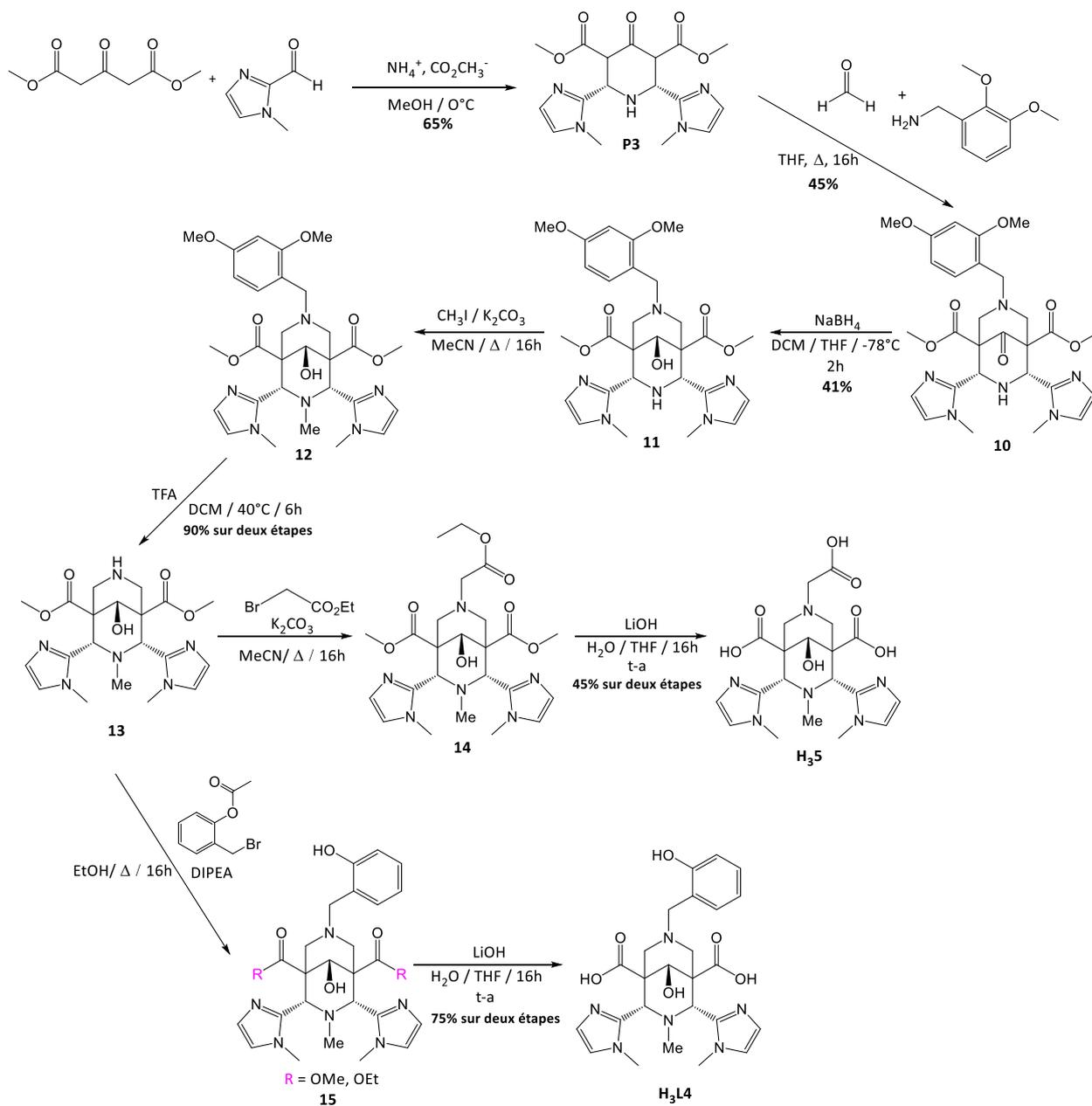


Figure 125 : voie de synthèse finale de H₃L4 et H₃L5

La première et la seconde étape ont été inspirées d'un motif bispidine-1-méthylimidazole étudié par Comba *et al.* en 2003 ^[19] pour des propriétés de catalyse. La première étape est classiquement une condensation de Mannich en partant de la diméthyle 1,3-acetonedicarboxylate avec le 1-méthyl-2-imidazolecarbaldehyde en présence d'acétate d'ammonium. Le précurseur **P3** est obtenu par précipitation. Ce précurseur, comme **P2** se présente sous 2 formes (énol et cétone). L'équilibre céto-énolique tend majoritairement vers la forme énol lorsque celui-ci est laissé une nuit à précipiter dans un solvant polaire protique comme le méthanol.

La seconde étape est une condensation de Mannich effectuée avec le groupement protecteur 2,4-diméthoxybenzylamine en présence de formaldéhyde. L'intermédiaire **10** est obtenu par précipitation et aucune purification supplémentaire n'est effectuée. Nous avons effectué comme précédemment deux manipulations en parallèle avec **P3** majoritairement sous forme cétone (récolté le 1^{er} jour) et sous la forme énol (récolté le 2nd jour). La bispidone **10** obtenue est la même dans les deux cas (Figure 125) et les rendements de la réaction de Mannich sont très similaires (respectivement de 45% et 48%).

La troisième étape est la réduction de la cétone centrale, celle-ci est particulièrement différente de toutes les autres bispidones car **10** est une bispidone insoluble dans le THF (le méthanol et l'éthanol sont les solvants utilisés pour précipiter la bispidone). En effet, l'intermédiaire **10** n'est soluble que dans le DCM (après essais de divers solvants) cependant la réduction ne peut être effectuée dans ce solvant, car le borohydrure de sodium est insoluble dans le DCM. Pour effectuer la réduction de **10**, celui-ci doit être solubilisé dans le DCM à 40°C et ensuite le THF peut être ajouté, puis par la suite le borohydrure de sodium. Le rendement de cette réaction (41%) est donc limité par la précipitation de **10** qui s'observe petit à petit du fait de la basse température. Rendement très difficile à améliorer car durant la réduction on a aussi la précipitation de **10** qui s'effectue, étant à très basse température il est impossible de remonter la température pour resolubiliser **10**. L'intermédiaire **11** est obtenu après une purification par chromatographie sur gel de silice.

La quatrième étape est la méthylation de l'amine en position *N3*. Celle-ci est nécessaire car l'utilisation du précurseur *N*³-méthylé dès la première étape réduit drastiquement les rendements. En effet, le précurseur contenant un méthyle en *N3* a été synthétisé tout autant que la bispidone. Dans ce cas, il faut noter que, dès la première étape, le précurseur pipéridone est présent sous la forme de nombreuses espèces outre les formes *cis/trans*-énol et *cis/trans*-cétone classiquement observées. Il est supposé que cela est dû à l'encombrement stérique des groupements méthyles des imidazoles qui génère des conformations bloquées. De plus, la réduction de la bispidone *N*³-méthylé est bien plus complexe. Nous avons donc choisi de métyler l'intermédiaire **11** après la réaction de réduction.

La méthylation pour obtenir le produit **12** se fait avec l'iodomethane en présence de carbonate de potassium. Celui-ci est obtenu avec un rendement de 90% après 1 nuit de réaction. Une purification par chromatographie est nécessaire ; il faut savoir que l'imidazole n'étant pas un bon chromophore il n'est pas aisé de purifier ce produit car on ne peut pas le détecter facilement en UV. Plusieurs révélateurs ont été essayés, seul l'iode et une solution de FeCl₃ révèle les intermédiaires bispidol-imidazole. Pour cette raison nous avons choisi de ne plus purifier le produit **12** et d'effectuer la cinquième étape sans purification.

La cinquième étape est la déprotection de l'amine en *N7* pour conduire à l'intermédiaire **13**. Celle-ci a dû être adaptée à cette famille, car les conditions classiques donnaient des rendements faibles à modérés. Pour améliorer les rendements (95%), nous avons diminué drastiquement le nombre d'équivalent de TFA de 130 à une dizaine d'équivalents et limité la durée de la réaction six heures contre une nuit auparavant.

La sixième étape est la substitution nucléophile menant à l'intermédiaire **14**. Celle-ci est effectuée avec le bromoacétate d'éthyle en présence de carbonate de potassium. Le produit est confirmé par MALDI et RMN ¹H, car il est assez difficile de se fier à la CCM avec la famille des imidazoles. Une fois le produit confirmé, il est utilisé ainsi sans purification. La saponification est effectuée en une nuit et le produit **H₃L5** est obtenu après une purification par chromatographie en phase inverse sur C18. Il est possible d'obtenir plus de 100 mg de produit en une fois avec cette voie de synthèse.

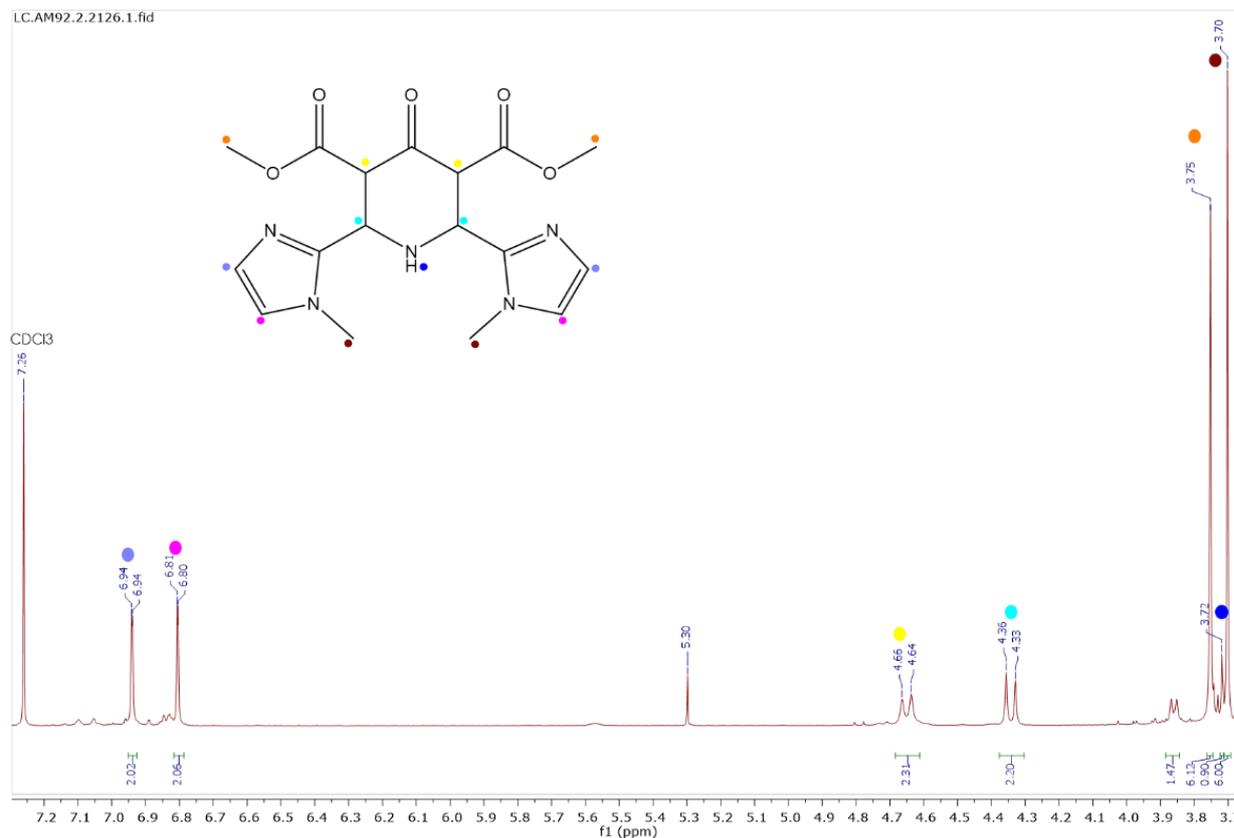
H₃L4 est obtenu à partir de la même voie en démarrant sa voie de synthèse depuis l'intermédiaire **13** (Figure 125). L'intermédiaire **13** est mis à réagir avec l'acétate de 2-bromométhylphényle en présence de DIPEA (base organique) dans l'éthanol pour une nuit. Ces conditions de substitution nucléophile nous ont permises d'améliorer la solubilité et les rendements. La raison pour laquelle celles-ci n'ont pas été utilisées durant la voie de synthèse de **H₃L5** est que la DIPEA est très difficile à enlever. Dans notre cas, il n'est pas possible d'envisager une extraction car après l'intermédiaire **13** les molécules ne sont plus solubles dans le dichlorométhane, le chloroforme ou l'acétate d'éthyle. Le seul moyen que nous avons est donc la purification par colonne. Comme les imidazoles sont de très mauvais chromophores ($\epsilon \approx 2500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à $\lambda = 283 \text{ nm}$ pour **H₃L4**), nous avons dû optimiser l'absorbance afin d'observer un signal sur notre Puriflash. Une amélioration suffisante pour faciliter la purification a été obtenue en augmentant le chemin optique de la cellule de détection et en acidifiant la solution injectée à pH 2. Ces conditions nous ont permis d'acquérir des chromatogrammes pour **H₃L5**.

Le produit **15** est obtenu sous la forme d'un mélange de deux produits : le produit souhaité ainsi que le produit obtenu par la transestérification des esters méthyliques en esters éthyliques pendant la réaction dans l'éthanol. Ceci est confirmé par RMN ¹H et par MALDI. Ces produits ne posent

aucun problème à la saponification qui se déroule très bien pour mener au produit **H₅L4** sous forme de poudre après purification sur colonne chromatographique en phase inverse. Il est possible d'obtenir plus de 250 mg de produit en une fois avec cette voie de synthèse.

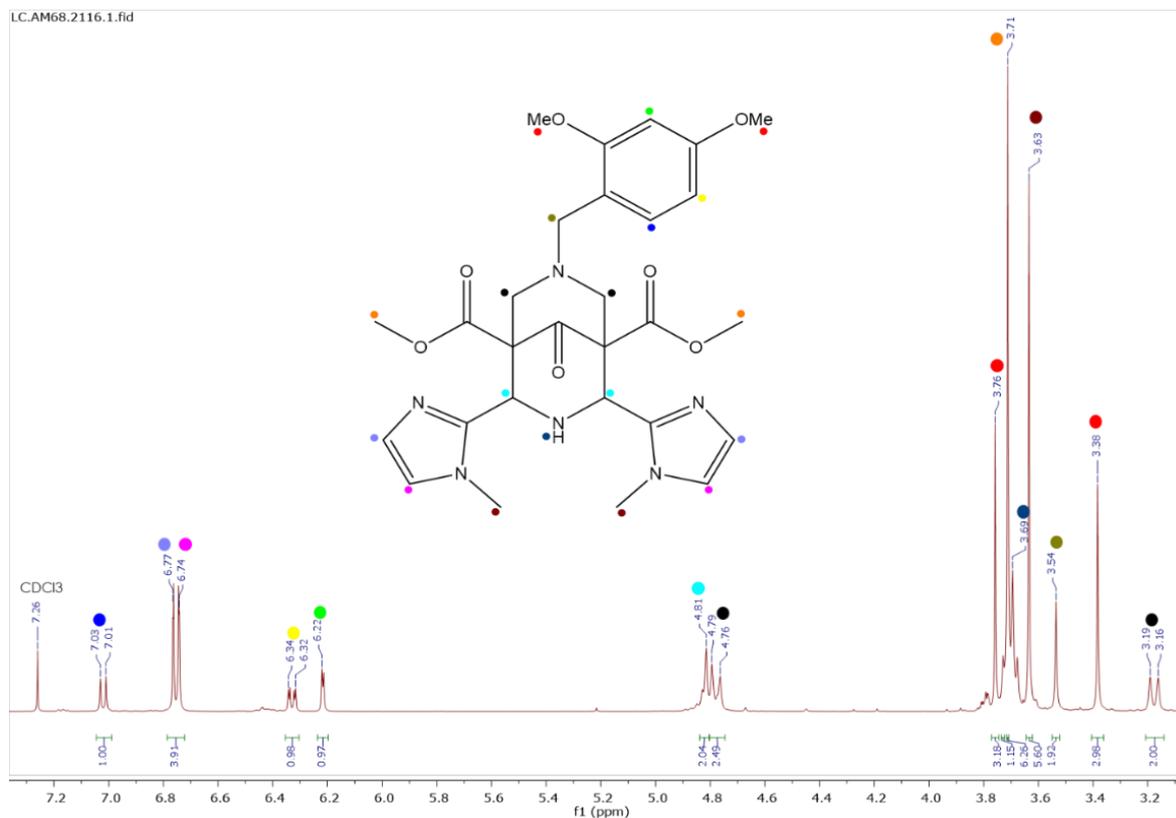
ii. **Caractérisation de H₃L4 et H₃L5 et quelques intermédiaires clés**

Le spectre du précurseur **P3** (Spectre 17) correspond à la forme majoritaire cis-cétone récoltée le premier jour. On remarque qu'il y a des résidus de la forme énol mais qu'ils restent négligeables.



Spectre 17 : RMN ¹H de **P3** (CDCl₃, 400 MHz, 25°C).

Le Spectre 18, représente l'intermédiaire **10** qui a la signature d'une bispidone. La différence à noter concerne la simplicité de la région des aromatiques par rapport aux dérivés avec les pyridines. Le groupement protecteur 2,4-diméthoxybenzyle à la même signature que précédemment.



Spectre 18 : RMN ¹H de 10 (CDCl₃, 400 MHz, 25°C).

Cet intermédiaire **10** a pu être cristallisé, la structure est présentée à la Figure 126. Contrairement aux autres bispidonnes, celle-ci se présente en conformation chaise-bateau avec une des distance N3---N7 parmi les plus grande que l'on a obtenue soit 3,681 Å. En moyenne les conformations chaise-chaise présentent une distance de 2,875 Å. L'orientation des azotes coordinants des 1-méthylimidazoles est tournée vers la cavité de la bispidone ce qui n'était pas le cas avec l'équivalent contenant des pyridines.

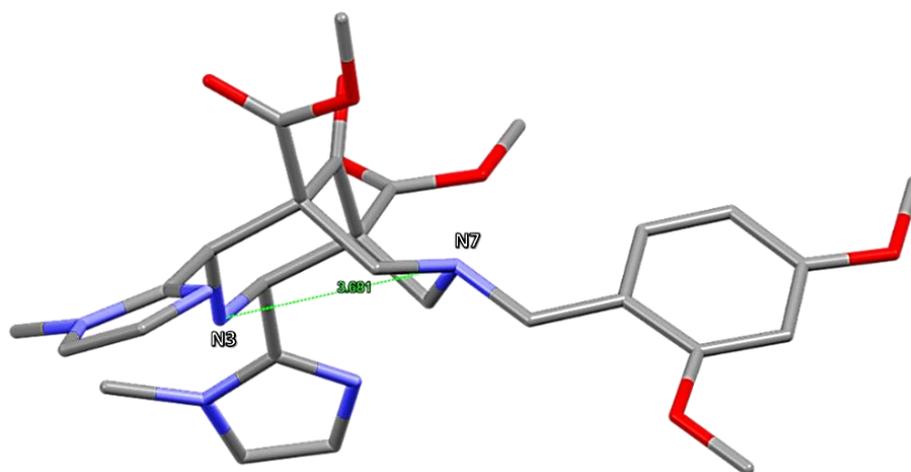


Figure 126 : Structure RX de l'intermédiaire **10** avec la distance N3—N7. azote, oxygène, carbone.

L'intermédiaire **12** a lui aussi été cristallisé : ici on est en présence de la conformation chaise-chaise hautement préorganisée, ce qui confirme l'influence des substituants sur la conformation de la

structure. La distance N3---N7 est très similaire aux autres systèmes en conformation chaise-chaise, ici 2,694 Å (Figure 127). La distance N3---N7 est plus courte par rapport à celle mesurée pour les analogues avec des pyridines, ce qui peut s'expliquer par la taille du cycle à 5. A noter qu'ici l'alcool en C9 est orienté vers N7.

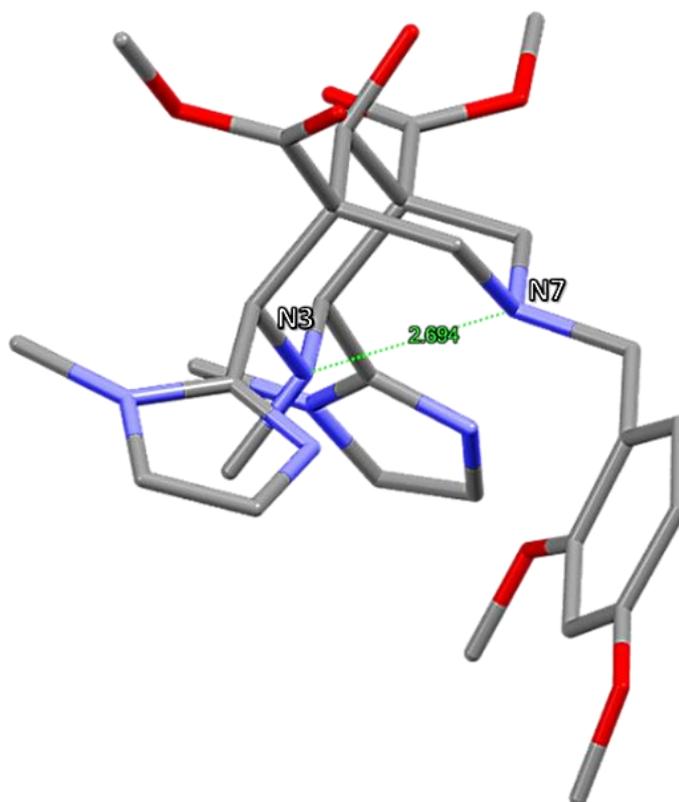
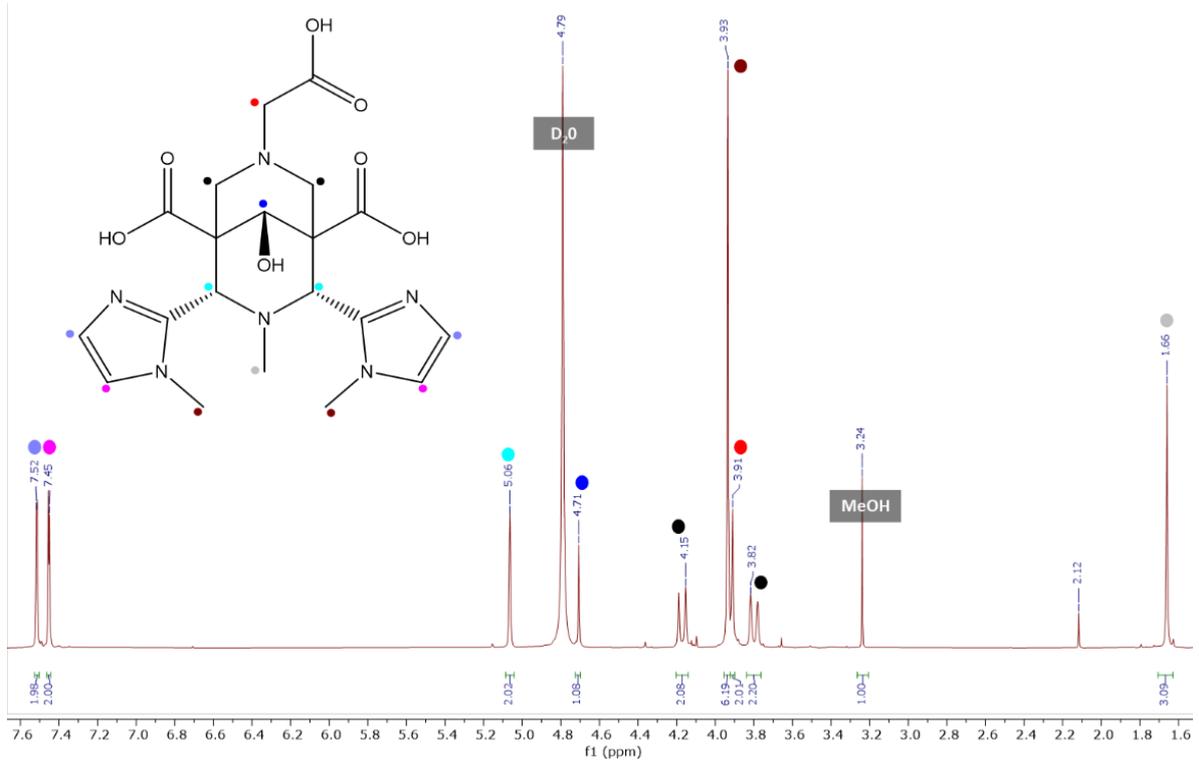
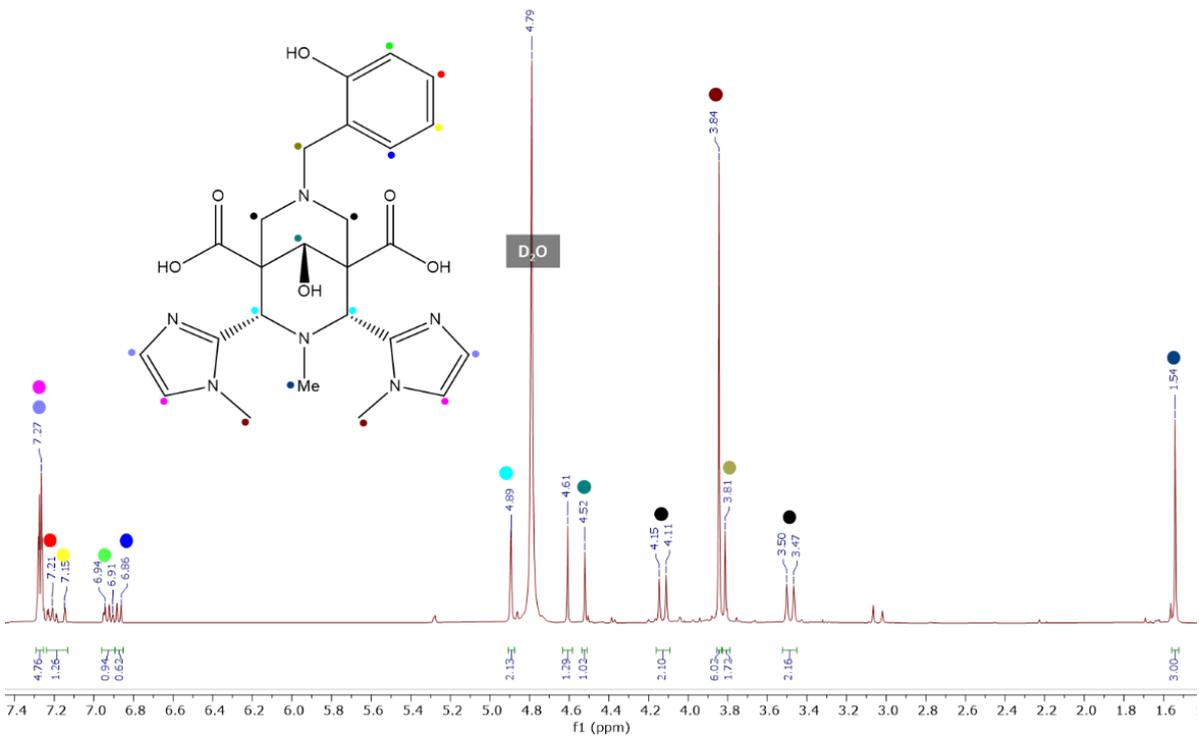


Figure 127 : structure RX de l'intermédiaire **12** avec la distance N3—N7. azote, *oxygène*, carbone.

Les spectres des molécules finales sont parmi les plus simples à dépouiller.



Spectre 19 : RMN ¹H de **H₃L5** (D₂O, 400 MHz, 25°C).



Spectre 20 : RMN ¹H de **H₃L4** (D₂O, 400 MHz, 25°C).

B. Synthèse des complexes [Mn^{II}L4] et [Mn^{II}L5]

a. Mn^{II}L4

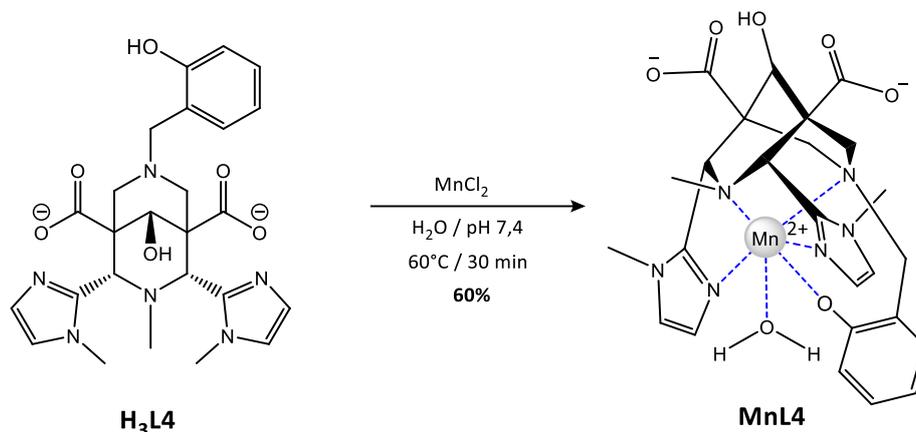


Figure 128 : synthèse de [Mn^{II}L4].

La complexation est effectuée classiquement (Figure 128) avec un suivi de la disparition du ligand libre par HPLC (Figure 129). Une fois la disparition complète du ligand observée, le complexe est purifié avec la même méthode par flash chromatographie avec 60% de rendement. L'analyse élémentaire révèle que le complexe est obtenu sous la forme [MnH₂L4],H₂O.

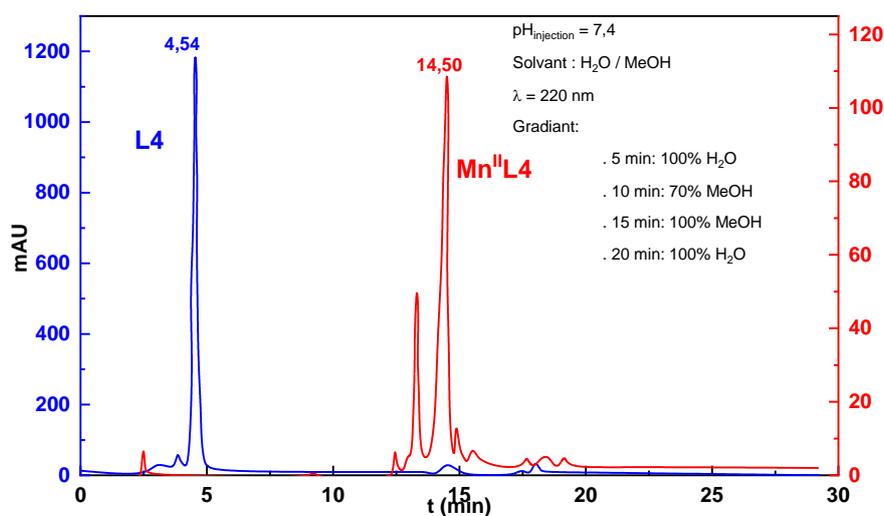


Figure 129 : HPLC de L4 et [MnL4] à pH 7,4.

Le complexe a été caractérisé par spectrométrie de masse (ESI) par le Pr Clotilde Policar et son équipe (Figure 130).

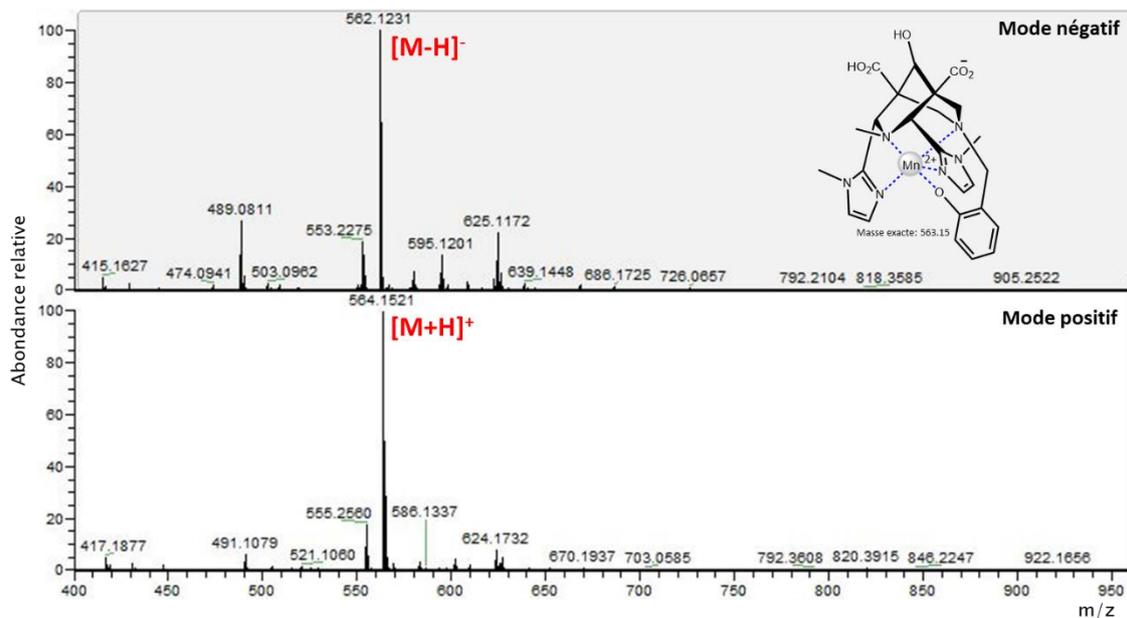


Figure 130 : Spectre de masse de $[Mn^{II}L4]$.

b. $Mn^{II}L5$

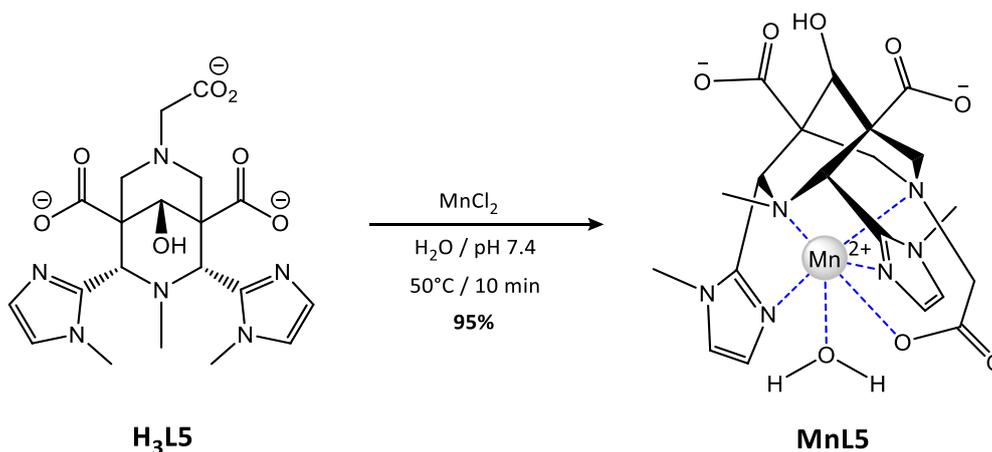


Figure 131 : Synthèse de $[Mn^{II}L5]$.

La synthèse du complexe débute par le mélange du ligand et $MnCl_2$ dans l'eau, par la suite le pH est fixé à 7,4 et le milieu est mis à 50°C pour 10 min avec un rendement de 95% (Figure 131). Le suivi de la réaction est effectué par HPLC ($H_2O/MeOH$), le pH est ajusté à nouveau à 7,4 si nécessaire pour le ligand libre et le complexe (Figure 132). Une fois la disparition complète du ligand observée, le complexe est purifié avec la même méthode par flash chromatographie. L'analyse élémentaire révèle que le complexe est obtenu sous la forme $[MnH_2L5]CF_3CO_2H$.

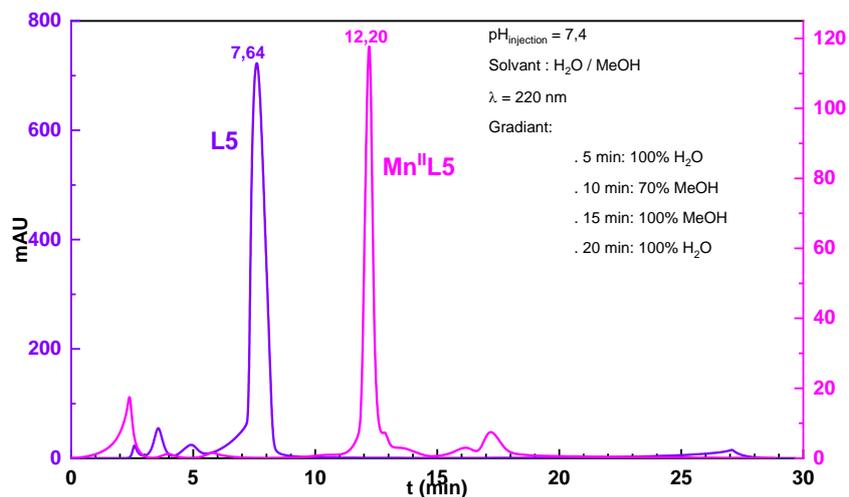


Figure 132 : HPLC de L5 et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ à pH 7,4.

Comme précédemment le complexe a été confirmé par spectrométrie de masse (Figure 133).

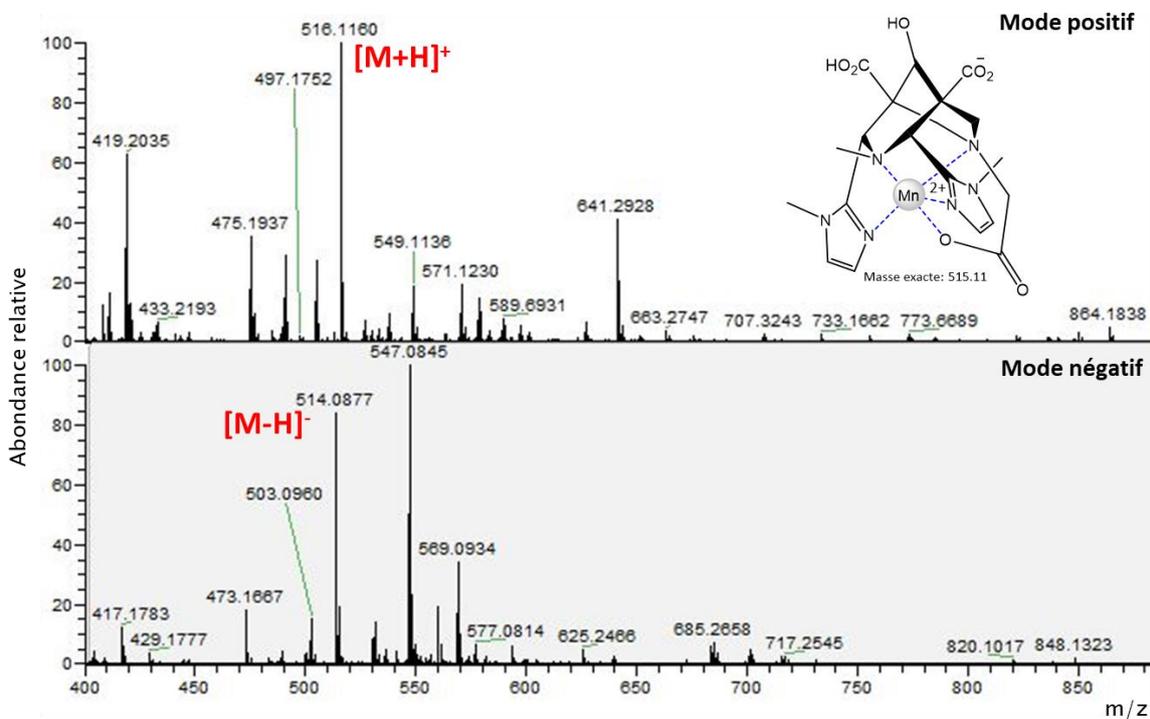


Figure 133 : Spectre de masse de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$.

Aucun des complexes n'a donné de spectre RMN ^1H interprétable, que ce soit dans le D_2O ou le CH_3OD .

III. Etudes potentiométriques, spectrophométriques et RMN de H₃L₄, H₃L₅ et les complexes

A. Etudes potentiométriques de H₃L₄, H₃L₅, [Zn^{II}L₄], [Zn^{II}L₅], [Mn^{II}L₄] et [Mn^{III}L₅]

i. Titrage de H₃L₄ et H₃L₅ (Figure 134)

Similairement au ligand H₃L₃, les constantes de protonation des ligands H₃L₄ et H₃L₅ ont été déterminées par potentiométrie.

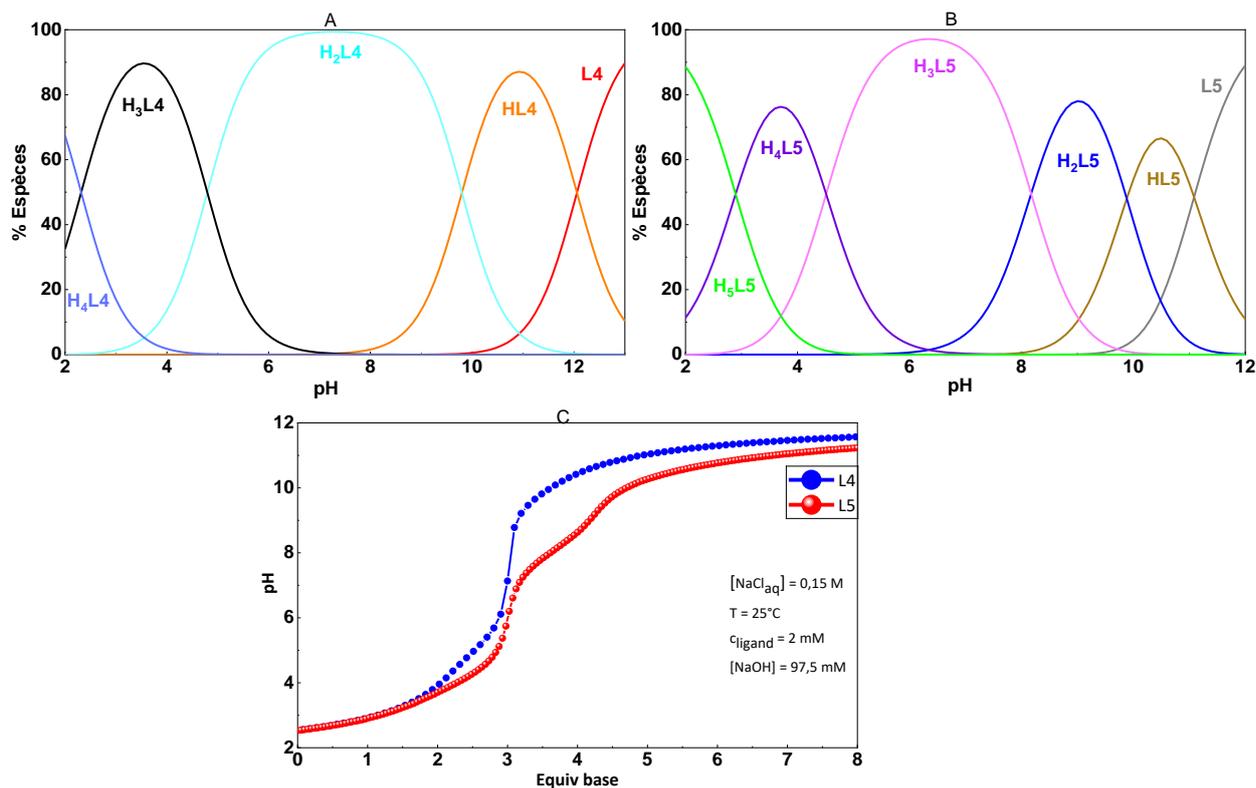


Figure 134 : (A) courbes de distribution des espèces de L₄, (B) courbes de distribution des espèces de L₅ et (C) courbes titrages des ligands L₄ et L₅.

Le schéma de protonation de L₄ est très similaire à celui de L₃, c'est-à-dire que l'on a une première protonation à $\log K_{H1} = 12,06(3)$ ($\log K_{H1} = 11,45(2)$ pour L₃) attribuable à une des deux amines tertiaires. La seconde protonation est attribuable au phénolate qui est à $\log K_{H2} = 9,81(5)$ pour L₄ ($\log K_{H2} = 9,51(3)$ pour L₃). La troisième et quatrième protonation sont attribuées aux acides carboxyliques qui sont respectivement à $\log K_{H3} = 4,78(7)$ et $\log K_{H4} = 2,32(7)$ pour L₄ ($\log K_{H3} = 3,93(4)$ et $\log K_{H4} = 2,26(4)$ pour L₃). Contrairement à L₃ et L₄, L₅ présente un schéma de protonation différent. En effet, dans le cas de L₅ on mesure deux constantes de protonation basiques attribuable aux deux amines tertiaires : une première à $\log K_{H1} = 11,26(1)$ et une seconde à $\log K_{H2} = 10,13(1)$. La troisième protonation est à $\log K_{H3} = 7,99(1)$ que nous avons attribuée à un cycle 1-méthyleimidazole ($\log K_{H(1\text{-méthyleimidazole})} = 6,95$).^[233] Enfin, on mesure deux autres constantes de protonation à $\log K_{H4} = 4,43(1)$ et $\log K_{H5} = 2,91(2)$ attribuables à deux acides carboxyliques du système (Figure 134).

L'explication la plus pertinente aux deux constantes de protonation basiques mesurables sur **L5** est une différence de conformation entre le ligand **L5** et les autres (le même phénomène est observé dans le chapitre 2 avec le ligand **H₆L1**). En effet, une seule constante de protonation est toujours observée dans le cas de bispidoles en conformation chaise-chaise.^[88,90–92] Dans cette conformation, le proton de la fonction ammonium est stabilisé à l'intérieur de la cavité par des liaisons hydrogènes avec **N3**, **N7** et les azotes des cycles aromatiques.^[12] Dans l'hypothèse d'une conformation chaise-bateau ou bateau-chaise, les deux amines (**N3** et **N7**) sont plus éloignées et il est donc possible d'avoir une protonation indépendante pour chaque site (Figure 135). Ce phénomène a déjà été obtenu récemment dans le cas d'autres bispidines à savoir **L_{mono}** et **L_{bis}** où il a été mesuré deux constantes de protonations basiques associées à **N3** et **N7**.^[92]

	L3	L4	L5	L_{lys} ^[4]	L_{mono} ^[92]	L_{bis} ^[92]
logK_{H1}	11,45(2)	12,06(3)	11,26(1)	11,44(1)	11,37(2)	9,91(1)
logK_{H2}	9,51(3)	9,81(5)	10,13(1)	10,31(2)	10,46(2)	9,05(1)
logK_{H3}	3,93(4)	4,78(7)	7,99(1)	4,71(5)	4,65(3)	5,66(2)
logK_{H4}	2,26(4)	2,32(7)	4,43(1)	2,76(5)	3,40(3)	3,73(2)
logK_{H5}			2,91(2)	2,22(4)	2,89	2,74(1)
ΣlogK_{Hi}	25,1	29,0	36,7	31,5	32,93	19,44

Figure 135 : Tableau récapitulatif des constantes de protonations de **L3**, **L4**, **L5**, **L_{mono}**, **L_{bis}**, **L_{lys}** et le modèle schématique de la conformation de chaque ligand.

ii. Titrage de $[Zn^{II}L_4]$, $[Zn^{II}L_5]$, $[Mn^{II}L_4]$ et $[Mn^{II}L_5]$

Les constantes de stabilité thermodynamiques des complexes $[Mn^{II}L_4]$, $[Zn^{II}L_4]$, $[Mn^{II}L_5]$ et $[Zn^{II}L_5]$ ont pu être déterminées par des études potentiométriques dans les conditions standards. Concernant $[Mn^{II}L_4]$, nous avons dû limiter notre étude à la gamme de pH entre 2 et 9 car au-delà de cette valeur de pH, un précipité se forme. Les courbes de dosage potentiométrique et les diagrammes de distribution des espèces sont représentés à la Figure 136.

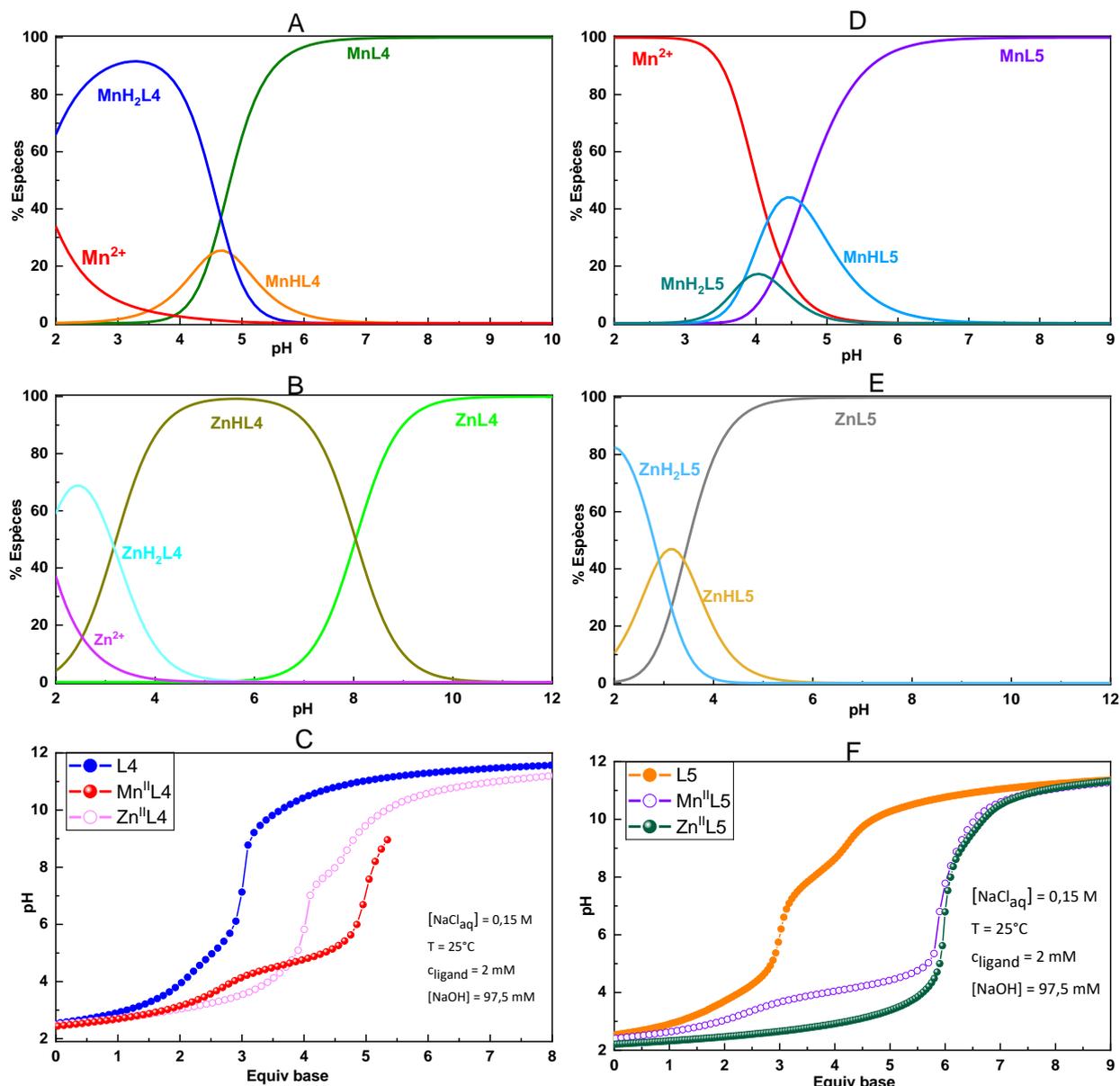


Figure 136 : (A) courbes de distribution de $[Mn^{II}L_4]$, (B) courbes de distribution de $[Zn^{II}L_4]$, (C) courbes de titrage potentiométriques de L4, $[Mn^{II}L_4]$ et $[Zn^{II}L_4]$, (D) courbes de distribution de $[Mn^{II}L_5]$, (E) courbes de distribution de $[Zn^{II}L_5]$ et (F) courbes de titrage potentiométriques de L5, $[Mn^{II}L_5]$ et $[Zn^{II}L_5]$.

$[Zn^{II}L_4]$ (Figure 136 B et C) : à la suite du titrage potentiométrique d'un mélange stœchiométrique de L4 et de Zn^{II} on mesure une constante globale de formation du complexe $\log K_{ZnL_4} = 15,40(1)$. Cette valeur est dans la moyenne pour un complexe de bispidine avec le Zn^{II} : $14 \leq \log K_{ZnL} \leq 18$.^[12,88,90,91] La première protonation mesurée pour le complexe $[Zn^{II}L_4]$ est à $\log K_{ZnHL_4} = 7,8(1)$, il s'agit

de la protonation du phénolate. Enfin on mesure une seconde constante de protonation du système à 3,17(6) que nous avons attribué à un acide carboxylique non coordonné.

[Zn^{II}L5] (Figure 136 E et F) : Le titrage débutant à pH 2 la courbe potentiométrique montre que l'on forme plus de 50% de complexe. Après traitement des données, nous avons obtenu une estimation de la constante de stabilité soit $\log K_{ZnL5} = 27,2(3)$. Une première constante de protonation est mesurée à $\log K_{ZnHL5} = 3,4(3)$ que nous avons attribué à un acide carboxylique. Enfin, une dernière constante de protonation est mesurée à $\log K_{ZnH2L5} = 2,9(3)$ que nous avons attribuée au second acide carboxylate.

[Mn^{II}L4] (Figure 136 A et C) : pour tous les titrages des complexes de Mn^{II} nous commençons toujours par étudier la cinétique de formation du complexe dans la région acide (pH 2 – 5) et neutre afin de déterminer le mode opératoire du titrage potentiométrique à 25°C. Dans le cas de **[Mn^{II}L4]** il s'agit d'une cinétique de formation rapide ; nous avons donc pu effectuer un titrage potentiométrique en ligne. Tout comme pour le complexe **[Mn^{II}L3]**, nous avons observé une précipitation aux pHs basiques, ce qui nous a conduit à réduire la région de travail (pH entre 2 et 9). La constante de stabilité mesurée est $\log K_{MnL4} = 17,28(3)$. Cette constante peut sembler très élevée à première vue, mais en comparant à d'autres systèmes Mn^{II}-bispidine de la littérature : $11 \leq \log K_{MnL} < 24$,^[88,90,91,234] on remarque que le complexe est tout à fait dans la gamme. Cette similitude se traduit par de pMn très proche. Une première constante de protonation est mesurée à $\log K_{MnHL4} = 4,50(4)$ qui a été attribuée à un phénolate. Cette constante a été attribuée au phénolate par analogie au titrage spectrophotométrique de **[Mn^{II}L3]**. Mais aussi par comparaison à **[Zn^{II}L4]** contenant une constante de protonation à 7,8(1) qui a été attribué au phénolate. Enfin, une dernière constante de protonation est mesurée à $\log K_{MnH2L4} = 3,82(2)$ que l'on attribue à un acide carboxylique.

[Mn^{II}L5] (Figure 136 B et F) : la cinétique de formation du complexe est très rapide dans n'importe quelle gamme de pH, nous avons donc effectué un titrage en ligne. Ici, on mesure une constante de stabilité $\log K_{MnL5} = 20,1(1)$. Une première constante de protonation est mesurée à $\log K_{MnHL5} = 4,6(1)$ que nous avons attribué à un acide carboxylique. Enfin, une dernière constante de protonation est mesurée à $\log K_{MnH2L5} = 3,8(1)$ que nous avons attribuée au second acide carboxylate.

Toutes les constantes thermodynamiques obtenues par ces dosages sont rassemblées dans le Tableau 20.

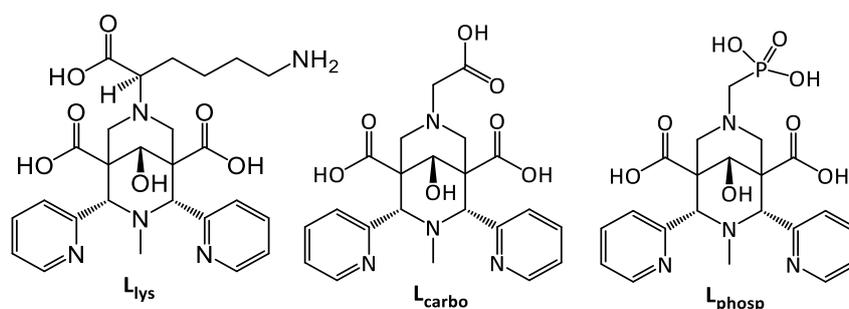


Figure 137 : Ligands de comparaison.

Tableau 20 : Récapitulatif des constantes thermodynamiques. En noir : titrage potentiométrique ($I = 0,15 \text{ M [NaCl]}$; $c = 2 \text{ mM}$; $T = 25^\circ\text{C}$), en rouge : titrage ultra-violet ($I = 0,1 \text{ M [NaCl]}$; $c = 0,1 \text{ mM}$; $T = 25^\circ\text{C}$ [22°C pour MnL] ; 2% MeOH) et en violet : titrage relaxométrique ($I = 0,15 \text{ M [NaCl]}$; $c = 1,86 \text{ mM}$; $T = 25^\circ\text{C}$; 60 MHz). $^{[a]} c_M = c_L = 10^{-5} \text{ M}$; pH 7,4.

	L3	L4	L5	L_{phosp}	L_{carbo}	L_{lys}
logK _{H1}	11,45(2)	12,06(3)	11,26(1)	11,15(1)	9,54(4)	11,44(1)
logK _{H2}	9,51(3)	9,81(5)	10,13(1)	7,35(3)	5,11(6)	10,31(2)
	9,352(8)					
logK _{H3}	3,93(4)	4,78(7)	7,99(1)	3,78(4)	2,99(6)	4,71(5)
	3,55(1)					
logK _{H4}	2,26	2,32(7)	4,43(1)	3,02(3)	-	2,76(5)
logK _{H5}	-	-	2,91(2)	-	-	2,22(4)
ΣlogK _{Hi}	25,1	29,0	36,7	25,3	17,64	31,5
logK _{MnL}	16,2(1)	17,28(3)	20,1(1)	13,72(3)	11,26(4)	12,21(5)
	14,9(2)					
logK _{MnHL}	-	4,50(4)	4,6(1)	5,31(2)	3,20(3)	10,42(3)
logK _{MnH2L}	-	3,82(2)	3,8(1)	3,90(1)	-	3,97(4)
logK _{ZnL}	18,47(5)	15,40(1)	27,2(3)	16,54(4)	13,72(2)	15,59(3)
logK _{ZnHL}	4,31(4)	7,8(1)	3,4(3)	5,43(3)	3,26(1)	10,33(2)
logK _{ZnH2L}	-	3,17(6)	2,9(3)	3,39(2)	-	3,28(1)
pMn ^[a]	7,52	7,6	8,9	7,28	7,06	6,65
pZn ^[a]	8,66	7,0	12,5	8,76	8,29	-

Comme on peut le voir dans le Tableau 20 les constantes de stabilité thermodynamique de **L3** et **L4** avec le Mn^{II} ou Zn^{II} (Tableau 12) sont dans la gamme haute. **L5** sort du lot avec des constantes de stabilité thermodynamique très élevée pour le manganèse et le zinc, mais il faut aussi prendre en compte les constantes de protonation du ligand qui sont très élevée ($\Sigma \log K_{Hi} = 36,7$) ce qui tend mécaniquement les constantes de stabilité à des valeurs élevées. Cependant, on note que **L5** à une très forte affinité pour l'ion zinc divalent.

B. Etude relaxométrique de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$

Un titrage relaxométrique longitudinal (r_1) a été effectué pour $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$, celui-ci confirme les observations du titrage potentiométrique avec une formation de complexe qui débute à pH très bas (Figure 138). Le titrage relaxométrique longitudinal de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ ne sera pas présenté ici car difficile à interpréter.

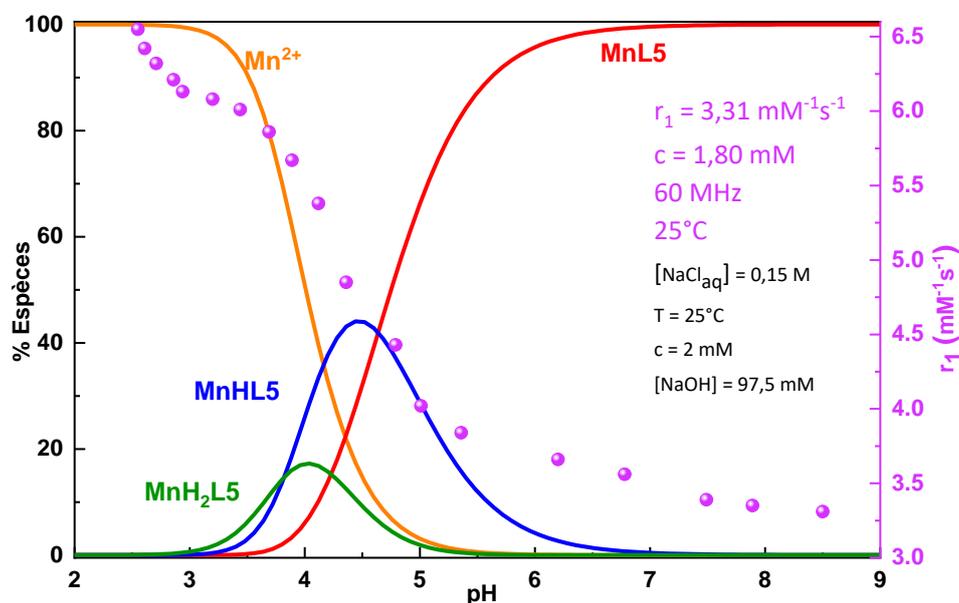


Figure 138 : Superposition des courbes de distribution déterminées par potentiométrie et titrage relaxométrique longitudinal (r_1) de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$.

C. Titrage spectrophotométrique de $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$

Pour confirmer ces données, des titrages spectrophotométriques ont été réalisés sur **L4** et ses complexes. Nous avons fait le choix de ne pas étudier le ligand **L5** et ses complexes car les motifs imidazoles sont difficile à suivre par spectrophotométrie UV-visible. Contrairement aux spectres d'absorption de la pyridine et de ses dérivés qui présentent deux bandes vers 204 nm et vers 256-270 nm^[235], les spectres de l'imidazole montrent une seule transition $\pi - \pi^*$ vers 205 nm.^[233] La position de cette bande d'absorption de l'imidazole est proche de la limite inférieure de longueur d'onde pour le domaine proche-UV, ce qui rend l'étude de cette bande difficile (Figure 139).^[233] Le 1-méthylimidazole à pH 3 : $\lambda_{\text{max}} = 208 \text{ nm}$, à pH 6,9 : $\lambda_{\text{max}} = 209 \text{ nm}$ et à pH 11,0 : $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$.^[228] Dans le cas de $\text{H}_3\text{L4}$ et de ses complexes, seule la seconde bande de transition centrée sur le phénolate à 290 nm a été suivie.

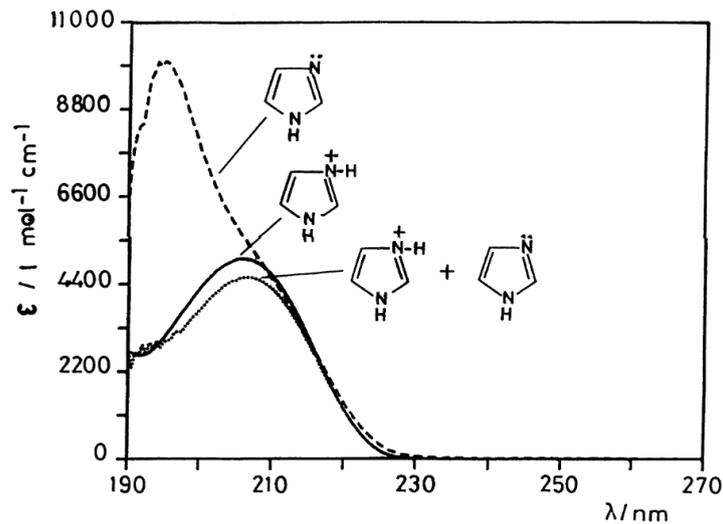


Figure 139 : Spectre d'absorption UV de l'imidazole en solution aqueuse : $1,006 \times 10^{-4}$ M à pH 3,2 (—) ; $1,025 \times 10^{-4}$ M à pH 6,9 (...) et $1,035 \times 10^{-4}$ M à pH 11,0 (---). Schéma issu de [228].

i. Titration de $[Zn^{II}L_4]$ et $[Mn^{II}L_4]$ à pH 7,06

Comme précédemment avec H_3L_3 , nous avons voulu effectuer un titrage des complexes de Zn^{II} et Mn^{II} à pH fixe afin de déterminer une constante apparente et de la recalculer par la suite via la constante formelle du titrage en fonction du pH (Figure 140). Cependant, tout ne s'est pas passé comme nous l'aurions voulu car les variations que l'on obtient en UV via l'addition de métal ne sont pas significatives pour le logiciel de régression non linéaire Specfit.

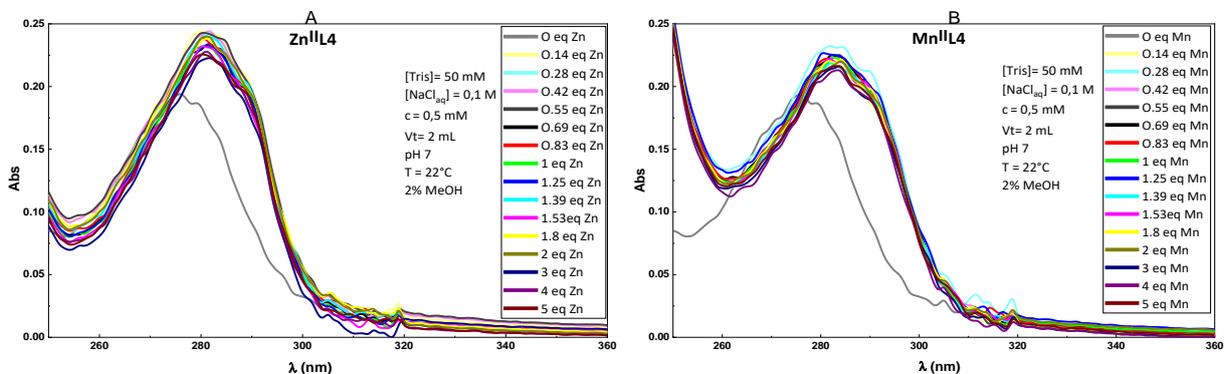


Figure 140 : Spectre d'absorption UV. (A) $[Zn^{II}L_4]$ et (B) $[Mn^{II}L_4]$.

Dans le cas de H_3L_4 seule la seconde bande de transition du phénolate centré à 290 nm a été suivie, la première bande étant plus difficile à suivre. L'évolution des deux complexes est très similaire, c'est-à-dire que dès l'ajout de 0,14 équivalent de métal on observe une évolution hyperchrome et bathochrome et par la suite l'évolution est très faible. Il nous a donc pas été possible de traiter ces données afin d'en déterminer des constantes thermodynamiques.

ii. Titration de $[Mn^{II}L_4]$ (Figure 141)

Des variations spectrales plus importantes ont été enregistrées pour le dosage en fonction du pH d'une solution de ligand et de $MnCl_2$ dans un ratio L : M (1 : 1).

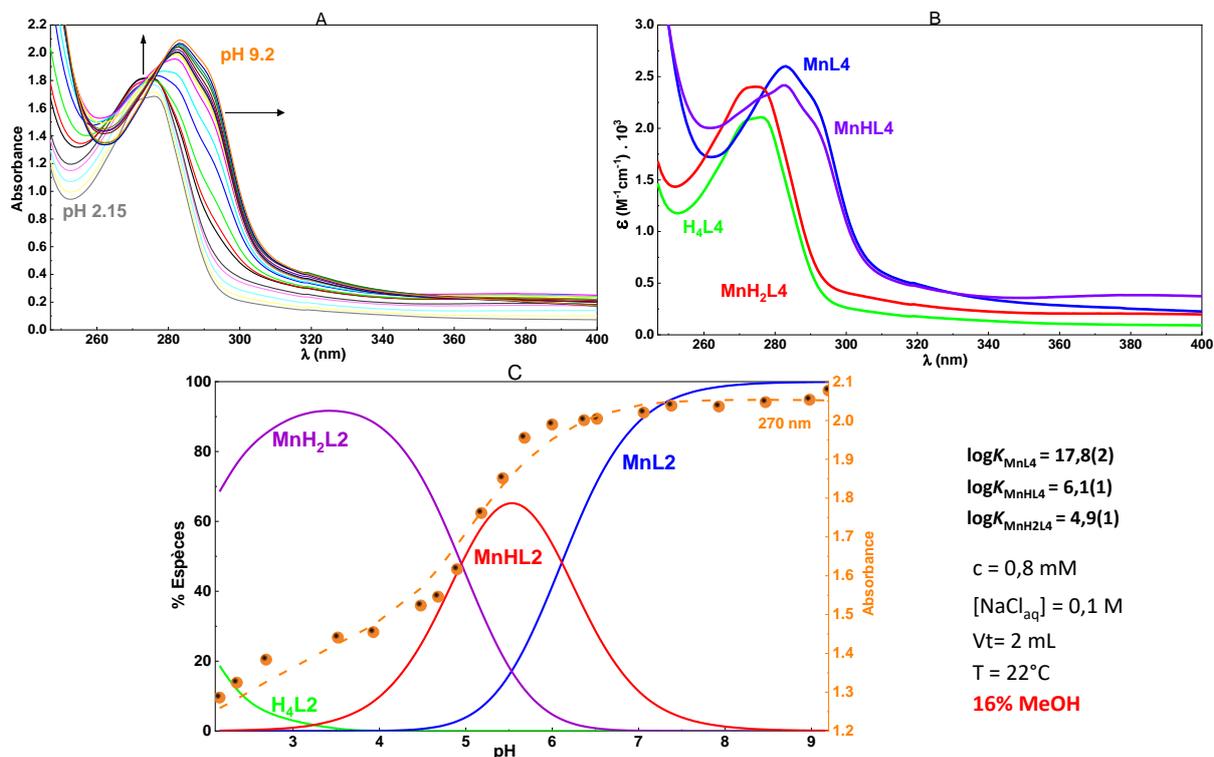


Figure 141 : (A) courbes de titrage de $[Mn^{II}L4]$ en fonction du pH, (B) Courbes d'absorption UV des espèces et (C) Courbes de distribution des espèces, les points expérimentaux et le fit en orange. Titrage entre $2 \leq \text{pH} < 9$.

A la suite de ce titrage spectrophotométrique UV du complexe $[Mn^{II}L4]$, nous avons déterminé une constante de stabilité thermodynamique $\log K_{MnL4} = 17,8(2)$ une valeur qui est très cohérente avec la constante déterminée par potentiométrie de $\log K_{MnL4} = 17,28(3)$. En suivant le schéma de protonation du système on mesure une première constante de protonation à $\log K_{MnHL4} = 6,1(1)$ tandis qu'en potentiométrie la première protonation n'est mesurée qu'à $\log K_{MnHL4} = 4,50(4)$ que nous avons attribué au phénolate. Une seconde constante de protonation a été déterminée à $\log K_{MnH2L4} = 4,9(1)$ que nous avons attribué à un acide carboxylique. Il y a un décalage des constantes de protonation et des proportions des espèces du titrage spectrophotométrique par rapport au titrage potentiométrique. Nous supposons que cela est dû à la forte quantité de méthanol présent dans le titrage spectrophotométrique (16%).

La simplicité des signaux imidazole nous a conduit à titrer les ligands H_3L4 , H_3L5 et les complexes de Zn^{II} associés par RMN.

D. Titrage et caractérisation RMN 1H de H_3L4 , H_3L5 , $[Zn^{II}L4]$ et $[Zn^{II}L5]$

Afin de déterminer des constantes thermodynamiques via des titrages RMN, nous avons commencé par étudier les déplacements chimiques des signaux des ligands à pH variables. De manière générale, il est relativement aisé de déterminer des $\log K_H$ par RMN lorsqu'il y a un échange de proton rapide entre les différentes espèces : les $\log K_H$ correspondent alors aux points d'inflexion. Pour cette étude, certaines protonations ne sont pas associées à des échanges rapides, et il est donc moins

évident de déterminer le $\log K_H$ par l'analyse directe des déplacements chimiques. Nous nous sommes aidé des résultats obtenus via les précédents titrages potentiométriques ou encore par spectroscopie d'absorption. Dans les cas où il y a une ambiguïté, nous avons choisi de ne pas prendre les résultats en compte.

i. Titration de L4

Dans le cas du titrage de ce ligand, nous avons fait le choix de débuter à $pD = 0$ afin de déterminer les constantes de protonation des cycles imidazoles, celles-ci n'ayant pu être déterminées par potentiométrie dans la gamme de pH classique. Les valeurs de pD dans la gamme $0 \leq pD \leq 2$ et à des valeurs de $pD > 11,6$ ont été calculées à partir des concentrations molaires en DCl et non mesurées via un pH mètre. Les spectres obtenus sont représentés à la Figure 142. Cependant, dans la gamme $0 \leq pD \leq 1,6$ il y a très peu de variations de déplacement chimique associée aux protons des imidazoles. Cela confirme que les valeurs de $\log K_H$ des cycles 1-méthylimidazoles sont inférieures à $pD 0$ dans le cas du ligand H_3L4 . Les protons du phénolate ne seront pas suivis, car très difficiles à attribuer durant un titrage en fonction du pD .

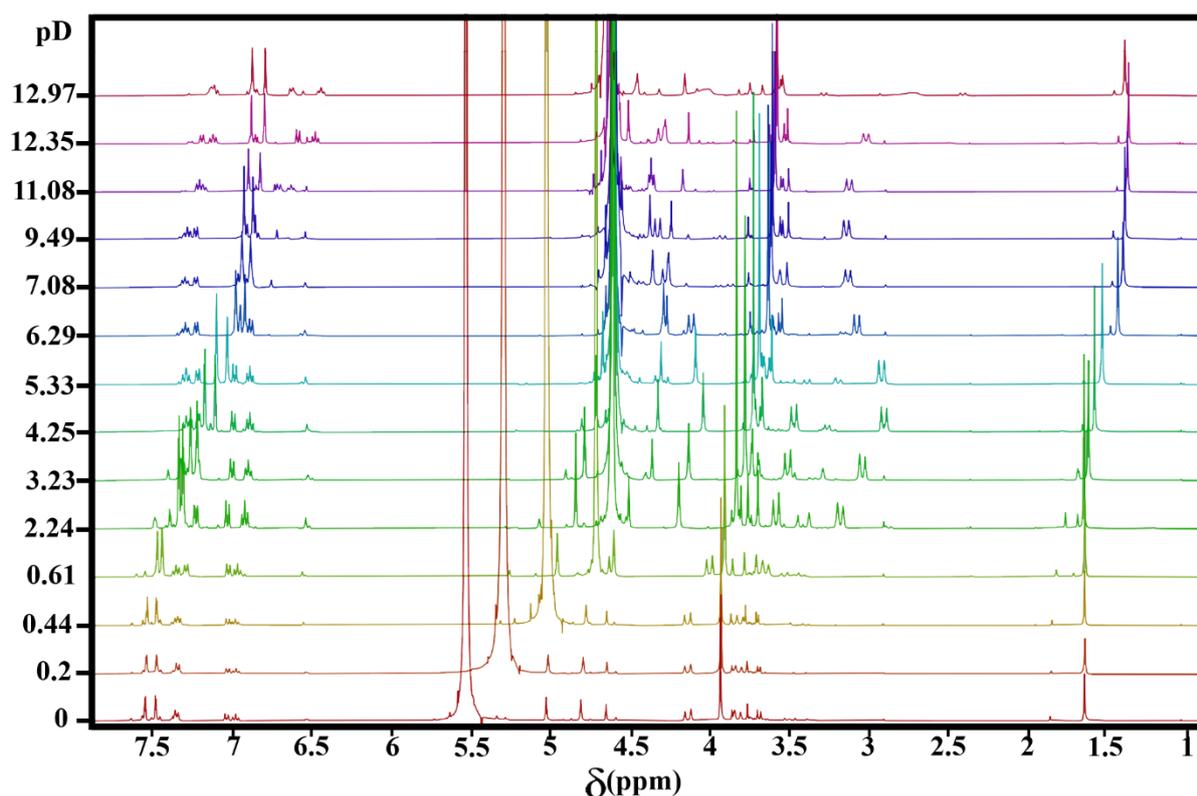


Figure 142 : Titrage RMN 1H de L4 en fonction du pD (D_2O ; 400 MHz ; $25^\circ C$; $c = 22,7$ mM). Référence : acétone

Afin de tracer le déplacement chimique des signaux en fonction du pD (Figure 144), les signaux ont été attribués tels que (Figure 143) :

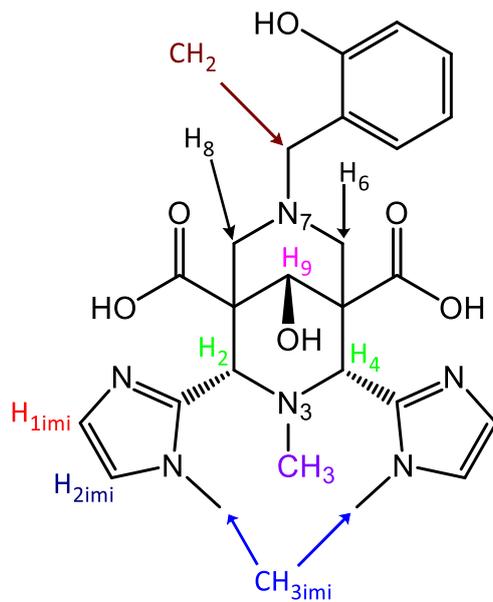


Figure 143 : Ligand H_3L4 .

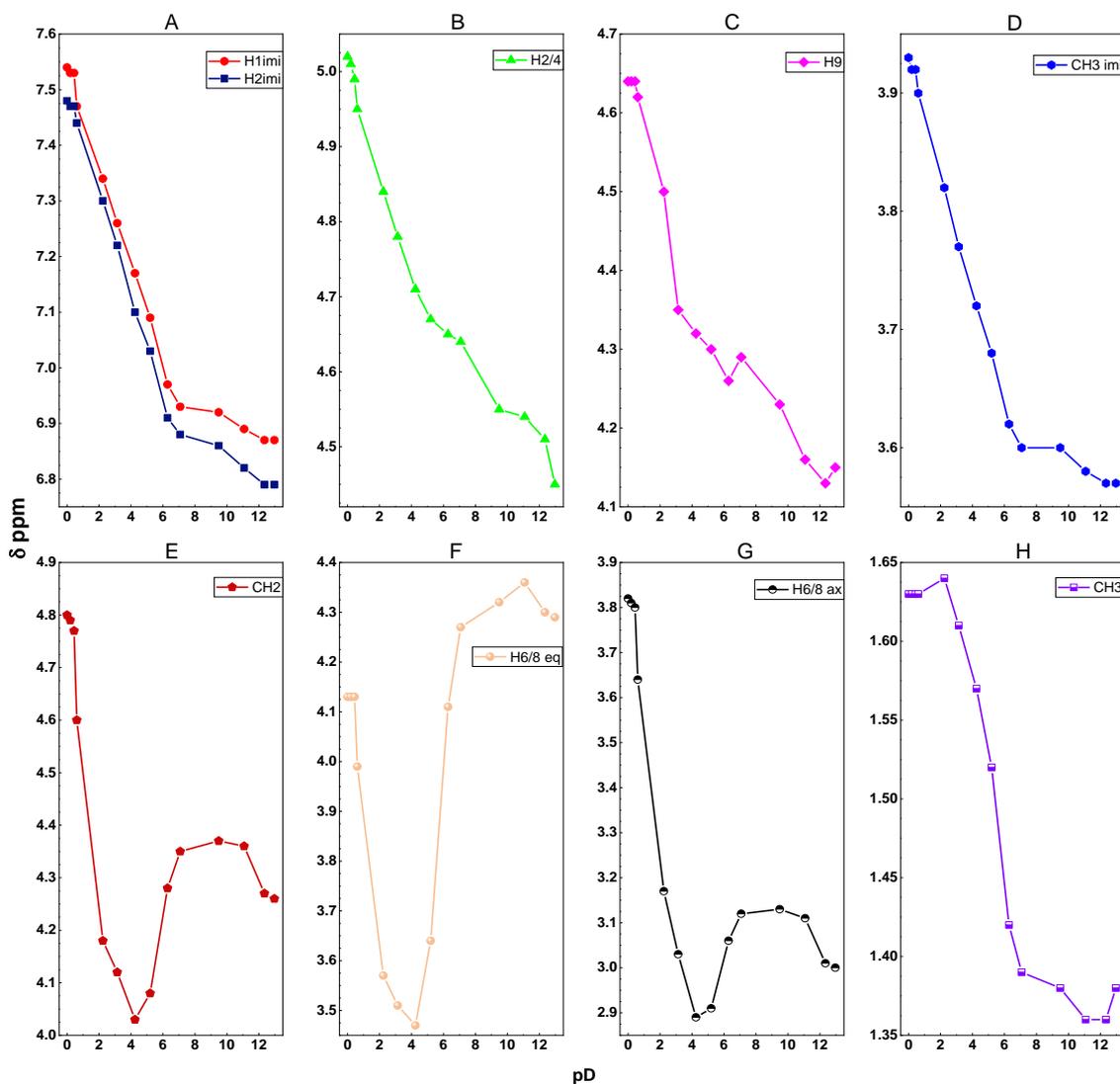


Figure 144 : Déplacement chimique des signaux de $L4$ en fonction du pD.

Pour cette analyse, je suis parti du principe que plus le signal est proche du site de protonation plus il sera influencé (Figure 144). En analysant les signaux du CH₂, de H^{6/8}_{ax}, de H^{6/8}_{eq} et CH₃, on remarque qu'ils subissent plusieurs variations aux pD basiques. Dans la gamme $7 \leq \text{pD} \leq 12$, on remarque de très grandes variations menant à penser qu'il y a au minimum deux constantes de protonation dans la région. Les protons subissant le plus de variations sont le CH₂ et les protons H^{6/8}_{ax} et H^{6/8}_{eq} qui sont dans la région d'influence de N7 (Figure 144) : on peut donc attribuer cette protonation pH environ 11,8 à N7. Une seconde variation basique est observée avec un point d'inflexion à pD = 10. Nous l'avons associée au point d'inflexion à pD = 9,7 observées dans le cas des protons H_{1/2imi} et CH_{3imi}. En faisant la moyenne de ces valeurs, on détermine pD = 9,85(2) soit pH 9,45(2) qui est cohérent avec la seconde constante de protonation mesurée par potentiométrie à 9,81(5). Cette constante est attribuée au phénolate. On remarque également un blindage des signaux CH₂, H^{6/8}_{ax}, H^{6/8}_{eq} et CH₃ jusqu'à un minimum de pD = 4,1 où on a une nouvelle hausse du déplacement chimique. Ces variations peuvent être attribuées à la protonation d'un des carboxylates ($\log K_H = 4.78$ par potentiométrie). Enfin, le CH₃ en N3 montre un point d'inflexion à pD = 2,4 soit pH 2,0 attribuable à une protonation de la deuxième fonction carboxylate ($\log K_H = 2.32$ par potentiométrie).

ii. Titrage de L5

Dans le cas de **H₃L5**, nous voulions voir s'il était possible d'assigner la valeur de $\log K_H$ mesurée à 7,99(1) par potentiométrie et que nous avons hypothétiquement attribuée à un cycle 1-méthylimidazole. Pour cela comme pour le ligand **H₃L4** nous avons effectué un titrage dans la gamme $0 \leq \text{pD} \leq 12,66$ (Figure 145).

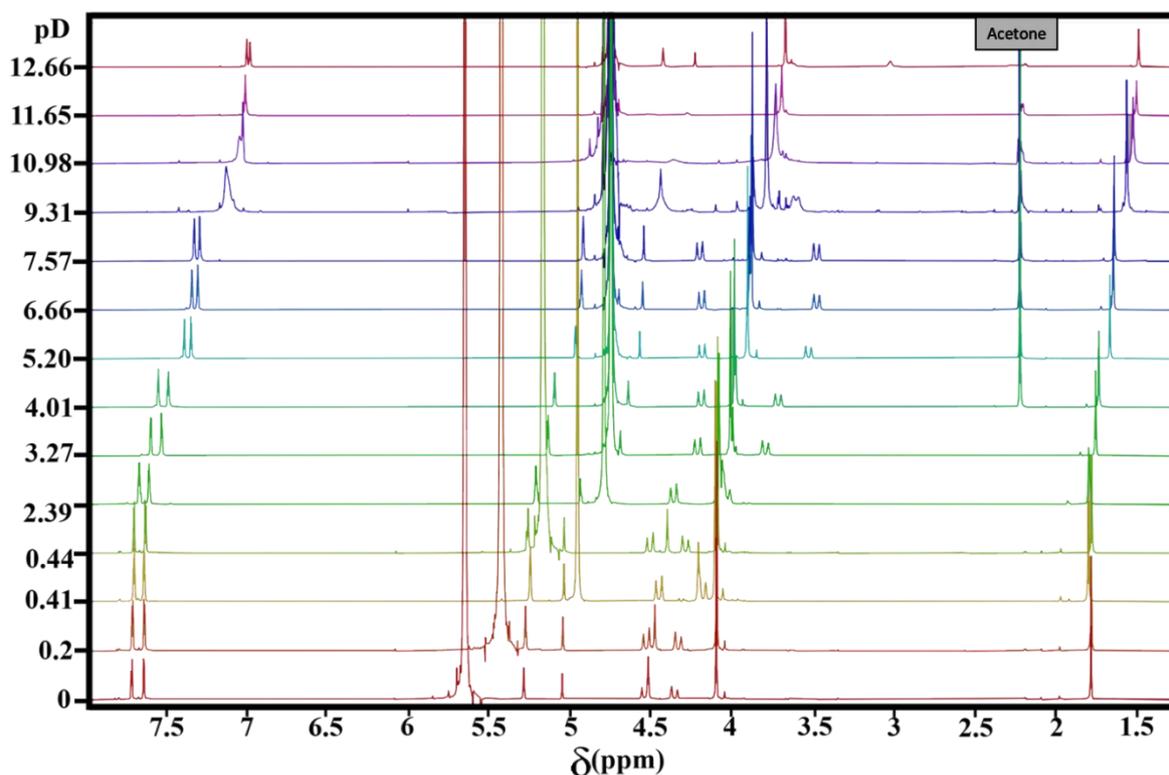


Figure 145 : Titration RMN ^1H de **L5** en fonction du pD (D_2O ; 400 MHz ; 25°C ; $c = 25,0 \text{ mM}$). Référence : acétone

Afin de tracer le déplacement chimique des signaux en fonction du pD (Figure 147), les signaux ont été attribués tels que (Figure 146) :

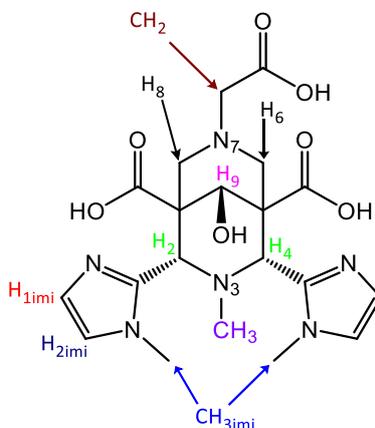


Figure 146 : Le ligand **H₃L5**.

Les variations des déplacements chimiques des signaux sont représentées à la Figure 147. Seul le CH_2 et $\text{H}^{6/8}_{\text{eq}}$ comprennent un point d'inflexion marqué autour de $\text{pD} = 10$ pouvant être attribué à une protonation d'une des deux amines tertiaires. Cette valeur correspond à la seconde protonation du ligand déterminé par potentiométrie à 10,13(1). Un second point d'inflexion marqué est observé dans le cas de $\text{H}^{6/8}_{\text{eq}}$ à $\text{pD} = 8,0$ soit $\text{pH} 7,6$. A ce pD, une inflexion est observée pour toutes les courbes, sauf celle du CH_2 . Ce pH de 7,6 est très proche de la valeur mesurée par potentiométrie à 7,99(1) que nous avons attribué à un des cycles 1-méthylimidazole. Une protonation d'un des 1-méthylimidazoles nous a étonné car nous nous attendions à avoir un schéma de protonation relativement similaire à celui

de **H₃L4**. En effet, dans le cas de **H₃L4** les protonations des cycles 1-méthylimidazoles sont en dessous de pH = -0,4. La seule grande différence pouvant justifier ce schéma de protonation différent (en dehors du substituant en N7) est la conformation du bicyclic. Dans le cas de **H₃L4**, il s'agit d'une conformation chaise-chaise, qui contraint par répulsion électrostatique à abaisser d'avantage les protonations des 1-méthylimidazoles. Ce n'est pas le cas de **H₃L5** qui est en conformation chaise-bateau (ou bateau chaise) comme le montrent les deux constantes de protonation des amines tertiaires. En conformation chaise-bateau (ou chaise bateau), les répulsions électrostatiques sont moindres ce qui permet une protonation élevée d'une des deux cycles 1-méthylimidazole. Enfin, on mesure un point d'inflexion du CH₃ à pD = 3,0 soit pH 2,6 qui est en accord avec une protonation obtenue par potentiométrie à 2,91(2) (Figure 147) et avec ce qui a été observé pour **H₃L4**.

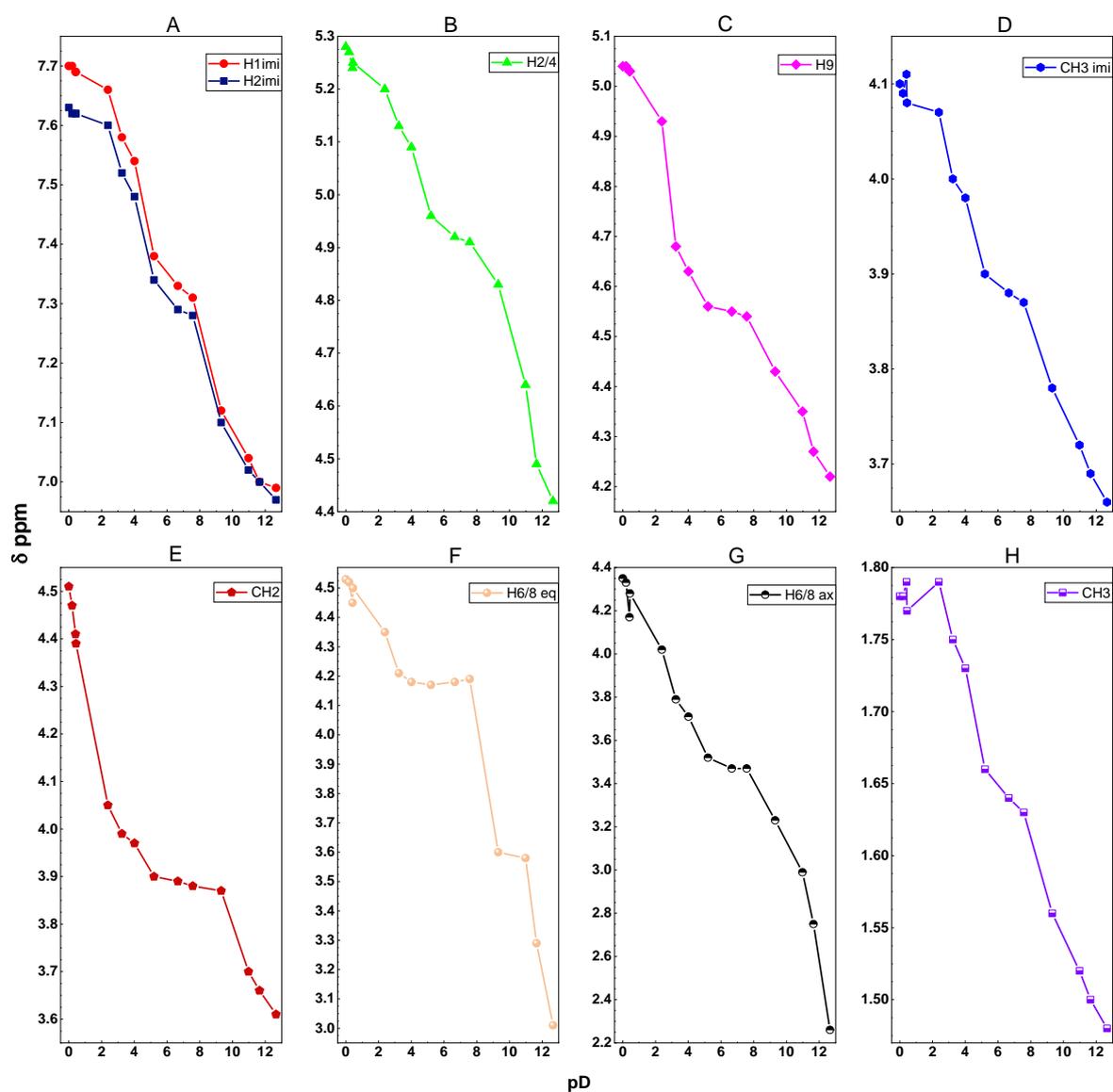


Figure 147 : Déplacement chimique des signaux de L5 en fonction du pD.

iii. Titration et caractérisation de $[Zn^{II}L4]$

a. Titration

Ce titrage a été fait dans le but d'assigner plus précisément la constante de protonation mesurée par potentiométrie à 7,8(1) (Figure 148). À la suite du titrage RMN proton du complexe nous nous sommes rendu compte que dans la même région ($6,13 \leq pD \leq 8,05$) plusieurs signaux deviennent non équivalents et le reste après $pD = 8,05$. Il était donc clair pour nous que la constante mesurée par potentiométrie n'était pas liée à une hydrolyse du métal mais bien un changement qui s'est opéré au sein du complexe (Figure 148).

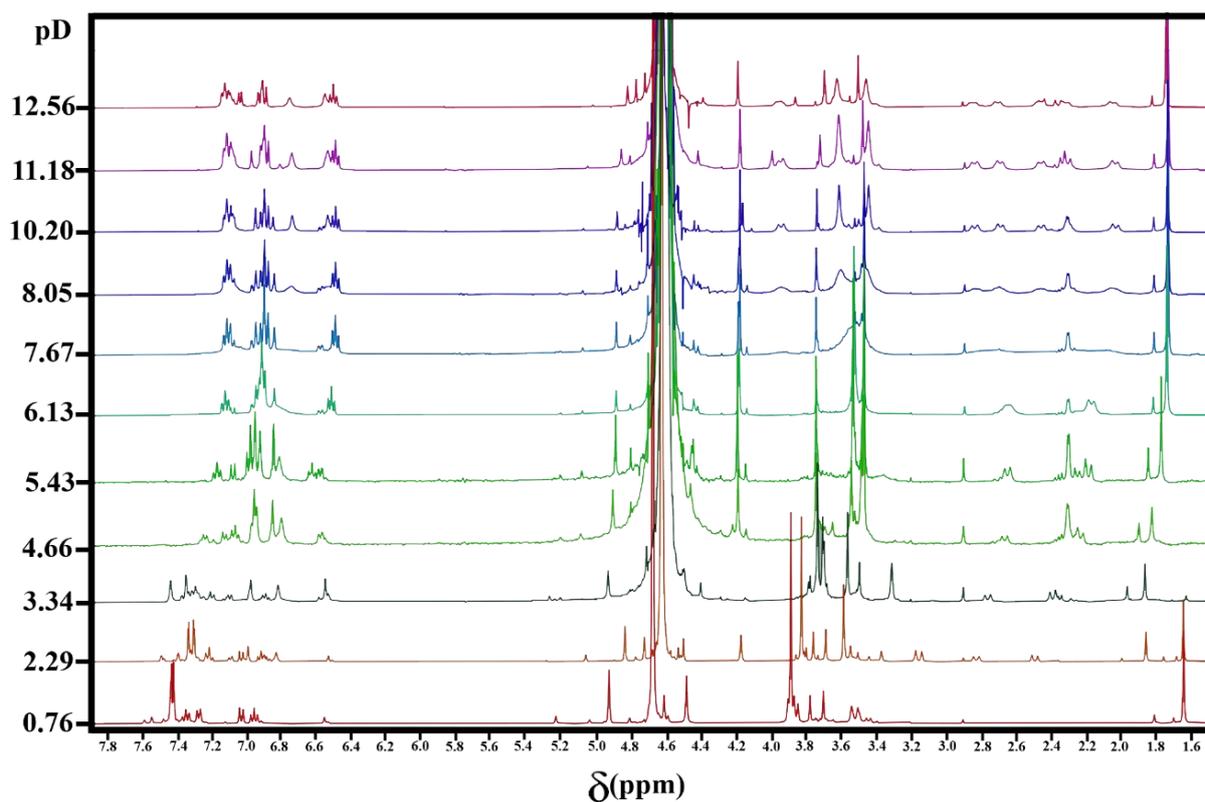


Figure 148 : Titration RMN 1H de $[Zn^{II}L4]$ en fonction du pD (D_2O ; 400 MHz ; $25^\circ C$; $c = 28,3$ mM). Référence : acétone

Le point d'inflexion le plus simple à analyser pour ce titrage est à $pD = 3,5(2)$ soit $pH = 3,2(2)$. Il est observé sur les courbes des protons $H_{1/2imi}$, CH_{3imi} , CH_2 , $H^{6/8}_{ax}$, $H^{6/8}_{eq}$ et CH_3 . Il est en parfait accord avec la constante de protonation obtenue par potentiométrie à 3,17(6) que nous avons attribué à un acide carboxylique (Figure 149).

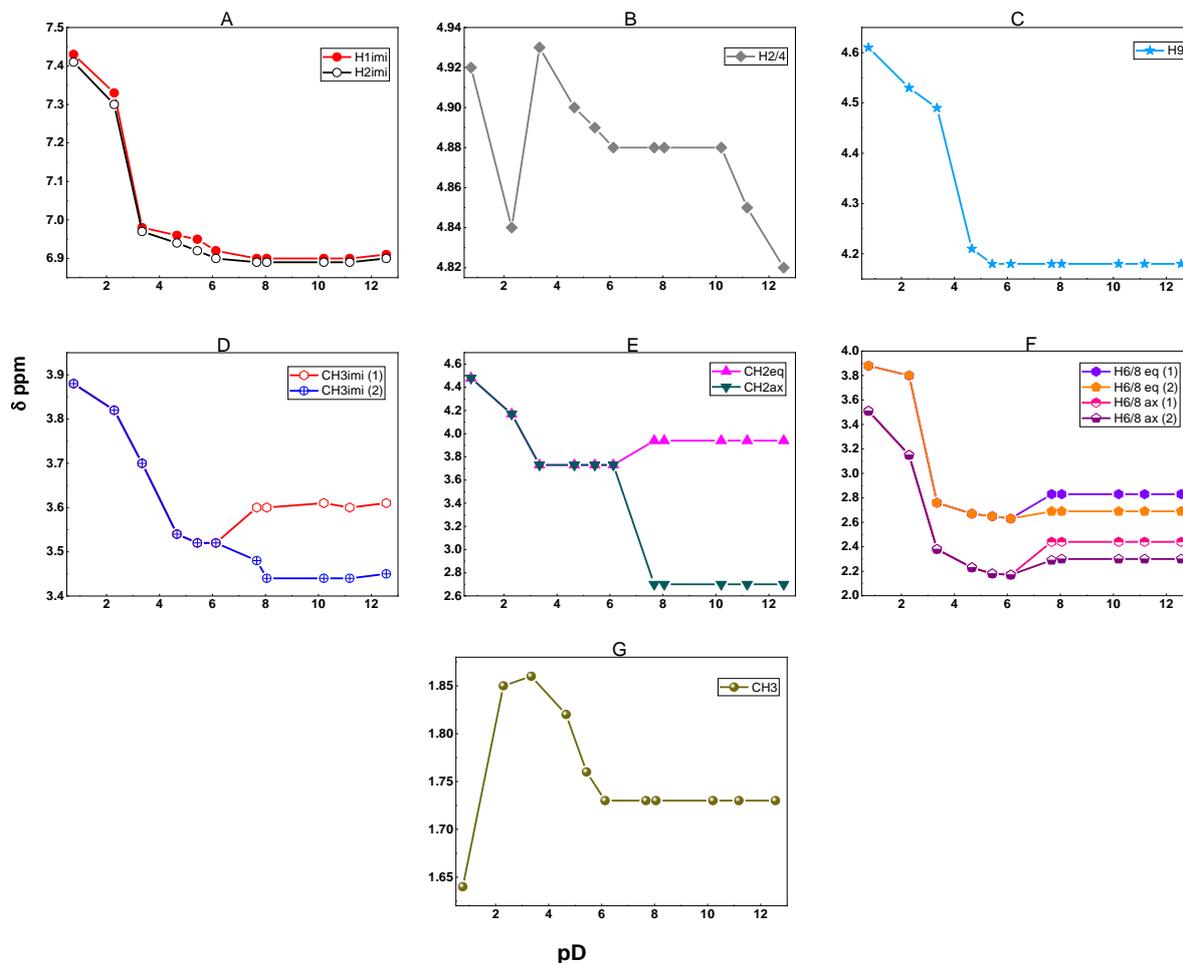


Figure 149 : Déplacement chimique des signaux de $[Zn^{II}L4]$ en fonction du pD

A pD = 7,8 (soit pH = 7,4), on remarque que les signaux CH_{3imi} , CH_2 et $H^{6/8}_{ax}$ et $H^{6/8}_{eq}$ ne sont plus équivalents. On en déduit que la déprotonation induit une rupture de symétrie du complexe et il est possible que cette dissymétrie soit induite par la déprotonation et la coordination du phénolate ou par la déprotonation d'un cycle 1-méthylimidazole comme précédemment observé pour le ligand **L5**. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons regardé très en détail la région aromatique afin d'y voir une variation quelconque pouvant nous mettre sur une piste (Figure 150). En fixant la valeur de l'intégrale des protons méthyliques en N3 à 3, nous pouvons noter que la valeur globale des intégrales dans la région aromatique est constante et prend une valeur de 8.7(6), ce qui est en très bon accord avec les 8 protons aromatiques attendus. De plus, nous observons l'apparition progressive d'un signal à 6.75 ppm, qui pourrait correspondre à un proton du cycle phénolate ou du cycle imidazolate (Figure 150). Enfin, la constante mesurée par RMN à pH = 7,4 est en bon accord avec la valeur de pH = 7,8(1) obtenue par potentiométrie et a été attribuée au phénolate. On remarque également que le CH_3 lié à N3 ne subit aucune variation dans toute cette gamme. Une assignation complète des signaux à pD = 12.6 a pu être réalisée.

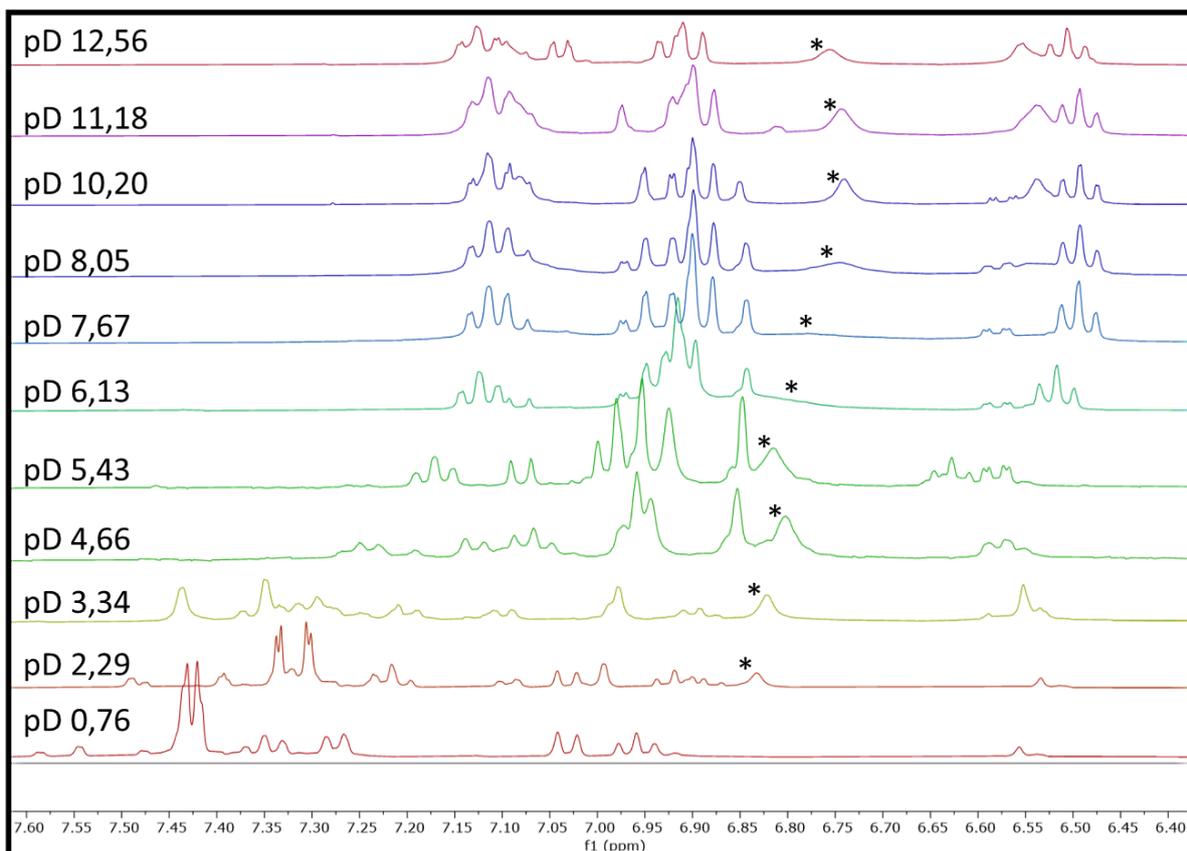
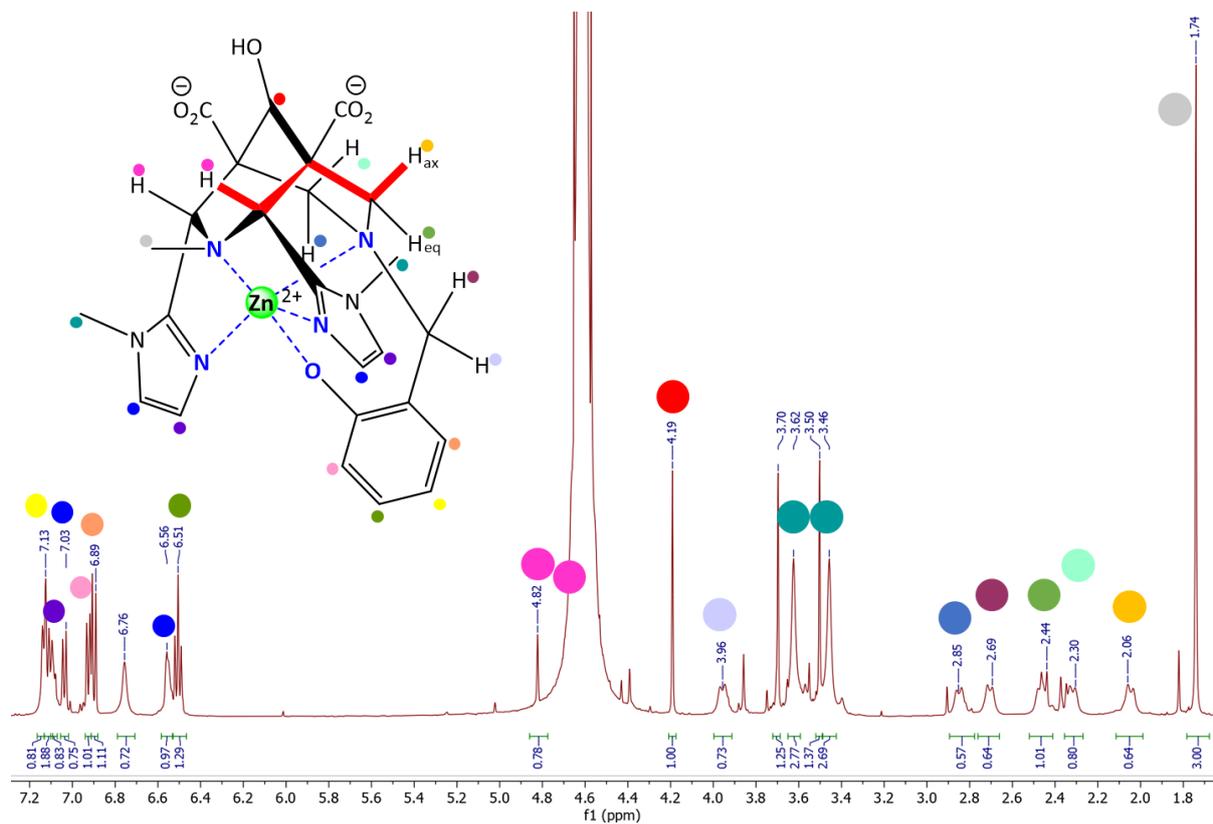


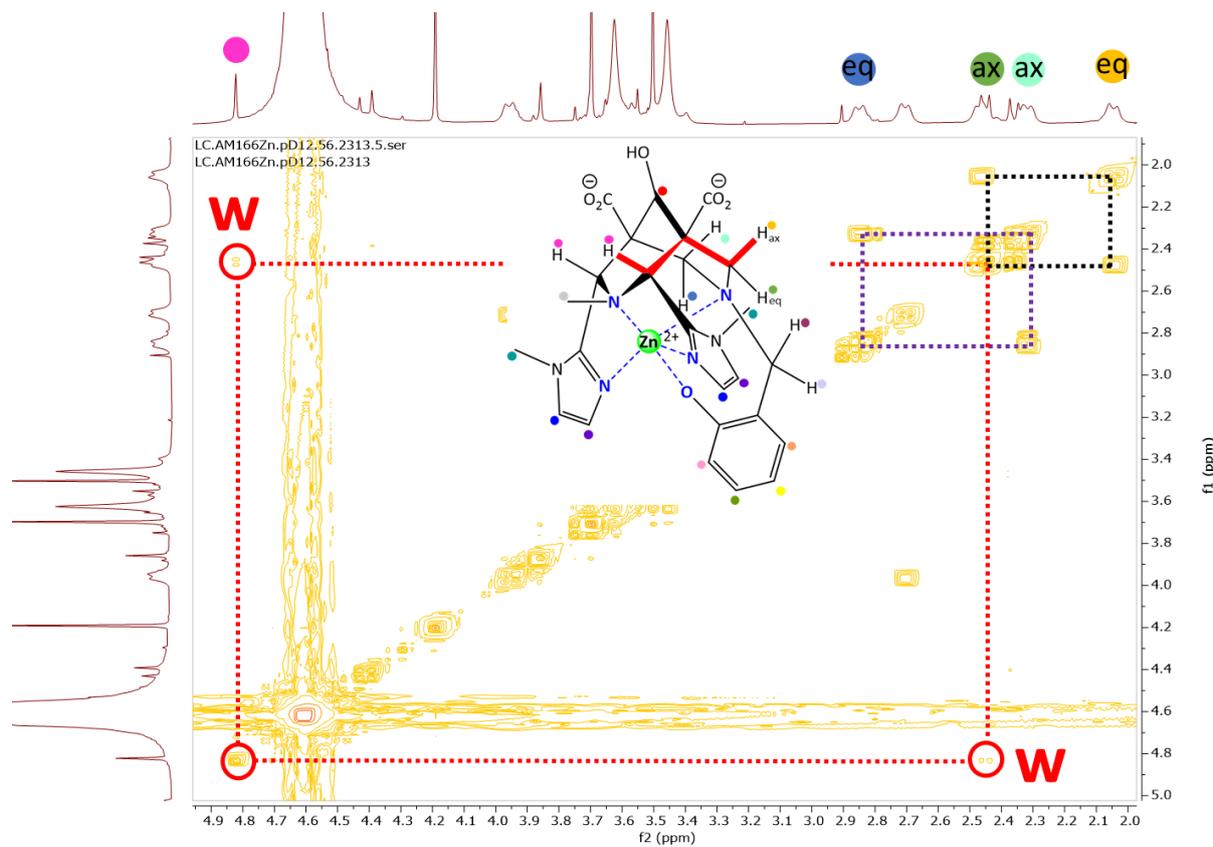
Figure 150 : Agrandissement de la région des aromatiques du titrage de $[Zn^{II}L4]$. * Signal lié au phénol. Référence : acétone

b. Caractérisation

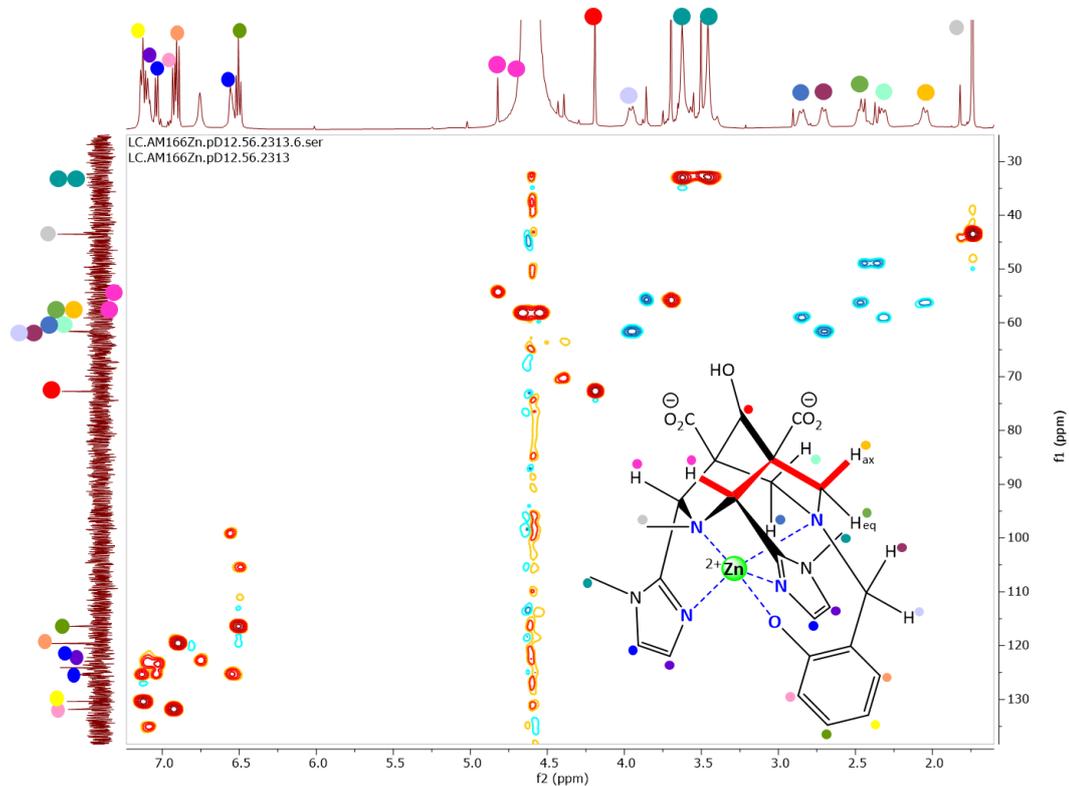
La caractérisation complète des signaux a été effectuée par RMN COSY et HSQC (Spectre 21, Spectre 22 et Spectre 23). Le couplage W entre $H^{6/8}_{ax}$ et $H^{2/4}$ nous permet de dire que le complexe en forme chaise-chaise (Spectre 22).



Spectre 21 : RMN 1H de $[Zn^{II}L4]$ (pD 12,56 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; c = 28,3 mM).



Spectre 22 : Couplage W en RMN COSY 1H - 1H de $[Zn^{II}L4]$ (pD 12,56 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; c = 28,3 mM).



Spectre 23 : HSQC de $[Zn^{II}L4]$ (pD 12,56 ; D_2O ; 500 MHz ; $25^\circ C$; $c = 28,3$ mM). On peut voir sur le spectre la présence d'une seconde espèce minoritaire que nous n'avons pas dépouillé car certains pics sont confondus avec ceux du complexe majoritaire (l'espèce minoritaire pourrait être une petite quantité de ligand).

iv. Titrage et caractérisation de $Zn^{II}L5$

a. Titrage

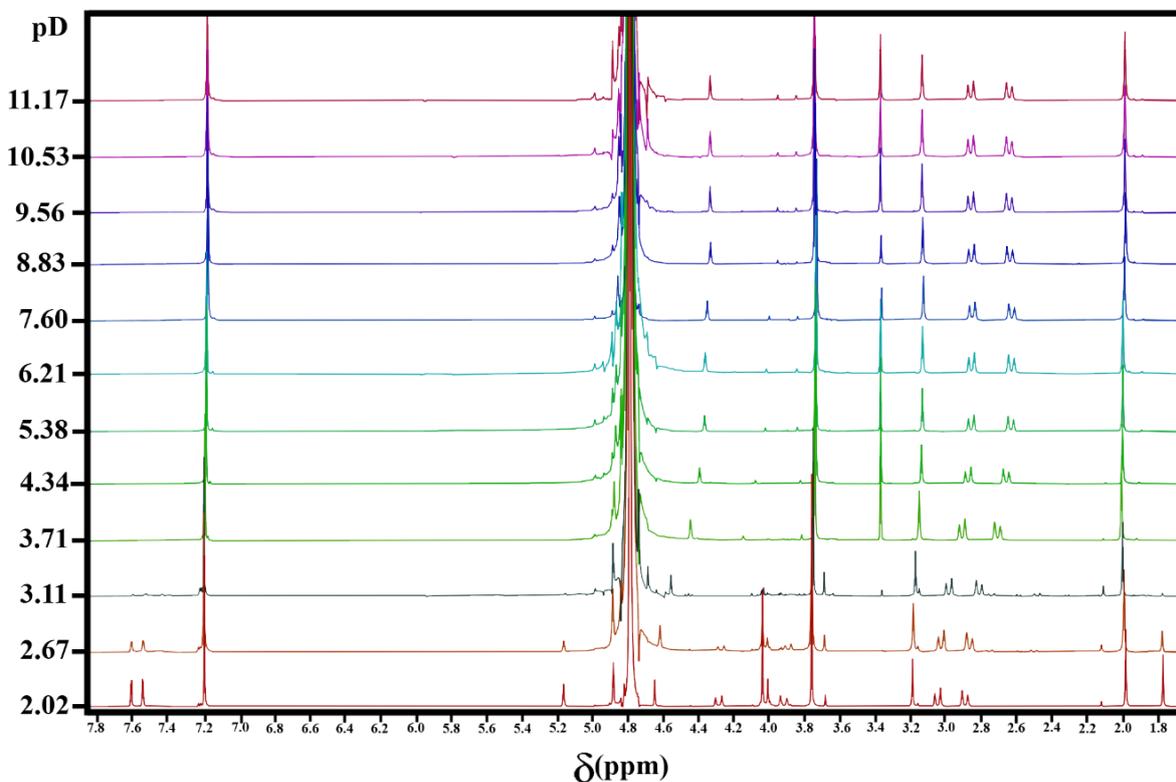


Figure 151 : Titration RMN 1H de $[Zn^{II}L5]$ en fonction du pD (D_2O ; 400 MHz ; $25^\circ C$; $c = 25,0$ mM). Référence : acétone

Pour ce titrage, le ligand a été dissout dans D₂O puis le pD a été ajusté à 2,02 avant d'ajouter le métal. Dans le cas du complexe **[Zn^{II}L5]**, on remarque par RMN ¹H qu'à pD 2,02 il y a plus de 65% du complexe final qui est formé (Figure 151). Cela confirme les résultats obtenus via le titrage potentiométrique avec une constante thermodynamique estimée à $\log K_{MnL5} = 27,2$. Une estimation de la distribution des espèces peut être obtenue. De plus, une analyse comparative des spectres RMN ¹H du ligand et du complexe à pD = 2,0 et 7,6 indique l'absence de ligand et la formation d'un complexe sous deux états de protonation majoritaires (Figure 152).

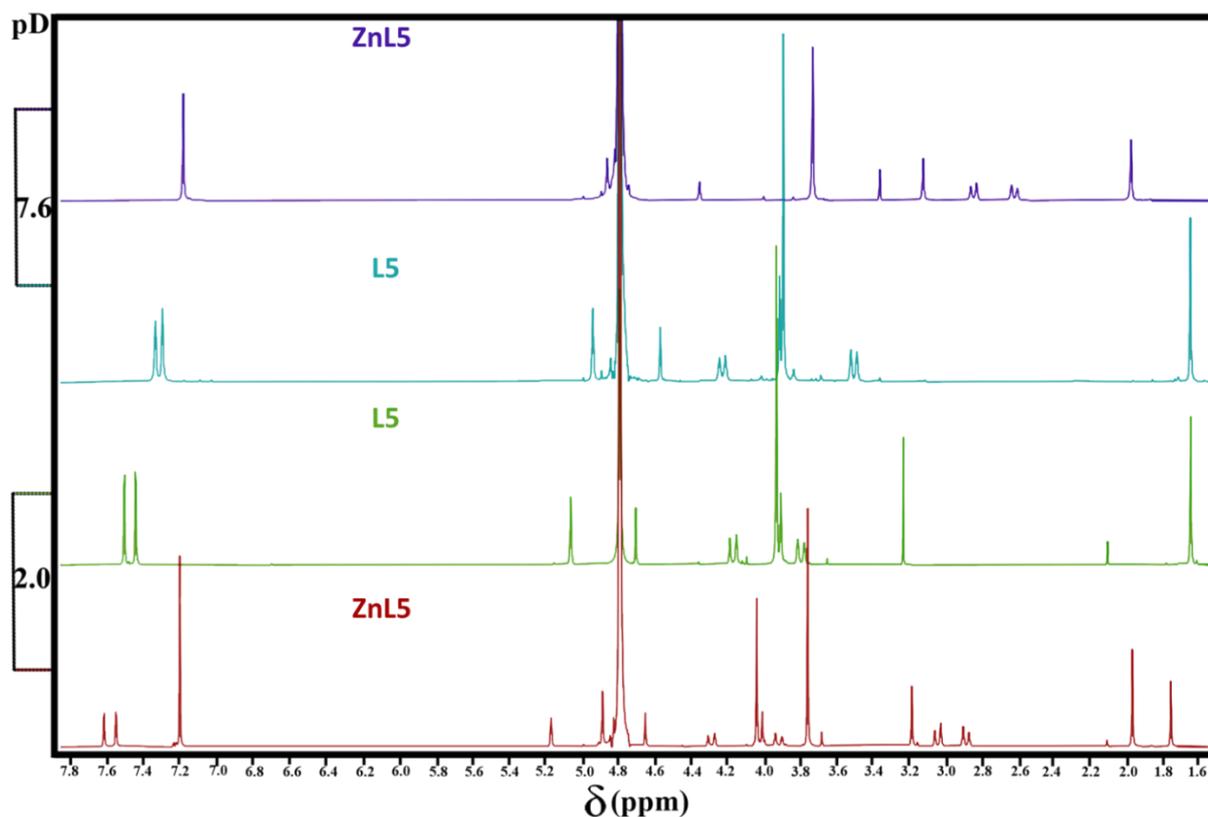


Figure 152 : Spectre RMN de **[Zn^{II}L5]** et **L5** à pD 7,6 et 2,0. Référence : acétone

Les variations de déplacement chimiques des signaux observées sont très faibles (Figure 153).

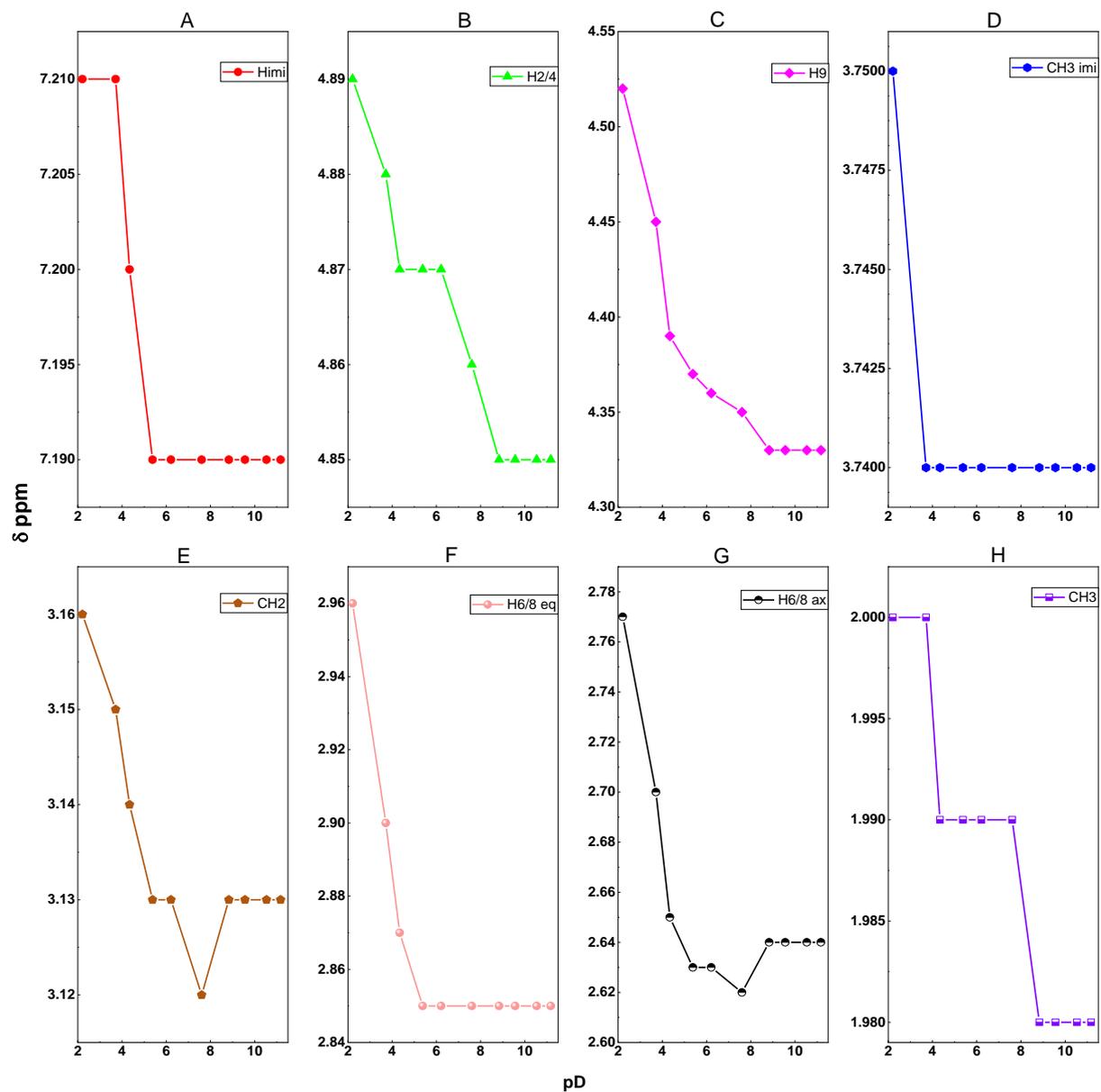
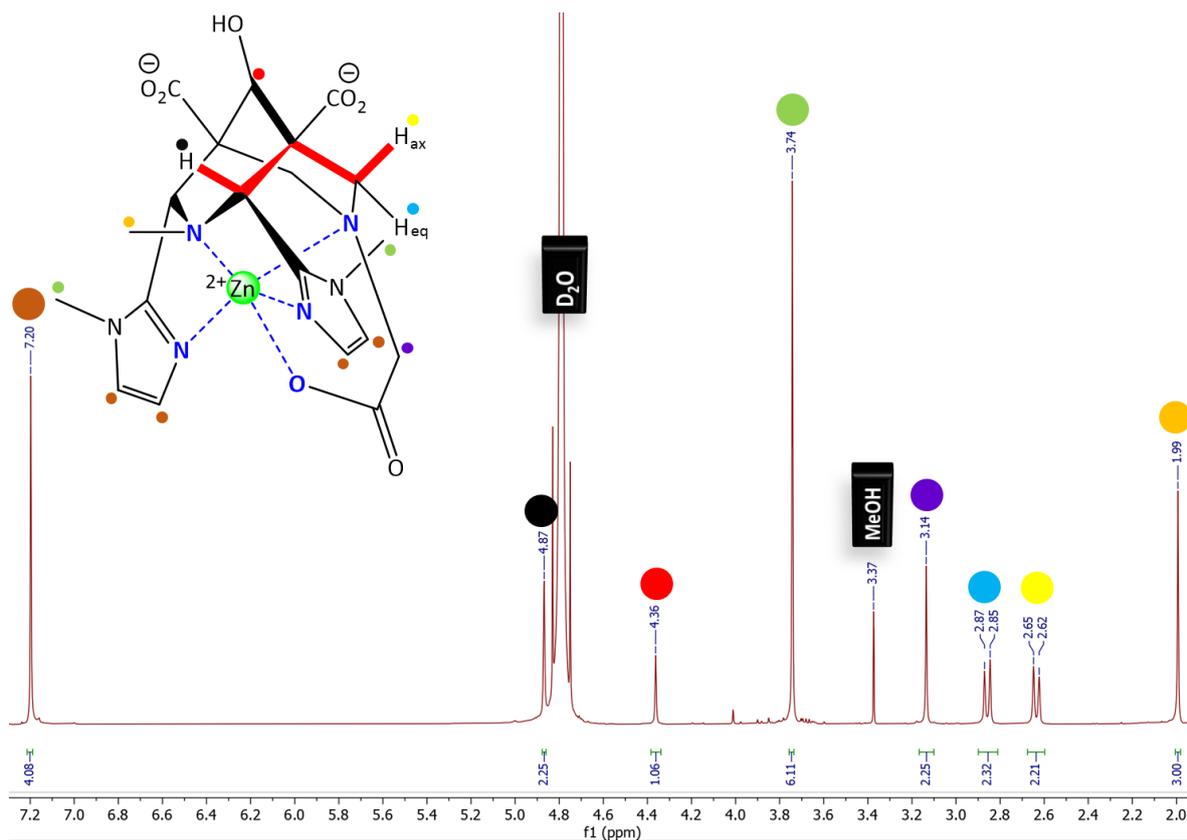


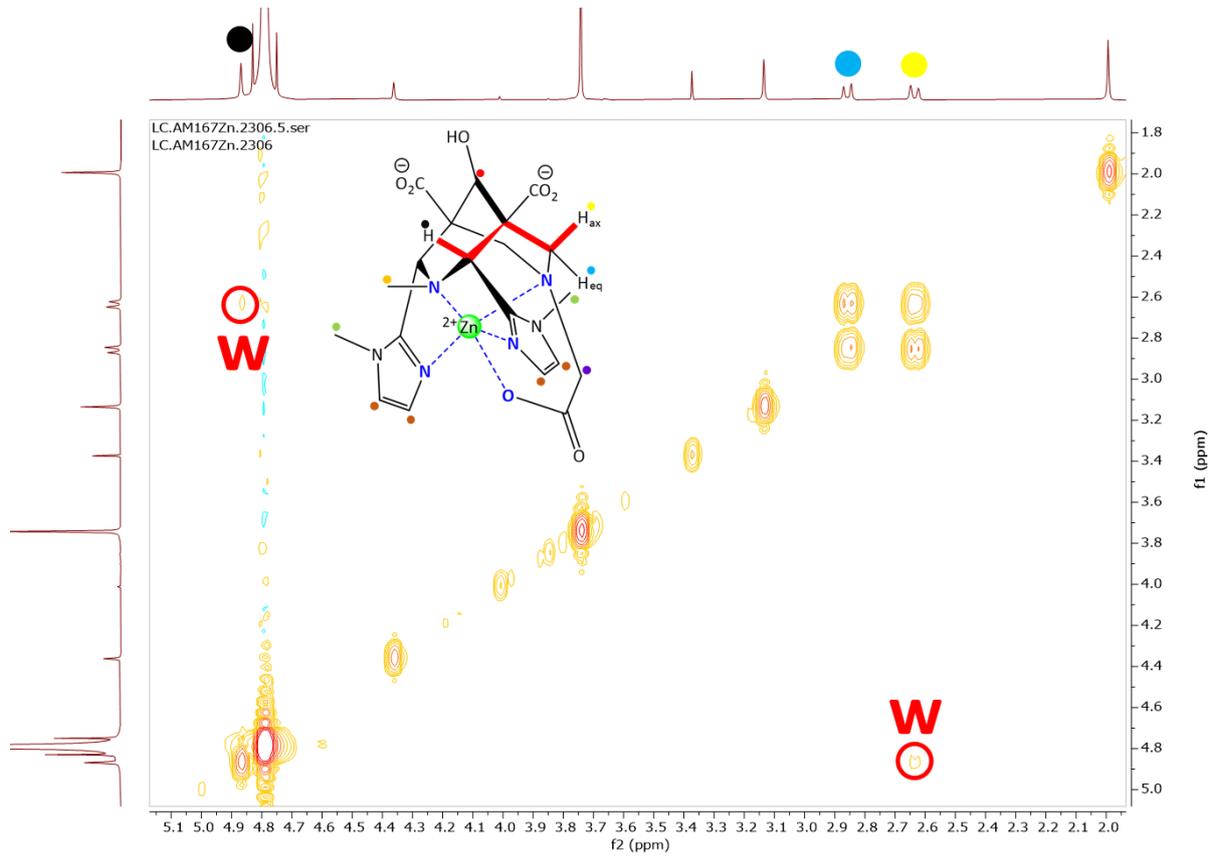
Figure 153 : Déplacement chimique des signaux de $[Zn^{II}L5]$ en fonction du pD.

b. Caractérisation

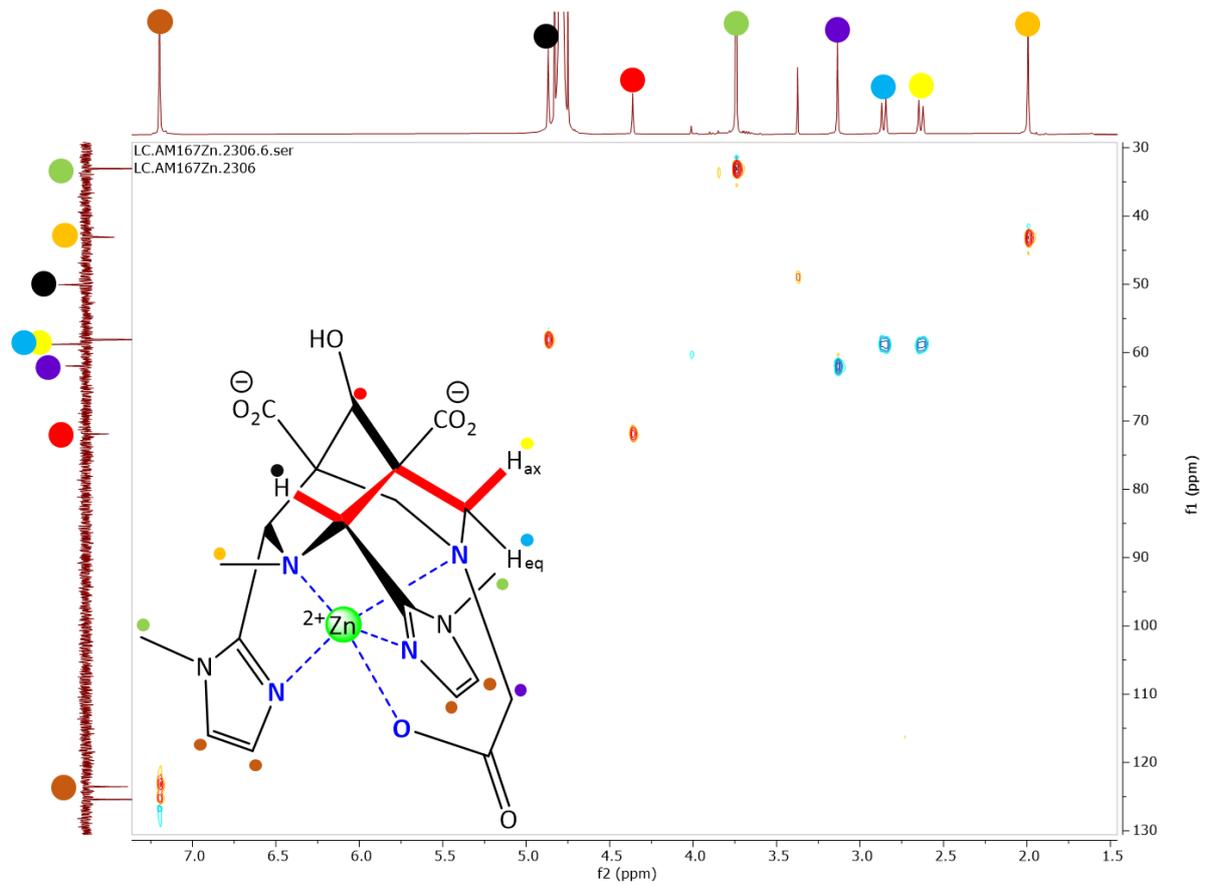


Spectre 24 : RMN 1H de $[Zn^{II}L5]$ (pD 11,17 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; c = 25,0 mM).

La caractérisation complète des signaux a été effectuée (Spectre 24). Le couplage W entre $H^{6/8}_{ax}$ et $H^{2/4}$ nous permet de dire que le complexe est en forme chaise-chaîe (Spectre 25), la HSQC du système est très simplifiée nous permettant de confirmer tous les signaux (Spectre 26).



Spectre 25 : Couplage W en RMN COSY ^1H - ^1H de $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{L5}]$ (pD 11,17 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; $c = 25,0 \text{ mM}$).



Spectre 26 : HSQC de $[\text{Zn}^{\text{II}}\text{L5}]$ (pD 11,17 ; D_2O ; 500 MHz ; 25°C ; $c = 25,0 \text{ mM}$).

v. Récapitulatif des constantes thermodynamiques

Tableau 21 : Récapitulatif des constantes thermodynamiques déterminées par diverses techniques : violet = potentiométrie, rouge = spectroscopie d'absorbance UV-visible, en vert = RMN ¹H et en rose = relaxométrie.

	L3	L4	L5	
logK _{H1}	11,45(2) ^[a]	12,06(3) ^[a] 11,8 ^[d]	11,26(1) ^[a]	[a] : I = 0,15 mM (NaCl) ; c = 2 mM ; T = 25°C.
logK _{H2}	9,51(3) ^[a] 9,352(8) ^[b]	9,81(5) ^[a] 9,45 ^[d]	10,13(1) ^[a] 10,1 ^[f]	[b] : I = 0,1 mM (NaCl) ; c = 0,1 mM ; T = 25°C (22°C dans le cas de MnL) ; 2% MeOH. [c] : I = 0,1 mM (NaCl) ; c = 0,8 mM ; T = 22°C ; 16% MeOH.
logK _{H3}	3,93(4) ^[a] 3,55(1) ^[b]	4,78(7) ^[a]	7,99(1) ^[a] 7,6 ^[f]	[d] : c = 22,7 mM ; T = 25°C ; 400 MHz ; D ₂ O. [e] : c = 28,3 mM ; T = 25°C ; 400 MHz ; D ₂ O.
logK _{H4}	2,26(4) ^[a]	2,32(7) ^[a] 2,0 ^[d]	4,43(1) ^[a]	[f] : c = 25,0 mM ; T = 25°C ; 400 MHz ; D ₂ O.
logK _{H5}	-	-	2,91(2) ^[a] 2,6 ^[f]	[g] : c _M = c _L = 10 ⁻⁵ M ; pH 7,4.
ΣlogK _{Hi}	25,1	29,0	36,7	[h] : I = 0,15 mM (NaCl) ; r ₁ ; 60 MHz ; T = 25°C ; c = 1,86 mM.
logK _{MnL}	16,2(1) ^[b] 14,9(2) ^[h]	17,28(3) ^[a] 17,8(2) ^[c]	20,1(1) ^[a]	
logK _{MnHL}		4,50(4) ^[a] 6,1(1) ^[c]	4,6(1) ^[a]	
logK _{MnH2L}	-	3,82(2) ^[a] 4,9(1) ^[c]	3,8(1) ^[a]	
logK _{ZnL}	18,47(5) ^[b]	15,40(1) ^[a]	27,2(3)	
logK _{ZnHL}	4,31(4) ^[b]	7,8(1) ^[a] 7,4 ^[e]	3,4(3) ^[a]	
logK _{ZnH2L}	-	3,17(6) ^[a] 3,2 ^[e]	2,9(3)	
pMn ^[g]	7,52	7,6	8,9	
pZn ^[g]	8,66	7,0	12,5	

IV. Etude relaxométrique et inertie cinétique de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$

A. Inertie cinétique

Comme pour $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$, les mesures ont été faites à différents pH avec 50 équivalents de Zn^{II} . La dissociation du $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ a été suivie par relaxométrie à différents pH dans le temps. Ici, on est en présence d'une pseudo équation du premier ordre pour la dissociation du complexe. A 50 équivalents de Zn^{II} à pH 3 et 4, la dissociation est bien trop rapide pour pouvoir faire des ajustements des courbes. Dans le cas de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$, nous avons étudié la cinétique de complexation à pH 5 et 6 (Figure 154). A pH 5 pour $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$, on mesure des temps de demi-vie respectivement de 14 min et 1,4 min. A pH 6 pour $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$, on mesure des temps de demi-vie respectivement de 2,12 h et 5,75 min.

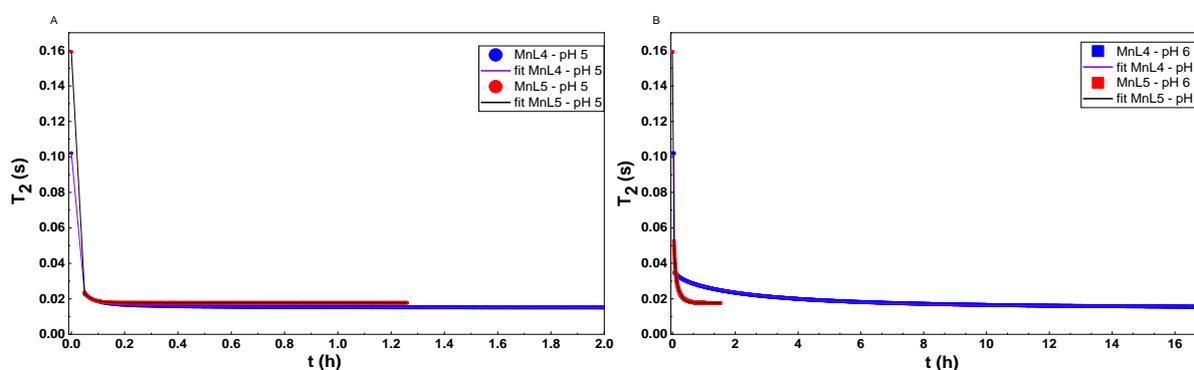


Figure 154 : Variation du temps de relaxation transversale de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ ($c = 1,1 \text{ mM}$; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl) ; 37°C ; 60 MHz) en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn^{II} . pH 5 : tampon N-méthyle pipérazine – 50 mM ; pH6 : MES – 50 mM. Les points correspondent aux valeurs expérimentales et les courbes aux ajustement mathématiques des données expérimentales. (A) pH 5 et (B) pH 6.

Le point le plus important à souligner est l'importance des pyridines dans l'inertie cinétique de ces systèmes. En effet, à pH 6 en présence de 50 équivalents de Zn^{II} la substitution des pyridines par les 1-méthylimidazoles divise l'inertie cinétique par 10. Dans ces mêmes conditions $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ à un temps de demi-vie $t_{1/2} = 20,3 \text{ h}$ tandis que $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ présente un temps de demi-vie $t_{1/2} = 2,12 \text{ h}$. Nous avons vu précédemment que $\text{H}_3\text{L5}$ est très affiné du Zn^{II} avec sa très forte stabilité thermodynamique. Ce qui confirme la très forte affinité du 1-méthylimidazole au Zn^{II} par rapport à la pyridine.

Tableau 22 : Constante de vitesse de pseudo-premier ordre (k_{obs}) et temps de demi-vie de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ ($c_{\text{complexe}} = 1,1 \text{ mM}$; $I = 0,1 \text{ M}$ NaCl ; 37°C ; 60 MHz) en fonction du temps, en présence de 50 équivalents de Zn^{II} . pH 5 : tampon N-méthyle pipérazine – 50 mM ; pH6 : MES – 50 mM.

$[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$		$[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$	
$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1}) / t_{1/2}$			
pH 5		pH 6	
$8,24 \cdot 10^{-4} / 14 \text{ min}$	$9,09 \cdot 10^{-5} / 2,12 \text{ h}$	$8,25 \cdot 10^{-3} / 1,4 \text{ min}$	$2,01 \cdot 10^{-3} / 5,75 \text{ min}$

Les temps de demi-vie de $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$ sont assez bas par rapport à différentes bispidine où l'on n'observe pas de dissociation à pH 6 avec 50 équivalents de zinc à 37°C (Tableau 23 et Figure 155).

Tableau 23 : Temps de demi-vie des différents complexes de manganèse avec 50 équivalents de zinc, pH 6 à 37°C. pdd : pas de dissociation.

	MnL3	MnL4	MnL5	MnL _{lys} ^[88]	MnL _{carbo} ^[91]	MnL _{phosp} ^[91]	MnPyC3A ^[81]	MnPC2A-EA ^[83]
t _{1/2}	20,3h	2,12h	6 min	pdd	pdd	pdd	17,1 min	54,4h

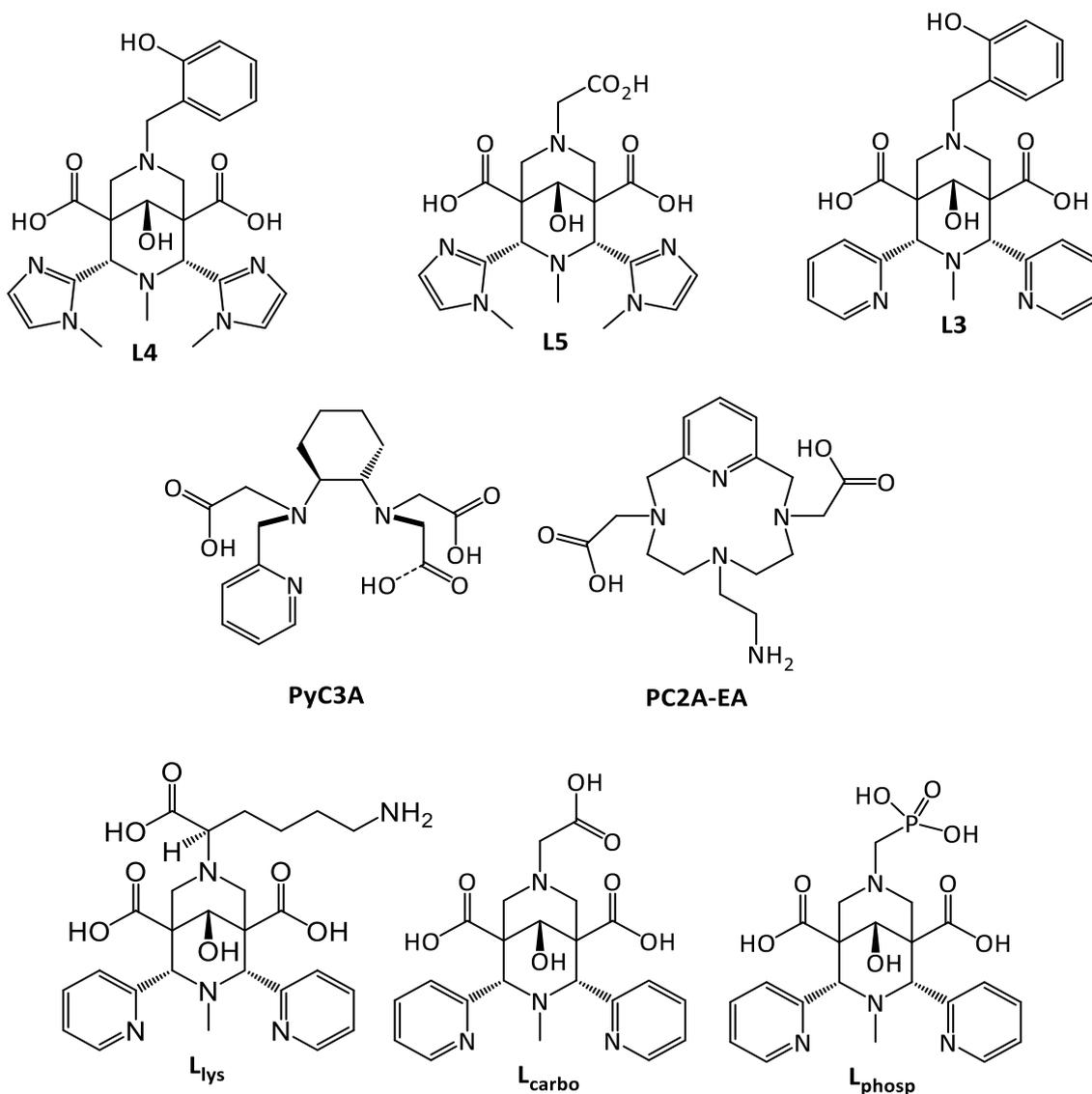


Figure 155 : Ligands de comparaison.

B. Relaxométrie

i. Mesure relaxivité

A 60 MHz, pH 7 et 25°C : la relaxivité longitudinale de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ est de $3,90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ très similaire à $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ avec $r_1 = 3,91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. La différence de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$ par rapport à $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ est la substitution du cycle pyridine par le cycle 1-méthylimidazole au vu de leur relaxivité on peut conclure que ces cycles ne modifient pas intrinsèquement le système.

A 60 MHz, pH 7 et 25°C : la relaxivité de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ est de $3,39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, celle-ci est plus faible par rapport à celle de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$. En effet, on sait que le temps de relaxation corrélationnel (τ_c) à une forte influence sur la relaxivité et est liée au poids moléculaire. La différence de poids moléculaire entre $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ est de 48, ce qui peut expliquer cette différence de relaxivité.

ii. Mesure oxygène 17

Dans le cas de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ $r_{2\text{max}}^{\circ} = 309 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, en appliquant l'équation 11 on a $q = 0,60(2)$. Concernant $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ $r_{2\text{max}}^{\circ} = 331,34 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ soit $q = 0,65(2)$ (Figure 156). La première chose qui ressort en analysant l'allure des points de temps de relaxation longitudinaux des deux complexes est que l'échange de molécules d'eau est plus rapide dans le cas de $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$ par rapport à $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$. Nous avons été très surpris de mesurer moins d'une molécule d'eau pour les deux complexes, en prenant en compte que les deux ligands ne sont que pentadentates. En effet, il est possible que les deux complexes présentent probablement un mélange d'espèces hydratées et non hydratées. Il sera donc difficile de réaliser un ajustement correct de ces données expérimentales car nous ne sommes pas en mesure de connaître la proportion des différentes espèces à chaque température.

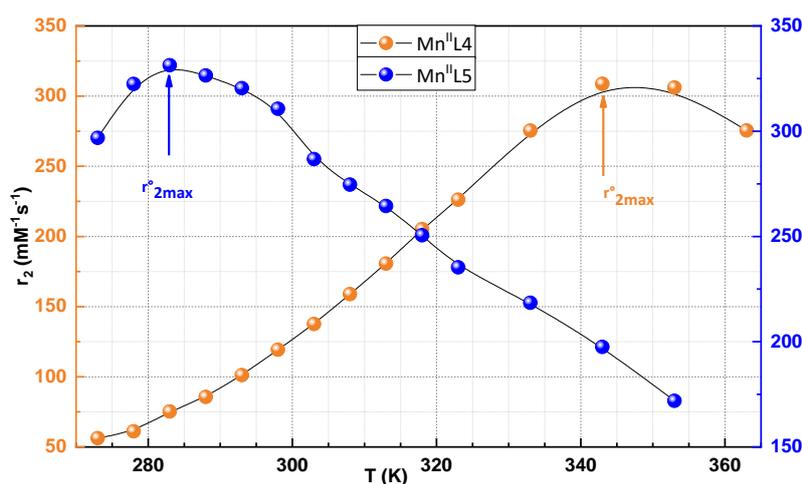


Figure 156 : Mesure de la relaxivité transversale de l'oxygène 17 en fonction de la température. $I = 0,15 \text{ M (NaCl)}$; $c_{\text{MnL4}} = 3,80 \text{ mM}$; $c_{\text{MnL5}} = 4,05 \text{ mM}$.

iii. Mesure profil NMRD

Les profil NMRD présentent une allure classique pour des complexes de petite taille, caractéristique du Mn^{II} . La relaxivité du complexe diminue en passant de 25°C à 37°C. Ceci démontre

que la relaxivité est limitée par le temps de rotation corrélacionnelle (τ_r) du complexe et non par la vitesse d'échange de la molécule d'eau dans la première sphère de coordination (Figure 157).

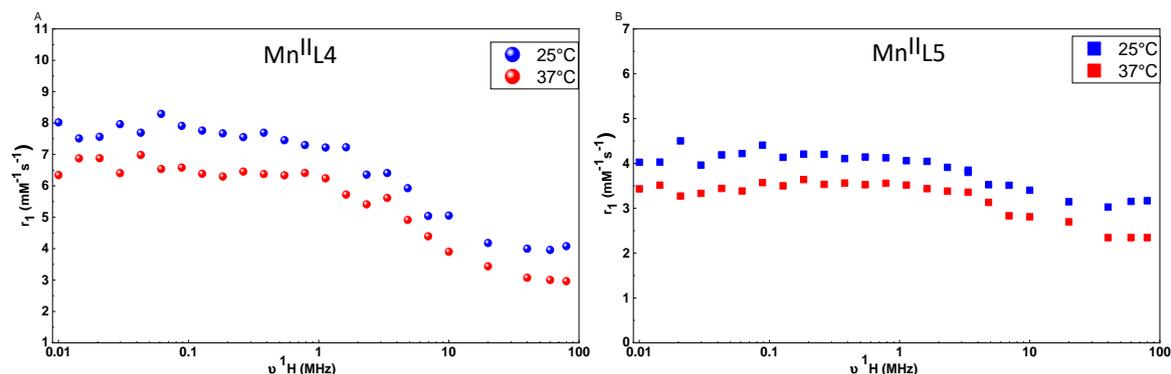


Figure 157 : Mesure du profil NMRD de Mn^{II} à 25°C et 37°C. $I = 0,15 M (NaCl)$; (A) $c_{MnL4} = 1,1 mM$ et (B) $c_{MnL5} = 1,2 mM$.

V. Potentiel redox et stabilité thermodynamique de $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$

Les potentiels redox de ces deux complexes ont aussi été mesurés dans les mêmes conditions que $[Mn^{II}L3]$.

A. Etude voltampérométrique de $[Mn^{II}L4]$

Dans le cas de $[Mn^{II}L4]$, le potentiel redox est de $E_{1/2} = 329 mV$ vs SCE avec un potentiel de réduction $E_{red} = 260 mV$ et un potentiel d'oxydation $E_{ox} = 397 mV$. Le $\Delta E = 137 mV$. On a donc un système quasi-réversible (Figure 158-A/B).

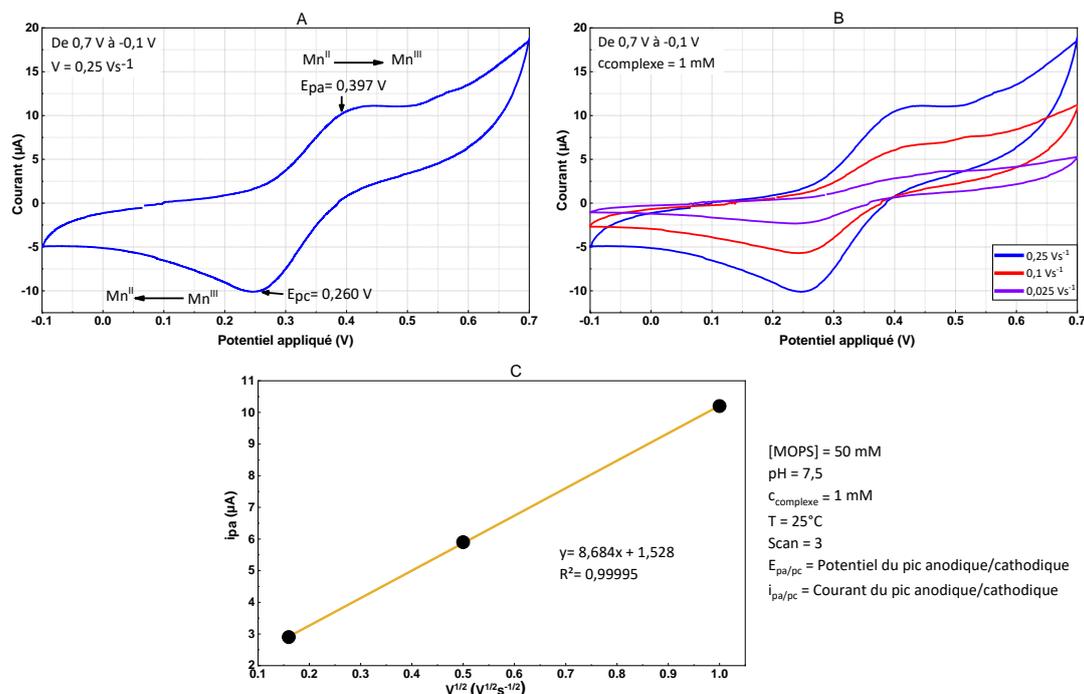


Figure 158 : (A) Voltampéromogramme enregistré pour $[Mn^{II}L4]$. (B) Voltampéromogramme enregistré pour $[Mn^{II}L4]$ à différentes vitesses de balayage. (C) Influence de la vitesse de balayage puissance 1/2 sur i_{pa} .

En traçant i_{pa} en fonction de la vitesse de balayage on a une linéarité confirmant réversibilité du système (Figure 158-C).

B. Etude voltampérométrique de $[Mn^{II}L5]$

Dans le cas de $[Mn^{II}L5]$, le potentiel redox est de $E_{1/2} = 311$ mV vs SCE avec un potentiel de réduction $E_{red} = 169$ mV et un potentiel d'oxydation $E_{ox} = 452$ mV. Le $\Delta E = 283$ mV. On a donc un système irréversible (Figure 159).

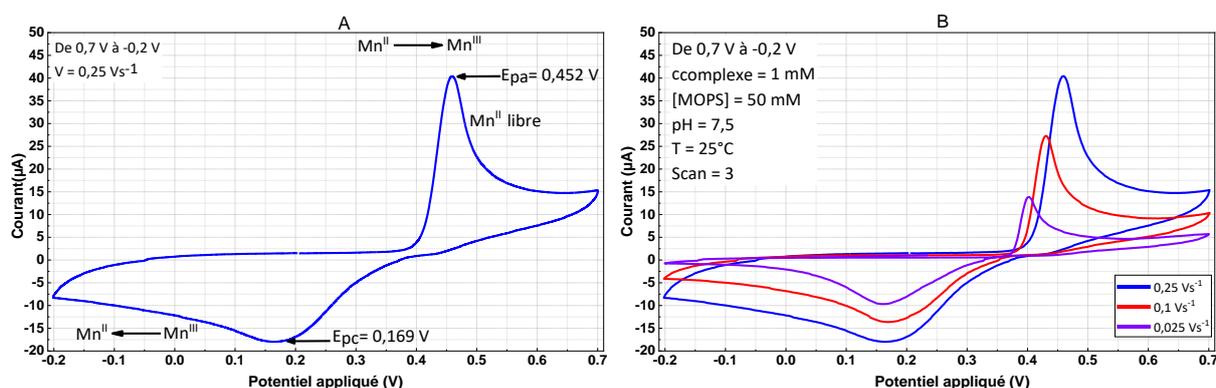


Figure 159 : (A) Voltampérogramme enregistré pour $[MnL5]$. (B) Voltampérogramme enregistré pour $[MnL5]$ à différentes vitesses de balayage.

Dans le cas de $[MnL5]$, on observe un phénomène similaire à $[MnL3]$ avec le relargage de manganèse (III) libre dans le milieu durant les cycles d'oxydation-réduction. Dans ce cas, 55,2% de manganèse (III) est relargué au bout de 3 cycles, soit environ 20% de manganèse relargué par cycle. Il s'agit ici du système le moins inerte de la série, ce résultat ne nous a donc pas surpris.

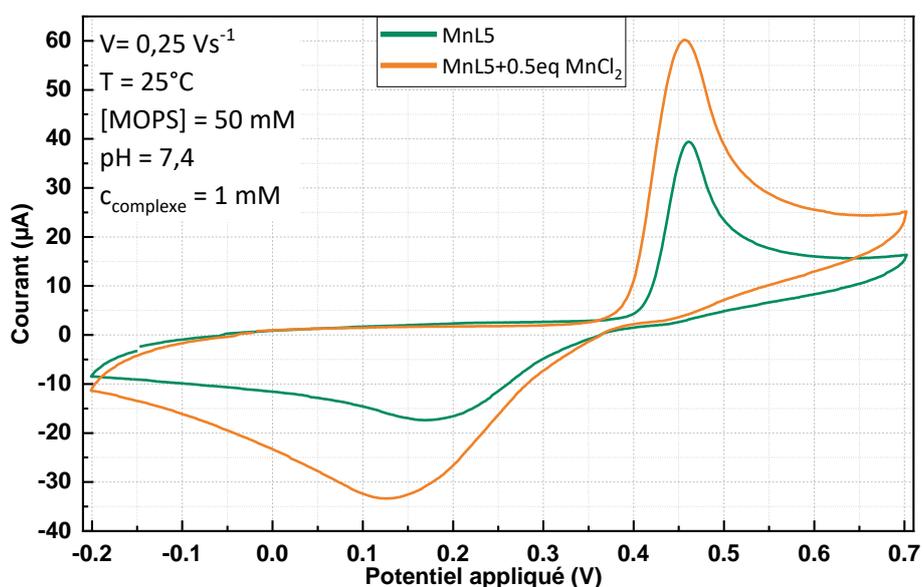


Figure 160 : Voltampérogramme de $[MnL5]$ avec et sans ajout de 0,5 équivalent de $MnCl_2$.

C. Stabilité thermodynamique théorique de $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$

A partir de ces potentiels redox et connaissant la constante de stabilité des complexes de Mn^{II} nous avons calculé la stabilité théorique du complexe de Mn^{III} via les équations 12 et 13 (Tableau 24).

Cette stabilité théorique peut être comparée à diverses stabilités déterminée pour d'autres complexes de manganèse existant dans la littérature tels que : $[Mn(JED)]$,^[134] $[Mn(HBED)]$,^[134] $[Mn(EDTA)]$,^[225] $[Mn(HBET)]$,^[136] $[Mn(CyHBET-NO_2)]$,^[136] $[Mn(NOTA)]$,^[226] $[Mn(15-pyN_3O_2)]$,^[227] $[Mn(15-pyN_5)]$,^[227] $[Mn1]$ ^[166] ou encore $[Mn1C]$.^[170] Les données ont été regroupées dans le Tableau 24 où l'on peut voir que $[MnL4]$ et $[MnL5]$ sont plutôt bien placés par rapport à différents complexes existants que ce soient des chaînes linéaires ou macrocycliques (Figure 161).

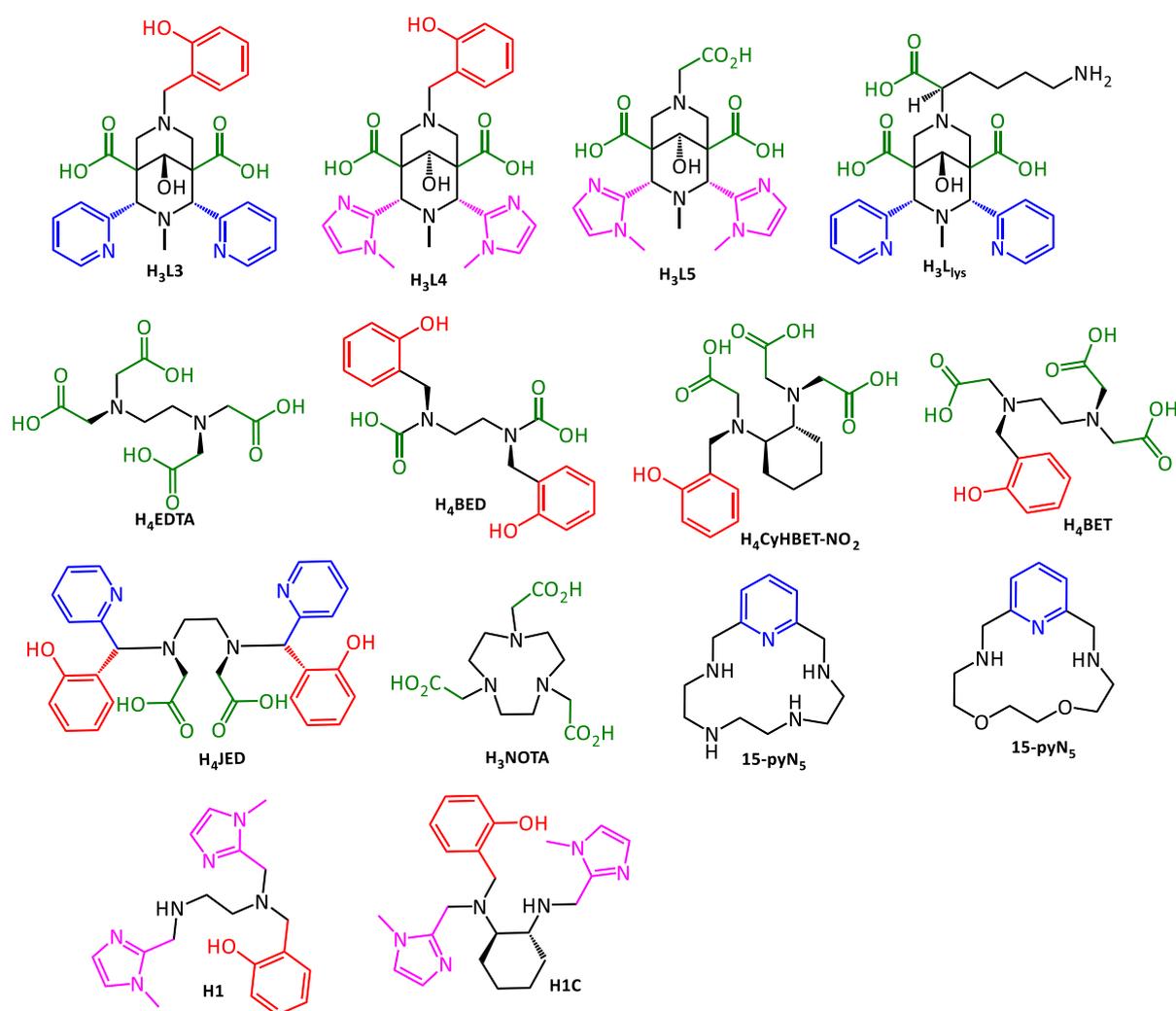


Figure 161 : Ligands discutés.

Tableau 24 : Comparatif des potentiels redox et des stabilités thermodynamiques de différents complexes de Mn^{II/III} par rapport à différents complexes de manganèse existants à chaîne linéaire et macrocyclique.

Mn complexe	E _{1/2} (V vs SCE)	Système redox	Mn ^{II} logK	Mn ^{III} logK
[Mn(HBED)]	-0,091	Irréversible	6,3	29,4
[Mn1C]	0,17	Réversible	-	-
[Mn1]	0,21	Réversible	-	-
[Mn(HBET)]	0,219	Irréversible	8,0	25,7
[Mn(JED)]	0,22	Irréversible	10,8	28,6
[MnL3]	0,306	Réversible	16,2	32,43
[MnL5]	0,311	Irréversible	20,1	36,26
[MnL4]	0,329	Réversible	17,28	33,36
[Mn(CyHBET-NO ₂)]	0,329	Irréversible	10,1	26,0
[MnL _{lys}]	0,494	Quasi-réversible	12,21	25,26
[Mn(NOTA)]	0,50	Réversible	10,5	23,6
[Mn(15-pyN ₃ O ₂)]	0,79	Quasi-réversible	5,2	13,3
[Mn(EDTA)]	0,81	Irréversible	10,5	22,5
[Mn(15-pyN ₅)]	0,89	Quasi-réversible	7,7	14,2

Afin de rationaliser toutes ces données et en tirer une tendance on remarque plusieurs points : (1) Quatre substituants sont importants à savoir les carboxylates, les phénolates, les pyridines et les 1-méthylimidazoles. (2) Les structures comportant un acide carboxylique conduisent à des complexes de manganèse (II/III) irréversible, sauf dans le cas de [MnL_{lys}] et [Mn(NOTA)]. (3) La substitution du carboxylate par un phénolate conduit à un abaissement du potentiel redox (E_{1/2}) et un système réversible ou quasi-réversible. Sauf dans le cas du ligand **JED (Janus)** qui est conçu pour effectuer un switch du groupement coordinant (entre pyridine et phénolate) en fonction du degré d'oxydation. (4) La combinaison pyridine phénolate conduit au meilleur compromis avec un potentiel redox bas, un système réversible ou quasi-réversible, une bonne rigidité et une meilleure inertie cinétique. (5) La substitution de pyridine par un 1-méthylimidazole n'apporte pas une grande différence de potentiel redox et provoque une forte baisse de l'inertie cinétique, mais améliore la stabilité thermodynamique du complexe.

VI. Etude de [Mn^{III}L4] et [Mn^{III}L5]

A. Formation du complexe [Mn^{III}L4] et [Mn^{III}L5]

Comme pour [Mn^{III}L3], nous avons étudié trois voies de formation des complexes : (1) Formation du complexe dans l'eau à partir du ligand et de la poudre de MnF₃ à pH 7,4. Il faut préciser que cette voie de formation a été lancée en parallèle pour les trois complexes [Mn^{III}L3], [Mn^{III}L4] et [Mn^{III}L5] mais elle n'est viable pour aucun des trois ligands. (2) Oxydation des complexes [Mn^{II}L4] et

[Mn^{III}L5] par H₂O₂ avec ou sans HRP. (3) Formation des complexes **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** dans le méthanol à partir du ligand et de MnF₃ à pH 7,4. L'oxydation des ligands **H₃L4** et **H₃L5** par H₂O₂ n'a pas été étudiée.

i. Oxydation de **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]**

L'oxydation des complexes **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** a été étudiée dans les mêmes conditions que précédemment (20 équivalents H₂O₂, sans HRP, HEPES) (Figure 162).

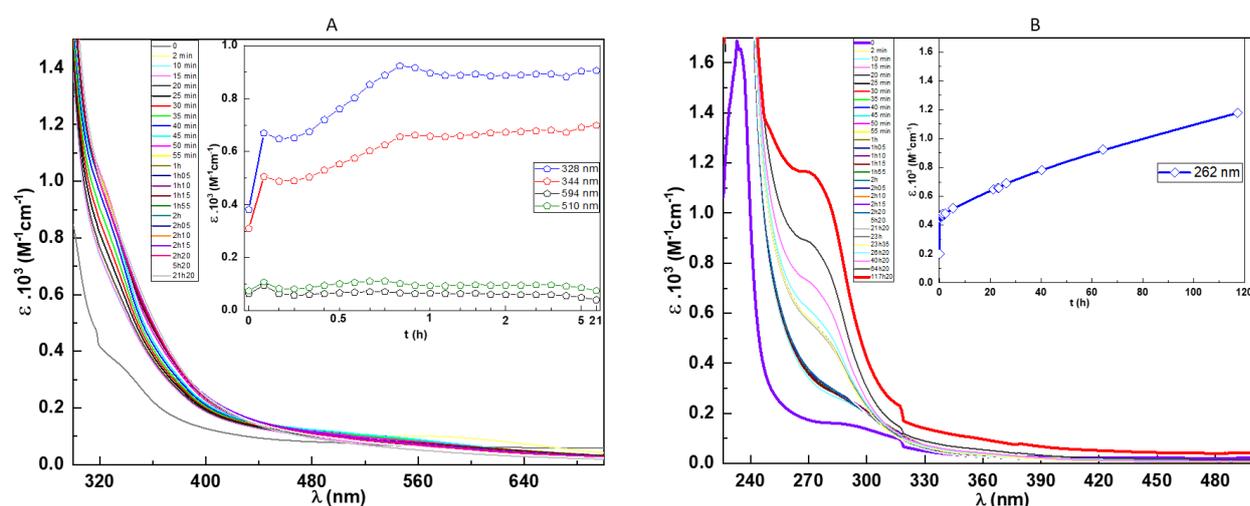


Figure 162 : (A) Suivi de l'oxydation de **[Mn^{III}L4]** dans l'HEPES. Insert : Absorbance à 328 nm, 344 nm, 594 nm et 510 nm en fonction du temps. (B) Suivi de l'oxydation de **[Mn^{III}L5]** dans l'HEPES. Insert : absorbance à 262 nm en fonction du temps. (A) et (B) 20eq H₂O₂, C_{complexe} = 2 mM, HEPES (50 mM ; pH 7,4).

Dans le cas de **[Mn^{III}L4]**, la bande caractéristique des complexes de Mn^{III} (400-600 nm) est difficile à suivre dans l'eau due aux faibles coefficients d'extinction molaire des dérivés imidazoles (Figure 162-A). Nous avons donc analysé les signaux à 328 nm et 344 nm. Ils semblent indiquer une oxydation rapide car au bout d'une heure il n'y a plus de variation des longueurs d'ondes à 328 nm et 344 nm.

Dans le cas de **[Mn^{III}L5]**, une nouvelle bande autour de 270 nm apparaît lors de l'ajout de H₂O₂ (Figure 162-B). En suivant l'évolution de cette bande, on observe une évolution très lente qui ne varie plus après plus de 5 jours (120h). Toutefois, il est difficile d'affirmer que cette bande est caractéristique de l'oxydation en **[Mn^{III}L5]**. Nous n'avons pas effectué l'oxydation en présence de HRP car en parallèle nous développons une autre voie de formation du complexe.

ii. Formation de Mn^{III}L4 et Mn^{III}L5 dans le méthanol

Cette voie étant la plus prometteuse, la formation des complexes **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** a été effectuée comme précédemment pour **[Mn^{III}L3]**. Nous avons confirmé la formation des complexes par spectroscopie UV-visible. En les comparant à **[Mn^{III}L3]**, on remarque la bande caractéristique des complexes de Mn^{III} (Figure 163).

Nous avons par la suite mesuré un spectre sur plusieurs jours afin de déterminer si une évolution se produisait dans le temps. Aucune évolution n'a été observée, nous avons pu en conclure de la pertinence de former les complexes $[Mn^{III}L4]$, $[Mn^{III}L5]$ et $[Mn^{III}L3]$ dans le méthanol avant d'éventuellement les étudier en solution aqueuse. Concernant $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$, les spectres RMN proton n'ont pas donné de résultat dans le méthanol deutéré, similairement à ce qui avait été observé pour $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$.

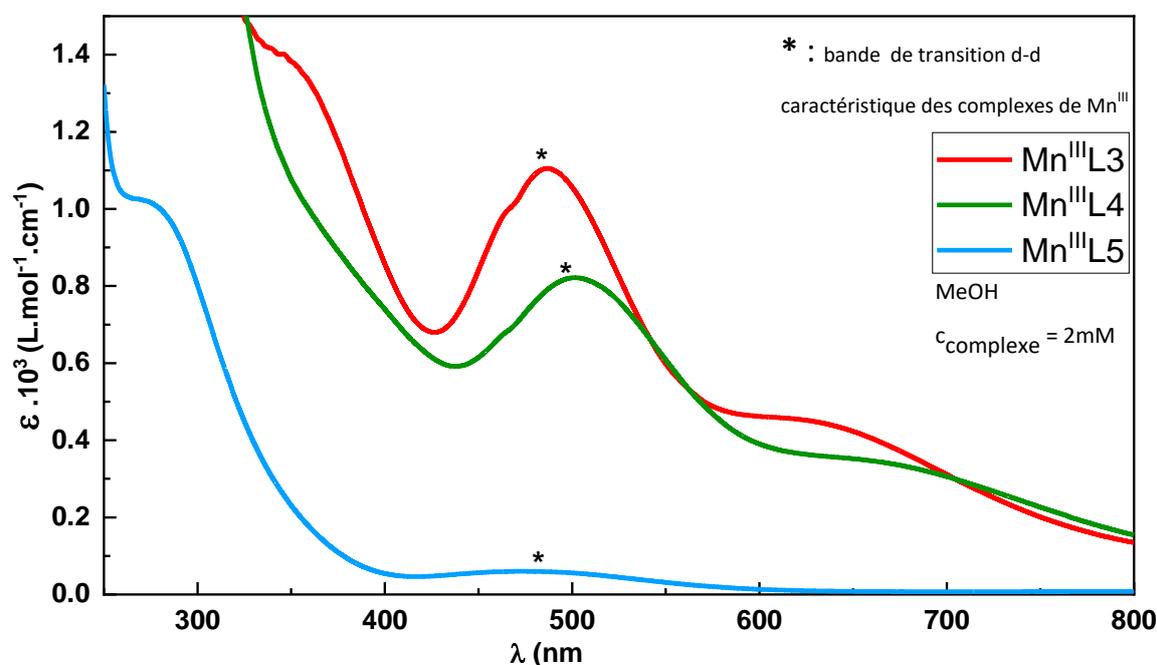


Figure 163 : Coefficients d'extinction molaire des complexes $[Mn^{III}L3]$, $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ formés dans le méthanol à 2mM.

En comparant la bande caractéristique du manganèse(III) avec un dérivé $[Mn^{III}CyDTA]$.^[236] Le **CyDTA** est un dérivé de l'EDTA avec un cyclohexane à la place de l'éthylène. $\epsilon_{[Mn^{III}CyDTA]} = 331 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tandis que $\epsilon_{[Mn^{III}L5]} = 60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Le faible coefficient d'extinction molaire est dépendant du phénolate/pyridine comme on peut le voir entre les trois complexes. $[Mn^{III}L3]$ présente le coefficient d'extinction molaire le plus élevé puis $[Mn^{III}L4]$ qui ne possède plus de pyridine et enfin $[Mn^{III}L5]$ qui ne possède ni pyridine, ni phénolate.

Les complexes $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ ont par la suite été confirmés par MALDI. La masse molaire de $[Mn^{III}L4]$ est de $562,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Figure 164) tandis que celle de $[Mn^{III}L5]$ est de $514,10 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Figure 165). Similairement au complexe $[Mn^{III}L3]$, les complexes $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ sont silencieux dans ces conditions. Les pics monoisotopiques monochargés sont attendus à $563,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ et $515,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivement et encore une fois, les motifs isotopiques semblent correspondre alors qu'un décalage de +2 est observé. Ce phénomène est en cours d'investigation.

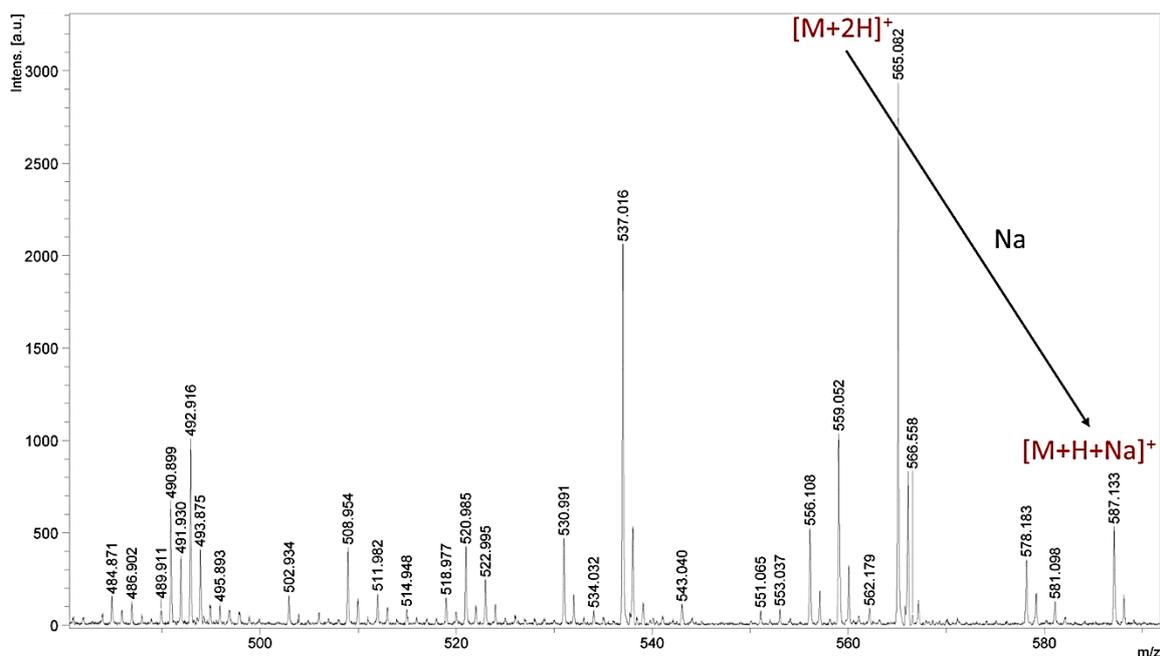


Figure 164 : Spectre de masse de $[Mn^{III}L4]$.

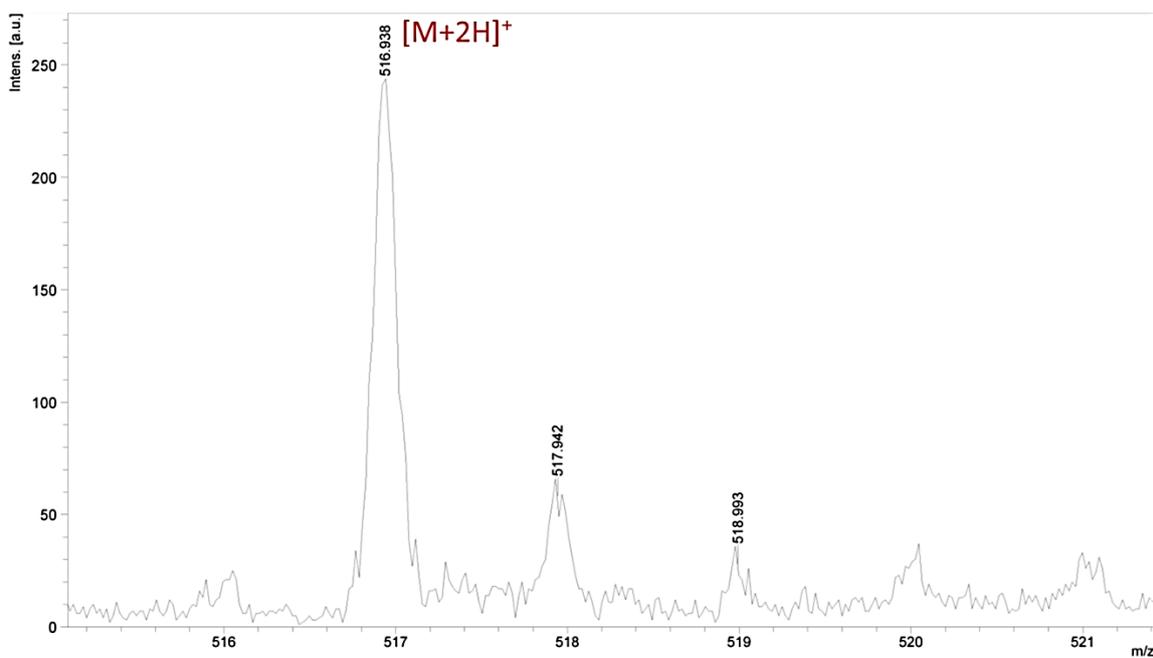


Figure 165 : Spectre de masse de $[Mn^{III}L5]$.

B. Stabilité de $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$

Nous avons par la suite voulu étudier la stabilité des complexes $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ dans l'eau. Les complexes ont donc été solubilisés dans des mélanges MeOH/ HEPES dans des proportions variables jusqu'à un maximum de 20% de tampon HEPES (Figure 166). Comme on peut le voir sur Figure 166, $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ sont encore moins stable que $[Mn^{III}L3]$ dans l'eau.

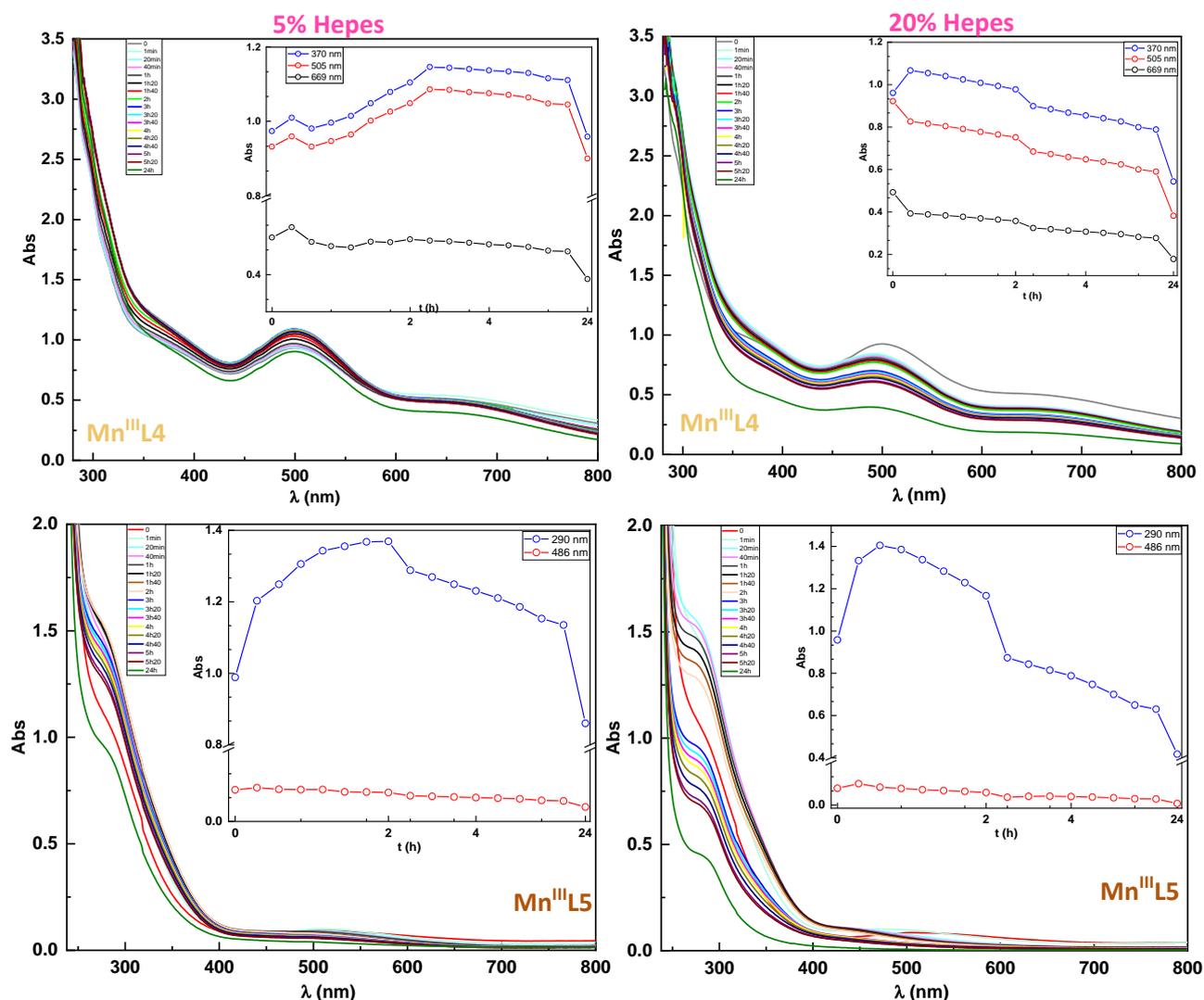


Figure 166 : Stabilité de $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ dans 5% (gauche) et 20% (droite) de tampon HEPES et du méthanol. $c = 1mM$, $[HEPES] = 50mM$ à pH 7,4.

Dans le cas de $[Mn^{III}L4]$: (1) En présence de 5% de tampon, on observe une hausse de l'absorbance 25% les deux premières heures puis une stabilisation de celle-ci jusqu'à cinq heures avant d'observer une décroissance de l'absorbance de 16% sur 19 heures. (2) En présence de 20% de tampon, l'absorbance décroît dès le départ. Il s'agit d'une décroissance légère les cinq premières heures mais par la suite une très forte chute du signal est observée (Figure 166).

Dans le cas de $[Mn^{III}L5]$: (1) En présence de 5% de tampon, l'absorbance augmente de 29% durant les deux premières heures puis on observe une très légère décroissance jusqu'à plus de cinq heures, avant d'observer une très forte décroissance de l'absorbance de 21% sur 19 heures. (2) En présence de 20% de tampon, on observe une hausse de 30% de l'absorbance les dix premières minutes, par la suite une très forte décroissance avec des variations de pente (Figure 166).

Par cette expérience on montre que, malgré une constante de stabilité thermodynamique théorique plus fortes pour $[Mn^{III}L4]$ par rapport à $[Mn^{III}L3]$, la stabilisation du Mn^{III} dans l'eau est plus

difficile avec le 1-méthylimidazole qu'avec la pyridine (Figure 167). Le complexe formé à l'issu de l'ajout de l'eau dans le cas de $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ n'a pas encore été caractérisé mais nous supposons la réduction du complexe pour conduire à $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$.

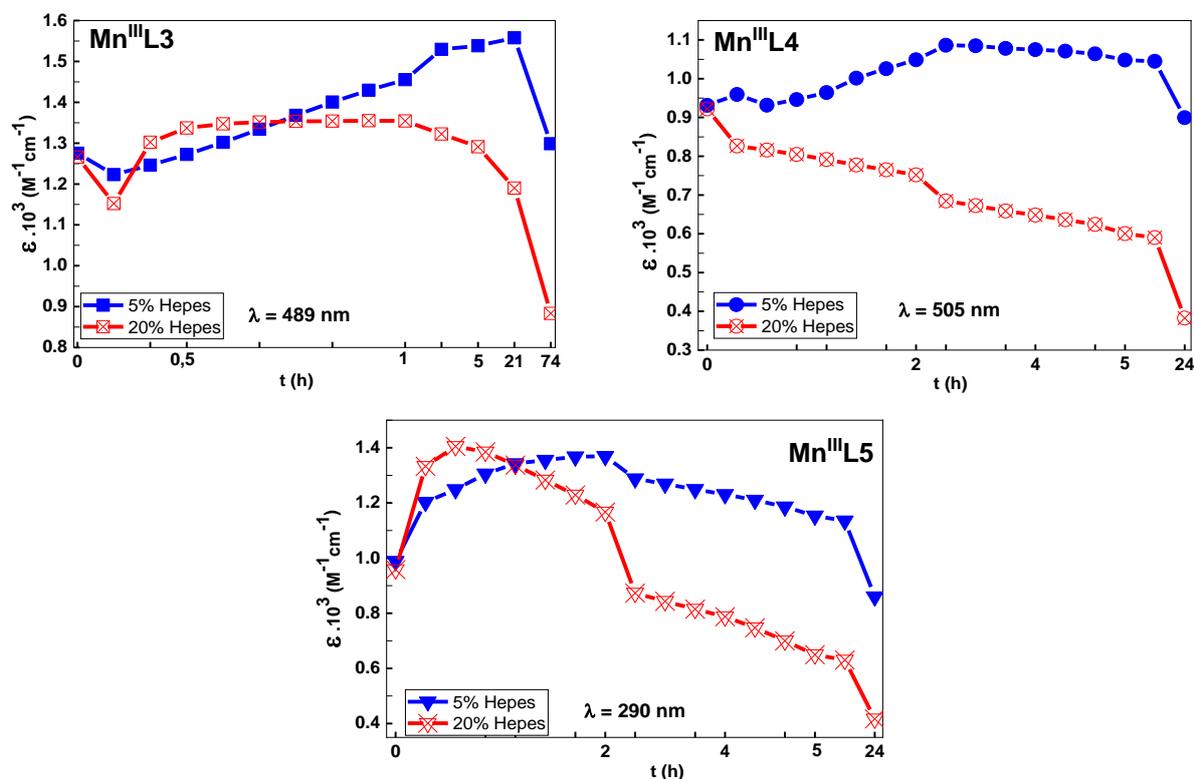


Figure 167 : Variation temporelle des coefficients d'extinction molaire de $[Mn^{III}L3]$, $[Mn^{III}L4]$ et $[Mn^{III}L5]$ dans 5% et 20 % de tampon HEPES (50 mM ; pH 7,4). $C_{\text{complexe}} = 1 \text{ mM}$. MeOH / HEPES.

VII. Conclusion

Nous avons développé une toute nouvelle famille de ligand bispidine en substituant les pyridines par des 1-méthylimidazoles, **H₃L4** et **H₃L5**. La synthèse et l'isolement des complexes **[Mn^{II}L4]** et **[Mn^{II}L5]** ont été développés. Toutes les études physicochimiques des complexes de Mn^{II} ont été effectuées, montrant en particulier des constantes globales de stabilité thermodynamique de $\log K_{MnL} = 17,28$ et $20,1$ respectivement pour **[Mn^{II}L4]** et **[Mn^{II}L5]**. L'inertie cinétique de ces complexes a été évaluée à pH 6 en présence de 50 équivalents de zinc et a révélé des résultats inattendus avec un temps de demi-vie de 2h et 6 min respectivement pour **[Mn^{II}L4]** et **[Mn^{II}L5]**. Les études relaxométriques ont révélé que l'on n'a pas une molécule d'eau mais 0,65(2) molécule d'eau dans le cas des deux complexes de Mn^{II}. Ce résultat est difficile à exploiter. Toutefois, une explication peut être obtenue par l'analyse structurale des complexes de Zinc(II) par RMN qui sont en conformation chaise-chaise avec tous les groupement coordinants engagés. Enfin, ces ligands avaient été synthétisés avec l'objectif d'abaisser le potentiel redox par rapport à ceux des complexes **[MnL_{lys}]** ($E_{1/2}(\mathbf{MnL}_{lys}) = 454$ mV vs SCE) et **Mn3** ($E_{1/2}(\mathbf{Mn3}) = 388$ mV vs SCE) préalablement synthétisés au laboratoire et de favoriser l'oxydation en Mn^{III}. Cet objectif a été atteint puisque les deux systèmes ont tous les deux des potentiels redox plus bas avec $E_{1/2}(\mathbf{MnL4}) = 326$ mV vs SCE et $E_{1/2}(\mathbf{MnL5}) = 322$ mV vs SCE. Ce potentiel est proche de celui mesuré pour le complexe **MnL3** étudié au chapitre précédent ($E_{1/2}(\mathbf{MnL3}) = 306$ mV vs SCE). A noter que **[MnL4]** est un système quasi-réversible tandis que **[MnL5]** est irréversible.

C'est à partir de ces informations que nous avons isolé les complexes **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** dans le méthanol. La formation de ces complexes a pu être confirmée par spectroscopie d'absorption UV-visible et spectrométrie de masse. Par la suite, nous avons examiné l'influence de l'eau sur ces complexes. C'est ainsi que nous avons pu déterminer que, malgré des constantes thermodynamiques théoriques favorables, les complexes de bispidine contenant des unités 1-méthylimidazoles étaient moins stables que le complexe **[Mn^{III}L3]**. Ceci pourrait s'expliquer par un angle N_{Ar}-Mn-N_{Ar} plus fermé dans le cas de substituants pyridinyl que des dérivés imidazoles. Toutefois, la réactivité de ces complexes peut avoir une application intéressante en catalyse, ce qui fait l'objet du chapitre suivant.



**Chapitre 5 : Mn^{II/III} - bispidine, mime de la
superoxyde dismutase**



I. Introduction et contexte de travail

Le développement des ligands **H₃L3**, **H₃L4** et **H₃L5** a été mené pour une double application à savoir : le développement de sondes IRM redox-activées et leur utilisation comme mimes de la superoxyde dismutase. Le développement de ces ligands a donc été inspiré des ligands connus pour catalyser la **SOD**. Parmi eux le ligand associé au complexe **[Mn1]** publié par C. Policar et son équipe en 2007 ^[166] a été une de nos références (Figure 168).

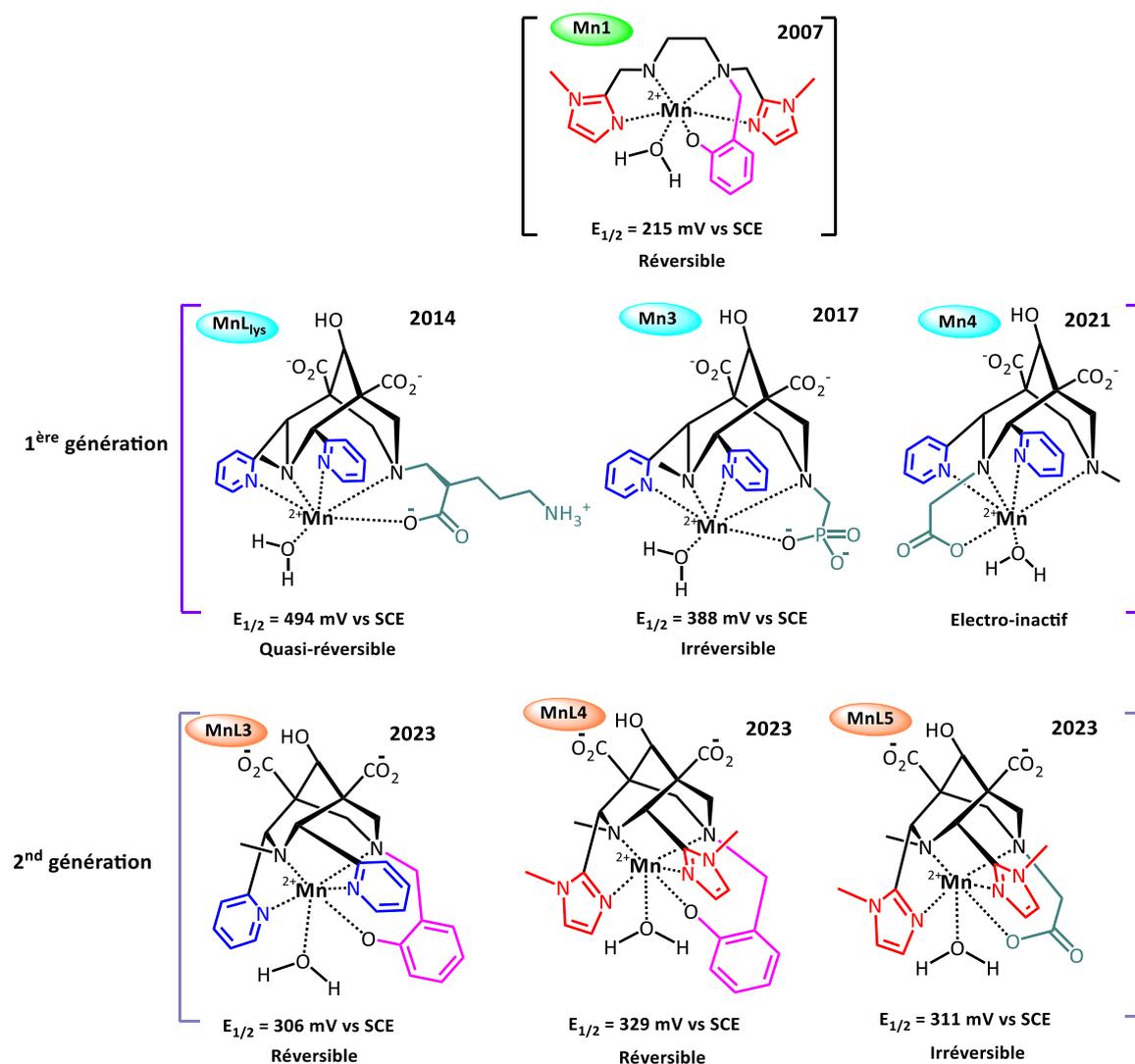


Figure 168 : Complexes **[Mn1]** développé par Clotilde Policar et son équipe et Mn-bispidine de première et seconde génération.

Le ligand du complexe **[Mn1]** possède des substituants spécifiques à savoir le motif phénolate et le 1-méthylimidazole. Ces substituants ont été choisis spécifiquement car le motif phénol est connu comme pouvant mimer le carboxylate monodentate présent dans le site actif de la protéine naturelle **MnSOD** (Figure 169).^[237] Le motif 1-méthylimidazole est quant à lui connu pour mimer l'histidine de la chaîne latérale de la protéine (Figure 169).^[166]

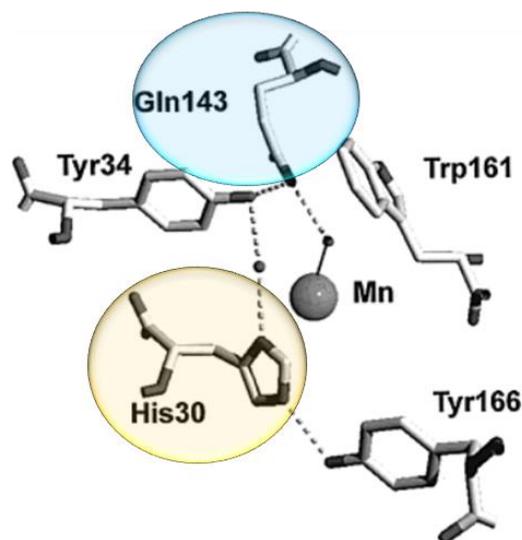


Figure 169 : Structure cristalline du site actif de la **MnSOD** humaine, présentée avec les liaisons hydrogène. Les aminoacides coordonnant le métal ne sont pas montrés (His26, His74, His163, Asp159).

II. Région d'activité

La catalyse de la dismutation du superoxyde est un processus d'oxydoréduction, impliquant à la fois les états d'oxydation Mn^{II} et Mn^{III} . Pour rendre cette catalyse redox efficace, le potentiel redox du couple Mn^{III}/Mn^{II} doit être, comme rencontré dans les SOD (cf. chapitre 1-IV-B),^[238] c'est à dire entre le potentiel des deux couples $O_2/O_2^{\bullet -}$ et $O_2^{\bullet -}/H_2O_2$, à pH = 7, -0.40 V vs SCE et $+0.65$ V vs SCE, respectivement (Figure 170-A). Si l'on place les complexes Mn-bispidine sur un diagramme en fonction des potentiels on constate que tous les complexes se situent dans une région pouvant potentiellement permettre une activité **SOD**, certains meilleurs que d'autres (Figure 170-B). Jusqu'à présent, la valeur optimisant la réactivité des deux réactions d'oxydation et de réduction est le potentiel médian ($E_{\text{médian}}$), c'est-à-dire 0.116 V vs SCE (cf. chapitre 1 – IV-B).

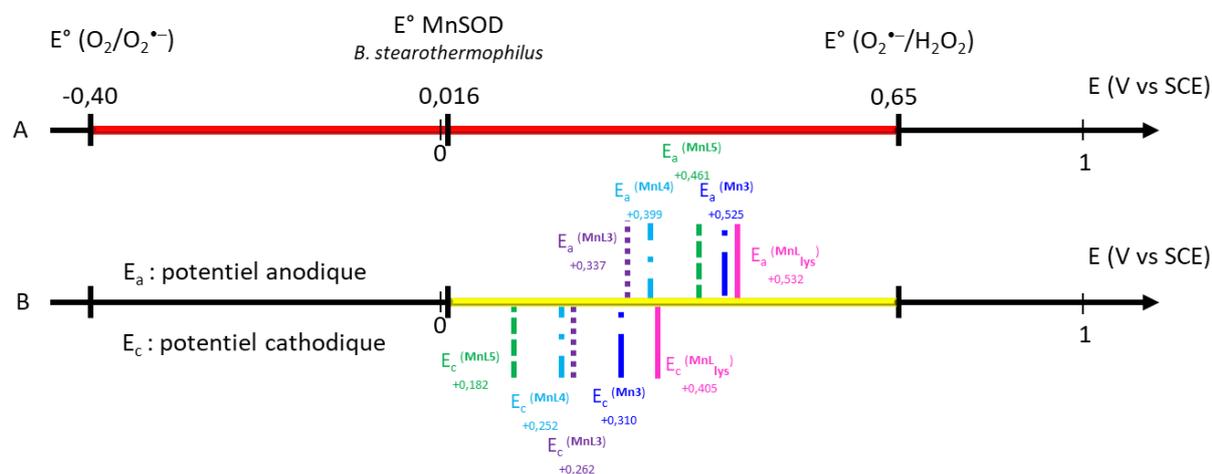


Figure 170 : (A) Potentiel standard du couple superoxyde à pH 7. (B) Potentiels anodiques et cathodiques à demi-vague des complexes $[MnL_{lys}]$, $[Mn3]$, $[MnL3]$, $[MnL4]$ et $[MnL5]$ à pH 7,5 dans le tampon MOPS.

III. Activité SOD

A. Principe

Dans une étude préliminaire à nos travaux, des premières mesures d'activité **SOD** avaient été mesurées sur les complexes **[MnL_{lys}]**, **[Mn3]** et **[Mn4]** et aucun de ces complexes ne présente d'activité catalytique. Afin d'évaluer une éventuelle activité anti-superoxyde, l'IC₅₀ (concentration d'inhibition à 50%) et la *k_{cat}* (constante catalytique) des nouveaux complexes ont été déterminées avec un test indirect développé par McCord et Fridovich. Le principe de ce test colorimétrique est décrit à la Figure 171.^[239]

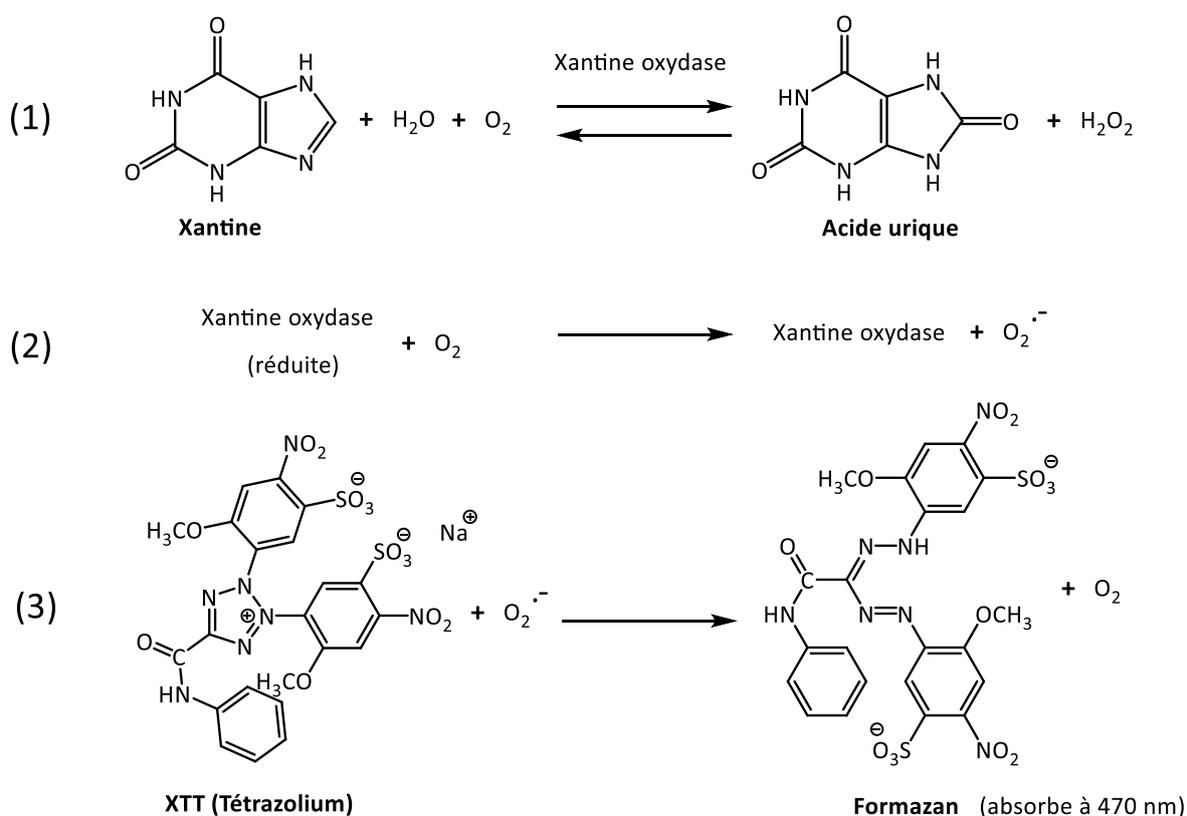


Figure 171 : Méthode de McCord et Fridovich.

(1) La xanthine oxydase (XO) ajoutée au système catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique, ce qui entraîne une réduction de la XO.

(2) La réoxydation de la XO par O₂ produit du superoxyde comme produit secondaire. Même si le superoxyde est un composé coloré (jaune), son coefficient d'absorption est trop faible et sa concentration dans l'essai est beaucoup trop basse pour un contrôle direct par spectroscopie d'absorption UV-visible.^[240]

(3) Un indicateur d'oxydoréduction est utilisé pour une mesure indirecte. Le tétrazolium (XTT) réagit avec le superoxyde selon une cinétique connue pour former du formazan, qui absorbe à 470 nm.^[241]

Le test de McCord et Fridovich est basé sur une compétition cinétique entre la **SOD** et l'indicateur redox. Le cytochrome C peut également être utilisé comme indicateur à la place du XTT. La production de formazan est contrôlée en mesurant l'absorbance à 470 nm au cours du temps. Celle-ci augmente linéairement lors de la production de formazan avec une pente appelée p_1 . Lorsqu'une **SOD** (ou un mime) est ajoutée, elle entre en compétition avec le XTT pour la réaction avec le superoxyde, ralentissant la vitesse globale de production de formazan avec une pente nommée p_2 . En mesurant la pente de la diminution de l'absorbance en absence (p_1) et en présence (p_2) on peut déterminer k_{XTT} (constante catalytique de la XTT) (Figure 172).

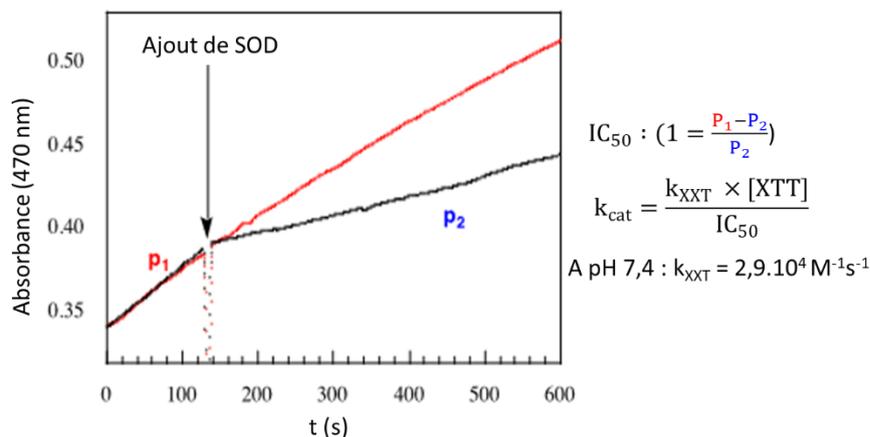


Figure 172 : Méthode de détermination de l' IC_{50} et k_{cat} . k_{XTT} est la constante catalytique de la XTT.

B. Activité de [MnL3]

À la suite du test, nous avons accès à l' IC_{50} nous permettant de calculer $k_{\text{cat}} = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figure 173). Cette valeur de constante catalytique est très proche de la vitesse de dismutation du superoxyde ($6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ à pH 7). On considère donc que le complexe **[MnL3]** n'a pas d'activité catalytique dans ces conditions.

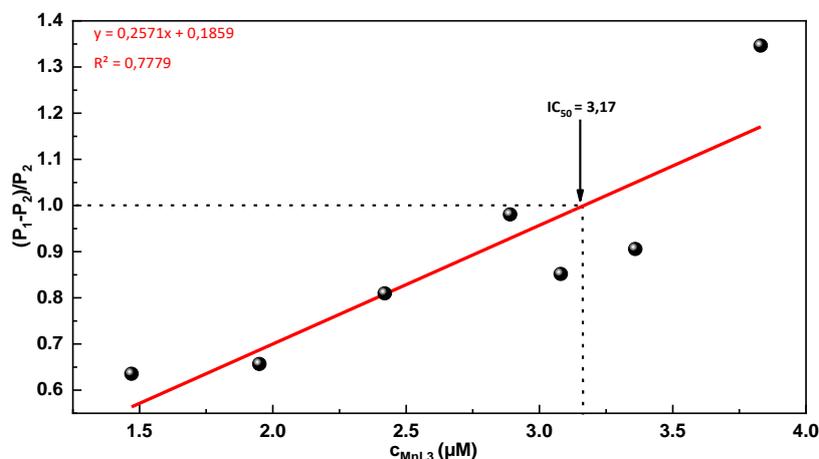


Figure 173 : **[MnL3]** - Test McCord et Fridovich de mime de la SOD effectuée à pH 7,5 dans le MOPS 50 mM avec la XTT comme compétiteur. $[\text{XTT}] = 100 \mu\text{M}$, 8 μL de Xanthine oxydase à 20 mg/mL.

C. Activité de [MnL4]

A l'issue du test, nous avons déterminé l' IC_{50} nous permettant de calculer $k_{cat} = 1,81 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figure 174). La constante catalytique est supérieure à la vitesse de dismutation du superoxyde. On considère donc que le complexe [MnL4] possède une faible activité catalytique dans ces conditions.

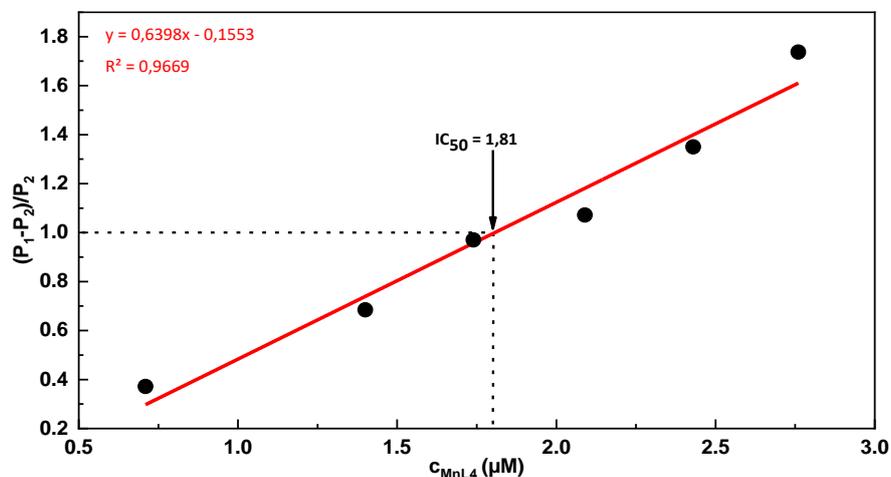


Figure 174 : [MnL4] - Test McCord et Fridovich de mime de la SOD effectuée à pH 7,5 dans le MOPS 50 mM avec la XTT comme compétiteur. [XTT] = 112,84 µM, 8 µL de Xanthine oxydase à 20 mg/mL.

D. Activité de [MnL5]

À la suite du test, nous avons accès à l' IC_{50} nous permettant de calculer $k_{cat} = 3,91 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figure 175). Cette valeur de constante catalytique est très proche de la vitesse de dismutation du superoxyde ($6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à pH 7). On considère donc que le complexe [MnL5] n'a pas d'activité catalytique dans ces conditions.

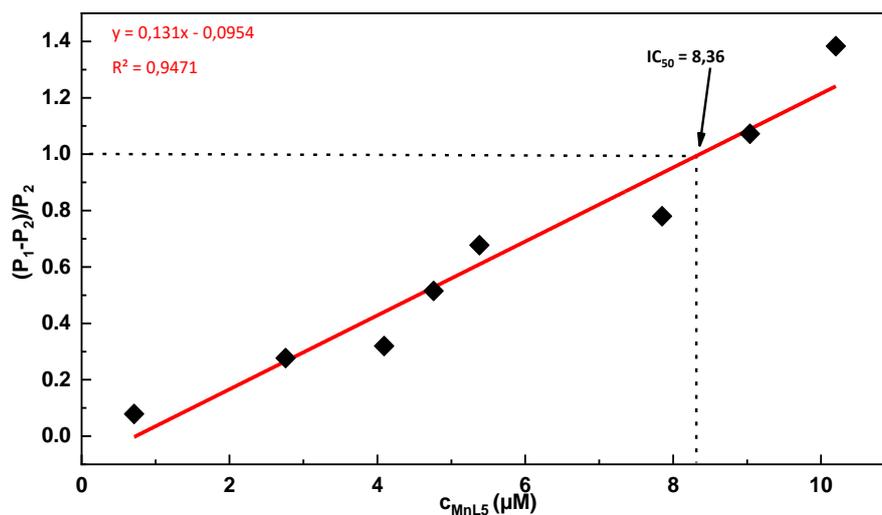


Figure 175 : [MnL5] - Test McCord et Fridovich de mime de la SOD effectuée à pH 7,5 dans le MOPS 50 mM avec la XTT comme compétiteur. [XTT] = 112,84 µM, 8 µL de Xanthine oxydase à 20 mg/mL.

IV. Cytotoxicité de [Mn^{II}L3], [Mn^{II}L4] et [Mn^{II}L5]

La cytotoxicité des complexes [Mn^{II}L3], [Mn^{II}L4] et [Mn^{II}L5] a été évaluée à l'aide du test LDH (où LDH est la lactate déshydrogénase) sur un modèle cellulaire de cellules épithéliales intestinales (HT29-MD2).^[242] Les cellules HT29-MD2 activées par le LPS (le lipopolysaccharide) ont été incubées avec les complexes à des concentrations variant de 100 µM à 200 µM pendant 6 heures. Après activation, les cellules se lient au récepteur TLR4 (protéine Toll Like Receptor 4), un récepteur membranaire qui appartient à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.^[243] Cette reconnaissance promeut la libération de cytokines pro-inflammatoires. La cytotoxicité des composés a été testée en suivant la libération de la lactate déshydrogénase cytosolique dans le surnageant, ce qui indique des dommages à la membrane cellulaire. L'activité de la LDH est mesurée indirectement sur la base de sa capacité à catalyser la réduction du pyruvate en lactate en présence de NADH absorbant à 340 nm, qui est oxydé pour former du NAD⁺ (Figure 176).^[170]

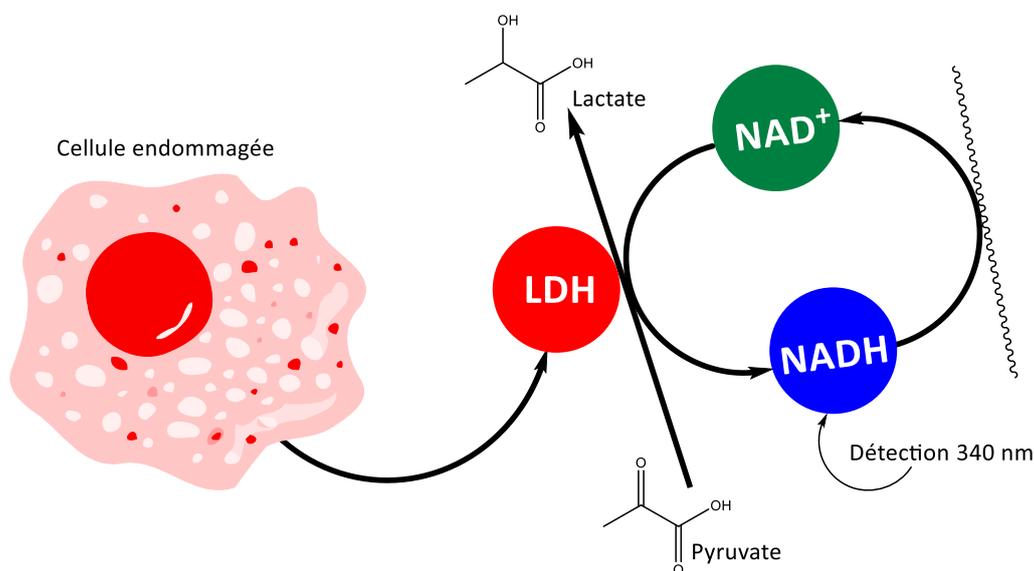


Figure 176 : Schéma simplifié du test LDH.

Les données représentent le % de LDH libérée de manière extracellulaire (moyenne d'au moins 2 expériences indépendantes). Le pourcentage de LDH libérée dans les surnageants était toujours inférieur à 10 % (qui ont été choisis comme limite de non-cytotoxicité). Nous pouvons conclure qu'aucun des complexes n'induit une cytotoxicité significative à 100-200 µM dans les cellules HT29-MD2 (Figure 177).

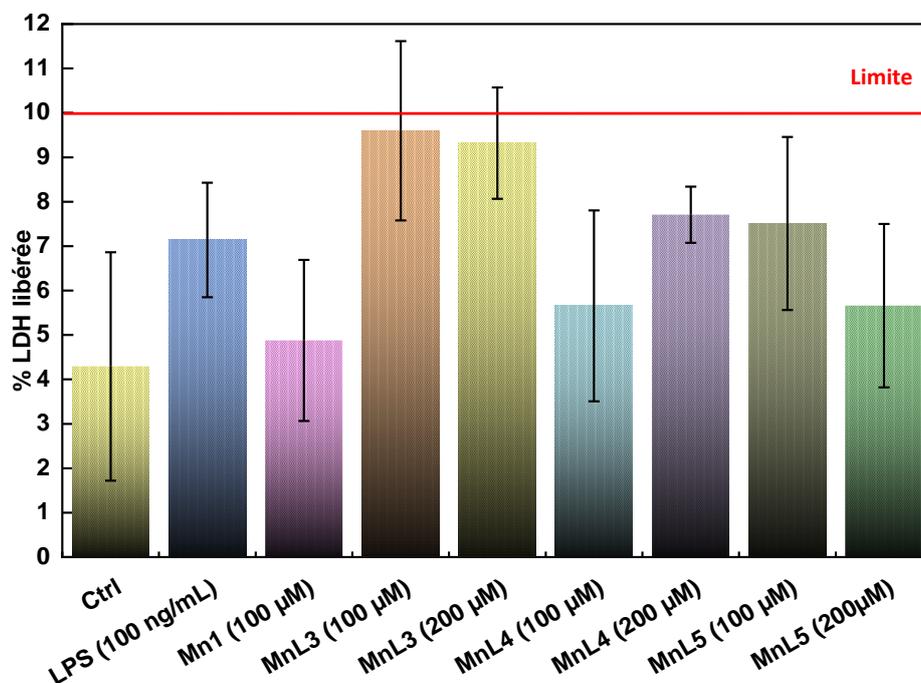


Figure 177 : Evaluation de la cytotoxicité de $[Mn^{II}L3]$, $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$ à une concentration de 100 et 200 μM .

V. Activité anti-inflammatoire de $[Mn^{II}L3]$, $[Mn^{II}L4]$ et $[Mn^{II}L5]$

La section suivante résume l'effet des trois complexes dans les cellules **HT29-MD2** activées par le **LPS**. Pour toutes les expériences, les cellules **HT29-MD2** ont été incubées avec du **LPS** à 0,1 $\mu g/mL$ pour induire une inflammation avec ou sans les complexes à différentes concentrations pendant 6 heures. L'activité anti-inflammatoire des complexes a été évaluée en examinant leur capacité à limiter la sécrétion d'interleukine-8 (**IL-8**). Cette cytokine est produite en particulier par les cellules épithéliales à la suite de la détection d'agents microbiologiques ou chimiques potentiellement pathogènes. Le contrôle positif utilisé est les cellules activées par le **LPS** en absence de complexe de manganèse (Figure 178). Il est d'usage de considérer une activité anti-inflammatoire lorsque la sécrétion de **IL-8** ne dépasse pas 35%.^[170,244] Comme on peut le voir pour les trois complexes, la concentration **IL-8** est au-dessus des 50% ce qui montre une faible efficacité anti-inflammatoire (Figure 178).

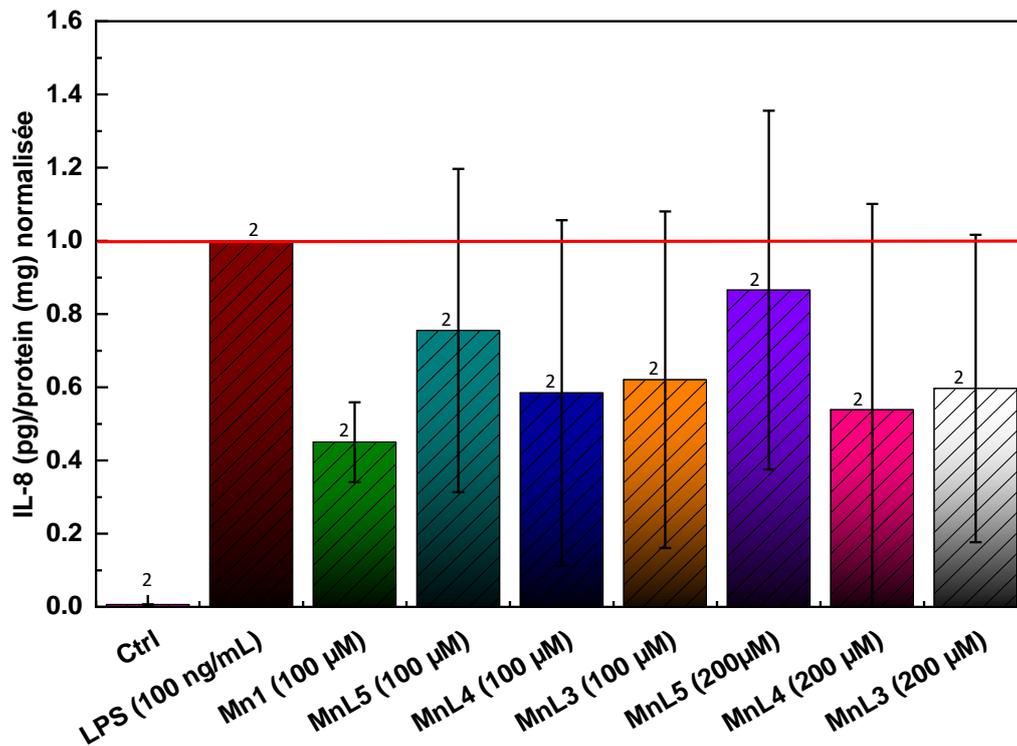


Figure 178 : Quantification du marqueur inflammatoire **IL-8** dans les cellules épithéliales intestinales activées par le **LPS** (0,1 µg/mL). La sécrétion d'**IL-8** a été mesurée par test ELISA dans le surnageant de cellules **HT29-MD2** activées par le **LPS** incubées pendant 6 heures avec chaque complexe à différentes concentrations. La quantité d'**IL-8** mesurée pour les cellules activées par le **LPS** est fixée à 100 % pour chaque expérience indépendante. Les données représentent la moyenne pour au moins deux expériences indépendantes : le nombre d'expériences indépendantes est indiqué au-dessus de chaque colonne.

Nb : La technique ELISA est une technique de dosage immunologique qui permet la détection d'un antigène ou d'un anticorps dans un échantillon. Le principe de cette technique repose sur la visualisation d'une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction enzymatique colorimétrique. L'enzyme, préalablement couplée à l'anticorps, catalyse une réaction chimique qui transforme son substrat en composé coloré.

VI. Conclusion

A l'issus des premières études effectuées sur les trois complexes $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L3}]$, $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ et $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L5}]$, seul $[\text{Mn}^{\text{II}}\text{L4}]$ présente une faible activité de mime de SOD. La cytotoxicité des trois complexes sur des cellules épithéliales intestinales a été étudiée et aucun des trois ne présente de toxicité. L'activité anti-inflammatoire des trois complexes a été explorée et les complexes présentent un très faible potentiel anti-oxydant. Cependant, il est possible que les complexes ne pénètrent pas dans la cellule ce qui pourrait expliquer cette faible activité anti-inflammatoire. La suite du travail sera de vérifier la pénétration cellulaire des complexes mais aussi d'augmenter la dose afin de vérifier s'il n'y a pas une meilleure activité anti-inflammatoire.

Dans le cas où il n'y aurait pas d'internalisation des complexes, il est possible d'envisager d'utiliser les dérivés des ligands $\text{H}_3\text{L3}$, $\text{H}_3\text{L4}$ et $\text{H}_3\text{L5}$ avec les acides carboxyliques protégés sous la forme d'ester ou encore de réduire les esters en alcool (Figure 179) dans le but d'obtenir des complexes neutres. La synthèse de ces dérivés a été explorée durant la thèse.

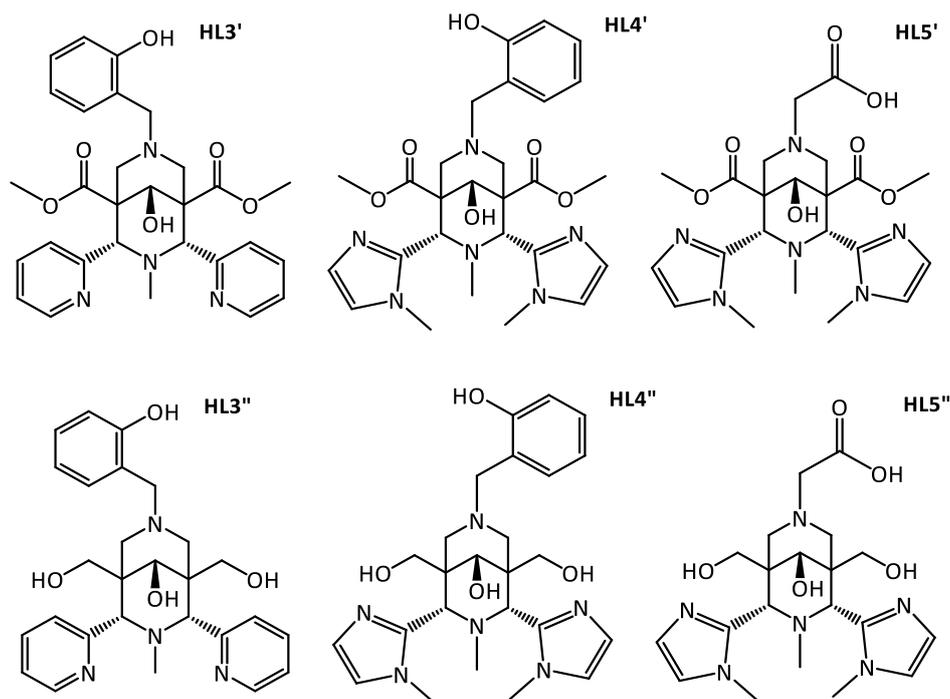
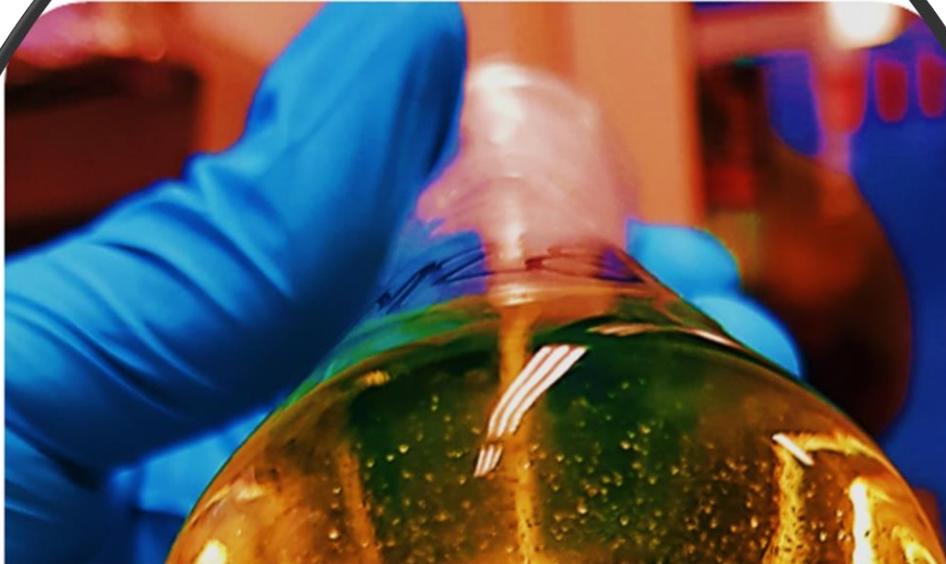
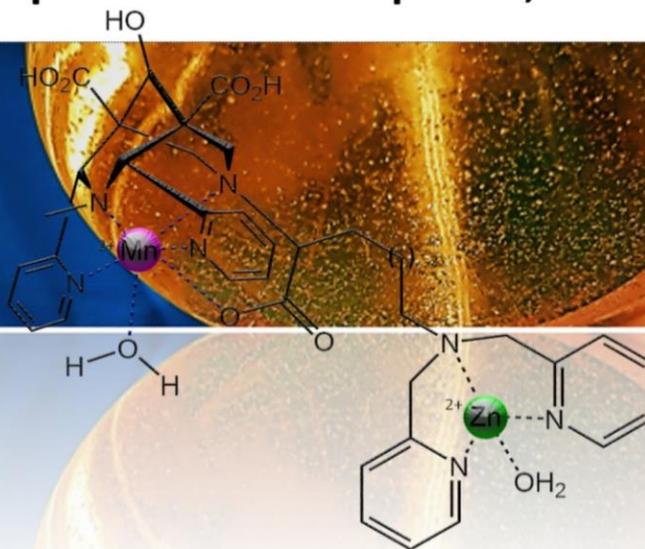


Figure 179 : Dérivés alternatifs de L3 , L4 et L5 afin de franchir la membrane cellulaire.



Chapitre 6 : Mn^{II} - bispidine, sonde à Zn^{II}



I. Introduction et contexte de travail

Comme nous l'avons vu précédemment, depuis 2008 plusieurs études mettent en exergue la toxicité du gadolinium.^[80] Une des alternatives les plus pertinentes est le développement d'agent de contraste basé sur le manganèse. Le complexe bispidine **[MnL_{lys}]** se révèle être un très bon candidat pour une première génération de sonde à zinc. Publié pour la première fois en 2017, ce complexe se révèle être exceptionnel dans la famille des agents de contraste de manganèse. En effet il présente une très bonne relaxivité $r_1 = 4,14 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (60 MHz, 25°C, pH 7, H₂O) et une inertie cinétique tout à fait exceptionnelle. En présence de 50 équivalents de Zn^{II}, le complexe présente un $t_{1/2}$ de plus 130 jours (pH 6 ; 37°C ; 60 MHz ; 0,1 M KCl). La première génération de bispidine manganèse pour la détection du zinc sera le complexe **[MnL_{lys}]** couplé à une unité DPA (bis-(2-pyridylméthyl)amine) sur l'amine terminale de la L-lysine (Figure 180). Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec les Dr Daouda Ndiaye et Célia Bonnet au CBM, à Orléans.

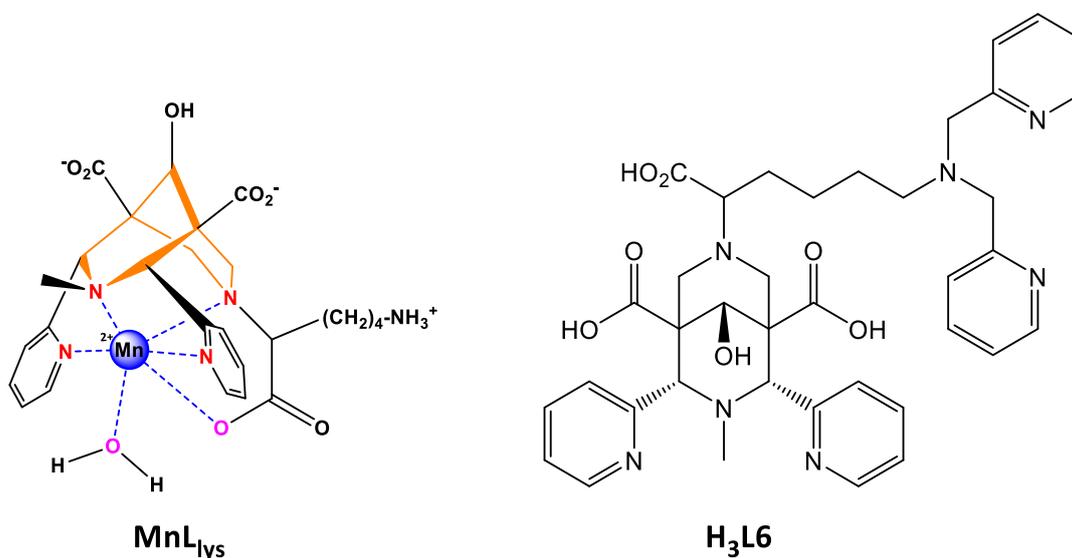


Figure 180 : Complexe **[MnL_{lys}]** et le ligand **H₃L6**.

II. Synthèse et caractérisation de H₃L6 et [MnL6]

A. Synthèse et caractérisation de H₃L6

i. Synthèse de H₄L6

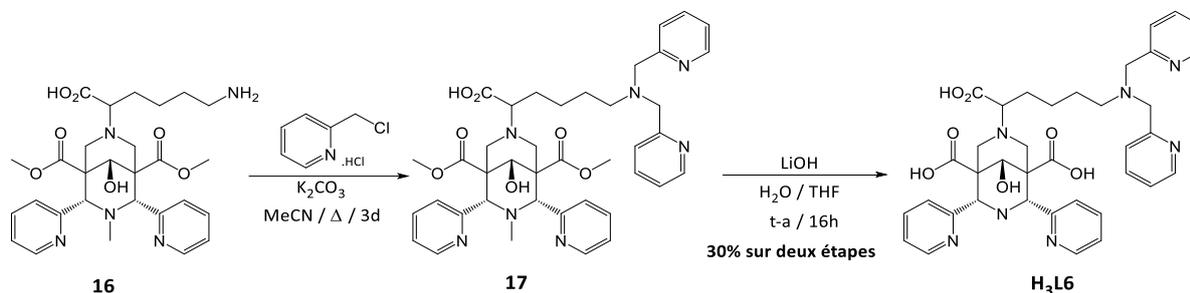
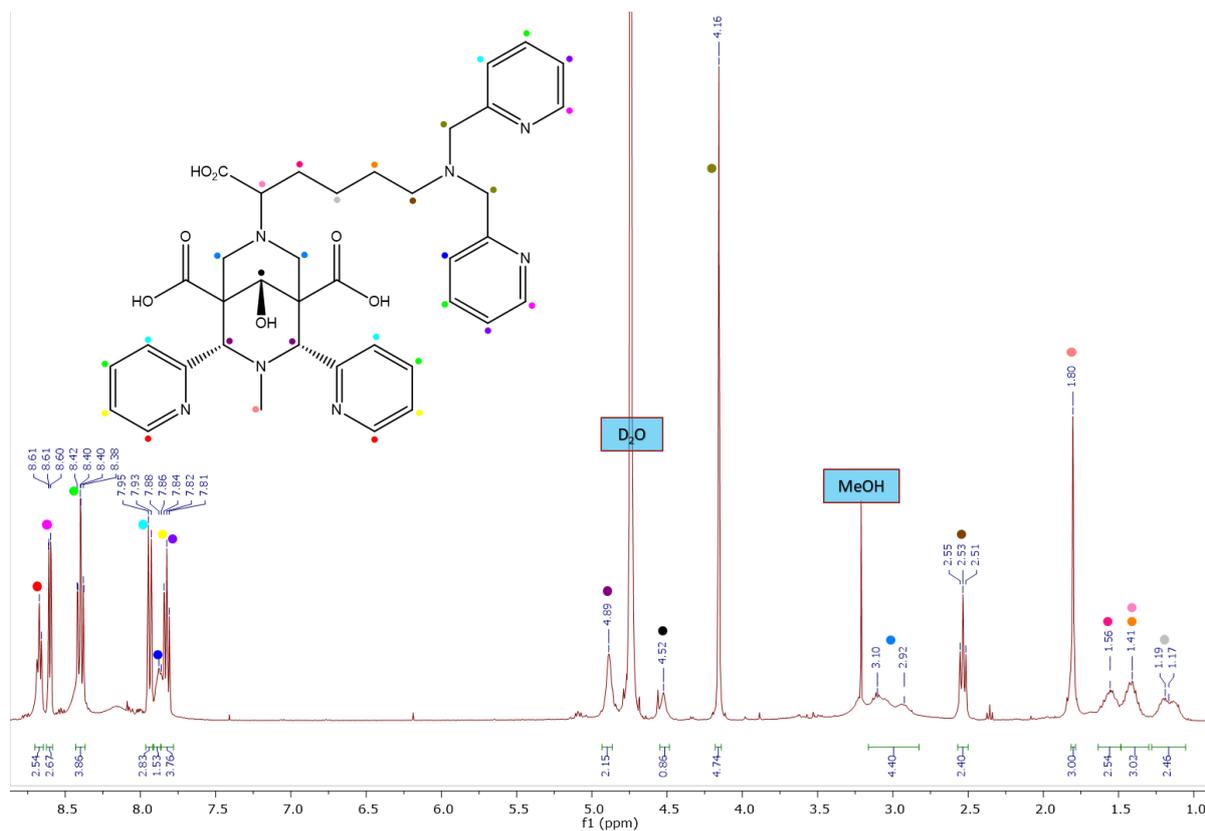


Figure 181 : Voie de synthèse de H₃L6.

La synthèse débute avec l'intermédiaire **16**, celui-ci a été développé et publié en 2017 au laboratoire ; sa voie de synthèse ne sera donc pas décrite ici. A cet intermédiaire **16**, une substitution nucléophile y est effectuée en présence du 2-(chlorométhyl)pyridine (produit commercial) et de carbonate de potassium dans l'acétonitrile à reflux pour 3 jours. La fin de la réaction est confirmée par plaque CCM et spectrométrie de masse. Le MALDI révèle la présence de 3 produits : le mono, le bis et le tris-substitué, ce qui conduit nécessairement une forte baisse du rendement du produit d'intérêt. Divers essais sont encore en cours afin d'améliorer ce rendement. Le mélange est cependant purifié et la saponification a été effectuée sur le produit **17** pour conduire à H₃L6 sous forme de poudre après purification (Figure 181).

ii. Caractérisation de H₃L6

Comme pour tous les autres ligands, celui-ci a été caractérisé par toutes les techniques classiques, notamment la RMN. L'attribution des pics se fait à l'aide du spectre de l'intermédiaire **16** et d'une COSY ¹H-¹H. La région des aromatiques est assez simple. Comme précédemment, nous avons repéré les signaux caractéristiques de la bispidine puis ceux des substituants (Spectre 27).



Spectre 27 : RMN 1H de H_3L6 (D_2O , 500 MHz, 25°C).

B. Synthèse de $[MnL6]$

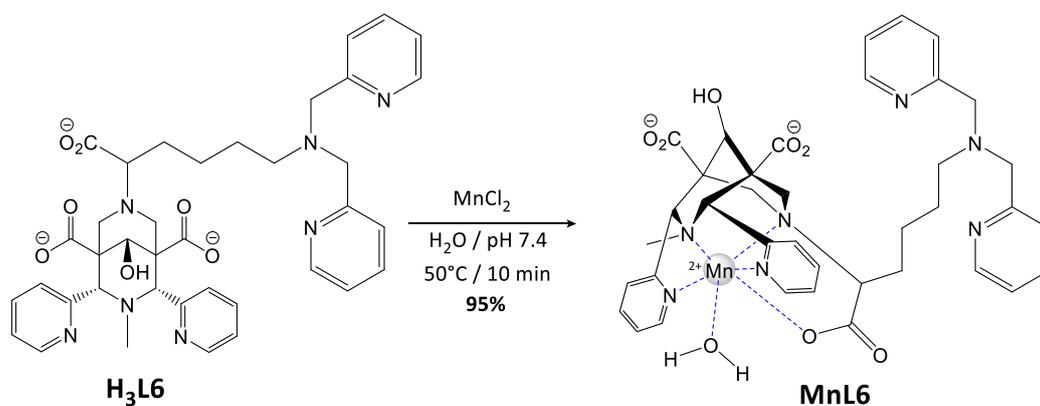


Figure 182 : Complexation de $[MnL6]$.

Comme précédemment, La synthèse du complexe débute par le mélange du ligand et $MnCl_2$ dans l'eau, par la suite le pH est fixé à 7,4 et le milieu est mis à 60°C pour 10 min (Figure 182). Le suivi de la réaction est effectué par HPLC ($H_2O/MeOH$) sur colonne de phase inverse C18, le pH est ajusté à nouveau à 7,4 si nécessaire pour le ligand libre et le complexe. Une fois la disparition complète du ligand observée, le complexe est purifié avec la même méthode par chromatographie flash (Figure 183).

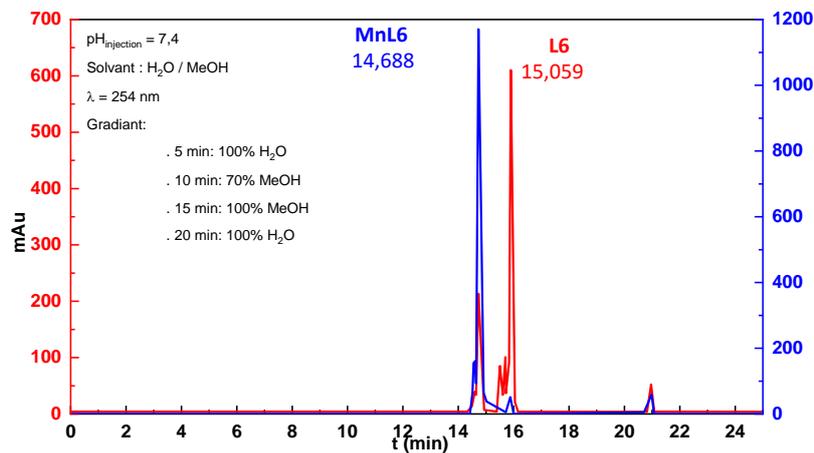


Figure 183 : HPLC de L6 et [Mn^{II}L6] à pH 7,4.

III. Etudes préliminaires de [MnL6] et sa sélectivité au Zn^{II}

A. Affinité et sélectivité au Zn^{II}

Afin de mesurer la sélectivité du complexe [Mn^{II}L6] pour le zinc, celui-ci a été mis en présence de quantités croissantes connues de métal. La relaxivité longitudinale a été mesurée lors des ajouts, mettant en évidence une complexation du Zn^{II} et une influence sur la relaxivité. La même manipulation a été effectuée dans un premier temps avec le zinc puis par le calcium qui est un compétiteur (Figure 184).

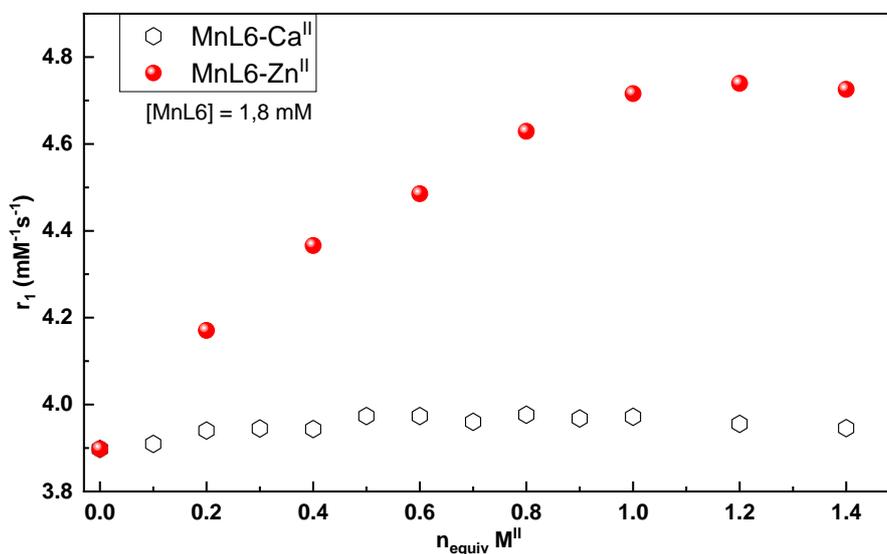


Figure 184 : [Mn^{II}L6] en présence de Zn^{II} ou Ca^{II} suivi par relaxométrie (60 MHz, 25°C). M^{II} = Ca^{II} ou Zn^{II}.

En présence d'une quantité croissante de zinc, on observe une hausse de la relaxivité. Cette hausse peut s'expliquer par l'augmentation du poids moléculaire du complexe, ce qui influe très fortement le temps de rotation corrélational (τ_r). Au bout de 1,2 équivalent de zinc on atteint un plateau qui laisse supposer la formation d'un complexe 1 : 1 hétéro-bimétallique [MnL6Zn]. On sait

que l'unité DPA est très sélective au zinc ; cela se confirme dans notre cas en exposant $[Mn^{II}L6]$ à des quantités croissantes de calcium. L'expérience dans le cas du calcium ne présente pas de variation significative de la relaxivité (Figure 136). Nous avons donc conclu que le complexe hétéro-bimétallique $[MnL6Ca]$ ne se formait pas.

B. Sélectivité du Zn^{II} dans l'albumine sérique humaine

L'albumine sérique humaine (HSA, en anglais), la protéine la plus abondante dans le plasma, est une macromolécule monomérique à plusieurs domaines, représentant le principal déterminant de la pression oncotique plasmatique et le principal modulateur de la distribution des fluides entre les compartiments corporels.^[245] Les agents d'imagerie présentant une forte affinité pour la HSA sont très intéressants pour l'angiographie.^[246] En particulier, la formation d'un adduit macromoléculaire permet de ralentir la rotation du complexe (donc augmenter le temps de rotation corrélational τ_r) et par conséquent, d'augmenter sa relaxivité.^[72]

Dans un premier temps nous avons mis le complexe $[Mn^{II}L6]$ en présence de la HSA. Un adduit est formé entre le complexe et la protéine ce qui augmente le poids moléculaire et augmente la relaxivité (Figure 185). La même expérience a aussi été effectuée avec le complexe hétéro-bimétallique $[MnL6Zn]$ avec des ajouts croissants de HSA et l'on observe une relaxivité (r_1) dépassant les $9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

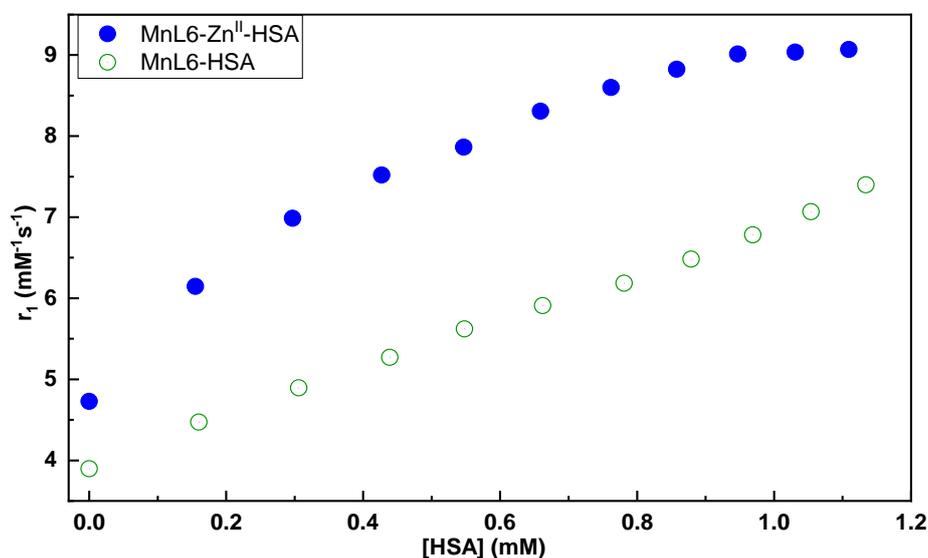


Figure 185 : Comportement de $[Mn^{II}L6]$ en présence de HSA et HSA + Zn^{II} .

IV. Conclusion

En conclusion de ces études préliminaires, nous avons développé un nouveau ligand ditopique **H₃L6** qui possède une entité bispidine-lysine pour la complexation du manganèse (II) et un motif DPA connu pour sa très forte sélectivité au zinc. Le complexe **[Mn^{II}L6]** a été isolé et des études préliminaires ont été menées afin de prouver son affinité pour le zinc. Des résultats très prometteurs ont été obtenus avec une hausse de la relaxivité du complexe de 20% en présence de 1.2 équivalents de zinc ou plus. Ces variations sont exacerbées en présence de HSA. Des études plus approfondies sont prévues, notamment afin de savoir comment est coordonné le zinc au sein du complexe. Nous n'avons pas encore déterminé si les acides carboxyliques présents sur le bicycle interviennent dans la coordination du zinc. Pour le savoir nous allons utiliser l'intermédiaire **17** qui est le ligand final avec les acides carboxyliques protégés sous forme d'ester. Les essais sont en cours.

Conclusion générale

Les travaux de cette thèse « Complexes de bispidines pour l'imagerie » ont porté sur la synthèse de nouveaux chélateurs à base de bispidines pour la complexation de l'ion terbium(III) pour la TEP et le manganèse(II) pour l'IRM afin de répondre à la demande grandissante en agents d'imagerie médicale. L'opportunité de l'utilisation de nos complexes de bispidine à base de manganèse pour la catalyse de la SOD s'est présentée à nous et a donc été explorée en parallèle de ces travaux.

Dans une première partie nous avons développé deux ligands (**H₆L1** et **H₄L2** - Figure 186) afin de complexer le Tb^{III}. Cet objectif a été atteint et nous avons été en mesure de complexer le lanthanide dans une gamme de temps courte (maximum 20 min à température ambiante à pH neutre). Les propriétés physicochimiques des complexes **[TbL1]** et **[TbL2]** ont été étudiées ; les constantes de stabilité thermodynamique sont respectivement $\log K_{\text{TbL1}} = 12,8(2)$ et $\log K_{\text{TbL2}} = 9,7(1)$. Les propriétés de luminescence des deux complexes ont également été mesurées afin d'en déterminer plusieurs paramètres tels que les temps de vie de luminescence dans l'eau, soit 1,9(2) ms pour **[TbL1]** et 1,7(2) ms pour **[TbL2]**, ou encore leur rendement quantique, soit 0,15% pour **[TbL1]** et 0,5% pour **[TbL2]**. Ce projet nous a permis de développer une première génération de ligands à squelette bispidine pour complexer le terbium(III). La suite du travail va se concentrer sur le développement de ligands bifonctionnels pour **H₆L1** et **H₄L2** afin de pouvoir coupler une unité de ciblage biologique tels qu'un anticorps, un nano-body ou encore un peptide avant de pouvoir complexer ces nouveaux bioconjugués avec un isotope radioactif et les utiliser comme radiotraceurs pour l'imagerie TEP *in vivo*.

Dans une seconde partie, nous avons développé trois ligands (**H₃L3**, **H₃L4** et **H₃L5** - Figure 186) afin de complexer le Mn^{II} et le Mn^{III} pour développer une sonde IRM rédox-activée. Ce projet s'inscrit dans la continuation du travail de trois précédents doctorants qui ont développés des ligands bispidines pour différentes applications, et en particulier des ligands capables de complexer l'ion Mn^{II} (**[MnL_{lys}]**, **[Mn3]** et **[Mn4]**). Toutefois, le potentiel rédox de **[MnL_{lys}]**, **[Mn3]** et **[Mn4]** étant trop élevé pour des applications biologiques, nous nous sommes intéressés à une nouvelle famille : **[Mn^{II}L3]**, **[Mn^{II}L4]** et **[Mn^{II}L5]**. Les trois complexes présentent des potentiels redox inférieurs à ceux de **[MnL_{lys}]**, **[Mn3]** et **[Mn4]** (de la première génération). Nous avons étudié les propriétés physicochimiques de **[Mn^{II}L3]**, **[Mn^{II}L4]** et **[Mn^{II}L5]**. Les trois complexes présentent des constantes de stabilité thermodynamique de $\log K_{\text{MnL3}} = 16,2(1)$, $\log K_{\text{MnL4}} = 17,28(3)$ et $\log K_{\text{MnL5}} = 15,80(6)$, respectivement. Les propriétés relaxométriques des complexes ont aussi été étudiées et les valeurs caractéristiques sont : $r_1(\text{MnL3}) = 3,91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r_1(\text{MnL4}) = 3,90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $r_1(\text{MnL5}) = 3,39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ à 25°C, 60 MHz et pH 7. Nous avons développé une voie de synthèse des complexes de Mn^{III} dans le méthanol, ce qui nous a permis d'étudier la stabilité des complexes **[Mn^{III}L3]**, **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]**. Cependant, les complexes

[Mn^{III}L3], **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** ne présentent pas une stabilité suffisante dans l'eau pour les caractériser de manière complète et encore moins pour les utiliser comme agents de contrastes redox IRM activés. La suite du travail doit se concentrer sur le développement de nouveaux ligands avec une meilleure stabilisation du manganèse(III) tout en conservant les propriétés de **[Mn^{III}L3]**, **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** à savoir un potentiel redox cohérent avec les couples redox biologiques, une inertie cinétique des complexes de manganèse(II) élevé, une bonne relaxivité, un système redox réversible, une bonne stabilisation du manganèse(III) ainsi qu'une bonne inertie cinétique.

Nous avons aussi exploré de potentielles propriétés de catalyse des complexes **[Mn^{III}L3]**, **[Mn^{III}L4]** et **[Mn^{III}L5]** comme mime de la superoxyde dismutase. Seul **[Mn^{III}L4]** présente une activité catalytique. La cytotoxicité des trois complexes a été étudiée et aucun des trois ne présente de toxicité dans les conditions de l'étude. L'activité anti-inflammatoire des trois complexes a été explorée, les complexes présentent un très faible potentiel anti-oxydant. Cette faible activité anti-inflammatoire pourrait s'expliquer par l'absence de pénétration des complexes dans la cellule. Des mesures complémentaires sont à prévoir afin d'évaluer ce paramètre avant d'envisager éventuellement une modification de la structure chimique des complexes, comme le couplage avec des peptides pénétrants. Une dernière application en imagerie médicale nous a intéressé durant cette thèse, il s'agit de la détection de l'ion zinc(II) par IRM. Nous avons développé la première sonde Mn-bispidine basée sur la bispidine L-lysine avec une extension spécifique à la coordination du zinc (**H₃L6** - Figure 186). Des premières études préliminaires ont été effectuées afin de confirmer la spécificité du complexe **[Mn^{III}L6]** au zinc. Les résultats sont très prometteurs car aucune variation de relaxivité du complexe **[Mn^{III}L6]** n'a été enregistrée en présence d'ion calcium(II) tandis que la relaxivité augmente en présence de zinc(II). En particulier, une hausse de 20% de la relaxivité longitudinale (r_1) a été observée en présence d'un équivalent de zinc. Afin de comprendre le mode d'action de cette nouvelle sonde, il sera nécessaire de confirmer les atomes coordinants impliqués dans la coordination du zinc. Ces études sont en cours avec notamment la synthèse et l'étude d'un analogue du ligand **H₃L6** avec les acides carboxyliques sous la forme ester (**17**).

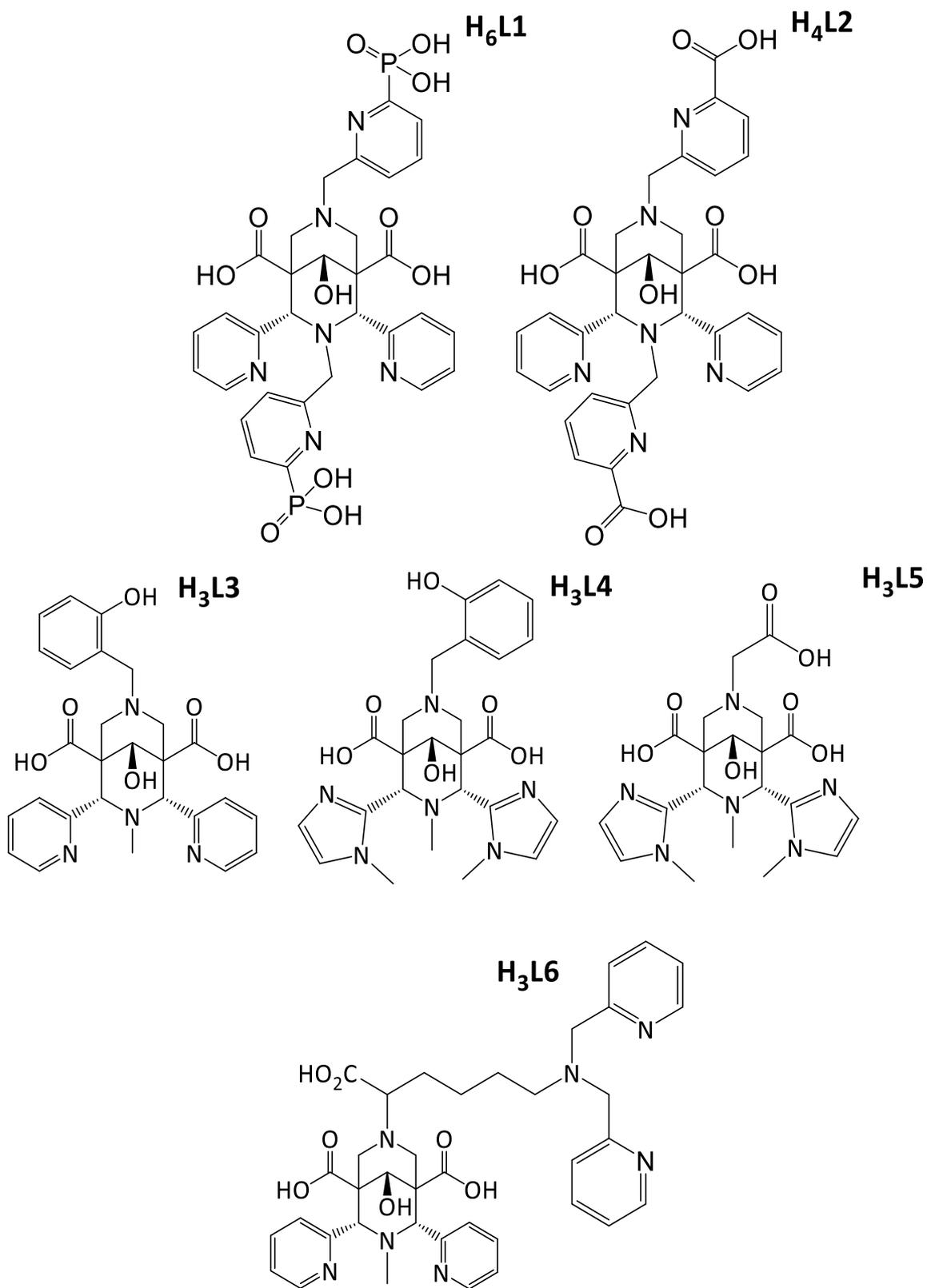


Figure 186 : Les ligands conçus pour les différents projets.

Experimental section

I. Measurements and materials

a. Solvents and starting materials.

Solvents and starting materials were purchased from Aldrich, Acros, Fluorochem, TCI chemicals and Alfa Aesar and used without further purification. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer Spectrum. ^1H and ^{13}C NMR spectra and 2D COSY, NOESY, HSQC, and HMBC spectra were recorded on Advance 400 and Advance 500 Bruker spectrometers operating at 7.04 T and 9.39 T, respectively. Chemical shifts are reported in ppm, with residual protonated solvent as the internal reference.

b. Stock solutions

All the stock solutions were prepared by weighing solid products using an AG 245ML304T100 Mettler Toledo analytical balance (precision 0.01 mg). Metal cation Tb(III) solutions were prepared from their chloride salt ($\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / $\text{LuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / ZnCl_2 / MnCl_2 , 99.9%, Sigma-Aldrich), and their concentrations were determined by colorimetric titrations with EDTA (10⁻² M, Merck, Titriplex III) according to standard procedures, using xylenol orange as indicator.^[247]

c. FPLC

The device is an Interchim puriflash gen 5 InterSoft® X "Genius". The flow rate: 250mL/min, pressure max.: 250bar, Quaternary Gradient, Air purge, Washing discs, Solvent tray with drainage system. The UV range: 200 – 400 nm multi wavelength & scan collection, spectral view & purity confirmation. Bispidine-pyridine derivatives: $\lambda = 254$ nm, bispidine-imidazole derivatives: $\lambda = 220$ nm was monitored used for the detection. Column SiO_2 : CHROMABOND Flash RS 15 SiOH 15-40 μm . Column C18: interchim PF-15C18AQ-F004 15 μm . Gradient for all purifications below.

Iterchim PF-30SIHP-JP-F0040 30 μm DCM / MeOH	Iterchim PF-15C18AQ-F004 15 μm H ₂ O / MeOH
2 min: 100% DCM	5 min: 100% H ₂ O
10 min: 10% MeOH	10 min: 70% MeOH
13 min: 15% MeOH	15 min: 100% MeOH
16 min: 20% MeOH	20 min: 100% H ₂ O
20 min: 25% MeOH	

d. HPLC

High Performance Liquid Chromatography/UV absorption spectrophotometry analysis was performed on an Agilent 1100 system equipped with a Diode-Array Detector (DAD). Samples (15-50 μL) were injected into the column (Uptisphere® CS Evolution™ C18AQ, 250 x 4.6 mm, 5 μm , Interchim), at room temperature. The pH value of the samples was adjusted to 7.4 prior to their injection. A water/methanol gradient was used for mobile phase as follows: 100% of water from 0 to 5 min post injection, linear increase to 70% MeOH at 10 min, linear increase to 100% MeOH at 15 min,

followed by a linear decrease to 100% water at 20 min before the next run. The flowrate was 1 mL/min. Bispidine-pyridine derivatives: $\lambda = 254$ nm, bispidine-imidazole derivatives: $\lambda = 220$ nm was monitored used for the detection. Gradient for all manipulations below.

**Iterchim PF-15C18AQ-F004 15 μ m
H₂O / MeOH**

5 min: 100% H₂O

10 min: 70% MeOH

15 min: 100% MeOH

20 min: 100% H₂O

e. NMR

¹H, ¹³C, ³¹P NMR spectra and 2D COSY, HSQC, NOESY, ROESY, and HMBC spectra were recorded on Advance 400 and Advance 500 Bruker spectrometers operating at 7.04 T and 9.39 T, respectively. Chemical shifts are reported in ppm, with residual protonated solvent as the internal reference.

f. Mass spectrometry

Mass measurements (MALDI) were carried out on an AutoflexTM MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). This instrument was used at a maximum accelerating potential of 20 kV in positive mode and was operated in linear mode. The delay extraction was fixed at 560 ns and the frequency of the laser (nitrogen 337 nm) was set at 5 Hz. The acquisition mass range was set to 100-10000 m/z with a matrix suppression deflection (cut off) set to 190 m/z. The equipment was calibrated with Dithranol ([M+H]⁺ 227.23), α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ([M+H]⁺ 190.17) ACTH_1-17 ([M+H]⁺ 2094.42), insulin ([M+H]⁺ 5732.52), ubiquitin I ([M+H]⁺ 8565.76) and myoglobin ([M+H]⁺ 16952.31). Each raw spectrum was opened with flexAnalysis 2.4 build 11 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) software and processed using the following parameters: signal-to-noise threshold of 1, Savitzky-Golay algorithm for smoothing, median algorithm for baseline subtraction.

Mass measurements (ESI) were recorded on an Orbitrap Exactive Plus EMR (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) mass spectrometer, coupled to an automated chip-based nanoelectrospray device (Triversa Nanomate, Advion, Ithaca, U.S.A.) operating in the positive ion mode at 1.3 kV and the pressure of the nebulizer gas was 0.40 psi. Ions were driven through the mass spectrometer with an in-source voltage of 40 eV and then thermalized in the HCD cell at 20 eV. The constant N₂ pressure in the backing source region, the HCD cell and the orbitrap analyzer were set to 2.10–5 mbar and 10–9 mbar, respectively.

g. Elemental analysis

Elemental analysis was carried out by the Service Commun d'Analyses of the University of Strasbourg.

h. Crystallography data

Crystallography data were collected on an APEX II Bruker AXS diffractometer with Mo–K α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Structure was solved by direct methods (SIR92) and refined (SHELXL-2014/7) by full-matrix least-squares methods as implemented in the WinGX software package. An empirical absorption (multi-scan) correction was applied. Hydrogen atoms were introduced at calculated positions (riding model) included in structure factor calculation but not refined with exception for the hydrogen atom on the secondary amino group (N7) whose coordinates have been freely refined (AFIX 2).

	1	20	6
Formula	C ₃₀ H ₃₂ N ₄ O ₇	C ₃₀ H ₃₂ N ₄ O ₆	C ₃₁ H ₃₄ N ₄ O ₇
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	560.59	544.60	574.62
Temperature (K)	296(2)	150	296
Crystal size (mm)	0.22×0.18×0.06	0.14×0.12×0.10	0.25×0.11×0.09
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Triclinic
Space group	P 2 ₁ /n	P-1	P-1
Cell lengths (Å)	a = 13.1361(4) b = 14.7490(5) c = 14.8041(5)	a = 10.553(2) b = 10.859(2) c = 13.234(2)	a = 10.9679(5) b = 11.6302(5) c = 12.9288(5)
Cell angles (°)	α = 90 β = 104.4930(10) γ = 90	α = 99.729(8) β = 93.264(7) γ = 113.435(7)	α = 110.227(1) β = 100.454(1) γ = 98.803(2)
Volume (Å ³); Z	2776.94(16); 4	1358.5(4); 2	1479.60(11); 2
Density (calc.) (g.cm ⁻³)	1.341	1.331	1.290
Abs. coeff. (mm ⁻¹)	0.097	0.094	0.092
F(000)	1184.0	576.0	608.0
θ_{\max}	27.524	27.54	27.479
Reflections collected	23175	21550	30572
Independent reflections	6313	6222	6715
$I > 2\sigma(I)$ reflections	3741	4637	4338
Parameters	377	365	384
R1, wR2 ($I > 2\sigma(I)$)	0.0490, 0.1108	0.0662, 0.1634	0.0457, 0.1024
R1, wR2 (all data)	0.1008, 0.1378	0.0866, 0.1764	0.0845, 0.1253
Largest diff. peak, hole (e Å ⁻³)	0.279, -0.232	0.76, -0.558	0.227, -0.194

	8	10	12
Formula	C ₃₂ H ₃₇ N ₄ O ₅ , C ₂ F ₃ O ₂	C ₂₈ H ₃₄ N ₆ O ₇	C ₂₉ H ₃₉ N ₆ O ₇ , I
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	540.50	566.61	710.56
Temperature (K)	150	150	150
Crystal size (mm)	0.11×0.04×0.01	0.12×0.05×0.01	0.21×0.13×0.06
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Triclinic
Space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n	P-1
Cell lengths (Å)	a = 15.998(3) b = 9.8521(18) c = 15.697(3)	a = 10.5189(13) b = 24.127(3) c = 11.5610(19)	a = 10.5536(11) b = 11.5043(12) c = 13.8837(14)
Cell angles (°)	α = 90 β = 92.816(5) γ = 90	α = 90 β = 110.364(5) γ = 90	α = 103.795(4) β = 94.499(4) γ = 102.168(4)
Volume (Å ³); Z	2471.1(8) ; 4	2750.7(7) ; 4	1585.5(3) ; 2
Density (calc.) (g.cm ⁻³)	1.453	1.368	1.488
Abs. coeff. (mm ⁻¹)	0.122	0.100	1.064
F(000)	1128.0	1200.0	728.0
θ _{max}	27.469	27.470	27.508
Reflections collected	15325	33022	23919
Independent reflections	5501	6277	7212
I>2σ(I) reflections	2353	4808	6703
Parameters	347	379	397
R1, wR2 (I>2σ(I))	0.0884, 0.2098	0.0726, 0.1777	0.0251, 0.0636
R1, wR2 (all data)	0.1973, 0.2738	0.0948, 0.1871	0.0278, 0.054
Largest diff. peak, hole (e Å ⁻³)	0.964, -0.741	-0.423, 1.198	0.948, -0.646

i. Potentiometric titration

Carbonate-free 0.15 M (or 0.1 M) NaOH and 0.1 M HCl were prepared by dilution of concentrated solutions from Fisher Chemicals. Potentiometric titrations were performed in 0.15 M aqueous KCl (or NaCl) under nitrogen atmosphere and the temperature was controlled at 25 ± 0.1 °C with a circulating water bath. The p[H] (p[H] = -log[H⁺], concentration in molarity) was measured in each titration with a combined pH glass electrode (Metrohm) filled with 3 M KCl. The titrant addition was automated using a 702 SM titrino system (Metrohm). Prior to each experiment, the electrode was calibrated as a hydrogen concentration probe by titrating known amounts of HCl with KOH (or NaOH) in 0.1 M electrolyte solution. A plot of potential versus p[H] allows the determination of the electrode standard potential (E°) and the slope factor (f). The GLEE program was used for glass electrode calibration. Continuous potentiometric titrations with 0.1 M KOH (or NaOH) were conducted on aqueous solutions containing 1.5-1.8 mM of ligand in 0.15 M KCl (NaCl) (V₀ = 5 mL), with 2 minutes waiting time between successive points. The titrations of the metal complexes were performed with the same ligand solution to which 1 equivalent of the metal cation had been added. Experimental data were refined using the computer program Hyperquad 2008.^[248] All equilibrium constants are concentration quotients rather than activities and are defined as: $K_{mlh} = [M_m L_l H_h] / [M]_m [L]_l [H]_h$. The ionic product of water at 25 °C and 0.15 M ionic strength is pK_w = 13.77. Fixed values were used for

pK_w , ligand acidity constants and total concentrations of metal, ligand, and acid. All values and errors (one standard deviation) reported are at least the average of two independent experiments.

j. Dissociation kinetics studies

The kinetic inertness of **Mn^{II}L3**, **Mn^{II}L4** and **Mn^{II}L5** was assessed at 37°C and in 0.15 M NaCl, via transmetallation studies of the manganese complexes (1.1 mM) with Zn^{II} at pH = 6 (50 mM MES buffer, in the presence of 10- and 50-fold excess of the exchanging Zn^{II}), and at pH = 3 and 3.49 (50 mM KH-phthalate buffer), pH = 4 (50 mM dimethyl-piperazine), and pH = 5 (50 mM N-methylpiperazine), in the presence of 50-fold excess of Zn^{II}. The excess of the exchanging metal ion guarantees the pseudo-first order conditions. For the duration of the experiments (up to 1 month), the samples were stored in a thermostat at 37 °C and the water proton relaxation rates at 60 MHz were monitored upon time using a Bruker Minispec relaxometer. The pH was controlled for each sample at the end of the kinetic measurements to confirm that it remained stable during the experiment. The analysis of the experimental data was performed using Visualiseur/Optimiseur running on a MATLAB 8.3.0 (R2014a) platform.

k. Relaxometric Measurements

Proton NMRD profiles of manganese complexes were recorded in an aqueous solution ($C_{MnL} = 1.1-1.3$ mM, pH = 7.0) at 25°C and 37 °C on a Stellar SMARTracer Fast Field Cycling relaxometer (0.01-10 MHz) and a Bruker WP80 NMR electromagnet adapted to variable field measurements (20-80 MHz) and controlled by a SMARTracer PC-NMR console. The temperature was monitored by a VTC91 temperature control unit and maintained by a gas flow. The temperature was determined by previous calibration with a Pt resistance temperature probe.

Relaxometric pH-titration: 30 samples (for r_2) and 24 samples (for r_1) with $[Mn^{II}L3]_{r_2} = 0.3$ mM (1.86 mM for r_1) and a total volume of 350 μ L were prepared, the ionic strength was adjusted to 0.15 M with NaCl. A calculated volume of [NaOH]= 97.5 mM was determined for each sample, the solutions were stirred for 3h. The relaxation times (T_1 & T_2) were measured at 3h and 24h (Minispec 60 MHz, 25°C) and plotted as a function of pH.

l. ¹⁷O NMR measurements

Variable temperature ¹⁷O transverse (T_2) relaxation times and chemical shifts of aqueous solution of manganese complexes ($C_{Mn^{2+}} = 4.32$ kg/mmol [**Mn^{II}L3**]; 3.793 kg/mmol [**Mn^{II}L4**] and 4.05 kg/mmol [**Mn^{II}L5**] (pH = 7.0), were measured using a Bruker ARX 400 spectrometer (9.4 T). As stated before, the absence of free metal ion was checked by the Xylenol Orange test and the concentration of Mn(II) was checked by the chemical shift measurement of tert-butanol induced by the magnetic susceptibility. The samples were sealed in a glass sphere fitted into a 10 mm NMR tube to eliminate magnetic susceptibility corrections to the chemical shifts. To improve sensitivity in ¹⁷O NMR, ¹⁷O-

enriched water (11.10 % H₂¹⁷O, Cortecnet) was added to the solutions to yield approximately 1% ¹⁷O enrichment. An acidified water solution (HClO₄, pH 3) was used as external reference. It was previously shown that an acidified water reference or the diamagnetic Zn^{II} analogue of the Mn^{II} complex measured at the same concentration and pH as the paramagnetic sample give identical results. The temperature varied between 273 and 363 K. The temperature was calculated according to previous calibration with ethylene glycol and methanol. Transverse relaxation times (T₂) were obtained by the Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo technique. The technique of the ¹⁷O NMR measurements on paramagnetic complexes has been described in the Annex (part II). The ¹⁷O NMR data have been treated according to the Solomon-Bloembergen-Morgan theory of paramagnetic relaxation using Visualiseur/Optimiseur running on a MATLAB 8.3.0 (R2014a) platform.

m. UV-visible absorption, emission, and excitation spectra + lifetime.

All the absorption spectra of Mn^{III}-bispidine complexes were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 950 UV/VIS/NIR absorption spectrometer from Perkin Elmer. Oxidation of **H₃L3**, **Mn^{II}L3**, **Mn^{II}L4** and **Mn^{II}L5** were monitored in the following conditions: Solution of 2 mL of [**Mn^{II}L3**] = 1mM ([**H₃L3**] = 0.1 mM, [**Mn^{II}L4**] = 2mM and [**Mn^{II}L5**] = 2mM) in HEPES (50 mM, pH 7.4) were prepared and 20 equivalents of H₂O₂ (≥30%, Sigma Aldrich) and catalytic amount of HRP (Sigma Aldrich) were used.

Steady state emission spectra were recorded on an Edinburgh Instrument FLP920 spectrometer working with a continuous 450W Xe Lamp and a red sensitive R928 photomultiplier from Hamamatsu in Pelletier housing for visible detection (230 to 900 nm) or a Hamamatsu R5 509-72 photomultiplier for the Vis-NIR part. All spectra were corrected for the instrumental functions. For emission spectra upon UV excitation, a 330 nm cut-off filter was used to eliminate second order artefacts. Phosphorescence lifetimes were measured on the same instrument working in the Multi-Channel Spectroscopy (MCS) mode, using a Xenon flash lamp as the excitation source. For short μs lifetimes, the intensity decay was corrected for the lamp intensity decay profile using a scattering solution of Ludox in water. Luminescence quantum yields were measured according to conventional procedures,^[249] with optically diluted solutions (optical density < 0.05), using [Ru(bipy)₃CL₂] in water (Φ = 0.04)^[250] as reference for Eu, a bipyridine Tb complex, [TbL(H₂O)] in water (Φ = 0.31)^[251] as reference for Tb, and cardiogreen (IR125) in MeOH (Φ = 0.078) for Yb.^[252] The errors are estimated to 10 % on the lifetimes and 15 % on the luminescence quantum yields. Hydrations numbers, q of Tb complexes were obtained using equation of Beeby *et al* (detail in the Annex part I).^[253]

The automatic UV-visible spectrophotometric titrations as a function of pH for the ligands (**L1**, **L2** and **L3**) and the complexes 1-1 (**Zn^{II}L3**) were performed in water (2% of MeOH for **H₃L3** and **Zn^{II}L3**). Typically, 40 mL of the solution were introduced into a jacketed cell (Metrohm) maintained at 25°C by the flow of a Lauda E200 thermostat, the final concentrations were [**H₆L1**] = 5 x10⁻⁵ M, [**H₄L2**] = 4.24 x10⁻⁵ M, [**H₃L3**] = 1 x10⁻⁴ M and [**Zn^{II}L3**] = 1 x10⁻⁴ M. The initial pH was adjusted around 2 with HCl

solution (0.106 M) and the titration of the ligands and Zn^{II}-complex were then carried out automatically (around 2 ≤ pH ≤ 11) using automatic titrator of the 794 Basic device for the controlled adding of the NaOH solution (0.108 M). After each addition of the base and subsequent measurement of the potential of the solution by the automated system (DET-pH method [DET stands for Dynamic Equivalent point Titration] in the *Tiamo light 1.2* software – Metrohm AG Ltd]) a UV-visible absorption spectrum (200–800 nm) was repeatedly recorded using a Varian Cary 50 spectrophotometer fitted with Hellma optical fibres (Hellma, 041.002-UV) and an immersion probe made a suprasil quartz (Hellma, 661.500-QX), that was interfaced (Cetrib) with the potentiometric unit. The spectrophotometric data were analyzed with *Specfit* program which adjusts the absorptivities and the stability constants of the species formed at equilibrium.^[254]

Nb: Concerning the titration **H₃L₃**, the ligand was first dissolved in water at pH 10 to improve the solubility then the pH was adjusted to 7.4.

Manual titration as function of pH were monitored by UV/Vis absorption spectra which were recorded on a Specord 205 (Analytic Jena). For **Mn^{II}L₄** a solution of 2 mL (I = 0.1 NaCl) of complex was prepared ([**Mn^{II}L₄**] = 0.8 mM). The first pH was adjusted with a solution of HCl (2.99 M). Subsequently, the pH was adjusted with 2 μL of NaOH (0.1 M, 1M and 5M).

Batch titrations as function of pH were monitored by UV/Vis absorption spectra which were recorded on a Specord 205 (Analytic Jena). For **Mn^{II}L₃**, **Mn^{II}L₄** and **Tb^{III}L₁**, a solution of 110 mL (I = 0.1 NaCl) of complex was prepared ([**Mn^{II}L₃**] = 0.1 mM, [**Mn^{II}L₄**] = 0.8 mM and [**Tb^{III}L₁**] = 5 × 10⁻⁵ M). The first pH was adjusted with a solution of HCl (2.99 M). Subsequently, the pH was adjusted with 2 μL of NaOH (0.1 M, 1M and 5M). For a selection of pH values, a solution of 2 mL was collected. The solution of complexes was stirred for 3h (**Mn^{II}L₃**) and 30 min (**Tb^{III}L₁**). 2 ≤ pH ≤ 11. The spectrophotometric data were analyzed with *Specfit* program.^[255]

n. Cyclic voltammetry

Instrumentation

Cyclic voltammograms were recorded using a Metrohm potentiostat (AUTOLAB model). The auxiliary electrode was a Pt wire, and the working electrode was a glassy carbon disk (3 mm diameter) carefully polished before each voltammogram with a 1 μm diamond paste, washed with water and finally air dried.

UV-visible spectra were recorded on a thermostated CARY 300 Bio UV-visible spectrophotometer using a double-beam mode with media as the reference or on a SPECORD S600 Analytik Jena spectrophotometer.

Cyclic Voltammetry

Samples were directly added into the cell under stirring to reach desired concentration (between 100 μM and 1 mM) in a 3 mL cell containing 1mL of MOPS (50mM) pH 7.5. Glassy carbon working electrode, platinum wire counter electrode and an aqueous saturated calomel electrode (SCE) were used. They were washed with distilled water prior to experiments. Glassy carbon electrode was also polished each time. The software used was Nova. CV staircase method with the following method: Scan rate: 200 or 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$; Start potential: 0 V_{ocp} ; Upper vertex potential: 1.1 V_{ref} ; Lower vertex potential: -0.7 V_{ref} ; Step: 0.005V.

McCord and Fridovich assay protocol

- Xanthine (6.6 mg, $M=174.09$ g/mol, 37.9 μmol) was dissolved in HEPES 50 mM (190 mL) pH 7.6 by heating at 80°C for 3 hours to obtain a solution at 200 μM . The solution was cooled to room temperature and kept in the dark.
- XTT tetrazolium (3.5 mg, $M= 673.53$ g/mol, 5.2 μmol) was dissolved in the xanthine solution (52 mL) to get a solution at 100 μM in XTT.
- 1.5 mL of the xanthine/XTT solution was added in a microcuvette. The cuvette is left in the thermostated spectrophotometer for 10 minutes for the temperature to reach 25°C.
- 4 μL of a solution of xanthine oxidase at 20 mg/mL in water (milliQ) is added in the microcuvette. The absorbance at 470 nm was measured for 4 minutes.
- After 1.5 minutes, few μL of the SOD mimic at 100 μM are added in the cuvette.

The slope of the absorbance was measured in absence of SOD mimics (p_1) between 0 and 1.5 minutes and in presence of SODm (p_2) between 2 and 4 minutes. The theoretical calculation of the chemical kinetics revealed that the temporal evolution of the absorbance at a given wavelength is linear if the concentration in superoxide is negligible compared to that of the XTT marker. This criteria is fulfilled for a concentration in XTT marker around 100 μM and for a slope p_1 comprised between 0.027 et 0.028 min^{-1} . The volume of xanthine oxidase at 20 mg/mL has thus to be tuned at the beginning to get the slope p_1 in the appropriate range.

This protocol is repeated for several concentration of SODm added. For each concentration, the value $\frac{p_1-p_2}{p_2}$ is calculated and plotted as a function of the concentration in SOD mimics in the microcuvette ($0.6 < \frac{p_1-p_2}{p_2} < 1.2$). The IC_{50} can be extrapolated from the linear regression of this curve by determining the concentration of SODm for which $\frac{p_1-p_2}{p_2}$ is equal to 1 ($p_1 = 2 * p_2$).

The IC_{50} value is not an absolute value as it is dependent on the experimental conditions, hence on. But from the measured IC_{50} values, an apparent kinetic constant value which is independent of both the concentration and the nature of the detector can be calculated. When the concentration of the SOD mimic is the IC_{50} , the superoxide anion reacts with the XTT tetrazolium and with the SOD

mimics at the same speed. From the known kinetic constant of XTT tetrazolium, that of the SOD mimic can be determined.

$$k_{XTT \text{ tetrazolium}} * [O_2^{\bullet-}] * [XTT \text{ tetrazolium}] = k_{SOD \text{ mimic}} * [O_2^{\bullet-}] * IC50$$

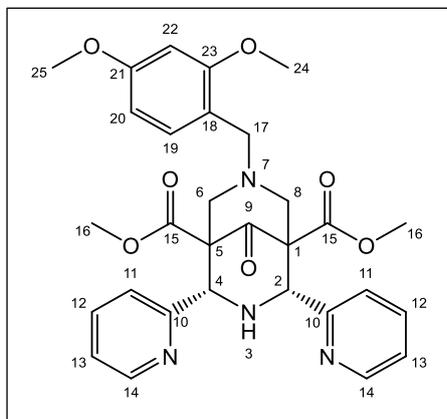
$$k_{SOD \text{ mimic}} = \frac{k_{XTT \text{ tetrazolium}} * [XTT \text{ tetrazolium}]}{IC50}$$

The intrinsic activities of SOD mimics ($k_{SODmimic}$) can be compared by using these catalytic rate values.

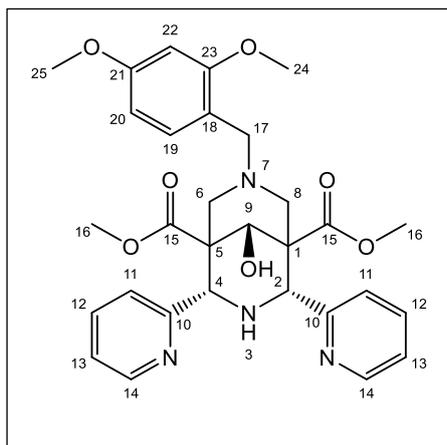
II. Organic synthesis

Note: The numbering respects the IUPAC numbering of the bispidine skeleton. However, for symmetry reasons C2 and C4 as well as C6 and C8 and C1 and C5 are equivalents for most compounds.

Precursor **P1** and **P2** have been obtained following established protocols.^{[28], [256]}

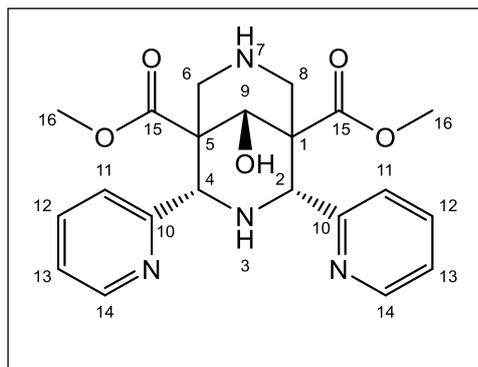


Bispidone 1 ($C_{30}H_{32}N_4O_7$, 560.23 $g\text{mol}^{-1}$). Precursor **P1** (3.32 g, 9.00 mmol, 1 equiv) was dissolved in 30 tetrahydrofuran and heated to 50°C under stirring. Then 2,4-dimethoxybenzylamine (1.60 mL, 10.7 mmol, 1.2 equiv) and formaldehyde (1.60 mL, H₂O at 36-38%, 21.6 mmol, 2.4 equiv) were added under stirring for 16h at 65°C. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and washed with MeOH yielding the product as a white powder (2.3 g, 45%, average yield 46%). TLC (DCM/MeOH - 90/10); $R_f = 0.68$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 2.91$ (d, $J = 11.3$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.29 (s, 2H, CH_2 , 17), 3.61 (s, 3H, OCH_3 , 24), 3.61 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.73 (s, 6H, OCH_3 , 16), 3.78 (s, 3H, OCH_3 , 25), 5.10 (s, 2H, CH, 2 and 4), 5.18 (s, 1H, 3), 6.26 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, 1H, 20), 6.29 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, 1H, 22), 6.95 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 1H, 19), 7.12 (m, 2H, 13), 7.51 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 2H, 11), 7.59 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 2H, 12), 8.36 (m, 2H, 14); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 52.1$ (16), 54.9 (2 and 4), 55.4 (24), 57.6 (25), 61.3 (17), 66.5 (6 and 8), 98.3 (1 and 5), 103.3 (22), 118.0 (20), 122.3 (18), 122.8 (13), 131.7 (11), 136.2 (12), 148.5 (19), 157.5 (14), 158.9 (10), 160.2 (23 and 21), 169.9 (15), 205.5 (9) ppm.



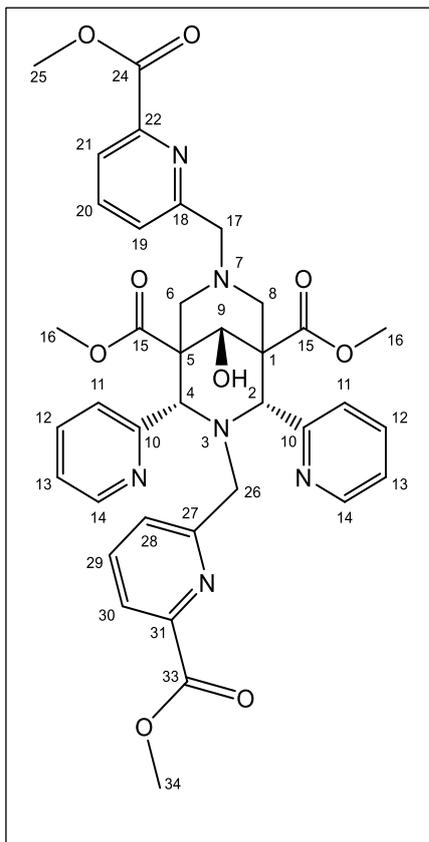
Bispidol 2 ($C_{30}H_{34}N_4O_7$, 562.24 $g\text{mol}^{-1}$). **Bispidone 1** (0.6 g, 1.07 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (30 mL) and was cooled at -78°C in a bath of acetone/dry ice. Then, sodium borohydride (30 mg, 0.80 mmol, 0.75 equiv) was slowly added. After 2h at -78°C the reaction was completed as indicated by $^1\text{H NMR}$ spectra. Ammonium chloride (pH 5, 5 mL) was added under stirring. Then water (50 mL) was added, the product was extracted by dichloromethane (3 x 30 mL) and dried with MgSO_4 , and finally the solvents were removed under reduced pressure. The product was purified by flash column chromatography (SiO_2 , 100% DCM to 80% DCM in 30 min). Pure product was obtained as a white solid (0.385 g, 64%, average yield 54%). TLC (DCM/MeOH - 90/10); $R_f = 0.45$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 2.46$ (d, $J = 12.00$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.29 (s, 2H, 17), 3.49 (d, $J = 12.00$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.55 (s, 6H, OCH_3 , 16), 3.64 (s, 3H, OCH_3 , 24), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 4.31 (s, H, 9), 5.10 (s, 1H, 3), 5.18 (s, 2H, 2 and 4), 6.35 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$

Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, 1H, 20) 6.38 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, 1H, 22), 7.05 (m, 2H, 13), 7.09 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 2H, 11), 7.43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 2H, 19) 7.63 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 2H, 12), 8.36 (m, 2H, 14); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 50.2$ (5 and 1), 52.4 (2 and 4), 53.0 (16), 56.1 (6 and 8), 56.2 (25), 58.8 (24), 68.5 (17), 75.1 (9), 99.8 (22), 105.2 (20), 119.4 (18), 123.2 (13), 124.2 (11), 134.1 (12), 138.1 (19), 149.9 (14), 158.9 (10), 161.0 (23), 162.5 (21), 174.2 (15) ppm; **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 563.761$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 564.154 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 24%), 565.169 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 0.36%).



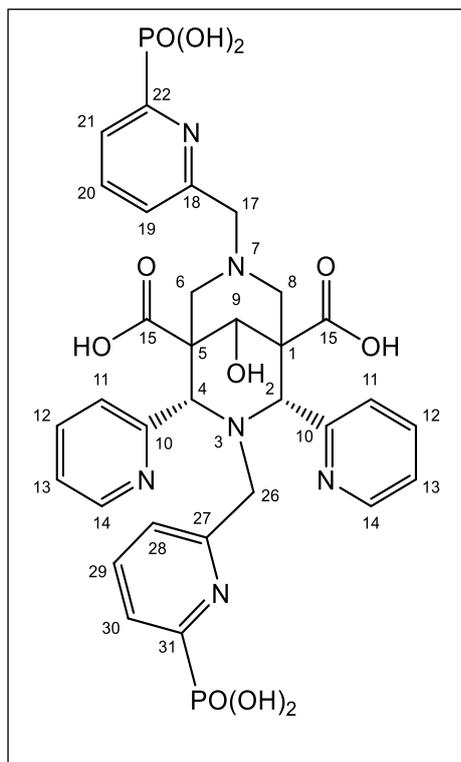
Bispidol 3 ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5$, 412.17 g mol^{-1}). To a solution of **bispidol 2** (0.744 g, 1.3 mmol, 1 equiv) in 60 mL of dichloromethane was added trifluoroacetic acid (13.6 mL, 177 mmol, 136 equiv) and the solution was stirred at 50°C overnight. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum, the residue dissolved in methanol and the purple solution was stirred at 65°C for 1h. After the solvent was filtered hot and the purple solid was purified by flash

column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH - 100% DCM to 80% in 30 min). The pure compound was obtained as a white solid (0.450 g, 83%, average yield 80%). TLC (DCM/MeOH - 90/10); $R_f = 0.39$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 3.49$ (s, 2H, 2 and 4), 3.55 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 4.03 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.61 (s, 6H, OCH_3 , 16), 4.64 (s, 1H, 9), 5.33 (s, 2H, 3 and 7), 7.18 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, 2H, 13), 7.46 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, 2H, 11), 7.71 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 2H, 12), 8.63 (m, 2H, 14); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 41.4$ (8 and 6), 51.9 (2 and 4), 53.2 (16), 67.6 (1 and 5), 73.3 (9), 124.7 (13), 125.3 (11), 139.0 (12), 150.8 (14), 158.2 (10), 171.6 (15) ppm. **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 413.739$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 414.750 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 24%), 415.810 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 0.36%).



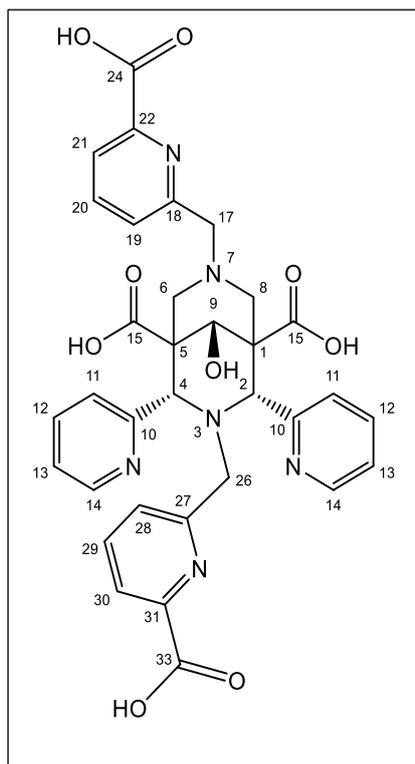
Bispidol 4 ($C_{37}H_{38}N_6O_9$, $710.27 \text{ g mol}^{-1}$). To an acetonitrile solution (50 mL) of **Bispidol 3** (0.450 g, 1.09 mmol, 1 equiv) was added methyl 6-(bromomethyl)picolinate (0.745 g, 3.27 mmol, 3 equiv) and potassium carbonate (0.451 g, 3.27 mmol, 3 equiv). After, the mixture was heated to reflux for 2 days, the solution was filtered, then the product was evaporated under vacuum. The obtained solid was dissolved in a mixture of DCM/water (1/1 - 200 mL), then the product was extracted with DCM (3*50 mL). Subsequently the product was dried with $MgSO_4$, and the solvent evaporated. The solid was purified by flash column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH, 100/0 - 80/20 in 25 min). The pure compound was obtained as a white solid (0.179 g, 23%). TLC (DCM/MeOH - 90/10); $R_f = 0.20$; 1H NMR (400 MHz, $25^\circ C$, $CDCl_3$) : $\delta = 2.39$ (d, $J = 12.2$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 2.89 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.54 (s, 2H, 17), 3.62 (s, 6H, OCH_3 , 16), 3.79 (s, 2H, 26), 3.93 (s, 3H, OCH_3 ,

25), 4.01 (s, 3H, OCH_3 , 25/34), 4.23 (s, H, 9), 5.34 (s, 2H, 4 and 2), 6.98 (m, 2H, 13), 7.37 (td, $^3J_{HH} = 7.7$ Hz, $^4J_{HH} = 1.7$ Hz, 2H, 12) 7.47 (d, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 1H, 19), 7.55 (t, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 1H, 20), 7.75 (m, 1H, 30), 7.78 (d, $^3J_{HH} = 7.8$ Hz, 2H, 28), 7.86 (t, $^3J_{HH} = 7.7$ Hz, 1H, 29), 8.02 (d, $^3J_{HH} = 8.0$ Hz, 2H, 11), 8.12 (dd, $^3J_{HH} = 7.77$ Hz, $^4J_{HH} = 0.8$ Hz, 1H, 21), 8.32 (m, 2H, 14); ^{13}C NMR (126 MHz, $25^\circ C$, $CDCl_3$): $\delta = 51.56$ (5 and 1), 52.72 (16), 53.32 (25), 53.81 (34), 56.36 (6 and 8), 64.97 (17 and 26), 65.45 (4 and 2), 74.09 (9), 122.51 (13), 123.16 (28), 124.20 (21), 125.30 (11), 126.84, 128.32 (30), 135.90 (12), 136.78 (29), 137.13 (19), 137.45 (20), 148.63 (14), 161.02 (22/31), 166.10 (10), 166.32 (33 and 24), 173.71 (15) ppm; **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 711.753$ ($[M + H]^+$, 100%), 712.803 ($[M + H]^+$, 24%), 713.906 ($[M + H]^+$, 0.36%).



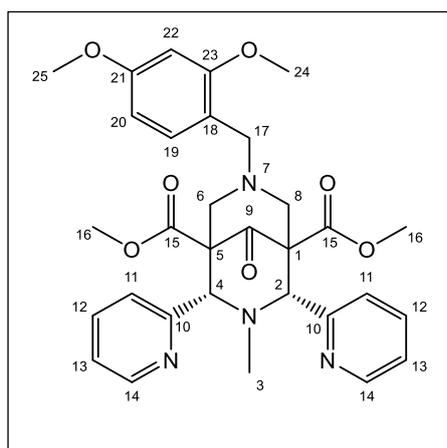
Ligand H₆L1 (C₃₇H₃₈N₆O₉, 7266.58 g mol⁻¹). To an anhydrous acetonitrile solution (50 mL) of **compound 3** (0.189 g, 0.46 mmol, 1 equiv) was added diethyl (6-(chloromethyl)pyridin-2-yl)phosphonate (0.266 g, 1.01 mmol, 2.2 equiv) and potassium carbonate (0.140 g, 1.01 mmol, 2.2 equiv) under inert atmosphere. After, the mixture was stirred at 40°C for 16h, the solution was filtered, then the mixture was evaporated under vacuum. The crude intermediate **5** was used without further purification. The solid was dissolved in HCl (30 mL, 6M), the mixture was heated at 55°C for 3 days. Subsequently, the solvent was evaporated, and the product was purified by flash chromatography (C₁₈, using H₂O/MeCN from 100/0 to 0/100) to give **I¹** and **I²**. Then, the mixture was basified (pH 12) with LiOH and stirred for 16h. The solvent was evaporated, and the product purified by flash

chromatography (C₁₈, using H₂O/MeCN from 100/0 to 0/100) to give **L1** (0.102 g, 52%). TLC (MeOH/H₂O - 10/90); R_f = 0.26; ¹H NMR (500 MHz, D₂O, pD 12.1) δ = 2.20 (d, J = 12.6 Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 2.89 (d, J = 12.5 Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.49 (s, 2H, 26), 3.54 (s, 2H, 17), 3.96 (s, 1H, 9), 5.16 (s, 2H, 2 and 4), 7.12 (d, ³J = 7.1 Hz, 1H, 28), 7.18 – 7.23 (m, 2H, 13), 7.24 – 7.26 (m, 1H, 19), 7.34 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, 11), 7.57 – 7.64 (m, 2H, 29 and 30), 7.64 – 7.70 (m, 2H, 12), 7.71 – 7.77 (m, 1H, 21), 7.83 – 7.89 (m, 1H, 20), 8.43 – 8.53 (m, 2H, 14). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O, pD 12.1) δ = 51.77 (1 and 5), 56.50 (26), 56.90 (6_{ax/eq} and 8_{ax/eq}), 62.83 (2 and 4), 65.39 (17), 74.08 (9), 122.67 (13), 124.21 (28), 124.38 (29 and 30), 124.91 (19), 125.05 (21), 126.48 (11), 136.86 (20), 136.96 (12), 149.41 (14), 158.77 (18 and 27), 158.87 (10), 163.14 (22 and 31), 178.87 (15). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O, pD 12.1, 25°C) δ = 6.45, 6.48. MALDI (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: m/z = 727.348 ([M + H]⁺, 100%), 728.346 ([M + H]⁺, 24%), 729.380 ([M + H]⁺, 0.36%). Elemental analysis: calculated for **L1 • 2 TFA**, % C 44.36, % H 4.01, % N 8.92. Found % C 44.04, % H 3.59, % N 8.80; retention time was 13.30 min. A second batch with different TFA/CH₃OH content was also synthesized. Elemental analysis: calculated for **L1 • 3 CH₃OH**, % C 49.64, % H 5.39, % N 10.22. Found % C 49.14, % H 5.22, % N 10.10; retention time was 13.31 min on our standard analytical HPLC method (Uptisphere[®] CS EvolutionTM C18AQ, H₂O/CH₃OH).



Ligand H₄L₂ (C₃₃H₃₀N₆O₉, 654.21 gmol⁻¹). **Bispidol 3** (179 mg, 0.25 mmol) was dissolved in a mixture of H₂O/THF (6 mL/4 mL) and lithium hydroxide (60 mg, 2.5 mmol) was added at room temperature under stirring. After 16 h, the mixture was evaporated under reduced pressure and was purified by column chromatography (C₁₈, 100% to 97% of MeOH in 20 min). Pure product (158 mg, 97%) was obtained as a powder. TLC (MeOH/H₂O - 97/3); R_f = ; ¹H NMR (DMSO- d₆, 400 MHz): δ= 3.27 (s, 2H, 26), 3.50 (d, J= 11.4 Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 4.00 (d, J= 11.4 Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.16 (s, 1H, 9), 4.56 (s, 2H, 17), 5.08 (s, 2H, 2 and 4), 7.07 (d, ³J= 7.5 Hz, 1H, H19), 7.12 (dd, ³J= 7.2 Hz, ⁴J= 5.2 Hz, 2H, 13), 7.41 (d, ³J= 7.6 Hz, 2H, 11), 7.61 (td, ³J= 7.7 Hz, ⁴J= 1.6 Hz, 2H, 12), 7.69 – 7.80 (m, 2H, 20/21), 8.01 (d, ⁴J= 4.2 Hz, 2H, 14), 8.06 (d, ²J= 7.3 Hz, 1H, 30), 8.22 – 8.34 (m, 2H, 28 and 29); ¹³C

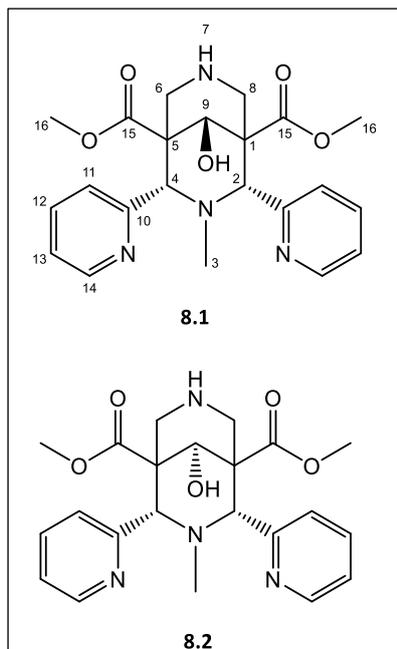
NMR (DMSO-d₆, 150 MHz) δ= 48.9 (1 and 5), 56.0 (6 and 8), 57.2 (26), 60.9 (17), 64.3 (2 and 4), 72.8 (9), 122.4 (19), 122.8 (13), 124.9 (28), 126.8 (22), 127.4 (11), 129.0 (30), 136.3, 136.9 (20), 138.8 (29), 146.9, 148.2 (14), 149.1 (C_{quat}), 151.2 (C_{quat}), 156.7 (C_{quat}), 157.2 (C_{quat}), 165.9 (C_{quat}), 166.0 (C_{quat}), 170.5 (C_{quat}); Mass Spectrometry: **MALDI** (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: m/z = 655.77 ([M + H]⁺, 100%), 656.76 ([M + H]⁺, 33%), 657.77 ([M + H]⁺, 9%); Elemental Analysis: Calculated for **L₂ • 1.5 H₂O**, %C 58.15, %H 4.88, %N 12.33. Found: %C 57.91, %H 4.78, %N 12.53; retention time was 7.46 min on our standard analytical HPLC method (Uptisphere® CS Evolution™ C18AQ, H₂O/CH₃OH).



Bispidone 6 (C₃₁H₃₄N₄O₇, 574.24 gmol⁻¹). Precursor **P2** (3 g, 7.7 mmol, 1 equiv) was dissolved in 60 mL tetrahydrofuran and heated to 50°C. 2,4-dimethoxybenzylamine (1.4 mL, 9.24 mmol, 1.5 equiv) and formaldehyde (1.3 mL, in H₂O at 36%-38%, 18.5 mmol, 2.4 equiv) were added successively. The reaction mixture was heated under reflux (70°C) for 16h. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure. The product was washed with cold MeOH yielding after evaporation of solvent a white powder (3.55 g,

81%, average yield 85%). TLC (DCM/MeOH - 90/10); R_f = 0.61; ¹H NMR (400 MHz, 25°C, CDCl₃) : δ= 1.93 (s, 3H, 3), 2.47 (d, J= 12.0 Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.07 (d, J= 12.5 Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.38 (s, 2H, 17), 3.82 (s, 6H, OCH₃, 16), 3.85 (s, 3H, OCH₃, 24), 3.95 (s, 3H, OCH₃, 25), 4.67 (s, 2H, 2 and 4), 6.43 (dd, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.4 Hz, 1H, 20), 6.59 (d, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, 1H, 22), 7.04 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 1H, 19), 7.05 (ddd,

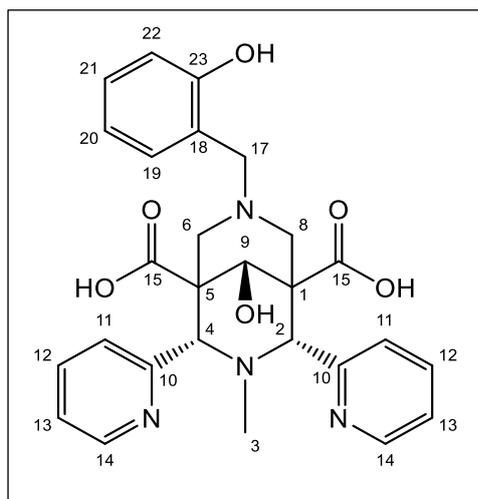
$^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 2H, 13), 7.48 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.8 \text{ Hz}$, 2H, 12), 8.0 (d, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, 2H, 11), 8.42 (m, 2H, 14). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C, CDCl_3): $\delta = 43.22$ (3), 52.48 (16), 55.55 (24 and 25), 55.81 (17), 59.06 (6 and 8), 62.09 (1 and 5), 74.02 (2 and 4), 98.79 (22), 103.85 (20), 117.79 (18), 122.83 (13), 123.73 (11), 133.20 (19), 136.14 (12), 148.91 (14), 158.76 (10), 159.35 (23), 160.76 (21), 168.69 (15), 204.08 (9); **MALDI** (Dithranol MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 575.070$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 576.069 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 24%), 577.109 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 0.36%).



Bispidol 8 ($\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$, 426.19 g mol^{-1}). **Bispidone 6** (0.2 g, 0.35 mmol, 1 equiv) was dissolved in anhydrous tetrahydrofuran (50 mL) and was cooled at -78°C in a bath of acetone/dry ice. Then, sodium borohydride (5 mg, 0.14 mmol, 0.4 equiv) was slowly added. After 2h at -78°C the reaction was completed as indicated by $^1\text{H NMR}$. Ammonium chloride (pH 5, 5 mL) was added under stirring. Then water (50 mL) was added, the product was extracted by dichloromethane (3 x 30 mL) and dried with MgSO_4 , and finally the solvents were removed under reduced pressure and the product was obtained as a white solid. At the end of this reaction, we had 2 diastereomers (which can be seen by NMR). We decided to not separate them before the deprotection of the amine to limit the loss of product. To a solution of **bispidol 7** (0.375 g, 0.65 mmol, equiv) in 50 mL of dichloromethane was added trifluoroacetic acid (6.8 mL, 88.4 mmol, 136 equiv) and the solution was stirred at 50°C overnight. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum, the residue taken up in methanol and the purple solution was stirred at 65°C for 1h. After the solvent was filtered, hot and the purple solid was purified by flash column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 100% DCM to 80%). The pure compound was obtained as a white solid (0.240 g, 74%, average yield 80%).

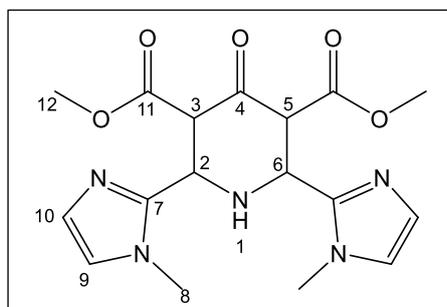
Bispidol 8.1: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25°C, MeOD): $\delta = 1.53$ (s, 3H, 3), 3.58 (d, $J = 13.0 \text{ Hz}$, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.61 (s, 6H, OCH_3 , 16), 4.33 (d, $J = 13.0 \text{ Hz}$, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.53 (s, 1H, 9), 4.75 (d, $J = 1.2 \text{ Hz}$, 2H, 2 and 4), 7.36 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 2H, 13), 7.53 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, 11), 7.8 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.8 \text{ Hz}$, 2H, 12), 8.64 (m, 2H, 14); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C MeOD): $\delta = 40.48$ (3), 46.92 (6 and 8), 50.19 (1 and 5), 51.67 (16), 66.23 (2 and 4), 72.06 (9), 123.31 (13), 127.37 (11), 136.81 (12), 149.11 (14), 157.44 (10), 169.08 (15) ppm; TLC (DCM/MeOH - 96/4); $R_f = 0.34$; **Bispidol 8.2**: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 25°C, MeOD): $\delta = 1.68$ (s, 3H, 3), 3.47 (d, $J = 12.9 \text{ Hz}$, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.89 (d, $J = 12.9 \text{ Hz}$, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 3.63 (s, 6H, OCH_3 , 16), 4.29 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, 2H, 2 and 4), 4.87 (s, 1H, 9), 7.35 (m, 2H, 11), 7.42 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.1 \text{ Hz}$, 2H, 13), 7.85 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.8 \text{ Hz}$, 2H, 12), 8.7 (m, 2H, 14); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C MeOD): $\delta = 40.33$ (3), 40.25 (6 and 8), 51.76 (16), 51.44 (1 and 5), 70.61 (9), 72.29 (2 and 4), 123.93 (13), 124.48 (11), 137.63 (12), 149.86 (14), 155.04 (10),

169.54 (15) ppm; TLC (DCM/MeOH - 96/4); $R_f = 0.24$; **MALDI** (Dithranol MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 427.09$ ($[M + H]^+$, 100%), 428.09 ($[M + H]^+$, 24%), 429.13 ($[M + H]^+$, 0.36%).



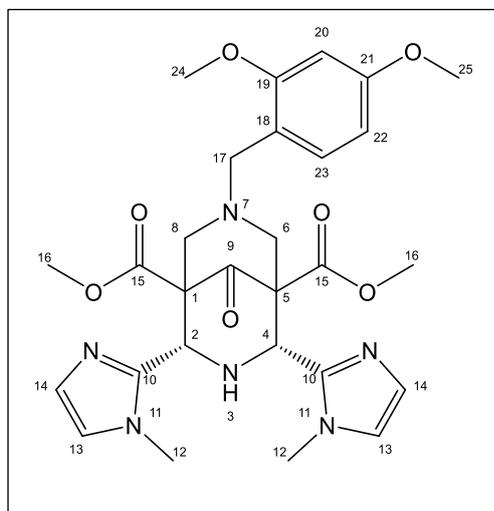
Ligand H₃L₃ ($C_{27}H_{28}N_4O_6$, 504.54 $g\ mol^{-1}$). To an ethanol solution (30 mL) of bispidol (0.400 g, 0.94 mmol, 1 equiv) was added 2-(bromomethyl)phenyl acetate (0.255 g, 1.26 mmol, 1.13 equiv) and N,N-Diisopropylethylamine (0.394 mL, 3.055 mmol, 3.25 equiv). The mixture was heated to reflux for 16h, the solution was evaporated, and the mixture has been used without further purification. TLC (DCM/MeOH - 90/10; $R_f = 0.35$; MALDI (Dithranol MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 533.163$ ($[M + H]^+$, 100%), 533.145 ($[M + H]^+$, 24%), 535.187 ($[M + H]^+$, 0.36%). The mixture was dissolved

in H_2O/THF (12/8 - 20mL) and lithium hydroxide (337 mg, 14.1 mmol, 15 equiv) was added at room temperature under stirring. After 16h, the mixture was acidified (pH 2) by TFA and was purified by column chromatography (C18, 100% for 5 min to 0% of H_2O in 20 min, $H_2O/MeOH$). The product was evaporated under high pressure to obtain the final power (200 mg, 42%). TLC (MeOH/ H_2O - 90/10); $R_f = 0.65$; 1H NMR (400 MHz, 25°C, MeOD): $\delta = 1.72$ (s, 1H, 3), 3.04 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.94 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.14 (s, 2H, 17), 4.29 (s, 1H, 9), 4.84 (s, 2H, 2 and 4), 6.92 (t, $^2J_{HH} = 7.3$ Hz, 1H, 20), 7.04 (d, $^2J_{HH} = 8.2$ Hz, 1H, 22), 7.20 (dd, $^2J_{HH} = 6.9$ Hz, $^3J_{HH} = 5.0$, 2H, 13), 7.37 (m, 2H, 19 and 21), 7.45 (d, $^2J_{HH} = 7.8$ Hz, 2H, 11), 7.66 (td, $^2J_{HH} = 7.7$ Hz, $^4J_{HH} = 1.7$ Hz, 2H, 12), 8.29 (m, 2H, 14); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): $\delta = 41.98$ (3), 50.32 (1 and 5), 54.56 (6 and 8), 57.65 (17), 65.75 (2 and 4), 72.16 (9), 115.62 (22), 117.75 (18), 120.65 (10), 121.06 (20), 122.51 (13) 126.29 (11), 132.67 (21), 136.32 (12), 148.27 (14) 155.54 (23), 172.08 (15); **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 505.695$ ($[M + H]^+$, 100%), 506.723 ($[M + H]^+$, 24%), 507.720 ($[M + H]^+$, 0.36%). Elemental Analysis: Found for **H₂L₃ • Li • H₂O**, %C 60.96, %H 5.59, %N 11.10. Calculated: %C 61.36, %H 5.53, %N 10.60; retention time was 16.718 min on our standard analytical HPLC method (Uptisphere[®] CS Evolution[™] C18AQ, H_2O/CH_3OH).



Precursor P₃ ($C_{17}H_{21}N_5O_5$, 375.15 $g\ mol^{-1}$). Dimethyl 1,3-acetonedicarboxylate (2 mL, 13.63 mmol) and ammonium acetate (1.05 g, 13.63 mmol, 1 equiv) were added to 60 mL of ethanol at 0°C. 1-methyl-2-imidazolecarbaldehyde (3.00 g, 27.27 mmol, 2 equiv) was added dropwise. After stirring at 0°C for 1h, precipitation of a pale-yellow solid was observed. The solid was collected by filtration washed with ethanol and dried under vacuum to yield **P₃** as a yellow solid (3.2 g, 63%). TLC (DCM/MeOH - 95/5); $R_f = 0.80$; 1H NMR (400 MHz, 25°C, $CDCl_3$): $\delta = 3.70$ (s, 6H,

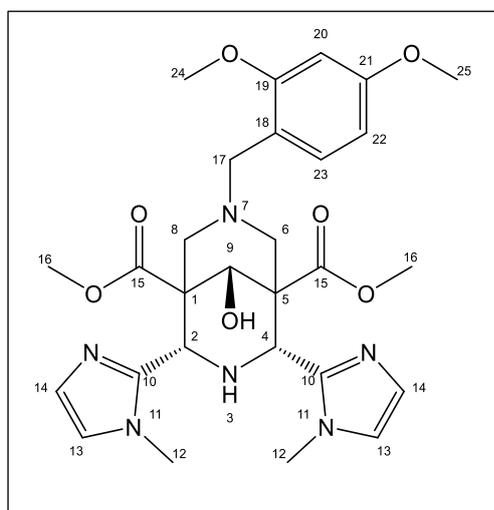
OCH₃, 12), 3.75 (s, 1H, 1) 3.75 (s, 6H, NCH₃, 8), 4.34 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, 3 and 5), 4.65 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H, 2 and 6), 6.81 (d, ³*J* = 1.3 Hz, 2H, 9), 6.94 (d, ³*J* = 1.3 Hz, 2H, 10); ¹³C NMR (126 MHz, 25°C, CDCl₃): δ = 32.83 (8), 52.45 (12), 54.27 (2 and 6), 61.16 (3 and 5), 121.80 (9), 121.39 (7), 127.33 (10), 145.29 (11), 168.54 (4).



Bispidone 10 (C₂₈H₃₄N₆O₇, 566.62 g mol⁻¹). Precursor **P3**

(0.368 g, 0.981 mmol, 1 equiv) was dissolved in 30 mL of tetrahydrofuran and heated to 50°C under stirring. Then 2,4- dimethoxybenzylamine (0.20 mL, 1.18 mmol, 1.2 equiv) and formaldehyde (0.18 mL, H₂O at 36-38%, 2.35 mmol, 2.4 equiv) were added under stirring for 16h at 65°C. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and washed with hot MeOH yielding the product as a white powder (0.263 g, 43%). TLC (DCM/MeOH - 95/5 - revealed with iodine or

FeCl₃); R_f = 0.61; ¹H NMR (400 MHz, 25°C, CDCl₃) δ = 3.99 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.39 (s, 3H, OCH₃, 24), 3.54 (s, 2H, 17), 3.64 (s, 6H, NCH₃, 12), 3.69 (s, 1H, 3), 3.72 (s, 6H, OCH₃, 16), 3.77 (s, 3H, OCH₃, 25), 4.80 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.82 (s, 2H, 2 and 4), 6.22 (d, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, 20), 6.33 (dd, ³*J* = 8.2, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1H, 22), 6.75 (d, ³*J* = 1.2 Hz, 2H, 13), 6.77 (d, ³*J* = 1.2 Hz, 2H, 14), 7.03 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, 23); ¹³C NMR (126 MHz, 25°C, CDCl₃) δ = 33.24 (16), 52.28 (12), 54.47 (24), 55.31 (25), 55.41 (17), 57.83 (6 and 8), 58.93 (2 and 4), 61.45 (1 and 5) 98.42 (20), 103.46 (22), 121.01 (13), 118.12 (18), 127.14 (14), 131.38 (23), 144.80 (10), 159.04 (21), 160.29 (19), 169.58 (15), 204.39 (9) ppm. **MALDI** (Dithranol MATRIX) / MS⁺: *m/z* = 567.96 ([M + H]⁺, 100%), 568.754 ([M + H]⁺, 24%), 569.98 ([M + H]⁺, 0.36%).

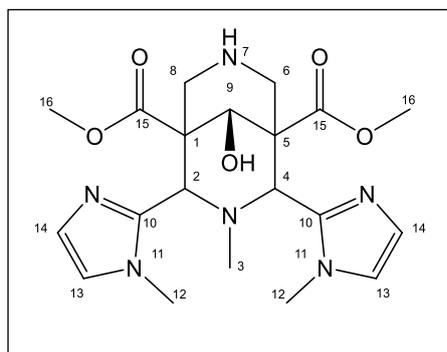


Bispidol 11 (C₂₈H₃₆N₆O₇, 568.26 g mol⁻¹). **Bispidone 10**

(0.150 g, 0.26 mmol, 1 equiv) was totally dissolved in hot DCM (20 mL) then THF (20 mL) was added. The mixture was cooled at -78°C in a bath of acetone/dry ice. Then, sodium borohydride (15 mg, 0.39 mmol, 1.5 equiv) was slowly added. After 2h at -78°C the reaction was done as followed by ¹H NMR spectroscopy. Ammonium chloride (pH 5, 5 mL) was added under stirring. Then, water (50 mL) was added, the product was extracted by dichloromethane (3 x 30 mL) and dried with MgSO₄, and finally the solvents

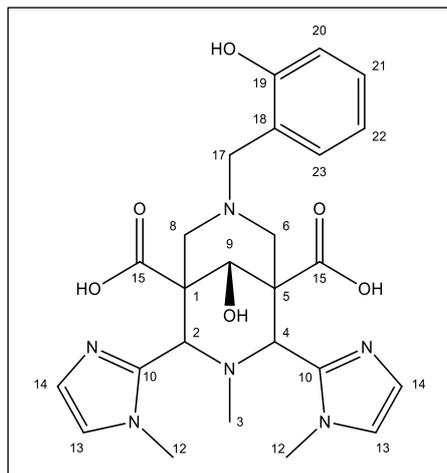
were removed under reduced pressure. The white solid was purified by chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 100% DCM to 80%) yielding the product as a white powder (82.7 mg, 56%, average yield

54%). TLC (DCM/MeOH - 95/10 - revealed with iodine); $R_f = 0.4$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 25°C, CDCl_3) $\delta = 2.79$ (d, $J = 11.9$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.50 (s, 3H, OCH_3 , 24), 3.59 (s, 6H, NCH_3 , 12), 3.69 (s, 2H, 17), 3.72 (s, 6H, OCH_3 , 16), 3.80 (s, 3H, OCH_3 , 25), 4.47 (s, 1H, 9), 4.49 (s, 1H, 3), 4.56 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 5.18 (s, 2H, 2 and 4), 6.37 (s, 1H, 20), 6.39 (m, 1H, 22), 6.72 (d, $^3J = 1.0$ Hz, 2H, 13), 6.75 (d, $^3J = 1.0$ Hz, 2H, 14), 7.10 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, 23); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C, CDCl_3) $\delta = 33.41$ (24), 50.72 (2 and 4), 52.51 (16), 54.72 (12), 55.35 (25), 55.44 (6 and 8), 54.18 (24), 56.55 (17), 61.45 (1 and 5), 75.08 (9), 98.41 (20), 103.38 (22), 118.90 (18) 121.09 (13), 127.16 (14), 131.86 (23), 143.36 (10), 159.71 (21), 160.67 (19), 171.84 (15) ppm; **MALDI** (Dithranol MATRIX) / MS^+ : $m/z = 569.027$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 570.126 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 24%), 571.231 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 0.36%).



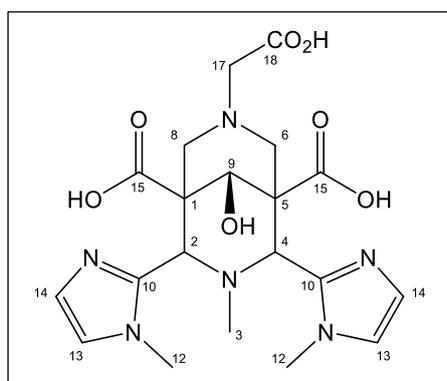
Bispidol 13 ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5$, 432.218 g mol^{-1}). To an acetonitrile solution (15 mL) of **Bispidol 11** (68 mg, 0.12 mmol, 1 equiv) was added iodomethane (9 μL , 0.14 mmol, 1.2 equiv) and potassium carbonate (20 mg, 1.2 mmol, 1.2 equiv). After the mixture was heated to reflux for 2 days, monitored by $^1\text{H NMR}$ spectroscopy. The solution was filtered, then evaporated under the vacuum. The obtained solid has been used without

further purification. TLC (DCM/MeOH - 90/10 - revealed with iodine); $R_f = 0.41$; **MALDI** (Dithranol MATRIX) / MS^+ : $m/z = 583.01$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 584.02 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 24%), 585.06 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 0.36%). To a solution of **bispidol 12** (69 mg, 0.12 mmol, 1 equiv) in 10 mL of dichloromethane was added trifluoroacetic acid (92 μL , 1.2 mmol, 10 equiv) and the solution was stirred at 50°C overnight. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum, the residue dissolved in methanol (20 mL) and the purple solution was stirred at 65°C for 1h. After, the solvent was filtered hot and the purple solid was purified chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 100/0 – 85/15). The pure compound was obtained as a white solid (50.7 mg, 97%, average yield 80%); TLC (DCM/MeOH - 90/10); $R_f = 0.20$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 25°C, MeOD): $\delta = 1.63$ (s, 1H, 3), 3.65 (s, 1H, 9), 3.77 (s, 6H, NCH_3 , 12), 4.02 (d, $J = 14.6$ Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 4.16 (s, 6H, OCH_3 , 16), 4.25 (d, $J = 14.6$ Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.94 (s, 2H, 2 and 4), 7.72 (s, 4H, 13 and 14); $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, 25°C; MeOD): $\delta = 35.53$ (16), 39.78 (3), 44.88 (6 and 8), 52.94 (12), 61.45 (1 and 5), 70.78 (9), 70.81 (2 and 4), 120.12 (13), 124.85 (14), 141.22 (10), 167.92 (15) ppm; **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS^+ : $m/z = 433.35$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 434.12 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 24%), 435.12 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 0.36%).



Ligand H₃L₄ (C₂₅H₃₀N₆O₆, 510.55 gmol⁻¹). To an ethanol solution (50 mL) of **bispidol 13** (0.400 g, 0.92 mmol, 1 equiv) was added 2-(bromomethyl)phenyl acetate (0.227 g, 1.10 mmol, 1.2 equiv) and N,N-Diisopropylethylamine (0.54 mL, 3.00 mmol, 3.25 equiv). The mixture was heated to reflux for 16h, the solution was evaporated, and the mixture has been used without further purification. The intermediate **15** was confirmed by MALDI (Dithranol MATRIX)/ MS⁺: *m/z* = 553.123 ([M + H]⁺, 100%), 554.145 ([M + H]⁺, 24%), 555.187 ([M + H]⁺,

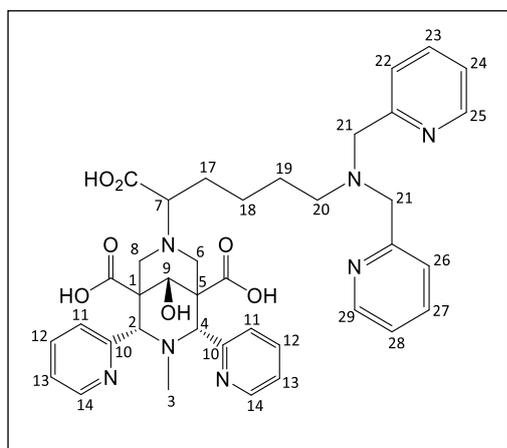
0.36%). The mixture was dissolved in a mix of H₂O/THF (6/4 – 20 mL) and lithium hydroxide (335 mg, 14.00 mmol, 15 equiv) was added at room temperature under stirring. After 16h, the mixture was acidified (pH 1.2) by TFA and was purified by column flash chromatography (C18, 100% for 5 min to 0% of H₂O in 20 min, H₂O/MeOH). The product was evaporated under high pressure to obtain the final power (220 mg, 45%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.54 (s, 3H, 3), 3.48 (d, J = 14.1 Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.84 (s, 6H, 12), 4.13 (d, J = 14.1 Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.52 (s, 1H, 9), 4.61 (s, 2H, 17) 4.89 (s, 2H, 2 and 4), 6.87 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 1H, 23), 6.89 – 6.96 (m, 1H, 20), 7.13 – 7.21 (m, 1H, 22), 7.22 – 7.26 (m, 1H, 21), 7.26 (d, ³J = 1.6, 2H, 13), 7.28 (d, ³J = 1.6, 2H, 14); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ = 34.34 (12), 40.23 (3), 47.01 (6 and 8), 48.94 (1 and 5), 58.72 (2 and 4), 59.51(17), 72.53 (9), 115.46 (23), 120.47 (20), 122.68 (13), 123.31 (14), 126.43 (18), 129.43 (22), 129.56 (21), 143.55 (10), 153.79 (19), 173.82 (15); MALDI (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: *m/z* = 511.707 ([M + H]⁺, 100%), 512.723 ([M + H]⁺, 24%), 513.726 ([M + H]⁺, 0.36%). Elemental Analysis: Found for **L4 • 3 Li • 2.5 H₂O**, %C 52.01, %H 5.91, %N 14.60. Calculated: %C 52.37, %H 5.63, %N 14.66; retention time was 4.54 min on our standard analytical HPLC method (Uptisphere® CS Evolution™ C18AQ, H₂O/CH₃OH).



Ligand H₃L₅ (C₂₀H₂₆N₆O₇, 462.46 gmol⁻¹). To an acetonitrile solution (50 mL) of **bispidol 13** (0.400 g, 0.92 mmol, 1 equiv) was added ethyl bromoacetate (0.12 mL, 1.38 mmol, 1.5 equiv) and potassium carbonate (0.193 mL, 2.99 mmol, 3.25 equiv). The mixture was heated to reflux for 16h, the solution was evaporated, and the mixture has been used without further purification. MALDI (Dithranol MATRIX) / MS⁺: *m/z* = 526.873 ([M + Na]⁺, 100%), 527.878 ([M + Na]⁺, 24%), 528.869

([M + Na]⁺, 0.36%). The mixture was dissolved in a mixture of H₂O/THF (6/4 – 20 mL) and lithium hydroxide (335 mg, 14.00 mmol, 15 equiv) was added at room temperature under stirring. After 16h, the mixture was acidified (pH 1.2) by TFA and was purified by column chromatography (C18, 100% for

5 min to 0% of H₂O in 20 min, H₂O/MeOH). The product was evaporated under high pressure to obtain the final powder (212 mg, 50%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ = 1.66 (s, 1H, 3), 3.80 (d, *J*=14.3 Hz, 2H, 6_{ax} and 8_{ax}), 3.91 (s, 2H, 17), 3.93 (s, 6H, 12), 4.17 (d, *J*=14.4 Hz, 2H, 6_{eq} and 8_{eq}), 4.71 (s, 1H, 9), 5.06 (s, 2H, 2 and 4), 7.45 (d, ³*J*= 2.0 Hz, 2H, 13), 7.51 (d, ³*J*= 2.0, 2H, 14); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ= 35.52 (12), 40.23 (3), 50.11 (1 and 5), 55.09 (6 and 8), 58.14 (2 and 4), 58.85 (17), 71.83 (9), 119.96 (10), 124.60 (14), 141.12 (13), 170.14 (18), 170.99 (15); **Mass spectrometry** (ESI⁺/MS): *m/z*= 463.193 ([M + H]⁺, 100%), 464.195 ([M + H]⁺, 24%), 465.196 ([M + H]⁺, 0.36%). Elemental Analysis: Found for **H₃L5 • 3 H₂O**, %C 45.24, %H 5.47, %N 15.125. Calculated: %C 44.96, %H 5.47, %N 15.73; retention time was 7.64 min on our standard analytical HPLC method (Uptisphere[®] CS Evolution[™] C18AQ, H₂O/CH₃OH).



Ligand H₃L6 (C₃₈H₄₃N₇O₇, 709.80 g mol⁻¹). To an acetonitrile solution (15 mL) of bispidol **16** (0.296 g, 0.53 mmol, 1 equiv) was added a solution of 2-(chromethyl)pyridine hydrochloride (0.191 mg, 1.17 mmol, 2.2 equiv) in acetonitrile (15 mL), potassium carbonate (0.342 mL, 2.65 mmol, 5 equiv) and a small quantity of potassium iodine. The mixture was heated to reflux for 3 days. After filtration, the solution was evaporated, and the mixture was used without further

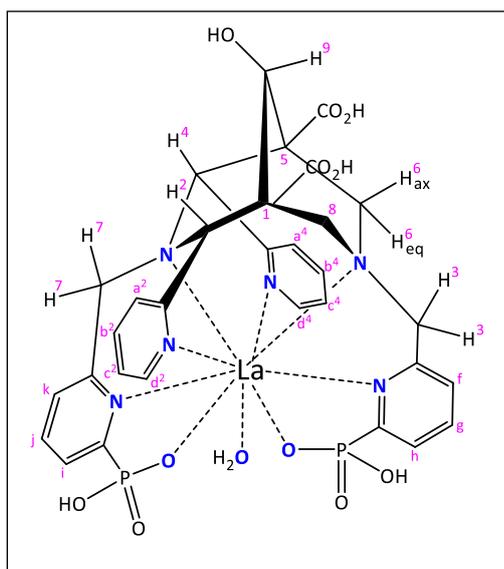
purification. The mixture was dissolved in a mix of H₂O/THF (6/4 – 20 mL) and lithium hydroxide was added (pH 12) at room temperature under stirring. After 16h, the mixture was acidified (pH 1.2) by TFA and was purified by column chromatography (C₁₈, 100% for 5 min to 0% of H₂O in 20 min, H₂O/MeOH). The product was evaporated under high pressure to obtain the final power (113 mg, 30%); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ= 1.14 – 1.20 (m, 2H, H¹⁸), 1.33 – 1.49 (m, 3H, H^{7/19}), 1.51 – 1.65 (m, 2H, 17), 1.80 (s, 3H, H³), 2.53 (t, ³*J*= 7.7 Hz, 2H, H²⁰), 2.90 – 3.30 (m, 2H, H^{6/8}_{ax}), 3.50 – 3.12 (m, 2H, H^{6/8}_{eq}), 4.16 (s, 4H, H²¹), 4.52 (s, 1H, H⁹), 4.89 (s, 2H, H^{2/4}), 7.80 – 7.83 (m, 2H, H^{24/28}), 7.82 – 7.84 (m, 2H, H¹³), 7.85 – 7.91 (m, 1H, H²⁶), 7.94 (d, ³*J*= 7.9 Hz, 1H, H²²), 8.40 (td, ³*J*= 7.9 Hz, ⁴*J*= 1.5 Hz, 4H, H^{12/27/23}), 8.56 – 8.62 (m, 2H, H^{25/29}), 8.63 – 8.71 (m, 2H, H¹⁴). ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ= 23.68 (18), 25.15 (7/19/17), 42.88 (3), 50.97 (6/8), 51.43 (C_{quat}) 54.18 (20), 54.51 (C_{quat}), 55.32 (21), 63.60 (2/4), 71.75 (9), 126.20 (24/28), 126.68 (13), 126.90 (26) 127.00 (11/22), 141.24 (14/25/29), 147.12 (12/23/27), 152.74 (C_{quat}), 171.89 (C_{quat}), 172.09 (C_{quat}). **MALDI** (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: *m/z*= 710.905 ([M + H]⁺, 100%), 711.896 ([M + H]⁺, 24%), 712.941 ([M + H]⁺, 0.36%). Elemental Analysis: Found for **H₃L6 • 3 TFA**, %C 50.16, %H 4.77, %N 9.49. Calculated: %C 50.24, %H 4.41, %N 9.32; retention time was 15.06 min on our standard analytical HPLC method (Uptisphere[®] CS Evolution[™] C18AQ, H₂O/CH₃OH).

III. Inorganic synthesis

General procedure of the formation of Tb^{III}-bispidine complexes: To a water solution of the ligand, 1.1 equivalent of TbCl₃·6H₂O was added. Then, the pH was adjusted to 7.4. The solution was heated under stirring at 50°C for 30 min, and the formation of complex was followed by HPLC (H₂O/MeOH). The solvent was then evaporated under vacuum, and the product was purified by FPLC (C₁₈, using H₂O/MeOH from 100/0 to 0/100) to give the pure final complex.

[TbL1] (C₃₁H₃₀N₆O₁₁P₂Tb, 882.47 gmol⁻¹). **L1**•**3.5 MeOH** (20 mg, 0.0243 mmol, 1 equiv) and TbCl₃·6H₂O (7 mg, 0.027 mmol, 1.1 equiv) to give pure **TbL1** as a powder (15 mg, 60%). Elemental analysis: calculated for **TbL1** • **MeOH** • **7 H₂O**: % C 36.93, %H 4.55, %N 8.08. Found % C 37.18, %H 4.41, %N 7.71. Retention time (C18AQ, H₂O/MeOH, general method) was 4.24 min.

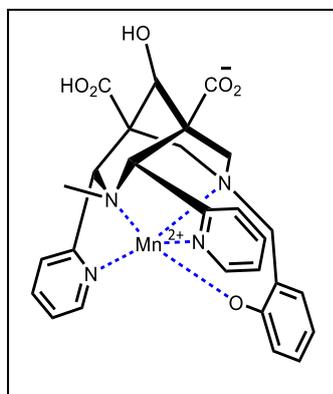
[TbL2] (C₃₃H₃₆Cl₃Li₃N₆O₁₃Tb, 1010.78 gmol⁻¹). **L2**•**1.5 H₂O** (21 mg, 0.031 mmol, 1 equiv) and TbCl₃·6H₂O (12.7 mg, 0.034 mmol, 1.1 equiv) to give pure **TbL2** as a powder (22.8 mg, 73%). Elemental Analysis: Calculated for **TbL2** • **3 LiCl** • **4 H₂O**, %C, 39.21, %H, 3.59, %N, 8.31. Found: %C, 39.54, %H, 3.74, %N, 8.38. Retention time (C18AQ, H₂O/MeOH, general method) was 4.07 min.



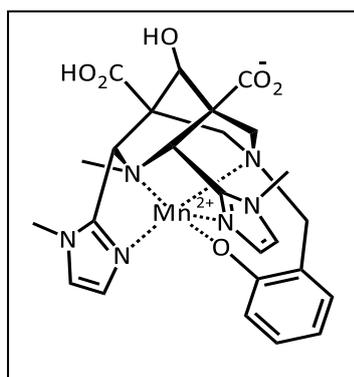
Complex [LaL1] (C₃₂H₃₆N₆O₁₂P₂La, 897.52 gmol⁻¹). The ligand (**H₆L1**) (5.5 mg, 5.76 μmol, 1 equiv) and the metal (LaCl₃·7H₂O, 2 mg, 5.76 μmol, 1 equiv) was mixed in deuterium oxide (600 μL). Titration was performed from pD 2 to 12.5 and the adjustment of the pD was done with DCl and NaOD. ¹H NMR (500 MHz, D₂O, pD 12.5, 25°C) δ= 2.61 (d, J=13.0 Hz, 1H, H⁶_{ax}), 2.87 (d, J=13.1, 1H, H⁸_{ax}), 3.17 (d, J=13.0, 1H, H⁶_{eq}), 3.66 (s, 1H, H³), 3.69 (d, J= 13.1 Hz, 1H, H⁸_{eq}), 4.35 (d, J=15.4 Hz, 1H, H⁷), 4.40 (s, 1H, H⁹), 4.69 (d, J=15.4, 1H, H⁷), 5.0 (s, 1H, H³), 5.34 (s, 1H, H^{2/4}), 5.43 (s, 1H, H^{2/4}), 7.39 – 7.44 (m, 1H, H^{C2}), 7.46 (d, ³J=7.5 Hz,

2H, H^{a2}), 7.49 (m, 1H, H⁸), 7.68 – 7.73 (m, 1H, H^{C4}), 7.76 (d, ³J=7.7 Hz, 1H, H^f), 7.80 (d, ³J=7.8 Hz, 1H, H^{b2}), 7.82 (m, 1H, Hⁱ), 7.84 (m, 1H, H^h), 7.88 (d, ³J=7.8 Hz, 1H, H^{a4}), 8.09 (d, ³J= 7.0 Hz, 1H, H^k), 8.11 – 8.16 (m, 1H, H^{b4}), 8.23 – 8.28 (m, 1H, H^j), 9.16 (d, ³J=5.0 Hz, 1H, H^{d2}), 9.72 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H^{d4}). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O, pD 12.5, 25°C) δ= 51.24 (C_{quat}), 52.34 (C_{quat}), 56.95 (8_{ax/eq}), 58.46 (6_{ax/eq}), 66.82 (3), 68.55 (7), 69.49 (2/4), 71.05 (2/4), 73.00 (9), 122.85 (a²) 123.68 (c²), 124.30 (c⁴), 124.42 (b²), 125.50 (C_{quat}), 126.47 (a⁴), 126.82 (g), 138.33 (k, h), 138.42 (i), 138.68 (f), 139.0 (j) 139.32 (b⁴), 148.97 (d²), 151.10 (d⁴) 158.20 (C_{quat}), 167.94 (C_{quat}), 175.84 (C_{quat}), 176.56 (C_{quat}), 177.83 (C_{quat}). ³¹P NMR (202 MHz, D₂O, pD 12.5, 25°C) δ= 11.68, 11.36.

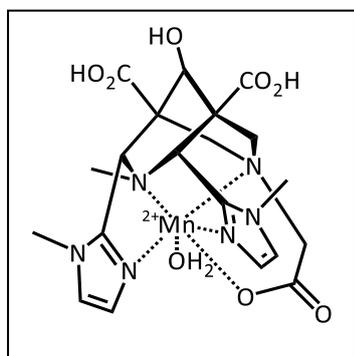
General procedure of the formation of Mn^{II}-bispidine complexes: To a water solution of the ligand (pH 7.4), 1.1 equivalent of MnCl₂ was added. Then, the pH was adjusted to 7.4. The solution was heated under stirring at 50°C for 10 min, and the formation of complex was followed by HPLC (H₂O/MeOH). The solvent was then evaporated under vacuum, and the product was purified by FPLC (C₁₈, using H₂O/MeOH from 100/0 to 0/100) to give the pure final complex.



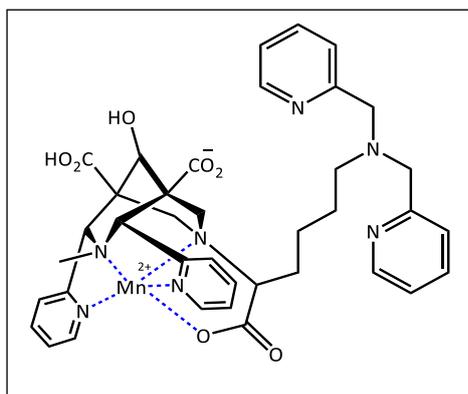
Complex [Mn^{II}L3] (C₂₇H₂₆N₄O₆Mn, 557.12 gmol⁻¹). Elemental Analysis: Calculated for **MnL3** • 4 TFA, %C, 40.75, %H, 3.13, %N, 5.43. Found: %C, 40.475, %H, 3.09, %N, 5.36; retention time (C18AQ, H₂O/MeOH, general method) was 16.041 min. MS⁺ (without H₂O): *m/z* = 558.1305 ([M + H]⁺, 100%), 559.1306 ([M + H]⁺, 24%), 560.1307 ([M + H]⁺, 0.36%). MS⁻ (without H₂O): *m/z* = 556.1014 ([M - 2H]⁻, 100%), 557.1015 ([M - 2H]⁻, 24%), 558.1016 ([M - 2H]⁻, 0.36%).



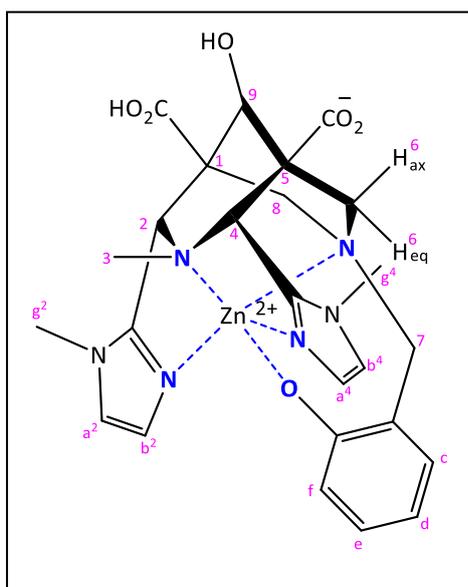
Complex [Mn^{II}L4] (C₂₅H₂₈N₆O₆ Mn, 563.15 gmol⁻¹). To a water solution of the ligand (pH 7.4), 1.1 equivalent of MnCl₂ was added. The solution was heated under stirring at 60°C for 30 min, and the formation of complex was followed by HPLC (H₂O/MeOH). The solvent was then evaporated under vacuum, and the product was purified by FPLC (C₁₈, using H₂O/MeOH from 100/0 to 0/100) to give the pure final complex. Elemental Analysis: Calculated for **MnL4** • K • 1.4 H₂O, %C, 56.68, %H, 5.08, %N, 13.61. Found: %C, 46.265, %H, 5.37, %N, 13.785; retention time (C18AQ, H₂O/MeOH, general method) was 14.50 min. MS⁺ (without H₂O): *m/z* = 564.1421 ([M + H]⁺, 100%), 565.1422 ([M + H]⁺, 24%), 566.1423 ([M + H]⁺, 0.36%). MS⁻ (without H₂O): *m/z* = 562.1231 ([M - 2H]⁻, 100%), 563.1232 ([M - 2H]⁻, 24%), 564.1233 ([M - 2H]⁻, 0.36%).



Complex [Mn^{II}L5] (C₂₀H₂₄N₆O₇Mn, 515.11 gmol⁻¹). Elemental Analysis: Calculated for **MnL5** • 0.4 TFA • 3.7 MeOH, %C, 41.52, %H, 5.79, %N, 11.67. Found: %C, 41.815, %H, 5.85, %N, 11.24; retention time (C18AQ, H₂O/MeOH, general method) was 12.205 min. MS⁺ (without H₂O): *m/z* = 516.1160 ([M + H]⁺, 100%), 517.1161 ([M + H]⁺, 24%), 518.1162 ([M + H]⁺, 0.36%). MS⁻ (without H₂O): *m/z* = 514.0877 ([M - H]⁻, 100%), 515.0878 ([M - H]⁻, 24%), 516.0879 ([M - H]⁻, 0.36%).

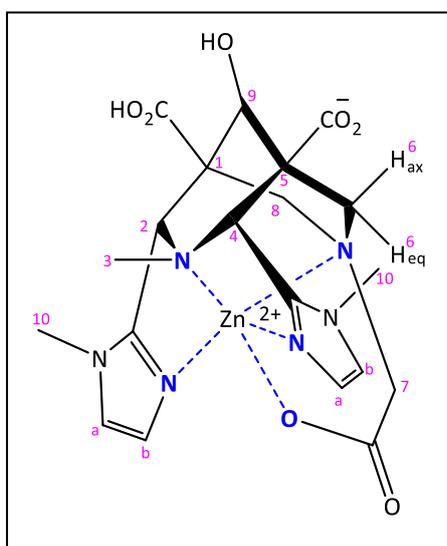


Complex [Mn^{II}L6] (C₃₈H₄₁N₇O₇Mn, 762.25 gmol⁻¹). Elemental Analysis: Calculated for **MnL6** • 5 TFA, %C, 42.65, %H, 3.65, %N, 7.25. Found: %C, 42.22, %H, 4.06, %N, 7.25; retention time (C18AQ, H₂O/MeOH, general method) was 14.61 min.



Complex [Zn^{II}L4] (C₂₅H₂₈N₆O₆Zn, 573.92 gmol⁻¹). The ligand (**H₃L4**) (10.0 mg, 17.0 μmol, 1 equiv) and the metal (ZnCl₂, 2.3 mg, 17.0 μmol, 1 equiv) was mixed in deuterium oxide (600 μL). Titration was performed from pD 0.76 to 12.56 and the adjustment of the pD was done with DCl and NaOD. ¹H NMR (500 MHz, D₂O, pD 12.56, 25°C) δ= 1.74 (s, 3H, H³), 2.05 (d, *J*= 13.0 Hz, 1H, H^{6_{ax}}), 2.32 (d, *J*=13.0 Hz, 1H, H^{8_{ax}}), 2.45 (d, *J*=13.0 Hz, 1H, H^{6_{eq}}), 2.70 (d, *J*=11.5 Hz, 1H, H^{7_{ax}}), 2.85 (d, *J*=13.0, 1H, H^{8_{eq}}), 3.46 (s, 3H, Hg_{2/4}), 3.62 (s, 3H, Hg_{2/4}), 3.96 (d, *J*=11.5 Hz, 1H, H^{7_{eq}}), 4.19 (s, 1H, H⁹), 4.66 (s, 1H, H^{2/4}), 4.82 (s, 1H, H^{2/4}), 6.51 (t, ³*J*=7.3 Hz, 1H, H^e), 6.54 – 6.57 (m, 1H, H^{a^{2/4}}), 6.90 (d, ³*J*= 8.1 Hz, 1H, H^c), 6.93 (d, ³*J*= 7.3 Hz, 1H, H^f),

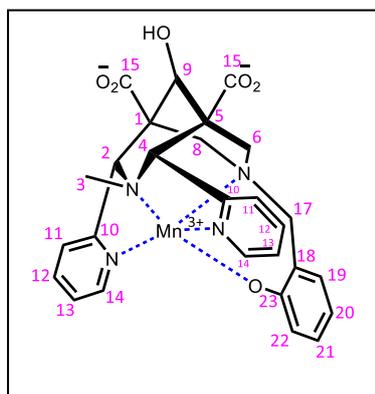
7.04 (d, ³*J*= 8.0 Hz, 1H, H^{a^{2/4}}), 7.07 – 7.12 (m, 1H, H^{b^{2/4}}), 7.13 (s, 1H, H^d); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O, pD 12.56, 25°C) δ= 32.94 (g^{2/4}), 43.52 (3), 54.35 (C_{quat}), 54.37 (C_{quat}), 56.32 (6), 58.04(2/4), 58.98 (8), 61.58 (7), 72.76 (9), 116.46 (e), 119.60 (c), 123.36 (b^{2/4}), 123.59 (C_{quat}), 124.10 (C_{quat}), 125.38 (a^{2/4}), 130.41 (d), 131.86 (f) (a^{2/4}), 164.53 (C_{quat}), 164.73 (C_{quat}), 176.52 (C_{quat}), 176.54 (C_{quat}), 188.18(C_{quat}).



Complex [Zn^{II}L5] (C₂₀H₂₄N₆O₇Zn, 525.84 gmol⁻¹). The ligand (5 mg, 9.36 μmol, 1 equiv) was mixed in deuterium oxide (600 μL) at pD 2.02 then the metal (ZnCl₂, 1.3 mg, 9.36 μmol, 1 equiv) was added. Titration was performed from pD 2.02 to 11.17 and the adjustment of the pD was done with DCl and NaOD. ¹H NMR (pD 11.17, 500 MHz, D₂O, 25°C) δ= 1.99 (s, 3H, H³), 2.64 (d, ²*J* = 12.8 Hz, 2H, H^{6/8ax}), 2.86 (d, ²*J* = 12.8 Hz, 2H, H^{6/8eq}), 3.13 (s, 2H, H⁷), 4.36 (s, 1H, H⁹), 3.74 (s, 6H, H¹⁰) 4.87 (s, 2H, H^{2/4}), 7.20 (s, 4H, H^{a/b}). ¹³C NMR (pD 11.17, 126 MHz, D₂O, 25°C) δ= 33.06 (10), 43.10 (3), 50.07 (C_{quat}), 58.08 (2/4),

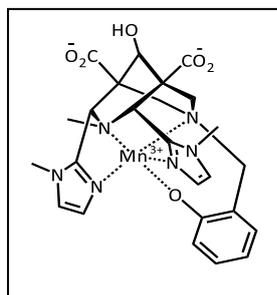
58.79 (6/8), 61.95 (7), 71.90 (9), 123.54 (a/b), 125.42 (a/b), 147.57 (C_{quat}), 177.96 (C_{quat}), 212.63 (C_{quat}).

General procedure of the formation of Mn^{III}-bispidine complexes: To a water solution of the ligand the pH was adjusted to 7.4, then the water removed under vacuum. The powder of ligand was subsequently dissolved in methanol and 1.1 equivalent of MnF₃ was added. The solution was heated under stirring at 60°C for 1h min, and the formation of complex was followed by UV-visible spectroscopy.

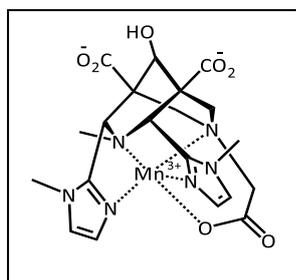


Complex [Mn^{III}L3] (C₂₇H₂₅N₄O₆Mn, 556.12 gmol⁻¹). **¹H NMR** (500 MHz, MeOD, 25°C) δ = 1.77 (s, 3H, H³), 2.10 (d, ²J= 8.8 Hz, 2H, H^{6/8}_{ax}), 2.99 (d, ²J= 8.8 Hz, 2H, H^{6/8}_{eq}), 3.35 (s, 2H, H¹⁷), 3.94 (s, 1H, H⁹), 4.61 (s, 2H, H^{2/4}), 6.34 (m, 1H, H¹⁹), 6.88 (m, 2H, H^{20/21}), 7.01 (m, 1H, H²²), 7.10 (m, 2H, H¹³), 7.45 (m, 2H, H¹¹), 7.58 (m, 2H, H¹²), 8.32 (m, 2H, H¹⁴). **¹³C NMR** (126 MHz, MeOD, 25°C) δ = 42.78 (3), 51.68 (1/5), 57.06 (6/8), 60.78 (17), 68.09 (C_{quat}), 75.19 (9), 79.91 (C_{quat}) 114.48 (19), 117.77 (20), 121.81 (13), 125.97 (11), 128.46 (22), 132.62 (21),

136.10 (12), 148.79 (14), 160.76 (23), 177.94 (15). **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: *m/z*= 559.046 ([M + 2H]⁺, 100%), 560.060 ([M + 2H]⁺, 24%), 561.119 ([M + 2H]⁺, 0.36%).



Complex [Mn^{III}L4] (C₂₅H₂₈N₆O₆Mn, 563.14 gmol⁻¹). **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: *m/z*= 565.082 ([M + 2H]⁺, 100%), 566.558 ([M + 2H]⁺, 24%), 567.752 ([M + 2H]⁺, 0.36%).



Complex [Mn^{III}L5] (C₂₀H₂₃N₆O₇Mn, 514.39 gmol⁻¹). **MALDI** (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid MATRIX)/ MS⁺: *m/z*= 516.938 ([M + 2H]⁺, 100%), 517.942 ([M + 2H]⁺, 24%), 518.993 ([M + 2H]⁺, 0.36%).

Références bibliographiques

- [1] J. Stenhouse, *Ann Chem Pharm* **1851**, 1–5.
- [2] C. Mannich, F. Veit, *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1935**, *68*, 506–512.
- [3] E. E. Smisson, P. C. Ruenitz, *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 184–186.
- [4] A. Borsodi, S. Benyhe, U. Holzgrabe, Á. Márki, C. Nachtsheim, *Regul. Pept.* **1994**, *54*, 27–28.
- [5] P. Comba, M. Kerscher, W. Schiek, in *Prog. Inorg. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**, pp. 613–704.
- [6] R. Haller, H. Unholzer, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1972**, *305*, 855–863.
- [7] R. Caujolle, A. Lattes, J. Jaud, J. Galy, *Acta Crystallogr. B* **1981**, *37*, 1699–1703.
- [8] U. Kuhl, A. Cambareri, C. Sauber, F. Sörgel, R. Hartmann, H. Euler, A. Kirfel, U. Holzgrabe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 2083–2088.
- [9] A. M. Nonat, A. Roux, M. Sy, L. J. Charbonnière, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 16476–16492.
- [10] P. Comba, M. Kerscher, W. Schiek, in *Prog. Inorg. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**, pp. 613–704.
- [11] N. Choudhary, A. Dimmling, X. Wang, L. Southcott, V. Radchenko, B. O. Patrick, P. Comba, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 8685–8693.
- [12] R. Gillet, A. Roux, J. Brandel, S. Huclier-Markai, F. Camerel, O. Jeannin, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 11738–11752.
- [13] P. Comba, S. Hunoldt, M. Morgen, J. Pietzsch, H. Stephan, H. Wadepohl, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8131–8143.
- [14] A. Roux, R. Gillet, S. Huclier-Markai, L. Ehret-Sabatier, L. J. Charbonnière, A. M. Nonat, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1475–1483.
- [15] R. Haller, H. Unholzer, *Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges* **1971**, 654–659.
- [16] S. Juran, M. Walther, H. Stephan, R. Bergmann, J. Steinbach, W. Kraus, F. Emmerling, P. Comba, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 347–359.
- [17] A. Roux, A. M. Nonat, J. Brandel, V. Hubscher-Bruder, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 4431–4444.
- [18] H. Stephan, M. Walther, S. Fähnemann, P. Ceroni, J. K. Molloy, G. Bergamini, F. Heisig, C. E. Müller, W. Kraus, P. Comba, *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20*, 17011–17018.
- [19] P. Comba, M. Merz, H. Pritzkow, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003*, 1711–1718.
- [20] R. Haller, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1969**, *302*, 113–118.
- [21] P. Comba, B. Nuber, A. Ramlow, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, *0*, 347–352.
- [22] P. Comba, B. Kanellakopoulos, C. Katsichtis, A. Lienke, H. Pritzkow, F. Rominger, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1998**, 3997–4002.
- [23] P. Comba, M. Maurer, P. Vadivelu, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 10389–10396.
- [24] M. Atanasov, P. Comba, S. Helmle, D. Müller, F. Neese, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12324–12335.
- [25] P. Comba, M. Kerscher, M. Merz, V. Müller, H. Pritzkow, R. Remenyi, W. Schiek, Y. Xiong, *Chem. – Eur. J.* **2002**, *8*, 5750–5760.

- [26] C. Bleiholder, H. Börzel, P. Comba, R. Ferrari, M. Heydt, M. Kerscher, S. Kuwata, G. Laurency, G. A. Lawrance, A. Lienke, B. Martin, M. Merz, B. Nuber, H. Pritzkow, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8145–8155.
- [27] M. Li, S. A. Odom, A. R. Pancoast, L. A. Robertson, T. P. Vaid, G. Agarwal, H. A. Doan, Y. Wang, T. M. Suduwella, S. R. Bheemireddy, R. H. Ewoldt, R. S. Assary, L. Zhang, M. S. Sigman, S. D. Minter, *ACS Energy Lett.* **2021**, *6*, 3932–3943.
- [28] P. Comba, U. Jermilova, C. Orvig, B. O. Patrick, C. F. Ramogida, K. Rück, C. Schneider, M. Starke, *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 15945–15956.
- [29] P. Cieslik, M. Kubeil, K. Zarschler, M. Ullrich, F. Brandt, K. Anger, H. Wadepohl, K. Kopka, M. Bachmann, J. Pietzsch, H. Stephan, P. Comba, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 21555–21567.
- [30] L. Abad-Galán, P. Cieslik, P. Comba, M. Gast, O. Maury, L. Neupert, A. Roux, H. Wadepohl, *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27*, 10303–10312.
- [31] R. D. Shannon, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1976**, *32*, 751–767.
- [32] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533–3539.
- [33] H. Irving, R. J. P. Williams, *Nature* **1948**, *162*, 746–747.
- [34] P. V. Bernhardt, G. A. Lawrance, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *104*, 297–343.
- [35] D. Parker, *Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19*, 271–291.
- [36] K. A. Deal, I. A. Davis, S. Mirzadeh, S. J. Kennel, M. W. Brechbiel, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2988–2992.
- [37] R. E. Mewis, S. J. Archibald, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1686–1712.
- [38] M. Takahashi, S. Takamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 3413–3414.
- [39] Y. Zhang, H. Hong, J. W. Engle, J. Bean, Y. Yang, B. R. Leigh, T. E. Barnhart, W. Cai, *PLOS ONE* **2011**, *6*, e28005.
- [40] J. P. André, H. R. Maecke, J. P. André, M. Zehnder, L. Macko, K. G. Akyel, *Chem. Commun.* **1998**, 1301–1302.
- [41] D. Parker, K. Pulukkody, F. C. Smith, A. Batsanov, J. A. K. Howard, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 689–693.
- [42] A. Tatsi, T. Maina, R. Cescato, B. Waser, E. P. Krenning, M. de Jong, P. Cordopatis, J. C. Reubi, B. A. Nock, *EJNMMI Res.* **2012**, *2*, 25.
- [43] B. L. R. Kam, J. J. M. Teunissen, E. P. Krenning, W. W. de Herder, S. Khan, E. I. van Vliet, D. J. Kwekkeboom, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, 103–112.
- [44] S. Liu, D. S. Edwards, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 7–34.
- [45] P. Comba, L. Grimm, C. Orvig, K. Rück, H. Wadepohl, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 12531–12543.
- [46] H.W. Kirby, L.R. Morss, in *Chem. Actin. Trans. Elem.*, **2006**, pp. 18–51.
- [47] M. G. Ferrier, E. R. Batista, J. M. Berg, E. R. Birnbaum, J. N. Cross, J. W. Engle, H. S. La Pierre, S. A. Kozimor, J. S. Lezama Pacheco, B. W. Stein, S. C. E. Stieber, J. J. Wilson, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12312.
- [48] R. M. Diamond, K. Jr. Street, G. T. Seaborg, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1461–1469.
- [49] D. Manna, S. Mula, A. Bhattacharyya, S. Chattopadhyay, T. K. Ghanty, *Dalton Trans.* **2014**, *44*, 1332–1340.
- [50] K. Born, P. Comba, R. Ferrari, G. A. Lawrance, H. Wadepohl, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 458–464.
- [51] P. Comba, L. Grimm, C. Orvig, K. Rück, H. Wadepohl, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 12531–12543.

- [52] S. Basu, T. C. Kwee, S. Surti, E. A. Akin, D. Yoo, A. Alavi, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, 1228, 1–18.
- [53] D. Townsend, *Ann. Acad. Med. Singapore* **2004**, 33, 133–145.
- [54] N. Cauchon, R. Langlois, J. A. Rousseau, G. Tessier, J. Cadorette, R. Lecomte, D. J. Hunting, R. A. Pavan, S. K. Zeisler, J. E. van Lier, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, 34, 247–258.
- [55] G. A. M. S. van Dongen, G. W. M. Visser, M. N. Lub-de Hooge, E. G. de Vries, L. R. Perk, *The Oncologist* **2007**, 12, 1379–1389.
- [56] J. P. Holland, V. Divilov, N. H. Bander, P. M. Smith-Jones, S. M. Larson, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med.* **2010**, 51, 1293–1300.
- [57] W. Wei, Z. T. Rosenkrans, J. Liu, G. Huang, Q.-Y. Luo, W. Cai, *Chem. Rev.* **2020**, 120, 3787–3851.
- [58] J. F. Eary, *The Lancet* **1999**, 354, 853–857.
- [59] D. M. Goldenberg, *Cancer Immunol. Immunother.* **2003**, 52, 281–296.
- [60] P. A. Trail, D. H. King, G. M. Dubowchik, *Cancer Immunol. Immunother.* **2003**, 52, 328–337.
- [61] P. K. E. Börjesson, Y. W. S. Jauw, R. Boellaard, R. de Bree, E. F. I. Comans, J. C. Roos, J. A. Castelijns, M. J. W. D. Vosjan, J. A. Kummer, C. R. Leemans, A. A. Lammertsma, G. A. M. S. van Dongen, *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 2133–2140.
- [62] U. Hennrich, K. Kopka, *Pharmaceuticals* **2019**, 12, 114.
- [63] Y.-S. Lee, *Open Nucl. Med. J.* **2010**, 2.
- [64] R. F. Cavaier, F. Haddad, T. Sounalet, T. Stora, I. Zahi, *Phys. Procedia* **2017**, 90, 157–163.
- [65] L. M. P. Lima, D. Esteban-Gómez, R. Delgado, C. Platas-Iglesias, R. Tripier, *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 6916–6927.
- [66] T. J. Wadas, M. Eiblmaier, A. Zheleznyak, C. D. Sherman, R. Ferdani, K. Liang, S. Achilefu, C. J. Anderson, *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 1819–1827.
- [67] N. D. Bartolo, A. M. Sargeson, S. V. Smith, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 3350–3357.
- [68] E. Boros, J. F. Cawthray, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 6279–6284.
- [69] J. Pu, Q. Wang, W. Xu, L. Lu, S. Jiang, *Viruses* **2019**, 11, 705.
- [70] V. Avdoshina, F. Taraballi, E. Tasciotti, A. Üren, I. Mochetti, *Mol. Brain* **2019**, 12, 61.
- [71] E. D. Becker, *High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications*, Elsevier, **1999**.
- [72] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293–2352.
- [73] M. Bottrill, L. Kwok, N. J. Long, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 557–571.
- [74] T. Aime, Enzo Terreno, Daniela Delli Castelli, Alessandra Viale, and Silvio Aime, *Chem. Rev.* **2010**, 5, 3019–3042.
- [75] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2064–2110.
- [76] A. Merbach, L. Helm, É. Tóth, Eds. , *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Helm/The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2013**.
- [77] I. Solomon, *Phys. Rev.* **1955**, 99, 559–565.
- [78] R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 901–927.

- [79] J. Kowalewski, L. Nordenskiöld, N. Benetis, P.-O. Westlund, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1985**, *17*, 141–185.
- [80] S. K. Saxena, M. Sharma, M. Patel, D. Oreopoulos, *Int. Urol. Nephrol.* **2008**, *40*, 715–724.
- [81] E. M. Gale, I. P. Atanasova, F. Blasi, I. Ay, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15548–15557.
- [82] M. Botta, F. Carniato, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, L. Tei, *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 1461–1483.
- [83] R. Botár, E. Molnár, G. Trencsényi, J. Kiss, F. K. Kálmán, G. Tircsó, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1662–1666.
- [84] C. Vanasschen, E. Molnár, G. Tircsó, F. K. Kálmán, É. Tóth, M. Brandt, H. H. Coenen, B. Neumaier, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 7746–7760.
- [85] L. M. Carter, A. L. Kesner, E. C. Pratt, V. A. Sanders, A. V. F. Massicano, C. S. Cutler, S. E. Lapi, J. S. Lewis, *Mol. Imaging Biol.* **2020**, *22*, 73–84.
- [86] C. M. Lewis, S. A. Graves, R. Hernandez, H. F. Valdovinos, T. E. Barnhart, W. Cai, M. E. Meyerand, R. J. Nickles, M. Suzuki, *Theranostics* **2015**, *5*, 227–239.
- [87] S. M. A. Pinto, M. J. F. Calvete, M. E. Ghica, S. Soler, I. Gallardo, A. Pallier, M. B. Laranjo, A. M. S. Cardoso, M. M. C. A. Castro, C. M. A. Brett, M. M. Pereira, É. Tóth, C. F. G. C. Geraldés, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 3249–3262.
- [88] D. Ndiaye, M. Sy, A. Pallier, S. Mème, I. de Silva, S. Lacerda, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, É. Tóth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 11958–11963.
- [89] P. Cieslik, P. Comba, B. Dittmar, D. Ndiaye, É. Tóth, G. Velmurugan, H. Wadepohl, *Angew. Chem. Int. Ed. n.d.*, *n/a*, DOI 10.1002/anie.202115580.
- [90] D. Ndiaye, P. Cieslik, H. Wadepohl, A. Pallier, S. Mème, P. Comba, É. Tóth, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 22212–22220.
- [91] M. Sy, D. Ndiaye, I. da Silva, S. Lacerda, L. J. Charbonnière, É. Tóth, A. M. Nonat, *Inorg. Chem.* **2022**, *61*, 13421–13432.
- [92] D. Ndiaye, M. Sy, W. Thor, L. J. Charbonnière, A. M. Nonat, É. Tóth, *Chem. – Eur. J. n.d.*, *n/a*, e202301880.
- [93] P. Caravan, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 851–862.
- [94] L. M. De Leon-Rodriguez, A. J. M. Lubag, C. R. Malloy, G. V. Martinez, R. J. Gillies, A. D. Sherry, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 948–957.
- [95] P. B. Tsitovich, P. J. Burns, A. M. McKay, J. R. Morrow, *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *133*, 143–154.
- [96] Q. N. Do, J. S. Ratnakar, Z. Kovács, A. D. Sherry, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1116–1129.
- [97] A. J. M. Lubag, L. M. De Leon-Rodriguez, S. C. Burgess, A. D. Sherry, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 18400–18405.
- [98] T. Lee, L. X. Cai, V. S. Lelyveld, A. Hai, A. Jasanoff, *Science* **2014**, *344*, 533–535.
- [99] S. Huang, H. H. Chen, H. Yuan, G. Dai, D. T. Schuhle, C. Mekkaoui, S. Ngoy, R. Liao, P. Caravan, L. Josephson, D. E. Sosnovik, *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 729–737.
- [100] D. V. Hingorani, A. S. Bernstein, M. D. Pagel, *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10*, 245–265.
- [101] F. Q. Schafer, G. R. Buettner, *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
- [102] C. Vandeputte, I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier, G. Lorenzon, *Cell Biol. Toxicol.* **1994**, *10*, 415–421.
- [103] I. Rahman, A. Kode, S. K. Biswas, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 3159–3165.

- [104] D. F. Quail, J. A. Joyce, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437.
- [105] T. Mammoto, A. Jiang, E. Jiang, D. Panigrahy, M. W. Kieran, A. Mammoto, *Am. J. Pathol.* **2013**, *183*, 1293–1305.
- [106] T. C. Jorgenson, W. Zhong, T. D. Oberley, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 6118–6123.
- [107] R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4397–4402.
- [108] S. Cannito, E. Novo, A. Compagnone, L. Valfrè di Bonzo, C. Busletta, E. Zamara, C. Paternostro, D. Povero, A. Bandino, F. Bozzo, C. Cravanzola, V. Bravoco, S. Colombatto, M. Parola, *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 2267–2278.
- [109] G. Angelini, S. Gardella, M. Ardy, M. R. Ciriolo, G. Filomeni, G. Di Trapani, F. Clarke, R. Sitia, A. Rubartelli, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 1491–1496.
- [110] J. L. Zweier, J. T. Flaherty, M. L. Weisfeldt, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 1404–1407.
- [111] D. J. Hausenloy, D. M. Yellon, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 92–100.
- [112] D. Jiang, S. Shi, L. Zhang, L. Liu, B. Ding, B. Zhao, G. Yagnik, F. Zhou, *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 1305–1313.
- [113] G. Eskici, P. H. Axelsen, *Biochemistry* **2012**, *51*, 6289–6311.
- [114] M. Rosini, E. Simoni, A. Milelli, A. Minarini, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2821–2831.
- [115] L. M. Sayre, G. Perry, M. A. Smith, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 172–188.
- [116] M. H. Lee, Z. Yang, C. W. Lim, Y. H. Lee, S. Dongbang, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5071–5109.
- [117] S. McRae Page, M. Martorella, S. Parelkar, I. Kosif, T. Emrick, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 2684–2692.
- [118] S. Zhang, K. Wu, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3192–3194.
- [119] N. Raghunand, C. Howison, A. D. Sherry, S. Zhang, R. J. Gillies, *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 249–257.
- [120] M. L. Garcia-Martin, G. V. Martinez, N. Raghunand, A. D. Sherry, S. Zhang, R. J. Gillies, *Magn. Reson. Med.* **2006**, *55*, 309–315.
- [121] H. Hagen, P. Marzenell, E. Jentsch, F. Wenz, M. R. Veldwijk, A. Mokhir, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 924–934.
- [122] S.-M. Eschmann, F. Paulsen, M. Reimold, H. Dittmann, S. Welz, G. Reischl, H.-J. Machulla, R. Bares, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 253–260.
- [123] J. A. Alawneh, R. R. Moustafa, S. T. Marrapu, U. Jensen-Kondering, R. S. Morris, P. S. Jones, F. I. Aigbirhio, T. D. Fryer, T. A. Carpenter, E. A. Warburton, J.-C. Baron, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2014**, *41*, 736–744.
- [124] M. Bourgeois, H. Rajerison, F. Guerard, M. Mougin-Degraef, J. Barbet, N. Michel, M. Cherel, A. Faivre-Chauvet, *Nucl. Med. Rev.* **2011**, *14*, 90–95.
- [125] K. A. Wood, W. L. Wong, M. I. Saunders, *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 393–400.
- [126] F. A. Rojas-Quijano, G. Tircsö, E. Tircsöné Benyő, Z. Baranyai, H. Tran Hoang, F. K. Kálmán, P. K. Gulaka, V. D. Kodibagkar, S. Aime, Z. Kovács, A. D. Sherry, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 9669–9676.
- [127] K. Okuda, Y. Okabe, T. Kadonosono, T. Ueno, B. G. M. Youssif, S. Kizaka-Kondoh, H. Nagasawa, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 324–329.
- [128] N. L. Baganz, R. D. Blakely, *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 48–63.
- [129] S. J. Ratnakar, S. Viswanathan, Z. Kovacs, A. K. Jindal, K. N. Green, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5798–5800.

- [130] P. B. Tsitovich, J. A. Sperryak, J. R. Morrow, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13997–14000.
- [131] R. Bakalova, Z. Zhelev, I. Aoki, T. Saga, *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 2503–2517.
- [132] S. J. Ratnakar, T. C. Soesbe, L. L. Lumata, Q. N. Do, S. Viswanathan, C.-Y. Lin, A. D. Sherry, Z. Kovacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14904–14907.
- [133] C. Tu, R. Nagao, A. Y. Louie, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6669–6673.
- [134] E. M. Gale, C. M. Jones, I. Ramsay, C. T. Farrar, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 15861–15864.
- [135] D. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, G. M. Lanza, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8431–8444.
- [136] E. M. Gale, S. Mukherjee, C. Liu, G. S. Loving, P. Caravan, *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 10748–10761.
- [137] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, *NMR of Paramagnetic Molecules: Applications to Metallobiomolecules and Models*, Elsevier, **2016**.
- [138] S. Aime, M. Botta, E. Gianolio, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 747–750.
- [139] G. Hernandez, R. G. Bryant, *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 394–397.
- [140] G. S. Loving, S. Mukherjee, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4620–4623.
- [141] E. Rodríguez, M. Nilges, R. Weissleder, J. W. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 168–177.
- [142] H. Börzel, P. Comba, C. Katsichtis, W. Kiefer, A. Lienke, V. Nagel, H. Pritzkow, *Chem. – Eur. J.* **1999**, *5*, 1716–1721.
- [143] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [144] R. S. Coleman, J.-S. Kong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3538–3539.
- [145] M. R. Bukowski, P. Comba, C. Limberg, M. Merz, L. Que Jr., T. Wistuba, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1303–1307.
- [146] W. Nam, M. H. Lim, S.-Y. Oh, J. H. Lee, H. J. Lee, S. K. Woo, C. Kim, W. Shin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3646–3649.
- [147] M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939–986.
- [148] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980.
- [149] N. Lehnert, F. Neese, R. Y. N. Ho, Que Lawrence, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10810–10822.
- [150] A. Karlsson, J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Science* **2003**, *299*, 1039–1042.
- [151] C. V. Sastri, M. S. Seo, M. J. Park, K. M. Kim, W. Nam, *Chem. Commun.* **2005**, *0*, 1405–1407.
- [152] O. Cuzan, S. Shova, G. Novitchi, V. Lozan, *Inorganica Chim. Acta* **2023**, *553*, 121526.
- [153] P. Comba, M. Kerscher, *Cryst. Eng.* **2003**, *6*, 197–211.
- [154] M. R. Bukowski, P. Comba, A. Lienke, C. Limberg, C. Lopez de Laorden, R. Mas-Ballesté, M. Merz, L. Que Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3446–3449.
- [155] M. Haberberger, C. I. Someya, A. Company, E. Irran, S. Enthaler, *Catal. Lett.* **2012**, *142*, 557–565.
- [156] X. Hu, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 1867–1886.
- [157] R. Jana, T. P. Pathak, M. S. Sigman, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1417–1492.

- [158] C. Policar, in *Redox-Act. Ther.* (Eds.: I. Batinić-Haberle, J.S. Rebouças, I. Spasojević), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 125–164.
- [159] P. R. Gardner, I. Raineri, L. B. Epstein, C. W. White, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13399–13405.
- [160] P. R. Gardner, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8757–8763.
- [161] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, **2015**.
- [162] Y. Sheng, I. A. Abreu, D. E. Cabelli, M. J. Maroney, A.-F. Miller, M. Teixeira, J. S. Valentine, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3854–3918.
- [163] S. Melov, P. Coskun, M. Patel, R. Tuinstra, B. Cottrell, A. S. Jun, T. H. Zastawny, M. Dizdaroglu, S. I. Goodman, T.-T. Huang, H. Mizioro, C. J. Epstein, D. C. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 846–851.
- [164] Y. Li, T.-T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace, C. J. Epstein, *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 376–381.
- [165] A. K. Holley, S. K. Dhar, Y. Xu, D. K. St. Clair, *Amino Acids* **2012**, *42*, 139–158.
- [166] F. Cisnetti, A.-S. Lefèvre, R. Guillot, F. Lambert, G. Blain, E. Anxolabéhère-Mallart, C. Policar, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 4472–4480.
- [167] S. Durot, C. Policar, F. Cisnetti, F. Lambert, J.-P. Renault, G. Pelosi, G. Blain, H. Korri-Yousoufi, J.-P. Mahy, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 3513–3523.
- [168] E. Mathieu, A.-S. Bernard, N. Delsuc, E. Quévrain, G. Gazzah, B. Lai, F. Chain, P. Langella, M. Bachelet, J. Masliah, P. Seksik, C. Policar, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 2545–2555.
- [169] M. Zoumpoulaki, G. Schanne, N. Delsuc, H. Preud'homme, E. Quévrain, N. Eskenazi, G. Gazzah, R. Guillot, P. Seksik, J. Vinh, R. Lobinski, C. Policar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202203066.
- [170] G. Schanne, M. Zoumpoulaki, G. Gazzah, A. Vincent, H. Preud'homme, R. Lobinski, S. Demignot, P. Seksik, N. Delsuc, C. Policar, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 3858122.
- [171] O. Iranzo, *Bioorganic Chem.* **2011**, *39*, 73–87.
- [172] I. Batinic-Haberle, A. Tovmasyan, E. R. H. Roberts, Z. Vujaskovic, K. W. Leong, I. Spasojevic, *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 2372–2415.
- [173] L. Zecca, M. B. H. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor, R. R. Crichton, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 863–873.
- [174] E. L. Que, D. W. Domaille, C. J. Chang, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1517–1549.
- [175] P. Faller, C. Hureau, *Dalton Trans.* **2009**, *0*, 1080–1094.
- [176] G. A. Rutter, P. Chabosseau, E. A. Bellomo, W. Maret, R. K. Mitchell, D. J. Hodson, A. Solomou, M. Hu, *Proc. Nutr. Soc.* **2016**, *75*, 61–72.
- [177] B. L. Vallee, in *Adv. Protein Chem.* (Eds.: M.L. Anson, K. Bailey, J.T. Edsall), Academic Press, **1955**, pp. 317–384.
- [178] M. Brines, A. Cerami, *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 484–494.
- [179] S. L. Sensi, P. Paoletti, A. I. Bush, I. Sekler, *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, *10*, 780–791.
- [180] K. Kikuchi, K. Komatsu, T. Nagano, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 182–191.
- [181] K. Hanaoka, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Nagano, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 1840–1843.
- [182] K. Hanaoka, K. Kikuchi, Y. Urano, M. Narazaki, T. Yokawa, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1027–1032.
- [183] C. S. Bonnet, É. Tóth, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 367–384.

- [184] M. Isaac, A. Pallier, F. Szeremeta, P.-A. Bayle, L. Barantin, C. S. Bonnet, O. Sénèque, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 7350–7353.
- [185] B. J. Allen, G. Goozee, S. Sarkar, G. Beyer, C. Morel, A. P. Byrne, *Appl. Radiat. Isot.* **2001**, *54*, 53–58.
- [186] C. Müller, A. Singh, C. A. Umbricht, H. R. Kulkarni, K. Johnston, M. Benešová, S. Senftleben, D. Müller, C. Vermeulen, R. Schibli, U. Köster, N. P. van der Meulen, R. P. Baum, *EJNMMI Res.* **2019**, *9*, DOI 10.1186/s13550-019-0538-1.
- [187] J.-C. G. Bünzli, *J. Coord. Chem.* **2014**, *67*, 3706–3733.
- [188] J.-C. G. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048.
- [189] F. Braun, P. Comba, L. Grimm, D.-P. Hertel, B. Pokrandt, H. Wadepohl, *Inorganica Chim. Acta* **2019**, *484*, 464–468.
- [190] L. Pellegatti, J. Zhang, B. Drahos, S. Villette, F. Suzenet, G. Guillaumet, S. Petoud, É. Tóth, *Chem. Commun.* **2008**, 6591.
- [191] S. Abada, A. Lecointre, M. Elhabiri, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, G. Tallec, M. Mazzanti, L. J. Charbonnière, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4085.
- [192] Y. Bretonnière, M. Mazzanti, J. Pécaut, F. A. Dunand, A. E. Merbach, *Chem. Commun.* **2001**, 621–622.
- [193] C. Gateau, M. Mazzanti, J. Pécaut, F. A. Dunand, L. Helm, *Dalton Trans* **2003**, 2428–2433.
- [194] C. Charpentier, J. Salaam, A. Nonat, F. Carniato, O. Jeannin, I. Brandariz, D. Esteban-Gomez, C. Platas-Iglesias, L. J. Charbonnière, M. Botta, *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26*, 5407–5418.
- [195] J. Salaam, L. Tabti, S. Bahamyrou, A. Lecointre, O. Hernandez Alba, O. Jeannin, F. Camerel, S. Cianféroni, E. Bentouhami, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 6095–6106.
- [196] M. Sy, Synthèse de Ligands de Type Bispidine Pour La Complexation Du Manganèse (II) et Leurs Applications à l’imagerie, These de doctorat, Strasbourg, **2021**.
- [197] J. L. Kolanowski, E. Jeanneau, R. Steinhoff, J. Hasserodt, *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 8839–8849.
- [198] M. Mato-Iglesias, A. Roca-Sabio, Z. Pálinkás, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, É. Tóth, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 7840–7851.
- [199] G. D. Klungness, R. H. Byrne, *Polyhedron*, **2000**, *19*, 99–107.
- [200] M. Le Fur, E. Molnár, M. Beyler, O. Fougère, D. Esteban-Gómez, O. Rousseaux, R. Tripier, G. Tircsó, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 6932–6945.
- [201] A. Nonat, C. Gateau, P. H. Fries, M. Mazzanti, *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12*, 7133–7150.
- [202] M. Regueiro-Figueroa, B. Bensenane, E. Ruscsák, D. Esteban-Gómez, L. J. Charbonnière, G. Tircsó, I. Tóth, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, C. Platas-Iglesias, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4125–4141.
- [203] C. Charpentier, J. Salaam, A. Lecointre, O. Jeannin, A. Nonat, L. J. Charbonnière, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019**, *2019*, 2168–2174.
- [204] M. Sy, A. Nonat, N. Hildebrandt, L. J. Charbonnière, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5080–5095.
- [205] A. Roux, Synthèse et Fonctionnalisation de Bispidines Pour La Complexation Du ⁶⁴Cu En Vue d’applications En Imagerie Médicale Par Tomographie à Émission de Positrons et En Radiothérapie, These de doctorat, Strasbourg, **2014**.
- [206] R. Gillet, Synthèse et Caractérisation de Bispidines, Chélatants Du ⁶⁴Cu, En Vue d’applications Pour La Tomographie à Émission de Positrons, These de doctorat, Strasbourg, **2017**.
- [207] J. M. Held, *Antioxid. Redox Signal.* **2020**, *32*, 659–676.

- [208] S. M. A. Pinto, M. J. F. Calvete, M. E. Ghica, S. Soler, I. Gallardo, A. Pallier, M. B. Laranjo, A. M. S. Cardoso, M. M. C. A. Castro, C. M. A. Brett, M. M. Pereira, É. Tóth, C. F. G. C. Geraldes, *Dalton Trans.* **2019**, 48, 3249–3262.
- [209] G. Bernardinelli, D. Fernandez, R. Gosmini, P. Meier, A. Ripa, P. Schüpfer, B. Treptow, E. P. Kündig, *Chirality* **2000**, 12, 529–539.
- [210] P. K. Mandal, J. S. McMurray, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6599–6601.
- [211] T. Legdali, A. Roux, C. Platas-Iglesias, F. Camerel, A. M. Nonat, L. J. Charbonnière, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 11167–11176.
- [212] D. Unjaroen, M. Swart, W. R. Browne, *Inorg. Chem.* **2017**, 56, 470–479.
- [213] C.-E. Yeom, S. Y. Lee, Y. J. Kim, B. M. Kim, *Synlett* **2005**, 2005, 1527–1530.
- [214] J. M. Antosiewicz, D. Shugar, *Biophys. Rev.* **2016**, 8, 151–161.
- [215] E. Pines, in *Chem. Phenols*, John Wiley & Sons, Ltd, **2003**, pp. 491–527.
- [216] B. Drahoš, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, L. Helm, I. Lukeš, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 12785–12801.
- [217] A. Ringbom, *J. Chem. Educ.* **1958**, 35, 282.
- [218] Charbonnière, L.J.; Nonat, A.; Toth, E.; Sy Maryame., *Novel Bispidine-Based Metal Chelating Ligands Displaying Good Relaxivity*, **2021**, 21306966.9.
- [219] D. H. Powell, O. M. N. Dhubhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9333–9346.
- [220] E. M. Gale, J. Zhu, P. Caravan, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 18600–18608.
- [221] G. A. Rolla, C. Platas-Iglesias, M. Botta, L. Tei, L. Helm, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 3268–3279.
- [222] E. Balogh, Z. He, W. Hsieh, S. Liu, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 238–250.
- [223] R. S. Nicholson, Irving. Shain, *Anal. Chem.* **1964**, 36, 706–723.
- [224] M. M. Bernardo, R. R. Schroeder, D. B. Rorabacher, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 1241–1247.
- [225] B. Drahoš, I. Lukeš, É. Tóth, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2012, 1975–1986.
- [226] Y. Fukuda, M. Hirota, M. Kon-no, A. Nakao, K. Umezawa, *Inorganica Chim. Acta* **2002**, 339, 322–326.
- [227] B. Drahoš, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 3224–3238.
- [228] E. Pelizzetti, E. Mentasti, G. Giraudi, *Inorganica Chim. Acta* **1975**, 15, L1–L3.
- [229] S. M. Pinto, V. Tomé, M. J. F. Calvete, M. M. C. A. Castro, É. Tóth, C. F. G. C. Geraldes, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, 390, 1–31.
- [230] M. Fodor, P. Szabó, G. Lendvay, O. Horváth, *Z. Für Phys. Chem.* **2021**, 236, DOI 10.1515/zpch-2020-1787.
- [231] H. Musso, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 723–735.
- [232] B. Meunier, in *Compr. Coord. Chem. II* (Eds.: J.A. McCleverty, T.J. Meyer), Pergamon, Oxford, **2003**, pp. 261–280.
- [233] F. Peral, E. Gallego, *J. Mol. Struct.* **1997**, 415, 187–196.
- [234] P. Cieslik, P. Comba, B. Dittmar, D. Ndiaye, É. Tóth, G. Velmurugan, H. Wadepohl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e202115580.
- [235] I. Kaljurand, T. Rodima, I. Leito, I. A. Koppel, R. Schwesinger, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6202–6208.

- [236] R. E. Hamm, M. A. Suwyn, *Inorg. Chem.* **1967**, *6*, 139–142.
- [237] V. J.-P. L  v  que, C. K. Vance, H. S. Nick, D. N. Silverman, *Biochemistry* **2001**, *40*, 10586–10591.
- [238] W. C. Barrette, D. T. Sawyer, J. A. Fee, K. Asada, *Biochemistry* **1983**, *22*, 624–627.
- [239] J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055.
- [240] S. A. Goscin, I. Fridovich, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **1972**, *289*, 276–283.
- [241] A. Okado-Matsumoto, I. Fridovich, *Anal. Biochem.* **2001**, *298*, 337–342.
- [242] A. Vincent, M. Thauvin, E. Quévrain, E. Mathieu, S. Layani, P. Seksik, I. Batinic-Haberle, S. Vrız, C. Polıcar, N. Delsuc, *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *219*, 111431.
- [243] Q. Gao, L. Qi, T. Wu, J. Wang, *Mol. Cell. Biochem.* **2012**, *361*, 31–37.
- [244] A.-S. Bernard, C. Giroud, H. Y. Vincent Ching, A. Meunier, V. Ambike, C. Amatore, M. Guille Collignon, F. Lemaître, C. Polıcar, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6399–6403.
- [245] G. Fanali, A. Di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects Med.* **2012**, *33*, 209–290.
- [246] P. Caravan, G. Parigi, J. M. Chasse, N. J. Cloutier, J. J. Ellison, R. B. Lauffer, C. Luchinat, S. A. McDermid, M. Spiller, T. J. McMurry, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 6632–6639.
- [247] K. L. Cheng, B. L. Goydish, *Talanta* **1962**, *9*, 987–995.
- [248] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- [249] B. R. Masters, *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 039901.
- [250] H. Ishida, S. Tobita, Y. Hasegawa, R. Katoh, K. Nozaki, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2449–2458.
- [251] N. Weibel, L. J. Charbonnière, M. Guardigli, A. Roda, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4888–4896.
- [252] R. C. Benson, H. A. Kues, *Phys. Med. Biol.* **1978**, *23*, 159.
- [253] A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, *0*, 493–504.
- [254] H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 95–101.
- [255] H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 257–264.
- [256] N. A. Barnes, A. T. Brooker, S. M. Godfrey, P. R. Mallender, R. G. Pritchard, M. Sadler, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1019–1030.

Liste des abréviations

ATSM	Diacetyl-bis(N4-méthylthiosemicarbazone
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CB-TE2A	11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tetraaza-bicyclo[6.6.2]hexadecane
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDTA	trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CE	Capture d'électrons
COSY	COrrrelation Spectroscopy
Cyclam	1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane
Cyclen	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane
CYDTA	2,2',2'',2'''-(cyclohexane-1,2-diylbis(azanetriyl))tetraacetic acid
DCM	Dichlorométhane
DFO	DesFerriOxamine
DFT	Density Functional Theory
DIPEA	N,N-DiisoPropylEthylAmine
DMAP	4-DiMéthylAminoPyridine
DMB	DiMétoxyBenzylamine
DMF	DiMéthylFormamide
DMP	DiMéthylPipérazine
DO1A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-acetic acid
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
DPA	bis-(2-pyridylméthyl)amine
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
Ehc	Potentiel de réduction à demi-cellule
ES	ElectroSpray
ESI	ElectroSpray Ionization
FDG	FluoroDésoxyGlucose
¹⁸ F-MISO	¹⁸ F-fluoromisonidazole
FPLC	Flash Purification Liquid Chromatography
H ₂ bispa	6,6'-(9-hydroxy-1,5-bis(methoxycarbonyl)-2,4-di(pyridin-2-yl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane-3,7-diyl)bis(methylene))dipicolinic acid
H ₂ bisposx	dimethyl 9-hydroxy-3,7-bis((8-hydroxyquinolin-2-yl)méthyl)-2,4-di(pyridin-2-yl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane-1,5-dicarboxylate
HEPES	2-[4-(2-hydroxyéthyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSA	Human Serum Albumine
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Sequence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IC ₅₀	Inhibition Concentration at 50%
ICP	Inductive Coupled Plasma
IL-8	Interleukine-8
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IS	Inner Sphere
IT	Transition isomérique
<i>k_{cat}</i>	Constante catalytique
LC	Liquid Chromatography
LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
mAb	Anticorps monoclonaux
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeCN	Acétonitrile
MES	Acide 2-éthanosulfonique
MS	Mass Spectroscopy
NC	Nombre de Coordination
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NHE	Normal hydrogen electrode
NHS	N-HydroxySuccinimide
NMM	N-MéthylMorpholine
NMP	N-MéthylPipérazine
NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion

NOESY	Nuclear OverHauser Effect SpectroscopY
NOTA	2,2',2''-(1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyl)triacetic acid
OS	Outer Sphere
PC2A-EA	2,2'-(6-(2-aminoethyl)-3,6,9,15-tetraaza-bicyclo[9.3.1]pentadeca-1(14),11(15),12-triene-3,9-diil)diaceticacid
PyC3A	N-picolyl-N,N',N'-trans-1,2-cyclohexylenediaminetriacetic acid
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive oxygen species
Rq	Rendement quantique
SBM	Solomon-Bloembergen-Morgan
SOD	SuperOxideDismutase
SPIO	Small Paramagnetic Iron Oxide
SPION	SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
SS	Second sphère
Tacn	1,4,7-Triazacyclononane
t-a	Température ambiante
TEMP	Tomographie à Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie à Emission de Positrons
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TLC	Thin Layer Chromatography
TOF	Timo Of Flight
Tpaa	tris[N-(2-pyridylmethyl)-2-aminoethyl]amine
Tpatcn	6,6',6''-[1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triyltris(methylene)]tris[pyri-dine-2-carboxylic acid
USPIO	Ultrasmlal SuperParamagnetic Iron Oxide
UV	Ultra-violet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XO	Xantine Oxydase
XTT	Tétrazolium
ZFS	Zero Field Splitting

Liste des présentations et publications

Conférences nationales

Congrès	Année	Communication	Titre	Auteurs
Journées du WP "Agents d'imagerie", WP1, de FLI et du GDR AIM	Novembre 2021	Orale + Poster	Bispidines complexes for medical imaging	<u>Anli Mahamoud</u> Dr Eva Jakab Tóth Dr Loïc J. Charbonnière Dr Aline M. Nonat
4es Journées scientifiques du GDR AIM	Octobre 2022	Poster	Mn ^{II/III} -bispidine complexes for redox-activated MRI probes	<u>Anli Mahamoud</u> Jean Bouvet Dr Daouda Ndiaye Dr Clotilde Policar Dr Eva Jakab Tóth Dr Aline M. Nonat
3èmes Journées du GDR ChemBio	Juin 2023	Poster	Complexes of Mn ^{II/III} – bispidine for redox MRI contrast agent	<u>Anli Mahamoud</u> Jean Bouvet Dr Daouda Ndiaye Dr Clotilde Policar Dr Eva Jakab Tóth Dr Aline M. Nonat
French Industrial Chemistry Symposium	Juillet 2023	Poster	Design of bispidines complexes for medical imaging	<u>Anli Mahamoud</u> Dr Eva Jakab Tóth Dr Aline M. Nonat

Conférences internationales

Congrès	Année	Communication	Titre	Auteurs
Macrocyclic and Supramolecular Chemistry 2023 Londres	Juillet 2023	Poster	Complexes of Mn ^{II/III} – bispidine for redox MRI contrast agent	<u>Anli Mahamoud</u> Jean Bouvet Dr Daouda Ndiaye Dr Clotilde Policar Dr Eva Jakab Tóth Dr Aline M. Nonat

Autres présentations

- Journée des doctorants 2021 : Les complexes de bispidine pour l'imagerie.
- Concours « ma thèse en 180s » 2022.

Publications

Novembre 2023 : les publications sont en cours d'écriture.

Annexe

I. Détermination de q par la mesure des temps de vie de luminescence

Cette méthode est basée sur la différence des vitesses de désactivation de la luminescence dans l'eau et dans le D₂O par les processus non radiatifs.

Le taux de désactivation global, qui est l'inverse du temps de vie, est donné par l'équation suivante :

$$k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}} = k^r + \sum_n k_n^{nr} = k^r + \sum_i k_i^{vibr} (T) + \sum_j k_j^{tep} (T) + \sum_l k_l^{nr} (T) \quad \text{Equation 1. 1}$$

où k^r et k^{nr} sont les constantes de désactivation radiatives et non radiatives ; *vibr* désigne les processus de vibrations, *tep*, les transferts électroniques photoinduits et k' est la constante associée à tous les autres processus de désactivation non radiatifs.

En séparant la contribution des oscillateurs O-H à la désactivation non radiative, l'Equation 1.1 devient :

$$k_{obs} = \frac{1}{\tau_{obs}} = k^r + \sum k_n^{nr} + k^{OH} \quad \text{Equation 1. 2}$$

Dans le D₂O, le terme k^{OH} peut être négligé. De plus, les vibrations O-D ne provoquent pas de désactivation. Y. Haas et G. Stein ont montré que chaque oscillateur O-H agit indépendamment et que le terme k^{OH} est directement proportionnel au nombre de vibreurs O-H lié au métal, et donc au nombre de molécules d'eau liées q.^[1,2] On obtient donc l'Equation 1.3 :

$$\Delta k = k_{H_2O} - k_{D_2O} = k^{OH} = A'q \text{ soit } q = A(k_{H_2O} - k_{D_2O}) \quad \text{Equation 1. 3}$$

où le coefficient A dépend de l'ion Ln(III) étudié.

Complexes avec les ions Tb(III) et Eu(III)

L'étude par cette méthode de nombreux complexes dont le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination est connu indépendamment par la structure à l'état solide a permis à W.D. Horrocks et D. R. Sudnick de déterminer les coefficients de proportionnalité A_{Eu} et A_{Tb} .^[3,4] Cependant, des erreurs importantes sont observées pour les complexes dont la sphère de coordination est saturée car l'Equation 1.3 ne tient compte ni de l'influence des molécules d'eau présentes dans la seconde sphère de coordination, ni des contributions d'autres vibrations éventuelles (N-H ou C-H). Une étude plus récente, sur une plus grande quantité de complexe a été réalisée par A. Beeby et ses collaborateurs.^[5,6] Des corrections sur les valeurs de Δk et A ont été proposées (Equation 1.4). L'erreur sur q est alors beaucoup plus faible (± 0.2).

$$q = A_{Ln}(k_{H_2O} - k_{D_2O} - a_{Ln}) \quad \text{Equation 1. 4}$$

avec $A_{Tb} = 5 \text{ ms}$, $A_{Eu} = 1.2 \text{ ms}$, $a_{Tb} = 0.06 \text{ ms}^{-1}$ et $a_{Eu} = 0.25 \text{ ms}^{-1}$.

Bibliographie

- [1] Y. Haas, G. Stein, J. Phys. Chem. 1971, 75, 3668.
 [2] Y. Haas, G. Stein, J. Phys. Chem. 1971, 75, 3677.
 [3] W. Horrocks, D. R. Sudnick, J. Am. Chem. Soc. 1979, 101, 334.
 [4] W. Horrocks, D. R. Sudnick, Acc. Chem. Res. 1981, 14, 384.
 [5] A. Beeby, I. M. Clarkson, R. S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, M. Woods, J. Chem. Soc., Perkin Trans 2 1999, 493.
 [6] R. S. Dickins, D. Parker, A. S. D. Sousa, J. A. G. Williams, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1996, 697.

II. Détermination de la vitesse d'échange des molécules d'eau en première sphère de coordination

Les vitesses de relaxation longitudinale et transversale réduites, respectivement $1/T_{1r}$ et $1/T_{2r}$, ainsi que le déplacement chimique réduit $\Delta\omega_r$, sont donnés par les équations de T. J. Swift et R. G. Connick.^[3] Elles sont détaillées ci-dessous (Equations 2.1 à 2.3). La contribution de sphère externe à la relaxivité longitudinale et transversale est négligée.^[4]

$$\frac{1}{T_{1r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_{1l}} - \frac{1}{T_{1d}} \right] = \frac{1}{T_{1m} + \tau_m} \quad \text{Equation 2. 1}$$

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_{2l}} - \frac{1}{T_{2d}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad \text{Equation 2. 2}$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} (\omega - \omega_d) = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} \quad \text{Equation 2. 3}$$

Avec :

- P_m la fraction molaire de molécules de solvant en première sphère de coordination ;
- T_i les temps de relaxation longitudinale ($i = 1$) et transversale ($i = 2$) de ^{17}O des molécules d'eau en présence d'espèce paramagnétique ;
- T_{id} les temps de relaxation de ^{17}O des molécules d'eau de la référence diamagnétique;
- T_{im} les temps de relaxation de ^{17}O des molécules d'eau liées au centre métallique ;
- ω le déplacement chimique de ^{17}O en présence d'espèce paramagnétique ;
- ω_d le déplacement chimique de ^{17}O pour la référence diamagnétique ;
- $\Delta\omega_m$ la contribution des molécules d'eau en première sphère de coordination ;
- $\Delta\omega_{os}$ la contribution de sphère externe au déplacement chimique, souvent négligée.

La vitesse de relaxation longitudinale $1/T_{1m}$

La vitesse de relaxation longitudinale de ^{17}O des molécules d'eau liées est dominée par les interactions dipôle-dipôle et quadripolaires ($I = 5/2$). Elle est décrite par l'Equation 2. 6 :

$$\frac{1}{T_{1m}} = \left[\frac{1}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{GdO}^6} S(S+1) \right] \times 6\tau_{d1} + \frac{3\pi^2}{10} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \chi^2 \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \tau_R \quad \text{Equation 2. 6}$$

Avec :

- γ_I le rapport gyromagnétique nucléaire de l'oxygène-17 ;
- r_{GdO} la distance moyenne Gd(III)-O ;
- I le nombre quantique de spin nucléaire ($I = 5/2$) ;
- χ la constante de couplage quadripolaire ;
- η un paramètre lié au défaut de symétrie axiale du noyau ;
- τ_{d1} est le temps de corrélation relatif à la dynamique du couplage dipolaire. Il est exprimé par l'Equation 2.7.

$$\frac{1}{\tau_{d1}} = \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_m} \quad \text{Equation 2. 7}$$

La distance moyenne r_{GdO} a été estimée à partir de l'étude des structures cristallographiques d'une série de complexes de Gd(III).^[5] De la même manière que pour la distance Gd(III)-proton, la distance Gd(III)-O peut être considérée comme indépendante du complexe étudié et égale à 2.5 Å. Les paramètres χ et η sont également fixés, en considérant que la constante de couplage quadripolaire est égale à celle de l'eau acidifiée (Equation 2.8).^[6]

$$\chi \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right)^{1/2} = 7.58 \text{ MHz} \quad \text{Equation 2. 8}$$

Ces deux données permettent ensuite de déterminer la vitesse de relaxation réduite et le déplacement chimique réduit de l'oxygène 17 grâce aux équations de Swift et Connick (Equation 1.17 et 1.18) :

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{\tau_m (\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} + \frac{1}{T_{2OS}} \quad \text{Equation 1.17}$$

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{P_m} [\omega - \omega_A] = \frac{\Delta\omega_m}{(1 + \tau_m T_{2m}^{-1})^2 + \tau_m^2 \Delta\omega_m^2} + \Delta\omega_{OS} \quad \text{Equation 1.18}$$

Avec :

- $1/T_{2r}$, la vitesse de relaxation transversale réduite de ^{17}O de la solution paramagnétique.
- $\Delta\omega_r$, le déplacement chimique réduit de ^{17}O de la solution paramagnétique.
- $\Delta\omega_m$, le déplacement chimique réduit de ^{17}O lié au métal.
- $\Delta\omega_{OS}$, le déplacement chimique de ^{17}O de la sphère externe.
- $1/T_{2OS}$, la vitesse de relaxation transversale de ^{17}O de la sphère externe.
- $1/T_{2A}$ et $1/T_2$, respectivement, les vitesses de relaxation transversales de ^{17}O de la référence diamagnétique et de la solution paramagnétique.
- ω_A et ω , respectivement, les déplacements chimiques de ^{17}O de la référence diamagnétique et de la solution paramagnétique.
- τ_m , le temps de résidence de la molécule d'eau.
- T_{2m} , le temps de relaxation transversal de la molécule d'eau liée au métal.

Le déplacement chimique de ^{17}O lié au métal $\Delta\omega_m$ est proportionnel à la constante de couplage scalaire A_0/\hbar selon l'équation 1.19 :

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B A_O}{3k_B T \hbar} \quad \text{Equation 1.19}$$

Avec B, les champs magnétiques, S, le nombre de spin, g_L , le facteur de Landé g isotropique, μ_B , le magnéton de Bohr, k_B , la constante de Boltzmann ($=1,380\,649 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) et T, la température.

Les mesures de la relaxation transversale et du déplacement chimique de ^{17}O sont réalisées dans les conditions où la théorie SBM est valide (jusqu'à 5 T). Comme l'oxygène de la molécule d'eau est directement lié au métal, la contribution scalaire à la relaxation transversale est dominante, il est alors possible d'écrire que (d'après l'équation 1.9 et 1.13) :

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A}{\hbar}\right)^2 \left(\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} + \tau_{e1}\right) \quad \text{Equation 1.20}$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{ie}} \quad (i = 1, 2) \quad \text{Equation 1.21}$$

L'inverse du temps de résidence τ_m correspond à la vitesse d'échange k_{ex} avec les molécules d'eau et est exprimé par l'équation 1.22:

$$k_{ex} = \frac{1}{\tau_m} \cong \frac{k_B T}{\hbar} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_{ex}^{298} T}{298,15} \exp\left[\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T}\right)\right] \quad \text{Equation 1.20}$$

Avec ΔS^\ddagger et ΔH^\ddagger , respectivement, l'entropie et l'enthalpie d'activation du processus d'échange et k_{ex}^{298} , la vitesse d'échange de la molécule d'eau à 298,15 K. Les mesures de la relaxation transversale et du déplacement chimique permettent donc de déterminer un certain nombre de paramètre influençant la relaxivité. Ces paramètres sont k_{ex} , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger , A_O/\hbar , ainsi que τ_v et Δ^2 , les paramètres qui gouvernent le temps de relaxation électronique T_{ie} (équation 1.15 et 1.16).

Bibliographie

- [3] T. J. Swift, R. E. Connick, J. Chem. Phys. 1962, 37, 307.
- [4] K. Micskei, L. Helm, E. Brucher, A. E. Merbach, Inorg. Chem. 1993, 32, 3844.
- [5] M.-R. Spirlet, J. Rebizant, M.-F. Loncin, J. F. Desreux, Inorg. Chem. 1984, 1984, 4278.
- [6] B. Halle, H. Wennerstrom, J. Chem. Phys 1981, 75, 1928.

Anli MAHAMOUD

Complexes de bispidines pour l'imagerie médicale



Résumé

Les bispidines sont une famille de composés hautement préorganisés et versatiles, pouvant complexer divers métaux et conduire à des complexes stables et inertes. Cette thèse décrit la synthèse et la caractérisation de complexes à base de bispidine pour une application en imagerie médicale. Leurs propriétés thermodynamiques, cinétiques, spectroscopiques, relaxométriques et redox ont été étudiées.

Une première partie est axée sur de nouveaux ligands pour la complexation du manganèse(II/III). L'ion manganèse est un agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dont l'efficacité peut être modulée en fonction de son état redox (II/III) en milieu biologique. Une deuxième partie se focalise sur la complexation du terbium(III) pour une application en tomographie par émission de positon (TEP). De par ses 4 isotopes radioactifs, le Tb(III) possède une polyvalence unique en tant que "couteau suisse" pour l'imagerie médicale, le théranostique et la radiothérapie.

Ces travaux ont montré que bien que ces complexes possèdent une stabilité thermodynamique modeste, ils ont des cinétiques de formations rapides et de bonnes inerties cinétiques. Un premier complexe de Mn(III)-bispidine a pu être obtenu.

Mots-clés : bispidine, manganèse, terbium, IRM-redox, immuno-TEP.

Summary

Bispidines are a family of highly pre-organized and versatile compounds that can complex various metals to form stable, inert complexes. This thesis describes the synthesis and characterization of bispidine-based complexes for an application to medical imaging. Their thermodynamic, kinetic, spectroscopic, relaxometric and redox properties were studied.

The first part describes the synthesis of new ligands for the complexation of manganese(II/III) in order to develop redox probes for magnetic resonance imaging (MRI). The redox properties of manganese and its redox state can be modulated in a biological environment, leading to a variation of the contrast in MRI. The second part focuses on Terbium(III) complexation for use in positron emission tomography (PET). With its 4 radioactive isotopes, Tb^{III} has unique versatility as a 'Swiss Army knife' for medical imaging, theranostic and radiotherapy.

This work showed that although these complexes have modest thermodynamic stability, they have rapid formation kinetics and good kinetic inertness. A first Mn(III)-bispidine complex could be obtained.

Key words: bispidine, manganese, terbium, redox-MRI, immuno-PET.