



HAL
open science

Caractérisation et purification de molécules cages de type cryptophane et cucurbituril pour applications en IRM Xenon

Sylvie Coudert

► **To cite this version:**

Sylvie Coudert. Caractérisation et purification de molécules cages de type cryptophane et cucurbituril pour applications en IRM Xenon . Sciences de l'ingénieur [physics]. 2011. dumas-01157683

HAL Id: dumas-01157683

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01157683>

Submitted on 28 May 2015

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

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

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS
PARIS

MEMOIRE

présenté en vue d'obtenir

Le DIPLOME d'INGENIEUR CNAM

SPECIALITE : MESURE ANALYSE

OPTION : SCIENCES ET TECHNIQUES ANALYTIQUES APPLIQUEES A LA
CHIMIE ET AU VIVANT

par

Sylvie COUDERT

**CARACTERISATION ET PURIFICATION DE MOLECULES CAGES
DE TYPE CRYPTOPHANE ET CUCURBITURIL
POUR DES APPLICATIONS EN IRM XENON**

Soutenu le 19 octobre 2011 devant le jury composé de :

Président : Christine PERNELLE (CNAM)

Membres : David-Alexandre BUISSON (CEA Saclay)

François GIRAUD (CNAM)

Xavier MILLOT (CEA Saclay)

Christophe MOULIN (CNAM-CEA Bruyères-le-Châtel)

Bernard ROUSSEAU (CEA Saclay)

Remerciements

Et voilà, quatre ans se sont écoulés depuis le premier jour où j'ai commencé les enseignements au CNAM. Je me souviens encore de la première année en ne sachant pas où cela allait m'amener...Aujourd'hui je suis fière d'avoir franchi ces nombreuses épreuves et d'avoir autant enrichi mes connaissances et mes compétences par cette formation.

Je tiens, tout d'abord, à remercier Bernard ROUSSEAU, pour avoir accepté de m'accueillir dans son service de chimie bio-organique et de marquage (SCBM). Je le remercie pour sa jovialité, sa disponibilité et pour tous ses bons conseils.

Je remercie également David-Alexandre BUISSON pour son encadrement au sein du laboratoire d'analyses. Il a su avec patience et gentillesse, me conseiller et me transmettre beaucoup de ses connaissances. Je remercie également Céline PUENTE pour son aide précieuse et tous les nombreux échanges que l'on a partagés.

Je voulais remercier en particulier Christophe MOULIN d'avoir accepté d'être mon tuteur CNAM, pour la qualité de son enseignement et pour sa sympathie.

Je souhaite évidemment remercier Xavier MILLOT sans qui il m'aurait été impossible de réaliser ce diplôme. Je le remercie de m'avoir fait confiance dans mes choix, de m'avoir dégagé du temps pour arriver à ce résultat et d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie également Catherine BOURCIER pour son soutien, sa disponibilité et sa gentillesse. Merci également à Catherine VUILLEMARD qui m'a également

beaucoup conseillée et fait partager son expérience. Enfin je ne tiens pas à oublier tous les collègues du laboratoire de biologie médicale (LBM) de Saclay pour tous les bons moments passés ensemble et pour m'avoir accompagnée tout au long de ces années.

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans la collaboration de deux équipes au sein du SCBM. Merci à la « Crypto Team » avec Léa, Naoko et Ténin et aux « Cucurbiturils Girls » avec Véronique, Julie et Marie-Pierre qui m'ont beaucoup appris sur la synthèse organique. Merci pour tous ces échanges, leur soutien mutuel, et les rires partagés.

Je remercie également toutes les autres personnes du service du SCBM qui m'ont apporté beaucoup de choses aussi bien scientifiques que personnelles (mais peut-être pas le surnom de Martine...).

Je tiens également à dire un grand merci à toute ma famille d'avoir été autant présente et à l'écoute et de m'avoir fait confiance dans tous mes choix. Une pensée très forte pour ma grand-mère qui était la première à m'encourager...

Je voudrais faire une spéciale dédicace « aux tréteaux ivres », pour leur amitié, leurs moments de détente, leur patience et tous nos fous rires inoubliables. Un clin d'œil à Mariette, qui n'a pas toujours été heureuse de connaître le CNAM mais qui a su être là quand j'en avais besoin et surtout je la remercie pour sa grande patience...

Enfin merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées, et je souhaite plein de réussite aux « Cnameurs » en particulier à Martin-Charles, Hélène, Stéphanie, Amélie et Pascale....

Liste des abréviations

API : Ionisation à Pression Atmosphérique (Atmospheric Pressure Ionisation)

APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique

BEH : Ethylene Bridged Hybrid

CB ou CB[n] : Cucurbituril

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CID : Chambre de collision (Collision Ionic Dissociation)

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CTV : Cyclotrivéatrylène

CV : Coefficient de Variation

DAD : Détecteur à barrettes de diodes (Diode array Detector)

DC : Dichroïsme Circulaire

DCI : Ionisation chimique par désorption

DEDL : Détecteur évaporatif à Diffusion de Lumière

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

ESI : Ionisation Electrospray

FAB : Ionisation par bombardement moléculaire (Fast atom bombardment)

FT-ICR : L'analyseur à résonance cyclotronique à transformée de fourier (Fourier Transform Ion cyclotron Resonance)

GUM : Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (Guide to the expression of uncertainty in measurement)

HEPT : Hauteur équivalente à un plateau théorique

HILIC : Chromatographie à interactions hydrophiles

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IC : Ionisation chimique

ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (Inductively coupled Plasma Mass Spectrometry)

IE : Impact électronique

IR : Infra-Rouge

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LC-MS : Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LD : Limite de Détection
LQ : Limite de Quantification
RMN : Résonance magnétique nucléaire
MALDI : Désorption–ionisation laser assistée par matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)
NTA : Acide Nitrotriacétique
PDMS : Désorption plasma (Plasma desorption spectrometry)
PEG : Polyéthylène glycol
SCBM : Service de Chimie Bio-organique et de Marquage
SCE : Somme des carrés des écarts
SFC : Chromatographie super critique
SM ou MS : Spectrométrie de Masse
SRC : Substance de Référence Certifiée
THF : Tétrahydrofurane
Tr : Temps de rétention
Tr' : Temps de rétention réduit
TIC : Courant Ionique Total (Total Ion Current)
TOF : Le temps de vol (Time of Flight)
UPSFC : Chromatographie super critique Ultraperformante
UV : Ultra-Violet
VIM : Vocabulaire International de Métrologie
Vm : Volume mort
Xe : Xénon

Listes des figures

Figure 1 : Structure des cyclodextrines α -, β - et γ - (de gauche à droite).....	4
Figure 2 : Différentes représentations du calix[4]arène	5
Figure 3 : Encapsulation d'un gaz dans un hémicarcérand ¹⁴	6
Figure 4 : Structure des cryptophanes (n = longueur de la chaîne carbonée).....	7
Figure 5 : Configuration <i>syn</i> (à gauche) et <i>anti</i> (à droite) des cryptophanes	7
Figure 6 : Structures des CB[n] déterminées par cristallographie aux rayons X.....	8
Figure 7 : Dimensions des cucurbiturils (a = largeur de la molécule et b = distance entre les atomes d'oxygène de part et d'autre du CB)	9
Figure 8 : Exemple de biocapteur pour de l'imagerie au ¹²⁹ Xe RMN.....	10
Figure 9 : (a–c) IRM <i>in vivo</i> de la cage thoracique après respiration d'un mélange de gaz contenant du ¹²⁹ Xe hyperpolarisé (a) En gris, IRM ¹ H anatomique (b) Superposition des images obtenues en IRM ¹ H et ¹²⁹ Xe où en rouge est représenté l'espace du xénon dans les poumons (c) ³³	12
Figure 10 : Structure de la biosonde Biotine-Avidine	13
Figure 11 : Spectre RMN- ¹²⁹ Xe du système Biotine-Avidine	14
Figure 12 : Modèle des 3 points d'interaction selon Dalglish ³⁶	20
Figure 13 : Phases stationnaires de type Pirkle	21
Figure 14 : Principe de la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC)	22
Figure 15 : Paramètres importants en chromatographie préparative	23
Figure 16 : Micromass Quattro LC®	26
Figure 17 : Schéma de la LC-MS-UV-DEDL (circuit analytique en bleu).....	27
Figure 18 : Schéma du diviseur et de la pompe make-up.....	28
Figure 19 : Principe de la collecte des fractions par SM	29
Figure 20 : Exemple d'un chromatogramme de purification avec les fractions en bleu et jaune du composé purifié	30
Figure 21 : Photo de la LC-MS-UV-DEDL	30
Figure 22 : Synthèse des cucurbiturils mixtes.....	32
Figure 23 : Structure du CB6Cy[6] déterminée par cristallographie aux rayons X	32
Figure 24 : CB6 (C ₃₆ H ₃₆ N ₂₄ O ₁₂ MM=996,82 g.mol ⁻¹).....	33

Figure 25 : CB6Cy[1](C ₄₀ H ₄₂ N ₂₄ O ₁₂ MM=1050,34 g.mol ⁻¹).....	33
Figure 26 : CB6Cy[2] (C ₄₄ H ₄₈ N ₂₄ O ₁₂ MM=1104,39 g.mol ⁻¹)	34
Figure 27 : CB6Cy[3] (C ₄₈ H ₅₄ N ₂₄ O ₁₂ MM=1158,44 g.mol ⁻¹)	34
Figure 28 : CB6Cy[4] (C ₅₂ H ₆₀ N ₂₄ O ₁₂ M=1212,48 g.mol ⁻¹).....	34
Figure 29 : CB6Cy[5] (C ₅₆ H ₆₆ N ₂₄ O ₁₂ M=1266,53 g.mol ⁻¹).....	34
Figure 30 : CB6Cy[6] (C ₆₀ H ₇₂ N ₂₄ O ₁₂ M=1320,58 g.mol ⁻¹).....	35
Figure 31 : Technologie BEH.....	39
Figure 32 : Greffage des colonnes Phényl et C ₁₈ xbridge Waters©	39
Figure 33 : Chromatogrammes échantillon A LC/MS-ESI+/UV	41
Figure 34 : Extraction des ions multichargés [M+2H] ²⁺	41
Figure 35 : a) Chromatogramme en courant ionique total long60, b-d) Ions [M+2H] ²⁺	43
Figure 36 : a) Chromatogramme en courant ionique total long85-50 b-d) Ions [M+2H] ²⁺	43
Figure 37 : a) Chromatogramme LC-MS-ESI+ long60 à 100 g.L ⁻¹ et b) à d) pics [M+2H] ²⁺	46
Figure 38 : a) Chromatogramme LC-MS-ESI+ long90-50 à 100 g.L-1 et b) à d) pics [M+2H] ²⁺	46
Figure 39 : Spectres de masse du CB6Cy[4] de la solution à 100 g.L ⁻¹	47
Figure 40 : Extractions des ions correspondant au CB6Cy[4] et aux impuretés en long60.....	48
Figure 41 : Spectres de masse du CB6Cy[5] de la solution à 100 g.L ⁻¹	49
Figure 42 : Extractions des ions CB6Cy[5] et CB6Cy[5]	49
Figure 43 : Extractions des ions CB6Cy[5] et des impuretés en long90-50.....	50
Figure 44 : Spectres de masse CB6Cy[6] de la solution à 100 g.L ⁻¹	51
Figure 45 : Spectres de masse des 3 composés après purifications	54
Figure 46 : Chromatogramme TIC du CB6Cy[5] avec extraction de l'ion [M+2H] ²⁺	55
Figure 47 : Chromatogramme TIC du CB6Cy[6] avec extraction de l'ion [M+2H] ²⁺	55
Figure 48 : Chromatogrammes (a-TIC et b-d extraction des [M+2H] ²⁺) du CB6 à CB6Cy[3]....	58
Figure 49 : Spectres de masse des CB6Cy[1 à 3]	59
Figure 50 : Chromatogrammes TIC avec extractions des [M+2H] ²⁺ de CB6 à CB6Cy[3]	60
Figure 51 : Chromatogrammes de purification TIC avec extractions pics [M+2H] ²⁺	61
Figure 52 : Chromatogramme TIC après purification du CB6Cy[3] et extraction du [M+2H] ²⁺	62
Figure 53 : Chromatogramme TIC après purification du CB6Cy[1] et extraction du [M+2H] ²⁺	62
Figure 54 : Cucurbit[7]uril C ₄₂ H ₄₂ N ₂₈ O ₁₄ M=1162,96 g.mol ⁻¹	67
Figure 55: Droite d'étalonnage interne.....	69
Figure 56 : Structure générale des cryptophanes	81

Figure 57 : Synthèse du cryptophane-2.1.1	83
Figure 58 : Configuration <i>anti</i> et <i>syn</i> du cryptophane	83
Figure 59 : Structure du greffon colonne type « Pirkle » Whelk-O1.....	84
Figure 60 : Structure du greffon colonne ULMO.....	84
Figure 61 : Chromatogramme du cryptophane 211 à 240 nm	85
Figure 62 : Chromatogramme du cryptophane-211 par dichroïsme circulaire	86
Figure 63 : Structure de la biosonde bimodale	87
Figure 64 : Synthèse de la biosonde bimodale	88
Figure 65 : Chromatogrammes TIC MS-ESI+/UV/DEDL de la biosonde	89
Figure 66 : Ligand de la biosonde bimodale.....	90
Figure 67 : Chromatogrammes ESI+ et DEDL du ligand avant la purification	91
Figure 68 : Spectre de masse du ligand tr=18,9min.....	92
Figure 69 : Chromatogrammes ESI+ et DEDL du ligand après la purification	93
Figure 70 : Chromatogrammes TIC MS-ESI+/UV de la biosonde en long85-75-70.....	94
Figure 71 : Spectre de masse de la biosonde à partir du chromatogramme long85-75-70	94
Figure 72 : Biosonde NTA	96
Figure 73 : Synthèse de la Biosonde NTA.....	96
Figure 74 : Chromatogramme TIC-MS-ESI+ biosonde NTA dans les conditions optimisées....	97
Figure 75 : Spectres RMN- ¹²⁹ Xe biosonde NTA (seule en rouge et après ajout de zinc en bleu)	98
Figure 76 : La polarisation nucléaire	103
Figure 77 : Signal RMN du ¹²⁹ Xe thermique (à gauche) et hyperpolarisé (à droite).....	104
Figure 78 : Schéma de polarisation du Rubidium	105
Figure 79 : a) Schéma d'hyperpolarisation du ¹²⁹ Xe par pompage optique et b) Exemple de spectre de RMN au ¹²⁹ Xe hyperpolarisé complexé ou non dans une molécule cage.....	105
Figure 80 : Choix d'une méthode chromatographique (<i>Caude</i>)	107
Figure 81 : Courbe de Van Deemter en CPG	108
Figure 82 : Caractéristiques d'une courbe de Gauss.....	110
Figure 83 : Le facteur de résolution R de 0,75 à 1,5	112
Figure 84 : Ionisation Electrospray du Micromass Quattro LC.....	118
Figure 85 : Analyseur quadripolaire	119
Figure 86 : Schéma du PL-ELS-1000	121

Figure 87 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[1] purifié (échantillon B)	130
Figure 88 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[2] purifié (échantillon B)	130
Figure 89 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[3] purifié (échantillon B)	131
Figure 90: Spectre RMN-1H du CB6Cy[4] purifié (échantillon A).....	131
Figure 91 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[4] purifié (échantillon A).....	132
Figure 92 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[6] purifié (échantillon A).....	132
Figure 93 : Spectre RMN- ¹²⁹ Xe du CB6Cy[1] dans D ₂ O	133
Figure 94 : Spectre RMN- ¹²⁹ Xe du CB6Cy[1] dans D ₂ O	133
Figure 95 : Spectre RMN- ¹²⁹ Xe du CB6Cy[1] dans D ₂ O	133
Figure 96 : Spectre RMN-1H du ligand de la biosonde bimodale	134
Figure 97 : Spectre RMN-1H de la biosonde bimodale n°2.....	134
Figure 98 : Spectre RMN- ¹²⁹ Xe hyperpolarisé bimodale n°2 (D2O pH=7,4 T=293K)	135
Figure 99 : Spectre RMN-1H de la biosonde NTA	135
Figure 100 : Spectre RMN- ¹²⁹ Xe hyperpolarisé de la biosonde NTA (D2O pH=7,4 T=293K...)	136
Figure 101 : Table des coefficients a _i	138
Figure 102 : Table de shapiro Wilk pour W _a avec α= 5 et 1%.....	139
Figure 103 : Table de Fisher au risque alpha de 1% avec I _A =ddl1 et I _B =ddl2	141
Figure 104 : Table de Cochran avec p le nombre de séries et n le nombre de répétitions...	143
Figure 105 : Table de Grubbs aux risques α de 1 et 5% avec p le nombre de série.	145

Liste des tableaux

Tableau 1 : Dimensions et propriétés physiques des CB[n] et des cyclodextrines.....	9
Tableau 2 : Différences entre l'HPLC analytique et préparative.....	23
Tableau 3 : Optimisation des paramètres des 2 spectromètres de masse.....	36
Tableau 4 : Masses molaires et ions des CB6Cy[1] à CB6Cy[6] en MS-ESI+	37
Tableau 5 : Temps de rétention Tr et efficacité des colonnes N des CB6Cy[n]	40
Tableau 6 : Temps de rétention (min) et résolutions des CB6Cy[4 à 6] selon les différents gradients testés	42
Tableau 7 : Résultats des chromatogrammes de la surcharge de 0,02 à 2 mg injectés	45
Tableau 8 : Colonnes analytiques et préparatives utilisées.....	52
Tableau 9 : Résultats des chromatogrammes VL348 en préparative en Long60	53
Tableau 10 : Comparaison de la séparation des CB6Cy[n] sur colonne phényl.....	57
Tableau 11 : Séparation des CB6Cy[1 à 3] avec le gradient long70.....	58
Tableau 12 : Temps de rétention (min) et résolutions de l'échantillon B LC-Prep en long70.	60
Tableau 13 : Proportions relatives des CB6Cy[n] purifiés dans l'échantillon B	64
Tableau 14 : Masses totales des échantillons selon leurs conditions de synthèse	65
Tableau 15 : Proportions relatives des CB6Cy[n] mesurés dans chaque échantillon.....	65
Tableau 16: Préparation de la gamme d'étalonnage.....	68
Tableau 17 : Moyennes des résultats obtenus après intégration de chaque pic (CB6 et CB7)69	
Tableau 18 : Résultats du test statistique de Fischer selon la norme XP T90-220	70
Tableau 19 : Préparation des solutions pour les essais de fidélité	72
Tableau 20 : Bilan de la fidélité intermédiaire pour les trois niveaux de concentration.....	73
Tableau 21 : Estimation de la justesse par le calcul du biais	73
Tableau 22 : Sources d'incertitudes selon les 5M.....	74
Tableau 23 : Synthèse des critères de performance validés.....	75
Tableau 24 : Pourcentages massiques des CB6Cy[n] dans les différents échantillons (LQ= limite de quantification, LD=limite de détection) avec l'incertitude associée à k=2.....	76
Tableau 25 : Rendements de synthèse en pourcentage.....	77
Tableau 26 : Solubilité des cucurbiturils dans l'eau	79

Tableau 27 : Calculs des différentes SCE et variances avec N = nombre total des mesures et p = nombre de niveaux.....	141
---	-----

Table des matières

I.	INTRODUCTION	1
II.	LES MOLECULES CAGES.....	3
1.	Les cyclodextrines	3
2.	Les calix[n]arènes	4
3.	Les hémicarcérands.....	6
4.	Les cryptophanes.....	6
5.	Les cucurbiturils.....	8
III.	LES BIOSONDES POUR L'IMAGERIE MEDICALE AU XENON 129	11
1.	L'Imagerie à Résonance Magnétique nucléaire (IRM)	11
2.	L'Imagerie à Résonance Magnétique nucléaire au ¹²⁹ Xe	12
3.	Les biosondes au ¹²⁹ Xe hyperpolarisé	13
3.1	Principe d'une biosonde	13
3.2	Les biosondes synthétisées au laboratoire.....	15
IV.	TECHNIQUES ANALYTIQUES DE CARACTERISATION ET DE PURIFICATION.....	16
1.	Analyses structurales et spectrales.....	16
2.	Techniques séparatives	17
2.1	La chromatographie liquide haute performance.....	17
2.1.1	La chromatographie chirale.....	19
a.	Quelques définitions.....	19
b.	Principe	19
c.	Les phases stationnaires chirales	20
2.1.2	La chromatographie HILIC	22
2.1.3	La Chromatographie préparative	23
a.	Optimisation sur colonne préparative.....	24

2.2	La spectrométrie de masse	26
2.2.1	Principe	26
2.3	Le couplage LC-MS	27
V.	LES CUCURBITURILS	31
1.	Caractérisation et purification des cucurbiturils mixtes	32
1.1	Synthèses et structures des CB6Cy[n]	32
1.2	Optimisation des spectromètres de masse	35
1.2.1	Préparation de l'échantillon	35
1.2.2	Réglages des paramètres.....	36
1.3	Caractérisation et purification des CB6Cy[4] à CB6Cy[6]	37
1.3.1	Optimisation LC-MS	38
a.	Préparation de l'échantillon	38
b.	Choix de la colonne.....	38
c.	Choix du gradient et de l'éluant	40
d.	Le choix du gradient	42
1.4	Transposition de la LC-analytique à la LC-préparative	44
1.4.1	Surcharge de la colonne	44
a.	Séparation du CB6Cy[4].....	47
b.	Séparation du CB6Cy[5].....	48
c.	Séparation du CB6Cy[6].....	50
1.4.2	Calculs de transposition.....	51
1.4.3	Résultats de la purification	52
1.4.4	Evaluation des purifications et conclusion.....	54
1.5	Caractérisation et purification des CB6Cy[1] à CB6Cy[3]	56
1.5.1	Préparation de l'échantillon	56
1.5.2	Optimisation LC-MS.....	56

1.5.3	Résultats de la purification des CB6Cy[1] à CB6Cy[3]	60
2.	Quantification des CB6Cy[n]	63
2.1	Evaluation relative des CB6Cy[n]	64
2.2	Principe de l'étalonnage interne et choix de l'étalon.....	66
2.3	Détermination du domaine de mesure et de la linéarité.....	67
2.4	Fidélité.....	71
2.5	Justesse	73
2.6	Limite de détection et de quantification	73
2.7	Incertitudes	74
2.8	Synthèses des critères de validation.....	75
2.9	Dosages des CB6Cy[n].....	76
2.10	Etude de la solubilité des CB6Cy[n]	78
3.	Conclusion	79
VI.	LES CRYPTOPHANES.....	81
1.	Caractérisation du cryptophane-2.1.1	82
1.1	Synthèse et structure.....	83
1.2	Caractérisation HPLC Chirale	83
1.2.1	Choix de la colonne.....	84
1.2.2	Choix des solvants	85
2.	Caractérisation et purification de biosondes.....	87
2.1	La biosonde bimodale	87
2.1.1	Synthèse et structure	87
2.1.2	Caractérisation et purification de la biosonde bimodale.....	88
2.1.3	Caractérisation et purification du ligand HPLC HILIC	90
a.	Optimisation LC-MS.....	90
b.	Purification du ligand.....	92

2.1.4	Caractérisation et purification de la biosonde bimodale n°2.....	93
2.2	La biosonde NTA	95
2.2.1	Synthèse et structure	96
2.2.2	Caractérisation et purification de la biosonde NTA	97
3.	Conclusion	99
VII.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	100
VIII.	ANNEXES	102

I. INTRODUCTION

L'imagerie médicale est certainement l'un des domaines de la médecine qui a le plus progressé ces vingt dernières années. Ces récentes découvertes permettent non seulement un meilleur diagnostic mais offrent aussi de nouveaux espoirs de traitement pour de nombreuses maladies en les détectant à des stades précoces.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM), par sa précision, a permis de grands progrès en imagerie médicale. Son intérêt réside dans sa capacité à réaliser des coupes dans tous les plans de l'espace, et à permettre une ébauche de caractérisation tissulaire (eau, graisse, sang, os...) grâce à la confrontation des différents types d'acquisition possibles. Les techniques d'IRM (basées sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire, RMN) les plus couramment utilisées reposent sur la détection de noyaux comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N . L'IRM présente de nombreux intérêts : c'est une technique non-invasive et elle combine une haute résolution spatiale couplée à une grande pénétration dans les tissus. Néanmoins sa faible sensibilité, implique l'utilisation de différents types d'agents de contraste afin d'améliorer la qualité des images. Pour palier ce manque de sensibilité, de nouvelles méthodes utilisant des gaz hyperpolarisés comme le xénon ont fait leur apparition. Le xénon possède des propriétés physiques remarquables. En plus d'être polarisable, la grande sensibilité de son nuage électronique à son environnement immédiat lui confère des propriétés remarquables de sonde locale. L'utilisation de xénon (^{129}Xe) polarisé par pompage optique a notamment permis de gagner plusieurs ordres de grandeurs en intensité de signal.

Cependant, étant un gaz marqueur non spécifique, le xénon diffuse dans tout l'organisme et se fixe principalement sur des zones hydrophobes. L'idée est de transporter le xénon polarisé jusqu'à certains récepteurs biologiques grâce à des molécules hôtes. Le laboratoire de chimie bio-organique consacre une partie de ses recherches dans la synthèse de nouvelles biosondes destinées à cibler une zone d'intérêt. Parmi les molécules-cages possédant une grande affinité pour le xénon, les cryptophanes et les cucurbiturils ont montré des propriétés très intéressantes. Cependant ces molécules sont souvent insolubles en milieu aqueux, et doivent donc subir des modifications chimiques dans le but d'améliorer leurs solubilités.

Ainsi le premier objectif de ce travail a été de déterminer des méthodes analytiques capables de caractériser les cryptophanes et les cucurbiturils synthétisés au laboratoire. Souvent peu soluble en milieux aqueux, et de structures différentes, chaque molécule cage a nécessité un développement analytique spécifique. L'utilisation de techniques, comme la chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse, a été essentielle pour leur caractérisation. Cependant la difficulté de ces synthèses organiques entraîne souvent la formation de matrices complexes.

Le deuxième objectif de ce travail, a donc été de développer des méthodes complémentaires aux premières, capable de purifier ces molécules. Leur purification reste une étape indispensable pour permettre de poursuivre les étapes de synthèses suivantes et de réaliser des analyses structurales comme la cristallographie ou encore la RMN.

Enfin le dernier objectif a été de développer et de valider une méthode pour quantifier une catégorie de ces molécules cages, les cucurbiturils mixtes (CB6Cy[n]). Cette quantification a permis d'étudier six CB6Cy[n] synthétisés dans diverses conditions afin d'en évaluer le rendement de synthèse, et également leur solubilité dans l'eau.

II. LES MOLECULES CAGES

La chimie supramoléculaire utilise des interactions intermoléculaires où aucune liaison covalente n'est établie entre les espèces qui interagissent, c'est-à-dire molécules, ions ou radicaux. La majorité de ces interactions sont de types host-guest (hôte-invité), récepteur-substrat ou complexe d'inclusion.

En 1987, *D.J. Cram, J.M. Lehn et C.J. Pedersen* se partagent le prix Nobel de chimie pour leurs travaux sur le développement et les applications de molécules ayant des interactions « structure-spécifique » hautement sélectives, c'est-à-dire des molécules qui peuvent se reconnaître entre-elles et choisir avec quelles molécules elles formeront un complexe. Les complexes sont composés de deux molécules (un invité et un hôte) et généralement stabilisés à l'aide de liaisons hydrogènes, de liaisons ioniques, d'interactions π - π , de forces de Van Der Waals, etc. De nombreuses classes de molécules organiques peuvent ainsi former des complexes d'inclusion, comme par exemple, les calixarènes, les cyclodextrines, les hémicarcérands et plus particulièrement **les cryptophanes** et **les cucurbiturils** qui seront développés dans ce mémoire.

1. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides cycliques d'origine naturelle résultant de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. Elles ont été découvertes en 1891 par *Villiers* et caractérisées par *Schardinger* en 1903.

Les composés les plus utilisés ou étudiés sont les α -, β -, et γ -cyclodextrines composées de six, sept, huit unités glucose, respectivement (Figure 1).

Elles possèdent une structure en tronc de cône qui peut être représentée de façon schématique sous forme de godet ou d'abat-jour. Grâce à sa structure amphiphile, les β -cyclodextrines sont solubles dans l'eau et possèdent une cavité interne hydrophobe. Les dimensions de la cavité peuvent aller de 4,7 à 8,3 Å de diamètre et avoir un volume de 174 à 427 Å³ pour les α - et γ -cyclodextrines respectivement.

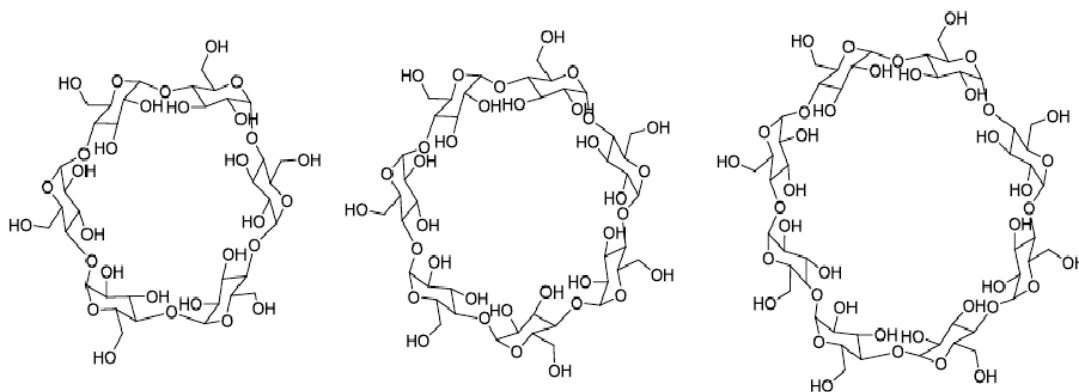


Figure 1 : Structure des cyclodextrines α -, β - et γ - (de gauche à droite).

Ces composés sont utilisés dans différents domaines comme la pharmacie, l'agrochimie, l'analyse, la catalyse et l'alimentaire. Ils peuvent servir de système de transport de médicaments par formation de complexes d'inclusion (*Bekers*¹ et *Bhardwaj*²), dans le traitement de l'eau afin d'éliminer les agents contaminants comme les composés aromatiques (*Kamiya*³) mais ces molécules entrent également dans la composition de phase stationnaire ou mobile pour la séparation des composés chiraux en chromatographie liquide haute performance (*Lu*⁴). Grâce à la cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en milieu aqueux avec une grande variété de molécules hydrophobes et les premiers essais d'encapsulation de gaz par des cyclodextrines ont eu lieu dans les années 1950 (*Cramer*^{5,6}).

2. Les calix[n]arènes

Les calixarènes sont des capsules hydrophobes composées de noyaux aromatiques (n= 4 à 16 phénols) reliés par un pont méthylène. Suivant le nombre d'unités aromatiques, il est possible d'accéder à différentes tailles de calixarènes. Un exemple de calix[4]arène est représenté sur la Figure 2.

¹ Bekers O. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal*, **1991**, 9, 1055-1060.

² Bhardwaj R et al., *J. Pharm. Sci. Technol*, **2000**, 54, 233-239.

³ Kamiya M. et al., *Chemosphere*, **2001**, 42, 251-255.

⁴ Lu X. and Chen Y., *J. Chromatography A*, **2002**, 955, 133-140.

⁵ Cramer F., *Angew. Chem.*, **1952**, 64, 437-447.

⁶ Cramer F. and Henglein F.M., *Chem. Ber.*, **1957**, 90, 2572-2575.

Le terme calixarène est issu des mots « *calix* » (grec) pour sa forme de vase et d'hydrocarbure aromatique « *arène* » pour les cycles aromatiques. Il a été découvert en 1978 par Gutsche.⁷

Sa forme de vase facilite la capture des molécules. De plus la forte polarisation négative générée par les oxygènes des groupements OH lui permet d'attirer les cations et de les retenir dans l'espace situé au centre du macrocycle. Le complexe très stable obtenu, peut être dissocié ultérieurement afin de récupérer le cation. Le diamètre de la cavité interne est de 3,0 ; 7,6 et 11,7 Å pour les calix[4]arène, calix[6]arène et calix[8]arène respectivement.

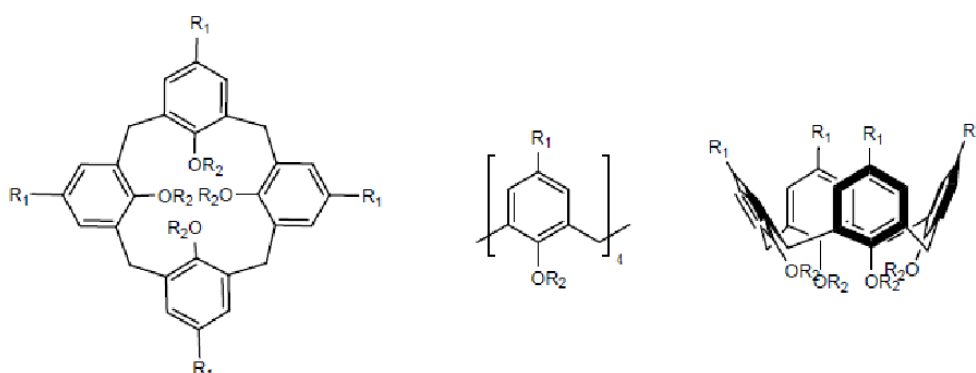


Figure 2 : Différentes représentations du calix[4]arène

Grâce à leurs propriétés, les calixarènes ont, depuis quelques années, trouvé de nombreuses applications pour l'industrie. Des recherches sont poursuivies quant à la propriété de certains calixarènes à transporter des ions métalliques ou des protéines à travers des membranes liquides (Oshimaa⁸).

Les calixarènes sont déjà utilisés dans le retraitement des déchets nucléaires pour leurs propriétés de complexant notamment en ce qui concerne l'uranium (Evans⁹) et surtout le césium (Dozol¹⁰). Cette propriété de complexant est également utilisée dans l'environnement pour décontaminer certains liquides c'est à dire y extraire des molécules indésirables ou pour neutraliser des polluants (Qureshi¹¹).

⁷ Gutsche C.D. and Muthukrishnan R., *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 4905-4906.

⁸ Oshimaa T. *et al.*, *Journal of Membrane Science*, **2008**, 307, 284-291.

⁹ Evans C.J. and Nicholson G.P., *Sensors and Actuators B*, **2005**, 105, 204-207.

¹⁰ Dozol J.F, Luxembourg : European Commission, **1997**, 189 p.

¹¹ Qureshi I. *et al.*, *C. R. Chimie*, **2010**, 13, 1416-1423.

Ils peuvent également être utilisés comme les cyclodextrines en chimie analytique pour la séparation d'énantiomères (Sokoließ¹²).

3. Les hémicarcérands

Ces cages dotées d'une grande cavité obtenues en 1991 par Cram¹³ et ses collaborateurs sont constituées de deux tétramères aromatiques reliés par une chaîne pontante. Elles possèdent un volume interne d'environ 120 Å³ (Figure 3).

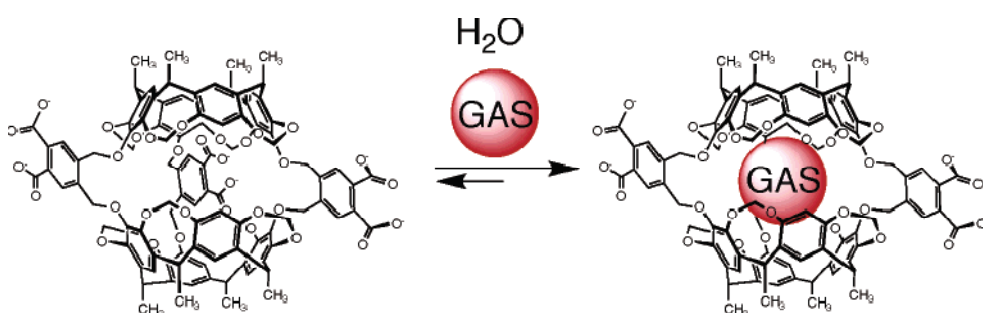


Figure 3 : Encapsulation d'un gaz dans un hémicarcérand¹⁴

Ils sont capables d'encapsuler aussi bien des ions que des molécules (Jankowska¹⁴) comme O₂, N₂, CO₂, Xe et des hydrocarbures (Leontiev¹⁵).

4. Les cryptophanes

Les premiers cryptophanes ont été synthétisés par Gabard et Collet¹⁶ en 1981. Ils sont constitués de deux sous unités cyclotrivratriylènes (CTV) reliées entre elles par des chaînes carbonées de différentes longueurs (Figure 4).

Le volume de leur cavité interne est très variable et dépend de la longueur des chaînes pontantes. Il est par exemple de 81 Å³ pour le cryptophane-111 (avec n=1) et de 121 Å³ pour le cryptophane-333 (avec n=3).

¹² Sokoließ T. et al., *Journal of Chromatography A*, **2002**, 948, 309–319.

¹³ Cram D.J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7717-7727.

¹⁴ Jankowska K.I. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16423–16431.

¹⁵ Leontiev A.V. et al., *Organics letter*, **2007**, 9, 1753-1755.

¹⁶ Gabard J. and Collet A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 1137-1139.

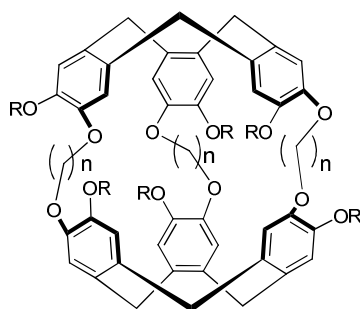


Figure 4 : Structure des cryptophanes (n = longueur de la chaîne carbonée)

Les cryptophanes présentent une structure relativement sphérique et possèdent, comme les autres molécules cages une cavité intérieure hydrophobe capable d'encapsuler différentes petites molécules.

Ils ont également des propriétés optiques de chiralité, apportés par les molécules de départ (CTV) elles mêmes chirales.

Les cryptophanes sont sous deux formes diastéréoisomères représentées sur la Figure 5 : une configuration "syn" et une configuration "anti". Le cryptophane "syn" est celui dans lequel les groupements R_1 et R_2 sont du même côté par rapport à la chaîne pontante.

Le cryptophane "anti" est celui dans lequel les groupements R_1 et R_2 sont de part et d'autre de la chaîne pontante mais seule la forme *anti* est chirale.



Figure 5 : Configuration *syn* (à gauche) et *anti* (à droite) des cryptophanes

Les cryptophanes ont trouvé leurs intérêts dans différents domaines et notamment dans la conception de capteurs chimiques. Benounis *et al.*¹⁷ ont développé un capteur constitué d'une fibre optique capable de détecter le méthane et d'autres alcanes (éthane, propane et butane) par piégeage du gaz dans les cryptophanes.

¹⁷ Benounis M. *et al.*, *Sens. Actuators B*, **2005**, 107, 32-39.

Les récents développements visant à fonctionnaliser les cryptophanes permettent en effet d'envisager l'élaboration de nouvelles molécules "utiles", par exemple pour l'encapsulation de gaz rares pour l'imagerie biomédicale (Chaffee¹⁸). Des équipes du CEA et notamment au sein du SCBM ont travaillé sur ce sujet en développant des cryptophanes homologues (Kotera¹⁹). Ces molécules cages ont été le plus étudiées jusqu'à ce jour en RMN xénon et des études de complexation avec le xénon ont permis de déterminer l'influence de la nature de la cage et du milieu environnant (Berthault²⁰).

5. Les cucurbiturils

Les cucurbit[n]urils (CB[n] figure 6) sont des composés synthétiques formés par plusieurs unités de glycolurils liées par des ponts méthylène. Aujourd'hui de nombreuses synthèses de CB[n] ont été réalisées et les composés connus sont constitués de n = 5 à 10 unités de glycolurils (Kim²¹).

Bien que le premier cucurbituril, le cucurbit[6]uril (CB[6] C₃₆H₃₆N₂₄O₁₂), ait été synthétisé en 1905 (Behrend²²), ce n'est pas avant 1981 que leur nature chimique et leur structure ont été complètement caractérisées par Mock *et al.* (Freeman²³).

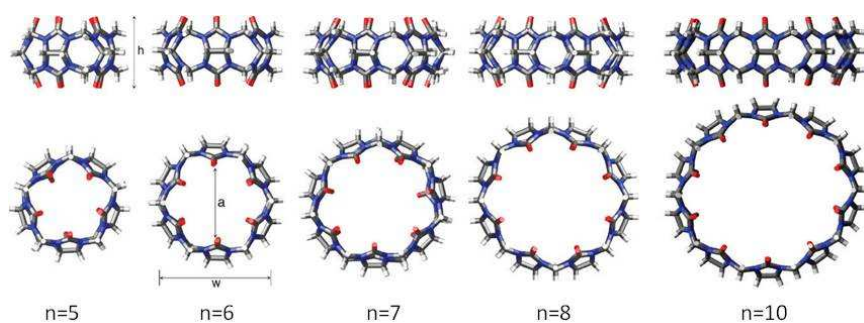


Figure 6 : Structures des CB[n] déterminées par cristallographie aux rayons X²⁴

¹⁸ Chaffee K.E. *et al.*, *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, 13675–13684.

¹⁹ Kotera N. *et al.*, *Organic letters*, **2011**, 13, 2153-2155.

²⁰ Berthault P. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 16456–1645

²¹ Kim J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 540.

²² Behrend R., Meyer E. and Rusche F., *Just. Liebigs Ann. Chem.*, **1905**, 339, 1-37.

²³ Freeman W.A., Mock W. L. and Shih N.-Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 7367-7368.

²⁴ Isaacs L., *Chem. Commun.*, **2009**, 619–629.

Ces composés possèdent une structure rigide, une large gamme de taille (Figure 6) comparable aux cyclodextrines (Figure 7 et Tableau 1). Le Cucurbit[6]uril possède une taille de cavité similaire aux α -cyclodextrines et l'éther couronne (18-couronne-6). Cependant ils se distinguent l'un de l'autre par leurs différences structurales. En effet, les CB[n] présentent une géométrie symétrique avec deux ouvertures identiques de part et d'autre, constituées de groupements carbonyles électronégatifs.

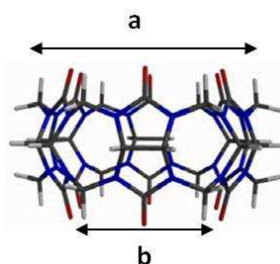


Figure 7 : Dimensions des cucurbiturils (a = largeur de la molécule et b = distance entre les atomes d'oxygène de part et d'autre du CB)

	a [Å]	b [Å]	V [Å ³]	S _{H2O} [mM]
CB[5]	2,4	4,4	82	20-30
CB[6]	3,9	5,8	164	0,018
CB[7]	5,4	7,3	279	20-30
CB[8]	6,9	8,8	479	<0,01
CB[10]	9,0-11,0	10,7-12,6	-	-
α-CD	4,7	5,3	174	149
β-CD	6	6,5	262	16
γ-CD	7,5	8,3	427	178

Tableau 1 : Dimensions et propriétés physiques des CB[n] et des cyclodextrines²⁵

Ces composés possèdent, comme les cryptophanes, une cavité intérieure hydrophobe. Ils peuvent former des complexes avec des molécules organiques ou inorganiques à l'intérieur de la cavité ou au niveau du portail. Ces complexes sont formés par différentes combinaisons d'interactions (dipôle-ion, liaisons hydrogènes, forces de Van der Waals et interactions hydrophobes).

Les cucurbiturils ont trouvé des applications dans différents domaines aussi bien pharmacologiques, environnementaux que biologiques. Dans le domaine de la

²⁵ Lagona J. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 4844 - 4870.

pharmacologie, ils permettent le transport des médicaments. Il a été reporté que le Cucurbit[7]uril (CB[7]) était capable de complexer l'Oxaliplatine, médicament anticancéreux, en encapsulant une partie du principe actif à l'intérieur de sa cavité (Kim²⁶).

Mais d'autres utilisations des cucurbiturils ont fait l'objet de recherches notamment dans des réactions de catalyses chimiques. Kim *et al.*²⁷ ont démontré l'inclusion sélective de deux molécules différentes dans un Cucurbit[8]uril stabilisées par des interactions de transfert de charges afin de former un polymère supramoléculaire.

Comme les autres molécules cages décrites précédemment, les CB[n] sont utilisés dans la purification des eaux usées (Buschmann²⁸), et entrent dans la composition de phase stationnaire en HPLC. Liu *et al.*²⁹ ont synthétisé un perhydroxyCB[6] immobilisé sur un gel de silice et qui permet la séparation d'alcaloïdes en HPLC.

Plus récemment, Cheong *et al.*³⁰ ont développé une nouvelle phase stationnaire chromatographique par polymérisation croisée entre de la silice modifiée et un cucurbit[6]uril, permettant la séparation de composés polaires et non polaires.

Enfin, ils peuvent entrer dans la composition de biocapteurs (Figure 8) pour réaliser de l'imagerie biomédicale RMN-¹²⁹Xe. Kim B. *et al.*³¹ ont étudié un cucurbit[6]uril hydrosoluble (CB[6]* ou CB6Cy[6] composé de six cyclohexyles en position équatoriale) capable de former un complexe stable cinétiquement et thermodynamiquement avec du xénon polarisé.

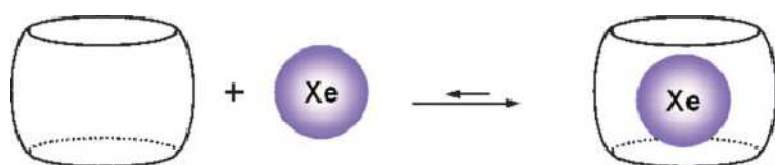


Figure 8 : Exemple de biocapteur pour de l'imagerie au ¹²⁹Xe RMN

Ces recherches ont donc mis en évidence l'efficacité des cucurbiturils à encapsuler du xénon et en font des molécules très prometteuses dans le domaine de l'IRM du ¹²⁹Xe hyperpolarisé.

²⁶ Kim K. *et al.*, *PCT Int. Appl.*, **2003**, WO 03/24978,1-24.

²⁷ Kim H-J. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 1526-1529.

²⁸ Buschmann, H-J *et al.*, *E. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, **2001**, 40, 117-120.

²⁹ Liu S. M. *et al.*, *Talanta*, **2004**, 64, 929.

³⁰ Cheong W. J. *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2008**, 29, 1941-1945.

³¹ Kim B.S. *et al.*, Selvapalam N., Lee H.C. and Kim K., *Chem. Commun.*, **2008**, 2756-2758.

Dans cet objectif, des chercheurs du SCBM s'intéressent à la synthèse de nouveaux cucurbiturils et de cryptophanes pour développer de nouvelles sondes moléculaires.

III. LES BIOSONDES POUR L'IMAGERIE MEDICALE AU XENON 129

1. L'Imagerie à Résonance Magnétique nucléaire (IRM)

L'IRM est une technique qui permet un examen non invasif adapté aux tissus mous. Elle repose sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) qui utilise les propriétés quantiques des noyaux atomiques pour la spectroscopie en analyse chimique. Lors d'un examen d'IRM, on applique un champ magnétique puissant au patient et on mesure la manière dont les moments magnétiques (spins) des noyaux d'hydrogène de son corps entrent en résonance avec des ondes de radiofréquence. L'image finale est une représentation cartographique de la répartition en intensité d'un même type de signal, le contraste étant relié aux variations des temps de relaxation des protons dans le plan choisi.

L'IRM est une technique d'imagerie peu sensible due à la faible polarisation des spins même si l'on augmente l'aimantation. C'est pourquoi aujourd'hui des agents de contraste sont utilisés dans le but d'augmenter le rapport signal sur bruit de l'IRM. Deux types sont actuellement utilisés dans le domaine médical : le gadolinium et les nanoparticules d'oxyde de fer. Ces agents de contrastes permettent ainsi d'accélérer les vitesses de relaxation magnétique des protons des molécules d'eau.

Mais ces deux types d'agents de contraste, bien qu'ayant fait leurs preuves en termes d'utilisation dans le domaine de l'imagerie médicale, présentent des inconvénients de toxicité et de sensibilité à l'échelle moléculaire. Il y a donc un réel besoin de développer des techniques d'imagerie plus performantes en utilisant des molécules biocompatibles. Un nombre croissant de laboratoires s'intéressent aujourd'hui aux espèces hyperpolarisées extrêmement sensibles en IRM comme le ^{129}Xe , obtenu grâce à des techniques d'hyperpolarisation.

2. L'Imagerie à Résonance Magnétique nucléaire au ^{129}Xe

L'emploi du xénon en IRM présente de nombreux avantages. C'est un gaz rare incolore et inodore et, de par son caractère hydrophobe, le xénon est particulièrement sujet aux forces de Van der Waals, c'est-à-dire aux interactions dipôle induit – dipôle induit. Dans la nature on trouve 9 isotopes stables. Parmi ces isotopes, seuls deux sont observables en RMN : le ^{131}Xe (spin $3/2$) et ^{129}Xe (spin $1/2$). Son nuage électronique fortement polarisable va entraîner une sensibilité du déplacement chimique de son noyau vis-à-vis de son environnement immédiat. Sa fréquence de résonance peut s'étendre sur une gamme d'une centaine de ppm.

Le ^{129}Xe présente la particularité d'avoir une polarisation qui peut être considérablement augmentée, d'un facteur de l'ordre de 10^5 , par pompage optique³² (annexe 1) par rapport à sa valeur à l'équilibre thermique. On parle alors d'hyperpolarisation, ce qui va compenser la faible densité volumique de ces noyaux, les rendant ainsi plus aisément détectables.

Cette technique d'hyperpolarisation est réalisée au laboratoire du CEA de SACLAY. Ce gaz hyperpolarisé a été utilisé initialement pour imager des poumons et des cerveaux (Swanson³³ et Mugler³⁴ Figure 9).



Figure 9 : (a–c) IRM *in vivo* de la cage thoracique après respiration d'un mélange de gaz contenant du ^{129}Xe hyperpolarisé (a) En gris, IRM ^1H anatomique (b) Superposition des images obtenues en IRM ^1H et ^{129}Xe où en rouge est représenté l'espace du xénon dans les poumons (c)³³

Le xénon est donc un gaz qui possède des propriétés de détection intrinsèques intéressantes et exploitables. Cependant, c'est un gaz marqueur non spécifique qui diffuse dans tout l'organisme et se fixe principalement sur des zones hydrophobes.

³² Desvaux H. *et al.*, *Eur. Phys. J. D.*, **2000**, 12, 289-296.

³³ Swanson S.D. *et al.*, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 38, 695.

³⁴ Mugler J.P. *et al.*, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 37, 809.

Il apparait donc de manière évidente que l'obtention de molécules capables de transporter le xénon vers une cible biologique à imager, est indispensable.

3. Les biosondes au ^{129}Xe hyperpolarisé

3.1 Principe d'une biosonde

Les biosondes étudiées dans ce mémoire sont constituées d'une « cage » et d'un ligand capable de se lier spécifiquement à un récepteur biologique.

Ce principe a été introduit par l'équipe de *David Wemmer* et *Alexander Pines* à Berkeley en 2001. Ils ont publié le premier exemple de biosonde xénon basé sur l'utilisation d'un cryptophane et de la RMN ^{129}Xe hyperpolarisé.

Une sonde comporte trois parties :

- une molécule cage, représentée ici par un cryptophane
- un bras espaceur, capable de rendre le système hydrosoluble
- un ligand se fixant à un récepteur, dans la première sonde synthétisée par *Spence*³⁵, le ligand est la biotine, qui a pour récepteur l'avidine (Figure 10).

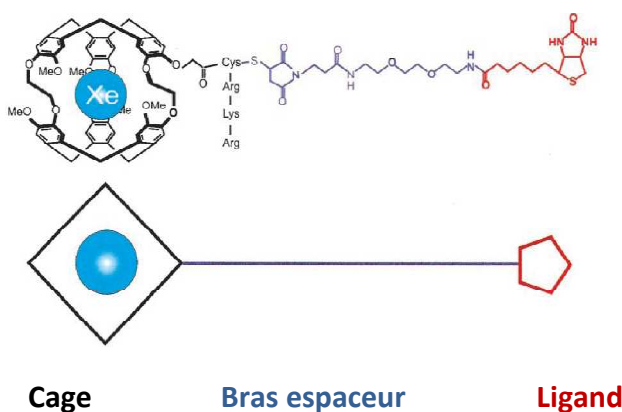


Figure 10 : Structure de la biosonde Biotine-Avidine

³⁵ Spence M.M. *et al.*, *P.N.A.S.*, **2001**, 98, 19, 10654-10657.

Grâce à son ligand, la biosonde va se lier spécifiquement à son récepteur biologique. Une partie du ^{129}Xe hyperpolarisé ayant une grande affinité pour la partie hydrophobe de la molécule cage va ainsi se retrouver dans sa cavité intérieure. Le xénon étant très sensible à son environnement, le déplacement chimique sera différent qu'il soit sous forme libre, encapsulé dans la molécule cage ou encapsulé dans la cage elle-même liée à sa cible.

Pour illustrer cela, on peut observer le spectre (Figure 11) obtenu après complexation du xénon par la biosonde biotine-avidine.

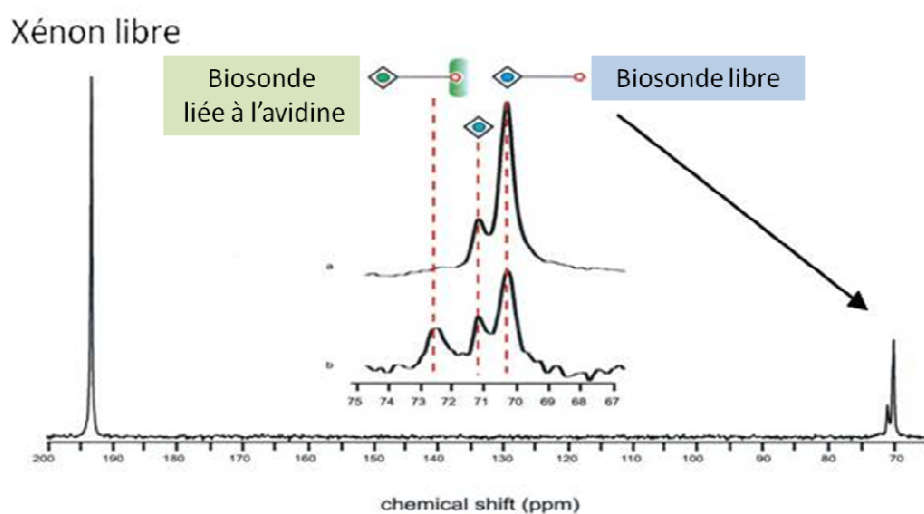


Figure 11 : Spectre RMN- ^{129}Xe du système Biotine-Avidine

La RMN- ^{129}Xe montre (Figure 11) :

- à 193 ppm un signal correspondant au xénon dissout dans l'eau
- à 71 ppm un signal pour le xénon encapsulé dans le cryptophane-A
- à 70 ppm un signal pour le xénon dans la biosonde
- à 73 ppm le signal du xénon encapsulé dans la biosonde lorsque celle-ci est liée à l'avidine.

Cet exemple confirme l'extrême sensibilité du xénon à son environnement immédiat, malgré le fait que la reconnaissance biotine-avidine ait lieu loin du xénon.

Ainsi en utilisant l'IRM au ^{129}Xe hyperpolarisé, le suivi de ce signal permettra de localiser et d'imager la biosonde liée à sa cible biologique.

3.2 Les biosondes synthétisées au laboratoire

Comme nous venons de le voir, l'élaboration de sonde à base de xénon nécessite une molécule hôte capable d'encapsuler ce gaz, qui doit cependant présenter des propriétés particulières :

- avoir une très bonne affinité pour le xénon,
- permettre un échange entre le xénon encapsulé et le xénon en solution afin de maintenir un signal exploitable en RMN- ^{129}Xe ,
- permettre une différence de déplacement chimique notable entre le xénon encapsulé dans la biosonde liée ou non à sa cible biologique,
- être soluble en milieu aqueux et non toxique en vue de l'obtention d'une sonde pour des applications "*in vivo*",
- être adressable pour des applications en imagerie ciblée.

Deux équipes du service SCBM réalisent les synthèses de nouvelles molécules cages dans le but d'obtenir des biosondes pour l'IRM au ^{129}Xe hyperpolarisé. En particulier, des biosondes à base de cryptophanes pour la détection et la localisation de cations métalliques et des biosondes bimodales (IRM ^{129}Xe + IRM ^1H).

Ces molécules organiques synthétisées au sein du laboratoire, doivent être étudiées par différentes techniques analytiques avant de pouvoir être employées pour les différentes applications auxquelles elles sont destinées.

Cette étude implique deux étapes essentielles :

- une étape de caractérisation
- une étape de purification

Ainsi dans cet objectif, nous avons utilisé différentes techniques analytiques et plus particulièrement le couplage de la chromatographie liquide haute performance avec un spectromètre de masse qui sera présenté dans le paragraphe suivant.

IV. TECHNIQUES ANALYTIQUES DE CARACTERISATION ET DE PURIFICATION

La caractérisation et la purification des biosondes sont des étapes fondamentales et nécessaires pour les identifier et les isoler.

Plusieurs techniques analytiques, souvent complémentaires, sont donc utilisées et peuvent être classées selon deux catégories :

- l'analyse structurale et spectrale (RMN, IR, UV...)
- les techniques séparatives et couplées (LC-MS)

1. Analyses structurales et spectrales

Parmi de nombreuses techniques de caractérisation, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est aujourd'hui un moyen d'investigation structurale extrêmement puissant. C'est une technique non destructive permettant de déterminer la structure des molécules dans les nombreux domaines de la physique, de la physico-chimie, de la chimie et de la biologie. Elle permet également d'obtenir des informations sur les propriétés d'association et de stabilité. Mais la faible sensibilité de cette technique nécessite l'utilisation d'un champ magnétique puissant et souvent de longues durées d'acquisitions. Un autre inconvénient est que tous les atomes ne sont pas visibles en RMN et l'interprétation des spectres est souvent délicate dans des milieux complexes.

Au laboratoire, la RMN est utilisée par les chimistes organiciens pour le suivi des synthèses et pour une évaluation qualitative des purifications.

La cristallographie permet également l'étude structurale tridimensionnelle des molécules. Aujourd'hui plusieurs milliers de structures de macromolécules biologiques (oligonucléotides, acides ribonucléiques, virus d'insectes, de plantes ou de mammifères...) ont été déterminées par cristallographie. Et parmi ces méthodes, la diffraction des rayons X, est la méthode par excellence pour l'étude des macromolécules biologiques.

La limitation de cette technique réside dans la difficulté à cristalliser les macromolécules (température, pression, temps d'évaporation...). De plus il est nécessaire d'avoir une grande quantité d'échantillon très pur (5-10 mg avec une pureté > 98%).

Cette technique, réalisée par une équipe du CEA de Saclay, permettra de déterminer la structure tridimensionnelle de nouveaux cucurbiturils présentés dans le chapitre V.

Enfin parmi les méthodes classiques de spectroscopies moléculaires optiques, on distingue les spectroscopies UV-visibles (absorption, fluorescence) qui mettent en jeu les niveaux énergétiques électroniques, et les spectroscopies vibrationnelles et rotationnelles (infrarouge et Raman). Très schématiquement, l'utilisation de la spectroscopie dans l'UV-visible est en général limitée à des molécules comportant des groupements dits « chromophores », c'est-à-dire présentant une forte absorption dans le domaine spectral envisagé, alors que toute molécule possède un spectre de vibration.

Ce mode de détection UV-visible sera essentiellement utilisé dans notre étude pour l'analyse et la séparation des cryptophanes en HPLC, en parallèle avec le spectromètre de masse.

Un pré-requis majeur pour réaliser l'analyse structurale, est la pureté de la molécule étudiée. Or la synthèse organique entraîne souvent la formation de produits secondaires. La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse permettra ainsi :

- La séparation des différents constituants du mélange
- La purification de la molécule d'intérêt
- Ainsi que son identification et sa quantification.

2. Techniques séparatives

Parmi les nombreuses techniques analytiques existantes, l'HPLC est devenue l'une des techniques analytiques dominantes dans les industries pharmaceutiques, chimiques et alimentaires mais également dans les laboratoires environnementaux et de bioanalyses.

2.1 La chromatographie liquide haute performance

En chromatographie en phase liquide comme dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases

non miscibles, l'une stationnaire (silice vierge ou greffée, polymère moléculaire ou échangeur d'ions), l'autre mobile (phase liquide constituée par un solvant pur ou plus souvent par un mélange de solvants). Les différents types de chromatographie sont résumés dans l'annexe 2.

Le choix d'une méthode de séparation constitue une étape essentielle dans la mise au point de toute analyse et va dépendre de plusieurs paramètres :

- **de la nature du soluté** : liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
- **du but de l'analyse** : identification de composants d'un mélange, nécessité ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (LC-MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification).

Une bonne séparation chromatographique en phase liquide nécessite :

- **que les différents composés soient retenus sur la phase stationnaire,**
- **qu'ils soient bien séparés,**
- **éventuellement une durée d'analyse courte pour de grandes quantités d'échantillons analysés de manière routinière.**

Ainsi la séparation des cryptophanes et des cucurbiturils, a été en grande partie réalisée par chromatographie liquide de partage à polarité de phases inverses, mettant en jeu des interactions de types hydrophobes. Et la qualité de la séparation a été évaluée à partir des grandeurs caractéristiques (efficacité de la colonne et résolution) dont les formules sont rappelées également dans l'annexe 2.

Parmi les techniques HPLC spécifiques, on peut trouver la chromatographie chirale et la chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC). Dans le cadre de notre étude, nous avons eu la nécessité d'utiliser ces deux techniques chromatographiques. En effet, nous avons été amenés à étudier la chiralité d'un cryptophane et donc à séparer ses deux énantiomères par HPLC. Nous avons eu également recours à la chromatographie HILIC dans le but de séparer et de purifier un ligand très polaire pour la synthèse d'une biosonde, ce composé n'étant pas séparable dans les conditions classiques de LC-MS en phase inverse.

2.1.1 La chromatographie chirale

a. Quelques définitions

La chiralité est la propriété qui caractérise le fait qu'un objet et son image dans un miroir ne sont pas superposables.

Des isomères pour lesquels seul l'arrangement spatial des atomes diffère sont appelés stéréoisomères. Deux stéréoisomères sont dits énantiomères (appelés R ou S selon la règle de Cahn, Ingold et Prelog), s'ils sont images l'un de l'autre dans un miroir, mais non superposables. Le caractère chiral d'une substance est intimement lié à l'arrangement spatial des atomes qui la constituent. Ainsi, l'existence d'éléments structuraux stéréogènes tels qu'un centre, un axe ou un plan dans une molécule est responsable de sa chiralité. Les énantiomères ont des propriétés identiques vis-à-vis de phénomènes physiques (températures d'ébullition ou de fusion, solubilité dans un solvant achiral, densité...) mais ils possèdent un pouvoir rotatoire spécifique (lévogyre ou dextrogyre).

Si des stéréoisomères ne sont pas images dans un miroir, ils sont dits diastéréoisomères (les formes cis et trans d'une même molécule sont, par définition, des diastéréoisomères). Contrairement aux énantiomères, les diastéréoisomères ont des propriétés physicochimiques différentes et peuvent être séparés par des méthodes d'analyses classiques.

b. Principe

Pour séparer des énantiomères trois approches sont possibles :

- Formation de diastéréoisomères avec un réactif chiral avant injection et séparation sur colonne achirale
- Formation de diastéréoisomères labiles dans la phase mobile par addition d'un réactif chiral (phase stationnaire achirale)
- Formation de diastéréoisomères labiles dans une phase stationnaire chirale (phase mobile achirale).

Dans notre étude, nous avons utilisé cette dernière approche en utilisant des colonnes constituées d'une phase stationnaire chirale, dont le principe est le suivant.

La séparation des énantiomères repose sur la formation de complexes diastéréoisomères entre le racémate et un sélecteur chiral. La stéréosélectivité dépend de la différence de stabilité des diastéréoisomères ainsi formés. La règle des trois points d'interaction (dite règle de Dalglish³⁶) permet, à partir de considérations purement géométriques, de montrer que deux énantiomères seront séparés si au moins trois interactions simultanées (AA', BB', CC') dont l'une de nature stéréosélective, ont lieu avec l'un des énantiomères (Figure 12).

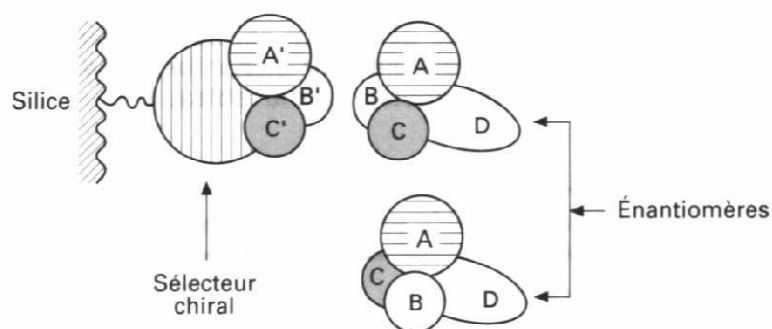


Figure 12 : Modèle des 3 points d'interaction selon Dalglish³⁶

c. Les phases stationnaires chirales

La multiplicité des sélecteurs chiraux commercialement disponibles et la complexité des mécanismes de reconnaissance chirale rendent le choix d'un système analytique difficile lorsqu'on est confronté à une séparation énantiomérique.

Les phases stationnaires chirales sont constituées principalement de résines optiquement actives ou des gels de silice greffés avec des cyclodextrines par l'intermédiaire d'un bras ayant plusieurs atomes de carbone. Elles possèdent des centres d'asymétrie identiques correspondant à un seul énantiomère (R ou S).

Des recherches ayant déjà été effectuées sur les cryptophanes (Fogarty³⁷) nous ont permis d'orienter notre choix vers l'utilisation des phases stationnaires de type Pirkle. Elles sont constituées d'un sélecteur chiral greffé par l'intermédiaire d'un bras espaceur sur un gel de silice. Chaque greffon est composé d'un acide aminé (leucine, valine...) dérivé, soit par un

³⁶ Dalglish C.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 3940-3942.

³⁷ Fogarty H. A. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332-10333.

noyau aromatique à caractère accepteur d'électrons π (dinitro-3,5 benzoyle) ou par un composé aromatique donneur d'électrons π (Figure 13).

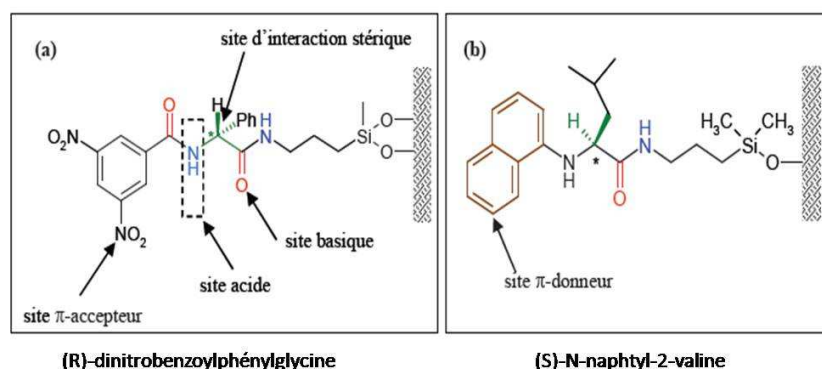


Figure 13 : Phases stationnaires de type Pirkle

Ces phases stationnaires sont généralement utilisées en polarité de phase normale afin de favoriser les interactions de type π - π entre l'analyte et le greffon chiral.

La détection chromatographique des composés chiraux peut se faire par différents détecteurs comme l'UV, une barrette de diodes (DAD) ou encore par dichroïsme circulaire (DC).

Le détecteur à barrette de diodes permet d'observer simultanément un domaine de longueurs d'ondes. Ce détecteur est composé d'une rangée de diodes, chacune indiquant l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde. Il fournit des renseignements spectraux à fin d'assurer l'identité des composés séparés grâce à une représentation en trois dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde). Ainsi le spectre d'absorption obtenu présentera deux formes identiques à la même longueur d'onde correspondant aux deux énantiomères séparés.

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de manière inégale la lumière polarisée. Cette lumière (émise par une lampe Xe-Hg), est envoyée vers un polariseur puis modulée alternativement en lumière polarisée circulairement droite et gauche. Le faisceau lumineux passe ensuite à travers la cellule d'analyse où l'échantillon optiquement actif va absorber préférentiellement l'une des deux ondes polarisées circulairement. La spectroscopie de dichroïsme circulaire mesure la différence d'absorption pour un composé chiral de la lumière polarisée circulairement

gauche et de la lumière polarisée circulairement droite et ceci, en fonction de la longueur d'onde. Le spectre du dichroïsme circulaire est défini par le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde. Ainsi le spectre de deux énantiomères est formé de deux pics symétriques entre eux par rapport à l'axe des abscisses.

2.1.2 La chromatographie HILIC

La chromatographie à interaction hydrophile³⁸ (HILIC) est une solution pour séparer des composés fortement polaires peu ou pas retenus en phase inverse. La Chromatographie à Interaction Hydrophile est également appelée «phase normale aqueuse» ou «phase inverse inverse», car l'élution est dans l'ordre de l'hydrophilicité croissante. La partie organique de la phase mobile (acétonitrile, méthanol...) est le solvant faible, et la partie aqueuse est le solvant fort (Figure 14). L'échantillon hydrophile polaire aura une attraction majeure vers la phase stationnaire et sera élué par l'eau de la phase mobile au moyen de méthodes isocratiques ou par gradient.

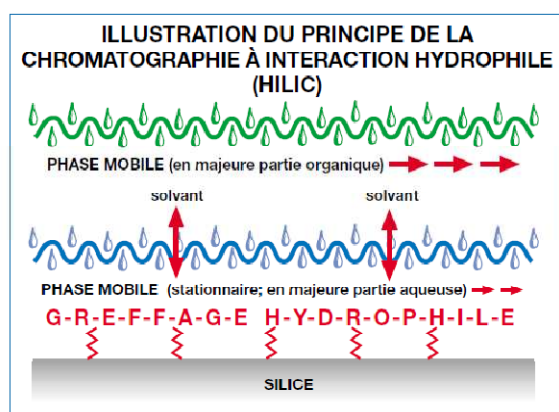


Figure 14 : Principe de la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC)

L'HILIC est un outil très intéressant, et souvent complémentaire des phases hydrophobes ne pouvant pas retenir les composés polaires et hydrophiles. Et elle a l'avantage d'avoir un système d'éluant compatible avec le couplage SM.

³⁸ Buszewski B. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, Online First™

2.1.3 La Chromatographie préparative

La chromatographie en phase liquide préparative est utilisée pour isoler, enrichir ou purifier un ou plusieurs composants d'un mélange.

En HPLC analytique les chromatographistes se focalisent sur la forme des pics, et la résolution de tous les analytes élués, alors qu'en chromatographie préparative le rendement et la pureté du produit final, comme le coût de la méthode sont privilégiés.

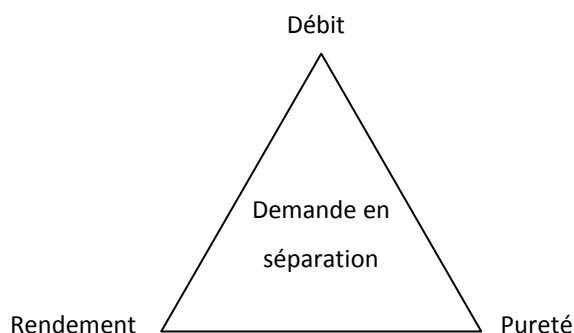


Figure 15 : Paramètres importants en chromatographie préparative

Le plus important des trois paramètres « débit, rendement et pureté » (Figure 15), pour que la séparation soit optimisée, dépend des applications auxquelles sont destinées les composés purifiés. En effet, il est nécessaire d'obtenir une très grande pureté pour des molécules servant par exemple d'étalon de référence. Concernant les synthèses réalisées dans le service, la pureté devra être relativement bonne pour les composés finaux (> 80%). Par contre on pourra se contenter d'une qualité inférieure pour les intermédiaires de synthèse.

Il est intéressant de différencier les caractéristiques de ces deux modes (analytique et préparatif) en termes d'équipement et d'objectif (Tableau 2).

	Analytique	Préparative
Diamètres des colonnes	≤ 4,6 mm	≥ 4,6 mm
Débits	≤ 1mL.min ⁻¹	> 4 mL.min ⁻¹
But	Identifier et quantifier	Collecter, purifier et isoler
Facteur important	Résolution	Coût final du produit

Tableau 2 : Différences entre l'HPLC analytique et préparative

En chromatographie analytique la quantité injectée dans la colonne est typiquement de l'ordre du μg permettant de réaliser de bonnes séparations. La plus grande différence en LC préparative est une quantité d'échantillon injectée beaucoup plus importante dans la phase stationnaire. Elle est évidemment réalisée à plus grande échelle avec un débit et des dimensions de colonnes supérieures et le système chromatographique est équipé d'une fonction de collecte des fractions des composés séparés.

a. Optimisation sur colonne préparative

Toutes les séparations préparatives commencent par une phase analytique qui sera développée et utilisée comme point de départ. En fait, une grande partie du travail de fond est effectuée à ce stade car la rétention relative est déterminée par le système chromatographique : la phase mobile et la phase stationnaire.

Pour optimiser le rendement des colonnes préparatives deux approches sont possibles :

- **par transposition du système analytique** : la longueur de la colonne reste constante et on augmente le diamètre de la colonne et le débit en fonction du volume de l'échantillon (de même concentration). Cette méthode est peu utilisée car elle est coûteuse
- **par surcharge de la colonne** : qui consiste à injecter des quantités d'échantillons croissantes sous les mêmes conditions analytiques.

Cette méthode peut être réalisée de deux façons :

- par surcharge en volumes
- par surcharge en concentrations d'échantillons si le composé présente une bonne solubilité dans la phase mobile.

La surcharge de masse est complexe et basée principalement sur trois effets différents³⁹ :

- Effets de dispersion. L'échantillon est distribué par la phase mobile dans la colonne avant que la totalité de celui-ci ait pu être complètement absorbé par la phase stationnaire. La zone contenant l'échantillon est donc fortement élargie.

³⁹ Scott R.P.W. and Kucera P., *Journal of Chromatography A*, **1976**, 119, 467-482.

- Désactivation de l'absorbant. Le dépôt massif d'un échantillon provoque non seulement un effet de dispersion mais recouvre aussi la phase stationnaire avec les molécules de l'échantillon, ayant pour conséquence la modification de la polarité de la phase stationnaire par rapport à celle de l'éluant. Les temps de rétention peuvent par exemple diminués.
- Isotherme d'absorption non linéaire. Elle est provoquée par une trop grande quantité d'échantillon. La conséquence est la formation de pic asymétrique (tailing ou trainée) et une diminution du facteur de capacité k' .

Les colonnes préparatives utilisées sont ainsi constituées de particules de 5 μ m, de diamètres 19 mm et de longueurs 150 mm pour les colonnes hydrophobes (C₁₈ et phényl) et de 250 mm pour l'HILIC. Comme en analytique, chaque colonne est précédée d'une colonne de garde constitué du même type de greffage. Elle permet d'augmenter la durée de vie de la colonne, en éliminant les impuretés du solvant mais également des espèces chimiques qui se lient de manière irréversible à la phase stationnaire.

Pour réaliser le passage de l'échelle analytique à l'échelle préparative nous réaliserons :

- **l'optimisation de la méthode analytique avec de bonnes résolutions**
- **la surcharge de la colonne analytique**
- **les calculs des facteurs nécessaires à la transposition sur la colonne préparative adéquate.**

Les caractéristiques d'une colonne préparative et les calculs permettant la transposition de LC analytique à la LC préparative sont détaillés dans l'annexe 2.

Pour réaliser ces analyses, il est indispensable de choisir un détecteur bien adapté. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés (absorption, fluorescence...). La LC-MS peut devenir indispensable lorsque ces autres modes de détections sont inefficaces. De plus elle est un outil précieux car les composants du mélange peuvent être caractérisés spécifiquement par leur masse moléculaire et quantifiés sélectivement. Enfin elle constitue une méthode de choix grâce à sa haute sensibilité et sélectivité dans de nombreux domaines.

2.2 La spectrométrie de masse

2.2.1 Principe

La spectrométrie de masse est fondée sur la mesure en phase gazeuse du rapport masse/nombre de charge (m/z), d'ions positifs ou négatifs obtenus à partir de la substance à analyser. Les ions formés dans la source de l'appareil sont accélérés puis séparés par un analyseur avant d'atteindre le détecteur. Le spectre de masse obtenu représente l'abondance relative des différentes espèces ioniques présentes en phase gazeuse.

La spectrométrie de masse donne accès à :

- la masse des molécules
- des informations structurales grâce à des fragmentations.

Les analyses réalisées dans ce mémoire ont été effectuées sur deux LC-MS dont les spectromètres de masse de type Micromass Quattro LC (Figure 16) et ZQ de Waters® sont constitués d' :

- une source d'ionisation électrospray (ESI)
- un analyseur quadripôle et triple quadripôle
- un détecteur photomultiplicateur.

Le principe de chacun de ces éléments est décrit dans l'annexe 3 « la spectrométrie de masse ».

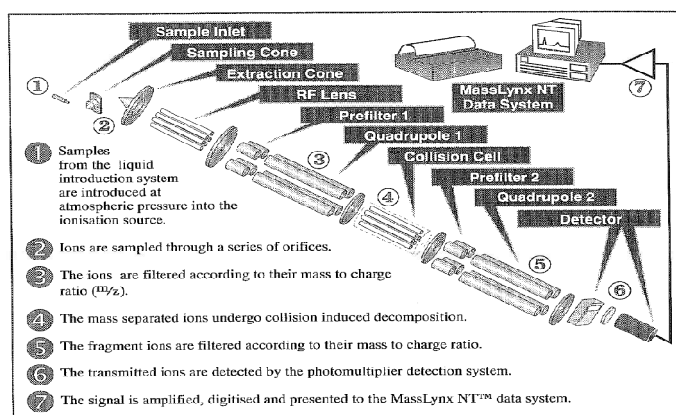


Figure 16 : Micromass Quattro LC®

Le couplage LC-MS est possible grâce à des sources d'ionisation à pression atmosphérique comme l'électrospray (ESI).

Nous allons présenter dans le paragraphe suivant le système LC-MS utilisé pour la caractérisation et la purification des molécules cages.

2.3 Le couplage LC-MS

Le système (Waters®) utilisé comprend différents modules (schéma sur la Figure 17 et en photo sur la Figure 21) :

- Une pompe à gradient binaire 2525/2545 :
- Un Injecteur/collecteur 2767 « sample manager »
- Column fluidic organizer (CFO)
- Diviseur 1000:1
- Pompe Make up 515
- Détecteurs (UV/MS/DEDL)
- Logiciel Masslynx

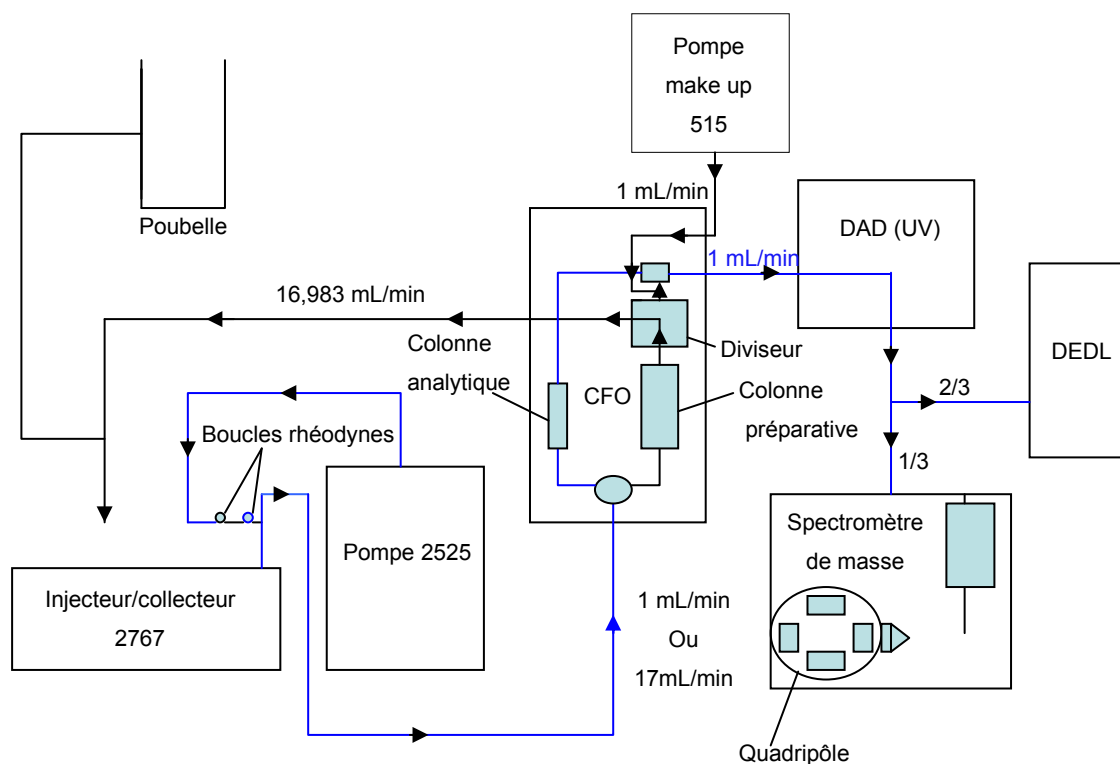


Figure 17 : Schéma de la LC-MS-UV-DEDL (circuit analytique en bleu)

- **La pompe à gradient binaire** est une pompe haute pression (jusqu'à 6000 psi) capable de délivrer des mélanges de deux solvants à un débit de 0,5 à 150 mL.min⁻¹. Elle permet donc un usage aussi bien en analytique qu'en préparative.
- **Le sample manager 2767** est un système de grande capacité de traitement des échantillons qui gère facilement et automatiquement l'aspiration et l'injection des échantillons, ainsi que la collecte des fractions sur une seule plateforme LC-MS, contrôlée par le logiciel MassLynx. Il possède :
 - un système constitué de 2 boucles d'injection (20 µL et 1 mL pour l'analytique et la préparative respectivement)
 - un passeur d'échantillon permettant d'injecter jusqu'à 144 échantillons (3 microplaques de 48 flacons)
 - un collecteur permettant de récolter jusqu'à 336 fractions (4 racks de 84 tubes)
 - une pompe de rinçage au méthanol.
- **Le Column Fluidic Organizer CFO** est un système à double voix permettant de travailler en parallèle sur la colonne analytique et préparative. Grâce au logiciel, il permet de permuter d'un système à un autre de manière simple et rapide. De plus il est équipé d'un diviseur (1000 :1) permettant de diriger une petite portion de l'éluant au détecteur (nécessitant un débit plus faible) et la majorité vers le collecteur ou à la poubelle en mode préparatif.
- **La pompe make-up 515** permettra ainsi de rétablir le débit à 1 mL.min⁻¹ qui a été divisé au 1/1000^{ème} à la sortie du diviseur, vers l'entrée du détecteur UV (Figure 18).

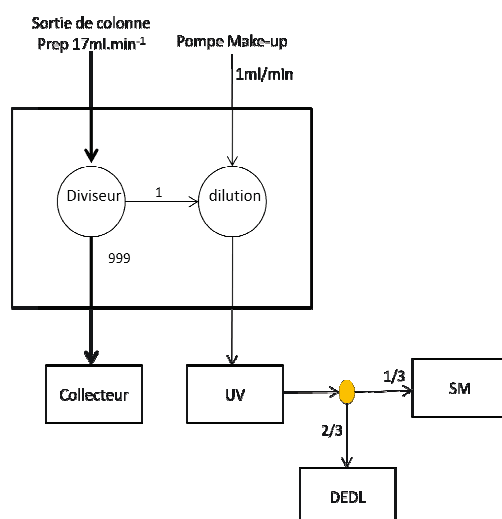


Figure 18 : Schéma du diviseur et de la pompe make-up

- **Le détecteur UV-Visible à barrettes de diodes 2996** est constitué d'une lampe au deutérium et d'un réseau de 512 diodes. Il est capable de mesurer l'absorbance sur une plage de longueurs d'ondes de 190 à 800 nm. Il est équipé d'une cellule de détection de 10 mm.
- **Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (PL-ELS-1000)** est considéré comme un détecteur universel, dans lequel les analytes doivent être obligatoirement moins volatiles que les solvants de la phase mobile. Le signal du DEDL est indépendant des caractéristiques intrinsèques de l'analyte, incluant ses propriétés d'absorption UV, de fluorescence et électrochimiques. C'est un détecteur de masse compatible avec un gradient d'élution et insensible aux changements de températures mais c'est une méthode de détection destructive. Son principe est décrit dans l'annexe 4.
- **Le couplage LC-MS** nécessite des spécificités particulières : il faut en effet que les analytes soient ionisables et que les solvants de la phase mobile soient volatiles. Le débit de cette phase mobile à la sortie du détecteur UV est adapté pour pouvoir atteindre la source d'ionisation électrospray. Un diviseur permet d'obtenir un débit d'environ $0,3 \text{ ml.min}^{-1}$.
- **Le logiciel Masslynx** permet de commander toutes les fonctions nécessaires pour l'utilisation de la LC-MS (acquisition, analyse, gestion de tous les modules, traitement des données...) essentielles pour la réalisation des purifications. La collecte des fractions est basée sur le signal d'un détecteur et dans notre cas le signal de masse (Figure 19).



Figure 19 : Principe de la collecte des fractions par SM

La programmation du logiciel pour réaliser une purification contient :

- L'identification de l'échantillon
- Le volume à injecter

- Le gradient utilisé (annexe 5)
- La masse molaire du composé à purifier
- Le seuil de détection minimal en courant ionique total selon le mode utilisé (ESI+ ou ESI-).

Les fractions du composé séparé sont identifiées et représentées par des zones colorées sur le chromatogramme en courant ionique total TIC (Figure 20).

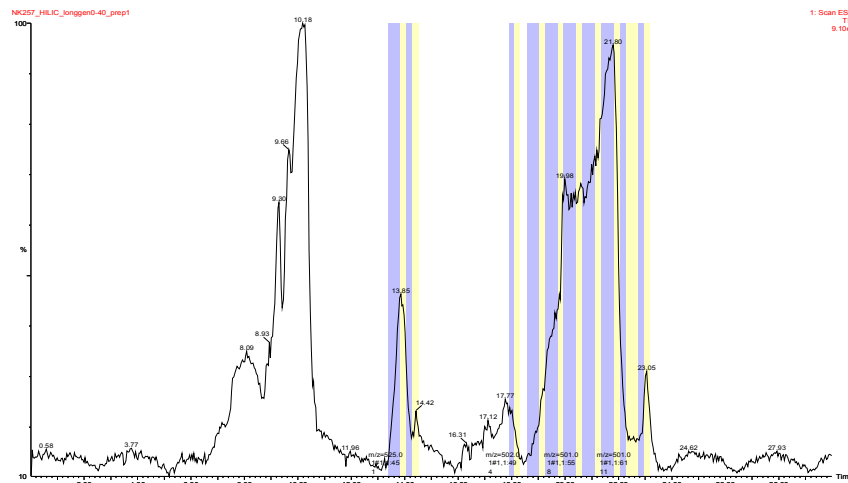


Figure 20 : Exemple d'un chromatogramme de purification avec les fractions en bleu et jaune du composé purifié



Figure 21 : Photo de la LC-MS-UV-DEDL

V. LES CUCURBITURILS

Parmi les différentes molécules cages existantes, le laboratoire développe ses recherches dans la synthèse de nouveaux cucurbiturils.

Le Cucurbit[6]uril (CB6), le plus simple de la famille des cucurbiturils, est synthétisé par la réaction du glycoluril et du formaldéhyde²² en conditions acides. *Mock et al.*⁴⁰ ont été les premiers à déterminer la structure du CB6 comme étant un hexamère macrocyclique composé de six motifs glycoluril. Le CB6 est un hôte rigide avec de nombreuses applications potentielles et en particulier pour l'encapsulation des gaz comme le xénon. Par contre, comparé à d'autres molécules macrocycliques telles que les cyclodextrines, il présente une faible solubilité dans l'eau ($S_{CB6} \sim 0,020$ mM). Selon l'étude de *Zhao et al.*⁴¹, la présence de six groupements cyclohexyles dans le CB6Cy[6] (ou CB6*), favorise la solubilisation des cucurbiturils en milieu aqueux ($S_{CB6^*} \sim 0,2$ M). *Uzunova et al.*⁴² ont démontré que la faible toxicité du CB[7] (< 250 mg.kg⁻¹ in vivo) était encourageante pour des applications médicales et pharmaceutiques.

Toutes ces propriétés et caractéristiques ont incité le laboratoire à développer des cucurbiturils homologues hydrosolubles : les cucurbiturils mixtes CB6Cy[n].

L'objectif principal de mon travail dans cette étude a été de développer une méthode par LC-MS permettant :

- **D'isoler et de caractériser les CB6Cy[n]**
- **De les purifier pour des fins d'analyses de cristallographie ou de RMN-¹²⁹Xe**
- **De les quantifier afin d'évaluer le rendement et l'orientation de la synthèse selon différentes conditions.**

⁴⁰ Freeman W.A. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 7367-7368.

⁴¹ Zhao J. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 22, 4233-4235.

⁴² Uzunova V. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 2037-2042.

1. Caractérisation et purification des cucurbiturils mixtes

1.1 Synthèses et structures des CB6Cy[n]

Les cucurbiturils mixtes CB6Cy[n] ont été synthétisés selon les travaux de Ni⁴³ à partir d'un équivalent de réactif de glycoluril (Tetrahydro-imidazo(4,5-d)imidazole-2,5-dione) et de n équivalents de diéther de cyclohexylglycoluril (1,6:3,4bis(2oxapropylène)tétrahydro-3a-6a-butano-imidazo[4,5-d]imidazol-2,5(1H,3H)dione) en milieu acide (HCl) (Figure 22).

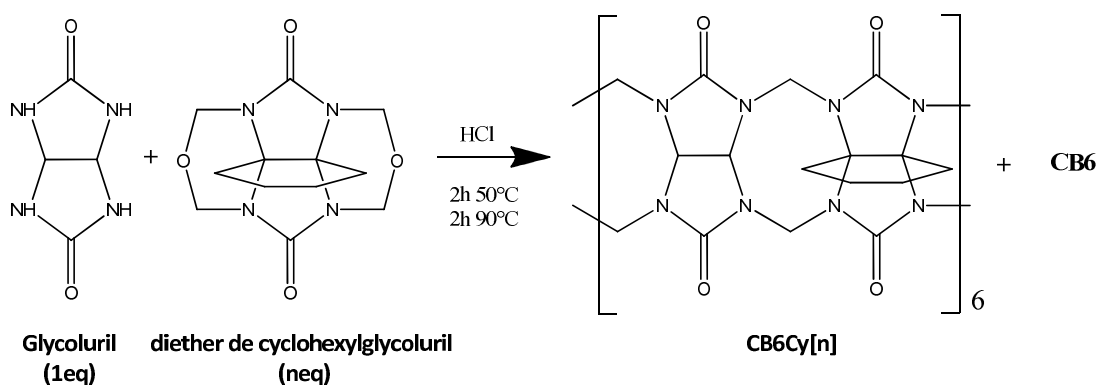


Figure 22 : Synthèse des cucurbiturils mixtes

Ces macromolécules cycliques CB6Cy[n] sont constituées de 6 motifs glycolurils sur lesquels peuvent être fixés [n] groupements cyclohexyles (et n= 0 à 6 sur les Figures 24 à 30).

Comme le CB6, ils sont constitués d'une cavité interne hydrophobe et de groupements carbonyles électro-négatifs au niveau du portail. La structure tridimensionnelle du CB6Cy6 déterminée par diffraction aux rayons X a permis de démontrer que les groupements cyclohexyles sont orientés vers l'extérieur (Figure 23).

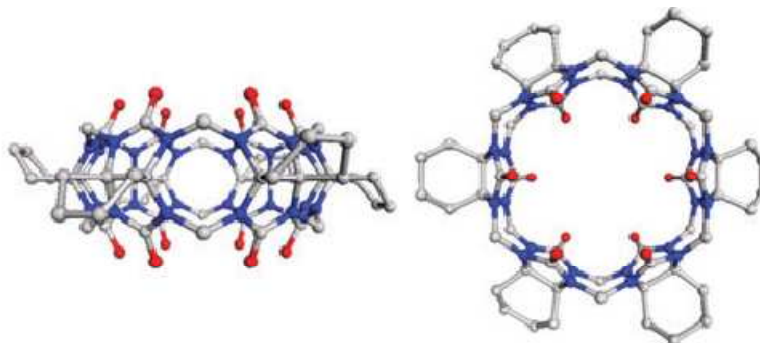


Figure 23 : Structure du CB6Cy[6] déterminée par cristallographie aux rayons X

⁴³ Ni X-L. *et al.*, *Journal of molecular structure*, **2008**, 876, 322-327.

Il semble que la présence de ces groupements augmente la solubilité, facilitant pour notre part la préparation des échantillons dans l'eau. Cette théorie fera l'objet d'une étude réalisée dans ce mémoire pour la mesure de la solubilité des CB6Cy[n] dans l'eau.

Lors d'études précédentes réalisées dans le service, il s'est révélé que la synthèse engendre la formation de nombreux composés :

- des CB[n] avec n=5 à 7 motifs glycolurils
- des molécules non cyclisées appelées « rubans »
- des cucurbiturils mixtes homologues CBnCy[n] (avec n=5 et 7).

La méthode analytique devra donc permettre d'identifier et d'isoler les CB6Cy[n] en s'affranchissant de toutes ces impuretés.

Les différents CB6Cy[n] peuvent être représentés de la manière suivante sous leur forme plane :

- **Le CB6** qui ne contient aucun groupement cyclohexyle en position équatoriale

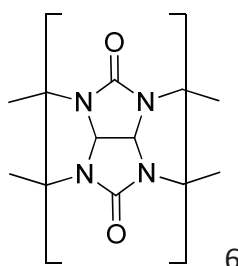


Figure 24 : CB6 ($C_{36}H_{36}N_{24}O_{12}$ MM=996,82 $g \cdot mol^{-1}$)

- **CB6Cy[1]** possédant n=1 groupement cyclohexyle

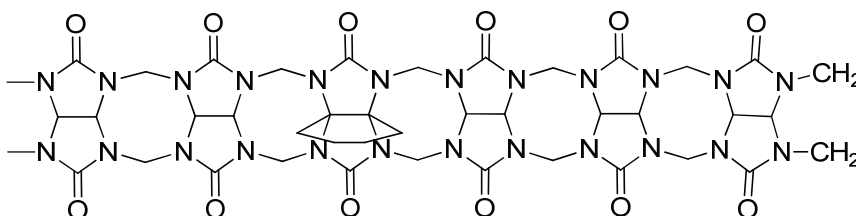


Figure 25 : CB6Cy[1] ($C_{40}H_{42}N_{24}O_{12}$ MM=1050,34 $g \cdot mol^{-1}$)

- **CB6Cy[2]** possédant n=2 groupements cyclohexyles

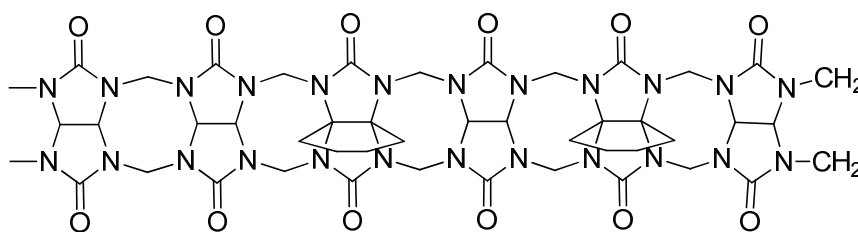


Figure 26 : CB6Cy[2] (C₄₄H₄₈N₂₄O₁₂ MM=1104,39 g.mol⁻¹)

- **CB6Cy[3]** possédant n=3 groupements cyclohexyles

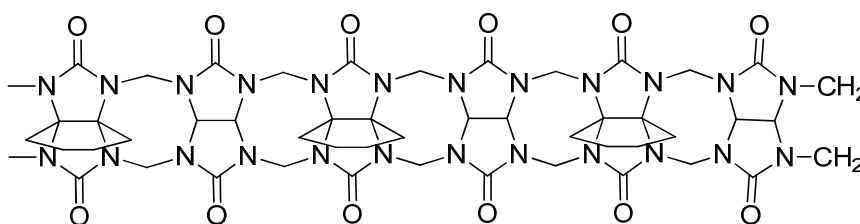


Figure 27 : CB6Cy[3] (C₄₈H₅₄N₂₄O₁₂ MM=1158,44 g.mol⁻¹)

- **CB6Cy[4]** possédant n=4 groupements cyclohexyles

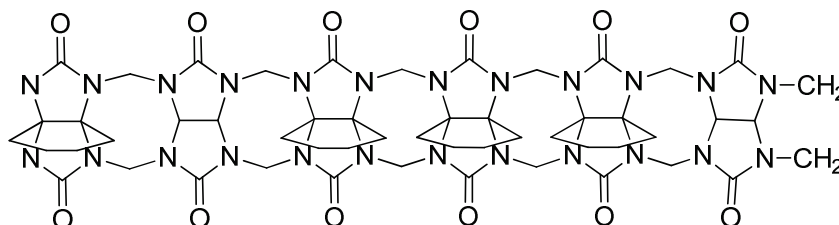


Figure 28 : CB6Cy[4] (C₅₂H₆₀N₂₄O₁₂ M=1212,48 g.mol⁻¹)

- **CB6Cy[5]** possédant n=5 groupements cyclohexyles

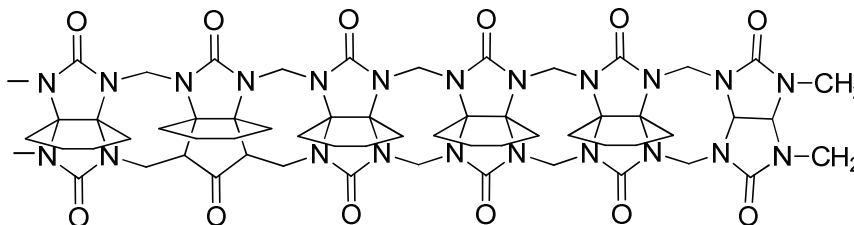


Figure 29 : CB6Cy[5] (C₅₆H₆₆N₂₄O₁₂ M=1266,53 g.mol⁻¹)

- **CB6Cy[6] ou CB[6]*** possédant n=6 groupements cyclohexyles

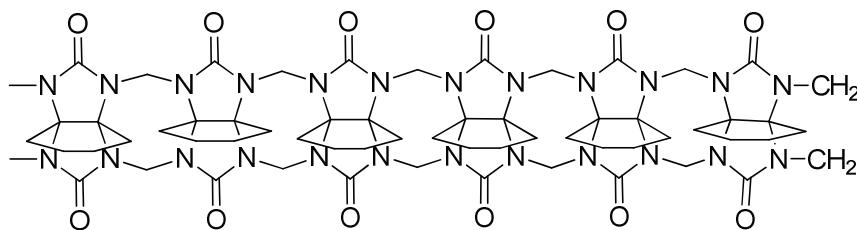


Figure 30 : CB6Cy[6] (C₆₀H₇₂N₂₄O₁₂ M=1320,58 g.mol⁻¹)

Les enchaînements des motifs cyclohexyles dans la molécule ont été déterminés par RMN-1H en deux dimensions (2D).

Ne présentant pas de chromophores, ces molécules absorbent très peu dans l'UV. Cependant, des études antérieures au sein du service, ont démontré qu'une détection par SM avec une source électrospray était possible, malgré une faible réponse.

La solubilité des composés dans l'eau et leurs structures chimiques orientent notre choix vers une technique de chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse. Les premiers essais seront effectués sur des colonnes apolaires de types C₁₈ ou phényl. La détection par SM permettra leur identification ainsi que leur quantification en ayant au préalable déterminé les conditions optimales d'ionisation.

1.2 Optimisation des spectromètres de masse

La première étape du développement d'une nouvelle méthode analytique utilisant un spectromètre de masse, consiste à optimiser les paramètres du détecteur afin d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit pour nos composés. J'ai effectué ces réglages sur les deux appareils LC-MS préparatives du laboratoire (décrit au paragraphe IV.2.2 La spectrométrie de masse).

1.2.1 Préparation de l'échantillon

Pour optimiser la détection des cucurbiturils mixtes, il a été nécessaire de chercher une molécule pure possédant une réponse d'ionisation identique aux CB6Cy[n]. Pour cela un composé commercial, le cucurbit[6]uril (C₃₆H₃₆N₂₄O₁₂·xH₂O), de structure chimique proche

des CB6Cy[n] a été utilisé. D'une pureté de 99%, ce composé a été acheté chez Sigma-Aldrich (certificat d'analyse en annexe 6). Une solution de CB6 a été préparée à 0,31 g.L⁻¹ dans un mélange d'eau ultra-pure millipore et d'acide formique (13v/1v) et favorisant la solubilisation et l'ionisation. Après homogénéisation, cette solution a été introduite par infusion directe dans les SM.

1.2.2 Réglages des paramètres

Les SM sont calibrés avec une solution de référence d'iodure de sodium et de césium et un nettoyage de la source d'ionisation est réalisé régulièrement. L'optimisation des paramètres d'ionisation de la source électrospray qui influent le plus sur le signal sont :

- la tension du capillaire
- la tension de cône
- la tension de la lentille (RF Lens)
- la résolution basse et haute masse (LM et HM Res)
- la température de la source et de désolvatation.

Sur les deux modes ESI (positif et négatif) testés, l'ionisation du CB6 semble plus favorable en mode positif. En observant les spectres de masse ainsi obtenus, nous avons constaté que le pic de l'ion multichargé $[M+2H]^{2+} = 499,5$ était plus intense que le pic moléculaire $[M+H]^+$. L'optimisation du signal sur ce pic a permis d'obtenir les réglages définis dans le Tableau 3.

MS-ESI+	Triple quadripôle	quadripôle
Noms programme	« Cucurbituril »	« cucurbit »
Tension du capillaire	3,5 kV	3,8 kV
Tension du cône	50,0 V	55,0 V
LM Resolution	15,0	14 ,0
HM Resolution	15,0	14,0
Température de désolvatation	300°C	300°C
Température de la source	120°C	120°C

Tableau 3 : Optimisation des paramètres des 2 spectromètres de masse

Ces paramètres seront utilisés tout au long des expériences d'analyses des CB6Cy[n], et leurs détections se fera sur le pic multichargé $[M+2H]^{2+}$ correspondant répertorié dans le Tableau 4.

NOMS	CB6	CB6Cy1	CB6Cy2	CB6Cy3	CB6Cy4	CB6Cy5	CB6Cy6
Masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	996,8	1050,3	1104,4	1158,4	1212,5	1266,5	1320,5
Ions moléculaires $[M+H]^+$	997,8	1051,3	1105,4	1159,4	1213,5	1267,5	1321,6
Ions multichargés $[M+2H]^{2+}$	499,4	526,2	553,2	580,2	607,3	634,3	661,3

Tableau 4 : Masses molaires et Ions des CB6Cy[1] à CB6Cy[6] en MS-ESI+

Les paramètres de détection ainsi optimisés, nous devons maintenant déterminer les meilleures conditions analytiques pour la séparation en HPLC des différents CB6Cy[n].

Les résultats obtenus par les chimistes montrent que tous les CB6Cy[n] ne pouvaient pas être formés par une synthèse unique. En effet la formation des motifs contenant le groupement cyclohexyle semble être favorisée par la quantité de diéther de cyclohexylglycoluril engagé dans la réaction. C'est pourquoi nous avons été contraints de travailler sur deux échantillons provenant de synthèses différentes. La première synthèse (échantillon A) fournira les CB6Cy[4 à 6] et la deuxième (échantillon B) les CB6Cy[1 à 3]. Ainsi la caractérisation, la séparation et la purification des cucurbiturils mixtes (CB6Cy[1] à CB6Cy[6]) seront présentées dans deux parties distinctes.

1.3 Caractérisation et purification des CB6Cy[4] à CB6Cy[6]

Dans ce chapitre, j'expliquerai le développement de ma démarche analytique ainsi que la réalisation de la transposition de l'échelle analytique à préparative (Scale-up). Cette méthode sera appliquée à l'ensemble de toutes les molécules cages étudiées dans ce mémoire.

1.3.1 Optimisation LC-MS

L'optimisation de la LC-analytique a donc porté sur les différents paramètres suivant :

- La préparation de l'échantillon
- La colonne analytique
- L'éluant
- Le gradient

a. Préparation de l'échantillon

L'échantillon **A** contenant les CB6Cy[4], CB6Cy[5], et CB6Cy[6] a été synthétisé à partir d'un équivalent de glycoluril et de cinq équivalents de diéther de cyclohexylglycoluril en milieu acide comme présenté sur la Figure 22.

Après 4 heures de réaction, le brut réactionnel est concentré à sec puis dilué dans de l'eau. Après centrifugation le culot de réaction est éliminé. Dans le surnageant est rajouté du dioxane et l'ensemble est mis une nuit au réfrigérateur. Ce mélange est évaporé à sec, puis lavé trois fois avec de l'acide chlorhydrique pour éliminer le dioxane. Un précipité est formé après ajout d'eau et d'acétone. Après concentration et lyophilisation du surnageant le produit final contenant les CB6Cy[n] est obtenu.

Afin d'obtenir de plus grandes quantités de CB6Cy[4 à 6], la synthèse est réalisée douze fois permettant d'obtenir au total 160 mg d'échantillon **A**. Cette manière de procéder a été la plus efficace car la synthèse à partir de quantités de réactifs plus importantes n'a pas fonctionné.

La méthode de séparation a été mise au point à partir d'une solution d'échantillon **A** à 1 g.L^{-1} solubilisé dans de l'eau ultra-pure sans ajout d'acide formique. Cette concentration permet d'obtenir un échantillon totalement solubilisé, sachant que la solubilité du CB6 est d'environ $0,018 \text{ g.L}^{-1}$.

b. Choix de la colonne

La nature de nos composés nous a conduit à tester des colonnes de types XBrigde Waters® (C₁₈ et Phényl) de nature hydrophobe.

Ces colonnes sont constituées de particules hybrides (BEH) utilisant une structure à pont éthane (Figure 31).

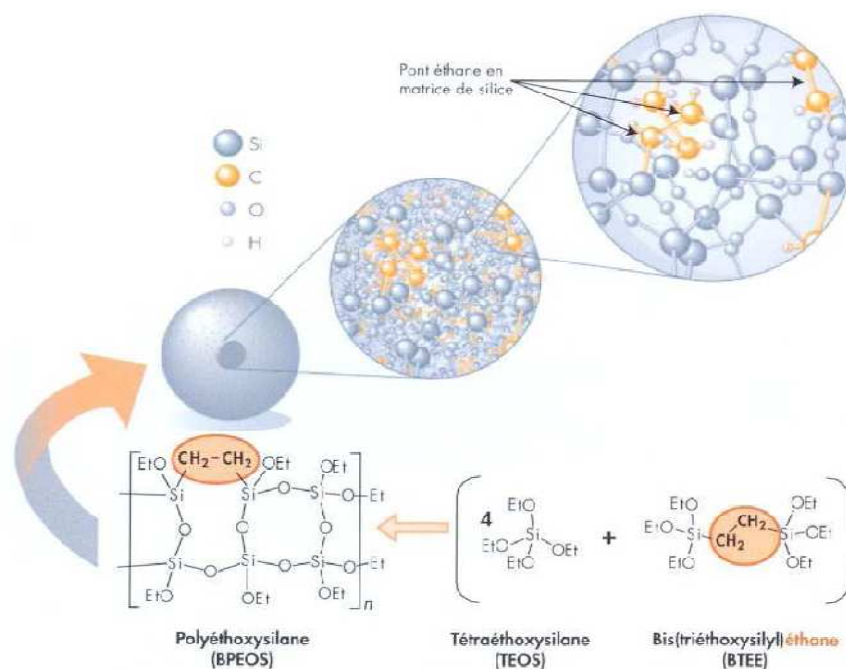


Figure 31 : Technologie BEH⁴⁴

Elles ont la propriété d'être très résistantes aux pH extrêmes (pH de 1 à 12) et de fournir de meilleures reproductibilités⁴⁵. Les colonnes Xbridge phényl et C₁₈ testées ont une dimension de 4,6 x 100 mm et des particules de 3,5 µm de diamètre (Figure 32). Chaque colonne est précédée par une colonne de garde constituée du même greffage de dimension 4,6 x 20 mm avec des particules de 3,5 µm de diamètre.

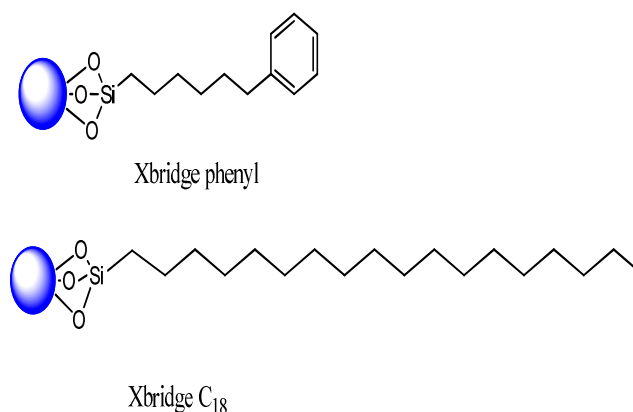


Figure 32 : Greffage des colonnes Phényl et C₁₈ xbridge Waters©

⁴⁴ Waters, ACQUITY UPLC BEH Columns brochure, **2005**.

⁴⁵ Wyndham K.D. *et al.*, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6781-6788.

c. Choix du gradient et de l'éluant

La phase mobile choisie est un mélange d'eau et d'acétonitrile contenant comme additif 0,1% d'acide formique. L'acétonitrile (CH₃CN HiPerSolv CHROMANORM ISOCRATIC GRADE for HPLC) est acheté chez VWR, l'eau utilisée est de l'eau ultra-pure de millipore et l'acide formique à 95% est fourni par Sigma-Aldrich.

Pour étudier le comportement des composés, la solution à 1 g.L⁻¹ a été injectée sur les deux colonnes en utilisant un premier gradient « générique » (annexe 5) à température ambiante. L'intérêt de celui-ci est d'éluer toutes les molécules présentes dans l'échantillon sur une plage de 13 minutes, et d'évaluer d'une manière simple et rapide l'efficacité de la colonne (Tableau 5) choisie vis-à-vis des CB6Cy[n].

lot	Colonne C ₁₈		Colonne phényl	
	127391041		127301951	
	Tr (min)	N	Tr (min)	N
CB6Cy[4]	4,7	654	5,7	1550
CB6Cy[5]	4,9	282	6,5	2573
CB6Cy[6]	5,4	440	8,4	1139

Tableau 5 : Temps de rétention Tr et efficacité des colonnes N des CB6Cy[n]

Ces premiers résultats montrent que les trois composés (CB6Cy[4à6]) interagissent avec les deux types de phases. Toutefois la colonne phényl révèle des temps de rétention plus grands, de meilleures efficacités, et une résolution R1 de 1,2 entre le CB6Cy[4] et CB6Cy[5] et R2 de 2,7 entre le CB6Cy[5] et CB6Cy[6]. Ces résultats laissent supposer qu'il y a une meilleure interaction entre nos composés et le noyau aromatique présent sur la colonne phényl que sur la colonne C₁₈.

En observant le chromatogramme de la Figure 33 l'absence d'absorption UV (DAD de 210 à 400 nm) et la faible ionisation des composés, nécessitent une extraction des ions multichargés [M+2H]²⁺.

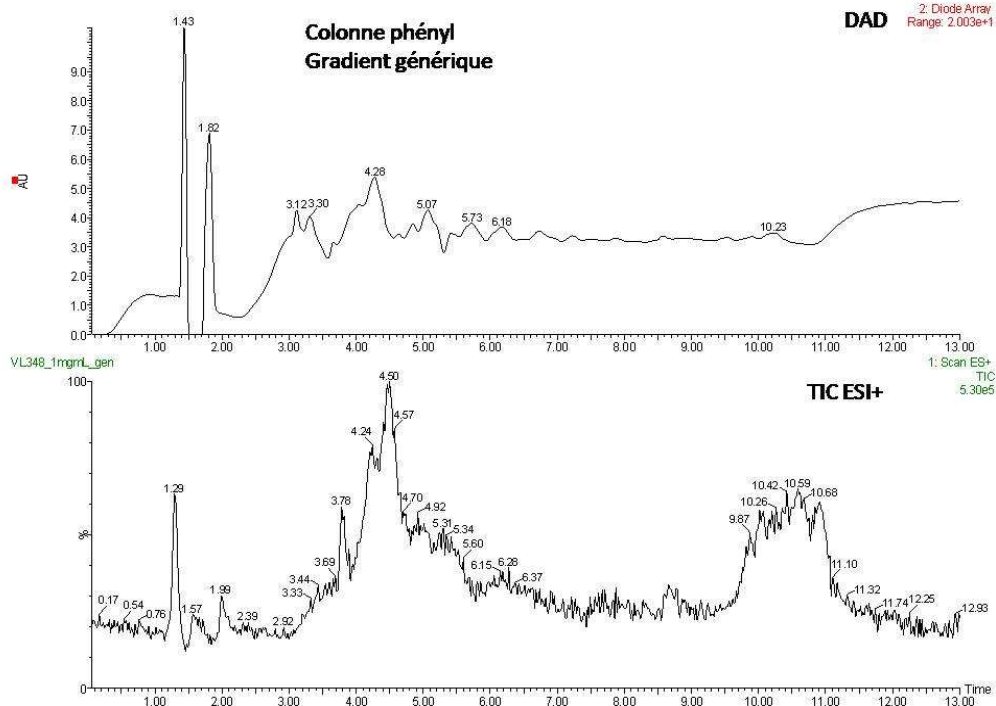


Figure 33 : Chromatogrammes échantillon A LC/MS-ESI+/UV

Cette opération permet d'une part de visualiser la séparation des composés, non visibles en TIC, et d'autre part de les intégrer pour déterminer l'aire du pic (Figure 34).

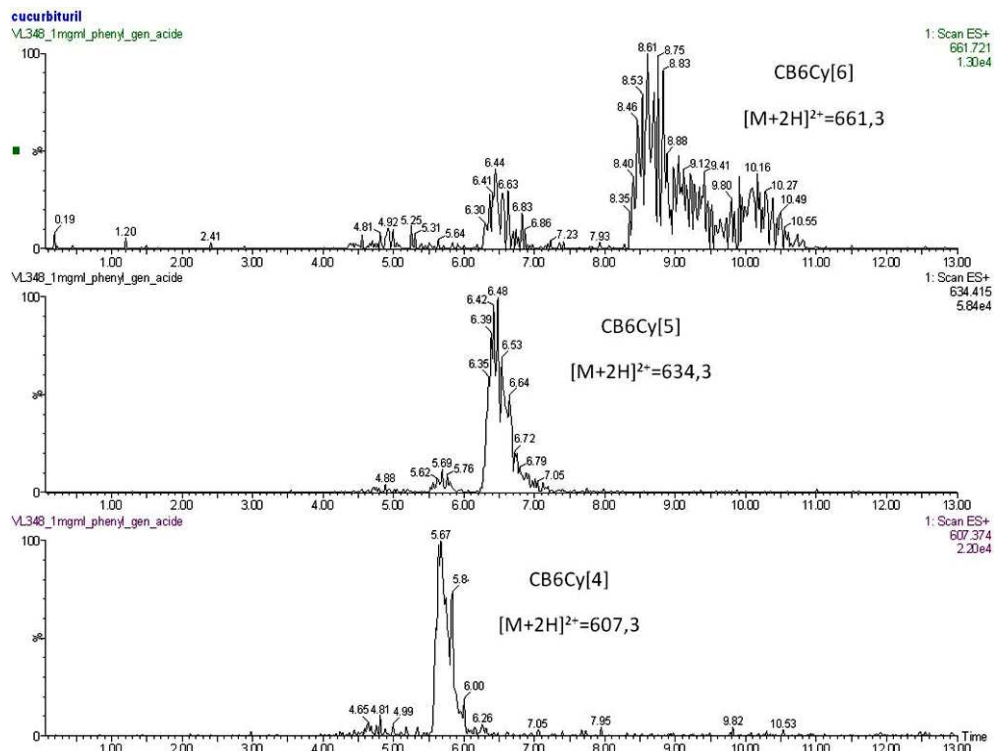


Figure 34 : Extraction des ions multichargés $[M+2H]^{2+}$

Le choix de la colonne phényl xbridge et de l'acétonitrile comme éluant semblent donc convenir pour la séparation des cucurbiturils mixtes. Nous validerons ce choix définitivement en comparant différents gradients composés des mêmes solvants. L'objectif étant de trouver un gradient permettant d'obtenir des résolutions les plus favorables possibles pour être transposables en LC-préparative.

d. Le choix du gradient

Dans un premier temps, la durée du gradient a été allongée de 13 à 30 minutes afin de favoriser l'interaction des composés avec la colonne et de les séparer le plus possible.

En augmentant progressivement le taux d'acétonitrile de 40 à 60% en fin de gradient (correspondant aux gradients « long60, 50 et 40 » en annexe 5) des résolutions de 1,2 à 1,8 pour R1 et de 1,3 à 2,5 pour R2 ont été obtenues (Tableau 6). Parmi eux, le gradient « long60 » présente la meilleure séparation. Cependant choisir un gradient encore moins éluant que celui-ci risquerait d'éluer le CB6Cy[6] au-delà des 24 minutes en même temps que les impuretés retenues sur la colonne dans la phase de rinçage (100% d'acétonitrile).

Ensuite, dans le but d'augmenter la séparation sur la totalité de cette plage, les gradients ont été modifiés par un pourcentage d'acétonitrile plus importante au départ (10 et 15%). Ce choix a permis d'obtenir ainsi des résolutions supérieures à 2, excepté avec le gradient « long90-40 ».

Série	gradients	tr1	tr2	tr3	R1	R2
	long40	12,1	13,9	16,1	1,2	1,3
1	long50	13,2	14,9	17,5	1,8	2,3
	long60	15,8	17,9	21,0	1,6	2,5
	long85-50	9,7	12,0	15,2	2,4	2,5
	Long80-60	11,2	15,6	21,5	2,2	2,4
2	long90-40	11,3	13,1	15,6	1,2	1,3
	long90-50	12,0	13,8	16,8	1,6	2,4

Tableau 6 : Temps de rétention (min) et résolutions des CB6Cy[4 à 6] selon les différents gradients testés

Les deux chromatogrammes présentant les meilleures séparations (« long60 et long85-50 ») dans chaque série, sont présentés sur les Figures 35 et 36.

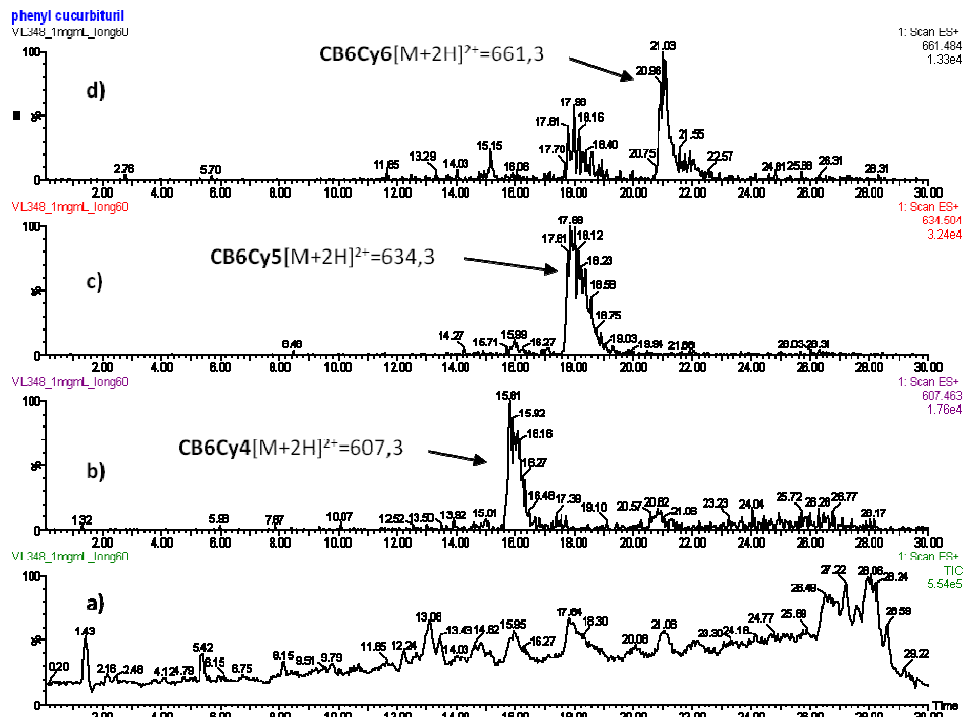


Figure 35 : a) Chromatogramme en courant ionique total long60, b-d) Ions $[M+2H]^{2+}$

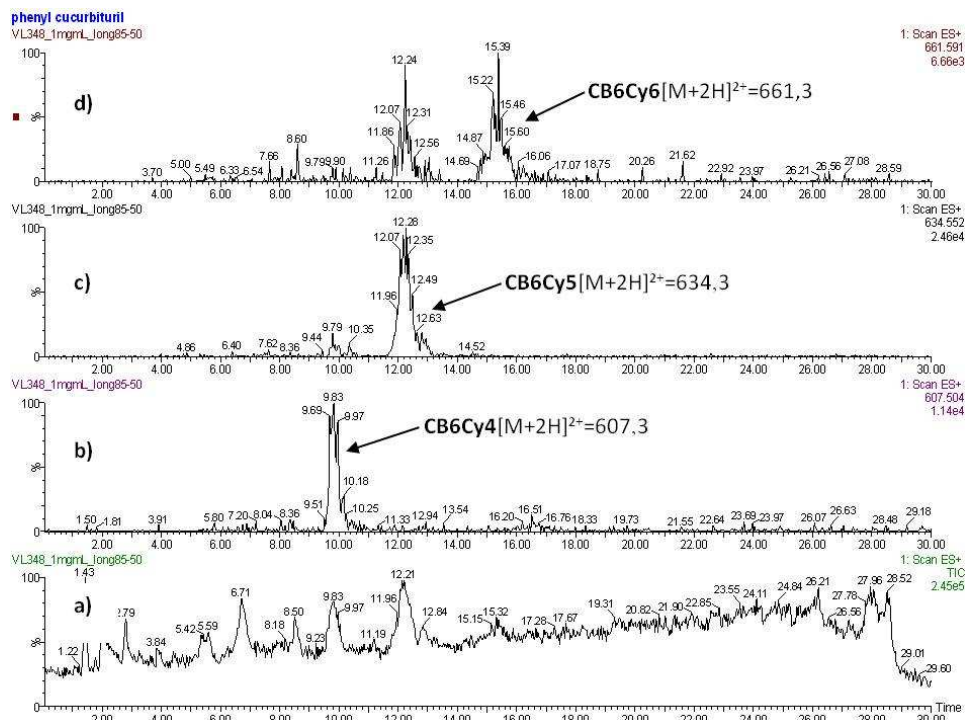


Figure 36 : a) Chromatogramme en courant ionique total long85-50 b-d) Ions $[M+2H]^{2+}$

En comparant ces deux chromatogrammes, nous pouvons en déduire que le gradient « long85-50 » semble le plus adéquat avec de très bonnes résolutions ($R_1 = 2,4$ et $R_2 = 2,5$) contre celles obtenues avec le long60 ($R_1 = 1,6$ et $R_2 = 2,5$). **Cependant il a été constaté lors d'études précédentes, et dans les conditions idéales de transposition, qu'une quantité plus importante d'échantillon injectée sur la colonne préparative entraînait une diminution des temps de rétention, dégradant ainsi la qualité de la séparation. J'ai donc sélectionné les gradients « long60 » et « long 90-50 » pour réaliser l'étude de la transposition à l'échelle préparative.**

1.4 Transposition de la LC-analytique à la LC-préparative

Cette transposition a été réalisée par la méthode de la surcharge en concentration, de la colonne analytique, en injectant des quantités d'échantillon croissantes mais à volume constant (20 μL). Cette surcharge est possible car les CB6Cy[n] présentent une bonne solubilité dans la phase mobile, et notamment dans l'eau.

L'optimisation sur la colonne préparative comprendra deux étapes principales :

- **La surcharge de la colonne analytique**
- **Les calculs de transposition (temps du gradient, débit, et quantité maximale d'échantillon injectée).**

1.4.1 Surcharge de la colonne

Pour réaliser la surcharge de la colonne analytique phényl Xbridge trois solutions à 10, 50 et 100 g.L^{-1} ont été préparées dans de l'eau ultra-pure.

Les quantités d'échantillon sont injectées de manière croissante (0,02 mg à 2 mg) dans les conditions opératoires définies précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7.

Solutions (g.L ⁻¹)	quantité injectée (mg)	Gradients	tr1	tr2 (min)	tr3	R1	R2
1	0,02		12,0	13,8	16,8	1,6	2,4
10	0,2	Long	9,9	11,4	13,8	1,3	1,9
50	1	90-50	8,9	10,5	12,6	1,0	1,3
100	2		8,2	9,6	12,1	0,9	1,2
1	0,02		15,8	17,9	21,0	1,6	2,5
10	0,2		13,6	15,8	18,5	1,4	2,1
50	1	Long 60	12,6	14,6	17,1	1,2	1,3
100	2		12,2	13,9	16,6	1,0	1,4

Tableau 7 : Résultats des chromatogrammes de la surcharge de 0,02 à 2 mg injectés

Comme attendu, la diminution des temps de rétention est observée lors d'injections de quantités plus importantes d'échantillons. Ce phénomène peut s'expliquer par l'effet de désactivation de l'absorbant (paragraphe IV.2.1.3a « Optimisation sur colonne préparative »). Une grande quantité d'échantillon recouvrant la phase stationnaire induit une légère modification de sa polarité entraînant une diminution des temps de rétention. Cette diminution est accompagnée d'une baisse également importante des résolutions (R1 et R2), dû à l'élargissement des pics et ces effets sont observés sur les chromatogrammes des deux gradients (Figure 37 et Figure 38) correspondant à l'échantillon A à 100 g.L⁻¹.

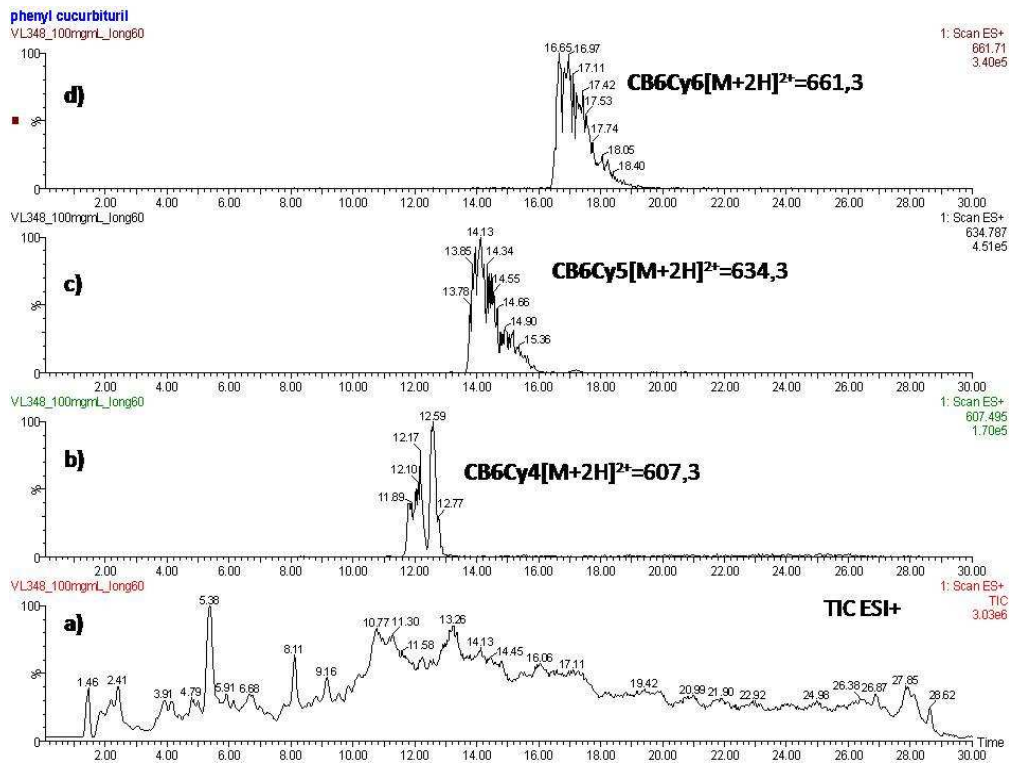


Figure 37 : a) Chromatogramme LC-MS-ESI+ long60 à 100 g.L^{-1} et b) à d) pics $[M+2H]^{2+}$

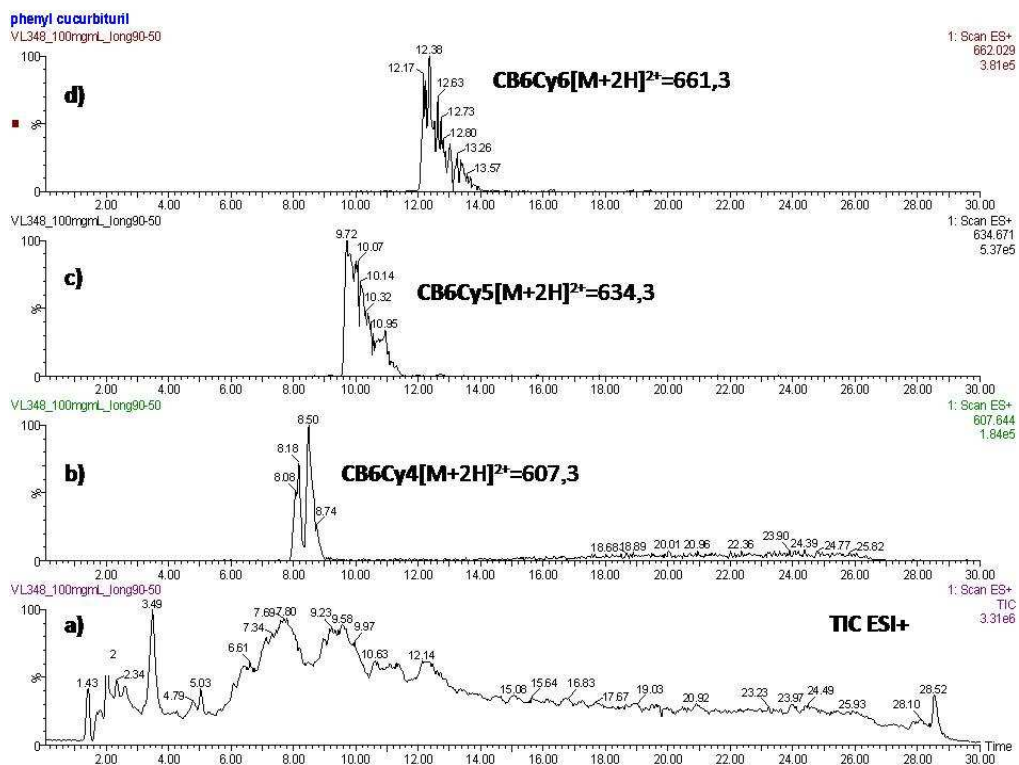


Figure 38 : a) Chromatogramme LC-MS-ESI+ long90-50 à 100 g.L^{-1} et b) à d) pics $[M+2H]^{2+}$

Ensuite à partir de ces mêmes chromatogrammes, les spectres de masse de chaque composé ont été étudiés afin de déterminer le gradient le plus favorable vis-à-vis de ces impuretés.

a. Séparation du CB6Cy[4]

En premier lieu sur les deux chromatogrammes (Figures 37b et 38b) le pic du CB6Cy[4] semble se dédoubler. De plus en observant les spectres de masse de l'ion $[M+2H]^{2+}$ sur la Figure 39, on remarque la présence de pics multiples. En particulier les pics $[M+2H]^{2+} = 525$, $[M+2H_2O+2H]^{2+} = 543$ et $[M+H_2O+H]^+ = 1066$ qui correspondent à un autre cucurbituril : le CB5Cy[4].

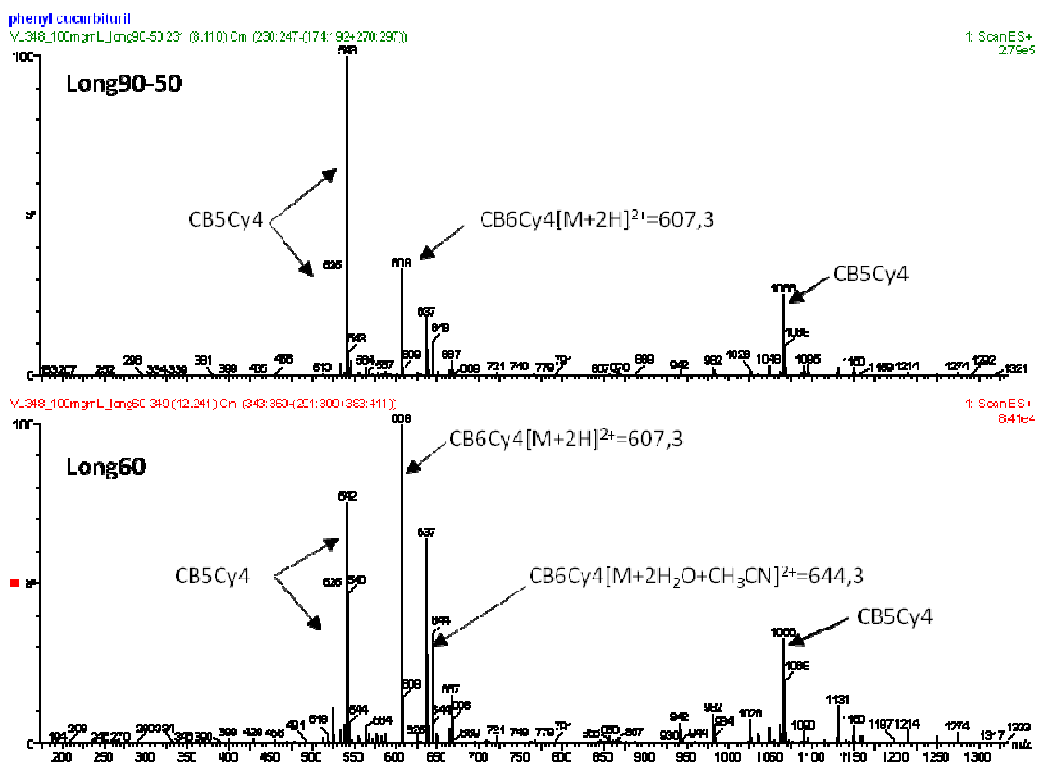


Figure 39 : Spectres de masse du CB6Cy[4] de la solution à 100 g.L⁻¹

L'analyse de ces pics sur le chromatogramme (Figure 40), montre que ce dédoublement est lié à de nombreuses impuretés et qu'une partie du CB5Cy[4] est coélué avec le CB6Cy[4].

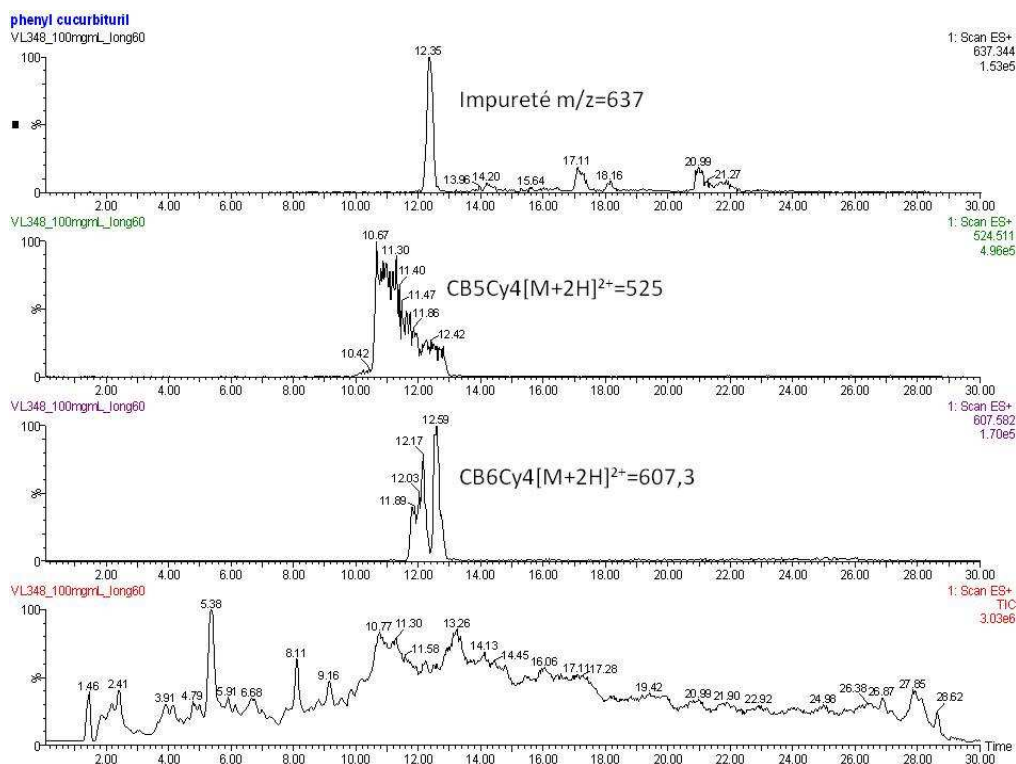


Figure 40 : Extractions des ions correspondant au CB6Cy[4] et aux impuretés en long60

A ce stade, la coélution de cucurbiturils homologues rend la séparation difficile et la purification du CB6Cy[4] semble compromise. Cependant plusieurs solutions peuvent être envisagées comme la réalisation d'une pré-purification dans les mêmes conditions puis de procéder à un nouveau développement de méthode.

b. Séparation du CB6Cy[5]

Les spectres de masse du CB6Cy[5] sur la Figure 41 semblent, quant à eux, présenter moins d'impuretés de m/z à 551, 650, 735, 1120, 1269 et 1298.

Parmi ces pics apparait de nouveau un CBnCy[n] homologue : le CB5Cy5 ($[M+2H]^{2+} = 551$, $[M+2H+H_2O]^{2+} = 569$ $[M+H+H_2O]^+ = 1120$).

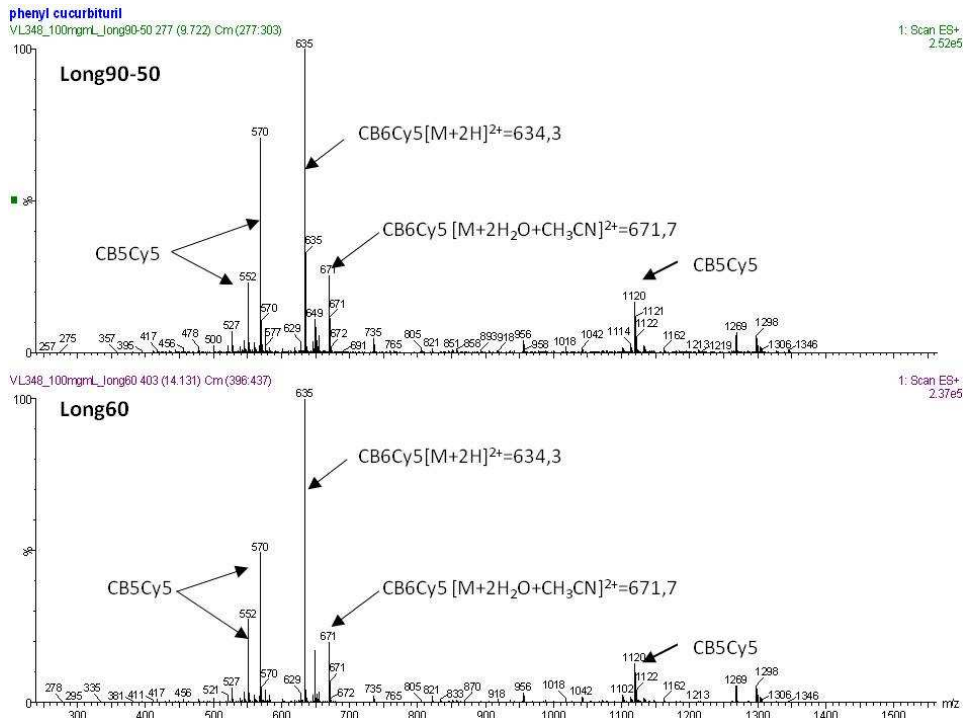


Figure 41 : Spectres de masse du CB6Cy[5] de la solution à 100 g.L⁻¹

Très proche du CB6Cy[5], en particulier en « long90-50 » (Figure 42), il est fort probable, du fait de la baisse de résolution, qu'une partie du CB5Cy[5] soit coélué lors de la purification.

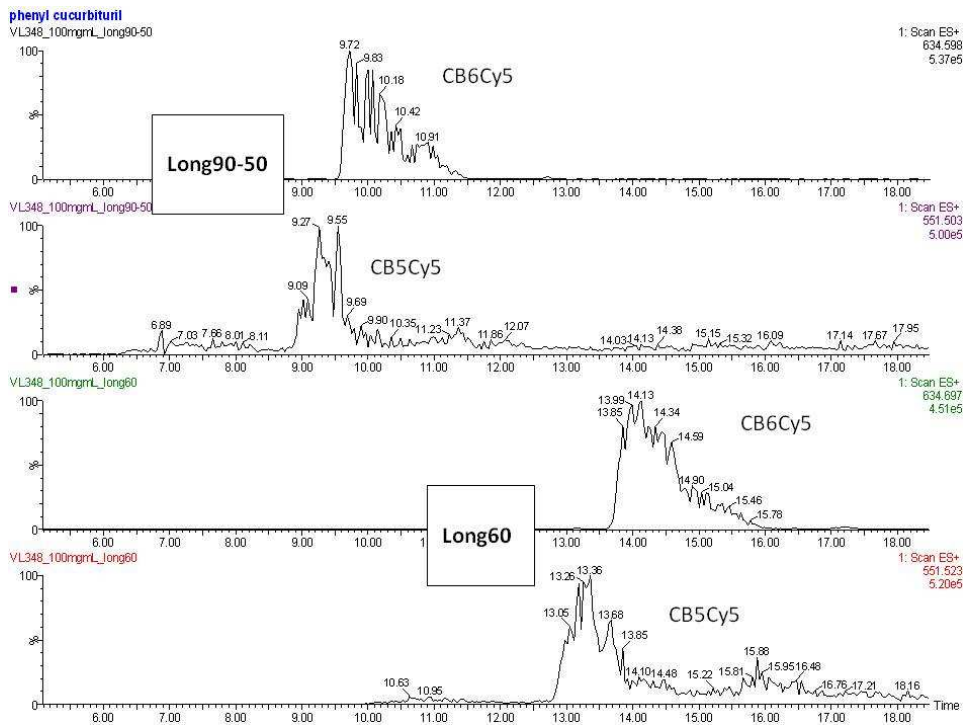


Figure 42 : Extractions des ions CB6Cy[5] et CB5Cy[5]

Concernant l'impureté de $m/z = 650$, celle-ci n'interfère sur la séparation, par contre celle de $m/z = 735$ semble plus gênante en « long90-50 » comme nous pouvons l'observer sur la Figure 43.

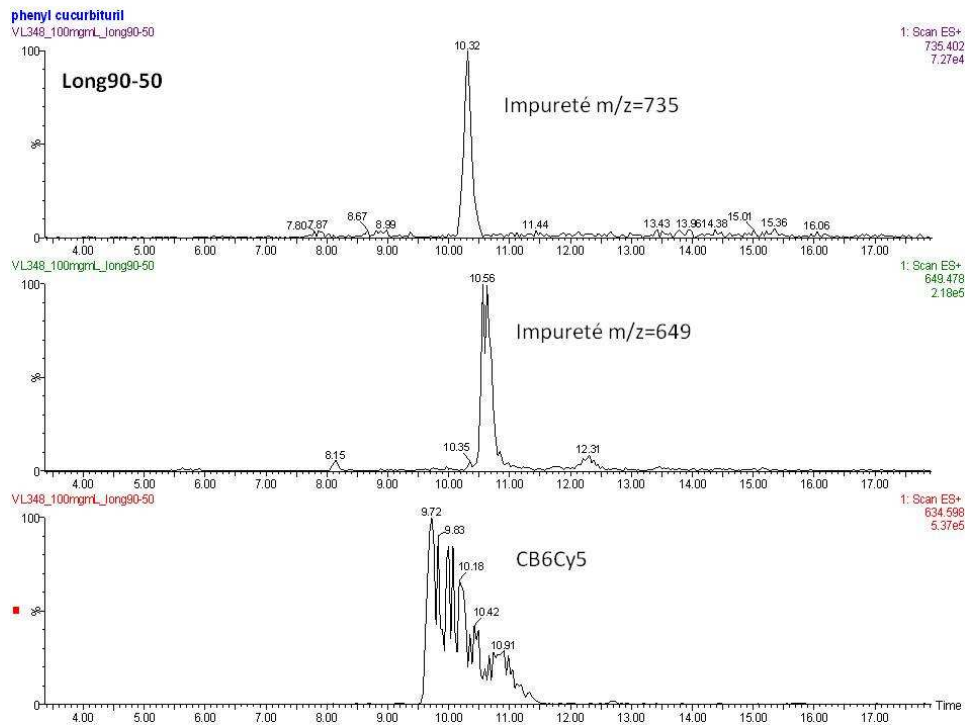


Figure 43 : Extractions des ions CB6Cy[5] et des impuretés en long90-50

Il semble donc que le gradient « long60 » soit le plus adapté pour la séparation du CB6Cy[5]. De plus il a l'avantage de présenter une meilleure rétention du composé.

c. Séparation du CB6Cy[6]

Enfin, concernant le CB6Cy[6], nous pouvons constater que les spectres de masse (Figure 44) sont relativement propres dans les deux cas de figure (long60 et long90-50).

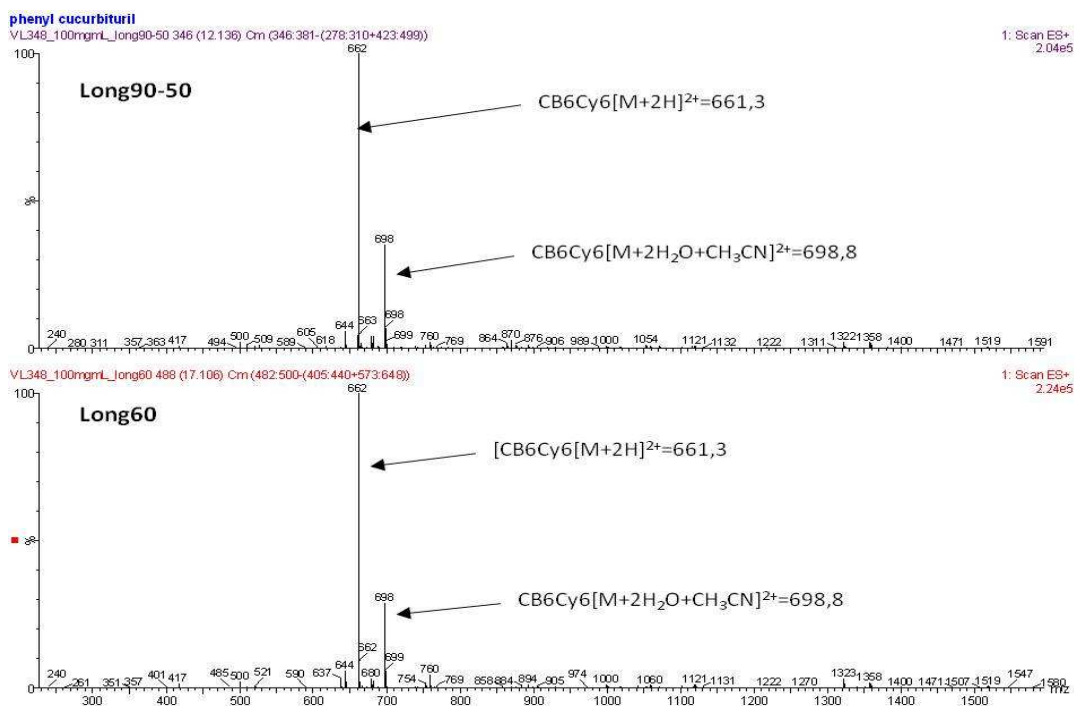


Figure 44 : Spectres de masse CB6Cy[6] de la solution à 100 g.L⁻¹

J'ai donc fait le choix de la sélection du gradient « long60 » présentant une meilleure qualité de séparation pour les composés CB6Cy[5] et CB6Cy[6]. Malgré la présence d'impuretés sous le pic du CB6Cy[4], ces conditions ont été validées pour réaliser leur purification. Cela aura l'avantage d'éliminer d'autres impuretés présentes dans l'échantillon en prépurifiant le CB6Cy[4]. Par la suite, il sera nécessaire de mettre au point une nouvelle méthode pour s'affranchir des homologues de cucurbiturils présents pour obtenir le composé pur.

Une fois ces conditions optimisées j'ai effectué les calculs pour la transposition de la méthode à l'échelle préparative.

1.4.2 Calculs de transposition

La colonne préparative choisie est une colonne XBridge Prep Phenyl OBD avec des particules de 5 µm de diamètre, de dimension 19 x 150 mm (lot n°1171302031) et de longueur réduite *l* identique à la colonne analytique (Tableau 8).

Colonnes phényl xbridge		
	Analytique	Préparative
Longueur L (cm)	10	15
Diamètre interne d (cm)	0,46	1,9
Diamètre des particules ϕ (cm)	3,5E-04	5,0E-04
longueur réduite l	28571	30000

Tableau 8 : Colonnes analytiques et préparatives utilisées

Pour réaliser la purification dans les conditions optimales nous avons calculé les facteurs de transposition selon les équations décrites dans l'annexe 2.

- Le débit utilisé sera donc de $17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sur la colonne préparative
- Le gradient sera de 32 minutes (eau/acétonitrile)
- Pour des résolutions identiques obtenues sur la colonne analytique, on pourra injecter au maximum 36 mg d'échantillon.

1.4.3 Résultats de la purification

La quantité totale d'échantillon A à purifier est de 160 mg. Pour éviter la perte et/ou la dégradation de l'échantillon, la purification a été réalisée à partir de deux solutions préparées extemporanément. La première solution a été préparée à une concentration de $42,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (solution 1) et la deuxième à $50,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (solution 2).

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 9.

A	qté injectée (mg)	tr1 (min)	tr2	tr3	R1	R2
Solution 1	34,1	12,2	13,8	16,6	0,8	1,2
	21,3	12,3	13,9	16,8	1,0	1,4
	17,1	12,5	14,2	16,9	0,9	1,3
	12,8	12,7	14,4	17,1	0,9	1,4
	12,8	12,7	14,4	17,3	0,8	1,4
Solution 2	15,0	12,8	14,5	17,3	0,8	1,4
	17,5	12,6	14,2	16,9	0,9	1,3
	17,5	12,5	14,2	17,3	0,9	1,4

Tableau 9 : Résultats des chromatogrammes VL348 en préparative en Long60

Des quantités décroissantes d'échantillon (de 34,1 à 12,8 mg) ont été injectées afin d'étudier les différentes séparations et de les confronter à celles obtenues lors de la surcharge. En effet les temps de rétention et les résolutions sont conformes à ceux de la surcharge (Tableau 7).

La purification des CB6Cy[5] et CB6Cy[6] a été réalisée dans des conditions appropriées et les fractions séparées ont été correctement récoltées. Comme nous l'avons décidé, les fractions du CB6Cy[4] contenant du CB5Cy[4] coélué ont été récoltées, comme le montre le spectre de masse en Figure 45. Cet échantillon prépurifié a fait l'objet d'un nouveau développement analytique sur d'autres colonnes de types Luna PFP Phenomenex ou Synergi Fusion-RP mais aucune n'a permis de séparer les deux composés.

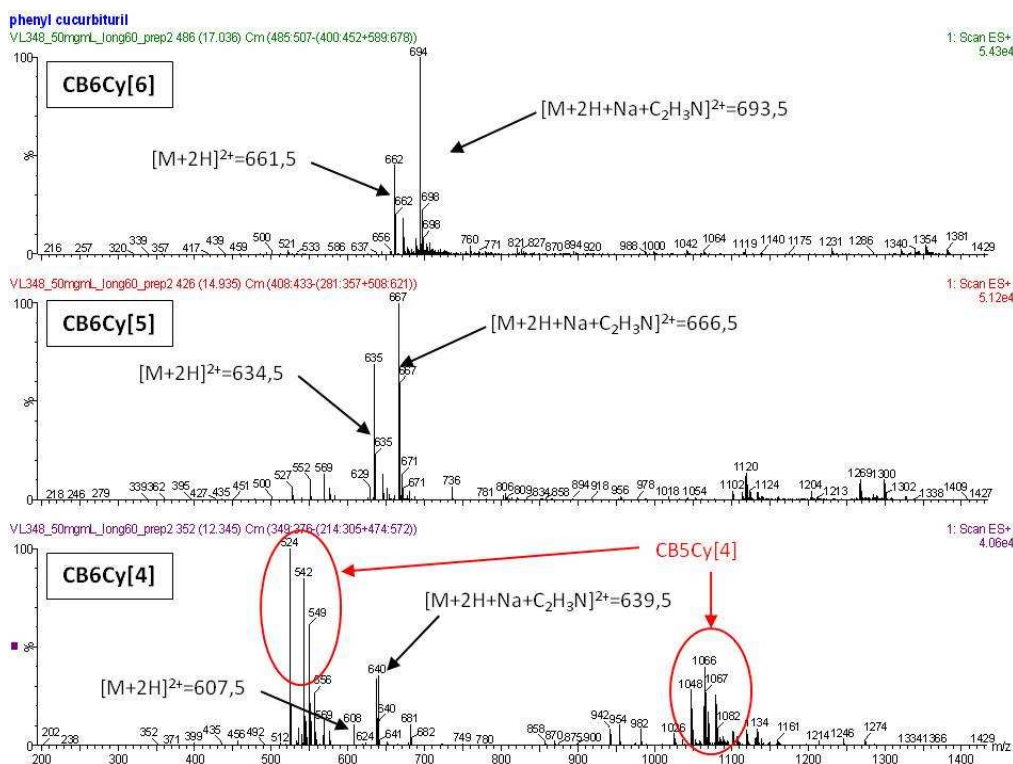


Figure 45 : Spectres de masse des 3 composés après purifications

Avant de conclure sur cette première partie, le degré de pureté des CB6Cy[5 et 6] purifiés a été évalué.

1.4.4 Evaluation des purifications et conclusion

Les fractions séparées des CB6Cy[5] et CB6Cy[6] ont été concentrées et lyophilisées, produisant au final une quantité de 5mg de chaque composé. Une première analyse par RMN-1H a été réalisée par les chimistes organiciens (spectres RMN-1H dans l'annexe 7). Ensuite j'ai estimé un rendement de purification en réalisant leur quantification par étalonnage interne selon la méthode décrit au paragraphe « Quantification des CB6Cy[n] ». Les chromatogrammes des composés réanalysés en LC-MS sont présentés sur la Figure 46 pour le CB6Cy[5] et la Figure 47 pour le CB6Cy[6]. Ils confirment l'enrichissement du composé en particulier sur le chromatogramme en TIC (entouré en rouge) en sachant que leurs réponses sont très faibles.

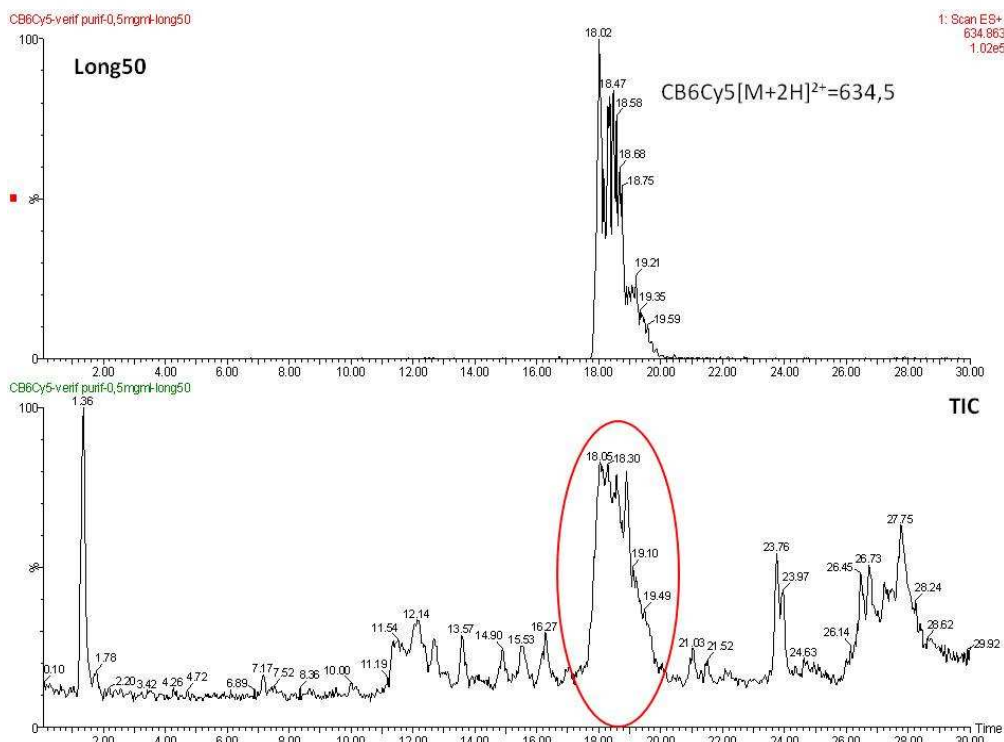


Figure 46 : Chromatogramme TIC du CB6Cy[5] avec extraction de l'ion $[M+2H]^{2+}$

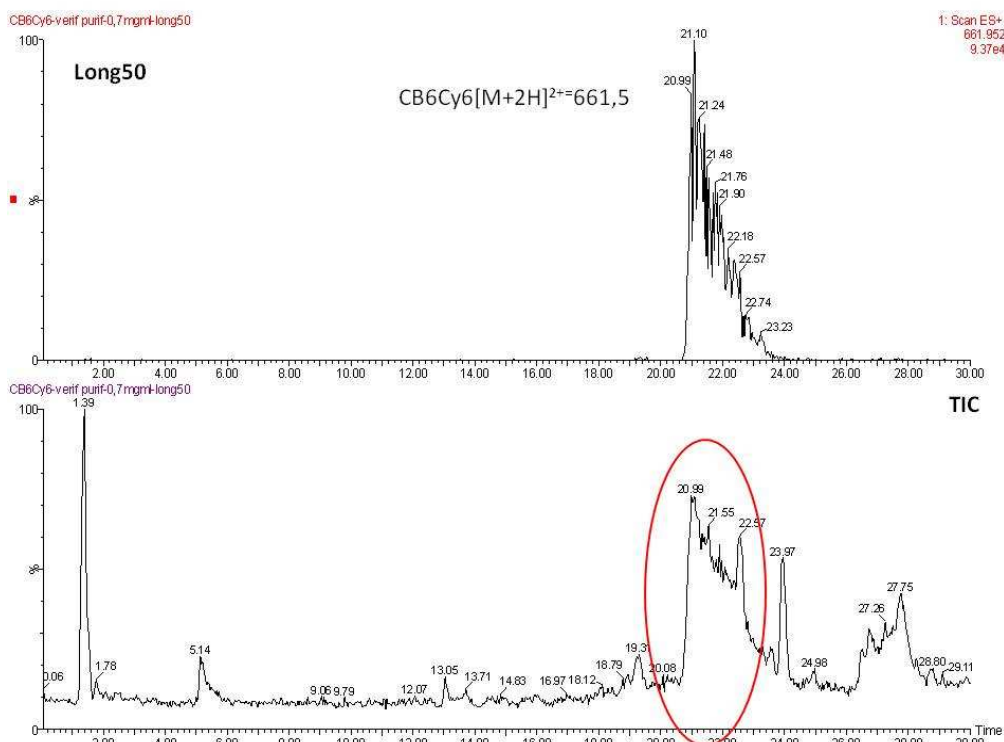


Figure 47 : Chromatogramme TIC du CB6Cy[6] avec extraction de l'ion $[M+2H]^{2+}$

De cette manière une pureté de 99% pour CB6Cy[5] et de 89% pour le CB6Cy[6] ont été calculées, permettant de conclure à un résultat très satisfaisant.

Ces échantillons ont ainsi pu être transmis à une équipe du CEA pour réaliser des études de RMN-¹²⁹Xe qui feront l'objet d'une prochaine publication.

Dans le chapitre suivant, j'ai réalisé, dans la même démarche analytique, la purification des CB6Cy[1] à CB6Cy[3].

1.5 Caractérisation et purification des CB6Cy[1] à CB6Cy[3]

1.5.1 Préparation de l'échantillon

L'échantillon **B** a été synthétisé à partir d'un équivalent de glycoluril et d'un équivalent de diéther de cyclohexylglycoluril en milieu acide comme présenté sur la Figure 22.

La synthèse est réalisée selon le protocole de l'échantillon **A** mais après l'étape de précipitation par l'eau et l'acétone, le culot est récupéré et non le surnageant. Après concentration et lyophilisation du culot, 130 mg d'échantillon **B** sont obtenus.

Pour optimiser la méthode, une solution d'échantillon **B** à 0,92 g.L⁻¹ a été préparée dans de l'eau ultra pure, dans des conditions de solubilité supérieures au CB6.

1.5.2 Optimisation LC-MS

L'échantillon ainsi solubilisé a été analysé sur la LC-MS en utilisant le gradient « générique » (annexe 5) afin de le comparer à l'échantillon **A**.

Les résultats obtenus (Tableau 10) confirment que ces trois nouveaux composés interagissent également sur cette colonne, avec une plus faible rétention.

Echantillon	CB	Gradient « générique »	
		Tr (min)	N
B	CB6	4,6	976
	CB6Cy[1]	4,8	818
	CB6Cy[2]	5,1	949
	CB6Cy[3]	5,6	1118
A	CB6Cy[4]	5,5	1550
	CB6Cy[5]	6,3	2573
	CB6Cy[6]	8,4	1139

Tableau 10 : Comparaison de la séparation des CB6Cy[n] sur colonne phényl

Cette baisse d'affinité, peut s'expliquer par la diminution des groupements cyclohexyles (1 à 3 au lieu de 4 à 6 pour l'échantillon A) et confirme que les interactions hydrophobes entre ces molécules et la colonne dépendent de ces groupements.

De plus la synthèse de l'échantillon **B** entraîne la formation de CB6 (cucurbiturils sans groupements cyclohexyles Figure 24) qui pourra être correctement séparé et isolé des autres composés (Figure 48 b). Enfin à partir de ces temps de rétention, un choix de gradient moins éluant que le gradient « long60 » (utilisé pour les CB6Cy[4à6]) peut être envisagé afin de mieux retenir les composés sur la colonne.

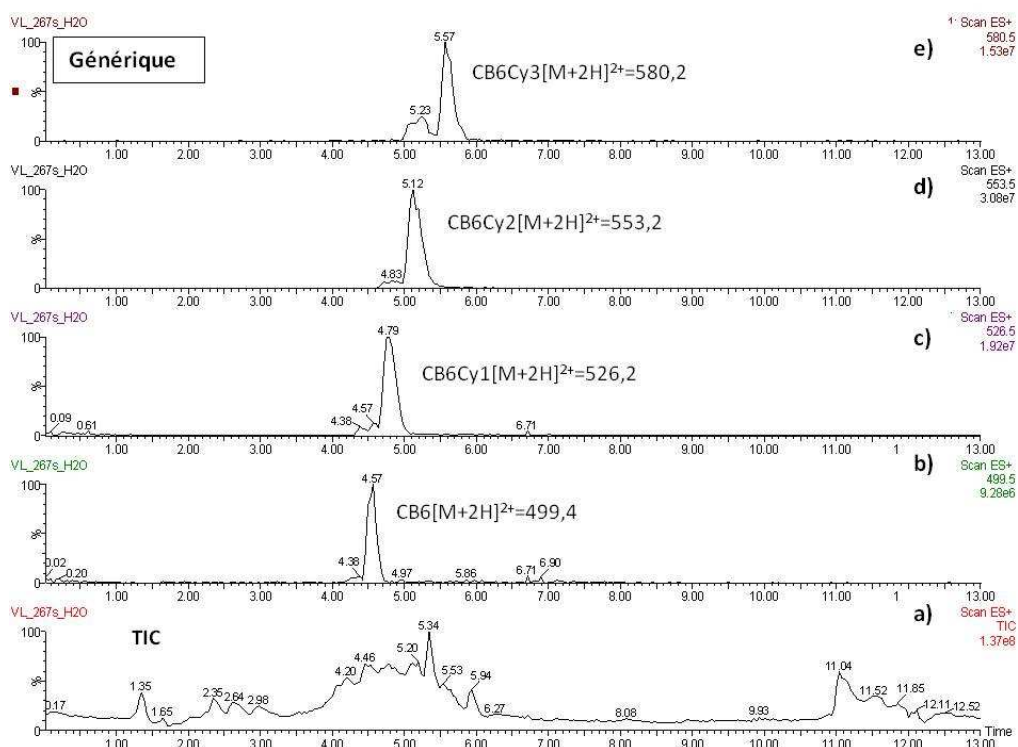


Figure 48 : Chromatogrammes (a-TIC et b-d extraction des $[M+2H]^{2+}$) du CB6 à CB6Cy[3]

En fonction de ces premiers résultats, des essais ont été réalisés avec les gradients « long80 » et « long70 » (annexe 5). Avec le gradient « long80 » le dernier composé (CB6Cy[3]) trop retenu, a été élué dans la phase de nettoyage de la colonne (plateau 100% d'acétonitrile) mais une très bonne séparation a été obtenue avec le gradient « long70 » (Tableau 11).

Pour évaluer la qualité de la séparation j'ai calculé les résolutions entre chaque composé de la manière suivante :

- R1 entre le CB6 et CB6Cy[1]
- R2 entre le CB6Cy[1] et le CB6Cy[2]
- R3 entre CB6Cy[2] et CB6Cy[3]

Composés	tr (min)	R1	R2	R3
CB6	9,8			
CB6Cy[1]	13,8	2,2		
CB6Cy[2]	17,5		2,2	
CB6Cy[3]	21,4			3,0

Tableau 11 : Séparation des CB6Cy[1 à 3] avec le gradient long70

L'analyse des spectres de masse (Figure 49) confirme la qualité de séparation en ne présentant pas d'impuretés interférentes et coéluantes.

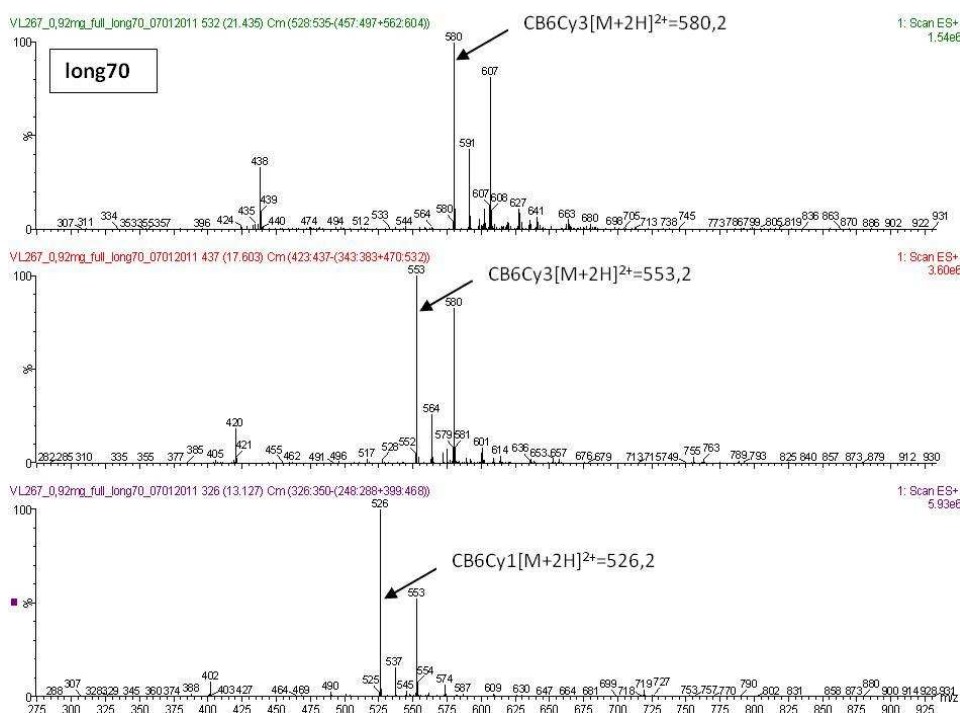


Figure 49 : Spectres de masse des CB6Cy[1 à 3]

Cette séparation a été réalisée sur le deuxième SM (programme « cucurbit » paragraphe 1.2.2) et une différence d'ionisation a été observée. En effet, sur le chromatogramme de la Figure 50 ainsi que sur les spectres de masse de la Figure 49, il apparaît un ion de $[M+2H+27]^{2+}$ correspondant à la même masse $[M+2H]^{2+}$ du CB6Cy[n-1]. Par exemple sur le chromatogramme de la Figure 50 on observe un pic à 13,8 minutes correspondant au CB6Cy[1] (avec $[M+2H]^{2+} = 526$) et le pic du CB6 à 9,8 minutes correspondant au $[M+2H]^{2+} = 499$ et au $[M+2H+27]^{2+} = 526$. Grâce à la présence de l'ion moléculaire, les pics des CB6Cy[n] ont été confirmés évitant le risque d'erreur dû à cette coïncidence.

J'ai donc choisi le gradient « long70 » et réalisé la purification des trois CB6Cy[n] avec les mêmes facteurs de transposition utilisés pour les CB6Cy[4 à 6] et sur la même colonne préparative (phényl OBD xbridge waters®).

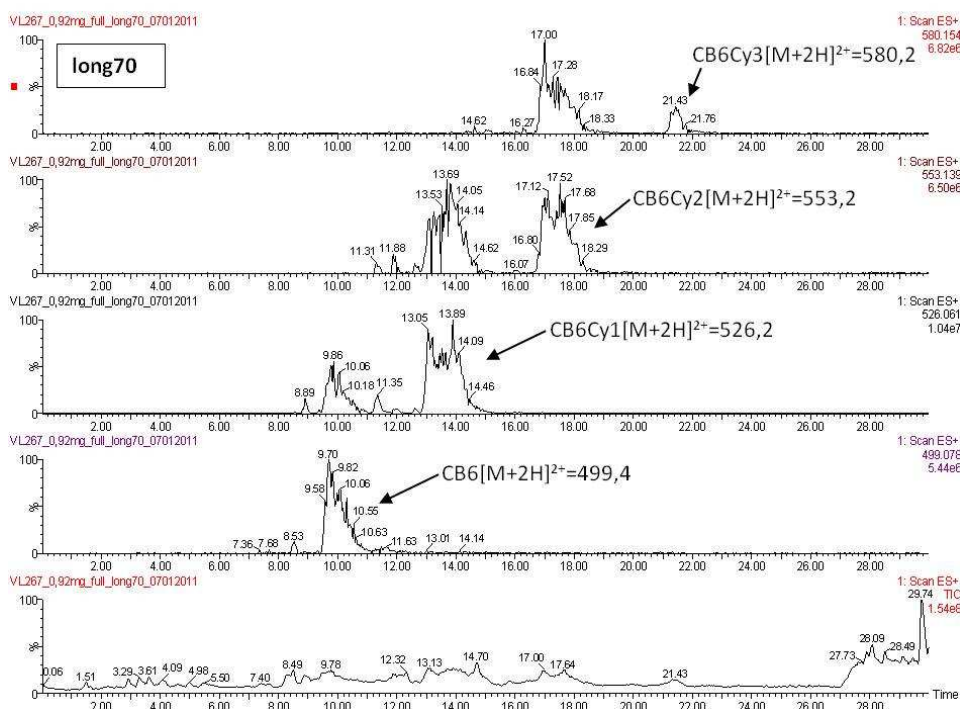


Figure 50 : Chromatogrammes TIC avec extractions des $[M+2H]^{2+}$ de CB6 à CB6Cy[3]

1.5.3 Résultats de la purification des CB6Cy[1] à CB6Cy[3]

La quantité d'échantillon **B** à purifier est d'environ 70 mg.

La purification des trois CB6Cy[n] a été réalisée en plusieurs injections à partir de solutions solubilisées dans de l'eau ultra-pure.

Afin de minimiser la dégradation de la séparation, des quantités plus faibles d'échantillon (~ 5 mg) ont été injectées sur la colonne préparative. En effet, malgré la diminution des temps de rétention de meilleures résolutions (> 1,2) ont été obtenues et le Tableau 12 présente les temps de rétention et les résolutions obtenus.

Qté injectée	tr1	tr2	tr3	R2	R3
	8,3	11,8	16,6	1,4	2,0
~ 5mg	8,3	11,6	15,7	1,4	1,6
Ech B	8,1	11,6	15,6	1,2	1,4
	8,4	11,5	15,6	1,3	1,7

Tableau 12 : Temps de rétention (min) et résolutions de l'échantillon B LC-Prep en long70

Comme nous l'avons supposé lors de la séparation sur la colonne analytique, la présence de CB6 n'a pas perturbé la séparation, et les fractions du CB6Cy[1] ont pu correctement être récoltées (Figure 51).

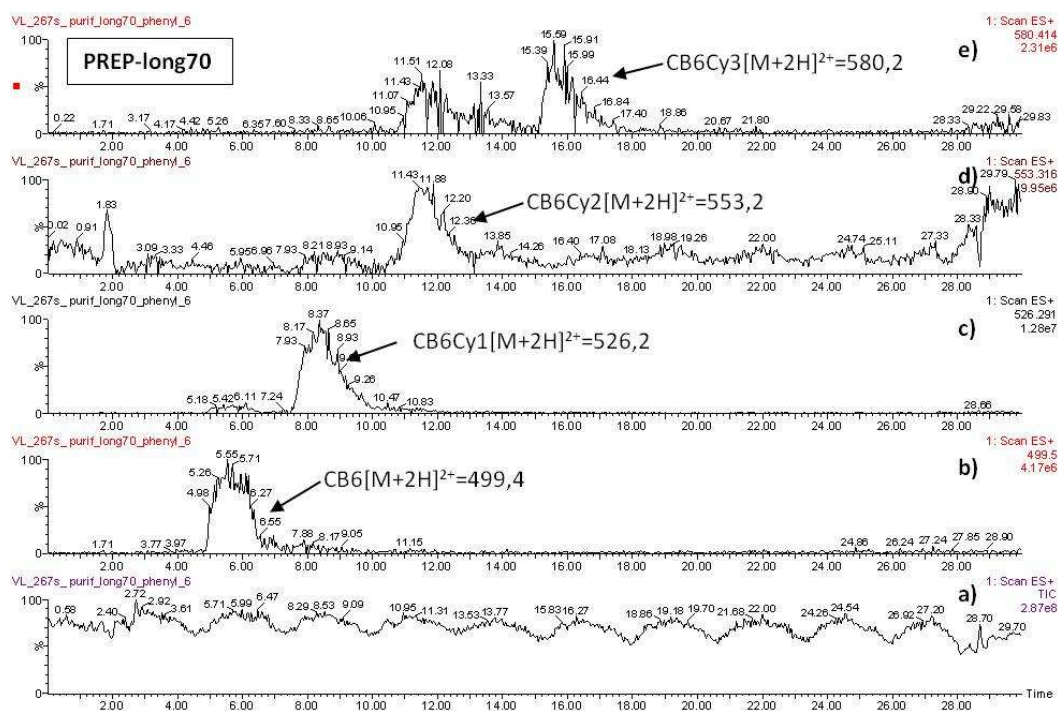


Figure 51 : Chromatogrammes de purification TIC avec extractions pics $[M+2H]^{2+}$

Les fractions des trois composés ainsi séparées ont ensuite été concentrées et lyophilisées. Les composés purifiés ont été réanalysés et leur pureté a été quantifiée avec la méthode développée pour les CB6Cy[4 à 6]. Sur les 66,6 mg de l'échantillon B purifié, nous avons obtenu :

- 22 mg de CB6Cy[1] d'une pureté de 45%
- 14 mg de CB6Cy[2] d'une pureté de 71%
- 3,4 mg de CB6Cy[3] d'une pureté de 85%.

Les CB6Cy[2 et 3] réanalysés en LC-MS et une analyse par RMN-1H a également permis d'évaluer la qualité de la purification (annexe 7). La Figure 52 représente le chromatogramme du CB6Cy[3] après la purification.

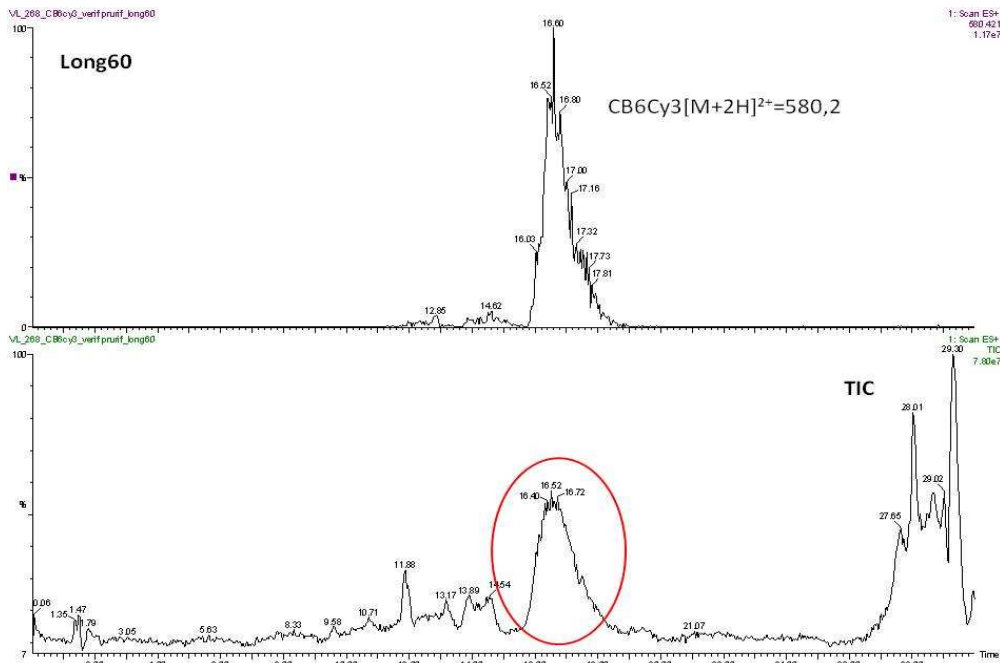


Figure 52 : Chromatogramme TIC après purification du CB6Cy[3] et extraction du $[M+2H]^{2+}$

Cependant l'observation du chromatogramme du CB6Cy1 purifié sur la Figure 53 il apparaît la présence d'une série de pics auparavant inexistantes. En effet il semblerait que l'échantillon ait été contaminé chimiquement peut-être lors de l'évaporation ou de la lyophilisation, d'où la faible pureté obtenue. Une analyse RMN-1H a été réalisée sur l'échantillon et a confirmé la présence d'une impureté.

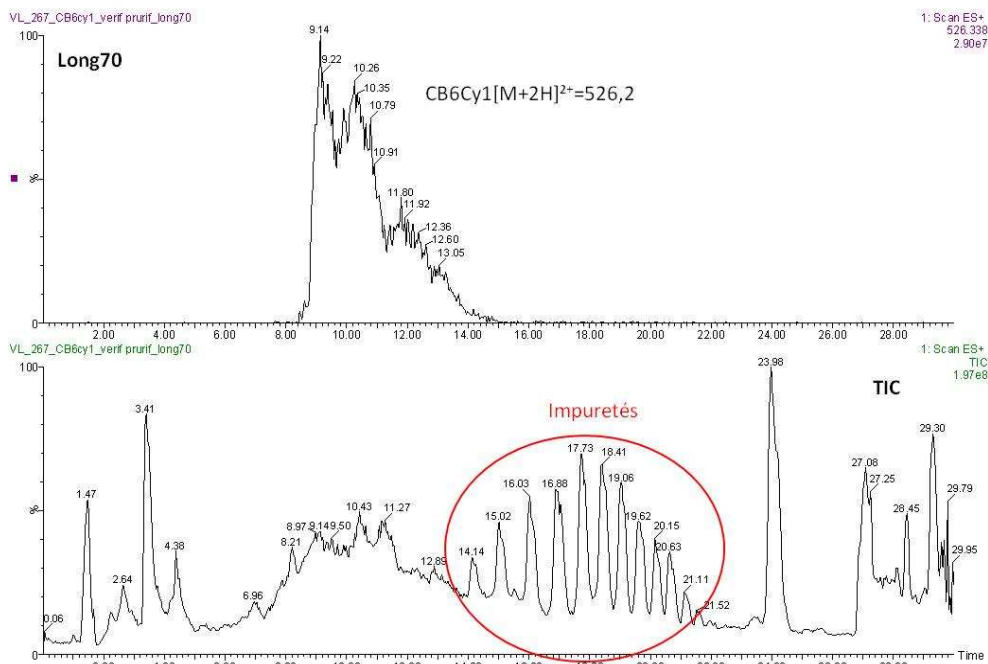


Figure 53 : Chromatogramme TIC après purification du CB6Cy[1] et extraction du $[M+2H]^{2+}$

L'analyse du profil du chromatogramme TIC et le spectre de masse de chacun de ces pics ont révélé la même différence $m/z = 44$ confirmant la présence d'un polyéthylène glycol « PEG » ($\text{H}[\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]_n-\text{OH}$). En effet ce composé servant actuellement à la synthèse de certains composés dans le service et l'utilisation d'un lyophilisateur commun peuvent expliquer la contamination de l'échantillon CB6Cy[1].

La faible pureté du CB6Cy[1] (45%) a nécessité de le resynthétiser et de le purifier à nouveau. Des études en RMN- ^{129}Xe ont pu être ainsi réalisées. Des exemples de spectres RMN- ^{129}Xe sont présentés dans l'annexe 7 et des premiers résultats montrent que le nombre de groupements cyclohexyles influence le comportement du xénon, entraînant un déplacement chimique différent en fonction de la molécule.

Malgré la difficulté de certaines séparations causée par la coélution de cucurbiturils homologues, j'ai donc réussi à mettre au point une méthode par LC-MS capable de d'isoler, de caractériser et de purifier majoritairement les CB6Cy[1] à CB6Cy[6] à l'exception du CB6Cy[4].

Le dernier objectif était alors de développer une méthode de quantification en réalisant une validation de méthode pour déterminer les concentrations des CB6Cy[n] dans les échantillons ainsi que les rendements de synthèses.

2. Quantification des CB6Cy[n]

Avant de pouvoir quantifier les différents CB6Cy[n] synthétisés, il a été nécessaire de vérifier que la réponse SM des CB6Cy[n] était proportionnelle à la quantité présente dans l'échantillon. Pour cela j'ai commencé par réaliser une évaluation relative des composés puis j'ai développé une méthode de dosage pour quantifier de manière absolue les CB6Cy[n] issus de synthèses différentes.

2.1 Evaluation relative des CB6Cy[n]

Pour vérifier cette proportionnalité nous avons raisonné sur la proportion des pics CB6Cy[1 à 3] obtenus à partir des chromatogrammes des purifications.

Chaque pic $[M+2H]^{2+}$ a été intégré pour déterminer son aire et le rapport entre l'aire du pic considéré et la somme totale des aires des CB6Cy[n] a été calculé. Puis ces pourcentages ont été comparés avec le pourcentage de masses relatives réellement obtenues après purification. Le Tableau 13 résume les résultats obtenus.

NOMS	CB6	CB6Cy1	CB6Cy2	CB6Cy3	total
Proportions relatives	13%	47%	34%	6%	100%
Masses purifiées (mg)	9	22	14	3,4	48,4
Masses relatives	19%	46%	29%	7%	100%

Tableau 13 : Proportions relatives des CB6Cy[n] purifiés dans l'échantillon B

Ces résultats montrent que l'aire (ou la proportion relative) de chaque composé est très proche de la masse relative obtenue après la purification.

Il est alors possible de conclure que l'aire du signal en MS-ESI+ des pics $[M+2H]^{2+}$ après séparation par HPLC est bien proportionnelle à la quantité massique de cucurbiturils mixtes présents dans l'échantillon.

Pour poursuivre cette démarche analytique la proportion de chacun des CB6Cy[n] a été évaluée dans une série d'échantillons provenant de synthèses différentes.

Pour cela, le laboratoire de recherche réalisant ces synthèses a fait varier différents paramètres :

- La nature de l'acide (HCl, H₂SO₄, CH₃COOH,...)
- La température et les temps des différentes étapes
- Le nombre d'équivalents de réactifs nécessaires à la synthèse des CB6Cy[n].

Une série d'échantillons des culots de synthèses (sauf pour l'échantillon A) ont été analysés et sont présentés dans le Tableau 14 en fonction des conditions de synthèse utilisées.

Echantillons	Masse (mg)	Glycoluril (Eq)	Cylcohexyglycoluril diether (Eq)	Acides	T1 (°C)	Tps 1 (heures)	T2 (°C)	Tps2 (heures)
282	6,4	1	0,5	HCl	50	2	90	2
B	130	1	1	HCl	50	2	90	2
286	ND	1	1	HCl	TA	24	-	-
298	17	1	1	HCl	-	-	90	24
301	4,2	1	1	CH ₃ COOH	50	2	90	2
304	0	1	1	H ₂ SO ₄	50	2	90	2
268	50	1	3	HCl	50	2	90	2
283	6,5	1	5	HCl	50	2	90	2
A surnageant	160	1	5	HCl	50	2	90	2
A culot	570	1	5	HCl	50	2	90	2
284	15	1	10	HCl	50	2	90	2
315	80	1	30	HCl	50	2	90	2

Tableau 14 : Masses totales des échantillons selon leurs conditions de synthèse

Nous avons ainsi analysé ces différents échantillons et sur chaque chromatogramme les pics de nos composés ont été intégrés pour mesurer leur proportion relative. Chaque échantillon est analysé trois fois pour une meilleure précision et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 15.

Echantillons	CB6	CB6Cy1	CB6Cy2	CB6Cy3	CB6Cy4	CB6Cy5	CB6Cy6
282	41	46	13	1	0	0	0
B	16	45	35	5	0	0	0
286	0	0	0	0	0	0	0
298	9	34	45	12	0	0	0
301	0	0	0	0	0	0	0
304	0	0	0	0	0	0	0
268	0	0	9	45	41	5	0
283	0	0	5	41	50	5	0
A surnageant	0	0	0	1	21	51	27
A culot	0	0	2	18	53	16	1
284	0	0	0	8	44	45	3
315	0	0	0	13	46	37	4

Tableau 15 : Proportions relatives des CB6Cy[n] mesurés dans chaque échantillon

Ces résultats permettent d'obtenir des informations essentielles sur les variations de synthèse. En effet une quantité plus importante de diéther de cyclohexyglycoluril permet de former les CB6Cy[n] avec plus de groupements cyclohexyles. Par contre l'usage d'un acide différent de l'acide chlorhydrique (HCl) et l'absence de chauffage lors de la première étape ne conduit pas à la formation de CB6Cy[n]. Ces données importantes pour les organiciens, ont contribué à l'optimisation de la synthèse.

Cependant ces proportions ne permettent pas de déterminer la quantité exacte et réelle des CB6Cy[n] dans les différents échantillons ainsi que les rendements de synthèse. C'est pourquoi j'ai choisi de réaliser les dosages par une méthode d'étalonnage interne en réalisant au préalable une validation de méthode.

2.2 Principe de l'étalonnage interne et choix de l'étalon

La méthode de l'étalon interne consiste à utiliser une substance qui va subir les mêmes perturbations que l'analyte et qui sert en même temps de référence. Cet étalonnage repose sur l'ajout en quantité parfaitement connue, dans toutes les solutions étalons et tous les échantillons.

L'étalon interne doit présenter les propriétés suivantes :

- ne pas se trouver initialement dans l'échantillon
- être distinguable des analytes cibles (il doit être bien séparé des autres constituants du mélange, son temps de rétention et sa concentration doivent être proches des éléments dosés)
- avoir des propriétés physiques et chimiques proches du composé analysé.

Il est recommandé d'utiliser une substance de référence certifiée (SRC) comme étalon interne mais n'ayant pas ce type de matériel sur le marché à ce jour, différentes idées ont été testées. Le premier choix s'est tourné vers un étalon marqué par un isotope stable. Une équipe d'organiciens au sein du service, avait synthétisé un CB6 marqué au carbone 13. Malheureusement ce choix a été abandonné pour des raisons de pureté et de quantité insuffisante. Finalement, nous avons choisi une molécule disponible commercialement : le cucurbit[7]uril (Figure 54) de pureté 99% (certificat d'analyses en annexe 6) et présentant toutes les propriétés citées ci-dessus.

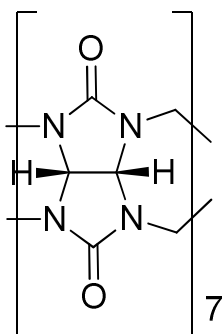


Figure 54 : Cucurbit[7]uril $C_{42}H_{42}N_{28}O_{14}$ $M=1162,96 \text{ g.mol}^{-1}$

Précédemment il a été démontré que le CB6 et les CB6Cy[n] présentaient une structure chimique proche et une réponse en masse similaire, et qu'ils étaient séparables selon la méthode LC-MS mise au point. Pour pouvoir utiliser le CB7 comme étalon, j'ai vérifié si sa réponse en masse en fonction de sa concentration était similaire à celle du CB6. Des réponses analogues ont permis de valider ce choix.

Ainsi pour réaliser l'étalonnage interne, des solutions de concentrations croissantes de CB6 commerciales ont été préparées, auxquelles une solution de CB7 également commerciale de concentration connue a été rajoutée.

Les critères de performance qui seront déterminés sont :

- **la linéarité et gamme dynamique**
- **la fidélité (répétabilité et reproductibilité intermédiaire)**
- **la limite de détection et de quantification**
- **la justesse**
- **l'incertitude de mesure.**

2.3 Détermination du domaine de mesure et de la linéarité

La linéarité d'une méthode d'essai ou d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle à fournir des valeurs d'information proportionnelles à la quantité à mesurer sur l'échantillon. En utilisant la technique d'étalonnage d'interne, l'étalon doit avoir une concentration telle que la réponse soit du même ordre de grandeur que celle de la substance à analyser.

En réalisant l'étude de la proportion relative des CB6Cy[n] un ordre de grandeur a pu être déterminé et nous avons donc décidé de travailler sur une gamme de concentration de CB6 de 0 à 170 mg.L⁻¹.

Sachant que la surface des pics *S* est directement fonction de la quantité de produit injecté au départ (*m*) soit :

$$S = K . m \quad (V-1)$$

K : constante pour un produit donné et pour les conditions opératoires fixés
m : masse de produit injecté.

Comme la quantité de produit injecté est fonction de la concentration *C* du produit et du volume injecté *V_i*, soit :

$$m = C . V_i \quad (V-2)$$

d'où

$$S = K . C . V_i \quad (V-3)$$

La réponse du CB6 sera $S_{CB6} = K_{CB6} . C_{CB6} . V_i$ et de l'étalon interne $S_{CB7} = K_{CB7} . C_{CB7} . V_i$

En faisant le rapport des surfaces on obtient :

$$\frac{S_{CB6}}{S_{CB7}} = R \frac{C_{CB6}}{C_{CB7}} \quad \text{avec } R = \frac{K_{CB6}}{K_{CB7}} \quad (V-4)$$

Six solutions de CB6 dans le l'eau ultra-pure de 56,6 mg.L⁻¹ à 339,3 mg.L⁻¹ ainsi qu'une solution de CB7 à 452,3 mg.L⁻¹ également dans de l'eau ultra-pure ont été préparées. Ensuite 200 µL de chaque solution de CB6 ont été mélangés avec 200 µL de CB7 et cette préparation a été répétée 5 fois par point de gamme. Le Tableau 16 synthétise la préparation de la gamme d'étalonnage.

Solutions	1	2	3	4	5	6
[CB6] _i mg.L ⁻¹	56,6	84,8	141,4	197,9	254,5	339,3
[CB7] _i mg.L ⁻¹			452,3			
Mélange de 200µL de CB6 et de 200µL de CB7						
[CB6] _f mg.L ⁻¹	28,3	42,4	70,7	98,9	127,3	169,7
[CB7] _f mg.L ⁻¹			226,3			

Tableau 16: Préparation de la gamme d'étalonnage

Les mêmes conditions analytiques optimisées ont été conservées, en utilisant le gradient « long50 », permettant d'obtenir des temps de rétention convenables sur la totalité du chromatogramme.

Pour rappel ces conditions sont :

- Colonne phényl xbridge (4,6 x 100 mm, 3,5 µm)
- Gradient « Long50 » sur 30 minutes (annexe 5) en eau/acétonitrile
- Débit 1 ml.min⁻¹ et Injection 20 µL en boucle pleine (« full injection »)
- Programme de masse « Cucurbituril » ESi+

Après intégration de chaque pic [M+2H]²⁺ du CB6 et du CB7, la moyenne du rapport de la surface du CB6 et du CB7 par niveau de concentration a été réalisée (Tableau 17).

Solutions	1	2	3	4	5	6
[S _{cb6} /S _{cb7}]	0,125	0,187	0,312	0,437	0,562	0,750
[C _{cb6} /C _{cb7}]	0,110	0,181	0,287	0,412	0,566	0,749

Tableau 17 : Moyennes des résultats obtenus après intégration de chaque pic (CB6 et CB7)

Ces résultats ont permis ensuite de tracer la droite $\left(\frac{S_{CB6}}{S_{CB7}} = f\left(\frac{[CB6]}{[CB7]}\right)\right)$ ou R correspond à la pente de la droite (Figure 55).

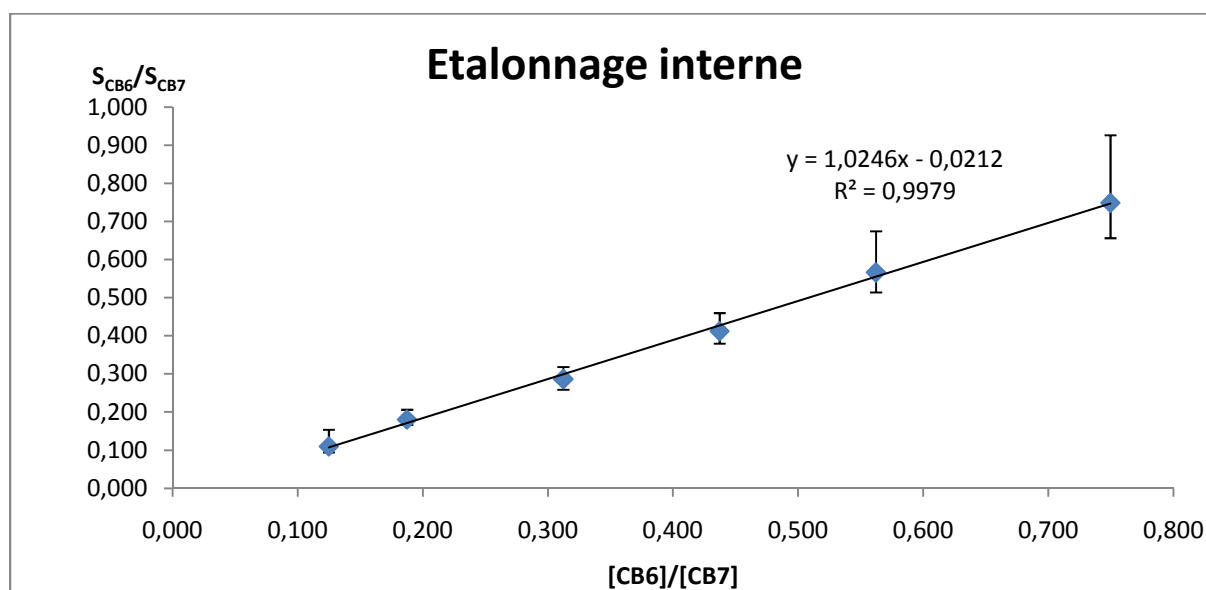


Figure 55: Droite d'étalonnage interne

L'équation de la droite est déterminée par la méthode des moindres carrés.⁴⁶

Ainsi la concentration du CB6 (ou CB6Cy[n]) en mg.L⁻¹ sera calculé selon cette droite d'étalonnage de la manière suivante :

$$[CB6] = \frac{S_{CB6}}{S_{CB7}} \times \frac{[CB7]}{1,0246} + 0,0212 \quad (V-5)$$

Afin de conclure sur la linéarité de notre étalonnage nous avons réalisé différents tests statistiques, d'une part pour vérifier une distribution normale et d'autre part que l'on peut affirmer avec un risque faible, que dans le domaine de concentration choisi le modèle d'étalonnage est bien linéaire.

- Pour vérifier que l'échantillon suit une loi normale, on réalise le test statistique de Shapiro-Wilk (annexe 8). On calcule $W=1,037$ et on le compare à $W_{crit}= 0,927$ (tabulé à 5%).

Comme $W > W_{crit}$ on accepte au risque de 5% l'hypothèse de normalité de la distribution statistique donnée.

- Pour vérifier le domaine d'étalonnage et le modèle de régression linéaire on réalise un test de Fischer selon la norme XP T90-220⁴⁷ (annexe 8). Cette méthode utilise des concepts introduits par la méthode des moindres carrés. La recherche de la limite de linéarité met en œuvre un test d'erreur d'adéquation du modèle, basé sur l'analyse de variance. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 18.

Sources	SCE	ddl	Variance s	F	Limites (Ftabulés)1%
Régression	1,461	1	1,461	729,721	7,82
Résiduelle	0,048	24	0,002		
Totale	1,512	29			
Erreur de modèle	0,003	4	0,0007	0,379	4,22
Conclusion sur régression :	Modèle acceptable				
Conclusion sur modèle :	linéarité validée				

Tableau 18 : Résultats du test statistique de Fischer selon la norme XP T90-220

⁴⁶ Laboratoire de génie analytique, « Généralités » TPGAN114, CNAM, Chapitre II La régression linéaire, **2009-2010**, p23-27.

⁴⁷ Norme XP T 90-220, **2003**, AFNOR

$F_{reg}(729,721) > F_{tab\ 1\%}(7,82)$: la régression explique bien une grande partie de la variation. Il existe donc une relation linéaire entre X et Y au risque alpha de 1%.

$F_{em}(0,379) < F_{tab\ 1\%}(4,22)$: il n'y a pas de courbure et on peut accepter la gamme étalon choisie comme domaine de linéarité.

2.4 Fidélité

La fidélité, c'est l'étroitesse de l'accord entre des résultats d'essai ou d'analyse indépendants obtenus sous des conditions stipulées.

Nous avons réalisé quatre séries de cinq mesures sur trois niveaux de concentration répartis dans le domaine d'application. Pour chaque série, cinq mesures ont été réalisées dans les conditions de répétabilité : même opérateur, même jour de mesure, même calibration du spectromètre de masse. Pour les conditions de fidélité intermédiaire, nous avons fait varier le jour, l'opérateur, la solution de CB6 et la calibration du spectromètre de masse.

Les tests statistiques utilisés pour vérifier les essais de la fidélité sont le test de *Cochran* et de *Grubbs* (annexe 8). Le test de *Cochran* a pour objet la vérification de l'homogénéité des variances concernant plusieurs populations. Le test de *Grubbs* permet le rejet de deux points aberrants dans une série de mesures ou le rejet d'une ou de deux moyennes par rapport à la moyenne générale.

Nous avons calculé l'écart type de répétabilité S_r et l'écart type de fidélité intermédiaire S_R , ainsi que la limite de répétabilité r et de fidélité intermédiaire R (ISO 5725⁴⁸).

La limite de répétabilité est la valeur en dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux essais individuels, obtenus sous des conditions de répétabilité et est calculée selon la formule :

$$r = t_{(0,95,N-p)} \times \sqrt{2} \times S_r \approx 2,83 \times S_r \quad (V-6)$$

Avec N le nombre total de mesures et p le nombre de séries

⁴⁸ Norme ISO 5725-1 et 2, 2004, AFNOR

La limite de fidélité intermédiaire (ou reproductibilité) est la valeur en dessous de laquelle est située, avec une probabilité de 95%, la valeur absolue de la différence entre deux essais individuels, obtenus sous des conditions de répétabilité.

Elle est calculée selon la formule :

$$R = t_{(0,95,N-1)} \times \sqrt{2} \times Sr \approx 2,83 \times Sr \quad (V-7)$$

Trois niveaux de concentration de CB6 auxquels est ajoutée la solution étalon (Tableau 19) ont été analysés de la même manière que pour la linéarité.

Solutions	1	2	3
[CB6] _i mg.L ⁻¹	98,9	169,7	282,8
[CB7] _i mg.L ⁻¹		452,3	
Mélange de 200 µL de CB6 et de 200 µL de CB7			
[CB6] _f mg.L ⁻¹	49,5	84,8	141,4
[CB7] _f mg.L ⁻¹		226,3	

Tableau 19 : Préparation des solutions pour les essais de fidélité

Les valeurs numériques et les résultats de ces 2 tests sont présentés dans l'annexe 8 tests statistiques

Le test de Cochran permet de conclure à une homogénéité des variances au risque de 5% et le test de Grubbs permet de conclure que les moyennes sont correctes (sans valeurs aberrantes) au risque de 5% pour les trois niveaux de concentration de CB6.

Les critères de fidélité que nous nous sommes fixés sur l'ensemble du domaine de validation sont un coefficient de variation de répétabilité (r %) et de fidélité intermédiaire(R %) inférieur à 10%. Les résultats expérimentaux obtenus satisfont les critères retenus, l'analyse est donc répétable et reproductible.

Le Tableau 20 présente la synthèse des essais de fidélité.

	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Valeur théoriques (mg.L ⁻¹)	49,5	84,8	141,4
S _{R intra} (mg.L ⁻¹)	5,0	5,5	12,3
CV _{R intra} (%)	9,9	6,8	8,1

Tableau 20 : Bilan de la fidélité intermédiaire pour les trois niveaux de concentration

2.5 Justesse

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse sera exprimée par le biais exprimé en pourcentage.

N'ayant pas de solution de référence pour ce type de molécules, les biais ont été calculés sur les trois niveaux des essais de fidélité (Tableau 21).

Solutions CB6	1	2	3
Valeurs cibles (mg.L ⁻¹)	49,5	84,8	141,4
Moyennes obtenues (mg.L ⁻¹)	50,6	80,3	151,3
Biais (%)	2,2	5,3	7,0

Tableau 21 : Estimation de la justesse par le calcul du biais

Ces résultats permettent de conclure, dans le domaine de mesure défini, que l'erreur de justesse (ou biais) est inférieure à 10%.

2.6 Limite de détection et de quantification

La limite de détection d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme valeur exacte.

Elle est calculée par la pente de la droite d'étalonnage et l'écart type de l'ordonnée à l'origine par la formule⁴⁹ :

$$LD = \frac{a_0 + 3s_{a0}}{a} \quad (V-8)$$

Avec α_0 l'ordonnée à l'origine
 S_{a0} l'écart type de l'ordonnée à l'origine
 α la pente de la droite

La limite de détection calculée est de 6,1 mg.L⁻¹.

La limite de quantification est la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriées.

Elle est calculée à l'aide de la droite d'étalonnage par la formule⁴⁶ :

$$LD = \frac{a_0 + 10s_{a0}}{a} \quad (V-9)$$

La limite de quantification calculée est de 31,3 mg.L⁻¹.

2.7 Incertitudes

Pour évaluer l'incertitude, il est nécessaire d'analyser le processus de mesure en recensant les sources d'incertitude selon la méthode des 5M (Tableau 22) représentant la Main d'œuvre, la Matière, le Matériel, la Méthode et le Milieu.

Main d'œuvre	Matière	Matériel	Méthode	Milieu
Préparation des réactifs et des échantillons	Echantillons	Balance	Mode opératoire	Sans objet
Détection et intégration des composés	Solution commerciale CB6 et CB7	pipettes		
	Réactifs (eau millipore, acétonitrile, acide formique)	LC-MS		

Tableau 22 : Sources d'incertitudes selon les 5M.

⁴⁹ FEINBERG M., *Techniques de l'ingénieur*, 2001, P224, 1-23.

L'incertitude est quantifiée avec l'approche « GUM » selon la formule de l'incertitude type composée :

$$U_T(C) = \sqrt{U_{\text{échantillon}}(C)^2 + U_{\text{grandeurs}}(C)^2} = \sqrt{U_{\text{échantillon}}(C)^2 + U_A^2 + U_B^2} \quad (\text{V-10})$$

Avec $U_{\text{échantillon}}$ est obtenu par l'écart type de fidélité

U_A Incertitude liée à la partie expérimentale de l'étalonnage

U_B l'incertitude sur les étalons apportée par l'erreur de justesse du matériel

L'incertitude $U_{\text{échantillon}}$ est estimée par le CV_{max} de la fidélité intermédiaire soit dans notre cas de 9,9% correspondant au $CV_{R \text{ Intra}}$ du niveau 1 dans le Tableau 20.

L'incertitude U_A est l'écart type maximal obtenu lors de la répétition de 5 échantillons du même niveau obtenu pour la linéarité, soit de 6,9%.

Enfin l'incertitude U_B a été calculée en prenant la plus grande erreur de justesse du matériel obtenue lors de la préparation des échantillons de la gamme d'étalonnage, soit de 2,5%.

Ainsi on obtient une incertitude relative maximale de :

$$U_T(C) = \sqrt{9,9^2 + 6,9^2 + 1,9^2} = 12,2\% \quad (\text{V-11})$$

Avec k=2 l'incertitude relative élargie est de 24,4%.

2.8 Synthèses des critères de validation

Les différents critères de performance déterminés permettent de valider la méthode de dosage de cucurbiturils par LC-MS-ESI+ par étalonnage interne et les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau 23.

Critères de performance	Résultats obtenus
Domaine de linéarité	De la LD à 169,7 mg.L ⁻¹
Fidélité	CV _r =7,8 % et CV _R =9,9%
Justesse	Biais = 7,0%
Limite de détection et de quantification	LD= 6,1 mg.L ⁻¹ et LQ=31,3 mg.L ⁻¹
Incertitude	U=24,4% (à k=2)

Tableau 23 : Synthèse des critères de performance validés

Les dosages des cucurbiturils mixtes provenant d'une série d'échantillons de synthèses différentes peuvent à présent être réalisés.

2.9 Dosages des CB6Cy[n]

Plusieurs échantillons, provenant des culots de synthèses (Tableau 14), ont été solubilisés dans de l'eau ultra-pure à des concentrations de 2 g.L^{-1} et chaque échantillon a été préparé trois fois.

A partir de la droite d'étalonnage (équation V-5), j'ai calculé la concentration massique du CB6Cy[n] présent dans l'échantillon dilué puis le pourcentage massique sur la totalité de l'échantillon synthétisé, la masse totale étant répertoriée dans le Tableau 14. Les échantillons présentant des concentrations supérieures à la limite de linéarité ont été dilués. Le Tableau 24 ci-dessous résume les concentrations des CB6Cy[n] obtenues en pourcentage massique.

N°	Masse (mg)	CB6	CB6Cy1	CB6Cy2	CB6Cy3	CB6Cy4	CB6Cy5	CB6Cy6
282	6,4	15,9±3,9	15,9±3,9	5,3±1,3	<LD	-	-	-
B	130	5,3±1,3	20,8±5,1	14,6±3,6	<LQ	-	-	-
298	17	4,1±1,0	15,1±3,7	20,1±4,9	5,6±1,4	-	-	-
283	6,5	-	-	<LQ	10,4±2,5	14,7±3,6	<LQ	-
284	15	-	-	-	<LQ	11,7±2,9	11,7±2,9	<LQ
315	80	-	-	-	<LQ	5,4±1,3	4,1±1,0	<LD

Tableau 24 : Pourcentages massiques des CB6Cy[n] dans les différents échantillons (LQ= limite de quantification, LD=limite de détection) avec l'incertitude associée à k=2

En observant ces résultats plusieurs conclusions peuvent être faites. Lors de l'évaluation relative, il avait déjà été constaté que certaines conditions (HCl, temps et température des étapes) étaient nécessaires pour former les CB6Cy[n].

De plus il a été démontré qu'une augmentation de plus de trois équivalents de diéther de cyclohexylglycoluril favorisait la synthèse des CB6Cy[3 à 6]. En effet avec dix équivalents (échantillon 284) le CB6Cy[4] et le CB6Cy[5] se forment majoritairement. Cependant avec

trente équivalents la synthèse du CB6Cy[6] n'est pas favorisée malgré une masse d'échantillon plus importante (80mg). Or la purification du CB6Cy[6] de l'échantillon A ne provenait pas du culot de précipitation mais du surnageant de la dernière étape de synthèse.

Nous en avons donc conclu que ces composés étaient entraînés par l'eau due à une solubilité plus grande. C'est pourquoi pour obtenir préférentiellement les CB6Cy[5 et 6], il a été nécessaire de travailler sur les surnageants à partir de 5 équivalents de diéther de cyclohexylglycoluril. Cela explique également pourquoi les quantités massiques des culots 284 et 315, dans le tableau 24, non pas pu être quantifiées.

Ces pourcentages massiques ont également permis de calculer les rendements de synthèse de chaque CB6Cy[n].

Les rendements (Tableau 25) ont été calculés selon la formule suivante :

$$RDT = \frac{n \text{ produit purifié}}{n \text{ produit limitant}} \quad (\text{V-12})$$

Avec n nombre de moles

	CB6	CB6Cy[1]	CB6Cy[2]	CB6Cy[3]	CB6Cy[4]	CB6Cy[5]	CB6Cy[6]
282	2	1	<1	-	-	-	-
B	2	6	3	-	-	-	-
298	2	7	7	1	-	-	-
283	-	-	-	3	2	-	-
284	-	-	-	-	4	2	-
315	-	-	-	-	10	4	-

Tableau 25 : Rendements de synthèse en pourcentage

En synthèse organique les rendements de synthèse sont indispensables pour déterminer l'efficacité de la synthèse dans le but de l'optimiser.

Ces rendements, relativement faibles, correspondent cependant à ceux trouvés dans la littérature pour ce type de molécule. En effet plusieurs études montrent des rendements de 2% pour la synthèse du CB6* (ou CB6Cy[6]).^{41,50}

⁵⁰ Lee J.W., Samal S., Selvapalam N., Kim H.J, and Kim K., *Acc. Chem. Res.*, **2003**, 36, 621-630.

Après avoir obtenu toutes ces informations, et avant de réaliser les essais en RMN-¹²⁹Xe, il a été nécessaire de déterminer un autre paramètre important : la solubilité des CB6Cy[n]. La préparation de l'échantillon par solubilisation en milieu aqueux est primordiale afin de comparer les essais (réalisés dans les mêmes conditions) et de ne pas obtenir des résultats faussés par la présence d'agrégats. Dans cet objectif j'ai développé une méthode afin de déterminer la solubilité des cucurbiturils mixtes dans l'eau.

2.10 Etude de la solubilité des CB6Cy[n]

Dans la littérature il est décrit que le CB6 a une solubilité très faible dans l'eau d'environ 0,020 mM²⁵ par rapport au CB6Cy[6] qui présente une solubilité de 0,20 M⁴¹.

Pour déterminer la solubilité des CB6Cy[1 à 6] un protocole a été développé de manière à préparer les échantillons en vue être dosés par notre méthode d'étalonnage (LC-MS).

Tout d'abord pour mettre au point ce protocole, les premiers dosages ont été effectués en utilisant la solution commerciale de CB6. Une solution saturée à 0,67 g.L⁻¹ a été préparée dans l'eau ultra-pure, homogénéisée 10 minutes aux ultrasons.

Après une sédimentation de 24 heures le surnageant est centrifugé. Une prise d'essai de 200 µL de surnageant est utilisée pour réaliser le dosage. La solubilité du CB6 a été mesurée à 29 µM dans l'eau. Cette valeur étant relativement proche des données bibliographiques²⁵, ce protocole a été validé pour déterminer la solubilité de nos composés.

Les solubilités des CB6, CB6Cy[1] et CB6Cy[2] obtenues sont présentées dans le Tableau 26. N'ayant qu'une faible quantité de produit (< 5 mg), la solubilité des autres CB6Cy[n] n'a pas pu être mesurée. En effet en préparant la solution du CB6Cy[2], nous nous sommes aperçus qu'il était nécessaire de diluer plus de 6 mg de ce composé dans 100 µL d'eau pour obtenir une solution saturée.

CB[n]	Solubilité (mM)
CB[6]	0,029
CB[6] ²⁴	0,018
CB6Cy[1]	5
CB6Cy[2]	20
CB7 ²⁴	20-30
CB6Cy[6] ³⁸	200

Tableau 26 : Solubilité des cucurbiturils dans l'eau

Les solubilités mesurées permettent donc de confirmer l'influence des groupements cyclohexyles et les résultats connus dans la littérature avec le CB6Cy[6].³⁸ En effet plus ces groupements sont nombreux plus le CB6Cy[n] résultant sera soluble, et ces résultats sont en adéquation avec l'objectif fixé de synthétiser des molécules hydrosolubles. Or d'un point de vue chimique ce résultat est contraire à ce que l'on attendait. En général lorsque l'on ajoute des groupements méthylène (-CH₂) sur une molécule, la solubilité diminue. Cela pourrait s'expliquer par une modification de la structure de la molécule dans l'espace. Nous supposons que l'ajout des cyclohexyles entraîne la réduction de l'ouverture du portail formé par les groupements carbonyles, ce qui favoriserait les interactions hydrogènes entre les atomes d'oxygène du portail et l'eau.

3. Conclusion

Dans l'objectif de développer de nouvelles molécules cages hydrosolubles capables d'encapsuler le xénon, j'ai mis au point une méthode capable de caractériser, de purifier, et de quantifier six cucurbiturils différents : les CB6Cy[1] à CB6Cy[6]. Ces séparations ont été réalisées par HPLC sur colonne phényl avec un gradient constitué d'eau et d'acétonitrile et par une détection MS-ESI+.

Les différentes analyses effectuées ont démontré que les synthèses réalisées entraînent la formation de matrices complexes perturbant certaines séparations, en particulier pour la purification du composé CB6Cy[4]. Des essais sur d'autres phases greffées (de types Luna PFP Phenomenex ou Synergi Fusion-RP) ont été menés pour le séparer du CB5Cy[4] mais aucun résultat à ce jour n'a été concluant.

Le développement de la méthode de dosage par étalonnage interne a été validé selon les critères de performance requis. Cette technique de dosage a permis de quantifier les CB6Cy[n] synthétisés mais également de déterminer les rendements de synthèse sur une série d'échantillons variés. Grâce à ces résultats, les conditions de synthèse ont été optimisées et ont permis de favoriser la réaction vers la formation d'un type de cucurbiturils mixtes CB6Cy[n] majoritaires.

Cette méthode a également démontré que les cucurbit[6]urils mixtes présentent des solubilités dans l'eau très supérieures au CB6, critère déterminant pour la réalisation d'essais in vivo. Des expérimentations de RMN-¹²⁹Xe, réalisées par l'équipe de Gaspard Huber au CEA de Saclay, sont nécessaires pour étudier leur capacité d'encapsulation. Les premiers résultats permettent déjà de conclure à un déplacement chimique spécifique de chaque CB6Cy[n] (entre 110 et 120 ppm) et feront l'objet d'une prochaine publication.

VI. LES CRYPTOPHANES

Ce chapitre, concerne l'étude d'un autre type de molécule cage : les cryptophanes (Figure 56). Comme nous l'avons présenté au paragraphe II.4, ils possèdent une cavité intérieure hydrophobe, comme pour les cucurbiturils, capable d'encapsuler des petites molécules organiques.

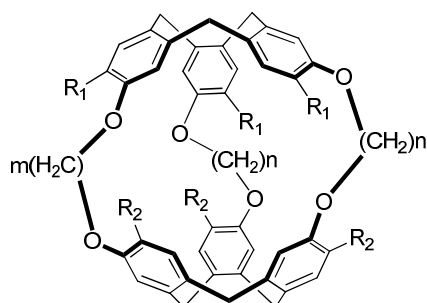


Figure 56 : Structure générale des cryptophanes

Parmi les cryptophanes synthétisés, le plus petit cryptophane, appelé cryptophane-111 ($n = 1$ $m = 1$, $R_1 = R_2 = H$), obtenu par l'équipe de Jean-Pierre Dutasta et Thierry Brotin⁵¹ est celui qui possède à ce jour, la plus grande affinité pour le xénon. Parmi ses nombreux homologues, le SCBM a contribué au développement de nouveaux cryptophanes hydrosolubles et fonctionnalisés. Le but de ces recherches est d'une part de réduire les étapes de synthèses et d'autre part de développer des cryptophanes présentant une taille et une fonctionnalisation les mieux adaptées pour encapsuler le xénon. En effet, à l'issue de ces synthèses, différentes biosondes xénon ont été conçues pour des applications biologiques comme par exemple pour la détection du peroxyde d'hydrogène responsable du stress oxydant.⁵²

Des études de toxicité ont été réalisées en 2008 par l'équipe de Dmochowski⁵³ sur des cryptophanes porteurs d'une séquence peptidique. Elles ont montré l'absence de toxicité de ces molécules et la possibilité de les internaliser dans les cellules, à des concentrations convenables pour la RMN-¹²⁹Xe ($\sim \mu M$).

⁵¹ Fairchild R.M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15505–15507.

⁵² Traoré Ténin, Thèse de doctorat : Université Paris XI (Orsay), **2011**, 181 pages.

⁵³ Seward G. K. *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2129.

J'ai donc étudié différents cryptophanes (et biosondes) et plusieurs objectifs d'étude ont été définis. Tout d'abord, il a été démontré que les cryptophanes existaient sous deux configurations « syn » et « anti » et que cette dernière était chirale. Nous avons donc étudié le cryptophane-211, récemment synthétisé, dans le but de connaître sa configuration.

Le deuxième objectif a été de caractériser et de purifier deux nouvelles biosondes xénon. La première est une sonde bimodale permettant une double détection en RMN proton et xénon. La deuxième est une sonde (biosonde NTA) capable de détecter et de localiser des cations métalliques de types Cu^{2+} , Zn^{2+} ...

La structure de ces différentes sondes met en jeu différentes interactions. Ainsi le but est de pouvoir déterminer, pour chacune de ces molécules, les conditions optimales de séparation pour les purifier. Pour cela nous avons mis au point différentes méthodes chromatographiques, en utilisant différents modes de détection (UV, SM, DEDL....) ainsi que différentes phases stationnaires. A la différence des cucurbiturils, ces macromolécules sont constituées de noyaux aromatiques, donc de liaisons π conjuguées, permettant une détection UV.

Une première partie présentera l'étude de la chiralité du cryptophane-211 puis une deuxième partie développera la caractérisation et la purification des deux biosondes synthétisées.

1. Caractérisation du cryptophane-2.1.1

Huber *et al.*⁵⁴ ont démontré que la taille de la cavité du cryptophane jouait un rôle important sur les interactions du xénon dans la cage. Par exemple le cryptophane-111 présente une plus grande constante d'affinité pour le xénon mais le cryptophane-222 un taux d'échange plus élevé. Ainsi dans le but d'optimiser les biosondes xénon, de nombreux cryptophanes homologues ont été synthétisés.

En effet en 2011, une équipe du service¹⁸ a synthétisé deux nouveaux cryptophanes (211 et 221) capables d'encapsuler le xénon hyperpolarisé. Mon travail a été de démontrer si les molécules cages formées étaient de configuration *syn* ou *anti* comme nous l'avons présenté au paragraphe II.4 sur la Figure 5.

⁵⁴ Huber G. *et al.*, *J Phys Chem A.*, **2008**, 112, 11363-72.

1.1 Synthèse et structure

Les cryptophanes sont synthétisés à partir d'une méthode multi-étapes nécessitant deux unités de cyclotrivérratrilène (CTV) sous forme racémique (Figure 57).

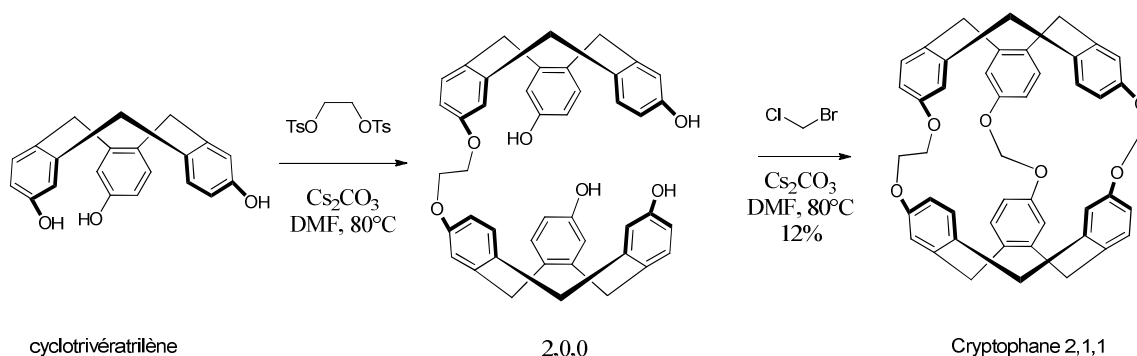


Figure 57 : Synthèse du cryptophane-2.1.1

La chiralité du CTV entraîne la formation de deux cryptophanes de configuration *syn* et *anti* (Figure 58). Si deux unités CTV identiques sont jointes entre elles, on obtiendra un cryptophane *anti*. Dans le cas où les deux CTV sont énantiomères, le cryptophane *syn* est obtenu. Seule la forme *anti* est chirale et les deux énantiomères peuvent être séparés en HPLC chirale.

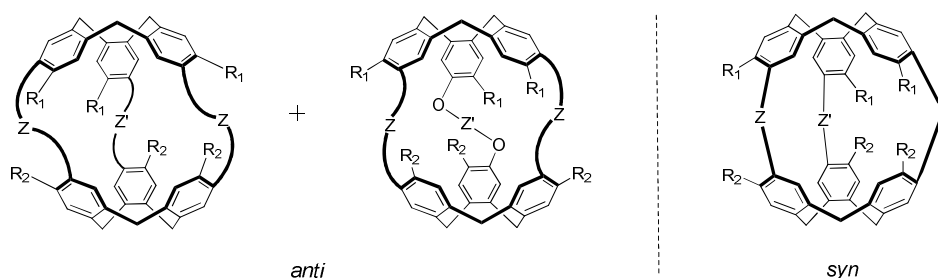


Figure 58 : Configuration *anti* et *syn* du cryptophane

1.2 Caractérisation HPLC Chirale

Afin de vérifier la configuration (*syn* ou *anti*) du cryptophane-211 une méthode permettant de séparer les énantiomères a été développée par l'utilisation d'une technique séparative LC-UV constituée d'une phase stationnaire chirale et d'un solvant d'éluion apolaire car les

cryptophanes sont solubles dans les solvants organiques de type dichlorométhane, tétrahydrofurane (THF), diméthylsulfoxyde (DMSO), acétonitrile...

Le principe de l'HPLC chirale décrit au paragraphe « La chromatographie chirale » (IV.2.1.1b) est basé sur la formation de diastéréoisomères et donc la présence de deux pics sur le chromatogramme pourra signifier soit :

- La présence racémique du cryptophane sous les 2 configurations *anti* et *syn*
- La présence des deux énantiomères de la forme *anti*.

1.2.1 Choix de la colonne

En 2007 Fogarty *et al.*³⁷ ont séparé le cryptophane-111 *anti* en HPLC chirale par détection UV sur une colonne Pirkle (S,S) Whelk-O1 (Figure 59) avec le mélange 6:4 hexane/Tétrahydrofurane comme éluant ($1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Les deux pics correspondant aux énantiomères ont été observés à 12,62 et 13,708 min à 230 nm.

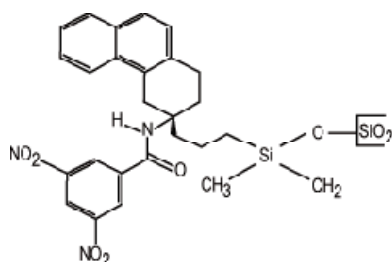


Figure 59 : Structure du greffon colonne type « Pirkle » Whelk-O1

En se basant sur cette étude, les premiers essais ont été réalisés sur des colonnes de même type « Pirkle » : ULMO (SS et RR) REXCHROM de dimension 25 cm x 4,6 mm possédant des particules de $5 \mu\text{m}$ de diamètre (Figure 60).

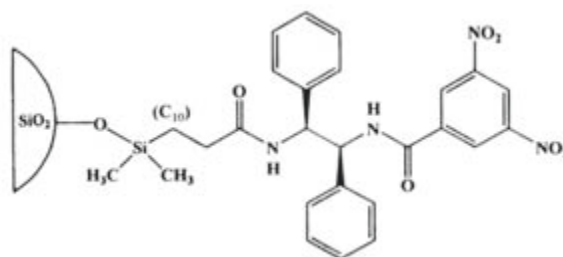


Figure 60 : Structure du greffon colonne ULMO

1.2.2 Choix des solvants

L'échantillon contenant le cryptophane-211 a été solubilisé dans l'acétonitrile.

Suite à des travaux antérieurs, des mélanges d'hexane et de dichlorométhane facilitant la solubilisation du cryptophane ont été testés. Une longueur d'onde de 240 nm a été choisie pour que la macromolécule absorbe sans être dans le cut-off du solvant (de 233 nm pour le dichlorométhane). Aucune élution du composé n'a été observée dans ces conditions malgré des essais avec un fort pourcentage de dichlorométhane. Ainsi les solvants ont été changés par du pentane et de l'isopropanol, ce dernier étant plus polaire que le dichlorométhane. Après plusieurs essais en faisant varier le pourcentage d'éluant, j'ai réussi à obtenir deux pics identiques de mêmes intensités à 28,6 et 31,7 min (Figure 61) dans les conditions suivantes :

- Colonne (S,S) Ulmo 25 cm x 4,6 mm 5 μm
- 75/25 Pentane/Isopropanol, en mode isocratique
- 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- 240 nm (UV)
- Volume d'injection 20 μL

La chaîne HPLC utilisée est de type Hewlett Packard série 1050.

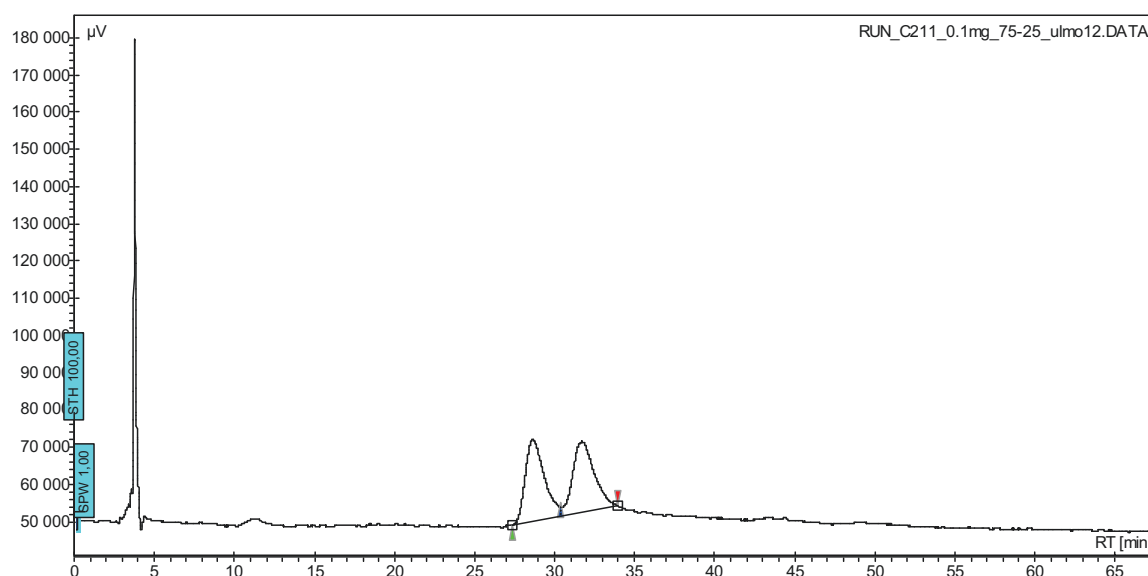


Figure 61 : Chromatogramme du cryptophane 211 à 240 nm

Pour tenter d'optimiser cette séparation, l'échantillon a été injecté sur la colonne ULMO RR dans les mêmes conditions mais des pics moins résolus et de plus faibles intensités ont été obtenus.

Pour vérifier que les deux pics correspondaient aux énantiomères de la forme *anti*, nous avons collaboré avec Emmanuelle Shultz *et al.* de l'université Paris sud équipée d'une chaîne HPLC couplée à un détecteur de dichroïsme circulaire. Les essais ont été réalisés sur cet appareillage dans les conditions mises au point ci-dessus et ont confirmé la forme *anti* par la présence de deux pics identiques de signe opposé (Figure 62).

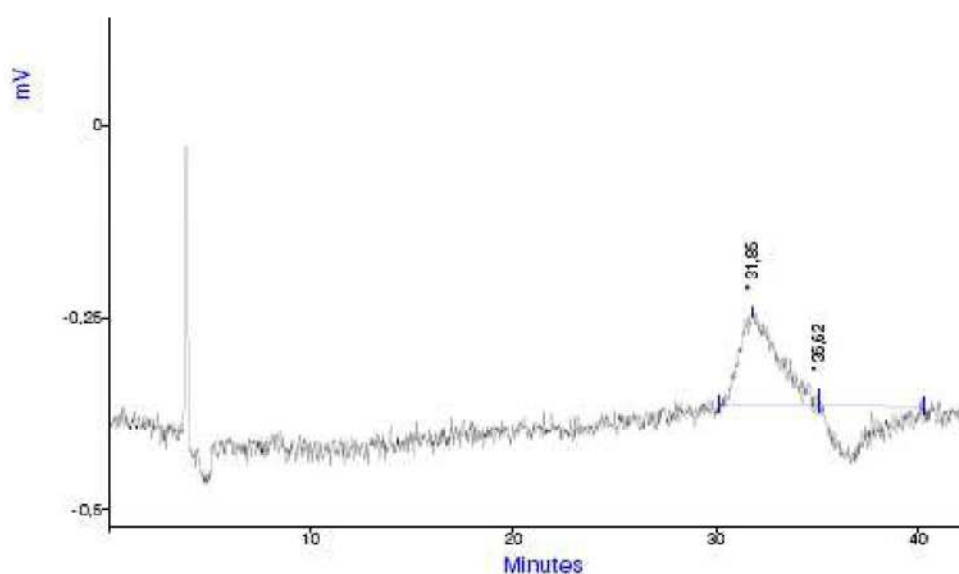


Figure 62 : Chromatogramme du cryptophane-211 par dichroïsme circulaire

L'étude sur le cryptophane-221 a confirmé de manière identique la synthèse sous sa forme *anti*.

Pour conclure, cette étude a démontré que la synthèse effectuée par les organiciens permettait de former les cryptophanes uniquement sous la forme *anti*. Des essais réalisés en RMN-¹²⁹Xe sur les cryptophanes-211 et 221 ont montré des propriétés d'encapsulation encourageantes et prometteuses conduisant à la synthèse de nouvelles biosondes xénon décrites dans le chapitre suivant.

2. Caractérisation et purification de biosondes

En collaboration avec les organiciens, j'ai travaillé sur deux biosondes xénon :

- la biosonde bimodale
- la biosonde NTA

Pour chacun d'elle, une méthode a été développée afin de la caractériser (ou un des éléments la constituant comme le cryptophane ou le ligand) en vue de la purifier en utilisant la même démarche analytique réalisée sur les cucurbiturils en LC-MS.

Ce chapitre fera donc l'objet d'une synthèse des méthodes optimisées et des résultats obtenus sur ces deux biosondes.

2.1 La biosonde bimodale

La biosonde bimodale représentée sur la Figure 63 a été développée pour des applications médicales par IRM en utilisant deux types d'agents de contrastes : le gadolinium et le xénon ^{129}Xe hyperpolarisé. Le gadolinium sera chélaté dans la partie terminale de la sonde (ligand) et le ^{129}Xe dans le cryptophane. Cette double détection permettra d'augmenter d'une part la sensibilité de l'IRM mais également par l'intermédiaire d'un bras fonctionnalisé de pouvoir localiser la cellule imagée dans l'organisme en fonction de sa reconnaissance avec une cible biologique spécifique.

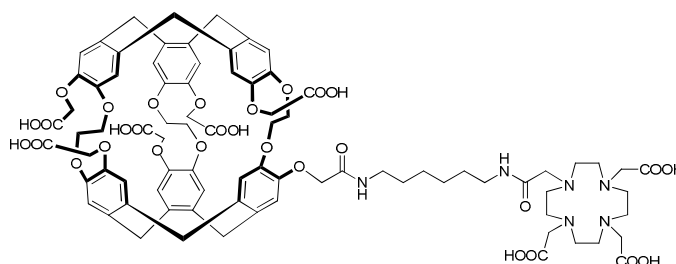


Figure 63 : Structure de la biosonde bimodale

2.1.1 Synthèse et structure

Cette biosonde est constituée d'un cryptophane-222 ($n=m=2$) et de groupements carboxyliques ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) en position R (Figure 64). Le ligand est couplé au cryptophane

par l'intermédiaire d'un bras espaceur constitué d'une chaîne de dix atomes de carbone possédant aux deux extrémités deux fonctions amides. Le cryptophane et le ligand sont synthétisés d'une manière indépendante puis assemblés par couplage peptidique.

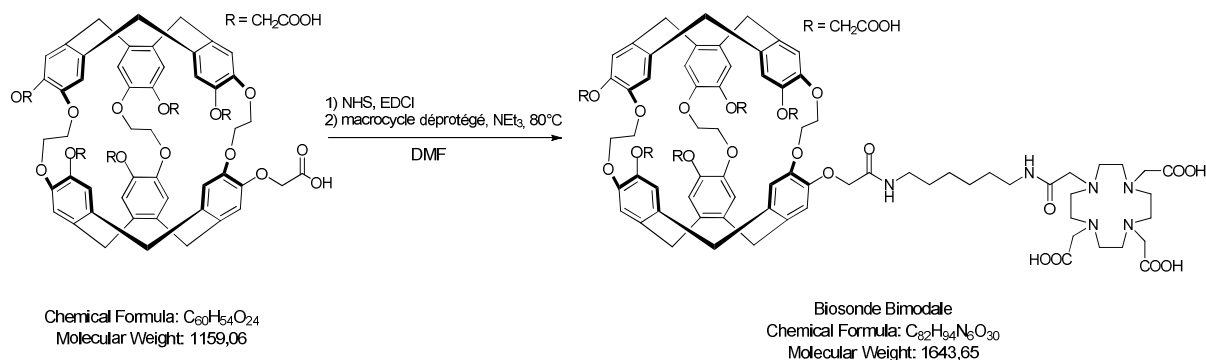


Figure 64 : Synthèse de la biosonde bimodale

La fonction acide carboxylique est fortement polaire et donneur-accepteur de liaisons hydrogène. Le rôle de ces groupements positionnés sur le cryptophane et sur le ligand est de rendre la biosonde hydrosoluble.

2.1.2 Caractérisation et purification de la biosonde bimodale

Ainsi à partir d'une première synthèse, cette biosonde a été caractérisée et isolée en LC-MS (Figure 65) avec les conditions suivantes :

- colonne analytique phényl xbridge Waters® (4,6 x 100 mm et des particules de 3,5 μm de diamètre)
- débit de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ et injection de 20 μL
- gradient de 30 minutes « long75-65 » (annexe 5) en eau/acétonitrile
- détection MS-ESI+/UV/DEDL.

Le même programme de masse sera utilisé pour toute l'étude des cryptophanes avec une tension capillaire de 3,2 kV et une tension de cône de 20 V, les autres paramètres étant identiques au programme « cucurbituril » du Tableau 3.

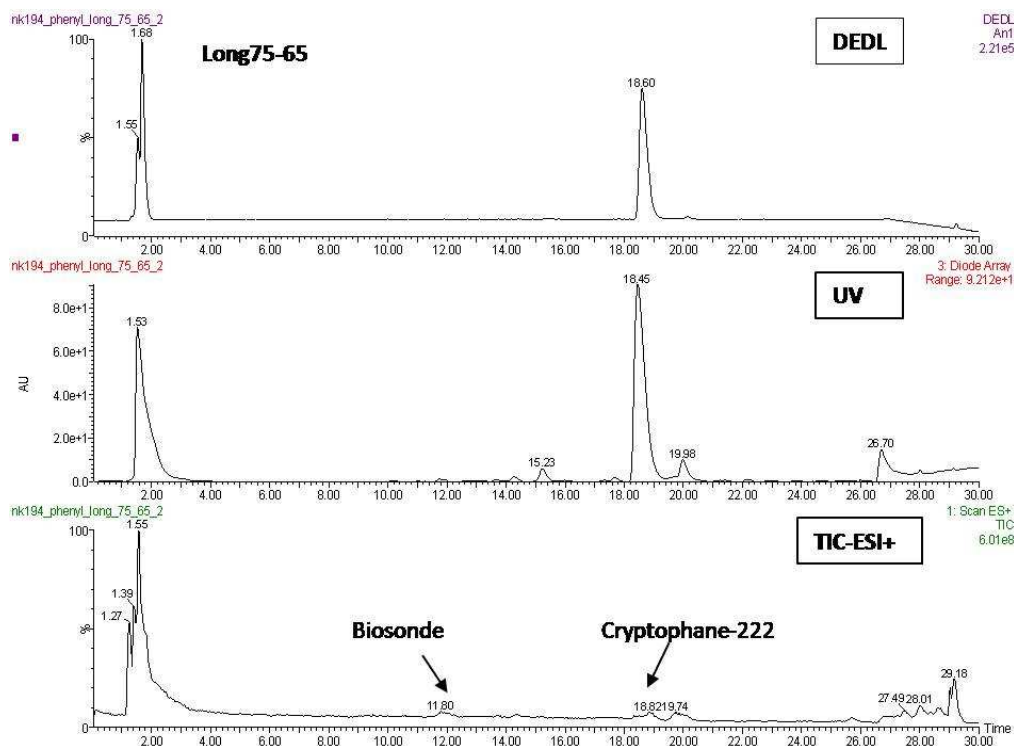


Figure 65 : Chromatogrammes TIC MS-ESI+/UV/DEDL de la biosonde

Dans ces conditions une bonne séparation a été obtenue (Figure 65), avec un Tr à 11,8 minutes pour la biosonde ($[M+2H]^{2+} = 822$) et de 18,8 minutes pour le cryptophane-222 de départ ($[M+H]^+ = 1159$).

Ces résultats ont permis de réaliser la purification de la biosonde par détection MS-ESI+ dans les conditions suivantes :

- colonne préparative phényl xbridge Waters (19 x 150 nm OBD de particules de 5 µm de diamètre)
- débit : 17 ml.min⁻¹
- gradient « long75-65 » en eau/acétonitrile sur 32 minutes
- détection et recueil des fractions par MS-ESI+

Après concentration et lyophilisation des fractions récoltées, le produit final est pesé et le rendement de synthèse est calculé selon la formule de l'équation V-12.

Au final, 2 mg de biosonde ont été obtenus avec un rendement de synthèse de 2,8%.

Etant donné la prédominance du cryptophane de départ sur le chromatogramme (UV et DEDL), ces résultats étaient prévisibles et prouvent que la réaction présente un rendement de synthèse très faible.

N'ayant pas de doute sur la pureté du cryptophane-222, seul le ligand a été remis en cause amenant les organiciens à réaliser une nouvelle synthèse de ce produit.

A la suite de cela, l'optimisation d'un nouveau développement de méthode a été nécessaire pour purifier ce nouveau ligand pour être de nouveau couplé au cryptophane-222.

2.1.3 Caractérisation et purification du ligand HPLC HILIC

Le ligand présenté sur la Figure 66 est un macrocycle constitué de groupements carboxyliques et d'une amine primaire rendant ce composé très polaire.

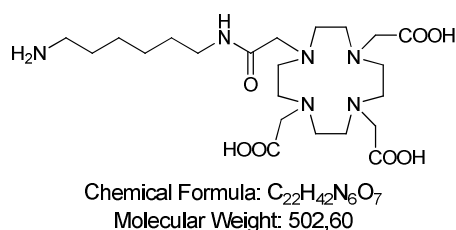


Figure 66 : Ligand de la biosonde bimodale

Ce composé hydrophile polaire présentant une rétention trop faible sur les colonnes de type C_{18} , nous a conduits à l'utilisation d'une colonne à interactions hydrophiles (HILIC).

Pour rappel, basé sur le principe de l'HPLC de partage en phase normale, ces colonnes sont constituées d'une phase stationnaire polaire à base de silice mais ayant la particularité d'être utilisable avec de l'eau (principe décrit au paragraphe IV.2.1.2) et d'être compatible avec notre système LC-MS préparative.

a. Optimisation LC-MS

Après optimisation de la méthode, une bonne séparation a confirmé le choix du gradient « long0-40 » facilement transposable sur la LC-Préparative.

Le chromatogramme sur la Figure 67 montre un Tr du ligand de 18,9 minutes avec les conditions analytiques suivantes :

- colonne analytique HILIC xbridge Waters® (4,6 x 150 mm de particules 3,5 µm de diamètre lot 0101383301)
- débit de 1 ml.min⁻¹ et injection de 20 µL
- gradient de 30 minutes « long0-40 » (annexe 5) en eau/acétonitrile
- détection MS-ESI+/UV/DEDL.

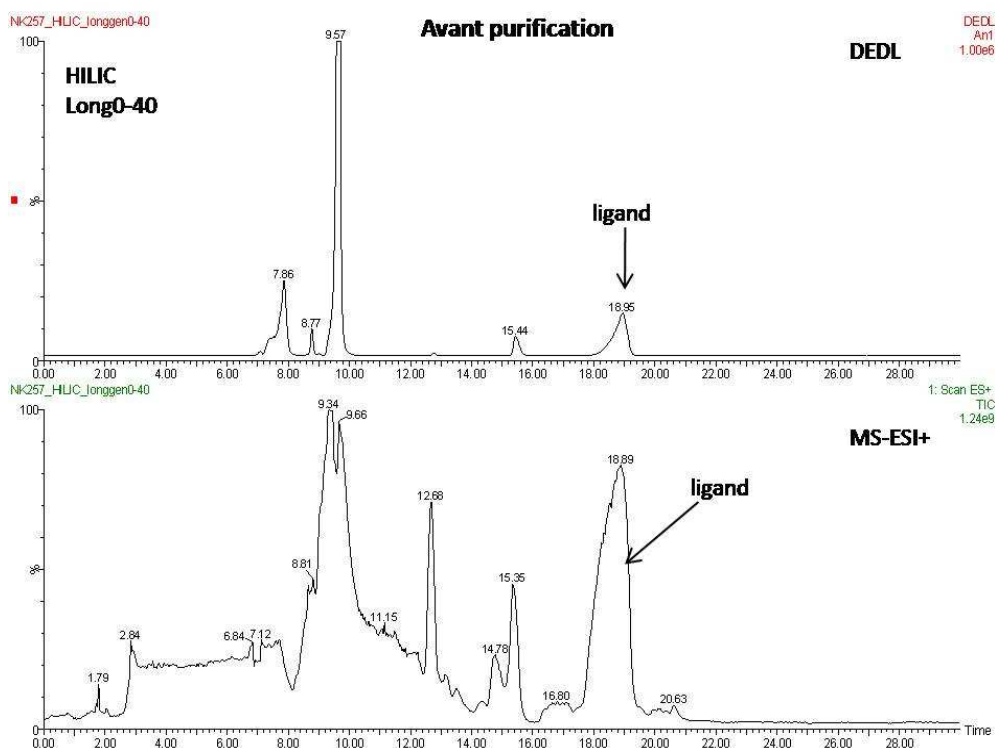


Figure 67 : Chromatogrammes ESI+ et DEDL du ligand avant la purification

La vérification de la pureté du pic du composé par le spectre de masse sur la Figure 68, confirme l'absence d'impuretés et validant le choix de ces conditions pour réaliser la purification.

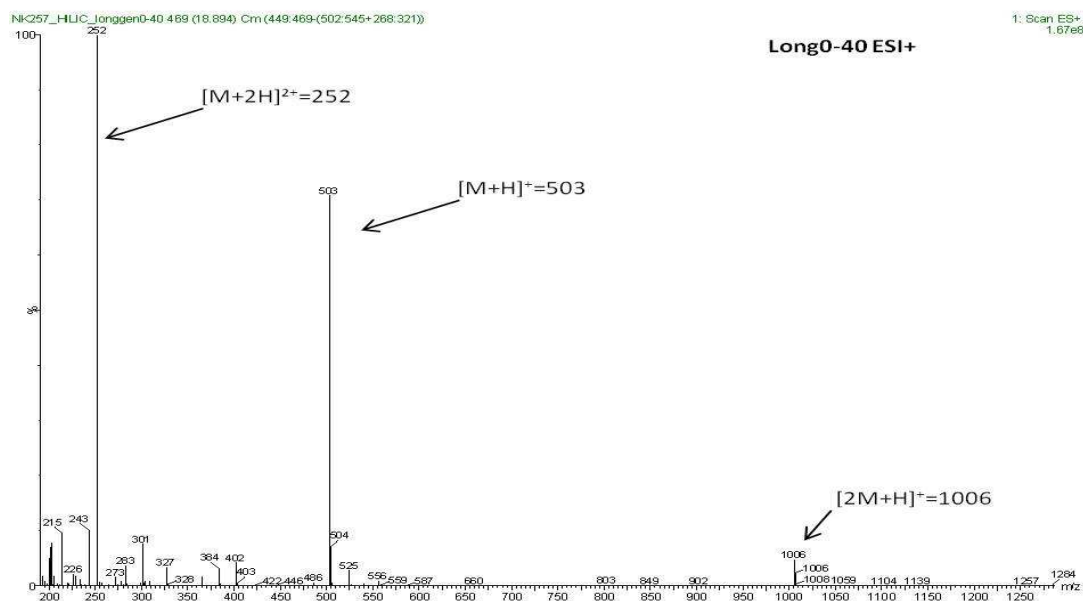


Figure 68 : Spectre de masse du ligand $t_r=18,9$ min.

b. Purification du ligand

Après réalisation des calculs de transposition, l'échantillon de 241 mg contenant le ligand est dissous dans un volume de 0,5 mL d'eau ultra-pure.

La purification est réalisée dans les conditions suivantes :

- colonne préparative HILIC (19 x 250 mm avec des particules de 5 μ m de diamètre lot 0102190681)
- gradient « Long0-40 prep » en eau/acétonitrile de 32 minutes
- débit 17 ml.min⁻¹
- détection et recueil des fractions par MS-ESI+.

Les fractions récoltées ont été concentrées, lyophilisées et 20 mg de produit final a été obtenu avec un rendement de synthèse de 21%.

Une vérification de la purification a été réalisée par une analyse en LC-MSESI+/DEDL sur la Figure 69 faisant apparaître notre produit de façon très majoritaire comparé aux chromatogrammes Figure 68 avant la purification. De plus une analyse RMN-1H (Figure 96 en annexe 7) a confirmé la pureté très satisfaisante du ligand pour poursuivre la synthèse.

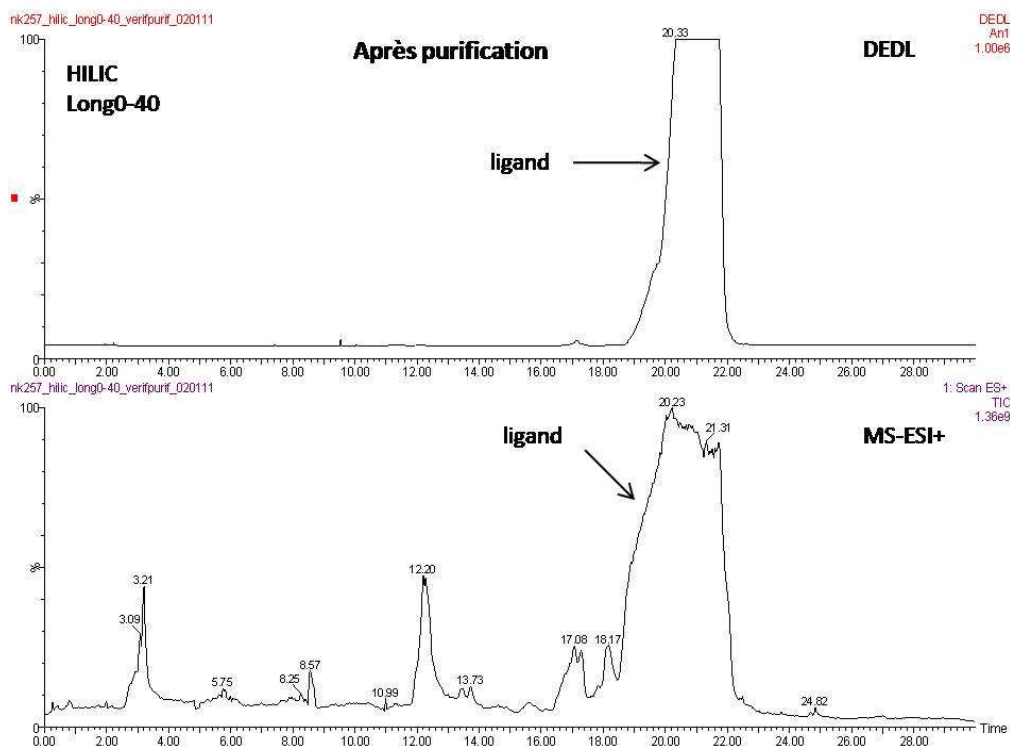


Figure 69 : Chromatogrammes ESI+ et DEDL du ligand après la purification

Une nouvelle biosonde bimodale a pu ainsi être à nouveau synthétisée dans le but d'obtenir un meilleur rendement de synthèse.

2.1.4 Caractérisation et purification de la biosonde bimodale n°2

Ce nouveau développement de méthode a été optimisé avec une colonne C₁₈ et un gradient non linéaire afin de s'affranchir d'une impureté contigüe à la biosonde n°2 dans les conditions suivantes :

- Colonne C₁₈ Xbridge (19 x 150 mm avec des particules de diamètre 3,5 µm lot 12739104106)
- Débit 1 ml/min
- Gradient « long 85-75-70 » en eau/acétonitrile de 30 minutes (annexe 5)
- Détections MS-ESI+/UV

Le chromatogramme obtenu dans ces conditions représenté sur la Figure 70 montre un Tr de la biosonde de 17,9 minutes.

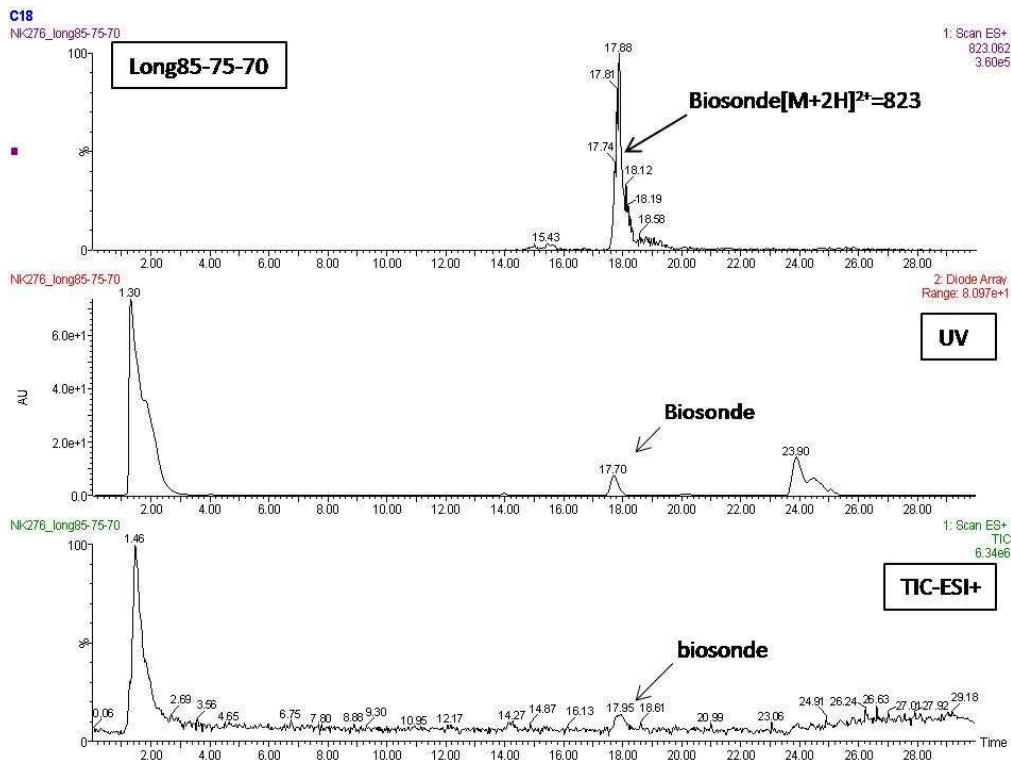


Figure 70 : Chromatogrammes TIC MS-ESI+/UV de la biosonde en long85-75-70

Cette optimisation a été confirmée par le spectre de masse très propre du pic correspondant à la biosonde sur la Figure 71.

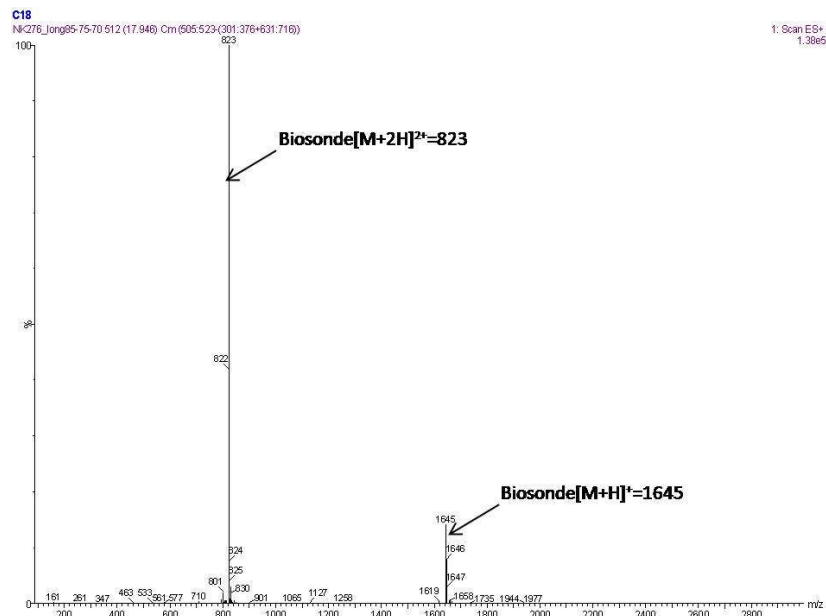


Figure 71 : Spectre de masse de la biosonde à partir du chromatogramme long85-75-70

L'échantillon de 19 mg a été solubilisé dans 0,7 mL de diméthyl sulfoxyde (DMSO 99,9% Sigma Aldrich) et la purification a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Colonne Préparative C₁₈ OBD Xbridge (19 x 150 mm de particules 5 µm de diamètre lot 172130078)
- Débit 17 ml.min⁻¹
- Gradient « long 85-75-70prep » en eau/acétonitrile sur 32 minutes
- Détections MS-ESI+/UV

Après concentration et lyophilisation des fractions récoltées nous avons obtenu 3 mg de produit final et 14% de rendement de synthèse. Ces résultats montrent l'importance de la pureté des produits dans les différentes étapes de synthèse. En effet le couplage du ligand purifié sur le cryptophane a permis d'augmenter fortement le rendement de synthèse de 2 à 14%.

La pureté de la biosonde a été évaluée en réalisant tout d'abord une analyse RMN-1H (Figure 97 en annexe 7) confirmant l'absence de protons pouvant provenir d'éventuelles impuretés. Puis une deuxième analyse par RMN-¹²⁹Xe (Figure 98 en annexe 7) a été effectuée confirmant l'absence du cryptophane de départ. En effet si le produit est pur le spectre RMN-¹²⁹Xe ne fera apparaître que deux pics, celui du xénon libre et celui du xénon encapsulé dans la biosonde.

Les premiers essais de la double détection (proton et xénon) permettront de donner des informations essentielles sur les qualités fonctionnelles de cette biosonde bimodale. Cependant ces résultats ont amenés les chercheurs à tester d'autres agents de contrastes (pour la RMN-1H) car celui-ci entrainerait la dépolarisation du xénon.

2.2 La biosonde NTA

L'objectif de la synthèse de cette biosonde (Figure 72) est d'en faire un capteur capable de quantifier les cations métalliques (Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺...) de l'organisme *in situ* et en temps réel par IRM-¹²⁹Xe.

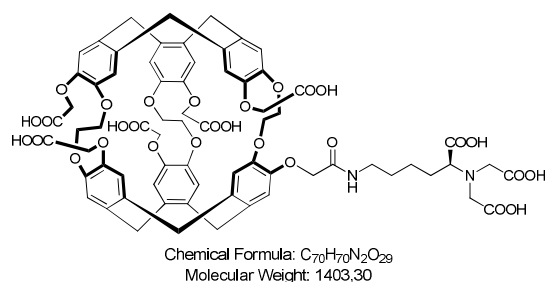


Figure 72 : Biosonde NTA

En effet la détection des ions comme Cu²⁺ est essentielle pour diagnostiquer le plus tôt possible des pathologies comme par exemple la maladie de Wilson caractérisée par une accumulation de cuivre dans les tissus. La détection des cations métalliques par RMN-¹²⁹Xe impliquerait un déplacement chimique spécifique selon la nature du cation chélaté ou pas.

2.2.1 Synthèse et structure

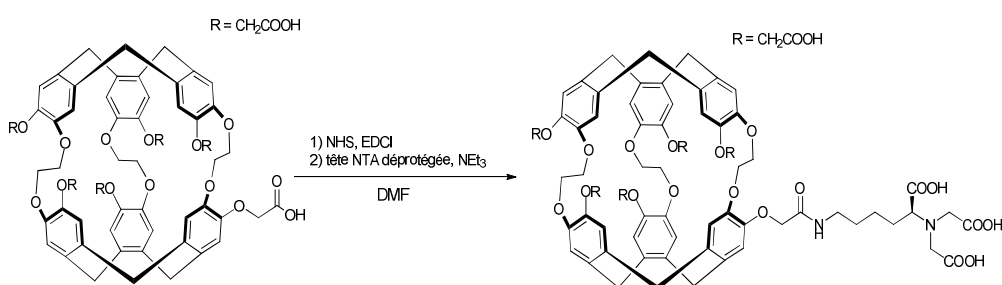


Figure 73 : Synthèse de la Biosonde NTA

La biosonde NTA (nitrilo-triacétique) possède une structure identique à celle de la biosonde bimodale (avec cryptophane-222 et R = CH₂-COOH) avec pour différence la nature du ligand. Il est formé de 3 fonctions carboxyliques liées par un atome d'azote (Figure 73) et il est obtenu à partir de la L-Lysine commerciale d'une pureté supérieure à 98%. La synthèse à partir du cryptophane-222 chiral de configuration *anti* (+ et -) et le ligand optiquement pur (L) entrainera la formation d'une biosonde NTA sous la forme de deux diastéoisomères de « L(+) » et « L(-) ».

2.2.2 Caractérisation et purification de la biosonde NTA

La structure de cette biosonde met en jeu les mêmes types d'interactions que la biosonde bimodale et l'optimisation a été réalisée selon les conditions suivantes :

- Colonne analytique phényl Xbridge (4,6 x 100 mm - 3,5 μm)
- Débit : 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ Injection analytique 20 μL
- Gradient « long85/65 » en eau/acétonitrile de 30 minutes (annexe 5)
- Détections : SM-ESI/UV/DEDL.

Le chromatogramme sur la Figure 74 montre la séparation obtenue dans ces conditions avec un T_r de la biosonde à 24,6 minutes.

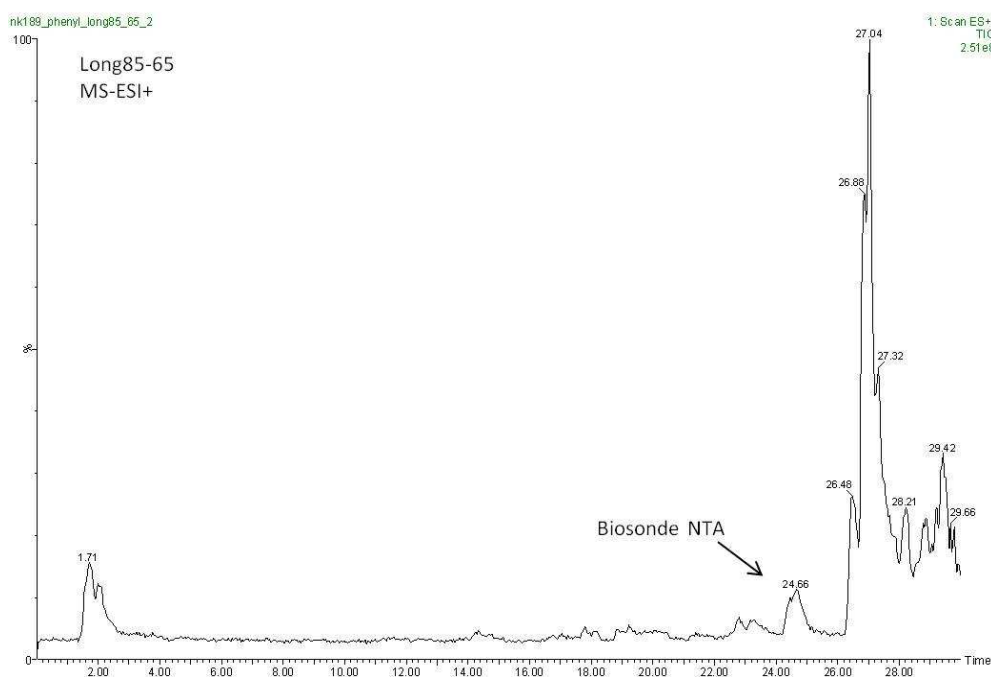


Figure 74 : Chromatogramme TIC-MS-ESI+ biosonde NTA dans les conditions optimisées

L'échantillon de 30 mg a été solubilisé dans 0,5 mL de DMSO et la purification a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Colonne préparative phényl XBRIDGE (19 x 150 nm OBD – 5 μm)
- Débit : 17 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Gradient « long85/35prep » en eau/acétonitrile de 32 minutes (annexe 5)
- Détections : SM-ESI/UV/DEDL.

Grâce à cette optimisation 8,6 mg de biosonde purifiée ont été obtenus avec un rendement de synthèse de 35,5%.

Les analyses RMN-1H et RMN-¹²⁹Xe (Figure 99 et Figure 100 en annexe 7) ont confirmé la qualité de la purification et ont permis de réaliser de nombreux essais sur des cations métalliques. Les premiers résultats montrent que la biosonde détecte certains cations comme le Co²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ et le Zn²⁺. D'autres essais ont démontré que la détection du Zn²⁺ en RMN-¹²⁹Xe est quantitative car la surface du pic est proportionnelle à la concentration en cations. Le spectre RMN-¹²⁹Xe (Figure 75) montre que l'ajout de zinc permet de mettre en évidence la présence des diastéréoisomères de la biosonde NTA (en bleu) ayant chélaté les cations ainsi que la différence de déplacement chimique avec la biosonde libre.

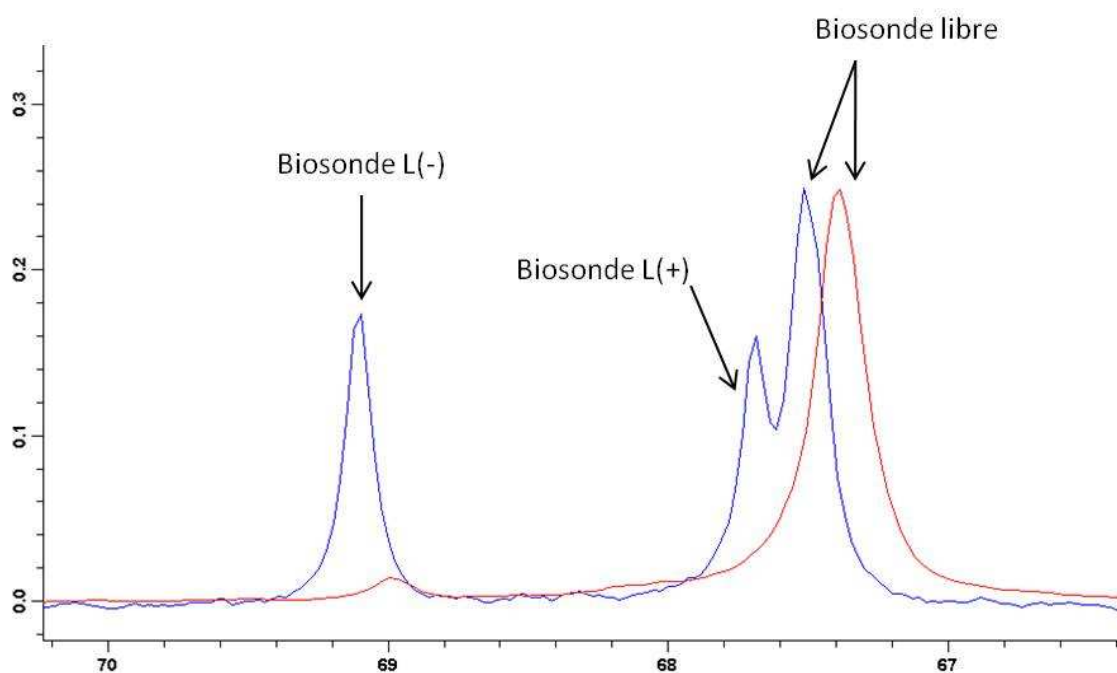


Figure 75 : Spectres RMN-¹²⁹Xe biosonde NTA (seule en rouge et après ajout de zinc en bleu)

Enfin il semblerait que le déplacement chimique soit en plus spécifique d'un cation à l'autre, mais d'autres essais devront être encore réalisés pour quantifier cet aspect.

Ces résultats menés par Kotéra N. pour la synthèse et Bertault P. pour la partie xénon seront prochainement publiés.

3. Conclusion

Dans ce chapitre j'ai étudié différents cryptophanes synthétisés dans le service et plusieurs objectifs ont été atteints. Ainsi deux biosondes issues de synthèses à base d'un cryptophane-222 fonctionnalisé et hydrosoluble ont été purifiées par LC-MS sur des colonnes hydrophobes (phényl et C₁₈).

La première biosonde bimodale purifiée, issue d'un brut de synthèse, a permis de mettre en évidence un faible rendement de synthèse de 2,8%. **Pour optimiser cette synthèse, nous avons donc jugé nécessaire de purifier chaque partie de la biosonde (cryptophane, et ligand).** Le ligand nouvellement synthétisé de nature très polaire a été purifié sur une colonne HILIC. Nous avons alors obtenu 20 mg de ligand pur avec 21% de rendement de synthèse. A la suite de cela, celui-ci a été de nouveau couplé au cryptophane-222. La nouvelle biosonde a été ensuite purifiée sur phase C₁₈. **Cette nouvelle démarche a ainsi permis d'améliorer le rendement de synthèse de 2,8 à 14%.**

Des essais en RMN-¹²⁹Xe ont été réalisés sur cette biosonde, entraînant une discussion sur le choix de l'agent de contraste pour la RMN du proton. En effet les premiers résultats n'ont pas été concluants avec les lanthanides car la présence du gadolinium entraîne la dépoliarisation du ¹²⁹Xe.

La deuxième biosonde NTA a été synthétisée à partir du cryptophane-222 couplé avec un ligand (L-Lysine) commercial, optiquement pur. **Dans la même démarche analytique, cette biosonde a été purifiée sur phase Phényl et 8,6 mg de celle-ci ont été obtenus avec un rendement de synthèse de 35,5%.** Les analyses en RMN-¹²⁹Xe ont montré des résultats très intéressants et prometteurs pour la détection et la quantification de cations métalliques comme le zinc (Zn²⁺). En effet ils ont permis de mettre en évidence la sélectivité de la technique, par des déplacements chimiques différents, spécifiques selon le cation. De plus nous avons démontré la configuration *anti des* cryptophanes utilisés lors de ces synthèses, par séparation des énantiomères en HPLC chirale (colonne Pirkle-ULMO SS / détection UV confirmé par dichroïsme circulaire). L'analyse des spectres RMN a également révélé la présence de deux signaux : Ils correspondent aux diastéréoisomères de la biosonde chélatant les cations métalliques. **Il serait intéressant de purifier la forme L(-) (figure 75) présentant le déplacement chimique le plus éloigné de la forme libre, pour quantifier de manière optimale le cation considéré.**

VII. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce mémoire était de caractériser et de purifier des molécules cages de type cryptophane et cucurbituril pour des applications biologiques et médicales en IRM. La synthèse et la modification chimique (fonctionnalisation) de ces molécules ont pour objectif d'en faire des biosondes xénon hydrosolubles. En effet, ces molécules, capables d'encapsuler le xénon, montrent des différences structurales impactant sur leur affinité vis-à-vis du xénon et leur solubilité. Malgré ces différences, nous avons pu utiliser une méthode analytique commune permettant leur séparation : la chromatographie liquide haute performance couplé à la spectrométrie de masse.

Ainsi dans une première partie sur l'étude des cucurbiturils, une méthode séparative a été développée permettant d'identifier et de purifier les cucurbiturils mixtes (CB6Cy[n] avec $n = 1$ à 6). Ensuite, en réalisant une validation de méthode par un étalonnage interne, nous avons pu quantifier ces cucurbiturils mixtes permettant d'une part, d'optimiser la synthèse et d'autre part de mesurer leur solubilité dans l'eau. Les résultats obtenus ont montré l'intérêt du greffage des groupements cyclohexyles sur ces molécules, améliorant fortement leur solubilité dans l'eau ($S_{\text{CB6Cy}[6]} = 200 \text{ mM}$) de manière comparable aux γ -cyclodextrines. Enfin cet étalonnage a également permis de déterminer les puretés (45 à 99%) des cucurbiturils mixtes purifiés. Les premiers résultats RMN ont révélé des propriétés d'encapsulation de gaz très prometteuses et des déplacements chimiques différents selon la présence du nombre de groupements de cyclohexyles. Ainsi cela permettra d'envisager la synthèse de différentes sondes spécifiques. De plus, des essais de synthèse par des réactions d'hydroxylation sont actuellement en cours, afin de pouvoir par la suite fonctionnaliser les cucurbiturils mixtes (CB6Cy[1 et 2]).

Dans une deuxième partie, nous avons étudié deux types de biosondes xénon synthétisées à partir du cryptophane-222 couplé à des ligands spécifiques et sélectifs. Une première purification de ces biosondes, sans purification intermédiaire du ligand a conduit à des rendements de synthèse insuffisants. Une autre approche a donc été envisagée dans le but d'obtenir une grande pureté des éléments constituant la biosonde avant l'étape de couplage. Pour se faire, différentes méthodes chromatographiques telles que l'HILIC ont été utilisées. A la suite des ces différentes séparations et purifications, la biosonde bimodale et

la biosonde NTA ont été testées en RMN-¹²⁹Xe révélant des résultats très prometteurs notamment pour la détection des cations métalliques.

Afin de rendre ces molécules plus hydrosolubles, de nouvelles biosondes sont en cours de développement par greffage de groupements polyéthylène glycol (PEG) sur des cryptophanes. Celle-ci serait destinée à la mesure du pH extracellulaire pour la détection de cancers.

Pour terminer je tenais à préciser que la réalisation de ce mémoire m'a permis de mettre en application mes connaissances scientifiques dans le domaine de la chimie analytique. Toutes les techniques utilisées, n'ont fait qu'enrichir mes compétences et accroître mon intérêt pour le développement de méthodes d'analyses. J'ai eu en plus la chance d'interagir avec de nombreux scientifiques dans des domaines très variés, dont des organiciciens, ce qui a été essentiel pour m'imprégner du sujet dans sa globalité. Enfin je pense que cette année passée dans ce service d'analyse, m'a permis d'acquérir beaucoup d'autonomie et de maturité pour exercer le métier d'ingénieur.

VIII. ANNEXES

ANNEXE 1 : La polarisation du xénon.....	103
ANNEXE 2 : La chromatographie liquide	106
ANNEXE 3 : La spectrométrie de masse	116
ANNEXE 4 : Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière	121
ANNEXE 5 : Les gradients utilisés sur la LC-MS	125
ANNEXE 6 : Certificats d'analyses CB6 et CB7.....	128
ANNEXE 7 : Spectres RMN-1H et RMN- ¹²⁹ Xe	130
ANNEXE 8 : Tests statistiques.....	137

ANNEXE 1 : La polarisation du xénon

Le terme d'hyperpolarisation fait référence à un état hors équilibre de la polarisation nucléaire pour un élément donné, cet état ayant été obtenu *via* un transfert de polarisation en provenance d'un système dont les différences de population sont plus marquées.

Les techniques d'hyperpolarisation ont connu leurs débuts au CEA Saclay grâce aux travaux d'Abragam dans le domaine de la RMN. Elles suscitent aujourd'hui un intérêt grandissant car elles permettent de résoudre le problème de la faible sensibilité de la RMN et de plus en plus de noyaux ont pu être hyperpolarisés.

Qu'est ce que la polarisation nucléaire ?

Lorsqu'ils sont plongés dans un champ magnétique, les moments magnétiques des noyaux de spin $\frac{1}{2}$ s'orientent parallèlement ou antiparallèlement à celui-ci (Figure 76), créant ainsi deux niveaux d'énergie. A l'équilibre thermodynamique et étant donné la faiblesse de l'énergie mise en jeu, la distribution de population sur les deux états suit une loi de Boltzmann. La polarisation nucléaire P , grandeur sans unité représentant l'écart relatif de population entre ces états, est proportionnelle à l'amplitude du champ magnétique statique B_0 et inversement proportionnelle à la température T de l'échantillon. La polarisation est ainsi généralement très faible, de l'ordre de 10^{-5} dans les aimants supraconducteurs actuels. Lorsqu'il est possible de transférer efficacement la polarisation d'un système dont les différences de populations sont plus marquées vers les moments magnétiques nucléaires, l'espèce est dite « hyperpolarisée ». Une des méthodes d'hyperpolarisation est le pompage optique⁵⁵.

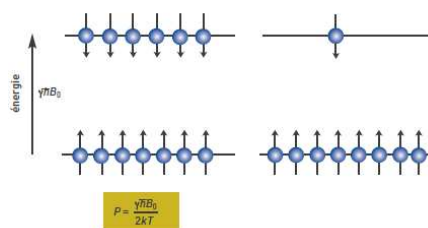


Figure 76 : La polarisation nucléaire

⁵⁵ Walker T.G. and Happer W., 1997, *Rev. Mod. Phys.*, 69, 629-642.

Appliqué sur des gaz rares, il permet d'augmenter fortement le signal, ainsi qu'en témoigne la comparaison des spectres du même échantillon de ^{129}Xe thermique (à gauche obtenu en 15 heures d'accumulation) et hyperpolarisé (à droite, 1 seconde d'acquisition)⁵⁶ sur la Figure 77.

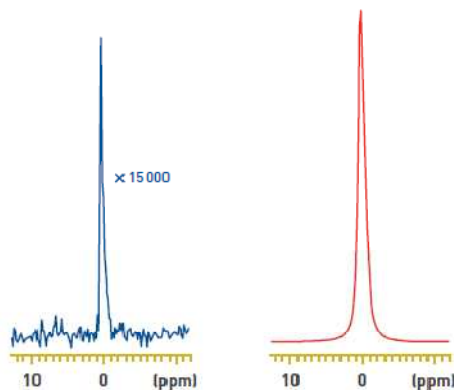


Figure 77 : Signal RMN du ^{129}Xe thermique (à gauche) et hyperpolarisé (à droite)

Le pompage optique est une technique introduite par Kastler⁵⁷ en 1950 pour améliorer la polarisation électronique. Cette technique a été appliquée pour la première fois aux spins nucléaires en 1960. Appliqué sur des gaz rares de spin $\frac{1}{2}$ tels que ^3He ou ^{129}Xe , le pompage optique permet d'obtenir des espèces hyperpolarisées avec un gain en sensibilité de plusieurs ordres de grandeur. Dans le cas du ^{129}Xe , le processus le plus efficace se fait en deux étapes :

La première étape : consiste à éclairer une cellule contenant un mélange de rubidium (Rb), de xénon et d'azote préalablement chauffé à 100°C à l'aide d'un laser à 795 nm. Ce chauffage préalable permet de vaporiser partiellement le rubidium qui se trouve initialement à l'état solide.

Comme le montre la Figure 78 ci-dessous, en présence d'un champ magnétique, la seule transition électronique permise dans ces conditions concerne le rubidium.

Elle correspond à la transition σ^+ entre les niveaux de spin électronique $-\frac{1}{2}$ et le premier état excité de spin $+\frac{1}{2}$. Des collisions successives entre atomes de rubidium permettent d'égaliser les populations des états excités et ce dernier se désexcite pour retourner à l'état fondamental (Figure 78).

⁵⁶ Navon G., Song Y.-Q., Room T., Appelt S., Taylor R. E. and Pines A., *Science*, **1996**, 271, 1848-1891.

⁵⁷ Kastler A., **1950**, *J. Phys. Radium.*, 11, 255-265.

Cependant, la vitesse d'excitation du spin électronique étant supérieure à la vitesse de relaxation électronique, on obtient une forte concentration de rubidium à l'état de spin électronique + 1/2.

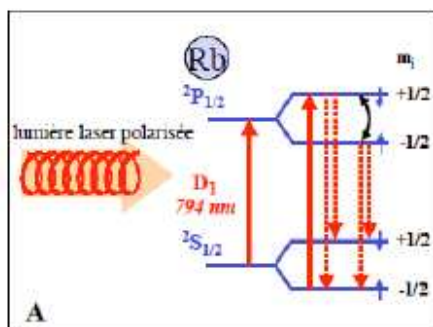


Figure 78 : Schéma de polarisation du Rubidium

La deuxième étape : qui fait intervenir de multiples collisions entre le rubidium et le xénon en phase gazeuse donne lieu à un couplage dipolaire entre le spin électronique du métal et le spin nucléaire du gaz.

On obtient ainsi en un temps très court, une importante concentration de xénon fortement polarisé, la relaxation nucléaire de ce dernier étant vraiment minime.

Cette hyperpolarisation du xénon se traduit alors par une différence de population entre deux états excités et par une augmentation de la sensibilité très nette en termes de RMN comme le montre la Figure 79.

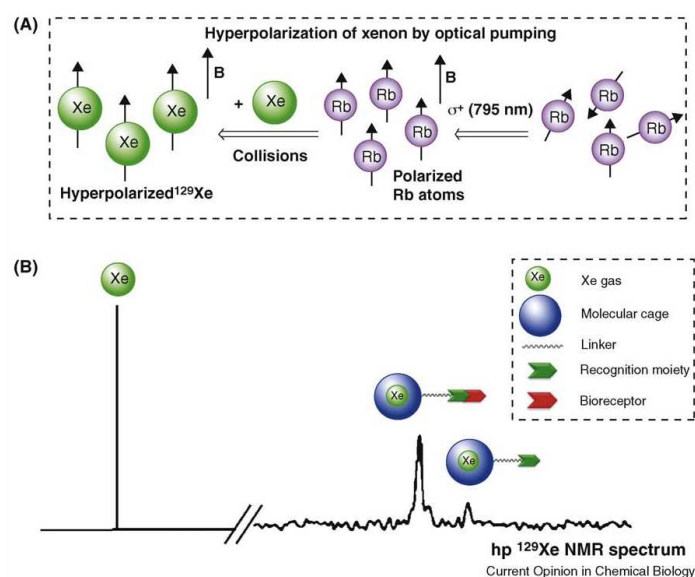


Figure 79 : a) Schéma d'hyperpolarisation du ^{129}Xe par pompage optique et b) Exemple de spectre de RMN au ^{129}Xe hyperpolarisé complexé ou non dans une molécule cage

ANNEXE 2 : La chromatographie liquide

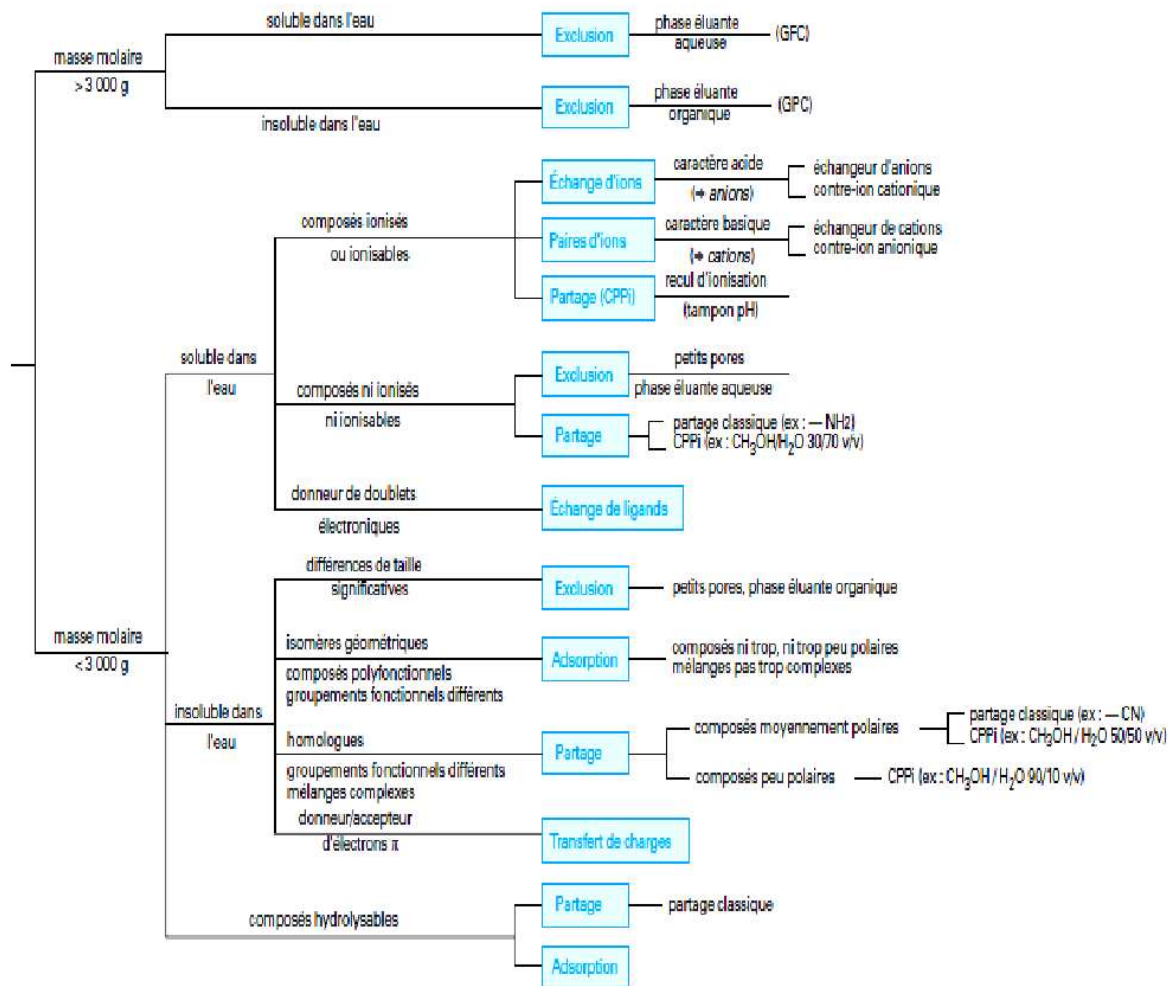
a. Classification

Plusieurs classifications des différents types de chromatographie peuvent se faire par la nature des phénomènes mis en jeu. Elle repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer (Figure 80). On peut distinguer les mécanismes suivants :

- ✓ **chromatographie de partage** : Dans cette chromatographie les analytes sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des analytes et des phases. En mode normal la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire. Il en existe deux types :
 - Liquide/liquide : elle est fondée sur la (ré)partition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile.
 - Liquide – phase greffée : la phase stationnaire consiste en une espèce organique liée par des liaisons chimiques à la surface des particules du matériau support.
- ✓ **chromatographie d'adsorption** (ou liquide /solide): Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la (ré)partition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.
- ✓ **chromatographie ionique** : Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.
- ✓ **Chromatographie d'exclusion**, tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les

premières, au niveau du volume mort (V_m). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire. Le coefficient de distribution prend le nom de diffusion.

- ✓ **Chromatographie d'affinité** (ou échange de ligand) : la phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).



CPP : chromatographie de partage à polarité de phases inversée

Figure 80 : Choix d'une méthode chromatographique (Caude⁵⁸)

⁵⁸ Caude M. et Jardy A., *Techniques de l'Ingénieur*, 1994, P1455, 1-47.

b. Effet de la vitesse d'éluion sur l'efficacité de la colonne

L'influence de la vitesse de la phase mobile a été mise en évidence par Van Deemter qui a proposé la première équation cinétique, dans le cas des colonnes remplies en chromatographie en phase gazeuse.

Elle relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile \bar{u} dans la colonne :

$$H = A + (B/\bar{u}) + (C \cdot \bar{u}) \quad (\text{VIII-1})$$

La courbe correspondante (Figure 81) est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum correspondant au débit optimal.

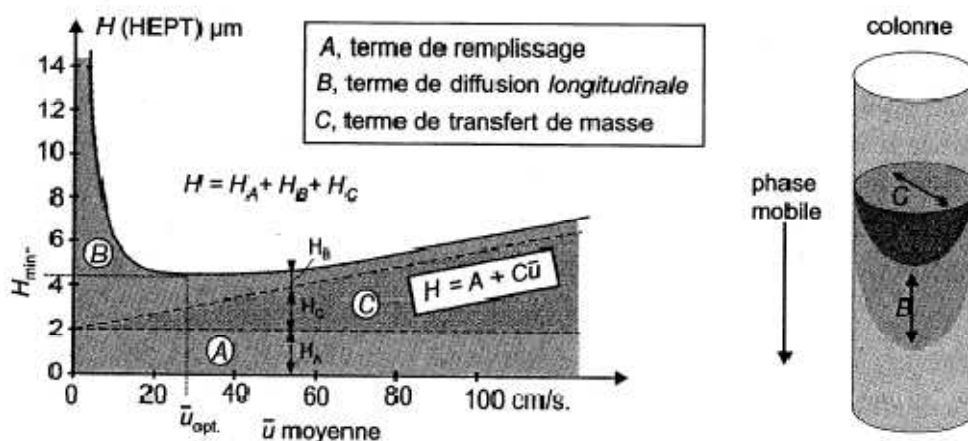


Figure 81 : Courbe de Van Deemter en CPG

Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C caractérisent divers paramètres physico-chimiques du système :

A est la Diffusion turbulente. Ce terme caractérise l'écoulement de la phase mobile le long de la phase stationnaire. Il dépend de la taille des particules constituant la phase stationnaire, de leur répartition et de la régularité du remplissage.

Ce terme est une constante, indépendante de \bar{u} qui est d'autant plus grand que le diamètre des particules est grand. A est surtout important dans les colonnes remplies garnies de particules ; il est peu important en chromatographie liquide et nul pour les colonnes capillaires.

B est la diffusion longitudinale. Il traduit la tendance naturelle des molécules de solutés à se disperser c'est-à-dire à diffuser dans toutes les directions; cette dispersion est d'autant plus grande que le débit est faible. Ce terme est important quand la phase mobile est un gaz.

C est la résistance au transfert de masse. Il traduit la résistance des solutés à se répartir à l'équilibre entre les deux phases. Plus le débit augmente, plus l'équilibre est difficile à atteindre (du fait des turbulences et des gradients de concentration qui sont plus importantes) et une partie des solutés peut-être entraînée hors équilibre. Ce terme est égal à la somme du coefficient de diffusion dans la phase mobile gazeuse et du coefficient de diffusion dans la phase stationnaire liquide : $C = C_G + C_L$

Une autre équation est applicable aux divers types de chromatographie liquide et fait intervenir la hauteur réduite. C'est l'équation de Knox :

$$H = A\bar{u}^{-1/3} + (B/\bar{u}) + (C \cdot \bar{u}) \quad (\text{VIII-2})$$

c. Les grandeurs fondamentales

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une stationnaire (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre mobile (liquide).

Pour un système chromatographique donné, le coefficient de distribution de Nernst (ou coefficient de partage) K défini par la relation :

$$K = \frac{C_s}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}} \quad (\text{VIII-3})$$

En LC analytique, la forme du pic idéal d'un composé est comparable à une courbe Gaussienne (Figure 82). Dans le cas d'une élution linéaire, le coefficient de distribution K varie linéairement avec la quantité injectée. A une température donnée, la courbe C_s en fonction de C_m est l'isotherme d'adsorption, avec K la pente de la droite.

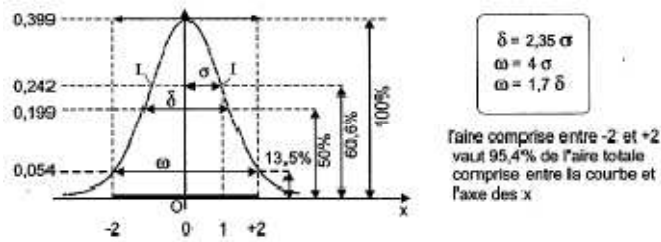


Figure 82 : Caractéristiques d'une courbe de Gauss

d. Les grandeurs de rétention

Soit t_r le temps de rétention d'un composé correspondant au temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué sur le chromatogramme.

On appelle t_m le temps mort correspondant au temps que met un composé non retenu sur la colonne.

On en déduit ainsi le temps réduit t'_r qui prend plus comme origine l'injection mais le pic du temps mort :

$$t'_r = t_r - t_m \quad (\text{VIII-4})$$

La rétention d'un soluté, dans des conditions opératoires données, est caractérisée par son facteur de capacité k' :

$$k' = \frac{t'_r}{t_m} \quad (\text{VIII-5})$$

e. Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne, dont dépend la largeur des pics, est caractérisée par son nombre de plateaux théoriques N .

Si le pic chromatographique obtenu est gaussien, N est exprimé, pour un soluté donné, par la relation suivante :

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r^2}{\delta^2} \quad (\text{VIII-6})$$

Avec ω largeur du pic à la base
 δ largeur du pic à mi-hauteur
 t_r temps de rétention du soluté

Une colonne est d'autant plus efficace que N est élevé.

Afin de comparer des colonnes entre elles selon leurs longueurs, on définit la hauteur équivalente de plateau théorique (HEPT ou H). Ce paramètre est exprimé par la relation :

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{VIII-7})$$

Avec L longueur de la colonne

Une colonne avec une petite HEPT est plus efficace qu'une colonne avec une HEPT supérieure. Si les colonnes sont formées de particules sphériques, on utilise la hauteur de plateau réduite h qui tient compte du diamètre des particules. Ainsi des colonnes présentant le même rapport h , conduisent à des performances semblables soit :

$$h = \frac{H}{\phi} = \frac{L}{N \cdot \phi} \quad (\text{VIII-8})$$

Avec ϕ diamètre des particules

f. Facteur de sélectivité

A partir de ces grandeurs de rétention, on peut définir le facteur de séparation α ou facteur de sélectivité qui permet de préciser les positions relatives de deux pics sur un chromatogramme.

Ce facteur de séparation est le rapport du coefficient de distribution du composé le plus retenu à celui du composé le moins retenu. C'est aussi le rapport des facteurs de rétention k' de ces deux composés il est accessible sur le chromatogramme à partir des temps de rétention réduits :

$$\alpha = \frac{t'_{r(2)}}{t'_{r(1)}} \quad (\text{VIII-9})$$

Avec t'_r le temps de rétention réduit

Le facteur de sélectivité mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés. On démontre que si $\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1$ (différence des énergies libres de distribution des deux composés) on a :

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha \quad (\text{VIII-10})$$

Pour des pics non adjacents, on définit alors le facteur de rétention relative r , qui, calculé comme α , ne peut être inférieur à 1.

g. Résolution

La résolution R est la qualité de séparation de deux pics voisins et est définie par la relation :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha-1}{\alpha} \times \frac{k'}{1+k'} \quad (\text{VIII-11})$$

Avec N efficacité de la colonne
 α facteur de sélectivité
 k' facteur de capacité

Mais R peut être calculé à partir du chromatogramme à partir de la formule suivante :

$$R = 2 \frac{(tr_2 - tr_1)}{(\omega_2 + \omega_1)} \quad (\text{VIII-12})$$

Avec ω largeur des pics à la base ($\omega=1,7 \delta$ avec δ la largeur du pic à mi-hauteur)

Ce paramètre permet de quantifier la qualité de la séparation. En effet si $R < 0,5$ les pics ne sont pas suffisamment séparés (Figure 83). Si $1,4 < R < 1,6$ la séparation est optimale.

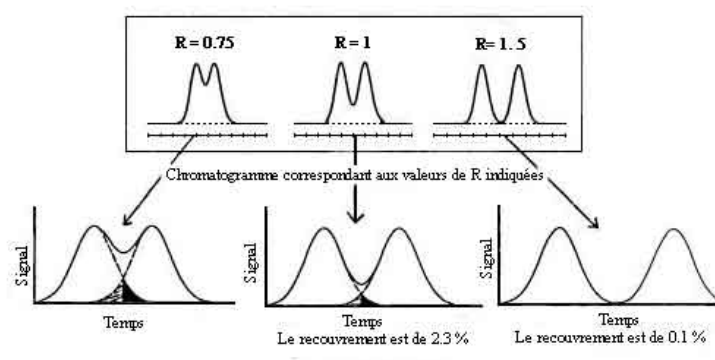


Figure 83 : Le facteur de résolution R de 0,75 à 1,5

h. Caractéristiques de la colonne préparative

La colonne préparative devra être constituée du même type de greffage que la colonne analytique. La taille des particules et la longueur de la colonne ont également leur importance. Le remplissage des colonnes avec des phases stationnaires de fine

granulométrie entraîne une augmentation importante de l'efficacité et donc de la résolution. Un compromis doit cependant être réalisé car si le diamètre des particules diminue, la perte de charge augmente de façon inversement proportionnelle au diamètre des particules au carré.

Selon la loi DARCY, la perte de charge est :

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{K^o} \quad \text{avec } K^o = \frac{dp^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon^2)} \quad (\text{VIII-13})$$

Avec ΔP perte de charge (en barye = 10^{-6} bars)
 η viscosité (poise)
 L longueur de la colonne (cm)
 v vitesse de la phase mobile ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
 K^o constante de perméabilité (cm^2)
 dp diamètre des particules (cm)
 ε porosité interstitielle (volume interstitiel de la colonne/volume total).

Pour des colonnes bien remplies de particules sphériques ou irrégulières, la formule empirique suivante, établie avec les unités usuelles, permet le calcul d'une estimation de ΔP en fonction du débit F de la phase mobile avec une incertitude inférieure à 25% :

$$\Delta P = 400 \frac{F \cdot L \cdot \eta}{dp^2 \cdot dc^2} \quad (\text{VIII-14})$$

Avec ΔP (MPa)
 F débit ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)
 L longueur de la colonne (cm)
 η viscosité (cP)
 dp diamètre des particules (μm) et dc diamètre de la colonne (mm)

Etant limité par le risque d'avoir des pressions trop fortes et non supportées par l'appareillage, il est nécessaire d'utiliser des colonnes de particules plus grandes. Un diamètre de colonne plus grand permettra d'augmenter la quantité de produit injecté et donc le débit.

Pour éviter la perte d'efficacité, des colonnes plus longues sont utilisées et permettent d'obtenir ainsi la même longueur réduite l qui représente le nombre de « tranches » de particules contenues dans la colonne et de formule :

$$l = \frac{L}{\phi} \quad (\text{VIII-15})$$

Avec L longueur de la colonne
 ϕ diamètre des particules de la phase stationnaire

i. Les calculs de transposition

Pour obtenir les meilleurs résultats possibles en termes de résolutions chromatographiques de nombreux facteurs doivent être considérés :

- La transposition en débit
- La transposition du temps du gradient
- Le facteur « quantité massique » qui permet de connaître la quantité maximum injectée d'échantillon.

• Transposition en débit

Le débit dépend de la section de la colonne et la vitesse linéaire doit rester constante :

$$v = \frac{D}{S} = \frac{D}{\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2} \quad (\text{VIII-16})$$

Avec v vitesse linéaire
 D débit
 S section
 d diamètre de la colonne

$$\frac{D_a}{S_a} = \frac{D_p}{S_p} \quad \text{d'où} \quad D_p = D_a \times \frac{d_p^2}{d_a^2} \quad (\text{VIII-17})$$

Avec a colonne analytique et p colonne préparative.

• Transposition du gradient

La durée du gradient doit correspondre au même nombre de volume de la colonne et donc le temps du gradient sur colonne préparative T_p est défini par :

$$T_p = T_a \times \frac{D_a \times d_p^2 \times L_p}{D_p \times d_a^2 \times L_a} \quad (\text{VIII-18})$$

Comme il y a une différence de phase stationnaire de part la taille des particules on utilise la longueur réduite l et donc la formule devient :

$$T_p = T_a \times \frac{D_a \times d_p^2 \times l_p \times \emptyset_p}{D_p \times d_a^2 \times l_a \times \emptyset_a} \quad (\text{VIII-19})$$

Avec T durée du gradient
 D débit
 d diamètre de la colonne
 l longueur réduite
 \emptyset diamètre des particules

- **Facteur « quantité massique »**

Ce facteur permet d'obtenir le facteur multiplicateur en termes de quantité injectée sur la colonne. Comme la quantité injectée maximale est proportionnelle au volume de la colonne on en déduira la quantité Q_p maximale à partir de la formule :

$$\frac{Q_a}{L_a \times \pi \times \left(\frac{d_a}{2}\right)^2} = \frac{Q_p}{L_p \times \pi \times \left(\frac{d_p}{2}\right)^2} \quad (\text{VIII-20})$$

Avec Q quantité de l'échantillon
 L longueur de la colonne
 d diamètre de la colonne

ANNEXE 3 : La spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse est composé de plusieurs parties ayant chacune une fonction bien précise : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

Les molécules d'échantillon qui se trouvent soit à l'état liquide, solide ou gaz sont introduites dans la source d'ionisation où elles sont transformées en espèces chargées (ions) à l'état gazeux. Suivant le type de source, ces ions sont formés soit à pression atmosphérique soit sous vide. Les ions ainsi formés sont envoyés vers l'analyseur où ils vont être séparés en fonction de leur rapport masse/charge et selon le principe de l'analyseur employé. Quel que soit l'analyseur utilisé, il devra être sous un vide poussé. Ceci afin d'éviter toutes les collisions qui peuvent entraîner une déviation de l'ion de sa trajectoire et sa décharge sur les parois de l'analyseur. Les ions séparés sont ensuite comptés par un détecteur, choisi en fonction de l'analyseur et la source d'ionisation. Les signaux en sortie du détecteur sont transformés par un logiciel de traitement de données en signaux binaires et traitables par l'informatique. Un spectre de masse représentatif et spécifique de la molécule analysée peut être obtenu. Les logiciels employés permettent non seulement le traitement automatique des données mais également le contrôle de l'ensemble du système.

A. La source d'ionisation

Les différentes sources d'ionisation sont :

- Impacte électronique : IE
- Ionisation chimique : IC
- Ionisation chimique par désorption : DCI
- Désorption plasma : PDMS
- Ionisation par bombardement moléculaire : FAB
- Désorption laser : MALDI
- **Electrospray : ESI (Figure 84)**
- Ionisation chimique à pression atmosphérique : APCI
- Décharge électrique : plasma par couplage inductif ICP-MS

Les spectromètres de masse du laboratoire sont équipés d'une source d'ionisation électrospray permettant le couplage avec une chromatographie liquide.

L'échantillon en solution est introduit (au moyen d'un pousse-seringue ou d'une pompe chromatographique) dans l'appareil par l'intermédiaire d'un capillaire dont l'extrémité traverse une aiguille métallique portée à un potentiel de plusieurs kilovolts (typiquement 3 à 5 kV). Il en résulte la formation de gouttelettes mono ou polychargées, qui conduisent, par désolvatation, à des ions en phase gazeuse. A mesure que les gouttelettes diminuent en taille avec l'évaporation de la solution, la tension des charges superficielles augmente jusqu'au moment où la goutte explose. Il y a alors transfert de charges vers le soluté. Un flux d'azote, dirigé le plus souvent à contre-courant du trajet des ions, joue un rôle prépondérant dans le processus de désolvatation puisqu'il permet de sécher les solvants résiduels de façon que seuls les ions en phase gazeuse puissent traverser l'orifice pour pénétrer dans l'enceinte de l'appareil. Les ions générés soumis à une différence de potentiel sont accélérés dans l'analyseur, les neutres (non chargés) restant sont éliminés par un flux de gaz (Azote).

- **Les avantages :**

- appropriée pour les composés chargés, polaires ou basiques
- permet la détection de haut poids moléculaire
- meilleure méthode pour analyser des composés multichargés
- bruit de fond chimique très bas et très bonnes limites de détection
- possibilité de contrôler la présence/absence de fragmentation via les potentiels
- compatible avec les méthodes MS/MS
- Gamme de masse jusqu'à 200,000 Da.

- **Les limitations :**

- nombreuses espèces chargées requièrent des interprétations et transformations mathématiques complexes
- inadaptée pour les espèces neutres, non basiques et de faible polarité (ex : stéroïdes). Complémentaire de l'APCI
- très sensible aux sels.

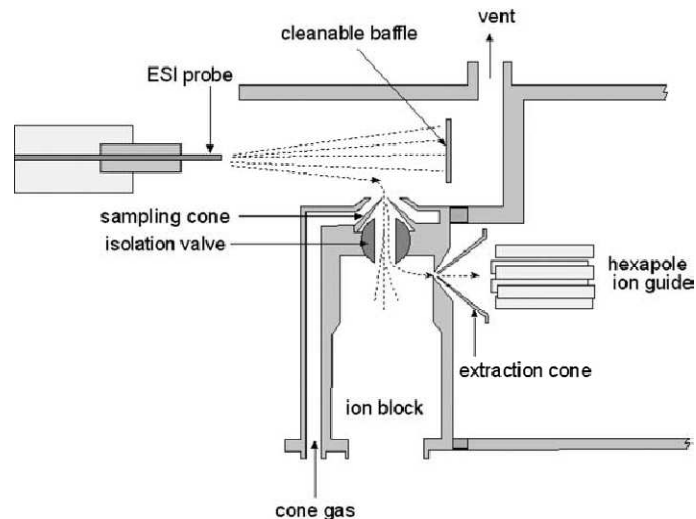


Figure 84 : Ionisation Electrospray du Micromass Quattro LC

B. L'analyseur

Les différents analyseurs sont :

- L'analyseur magnétique
- **L'analyseur quadripolaire (Figure 85)**
- Le temps de vol (TOF)
- L'analyseur à résonance cyclotronique d'ion (FT-ICR)
- L'orbitrap
- Le piège ionique quadripolaire ou trappe d'ions.

Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure du rapport m/z des ions, qui est :

- la dispersion des ions, fondée sur leur moment ou leur énergie cinétique (instruments à secteur magnétique ou électrique)
- la séparation dans le temps, fondée sur la vitesse des ions (TOF)
- la transmission des ions traversant un champ électrodynamique (quadripôle)
- le mouvement périodique dans un champ magnétique ou électrodynamique (pièges ou trappes à ions)

Le spectromètre de masse « *Micromass ZQ* » est équipé d'un analyseur quadripôle.

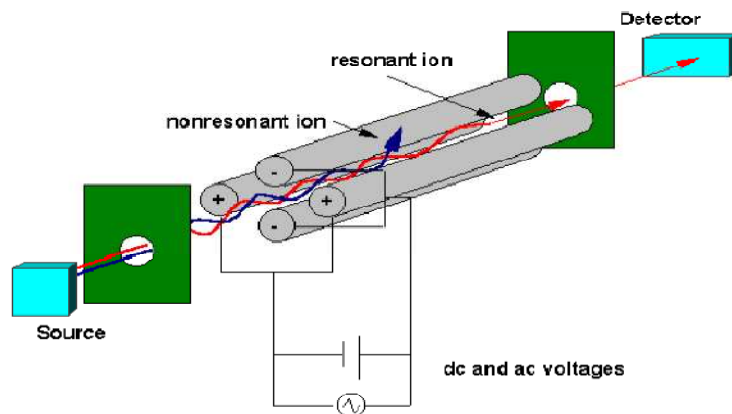


Figure 85 : Analyseur quadripolaire

Le quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique (Figure 85). Ces électrodes sont cylindriques et longues de douze à vingt centimètres selon les modèles. L'application d'un potentiel de type $U + V \cos \omega t$ crée un champ quadripolaire entre les électrodes.

La tension appliquée aux barres Φ peut s'exprimer comme :

$$\Phi_0 = + (U - V \cos \omega t)$$

$$- \Phi_0 = - (U - V \cos \omega t)$$

Pour qu'un ion de rapport m/z donné ait une trajectoire stable dans le quadripôle et qu'il puisse ainsi atteindre le détecteur, il faut que les paramètres U et V soient tels que l'amplitude radiale de la trajectoire de l'ion soit inférieure à la distance séparant les électrodes. Dans la pratique, le quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : on fait varier simultanément les valeurs de U et de V de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. A un instant t donné, ne sont détectés que les ions d'un m/z donné. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage.

Le Micomass Quattro LC est un spectromètre de masse triple quadripôle haute performance destiné à des analyses LS-MS-MS de routine. Entre les deux quadripôles se trouve une chambre de collision (CID). L'utilisation du spectromètre de masse en tandem (MS-MS) permet d'obtenir des informations plus précises sur la structure des ions fragments issus de la décomposition des composés moléculaires introduits.

- **Avantages :**
 - spectre de masse classique
 - bonne reproductibilité
 - matériel compact et abordable
 - spectre CID MS/MS
- **Limitations**
 - résolution limitée
 - hauteur des pics variables en fonction de la masse (discrimination de masse)
 - Inadaptée pour les méthodes d'ionisation pulsée
 - spectres CID MS/MS dépendent de nombreux facteurs (énergie, gaz de collision, pression,...).

C. Les détecteurs

Les différents détecteurs sont :

- Les multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées
- Les multiplicateurs d'électrons à dynode continue
- Les détecteurs à microcanaux

Les spectromètres de masse utilisés sont équipés d'un détecteur photomultiplicateur. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires à l'aide de tubes en verre dopés au plomb (dynode). Ceux-ci sont accélérés vers un écran phosphorescent où ils sont convertis en photons. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur. Il présente une bonne sensibilité, avec amplification forte mais le balayage est moins rapide qu'avec un multiplicateur d'électrons.

ANNEXE 4 : Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière

Le DEDL (Figure 86) comprend trois phases distinctes et consécutives qui nécessitent d'être optimisées dans le but d'obtenir un bas bruit de fond, ainsi qu'une haute sensibilité et répétabilité.

Ces trois phases sont :

- La nébulisation
- L'évaporation
- La détection optique

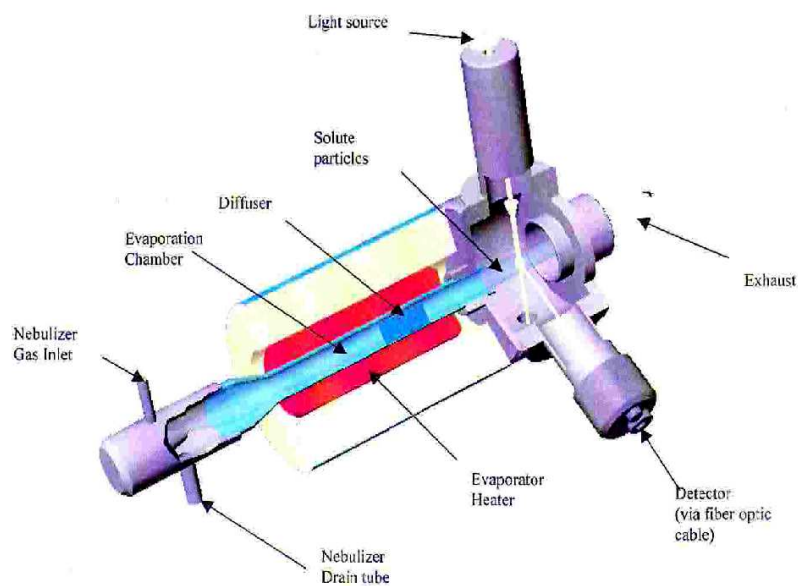


Figure 86 : Schéma du PL-ELS-1000

A. La nébulisation

Tout d'abord, les solvants de la phase mobile provenant de la colonne chromatographique sont introduits dans le nébuliseur pour créer un aérosol. Le nébuliseur se compose d'un

orifice central, à travers lequel les solvants d'élution arrivent et qui lui-même est alimenté d'un flux de gaz inerte (azote, dioxyde de carbone, argon ou hélium). Ce flux rapide de gaz porteur crée une région de basse pression formant un nuage de gouttelettes de tailles uniformes pour ainsi passer en continu dans la chambre d'évaporation.

De nombreux paramètres qui ont une incidence sur le diamètre des gouttelettes dépendent des propriétés de la phase mobile comme la viscosité, la densité et la tension de surface. Comme la phase mobile est choisie pour une séparation chromatographique optimale, ces paramètres ne sont pas facilement ajustables. Le diamètre des gouttelettes et leur répartition sont contrôlés par la conception du nébuliseur, en particulier la taille et la forme de l'orifice et le débit du gaz porteur. Les orifices du nébuliseur sont conçus pour supporter des débits du $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ au $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, avec ajustement en fonction du débit du gaz afin de produire une répartition précise et homogène des gouttelettes. En général, un faible débit de gaz produit des gouttelettes plus grandes, entraînant une plus grande quantité d'analytes et donc une meilleure détection. Cependant, ces plus grandes gouttelettes ne peuvent pas être efficacement évaporées ce qui entraîne une augmentation du bruit de fond du détecteur.

B. L'évaporation

Il y a deux manières pour introduire l'aérosol formé dans la chambre d'évaporation.

La première est une connexion directe entre le nébuliseur et la chambre d'évaporation qui permet une répartition complète des gouttelettes, avec l'avantage que tous les analytes atteignent le détecteur optique. Cependant la taille des gouttelettes étant trop différentes, les gouttelettes trop grandes ne pourraient pas être complètement évaporées.

La deuxième solution permet aux plus grandes gouttelettes de se condenser sur les parois de la chambre de nébulisation par l'introduction d'un obstacle, comme un diaphragme ou un coude, sur chemin de l'aérosol. Celle-ci présente l'avantage d'obtenir une distribution de taille des gouttelettes plus uniforme.

Le flux de gaz transporte les gouttelettes jusque dans la chambre d'évaporation qui est chauffée entre 30°C et 100°C. Le solvant de phase mobile est évaporé au fur et à mesure, conduisant à un panache de particules sèches de l'analyte. L'utilisation d'une faible température d'évaporation est très importante pour les composés très volatiles. Cependant

si la température est trop basse, l'évaporation de la phase mobile risque d'être incomplète augmentant le bruit de fond du détecteur.

C. La détection optique

Après l'évaporation, les particules entrent dans la partie de détection optique où elles vont interagir avec un faisceau lumineux. La lumière de la lampe (Tungstène/halogène) est disposée perpendiculairement au flux de gaz. Le faisceau de lumière incident transmis est capturé et mesuré en temps réel par un photomultiplicateur ou une photodiode. La quantité de lumière détectée est dépendante de la concentration du soluté et de la distribution de la taille des particules du soluté.

Il y a 4 principaux processus par lesquels la trajectoire de la radiation électromagnétique peut changer de direction quand elle est traversée par un milieu contenant des particules en suspension. Il y a la diffusion Rayleigh, la diffusion Mie, la réflexion et la réfraction.

La diffusion Rayleigh est un mode de diffusion des ondes, par exemple électromagnétiques ou sonores, dont la longueur d'onde est beaucoup plus grande que la taille des particules diffusantes. On parle de diffusion élastique, car cela se fait sans variation d'énergie, autrement dit l'onde conserve la même longueur d'onde. La diffusion par des très petites particules, telles que des molécules, de dimensions inférieures au dixième de la longueur d'onde de la lumière considérée, est un cas limite appelé diffusion Rayleigh. Pour les particules plus grosses que la longueur d'onde, on doit prendre en compte la diffusion de Mie dans son intégralité : elle explique dans quelles directions la diffusion est la plus intense, on obtient ainsi un « patron de réémission » qui ressemble à celui des lobes d'émission d'une antenne, avec, dans le cas de grosses particules, un lobe plus intense dans la direction opposée à celle d'où provient l'onde incidente.

Le chevauchement de ces différents mécanismes de dispersion de la lumière pour une distribution non uniforme des tailles de particules entraîne une réponse non linéaire bien que la dispersion soit indépendante de la composition chimique des particules.

Une fois les paramètres optimisés, comme le débit, la température d'évaporation pour une séparation donnée, le DEDL permet d'obtenir une détection reproductible avec un bas bruit de fond. C'est un détecteur universel, permettant la détection directe de composés comme

les carbohydrates, qui ne sont pas détectables par les techniques d'UV, de fluorescence et électrochimiques sans dérivation. En plus, le DEDL permet l'utilisation de phases mobiles ayant une forte absorption UV comme l'acétone. De plus il a trouvé de nombreuses applications aussi bien dans les domaines pharmaceutiques que dans les industries de polymères.

D. Spécifications du PL-ELS-100 :

Light Source		Tungsten/Halogen Lamp
Detector		Photodiode
Temperature Range*	Evaporator	30-300°C
	Nebulizer	30-220°C
	Heated Transfer Line	30-220°C
Gas Flow		0-2 SLM @60 psi @25°C (PL-ELS 1000)
		0-1 SLM @100 psi @25°C (PL-ELS 1000 μ)
	Pressure operating range	60 - 100 psi (4-6.7 bar)
Eluent Flow	Maximum Pressure	150 psi (10 bar)
		0-5.0ml/min (PL-ELS 1000)
Analogue Output		0-0.5ml/min (PL-ELS 1000 μ)
		0-10V
Communication		0-1V
		Serial I/O
	Outputs	2 Contact closures
		1 TTL +ve
Instrument Control		1 TTL -ve
		Heated Transfer line control
	Input	Remote auto-zero control
		Remote mode switching
Instrument Interface		Microprocessor
Detector Status		Detachable IR remote control
		Windows based PC control
Size		Sleep, Gas Save, Standby, Heating, Ready and Error
	wxdxh	175x480x430mm
Weight	Packaged wxdxh	670x340x580mm
		15kg
	Packaged	22kg

ANNEXE 5 : Les gradients utilisés sur la LC-MS

Les solvants utilisés sont l'eau et l'acétonitrile dans lesquels 0,1% d'acide formique est ajouté.

- Les gradients utilisés en analytique à 1 ml.min⁻¹

Générique		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
8	0	100
13	0	100
14	95	5
17	95	5

Long60		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
24	60	40
30	0	100
31	95	5
36	95	5

Long85-50		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	85	15
24	50	50
30	0	100
31	85	15
36	85	15

Générique Long		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
24	0	100
30	0	100
31	95	5
36	95	5

Long70		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
24	70	30
30	0	100
31	95	5
36	95	5

Long85-35		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	85	15
24	35	65
30	0	100
31	85	15
36	85	15

Long40		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
24	40	60
30	0	100
31	95	5
36	95	5

Long90-40		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	90	10
24	40	60
30	0	100
31	90	10
36	90	10

Long80-60		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	80	20
24	60	40
30	0	100
31	80	20
36	80	20

Long50		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
24	50	50
30	0	100
31	95	5
36	95	5

Long90-50		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	90	10
24	50	50
30	0	100
31	90	10
36	90	10

Long75-65		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
24	50	50
30	0	100
31	95	5
36	95	5

Générique 0-40		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	0	100
8	40	60
13	40	60
14	0	100
17	0	100

Long85-75-70		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	85	15
8	75	25
22	70	30
27	0	100
31	85	15
36	85	15

Long 0-40		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	0	100
24	40	60
25	50	50
31	0	100
36	0	100

- Les gradients utilisés en préparative à 17ml.min⁻¹

Long60 prep		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
27	60	40
32	0	100
33	95	5
36	95	5

Long 0-40 prep		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	0	100
24	40	60
25	50	50
32	0	100
36	0	100

Long70 prep		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	95	5
27	70	30
32	0	100
33	95	5
36	95	5

Long85-75-70 prep		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	85	5
10	75	25
25	70	30
32	0	100
35	85	15
38	85	15

Long75-65 prep		
T (min)	% H ₂ O	% CH ₃ CN
0	75	15
27	65	25
32	0	100
33	95	5
36	95	5

ANNEXE 6 : Certificats d'analyses CB6 et CB7

SIGMA-ALDRICH

ALDRICH
Chemistry

Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs (SG), Switzerland
Tel: +41 81 755 2511 Fax: +41 81 756 5449

Certificate of Analysis

Product Name: CUCURBIT[6]URIL HYDRATE
purum, >= 97.0 % CHN
Product Number: 94544
Product Brand: Aldrich
Molecular Formula: C₃₆H₃₆N₂₄O₁₂ * xH₂O
Molecular Mass: 996.82
CAS Number: 80262-44-8

TEST	SPECIFICATION	LOT 1438646 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE/COLORLESS	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
TITRATION	97.0 - 103.0 %	98.8 % (CALCULATED ON DRY SUBSTANCE)
ASSAY (ELEMENTAL ANALYSIS)	≥ 97.0 % (N)	99.1 % (N)
MELTING POINT	~ 470 C	467 C (DSC)
WATER	5 - 15 %	8.5 %
CARBON CONTENT	43.38 % (THEORY)	43.69 %*
HYDROGEN CONTENT	3.64 % (THEORY)	3.56 % *
NITROGEN CONTENT	33.72 % (THEORY)	33.40 *
REM. ON ELEMENTAL ANALYSIS	--	*CALCULATED ON DRY SUBSTANCE
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
QC RELEASE DATE	10/JUN/09	



Edeltraud Schwärzler, Manager
Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name Cucurbit[7]uril
Product Number 545201
Product Brand ALDRICH
CAS Number 259886-50-5
Molecular Formula C₄₂H₄₂N₂₈O₁₄
Molecular Weight 1162.96

TEST	SPECIFICATION	LOT 00325cd RESULTS
APPEARANCE	WHITE POWDER	WHITE POWDER
INFRARED SPECTRUM		CONFORMS TO STRUCTURE.
PROTON NMR SPECTRUM	99% PURE *	99% PURE * COMMENT: LESS THAN 1% ORGANIC IMPURITIES OR ISOMERS WERE DETECTED BY 1H NMR *
LOSS ON DRYING	20% H ₂ O (MAXIMUM) (100 DEGREES C, 12 HOURS, 0.1 MM HG) *	13.3% H ₂ O (100 DEGREES CELSIUS, 12 HOURS, 0.1 MM HG) *
ACIDITY	MAY CONTAIN ACID OF CRYSTALLIZATION, LOT SPECIFIC DATA PROVIDED *	TITRATION FOR ACID GAVE ANALYSIS CONSISTENT WITH C ₄₂ H ₄₂ N ₂₈ O ₁₄ .10H ₂ O .0.5HCL * COMMENT: TITRATION FOR ACID BEFORE AND AFTER THE WEIGHT LOSS TEST SHOWED NO ACID LOSS * * SUPPLIER DATA APRIL 2005
QUALITY CONTROL	APPROVED MAY 30, 2008 RJM	
ACCEPTANCE DATE		



Barbara Rajzer, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

ANNEXE 7 : Spectres RMN-1H et RMN-¹²⁹Xe

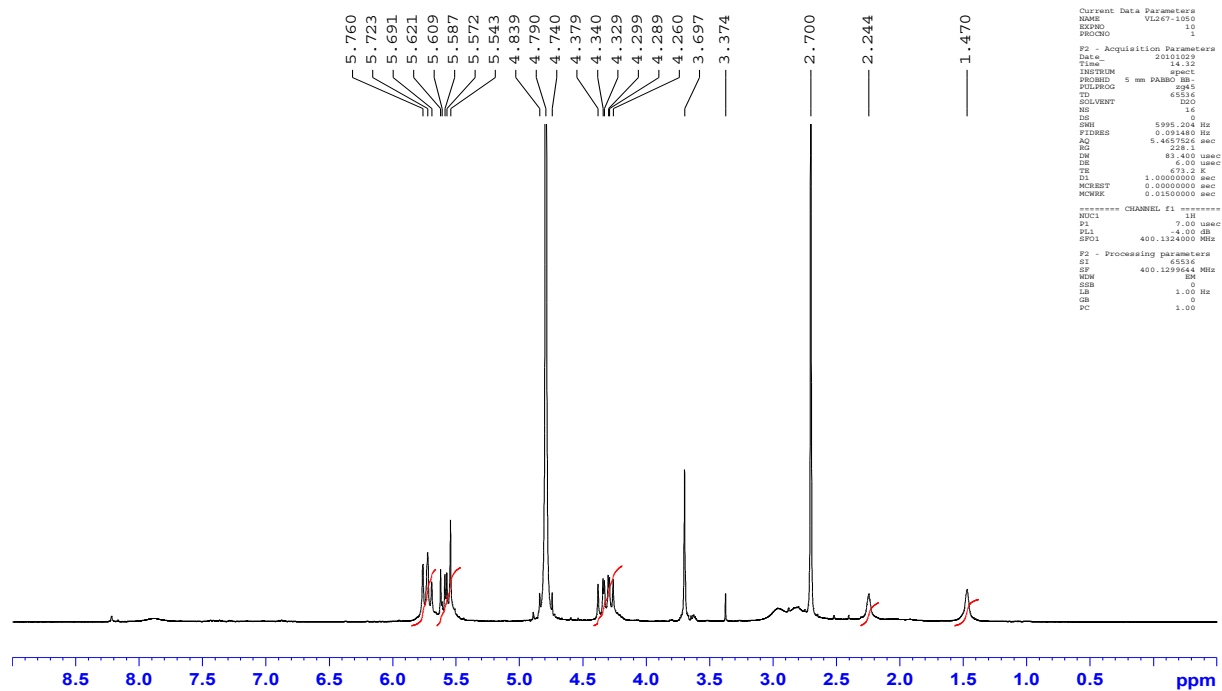


Figure 87 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[1] purifié (échantillon B)

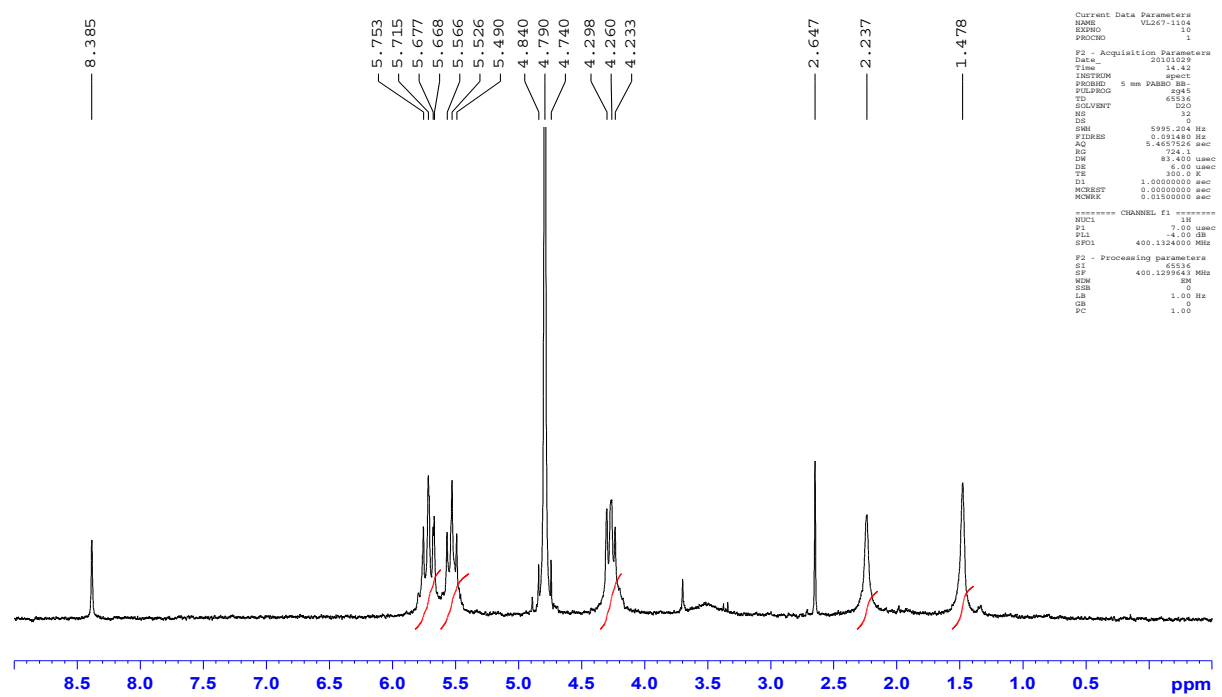


Figure 88 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[2] purifié (échantillon B)

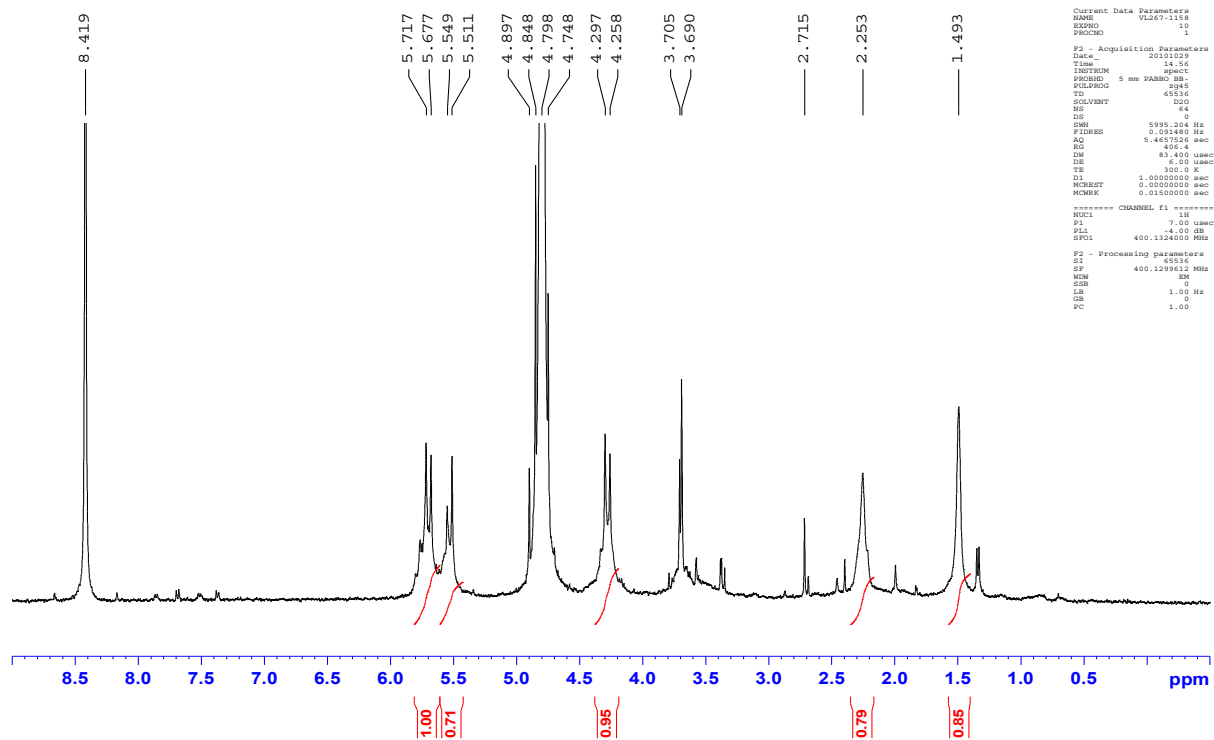


Figure 89 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[3] purifié (échantillon B)

VL348_cy4bis - D2O

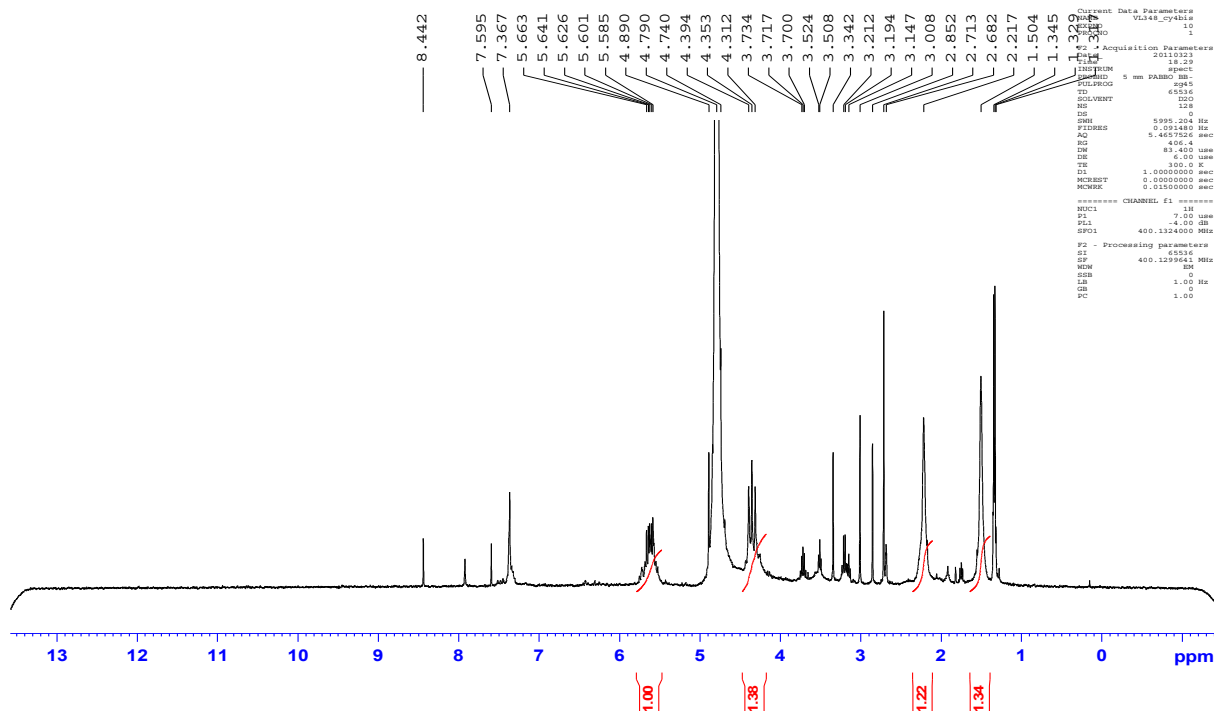


Figure 90: Spectre RMN-1H du CB6Cy[4] purifié (échantillon A)

VL348Cy5

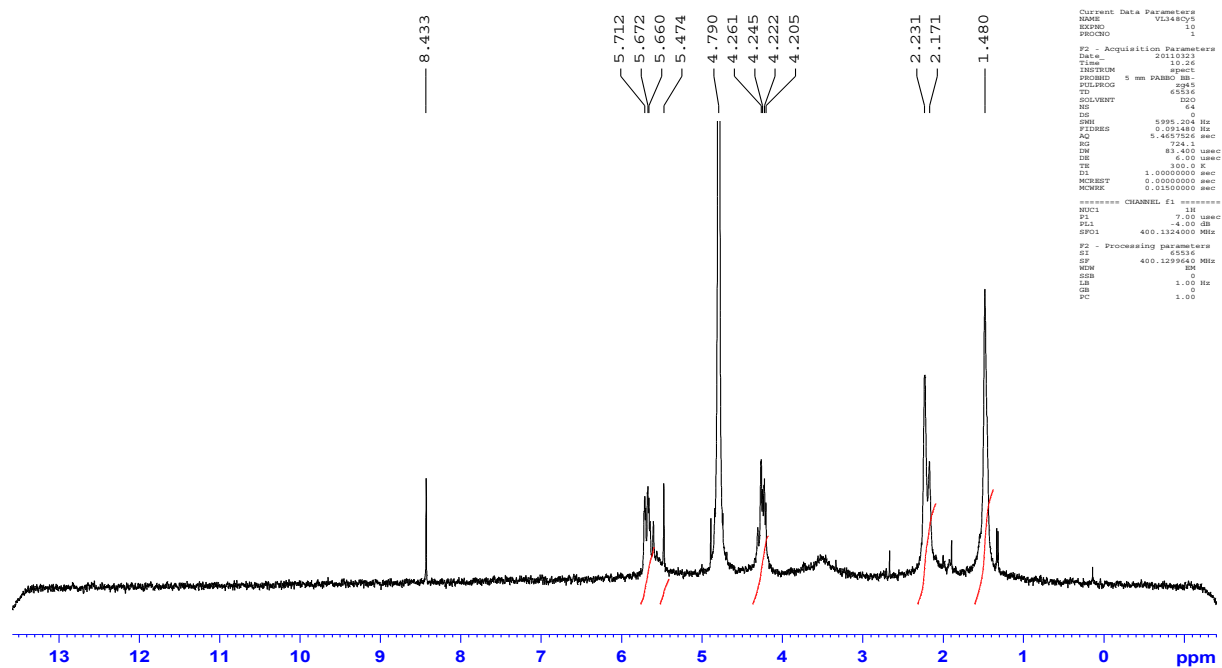


Figure 91 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[4] purifié (échantillon A)

VL348Cy6

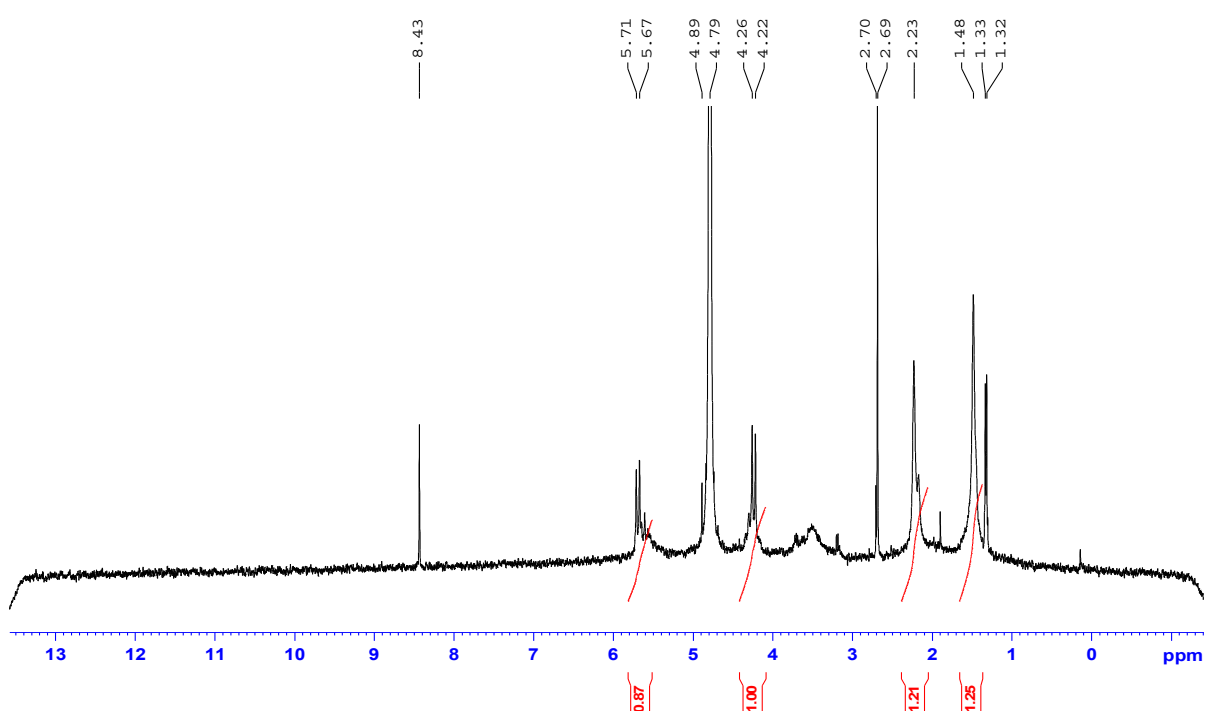


Figure 92 : Spectre RMN-1H du CB6Cy[6] purifié (échantillon A)

Exemples de spectres RMN-¹²⁹Xe des CB6Cy[1à3]

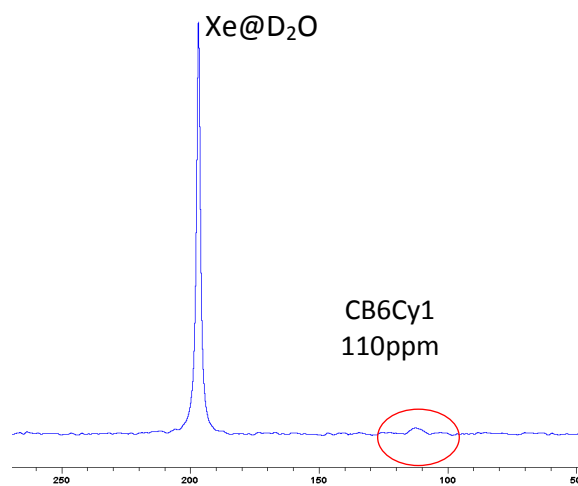


Figure 93 : Spectre RMN-¹²⁹Xe du CB6Cy[1] dans D₂O

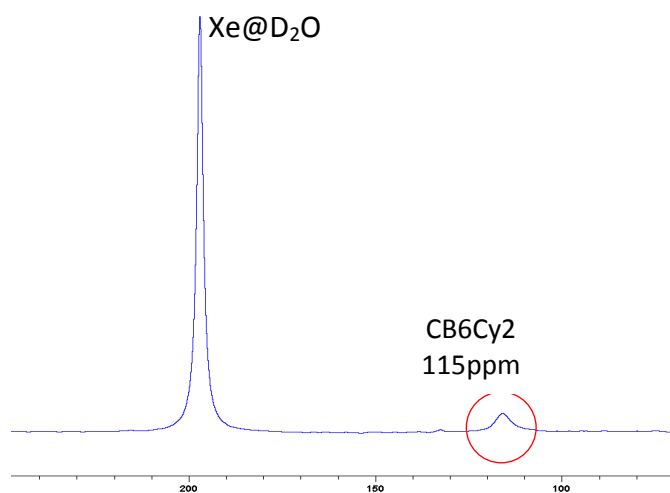


Figure 94 : Spectre RMN-¹²⁹Xe du CB6Cy[1] dans D₂O

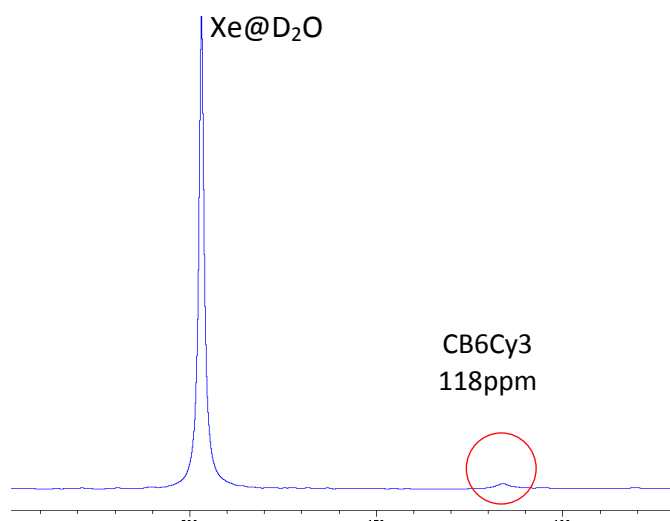


Figure 95 : Spectre RMN-¹²⁹Xe du CB6Cy[1] dans D₂O

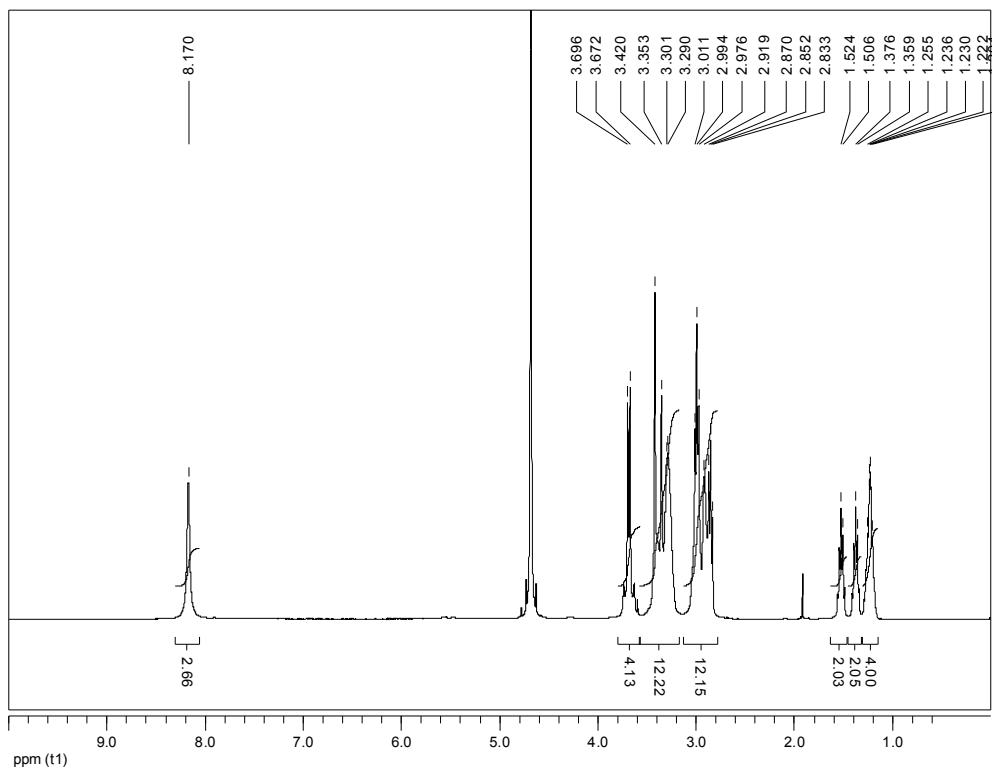


Figure 96 : Spectre RMN-1H du ligand de la biosonde bimodale

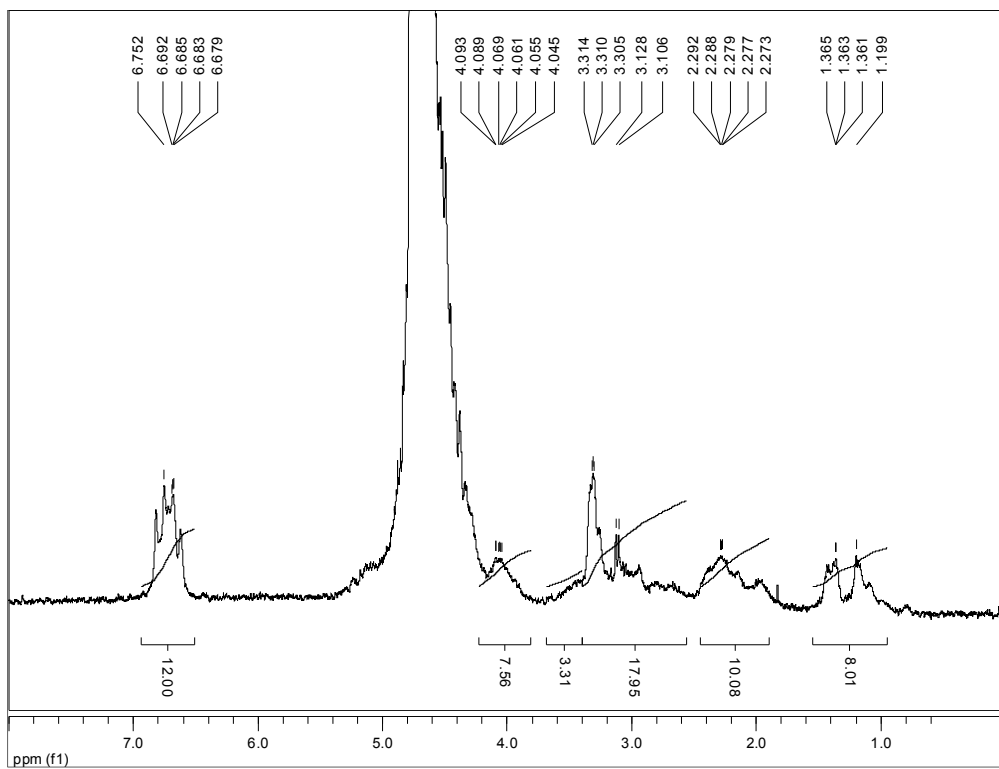


Figure 97 : Spectre RMN-1H de la biosonde bimodale n°2

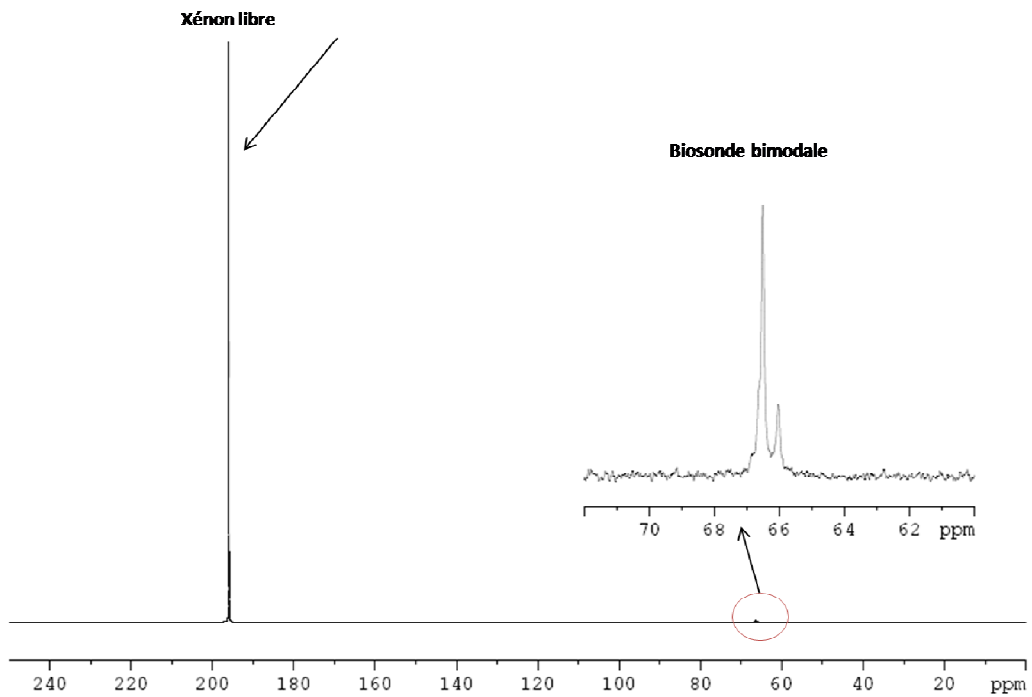


Figure 98 : Spectre RMN- ^{129}Xe hyperpolarisé bimodale n°2 (D2O pH=7,4 T=293K)

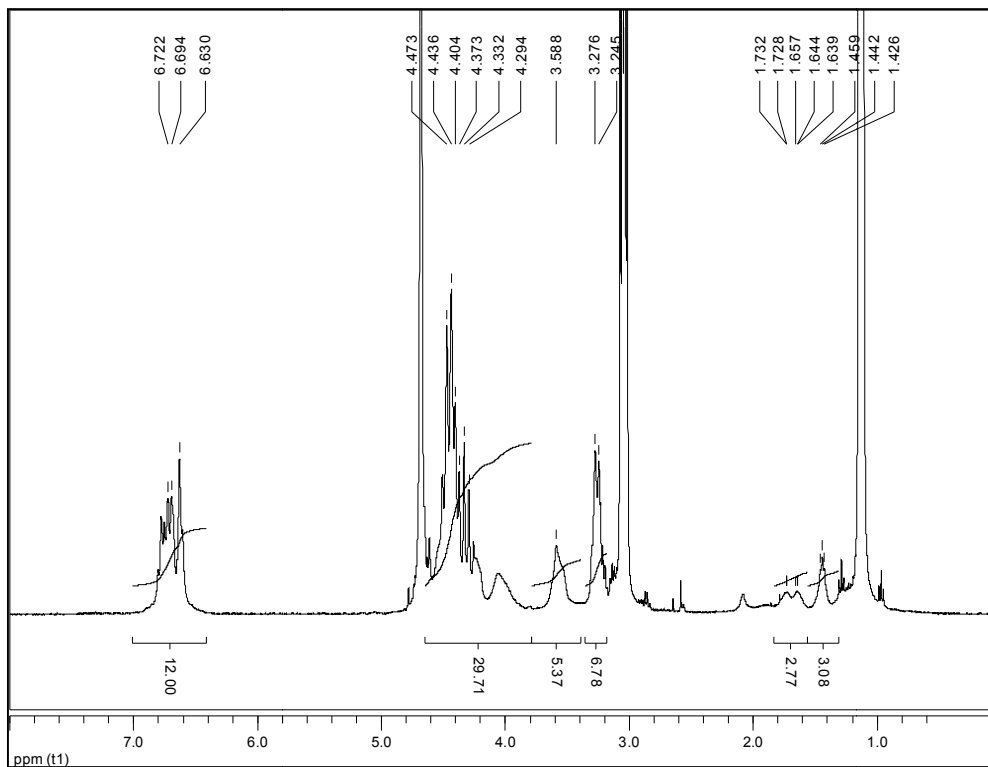


Figure 99 : Spectre RMN-1H de la biosonde NTA

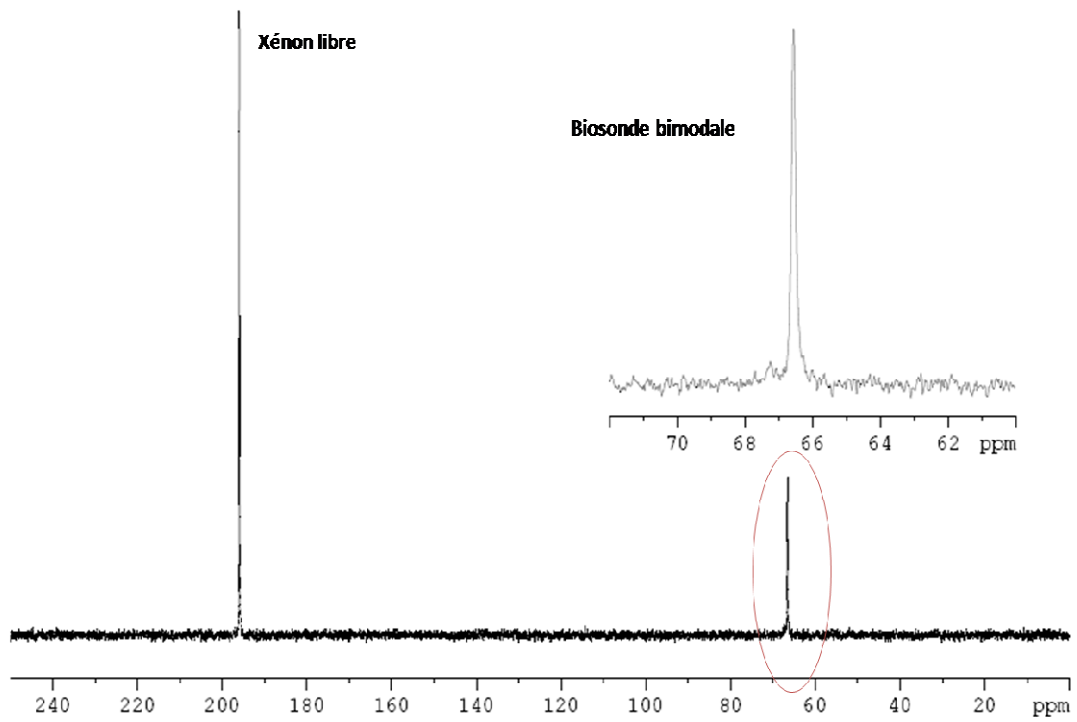


Figure 100 : Spectre RMN- ^{129}Xe hyperpolarisé de la biosonde NTA (D2O pH=7,4 T=293K)

ANNEXE 8 : Tests statistiques

A. Test de Shapiro-Wilk

Il teste l'hypothèse nulle selon laquelle un échantillon x_1, \dots, x_n est issu d'une population normalement distribuée.

Il est basé sur la statistique W et est particulièrement puissant pour les petits effectifs ($n \leq 50$).

Etape de réalisation du test :

1. Trier les n valeurs par ordre de grandeur croissante : $x_1 \leq x_2 \leq x_3 \dots \leq x_n$
2. Calculer la somme des carrés des écarts (SCE) : $SCE = \sum (x_i - \bar{x})^2$
3. Calculer différences $d_i = x_{n-i+1} - x_i$
4. Calculer $b = \sum (a_i d_i)$

Les coefficients a_i sont donnés dans une table en fonction de n et i (Figure 101).

5. Calculer $W = \frac{b^2}{SCE}$
6. Comparer W à $W_{1-\alpha, n}$ ($=W_{crit}$)

$W_{1-\alpha, n}$ est trouvé dans la table de Shapiro-Wilk en fonction du risque d'erreur α et de la taille de l'échantillon (le nombre d'observations) n (Figure 102).

si $W < W_{1-\alpha, n}$ la distribution ne suit pas une loi normale

si $W \geq W_{1-\alpha, n}$ la distribution suit une loi normale

a) Résultats numériques

$n = 30$

$SCE = 1,51$

$b^2 = 1,57$

$W = 1,037$

Pour un risque $\alpha = 0,05$ le seuil critique lu dans la table pour $n = 30$ est $W_{crit} = 0,927$

On a donc $W > W_{crit}$, on accepte donc au risque de 5% l'hypothèse de normalité de la distribution statistique donnée.

table des coefficients a_i pour le test W de Shapiro-Wilk
(Biometrika 1965)

$n \backslash i$	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0,664 6	0,643 1	0,623 3	0,605 2	0,588 8	0,573 9	0,560 1	0,547 5	0,535 9	0,525 1	0,515 0
2	0,241 3	0,280 6	0,303 1	0,316 4	0,324 4	0,329 1	0,331 5	0,332 5	0,332 5	0,331 8	0,330 6
3	0,000 0	0,087 5	0,140 1	0,174 3	0,197 6	0,214 1	0,226 0	0,234 7	0,241 2	0,246 0	0,249 5
4			0,000 0	0,055 1	0,094 7	0,122 4	0,142 9	0,158 6	0,170 7	0,180 2	0,187 8
5					0,000 0	0,039 9	0,069 5	0,092 2	0,109 9	0,124 0	0,135 3
6							0,000 0	0,030 3	0,053 9	0,072 7	0,088 0
7									0,000 0	0,024 0	0,043 3
8											0,000 0

$n \backslash i$	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
1	0,432 8	0,429 1	0,425 4	0,422 0	0,418 8	0,415 6	0,412 7	0,409 5	0,406 8	0,404 0	0,401 5
2	0,299 2	0,295 8	0,294 4	0,292 1	0,289 8	0,287 6	0,285 4	0,283 4	0,281 3	0,279 4	0,277 4
3	0,251 0	0,249 9	0,248 7	0,247 5	0,245 3	0,245 1	0,243 9	0,242 7	0,241 5	0,240 3	0,239 1
4	0,215 1	0,215 0	0,214 8	0,214 5	0,214 1	0,213 7	0,213 2	0,212 7	0,212 1	0,211 6	0,211 0
5	0,185 7	0,186 4	0,187 0	0,187 4	0,187 8	0,188 0	0,188 2	0,188 3	0,188 3	0,188 3	0,188 1
6	0,160 1	0,161 6	0,163 0	0,164 1	0,165 1	0,166 0	0,166 7	0,167 3	0,167 8	0,168 3	0,168 6
7	0,137 2	0,139 5	0,141 5	0,143 3	0,144 9	0,146 3	0,147 5	0,148 7	0,149 6	0,150 5	0,151 3
8	0,116 2	0,119 2	0,121 9	0,124 3	0,126 5	0,128 4	0,130 1	0,131 7	0,133 1	0,134 4	0,135 6
9	0,096 5	0,100 2	0,103 6	0,106 6	0,109 3	0,111 8	0,114 0	0,116 0	0,117 9	0,119 5	0,121 1
10	0,077 8	0,082 2	0,086 2	0,089 9	0,093 1	0,096 1	0,098 8	0,101 3	0,103 6	0,105 6	0,107 5
11	0,059 8	0,065 0	0,069 7	0,073 9	0,077 7	0,081 2	0,084 4	0,087 3	0,090 0	0,0 2 4	0,094 7
12	0,042 4	0,048 3	0,053 7	0,058 5	0,062 9	0,066 9	0,070 5	0,073 9	0,077 0	0,079 8	0,082 4
13	0,025 3	0,032 0	0,038 1	0,043 5	0,048 5	0,053 0	0,057 2	0,061 0	0,064 5	0,067 7	0,070 6
14	0,008 4	0,015 9	0,022 7	0,028 9	0,034 4	0,039 5	0,044 1	0,048 4	0,052 3	0,055 9	0,059 2
15		0,000 0	0,007 6	0,014 4	0,020 6	0,026 2	0,031 4	0,036 1	0,040 4	0,044 4	0,048 1
16				0,000 0	0,006 8	0,013 1	0,018 7	0,023 9	0,028 7	0,033 1	0,037 2
17						0,000 0	0,005 2	0,011 9	0,017 2	0,022 0	0,026 4
18								0,000 0	0,005 7	0,011 0	0,015 8
19										0,000 0	0,005 3

Figure 101 : Table des coefficients a_i

**Table 4b : table des valeurs limites W_α de $W = \frac{b^2}{Z^2}$
pour les risques $\alpha = 5 \%$ et 1%
(Biometrika 1965)**

n	Risque 5 %	Risque 1 %
	$W_{0,05}$	$W_{0,01}$
5	0,762	0,686
6	0,788	0,713
7	0,803	0,730
8	0,818	0,749
9	0,829	0,764
10	0,842	0,781
11	0,850	0,792
12	0,859	0,805
13	0,866	0,814
14	0,874	0,825
15	0,881	0,835
16	0,887	0,844
17	0,892	0,851
18	0,897	0,858
19	0,901	0,863
20	0,905	0,868
21	0,908	0,873
22	0,911	0,878
23	0,914	0,881
24	0,916	0,884
25	0,918	0,888
26	0,920	0,891
27	0,923	0,894
28	0,924	0,896
29	0,926	0,898
30	0,927	0,900
31	0,929	0,902
32	0,930	0,904
33	0,931	0,906
34	0,933	0,908
35	0,934	0,910
36	0,935	0,912
37	0,936	0,914
38	0,938	0,916
39	0,939	0,917
40	0,940	0,919
41	0,941	0,920
42	0,942	0,922
43	0,943	0,923
44	0,944	0,924
45	0,945	0,926
46	0,945	0,927
47	0,946	0,928
48	0,947	0,929
49	0,947	0,929
50	0,947	0,930

Figure 102 : Table de shapiro Wilk pour W_a avec $\alpha= 5$ et 1%

B. Test de Fisher

Ce test consiste à définir le domaine de concentration où on peut affirmer, avec un faible risque d'erreur, que le modèle d'étalonnage est bien linéaire.

La méthode proposée pour réaliser cette vérification utilise des concepts introduits par la méthode des moindres carrés. Ce test est basé sur l'analyse de variance et consiste à décomposer la somme des carrés des écarts des réponses, notée SCE_y , selon l'équation suivante :

$$\underbrace{\sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2}_{SCE_y} = \underbrace{\sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}_{SCE_e} + \underbrace{\sum_i n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}_{SCE_{em}} + \underbrace{\sum_i n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}_{SCE_{reg}} \quad (8-1)$$

avec i : numéro du niveau d'étalonnage, varie de 1 à p

j : numéro de répétition, varie selon le niveau d'étalonnage de 1 à n_i

\bar{y} : moyenne sur i et j des y_{ij}

\bar{y}_i : moyenne sur j des y_{ij}

\hat{y}_i : valeur théorique de y_i .

SCE_{reg} représente la somme de carrés des écarts due à la régression et SCE_{em} celle due à une erreur de modèle. Dans ce cas, SCE_{em} sera interprétée comme une mesure de la non-linéarité puisque le modèle choisi est une droite mais ce test est applicable à tout type de modèle. SCE_e désigne la somme de carrés des écarts due à l'erreur pure.

On réalise les calculs selon le Tableau 27 et on vérifie :

- si la valeur de F_{reg} définie dans le tableau est supérieure à la valeur limite lue dans la table de Fisher (Figure 103) pour $F_{(1-\alpha; dd1, dd2)}$ soit $F_{1\%, 1, N-p}$, on peut conclure que la régression explique bien une grande partie de la variation. C'est une conclusion normale puisque les variations de x sont censées expliquer celle de y ;
- si la valeur de F_{em} est inférieure à la valeur limite lue dans la table de Fisher (Figure 103) pour $F_{(1-\alpha; dd1, dd2)}$ soit $F_{1\%, p-2, N-p}$, on peut conclure qu'il n'y a pas de courbure et accepter la gamme étalon choisie comme domaine de linéarité.

Sources de variation	Somme de carrés des écarts	Degrés de liberté	Variances	F de Fisher
Régression	SCE_{reg}	1	$V_{reg} = SCE_{reg}$	$F_{reg} = \frac{V_{reg}}{V_e}$
Erreur de modèle	SCE_{em}	$p - 2$	$V_{em} = \frac{SCE_{em}}{p - 2}$	$F_{em} = \frac{V_{em}}{V_e}$
Erreur pure ou résiduelle	SCE_e	$N - p$	$V_e = \frac{SCE_e}{N - p}$	
Total	SCE_y	$N - 1$		

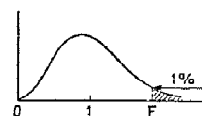
Tableau 27 : Calculs des différentes SCE et variances avec N = nombre total des mesures et p = nombre de niveaux

298

TABLE 5 C

Table de F (point 1 %) (*)

La table donne la limite supérieure de $F = \frac{s_A^2}{s_B^2}$ pour le risque 1 % (valeur ayant 1 chance sur 100 d'être égalée ou dépassée), en fonction des nombres de degrés de liberté l_A et l_B .



$l_B \backslash l_A$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	4052	4999,5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94
11	9,65	7,21	6,22	5,67	5,32	5,07	4,89	4,74	4,63
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72
120	6,85	4,79	3,95	3,48	3,17	2,96	2,79	2,66	2,56
∞	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41

Figure 103 : Table de Fisher au risque alpha de 1% avec $l_A=ddl1$ et $l_B=ddl2$

C. Test de Cochran

Le test de *Cochran* a pour objet la vérification de l'homogénéité des variances concernant plusieurs populations.

Soit un ensemble de p écarts-types s_i , tous calculés à partir du même nombre (n) de résultats de réplique sous des conditions de répétabilité, la statistique de Cochran C est :

$$C_{\text{cal}} = \frac{s_{\text{max}}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (8-2)$$

Avec s_{max} l'écart-type le plus élevé de l'ensemble.

Le critère de Cochran ne teste que la plus forte valeur d'un ensemble d'écarts-types et est donc un test unilatéral de valeur aberrante.

Les critères d'acceptation sont:

- Si la statistique du test est inférieure ou égale à sa valeur critique à 5% l'individu testé est accepté comme étant correct.
- Si la statistique du test est supérieure à sa valeur critique à 5% et inférieure ou égale à sa valeur critique à 1%, l'individu testé est appelé valeur isolée et signalé par un simple astérisque.
- Si la statistique du test est supérieure à sa valeur critique à 1%, l'individu testé est appelé valeur statistique aberrante et est signalé avec un double astérisque.

La valeur tabulée $C_{\text{tab}(\alpha,p,n)}$ correspond à la valeur critique et lu dans la table (Figure 104) aux risques $\alpha = 1$ et 5% avec n le nombre de répétition et p le nombre de série.

Tableau 4 — Valeurs critiques pour le test de Cochran

p	n = 2		n = 3		n = 4		n = 5		n = 6	
	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %	1 %	5 %
2	—	—	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,872
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,243
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120
32	0,347	0,280	0,229	0,188	0,181	0,151	0,155	0,131	0,138	0,117
33	0,339	0,273	0,224	0,184	0,177	0,147	0,151	0,127	0,134	0,114
34	0,332	0,267	0,218	0,179	0,172	0,144	0,147	0,124	0,131	0,111
35	0,325	0,262	0,213	0,175	0,168	0,140	0,144	0,121	0,127	0,108
36	0,318	0,256	0,208	0,172	0,165	0,137	0,140	0,118	0,124	0,106
37	0,312	0,251	0,204	0,168	0,161	0,134	0,137	0,116	0,121	0,103
38	0,306	0,246	0,200	0,164	0,157	0,131	0,134	0,113	0,119	0,101
39	0,300	0,242	0,196	0,161	0,154	0,129	0,131	0,111	0,116	0,099
40	0,294	0,237	0,192	0,158	0,151	0,126	0,128	0,108	0,114	0,097

p = nombre de laboratoires à un niveau donné
n = nombre de résultats d'essai par cellule (voir 7.3.3.3)

Figure 104 : Table de Cochran avec p le nombre de séries et n le nombre de répétitions

D. Test de Grubbs

Le test de *Grubbs* permet le rejet de deux points aberrants dans une série de mesures ou le rejet d'une ou de deux moyennes par rapport à la moyenne générale.

Soit un ensemble de données x_i pour $i = 1, 2, \dots, p$, rangées en ordre croissant, alors pour déterminer si la plus grande observation, est une valeur aberrante en utilisant le test de Grubbs, calculer la statistique de Gubbs, G_p :

$$G_{\max} = \frac{(x_{\max} - \bar{x})}{s} \quad (8-3)$$

Où

$$\bar{x} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_i \quad (8-4)$$

et

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2} \quad (8-5)$$

Pour tester la signification de la plus petite observation, calculer la statistique du test :

$$G_{\min} = \frac{(\bar{x} - x_{\min})}{s} \quad (8-6)$$

- Si la statistique du test est inférieure ou égale à sa valeur critique à 5%, l'individu testé est accepté comme étant correct.
- Si la statistique du test est supérieure à sa valeur critique à 5% et inférieure ou égale à sa valeur critique à 1%, l'individu testé est appelé valeur isolée et est signalé par un simple astérisque.
- Si la statistique du test est supérieure à sa valeur critique à 1%, l'individu testé est appelé valeur statistique aberrante et est signalé avec un double astérisque.

La valeur tabulée $C_{\text{tab}(\alpha,p)}$ correspond à la valeur critique et lu dans la table (Figure 105) aux risques $\alpha = 1$ et 5% p le nombre de série.

Tableau 5 — Valeurs critiques pour le test de Grubbs

p	Une plus grande ou une plus petite		Deux plus grandes ou deux plus petites	
	Supérieur 1 %	Supérieur 5 %	Inférieur 1 %	Inférieur 5 %
3	1,155	1,155	—	—
4	1,496	1,481	0,000 0	0,000 2
5	1,764	1,715	0,001 8	0,009 0
6	1,973	1,887	0,011 6	0,034 9
7	2,139	2,020	0,030 8	0,070 8
8	2,274	2,126	0,056 3	0,110 1
9	2,387	2,215	0,085 1	0,149 2
10	2,482	2,290	0,115 0	0,186 4
11	2,564	2,355	0,144 8	0,221 3
12	2,636	2,412	0,173 8	0,253 7
13	2,699	2,462	0,201 6	0,283 6
14	2,755	2,507	0,228 0	0,311 2
15	2,808	2,549	0,253 0	0,336 7
16	2,852	2,585	0,276 7	0,360 3
17	2,894	2,620	0,299 0	0,382 2
18	2,932	2,651	0,320 0	0,402 5
19	2,968	2,681	0,339 8	0,421 4
20	3,001	2,709	0,358 5	0,439 1
21	3,031	2,733	0,376 1	0,455 6
22	3,060	2,758	0,392 7	0,471 1
23	3,087	2,781	0,408 5	0,485 7
24	3,112	2,802	0,423 4	0,499 4
25	3,135	2,822	0,437 6	0,512 3
26	3,157	2,841	0,451 0	0,524 5
27	3,178	2,859	0,463 8	0,536 0
28	3,199	2,876	0,475 9	0,547 0
29	3,218	2,893	0,487 5	0,557 4
30	3,236	2,908	0,498 5	0,567 2
31	3,253	2,924	0,509 1	0,576 6
32	3,270	2,938	0,519 2	0,585 6
33	3,286	2,952	0,528 8	0,594 1
34	3,301	2,965	0,538 1	0,602 3
35	3,316	2,979	0,546 9	0,610 1
36	3,330	2,991	0,555 4	0,617 5
37	3,343	3,003	0,563 6	0,624 7
38	3,356	3,014	0,571 4	0,631 6
39	3,369	3,025	0,578 9	0,638 2
40	3,381	3,036	0,586 2	0,644 5

Reproduit, avec la permission de l'American Statistical Association, de la référence [4] en annexe C.

p = nombre de laboratoires à un niveau donné

Figure 105 : Table de Grubbs aux risques α de 1 et 5% avec p le nombre de série.

b) Résultats numériques

Les valeurs numériques obtenues sur les 3 niveaux de concentrations testés sont présentés dans les tableaux ci-dessous avec :

A_i moyenne par série

S_i écarts-types par série

S_i^2 variance par série

n_i le nombre de répétition par série

S_r^2 est la variance de répétabilité et correspond à la moyenne des variances S_i^2

S_r est l'écart-type de répétabilité et correspond à la moyenne des écarts-types S_i

R limite de répétabilité (en mg.L^{-1} et en %)

S_d^2 somme des $n_i \cdot (A_i - \text{moy} A_i)^2$

$S_r^2 = (S_d^2 - S_r^2)/n$ avec $n = 5$

S_R^2 est la variance de reproductibilité intra-laboratoire et est égale à la somme du S_i^2 et du S_r^2

S_R est l'écart-type de reproductibilité intra-laboratoire et est égale à $\sqrt{S_R^2}$

R limite de reproductibilité intra-laboratoire (en mg.L^{-1} et en %)

Données brutes et traitement statistique à la concentration de 49,5 mg.L⁻¹

P séries	Conditions	A1	Moyenne notée Ai	Si	Si ²	(Ai-moyAi) ²	n _i .(Ai-moyAi) ²
Série 1	op1 j1 sol1 cal1	56,95	53,29	3,61	13,06	7,43	37,13
		54,19					
		54,80					
		47,31					
		53,21					
Série 2	op2 j2 sol2 cal1	46,52	48,35	2,65	7,05	4,91	24,54
		49,81					
		52,17					
		45,59					
		47,68					
Série 3	op1 j3 sol3 cal2	47,97	48,97	3,67	13,50	2,55	12,74
		48,62					
		55,24					
		45,63					
		47,40					
Série 4	op2 j4 sol4 cal2	47,87	51,65	3,46	12,00	1,18	5,90
		50,58					
		56,16					
		49,36					
		54,29					

TEST DE COCHRAN			
Variance max	Somme Si ²	C _{cal}	C _{tab} (p=4,n=5,5%)
13,50	45,61	0,296	0,629
Conclusion	Les variances sont homogènes au risque alpha de 5%		

TEST DE GRUBBS			
Moyenne Ai	50,57	Ecartype des Ai	2,31
Moyenne Min		Moyenne Max	
48,35		53,29	
Gmin	0,96	Gmax	1,18
Valeur tabulée pour p=4 à α = 5%		1,481	
Conclusion	Les moyennes sont correctes au risque alpha de 5%		

REPETABILITE			
S _r ²	S _r	r en mg/L	r en %
11,40	3,38	9,56	6,68
REPRODUCTIBILITE intralaboratoire			
S _d ²	80,31	S _i ²	13,78
S _R ²	S _R	R en mg/L	R en %
25,18	5,02	14,20	9,92

Données brutes et traitement statistique à la concentration de 84,8 mg.L⁻¹

P séries	Conditions	A1	Moyenne notée Ai	Si	Si ²	(Ai-moyAi) ²	n _i .(Ai-moyAi) ²
Série 1	op1	71,77	78,98	5,62	31,64	1,70	8,50
		82,12					
	j1	76,02					
	sol1	86,45					
	cal1	78,57					
Série 2	op2	70,21	76,31	4,94	24,37	15,79	78,95
		73,18					
	j2	81,67					
	sol2	80,92					
	cal1	75,60					
Série 3	op1	78,66	82,12	2,28	5,22	3,35	16,75
		84,89					
	j3	81,53					
	sol3	82,59					
	cal2	82,93					
Série 4	op2	78,27	83,74	5,90	34,75	11,88	59,41
		82,89					
	j4	89,42					
	sol4	90,21					
	cal2	77,89					

TEST DE COCHRAN			
Variance max	Somme Si ²	C _{cal}	C _{tab} (p=4,n=5,5%)
34,75	95,98	0,362	0,629
Conclusion	Les variances sont homogènes au risque alpha de 5%		

TEST DE GRUBBS			
Moyenne Ai	80,29	Ecartype des Ai	3,30
Moyenne Min	Moyenne Max		
76,31	83,74		
Gmin	1,20	Gmax	1,04
Valeur tabulée pour p=4 à α = 5%	1,481		
Conclusion	Les moyennes sont correctes au risque alpha de 5%		

REPETABILITE			
S _r ²	S _r	r en mg/L	r en %
24,00	4,90	13,86	6,10
REPRODUCTIBILITE intralaboratoire			
S _d ²	54,54	S _i ²	6,11
S _R ²	S _R	R en mg/L	R en %
30,10	5,49	15,53	6,83

Données brutes et traitement statistique à la concentration de 141,4 mg.L⁻¹

P séries	Conditions	A1	Moyenne notée Ai	Si	Si ²	(Ai-moyAi) ²	n _i .(Ai-moyAi) ²
Série 1	op1	142,30	142,51	7,07	50,00	77,97	389,83
		151,39					
	j1	131,62					
	sol1	143,43					
	cal1	143,79					
Série 2	op2	146,85	157,33	14,09	198,52	35,90	179,48
		180,31					
	j2	154,78					
	sol2	159,42					
	cal1	145,28					
Série 3	op1	164,27	154,00	14,99	224,71	7,07	35,36
		152,60					
	j3	168,34					
	sol3	154,95					
	cal2	129,82					
Série 4	op2	143,27	151,52	8,95	80,04	0,03	0,16
		143,86					
	j4	157,39					
	sol4	163,91					
	cal2	149,14					

TEST DE COCHRAN			
Variance max	Somme Si ²	C _{cal}	C _{tab} (p=4,n=5,5%)
224,71	553,26	0,406	0,629
Conclusion	Les variances sont homogènes au risque alpha de 5%		

TEST DE GRUBBS			
Moyenne Ai	151,34	Ecartype des Ai	6,35
Moyenne Min	Moyenne Max		
142,51	157,33		
Gmin	1,39	Gmax	0,94
Valeur tabulée pour p=4 à α = 5%	1,481		
Conclusion	Les moyennes sont correctes au risque alpha de 5%		

REPETABILITE			
S _r ²	S _r	r en mg/L	r en %
138,32	11,76	33,28	7,77
REPRODUCTIBILITE intralaboratoire			
S _d ²	201,61	S _r ²	12,66
S _R ²	S _R	R en mg/L	R en %
150,97	12,29	34,77	8,12

Bibliographie

- ¹Bekers O., Beijnen J.H., Klein Tank M.J.T., Bult A. and Underberg W.J.M., "Effect of cyclodextrins on the chemical stability of mitomycins in alkaline solution", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1991**, 9, 1055-1060.
- ²Bhardwaj R, Dorr R.T. and Blanchard J., "Approaches to Reducing Toxicity of Parenteral Anticancer Drug Formulations Using Cyclodextrins", *J. Pharm. Sci. Technol.*, **2000**, 54, 233-239.
- ³Kamiya M., Kameyama K. and Ishiwata S., "Effects of cyclodextrins on photodegradation of organophosphorus pesticides in humic water", *Chemosphere*, **2001**, 42, 251-255.
- ⁴Lu X. and Chen Y., Chiral separation of amino acids derivatized with fluoresceine-5-isothiocyanate by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection using mixed selectors of β -cyclodextrin and sodium taurocholate", *J. Chromatography A*, **2002**, 955, 133-140.
- ⁵Cramer F., "Einschlußverbindungen", *Angew. Chem.*, **1952**, 64, 437-447.
- ⁶Cramer F. and Henglein F.M., "Über Einschlußverbindungen, XII. Verbindungen von α -Cyclodextrin mit Gasen", *Chem. Ber.*, **1957**, 90, 2572-2575.
- ⁷Gutsche C.D. and Muthukrishnan R., "Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalysed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols", *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 4905-4906.
- ⁸Oshimaa T., Suetsugu A., Babaa Y., Shikaze Y., Ohto K. and Inoue K, "liquid membrane transport of cytochrome c using a calix[6]arene carboxylic acid derivative as a carrier", *Journal of Membrane Science*, **2008**, 307, 284-291.
- ⁹Evans C.J. and Nicholson G.P., "A self-assembled electrochemical sensor for uranium", *Sensors and Actuators B*, **2005**, 105, 204-207.
- ¹⁰ Dozol J.F, "New macrocyclic extractants for radioactive waste treatment : ionizable crown ethers and functionalized calixarenes Eur 17615", Luxembourg : European Commission, **1997**, 189 p (Nuclear science and technology)
- ¹¹ Qureshi I., Memon S. and Yilmaz M., "An excellent arsenic(V) sorption behavior of p-tert-butylcalix[8]areneoctamide impregnated resin", *C. R. Chimie*, **2010**, 13, 1416–1423.

- ¹²Sokoließ T., Menyes U., Roth U. and Jira T., "Separation of *cis*- and *trans*-isomers of thioxanthene and dibenz[*b,e*]oxepin derivatives on calixarene- and resorcinarenebonded high-performance liquid chromatography stationary phases", *Journal of Chromatography A*, **2002**, 948, 309–319.
- ¹³Cram D.J., Tanner M.E. and Knobler C.B., "Host-guest complexation. 58. Guest release and capture by hemicarcerands introduces the phenomenon of constrictive binding", *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 7717-7727.
- ¹⁴Jankowska K.I., Pagba C.V., Piatnitski Chekler E.L., Deshayes K., and Piotrowiak P., "Electrostatic Docking of a Supramolecular Host-Guest Assembly to Cytochrome *c* Probed by Bidirectional Photoinduced Electron Transfer", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16423–16431.
- ¹⁵Leontiev A.V., Saleh A.W. and Rudkevich D.M., "Hydrophobic Encapsulation of Hydrocarbon Gases", *Organics letter*, **2007**, 9, 1753-1755.
- ¹⁶Gabard J. and Collet A., "Synthesis of a (D3)-Bis(cyclotrimeratrylenyl) macrocage by stereospecific replication of a (C3)-subunit", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1981**, 1137-1139.
- ¹⁷Benounis M., Jaffrezic-Renault N., Dutasta J.-P., Cherif K. and Abdelghani A., "Study of a new evanescent wave optical fiber sensor for methane detection based on cryptophane molecules", *Sens. Actuators B*, **2005**, 107, 32-39.
- ¹⁸Chaffee K.E., Fogarty H. A., Brotin T., Goodson B. M., and Dutasta J.P., "Encapsulation of Small Gas Molecules by Cryptophane-111 in Organic Solution. 1. SizeandShape-Selective Complexation of Simple Hydrocarbons", *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113, 13675–13684.
- ¹⁹Kotera N., Delacour L., Traore T., Tassali N., Berthault P., Buisson D-A., Dognon J-P., and Rousseau B., "Design and Synthesis of New Cryptophanes with Intermediate Cavity Sizes", *Organic letters*, **2011**, 13, 2153-2155.
- ²⁰Berthault P. Bogaert-Buchmann A., Desvaux H., Huber G., and Boulard Y., "Sensitivity and Multiplexing Capabilities of MRI Based on Polarized ¹²⁹Xe Biosensors", *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 16456–1645
- ²¹Kim J., Jung I.-S., Kim S.-Y., Lee E., Kang J.-K., Sakamoto S., Yamaguchi K. and Kim K., "New Cucurbituril Homologues: Syntheses, Isolation, Characterization, and X-ray Crystal Structures of Cucurbit[*n*]uril (*n* = 5, 7, and 8)", *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 540.
- ²²Behrend R., Meyer E. and Rusche F., "Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd", *Just.Liebigs Ann. Chem.*, **1905**, 339, 1-37.

- ²³ Freeman W.A., Mock W. L. and Shih N.-Y., "Cucurbituril", *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 7367-7368.
- ²⁴ Isaacs L., "Cucurbit[n]urils: from mechanism to structure and function", *Chem. Commun.*, **2009**, 619–629.
- ²⁵ Lagona J., Mukhopadhyay P., Chakrabarti S., and Isaacs L., "The Cucurbit[n]uril Family", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 4844 - 4870.
- ²⁶ Kim K., Jeon Y. J., Kim S. Y. and Ko Y. H., "Inclusion compound comprising derivatives as host molecule and pharmaceutical composition comprising the same", *PCT Int. Appl.*, **2003**, WO 03/24978,1-24.
- ²⁷ Kim H.-J., Heo J., Jeon W. S., Lee E., Kim J., Sakamoto, S., Yamaguchi K., and Kim K., "Selective Inclusion of a Hetero-Guest Pair in a Molecular Host: Formation of Stable Charge-Transfer Complexes in Cucurbit[8]uril", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 1526-1529.
- ²⁸ Buschmann, H.-J., Cleve E., Jansen K., Wego A. and Schollmeyer E., "Complex Formation between Cucurbit[n]urils and Alkali, Alkaline Earth and Ammonium Ions in Aqueous Solution", *E. J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, **2001**, 40, 117-120.
- ²⁹ Liu S. M., Xu L., Wu C.T. and Feng Y.Q., "Preparation and characterization of perhydroxyl-cucurbit[6]uril bonded silica stationary phase for hydrophilic-interaction chromatography", *Talanta*, **2004**, 64, 929.
- ³⁰ Cheong W. J., Go J. H., Baik Y. S., Kim S.S., Nagarajan E.R., Selvapalam N., Ko Y. H. and Kim K., "Preparation of Cucurbituril Anchored Silica Gel by Cross Polymerization and Its Chromatographic Applications", *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2008**, 29, 1941-1945.
- ³¹ Kim B.S., Ko Y.H., Kim Y., Lee H.J., Selvapalam N., Lee H.C. and Kim K., "Water soluble cucurbit[6]uril derivative as a potential Xe carrier for ¹²⁹Xe NMR-based biosensors", *Chem. Commun.*, **2008**, 2756-2758.
- ³² Desvaux H., Gautier T., Le Goff G., Pétro M. and Berthault P., "Direct evidence of a magnetization transfer between laser-polarized xenon and protons of a cage-molecule in water", *Eur. Phys. J. D.*, **2000**, 12, 289-296.
- ³³ Swanson S.D., Rosen M.S., Agranoff B.W., Coulter K.P., Welsh R.C., Chupp T.E., "Brain MRI with laser-polarized ¹²⁹Xe", *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 38, 695.

- ³⁴ Mugler J.P., Driehuys B., Brookeman J.R., Cates G.D., Berr S.S., Bryant R.G., Daniel T.M., de Lange E.E., Downs J.H., Erickson C.J., Happer W., Hinton D.P., Kassel N.F., Maier T., Phillips D., Saam B.T., Sauer K.L. and Wagshul M.E., "MR imaging, spectroscopy using hyperpolarized ¹²⁹Xe gas: preliminary human results", *Magn. Reson. Med.*, **1997**, 37, 809.
- ³⁵ Spence M.M., Rubin S.M., Dimintrov I.E., Ruiz E.J., Wemmer D.E., and Pines A., "Functionalized xenon as biosensor", *P.N.A.S.*, **2001**, 98, 19, 10654-10657.
- ³⁶ Dalgliesh C.E., "The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms", *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 3940-3942.
- ³⁷ Fogarty H. A., Berthault P., Brotin T., Huber G., Desvaux H., and Dutasta J-P., "A Cryptophane Core Optimized for Xenon Encapsulation", *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 10332–10333.
- ³⁸ Buszewski B. and Noga S., "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique", *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, Online First™ 31 August 2011.
- ³⁹ Scott R.P.W. and Kucera P., "Some aspects of preparative-scale liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, **1976**, 119, 467-482.
- ⁴⁰ Freeman W.A., Mock W. L. and Shih N.-Y., "Cucurbituril", *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 7367-7368.
- ⁴¹ Zhao J., Kim H.J., Oh J., Kim S.Y., Lee J.W., Sakamoto S., Yamaguchi K., and Kim K., "Cucurbit[*n*]uril Derivatives Soluble in Water and Organic Solvents", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 22, 4233-4235.
- ⁴² Uzunova V.D., Cullinane C., Brix K., Nau W.M. and Day A.I., "Toxicity of cucurbit[7]uril and cucurbit[8]uril: an exploratory in vitro and in vivo study", *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 2037-2042.
- ⁴³ Ni X-L., Zhang Y-Q., Zhu Q-J., Xue S-F. and Tao Z., "Crystal structures of host-guest complexes of meta-trichlohexyl cucurbit[6]uril with small organic molecules", *Journal of molecular structure*, **2008**, 876, 322-327.
- ⁴⁴ Waters, "A review of waters hybrid particle technology", ACQUITY UPLC BEH Columns brochure, **2005**. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf>
- ⁴⁵ Wyndham K.D., O'Gara J.E., Walter T.H., Glose K.H., Lawrence N.L., Aldren B.A., Izzo G.S., Hudalla C.J., and Iranet P., "Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phase based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles", *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6781-6788.

- ⁴⁶Laboratoire de génie analytique, "Généralités" TPGAN114, CNAM, Chapitre II "La régression linéaire", **2009-2010**, p23-27.
- ⁴⁷ Norme XP T 90-220, **2003**, AFNOR.
- ⁴⁸ Norme ISO 5725-1 et 2, **2004**, AFNOR.
- ⁴⁹ Feinberg M., "validation interne des méthodes d'analyse", *Techniques de l'ingénieur*, **2001**, P224, 1-23.
- ⁵⁰ Lee J.W., Samal S., Selvapalam N., Kim H.J, and Kim K., "Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry", *Acc. Chem. Res.*, **2003**, 36, 621-630.
- ⁵¹ Fairchild R.M., Joseph A.L., Holman K. T., Fogarty H.A., Brotin T., Dutasta J-P., Boutin C., Huber G., and Berthault P., "A Water-Soluble Xe@cryptophane-111 Complex Exhibits Very High Thermodynamic Stability and a Peculiar 129Xe NMR Chemical Shift", "A Water-Soluble Xe@cryptophane-111 Complex Exhibits Very High Thermodynamic Stability and a Peculiar 129Xe NMR Chemical Shift", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15505–15507.
- ⁵² Traoré Ténin, "Synthèse de Nouvelles Molécules Cages et Applications pour l'Imagerie par RMN Xénon", Thèse de doctorat : Université Paris XI (Orsay), **2011**, 181 pages.
- ⁵³ Seward G. K., Wie Q. and Dmochowski I. J., "peptide-mediated cellular uptake of cryptophane", *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2129.
- ⁵⁴ Huber G., Beguin L., Desvaux H., Brotin T., Fogarty H.A., Dutasta J-P. and Berthault P., "Cryptophane-xenon complexes in organic solvents observed through NMR spectroscopy", *J Phys Chem A.*, **2008**, 112, 11363-72.
- ⁵⁵ Walker T.G. and Happer W., "Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei", *Rev. Mod. Phys.*, **1997**, 69, 629-642.
- ⁵⁶ Navon G., Song Y.-Q., Room T., Appelt S., Taylor R. E. and Pines A., "Enhancement of Solution NMR and MRI with Laser-Polarized Xenon" *Science*, **1996**, 271, 1848-1891.
- ⁵⁷ Kastler A., "Quelques suggestions concernant la production optique et la détection optique d'une inégalité de population des niveaux de quantification spatiale des atomes. Application à l'expérience de Stern et Gerlach et à la résonance magnétique", **1950**, *J. Phys. Radium.*, 11, 255-265.
- ⁵⁸ Caude M. et Jardy A., "Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation", *Techniques de l'Ingénieur*, **1994**, P1455, 1-47.

L'imagerie médicale (IRM) est devenue un outil indispensable au diagnostic d'un grand nombre de pathologies. De nouvelles méthodes utilisant des gaz nobles hyperpolarisés (^{129}Xe , ^3He) ont été développées et ont prouvé leur efficacité pour augmenter la sensibilité de l'IRM. Grâce à son caractère hydrophobe, le xénon hyperpolarisé peut être encapsulé et transporté dans des molécules cages destinées à cibler des récepteurs biologiques. Plusieurs de ces molécules ont été synthétisées au laboratoire puis fonctionnalisées afin d'obtenir des biosondes hydrosolubles.

Ce mémoire porte sur le développement et l'optimisation de méthodes séparatives utilisant des techniques couplées (LC-MS-UV-DEDL) pour caractériser deux catégories de molécules cages : les cucurbiturils et les cryptophanes. Ces optimisations conduisent dans une première partie à la purification des cucurbiturils mixtes CB6Cy[n] avec $n=1$ à 6. De plus, une méthode de dosage par étalonnage interne validée par des critères de performance, a permis de quantifier les CB6Cy[n] issus de synthèses variées, et de déterminer les rendements de synthèse ainsi que la solubilité de ces composés dans l'eau.

La deuxième partie est consacrée à l'étude des propriétés chirales des cryptophanes ainsi qu'à la purification de deux biosondes xénon à base de cryptophanes fonctionnalisés destinées à des applications médicales.

À l'issue de ces purifications ces molécules ont fait l'objet d'études *in vitro* en RMN- ^{129}Xe confirmant la grande potentialité de cette approche.

Mots clés : IRM, xénon hyperpolarisé, LC-MS, cucurbituril, cryptophane, étalonnage.

SUMMARY

Medical imaging (MRI) has become an essential tool in the diagnosis of many diseases. New methods using hyperpolarized noble gases (^{129}Xe , ^3He) have been developed and have proven their efficiency in increasing the sensitivity of MRI. Due to its hydrophobic property, the hyperpolarized xenon can be trapped and transported within molecular capsules designed to target biological receptors. Some of those molecular hosts were synthesized in the laboratory and functionalized to obtain water-soluble biosensors.

The subject of this report is the optimization of separation methods (LC-UV-MS-ELSD) in order to characterize two types of molecular hosts: the cucurbiturils and cryptophanes. The first part of the document is devoted to the experiments concerning the purification of mixed cucurbiturils CB6Cy[n] with $n = 1-6$. Furthermore, CB6Cy [n] obtained from various synthetic routes were quantified using a method of internal calibration validated by performance criteria. Reaction yields and water solubility were also determined.

The second part of the document is devoted to the study of chiral properties of cryptophanes and the purification of two xenon-biosensors cryptophanes functionalized for medical applications.

After purifications, those cages were studied *in vitro* in the ^{129}Xe NMR experiments confirming the great potential of this approach.

Key words: MRI, hyperpolarized xenon, LC-MS, cucurbituril, cryptophane, calibration.