

Mémoire / Full Paper

# Nouveaux marqueurs de pH utilisables en RMN du $^{31}\text{P}$ . Détermination de la relaxation longitudinale en fonction de la structure chimique, de la température, du pH et du milieu biologique

Gaëlle Gosset<sup>a</sup>, Sophie Martel<sup>a</sup>, Jean-Louis Clément<sup>a</sup>, Bruno Blaive<sup>b</sup>,  
Gilles Olive<sup>a,c</sup>, Marcel Culcasi<sup>a</sup>, Roselyne Rosas<sup>d</sup>,  
André Thévand<sup>d</sup>, Sylvia Pietri<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Groupe « Sondes moléculaires en biologie », laboratoire SREP–CNRS–UMR 6517, faculté des sciences de Saint-Jérôme, universités d’Aix–Marseille-1 & 3, avenue Escadrille-Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France

<sup>b</sup> UMR 6178–Symbio, université Paul-Cézanne, centre scientifique de Saint-Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

<sup>c</sup> École industrielle et commerciale de la ville de Namur, rue Pépin, 2b, B-5000 Namur, Belgique

<sup>d</sup> Spectropole, université Paul-Cézanne, centre scientifique de Saint-Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

Reçu le 7 mai 2007 ; accepté après révision le 8 août 2007

Available online 4 December 2007

## Résumé

Une nouvelle série d’ $\alpha$ -aminophosphonates dérivés du (2-méthylpyrrolidin-2-yl) phosphonate de diéthyle a été obtenue par addition nucléophile de différents phosphites de dialkyle sur la 2-méthyl-1-pyrroline. Ces composés, testés *in vitro* pour leurs propriétés de marqueurs de pH en RMN du  $^{31}\text{P}$ , ont des  $\text{p}K_{\text{a}}$  proches de la neutralité ( $6,6 < \text{p}K_{\text{a}} < 7,0$ ), des déplacements chimiques dans la plage 21–35 ppm distincts de ceux des métabolites phosphorés, et sont trois à quatre fois plus sensibles ( $9,2 < \Delta\delta_{\text{ab}} < 9,9$  ppm) que des marqueurs usuels, tels que le phosphate inorganique ou le méthylphosphonate. Ce travail décrit la synthèse détaillée de trois composés sélectionnés, non toxiques dans le modèle du cœur de rat isolé perfusé. Les valeurs de  $1/T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) pour la série complète de 27  $\alpha$ -aminophosphonates de structures chimiques différentes ont été mesurées dans différentes conditions de milieu, de température et de pH. Les résultats laissent entrevoir une exceptionnelle aptitude à explorer les compartiments cellulaires acides. **Pour citer cet article :** G. Gosset *et al.*, *C. R. Chimie* 11 (2008).

© 2007 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## Abstract

**New highly sensitive pH probes for  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. Spin-lattice relaxation time measurements as a function of molecular structure, temperature, pH, and biological medium.** New uncharged  $\alpha$ -aminophosphonates derived from diethyl(2-methylpyrrolidin-2-yl) phosphonate were synthesized by nucleophilic addition of dialkylphosphites on 2-methyl-1-pyrroline.

*Abréviations :*  $\text{pH}_i$ , pH intracellulaire ;  $\delta_{\text{a}}$ , déplacement chimique en milieu acide ;  $\delta_{\text{b}}$ , déplacement chimique en milieu basique ;  $\Delta\delta_{\text{ab}}$ , différence de déplacement chimique entre les milieux acides et basiques ;  $\text{P}_i$ , phosphate inorganique ; ATP, adénosine triphosphate ; KH, milieu tampon de Krebs–Henseleit ; McyTC, milieu cytosolique cardiaque.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [pietri@srepir1.univ-mrs.fr](mailto:pietri@srepir1.univ-mrs.fr) (S. Pietri).

These compounds were intended as enhanced  $^{31}\text{P}$ -NMR pH probes in biological systems. Compared to standard pH markers such as inorganic phosphate or methylphosphonate, they demonstrated in vitro low acidic  $\text{p}K_{\text{a}}$  values ( $6.6 < \text{p}K_{\text{a}} < 7.0$ ), resonance peaks ranging from 21 to 35 ppm, distinct from those of phosphorylated metabolites, and 3–4 times as sensitive ( $9.2 < \Delta\delta_{\text{ab}} < 9.9$  ppm) as usual markers, such as inorganic phosphate or methylphosphonate. The detailed synthetic procedures for three representative new pH probes, which were non-toxic (in the mM range) in rat isolated heart preparations, was reported. In a larger series of 27 structurally related  $\alpha$ -aminophosphonates,  $1/T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) values were given in different conditions of milieu, temperature and pH. The data support unique features for these compounds to reveal acidic cellular compartments. **To cite this article:** G. Gosset et al., C. R. Chimie 11 (2008).

© 2007 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Mots-clés :**  $\alpha$ -aminophosphonate ; marqueur de pH ; RMN du  $^{31}\text{P}$  ; relaxation longitudinale ; systèmes biologiques ; compartiments acides

**Keywords:**  $\alpha$ -Aminophosphonates; pH probe;  $^{31}\text{P}$ -NMR; Spin–lattice relaxation; Biological systems; Acidic compartments

## 1. Introduction

Depuis une trentaine d'années, de nombreux travaux ont montré que la mesure des variations locales du pH dans la cellule est un élément clé dans l'avancée des connaissances du métabolisme des organismes vivants [1–3]. La régulation des pH intracellulaire ( $\text{pH}_{\text{i}}$ ) et extracellulaire, ainsi que de celui des compartiments acides ou organelles insérés dans les membranes, est indispensable au fonctionnement optimal d'un grand nombre d'enzymes [1–3]. Des défauts dans l'homéostasie du pH apparaissent très rapidement dans les situations physiopathologiques, ainsi qu'en témoignent les études portant sur la mesure du  $\text{pH}_{\text{i}}$  lors d'une ischémie [4], dans les tumeurs [5] ou les processus inflammatoires [6]. Des travaux récents ont montré l'importance de la régulation du pH au niveau subcellulaire, qui joue un rôle capital dans la signalisation cellulaire et l'apoptose [7,8]. Faisant suite aux travaux pionniers de Moon et Richards [9], qui, en 1973, ont utilisé le principe de la variation du déplacement chimique ( $\delta$ ) du phosphate inorganique principalement cytosolique ( $\text{P}_{\text{i}}$ ) avec le pH, la RMN du  $^{31}\text{P}$  est intensivement utilisée comme technique de mesure non invasive du  $\text{pH}_{\text{i}}$  [4,10]. Cependant, de nombreuses difficultés sont apparues, principalement liées à la trop faible variation de déplacement chimique ( $\Delta\delta_{\text{ab}}$ ) entre les formes acides ( $\delta_{\text{a}}$ ) et basiques ( $\delta_{\text{b}}$ ) du  $\text{P}_{\text{i}}$ , dont le  $\text{p}K_{\text{a}}$  de la seconde acidité est proche du pH physiologique. Ceci a pour conséquence de rendre peu sensible la mesure de faibles écarts de pH, tels que les gradients de pH intra- et extracellulaires [10]. De plus, la faible disponibilité du  $\text{P}_{\text{i}}$  dans le milieu extracellulaire tout comme dans certains compartiments et organelles ne permet pas localement d'accéder directement aux mesures de pH [11]. L'utilisation de marqueurs de pH synthétiques a donc été proposée, et tout

particulièrement celle de dérivés alkylés de l'acide phosphonique, tels que le méthylphosphonate (MeP) ou le phénylphosphonate (PheP); mais elle n'apportait pas d'amélioration significative de la sensibilité ( $\Delta\delta_{\text{ab}}$ ), ni de possibilité d'accès aux compartiments acides [10,12]. En revanche, l'utilisation de dérivés comportant une fonction amine, tels que l'aminométhylphosphonate ou le 2-aminoéthylphosphonate [13] a ouvert la voie vers l'étude des compartiments acides dans des préparations d'amibes *Dictyostelium discoideum* [14], puis de la mesure sélective des pH extracellulaire et cytosolique dans un modèle de foie isolé [15]. Le 3-aminopropylphosphonate, plus polaire, a été utilisé pour des déterminations de pH extracellulaire dans des cellules cancéreuses [16]. Dans la continuité de ces travaux, une nouvelle série de marqueurs de pH a été récemment développée afin (i) d'améliorer la pénétration intracellulaire et de permettre l'accès simultané aux compartiments intra- et extracellulaires ainsi qu'aux compartiments acides, (ii) d'accroître la sensibilité de la mesure du pH en augmentant la valeur  $\Delta\delta_{\text{ab}}$ , (iii) de disposer de molécules sensibles de différents  $\text{p}K_{\text{a}}$  et de différentes lipophilies [17,18]. Ces aminophosphonates offrent, grâce à la présence de substituants, une gamme de  $\text{p}K_{\text{a}}$  qui se situent entre 1,3 et 7 unités de pH, et présentent des valeurs  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  de trois à quatre fois supérieures à celles des marqueurs existants [13,17,18]. Un de ces composés, le (2-méthylpyrrolidin-2-yl) phosphonate de diéthyle (2;  $\text{p}K_{\text{a}}$  6,99) a déjà fait l'objet d'une étude par RMN du  $^{31}\text{P}$  dans le cœur et le foie isolés au décours de l'ischémie et de la reperfusion [19]. Ces travaux ont décrit la mesure simultanée des pH cytosolique et extracellulaire grâce à la distinction des pics de résonance de 2, ainsi que, dans le cas du foie, la première exploration directe du pH des compartiments acides [19]. Néanmoins, les compartiments acides cellulaires fonctionnent à un pH inférieur

à 5 [14,19], ce qui se situe dans la limite de précision que l'on peut obtenir avec le composé 2.

Le premier objectif de cette étude est donc de développer une nouvelle famille d'aminophosphonates, de  $pK_a$  proches de la neutralité, mais inférieurs à celui de 2, tout en gardant des valeurs de  $\Delta\delta_{ab}$  avantageuses, ceci en faisant varier les substituants sur le groupement phosphoré. Il faut en outre souligner que les études par RMN du  $^{31}\text{P}$ , tout particulièrement lorsqu'elles sont réalisées simultanément dans plusieurs milieux biologiques (tampon de perfusion, milieu extracellulaire, cytosol ou organelles) ou à température variable, exigent la détermination préalable des paramètres de relaxation des composés phosphorés étudiés. Ceci conditionne l'acquisition des spectres et la quantification éventuelle des métabolites détectés [1–3]. De très nombreux travaux ont été réalisés dans le domaine de la relaxation des composés phosphorés endogènes [20–23] ou des sondes de pH exogènes [24], afin d'étudier, par exemple, la compartimentation cellulaire ou les flux de métabolites tels que le  $\text{P}_i$ , l'ATP ou la créatine phosphate, ainsi que les variations des volumes cellulaires et de gradients de protons.

Poursuivant l'objectif de développer de nouvelles sondes de pH dont les temps de relaxation sont de même ordre de grandeur que ceux des composés phosphorés endogènes [20–23], le présent travail se propose, dans une seconde partie, de déterminer les temps de relaxation longitudinale du phosphore 31,  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ), pour une série de 27 aminophosphonates, incluant les nouvelles molécules, dans différentes conditions expérimentales, en faisant varier le milieu, le pH et la température. La vitesse de relaxation  $1/T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ), qui est elle-même dépendante du temps de corrélation de la molécule considérée  $\tau_c$ , sera étudiée en fonction de la masse moléculaire des molécules (M). Pour mieux étudier ce phénomène, cette étude rassemble cinq familles d'aminophosphonates cycliques et linéaires, mono et diposphorés, différemment substitués, dont les structures sont représentées sur la Fig. 1. Les valeurs de  $pK_a$  et  $\Delta\delta_{ab}$  originales pour douze molécules sont présentées. La synthèse et la caractérisation physicochimique et toxicologique des trois composés 1, 3 et 9, jugés particulièrement représentatifs de la nouvelle série, sont décrites en détail.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels

#### 2.1.1. Réactifs et solvants

Les produits chimiques utilisés pour la synthèse, les titrages ou les milieux tampons ou de perfusion

proviennent de Aldrich Chimie (Saint-Quentin-Fallavier, France) et sont utilisés sans purification préalable. De l'eau déionisée (ELGA, Purelab Option, France) est utilisée pour toutes les expériences de perfusion et de titrage. La synthèse et la caractérisation (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$ ) des aminophosphonates 2, 4, 10 à 27 ont été précédemment décrites [17,18,25,26], celle des molécules 5 à 8 sera décrite dans une publication ultérieure. La caractérisation par RMN des nouveaux aminophosphonates est obtenue sur un spectromètre Bruker Avance 300 MHz –  $^1\text{H}$  (300 MHz),  $^{31}\text{P}$  (121,49 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz) –, avec un découplage proton. Les valeurs des constantes de couplage  $J$  sont exprimées en Hz. Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS ( $^1\text{H}$ ) et  $\text{CDCl}_3$  ( $^{13}\text{C}$ ) ou à une solution à 85% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  dans l'eau ( $^{31}\text{P}$ , référence externe).

#### 2.1.2. Biologie

Les rats mâles de souche WISTAR proviennent de CERJ, France. Cette étude a été menée en conformité avec le *Guide of Care and Use of Laboratory Animals*, US Department of Health and Human Services, NIH Publication 85-23 (revised 1985). Les solutions tampons et les perfusats sont filtrés avant usage (Millipore, 0,2  $\mu\text{m}$ ).

#### 2.1.3. Titrages et mesures du $T_1$

Les titrages et les mesures de  $T_1$  sont faits sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz, équipé d'une sonde large bande (BBO) pour des tubes de 10 mm de diamètre :  $B_0 = 9,4 \text{ T}$  et  $\nu_0 = 161,98 \text{ Hz}$  pour le  $^{31}\text{P}$ . La sonde est équipée d'un régulateur de température permettant de contrôler la température de l'échantillon tout au long des expériences. La référence externe est une solution de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à 85% dans l'eau. Les pH sont mesurés avec un pH mètre Inolab 720 équipé d'une électrode Sentix 2I.

## 2.2. Expériences par RMN du $^{31}\text{P}$

### 2.2.1. Titrages

Les expériences de titrage ont été réalisées dans différents milieux : Krebs–Henseleit modifié (KHM, sans glucose ni  $\text{CaCl}_2$ ), milieu cytosolique cardiaque, solution de KCl (0,125 M) dont les procédés de préparation sont décrits ci-après.

Le pH des solutions d'aminophosphonates (5 mM), fraîchement préparées, est ajusté dans une gamme de valeur allant de 1 à 12 unités de pH (de 15 à 25 points par courbe de titrage) avec une solution de HCl 6 M ou de NaOH 6 M. Les solutions sont alors transférées dans un tube de 10 mm, dans lequel plonge un capillaire de  $\text{D}_2\text{O}$ . Pour chaque pH testé, le spectre est enregistré par la séquence standard d'observation du  $^{31}\text{P}$  découplé proton, avec un temps d'acquisition de 2 s et 64 acquisitions.

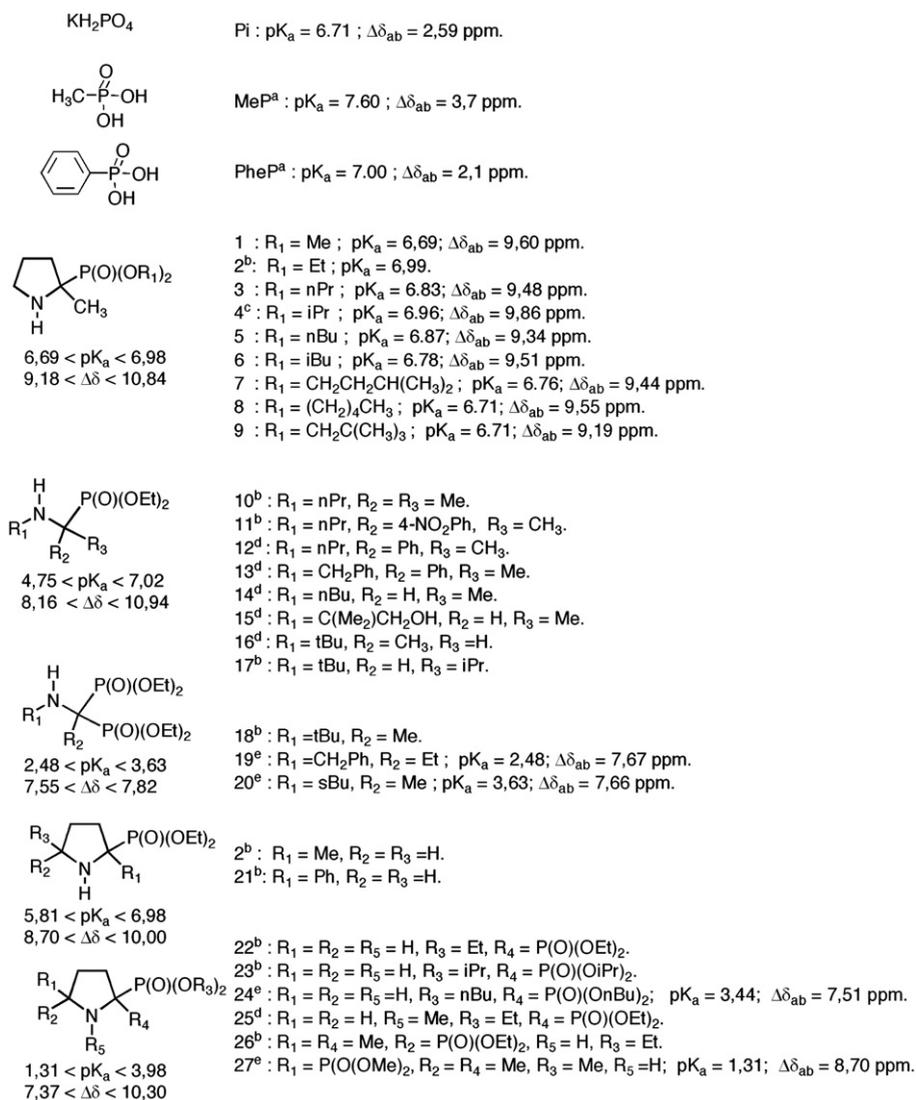


Fig. 1. Structure des  $\alpha$ -aminophosphonates, du  $\text{P}_i$  et des dérivés de l'acide phosphonique MeP, PheP. Me,  $\text{CH}_3$ ; Et,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $n\text{Pr}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $i\text{Pr}$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ;  $n\text{Bu}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;  $i\text{Bu}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ;  $s\text{Bu}$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ;  $t\text{Bu}$ ,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ; Ph,  $\text{C}_6\text{H}_5$ . (a) [14c]; (b) [17]; (c) [20]; (d) [18]; (e) [21].

Les caractéristiques de chaque composé ( $\text{pK}_a$ ,  $\delta_a$  et  $\delta_b$ ) sont obtenues après tracé de la courbe expérimentale  $\delta(^{31}\text{P}) = f(\text{pH})$ , qui est ajustée sur l'expression de Henderson–Hasselbalch (Eq. (1)) par régression statistique non linéaire :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\delta - \delta_a}{\delta_b - \delta} \quad (1)$$

### 2.2.2. Mesure des $T_1$ ( $^{31}\text{P}$ )

Sur les mêmes solutions que celles décrites précédemment, les spectres pour la mesure du  $T_1$  sont enregistrés, à

$\text{pH} = \text{pK}_a$ , avec une largeur spectrale de 100 ppm, en utilisant une impulsion  $\text{P}_1$  de  $90^\circ$  égale à 10  $\mu\text{s}$ , pour une puissance de  $-3\text{dB}$ . Les  $T_1$  sont mesurés à l'aide de la séquence « inversion–récupération », l'acquisition du signal se faisant sur un cycle de huit acquisitions. Les 16 délais d'évolution, pour le retour de l'aimantation vers sa valeur d'équilibre, sont appliqués aléatoirement selon la série suivante ( $\tau$  = délai d'évolution) :

$\tau = 0,01$  s ; 35 s ; 4 s ; 15 s ; 0,1 s ; 25 s ; 2 s ; 20 s ; 8 s ; 6 s ; 12 s ; 30 s ; 0,5 s ; 10 s ; 1 s ; 35 s.

Un temps d'attente supérieur à 5  $T_1$  (35 s pour les aminophosphonates) est utilisé entre deux mesures

consécutives, pour laisser au système le temps de revenir à l'équilibre.

Le traitement des données se fait par ajustement non linéaire d'une fonction mono-exponentielle sur les intensités expérimentales  $I$  des signaux mesurés en fonction du délai  $\tau$ , à l'aide de deux paramètres, suivant l'équation (2) :

$$I = A[1 - 2\exp(-\tau/T_1)]$$

( $A =$  intensité du signal à l'équilibre) (2)

Pour l'analyse de l'effet du pH sur le  $T_1$ , les temps de relaxation longitudinale du  $P_i$  (1,2 mM) et du composé **2** (5 mM) ont été mesurés simultanément, dans un milieu KHM, dont le pH a été ajusté à des valeurs entre 3 et 10. Pour respecter les conditions de retour à l'équilibre, le délai entre les impulsions est de 55 s (soit 5  $T_1$  du  $P_i$ ).

### 2.3. Techniques de perfusion cardiaque : études de cytotoxicité

Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg de poids corporel). La cavité thoracique est ouverte et le cœur rapidement prélevé et immergé dans du liquide de perfusion à 4 °C afin d'arrêter toute contraction, puis perfusé selon la technique de Langendorff par voie rétrograde aortique, dans laquelle le cœur est soumis à une pression constante appliquée en positionnant la colonne de perfusion à une hauteur de 90 cm [27]. Une petite incision dans l'artère pulmonaire permet l'écoulement et la mesure de l'effluent coronaire en fonction du temps (débit coronaire). Après ablation de l'oreillette gauche, un ballonnet en latex est inséré dans le ventricule gauche et rempli d'un volume d'eau distillée (50–60  $\mu$ l) qui reste constant au cours du protocole expérimental. Ce ballonnet est relié à un capteur de pression (Gould) et à un enregistreur différentiateur permettant la mesure des paramètres hémodynamiques suivants : pressions diastolique et développée ( $P_{dev}$ ) du ventricule gauche, la dérivée première de la pression développée  $dP/dt$ , la fréquence cardiaque ( $F$ ). Le milieu de perfusion est une solution ionique de Krebs–Henseleit (KH) de pH 7,35, saturée avec un mélange gazeux (95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ ), contenant NaCl (119 mM),  $NaHCO_3$  (25 mM), KCl (5,9 mM),  $MgSO_4$  (1,2 mM), EDTA (0,5 mM), glucose (11 mM) et  $CaCl_2$  (2,5 mM). Les cœurs sont perfusés selon le protocole suivant : une période initiale d'équilibration de 30 min avec du Krebs–Henseleit, suivie de la perfusion de concentrations croissantes (10 min chacune) d'aminophosphonate (0,1 à 20 mM) ajouté dans le milieu de

perfusion KH à partir d'une solution mère (50 mM) délivrée à l'entrée de l'aorte. Le débit coronaire (DC) ainsi que l'ensemble des paramètres hémodynamiques sont mesurés toutes les 5 min. Le travail cardiaque (RPP), représentatif de la fonction hémodynamique globale est calculé par le produit suivant :  $RPP = P_{dev} \times F$ .

### 2.4. Préparation du milieu cytosolique cardiaque (MCytC)

Le milieu cytosolique riche en protéines hydrosolubles a été obtenu à partir du myocarde prélevé sur un rat, selon un procédé précédemment décrit [19,22]. L'homogénat de tissu cardiaque (1,25 g de tissu frais pour 3,25 ml de KCl 0,125 M) est préparé en hachant, puis mixant le tissu dans un *blender* (10 min). Le mélange est alors centrifugé à 3 °C pendant 20 min, et le surnageant, considéré comme représentatif du milieu cytosolique, est utilisé pour les expériences de titrage et de mesure des  $T_1$  [19,28]. Ce milieu contient déjà naturellement du  $P_i$ , mais l'addition de  $KH_2PO_4$  (1,2 mM) permet d'améliorer les conditions d'observation du signal. L'aminophosphonate sélectionné est alors additionné à ce milieu, de manière à obtenir une concentration finale de 5 mM.

## 3. Résultats

### 3.1. Synthèse et caractérisation des aminophosphonates **1**, **3** et **9**

La voie de synthèse générale mise en œuvre pour préparer les aminophosphonates **1** à **9** est présentée sur la Fig. 2. La formation de l' $\alpha$ -aminophosphonate se fait en une ou deux étapes pour la série des amines différemment substituées sur le phosphore, selon la nature du phosphite de dialcyle utilisé (commercial ou non). L' $\alpha$ -aminophosphonate subit toujours une étape

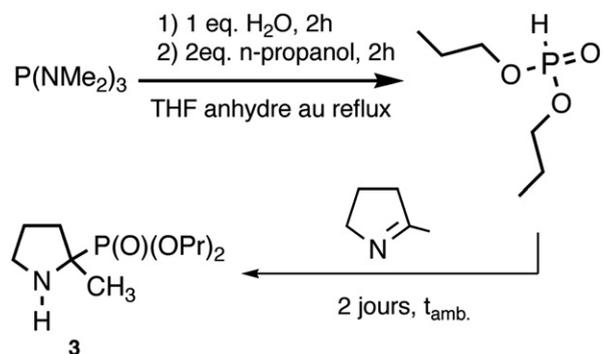


Fig. 2. Synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates **1**, **3** et **9**.

de purification sur colonne de silice pour obtenir le degré de pureté nécessaire pour une application en milieu biologique.

### 3.1.1. (2-Méthylpyrrolidin-2-yl) phosphonate de diméthyle (**1**)

On agite pendant 2 h le phosphite de diméthyle (10 g, 91 mmol) fraîchement distillé et la 2-méthyl-1-pyrroline (8,3 g, 100 mmol). De l'eau (50 ml) est ajoutée au mélange et le pH est porté à 2 par ajout d'HCl concentré (37%). La phase aqueuse est lavée trois fois par du *tert*-butyl-méthyl éther (3 × 50 ml). Puis le milieu est basifié jusqu'à pH = 10 par ajout de pastilles de NaOH et extrait au dichlorométhane (4 × 50 ml). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>. Les traces de solvant sont évaporées sous vide jusqu'à l'obtention d'une huile jaune visqueuse. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH : 86%/14%). On obtient **1** sous forme d'une huile jaune très visqueuse. (10,5 g, 60%). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) : 33,27. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 1,34 (d, *J* = 15 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 1,55–1,90 (m, 4H, NH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>CN) ; 2,13–2,26 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CN) ; 2,92–3,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N) ; 3,77–3,78 (d, *J* = 3 Hz, OCH<sub>3</sub>) ; 3,81–3,82 (d, *J* = 3 Hz, OCH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 24,18 (d, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>) ; 25,77 (d, *J* = 4,5 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ; 34,67 (d, *J* = 3 Hz, CH<sub>2</sub>CN) ; 47,06 (d, *J* = 8,3 Hz, CH<sub>2</sub>N) ; 53,15 (d, *J* = 8,3 Hz, OCH<sub>3</sub>) ; 53,42 (d, *J* = 8,3 Hz, OCH<sub>3</sub>) ; 59,71 (d, *J* = 166 Hz, C). Analyse élémentaire de **1** (C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>P) : calculé : C 43,52%, H 8,35%, N 7,25% ; obtenu : C 41,77%, H 8,16%, N 7,23%.

### 3.1.2. (2-Méthylpyrrolidin-2-yl) phosphonate de dipropyle (**3**)

P(NMe<sub>2</sub>)<sub>3</sub> (10 g, 61 mmol) est hydrolysé en 2 h au reflux du THF, sous atmosphère inerte, en acide bis(diméthylamino) phosphoreux, après l'ajout de 1 équivalent d'eau (1,1 g, 61 mmol). À l'acide bis(diméthylamino) phosphoreux formé in situ, on ajoute du 1-propanol (2 équivalent, 7,32 g, 122 mmol). Après 2 h au reflux et évaporation des solvants sous pression réduite, le phosphite de dipropyle est obtenu avec un rendement de 98%, sous forme d'une huile incolore. Un mélange de phosphite de dipropyle (9,9 g, 59 mmol) et de 2-méthyl-1-pyrroline (5,38 g, 65 mmol) est agité à température ambiante pendant 2 jours, l'évolution de la réaction pouvant être suivie par RMN du <sup>31</sup>P. Le mélange subit le même traitement que précédemment. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH : 86%/14%). On obtient **3** sous forme d'une huile écruée très visqueuse (9,7 g, 64%). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) : 30,65. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 0,65 (t, *J* = 6 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>–O) ;

1,05 (d, *J* = 15 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 1,26–1,60 (m, 8H, 2\* CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>, HN, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>CN) ; 1,80–2,00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CN) ; 2,66–2,80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N) ; 3,71–3,78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>–O). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 9,67 (s, CH<sub>3</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>–O) ; 23,59, 23,66 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>) ; 23,86 (d, *J* = 6 Hz, CH<sub>3</sub>) ; 25,33 (d, *J* = 4,5 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ; 34,30 (d, *J* = 3 Hz, CH<sub>2</sub>CN) ; 46,70 (d, *J* = 7,5 Hz, CH<sub>2</sub>N) ; 59,20 (d, *J* = 164 Hz, C) ; 67,20 (d, *J* = 8,3 Hz, CH<sub>2</sub>–O) ; 67,45 (d, *J* = 8,3 Hz, CH<sub>2</sub>–O). Analyse élémentaire de **3** (C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub>P) : calculé : C 53,00%, H 9,70%, N 5,62% ; obtenu : C 51,44%, H 8,88%, N 4,99%.

### 3.1.3. (2-Méthylpyrrolidin-2-yl) phosphonate de dinéopentyle (**9**)

P(NMe<sub>2</sub>)<sub>3</sub> (10 g, 61 mmol) est hydrolysé en 2 h au reflux du THF, sous atmosphère inerte, en acide bis(diméthylamino) phosphoreux, après l'ajout de 1 équivalent d'eau (1,1 g, 61 mmol). À l'acide bis(diméthylamino) phosphoreux formé in situ, on ajoute de l'alcool néopentyle : 1 équivalent, 5,38 g, 61 mmol. Après 3 h de reflux, le deuxième équivalent d'alcool est rajouté au milieu, qui est laissé au reflux encore pendant 3 h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite : le phosphite de dinéopentyle est obtenu avec un rendement de 80% sous forme d'une huile incolore. Un mélange de phosphite de dinéopentyle (10,9 g, 49 mmol) et de 2-méthyl-1-pyrroline (4,39 g, 53 mmol) est agité à température ambiante pendant 2 jours, l'évolution de la réaction pouvant être suivie par RMN du <sup>31</sup>P. Le mélange subit le même traitement que celui décrit pour **1**. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH : 86%/14%). On obtient **9** sous la forme d'une huile écruée très visqueuse (9,7 g, 64%). RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>) : 30,35. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : 0,88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>–C–CH<sub>2</sub>–O) ; 0,93 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>–C–CH<sub>2</sub>–O) ; 1,35 (d, *J* = 15 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 1,50–1,86 (m, 4H, HN, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, CH<sub>2</sub>CN) ; 2,10–2,40 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CN) ; 2,96–3,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N) ; 3,70–3,78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>–O). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : 24,60 (d, *J* = 6 Hz, CH<sub>3</sub>) ; 25,69 (d, *J* = 4,5 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ; 26,13 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 32,23 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; 34,84 (d, *J* = 3 Hz, CH<sub>2</sub>CN) ; 47,15 (d, *J* = 7,5 Hz, CH<sub>2</sub>N) ; 59,83 (d, *J* = 164 Hz, C) ; 75,46 (d, *J* = 8,3 Hz, CH<sub>2</sub>–O) ; 75,76 (d, *J* = 8,3 Hz, CH<sub>2</sub>–O). Analyse élémentaire de **9** (C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>3</sub>P) : calculé : C 58,99%, H 10,56%, N 4,59% ; obtenu : C 58,74%, H 10,83%, N 4,70%.

## 3.2. Cytotoxicité des aminophosphonates **1** à **9**

Des paramètres hémodynamiques réguliers sont enregistrés au cours de la période d'équilibration sur

l'ensemble des cœurs de rats perfusés ( $n = 22$ ) dans les conditions normoxiques décrites précédemment : RPP (mm Hg  $\times$  battements/min) =  $24\,220 \pm 701$  ;  $P_{\text{dias}}$  (mm Hg) =  $12,7 \pm 2,1$  mm Hg ; DC (ml/min) =  $16,2 \pm 1,4$ . La perfusion des composés **1**, **3** et **4** dans le myocarde de rat isolé perfusé à des concentrations croissantes dans des conditions normoxiques montre que ces composés ne perturbent pas ces index de la fonction cardiaque jusqu'à 10 mM pour **3**, résultat voisin de celui obtenu pour le composé **2** [19,27], 5 mM pour **1** et 3 mM pour **4**. Par exemple, on enregistre les paramètres hémodynamiques suivants dans le cas d'une perfusion de **4** à 3 mM pendant 20 min : RPP (mm Hg  $\times$  battements/min) =  $22\,770 \pm 1502$  ;  $P_{\text{dias}}$  (mm Hg) =  $11,7 \pm 2,4$  mm Hg ; DC (ml/min) =  $14,5 \pm 1,7$ . La diminution du travail cardiaque de observée ( $-8\%$ ), bien que non significative ( $p = 0,3245$ , test  $t$  de Student) par rapport au groupe de cœurs recevant seulement du tampon KH, indique le seuil maximal d'utilisation de ce composé dans ce modèle. Ces résultats démontrent l'innocuité de ces composés dans une gamme de concentrations compatibles (de l'ordre du mM) avec les expériences de RMN en biologie [19]. Les molécules **5** à **9**, qui possèdent des substituants plus encombrants sur le groupement phosphoré (Fig. 1), ce qui leur confère vraisemblablement une plus grande

lipophilie, sont globalement plus cytotoxiques, et donc utilisables sur des modèles biologiques à des concentrations inférieures à 3 mM.

### 3.3. Titrages des nouveaux aminophosphonates **1**, **3–9**, **19**, **20**, **24** et **27**

Les courbes de titrage obtenues dans KHM à 22 °C pour les molécules **1**, **3**, **4** et **9** sont présentées sur la Fig. 3 et sont comparées à celles du  $P_i$ . On obtient, pour trois de ces composés, des  $pK_a$  inférieurs à celui de **2** (respectivement (**1**) 6,69 ; (**3**) 6,83 et (**9**) 6,71), jusqu'alors considéré comme une référence, car son  $pK_a$  (6,99) est proche de la neutralité [17,19], ainsi qu'une différence de déplacement chimique  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  comparable (respectivement  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  (**1**) = 9,60 ;  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  (**3**) = 9,48), sauf pour le composé **9**, qui se situe un peu en retrait :  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  (**9**) = 9,19. En revanche (Fig. 3), le composé **4** ne se démarque pas de **2** ( $pK_a$  (**4**) 6,96 ;  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  (**4**) 9,86). La plage de variation des valeurs de  $pK_a$  obtenues pour les molécules de cette famille (**1–9**) est consignée sur la Fig. 1 et montre que les essais visant à modifier les substituants sur le phosphore, et non pas sur les groupements portés par le carbone en  $\alpha$  (comme c'est le cas des composés **10** à **27**), ne font varier le  $pK_a$  que dans une gamme relativement réduite ( $6,7 < pK_a < 7$ ) et permettent de conserver d'excellentes valeurs de  $\Delta\delta_{\text{ab}}$ ,

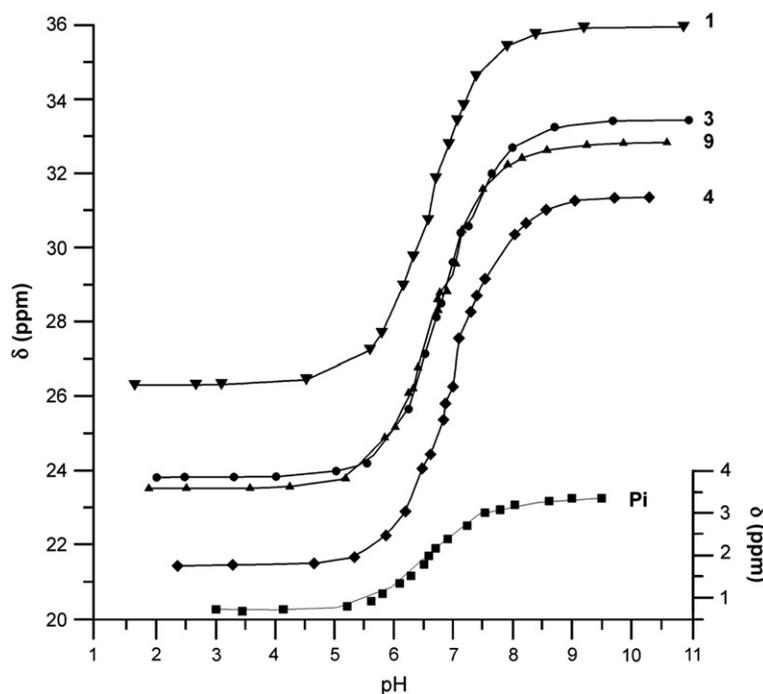


Fig. 3. Variation du déplacement chimique du  $^{31}\text{P}$  du  $P_i$  et des aminophosphonates **1** ( $\nabla$  ;  $pK_a = 6,69$ ), **3** ( $\bullet$  ;  $pK_a = 6,83$ ), **4** ( $\blacklozenge$  ;  $pK_a = 6,96$ ) et **9** ( $\blacktriangle$  ;  $pK_a = 6,71$ ) en fonction du pH. Les expériences sont réalisées à 22 °C dans un milieu tampon de Krebs–Henseleit modifié.

supérieures à 9 ppm. Les valeurs individuelles des nouvelles molécules non décrites dans la Fig. 3 ( $pK_a$ ;  $\Delta\delta_{ab}$ ) sont respectivement : **5** (6,87 ; 9,60); **6** (6,78 ; 9,34); **7** (6,76 ; 9,44); **8** (6,71 ; 9,57).

Les courbes de titrage des molécules diphasphorées **19**, **20**, **24** et **27** ont été obtenues selon le même procédé, dans un tampon KHM à 22 °C. Les valeurs des ( $pK_a$ ;  $\Delta\delta_{ab}$ ) pour ces molécules sont respectivement : **19** (2,48 ; 7,67); **20** (3,63 ; 7,66); **24** (3,44 ; 7,51); **27** (1,31 ; 8,70). Ces valeurs sont homogènes ( $1,5 < pK_a < 4$ ) avec celles obtenues pour des molécules portant aussi deux groupements phosphorés (**16**, **22**, **23** et **26** [17], et **25** [18]).

### 3.4. Effet du pH, du milieu et de la température sur les $T_1$ ( $^{31}\text{P}$ ) des aminophosphonates **1**, **2**, **3**, **10**, **16**, et du $\text{P}_i$

La mesure des  $T_1$  effectuée à différents pH dans le milieu tampon KHM modifié, pour le  $\text{P}_i$  et le composé **2**, montre que la relaxation longitudinale de ces molécules n'a pas la même sensibilité vis-à-vis du pH (Fig. 4). Le  $T_1$  du  $\text{P}_i$  varie en fonction du pH et présente un minimum relativement marqué dans la gamme de pH proche de son  $pK_a$ , alors que le  $T_1$  de **2** ne varie pas de manière significative dans la gamme de pH considérée.

Les valeurs des  $T_1$  mesurés dans différents milieux pour une sélection de molécules représentatives des cinq familles étudiées (**1**, **2**, **3**, **10**, **16**) et du  $\text{P}_i$  sont consignées dans le Tableau 1. On observe que, dans les milieux ioniques usuels (KHM ou KCl), le  $T_1$  du  $\text{P}_i$  est plus élevé que celui de l'ensemble des aminophosphonates. En revanche, une très forte diminution du  $T_1$  est observée pour le  $\text{P}_i$  lorsque la mesure est faite dans une

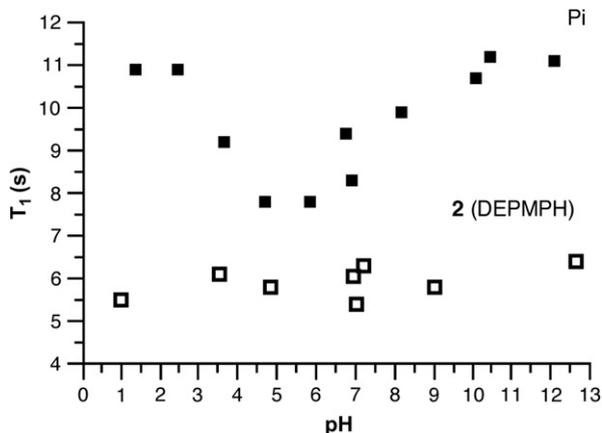


Fig. 4. Effet du pH sur le  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) du  $\text{P}_i$  (■) et de l' $\alpha$ -aminophosphonate **2** (□), mesurés à 22 °C dans un milieu tampon de Krebs-Henseleit modifié.

préparation de milieu cytosolique, alors que ce même milieu n'influence pas la relaxation des aminophosphonates de manière significative. Pour le composé **2**, les expériences réalisées dans la présente étude (Tableau 1) ont été rapprochées de celles effectuées sur le modèle de cœur de rat perfusé [19,29], montrant que la valeur du  $T_1$  mesuré dans le cytosol n'est pas sensiblement modifiée au cours des expériences biologiques.

Enfin, une sélection d'aminophosphonates représentatifs des différentes familles de molécules, tels que **2**, **3**, **10**, **16**, **18**, **22**, ainsi que du  $\text{P}_i$ , ont été étudiés à deux températures (KHM, 22 °C et 37 °C). Dans tous les cas, on observe une augmentation du  $T_1$  lorsque la température augmente (Tableau 1).

### 3.5. Détermination des $T_1$ ( $^{31}\text{P}$ ) dans KHM pour la série des 27 aminophosphonates

En complément des valeurs de  $T_1$  obtenues pour le  $\text{P}_i$  et les composés **1**, **2**, **3**, **10**, **16**, **18**, **22**, consignées dans la Tableau 1, les valeurs de  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) des 20 autres aminophosphonates, obtenues dans les mêmes conditions (KHM; 22 °C;  $\text{pH} = pK_a$ ) sont présentées ci-après. Pour chaque composé, la valeur de  $T_1$  indiquée, en secondes, correspond à la moyenne de 2–3 mesures indépendantes. À partir de trois mesures indépendantes, la déviation standard ( $\pm\text{SD}$ ) par rapport à la moyenne est présentée. Une variabilité d'environ 10% sur la mesure des  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) a été obtenue.

**4** :  $4,7 \pm 0,2$ ; **5** : 4,3; **6** : 4,2; **7**, 3,6; **8** : 3,9; **9** : 3,9; **11** : 3,4; **12** : 2,8; **13** : 3,0; **14** : 4,1; **15** : 4,3; **17** : 4,9; **19** : 1,9; **20** : 2,4; **21** : 4,4; **23** : 2,8; **24** : 2,2; **25** : 3,1; **26** :  $2,8 \pm 0,3$ ; **27** :  $5,1 \pm 0,4$ .

Les valeurs obtenues dans le KHM à  $\text{pH} = pK_a$ , pour MeP et PheP, sont respectivement  $8,3 \pm 0,5$  s et  $6,3 \pm 0,3$  s et sont proches des valeurs trouvées dans la littérature pour PheP dans le milieu extracellulaire du foie isolé perfusé [12].

### 3.6. Étude des variations des $1/T_1$ ( $^{31}\text{P}$ ) des aminophosphonates avec la structure chimique et la masse moléculaire

Un des objectifs de cette étude est d'établir un modèle empirique qui permette de prévoir, avant synthèse, le  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) des aminophosphonates. Un examen rapide des  $T_1$  mesurés montre qu'ils sont corrélés à plusieurs grandeurs, les meilleures corrélations étant obtenues avec la masse moléculaire, le  $pK_a$  et la constante de vitesse de protonation de l'amine (corrélations non montrées). Une difficulté est que ces grandeurs sont elles-mêmes corrélées entre elles dans la famille de

Tableau 1  
Valeurs du  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) de différents aminophosphonates et du  $\text{P}_i$  dans les milieux biologiques usuels

Composés	Milieu	pK <sub>a</sub>	$\Delta\delta_{\text{ab}}$ (ppm)	$T_1$ (s)	$1/T_1$ (s <sup>-1</sup> )
$\text{P}_i$	KHM	6,71	2,61	11,5 ± 0,5	0,087
	KHM*	6,69	2,61	12,6	0,079
	McytC cœur <sup>a,b</sup>	6,78	2,60	3,8	0,263
1	KCl	6,74	2,55	10,1	0,099
	KHM	6,69	9,60	7,90	0,126
2	McytC	6,77	9,65	4,50	0,222
	KHM <sup>c</sup>	6,98	9,65	6,3 ± 0,4	0,158
3	KHM*	6,81	9,58	8,2	0,122
	McytC <sup>c</sup> cœur <sup>a,b</sup>	7,09	9,69	5,4 ± 0,3	0,185
	KCl	6,95	9,69	4,8	0,208
	KHM	6,95	9,69	5,4	0,185
10	KHM*	6,88	9,98	5,06	0,197
	KHM*	6,50	9,59	6,03	0,166
	MCytC	6,88	9,55	5,64	0,177
12	KHM	6,99	10,17	4,5	0,222
	KHM*	6,77	10,20	6,1	0,164
	MCytC	7,09	10,20	4,2	0,238
	KCl	7,09	10,10	3,5	0,286
14	KHM	5,89	8,19	2,8	0,357
	MCytC	5,88	8,35	2,7	0,370
	KHM <sup>c</sup>	6,92	10,09	4,0	0,250
16	MCytC	7,05	10,16	3,7	0,270
	KCl	6,95	10,17	4,8	0,208
	KHM <sup>c</sup>	7,02	10,9	4,6 ± 0,2	0,217
	KHM*	6,72	10,8	5,8	0,172
18	MCytC	7,06	10,2	4,1	0,244
	KCl	7,03	10,26	8	0,125
	KHM	3,45	7,55	3,0	0,333
22	KHM*	2,90	7,18	5,3	0,189
	KHM <sup>c</sup>	3,63	7,61	3,3 ± 0,3	0,303
	KHM*	3,47	7,65	4,5	0,222
	MCytC <sup>c</sup>	3,51	7,69	2,4	0,416

Les spectres de RMN du  $^{31}\text{P}$  sont enregistrés à 22 °C ou à 37 °C (notés\*) dans un milieu de Krebs–Henseleit modifié (KHM), dans un milieu proche du cytosol cardiaque (McytC), dans le KCl (0,125 M) ou dans le cœur entier de rats<sup>g</sup>. La préparation de ces différents milieux est décrite dans la partie *Matériels et méthodes* (§ 2).  $\Delta\delta_{\text{ab}}$ , différence de déplacement chimique entre les milieux acide et basique : <sup>c</sup>[18]; <sup>a</sup>[19]; <sup>b</sup>[24]. Les valeurs de  $T_1$  représentent la moyenne de deux ou trois (±SD) expériences indépendantes.

molécules étudiées. La constante de vitesse de protonation  $k_{\text{exch}}$  a une influence sur le temps de relaxation transversal  $T_2$  et peut, par un mécanisme différent, influencer aussi sur  $T_1$ . Mais les résultats obtenus pour l'ensemble des molécules de la littérature montrent que l'on doit s'attendre surtout à une forte dépendance de  $T_1$  vis-à-vis de la masse moléculaire [30–32]. Un résumé de la théorie rappelle que la relaxation du spin du  $^{31}\text{P}$  est due à plusieurs mécanismes indépendants, qui sont en particulier : les interactions magnétiques dipolaires intra- et intermoléculaires (DD), l'anisotropie

du déplacement chimique (CSA), l'interaction spin–rotation (SR). La vitesse de relaxation longitudinale  $1/T_1$  est la somme de leurs contributions :

$$1/T_1 = (1/T_1)_{\text{DD}} + (1/T_1)_{\text{CSA}} + (1/T_1)_{\text{SR}} + al \quad (3)$$

( $al$  représente des termes complémentaires [31])

La majorité des termes qui composent cette expression dépendent du temps de corrélation  $\tau_c$ , qui décrit les fluctuations temporelles des champs magnétiques et dépend de la vitesse de réorientation de la molécule, elle-même fortement dépendante de la masse molaire  $M$ . Les interactions dipôle–dipôle s'écrivent de la manière suivante [31,32] :

$$(1/T_1)_{\text{DD}} = (\mu_0/4\pi)^2 \gamma_X^2 \gamma_P^2 h^2 \tau_c / [1 + (\omega_0 \tau_c)^2] \sum r_{\text{XP}}^{-6} \quad (4)$$

(avec  $X = \text{H}$  ou  $\text{P}$ ;  $\gamma_P$  est le rapport gyromagnétique et  $\omega_0/2\pi = 161,98$  MHz la fréquence de Larmor de  $^{31}\text{P}$ ), ou, pour des interactions intermoléculaires :

$$(1/T_1)_{\text{DD}} = (\mu_0/4\pi)^2 8\pi N \gamma_X^2 \gamma_P^2 h^2 / (9d_{\text{X-P}}^6) \quad (5)$$

Ces interactions dépendent de  $M$  par l'intermédiaire de  $\tau_c$ , ou par le coefficient d'autodiffusion  $D$ . Il en est de même pour le terme de la relaxation CSA [31,33] :

$$(1/T_1)_{\text{CSA}} = 2/15 \gamma_P^2 B_0^2 (\Delta\sigma)^2 \tau_c / [1 + (\omega_0 \tau_c)^2] \quad (6)$$

( $\Delta\sigma$  : modulation de l'écran électronique).

La relaxation spin–rotation dépend de  $M$  à la fois par le moment d'inertie  $I_r$  et par  $\tau_{\text{SR}}$  :

$$(1/T_1)_{\text{SR}} = 8\pi^2 I_r k T C^2 \tau_{\text{SR}} / h^2 \quad (7)$$

Dans ce contexte, il paraît justifié, pour l'ensemble des molécules étudiées (Fig. 1), de réaliser le tracé de  $1/T_1$  en fonction de  $M$  (Fig. 5). Un développement polynomial du second degré (Eq. (8)), qui représente ces points de façon satisfaisante (écart-type  $\sigma_{1/T_1} = 3,31 \times 10^{-2}$  Hz), a été obtenu par régression :

$$1/T_1 = 9,71 \times 10^{-2} + 1,63 \times 10^{-5} M + 1,85 \times 10^{-6} M^2 \quad (8)$$

On observe que les composés **1** et **27**, qui ont des  $T_1$  élevés, n'entrent pas dans la relation précédente. Ces composés se trouvent être ceux dans lesquels le phosphore porte deux substituants méthoxy, particulièrement encombrants et qui peuvent par leur rotation entraîner des fluctuations de champ magnétique. En revanche, le  $\text{P}_i$  et les dérivés alkylés de l'acide phosphonique, MeP et PheP, s'y inscrivent parfaitement.

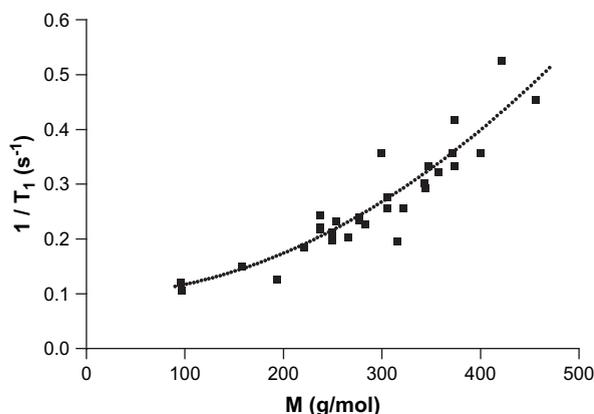


Fig. 5. Dépendance de la vitesse de relaxation longitudinale  $1/T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) vis-à-vis de la masse moléculaire  $M$ , pour les composés **2** à **26**, obtenus par des modifications de substituants sur les atomes de phosphore, Pi, MeP et PheP.

La corrélation statistique qu'on observe entre  $1/T_1$  et le  $\text{p}K_a$  ( $r^2 = 0,68$ ) n'a pas d'explication logique a priori. Un traitement statistique succinct va montrer qu'elle n'est qu'une redite de la corrélation entre  $1/T_1$  et  $M$ . Compte tenu des arguments théoriques précédents en faveur d'une forte dépendance de  $1/T_1$  vis-à-vis de  $M$ , il paraît logique de ne pas traiter le  $\text{p}K_a$  sur un pied d'égalité avec  $M$ , mais comme un facteur secondaire. Ceci évite que le  $\text{p}K_a$ , qui se trouve dans cette série de molécules être corrélé avec  $M$  (Fig. 6), puisqu'il dépend directement des substituants [19], ne s'approprie une partie de la corrélation de  $1/T_1$  avec  $M$ . L'équation (8) a donc été conservée, en la multipliant par une fonction affine inconnue  $f(\text{p}K_a) = a_0 + a_1 \text{p}K_a$ . On obtient ainsi, par régression, l'expression (9) :

$$1/T_1 = (9,71 \times 10^{-2} + 1,63 \times 10^{-5}M + 1,85 \times 10^{-6}M^2) \times (1,04 - 9,17 \times 10^{-3} \text{p}K_a) \quad (9)$$

Le second facteur fluctue peu autour de sa moyenne, égale à 1 (écart-type =  $1,5 \times 10^{-2}$ ), ce qui prouve qu'une fois soustraite la corrélation de  $1/T_1$  avec  $M$ ,  $1/T_1$  n'est plus corrélé au  $\text{p}K_a$ . Ceci est corroboré par l'écart-type global en  $1/T_1$  associé à l'Eq. (9) ( $\sigma_{1/T_1} = 3,28 \times 10^{-2}$  Hz), qui n'est pas meilleur que celui trouvé avec l'Eq. (8), que nous conserverons donc. Des considérations similaires conduisent à éliminer du modèle une autre grandeur, pourtant corrélée, qui est la constante de vitesse de protonation  $k_{\text{exch}}$ , elle-même corrélée au  $\text{p}K_a$ , donc à  $M$ . Par ailleurs, des relations liant  $1/T_1$  au déplacement chimique  $\delta = (\delta_a + \delta_b)/2$  ou à  $(\delta_b - \delta_a)$ , qui pourraient être partiellement corrélées à  $\Delta\sigma$ , ont été recherchées, sans résultat.

#### 4. Discussion

Ce travail décrit, en premier lieu, une nouvelle famille d' $\alpha$ -aminophosphonates, différemment substitués sur le phosphore, et plus particulièrement la synthèse de trois nouveaux composés **1**, **3** et **9**, dont les valeurs de  $\text{p}K_a$  sont inférieures (respectivement de 0,30, 0,15 et 0,28 unités de pH) à celle de **2**, utilisé avec succès comme marqueur de pH en RMN du  $^{31}\text{P}$  sur des organes perfusés [19], ou pour ses propriétés protectrices sur la fonction et le métabolisme cardiaque [17,27,29]. La diminution du  $\text{p}K_a$ , tout en restant proche du pH physiologique, peut dans certains cas offrir l'avantage d'une meilleure précision dans les bas pH, comme ceux des compartiments acides [14,19]. À ce titre, le composé **1** apparaît comme le plus sensible, puisqu'il associe une baisse de  $\text{p}K_a$  à un maintien, voire à une amélioration de  $\Delta\delta_{\text{ab}}$  (Tableau 1; Fig. 3). Le composé **3**, de plus faible cytotoxicité, peut aussi apparaître comme un meilleur compromis. Cette étude montre que, lorsqu'on fait varier les substituants sur le phosphore pour les composés **5** à **9**, on obtient des courbes de titrage quasi superposables, qui se situent entre celles de **1** et **4**, dont les valeurs de  $\text{p}K_a$  sont les plus extrêmes (Fig. 3), suggérant que les modifications de structure autour du  $^{31}\text{P}$  (molécules **5** à **9**) n'interviennent que faiblement dans l'acidité de l'amine. Enfin, l'ensemble de ces composés, quel que soit le pH étudié, résonnent ( $21,45 < \delta < 35,89$ ) loin des métabolites phosphorylés cellulaires, dont les pics de résonance détectés dans les modèles biologiques se situent entre  $-15$  et  $5$  ppm [18].

En comparant les quatre autres familles de molécules présentées dans ce travail, on observe que les

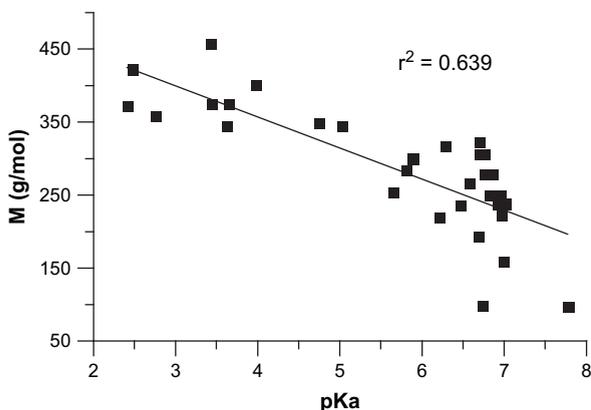


Fig. 6. Corrélation entre le  $\text{p}K_a$  et la masse moléculaire  $M$  pour les composés **1** à **26**, Pi, MeP et PheP.

substituants placés sur les carbones en  $\alpha$  ou  $\beta$  du groupement phosphoré, influencent au contraire fortement le  $pK_a$  avec une amplitude de variation de 6 unités de pH, tout en gardant des valeurs  $\Delta\delta_{ab}$  importantes. La contribution de chaque substituant à la modification du  $pK_a$  de la fonction amine de la pyrrolidine, qui fait intervenir des effets inductifs et structuraux, a été étudiée en détail grâce à l'élaboration d'un modèle semi-empirique permettant leur incrémentation [17,18]. Ceci représente un avantage incontestable sur les dérivés de l'acide phosphonique, dont le  $pK_a$  de la seconde acidité, qui seul présente un intérêt en biologie, ne varie significativement qu'en additionnant, par exemple, des substituants halogénés biologiquement peu compatibles [34]. Cette sensibilité moindre des dérivés de l'acide phosphonique pourrait provenir de la difficulté à faire varier la densité électronique autour de l'atome de phosphore, si les substituants lui sont directement liés [34]. Ce phénomène se trouve confirmé dans la présente étude, où de faibles variations de  $pK_a$  sont observées dans la nouvelle famille de composés **1–9**, portant différents substituants sur le groupement phosphoré.

La présente étude montre en parallèle que le  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) du  $\text{P}_i$  est très fortement sensible aux variations de milieu, alors que la relaxation des aminophosphonates n'est que très peu modifiée par leur environnement (ions, molécules biologiques hydrosolubles) et le pH, dans la limite des conditions expérimentales présentées. Le comportement du  $\text{P}_i$  est en accord avec différents travaux [11,21,35,36], qui montrent de même que d'autres molécules, telles que l'ATP, ou des dérivés alkylés de l'acide phosphonique, marqueurs de pH potentiels, réagissent avec le milieu environnant, tout particulièrement avec des ions métalliques [21]. Dans ce contexte, des mesures de  $T_1$  ont été réalisées dans le foie isolé lors de la perfusion de solutions contenant 10 mM de diméthyl méthylphosphonate ou de PheP, et des différences significatives ont été déterminées entre le milieu intracellulaire (valeurs de  $T_1$  de 2,4 s et 1,7 s, respectivement) et extracellulaire (valeurs de  $T_1$  de 8,2 s et 6,6 s, respectivement) [12]. D'autres composés portant des groupements phosphonate, comme l'ATP, peuvent avoir des temps de relaxation très différents (de 0,4 à 14 s), selon qu'ils se trouvent dans des compartiments cellulaires distincts [36,37]. La connaissance des valeurs des  $T_1$  des aminophosphonates, comprises entre 1 et 10 s selon leur structure chimique, permettra de sélectionner une sonde qui sera proche des valeurs des composés endogènes à étudier. De plus, leur faible sensibilité à leur environnement peut être un atout certain pour des études nécessitant l'emploi de séquences d'acquisitions courtes, pour suivre par exemple l'évolution rapide de composés labiles.

Les résultats obtenus sont à rapprocher de ceux décrits dans la littérature pour des composés en solution, dans lesquels le  $T_1$  augmente avec la température pour les petites molécules en milieu peu visqueux [32]. En revanche, il a été également décrit que, pour les molécules de taille plus importante, le  $T_1$  diminue avec la température en milieu très visqueux [32]. Ceci illustre encore le fait que l'analyse de la relaxation des composés ne peut se faire qu'en prenant en compte un nombre très important de paramètres, et en premier lieu les conditions expérimentales. De manière intéressante, l'effet de l'accroissement de la température, qui, dans le cas de la présente étude, conduit à une augmentation du temps de relaxation longitudinale  $T_1$  du  $\text{P}_i$  en solution tampon, n'est pas directement transposable aux études dans les systèmes biologiques. En effet, lorsque le  $\text{P}_i$  se trouve dans des compartiments cellulaires, la situation peut être très différente. Par exemple, aucune variation significative du  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ), si ce n'est une légère diminution, n'a été observée pour le  $\text{P}_i$  cytosolique et le  $\text{P}_i$  mitochondrial, dont les  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) ont été mesurés dans le foie isolé entre 4 et 37 °C [23].

En conclusion, outre une série de nouvelles molécules, ce travail apporte un ensemble exhaustif de valeurs du temps de relaxation  $T_1$  ( $^{31}\text{P}$ ) pour 27  $\alpha$ -aminophosphonates, et analyse les variations de ce paramètre dans différentes conditions expérimentales. Une tentative d'exploration de la contribution du temps de corrélation  $\tau_c$  dans la relaxation du  $^{31}\text{P}$  a été réalisée en considérant l'impact de la masse moléculaire  $M$  de chaque composé sur la vitesse de relaxation, étant logiquement attendu que cette dernière augmente avec  $M$ . Dans le contexte d'études biologiques à venir, ces données sont indispensables. Il faut par exemple souligner que la connaissance des temps de relaxation  $T_1$  s'est avérée déterminante pour l'observation sélective du  $\text{P}_i$  extracellulaire (par saturation,  $T_1 = 8–10$  s) et du  $\text{P}_i$  intracellulaire relaxant 10 fois plus rapidement [20]. Dans le cas plus précis des marqueurs de pH, la connaissance des temps de relaxation des dérivés alkylés de l'acide phosphonique (tels que PheP) a permis une utilisation optimale de ces molécules réparties dans les différents compartiments cellulaires [12,37]. En prenant en compte les présents résultats, on peut s'attendre à ce que l'utilisation des aminophosphonates permette d'obtenir des résultats concomitants et plus directs.

## Références

- [1] A. Roos, W.F. Boron, *Physiol. Rev.* 61 (1981) 296.
- [2] C.C. Aickin, *Annu. Rev. Physiol.* 48 (1986) 349.

- [3] N. Demaurex, *News Physiol. Sci.* 17 (2002) 1.
- [4] (a) J.M. Salhany, G.M. Pieper, S. Wu, G.L. Todd, F.C. Clayton, R.S. Eliot, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11 (1979) 601 ;  
(b) P.B. Garlick, G.K. Radda, P.J. Seely, *Biochem. J.* 184 (1979) 547 ;  
(c) J.M. Bond, E. Chacon, B. Herman, J.J. Lemasters, *Am. J. Physiol.* 265 (1993) C129.
- [5] N. Raghunand, X. He, R. Van Sluis, B. Mahoney, B. Baggett, C.W. Taylor, G. Paine-Murrieta, D. Roe, Z.M. Bhujwalla, R.J. Gillies, *Br. J. Cancer* 80 (1999) 1005.
- [6] U. Issberner, P.W. Reeh, K.H. Steen, *Neurosci. Lett.* 208 (3) (1996) 191.
- [7] I.N. Rich, I. Brackmann, D. Worthington-White, M.J. Dewey, *J. Cell. Physiol.* 177 (1) (1998) 109.
- [8] D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, V. Lecureur, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 953.
- [9] R.B. Moon, J.H. Richards, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 7276.
- [10] P. Lundberg, E. Harmsen, C. Ho, H.J. Vogel, *Anal. Biochem.* 191 (1990) 193.
- [11] S.M. Hutson, D. Berkich, G.D. Williams, K. LaNoue, R.W. Briggs, *Biochemistry* 31 (1992) 1322.
- [12] K. Bruynseels, N. Gillis, P. Van Hecke, F. Vanstapel, *NMR Biomed.* 10 (1997) 263.
- [13] P.M. Robitaille, P.A. Robitaille, G.G. Brown Jr., G.G. Brown, *J. Magn. Reson.* 92 (1991) 73.
- [14] (a) F. Brénot, L. Aubry, J.-B. Martin, G. Klein, *Biochimie* 74 (1992) 883 ;  
(b) L. Davies, M. Satre, J.-B. Martin, J.D. Gross, *Cell* 75 (1993) 321 ;  
(c) M. Satre, J.B. Martin, G. Klein, *Biochimie* 71 (1989) 941.
- [15] G. Vidal, E. Thiaudière, P. Canioni, J.-L. Gallis, *NMR Biomed.* 13 (2000) 1.
- [16] N. Raghunand, M.I. Altbach, R. Van Sluis, B. Baggett, C.W. Taylor, Z.M. Bhujwalla, R.J. Gillies, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 309.
- [17] S. Pietri, M. Miollan, S. Martel, F. Le Moigne, B. Blaive, M. Culcasi, *J. Biol. Chem.* 275 (26) (2000) 19505.
- [18] S. Martel, J.L. Clement, A. Muller, M. Culcasi, S. Pietri, *Bioorg. Med. Chem.* 10 (5) (2002) 1451.
- [19] S. Pietri, S. Martel, M. Culcasi, M.C. Delmas-Beauvieux, P. Canioni, J.-L. Gallis, *J. Biol. Chem.* 276 (3) (2001) 1750.
- [20] R.A. Iles, J.R. Griffiths, A.N. Stevens, D.G. Gadian, R. Porteous, *Biochem. J.* 192 (1980) 191.
- [21] A. Suzuki, M. Maeda, S. Kuki, M.C. Steward, H. Takami, Y. Seo, M. Murakami, H. Watari, *J. Biochem.* 107 (1990) 559.
- [22] S. Neubauer, T. Krahe, R. Schindler, H. Hillenbrand, C. Entzeroth, M. Horn, W.R. Bauer, T. Stephan, K. Lackner, A. Haase, G. Ertl, *Magn. Reson. Med.* 26 (1992) 300.
- [23] S. Dufour, E. Thiaudière, G. Vidal, J.-L. Gallis, N. Rousse, P. Canioni, *J. Magn. Reson.* 113 (1996) 125.
- [24] K. Clarke, R.E. Anderson, J.-F. Nédélec, D.O. Foster, A. Ally, *Magn. Reson. Med.* 32 (1994) 181.
- [25] F. Chalié, P. Tordo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 12 (2002) 2110.
- [26] (a) G. Olive, M. van Genderen, *Magn. Reson. Chem.* 38 (2000) 379 ;  
(b) G. Olive, *Synthèse de nouvelles nitrones du type pyrroline-N-oxyde et leur utilisation en spin-trapping*, thèse de chimie organique, université de Provence, 1998.
- [27] S. Pietri, T. Liebgott, C. Fréjaville, P. Tordo, M. Culcasi, *Eur. J. Biochem.* 254 (1998) 256.
- [28] W.E. Jacobus, I.H. Pores, S.K. Lucas, C.H. Kallman, M.L. Weisfeldt, J.T. Flaherty, in : R. Nuccitelli, D.W. Deamer (Eds.), *Intracellular pH: Its Measurement, Regulation, and Utilization in Cellular Functions*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1982, p. 537.
- [29] E. Maurelli, M. Culcasi, M.-C. Delmas-Beauvieux, M. Miollan, J.-L. Gallis, T. Tron, S. Pietri, *Free Radical Biol. Med.* 27 (1999) 34.
- [30] (a) T. Glonek, P.J. Wang, J.R. Van Wazer, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 7968 ;  
(b) W.E. Morgan, J.R. Van Wazer, *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6347 ;  
(c) T. Glonek, J.R. Van Wazer, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 639.
- [31] R.K. Harris, *Nuclear Magnetic Spectroscopy : A Physicochemical View*, Longman, Harlow, UK, 1987.
- [32] M. Levitt, *Spin dynamics : Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, Wiley, 2001, p. 523.
- [33] T. Farrar, E. Becker, *Pulse and Fourier Transform NMR: Introduction to Theory and Methods*, Academic Press, 1971, p. 58.
- [34] K. Ohia, *Bull. Chem. Soc. Jpn* 65 (1992) 2543.
- [35] D.C. McCain, J.L. Markley, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5559.
- [36] J. Granot, G.A. Elgavish, J.S. Cohen, *J. Magn. Reson.* 33 (1979) 569.
- [37] K. Clarke, L.C. Stewart, S. Neubauer, J.A. Balschi, T.W. Smith, J.S. Ingwall, J.-F. Nédélec, S.M. Humphrey, A.G. Kléber, C.S. Springer Jr., *NMR Biomed.* 6 (1993) 278.