Université Louis Pasteur de Strasbourg École Européenne de Chimie, Polymère et Matériaux de Strasbourg





THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur - Strasbourg I

Discipline: Chimie

Par

Nicolas WEIBEL

Marqueurs Luminescents à Base d'Ions Lanthanides : Synthèse, Propriétés et Marquage de Protéines.

Soutenue le 8 avril 2005 devant la commission d'examen :

Pr. Michel ROHMER
Pr. Jean-Claude BÜNZLI
Pr. Marc PORT
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe

Dr. Charles MIOSKOWSKI Examinateur

Dr. Raymond ZIESSEL Directeur de Thèse Dr. Loïc CHARBONNIÈRE Co-Directeur de Thèse

Université Louis Pasteur de Strasbourg École Européenne de Chimie, Polymère et Matériaux de Strasbourg





THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur - Strasbourg I

Discipline: Chimie

Par

Nicolas WEIBEL

Marqueurs Luminescents à Base d'Ions Lanthanides : Synthèse, Propriétés et Marquage de Protéines.

Soutenue le 8 avril 2005 devant la commission d'examen :

Pr. Michel ROHMER
Pr. Jean-Claude BÜNZLI
Pr. Marc PORT
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe

Dr. Charles MIOSKOWSKI Examinateur

Dr. Raymond ZIESSEL Directeur de Thèse
Dr. Loïc CHARBONNIÈRE Co-Directeur de Thèse

« Personne ne sait ce qui se passe aujourd'hui parce que personne ne veut qu'il se passe quelque chose. En réalité on ne sait jamais ce qui se passe, on sait simplement ce qu'on veut qu'il se passe, et c'est comme ça que les choses arrivent. En 17, Lénine et ses camarades ne disaient pas « nous allons faire la révolution parce que nous voulons la révolution», ils disaient « toutes les conditions de la révolution sont réunies, la révolution est donc inéluctable ». Ils ont fait la révolution qui n'aurait jamais eu lieu s'ils ne l'avaient pas faite, et qu'ils n'auraient pas faite s'ils n'avaient pas pensé qu'elle était inéluctable uniquement parce qu'ils la voulaient. A chaque fois que quelque chose a bougé dans ce monde ça a toujours été pour le pire. Voilà pourquoi personne ne bouge, personne n'ose provoquer l'avenir. Faudrait être fou pour provoquer l'avenir. Faudrait être fou pour risquer de provoquer un nouveau 19, un nouveau 14, un nouveau 37. Si, il y aura toujours des fous et des cons pour les suivre et des sages pour ne rien faire. »

Jean-Pierre Léaud dans « La naissance de l'amour », film de Philippe Garrel (1993).

Remerciements

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Laboratoire de Chimie Moléculaire, situé à l'École Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux de Strasbourg (Université Louis Pasteur – Strasbourg I).

Je tiens avant tout à remercier le Dr. Raymond Ziessel de m'avoir accueilli au sein de son équipe, ainsi que le Dr. Loïc Charbonnière de m'avoir guidé et épaulé jour après jour dans mes travaux de recherche. Grâce à leurs vastes connaissances scientifiques, leur disponibilité et leur enthousiasme inébranlable, j'ai pu mener à bien ce projet.

Je suis tout particulièrement sensible à l'honneur que m'ont fait le Pr. Michel Rohmer, le Pr. Jean-Claude Bünzli, le Dr. Marc Port et le Dr. Charles Mioskowski en acceptant de juger ce travail.

Je témoigne ma gratitude au Pr. Aldo Roda, au Pr. Massimo Guardigli, au Dr. Claude Estournes, au Dr. Jérôme Steibel, au Dr. Michèle Cesario et au Dr. Michel Schmitt pour leur collaboration et les riches discussions que nous avons pu partager.

Un grand merci à celles et ceux qui n'ont pas été avares en conseils avisés et qui ont contribué par leur bonne humeur au climat agréable du labo: Antoinette, Franck et Gilles, les permanents; Christine, Laure, Samir et Sébastien, les étudiants en thèse; Abderr, Christophe, Guillaume sans oublier le Dr. Laurent Douce, les anciens; tous les stagiaires ayant fait étape au labo; ainsi que nos colocataires de l'équipe Ledoux, en particulier Patrick et Gauthier.

Enfin, mes remerciements les plus chaleureux sont adressés à mes parents, à ma sœur Camille et à l'ensemble de ma famille, à mes amis (Benoît, Catherine, Jocelyn, Marie, Maxime, Thomas, Ulrich...) et bien sûr à Pascale pour leur soutien illimité durant ces années.

Liste des abréviations

9N3	1,4,7-triazacyclononane	IRM	Imagerie par Résonance
ADN	acide désoxyribonucléique		Magnétique nucléaire
ADP	adénosine triphosphate	LMCT	transfert de charge du ligand au
AIBN	azobisisobutyronitrile		métal
aq.	aqueux	Ln	lanthanide
ARN	acide ribonucléique	MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption
BSA	albumine sérique bovine		Ionization Time-of-Flight
cat.	catalytique	MEB	microscopie électronique à
CCD	Charge Coupled Device		balayage
CCM	chromatographie sur couche	MLTR	microscopie de luminescence en
	mince		temps résolu
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide	mp	point de fusion
DDG	Digital Delay Generator	NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
DMF	diméthylformamide	NHS	N-hydroxysuccinimide
DMSO	diméthylsulfoxyde	NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation
DO	densité optique		Dispersion
DOTA	acide 1,4,7,10-tétraaza-	o.d.	diamètre extérieur
	cyclododécane-1,4,7,10-	OMs	mésylate
	tétraacétique	OTf	triflate
DTPA	acide diéthylènetriamine	PBS	tampon phosphate salin
	pentaacétique	quant.	quantitatif
DTPA-BMA	acide diéthylènetriamine-	RMN	résonance magnétique nucléaire
	pentaacétique-bis(méthylamide)	$S_N i$	substitution nucléophile interne
EDC·HCl	chlorhydrate de <i>N</i> -(3-	t.a.	température ambiante
	diméthylaminopropyl)-N'-	TBAI	iodure de tétrabutylammonium
	éthylcarbodiimide	THF	tétrahydrofurane
EDTA	acide	TMSCl	chlorure de triméthylsilyle
	éthylènediaminetétraacétique	TMSBr	bromure de triméthylsilyle
EDX	Energy Dispersive X-ray analysis	Tris	tris-
ESI-TOF	Electro Spray Ionization Time-of-		(hydroxyméthyl)aminométhane
	Flight	u.a.	unités arbitraires
FAB	Fast Atom Bombardment	UV	ultraviolet
hfc	3-heptafluoropropylhydroxy-		
	méthylène-(+)-camphorate		
HPLC	chromatographie liquide haute		
	performance		
ICCD	Intensified CCD		
IR	infrarouge		

Table des matières.

AVANT	Γ-PROPOS	9
CHAPI	TRE I. LES LANTHANIDES.	13
1. G	ENERALITES	13
1.1.	LES LANTHANIDES DANS LA NATURE.	14
1.2.	CONFIGURATION ELECTRONIQUE DES LANTHANIDES.	
1.3.	DEGRES D'OXYDATION ET NOMBRES DE COORDINATION	
1.4.	L'ION LN ³⁺ DANS UN ENVIRONNEMENT CHIMIQUE	
1.5.	Proprietes de luminescence	
1	5.1. $L'ion Eu^{3+}$	21
1	5.2. L'ion Tb^{3+}	
1	5.3. Durée de vie de luminescence	
1	5.4. Rendements quantiques de luminescence	24
2. A	PPLICATIONS	24
2.1.	MATERIAUX LUMINESCENTS	25
2.2.	CATALYSEURS ASYMETRIQUES.	26
2.3.	HYDROLYSE DE L'ADN ET DE L'ARN	27
2.4.	Dosages biologiques.	28
2	4.1. Généralités	
2	4.2. Dosages hétérogènes	29
2	4.3. Dosages homogènes	
2	4.4. Choix du marqueur	
2	4.5. Détection en temps résolu	
2.4	4.6. Exemples	39
2.5.	ETUDES IN VIVO.	
2.6.	FRET	43
2.7.	AGENTS DE CONTRASTE POUR L'IRM	47
2.	7.1. Principe de l'IRM	
2.	7.2. Rôle de l'agent de contraste	
2.	7.3. Toxicité	51
2.	7.4. Exemples d'agents de contraste	51
CHAPI	TRE II. COMPLEXES DE GEOMETRIE C_3	57
1. TI	RAVAUX ANTERIEURS REALISES AU LABORATOIRE	57
1.1.	STRUCTURE ET SYNTHESE DU LIGAND L¹H₃	57
1.2.	STRUCTURE DES COMPLEXES.	58
1.3.	PROPRIETES PHOTO-PHYSIQUES.	60
1.4.	STABILITE DES COMPLEXES.	61

	1.5.	MICROSCOPIE DE LUMINESCENCE EN TEMPS RESOLU.	61
2.	СНО	IX DE LA 2,2'-BIPYRIDINE SUBSTITUEE	63
	2.1.	Generalites sur la 2,2'-bipyridine.	63
	2.2.	Substitution de la 2,2'-bipyridine.	64
	2.2.1.	La 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine	64
	2.2.2.	Activation de la position 5'	65
	2.2.3.	Activation de la position 6	68
3.	LIGA	ANDS BIS- ET TRIS-TRIDENTATES.	72
	3.1.	Premiers intermediaires.	72
	3.1.1.	La 5'-aminométhyl-2,2'-bipyridine	72
	3.1.2.	La 5'-hydroxyméthyl-2,2'-bipyridine	73
	3.2.	Ligand tris-tridentate L^2H_3 .	73
	3.3.	LIGAND BIS-TRIDENTATE L^3H_2 .	75
	3.4.	COMPLEXES.	76
4.	LIGA	ANDS EN SERIE TRIS.	77
	4.1.	LE SQUELETTE TRIS.	77
	4.1.1.	Généralités	77
	4.1.2.	Protection du Tris	78
	4.2.	LIGAND TRIS-BIPYRIDINE.	80
	4.2.1.	Synthèse du ligand L^4H_3 « Tris-bipyridine »	80
	4.2.2.	Synthèse des complexes	84
	4.2.3.	Déprotection du Tris.	85
	4.2.4.	Propriétés photo-physiques	86
	4.3.	LIGAND TRIS-PYRIDINE.	97
	4.3.1.	Synthèse du ligand L^5H_3 « Tris-pyridine ».	98
	4.3.2.	Déprotection du Tris.	102
	4.3.3.	Propriétés photo-physiques	103
		E III. LIGANDS DERIVES DE L'ACIDE AMINOMALONIQUE ET DE L'ACIDE	
Gl	LUTAM	IQUE	113
1.	LA 6	-BROMO-6'-BROMOMETHYL-2,2'-BIPYRIDINE	115
2.	LIGA	AND EN SERIE AMINOMALONIQUE	116
	2.1.	SYNTHESE DU LIGAND L ⁶ H ₄	116
	2.2.	PROPRIETES PHOTO-PHYSIQUES.	
	2.2.1.	Ligand L^6H_4	118
	2.2.2.	Complexes [EuL ⁶]Na et [TbL ⁶]Na	119
	2.3.	ACTIVATION DES COMPLEXES.	121
3.	LIG	AND EN SERIE GLUTAMIOUE	123

3.1	1. Synthese du ligand L^7H_4	124
3.2	2. SYNTHESE ET CARACTERISATION DES COMPLEXES.	125
	3.2.1. Synthèse.	
	3.2.2. Spectrométrie de masse	126
	3.2.3. Spectroscopie IR	126
	3.2.4. Spectroscopie RMN	
3.3	3. Proprietes photo-physiques.	129
3.4	4. STABILITE DES COMPLEXES.	135
3.5	5. ACTIVATION DES COMPLEXES	
СНА	APITRE IV. APPLICATIONS DES COMPLEXES ACTIVES EN SERIE GLUTAN	MIQUE 141
1.	MARQUAGE DE PROTEINES.	142
1.1	1. Generalites	142
1.2	2. L'ALBUMINE SERIQUE BOVINE (BSA)	142
1.3	3. REACTION DE COUPLAGE	143
1.4	4. CARACTERISATION.	144
1.5	5. Proprietes photo-physiques.	145
1.6	6. MICROSCOPIE DE LUMINESCENCE EN TEMPS RESOLU	146
2.	MARQUAGE DE PARTICULES DE SILICE	147
2.1	1. ACTIVATIONS DES COMPLEXES EN ESTERS SULFO-NHS	148
2.2	2. REACTION DE COUPLAGE.	149
2.3	3. CARACTERISATION.	150
2.4	4. MICROSCOPIE DE LUMINESCENCE EN TEMPS RESOLU	151
2.5	5. Proprietes photo-physiques.	152
3.	UTILISATION EN IRM	156
3.1	1. Approche bimodale	157
3.2	2. MICROSCOPIE DE LUMINESCENCE EN TEMPS RESOLU	157
3.3	3. Mesure des relaxivites	159
СНА	PITRE V. OPTIMISATION DU LIGAND EN SERIE GLUTAMIQUE	165
1.	PASSAGE AUX PHOSPHONATES.	166
1.1	1. Synthese des ligands L^8Na_4 et L^9Na_6	166
1.2	2. Proprietes photo-physiques.	168
	1.2.1. Ligand L ⁹ Na ₆	
	1.2.2. Complexes [EuL ⁹]Na ₃ et [TbL ⁹]Na ₃	
2.	PASSAGE A LA PHENANTHROLINE.	174
2.1	1. SYNTHESE DU PRECURSEUR PHENANTHROLINIQUE	175
	2.1.1 Oxydation ménagée de la néocuproïne	176

p.	ARTIF F	YPERIMENTAL E	211
C	ONCLUS	SION	205
	3.4.2.	Complexes [EuL ¹¹] et [TbL ¹¹]	198
	3.4.1.	Ligand $L^{II}H_3$	198
		PROPRIETES PHOTO-PHYSIQUES.	
	3.3.	SYNTHESE ET CARACTERISATION DES COMPLEXES.	196
	3.2.	SYNTHESE DU LIGAND L ¹¹ H ₃ .	195
	3.1.	SYNTHESE DU PRECURSEUR PYRIDINIQUE.	193
3.	DEP	LACEMENT DE LA MOLECULE D'EAU COORDINEE	192
	2.3.2.	Complexes [EuL ¹⁰]Na et [TbL ¹⁰]Na	
	2.3.1.	Ligand $L^{10}H_4$	
	2.3.	PROPRIETES PHOTO-PHYSIQUES.	
	2.2.	SYNTHESE DU LIGAND L ¹⁰ H ₄ .	
	2.1.3.	Voie de la 8-nitroquinaldine	179
	2.1.2.	Réduction ménagée de la bis-ester-1,10-phénanthroline	

Avant-propos.

Avant-propos.

De nombreux composés inorganiques sont utilisés en chimie biomédicale, comme agents Pt. thérapeutiques (Li, Au, Bi) mais aussi comme agents diagnostic (radiopharmaceutiques). Les isotopes radioactifs permettent des explorations fonctionnelles in vivo (scintigraphie) ainsi que des diagnostics in vitro (dosages radioimmunologiques). La détection de ces traceurs est fiable et spécifique, les principaux inconvénients de ces isotopes radioactifs étant leur manipulation, leur stockage et leur élimination. De nouveaux systèmes de détection non isotopiques ont plus récemment été développés, comme les fluorophores organiques (la famille de la fluorescéine par exemple) généralement associés à des techniques de microscopie de fluorescence conventionnelle. La sensibilité est suffisante pour de nombreuses applications en imagerie biologique (visualisation de tissus et cellules). Néanmoins leur utilisation est limitée par l'autofluorescence (augmentation du bruit de fond) et la diffraction de lumière dans les milieux biologiques étudiés.

La luminescence en temps résolu a fait son apparition pour parer à ces limitations. L'application d'un délai approprié entre l'excitation de l'échantillon et la mesure du signal de luminescence permet de s'affranchir de l'autofluorescence et de la diffraction de lumière, la source étant éteinte durant l'enregistrement du signal émis. La plupart des fluorophores organiques développés ont des durées de vie de fluorescence courtes (de l'ordre de la nanoseconde), tout comme les molécules fluorescentes présentes dans les milieux étudiés. Il n'est donc pas possible d'effectuer une discrimination temporelle entre le signal à détecter et l'autofluorescence du milieu. Il a donc été nécessaire de développer de nouveaux luminophores ayant des durées de vie de luminescence élevées, comme ceux basés sur des transitions électroniques interdites, pour pouvoir profiter des nouvelles possibilités offertes par la luminescence en temps résolu.

A la fin des années 70, les complexes luminescents de lanthanides sont apparus comme des candidats intéressants en tant que marqueurs destinés à des applications biomédicales. Dans le cas de l'europium et du terbium, des temps de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde peuvent être obtenus, ce qui permet d'améliorer la résolution temporelle lors du traitement du signal tout en augmentant le rapport signal sur bruit. De nombreux complexes de lanthanides sont apparus depuis, mais très peu ont connu un développement commercial.

Cette tendance peut s'expliquer par les nombreuses caractéristiques à remplir par le composé pour permettre une utilisation en temps résolu. Tout d'abord le marqueur doit être soluble et stable dans l'eau pour être utilisable dans différents milieux biologiques sans libération du cation métallique toxique. Il doit présenter une absorption intense accessible énergétiquement pour permettre une excitation aisée de l'échantillon. Le ligand doit posséder des chromophores pour bénéficier de l'effet d'antenne, grâce auquel l'énergie absorbée par le ligand est, après croisement intersystème, transférée de manière non radiative au cation lanthanide émetteur. La luminescence de l'ion métallique doit être intense et la durée de vie de ses états excités longue. Enfin le ligand doit posséder une fonction qui peut être activée orthogonalement pour permettre le greffage du complexe sur la biomolécule à marquer.

Ainsi, nous avons organisé ce mémoire de thèse selon cinq chapitres. Dans un premier temps, nous présenterons les propriétés particulières des lanthanides ainsi que quelques unes de leurs applications, en particulier celles conduisant à l'utilisation de chélates d'europium et de terbium(III) comme marqueurs luminescents (Chapitre I). Une première série de ligands (L^2 à L^5) conçus autour de l'unité 6-carboxy-2,2'-bipyridine ainsi que les propriétés photophysiques de leurs complexes (Eu^{3+} , Tb^{3+}) seront exposés (Chapitre II). Deux autres ligands en série aminomalonique (L^6) et glutamique (L^7) ont ensuite été développés, leurs complexes présentent des propriétés de luminescence élevées et une fonction résiduelle potentiellement activable en vue d'un greffage (Chapitre III). Les complexes activés en série glutamique ont permis le marquage de différents composés (particules de silice, protéine modèle) conduisant à leur utilisation en microscopie de luminescence en temps résolu (Eu^{3+} , Tb^{3+}) et à l'étude de leur relaxivité (Gd^{3+}); ces résultats seront exposés dans le Chapitre IV. Nous conclurons enfin ce travail par le Chapitre V consacré aux premières modifications apportées à ces chélates (ligands L^8 à L^{11}) dans le but d'affiner leurs propriétés aussi bien physico-chimiques (stabilité) que spectroscopiques (absorption, émission).

Chapitre I.

Les lanthanides.

Chapitre I. Les lanthanides.

Dans ce chapitre d'introduction, nous allons nous intéresser aux propriétés électroniques et spectroscopiques des lanthanides ainsi qu'aux diverses applications qui en découlent (matériaux luminescents, catalyse...) avant de décrire l'utilisation de chélates de lanthanides comme marqueurs luminescents pour l'analyse biologique.

1. Généralités.

Les 14 éléments qui suivent le lanthane (Z = 57) dans la classification périodique des éléments sont désignés sous le terme de *lanthanides*, et comprennent généralement le lanthane lui-même (**Tableau 1**). Cette famille est subdivisée en deux catégories :

- le groupe *cérique*, du lanthane ⁵⁷La au samarium ⁶²Sm;
- le groupe *yttrique*, du l'europium ⁶³Eu au lutécium ⁷¹Lu.

Tableau 1. Configurations électroniques des lanthanides et de leurs ions trivalents, ainsi que leurs rayons

ioniques (nombre de coordination = 6).

Numéro	Nom	Symbole	Configuration	Configuration	Rayon ionique
atomique Z			électronique Ln	électronique Ln ³⁺	$Ln^{3+} (\mathring{A})^1$
57	Lanthane	La	$[Xe]5d^16s^2$	$[Xe]4f^0$	1,061
58	Cérium	Ce	$[\mathrm{Xe}]4f^{1}5d^{1}6s^{2}$	$[Xe]4f^1$	1,034
59	Praséodyme	Pr	$[Xe]4f^36s^2$	$[Xe]4f^2$	1,013
60	Néodyme	Nd	$[Xe]4f^46s^2$	$[Xe]4f^3$	0,995
61	Prométhéum	Pm	$[Xe]4f^56s^2$	$[Xe]4f^4$	0,979
62	Samarium	Sm	$[Xe]4f^66s^2$	$[Xe]4f^5$	0,964
63	Europium	Eu	$[Xe]4f^76s^2$	[Xe]4 <i>f</i> ⁶	0,950
64	Gadolinium	Gd	$[Xe]4f^{7}5d^{1}6s^{2}$	$[Xe]4f^7$	0,938
65	Terbium	Tb	$[Xe]4f^96s^2$	[Xe]4 <i>f</i> ⁸	0,923
66	Dysprosium	Dy	$[Xe]4f^{10}6s^2$	[Xe]4f ⁹	0,908
67	Holmium	Но	$[Xe]4f^{11}6s^2$	$[Xe]4f^{10}$	0,894
68	Erbium	Er	$[Xe]4f^{12}6s^2$	$[Xe]4f^{11}$	0,881
69	Thulium	Tm	$[Xe]4f^{13}6s^2$	$[Xe]4f^{12}$	0,869
70	Ytterbium	Yb	$[Xe]4f^{14}6s^2$	$[Xe]4f^{13}$	0,858
71	Lutécium	Lu	$[Xe]4f^{14}5d^{1}6s^{2}$	$[Xe]4f^{14}$	0,848

¹ Templeton, D. H.; Dauben, C. H. J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 5237.

Les terres rares comprennent l'ensemble des lanthanides complété du scandium ²¹Sc et de l'yttrium ³⁹Y. Avec les éléments compris entre l'actinium ⁸⁹Ac et le lawrencium ¹⁰³Lw appelés actinides,² les lanthanides forment l'ensemble des métaux du bloc f. Notons que le prométhéum ⁶¹Pm est un élément radioactif n'existant pas à l'état naturel, qui est produit sous forme d'isotope instable lors de la fission du novau d'uranium ⁹²U.

1.1. Les lanthanides dans la nature.

Contrairement à leur appellation, de nombreuses terres rares sont relativement abondantes dans l'écorce terrestre, principalement sous forme d'oxydes (Tableau 2). La concentration globale des terres rares y est du même ordre de grandeur que le zinc (0,016%) et largement supérieure aux teneurs en plomb et en argent. Notons que l'élément le plus abondant est le cérium, ce dernier présentant une teneur comprise entre celles du cuivre et de l'étain. Les lanthanides les moins abondants (l'europium, le terbium, le thulium et le lutétium) sont présents à des concentrations comparables à celles du mercure ou du cadmium.

Tableau 2. Teneur de l'écorce terrestre en différents oxydes de terres rares.³

Terre rare	Oxyde	Teneur (ppm)	Terre rare	Oxyde	Teneur (ppm)
Y	Y_2O_3	28	Gd	Gd ₂ O ₃	6,4
La	La_2O_3	18	Tb	Tb_4O_7	0,9
Ce	CeO_2	46	Dy	Dy_2O_3	5
Pr	Pr_6O_{11}	5,5	Но	Ho_2O_3	1,2
Nd	Nd_2O_3	24	Er	Er_2O_3	4
Pm	-	-	Tm	Tm_2O_3	0,4
Sm	Sm_2O_3	6,5	Yb	Yb_2O_3	2,7
Eu	Eu ₂ O ₃	0,5	Lu	Lu ₂ O ₃	0,8

La monazite est le minerai de terres rares le plus abondant, et également le principal minerai de thorium. Obtenu lors du traitement de l'ilménite, minerai mixte et source principale de titane, il est composé de phosphates de terres rares Ln(PO₄) et est enrichi par séparation magnétique. La bastnaésite offre une forte teneur en terres rares cériques et en europium,

² Cotton, F. A.; Wilkinson, G. In *Advanced Inorganic Chemistry*, Fifth Ed.; John Wiley & Sons: New York,

³ http://www.sfc.fr/Donnees/mine/tera/textera.htm#Teneurs minerais

présents sous forme de fluorocarbonates Ln(FCO₃). Ce minerai est exploité en Chine et aux Etats-Unis, et est enrichi par flottation. La *xénotime* dont la production est plus restreinte, est constituée de phosphates de terres yttriques et provient du traitement d'un minerai d'étain exploité en Malaisie. Notons que certaines argiles appelées minerais ioniques exploitées en Chine renferment 0,2% d'oxydes de terres rares sous la forme d'ions adsorbés. Ceux-ci sont récupérés par lixiviation avec des solutions salines. Ces minerais contiennent généralement des teneurs élevées en europium.³

Les lanthanides ne sont présents qu'à l'état de traces dans les organismes vivants, et ne semblent y jouer aucun rôle biologique. Chez l'humain, leur concentration moyenne varie entre 0.5 (tissus osseux) et $10.3 \,\mu\text{g/g}$ (foie). Les ions lanthanides sont des acides de Lewis durs pouvant interagir de manière spécifique avec certaines substances biologiques, grâce à leur forte affinité pour les atomes donneurs, en particulier pour l'oxygène (O > N > S). De manière plus générale, ils vont se lier très facilement à des ligands (acides aminés, sucres, nucléotides, nucléosides) présentant des groupements oxygénés chargés négativement (carboxylates, phosphates) ou neutres (carbonyles, hydroxyles).

1.2. Configuration électronique des lanthanides.

En parcourant la période allant du lanthane 57 La au lutétium 71 Lu, la configuration électronique de l'atome varie de [Xe]4f $^{0}5d$ $^{1}6s$ 2 à [Xe]4f $^{14}5d$ $^{1}6s$ (**Tableau 1**), conduisant ainsi au remplissage progressif de la sous-couche 4f (**Figure 1**).

Nous observons une diminution monotone du rayon ionique de Ln³⁺ lorsque le numéro atomique augmente (**Tableau 1**), ce phénomène est nommé *contraction lanthanidique* et provient de l'augmentation de la charge nucléaire. Cette contraction, de l'ordre de 16% entre le lanthane et le lutécium, n'affecte que faiblement les propriétés physico-chimiques des lanthanides le long de la série.

Ajoutons que seuls le lanthane(III) et le lutécium(III) sont diamagnétiques, tous les autres lanthanides étant paramagnétiques.

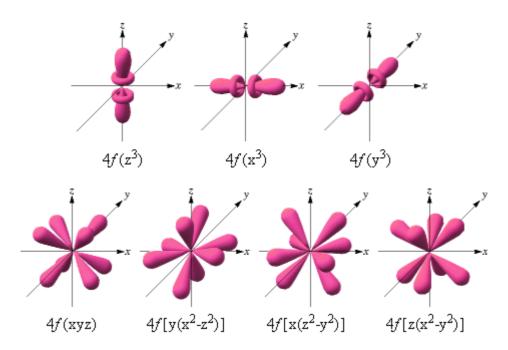


Figure 1. Représentation⁴ des orbitales 4f.

1.3. Degrés d'oxydation et nombres de coordination.

Les enthalpies de leurs trois premières ionisations étant relativement faibles, les lanthanides sont des éléments fortement électropositifs. Ils possèdent la capacité à stabiliser l'état d'oxydation (+3), qui se retrouve à l'état solide dans les oxydes de lanthanides Ln₂O₃, dans les ions *aqua* [Ln(H₂O)_n]³⁺ ou encore dans leurs complexes. Pour certains d'entre eux, les ions Ln²⁺ (Sm²⁺, Eu²⁺, Yb²⁺) ou Ln⁴⁺ (Ce⁴⁺, Pr⁴⁺, Tb⁴⁺) peuvent exister en solution ou à l'état solide, mais bénéficient d'une stabilisation beaucoup plus faible.⁵

Les complexes de lanthanides présentent des nombres de coordination compris entre 6 et 12 à l'état solide et en solution, des valeurs de 8 ou 9 étant les plus communes. En solution, le nombre de coordination de l'ion $aqua \left[\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_n \right]^{3+}$ varie de 9 en début de série à 8 en fin de série sous l'influence de la contraction lanthanidique.

⁴ http://hmchemdemo.clt.binghamton.edu/

⁵ Meyer, G. Chem. Rev. 1988, 88, 93.

1.4. L'ion Ln³⁺ dans un environnement chimique.

Un métal de transition du bloc *d* possède, sous forme ionique en solution, une première sphère de coordination bien définie, la seconde sphère de coordination étant formée par les autres espèces l'entourant.² Les propriétés principales d'un système sont déterminées par la nature de l'ion métallique et par la symétrie de sa première sphère de coordination. Dans ce cas, il est usuel de considérer le métal et sa première sphère de coordination comme une unique espèce appelée complexe, la seconde sphère de coordination perturbant alors l'environnement du complexe.

Pour un ion du bloc f, la situation n'est pas identique, la première sphère de coordination étant souvent moins bien définie et ses propriétés spectroscopiques ne dépendant que faiblement de son environnement. Cela provient du fait que les ions de valence occupent des orbitales f fortement écrantées par les électrons des couches supérieures s et p. Ainsi pour les ions du bloc f, il est plus approprié de considérer la première sphère de coordination comme une perturbation de l'ion « nu ». De cette manière, la première sphère de coordination d'un ion du bloc f joue un rôle similaire à celui joué par la seconde sphère de coordination d'un complexe métallique du bloc f. Dans ce cadre, nous pouvons citer l'exemple des bandes de transfert de charge de la première sphère de coordination du ligand vers le métal pour des ions du bloc f dont les intensités f sont aussi faibles que celles de la seconde sphère de coordination du ligand vers le métal pour des complexes métalliques du bloc f.

Ainsi, la perturbation des électrons f d'un ion lanthanide par la seconde sphère de coordination va influencer le comportement des ses états excités selon l'environnement chimique dans lequel il se trouve. ⁸ Illustrons cela sur l'exemple de l'ion Eu^{3+} , dont la configuration électronique $4f^{6}$ donne naissance à différents termes dont les énergies sont déterminées par la combinaison de la répulsion interélectronique, du couplage spin-orbite et du champ du ligand dans le cas d'un complexe (**Figure 2**).

⁶ Heath, G. A.; Yellowlees, L. J.; Braterman, P. S. Chem. Phys. Lett. 1982, 92, 646.

⁷ Ryan, J. L.; Jørgensen, C. K. J. Phys. Chem. **1966**, 70, 2845.

⁸ Balzani, V.; Sabbatini, N. Chem. Rev. **1986**, 86, 319.

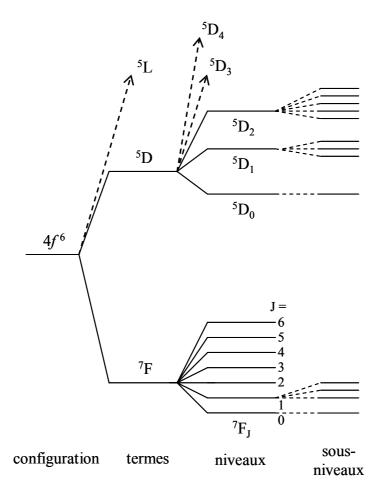


Figure 2. Diagramme d'énergie partiel de l'ion Eu³⁺ résultant de la répulsion interélectronique, du couplage spin-orbite et du champ du ligand.⁹

La répulsion interélectronique fournit des termes séparés d'environ 10000 cm⁻¹. Le couplage spin-orbite subdivise ensuite ces termes en différents niveaux J avec un écart typique de 1000 cm⁻¹. Enfin dans le cas d'un complexe, la dégénérescence des niveaux de l'ion libre est partiellement ou totalement levée par le champ du ligand (écart de l'ordre de 100 cm⁻¹). Il est à noter que les amplitudes relatives du couplage spin-orbite et du champ du ligand sont inversées par rapport aux complexes métalliques du bloc *d*.

1.5. Propriétés de luminescence.

La règle de Laporte (ou règle de parité) interdit les transitions conduisant à la redistribution d'électrons au sein d'une même sous-couche, c'est-à-dire entre des orbitales ayant les mêmes propriétés de symétrie par rapport à un centre d'inversion. Ainsi, les transitions *p-p*, *d-d* et *f-f*

_

⁹ Bünzli, J.-C. G. In *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice*; Bünzli, J.-C. G., Choppin, G. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1989; Chapter 7.

sont interdites. La règle de spin interdit quant à elle les transitions impliquant un changement de spin. Les transitions optiques de type dipôle électrique qui nous intéressent prennent place entre des niveaux 4f, elles sont donc interdites par la règle de Laporte et la règle de spin.

En plus de leurs propriétés redox ajustables et de leur acidité de Lewis associées à leur configuration électronique particulière [Xe] $4f^n$, les ions Ln(III) possèdent des états excités résultant de transitions électroniques internes 4f-4f conférant au centre métallique des propriétés spectroscopiques séduisantes. Les électrons 4f ne participent pas significativement à des liaisons chimiques et se comportent plutôt comme des électrons de cœur, ce qui se traduit par des bandes d'absorption et d'émission très fines. De plus, comme les transitions 4f-4f sont interdites par la règle de Laporte et la règle de sélection de spin, ces bandes présentent des probabilités de transition extrêmement faibles ($\epsilon \le 1 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Par comparaison, des bandes larges sont généralement observées pour les transitions d-d.

La répartition énergétique des niveaux des ions lanthanide en solution a été établie¹¹ à partir des données de la littérature¹⁰ (**Figure 3**). Lorsque l'écart d'énergie entre le niveau luminescent de plus basse énergie et le niveau non luminescent de plus haute énergie coïncide avec un ou plusieurs quanta d'énergie vibrationnelle d'une molécule de solvant (oscillateurs O-H pour l'eau), une désactivation non radiative de l'état excité peut prendre place au détriment de la luminescence attendue. Notons que la vitesse de cette désactivation non radiative est directement proportionnelle au nombre d'oscillateurs O-H présents en première sphère de coordination de l'ion métallique.

¹⁰ Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K. J. Chem. Phys. **1968**, 49, 4412 à 4450.

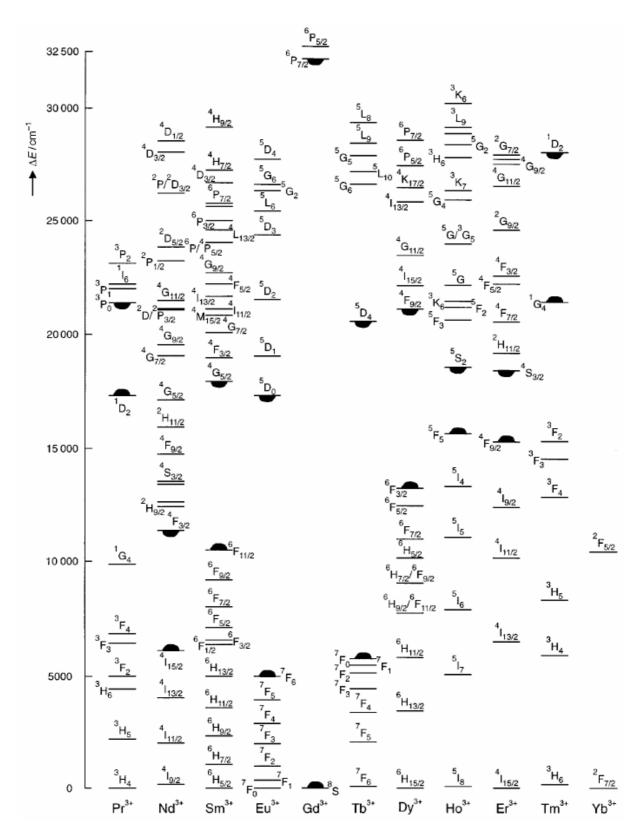


Figure 3. Diagramme d'énergie des ions lanthanides en solution aqueuse. Les niveaux luminescents les plus bas (**●**) et les niveaux non luminescents suivants (**●**) sont représentés. 11

¹¹ (a) Stein, G.; Würzberg, E. *J. Chem. Phys.* **1975**, *62*, 208. (b) Oude Wolbers, M. P.; van Veggel, F. C. J. M.; Snellink-Ruël, B. H. M.; Hofstraat, J. W.; Geurts, F. A. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2 1998**, 2141.

Nous allons dès à présenter nous focaliser sur les propriétés spectroscopiques particulières des ions europium et terbium(III) car ce sont eux que nous allons utiliser pour concevoir de nouveaux complexes de lanthanides luminescents dans le visible, grâce notamment à leurs durées de vie et rendements quantiques de luminescence qui peuvent être exceptionnellement élevés.

1.5.1. L'ion Eu³⁺.

La luminescence des complexes d'europium(III) en solution est associée aux transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ (J=0-6) recensées dans le **Tableau 3**, les bandes d'émission les plus intenses correspondant aux transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$. La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$, bien que de faible intensité, est unique et caractéristique d'un environnement chimique donné autour de l'ion Eu³⁺.

Tableau 3. Caractéristiques des transitions luminescentes de complexes d'europium en solution. 9

Transition	Caractère	Région	Intensité	Commentaires
	dipolaire	spectrale		
	principal	(nm)		
$^{5}D_0 \rightarrow ^{7}F_0$	électrique	577-581	faible	interdite, non dégénérée
$^{5}\mathrm{D}_{0} \rightarrow {}^{7}\mathrm{F}_{1}$	magnétique	585-600	forte	permise, peu sensible à
				l'environnement, forte activité
				optique
$^{5}\mathrm{D}_{0} \rightarrow {}^{7}\mathrm{F}_{2}$	électrique	610-625	forte	hypersensible
$^{5}\mathrm{D}_{0} \rightarrow ^{7}\mathrm{F}_{3}$	électrique	640-655	faible	interdite, toujours très faible
$^{5}\mathrm{D}_{0} \rightarrow {}^{7}\mathrm{F}_{4}$	électrique	680-710	moyenne	sensible à l'environnement
$^5D_0 \rightarrow {}^7F_5$	électrique	740-770	faible	interdite, rarement observée
$^{5}\mathrm{D}_{0} \rightarrow {}^{7}\mathrm{F}_{6}$	électrique	810-840	faible	rarement observée

Les intensités relatives des émissions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ sont très sensibles à l'environnement du ligand. En effet, la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ (caractère de dipôle électrique) est *hypersensible* à cet environnement alors que la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ (fort caractère de dipôle magnétique) n'y est que peu sensible. Le rapport de ces intensités va donc être un indicateur de la symétrie adoptée autour du cation lanthanide solvaté. Un composé

d'europium avec un centre d'inversion va présenter un spectre d'émission dominé par la transition de type dipôle magnétique ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, alors que la réciproque n'est pas forcément vraie. La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ est par exemple plus intense que la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ pour l'espèce $[Eu(H_2O)_n]^{3+}$ dans l'eau, ce qui ne signifie pas nécessairement que l'ion *aqua* possède un centre d'inversion. Dans le groupe de symétrie D_{3h} un tel élément est absent, mais les règles de sélection autorisent seulement une des cinq transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ possibles. De cette manière, l'intensité totale de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ sera plus faible que celle de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$. Par contre un centre d'inversion est présent lorsque les intensités des transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ sont toutes les deux faibles.

La luminescence à partir des niveaux excités supérieurs 5D_1 , 5D_2 et 5D_3 est généralement faible en solution, car ils sont efficacement désactivés vers le niveau 5D_0 . Notons qu'à l'état solide, des bandes d'émission intenses à partir de ces niveaux sont parfois observées.

1.5.2. L'ion Tb³⁺.

Les bandes d'émission caractéristiques des complexes de terbium(III) en solution proviennent exclusivement du niveau 5D_4 et sont associées aux transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ (J=0-6) présentées dans le **Tableau 4**. La transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ conduit invariablement à la bande de luminescence la plus intense et les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_0$ et ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_1$ présentent toujours de faibles intensités. Les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3$ et ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ possèdent un fort caractère de dipôle magnétique.

Tableau 4. Caractéristiques des transitions luminescentes de complexes de terbium en solution.⁹

Transition	Région spectrale (nm)	Intensité	Commentaires
$^{5}\mathrm{D}_{4} \rightarrow ^{7}\mathrm{F}_{6}$	480-505	moyenne - forte	sensible à l'environnement
$^5D_4 \rightarrow ^7F_5$	535-555	forte	forte activité optique
$^{5}\mathrm{D_{4}} \rightarrow ^{7}\mathrm{F_{4}}$	580-600	moyenne - forte	sensible à l'environnement
$^{5}\mathrm{D_{4}} \rightarrow ^{7}\mathrm{F_{3}}$	615-625	moyenne	forte activité optique
$^{5}\mathrm{D_{4}} \rightarrow {^{7}\mathrm{F}_{2}}$	640-655	faible	sensible à l'environnement
$^{5}\mathrm{D_4} \rightarrow {}^{7}\mathrm{F_1}$	660-670	faible	toujours faible
$^5D_4 \rightarrow ^7F_0$	675-680	faible	toujours faible

La luminescence du cation Tb^{3+} et en particulier les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ (J=6, 4, 2) possèdent une certaine sensibilité à la nature des ligands coordinés, mais aucune transition n'est hypersensible à l'environnement du ligand. Contrairement au cas de l'europium(III), il n'est pas possible d'obtenir des informations précises par ce biais quant à la symétrie du site de coordination à cause de la dégénérescence du niveau 5D_4 .

1.5.3. Durée de vie de luminescence.

Les durées de vie de luminescence de l'ion Eu^{3+} à partir du niveau 5D_0 , typiquement comprises entre 0,1 et 2,0 ms en solution aqueuse, peuvent atteindre 2,5 ms en solution anhydre et 4,5 ms dans des solvants deutériés. Contrairement aux durées de vie de luminescence à partir du niveau 5D_1 (< 0,05 ms), elles ne dépendent que faiblement de la température.

Les durées de vie de luminescence de l'ion Tb³⁺ à partir du niveau ⁵D₄ sont généralement supérieures à celles de l'europium(III), elles sont comprises entre 0,4 et 5,0 ms en solution aqueuse, et sont relativement insensibles à la température. Dans le cas d'un ligand possédant un chromophore permettant un transfert d'énergie non radiatif du ligand vers le métal, un transfert en retour (du métal vers le ligand) activé thermiquement peut avoir lieu selon la position énergétique de l'état triplet centré sur le ligand. ¹² Dans ce cas, la durée de vie de luminescence du terbium dépend de la température.

A titre d'exemple, les durées de vie de luminescence à température ambiante du nitrate d'europium et de terbium(III) dans différents solvants sont données dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Durées de vie de luminescence à température ambiante (ms) de solutions diluées (< 0,1 M) de nitrates Ln(NO₂)₂.

Lanthanide	H ₂ O	D ₂ O	CH ₃ CN	DMSO
Eu	0,114	3,71	1,35	1,40
Tb	0,478	3,20	1,87	2,61

-

¹² Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J. C.; Kankare, J. J. Lumin. **1997**, 75, 149.

1.5.4. Rendements quantiques de luminescence.

Le rendement quantique Φ d'un composé luminescent est défini comme étant le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés (**Équation 1**).

$$\Phi = \frac{\text{Nb. photons \'emis}}{\text{Nb. photons absorb\'es}}$$

Équation 1. Formule générale définissant le rendement quantique de luminescence Φ .

En pratique, le rendement quantique du composé étudié est déterminé par comparaison avec un composé fluorescent de référence. Pour minimiser le risque d'erreurs liées aux facteurs de corrections du système de détection, il est souhaitable que les deux composés puissent être excités à la même longueur d'onde et que leurs spectres d'émission couvrent le même domaine.

Le rendement quantique d'un complexe en solution dépend de nombreux facteurs, dont la nature du solvant comme l'illustre l'exemple donné (**Tableau 6**).

Tableau 6. Rendements quantiques (%) de perchlorates Ln(ClO₄)₃ dans différents solvants.

Lanthanide	H ₂ O	D_2O	CH ₃ CN	DMSO
Eu	0,5	78	20	27
Tb	8,4	-	-	-

2. Applications.

Les propriétés spectroscopiques, électroniques et magnétiques particulières des lanthanides, éloignées de celles des métaux du bloc *d*, permettent leur utilisation dans de nombreux domaines en tant que matériaux luminescents, catalyseurs ou encore marqueurs luminescents pour des applications en analyse biologique. Dans ce cadre, nous allons passer en revue un certain nombre de leurs développements récents avant d'aborder le domaine qui nous intéresse tout particulièrement, le marquage de molécules biologiques.

2.1. Matériaux luminescents.

L'incorporation de lanthanides à différents types de matrices est d'un grand intérêt pour le développement de nouveaux dispositifs optoélectroniques.¹³ Grâce à leurs propriétés uniques de luminescence, ces matériaux luminescents, dopés à hauteur de quelques pourcents molaires, couvrent toute la gamme utile du spectre, de l'infrarouge proche (Pr³⁺, Nd³⁺, Er³⁺) au rouge (Sm³⁺, Eu³⁺), jaune (Dy³⁺), vert (Tb³⁺) et bleu (Ce³⁺, Tm³⁺).

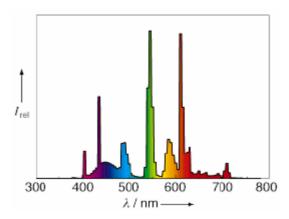


Figure 4. Spectre d'émission d'une lampe fluorescente tricolore. ¹⁴

Il est intéressant de noter que 90% des photons produits artificiellement sur Terre proviennent de lampes à décharge. Les sources lumineuses les plus efficaces sont basées sur l'émission directe ou indirecte de lumière à partir d'un plasma à décharge, le système actuellement le plus répandu étant le plasma à mercure, qui présente un taux de conversion d'énergie élevé (\sim 75%). Depuis le début des années 1970, des lampes fluorescentes tricolores utilisant un plasma à mercure basse pression permettent d'atteindre une efficacité et un rendu de couleurs très élevés. Ainsi, une lampe fluorescente employant les matériaux luminescents BaMgAl $_{10}$ O $_{17}$:Eu, (Ce,Gd,Tb)MgB $_{5}$ O $_{10}$ et Y $_{2}$ O $_{3}$:Eu va présenter un spectre d'émission avec des maxima à 450, 540 et 610 nm respectivement (**Figure 4**). L'ion Tb $_{3}$ + n'absorbant qu'à des longueurs d'ondes inférieures à 230 nm dans la plupart des matrices, il ne peut être excité directement par le plasma à mercure, dont le maximum d'émission se situe à 254 nm. L'ion Ce $_{3}$ + présente quant à lui un coefficient d'absorption élevé entre 250 et 350 nm, il va donc absorber l'énergie d'excitation puis la transférer à l'ion Tb $_{3}$ +.

¹³ Maas, H.; Currao, A.; Calzaferri, G. Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2495.

¹⁴ Jüstel, T.; Nikol, H.; Ronda, C. Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 3084.

Après 50 années de recherche, les matériaux luminescents actuellement employés possèdent des propriétés exceptionnelles (rendements quantiques, coefficients d'absorption), et ont permis l'avènement de nouveaux systèmes d'affichage, comme les écrans plats à plasma.¹⁴

2.2. Catalyseurs asymétriques.

L'utilisation des lanthanides comme catalyseurs pour la synthèse organique a pris son essor avec les travaux précurseurs de Kagan et al.¹⁵ sur les réactions activées par SmI₂ et ceux de Luche et al.¹⁶ sur la réduction chimio- et stéréosélective de fonctions carbonyle par CeCl₃/NaBH₄. L'intérêt des lanthanides pour la catalyse asymétrique¹⁷ a été démontré pour la première fois par Danishefsky et al.¹⁸ avec une réaction de Diels-Alder activée par le complexe [Eu(hfc)₃] (**Figure 5**) dont les excès énantiomériques pouvaient atteindre 58%.

Figure 5. Structure du complexe [Eu(hfc)₃] dérivé du 3-heptafluoropropylhydroxyméthylène-(+)-camphorate (hfc).

D'autres complexes de lanthanides catalysent efficacement diverses réactions énantiosélectives comme les réactions de réduction de Meerwein-Ponndorf-Verley, ¹⁹ d'hydrogénation, ²⁰ d'hydrosilylation, ²¹ d'hydroamination, ²⁰ de polymérisation ²² ou encore de Mukaiyama. ²³ Les propriétés catalytiques des lanthanides proviennent principalement de leur acidité selon Lewis.

26

 ⁽a) Namy, J. L.; Girard, P.; Kagan, H. B. *Nouv. J. Chim.* 1977, *I*, 5. (b) Girard, P.; Namy, J. L.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1980, *102*, 2693.
 (a) Luche, J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* 1978, *100*, 2226. (b) Luche, J.-L.; Rodriguez-Hahn, L.; Crabbe, P. *J. Chem.*

¹⁶ (a) Luche, J.-L. J. Am. Chem. Soc. **1978**, 100, 2226. (b) Luche, J.-L.; Rodriguez-Hahn, L.; Crabbe, P. J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1978**, 601. (c) Gernal, A. L.; Luche, J. L. J. Am. Chem. Soc. **1981**, 103, 5454.

¹⁷ (a) Aspinall, H. C. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1807. (b) Shibasaski, M.; Yoshikawa, N. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2187. (c) Inanaga, J.; Furuno, H.; Hayano, T. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2211.

¹⁸ Bednarski, M.; Maring, C.; Danishefsky, S. Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 3451.

¹⁹ Evans, D. A.; Nelson, S. G.; Gagné, M. R.; Muci, A.R. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 9800.

²⁰ Giardello, M. A.; Conticello, V. P.; Brard, L.; Gagné, M. R.; Marks, T. J. J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 10241.

²¹ Fu, P.-F.; Brard, L.; Li, Y.; Marks, T. J. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 7157.

²² Giardello, M. A.; Yamamoto, Y.; Brard, L.; Marks, T. J. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 3276.

²³ Uotsu, K.; Sasai, H.; Shibasaki, M. Tetrahedron: Asymmetry 1995, 6, 71.

2.3. Hydrolyse de l'ADN et de l'ARN.

Actuellement, l'ADN de bactéries ou virus est manipulé à l'aide d'enzymes naturelles. Dans le but d'exploiter l'ADN d'animaux ou de plantes d'ordres supérieurs, la conception d'enzymes artificielles permettant la coupure spécifique de certaines séquences de l'ADN et de l'ARN est nécessaire. Jusqu'à récemment, l'hydrolyse de l'ADN n'était pas possible en l'absence d'enzymes naturelles, et l'hydrolyse non enzymatique de l'ARN était ardue. Cela provient de l'extrême stabilité de la liaison phosphodiester qui, à pH 7 et à 30°C, présente des demi-vies estimées à 1000 ans pour l'ARN et 200 millions d'années pour l'ADN !²⁴

Il y a quelques années, la remarquable activité catalytique d'ions lanthanides pour l'hydrolyse d'acides nucléiques a été découverte, permettant ainsi l'hydrolyse de l'ADN²⁵ et de l'ARN²⁶ dans des conditions physiologiques avec des vitesses raisonnables. Le Ce⁴⁺ est le plus actif pour l'hydrolyse de l'ADN,²⁷ alors que les trois derniers ions de la série des lanthanides (Tm³⁺, Yb³⁺ et Lu³⁺) constituent d'excellents catalyseurs pour l'hydrolyse de l'ARN.²⁸ Avec ces ions métalliques, des accélérations de l'ordre de 10⁸ à 10¹² sont obtenues.

Sur l'exemple de l'ARN, l'hydrolyse de la liaison phosphodiester débute par la coordination de l'ARN au cation Ln³+ (acide de Lewis oxophile) du complexe bimétallique [(Ln³+)2(OH)2]⁴+, ce qui accentue le caractère électrophile de l'atome de phosphore (**Schéma** 1). Une addition nucléophile du groupement OH en position 2' a ensuite lieu sur le centre phosphoré, l'hydroxyde coordiné au lanthanide jouant le rôle de catalyseur basique. L'autre alternative est que le groupement OH en position 2' soit directement coordiné au lanthanide, la formation de l'alcoolate correspondant étant alors facilité. Sous l'influence d'une molécule d'eau coordinée au lanthanide (ou de l'ion lanthanide lui-même) se comportant comme un catalyseur acide, l'intermédiaire avec un atome de phosphore pentavalent libère les deux riboses conduisant à l'hydrolyse de la fonction phosphodiester de l'ARN.

²⁴ Komiyama, M.; Takeda, N.; Shigekawa, H. Chem. Commun. 1999, 1443.

²⁵ Shiiba, T.; Yonezawa, K.; Takeda, N.; Matsumoto, Y.; Yashiro, M.; Komiyama, M. J. Mol. Catal. **1993**, 84, L21.

²⁶ (a) Matsumura, K.; Komiyama, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 640. (b) Morrow, J. R.; Buttrey, L. A.; Shelton, V. M.; Berback, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1903. (c) Morrow, J. R.; Shelton, V. M. *New J. Chem.* **1994**, *18*, 371.

²⁷ (a) Komiyama, M.; Shiiba, T.; Kodama, T.; Takeda, N.; Sumaoka, J.; Yashiro, M. *Chem. Lett.* **1994**, 1025. (b) Takasaki, B. K.; Chin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1121. (c) Komiyama, M.; Takeda, N.; Takahashi, Y.; Uchida, H.; Shiiba, T.; Kodama, T.; Yashiro, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2 1995**, 269.

²⁸ Matsumura, K.; Komiyama, M. J. Biochem. **1997**, 122, 387.

$$\begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \end{array} \end{array} \end{array} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ \\$$

Schéma 1. Mécanisme proposé de l'hydrolyse de l'ARN catalysée par un lanthanide(III). ²⁴

Ainsi, des enzymes artificielles ont été préparées à partir d'ions lanthanides, et constituent des outils incontournables pour de nouvelles applications en biotechnologie, biologie moléculaire et thérapeutique.²⁹

2.4. Dosages biologiques.

2.4.1. Généralités.

Les dosages biologiques ultrasensibles nécessitent la détermination de la présence ou de la concentration d'un composé particulier, *l'analyte*, à l'aide de réactifs se liant ou réagissant spécifiquement avec ce dernier. L'analyte est généralement présent à de faibles concentrations dans l'échantillon biologique dont la composition est complexe, cela nécessite un système de détection à la fois sensible et spécifique. La limite de détection de l'analyte est de l'ordre du microgramme ou picogramme par millilitre, et les échantillons ne dépassent que rarement quelques centaines de microlitres.

Dans le but d'obtenir des systèmes permettant des dosages quantitatifs, sensibles et automatisés, de nombreux systèmes de détection faisant intervenir différents types de réactifs et de supports solides ont été développés. La sensibilité, la spécificité, la simplicité et le coût du dosage vont directement dépendre de la nature de l'analyte à détecter, de l'utilisateur et du système de détection choisi.

.

²⁹ Perreault, D. M.; Anslyn, E. V. Angew. Chem. Int. Ed. **1997**, 36, 432.

Plusieurs types de dosages s'offrent à nous selon l'analyte à quantifier :

- le dosage immunologique, où un anticorps joue le rôle de réactif spécifique ;
- le dosage par hybridation d'acides nucléiques, où le réactif spécifique est un fragment d'acide nucléique complémentaire de celui à doser ;
- le dosage enzymatique, dans lequel l'analyte est l'enzyme, un substrat ou un cofacteur de l'enzyme.

Nous allons décrire le principe des dosages hétérogènes et homogènes pour nous intéresser ensuite au choix du marqueur et à l'intérêt tout particulier des chélates de lanthanides provenant de leurs propriétés de luminescence singulières.

2.4.2. Dosages hétérogènes.

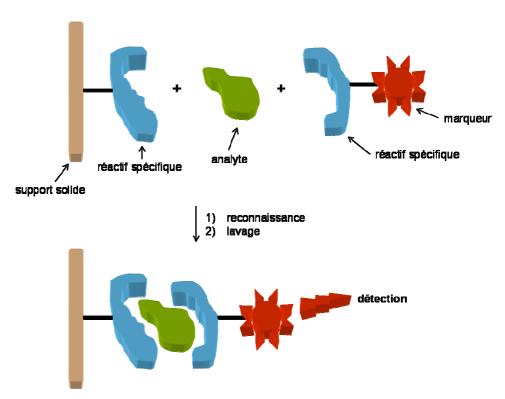


Schéma 2. Exemple de dosage hétérogène non compétitif.³⁰

Les dosages hétérogènes non compétitifs sont les plus communs et reposent sur l'utilisation d'un support solide (membrane, micropuit, microbilles...) fonctionnalisé avec un réactif spécifique. L'analyte est immobilisé à sa surface puis est reconnu par un réactif marqué. Une

³⁰ Gudgin Dickson, E. F.; Pollak, A.; Diamandis, E. P. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1995, 27, 3.

étape de lavage permet d'éliminer l'excès de réactif marqué, et le signal provenant du marqueur lié à l'analyte est détecté (**Schéma 2**). Notons qu'il existe une alternative de ce type de dosage par compétition, pour laquelle le support solide présente toujours le réactif spécifique adapté à la reconnaissance de l'analyte. De l'analyte marqué est ajouté à l'échantillon et entre en compétition avec l'analyse non marqué à doser. Après lavage du support solide, le signal de l'analyte marqué lié à ce dernier est détecté, permettant ainsi de quantifier l'analyte non marqué présent au départ.

2.4.3. Dosages homogènes.

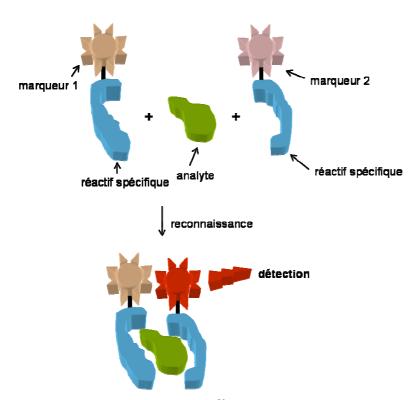


Schéma 3. Exemple de dosage homogène non compétitif.³⁰

Pour les dosages immunologiques homogènes, ainsi que pour les dosages par hybridation d'acides nucléiques ou les dosages enzymatiques, la reconnaissance de l'analyte conduit à la modification des propriétés du marqueur, permettant sa détection spécifique en solution sans séparation ou lavage préalables (**Schéma 3**). Cependant, l'absence d'étape de séparation conduit à l'interférence avec certaines espèces présentes dans l'échantillon. Sous leur forme non compétitive, les dosages immunologiques homogènes et les dosages par hybridation d'acides nucléiques font intervenir un ou deux réactifs spécifiques marqués destinés à la reconnaissance de l'analyte. Inversement, le dosage par compétition requiert l'ajout d'analyte

préalablement marqué, entrant alors en compétition avec l'analyte non marqué. Comme le réactif marqué en excès n'est pas extrait du milieu avant l'étape de détection, la réaction de reconnaissance doit conduire à des changements significatifs pour conduire à sa détection spécifique.

Dans le cas d'un dosage enzymatique où l'enzyme est l'analyte à doser, les substrats peuvent être conçus de manière à ce que leurs propriétés soient suffisamment altérées après liaison avec l'enzyme.

L'analyte étant présent dans l'échantillon à de faibles concentrations, la limite de détection pour un marqueur efficace doit être de l'ordre de 10^{-10} mol.L⁻¹, et même souvent inférieure de plusieurs ordres de grandeur pour un échantillon biologique. Cela impose une détection fiable, sensible et spécifique du signal provenant du marqueur.

2.4.4. Choix du marqueur.

2.4.4.1. Les radiopharmaceutiques.

Les radiopharmaceutiques sont des composés constitués d'un radioélément et sont utilisés en routine dans les départements de médecine nucléaire pour le diagnostic ou le traitement thérapeutique de différentes maladies.³¹ Ils se présentent sous la forme de complexes de coordination ou de biomolécules (anticorps...) marqués par un radioélément. A la fin des années 1940, le développement de réacteurs nucléaires, accélérateurs et cyclotrons a permis l'incursion de ces nouvelles technologies nucléaires dans le domaine de la médecine. En 1959, un générateur de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc a été développé, et les premiers radiotraceurs au ^{99m}Tc sont apparus en 1964.³² Depuis, le technétium-99m est utilisé dans plus de 85% des diagnostics en milieu hospitalier de par le monde.³³

Liu, S.; Edwards, S. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2235.
 Anderson, C. J.; Welch, M. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2219.

³³ Jurisson, S. S.; Lydon, J. D. Chem. Rev. **1999**, *99*, 2205.

$$R = CH_2C(CH_3)_2OCH_3$$
Cardiolite®

Figure 6. Structure du Cardiolite[®].

Le complexe [^{99m}Tc(sestamibi)]⁺ commercialisé sous le nom de Cardiolite[®] (**Figure 6**) permet de contrôler l'irrigation sanguine du myocarde. En effet, les complexes cationiques lipophiles de ce type miment le potassium ce qui permet leur captation par le myocarde. Dans le foie, les six groupements méthoxy sont métabolisés en hydroxy, conduisant ainsi à la formation de complexes de ^{99m}Tc plus hydrophiles qui ne sont donc pas retenus pas les tissus du myocarde.³⁴

Les principales techniques d'imagerie associées sont la scintigraphie gamma (où le radiopharmaceutique est constitué d'un émetteur γ) et la tomographie par émission de positron (où le radiopharmaceutique est constitué d'un émetteur β^{\dagger}). Dans les deux cas, un radiopharmaceutique adapté est injecté au patient pour permettre le diagnostic souhaité (cancer, infection, thrombose, fonctionnement anormal du foie ou des reins, problème cardiaque ou neurologique). La distribution biologique des radiopharmaceutiques est gouvernée par l'irrigation sanguine et les processus biochimiques de reconnaissance récepteur/antigène.

Les facteurs les plus importants à considérer pour pouvoir utiliser un radiopharmaceutique sont le temps de demi-vie du radioisotope, son mode de désintégration, son coût ainsi que sa disponibilité. Le temps de demi-vie doit être suffisamment long pour permettre la préparation du radiopharmaceutique et son accumulation au niveau du tissu ciblé chez le patient sans atteindre d'autres organes. D'autre part il doit être suffisamment court pour limiter la dose de radiation à laquelle le patient est exposé. Les radioisotopes utilisés en scintigraphie ont des temps de demi-vie variables, allant d'environ 10 min. (⁶²Cu) à 6 heures (^{99m}Tc) jusqu'à plusieurs jours (⁶⁷Ga).

-

³⁴ Guo, Z.; Sadler, P. J. Angew. Chem. Int. Ed. **1999**, 38, 1512.

D'autres radioéléments sont utilisés en imagerie médicale, dont les isotopes du gallium (⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga), de l'indium (¹¹¹In, ^{113m}In), du cuivre (⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu) et de l'yttrium (⁸⁶Y, ⁹⁰Y). ³²

Ces marqueurs sont mis à profit dans des systèmes de détection permettant des dosages biologiques ultrasensibles. Ils tirent leurs avantages de la détection spécifique et fiable du signal du marqueur, du faible bruit de fond généré par l'échantillon et des modifications chimiques minimes du réactif marqué, conservant ainsi sa spécificité vis-à-vis de ses cibles. Toutefois, les difficultés liées à la manipulation, le stockage et l'élimination de ces produits radioactifs ont initié le développement de nouveaux systèmes de détection non isotopiques.³⁰

2.4.4.2. Les fluorophores organiques.

La plupart des systèmes de détection non isotopiques ayant connu un développement commercial reposent sur la détection d'un signal lumineux émis dans le domaine du visible après excitation de l'échantillon. Les molécules organiques jouant ce rôle sont appelées *fluorophores*.

Après excitation, les fluorophores organiques réémettent une onde lumineuse par voie de fluorescence (à partir d'un état singulet excité) ou de phosphorescence (à partir d'un état triplet excité). Un bon fluorophore va devoir présenter des bandes d'absorption très intenses ainsi qu'une forte probabilité d'émission par fluorescence, les durées de vie de fluorescence ne dépassant pas la centaine de nanosecondes. La phosphorescence, processus interdit, ne conduit généralement à des rendements quantiques significatifs qu'à l'état solide ou en solution dans certains cas.

Comme exemples de fluorophores classiques, nous pouvons citer la famille composée de la fluorescéine et de ses dérivés halogénés, l'éosine, l'érythrosine et le rose Bengale (**Figure 7**). Tous ces composés reposent sur un squelette organique de type xanthène. Leurs propriétés d'absorption et d'émission en solution aqueuse tamponnée à pH 9,2 et à température ambiante sont recensées dans le **Tableau 7**.

Figure 7. Exemples de fluorophores organiques classiques dérivés de la fluorescéine.

Tableau 7. Maxima d'absorption et d'émission, rendements quantiques et durées de vie de fluorescence dans l'eau (pH = 9,2) à température ambiante de quelques fluorophores classiques.³⁵

Fluorophore	Absorption	Emission				
	$\lambda_{max} (nm)$	λ_{max} (nm)	$\Phi^{300\mathrm{K}}$ (%)	τ^{300K} (ps)		
Fluorescéine	490	520	92	5715		
Eosine	515	538	20	1425		
Erythrosine	521	534	2	115		
Rose Bengale	548	566	1,8	95		

Remarquons tout d'abord que les quatre fluorophores ne présentent que de faibles déplacements de Stokes (inférieurs à 1180 cm⁻¹), ce qui conduit à un domaine d'absorption et d'émission équivalents, le visible ici. Le rendement quantique de fluorescence est proche de 100% pour la fluorescéine, et décroît fortement au fur et à mesure de la substitution du squelette par des halogènes sous l'influence de l'*effet d'atome lourd*. Lorsque des atomes lourds sont présents dans la molécule étudiée ou dans le solvant, le couplage spin-orbite entre les niveaux singulets et triplets peut augmenter. Le croisement intersystème est alors favorisé et permet le peuplement des états triplets pouvant conduire à la phosphorescence de la molécule au détriment des états singulets fluorescents. En passant de la fluorescéine à l'érythrosine, la vitesse du croisement intersystème augmente d'un facteur 600 environ en

_

³⁵ Fleming, G. R.; Knight, A. W. E.; Morris, J. M.; Morrison, R. J. S.; Robinson, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4306.

solution aqueuse.³⁵ Les durées de vie de fluorescence sont de manière générale très faibles (< 1,4 ns) et subissent une diminution analogue.

Cet exemple permet d'illustrer aussi bien les avantages (absorption énergétiquement favorable, rendement quantique élevé) que les inconvénients (durée de vie très réduite, déplacement de Stokes faible) associés aux fluorophores organiques classiques. Ils ont cependant été largement utilisés pour la détection *in vitro* de composés physiologiques, malheureusement avec un rapport signal sur bruit souvent très élevé. Une manière élégante de s'affranchir des problèmes de sensibilité serait d'utiliser des complexes métalliques ayant des propriétés optiques (durées de vie de luminescence en particulier) plus adaptées. Ainsi, les chélates de lanthanides possèdent de nombreux avantages qui permettent en particulier leur utilisation dans des applications en temps résolu.

2.4.4.3. Les chélates de lanthanides.

Tableau 8. Propriétés d'émission de chélates de différents lanthanides en solution aqueuse. 30

Lanthanide	Maximum	Couleur	Durée de vie de	
	d'émission (nm)		luminescence (µs)	
Sm ³⁺	645	rouge	30-100	
Eu^{3+}	615	orange	100-2000	
Tb^{3+}	545	vert	400-5000	
Dy ³⁺	573	jaune	1-10	

Les cations lanthanides émettant dans le visible et présentant des durées de vie de luminescence suffisamment élevées sont au nombre de quatre, le samarium, l'europium, le terbium et le dysprosium(III) (**Tableau 8**). Notons que dans certains cas le chromophore peut jouer le rôle de ligand. Nous allons nous focaliser principalement sur les ions Eu³⁺ et Tb³⁺ car leurs durées de vie peuvent atteindre et même dépasser la milliseconde en solution aqueuse.

Comme nous l'avons vu, l'excitation directe des cations Ln³⁺ nécessite l'emploi de sources très intenses comme les lasers. Les états excités du lanthanide(III) peuvent cependant être

peuplés de manière indirecte, à l'aide d'un chromophore jouant le rôle d'antenne collectrice de photons ; c'est ce qui est nommé *effet d'antenne*³⁶ (**Figure 8**).

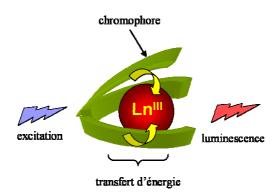


Figure 8. Représentation schématique de l'effet d'antenne conduisant à la luminescence d'un chélate de lanthanide.

Après avoir été mis à proximité du lanthanide *via* le ligand, le chromophore va absorber la lumière incidente (transitions $\pi \to \pi^*$) peuplant ainsi ses états excités singulets. Le lanthanide favorise le croisement intersystème ${}^1\pi\pi^* \to {}^3\pi\pi^*$ (effet d'atome lourd), ce qui permet de peupler les états excités triplets du chromophore. L'énergie est alors transférée à partir des états ${}^3\pi\pi^*$ jusqu'aux états excités du lanthanide, qui peuvent enfin conduire à la luminescence par désexcitation radiative souhaitée. Cette succession de transferts d'énergie est représentée schématiquement sur la **Figure 9**.

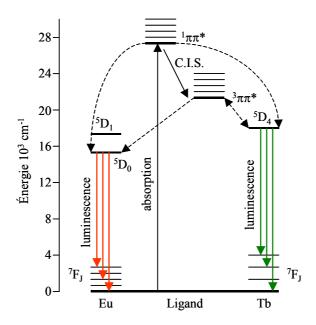


Figure 9. Diagramme d'énergie schématique représentant les transferts d'énergie conduisant à la luminescence du lanthanide. C.I.S. = croisement intersystème.

³⁶ Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J.-M. Coord. Chem. Rev. 1993, 123, 201.

Le transfert d'énergie des états excités triplets du chromophore vers les états excités du lanthanide a été largement discuté dans la littérature,³⁷ des mécanismes ont été proposés par Förster³⁸ et Dexter.³⁹

Le mécanisme de Förster décrit un transfert d'énergie non radiatif à travers l'espace, résultant d'interactions coulombiennes dipôle-dipôle entre un donneur (le chromophore) et un accepteur (le lanthanide). La désactivation du donneur génère un champ électrique (dipôle transitoire) qui conduit à une oscillation dipolaire de l'accepteur et permet de peupler ses états excités. Si r est la distance qui les sépare, l'efficacité de ce transfert est fonction de r^{-6} . Le mécanisme de Dexter décrit le transfert d'énergie non radiatif par un double échange d'électrons entre le donneur et l'accepteur, son efficacité varie comme $e^{-2r/L}$, L étant un paramètre dépendant du système considéré.

La principale différence entre ces deux modèles est la distance sur laquelle ces interactions peuvent avoir lieu. Le mécanisme de Dexter n'est efficace que pour des distances très courtes (< 10 Å) car un fort recouvrement orbitalaire est requis, alors que le mécanisme de Förster s'applique à des distances beaucoup plus longues et est fortement dépendant du recouvrement spectral du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur. Notons que le modèle de Förster, développé sur la base d'interactions dipôle-dipôle électriques a ensuite été étendu par Dexter en incluant des interactions et échanges faisant intervenir des multipôles d'ordres supérieurs.³⁹

Pour choisir un chromophore adapté, il est crucial de garder à l'esprit les différents processus pouvant conduire à des pertes énergétiques, comme le transfert en retour¹² ou l'existence d'un état LMCT (transfert de charge du ligand au métal) de basse énergie.⁴⁰

Les propriétés comparées des fluorophores organiques et des chélates de lanthanides sont consignées dans le **Tableau 9**.

³⁷ (a) Sabbatini, N.; Indelli, M. T.; Gandolfi, M. T.; Balzani, V. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3585. (b) Darwent, J. R.; Dong, W.; Flint, C. D.; Sharp, N.W. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1993**, 873.

³⁸ Förster, Th. In *Comparative effects of radiation*; Burton, M., Kirby-Smith, J. S., Magee, J. L., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1960.

³⁹ Dexter, D. L. J. Chem. Phys. **1953**, 21, 836.

⁴⁰ (a) Bünzli, J.-C. G.; Froidevaux, P.; Harrowfield, J. M. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3306. (b) Gonçalves e Silva, F. R.; Longo, R. L.; Malta, O. L.; Piguet, C.; Bünzli, J.-C. G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 5400.

Tableau 9. Propriétés typiques de fluorophores organiques comparées à celles de chélates de lanthanides. ³⁰

	Chélates de lanthanides		
UV à IR proche	UV		
UV à IR proche	visible à IR proche		
larges	larges		
larges	fines		
faible (< 3000 cm ⁻¹)	élevé (> 10000 cm ⁻¹)		
jusqu'à 100%	généralement plus faible,		
	surtout dans l'eau		
1-100 ns	10 μs à 10 ms		
	UV à IR proche larges larges faible (< 3000 cm ⁻¹) jusqu'à 100%		

La plupart des chélates de lanthanides présentent de faibles rendements quantiques de luminescence en solution aqueuse à cause de désactivations non radiatives liées à la présence de molécules d'eau coordinées^{41,42,43} ou à la proximité d'oscillateurs C-H présents sur le ligand. Dans des conditions particulières, certains complexes de lanthanides ont tendance à se dissocier en raison d'une faible stabilité, ce qui constitue un de leurs inconvénients majeurs. Toutefois, ces limitations peuvent être compensées dans la majorité des applications par une conception judicieuse du ligand. Un déplacement de Stokes élevé ainsi que de fines bandes d'émission permettent en particulier de sélectionner le signal provenant du chélate sur une fenêtre spectrale réduite. De plus, leurs durées de vie exceptionnellement longues permettent l'utilisation d'une fenêtre temporelle également utile à la détection spécifique du signal, et conduisent à des applications en temps résolu comme nous allons le voir à présent.

2.4.5. Détection en temps résolu.

Le principe de la détection est temps résolu est illustré sur l'exemple d'un chélate de terbium (**Figure 10**). Après excitation de l'échantillon, un délai temporel est choisi de façon à ce que les signaux constituant le bruit de fond (fluorescence du milieu, diffraction à l'excitation) aient disparus alors que la luminescence du chélate est encore intense. Combinée à une sélection spectrale du signal (centrée autour de la bande de luminescence la plus intense du

⁴¹ (a) Horrocks, W. De W., Jr.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334. (b) Horrocks, W. De W., Jr.; Sudnick, D. R. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 384.

⁴² Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; De Sousa, A. S.; Williams, J. A. G.; Woods, M. *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans.* 2 **1999**, 493.

⁴³ Supkowski, R.; Horrocks, W. DeW., Jr. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *340*, 44.

chélate), cette technique constitue un outil très puissant permettant la détection spécifique du signal d'un chélate, même dans des fluides biologiques complexes.

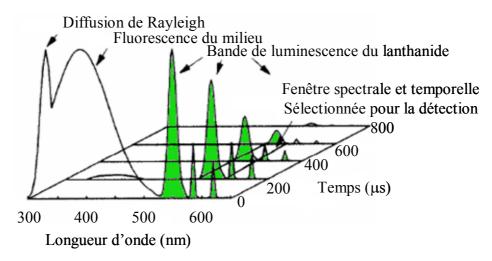


Figure 10. Principe de détection en temps résolu sur l'exemple d'un chélate de terbium. 30

L'instrumentation mise en jeu va dépendre du type de dosage souhaité. Une source pulsée (lampe flash au xénon, laser à azote) va devoir émettre dans un domaine où l'absorption du chélate est intense tout en présentant une largeur de pulse beaucoup plus faible que la durée de vie de luminescence de l'ion Ln³+ à détecter. La nature du détecteur va varier selon qu'il s'agisse d'une mesure qualitative ou quantitative, il peut être l'œil humain (microscopie traditionnelle), une pellicule photo (photographie en temps résolu) ou un système de détection électronique comme un photomultiplicateur ou une caméra CCD (microscopie en temps résolu).

2.4.6. Exemples.

Le système DELFIA® (« Dissociative Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay »), développé en Finlande dans les années 1980 repose sur les travaux de Hemmilä et *al.*⁴⁴ Comme son nom l'indique, il s'agit d'une méthode dissociative, adaptée aux dosages hétérogènes. Dans un premier temps, un réactif spécifique marqué à l'aide d'un chélate d'europium permet la reconnaissance de l'analyte et sa fixation sur le support solide. Notons que le ligand employé, dérivé de l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique), ne comporte pas de chromophore mais confère au chélate une excellente stabilité chimique et

⁴⁴ Hemmilä, I.; Dakbu, S.; Mukkala, V.-M.; Siitari, H.; Lövgren, T. Anal. Biochem. **1984**, 137, 335.

photochimique. L'excès de réactif marqué est éliminé par une étape de lavage. Dans un deuxième temps, le chélate d'europium est dissocié en milieu acide (tampon phthalate à pH 3,2) conduisant à la libération des ions Eu³⁺. Ces derniers sont stabilisés sous forme de micelles par un photosensibilisateur (β -naphtoyltrifluoroacétone) et de l'oxyde de trioctylphosphine, conduisant ainsi à la formation d'un chélate fortement luminescent. L'échantillon est alors excité dans l'UV ce qui conduit à la luminescence du cation europium(III) et à sa détection. Malgré ses inconvénients (contamination exogène, localisation spatiale du signal), ce système permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre de 5.10⁻¹⁴ mol.L⁻¹ et a conduit au développement commercial de kits de détection se prêtant à la détection d'hormones, d'antigènes et d'anticorps d'agents infectieux, de protéines, d'enzymes, de toxines ou encore de métabolites. Selon ce principe, le dosage simultané de quatre analytes (thyrotropine, 17α -hydroxyprogestérone, trypsine et créatine kinase) présents dans un même échantillon est possible à l'aide de réactifs spécifiques marqués au samarium, à l'europium, au terbium et au dysprosium. 45 Ce système conduit à des limites de détection comprises entre 0,035 et 46 pmol.L⁻¹ et permet, à l'aide de filtres et de délais temporels adaptés à chaque ion lanthanide, de détecter l'hyperthyroïdisme congénital, la fibrose cystique, l'hyperplasie rénale et la dystrophie musculaire de Duchenne et Becker en un test unique.

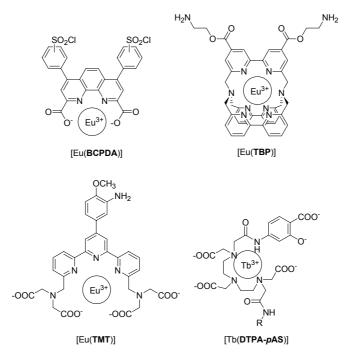


Figure 11. Structure de quelques chélates utilisés dans des systèmes de détection directe.

-

⁴⁵ Xu, Y. Y.; Petterson, K.; Blomberg, K.; Hemmilä, I.; Mikola, H.; Lövgren, T. *Clin. Chem.* **1992**, 2038.

Une méthode de détection directe repose sur l'utilisation d'un chélate de lanthanide luminescent comme marqueur du réactif spécifique. Après reconnaissance de l'analyte, immobilisation sur la phase solide, lavage et excitation de l'échantillon, la luminescence provenant du chélate est détectée sans étape de dissociation et de sensibilisation préalable. Le système de détection FIAgen[™] repose sur l'utilisation du complexe [Eu(BCPDA)],⁴⁶ le ligand étant dérivé d'une 1,10-phénanthroline-2,9-dicarboxylate (Figure 11).

Ce marqueur est principalement utilisé pour des dosages immunologiques, moins fréquemment pour des hybridations d'acides nucléiques. Pour obtenir une sensibilité suffisante, il est souvent nécessaire d'effectuer un marquage multiple du réactif spécifique avec ce chélate. Contrairement au système DELFIA®, ce système n'est pas sensible à la contamination exogène du milieu par des ions Eu³+. Le complexe [Eu(BCPDA)] est facilement synthétisé et son utilisation est aisée, mais il présente plusieurs inconvénients comme une limite de détection plus élevée (10-11 mol.L-1 environ), une stoechiométrie 1:2 (un métal pour deux ligands) avec une stabilité moins forte et la présence de deux fonctions de greffage pouvant conduire à un marquage non contrôlé.

D'autres chélates présentent un fort potentiel pour des applications de détection directe, comme le cryptate d'europium *tris*-bipyridine [Eu(TBP)]⁴⁷ et le chélate [Eu(TMT)]⁴⁸ dérivé d'une terpyridine. Ils présentent tous deux au moins une fonction amino activable (par exemple sous forme d'isothiocyanate) permettant le greffage du marqueur sur la macromolécule jouant le rôle de réactif spécifique. De plus, ils présentent des rendements quantiques élevés sur la phase solide, ainsi que des durées de vie de luminescence proches de la milliseconde. Le chélate de terbium [Tb(DTPA-pAS)]⁴⁹ dérivé de l'acide *p*-aminosalicylique peut également être utilisé comme marqueur pour des dosages immunologiques et pour des hybridations d'acides nucléiques.

⁴⁶ (a) Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.* **1988**, *21*, 139. (b) Evangelista, R. A.; Pollak, A.; Allore, B.; Templeton, E. F.; Morton, R. C.; Diamandis, E. P. *Clin. Biochem.* **1988**, *21*, 173. (c) Diamandis, E. P.; Morton, R. C. *J. Immunol. Methods* **1988**, *112*, 43.

⁴⁷ (a) Prat, O.; Lopez, E.; Mathis, G. *Anal. Biochem.* **1991**, *195*, 283. (b) Lopez, E.; Chypre, C.; Alpha, B.; Mathis, G. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 196.

⁴⁸ Saha, A. K.; Kross, K.; Kloszewski, E. D.; Upson, D. A.; Toner, J. L.; Snow, R. A.; Black, C. D. V.; Desai, V. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11032.

⁴⁹ (a) Bailey, M. P.; Rocks, B. F.; Riley, C. Analyst **1984**, 109, 1449. (b) Siepak, J. Analyst **1989**, 114, 529.

Depuis les premières utilisations de chélates de lanthanides luminescents comme marqueurs, de nouveaux composés viennent régulièrement enrichir cette famille.⁵⁰ Ces composés, principalement basés sur l'europium à l'origine, incorporent de plus en plus souvent le terbium.^{51,52}

2.5. Etudes in vivo.

Le but de ce premier chapitre étant de donner un aperçu général et varié des applications possibles des complexes de lanthanides, nous ne citerons ici qu'un exemple de chélate permettant des explorations *in vivo*. Le chélate de terbium [Tb-**P(CTMB)**] repose sur un ligand macrocyclique de type 1,4,7,10-tétraazacyclododécane (cyclène) fonctionnalisé avec trois bras chélatants de type monoester phosphonique et une 2-méthylpyridine (**Figure 12**).⁵³ Un seul chromophore pyridinique est inclus, ce qui conduit à un maximum d'absorption hauts en énergie (260 nm) et un coefficient d'absorption molaire faible (3000 M⁻¹.cm⁻¹). Toutefois, ses propriétés spectroscopiques sont très attrayantes, en particulier sa durée de vie de luminescence exceptionnellement élevée (3,5 ms).

Figure 12. Structure du chélate de terbium [Tb-P(CTMB)] employé pour l'exploration in vivo de tissus.

Sous l'influence d'injections régulières d'une solution de diméthylbenzanthracène dans la joue, le hamster développe des lésions tumorales macroscopiques. Après anesthésie de l'animal et application d'une solution d'un chélate de terbium [Tb-P(CTMB)], il est possible

⁵⁰ (a) Yuan, J.; Matsumoto, K.; Kimura, H. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 596. (b) Yuan, J.; Wang, G.; Majima, K.; Matsumoto, K. *Anal. Chem.* **2001**, 70, 1869. (c) Lee, R. T.; Lee, Y. C. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 845. (d) Selvin, P. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, 31, 275. (e) Sueda, S.; Yuan, J.; Matsumoto, K. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 200. (g) Peuralahti, J.; Suonpää, K.; Blomberg, K.; Mukkala, V.-M.; Hovinen, J. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 927.

⁵¹ Johansson, M. K.; Cook, R. M.; Xu, J.; Raymond, K. N. J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 16451.

⁵² Weibel, N.; Charbonnière, L. J.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R. J. Am. Chem. Soc. **2004**, 126, 4888.

⁵³ Bornhop, D. J.; Griffin, J. M. M.; Goebel, T. S.; Sudduth, M. R.; Bell, B.; Motamedi, M. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1216.

d'observer et de localiser des zones de lésions malignes précoces, ce qui a été confirmé par biopsie et histologie des zones suspectées (**Figure 13**). Cela suggère que ce type de composé peut être utilisé comme agent de contraste fluorescent pour la détection de lésions liées à un cancer épithélial dans la cavité buccale. Bien que l'interaction spécifique entre le complexe et les zones lésées n'ait pas été clairement établie, plusieurs mécanismes sont proposés ; l'un deux suggère que le chélate joue le rôle de ligand pour un récepteur surexprimé par les cellules tumorales.

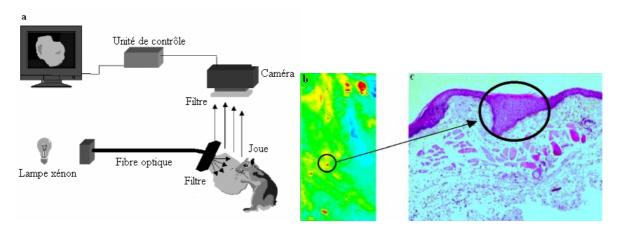


Figure 13. Schéma du protocole employé (a), visualisation en fausses couleurs de la fluorescence d'un tissu imprégné du chélate de terbium (b) et histopathologie des sites suspectés (c).

Notons que des chélates de lanthanides permettant la détection d'espèces anioniques (comme les nitrates⁵⁴ ou l'ATP⁵⁵), cationiques (comme l'ion zinc(II)⁵⁶ ou les protons⁵⁷ dans les sondes à pH) ou même le dioxygène⁵⁸ ont des structures assez proches des marqueurs qui nous intéressent ici.

2.6. FRET.

Le principe du FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») repose sur un transfert d'énergie par résonance (interaction dipôle-dipôle non radiative) entre un donneur et un accepteur. Ce transfert est efficace lorsque (i) le spectre d'émission du donneur et le spectre

43

⁵⁴ Charbonnière, L. J.; Ziessel, R.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Boehme, C.; Wipff, G. J. Am. Chem. Soc. **2002**, 124, 7779.

⁵⁵ Mameri, S.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 1819.

⁵⁶ Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Urano, Y.; Nagano, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *43*, 2996.

⁵⁷ (a) Parker, D.; Senanayake, K.; Williams, J. A. G. *Chem. Commun.* **1997**, 1777. (b) Gunnlaugsson, T.; Parker, D. *Chem. Commun.* **1998**, 511. (c) Gunnlaugsson, T. *Tetrahedron Lett.* **2001** *42*, 8901.

⁵⁸ Parker, D. Coord. Chem. Rev. **2000**, 205, 109.

d'absorption de l'accepteur se recouvrent et (ii) lorsque le donneur et l'accepteur sont spatialement proches (< 100 Å). Le donneur et l'accepteur, greffés sur des entités distinctes qui sont généralement des biomolécules, vont pouvoir entrer en interaction une fois à proximité l'un de l'autre. La fluorescence de l'accepteur est obtenue de la manière suivante : l'énergie d'excitation absorbée par le donneur permet de peupler ses états excités, le transfert d'énergie par résonance a lieu lorsque les deux entités sont spatialement proches, ce qui permet de peupler les états excités de l'accepteur et conduire à l'émission de ce dernier. Notons qu'aucun échange d'électron n'a lieu au cours de ce processus.

Les techniques analytiques les plus sensibles sont basées sur l'émission d'une onde lumineuse par fluorescence. Des modifications intra- ou intermoléculaires peuvent moduler le signal produit par un fluorophore donné, cela a été déterminant dans le développement des dosages homogènes. Parmi toutes les techniques permettant une modulation de signal, le FRET est d'une importance toute particulière car la vitesse du transfert d'énergie par résonance varie en r^{-6} , r étant la distance entre le donneur et l'accepteur. Le FRET est ainsi une méthode unique permettant de sonder des interactions de l'ordre de 10 à 75 Å avec une résolution proche de 1 Å, et a permis l'étude d'interactions de protéines avec l'ADN ainsi que des études structurelles.

Le FRET est également utilisé pour des dosages immunologiques homogènes,⁵⁹ car il a lieu dans un domaine caractéristique des interactions antigène-anticorps. En plus de la mesure de distances « statiques », il permet d'ausculter des processus dynamiques comme une activité enzymatique.⁶⁰

Les chélates de lanthanides trouvent aussi leur place en tant que donneurs dans le vaste domaine du FRET, c'est ce qui est communément appelé LRET (« Luminescence Resonance Energy Transfer »). Nous allons illustrer leur emploi sur l'exemple de la technologie TRACE[®] (« Time Resolved Amplified Cryptate Emission ») encore appelée HTRF[®] (« Homogenous Time Resolved Fluorescence »).⁶¹ Dans le FRET, la durée de vie de l'émission de l'accepteur contient une contribution égale à celle du donneur lorsque le transfert d'énergie prend place.⁵⁹ Ainsi, l'utilisation d'un chélate de lanthanide comme

⁵⁹ Morrison, L. E. *Anal. Biochem.* **1988**, *174*, 1.

⁶⁰ Matayoshi, E. D.; Wang, G. T.; Krafft, G. A.; Erickson, J. Science 1990, 247, 954.

⁶¹ Bazin, H.; Trinquet, E.; Mathis, G. Reviews in Molecular Biotechnology 2002, 82, 233.

donneur avec une durée de vie de luminescence élevée va permettre de mesurer la fluorescence de l'accepteur en temps résolu. Dans sa version originale, ⁶² le système TRACE[®] emploie le cryptate d'europium *tris*-bipyridine [Eu(**TBP**)], proche structurellement de celui présenté précédemment, comme donneur et le XL665, un dérivé d'allophycocyanine émettant à 665 nm, comme accepteur (**Figure 14**).

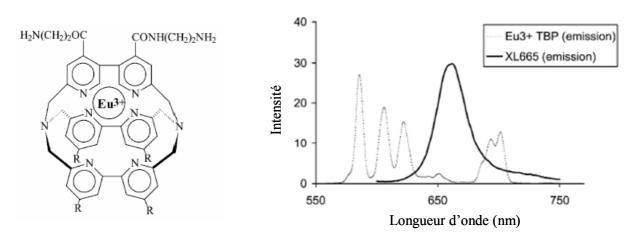


Figure 14. Structure du cryptate d'europium [Eu(**TBP**)] (R = COOH) et spectres d'émission du donneur [Eu(**TBP**)] (---) et de l'accepteur XL665 (—).⁶¹

Une mesure en temps résolu permet de distinguer la fluorescence de la XL665 lorsque le FRET a lieu (durée de vie longue) de la fluorescence naturelle de la XL665 libre (durée de vie courte) ainsi que celle de l'échantillon (bruit fond) comme illustré sur la **Figure 15**. Après excitation à 337 nm, le milieu biologique (**Figure 15a**) et l'accepteur (le XL665) greffé sur une macromolécule (**Figure 15b**) présentent des durées de vie de fluorescence courtes (inférieures à la microseconde). Dans les mêmes conditions, le donneur (le cryptate d'europium) greffé sur une macromolécule présente une durée de vie luminescence de l'ordre de la milliseconde (**Figure 15c**). Lorsque les deux biomolécules s'associent, le donneur et l'accepteur entrent en interaction et génèrent le signal FRET, c'est-à-dire la luminescence de l'accepteur à 665 nm avec une durée de vie longue (**Figure 15d**), permettant ainsi une mesure en temps résolu.

⁶² Mathis, G. Clin. Chem. **1993**, 39, 1953.

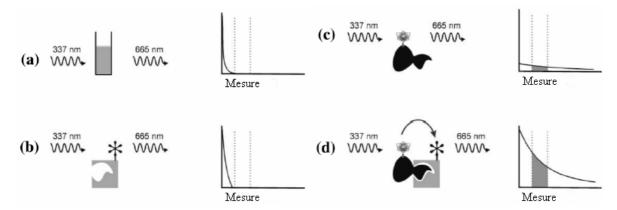


Figure 15. Sélectivité temporelle du système TRACE[®] : fluorescence du milieu (a), fluorescence de la XL655 libre (b), luminescence du cryptate [Eu(**TBP**)] (c) et signal FRET émis par la XL665 (d). 61

De nombreux kits de dosages utilisant le système HTRF® ont fait leur apparition, comme exemple d'application, nous pouvons citer celui permettant le dosage de la TNFα (« Tumor Necrosis Factor α»). 63 Cette dernière, une cytokine composée de 157 acides aminés (17 médiateur important impliqué kDa), est un dans de nombreux événements physiopathologiques comme la régulation de croissance tumorale, l'inflammation ou l'infection. Pour permettre son dosage, deux anticorps monoclonaux anti-TNFα distincts ont été marqués soit avec le cryptate d'europium, soit avec l'allophycocyanine XL665. Cette combinaison permet d'obtenir un très bon FRET lorsque les deux anticorps détectent la $TNF\alpha$.

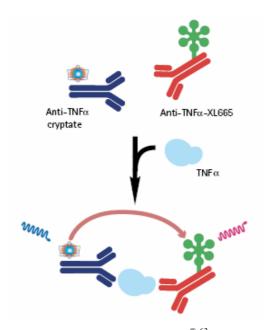


Figure 16. Principe de dosage de la TNF α selon le système HTRF[®]. ⁶³

⁶³ http://www.htrf-assays.com/

Pour finir, nous pouvons citer quelques articles de la littérature recensant des applications récentes du LRET en analyse bioologique. 64-66

2.7. Agents de contraste pour l'IRM.

2.7.1. Principe de l'IRM.

L'IRM (« Imagerie par Résonance Magnétique ») est une technique d'investigation médicale non invasive basée comme la RMN sur le principe de résonance de spins nucléaires dans un champ magnétique. Les atomes d'hydrogène des molécules d'eau contenues dans les cellules sont en particulier sollicités, l'eau représentant près de 80% de la masse corporelle chez l'homme. Les variations de densité en eau, bien que faibles, vont permettre de contraster l'image obtenue. Cependant, la sensibilité offerte par cette méthode est insuffisante pour de nombreuses applications. L'administration au patient d'un *agent de contraste* va permettre d'augmenter le contraste de l'image, par exemple entre les tissus sains et les tissus altérés, tout en fournissant des informations sur le fonctionnement ou l'irrigation des organes. De nos jours, environ 30% des examens d'IRM utilisent des agents de contraste, principalement des complexes de Gd³⁺, qui augmentent le contraste intrinsèque et ainsi la résolution anatomique des images. Notons que l'IRM est également utilisée dans d'autres domaines comme l'agroalimentaire pour suivre la formation d'alvéoles lors de la fermentation de pâtes boulangères⁶⁷ ou évaluer la durée de congélation de poissons.

2.7.2. Rôle de l'agent de contraste.⁶⁹

La magnétisation macroscopique des spins des protons, alignée avec le champ magnétique appliqué selon l'axe z, est perturbée par un ou plusieurs pulses en radiofréquence. La composante de la magnétisation le long de cet axe revient à sa valeur d'équilibre avec une

47

⁶⁴ Selvin, P. R.; Rana, T. M.; Hearst, J. E. J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 6029.

⁶⁵ Cooper, M. E.; Sammes, P. G. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 2000, 1695.

⁶⁶ Heyduk, T. Methods 2001, 25, 44.

⁶⁷ Bonny, J.-M.; Rouille, J.; Della Valle, G.; Devaux, M.-F.; Douliez, J.-P.; Renou, J.-P. *Magn. Reson. Imaging* **2004**, *22*, 395.

⁶⁸ Foucat, L.; Taylor, R. G.; Labas, R.; Renou, J.-P. American Laboratory **2001**, 33, 38.

⁶⁹ Lauffer, R. B. Chem. Rev. **1987**, 87, 901.

constante de temps T₁ appelée temps de relaxation longitudinale (ou spin-réseau). La dépendance temporelle de la magnétisation perpendiculaire à l'axe z est caractérisée de la même façon par un temps de relaxation transversale (ou spin-spin) T₂ qui correspond à la durée nécessaire au retour de cette magnétisation à sa valeur d'équilibre nulle. Les tissus présentant des valeurs de T₁ faibles fournissent généralement une plus grande intensité d'image que ceux ayant des valeurs plus élevées, car la magnétisation selon l'axe z est plus importante à l'équilibre dans un tissu ayant une relaxation rapide. Des valeurs de T₂ faibles conduisent à des intensités réduites car elles diminuent la magnétisation transversale disponible pour la mesure. Ainsi, le rôle d'un agent de contraste est d'augmenter l'intensité de signal du tissu le contenant, en diminuant les valeurs de T₁ qui dominent le phénomène de relaxation.

Les agents de contraste sont le plus souvent des complexes de métaux de transition (Fe³⁺, Mn²⁺) ou d'ions lanthanides (Gd³⁺) paramagnétiques présentant un nombre important d'électrons non appariés et des temps de relaxation électronique élevés. Ils sont capables de diminuer les temps de relaxation nucléaire dont dépend directement l'intensité de l'image obtenue. En effet, le temps de relaxation d'un noyau avoisinant le centre métallique peut être modulé par ce dernier *via* des interactions dipolaires.

Plus précisément, le rôle d'un agent de contraste est d'augmenter selon sa nature les vitesses de relaxation longitudinale $1/T_1$ et transversale $1/T_2$ des protons de l'eau. Les contributions paramagnétiques et diamagnétiques aux vitesses de relaxation sont additives comme le monte l'**Équation 2**:

$$\left(\frac{1}{T_{i}}\right)_{obs.} = \left(\frac{1}{T_{i}}\right)_{diamagn.} + \left(\frac{1}{T_{i}}\right)_{paramagn.}$$
 $i = 1, 2$

Équation 2. Contribution diamagnétique et paramagnétique à la vitesse de relaxation 1/T_i.

 $(1/T_i)_{obs.}$ est la vitesse de relaxation observée en présence de l'agent de contraste, $(1/T_i)_{diamagn.}$ la vitesse de relaxation du solvant en l'absence d'agent de contraste et $(1/T_i)_{paramagn.}$ la contribution paramagnétique de ce dernier.

En l'absence d'interaction soluté-soluté, les vitesses de relaxation du solvant dépendent linéairement de la concentration de l'espèce paramagnétique [M] (Équation 3).

$$\left(\frac{1}{T_{i}}\right)_{obs.} = \left(\frac{1}{T_{i}}\right)_{diamagn.} + r_{i} \times [M] \quad i = 1, 2$$

Équation 3. Relation liant les vitesses de relaxation $1/T_i$ aux relaxivités r_i .

Les *relaxivités* r_1 et r_2 correspondent respectivement aux vitesses de relaxation longitudinales et transversales d'une solution millimolaire de complexe, et sont généralement exprimées en $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

La contribution paramagnétique $(1/T_i)_{paramagn.}$ se décompose en deux termes résultant de la relaxation de la sphère interne et de la sphère externe de l'agent de contraste (**Équation 4**).

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{\text{paramagn}} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{\text{sphère interne}} + \left(\frac{1}{T_i}\right)_{\text{sphère interne}} i = 1, 2$$

Équation 4. Contribution de la sphère interne et de la sphère externe à la relaxivité.

La contribution de la sphère interne à la relaxation longitudinale provient d'un échange chimique d'une molécule d'eau entre la première sphère de coordination du métal paramagnétique et le solvant environnant. La vitesse de relaxation de la ou des molécules d'eau liées au métal est donnée par les équations de Solomon-Bloembergen-Morgan⁷⁰ que nous ne détaillerons pas ici. Elles s'appliquent à des espèces telles que $S > \frac{1}{2}$ (S = 7/2 pour Gd^{3+}) et rendent compte des contributions dipolaire à travers l'espace et scalaire (ou de contact) à travers les liaisons, qui dépendent entre autres de la distance r entre le métal et le proton (variations en $1/r^6$) et des temps de corrélation τ_{Ci} donnés par l'Équation 5 :

$$\frac{1}{\tau_{Ci}} = \frac{1}{\tau_{M}} + \frac{1}{\tau_{R}} + \frac{1}{\tau_{Si}}$$
 $i = 1, 2$

Équation 5. Relation donnant les temps de corrélation τ_{Ci} .

_

 τ_M est le temps de résidence de la molécule d'eau en première sphère de coordination du métal (et k_{ex} , son inverse, la vitesse d'échange), τ_R le temps de corrélation rotationnel de l'entité métal-eau et τ_{Si} le temps de relaxation électronique (**Figure 17**). L'interaction avec des molécules d'eau présentes en seconde sphère de coordination du métal (liées par exemple par des liaisons hydrogène) constitue la contribution de la sphère externe à la relaxation. Elle

⁷⁰ (a) Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559. (b) Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 572. (c) Kowaleski, J.; Nordenskioeld, L.; Benetis, N.; Westlund, P. O. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1985**, *17*, 141.

peut représenter une part significative, si ce n'est totale, de la relaxivité de complexes ayant une masse moléculaire et un nombre de molécules d'eau coordinées peu élevés.

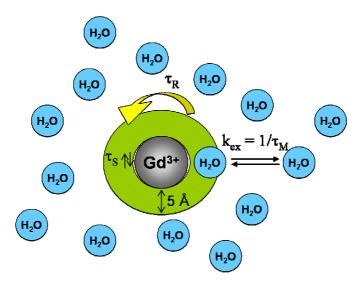


Figure 17. Représentation schématique des mécanismes de relaxation avec les principaux paramètres de relaxation en solution aqueuse contenant un chélate de Gd³⁺ paramagnétique.⁷¹

Différents paramètres physico-chimiques peuvent être optimisés pour augmenter la relaxivité et ainsi l'efficacité d'un agent de contraste, tout en diminuant les doses à injecter au patient. Parmi eux, nous citerons le nombre de molécules d'eau coordinées au métal (q), le temps de corrélation rotationnel (τ_R) et le temps de résidence des molécules d'eau coordinées (τ_M). L'augmentation de la valeur de q risquant d'entraîner une diminution concomitante de stabilité du complexe, il est plus aisé d'augmenter le temps de corrélation rotationnel τ_R grâce au greffage covalent d'un chélate de faible masse moléculaire à une macromolécule (polymère, dendrimère, biomolécule...). La distance r est plus difficile à mesurer et à contrôler, mais grâce à sa dépendance en $1/r^6$, la relaxivité augmenterait de 50% si r diminuait de 0,2 Å environ.

Notons que l'eau des tissus est répartie entre des espaces intravasculaires (5%), interstitiels entre les cellules et les capillaires (15%) et intracellulaires (80%). Si l'échange d'eau entre ces différents espaces est lent par rapport à la vitesse de relaxation de la zone ayant la valeur de T_1 la plus élevée, cela peut conduire à la diminution de la relaxivité effective d'un tissu car toute son eau ne pourra pas entrer en contact avec le composé paramagnétique.

-

⁷¹ Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E. Chem. Soc. Rev. **1998**, 27, 19.

2.7.3. Toxicité.

La toxicité du complexe métallique est un paramètre d'une importance primordiale devant être au mieux maîtrisé pour permettre des utilisations médicales. Elle peut provenir de l'ion métallique, du ligand libre (tous deux libérés après dissociation) ou du complexe lui-même. Dans ces deux derniers cas, il faut également considérer les métabolites qui peuvent être encore plus toxiques que leurs précurseurs.

La toxicité des ions métalliques est largement décrite. The peuvent en effet se coordiner à des hétéroatomes comme l'oxygène, l'azote ou le soufre dans des macromolécules ou des membranes, ce qui altère l'équilibre dynamique nécessaire à leur bon fonctionnement. L'ion Gd³+ peut par exemple prendre la place du calcium Ca²+ grâce à un plus grand rapport charge/rayon augmentant son affinité pour les sites lui étant spécifiques. En plus de leur toxicité « organique », la toxicité des ligands peut provenir de la séquestration d'ions essentiels comme Ca²+. Enfin la toxicité des complexes métalliques peut résulter de nombreux effets, comme l'inhibition d'enzymes, les changements conformationnels de protéines, l'altération des potentiels membranaires ou encore un choc osmotique lié à sa densité de chargée élevée.

Il est donc nécessaire de concevoir des complexes métalliques présentant une stabilité cinétique élevée, d'autant plus que les doses injectées aux patients sont conséquentes (de 0,5 à 5 g). L'agent de contraste doit être efficacement éliminé de l'organisme quelques minutes ou quelques heures après son administration, sa stabilité doit être intacte pendant ce temps de résidence.

2.7.4. Exemples d'agents de contraste.

Citons quatre complexes de gadolinium(III) (**Figure 18**) approuvés pour un usage clinique et largement utilisés, en particulier pour la détection de défauts de la barrière hémato-encéphalique. Les complexes $[Gd(\mathbf{DTPA})(H_2O)]^{2-}$ (Magnevist[®]) et $[Gd(\mathbf{DOTA})(H_2O)]^{-}$ (Dotarem[®]) sont chargés négativement alors que les complexes $[Gd(\mathbf{DTPA-BMA})(H_2O)]$

_

⁷² Luckey, T. D.; Venugopal, B. In *Metal Toxicity in Mammals*; Plenum: New York, 1977; Vol. 1.

 $(Omniscan^{TM})$ et $[Gd(HP-DO3A)(H_2O)]$ (ProHance[®]) sont neutres, ce qui permet de diminuer la douleur ressentie lors de l'injection grâce à leur plus faible osmolarité. Quelques unes de leurs propriétés (stabilité, relaxivité) sont recensées dans le **Tableau 10**.

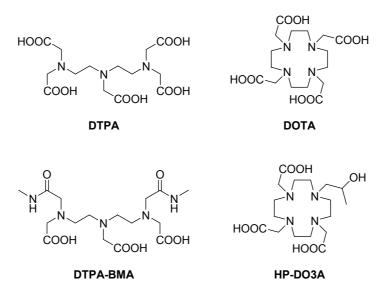


Figure 18. Structure de quelques ligands formant avec le Gd³⁺ des agents de contrastes usuels.

Tableau 10. Propriétés de stabilité et de relaxivité à 20 MHz de quatre complexes de gadolinium(III) utilisés en milieu hospitalier.⁷⁴

milieu nospitalier.							
Composé	$\log K_{ m GdL}^{298 m K}$	r_1	$\tau_{M}\left(ns\right)$	τ_R (ps)	τ_{S0} (ps)	r (Å)	q
		$(mM^{-1}.s^{-1})$					
$[Gd(\mathbf{DTPA})(H_2O)]^{2-}$	22,5	4,3 ^{25°C}	130	58	72	3,13	1
$[\mathrm{Gd}(\mathbf{DOTA})(\mathrm{H}_2\mathrm{O})]^{T}$	25,3	3,56 ^{39°C}	108	77	473	3,13	1
$[\mathrm{Gd}(\mathbf{DTPA\text{-}BMA})(\mathrm{H}_2\mathrm{O})]$	16,9	3,96 ^{35°C}	1000	66	81	3,13	1
$[Gd(\textbf{HP-DO3A})(H_2O)]$	23,8	3,7 ^{40°C}	-	-	-	-	-

Tous ces composés ne sont pas internalisés dans la cellule mais diffusent rapidement dans l'espace interstitiel. L'ion Gd^{3+} présente un nombre de coordination de 9 dans chaque cas, avec une molécule d'eau coordinée. Les stabilités de ces complexes dépendent fortement du pH. A titre d'exemple, la valeur de log K pour $[Gd(\mathbf{DTPA})(H_2O)]^{2-}$ diminue d'un facteur 4 environ en passant d'un pH de 7,4 à 5, ce qui peut se rencontrer dans certains compartiments biologiques comme les lysosomes. Ce même complexe est éliminé quasi exclusivement par les reins. L'introduction d'un substituant de type benzyloxyméthyle sur l'atome de carbone en α d'un groupement acétate terminal du \mathbf{DTPA} permet d'obtenir un complexe

⁷³ Guo, Z.; Sadler, P. J. Angew. Chem. Int. Ed. **1999**, 38, 1512.

⁷⁴ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.

[Gd(**BOPTPA**)(H₂O)]²⁻ (MultiHance[®]) entrant dans les hépatocytes et pouvant être éliminé par la bile.

En conclusion, nous pouvons dire que l'IRM permet d'obtenir des images de tissus et d'organes qui sont en réalité les représentations topologiques de leurs paramètres RMN. Parmi eux, les plus importants sont la relaxivité longitudinale r_1 et la relaxivité transversale r_2 . La présence de complexes de gadolinium(III) paramagnétiques augmente énormément la relaxivité des protons des molécules d'eau, ce qui permet d'apporter des informations physiologiques supplémentaires et d'augmenter la résolution anatomique par rapport aux images non contrastées. L'administration d'agents de contraste au gadolinium permet de nombreux diagnostics, en particulier concernant l'irrigation des organes, les défauts de la barrière hémato-encéphalique ou encore l'élimination rénale. De nombreuses autres applications connaissent un développement intense dans les domaines de l'angiographie (visualisation de vaisseaux sanguins invisibles en radiographie standard) et de la localisation de tumeurs. La littérature est régulièrement alimentée par les développements récents dans le domaine de l'IRM. $^{75-84}$

La suite de ce manuscrit sera consacrée à la synthèse de nouveaux ligands et à l'étude des propriétés spectroscopiques de leurs complexes d'europium, de terbium et de gadolinium(III) destinés au marquage de biomolécules. Les premières applications dans ce domaine seront ensuite détaillées (microscopie de luminescence en temps résolu, agent de contraste pour l'IRM), pour enfin aboutir aux premières modifications de leur structure destinées à optimiser les propriétés physico-chimiques et spectroscopiques.

⁷⁵ Nivorozhkin, A. L.; Kolodziej, A. F.; Caravan, P.; Greenfield, M. T.; Lauffer, R. B.; McMurry, T. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2903.

⁷⁶ Woods, M.; Kovacs, Z.; Zhang, S.; Sherry, A. D. Angew. Chem. Int. Ed. **2003**, 42, 5889.

⁷⁷ Zhang, S.; Trokowski, R.; Sherry, A. D. J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 15288.

⁷⁸ Nicolle, G. M.; Yerly, F.; Imbert, D.; Böttger, U.; Bünzli, J.-C.; Merbach, A. E. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5453.

⁷⁹ Corsi, D. M.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; van Bekkum, H.; Peters, J. A. Chem. Eur. J. **2001**, 7, 64.

⁸⁰ Zhang, S.; Merritt, M.; Woessner, D. E.; Lenkinski, R. E.; Sherry, A. D. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 783.

⁸¹ Ruloff, R.; van Koten, G.; Merbach, A. E. Chem. Commun. 2004, 842.

⁸² Frullano, L.; Rohovec, J.; Aime, S.; Maschmeyer, T.; Prata, M. I.; de Lima, J. J. P.; Geraldes, C. F. G. C.; Peters, J. A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5205.

⁸³ Fulton, D. A.; O'Halloran, M.; Parker, D.; Senanayake, K.; Botta, M.; Aime, S. Chem. Commun. 2005, 474.

⁸⁴ Dioury, F.; Guéné, E.; Di Scala-Roulleau, A.; Ferroud, C.; Guy, A.; Port, M. Tetrahedron Lett. 2005, 46, 611.

Chapitre II.

Complexes de géométrie C_3 .

Chapitre II. Complexes de géométrie C₃.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord exposer les travaux antérieurs réalisés au laboratoire ayant motivé ce travail de thèse, pour ensuite nous intéresser à la synthèse de deux familles de ligands ($\mathbf{L}^2\mathbf{H}_3$ et $\mathbf{L}^3\mathbf{H}_2$ en série *bis*- et *tris*-tridentate, $\mathbf{L}^4\mathbf{H}_3$ et $\mathbf{L}^5\mathbf{H}_3$ en série Tris) et aux propriétés spectroscopiques de leurs complexes de lanthanides (europium et terbium).

1. Travaux antérieurs réalisés au laboratoire.85

Le complexe de lanthanide présenté dans cette partie constitue le point de départ de nos travaux de recherche, aussi bien du point de vue de sa structure que de ses propriétés. Dans le but d'être utilisé comme marqueur luminescent dans des applications de luminescence en temps résolu, un certain nombre de critères ont été ciblés lors de sa conception. Idéalement, un tel complexe devra présenter :

- une bonne solubilité dans l'eau;
- une forte résistance à l'hydrolyse ;
- une forte absorption dans un domaine accessible du spectre ;
- une luminescence intense à partir du lanthanide ;
- une durée de vie longue des états excités centrés sur le lanthanide.

1.1. Structure et synthèse du ligand L^1H_3 .

Dans ce but, le ligand L¹H₃ possède une plateforme organisatrice cyclique polyaminée fonctionnalisée par trois sous-unités bipyridine, chacune portant un groupement carboxylate et donc une charge négative. La coordination de trois unités tridentates (N, N, COO) autour du cation lanthanide conduit à un nombre de coordination de 9. Le complexe neutre qui en résulte est ainsi stabilisé par la chélation multiple des bras fonctionnalisés et par des interactions électrostatiques.

⁸⁵ Charbonnière, L. J.; Guardigli, M.; Cesario, M.; Roda, A.; Sabbatini, N.; Ziessel, R. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 2436.

Le 1,4,7-triazacyclononane 1 est tout d'abord alkylé avec le composé clé 6, la 6-bromo-5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine. L'intermédiaire obtenu est engagé dans une réaction de carboxalkoxylation catalysée par du palladium, suivie d'une saponification. Le ligand $\mathbf{L}^1\mathbf{H}_3$ est isolé après acidification du milieu, il est ainsi obtenu en trois étapes avec un rendement global de 62% (**Schéma 4**).

Schéma 4. Synthèse du ligand L¹H₃.

1.2. Structure des complexes.

Les complexes mononucléaires sont formés à partir d'un mélange équimolaire de ligand et de chlorure de lanthanide hydraté $LnCl_3\cdot 6H_2O$ (Ln = Eu, Tb ou Gd), auquel est ajouté un excès de triéthylamine pour déprotoner les trois acides carboxyliques. Le spectre RMN 1H enregistré pour le complexe d'europium dans du DMSO- d_6 à température ambiante présente 13 signaux étalés sur 26 ppm résultant de la contribution paramagnétique de l'europium. Douze de ces signaux peuvent être attribués au ligand alors que le pic à 16,7 ppm correspond à un proton isolé. Ce signal disparaît en présence de D_2O par échange rapide avec le deutérium. La coalescence des différents systèmes méthyléniques chimiquement non équivalents provenant de la symétrie C_3 du complexe en solution n'est pas observée en remplaçant le solvant par D_2O ou en élevant la température à 370 K.

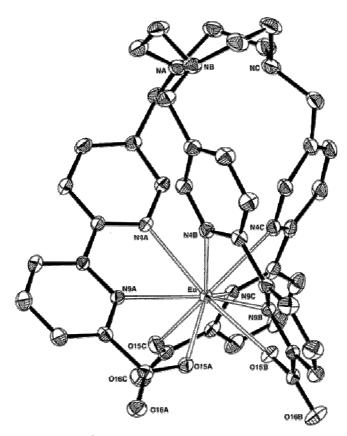


Figure 19. Structure cristalline de $[Eu(L^1H)]\cdot Cl\cdot 10H_2O$ à l'état solide. Vue ORTEP le long du pseudo axe C_3 , les atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.

D'après la structure à l'état solide obtenue par diffraction des rayons X (**Figure 19**), le proton supplémentaire est localisé à proximité de l'atome d'azote noté N_C du macrocycle. La présence d'un ion chlorure a été confirmée par chromatographie ionique haute performance. La formule générale du complexe est donc $[Eu(\mathbf{L}^1H)]\cdot Cl\cdot H_2O$, ce qui lui confère une bonne solubilité dans l'eau. La première sphère de coordination autour du cation Eu^{3+} est occupée par les six atomes d'azote des sous-unités bipyridines ainsi que par les trois atomes d'oxygène des fonctions carboxylate.

A l'état solide, la poche de chélation adopte une symétrie ternaire avec un pseudo axe C_3 perpendiculaire au cycle polyaminé et passant par l'atome d'europium. L'enroulement des sous-unités bipyridines autour du cation conduit à la formation d'une triple hélice où les motifs (N, N, COO) forment un angle de $121 \pm 5^{\circ}$ avec le plan moyen défini par le macrocycle.

1.3. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques des complexes de lanthanides de L^1H_3 ne varient pas pendant plusieurs semaines en milieu aqueux, ce qui prouve leur excellente stabilité dans l'eau (**Tableau 11**). Les bandes d'absorption intenses dans le domaine UV sont attribuées aux transitions $\pi \to \pi^*$ centrées sur les bipyridines. Les complexes d'europium et de terbium sont fortement luminescents dans l'eau après excitation des chromophores bipyridines. Les durées de vie de ces complexes font partie des plus longues recensées en solution aqueuse. ⁸⁶

Tableau 11. Propriétés photo-physiques des complexes $[Ln(L^1H)]\cdot Cl\cdot H_2O$ (Ln = Eu, Tb, Gd).

Lanthanide	Al	osorption		Lu	minescer	nce du m	étal	
	λ_{max}	ϵ_{max}	τ ^{300K}	(ms)	τ ^{77K}	(ms)	Φ^{3001}	^K (%)
	(nm)	$(M^{-1}.cm^{-1})$	H ₂ O	D_2O	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
Eu	309	34300	1,85	2,95	2,1	3,2	12	18
Tb	308	33400	0,50	0,52	1,7	2,0	10	12
Gd	308	35300		-		-		-

Les rendements quantiques de luminescence, mesurés après excitation du ligand organique, sont relativement élevés grâce à un bon transfert d'énergie du ligand vers le métal et à des désactivations non radiatives des états excités centrés sur le métal peu efficaces.

La comparaison des durées de vie dans l'eau et dans l'eau lourde indique que les oscillateurs O-H contribuent faiblement aux désactivations non radiatives, ce qui est confirmé en appliquant l'équation de Horrocks et Sudnick. En effet le nombre de molécules d'eau coordinées au cation peut être estimé à moins de 0,2-0,3 lorsque le complexe est en solution. Lorsque les corrections proposées par Parker et *al.* 2 sont appliquées à la seconde sphère de coordination, cette valeur devient nulle. Ces valeurs confirment l'excellente capacité du ligand à protéger le cation lanthanide du milieu environnant, comme le suggérait la structure à l'état solide du complexe d'europium.

Une étude des propriétés des complexes à différentes températures (300 et 77 K) montre que des processus activés thermiquement jouent un rôle significatif dans le cas du terbium mais

⁸⁶ Elhabiri, M.; Scopelliti, R.; Bünzli, J.-C. G.; Piguet, C. J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 10747.

pas pour les autres complexes. En effet il peut se produire un transfert d'énergie en retour à partir de l'état excité émetteur de Tb³⁺ (⁵D₄) vers les états triplets localisés sur les fragments bipyridines.⁸⁷ D'après le spectre de phosphorescence du complexe de gadolinium, l'état triplet centré sur le ligand peut être estimé à 21700 cm⁻¹, soit seulement 1300 cm⁻¹ au-dessus de l'état émetteur du terbium.

1.4. Stabilité des complexes.

La constante de stabilité conditionnelle $K_{\text{cond},\text{EuL}1}$ pour la formation du complexe d'europium avec le ligand $\mathbf{L}^1\mathbf{H}_3$ dans l'eau a été mesurée dans une solution tampon (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ à 0,05 M, pH = 7,0, 25°C) par compétition avec l'EDTA. La valeur de $\log(K_{\text{cond},\text{EuL}1})$ ainsi déterminée est de 14,3 ± 0,8, alors que $\log(K_{\text{cond},\text{Eu}(\text{EDTA})})$ est de 14,1. Cela signifie que dans les mêmes conditions, le ligand $\mathbf{L}^1\mathbf{H}_3$ forme un complexe de stabilité comparable à celui obtenu avec l'EDTA. Une stabilité élevée est en effet incontournable pour des applications dans des milieux biologiques. De plus, les complexes d'europium et de terbium sont stables pendant plusieurs jours dans un tampon acétate à 0,1 M (pH = 5,8) ou Tris à 0,1 M (pH = 7,9). En présence d'un excès de Ca²⁺ (1000 équivalents), les propriétés photo-physiques des complexes restent identiques à celles mesurées dans l'eau pure.

1.5. Microscopie de luminescence en temps résolu.

Grâce à leurs propriétés photo-physiques et à leur stabilité, les complexes d'europium et de terbium formés avec L¹H₃ sont des candidats potentiels pour des applications en tant que sondes luminescentes. Un dispositif de microscopie de luminescence en temps résolu a permis d'obtenir des clichés d'un système modèle constitué de billes de polyacrylate imprégnées de complexe d'europium ou de fluorescéine (**Figure 20**), cette dernière jouant le rôle de fluorophore organique de référence ayant une durée de vie courte (environ 6 ns dans l'eau). Lors de la mesure de la fluorescence du système, les billes contenant aussi bien le complexe

_

⁸⁷ (a) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I. In *Advances in Photochemistry*; Neckers, D. C., Volman, D. H., von Bünau, G., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1997; Vol. 23, p 213. (b) Charbonnière, L. J.; Balsiger, C.; Schenk, K.; Bünzli, J.-C. G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 505.

⁸⁸ Wu, S. L.; Horrocks, W. DeW., Jr. Anal. Chem. 1996, 68, 394.

⁸⁹ Smith, R. M.; Martell, A. E. In Critical Stability Constants; Plenum Press: New York, 1974; Vol. 1, p 204.

d'Eu³⁺ que la fluorescéine apparaissent. La fluorescence de cette dernière disparaît lorsque la mesure est réalisée en temps résolu, en appliquant un délai de 500 µs après l'excitation.

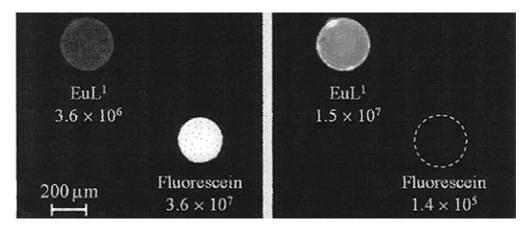


Figure 20. Clichés de microscopie de luminescence de billes de polyacrylate (diamètre $\sim 250~\mu m$) imprégnées de complexe [Eu(L¹H)]·Cl ou de fluorescéine. A gauche est représentée la fluorescence conventionnelle du système, à droite la luminescence en temps résolu (délai 500 μ s). Les valeurs indiquées représentent les intensités moyennes de luminescence, exprimées en photons.s⁻¹.pixel⁻¹.

Ces résultats très encourageants suggéraient que de tels complexes de lanthanides pouvaient être utilisés comme marqueurs luminescents, en association avec des techniques de microscopie de luminescence en temps résolu, dans le but de s'affranchir de la fluorescence résiduelle de l'échantillon lors de la mesure. Il en résulterait une augmentation sensible du contraste lors de l'analyse.

L'introduction d'une fonction de greffage constitue un des développements principaux à apporter à ce type de complexes luminescents pour pouvoir les greffer de manière covalente sur des molécules d'intérêt biologique. Le but est de développer de nouvelles méthodes pour l'analyse microscopique de tissus et de cellules, en apportant de nouveaux outils moléculaires sensibles et utilisables avec des techniques telles que l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*.

2. Choix de la 2,2'-bipyridine substituée.

2.1. Généralités sur la 2,2'-bipyridine.

La 2,2'-bipyridine est connue depuis la publication de la première synthèse de son complexe de fer par Blau à la fin du XIX^e. De la 2,2'-bipyridine pure a été obtenue l'année suivante, en 1889, par distillation du picolinate de cuivre. Depuis, la 2,2'-bipyridine reste un ligand de choix pour la chélation de métaux, tout particulièrement grâce à sa stabilité redox et sa fonctionnalisation aisée. Notons que certains isomères dissymétriques (les 2,3'- et 3,3'-bipyridines) sont naturellement abondants dans certaines variétés de tabac. De la 2,2'-bipyridines de son complexe de fer par Blau à la fin du XIX^e. De la 2,2'-bipyridine pure a été obtenue l'année suivante, en 1889, par distillation du picolinate de cuivre. De puis, la 2,2'-bipyridine reste un ligand de choix pour la chélation de métaux, tout particulièrement grâce à sa stabilité redox et sa fonctionnalisation aisée. Notons que certains isomères dissymétriques (les 2,3'- et 3,3'-bipyridines) sont naturellement abondants dans certaines variétés de tabac.

Schéma 5. Coordination de la 2,2'-bipyridine à un centre métallique M (a) et structure de la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **2** (b).

La 2,2'-bipyridine est une oligopyridine composée de deux fragments pyridiniques connectés en position 2 et 2' (**Schéma 5**). Elle possède deux facettes et se comporte à la fois comme un ligand σ -donneur et π -accepteur. Le doublet libre de chaque atome d'azote peut former une liaison σ avec un atome central, alors que le système aromatique peut participer à des interactions π - π . Ce ligand coordine facilement les ions métalliques, tout particulièrement les métaux de transition avec différents degrés d'oxydation. La 2,2'-bipyridine possédant deux atomes d'azote séparés par deux atomes de carbone, elle peut former un cycle chélate à cinq chaînons fortement stabilisé (**Schéma 5**). La bipyridine peut aussi être considérée comme une diimine, contribuant ainsi à la délocalisation des électrons dans le cycle chélate.

La 2,2'-bipyridine est d'un grand intérêt en chimie de coordination, aussi bien en tant que sensibilisateur pour la photochimie ^{93,94} que précurseur utile en chimie supramoléculaire. ^{95,96,97}

92 Kaes, C.; Katz, A.; Hosseini, M. W. Chem. Rev. 2000, 100, 3553.

⁹⁰ Blau, F. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1888, 21, 1077.

⁹¹ Blau, F. Monatsh. Chem. **1889**, 10, 375.

⁹³ Kalyanasundaram, K. Coord. Chem. Rev. **1982**, 46, 159.

⁹⁴ Denti, G.; Campagna, S.; Sabatino, L.; Serroni, S.; Ciano M.; Balzani V. Inorg. Chem. 1990, 29, 4750.

La complexation sélective de bipyridines autour de cations métalliques permet la formation sélective d'édifices évolués comme les hélicates. Notons que l'unité bipyridine présente également un intérêt dans le domaine de la catalyse, en particulier pour la réduction du dioxyde de carbone et l'hydroformylation d'oléfines. 100

2.2. Substitution de la 2,2'-bipyridine.

Dans le but d'intégrer le motif 2,2'-bipyridine dans des structures moléculaires plus complexes, il est nécessaire d'y introduire de nouvelles fonctionnalités. Pour ce faire, chaque noyau pyridinique a été substitué, respectivement dans les positions 6 et 5'. Le premier intermédiaire clé que nous avons été amené à préparer est la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2¹⁰¹, pour laquelle une nouvelle synthèse¹⁰² a été mise au point (**Schéma 6**).

2.2.1. La 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine. 102

La synthèse de la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **2** est résumée sur le **Schéma 6**. La 2-bromo-6-acétylpyridine **4** est préparée selon la méthode décrite dans la littérature. ¹⁰³ Grâce à un échange halogène-métal mené à basse température dans du diéthyléther, la 2,6-dibromopyridine commerciale **3** est mono-lithiée avec du *n*-butyllithium. La 2-bromo-6-lithiopyridine formée s'additionne ensuite sur du *N,N*-diméthylacétamide pour former l'intermédiaire **4**. Cette dernière est ensuite transformée quasi quantitativement en son sel d'acétylpyridinium **5** en présence de diiode dans de la pyridine à reflux en appliquant la procédure développée par King. ¹⁰⁴ L'iodure d'acétylpyridinium **5** est enfin condensé à chaud avec de la méthacroléine dans du formamide contenant de l'acétate d'ammonium selon le

⁹⁵ Ziessel, R.; Lehn, J.-M. Helv. Chim. Acta 1990, 73, 1149.

⁹⁶ Rodriguez-Ubis, J.-C.; Alpha, B.; Plancherel, D.; Lehn, J.-M. Helv. Chim. Acta **1984**, 67, 2264.

⁹⁷ Bilyk, A.; Harding, M. M. J. Chem. Soc., Dalton Trans. **1994**, 77.

⁹⁸ Piguet, C.: Bernardinelli, G.: Hopfgartner, G. Chem. Rev. 1997, 97, 2005.

⁹⁹ Collomb-Dunand-Sauthier, M.-N.; Deronzier, A.; Ziessel, R. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 2961.

¹⁰⁰ Haukka, M.; Alvila, L.; Pakkanen. T. A. J. Mol. Catal. 1995, 102, 79.

¹⁰¹ Hanan, G. S.; Schubert, U. S.; Volkmer, D.; Rivière, E.; Lehn, J.-M.; Kyritsakas, N.; Fischer, J. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 169.

¹⁰² Charbonnière, L. J.; Weibel, N.; Ziessel R. F. Tetrahedron Lett. 2001, 42, 659.

¹⁰³ Parks, J. E.; Wagner, B. E.; Holm, R. H. J. Organomet. Chem. **1973**, *56*, 53.

¹⁰⁴ King, L. C. J. Am. Chem. Soc. **1944**, 66, 894.

protocole décrit par Kröhnke. La 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2 est ainsi obtenue avec un rendement de 53% en trois étapes à partir de la 2,6-dibromopyridine 3. Notons que cette voie de synthèse permet de former cet intermédiaire clé en grande quantité. La fonctionnalisation indépendante des positions 6 (occupée par un groupement bromo) et 5' (occupée par un groupement méthyle) est maintenant possible. Ces deux voies vont être explorées dès à présent.

Schéma 6. Synthèse de la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2.

2.2.2. Activation de la position 5'.

L'halogénation du groupement méthyle en position 5' permet de conférer à la bipyridine 2 des propriétés alkylantes, la rendant réactive vis-à-vis de nucléophiles divers (alcools, amines...). Cette activation constitue ainsi l'étape déterminante pour incorporer le motif bipyridinique à des structures préorganisées.

2.2.2.1. Méthode de Fraser.

Dans un premier temps, la méthodologie développée par Fraser et *al.*¹⁰⁶ a été testée pour transformer la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **2** en 6-bromo-5'-bromométhyl-2,2'-

¹⁰⁵ Kröhnke, F. *Synthesis* **1976**, 1.

 ⁽a) Savage, S. A.; Smith, A. P.; Fraser, C. L. J. Org. Chem. 1998, 63, 10048.
 (b) Fraser, C. L.; Anastasi, N. R.; Lamba, J. J. S. J. Org. Chem. 1997, 62, 9314.
 (c) Lamba, J. J. S.; Fraser, C. L. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 1801.

bipyridine **6** (**Schéma 7**). Cette technique d'halogénation s'applique avec succès aux méthyl-2,2'-bipyridines, et consiste à déprotoner la fonction méthyle avec du diisoproylamidure de lithium (LDA) à basse température et à piéger l'anion avec du chlorure de triméthylsilyle (TMSCl). Le silane formé est ensuite mis à réagir avec du dibromotétrafluoroéthane dans du DMF contenant du fluorure de césium anhydre. Les bromométhyl-2,2'-bipyridines correspondantes sont obtenues avec d'excellents rendements (> 92%). ¹⁰⁶

1) LDA, -78°C
2) TMSCI
Br 3)
$$C_2F_4Br_2$$
, CsF Br 6

Schéma 7. Méthode de Fraser appliquée à la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2.

Malgré tous les tentatives effectuées pour appliquer cette méthode à la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2, il n'a pas été possible de former le silane dans des quantités raisonnables. Comme le substrat de départ présente un groupement bromo, la métallation en position 6 de la bipyridine 2 doit entrer en compétition avec la déprotonation voulue en présence de LDA.

2.2.2.2. Bromation radicalaire.

En nous basant sur une étude précédente visant à préparer des dérivés mono- et dibromés, ¹⁰⁷ il a été possible d'obtenir la bipyridine monobromée **6** à hauteur de 63% à partir de la 5'-méthyl-2,2'-bipyridine **2** par une réaction de bromation radicalaire (**Schéma 8**), déviant ainsi de manière favorable de la distribution statistique attendue (50% de produit monobromé). La réaction est effectuée dans le tétrachlorure de carbone à reflux en présence d'une source de brome (NBS) et d'un initiateur de radicaux (AIBN).

Schéma 8. Réaction de bromation radicalaire à partir de la 5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2.

¹⁰⁷ Ziessel, R.; Hissler, M.; Ulrich, G. Synthesis **1998**, 1339.

-

Dans le but de maximiser la formation du produit monobromé 6, différents paramètres réactionnels ont été modifiés (stoechiométrie, température, irradiation). Les résultats de cette étude sont consignés dans le **Tableau 12**. 108

Tableau 12. Mise au point des conditions expérimentales pour la bromation radicalaire de 2.

_	Qι	antités (é	eq.) ^a	Température (°C) ^b	hν ^c	Produi	its (%) ^d
	2	NBS	AIBN			6	7
_	1	1	0	80 à 100	-	0	0
	1	1	0,05	80	-	0	0
	1	1	0,05	100	-	51	4
	1	1	0,05	80	\checkmark	63	9
	1	1,25	0,05	80	\checkmark	69	28
	1	1,5	0,05	80	\checkmark	62	33 ^e

^a Conditions types : 50 mg de **2** dans 10 mL de CCl₄, 40 min. de réaction. ^b Pour les températures supérieurs à 80°C, la réaction a été conduite dans un tube de Schlenk. ^c Irradiation avec une lampe à incandescence conventionnelle de 60 W. ^d Rendements obtenus à partir des valeurs des intégrales du spectre RMN ¹H. ^e 5% de produit tribromé a été identifié.

Sans surprise, l'initiateur de radicaux et la source de lumière sont nécessaires pour obtenir les meilleurs résultats. En absence d'irradiation lumineuse, la réaction a lieu si la température est élevée à 100°C dans un tube de Schlenk. Des essais faisant varier la quantité de NBS ont conduit à une valeur optimale de 1,25 équivalents par rapport au composé de départ 2. Dans ce cas, seules des traces de ce composé sont présentes à la fin de la réaction, ce qui facilite grandement la séparation des produits par chromatographie sur colonne de silice. Ainsi, la bipyridine monobromée 6 est obtenue avec un rendement maximum de 69% après purification. Lorsque les quantités de NBS sont augmentées, la formation des produits dibromé 7 et tribromé est favorisée au détriment du produit recherché.

2.2.2.3. Synthèse de bases de Schiff.

Parallèlement à cette étude, nous avons mis au point une méthode efficace de préparation d'imines (ou bases de Schiff) à partir de la bipyridine dibromée 7. ¹⁰⁹ En effet, la fonction

_

¹⁰⁸ Charbonnière, L. J.; Weibel, N.; Ziessel R. F. Synthesis 2002, 1101.

¹⁰⁹ Weibel, N.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7876.

gem-dibromométhyle peut être vue comme une forme masquée d'un aldéhyde apte à réagir avec une amine primaire pour former l'imine correspondante (**Figure 21**).

Figure 21. Formation de bases de Schiff à partir de la 5'-dibromométhyl-2,2'-bipyridine 7.

Cette méthodologie a été testée avec des amines aliphatiques (*n*-propylamine, *n*-décylamine), une polyamine (*tris*-(2-aminoéthyl)amine) et un dérivé de l'aniline (*p*-anisidine) et a fourni les précurseurs de nouveaux ligands destinés à la complexation de cations lanthanides (**Figure 22**). Après formation de l'imine, il est possible de convertir efficacement celle-ci en amine secondaire par réduction au borohydrure de sodium dans de l'éthanol.

Figure 22. Exemple de bases de Schiff synthétisées selon la méthodologie décrite.

La mise au point de cette méthodologie originale a ainsi permis de valoriser un sous-produit de réaction issu de la bromation radicalaire de la 5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2, la 5'-dibromométhyl-2,2'-bipyridine 7. Cette approche est d'autant plus intéressante que le composé 7 est formé dans des quantités non négligeables (rendement de l'ordre de 30%).

2.2.3. Activation de la position 6.

Dans le but de transformer les fragments bipyridines bidentates en unités tridentates, de nouvelles fonctions coordinantes ont été introduites par voie chimique. Nous avons

principalement exploité la réaction de carboalkoxylation qui permet d'introduire une fonction acide carboxylique *via* l'ester correspondant, alors que la réaction de phosphorylation permet de passer à l'acide phosphonique et à ses mono- ou diesters. Nous allons dès à présent détailler la mise en œuvre de ces deux réactions, ainsi que leur application à l'activation de la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **2** en position 6.

2.2.3.1. Réaction de carboalkoxylation. 110

Cette méthodologie qui se base sur les travaux précurseurs de Heck¹¹¹ permet d'introduire aisément un ester carboxylique sur une oligopyridine substituée présentant un groupement chloro, bromo ou triflate. La réaction est catalysée par du palladium(0) et est menée dans des conditions douces (70°C, 1 atm. de CO) en présence d'un alcool primaire comme nucléophile et d'une amine tertiaire comme base. Typiquement, un mélange d'éthanol et de triéthylamine contenant une quantité catalytique de chlorure de *bis*-(triphénylphosphine)palladium(II) est traversé par un flux de monoxyde de carbone à pression atmosphérique pendant une nuit. En appliquant ces conditions opératoires, la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2 est convertie avec un très bon rendement après purification en 6-carboéthoxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 8 (Schéma 9). ^{102,108}

Schéma 9. Réaction de carboalkoxylation appliquée à la 6-bromo-2,2'-bipyridine 2 et hydrolyse de l'ester 8.

L'hydrolyse de l'ester carboxylique permet de générer la fonction anionique de la bipyridine substituée. Cette dernière étape peut être conduite soit en milieu acide, soit en milieu basique (saponification). Ainsi, l'hydrolyse acide de l'ester éthylique de la bipyridine 8 dans un mélange hydro-alcoolique à chaud permet d'obtenir l'acide carboxylique correspondant, la 6-carboxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridine 9, avec un rendement élevé après cristallisation (Schéma 9). 102,108

¹¹⁰ El-ghayoury, A.; Ziessel, R. J. Org. Chem. **2000**, 65, 7757.

¹¹¹ Schoenberg, A.; Bartoletti, I.; Heck, R. F. J. Org. Chem. **1974**, *39*, 3318.

2.2.3.2. Réaction de phosphorylation.

Les acides phosphoniques sont connus pour leur grande affinité pour les cations de métaux de transition et pour de nombreux oxydes métalliques. Dans certains cas, les liaisons formées avec le métal (Al^{III}, Ti^{IV}...) sont tellement stables qu'elles tolèrent des milieux fortement oxydants, réducteurs, acides ou basiques.¹¹²

Cette autre voie d'activation de la bipyridine en position 6 consiste en une réaction de phosphorylation s'inspirant des travaux de Odobel et *al.*¹¹² Il s'agit d'un couplage catalysé par du palladium(0) entre une halobipyridine et du diéthylphosphite dans du toluène à chaud. La base de Hünig (la *N,N*-diisopropyléthylamine) est présente pour consommer l'acide bromhydrique au fur et à mesure de sa formation. La bipyridine pouvant entrer en compétition avec les ligands du catalyseur et conduire à sa désactivation, un large excès de triphénylphosphine (10 équivalents par rapport à la bipyridine) est nécessaire pour prévenir cet échange de ligands et obtenir de bons rendements. Cette grande quantité de triphénylphosphine est facilement séparée et peut éventuellement être recyclée lors de la purification du produit phosphorylé par chromatographie sur colonne. La conversion efficace de la 6-bromo-2,2'-bipyridine 2 en 6-diéthylphosphonobipyridine 10 selon cette méthodologie est décrite dans la littérature,¹¹³ ainsi que les deux voies d'hydrolyse possibles à partir de cet intermédiaire (**Schéma 10**).

L'hydrolyse partielle du diester phosphonique **10** est accomplie avec une quantité stoechiométrique d'hydroxyde de sodium dans l'eau à reflux pendant une nuit (**Schéma 10**). Le monoester phosphonique **11** est ainsi obtenu avec un rendement de 83% sous forme de sel monosodique après extraction au dichlorométhane, filtration sur Célite et précipitation lente à l'hexane. ¹¹³

¹¹² Penicaud, V.; Odobel, F.; Bujoli, B. *Terahedron. Lett.* **1998**, *39*, 3689.

¹¹³ Comby, S.; Imbert, D.; Chauvin, A.-S.; Bünzli, J.-C. G.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7369.

Schéma 10. Réaction de phosphorylation appliquée à la 6-bromo-2,2'-bipyririne 2 et hydrolyses menant à 11 et 12

L'hydrolyse complète du diester phosphonique **10** est également possible avec un excès de bromure de triméthylsilyle dans du dichlorométhane anhydre (**Schéma 10**), sous atmosphère d'argon pendant deux jours selon une méthode décrite dans la littérature. L'acide phosphonique **12** qui précipite au cours de la réaction est isolé avec un rendement de 80% après filtration et lavage au dichlorométhane. Notons qu'une simple hydrolyse à l'aide d'acide chlorhydrique 6N à reflux permet aussi d'obtenir de l'acide phosphonique **12**.

Nous disposons maintenant des outils synthétiques nous permettant d'activer indifféremment les positions 5' (par bromation radicalaire) et 6 (par carboalkoxylation ou phosphorylation) de la 2,2'-bipyridine. De cette manière, en mettant en œuvre le tandem de réactions carboalkoxylation/hydrolyse ou phosphorylation/hydrolyse, un bras anionique de type carboxylate ou phosphonate peut facilement être introduit sur une unité bipyridinique, ce qui en fait une unité coordinante tridentate chargée négativement (**Schéma 11**). Nous allons dès à présent nous intéresser à la synthèse des premiers ligands obtenus à partir du composé clé 6.

Schéma 11. Unités tridentates 6-carboxy-2,2'-bipyridine (a) et 6-phosphono-2,2'-bipyridine (b) fonctionnalisées en position 5' et coordinées à un centre métallique M.

115 Boduszek, B. J. Prakt. Chem. 1992, 334, 444.

_

¹¹⁴ Montalti, M.; Wadhwa, S.; Kim, W. Y.; Kipp, R. A.; Schmehl, R. H. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 76.

3. Ligands bis- et tris-tridentates. 108

3.1. Premiers intermédiaires.

Deux intermédiaires ont été facilement obtenus à partir de la 6-bromo-5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 6 grâce à des réactions de substitution nucléophile tirant profit de la labilité de l'atome de brome du groupement bromométhyle en position 5'.

3.1.1. La 5'-aminométhyl-2,2'-bipyridine.

La réaction de Delépine¹¹⁶ permet de convertir les halogénures d'alkyle en amines primaires à l'aide d'hexaméthylènetétramine. Le sel d'ammonium obtenu est ensuite hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique en solution dans de l'éthanol. Cette méthode est très efficace avec les halogénures réactifs comme les halogénures allyliques ou benzyliques, les α -halocétones et les iodures d'alkyle.

Schéma 12. Synthèse de la 6-bromo-5'-aminométhyl-2,2'-bipyridine **13** et de la 6-bromo-5'-hydroxyméthyl-2,2'-bipyridine **14**.

Appliquée à la 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **6**, cette technique permet d'obtenir la 6-bromo-5'-aminométhyl-2,2'-bipyridine **13** (**Schéma 12**). Le composé **6** est mis à réagir avec de l'hexaméthylènetétramine dans du dichlorométhane à reflux pour former un sel

_

¹¹⁶ (a) Delépine, M. Compt. Rend. **1895**, 120, 501. (b) Long, L. M.; Troutman, H. D. J. Am. Chem. Soc. **1949**, 71, 2473.

d'ammonium qui cristallise à basse température. Ce dernier est ensuite hydrolysé en milieu acide dans de l'éthanol à reflux, puis la 6-bromo-5'-aminométhyl-2,2'-bipyridine 13 est extraite au dichlorométhane après passage en milieu basique (solution saturée d'hydroxyde de sodium dans l'eau) et isolée avec un bon rendement.

3.1.2. La 5'-hydroxyméthyl-2,2'-bipyridine.

La 6-bromo-5'-hydroxyméthyl-2,2'-bipyridine **14** est obtenue à partir du composé **6** par déplacement du groupement bromo par un excès d'acétate de sodium dans du DMF à chaud, suivi de la saponification de l'ester intermédiairement formé, avec de la soude dans un mélange méthanol/eau à reflux. Après neutralisation du milieu avec une solution diluée d'acide chlorhydrique, l'alcool brut est extrait en milieu organique puis purifié par une chromatographie sur colonne d'alumine. L'intermédiaire **14** est ainsi aisément obtenu avec un très bon rendement (**Schéma 12**).

Ainsi à partir du composé 6 il est possible d'obtenir deux intermédiaires ayant chacun une fonction réactive en tant que nucléophile (azotée pour 13, oxygénée pour 14) pouvant nous conduire à de nouveaux ligands *bis*- ou *tris*-tridendate par une succession de réactions alkylation/carboalkoxylation/hydrolyse que nous allons décrire maintenant.

3.2. Ligand tris-tridentate L^2H_3 .

Le groupement amino de la bipyridine **13** est apte à jouer le rôle de nucléophile dans des réactions de substitution nucléophile. Ainsi l'alkylation de la 5'-aminométhyl-2,2'-bipyridine **13** est effectuée avec 2,2 équivalents de 5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine **6** dans de l'acétonitrile anhydre, à chaud et en présence d'une base minérale (carbonate de sodium) préalablement flambée sous vide. Le tripode possédant trois bras 6-bromo-2,2'-bipyridines **15** est obtenu avec un très bon rendement (86%) après purification (**Schéma 13**).

Schéma 13. Synthèse du ligand *tris*-tridentate L^2H_3 . a) CO (1 atm.), $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ cat., $EtOH/Et_3N$, $80^{\circ}C$. b) NaOH, MeOH/H₂O, reflux puis HCl dilué.

Grâce à une réaction de carboalkoxylation menée dans des conditions classiques, des fonctions ester éthylique sont introduites sur chaque fragment bipyridinique. Le tripode *tris*-tridendate est ainsi obtenu avec un rendement modeste de 33%. L'étape finale consiste en la saponification du triester **16**. Le ligand triacide est isolé sous forme d'hémihydrate $L^2H_3\cdot \frac{1}{2}$ H_2O avec un rendement de 30% après précipitation en milieu acide à pH 4 environ. Ce ligand de type podand présente une structure chimique le rendant apte à la complexation de cations lanthanides.

D'après ce que nous avons vu précédemment, l'hydrolyse en milieu basique des fonctions ester de 16 est *a priori* aisée, ce qui peut expliquer le faible rendement de formation du triester 16. En effet la réaction de carboalkoxylation est réalisée dans un mélange équivolumique de solvants hygroscopiques (éthanol et triéthylamine) non distillées qui vont donc apporter une quantité non négligeable d'eau au milieu réactionnel. L'hydrolyse partielle du produit lors de sa purification par chromatographie sur colonne peut également être envisagée, le support employé étant de la silice traitée au préalable à la triéthylamine. Cette

dernière éventualité semble être confirmée par le fait que la saponification directe d'un échantillon brut de composé 16 (obtenu par simple évaporation des solvants après carboalkoxylation) permet d'obtenir le ligand L^2H_3 avec un rendement de 90%.

3.3. Ligand bis-tridentate L^3H_2 .

La synthèse du ligand *bis*-tridente L^3H_2 est résumée sur le **Schéma 14**.

Schéma 14. Synthèse du ligand bis-tridentate L³H₂.

L'alcool primaire de la bipyridine fonctionnalisée **14** peut également servir à construire une nouvelle entité chélatante *via* une réaction de type éthérification de Williamson. La fonction alcool est déprotonée à température ambiante dans du THF avec de l'hydrure de sodium dispersé à 60% dans une huile minérale. La 5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine **6** est ajoutée au milieu réactionnel contenant l'alcoolate formé, puis la solution est chauffée à 80°C pendant une nuit dans un tube de Schlenk. Le composé ditopique **17** est obtenu avec un bon rendement et présente un pont éther résultant de l'attaque nucléophile de l'alcoolate sur le carbone du groupement bromométhyle de la bipyridine **6**. Comme auparavant, l'étape d'alkylation est suivie d'une réaction de carboalkoxylation qui nous fournit le diester ponté **18** avec un rendement de 39% après purification. Le rendement doit être à nouveau limité par une perte partielle du produit lors de la chromatographie sur colonne de silice. Le ligand ditopique est isolé efficacement sous forme d'hydrate **L**³H₂·H₂O après saponification puis acidification du milieu avec une solution diluée d'acide chlorhydrique dans l'eau.

Nous venons de présenter la synthèse de deux nouveaux ligands destinés à la complexation de cations lanthanides, le ligand *tris*-tridentate L^2H_3 et le ligand *bis*-tridentate L^3H_2 , obtenus à partir d'un intermédiaire commun, la 6-bromo-5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 6. Chacun d'entre eux est synthétisé en quatre étapes successives, avec un rendement global de 7% pour L^2H_3 et 26% pour L^3H_2 . Dans les deux cas, l'étape présentant le rendement le plus faible est la réaction de carboalkoxylation, une grande partie du produit étant vraisemblablement perdue lors de la purification par chromatographie sur colonne de silice.

3.4. Complexes.

En présence d'un cation lanthanide Ln^{3+} et après déprotonation du ligand, la stoechiométrie escomptée pour les complexes neutres est $[\operatorname{Ln}\mathbf{L}^2]$ pour le ligand *tris*-tridentate et $[\operatorname{Ln}_2(\mathbf{L}^3)_3]$ pour le ligand *bis*-tridentate. En effet, le tripode \mathbf{L}^2H_3 présente trois bras tridentates portant chacun une charge négative, ce qui permet d'espérer la formation préférentielle de complexes 1:1 neutres, alors que dans le cas du ligand \mathbf{L}^3 , deux cations métalliques doivent accommoder trois ligands déprotonés pour fournir des complexes 2:3 neutres.

Les essais de complexation menés avec le ligand triacide L^2H_3 n'ont pas été fructueux. Après avoir mis en présence des quantités équimolaires de ligand et d'un chlorure de lanthanide hexahydraté (Eu^{3+} , Tb^{3+} ou Gd^{3+}) tous deux en solution dans du DMSO puis ajout de triéthylamine, les produits isolés sont certes luminescents (cas de l'europium et du terbium) mais fortement insolubles dans les solvants usuels aussi bien polaires (eau, acétonitrile, DMSO) que peu polaires (dichlorométhane, nitrométhane, THF), même à chaud. Nous avons observé le même comportement en essayant de former le complexe de stoechiométrie 2:3 $[Eu_2(L^3)_3]$ à partir du ligand L^3H_2 et de chlorure d'europium(III) hexahydraté dans du DMSO. Dans ces deux derniers cas, la substitution des bipyridines en position 5' ne permet pas de replier les bras chélatants autour d'un même centre métallique ; ces derniers divergent et conduisent vraisemblablement à la formation d'oligomères fortement insolubles.

Ainsi en raison des problèmes de solubilité et de caractérisation des complexes obtenus, nous avons décidé de ne pas mener d'études photo-physiques sur ces nouveaux ligands malgré leur potentialité pour la complexation de cations lanthanides. L'étude de la poche de chélation du ligand \mathbf{L}^2H_3 aurait été particulièrement intéressante en comparaison avec l'enroulement

observé du ligand L^1H_3 (basé sur le 9N3) autour du lanthanide. Notons que le ligand L^2H_3 ne présente pas de fonction de greffage dédiée au marquage de composés biologiques à part l'amine tertiaire centrale qui, pour sa part, n'offre que peu de possibilités de fonctionnalisation. Son étude aurait été celle d'un modèle préliminaire nécessitant la refonte partielle de son squelette et donc de sa synthèse pour étendre son champ d'application.

4. Ligands en série Tris.

Dans le but de concevoir de nouveaux complexes présentant une symétrie C_3 et pouvant être greffés sur des composés biologiques, nous avons choisi de repenser la structure du squelette du ligand. La partie chélatante repose toujours sur une structure dérivée du ligand $\mathbf{L}^1\mathbf{H}_3$, où trois bras tridentates monochargés de type bipyridine-carboxylate se prêtent à accueillir un cation lanthanide, alors qu'une fonction de greffage reste disponible à l'autre extrémité de l'édifice pour former une liaison covalente avec le composé biologique à marquer (**Figure 23**).

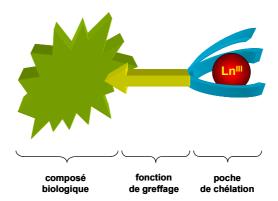


Figure 23. Représentation schématique du chélate de lanthanide greffé sur un composé biologique.

4.1. Le squelette Tris.

4.1.1. Généralités.

Cette nouvelle série de ligands a ainsi été construite sur un seul et même motif central, le *tris*-(hydroxyméthyl)aminométhane **19**, encore appelé Tris. Ce petit fragment organique azoté et

oxygéné présente deux types de fonctions chimiques : une fonction amine primaire et trois fonctions alcool primaire (**Schéma 15**). Comme nous l'avons vu auparavant, la fonction alcool peut être impliquée dans une réaction de O-alkylation avec un réactif électrophile. Nous pouvons profiter de la présence des trois groupements hydroxyméthyle indifférenciés pour construire la poche de chélation autour des trois bras bipyridine-carboxylate, la fonction amine restante pouvant être mise à contribution pour introduire une fonction de greffage. Grâce aux ponts éther formés par O-alkylation, il est ainsi possible d'éloigner le point d'ancrage des bipyridines, ce qui devrait favoriser l'enroulement des bras chélatants autour d'un seul et unique centre métallique.

La structure discrète du Tris est à la base de la construction d'édifices moléculaires plus imposants, comme des dendrimères sur support solide¹¹⁷ ou des agrégats supramoléculaires,¹¹⁸ mais aussi de ligands destinés à la complexation de lanthanides, présentant trois fonctions acide avec un chromophore de type pyrène¹¹⁹ ou une fonction de greffage de type phénylisothiocyanate.¹²⁰

4.1.2. Protection du Tris.

Comme le groupement amino est aussi réactif en tant que nucléophile, il est nécessaire de le différencier des groupements alcool. Il aurait été possible de jouer sur la différence de réactivité entre une amine primaire et un alcool primaire, l'azote étant moins électronégatif que l'oxygène, son doublet est plus polarisable, son caractère nucléophile est donc exalté. Cela aurait nécessité une mise au point très fine pour obtenir des conditions opératoires adéquates. Nous avons opté pour une stratégie plus directe mettant en jeu un tandem de réactions de protection et de déprotection. La synthèse proposée peut être scindée en trois grandes étapes successives :

- protection de la fonction amine;
- construction de la poche de chélation (alkylation des fonction alcools, carboalkoxylation, hydrolyse) et complexation ;
- déprotection de la fonction amine et mise en place d'une fonction de greffage.

¹¹⁸ Seto, C. T.; Mathias, J. P.; Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc. **1993**, 115, 1321.

78

¹¹⁷ Fromont, C.; Bradley, M. Chem. Commun. **2000**, 283.

¹¹⁹ Sohna Sohna, J.-E.; Fages, F. Tetrahedron Lett. **1997**, 38, 1381.

¹²⁰ Dupraz, A.; Guy, P.; Dupuy, C. Tetrahedron Lett. **1996**, 37, 1237.

Le groupement protecteur choisi doit être suffisamment robuste pour résister aux conditions opératoires utilisées lors de la construction de la poche de chélation (présence d'une base forte comme un hydrure, hydrolyse acide ou basique). Les étapes de protection et de déprotection doivent être sélectives et leur mise en œuvre ne doit pas altérer le reste de la molécule. Notre choix s'est ainsi porté sur un groupement protecteur de type benzyle, une hydrogénation catalytique devrait permettre sa déprotection sélective. La dibenzylation du Tris décrite succinctement dans la littérature¹²⁰ est réalisée avec du bromure de benzyle dans de l'eau contenant de l'hydrogénocarbonate de sodium, le produit est obtenu avec un rendement de 68%. Nous sommes partis de cette base pour mettre au point les conditions opératoires de cette réaction, tout en caractérisant le produit obtenu.

Schéma 15. Benzylation du Tris **19**. R_1 =PhCH₂, R_2 =Et, X=Cl ou R_1 = R_2 = n Bu, X=I.

La benzylation du Tris 19 est ainsi effectuée dans un système biphasique en présence d'un agent de transfert de phase. Une phase aqueuse contenant 19, de l'hydrogénocarbonate de sodium et un sel d'ammonium comme agent de transfert de phase est mise directement en contact avec une phase organique composée uniquement du bromure de benzyle. Sans adjonction de solvant organique, le système obtenu est porté à reflux (100°C) pendant une nuit. Après refroidissement, le milieu réactionnel est extrait au dichlorométhane, le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne d'alumine ou par cristallisation à basse température pour fournir le Tris dibenzylé 20 (Schéma 15).

En utilisant du chlorure de benzyltriéthylammonium en sous-stoechiométrie comme agent de transfert de phase, le rendement de réaction après purification est faible (24%). Dans le but d'augmenter la conversion du Tris en produit dibenzylé, l'iodure de tétrabutylammonium a ensuite été testé. Le rendement obtenu est certes plus élevé mais reste modéré et du même ordre de grandeur (30%). Ces conditions non optimisées (consignées dans le **Tableau 13**) ont été jugées satisfaisantes car elles nous ont permis d'obtenir suffisamment de Tris dibenzylé **20** pour effectuer toutes les synthèses présentées dans la suite de ce manuscrit.

Tableau 13. Influence	de l'agent de	transfert de phase	lore de la benz	vlation du Tric 10
i anieau 13. inituence	de i ageni de	transfert de bhase	TOTS de la Denz	viauon du 1118 19 .

Agent de transfert de	Stoechiométrie (éq.)	Temps de réaction (h)	Rendement (%)
phase			
(PhCH ₂)Et ₃ N ⁺ Cl ⁻	0,06	13	24
$^{n}\mathrm{Bu_{4}N}^{+}\mathrm{I}^{-}$	0,10	16	30

A partir de ce premier intermédiaire, nous avons envisagé l'édification de deux poches de chélation différentes pour accueillir le cation lanthanide (**Figure 24**). Dans la continuité des travaux présentés auparavant, le premier ligand sera doté de trois bras bipyridine-carboxylate (ligand Tris-bipyridine L⁴H₃). Par extension de cette voie de synthèse à un autre motif chélatant, nous avons synthétisé un second ligand avec trois bras pyridine-carboxylate (ligand Tris-pyridine L⁵H₃). Nous allons à présent exposer et discuter la synthèse de ces deux ligands, ainsi que la préparation de leurs complexes avant de nous intéresser à l'étude de leurs propriétés photo-physiques.

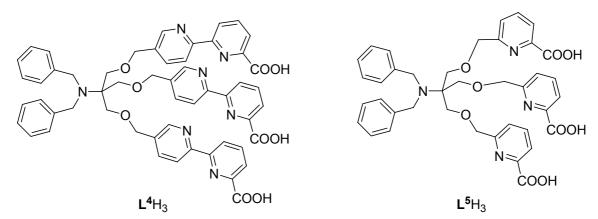


Figure 24. Structure des ligands L⁴H₃ et L⁵H₃.

4.2. Ligand Tris-bipyridine.

4.2.1. Synthèse du ligand L⁴H₃ « Tris-bipyridine ».

Après avoir protégé la fonction amine du Tris sous forme de dibenzyle, les trois fonctions alcool restent disponibles et réactives en tant que nucléophiles. L'étape clé nous donnant accès au premier intermédiaire précurseur du ligand Tris-bipyridine L⁴H₃ est donc une réaction de type éthérification de Williamson. Après avoir généré les fonctions alcoolate à

l'aide d'hydrure de sodium, la réaction de O-alkylation peut avoir lieu avec la 5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 6 pour former le produit trialkylé 21 (Schéma 16).

Schéma 16. Synthèse du ligand L⁴H₃.

Différents types de conditions opératoires ont été éprouvées pour optimiser la formation du produit **21**. Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau 14**. Le premier essai conduit à chaud dans du DMF anhydre avec un large excès d'hydrure (9 éq. ajoutés en plusieurs portions) nous a permis d'isoler et de caractériser le produit souhaité, toutefois avec un rendement faible (19%).

Tableau 14. Optimisation des conditions opératoires pour la formation de 21.

Solvant	Catalyseur	NaH	Température	Temps	Produi	ts (%)
		(éq.)	(°C)	(h)	21	23
DMF	-	9,0	70	24	19	25
THF	-	7,0	80	25	55	-
DMF	TBAI	4,5	t.a.	19	87	-

Nous avons ensuite remplacé le DMF par du THF anhydre, autre solvant aprotique conseillé pour les réactions en présence d'hydrures. Dans des conditions similaires (quantité d'hydrure,

température et temps de réaction), le produit **21** est isolé avec un rendement de 55%. Le rendement de la réaction est donc plus que doublé mais reste encore moyen.

Dans un troisième temps, nous nous sommes tournés vers des conditions d'alkylation plus douces. La réaction a pu être menée à bien dans du DMF anhydre à température ambiante avec une stoechiométrie raisonnable d'hydrure de sodium (1,5 éq. par fonction alcool en un seul ajout) grâce à l'intervention d'une catalyse par l'iodure de tétrabutylammonium (TBAI). Le rôle de ce dernier, présent à hauteur de 0,1 éq. par rapport à 20, est d'augmenter le caractère alkylant de la 5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 6. En effet, sous l'impulsion des ions iodures présents en solution, nous pouvons envisager la formation intermédiaire de la 5'-iodométhyl-2,2'-bipyridine (non isolée) par substitution nucléophile sur la 5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 6. L'iode étant l'élément le moins électronégatif de la série des halogènes, la liaison carbone-iode est plus polarisable que la liaision carbone-brome, ce qui rend l'iodure meilleur nucléofuge que le bromure, l'alkylation subséquente se faisant donc plus facilement.

Ainsi, l'utilisation de TBAI comme catalyseur nous a permis d'optimiser cette étape et d'obtenir le produit **21** avec un très bon rendement (87%), dans des conditions plus douces (température ambiante) tout en diminuant la quantité d'hydrure de sodium engagée et le temps de réaction.

Notons que lors du premier essai qui ne nous a offert que 19% de produit trialkylé 21, il a été possible d'isoler et de caractériser complètement l'intermédiaire dialkylé 23 présentant un groupement alcool non fonctionnalisé (**Figure 25**). Il est obtenu avec un rendement de 25%, ce qui en fait le produit majoritaire de la réaction dans ces conditions. Des monocristaux ont été obtenus par cristallisation dans un mélange dichlorométhane/diéthyléther. Sa structure cristallographique à l'état solide a été résolue par diffraction des rayons X (**Figure 25**).

Chaque bipyridine est plane et de conformation *trans*, les plans formés par les deux bras 6-bromo-2,2'-bipyridine sont parallèles et présentent une distance moyenne de 4,768 Å entre eux, ce qui ne peut conduire qu'à des interactions π – π faibles. Il est à noter que la fonction hydroxyle libre pointe vers l'atome d'azote N19, une interaction a lieu entre le doublet non liant de ce dernier et l'atome d'hydrogène H18 de l'alcool et donne ainsi naissance à une

-

¹²¹ (a) Fedorynski, M.; Wojciechowski, K.; Matacz, Z.; Makosza, M. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4682. (b) Cohen, R. J.; Fox, D. L.; Eubank, J. F.; Salvatore, R. N. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8617.

liaison hydrogène (distance $_{N19\text{-H}18} = 2,084$ Å). Cette interaction intramoléculaire relativement forte peut vraisemblablement être à l'origine de la réactivité réduite de la troisième fonction hydroxyle du Tris défavorisant ainsi la formation du produit trialkylé **21** lors de son alkylation dans des conditions non optimales.

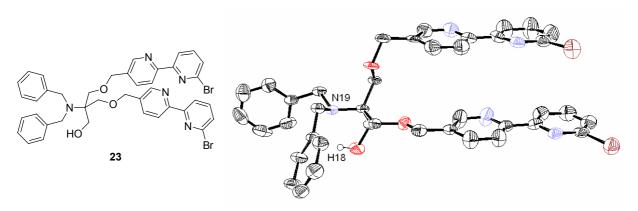


Figure 25. Structure cristalline de l'intermédiaire dialkylé **23** à l'état solide (vue ORTEP). Les atomes de carbone sont représentés en noir, les atomes d'azote en bleu, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes de brome en marron et les atomes d'hydrogène, à l'exception de H18, ont été omis pour plus de clarté.

L'introduction des trois fonctions ester se fait par une étape de carboalkoxylation (**Schéma 16**), cette fois en présence de 1,2-dichloroéthane. Ce dernier aide à la solubilisation du produit de départ **21** tout en permettant de chauffer le mélange réactionnel à 70°C, son point d'ébullition étant supérieur à 80°C. Après une première chromatographie sur colonne d'alumine, les fractions contenant le produit **22** renferment également de l'oxyde de triphénylphosphine. Pour s'en débarrasser efficacement, une méthode de purification additionnelle a été mise au point. L'ensemble des fractions organiques contenant le produit impur est extrait avec deux portions d'acide chlorhydrique 3N, le produit **22** est protoné et passe dans la phase aqueuse alors que l'oxyde de triphénylphosphine reste dans la phase organique. La phase aqueuse acide est ensuite neutralisée avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium dans l'eau, ce qui permet de régénérer le produit sous sa forme native et de l'extraire au dichlorométhane. Cette méthode est bien plus rapide, directe et efficace qu'une succession de chromatographies sur colonne. Le triester **22** est ainsi obtenu avec un excellent rendement de 81%.

Enfin, la saponification du triester **22** nous permet d'obtenir efficacement le ligand sous la forme d'un chlorhydrate hydraté L⁴H₃·4HCl·H₂O avec un rendement de 65% (**Schéma 16**).

Le rendement global de la formation de L^4H_3 en trois étapes à partir du Tris dibenzylé **20** est de 46%.

4.2.2. Synthèse des complexes.

Les complexes d'europium, de terbium et de gadolinium(III) du ligand L⁴H₃ ont été préparés. Après avoir solubilisé le ligand dans un mélange méthanol/eau en abaissant le pH à 1-2 avec une solution d'acide chlorhydrique diluée, une solution contenant le précurseur de lanthanide (chlorure de lanthanide hexahydraté LnCl₃·6H₂O) est ajoutée et le mélange est chauffé à 60°C pendant une heure. Après refroidissement à température ambiante, la solution est neutralisée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5% dans l'eau, ce qui permet de déprotoner les trois acides carboxyliques (pK_a de l'ordre de 2,8) ainsi que les bipyridines elles-mêmes (pK_a de l'ordre de 5,2). La solution est concentrée sous pression réduite jusqu'à l'apparition d'un précipité. Du THF est alors ajouté pour compléter la précipitation du produit, qui est finalement isolé par centrifugation et séché sous vide. Les complexes sont ainsi obtenus avec des rendements de l'ordre de 80% sous forme d'hydrates de formule [LnL⁴]·nH₂O (Schéma 17), qui ont été caractérisés par spectrométrie de masse FAB⁺ et analyse élémentaire. Le nombre n de molécules d'eau à l'état solide est donné par l'analyse élémentaire (Tableau 15).

Schéma 17. Synthèse des complexes [LnL⁴]·nH₂O (Ln=Eu, Tb, Gd).

Tableau 15. Nombre n de molécules d'eau à l'état solide et rendements de formation des complexes [LnL⁴]·nH₂O.

Lanthanide	n	Rendement (%)
Eu	3	85
Tb	2	78
Gd	4	79

4.2.3. Déprotection du Tris.

Une fois la poche de chélation établie, la déprotection de l'amine doit être faisable dans des conditions sélectives et douces vis-à-vis du reste de la molécule. Pour ce faire, une réaction d'hydrogénation catalytique semble tout particulièrement adaptée. Nous avons tout d'abord testé cette étape sur le Tris dibenzylé 20 dans des conditions classiques mettant en jeu une catalyse par du palladium sur charbon sous pression de dihydrogène dans de l'éthanol dégazé à température ambiante (Schéma 18).

Schéma 18. Hydrogénation catalytique du Tris dibenzylé 20.

Cette méthode permet de déprotéger efficacement le composé **20** en formant le Tris libre **19** par déplacement des deux groupements benzyles. Différentes conditions d'hydrogénation catalytique ont ensuite été testées sur le triester **22** et le ligand **L**⁴H₃ (**Schéma 19**).

Schéma 19. Essai de déprotection du triester 22 ou du triacide L⁴H₃.

La pression de dihydrogène, la nature du catalyseur ainsi que la température de réaction sont les paramètres sur lesquels nous sommes intervenus (**Tableau 16**). Quelques soient les conditions employées en partant du triester **22**, seul le produit de départ n'ayant pas réagi est isolé en fin de réaction, et ce même dans les conditions les plus dures (pression de H₂ et température élevées). L'ajout de quelques gouttes de dichlorométhane pour s'assurer de la

solubilisation complète du substrat de départ aussi bien que la présence d'acide chlorhydrique dilué n'améliore en rien la réaction. Un essai conduit sur le ligand L⁴H₃ dans des conditions similaires ne fournit que le triacide de départ.

Tableau 16. Essais d'hydrogénation catalytique dans de l'éthanol dégazé.

Substrat	Pression H ₂	Catalyseur	Température (°C)	Réaction
	(bar)			
22	1	Pd/C 10%	t.a.	-
	1	Pd/C 10%	40	-
	50	Pd/C 5%	t.a.	-
	50	Pd/C 10%	t.a.	-
	50	Pd/C 10%	40	-
	60	Pd(OH) ₂ /C 20%	t.a.	-
L^4H_3	60	Pd/C 10%	t.a.	-

La source d'hydrogène a été modifiée en utilisant du formiate d'ammonium en présence de Pd/C à 10% dans de l'éthanol à reflux, ce qui conduit au même résultat (recyclage du produit de départ).

Sans l'aide d'investigations complémentaires, deux justifications *a priori* antinomiques peuvent être énoncées. D'une part une très forte affinité du substrat, en particulier de ses fragments bipyridiniques, avec le catalyseur de palladium peut conduire à sa désactivation et être à l'origine des difficultés de déprotection observées. D'autre part, l'encombrement stérique provenant des trois bras bipyridine peut conduire à une approche difficile voire impossible du substrat vers la surface du catalyseur et donc à l'inertie exceptionnelle des groupements benzyles observée sur cette série de composés.

4.2.4. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques du ligand L^4H_3 et de ses complexes d'europium et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée. Le tampon choisi est le tampon Tris/HCl à 0,01 M (pH = 7,0). Les spectres d'absorption UV-visible, d'émission et d'excitation du ligand et des complexes ont été mesurés à des concentrations comprises entre 10^{-4} et 10^{-5} mol.L⁻¹. Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante (300 K).

4.2.4.1. Ligand L^4H_3 « Tris-bipyridine ».

Le spectre d'absorption UV-visible du ligand L^4H_3 présente des bandes intenses attribuées aux transitions $\pi \to \pi^*$ centrées principalement sur les bipyridines. Les maxima d'absorption sont situés à 290 et 242 nm, et les coefficients d'absorption molaire associés sont de 32800 et 27600 M^{-1} .cm⁻¹ (**Figure 26**). Ces valeurs sont en accord avec celles correspondant à d'autres ligands comportant des chromophores de type bipyridine-carboxylate. 85,122

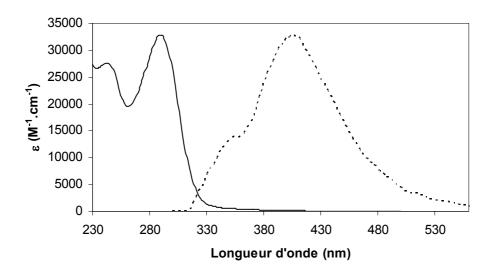


Figure 26. Spectres d'absorption (—) et d'émission (---, λ_{exc} =290 nm) du ligand L^4H_3 (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le spectre d'émission du ligand **L**⁴H₃, mesuré pour une excitation à la longueur d'onde de la bande d'absorption de plus faible énergie (290 nm, 34500 cm⁻¹), présente une large bande de luminescence à 405 nm (24700 cm⁻¹) avec un épaulement à 355 nm (28200 cm⁻¹) (**Figure 26**). Lorsqu'un délai suffisant (40 μs) est imposé, il n'y a plus de luminescence résiduelle du ligand. Notons qu'en solution aqueuse à pH 7,45, la bande de fluorescence de la 6-carboxy-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **9** présente un maximum à 344 nm (29050 cm⁻¹). ¹¹³

Le spectre d'excitation du ligand L^4H_3 , enregistré pour une émission à 410 nm, présente deux maxima à 250 et 290 nm (40000 et 34500 cm⁻¹ respectivement), en bonne concordance avec ceux du spectre d'absorption. Le même résultat est obtenu pour une émission à 347 nm.

¹²² (a) Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F.; Cesario, M.; Prangé, T.; Guardigli, M.; Roda, A.; Nierengarten, H. *J. Supramol. Chem.* **2003**, *15*, 277. (b) Bünzli, J.-C.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 1917.

4.2.4.2. Complexe d'europium [EuL⁴].

Absorption, émission et excitation.

La complexation du cation Eu^{3+} par le ligand est mise en évidence par spectroscopie UV-visible et se traduit notamment par un déplacement bathochrome de 10 à 20 nm de la bande d'absorption de plus faible énergie. En effet, la participation des chromophores à la complexation induit un changement de conformation des bipyridines, qui passent d'une conformation *trans* à une conformation *cis*. Dans cet exemple, la bande d'absorption de plus faible énergie passe de 290 nm pour le ligand libre L^4H_3 à 305 nm pour le complexe $[EuL^4]$, le déplacement vers les faibles énergies est donc significatif ($\Delta E = 1700 \text{ cm}^{-1}$) et est accompagné par un effet hypochrome et un élargissement des bandes, le coefficient d'absorption molaire passant de 32800 M^{-1} .cm⁻¹ pour le ligand libre L^4H_3 à 23400 M^{-1} .cm⁻¹ pour le complexe $[EuL^4]$ (**Figure 27**).

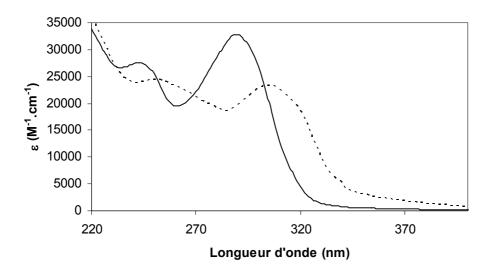


Figure 27. Spectres d'absorption du ligand L^4H_3 (—) et de son complexe d'europium [Eu L^4] (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le spectre d'émission du complexe d'europium (**Figure 28**) est obtenu après excitation à la longueur d'onde de la bande d'absorption de plus faible énergie (305 nm, 32800 cm⁻¹). Les bandes d'émission observées sont caractéristiques du cation europium(III) et s'étendent sur une plage allant de 580 à 720 nm. Elles sont attribuées aux transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ (J = 0-4).

-

¹²³ (a) Westheimer, F. H.; Benfey, O. T. J. Am. Chem. Soc. **1956**, 78, 5309. (b) Nakamoto, J. J. Phys. Chem. **1960**, 64, 1420.

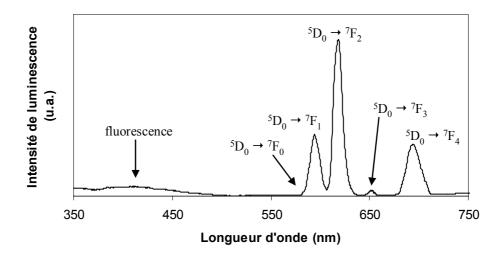


Figure 28. Spectre d'émission ($\lambda_{exc.}$ =305 nm) du complexe d'europium [EuL⁴] (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ n'est pas discernable ici car elle est d'intensité trop faible et est masquée par le pied de la bande de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ aux alentours de 580 nm. La bande d'émission la plus intense correspondant à la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ est centrée à 619 nm (émission dans le rouge). Notons également la présence d'une large bande d'émission autour de 405 nm d'intensité non négligeable, pouvant résulter de la fluorescence aussi bien du ligand au sein du complexe [EuL⁴] que du ligand partiellement ou totalement décomplexé. Lorsqu'un délai suffisant est appliqué lors de la mesure, la bande de fluorescence à 405 nm disparaît alors que la luminescence de l'europium reste inchangée. S'il s'agit de fluorescence à partir du complexe intègre, cela constitue le signe avant-coureur d'un croisement intersystème ${}^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$ non optimal et d'un mauvais transfert d'énergie entre le ligand et le métal. En effet, une partie de l'énergie absorbée par le ligand est réémise directement par fluorescence et donc perdue avant que le croisement intersystème et le transfert du ligand vers le métal n'aient eu lieu.

Le spectre d'excitation représente les variations de l'intensité d'émission à une longueur d'onde imposée en fonction de la longueur d'onde d'excitation. La longueur d'onde choisie correspond à la bande d'émission la plus intense située à 619 nm pour le complexe [EuL⁴] (transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$). Dans ce cas le maximum d'excitation se trouve à 309 nm alors que le maximum d'absorption est situé à 305 nm (**Figure 29**). Les spectres d'absorption et d'émission se recouvrent largement, ce qui indique que la luminescence observée à partir du cation Eu³⁺ résulte bien d'un transfert d'énergie du ligand vers le lanthanide. 36

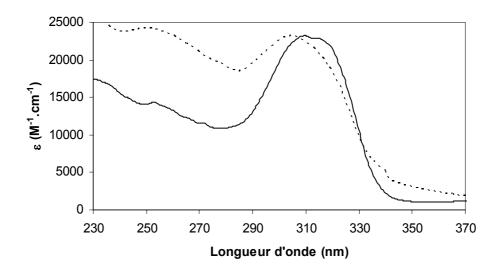


Figure 29. Spectres d'absorption (—) et d'excitation (---, $\lambda_{\text{\'em.}}$ =617 nm) du complexe d'europium [EuL⁴] (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Durées de vie de luminescence.

L'examen des durées de vie de luminescence permet de juger de la capacité d'un ligand à accommoder un cation lanthanide en l'isolant du milieu environnant. La désactivation des états excités d'un lanthanide trivalent est rendue possible par des transferts d'énergie vibrationnelle impliquant des molécules de solvant et/ou le ligand. Les oscillateurs O-H, présents par exemple dans les molécules d'eau coordinées, sont les désactivateurs les plus efficaces et conduisent à une relaxation non radiative du lanthanide, aussi bien à l'état solide qu'en solution. Le dépeuplement des états excités du lanthanide est moins efficace avec les oscillateurs N-H, C-H et C=O *via* leurs harmoniques de vibration d'élongation. 42

De manière générale, les désactivations vibrationnelles sont rendues peu efficaces lorsque les oscillateurs O-H sont remplacés par des oscillateurs O-D. Dans le cas de l'europium qui bénéficie d'un effet isotopique important, le couplage a lieu avec l'état vibrationnel v = 4 pour un oscillateur O-H et v = 5 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 5 mis en jeu pour un oscillateur O-H et v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscillateur O-D. Dans le cas du terbium, l'état vibrationnel v = 6 ou v = 7 pour un oscill

contribution des oscillateurs O-H en seconde sphère de coordination permettent de déterminer le nombre $q_{\rm H2O}$ de molécules d'eau coordinées au lanthanide (incertitude \pm 0,3-0,5) à partir des durées de vie de luminescence dans $\rm H_2O$ et $\rm D_2O$ (Équation 6 et Tableau 17).

$$q_{\text{H2O}} = \mathbf{A} \times \left(\frac{1}{\mathbf{\tau}_{\text{H2O}}} - \frac{1}{\mathbf{\tau}_{\text{D2O}}} - \mathbf{B} \right)$$

Équation 6. Formule générale donnant le nombre n de molécules d'eau coordinées en première sphère du lanthanide.

Tableau 17. Constantes utiles pour appliquer l'Équation 6 à un complexe d'Eu³⁺ ou de Tb³⁺.

Auteurs	Eu		Т	Tb .
	A	В	A	В
Horrocks et Sudnick ⁴¹	1,05	-	4,2	-
Parker et al. 42	1,2	0,25	5	0,06
Horrocks et Supkowski ⁴³	1,11	0,31	-	-

Une décroissance de luminescence monoexponentielle va conduire à une valeur unique de durée de vie τ correspondant à la présence d'une seule espèce en solution. Dans notre exemple, la luminescence du complexe $[EuL^4]$ présente une décroissance biexponentielle dans l'eau à température ambiante, ce qui tend à révéler la présence de deux espèces au moins en solution, alors qu'une seule durée de vie est trouvée dans l'eau lourde (**Tableau 18**).

Tableau 18. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence du complexe [EuL⁴]. Les facteurs préexponentiels sont indiqués entre parenthèses.

τ ^{300K} (ms)		Φ^{30}	^{0K} (%)
H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
1,23 (479) 0,27 (1422)	1,65	1,2	2,6

Ainsi l'application de l'**Équation 6** à l'espèce présentant la durée de vie la plus élevée dans l'eau révèle l'absence de molécule d'eau coordinée à l'europium. Le ligand nonadentate **L**⁴H₃ sature donc bien la première sphère de coordination du cation, reléguant les molécules d'eau aux sphères externes. La deuxième espèce présente quant à elle 3,3 molécules d'eau coordinées en moyenne (**Tableau 19**), ce qui peut vraisemblablement résulter du déplacement d'un bras bipyridine-carboxylate dans ces conditions de dilution du complexe en solution aqueuse (4,6.10⁻⁵ mol.L⁻¹). Le motif tridentate est alors remplacé par trois molécules d'eau en

première sphère de coordination de l'europium, d'où un temps de vie amoindri et l'apparition de la bande de fluorescence due au ligand déplacé sur le spectre d'émission du complexe. La comparaison des facteurs préexponentiels associés aux deux durées de vie tend à montrer que l'espèce partiellement décomplexée est majoritaire en solution.

Tableau 19. Calcul du nombre de molécules d'eau coordinées au complexe [EuL⁴] avec $\tau_{\text{H2O}} = 0,27$ ms (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

	$q_{_{ m H2O}}$	
Horrocks et Sudnick ⁴¹	Parker et al. 42	Horrocks et Supkowski ⁴³
3,3	3,4	3,1

Rendements quantiques de luminescence.

D'après la procédure décrite par Haas et Stein, 124 le rendement quantique inconnu Φ est fonction de l'indice de réfraction du milieu, de la surface sous le spectre d'émission et de l'absorbance de chacun des deux composés (**Équation 7**).

$$\frac{\Phi}{\Phi_{\text{réf.}}} = \frac{n^2}{n_{\text{réf.}}^2} \times \frac{S}{S_{\text{réf.}}} \times \frac{1 - 10^{-A_{\text{réf.}}}}{1 - 10^{-A}} \times \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda, \text{réf.}}^0}$$

Équation 7. Calcul du rendement quantique Φ en fonction de l'indice de réfraction n du milieu, de la surface S de luminescence corrigée, de l'absorbance A et de l'intensité incidente à la longueur d'onde λ I_{λ}^{0} de l'échantillon et du composé de référence.

$$\mathbf{A}_{\lambda} = \log \frac{\mathbf{I}_{\lambda}^{0}}{\mathbf{I}_{\lambda}} = \varepsilon(\lambda) \times l \times c$$

Équation 8. Loi de Beer-Lambert.

L'absorbance (A), donnée par la loi de Beer-Lambert (Équation 8), est dépendante de la longueur d'onde λ et est fonction du coefficient d'absorption molaire $\epsilon(\lambda)$ à cette longueur d'onde, de la longueur de la cuve l et de la concentration c du composé. Les aires de luminescence, corrigées par la fonction de correction du spectromètre, sont calculées à partir des spectres d'émission des deux composés, qui doivent impérativement être enregistrés dans des conditions expérimentales identiques (fentes des monochromateurs, voltage du photomultiplicateur, filtres, température...). Lorsque les solutions sont suffisamment diluées

_

¹²⁴ Haas, Y.; Stein, G. J. Phys. Chem. 1971, 75, 3668.

(A < 0,05), le dernier terme de l'équation peut être approximé au rapport des absorbances des deux composés (**Équation 9**).

$$\frac{\Phi}{\Phi_{\text{ref.}}} = \frac{n^2}{n_{\text{ref.}}^2} \times \frac{S}{S_{\text{ref.}}} \times \frac{A_{\text{ref.}}}{A}$$

Équation 9. Calcul du rendement quantique Φ lorsque A < 0,05.

Ces équations restent valides lorsque les composés ne sont pas excités à la même longueur d'onde, dans la mesure où l'appareillage corrige efficacement la dépendance à la longueur d'onde de l'intensité de la lampe et de l'efficacité du monochromateur d'excitation. Dans ce cas, le rapport $I_{\lambda}^{0}/I_{\lambda, {\rm réf.}}^{0}$ est égal à un. Notons que la précision des rendements quantiques obtenus de cette manière ne dépasse pas 5 à 10%, à cause de petites erreurs additives liées à la mesure des absorbances, aux facteurs de correction du système de détection et du rendement quantique de la référence. 125

Le composé de référence choisi diffère selon le lanthanide étudié (**Tableau 20**). Ainsi, le dichlorure de ruthénium *tris*-bipyridine dans de l'eau non dégazée¹²⁶ est utilisé comme référence pour les complexes d'europium, alors que la rhodamine 6G dans de l'éthanol¹²⁷ est adapté aux complexes de terbium. Notons que dans ce dernier cas le sulfate de quinine dans de l'acide sulfurique 1N est souvent employé. ¹²⁸

Tableau 20. Nature et propriétés des composés de référence utilisés.

Composé	Solvant	n	Φ ^{300K} (%)	Référence
Ru(bpy) ₃ Cl ₂	H ₂ O	1,333	2,8	126
Rhodamine 6G	EtOH	1,361	88	127

Comme l'indique le **Tableau 18**, le rendement quantique de [EuL⁴] est relativement faible dans l'eau à température ambiante (1,2%). Cette valeur est doublée dans l'eau lourde (2,6%) mais reste peu élevée et tend à indiquer la contribution importante de voies de désactivations non radiatives autres que les désactivations vibrationnelles liées à la présence de molécules de solvant coordinées ou encore un mauvais transfert d'énergie du ligand vers le métal.

¹²⁸ Meech, S. R.; Phillips, D. J. Photochem. **1983**, 23, 193.

¹²⁵ Valeur, B. In *Molecular Fluorescence*; Wiley: Weinheim, 2002; p 161.

¹²⁶ Nakamaru, K. Bull. Chem. Soc. Jpn. **1982**, 55, 2697.

¹²⁷ Olmsted, J., III J. Phys. Chem. **1979**, 83, 2581.

4.2.4.3. Complexe de terbium [TbL⁴].

La complexation du cation terbium(III) par le ligand L^4H_3 se traduit par un déplacement bathochrome de 290 à 303 nm de la bande d'absorption de plus basse énergie. Le déplacement hypochrome est plus important que dans le cas du complexe d'europium, le coefficient d'absorption molaire du complexe de terbium [TbL⁴] étant de 20800 M⁻¹.cm⁻¹ (**Figure 30**).

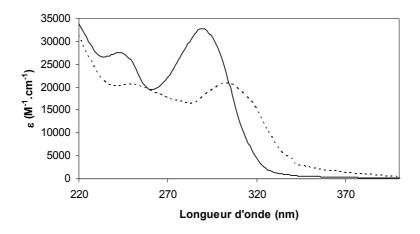


Figure 30. Spectres d'absorption du ligand L^4H_3 (—) et de son complexe de terbium $[TbL^4]$ (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le spectre d'émission du complexe de terbium (**Figure 28**) s'étend de 480 à 635 nm et présente les bandes d'émission caractéristiques du terbium(III) associées aux transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ (J = 3-6). La bande d'émission la plus intense se trouve à 547 nm et correspond à la transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ (émission dans le vert), les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_0$, ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_1$ et ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_2$ ne sont quant à elles pas visibles.

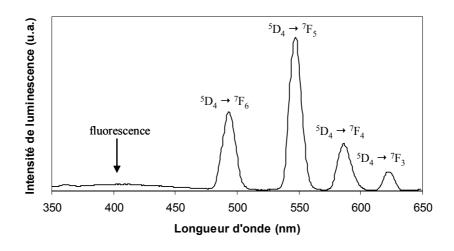


Figure 31. Spectre d'émission ($\lambda_{exc.}$ =322 nm) du complexe de terbium [TbL⁴] (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

A nouveau nous pouvons observer une large bande d'émission peu intense autour de 405 nm, provenant de la luminescence du ligand au sein du complexe [TbL⁴]. Lorsqu'un délai de 40 µs est appliqué lors de la mesure, cette bande d'émission disparaît.

Le spectre d'excitation du complexe [TbL⁴] obtenu pour une émission à 547 nm (transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$) présente un maximum à 309 nm (32360 cm⁻¹) et est en bonne adéquation avec le spectre d'absorption (**Figure 32**). Cela signifie que la luminescence provenant du cation Tb³⁺ est bien due à un transfert d'énergie du ligand vers le métal.

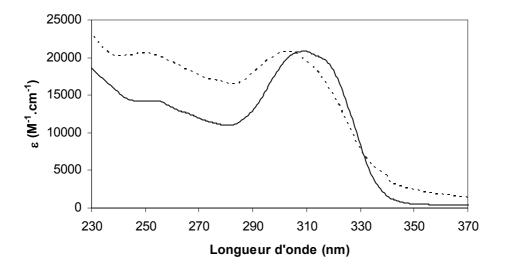


Figure 32. Spectres d'absorption (—) et d'excitation (---, $\lambda_{\text{exc.}}$ =547 nm) du complexe de terbium [TbL⁴] (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Les durées de vie de luminescence mesurées dans l'eau et l'eau lourde sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le complexe d'europium (**Tableau 21**).

Tableau 21. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence du complexe [TbL⁴]. Les facteurs préexponentiels sont indiqués entre parenthèses.

τ ^{300K} (ms)	Φ^{30}	^{0K} (%)	
H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
1,13 (984) 0,26 (1149)	1,70	0,3	1,1

A nouveau, deux durées de vie sont mesurées dans l'eau, d'où l'existence d'au moins deux espèces en solution. D'après les valeurs dans H₂O et D₂O, l'espèce avec la durée de vie la plus élevée présente en moyenne 1,2 molécule d'eau coordinée au terbium, alors que le complexe d'europium n'en possédait pas. La seconde espèce avec le temps de vie très court (0,26 ms) doit résulter de la décomplexation partielle ou totale du ligand dans ce domaine de

dilution (4,7.10⁻⁵ mol.L⁻¹). Il faut garder à l'esprit que le transfert en retour, probable dans le cas du terbium, peut conduire à fausser le calcul du nombre de molécules d'eau coordinées en première sphère du cation.

Le rendement quantique du complexe de terbium est de 0,3% dans l'eau et de 1,1% dans l'eau lourde à température ambiante. Ces valeurs sont bien en deçà de celles trouvées pour le complexe d'europium (1,2 et 2,6% dans H_2O et D_2O respectivement), alors que les désactivations vibrationnelles causées par les molécules d'eau coordinées sont moins efficaces dans le cas du terbium. La qualité du croisement intersystème ${}^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$ et du transfert d'énergie du ligand vers le métal peuvent également avoir des répercussions profondes sur la valeur du rendement quantique du complexe.

D'autres processus de relaxation doivent donc être considérés pour expliquer les valeurs peu élevées des rendement quantiques de [TbL⁴], comme le transfert d'énergie en retour du métal vers le ligand, qui est souvent le mode de désactivation non radiatif le plus important pour les complexes de terbium. En effet Latva et *al*.¹² ont déterminé que lorsque l'état triplet de plus faible énergie du ligand est trop proche de l'état émetteur ⁵D₄ du terbium (écart inférieur à 1850 cm⁻¹), le transfert en retour devient prépondérant et conduit à la diminution de l'intensité de luminescence, donc du rendement quantique.

4.2.4.4. Conclusion.

Tableau 22. Propriétés d'absorption du ligand L^4H_3 et de ses complexes $[EuL^4]$ et $[TbL^4]$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_{\text{max}} (M^{-1}.\text{cm}^{-1})$
L^4H_3	290	32800
	242	27600
[EuL ⁴]	305	23400
	251	24400
$[\mathrm{TbL}^4]$	303	20900
	250	20600

Les propriétés photo-physiques du ligand L⁴H₃, de son complexe d'europium [EuL⁴] et de terbium [TbL⁴] sont récapitulées ici. Tout d'abord les composés présentent des propriétés

d'absorption caractéristiques des ligands avec des chromophores de type bipyridinecarboxylate, à savoir des maxima d'absorption proches de 300 nm avec des coefficients d'absorption molaire élevés (Tableau 22).

Tableau 23. Durées de vie, rendements quantiques de luminescence et nombre de molécules d'eau coordinées

des complexes [EuL4] et [TbL4]

Complexe	$\tau^{300K} (ms)$		Ф ^{300К} (%)		$q_{ m _{H2O}}$	
	Н	I_2O	D_2O	H ₂ O	D_2O	
[EuL ⁴]	1,23 (479)	0,27 (1422)	1,65	1,2	2,6	0
$[\mathrm{Tb}\mathbf{L^4}]$	1,13 (984)	0,26 (1149)	1,70	0,3	1,1	1,2

Malgré des temps de vie appréciables (supérieurs à la milliseconde) dans l'eau à température ambiante, les complexes d'europium et de terbium pâtissent principalement de leurs rendements quantiques peu élevés (Tableau 23). D'après le nombre de molécules d'eau coordinées, le ligand nonadentate L⁴H₃ permet de saturer totalement la sphère de coordination du lanthanide, mais l'espèce correspondante n'est pas majoritaire en solution (voir les facteurs préexponentiels dans le Tableau 23). En effet, un équilibre entre cette forme, une espèce luminescente partiellement décomplexée (un bras tridentate remplacé par trois molécules d'eau dans le cas de l'europium) et l'ion libre non luminescent (résultant de la dissociation totale du complexe) est fortement envisageable à ces concentrations. Le rendement quantique mesuré dans H₂O ou D₂O n'en est que réduit.

4.3. Ligand Tris-pyridine.

Grâce aux trois fonctions alcool du squelette Tris benzylé 20, nous pouvons modifier à façon la nature des bras coordinants en nous appuyant sur la même séquence réactionnelle (alkylation, carboalkoxylation et hydrolyse) pour obtenir de nouveaux ligands. Nous avons décidé d'étendre cette étude en remplaçant le motif bipyridine-carboxylate par un motif pyridine-carboxylate comme représenté sur la Figure 33. Le fragment pyridine-carboxylate étant de nature bidentate, nous allons éprouver la capacité de la nouvelle poche de chélation à accommoder un cation lanthanide en faisant participer les ponts oxygénés porteurs des trois bras coordinants. Dans ce cas, le ligand serait capable de compléter la première sphère de coordination du lanthanide en atteignant un nombre de coordination de 9.

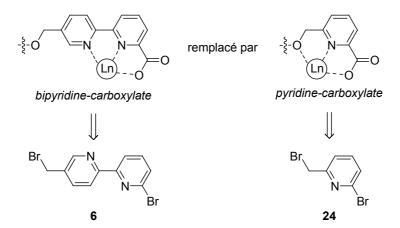


Figure 33. Motifs bipyridine- et pyridine-carboxylate coordinés à un cation lanthanide Ln³⁺, ainsi que leurs précurseurs respectifs, **6** et **24**.

Comme la 6-bromo-5'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 6 nous donnait auparavant accès au motif bipyridine-carboxylate, la 2-bromo-6-bromométhylpyridine 24 va maintenant être le précurseur de choix pour incorporer le motif pyridine-carboxylate au ligand L⁵H₃ (**Figure** 33).

4.3.1. Synthèse du ligand L⁵H₃ « Tris-pyridine ».

La bromation radicalaire¹²⁹ de la 2-bromo-6-méthylpyridine **25**¹³⁰ nous fournit la 2-bromo-6-bromométhylpyridine **24** avec un bon rendement (67%). Notons que le sous-produit dibromé **26** est minoritaire (14%) et que la 6-méthylpyridine **25** de départ est récupérée à hauteur de 19% et recyclée (**Schéma 20**).

Schéma 20. Réaction de bromation radicalaire à partir de la 2-bromo-6-méthylpyridine 25.

Cette fois-ci la réaction est menée dans un milieu biphasique porté à reflux par irradiation avec une lampe halogène de 150 W. En effet l'eau est un solvant adapté aux réactions radicalaires car elle tolère la présence de radicaux qui ne permettent pas une rupture homolytique de la liaison O-H (énergie de rupture = 463 kJ.mol⁻¹). La solubilité réduite des

-

¹²⁹ Bedel, S.; Ulrich, G.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1697.

¹³⁰ Adams, R.; Miyano, S. J. Am. Chem. Soc. **1954**, 76, 3168.

composés organiques dans l'eau a conduit les auteurs à envisager l'utilisation de systèmes biphasiques (tétrachlorure de carbone/eau, benzène/eau ou dichlorométhane/eau). Ce dernier système constitue dans notre cas un bon compromis en conduisant à une bonne sélectivité et à une conversion élevée. Lorsque la source de brome (NBS) est remplacée par du dibrome, la sélectivité est plus élevée, le temps de réaction est diminué et il n'y a pas de succinimide à éliminer en fin de réaction. Cette alternative conduit par contre à une conversion moins élevée (72%).

Schéma 21. Synthèse du ligand L⁵H₃.

L'étape d'alkylation du dérivé Tris benzylé **20** se déroule comme auparavant dans un solvant aprotique anhydre, en présence d'hydrure de sodium et de 3,3 équivalents de 6-bromométhylpyridine **24** (**Schéma 21**).

Tableau 24. Optimisation des conditions opératoires pour la formation de 27.

Solvant	Catalyseur	NaH	Température	Temps (h)	Prod	uits (%)
		(éq.)	(°C)		27	29
THF	-	4,0	65	28	41	22
DMF	TBAI	4,5	t.a.	1	75	-

La réaction dans du THF à chaud ne fournit le produit trialkylé **27** qu'avec un rendement moyen (41%), alors que la simple présence d'une quantité catalytique de TBAI dans du DMF

permet d'élever le rendement à 75%. Dans ce cas, la température est abaissée à l'ambiante et la réaction est complète en une heure seulement (**Tableau 24**).

Lorsque la réaction est effectuée avec les conditions non optimales (THF, 65°C sans TBAI), l'intermédiaire dialkylé **29** est isolé à hauteur de 22% (**Figure 34**). Comme nous l'avons vu auparavant, l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'atome d'azote central et le proton de la fonction hydroxyle libre doit certainement conduire à une troisième alkylation difficile en l'absence de TBAI.

Figure 34. Structure de l'intermédiaire dialkylé 29.

Une réaction de carboéthoxylation douce (EtOH/Et₃N, 70°C), pourtant indiquée pour la conversion des 6-bromo-2,2'-bipyridines, n'est pas efficace dans le cas du substrat 27 présentant des terminaisons 2-bromopyridines. Il est nécessaire de mettre en œuvre des conditions opératoires plus dures en élevant la température de réaction, ce qui nécessite le changement des solvants utilisés. Le *n*-butanol et la base de Hünig permettent de chauffer le mélange réactionnel à 120°C. Comme décrit dans la littérature, la carbobutoxylation conduit à des temps de réaction plus élevés (20-96 heures), alors que la carboéthoxylation menée à 70°C ne requiert que 8 à 12 heures pour être complète. Lorsque cette méthode est appliquée au composé 27, le triester butylique 28 est difficile à purifier et n'est isolé qu'avec un rendement de 44% après chromatographie sur colonne de silice (Schéma 21).

Pour contourner les limitations de l'étape d'introduction des fonctions esters par carbobutoxylation, nous avons tenté d'alkyler directement le Tris dibenzylé **20** avec la 6-bromométhyl-2-carboéthoxypyridine **30**, qui présente l'avantage d'être substituée au préalable par une fonction ester en position 2 (**Schéma 22**).

Pour obtenir le composé **30**, la 2,6-diméthylpyridine (2,6-lutidine) est oxydée en acide 6-méthylpicolinique (2-carboxy-6-méthylpyridine) selon la méthode de Black et *al*. Après une estérification standard, le 6-méthylpicolinate d'éthyle obtenu est engagé dans une réaction de bromation radicalaire dans le benzène qui fournit la pyridine **30** avec un rendement de 34% (**Schéma 22**).

Schéma 22. Synthèse de la 6-bromométhyl-2-carboéthoxypyridine 30.

En faisant varier la nature de la base (NaH, 'BuOK), du solvant (THF, DMF) et des conditions opératoires (à température ambiante ou à chaud, avec ou sans catalyse au TBAI), nous n'avons obtenu que des mélanges complexes ne permettant pas d'isoler le triester éthylique 30 (Schéma 23). L'attaque privilégiée d'un alcoolate sur la fonction ester de la pyridine conduisant à sa transestérification est vraisemblable et peut entrer en concurrence avec la réaction désirée. Bien que prometteuse et plus directe, cette voie a été écartée de notre plan de synthèse, et nous nous en sommes tenus à la carboalkoxylation précédente qui, malgré un rendement modeste, nous fournit le triester butylique 28 en quantité suffisante.

Schéma 23. Essai d'alkylation du Tris avec la 6-bromométhyl-2-carboéthoxypyridine 30.

_

¹³¹ Black, G.; Depp, E.; Corson, B. B. J. Org. Chem. **1949**, 14, 14.

La saponification du triester **28** n'étant pas efficace dans des conditions classiques (NaOH, MeOH/H₂O, 70°C), nous avons opté pour une hydrolyse dans de l'acide chlorhydrique 6N à 60°C. Après cristallisation à basse température dans un mélange méthanol/diéthyléther, le ligand est isolé sous forme de chlorhydrate hydraté **L**⁵H₃·4HCl·2H₂O avec un rendement quantitatif (**Schéma 21**).

4.3.2. Déprotection du Tris.

Malgré les résultats préliminaires peu prometteurs obtenus lors des essais d'hydrogénation catalytique en série Tris-bipyridine, nous avons tenté l'étape de déprotection du groupement amino sur le triester butylique 28 (Schéma 24).

N COOⁿBu

H₂, Pd/C cat.

EtOH

$$déprotection$$
 COO^nBu
 COO^nBu
 COO^nBu
 COO^nBu
 COO^nBu

Schéma 24. Essai de déprotection du triester 28.

Tableau 25. Essais d'hydrogénation catalytique du triester 28 avec Pd/C à 5%.

Solvant	Pression H ₂ (bar)	Température (°C)	Réaction
Dioxanne	70	t.a.	-
Dioxanne	70	40	-
EtOH	70	40	✓

Différents solvants dégazés ont été expérimentés en présence de palladium sur charbon à 5% pendant une nuit (**Tableau 25**). Tout d'abord les essais menés dans du dioxanne n'ont pas permis la déprotection sous 70 bar de H₂, à température ambiante comme à 40°C. En milieu éthanolique, le déplacement des groupements benzyles est effectif mais une rupture concomitante et partielle des ponts éther est observée. Ces conditions rigoureuses rendent la

déprotection de l'amine possible mais ne sont pas compatibles avec les autres fonctionnalités présentes sur la molécule.

La nature des bras éther semble donc jouer un rôle critique dans l'étape d'hydrogénation catalytique. Dans des conditions dures, le substrat portant des bras bipyridine est inerte et est récupéré inchangé. Dans des conditions semblables, le substrat portant des bras pyridine est réactif, conduisant aussi bien à la perte des groupements benzyles que des ponts oxygénés. Le composé de départ est certes moins encombré en série Tris-pyridine qu'en série Tris-bipyridine, mais ce facteur ne doit pas être prépondérant car l'environnement de l'amine tertiaire est proche dans les deux cas. La différence principale de réactivité doit plutôt provenir de l'affinité amoindrie de la partie pyridinique pour le palladium, ce qui ne conduit plus à la désactivation du catalyseur comme dans le cas de la bipyridine et permet la débenzylation souhaitée.

En série Tris-pyridine, l'étape de déprotection est donc envisageable mais nécessite encore la mise au point de conditions plus douces tolérant les autres fonctions du substrat, ce qui n'a été prévu que dans le cas de complexes offrant des propriétés photo-physiques suffisamment intéressantes.

4.3.3. Propriétés photo-physiques.

Les complexes de lanthanides associés au ligand \mathbf{L}^5H_3 n'ont pas été isolés mais préparés *in situ*, c'est-à-dire en ajoutant des quantités équimolaires d'une solution aqueuse du sel de lanthanide (europium ou terbium) à une solution aqueuse du ligand. Les propriétés photophysiques des complexes ainsi formés ont été déterminées directement à partir de la solution obtenue. Les propriétés photo-physiques du ligand \mathbf{L}^5H_3 et de ses complexes d'europium et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

4.3.3.1. Ligand $L^5H_3 \ll Tris$ -pyridine ».

Le ligand L^5H_3 présente une bande d'absorption de plus faible énergie à 268 nm attribuée aux transitions $\pi \to \pi^*$ centrées sur les pyridines. Par comparaison avec le ligand L^4H_3 , le

maximum d'absorption de L⁵H₃ est déplacé de 2800 cm⁻¹ vers les hautes énergies, ce qui résulte du remplacement des bipyridines (ligand L⁴H₃) par des pyridines (ligand L⁵H₃), où la délocalisation électronique est moins étendue (**Figure 35**). Le coefficient d'absorption molaire est quant à lui plus faible (14600 M⁻¹.cm⁻¹), ce qui découle directement de la nature des chromophores (**Tableau 26**). En effet, le coefficient d'absorption molaire peut être évalué à 10900 M⁻¹.cm⁻¹ par bipyridine dans le ligand L⁴H₃ et à 4900 M⁻¹.cm⁻¹ par pyridine dans le ligand L⁵H₃. Ces valeurs sont concordantes avec le nombre double de noyaux pyridiniques dans L⁴H₃ (six noyaux répartis dans trois bipyridines) par rapport à L⁵H₃ (trois noyaux).

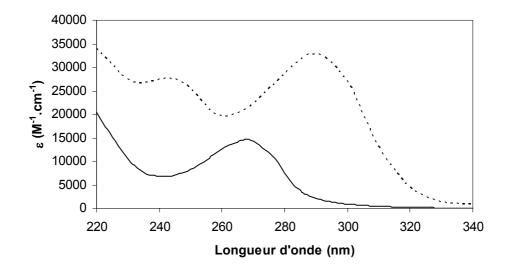


Figure 35. Spectres d'absorption du ligand L^4H_3 (---) et L^5H_3 (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Tableau 26. Propriétés d'absorption et d'émission des ligands L^4H_3 et L^5H_3 (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0)

Ligand	Abs	Absorption		Fluorescence	
	$\lambda_{max} (nm)$	$\varepsilon_{max} (M^{-1}.cm^{-1})$	$\lambda_{max} \ (nm)$	E (cm ⁻¹)	
L^4H_3	290	32800	405	24700	
	242	27600	355	28200	
L^5H_3	268	14600	350	28600	

Le spectre d'émission obtenu par excitation au maximum d'absorption (268 nm) présente une large bande à 350 nm avec un épaulement vers 300 nm (**Figure 36**). Avec un délai suffisant (40 μs), la luminescence du ligand disparaît, il s'agit donc bien de fluorescence à partir d'un état singulet du ligand situé aux alentours de 28600 cm⁻¹ (**Tableau 26**). L'écart de 3900 cm⁻¹ entre les positions des états émetteurs des ligands L⁴H₃ et L⁵H₃ provient également de la

nature des chromophores. La conjugaison plus vaste dans un motif bipyridine permet l'abaissement des ses états excités par rapport à une pyridine.

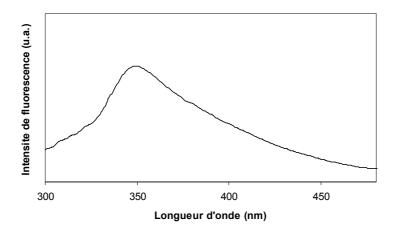


Figure 36. Spectre d'émission ($\lambda_{\text{exc.}}$ =268 nm) du ligand L⁵H₃ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Pour une longueur d'onde d'émission de 350 nm, le spectre d'excitation du ligand L^5H_3 révèle deux maxima à 238 et 284 nm (42000 et 35200 cm⁻¹ respectivement). Le maximum d'excitation est ainsi décalé de 2100 cm⁻¹ vers le rouge par rapport au maximum d'absorption.

4.3.3.2. Complexe $[EuL^5]$ et $[TbL^5]$.

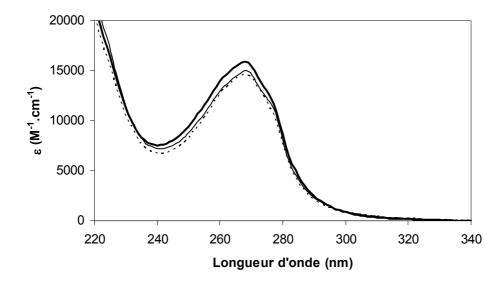


Figure 37. Spectres d'absorption du ligand L^5H_3 (---) et de ses complexes $[EuL^5]$ (—) et $[TbL^5]$ (—) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

La formation des complexes d'europium et de terbium [LnL⁵] ne conduit pas à un déplacement du maximum d'absorption, celui-ci étant toujours situé à 268 nm. Le déplacement bathochrome du maximum d'absorption lors de la complexation du ligand L⁴H₃ résultait du changement de conformation *trans-cis* des bipyridines, phénomène qui n'est évidemment plus envisageable pour le ligand L⁵H₃ basé sur des noyaux pyridiniques substitués. Un effet hyperchrome faible est cependant observé lors de la complexation (**Figure 37** et **Tableau 27**).

Tableau 27. Propriétés d'absorption du ligand L^5H_3 et de ses complexes $[EuL^5]$ et $[TbL^5]$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_{\text{max}} (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
L^5H_3	268	14600
[EuL ⁵]	268	15000
$[\mathrm{Tb}\mathbf{L^5}]$	268	15900

Les spectres d'émission des complexes [EuL⁵] et [TbL⁵] présentent les bandes d'émission caractéristiques de l'europium et du terbium(III), leurs maxima respectifs étant situés à 619 et 548 nm (**Figure 38**). Notons la présence d'une large bande de fluorescence autour de 350 nm d'intensité relativement faible, provenant du ligand au sein des complexes ou après décomplexation partielle ou totale. Celle-ci disparaît lorsqu'un délai suffisant est appliqué.

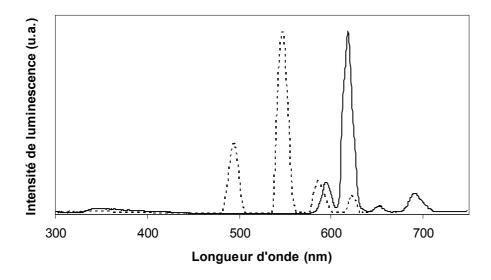


Figure 38. Spectres d'émission ($\lambda_{exc.}$ =268 nm) des complexes [Eu L^5] (—) et [Tb L^5] (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Sur l'exemple du complexe de terbium [TbL⁵], les spectres d'absorption et d'excitation coïncident pour chaque complexe, ce qui indique que la luminescence provenant d'un cation lanthanide donné résulte bien d'un transfert d'énergie du ligand vers le métal (**Figure 39**).

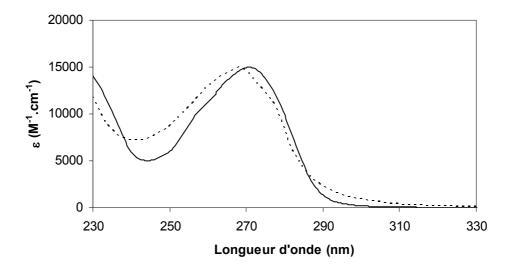


Figure 39. Spectres d'absorption (—) et d'excitation (---, $\lambda_{\text{exc.}}$ =547 nm) du complexe [TbL⁵] (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Les durées de vie de luminescence du complexe $[EuL^5]$ sont respectivement de 1,05 et 1,97 ms dans H_2O et D_2O à température ambiante (**Tableau 28**). Notons tout d'abord que la décroissance de luminescence est monoexponentielle, une seule durée de vie est donc mesurée ce qui révèle la présence d'une unique espèce en solution. Notons que les durées de vie et les rendements quantiques des complexes $[EuL^4]$ et $[EuL^5]$ sont du même ordre de grandeur dans H_2O et D_2O . Alors qu'elles sont légèrement plus faibles dans l'eau, les propriétés de $[EuL^5]$ dépassent celles de $[EuL^4]$ dans l'eau lourde.

Tableau 28. Durées de vie, rendements quantiques de luminescence et nombre de molécules d'eau coordinées des complexes [LnL⁵] et [LnL⁴] (Ln=Eu_Tb)

Complexe	τ ^{300K} (ms)	Φ^{300}	K (%)	$q_{\scriptscriptstyle ext{H2O}}$
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O	
[EuL ⁵]	1,05	1,97	1,3	9,3	0,3
$[TbL^5]$	1,79	2,01	1,6	12	0,2
$[EuL^4]$	1,23 0,27	1,65	1,2	2,6	0
$[\mathrm{Tb}\mathbf{L}^4]$	1,13 0,26	1,70	0,3	1,1	1,2

Les durées de vie mesurées nous permettent de calculer que le complexe [EuL⁵] possède en moyenne 0,3 molécule d'eau coordinées (**Tableau 29**). Ce résultat irait dans le sens d'une

participation effective des ponts oxygénés dans la complexation de l'europium(III). Chaque bras présentant une unité chélatante tridentate (O, N, COO), le ligand L⁵H₃ permettrait dans ce cas de saturer à lui seul la première sphère de coordination du lanthanide en l'isolant efficacement du milieu environnant, en particulier des molécules d'eau.

Tableau 29. Calcul du nombre de molécules d'eau coordinées aux complexes $[EuL^5]$ et $[TbL^5]$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Complexe	$q_{ m H2O}$				
	Horrocks et Sudnick ⁴¹	Parker et al. 42	Horrocks et Supkowski ⁴³		
[EuL ⁵]	0,5	0,2	0,1		
[Tb L ⁵]	0,3	0	-		

A température ambiante, le rendement quantique du complexe [EuL⁵] est de 1,3% dans l'eau et croît à 9,3% dans l'eau lourde (**Tableau 28**). Notons que les rendements quantiques mesurés dans D_2O restent inférieurs à 10%, ce qui laisse à penser que d'autres processus importants ne sont pas optimaux, comme le croisement intersystème ${}^1\pi\pi^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$ au sein du ligand ou le transfert d'énergie résonant du ligand vers l'ion coordiné.

Le complexe de terbium [TbL⁵] présente lui aussi une décroissance de luminescence monoexponentielle caractéristique d'une unique espèce en solution. Les valeurs de ses durées de vie dans H₂O et D₂O sont très élevées (de l'ordre de 2 ms) et supérieures à celles du complexe [TbL⁴] (**Tableau 28**). De la même manière, ses rendements quantiques de luminescence dans l'eau et l'eau lourde sont exaltés par rapport à [TbL⁴].

L'écart très important entre les valeurs des rendements quantiques mesurés dans H₂O et D₂O tend à montrer que la dissociation du complexe prend plus ou moins d'importance selon la concentration de la solution considérée. En effet, l'équilibre favorise la libération de l'ion lanthanide non luminescent dans une solution plus diluée (cas de l'eau) ou au contraire le complexe 1:1 luminescent dans une solution plus concentrée (cas de l'eau lourde). Notons qu'aucune espèce luminescente résultant d'une décomplexation partielle du ligand n'est observée en série Tris-pyridine.

4.3.3.3. Conclusion.

Les complexes en série Tris-bipyridine [LnL⁴] et Tris-pyridine [LnL⁵] présentent des propriétés spectroscopiques intéressantes, en particulier des durées de vie de luminescence supérieures à la milliseconde en solution aqueuse à température ambiante. Bien que les deux ligands peuvent isoler efficacement les cations lanthanides de leur milieu environnant, en particulier des molécules de solvant, les rendements quantiques restent inférieurs à 2% dans l'eau et ne dépassent pas 12% dans l'eau lourde, vraisemblablement à cause d'autres voies de désactivation non radiatives, de transferts d'énergie intramoléculaires peu efficaces (croisement intersystème, transfert ligand vers métal) ou encore d'échanges chimiques entre différentes espèces (décomplexation partielle ou totale du ligand). Le composé qui possède les meilleures caractéristiques ([TbL⁵]) présente un maximum d'absorption très haut en énergie, à 268 nm (37000 cm⁻¹), mais l'inconvénient majeur entravant leur utilisation en tant que marqueurs luminescents reste la déprotection ardue de la fonction de greffage potentielle (dibenzyle-amino). Des efforts supplémentaires pour mettre au point cette étape cruciale ou pour modifier en conséquence la nature du groupement protecteur pourraient nous conduire à nos fins. Nous avons cependant décidé de ne pas exploiter davantage ces familles de composés, sous l'impulsion de l'arrivée de nouveaux ligands dont la structure a été repensée en profondeur.

Chapitre III.

Ligands dérivés de l'acide aminomalonique et de l'acide glutamique.

Chapitre III. Ligands dérivés de l'acide aminomalonique et de l'acide glutamique.

Dans le chapitre précédent, nous avons examiné la synthèse et les propriétés de chélation de nouveaux ligands basés sur la bipyridine-carboxylate fonctionnalisée en position 5'. Les complexes obtenus présentaient des propriétés photo-physiques somme toute modestes dans l'eau, en particulier des rendements quantiques faibles malgré des durées de vie de luminescence supérieures à la milliseconde. De plus, les difficultés rencontrées pour générer facilement une fonction de greffage limitaient d'entrée de jeu le champ d'application de ces composés.

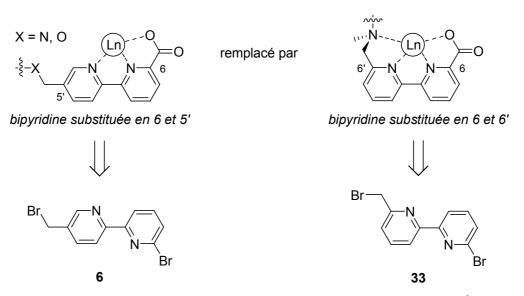


Figure 40. Bipyridines substituées en position 5' ou 6' coordinées à un cation lanthanide Ln³⁺, ainsi que leurs précurseurs respectifs, les bromométhyl-2,2'-bipyridines 6 et 33.

Dans le but de parer à ces points faibles, nous avons modifié la structure des ligands que nous allons exposer dans cette partie. Dans un premier temps, le remplacement d'une bipyridine-carboxylate substituée en 5' par une bipyridine-carboxylate substituée en 6' permet d'accroître le nombre de cycles chélates à cinq chaînons possibles lorsque le substituant est judicieusement choisi. Ainsi en fonctionnalisant le groupement méthyle porté par la bipyridine en position 6' par une fonction amino, trois cycles chélates très favorables peuvent être envisagés alors que seulement deux d'entre eux étaient accessibles dans le cas d'une substitution en postition 5' (**Figure 40**).

La nature du squelette a ensuite été choisie pour permettre la construction de la poche de chélation autour d'un groupement aminoacétate bidentate portant deux chromophores tridentates de type bipyridine-carboxylate, ce qui devrait conduire à un nombre de coordination de 8 après complexation. D'autre part, une fonction supplémentaire de type acide carboxylique non coordinée peut potentiellement nous donner accès à des esters activés en vue du greffage du complexe sur une molécule biologique. Une structure de type acide aminé portant une chaîne latérale de longueur variable terminée par un acide carboxylique semble donc être une alternative de choix dans la construction de ces nouveaux ligands. En pratique, le précurseur utile d'un acide aminé donné va être le chlorhydrate du diester d'alkyle (méthyle ou éthyle) correspondant (**Figure 41**).

Figure 41. Structures du précurseur utile et du squelette acide aminé associé (R=Me, Et; n=0, 2).

Notons que cette approche permet de tirer profit de la 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 33¹³² facilement synthétisée à l'échelle de plusieurs grammes sans avoir à modifier la stratégie de synthèse précédemment éprouvée avec succès (alkylation, carboalkoxylation, saponification).

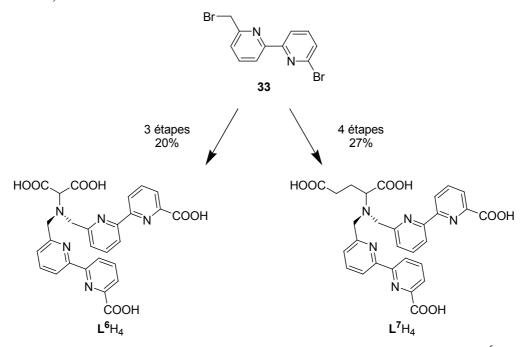


Figure 42. Structures de la 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine **33** et des ligands L^6H_4 (en série malonique) et L^7H_4 (en série glutamique).

¹³² Mameri, S.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F. Synthesis 2003, 17, 2713.

Nous allons tout d'abord présenter la synthèse de la 6'-bromométhyl-bipyridine $\bf 33$ et son incorporation dans de nouveaux ligands (**Figure 42**) dérivés de l'acide aminomalonique (ligand $\bf L^6H_4$) puis de l'acide glutamique (ligand $\bf L^7H_4$), ainsi que les propriétés photophysiques de complexes correspondants. Ce chapitre se conclura sur l'activation effective de la fonction de greffage en série glutamique.

1. La 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine.

La 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine **33** a été synthétisée selon la procédure décrite dans la littérature. La 2-amino-6-méthylpyridine commerciale est tout d'abord transformée en 2-bromo-6-méthylpyridine **25** par une réaction de Sandmeyer avec un rendement élevé (**Schéma 25**). Le dérivé lithié obtenu par métallation de **25** avec du *n*-butyllithium dans du THF à -78°C est mis à réagir avec du chlorure de tri-*n*-butylétain pour former la 2-tri-*n*-butylétain-6-méthylpyridine **31**, qui est extraite au diéthyléther après ajout d'eau au milieu réactionnel.

Schéma 25. Synthèse de la 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 33.

Contrairement à la 5'-méthyl-2,2'-bipyridine 2 obtenue selon la méthode de Kröhnke, l'étape clé de la formation de la 6'-méthyl-2,2'-bipyridine 32 est un couplage de Stille catalysé par du palladium(0) entre le dérivé de l'étain 31 et la 2,6-dibromopyridine commerciale 3. La réaction est conduite dans le toluène à 110°C sous une atmosphère d'argon, les produits organiques formés sont ensuite extraits sous forme protonée avec de l'acide chlorhydrique

-

¹³³ Jutzi, P.; Gilige, U. J. Organomet. Chem. **1983**, 246, 163.

6N, cette opération permet de les séparer efficacement des dérivés de l'étain résiduels ainsi que de la phosphine provenant du catalyseur. Après neutralisation, extraction et purification par chromatographie, la 6'-méthyl-2,2'-bipyridine **32** est isolée avec un rendement de 67%. Notons qu'une quantité non négligeable (7% environ) de 6,6''-diméthyl-2,2':6',2''-terpyridine est formée au cours de cette étape.

Une réaction de bromation radicalaire¹³² permet d'obtenir majoritairement le produit monobromé, la 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine **33**, avec un rendement proche de 50%, conformément à la distribution statistique attendue. Précisons que le solvant de la réaction est cette fois du benzène, l'irradiation lumineuse (lampe halogène de 150 W) permet d'atteindre rapidement son reflux. Même si le point d'ébullition du benzène est proche de celui du tétrachlorure de carbone (80°C), il permet d'obtenir une plus grande sélectivité lors de l'extraction de l'hydrogène en position benzylique par stabilisation du radical brome dont la réactivité est abaissée *via* la formation d'un complexe π benzène/Br^{*}. ^{129,134}

2. Ligand en série aminomalonique.

2.1. Synthèse du ligand L⁶H₄.

L'alkylation du chlorhydrate d'aminomalonate d'éthyle commercial **34** est effectuée dans des conditions classiques (base minérale, acétonitrile à chaud) en présence d'un excès de 6-bromométhyl-2,2'-bipyridine **33**, et fournit l'intermédiaire dialkylé **35** avec un rendement de 56% (**Schéma 26**). Ce dernier est engagé dans une réaction de carboéthoxylation douce (mélange éthanol/triéthylamine à 70°C pendant une nuit), le tétraester éthylique **36** est isolé avec un rendement raisonnable après passage en milieu acide, neutralisation et extraction pour se débarrasser des résidus de triphénylphosphine.

_

¹³⁴ (a) Raner, K. D.; Lusztyk, J.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3652. (b) Ingold, K. U.; Lusztyk, J.; Raner, K. D. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 219.

Schéma 26. Synthèse du ligand L⁶H₄.

L'étape finale conduisant au ligand L⁶H₄ est une saponification en présence de soude dans un mélange méthanol/eau, suivie d'une acidification à pH 4-5 à l'aide d'acide chlorhydrique dilué. Pour minimiser les risques de décarboxylation du β-diacide en milieu acide (**Schéma 27**), cette dernière opération est effectuée à 0°C. Le ligand est ainsi isolé avec un rendement de 53% sous la forme d'un chlorhydrate hydraté, L⁶H₄·3HCl·3H₂O. Le rendement de cette étape est honorable, sachant que quatre fonctions ester y sont successivement hydrolysées et que la décarboxylation est également possible en milieu basique (**Schéma 27**).

Schéma 27. Décarboxylation d'un β -diacide en milieu acide ou basique.

Cette synthèse en trois étapes présente un rendement suffisant (de l'ordre de 20%) pour permettre l'étude du ligand $\mathbf{L}^6\mathbf{H}_4$ ainsi que de ses complexes sans optimiser davantage les trois étapes mises en jeu.

2.2. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques du ligand \mathbf{L}^6H_4 et de ses complexes d'europium et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

2.2.1. Ligand L⁶H₄.

Le spectre d'absorption UV-visible du ligand L⁶H₄ présente deux maxima d'absorption à 288 et 239 nm avec des coefficients d'absorption molaire respectifs de 24800 et 20300 M⁻¹.cm⁻¹ (**Figure 43**). Ces données sont caractéristiques de ligands portant des chromophores de type bipyridine-carboxylate.^{85,122}

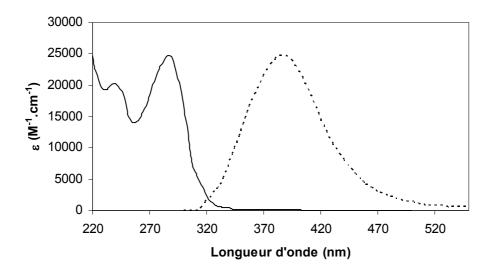


Figure 43. Spectres d'absorption (—) et d'émission (---, $\lambda_{exc.}$ =259 nm) du ligand \mathbf{L}^6H_4 (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le spectre d'émission du ligand L⁶H₄ est composé d'une large bande d'émission autour de 387 nm (**Figure 43**), qui disparaît dès qu'un délai suffisant est appliqué à la mesure. Il s'agit donc de fluorescence à partir d'un état singulet situé aux alentours de 25800 cm⁻¹.

Le spectre d'excitation du ligand L^6H_4 , obtenu pour une émission à 387 nm, présente deux maxima à 240 et 293 nm (respectivement 41700 et 34100 cm⁻¹) et coïncide avec son spectre d'absorption.

2.2.2. Complexes [EuL⁶]Na et [TbL⁶]Na.

La complexation de l'europium ou du terbium(III) par le ligand L⁶H₄ est caractérisé par le déplacement bathochrome prévisible de la bande d'absorption de plus faible énergie d'environ 2100 cm⁻¹ accompagné d'un effet hypochrome, somme toute faible pour le complexe d'europium (**Figure 44** et **Tableau 30**).

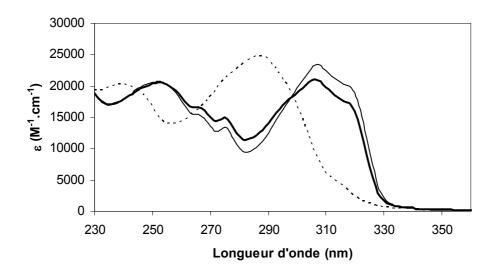


Figure 44. Spectres d'absorption du ligand L^6H_4 (---), de ses complexes $[EuL^6]Na$ (—) et $[TbL^6]Na$ (—) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Tableau 30. Propriétés d'absorption UV-visible du ligand L^6H_4 et de ses complexes $[EuL^6]Na$ et $[TbL^6]Na$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_{\text{max}} (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
L ⁶ H ₄	288	24800
	239	20300
[Eu L ⁶]Na	307	23400
	252	20700
[Tb L ⁶]Na	306	21000
	252	20500

Les spectres d'émission s'étendent de 575 à 715 nm pour le complexe [EuL⁶]Na et de 475 à 640 nm pour le complexe [TbL⁶]Na, les bandes d'émission observées sont typiques des cations europium et terbium(III), leur maxima respectifs étant situés à 617 et 546 nm (**Figure 45**). Pour les deux complexes, une bande d'émission de fluorescence de très faible intensité est observée à 347 nm, elle disparaît si un délai est fixé avant l'intégration du signal.

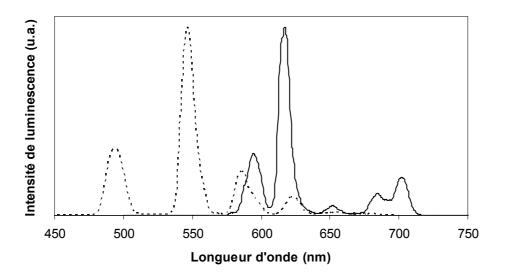


Figure 45. Spectres d'émission ($\lambda_{\text{exc.}}$ =307 nm) des complexes [EuL⁶]Na (—) et [TbL⁶]Na (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Les spectres d'absorption et d'excitation coïncident pour chacun des complexes (**Figure 46**), cela traduit le fait que l'émission à partir de l'europium ou du terbium résulte d'un transfert d'énergie du ligand vers le lanthanide.³⁶

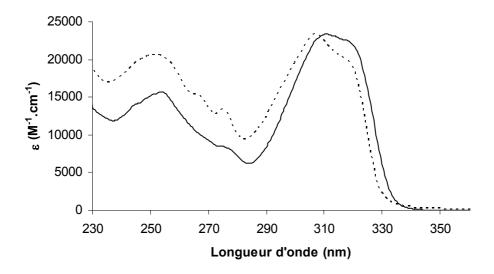


Figure 46. Spectres d'absorption (---) et d'excitation (—, $\lambda_{\text{\'em.}}$ =616 nm) du complexe [Eu**L**⁶]Na (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Les durées de vie de luminescence du complexe [EuL⁶]Na dans H₂O et D₂O sont respectivement de 0,57 et 2,65 ms à température ambiante (**Tableau 31**), ce qui permet d'évaluer le nombre de molécules d'eau coordinées à 1,3 en moyenne (**Tableau 32**). Cette valeur est bien concordante avec le fait que le ligand occupe 8 sites en première sphère de coordination, une molécule d'eau venant la compléter pour atteindre un nombre de

coordination de 9 autour de l'europium. L'exaltation de la durée de vie dans l'eau lourde donne toute la mesure des répercutions des désactivations vibrationnelles sur la durée de vie dans l'eau. Le rendement quantique en pâtit également, comme en atteste l'écart important entre les valeurs mesurées dans H₂O et D₂O (**Tableau 31**).

Tableau 31. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence des complexes [EuL⁶]Na et [TbL⁶]Na.

Complexe	$ au^{300 ext{K}}$	(ms)	Φ^{300}	OK (%)
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
[Eu L⁶] Na	0,57	2,65	4,4	9,3
[Tb L ⁶]Na	1,36	1,87	12,4	35,4

Tableau 32. Calcul du nombre de molécules d'eau coordinées au complexe $[EuL^6]$ Na (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

	$q_{_{ m H2O}}$	
Horrocks et Sudnick ⁴¹	Parker et al. ⁴²	Horrocks et Supkowski ⁴³
1,4	1,3	1,2

La durée de vie de luminescence à température ambiante de [TbL⁶]Na est de l'ordre de 1,4 ms en solution aqueuse (**Tableau 31**). Cette valeur est particulièrement élevée en comparaison des durées de vie généralement observées pour des complexes de terbium(III) comportant des chromophores de type bipyridine⁸⁷ ou bipyridine-carboxylate.^{85,122} Le transfert d'énergie en retour semble également peu efficace dans ce cas, ce qui pourrait se vérifier par la détermination de la position de l'état triplet de plus faible énergie centré sur le ligand par rapport à l'état émetteur de Tb³⁺ (⁵D₄) grâce à la phosphorescence du complexe de gadolinium [GdL⁶]Na. Les rendements quantiques de [TbL⁶]Na dans H₂O et D₂O sont largement supérieurs à ceux de [EuL⁶]Na; ce résultat rend bien compte de la moindre sensibilité du cation terbium(III) aux relaxations vibrationnelles engendrées par la présence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination.

2.3. Activation des complexes.

Dans une dernière étape (**Schéma 28**), la fonction carboxylate résiduelle *a priori* réactive du complexe [Eu**L**⁶]Na a été mise à profit pour former un ester activé [Eu**L**^{6*}], résultant de la condensation du complexe et du *N*-hydroxysuccinimide (NHS).

Schéma 28. Essai de synthèse de l'ester activé [EuL^{6*}].

Les carbodiimides favorisent la formation de liaisons amide (entre un acide carboxylique et une amine) ou ester (entre un acide carboxylique et un alcool). Les dérivés les plus couramment utilisés en synthèse peptidique sont le chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide (EDC·HCl) soluble dans l'eau ou le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) soluble dans les solvants organiques (**Figure 47**).

Figure 47. Structures de deux carbodiimides utilisés pour la formation de liaisons amide ou ester.

Dans notre cas, le chlorhydrate d'EDC a été choisi pour faciliter la réaction en augmentant la réactivité du groupement carboxylate vis-à-vis du nucléophile, le NHS. La réaction a été menée dans des conditions douces, à température ambiante dans du DMSO, solvant suffisamment polaire pour permettre la solubilisation au moins partielle du complexe d'europium.

La spectroscopie IR n'a pas permis de déceler la formation d'un ester avec le NHS, ce qui se serait traduit par un abaissement en intensité de la bande correspondant à la vibration d'élongation asymétrique de la fonction carboxylate libre (COO Na $^+$) aux alentours de 1570 cm $^{-1}$. Une nouvelle bande attribuée aux vibrations $\nu_{C=O}$ des fonctions amide du NHS serait également attendue vers 1740 cm $^{-1}$. De plus, la masse et l'analyse élémentaire du produit obtenu ne sont pas concordantes avec celles du produit souhaité, le produit obtenu n'a donc

pas pu être identifié comme étant l'ester [EuL^{6*}]. La réactivité de la fonction carboxylate libre pouvant être modulée par son environnement immédiat, il est probable que l'encombrement stérique autour du lanthanide et l'interaction possible du carboxylate résiduel avec le cation rendent difficile voire impossible l'approche du NHS pour former l'ester activé.

En conclusion, le premier essai d'activation n'a pas porté ses fruits alors que les complexes [EuL⁶]Na et [TbL⁶]Na présentent des propriétés photo-physiques avantageuses. Ces résultats ont motivé la modification du squelette principal du ligand *via* l'allongement de la chaîne latérale portant la fonction carboxylate libre dans le but de lui conférer une réactivité accrue.

3. Ligand en série glutamique.

L'acide glutamique a été choisi pour constituer l'ossature de ce nouveau ligand. Cet acide aminé non essentiel existe à l'état naturel sous la forme de son énantiomère L(+) noté Glu (**Figure 48**). Il est le précurseur de trois autres acides aminés, la glutamine (Gln), la proline (Pro) et l'arginine (Arg). La glutamine joue un rôle central dans l'incorporation d'azote dans les biomolécules en permettant l'entrée de NH₄⁺ dans les acides aminés. ¹³⁵

$$\begin{array}{c} \text{HOOC} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$$

Acide L-glutamique

Figure 48. Structure de l'énantiomère naturel de l'acide glutamique.

Il présente l'avantage d'allonger la chaîne latérale du squelette de deux atomes de carbone (pont éthylénique), tout en étant disponible en grande quantité à faible coût. Notre choix s'est ainsi porté sur le mélange racémique DL(±) de l'acide glutamique pour ne pas conférer d'activité optique au substrat de départ.

¹³⁵ Stryer, L. In *La Biochimie*, 4^e édition; Flammarion Médecine-Sciences: Paris, 1997.

_

3.1. Synthèse du ligand L^7H_4 . 52

Dans le but de conserver la même approche synthétique que pour le ligand \mathbf{L}^6 , il a simplement été nécessaire de remplacer le diester dérivé de l'acide aminomalonique par un diester dérivé de l'acide glutamique et d'appliquer successivement les réactions d'alkylation, de carboalkoxylation et de saponification.

Schéma 29. Synthèse du ligand L⁷H₄.

Ainsi, le diester méthylique de l'acide glutamique **38** est obtenu par estérification de l'acide glutamique racémique hydraté **37** dans le méthanol en présence de chlorure de triméthylsilyle. Après évaporation du solvant, le diester pur est isolé avec un rendement quantitatif sous la forme d'un sel (chlorhydrate), stable et facile à manipuler. La *N*-alkylation de **38** avec 2,2 équivalents de 6-bromométhyl-2,2'-bipyridine **33** conduit aisément au produit dialkylé **39**, qui est ensuite converti en tétraester **40**. La saponification finale des quatre

-

¹³⁶ Weigl, M.; Wünsch, B. Tetrahedron **2002**, 58, 1173.

fonctions ester est suivie d'une acidification du milieu pour isoler le ligand sous la forme d'un chlorhydrate L⁷H₄·3HCl, obtenu en quatre étapes à partir de l'acide glutamique commercial 37 avec un rendement de 27% (Schéma 29).

3.2. Synthèse et caractérisation des complexes.

3.2.1. Synthèse.

Schéma 30. Synthèse des complexes [LnL⁷]Na·nH₂O (Ln=Eu, Tb, Gd).

Les complexes d'europium, de terbium, de gadolinium et de lanthane(III) ont été préparés en mettant en présence des quantités équimolaires de ligand L^7H_4 et de précurseur de lanthanide (chlorure hexahydraté $LnCl_3\cdot 6H_2O$ pour l'europium, le terbium et le gadolinium, triflate $La(OTf)_3$ pour le lanthane) dans un mélange méthanol/eau. La solution est portée à $70^{\circ}C$ pendant une heure puis neutralisée avec une solution diluée de soude dans l'eau après refroidissement à température ambiante. L'évaporation des solvants sous pression réduite conduit à la précipitation du complexe, qui est complétée par ajout de THF (**Schéma 30**). Cette procédure permet de synthétiser avec des rendements élevés les complexes sous forme d'hydrates $[LnL^7]Na\cdot nH_2O$ dont la composition chimique à l'état solide est donnée par l'analyse élémentaire (**Tableau 33**).

Tableau 33. Nombre n de molécules d'eau à l'état solide et rendements de formation des complexes $[LnL^7]Na \cdot nH_2O$.

Lanthanide	n	Rendement (%)
Eu	5	85
Tb	4	95
Gd	3	85
La	4	76

3.2.2. Spectrométrie de masse.

Les complexes ont été caractérisés par spectrométrie de masse FAB en mode positif ou négatif. Le spectre du complexe d'europium a été enregistré en mode positif, la principale espèce révélée, $[Eu(L^7H) + H]^+$, présente la distribution isotopique attendue (deux signaux à 720,2 et 722,2 avec des intensités respectives de 80 et 100%). Les spectres des complexes de terbium, de gadolinium et de lanthane mettent en évidence les espèces $[LnL^7]^-$ en mode négatif après le départ du contre ion Na^+ . La perte du fragment acétate de sodium conduit à l'espèce majoritaire $[Ln(L^7Na) - CH_2COONa]^-$ dans le cas du terbium et du gadolinium.

3.2.3. Spectroscopie IR.

Les similitudes entre les spectres IR des complexes suggèrent qu'ils sont isostructuraux à l'état solide. L'examen détaillé des bandes d'absorption des fonctions carboxylate apporte de riches renseignements, malgré la présence des bandes correspondant aux vibrations $v_{C=C}$ et $v_{C=N}$ dans la même région.

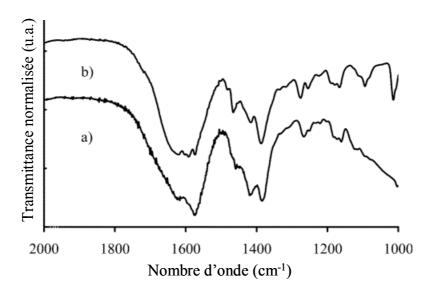


Figure 49. Spectres IR de L⁷Na₄ (a) et [TbL⁷]Na (b) à l'état solide (pastilles de KBr).

Dans les complexes, la bande d'absorption la plus intense associée à la vibration d'élongation asymétrique de COO⁻ est très large, s'étalant de 1574 à 1640 cm⁻¹ (**Figure 49**). L'élargissement de cette bande résulte de l'existence de plusieurs types de fonctions carboxylate différemment substituées (groupements méthylène ou pyridyle), de leurs différents modes de coordination au cation lanthanide ainsi que de la nature même des contre ions (Ln³⁺ ou Na⁺). D'après la structure supposée du complexe [LnL⁷]Na (**Figure 50**), au moins trois différents modes de coordination sont attendus : un premier pour les fonctions carboxylate portées par les bipyridines (**COO**⁻), un second pour la fonction carboxylate du fragment glutamate coordiné au lanthanide (COO) et un troisième pour la fonction carboxylate de sodium en bout de chaîne (*COONa*).

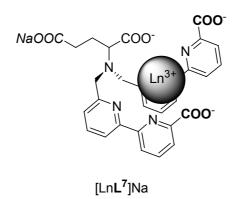


Figure 50. Coordination supposée du lanthanide Ln³⁺ au sein du complexe [LnL⁷]Na.

. .

¹³⁷ Silverstein, R. M.; Bassler, G. C. In *Identification spectrométrique des composés organiques*; Gauthier-Villars: Paris, 1968.

¹³⁸ Nakamoto, K. In *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4th Ed.; Wiley: New York, 1986; p 231.

D'après la littérature, la vibration $v_{C=O}$ de l'acétate de sodium se trouve à 1578 cm⁻¹ à l'état solide. La bande d'absorption aux alentours de 1574 cm⁻¹ peut donc être attribuée à la vibration de la fonction carboxylate de sodium en bout de chaîne. Les modes de vibration symétrique des groupements carbonyle génèrent une fine bande d'absorption à 1386 cm⁻¹, avec un épaulement vers les hautes énergies.

3.2.4. Spectroscopie RMN.

Les complexes d'europium et de lanthane ont été caractérisés par spectroscopie RMN ¹H dans un mélange CD₃OD/D₂O. Sur le spectre du complexe du lanthane (**Figure 51**), il apparaît que la complexation fait perdre aux protons des deux bipyridines leur équivalence chimique. Dans le domaine aromatique, nous pouvons en effet distinguer plusieurs doublets intégrant chacun pour un proton (à 7,61, 7,66, 8,44 et 8,48 ppm). De même la complexation du cation lanthane(III) a un effet sur le pont éthylène du bras aliphatique latéral. Alors qu'il apparaissait jusqu'ici sous la forme de deux multiplets intégrant chacun pour deux protons répartis entre 2,06 et 2,84 ppm, il se divise maintenant en quatre multiplets intégrant chacun pour un proton entre 1,79 et 2,36 ppm, signifiant ainsi leur non équivalence chimique au sein du complexe [LaL⁷]Na.

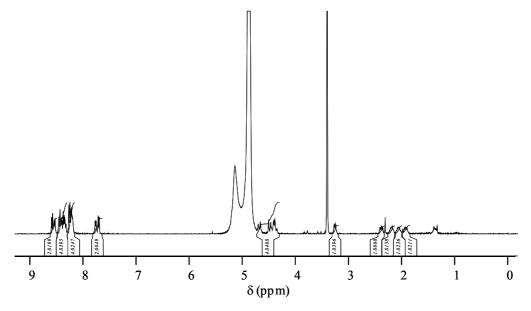


Figure 51. Spectre RMN ¹H du complexe de lanthane [LaL⁷]Na (CD₃OD/D₂O, 400 MHz).

-

¹³⁹ Itoh, K.; Bernstein, H. J. Can. J. Chem. **1956**, 34, 170.

Le spectre du complexe d'europium [EuL⁷]Na révèle la présence de 19 signaux sous la forme de singulets larges. La contribution paramagnétique de l'europium¹⁴⁰ étale ces signaux sur plus de 30 ppm, chacun intégrant pour un proton à part celui à 11,81 ppm comptant pour deux protons (**Figure 52**).

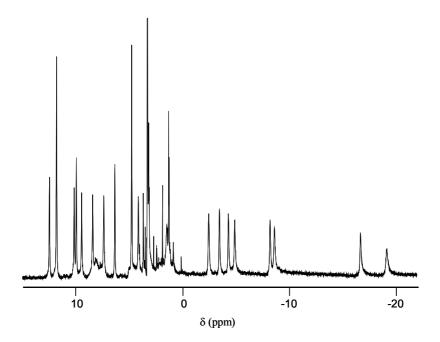


Figure 52. Spectre RMN ¹H du complexe d'europium [EuL⁷]Na (CD₃OD/D₂O, 200 MHz).

Une seule forme diastéréoisomérique est obtenue lors de la complexation du lanthanide par le ligand \mathbf{L}^7 , ce qui conduit à la différenciation des deux bipyridines chélatantes et donc à 21 protons chimiquement non équivalents. Le signal du proton manquant est certainement masqué sous le large signal correspondant à l'eau non deutériée résiduelle.

3.3. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques du ligand L^7H_4 et de ses complexes d'europium, de terbium et de gadolinium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0.01 M, pH = 7.0).

_

¹⁴⁰ (a) Bertini, I.; Lucchinat, C. In *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*; Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc.: Menlo Park, CA, 1986. (b) Renaud, F.; Piguet, C.; Bernadinelli, G.; Bünzli, J.-C. G.; Hopfgartner, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9326.

La formation des complexes a été mise en évidence par le titrage spectrophotométrique du ligand L⁷H₄ en suivant les variations de son spectre d'absorption UV-visible lors de l'addition de quantités croissantes de chlorure d'europium EuCl₃·6H₂O (**Figure 53**). Au cours des ajouts, le maximum d'absorption s'est progressivement déplacé vers les faibles énergies, de 288 nm pour le ligand libre à 308 nm pour un équivalent de sel d'europium ajouté. Avec des ajouts supplémentaires allant jusqu'à quatre équivalents d'europium, aucun changement n'a été décelé. Cette étude fournit la preuve de la formation d'une nouvelle espèce ayant une stoechiométrie 1:1 (un cation lanthanide pour un ligand).

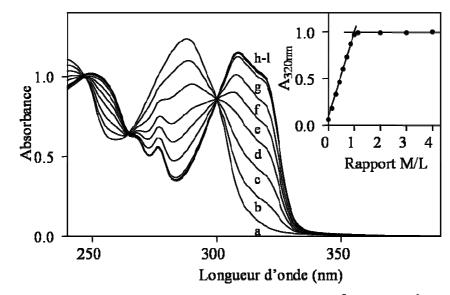


Figure 53. Titrage spectrophotométrique UV-visible d'une solution de L^7H_4 à $5.8.10^{-5}$ M par EuCl₃·6H₂O (tampon Tris/HCl à 0.01 M, pH = 7.0). Spectres d'absorption mesurés pour différents rapports métal/ligand : (a) 0, (b) 0.14, (c) 0.29, (d) 0.43, (e) 0.57, (f) 0.71, (g) 0.86, (h) 1.0, (i) 1.14, (j) 2.0, (k) 3.0, (l) 4.0. Encart : tracé de l'absorbance à 320 nm en fonction du rapport métal/ligand.

Le tracé de l'absorbance mesurée à 320 nm en fonction du rapport métal/ligand permet de suivre au cours du titrage l'évolution de l'absorbance due à la formation du complexe d'europium (**Figure 53**). Dans ces conditions, la constante apparente d'association pour la formation des complexes est trop élevée pour être évaluée à partir du titrage, celui-ci présente en effet une rupture de pente pour un équivalent d'europium ajouté. Nous pouvons tout de même l'estimer comme étant supérieure à 8 unités logarithmiques.

Le ligand libre L^7H_4 et les complexes $[LnL^7]Na$ (Ln = Eu, Tb ou Gd) présentent des bandes d'absorption intenses attribuées aux transitions $\pi \to \pi^*$ centrées sur les bipyridines. La bande d'absorption de plus faible énergie subit un déplacement bathochrome de 2250 cm⁻¹ et

hypochrome lors de la complexation, les coefficients d'absorption molaire des complexes étant compris entre 19000 et 21000 M⁻¹.cm⁻¹ (**Figure 53** et **Tableau 34**).

Après excitation dans les bandes d'absorption du ligand, les complexes d'Eu³⁺ et de Tb³⁺ présentent une forte luminescence en solution aqueuse. Les spectres d'excitation se superposent parfaitement aux spectres d'absorption des complexes, cela traduit le fait que l'émission à partir du lanthanide résulte bien d'un transfert d'énergie du ligand vers le métal (**Figure 54**).

Tableau 34. Propriétés d'absorption UV-visible du ligand L^7H_4 et de ses complexes $[LnL^7]Na$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	λ _{max} (nm)	$\varepsilon_{\text{max}} (M^{-1}.\text{cm}^{-1})$
L^7 H ₄	288	22300
	239	20200
[Eu L ⁷]Na	308	19700
	253	14400
[Tb L ⁷]Na	308	20800
	253	15100
[GdL ⁷]Na	308	19000
	253	13600

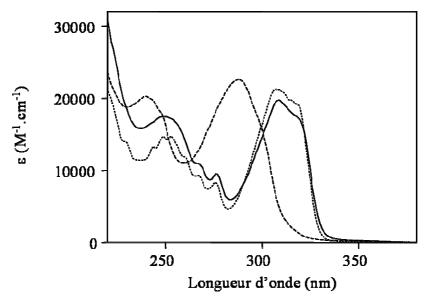


Figure 54. Spectres d'absorption de L^7H_4 (---) et de $[EuL^7]Na$ (—) et spectre d'excitation de $[EuL^7]Na$ (…, $\lambda_{\acute{e}m}$ =615 nm) dans l'eau.

Les spectres d'émission des complexes affichent les transitions ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ et ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_J$ (J = 0-6) typiques des cations Eu³⁺ et Tb³⁺ (**Figure 55**).

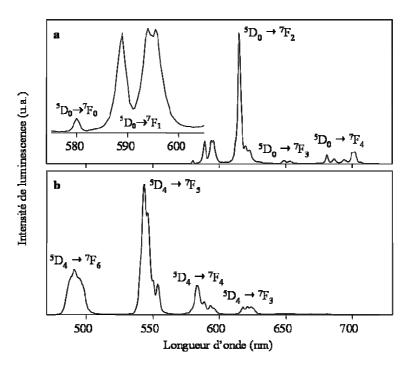


Figure 55. Spectres d'émission ($\lambda_{\text{exc.}}$ =308 nm) des complexes [EuL⁷]Na (a) et [TbL⁷]Na (b) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

La transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ de l'ion Eu^{3+} possède un fort caractère dipôle magnétique, son intensité est donc quasiment insensible à l'environnement de l'ion. Dans le cas d'un composé ayant plusieurs sites de coordination, cette propriété permet d'analyser leur peuplement. Dans notre cas, la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ présente trois composantes (**Figure 55a**), ce qui indique que la première sphère de coordination du cation Eu^{3+} possède une symétrie relativement basse, 9 comme le suggérait déjà le spectre RMN 1H du complexe $[EuL^7]Na$.

Tableau 35. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence des complexes [LnL⁷]Na.

Lanthanide	τ^{300K} (ms)		τ^{77K} (ms)		Φ ^{300K} (%)	
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
Eu	0,62	2,48	0,8	2,6	8	35
Tb	1,48	2,53	1,7	3,1	31	53

Les complexes d'europium et de terbium présentent tous les deux des durées de vie de luminescence élevées dans l'eau (**Tableau 35**), en très bonne adéquation avec les valeurs trouvées pour les complexes [LnL⁶]Na (**Tableau 31**). Notons que la durée de vie du complexe

de terbium est à nouveau particulièrement importante dans l'eau à température ambiante (de l'ordre de 1,5 ms).

Pour comprendre ces comportements photo-physiques, nous avons étudié en détail les processus de désactivation non radiatifs à partir des états émetteurs du métal. La comparaison des durées de vie et des rendements quantiques de luminescence dans H₂O et D₂O indique que les oscillateurs O-H contribuent significativement à la relaxation non radiative des états émetteurs du lanthanide. En solution aqueuse à température ambiante, les complexes d'Eu³⁺ et de Tb³⁺ possèdent en moyenne 1,1 molécule d'eau en première sphère de coordination. Cela est cohérent avec la structure proposée (**Figure 56**), le cation étant coordiné par huit hétéroatomes du ligand, à savoir trois atomes d'oxygène des groupements carboxylate, quatre atomes d'azote des bipyridines un atome d'azote du squelette aliphatique. Cette situation est ainsi très favorable, le nombre de coordination de 9 étant atteint autour du lanthanide avec la molécule d'eau coordinée.

Figure 56. Structure du complexe [LnL⁷]Na avec une molécule d'eau en première sphère de coordination.

De manière générale, les transferts d'énergie en retour de l'état émetteur du métal vers le ligand constituent la voie de désactivation non radiative majeure pour les complexes terbium. ^{87a} Il est à noter que ces transferts en retour sont activés thermiquement. Les durées de vie à 300 et 77 K des complexes [EuL⁷]Na et [TbL⁷]Na sont toutefois du même ordre de grandeur, ce qui montre que de tels processus ne jouent qu'un rôle mineur dans le cas présent.

L'état émetteur $^6P_{7/2}$ du gadolinium(III) se trouve au-delà de 30000 cm $^{-1}$, c'est-à-dire bien au-dessus de l'état triplet excité du ligand. Le transfert d'énergie du ligand vers le métal ne peut donc avoir lieu et la photosensibilisation du cation Gd^{3+} est impossible. Le complexe $[GdL^7]$ Na nous permet d'évaluer la position énergétique de l'état triplet excité du ligand au

sein de cette série de complexes de lanthanides grâce à la mesure de sa phosphorescence à basse température. L'état triplet excité du ligand se trouve aux alentours de 22100 cm⁻¹, c'est-à-dire à seulement 1700 cm⁻¹ au-dessus de l'état émetteur du Tb³⁺ (⁵D₄ à 20400 cm⁻¹). Bien que l'écart entre ces états soit légèrement inférieur à la limite de 1850 cm⁻¹ proposée par Latva et *al.*, ¹² les relaxations non radiatives activées thermiquement sont peu efficaces ici. Cela permet en particulier au complexe de terbium(III) de bénéficier de durées de vie exceptionnellement élevées.

Les complexes d'Eu³⁺ et de Tb³⁺ présentent tous les deux des rendements quantiques de luminescence élevés (**Tableau 35**) après excitation dans la bande d'absorption du ligand (308 nm). Alors que les durées de vie sont comparables, les rendements quantiques en série glutamique sont largement supérieurs à ceux trouvés en série aminomalonique. Remarquons en particulier que le rendement quantique du complexe de terbium(III) est le plus élevé à notre connaissance parmi les marqueurs luminescents comportant des bipyridines au sein de leurs ligands. ^{87a} Ces valeurs élevées résultent de l'efficacité concomitante du transfert d'énergie du ligand vers le métal (effet d'antenne) et de la luminescence du cation lanthanide. En supposant que la désactivation de l'état émetteur du lanthanide soit purement radiative à 77 K dans l'eau lourde, les efficacités de ces transferts d'énergie peuvent être estimées grâce aux durées de vie et aux rendements quantiques expérimentaux selon les formules :

$$oldsymbol{\eta}_{\mathrm{TE}} = oldsymbol{\Phi}_{\mathrm{H}_{2O}}^{\mathrm{300K}} imes rac{ au_{\mathrm{D}_{2O}}^{\mathrm{77K}}}{ au_{\mathrm{H}_{2O}}} \hspace{1cm} oldsymbol{\eta}_{\mathrm{L}} = rac{ au_{\mathrm{H}_{2O}}^{\mathrm{300K}}}{ au_{\mathrm{D}_{2O}}^{\mathrm{77K}}}$$

Équation 10. Efficacités du transfert d'énergie du ligand vers le métal (η_{TE}) et de la luminescence centrée sur le métal (η_L) , exprimées en fonction du rendement quantique Φ et des temps de vie τ expérimentaux.

Tableau 36. Efficacité du transfert d'énergie η_{TE} et efficacité de luminescence η_L des complexes [LnL⁷]Na.

Lanthanide	$\eta_{ ext{TE}}$	$\eta_{ m L}$
Eu	0,36	0,24
Tb	0,65	0,49

L'efficacité du transfert d'énergie η_{TE} du ligand vers le métal est de 0,36 et 0,65 respectivement pour le complexe d'Eu³⁺ et de Tb³⁺. La luminescence à partir du métal est également un processus particulièrement efficace, surtout dans le cas du complexe de terbium(III). L'efficacité de luminescence η_L présente des valeurs de 0,24 ([EuL⁷]Na) et 0,49 ([TbL⁷]Na) (**Tableau 36**).

Les excellentes propriétés photo-physiques des complexes [EuL⁷]Na et [TbL⁷]Na démontrent qu'un chromophore de type bipyridine-carboxylate est tout à fait adapté à la conception de ligands pouvant former des complexes stables et fortement luminescents avec des cations de la série des lanthanides. L'encapsulation du cation par le ligand L⁷H₄ est donc efficace, même si la présence d'une molécule d'eau coordinée laisse à penser qu'une modification appropriée du ligand, *via* par exemple l'introduction d'une fonction coordinante supplémentaire dans la partie aliphatique, pourrait maximiser la protection du lanthanide de son milieu environnant. Les propriétés photo-physiques des complexes devraient alors s'accroître en conséquence.

3.4. Stabilité des complexes.

La grande stabilité des complexes de lanthanides est une condition *sine qua non* pour envisager leur utilisation dans des milieux biologiques. A cet effet, la présence d'un groupement chargé négativement (carboxylate, phosphonate...) permet de lier très fortement le cation lanthanide au ligand.

Les complexes de lanthanides obtenus avec le ligand L^7H_4 se sont avérés être stables pendant plusieurs jours dans des tampons communément utilisés en analyse biologique, comme le tampon Tris/HCl à 0,01 M (pH = 7,0) ou le PBS (tampon phosphate salin) Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ à 0,02 M et NaCl à 0,15 M (pH = 7,4). Les propriétés photo-physiques des complexes dans ces solutions tampon restent quasi identiques à celles obtenues dans l'eau pure.

La constante de stabilité conditionnelle $K_{\text{cond,EuL7}}$ pour la formation du complexe d'europium avec le ligand $\mathbf{L}^7\mathrm{H}_4$ a été mesurée à 25°C dans un tampon Tris/HCl à 0,01 M (pH = 7,0). La méthode repose sur la mise en compétition de deux ligands, le ligand à étudier et l'EDTA dont la constante de stabilité pour la formation de son complexe avec l'europium est connue.⁸⁸ Le rapport des constantes de stabilité conditionnelle des deux complexes est déterminé, à partir duquel la constante de stabilité inconnue est calculée. Pour le complexe [Eu \mathbf{L}^7]Na, la valeur de log $K_{\mathrm{cond,EuL7}}$ est de 16,5 ± 0,6, alors que la littérature^{88,141} rapporte une valeur de 14,1 pour log $K_{\mathrm{cond,Eu(EDTA)}}$. Cela montre que le ligand $\mathbf{L}^7\mathrm{H}_4$ forme des complexes de lanthanides plus stables que ceux obtenus avec l'EDTA à pH physiologique. La constante de

¹⁴¹ Smith, R. M.; Martell, A. E. In *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York, 1974; Vol. 1, p 204.

stabilité thermodynamique pour la formation du complexe $[EuL^7]$ Na peut être déterminée à partir de K_{cond,EuL^7} et des constantes de protonation successives du ligand L^7 , ce qui à ce jour n'a pas encore été fait.

La valeur élevée de la constante de stabilité des complexes de lanthanides formés avec le ligand \mathbf{L}^7H_4 est fortement encourageante, et suggère ainsi que ces complexes sont de candidats adaptés à des applications biomédicales, comme les dosages biologiques, l'immunohistochimie ou encore l'hybridation *in situ*.

3.5. Activation des complexes.

L'activation de la fonction carboxylate non coordinée des complexes d'europium, de terbium et de gadolinium(III) a été réalisée en présence de *N*-hydroxysuccinimide et de chlorhydrate d'EDC dans du DMSO à température ambiante (**Schéma 31**). Le complexe [LnL⁷]Na, peu soluble au départ, se solubilise au fur et à mesure de sa consommation. Le complexe activé [LnL^{7*}] précipite quant à lui hors du milieu réactionnel au cours de la réaction sous la forme d'un solide blanc. Un ajout de THF permet de compléter cette précipitation, le produit désiré est ensuite simplement centrifugé, lavé au THF puis séché sous vide. Grâce à cette procédure, les complexes activés sont isolés sous forme d'hydrates [LnL^{7*}]·nH₂O avec des rendements compris entre 71 et 90% (**Tableau 37**). Notons que le nombre n de molécules d'eau associées à chacun des complexes activés à l'état solide est donné par l'analyse élémentaire. De plus, pour un cation lanthanide donné, l'état d'hydratation du complexe [LnL⁷]Na et du complexe activé [LnL^{7*}] est le même. Il a ainsi été possible d'obtenir efficacement les complexes activés [LnL^{7*}] avec un rendement moyen de 72% en deux étapes à partir du ligand L⁷H₄.

NHS
$$[LnL^7]$$
NaOOC $COO^ Ln^{3+}$ Ln^{3+} $DMSO, t.a.$ $[LnL^{7*}]$

Schéma 31. Synthèse des complexes activés $[LnL^{7*}]\cdot nH_2O$ (Ln=Eu, Tb, Gd).

Tableau 37. Nombre n de molécules d'eau à l'état solide et rendements de formation des complexes activés $[LnL^{7*}]\cdot nH_2O$.

Lanthanide	n	Rendement (%)
Eu	5	71
Tb	4	90
Gd	3	82

La spectroscopie de masse FAB en mode positif permet de mettre en évidence deux espèces dans chaque cas, le composé protoné $[\operatorname{Ln} \mathbf{L}^{7*} + \operatorname{H}]^+$ et le résidu résultant de la perte d'un fragment succinimidyle. Le pic moléculaire du complexe d'europium activé présente la distribution isotopique attendue (deux signaux à 817,1 et 819,1 de même intensité), ce qui confirme sa nature mononucléaire.

La formation de la fonction ester a également été mise en évidence par les changements observés en spectroscopie IR (**Figure 57**). Une nouvelle bande d'absorption, attribuée aux fonctions carbonyles du fragment *N*-hydroxysuccinimidyle, apparaît à 1740 cm⁻¹. La bande correspondant à la vibration d'élongation asymétrique de COO⁻ s'affine par rapport au complexe de départ, avec une perte d'intensité flagrante dans la région de 1570 cm⁻¹. Cela confirme *a posteriori* l'attribution de cette bande à la fonction carboxylate non coordinée.

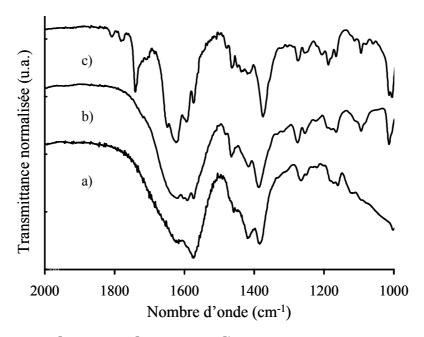


Figure 57. Spectres IR de L^7 Na₄ (a), $[TbL^7]$ Na (b) et $[TbL^{7^*}]$ (c) à l'état solide (pastilles de KBr).

La simple modification de l'architecture de départ du ligand a rendu possible l'allongement de la chaîne latérale tout en conservant la même approche synthétique. Le passage de l'acide aminomalonique à l'acide glutamique a permis d'obtenir des complexes ayant des propriétés photo-physiques supérieures (durées de vie comparables, rendements quantiques plus élevés) malgré la présence d'une molécule d'eau résiduelle en première sphère de coordination du lanthanide. L'activation finale des complexes a été couronnée de succès grâce à la réactivité accrue de la fonction carboxylate libre, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation de ces complexes en tant que marqueurs. Les premières investigations dans cette direction seront présentées et discutées dans le Chapitre IV.

Chapitre IV.

Application des complexes activés en série glutamique.

Chapitre IV. Applications des complexes activés en série glutamique.

Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur les premières applications menées à bien avec les complexes activés d'europium, de terbium et de gadolinium(III) en série glutamique (**Figure 58**). Ces composés, rappelons-le, présentent une fonction de type ester activée (NHS comme nous l'avons vu ou sulfo-NHS comme nous allons le présenter) prompte à réagir avec un nucléophile pour former une liaison covalente.

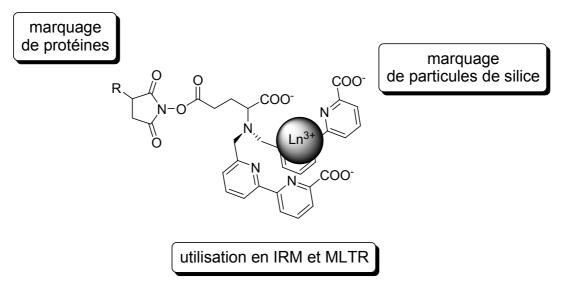


Figure 58. Applications des complexes activés NHS (R=H) ou sulfo-NHS (R=SO₃Na) (Ln=Eu, Tb, Gd).

Dans un premier temps nous allons nous intéresser au marquage d'une protéine modèle, la BSA,⁵² puis d'un composé inorganique constitué de particules de silice¹⁴² avec les complexes activés d'Eu³⁺ et de Tb³⁺. Les premières applications par microscopie de luminescence en temps résolu (MLTR) seront présentées. Enfin nous allons explorer le potentiel du complexe activé de Gd³⁺ qui, grâce à la présence d'une molécule d'eau coordinée, peut être utilisé en tant qu'agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

-

¹⁴² Charbonnière, L. J.; Weibel, N.; Estournes, C.; Leuvrey, C.; Ziessel, R. New J. Chem. 2004, 28, 777.

1. Marquage de protéines.⁵²

1.1. Généralités.

Les esters activés dérivés du NHS font partie des fonctions les plus couramment utilisées en analyse biologique pour coupler de manière covalente un marqueur à une biomolécule (albumine, enzyme, immunoglobuline...). La réaction a généralement lieu entre l'ester activé et une fonction de type amine primaire provenant des résidus lysine de la biomolécule. Cet acide aminé essentiel noté Lys présente une chaîne latérale linéaire terminée par une amine primaire (**Figure 59**). Lors de la putréfaction de tissus animaux, la lysine est décomposée par décarboxylation et libère la 1,5-pentanediamine également nommée cadavérine qui est une polyamine biogène à l'odeur pestilentielle.

La réaction de couplage entre le marqueur et la biomolécule est effectuée dans des conditions douces, dans un milieu légèrement basique dans lequel les esters activés réagissent spécifiquement avec les amines primaires. De plus, les esters dérivés du NHS permettent d'obtenir des rendements de couplage élevés, tout en minimisant la dénaturation des protéines ciblées.

1.2. L'albumine sérique bovine (BSA).

L'albumine, protéine hydrosoluble produite par le foie, est le principal composant protéique du sang chez l'homme et les mammifères (**Figure 59**). L'albumine sérique est présente dans le plasma sanguin de l'homme à une concentration comprise entre 35 et 45 g.L⁻¹, ce qui constitue environ 60% des protéines plasmatiques. Son rôle est primordial dans le maintien de la pression oncotique et du pH sanguin ainsi que dans le transport de nombreuses substances (hormones, Ca²⁺...). Notons que l'albumine est également présente dans l'œuf (ovalbumine) et dans le lait (lactalbumine).

142

¹⁴³ Hermanson, G. T. In *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, 1996.

¹⁴⁴ Schmidt, R. F. In *Physiologie*; De Noeck Université: Paris, Bruxelles, 1999.

Le marquage de protéines avec les esters activés [EuL^{7*}] et [TbL^{7*}] a été testé en choisissant l'albumine sérique bovine (notée BSA) comme protéine modèle. Celle-ci est connue pour avoir 59 résidus lysine potentiellement réactifs vis-à-vis d'un ester activé. ¹⁴⁵

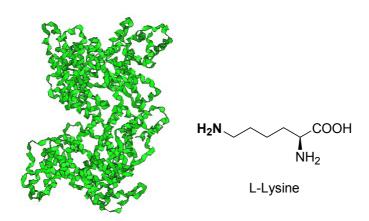


Figure 59. Représentation de l'albumine humaine (à gauche). Le squelette de la molécule est représenté sous forme d'un ruban faisant apparaître la structure tridimensionnelle de la protéine. Structure de l'énantiomère naturel de la lysine (à droite).

1.3. Réaction de couplage.

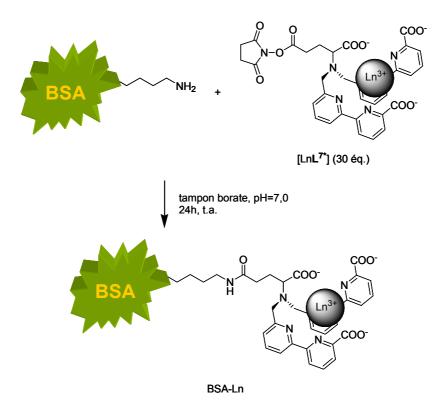


Schéma 32. Marquage de la BSA avec le complexe activé [LnL^{7*}] (Ln=Eu, Tb).

-

¹⁴⁵ Goodno, C. C.; Swaisgood, H. E.; Catignani, G. L. Anal. Biochem. 1981, 115, 203.

La réaction de couplage est effectuée dans un milieu tamponné (tampon borate à 0,05 M, pH = 7,0) avec un rapport molaire marqueur/protéine de 30:1 pour éviter le marquage excessif de la protéine (**Schéma 32**). Même si un fort taux de marquage facilitait la détection de la protéine marquée (augmentation du rapport signal/masse), il risquerait d'affecter son activité biologique, en modifiant par exemple ses capacités de reconnaissance dans le cas d'un anticorps. D'autre part, un marquage surabondant peut conduire à l'auto-absorption de la luminescence émise par le complexe, comme il a été observé pour des composés marqués à la fluorescéine. La solution est agitée pendant 24 heures à température ambiante, ce qui permet la dissolution complète du complexe activé. Le mélange réactionnel est ensuite concentré à un plus faible volume par microfiltration, la protéine marquée BSA-Ln est enfin lavée avec une portion de tampon Tris/HCl à 0,01 M (pH = 7,0) et concentrée à nouveau. Ces deux dernières opérations sont répétées jusqu'à ce que le filtrat ne présente plus de luminescence résiduelle due au complexe activé n'ayant pas réagi.

1.4. Caractérisation.

Les produits de couplage ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et spectroscopie UV-visible en déterminant le rapport molaire marqueur/protéine obtenu.

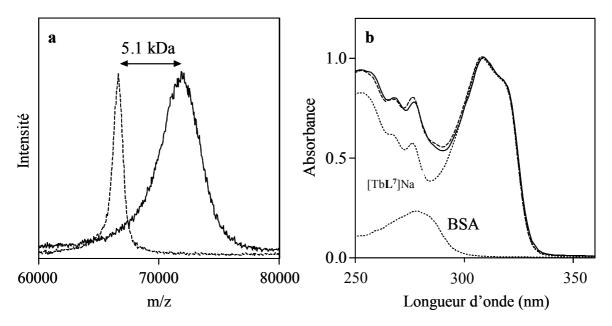


Figure 60. Caractérisation de la BSA-Tb par spectrométrie de masse et spectroscopie UV-visible. (a) Spectre de masse MALDI-TOF de la BSA (---) et de la BSA-Tb (—). (b) Spectre d'absorption expérimental de la BSA-Tb (—) et spectre d'absorption théorique (---) obtenu par combinaison linéaire des spectres de la BSA (…) et du complexe [TbL⁷]Na (…) libres.

La comparaison des masses moléculaires de la BSA de départ et de la BSA marquée permet d'établir un taux moyen de marquage pour un lanthanide donné, exprimé en nombre de marqueurs greffés par protéine (**Figure 60a**). Les valeurs trouvées pour les deux complexes sont du même ordre de grandeur, 8,1 pour la BSA-Eu et 7,3 pour la BSA-Tb (**Tableau 38**). Ces valeurs sont en bon accord avec les taux de marquage déterminés à partir des spectres d'absorption UV-visible (**Figure 60b**), en faisant l'hypothèse que le spectre d'absorption de la BSA marquée au terbium est la somme des spectres d'absorption de la BSA et du complexe [TbL⁷]Na libres.

Tableau 38. Masses moléculaires et taux de marquage de la BSA marquée à l'europium et au terbium.

Composé	Masse moléculaire (kDa)	Taux de marquage
BSA	66,6	-
BSA-Eu	72,3	8,1
BSA-Tb	71,7	7,3

1.5. Propriétés photo-physiques.

Les protéines marquées à l'europium et au terbium conservent chacune les excellentes propriétés photo-physiques des complexes [EuL⁷]Na et [TbL⁷]Na correspondants. La BSA-Eu présente en particulier une décroissance de luminescence polyexponentielle, vraisemblablement due aux différents environnements à proximité des complexes greffés sur la protéine. Il est intéressant de noter que la BSA marquée à l'europium possède une durée de vie de luminescence moyenne presque double (1,10 ms) de celle du complexe [EuL⁷]Na, alors que le comportement opposé est observé pour la BSA marquée au terbium, sa durée de vie (1,31 ms) étant légèrement plus courte que celle du complexe [TbL⁷]Na (**Tableau 39**).

Tableau 39. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence des protéines marquées BSA-Ln et des complexes libres [LnL⁷]Na correspondants (Ln=Eu, Tb) dans l'eau à température ambiante.

Composé	τ ^{300K} (ms)	Ф ^{300К} (%)
BSA-Eu	1,10	13
[EuL ⁷]Na	0,62	8
BSA-Tb	1,31	28
$[TbL^7]Na$	1,48	31

La même tendance est observée pour les rendements quantiques des protéines marquées. En effet, le rendement quantique est significativement plus élevé dans le cas de l'europium (13% pour la BSA-Eu) et légèrement plus faible pour le terbium (28% pour la BSA-Tb) (**Tableau 39**).

L'augmentation de la durée de vie et du rendement quantique de luminescence de la BSA marquée à l'europium peut être attribuée au remplacement partiel de la molécule d'eau en première sphère de coordination par d'autres groupements coordinants provenant d'acides aminés présents à la surface de la protéine. Parmi eux nous pouvons citer les fonctions alcool (sérine, thréonine), amide (asparagine, glutamine), carboxylate (aspartate, glutamate) ou encore thiol (cystéine). L'efficacité des désactivations non radiatives dues au solvant en serait donc réduite. Par extension, la BSA marquée au terbium devrait subir les mêmes effets, mais il a déjà été observé que des changements dans la sphère de coordination de l'ion Tb³⁺ (coordination d'anions par exemple) au sein de complexes pouvaient avoir une influence sur leurs propriétés photo-physiques ne pouvant pas être simplement expliqués par le déplacement de molécules d'eau coordinées.¹⁴⁶

1.6. Microscopie de luminescence en temps résolu.

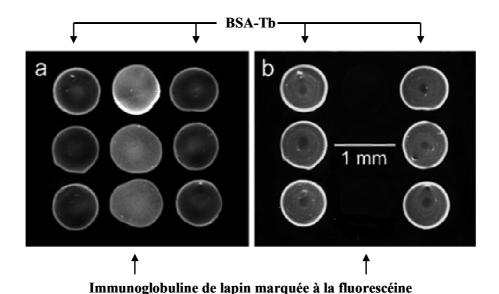


Figure 61. Microscopie de fluorescence (a) et de luminescence en temps résolu avec un délai de 0,5 ms (b) d'un ensemble de 3 × 3 gouttelettes contenant de la BSA-Tb (colonnes de gauche et droite) ou de l'immunoglobuline de lapin marquée à la fluorescéine (colonne du milieu).

⁻

¹⁴⁶ Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J.-M.; Mathis, G. J. Alloys Compd. 1992, 180, 363.

La BSA-Tb a été choisie pour illustrer l'utilisation des nos complexes de lanthanides en tant que marqueurs pour la microscopie de luminescence en temps résolu (MTLR). Des clichés de MLTR ont été obtenus à partir de gouttelettes d'environ 800 µm de diamètre de solutions contenant soit de la BSA-Tb (2-3 ng), soit de l'immunoglobuline de lapin marquée à la fluorescéine (**Figure 61**).

L'anticorps marqué à la fluorescéine et la BSA marquée au terbium apparaissent tous les deux sur le cliché de fluorescence prompte (**Figure 61a**). Lorsqu'un délai de 0,5 ms est appliqué, la fluorescence de la fluorescéine disparaît alors que la luminescence du complexe de Tb³⁺ est toujours intense (**Figure 61b**). Une analyse quantitative des signaux montre que la mesure de luminescence en temps résolu conduit à une augmentation d'un facteur 1000 du rapport des intensités d'émission du complexe de Tb³⁺ et de la fluorescéine par rapport à la fluorescence de ces espèces.

Les marqueurs que nous venons de présenter possèdent des durées de vie et des rendements quantiques élevés, ce qui permet d'envisager le développement de dosages reposant sur des techniques d'imagerie en temps résolu, notamment à l'aide de sondes biospécifiques marquées avec de tels composés. Dans ce cas, le bruit de fond résultant de la fluorescence du milieu étudié pourra être efficacement supprimé.

2. Marquage de particules de silice. 142

Les complexes activés $[LnL^{7*}]$ présentent de nombreux avantages et permettent le marquage de composés comme nous venons de le voir. Leur faible solubilité dans l'eau (environ 5.10^{-4} mol. L^{-1} au maximum) constitue toutefois un inconvénient majeur et restreint leur utilisation à certains milieux particuliers (DMSO, solutions tamponnées...).

Nous allons maintenant présenter la modification de la nature de l'ester activé pour contrebalancer le côté hydrophobe du chélate, puis les premières applications des complexes activés [LnL^{7#}] (Ln = Eu, Tb) au marquage de particules inorganiques, ainsi qu'un nouveau montage de microscopie de luminescence en temps résolu testé avec les particules marquées. Le composé inorganique choisi est un gel de silice fonctionnalisé par des chaînes latérales de

type 3-aminopropyle (1,46 mmol d'azote par gramme), qui se révèle être par ailleurs un catalyseur hétérogène efficace pour la condensation de Knoevenagel. 147

2.1. Activations des complexes en esters sulfo-NHS.

Dans le but de conserver l'approche de marquage déjà validée, nous avons simplement choisi de remplacer le NHS par un de ses dérivés fonctionnalisé avec un groupement sulfonate, le sel monosodique du *N*-hydroxysulfosuccinimide noté sulfo-NHS. Celui-ci est connu pour rendre possible le marquage de protéines avec des composés hydrophobes, en solution aqueuse à pH physiologique.¹⁴⁸

Schéma 33. Synthèse des complexes activés sulfo-NHS [LnL^{7#}]·nH₂O (Ln=Eu, Tb, Gd).

L'activation des complexes [LnL⁷]Na est conduite comme auparavant en présence de chlorhydrate d'EDC dans du DMSO à température ambiante (**Schéma 33**). Le complexe de départ est complètement solubilisé au bout de quelques heures et la solution est limpide en fin de réaction. L'ester activé sulfo-NHS [LnL^{7#}] étant plus soluble que l'ester activé NHS [LnL^{7*}], il ne précipite pas hors du milieu au cours de sa formation. Un ajout de THF permet de précipiter le produit voulu, qui est ensuite isolé par centrifugation puis séché sous pression réduite.

Seul le complexe de terbium activé au sulfo-NHS [TbL^{7#}]·5H₂O a pu être caractérisé par analyse élémentaire (**Tableau 40**). Cette analyse révèle la présence d'une molécule d'eau supplémentaire à l'état solide par rapport au complexe libre [TbL⁷]Na·4H₂O ou activé au NHS [TbL^{7*}]·4H₂O, ce qui est concordant avec la présence d'un groupement hydrophile supplémentaire (sulfonate de sodium). Notons que le sulfo-NHS commercial se présente sous

¹⁴⁸ Staros, J. V. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3950.

_

¹⁴⁷ Angeletti, E.; Canepa, C.; Martinetti, G.; Venturello, P. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 1989, 105.

la forme d'un sel monohydraté. Le complexe activé [TbL^{7#}]•5H₂O est ainsi obtenu avec un rendement de 81%.

Tableau 40. Analyse élémentaire du complexe activé [TbL^{7#}]·5H₂O.

	C (%)	H (%)	N (%)
Valeurs calculées	38,99	3,37	8,27
Valeurs mesurées	39,20	3,56	8,39

La spectroscopie de masse FAB^+ permet toutefois de mettre en évidence sans ambiguïté le complexe activé protoné $[LnL^{7\#} + H]^+$ dans le cas de l'europium, et ne révèle que des résidus résultant de la perte de fragments succinimidyle pour le terbium et le gadolinium. Les spectres IR des complexes activés au sulfo-NHS sont semblables à ceux des complexes activés au NHS, les vibrations d'élongation symétrique ($\nu_{SO_2,sym.}$ à 1039-1045 cm⁻¹) et asymétrique ($\nu_{SO_2,asym.}$ à 1222-1231 cm⁻¹) confirment la présence du groupement sulfonate.

Bien que la solubilité des esters activés [LnL^{7#}] soit accrue, leur plus grande réactivité les rend plus sensibles à l'eau, en particulier à l'humidité de l'air. Pour éviter toute décomposition précoce, ils sont conservés à -30°C au réfrigérateur. Ainsi, cette voie d'activation se révèle être aussi efficace avec le sulfo-NHS qu'avec le NHS, et permet d'obtenir les complexes activés [LnL^{7#}]·nH₂O avec un rendement moyen de 68% en deux étapes à partir du ligand L⁷H₄.

2.2. Réaction de couplage.

La silice fonctionnalisée est mise à réagir soit avec les complexes activés au NHS ([LnL^{7*}]) ou au sulfo-NHS ([LnL^{7#}]) comme émetteurs à durées de vie élevées, soit avec de la fluorescéine isothiocyanate commerciale comme sonde fluorescente de référence (**Schéma 34**).

Schéma 34. Marquage des particules de silice fonctionnalisées avec les complexes activés [LnL^{7*}] ou [LnL^{7*}] (Ln=Eu, Tb) ou la fluorescéine isothiocyanate.

En pratique, les particules de silice sont mises en suspension dans 1 mL d'éthanol contenant 100 μL de triéthylamine. Deux équivalents de marqueur luminescent en solution dans un mélange équivolumique d'éthanol et de DMSO sont ajoutés, puis la solution est agitée vigoureusement pendant deux heures à température ambiante. Les particules de silice sont isolées par décantation, lavées avec de petites portions d'éthanol jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus luminescent sous irradiation UV et enfin rigoureusement séchées sous pression réduite. Dans une dernière expérience, un marquage mixte est effectué en remplaçant les deux équivalents de marqueur [LnL^{7*}] par un équivalent de [EuL^{7*}] et un équivalent de [TbL^{7*}].

2.3. Caractérisation.

Tous les échantillons ont été caractérisés par microscopie électronique à balayage MEB couplée à une analyse chimique des surfaces par EDX (Energy Dispersive X-ray analysis). Il en découle que le marquage du gel de silice n'induit pas une modification de la morphologie des particules (**Figure 62**). Des grains de forme irrégulière avec une taille comprise entre 20 et 80 µm sont observés. L'analyse EDX permet de vérifier la présence (silice marquée à l'europium ou au terbium) ou l'absence (silice de départ ou marquée à la fluorescéine) des différents lanthanides à la surface des particules.

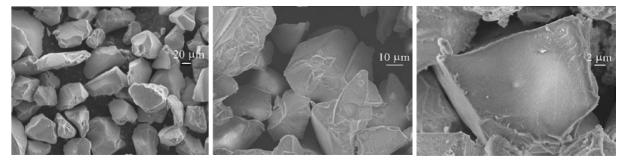


Figure 62. Clichés MEB de particules de silice non marquées (à gauche, \times 300), marquées à l'europium (au milieu, \times 1000) et au terbium (à droite, \times 3500).

2.4. Microscopie de luminescence en temps résolu.

Un mélange de particules marquées à la fluorescéine, à l'europium et au terbium a été étudié par microscopie de luminescence en temps résolu. Dès lors qu'un délai suffisant (50 µs) est établi entre le pulse d'excitation et l'intégration du signal, la fluorescence des particules marquées à la fluorescéine disparaît complètement alors que la luminescence des particules marquées par les lanthanides reste très intense (**Figure 63**).

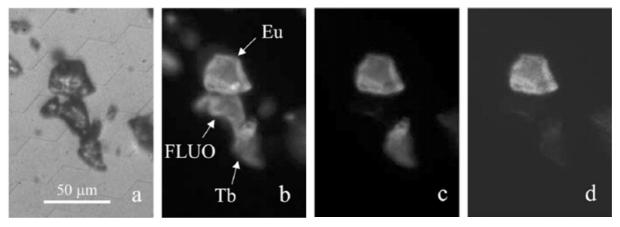


Figure 63. Microscopie en transmission (a), de fluorescence (b) et de luminescence en temps résolu (c, d) d'un mélange de particules de silice marquées à la fluorescéine (FLUO), à l'europium (Eu) et au terbium (Tb). Les délais appliqués en temps résolu sont de 50 μs (c) et 3 ms (d).

Le tracé de l'intensité d'émission collectée par la caméra CCD en fonction du temps permet d'obtenir le profil de décroissance de l'intensité de luminescence des particules marquées à l'europium et au terbium, à partir duquel les durées de vie des états excités peuvent être calculées (**Figure 64**). Les courbes de régression monoexponentielle conduisent à des durées de vie de 1,38 ms pour l'Eu³⁺ et 0,57 ms pour le Tb³⁺.

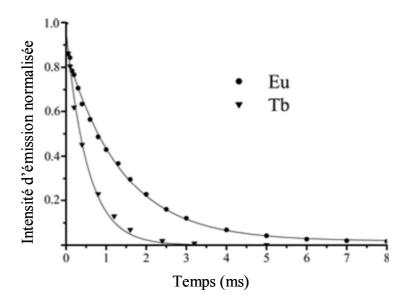


Figure 64. Tracé de l'intensité d'émission normalisée en fonction du temps pour les particules de silice marquées à l'europium ou au terbium. Les courbes de régression monoexponentielle sont représentées (—).

De manière générale, ce système permet la cartographie des durées de vie de luminescence supérieures à 20 µs, limite qui peut théoriquement être abaissée à 4-5 µs si une correction tenant compte de la diffraction de lumière est appliquée. Cela présente un intérêt tout particulier lorsque la sonde luminescente répond à des stimuli localisés comme la présence d'anions¹⁴⁹ ou de protons¹⁵⁰ en solution, permettant ainsi de remonter à la concentration de l'espèce perturbatrice considérée.

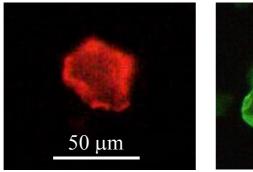
2.5. Propriétés photo-physiques.

Après excitation des particules marquées à l'europium ou au terbium dans une gamme UV comprise entre 300 et 360 nm, l'énergie lumineuse est absorbée par les chromophores (bipyridines) puis transférée du ligand vers le lanthanide. Les spectres d'émission présentent une luminescence intense dans le rouge pour l'europium ($\lambda_{max.} = 615$ nm) et dans le vert pour terbium ($\lambda_{max.} = 540$ nm), bandes caractéristiques⁹ de leurs transitions électroniques *f-f* (**Figure 65**). Dans les mêmes conditions, les particules marquées à la fluorescéine conduisent à la fluorescence jaune-verte attendue, dont l'intensité est toutefois réduite par la présence de fonctions thiourée (susceptibles de désactiver la luminescence) et par un domaine d'excitation non optimisé.

_

¹⁴⁹ Bretonnière, Y.; Cann, M. J.; Parker, D.; Slater, R. Chem. Commun. 2002, 1930.

¹⁵⁰ Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Fusi, V.; Masotti, A.; Valtancoli, B.; Roque, A.; Pina, F. *Chem. Commun.* **2000**, 561.



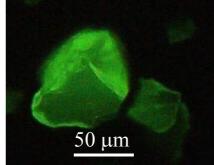


Figure 65. Clichés en couleurs réelles des particules de silice marquée à l'europium (à gauche) ou au terbium (à droite) obtenus par microscopie de fluorescence conventionnelle.

Alors que les particules marquées semblent fonctionnalisées de manière homogène en surface, la microscopie de fluorescence révèle la présence de particules non marquées présentant une fluorescence bleue intense, et ce quelque soit le marqueur utilisé. Ce phénomène peut être relié à la nature même de la silice employée et résulter en particulier de défauts de mouture.

Les durées de vie de luminescence des particules de silice marquées à l'europium et au terbium diffèrent de celles des complexes libres correspondants (**Tableau 41**).

Tableau 41. Durées de vie de luminescence des particules de silices marquées SiO₂-Ln et des complexes libres [LnL⁷]Na correspondants (Ln=Eu, Tb).

Composé	τ ^{300K} (ms)	
SiO ₂ -Eu	1,38	
[EuL ⁷]Na	0,62	
SiO ₂ -Tb	0,57	
$[TbL^7]Na$	1,48	

Dans le cas de l'europium, la durée de vie du composé marqué est plus que doublée par rapport au complexe [EuL⁷]Na. Le remplacement d'une molécule d'eau par une molécule de DMSO en première sphère de coordination du cation lanthanide au cours de l'étape de marquage peut vraisemblablement être à l'origine de cette forte augmentation, le déplacement de la molécule d'eau diminuant les possibilités de désactivations non radiatives qui étaient rendues efficaces par la proximité des oscillateurs O-H coordinés. La présence de DMSO est confirmée par l'analyse EDX, qui révèle des taux élevés de soufre dans les échantillons marqués.

La tendance inverse est observée dans le cas du terbium, les particules marquées présentant une durée de vie significativement plus courte que le complexe de référence [TbL⁷]Na. Bien que les complexes de Tb³⁺ soient de manière générale moins sensibles aux désactivations non radiatives dues aux oscillateurs O-H, le déplacement de la molécule d'eau coordinée de la silice marquée devrait conduire à une augmentation de sa durée de vie. Le remplacement de la molécule d'eau par une molécule de DMSO bien plus volumineuse peut toutefois perturber la géométrie du complexe en induisant des changements de la position en énergie de l'état triplet ${}^3\pi\pi^*$ centré sur le ligand. Ces modifications subtiles sont difficiles à quantifier mais peuvent avoir des conséquences néfastes sur les propriétés de luminescence du complexe de terbium, tout particulièrement lorsque l'écart entre l'état émetteur de Tb³⁺ (5D_4) et l'état triplet de plus basse énergie du ligand (${}^3\pi\pi^*$) est proche de la limite proposée par Latva et al. 12 (1850 cm⁻¹). Comme nous l'avons vu auparavant (Chapitre III), cet écart est de l'ordre de 1700 cm⁻¹ dans notre cas.

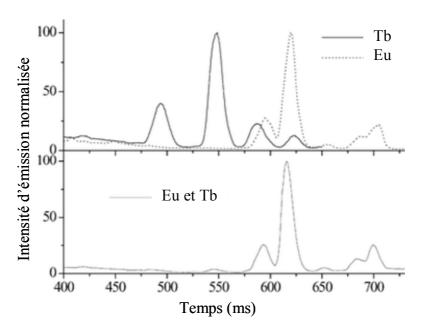


Figure 66. Spectres d'émission à l'état solide et à température ambiante de particules de silice marquées à l'europium ou au terbium (en haut) et de particules résultant du marquage mixte à l'europium et au terbium (en bas).

Alors que le mélange de particules marquées à l'europium et de particules marquées au terbium présente des émissions distinctes dans le rouge et dans le vert respectivement, les particules résultant du marquage mixte avec les deux marqueurs à la fois ne montrent que l'émission de l'europium. Dans ce cas, l'analyse EDX confirme bien la présence des deux cations lanthanides à la surface des particules de silice, et des mesures sur un échantillonnage de différentes particules conduisent à des pourcentages atomiques relatifs de 64% en Eu³⁺ et

36% en Tb³⁺. Le profil de décroissance d'intensité de luminescence mesuré par MLTR conduit à une courbe de régression monoexponentielle et à une durée de vie de 1,33 ms quasiment identique à celle trouvée pour les particules marquées à l'europium seul (1,38 ms).

La raison de l'absence de luminescence à partir du terbium peut être trouvée dans l'analyse des spectres d'émission à l'état solide des différents échantillons (**Figure 66**). Dans les différents cas, une partie du spectre d'émission est dominée vers les hautes énergies (de 400 à 480 nm) par la fluorescence même de la silice, fluorescence qui disparaît lorsque l'on passe en mode phosphorescence avec un délai de 10 μ s. Les autres bandes d'émission sont caractéristiques des transitions électroniques $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ pour l'europium et $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ pour le terbium (J = 0-6). Dans le cas du marquage mixte, les bandes d'émission correspondant au Tb³⁺ sont faibles, ce qui explique pourquoi la microscopie n'a révélé que la luminescence de l'Eu³⁺.

Sans la détermination de rendements quantiques de luminescence, il n'est pas possible de savoir si l'émission du terbium est normale ou au contraire réduite par la présence d'europium. Une preuve de cette dernière possibilité est fournie par la mesure des durées de vie de luminescence effectuée sur le spectrofluorimètre PerkinElmer LS 50B. La décroissance d'intensité à 540 nm (transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$) et à 486 nm (${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$) n'est pas strictement monoexponentielle. Une régression biexponentielle révèle deux durées de vie (0,085 et 0,69 ms), la valeur la plus élevée pouvant être attribuée à une émission non perturbée du Tb³⁺ par comparaison avec celle des particules marquée au terbium seul (0,57 ms). D'après les facteurs préexponentiels, cette espèce correspond à environ 30% des espèces marquées au terbium.

L'autre espèce, qui est majoritaire à hauteur de 70%, possède une durée de vie plus courte, qui peut provenir d'un transfert d'énergie du terbium vers l'europium. 9,151 Ce transfert résulte d'un recouvrement du spectre d'émission du terbium et du spectre d'absorption de l'europium dans une région correspondant aux transitions électroniques f-f. En première approximation, le spectre d'absorption et d'émission de l'europium peuvent être confondus grâce aux faibles déplacements de Stokes des transitions f-f. Dans ces conditions, le recouvrement est effectivement observé pour des longueurs d'onde supérieures à 575 nm, où les transitions électroniques $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ (J < 5) du terbium se superposent à celles de l'europium. Ainsi, la

¹⁵¹ Piguet, C.; Bünzli, J.-C. G.; Bernardinelli, G.; Hopfgartner, G.; Williams, A. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8197.

durée de vie la plus courte (0,085 ms) peut être vue comme une valeur moyenne pour les atomes de terbium sujets au transfert d'énergie $Tb^{3+} \rightarrow Eu^{3+}$ en raison de la distribution statistique des atomes d'europium et de terbium à la surface des particules.

L'efficacité η du transfert d'énergie vers l'europium peut être calculé à l'aide de la relation :9

$$\eta = 1 - \frac{\tau}{\tau_0}$$

 τ représente la durée de vie de l'échantillon mixte en présence de l'accepteur (Eu³⁺) et τ_0 celle de l'échantillon pur (SiO₂-Tb). Dans notre cas, l'efficacité du transfert d'énergie vers l'europium est de 85%.

Cette étude a permis d'illustrer l'utilisation des composés activés $[LnL^{7^*}]$ en tant que marqueurs de cibles inorganiques. Un nouveau dispositif de microscopie de luminescence en temps résolu a été mis au point, ¹⁵² nous permettant de cartographier les durées de vie d'échantillons solides.

3. Utilisation en IRM.

Nous allons maintenant présenter l'utilisation concomitante du complexe activé [GdL^{7#}] comme agent de contraste pour l'IRM et du complexe activé [TbL^{7#}] en microscopie de luminescence en temps résolu (**Figure 67**), fournissant ainsi un dispositif original d'analyse bimodale.

 $[Ln\textbf{L}^{\textbf{7}\#}(H_2O)]$

Figure 67. Structure du complexe activé [LnL^{7#}] avec une molécule d'eau en première sphère de coordination.

-

¹⁵² Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F.; Roda, A.; Guardigli, M. La Lettre des Sciences Chimiques 2003, 80, 5.

3.1. Approche bimodale.

Bien que les complexes d'Eu³⁺, de Tb³⁺ et de Gd³⁺ formés avec un ligand donné soient généralement isostructuraux (contraction du rayon ionique inférieure à 2% de Eu³⁺ à Tb³⁺ pour un nombre de coordination de 9), il est souvent nécessaire de concevoir des ligands spécifiques à l'application visée (IRM, MLTR...). D'une part, la présence d'au moins un site vacant accessible aux molécules d'eau en première sphère de coordination du gadolinium est indispensable pour toute application en IRM. D'autre part, les complexes d'europium ou de terbium destinés à la microscopie de luminescence en temps résolu doivent protéger au mieux le cation lanthanide des molécules de solvant pour minimiser les désactivations non radiatives par les oscillateurs O-H.

L'utilisation de complexes basés sur un seul et même ligand pour des applications à la fois en IRM et MLTR nécessite la prise en compte de ces restrictions, bien qu'elles semblent opposées de prime abord. Limiter l'accès des molécules d'eau à la seconde sphère de coordination ou aux sphères externes du Gd³⁺ ne permettra pas d'obtenir une relaxivité suffisamment élevée pour l'IRM. Il est cependant possible d'obtenir des complexes avec des propriétés photo-physiques élevées malgré la présence d'une molécule d'eau coordinée au lanthanide (Eu³⁺, Tb³⁺), en particulier dans le cas du terbium qui est lui moins sensible aux désactivations non radiatives par les oscillateurs O-H.

Dans cette optique, les complexes de terbium et de gadolinium en série glutamique semblent constituer des candidats idéaux permettant les deux types d'application car ils possèdent tous les deux une molécule d'eau en première sphère de coordination alors que le complexe de Tb^{3+} conserve une durée de vie ($\tau^{300K} = 1,48$ ms) et un rendement quantique ($\Phi^{300K} = 31\%$) de luminescence excellents en solution aqueuse.

3.2. Microscopie de luminescence en temps résolu.

De nombreux complexes ont été développés et étudiés pour leurs propriétés soit relaxométriques (IRM) soit photo-physiques (MLTR), mais peu nombreux sont les composés qui peuvent prétendre jouer sur les deux tableaux à la fois. Cet état de fait peut s'expliquer par

le défaut de chromophores à l'origine de l'effet d'antenne dans la plupart des complexes de Gd³⁺. Des unités pyridiniques ont été introduites sur des dérivés du DOTA¹⁵³ ou incorporées à des structures macrocycliques, ^{154,155} mais aucun marqueur bimodal pouvant être couplé de façon covalente à des biomolécules n'a fait ses preuves jusqu'à présent.

Dans un premier temps, le complexe de terbium [TbL⁷]Na a été utilisé comme marqueur luminescent en MLTR. Grâce à leur polarité élevée, nous pouvons supposer que les complexes de cette famille possèdent une bonne affinité avec les zones localement hydrophiles. Des coupes de cerveau de rat ont ainsi été incubées avec une solution aqueuse de [TbL⁷]Na puis examinées par microscopie de luminescence en temps résolu. Deux zones distinctes du cerveau sont représentées sur la **Figure 68**. Le parenchyme cérébral (clichés du haut) est l'ensemble des cellules qui constitue le tissu fonctionnel du cerveau. Les plexus choroïdes (clichés du bas) sont des organes de petite taille localisés à l'intérieur des ventricules intracérébraux. Ces ventricules, contenus au centre du cerveau et de la moelle épinière, sont remplis de liquide céphalorachidien sécrété par les plexus choroïdes.

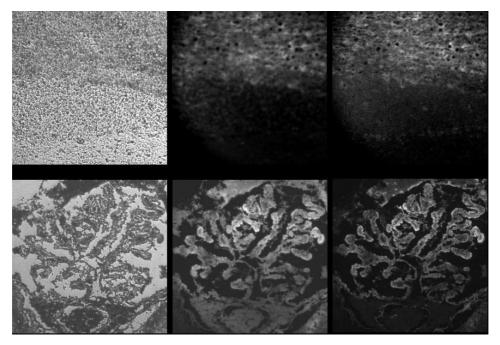


Figure 68. Microscopie en transmission (à gauche), de fluorescence (au milieu) et de luminescence en temps résolu (à droite) de coupes de cerveau de rat imprégnées du complexe $[TbL^7]Na$. Les clichés du haut représentent le parenchyme cérébral, ceux du bas les plexus choroïdes. Le délai appliqué en temps résolu est de $50 \, \mu s$.

¹⁵³ Congreve, A.; Parker, D.; Gianolio, E.; Botta, M. J. Chem. Soc., Dalton Trans. 2004, 1441.

¹⁵⁴ Bornhop, D. J.; Hubbard, D. S.; Houlne, M. P.; Adair, C.; Kiefer, G. E.; Pence, B. C.; Morgan, D. L. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2607.

¹⁵⁵ Aime, S.; Gianolio, E.; Corpillo, D.; Cavallotti, C.; Palmisano, G.; Sisti, M.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 615.

Le parenchyme cérébral, principalement hydrophobe, révèle un marquage sporadique limité aux vaisseaux sanguins. Les plexus choroïdes présentent quant à eux des domaines fortement luminescents, en particulier au niveau de la barrière hémato-encéphalique composée principalement de cellules épithéliales plutôt hydrophiles. L'acquisition en temps résolu avec un délai temporel de 50 µs permet de s'affranchir efficacement de l'auto-fluorescence de l'échantillon observé ainsi que de la diffraction de lumière dans le microscope.

Le complexe de Tb³⁺ se concentre principalement dans les zones cérébrales hydrophiles et permet leur détection localisée. Cette propriété revêt un intérêt tout particulier dans le diagnostic de maladies comme l'encéphalopathie où les frontières de la barrière hématoencéphalique sont altérées.¹⁵⁶

3.3. Mesure des relaxivités.

Dans un deuxième temps, les propriétés du complexe de gadolinium $[GdL^7]$ Na ont été étudiées par la mesure de la relaxivité longitudinale r_1 et transversale r_2 en solution aqueuse (**Tableau 42**).

Tableau 42. Relaxivités de [GdL⁷]Na et de la BSA marquée au gadolinium dans l'eau à 37°C.

Composé	Fréquence (MHz)	Champ (T)	$r_1 (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$r_2 (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$
[GdL ⁷]Na	20	0,48	3,5	3,7
[GdL ⁷]Na	60	1,43	3,3	3,8
[GdL ⁷]Na	300	7,14	3,5	4,4
BSA-Gd	200	4,7	5,5	17,9

Les valeurs trouvées sont en bon agrément avec celles de petits complexes de gadolinium mono *aqua* comme [Gd(**DTPA**)(H₂O)]²-, [Gd(**DOTA**)(H₂O)]⁻ ou [Gd(**DTPA-BMA**)(H₂O)]
¹⁵⁷ (**Figure 69**).

_

¹⁵⁶ Namer, I. J.; Steibel, J.; Poulet, P.; Armspach, J. P.; Mohr, M.; Mauss, Y.; Chambron, J. *Brain* **1993**, *116*, 147.

¹⁵⁷ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.

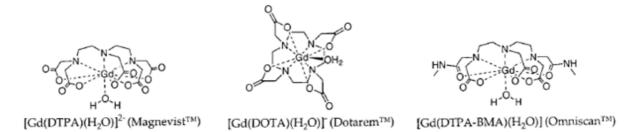


Figure 69. Structure de trois complexes de gadolinium de référence.

Tableau 43. Relaxivités des composés de référence dans l'eau à une fréquence de 20 MHz. 157

Composé	Température (°C)	$r_1 (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$	$r_2 (\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1})$
$[Gd(\mathbf{DTPA})(H_2O)]^{2-}$	25	4,3	-
$[Gd(\mathbf{DOTA})(H_2O)]^{-1}$	39	3,56	4,75
$[\mathrm{Gd}(\mathbf{DTPA\text{-}BMA})(\mathrm{H}_2\mathrm{O})]$	35	3,96	-

Le profil de dispersion de la relaxivité (spectre NMRD) de $[GdL^7]$ Na (**Figure 70**) dans l'eau présente deux plateaux pour des champs faibles (0,01 MHz) et forts (100 MHz), ce qui est caractéristique des complexes ayant un temps de corrélation rotationnel τ_R très court (de 50 à 150 ps). ¹⁵⁸

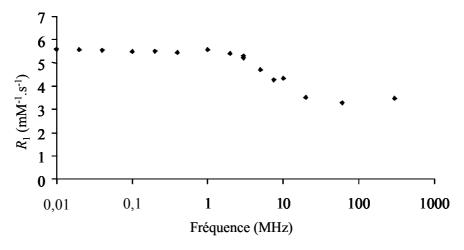


Figure 70. Profil de dispersion de relaxivité (spectre NMRD) de [GdL⁷]Na dans l'eau à 37°C.

Le greffage covalent du complexe de gadolinium sur une macromolécule devrait permettre d'augmenter τ_R et ainsi d'obtenir des relaxivités élevées. La BSA a ainsi été marquée avec le complexe de gadolinium activé au sulfo-NHS selon la méthode précédemment décrite⁵² puis purifié par dialyse avec un filtre à 8000 Da pendant 24 heures à 4°C. Le taux de marquage observé est d'environ 7 ± 1 complexes de Gd³⁺ par protéine, cette valeur étant du même ordre

-

¹⁵⁸ Lauffer, R. B. Chem. Rev. **1987**, 87, 901.

de grandeur que pour l'europium et le terbium(III). Pour un champ de 4,7 T (200 MHz), r_1 n'augmente que faiblement (5,5 mM⁻¹.s⁻¹) alors que l'influence sur r_2 est d'une amplitude beaucoup plus importante (17,9 mM⁻¹.s⁻¹) (**Tableau 42**).

En conclusion, les complexes activés en série glutamique constituent une famille de composés utilisables aussi bien en tant que marqueurs luminescents pour la microscopie de luminescence en temps résolu, qu'en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique. Grâce à leurs propriétés photo-physiques et magnétiques supérieures et à la facilité de marquage de protéines, ces composés ouvrent la voie à un vaste champ d'applications. Une approche bimodale permet d'utiliser les complexes de terbium et de gadolinium de manière indépendante dans des expériences séparées ou simultanées avec un mélange des deux composés. Un axe de développement prometteur est l'utilisation simultanée du complexe de Gd³⁺ pour des observations macroscopiques et du complexe de Tb³⁺ pour des observations microscopiques.

Chapitre V.

Optimisation du ligand en série glutamique.

Chapitre V. Optimisation du ligand en série glutamique.

Les complexes [LnL⁷]Na présentent des caractéristiques photo-physiques intéressantes (Chapitre III) avec un fort potentiel d'application (Chapitre IV), aussi bien comme marqueurs luminescents pour la microscopie de luminescence en temps résolu (Eu³⁺, Tb³⁺) ou comme agents de relaxation (Gd³⁺). Leurs propriétés spectroscopiques et physico-chimiques (absorption, émission, stabilité...) peuvent toutefois être affinées. Pour ce faire, nous allons présenter dans ce dernier chapitre les différentes modifications apportées à la structure du chélate.

Les variations chimiques du ligand L^7H_4 ont été explorées selon trois axes (**Figure 71**) :

- modification de la fonction anionique portée par les bipyridines pour renforcer la stabilité et la solubilité des complexes ;
- modification des chromophores pour obtenir un déplacement du spectre d'absorption des complexes vers les faibles énergies;
- modification du squelette pour déplacer la molécule d'eau coordinée et exalter les propriétés photo-physiques des complexes.

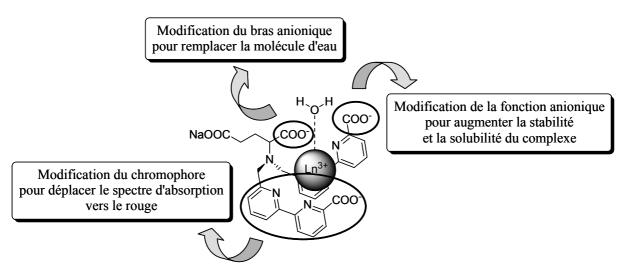


Figure 71. Modifications envisagées du complexe [LnL⁷]Na.

1. Passage aux phosphonates.

1.1. Synthèse des ligands L⁸Na₄ et L⁹Na₆.

Dans le but de tirer profit de la grande affinité des acides phosphoniques pour les cations métalliques, ¹¹³ la réaction de phosphorylation décrite auparavant ¹¹² a été appliquée au composé **39** donnant ainsi accès à deux nouveaux ligands en série glutamique, **L**⁸Na₄ et **L**⁹Na₆ (**Schéma 35**). Le remplacement des carboxylates portés par les bipyridines par des phosphonates peut conduire à une augmentation de la constante de stabilité des complexes de lanthanides formés¹¹³ et au déplacement de la molécule d'eau coordinée, ¹⁵⁵ les groupements phosphonate étant plus encombrants. Simultanément, l'efficacité du transfert d'énergie en leur sein pourrait être améliorée pour conduire à des propriétés d'émission accrues.

Schéma 35. Synthèse des ligands L⁸Na₄ et L⁹Na₆.

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II, il est possible de convertir aisément une 6-bromo-2,2'-bipyridine en 6-diéthylphosphono-2,2'-bipyridine par une réaction de phosphorylation catalysée par du palladium(0).¹¹³ Cette méthode a été appliquée avec succès

au substrat 39, qui a la particularité de présenter non pas une mais deux unités de type 6-bromo-2,2'-bipyridine. Notons qu'après une nuit de réaction à chaud en présence de 2,3 éq. de diéthylphosphite, le brut réactionnel révèle la présence de substrat de départ et de nombreux intermédiaires (produit monophosphorylé...), la réaction n'est donc pas à ce stade encore totalement déplacée vers la formation des produits. Un équivalent supplémentaire de diéthylphosphite est alors ajouté ainsi qu'une nouvelle portion de catalyseur, puis la réaction est poursuivie pendant 16 heures à 100°C.

Malgré toutes les précautions prises lors de la mise en œuvre de cette étape (séchage préalable des réactifs sous pression réduite, utilisation de solvants anhydres, dégazage de la solution à l'argon), le rendement de la réaction n'excède pas 31%, vraisemblablement à cause d'une hydrolyse partielle du produit ou des intermédiaires formés. En effet, il faut garder à l'esprit que notre substrat comporte également deux esters méthyliques particulièrement sensibles à l'hydrolyse en milieu basique à chaud, ce qui correspond aux conditions réactionnelles employées (base de Hünig, 100°C). La moindre trace d'eau introduite dans le milieu par le diéthylphosphite (huile hygroscopique) peut donc facilement conduire à l'hydrolyse de ces esters carboxyliques, ainsi que celle du diester phosphonique formé, qui est lui aussi sensible à ces conditions particulières. La formation de produits plus polaires que le composé cible 41 est confirmée par CCM du brut réactionnel.

Deux voies d'hydrolyse sont alors envisageables selon le type de ligand souhaité. Tout d'abord une saponification dans de l'eau à reflux en présence d'hydroxyde de sodium permet d'obtenir le ligand L⁸Na₄ avec un bon rendement. Dans un mélange eau/THF, ce dernier précipite sous forme de pentahydrate. D'autre part, l'hydrolyse complète du diester phosphonique 41 est possible à l'aide de bromure de triméthylsilyle. Après agitation pendant une nuit à température ambiante dans du dichlorométhane, un précipité orange se forme et la réaction est presque complète. Pour consommer totalement les esters phosphoniques résiduels, la solution est évaporée à sec puis reprise dans du chloroforme en présence d'une nouvelle fraction de TMSBr, puis la solution obtenue est portée à reflux pendant trois heures. Après évaporation du solvant, une saponification finale est réalisée pour s'assurer de l'hydrolyse complète des esters méthyliques. Le ligand L⁹Na₆ précipite dans un mélange méthanol/eau après ajout de THF, et est ainsi obtenu sous forme de dihydrate avec un rendement supérieur à 70%.

1.2. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques du ligand L⁹Na₆ et de ses complexes d'europium et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0). Le ligand L⁸Na₄ ne conduit qu'à la formation de complexes peu stables en solution aux concentrations utiles (environ 10⁻⁴ mol.L⁻¹); l'intensité de luminescence du lanthanide diminuant jusqu'à atteindre une valeur nulle à l'échelle de quelques minutes. Comme le suggèrent les résultats de la littérature, la formation d'espèces polymétalliques faiblement stabilisées peut être suspectée. Ainsi, nous avons choisi de ne pas présenter ses caractéristiques photo-physiques pour nous atteler à l'étude du ligand L⁹Na₆.

1.2.1. Ligand L⁹Na₆.

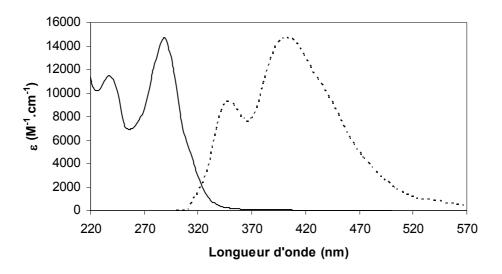


Figure 72. Spectres d'absorption (—) et d'émission (---, $\lambda_{exc.}$ =289 nm) du ligand **L**⁹Na₆ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le spectre d'absorption UV-visible du ligand L⁹Na₆ présente deux maxima à 237 nm (42200 cm⁻¹) et 289 nm (34600 cm⁻¹) ainsi qu'un épaulement à 315 nm (31700 cm⁻¹) avec des coefficients d'absorption molaire respectifs de 11400, 14700 et 4500 M⁻¹.cm⁻¹ (**Figure 72**). Les bandes d'absorption du ligand L⁹Na₆ (bras bipyridine-phosphonate) coïncident avec celles du ligand L⁷H₄ (bras bipyridine-carboxylate), alors que ses coefficients d'absorption molaires ont fortement diminué.

Le spectre d'émission présente deux bandes distinctes à 348 et 401 nm, qui disparaissent lorsqu'un délai de 40 µs est appliqué (**Figure 72**). Il est donc probablement question de fluorescence à partir d'états singulets situés à 28700 et 24900 cm⁻¹ respectivement. L'existence de ces deux bandes d'émission peut s'expliquer en s'appuyant sur le comportement de l'acide 6-phosphonique-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **12** en fonction du pH. (**Schéma 36**)

$$pK_a = -0.9/-1.0$$
 $pK_a = -0.9/-1.0$
 $pK_a = 3.06$
 $pK_a = 5.04$

Schéma 36. Equilibres et valeurs des pKa successifs lors de la déprotonation de l'acide 6-phosphonique-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **12** dans l'eau. 113

Il est intéressant de noter que dans l'eau, la bipyridine conserve une conformation cis jusqu'à la déprotonation finale grâce à l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre les doublets non liants des atomes d'azote de la bipyridine et l'acide phosphonique monoprotoné. Lorsque la déprotonation de la bipyridine est complète, la répulsion entre les doublets libres des atomes d'azote devient prépondérante et la bipyridine adopte une conformation trans, ce qui se traduit par le déplacement hypsochrome de la bande d'absorption de plus faible énergie associée aux transitions $\pi \to \pi^*$.

Dans notre cas, l'étude spectroscopique du ligand L⁹Na₆ est menée dans un domaine de pH correspondant à la deuxième acidité de l'acide phosphonique (solution aqueuse tamponnée à pH 7,0). Il est ainsi raisonnable d'envisager la coexistence des espèces L⁹H₂Na₄ et L⁹HNa₅ (conformation *cis*) et de l'espèce déprotonée L⁹Na₆ (conformation *trans*). Le maximum de la bande d'absorption de plus faible énergie va donc correspondre à une valeur moyenne pondérée selon la distribution de ces deux espèces en solution. L'épaulement apparaissant sur

le spectre d'absorption du ligand aux alentours de 31700 cm⁻¹ (315 nm) peut être raisonnablement attribué à l'espèce monoprotonée de conformation *cis*.

Nous pouvons ainsi postuler que la bande d'émission de plus faible énergie à 401 nm (24900 cm⁻¹) provient du ligand en conformation *cis* (bipyridines monoprotonées) alors que le ligand en conformation *trans* (bipyridines déprotonées) conduit à la fluorescence plus énergétique à 348 nm (28700 cm⁻¹).

1.2.2. Complexes [EuL⁹]Na₃ et [TbL⁹]Na₃.

La complexation d'un cation lanthanide(III) par le ligand L⁹Na₆ se manifeste par un déplacement bathochrome d'environ 1900 cm⁻¹ (de 289 à 306 nm) de la bande d'absorption de plus faible énergie. Un effet hyperchrome somme toute minime est observé lors de la complexation de l'europium ou du terbium, les coefficients d'absorption molaire du ligand et des complexes restant largement comparables (**Figure 73** et **Tableau 44**).

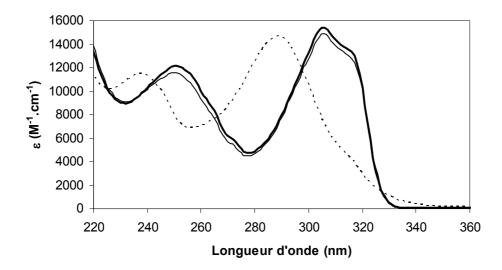


Figure 73. Spectres d'absorption du ligand L^9Na_6 (---) et de ses complexes $[EuL^9]Na_3$ (—) et $[TbL^9]Na_3$ (—) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Tableau 44. Propriétés d'absorption UV-visible du ligand L⁹Na₆ et de ses complexes [EuL⁹]Na₃ et [TbL⁹]Na₃ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	λ _{max} (nm)	$\varepsilon_{\text{max}} (M^{-1}.\text{cm}^{-1})$
L ⁹ Na ₆	289	14700
	237	11400
[EuL ⁹]Na ₃	306	14900
	250	11600
[TbL ⁹]Na ₃	305	15400
	251	12100

Les spectres d'émission des complexes [EuL⁹]Na₃ ($\lambda_{max} = 614$ nm) et [TbL⁹]Na₃ ($\lambda_{max} = 547$ nm) sont caractéristiques de leurs cations respectifs (**Figure 74**). Dans les deux cas, une bande d'émission de faible intensité se trouve aux alentours de 345 nm (29000 cm⁻¹), et disparaît dès qu'un délai temporel suffisant (30 µs) est appliqué lors de la mesure du signal. Cette bande de fluorescence est donc attribuée à l'état singulet ${}^1\pi\pi^*$ du ligand.

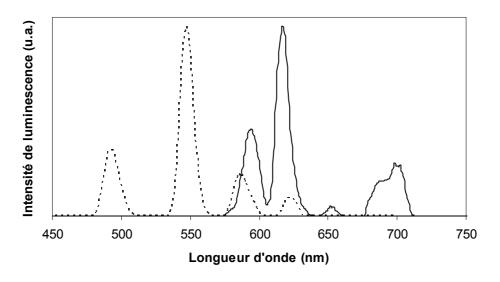


Figure 74. Spectres d'émission ($\lambda_{exc.}$ =304 nm) des complexes [EuL⁹]Na₃ (—) et [TbL⁹]Na₃ (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Pour chaque complexe, une excellente adéquation est observée entre le spectre d'absorption et le spectre d'excitation (**Figure 75**), ce qui confirme que la luminescence à partir du cation lanthanide provient d'un transfert d'énergie efficace du ligand vers le métal.³⁶

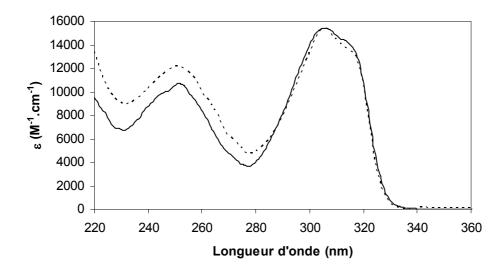


Figure 75. Spectres d'absorption (---) et d'excitation (—, $\lambda_{\text{ém.}}$ =547 nm) du complexe [TbL⁹]Na₃ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le complexe [EuL⁹]Na₃ présente deux durées de vie de luminescence à température ambiante (**Tableau 45**), signifiant qu'au moins deux espèces coexistent en solution aqueuse. L'espèce avec la durée de vie la plus élevée (1,52 ms) ne possède en moyenne que 0,1 molécule d'eau coordinée ^{41,42,43}; cela tend à prouver qu'il est possible d'éloigner la molécule d'eau coordinée aux complexes [LnL⁷]Na en remplaçant les groupements carboxylate monochargés par des groupements phosphonate dichargés. Il faut toutefois rester prudent car d'après les facteurs préexponentiels, l'espèce sans molécule d'eau coordinée est largement minoritaire face à celle ayant une durée de vie de 0,58 ms. Comme pour les complexes [LnL⁷]Na, cette seconde espèce présente 1,3 molécule d'eau coordinée en moyenne (**Tableau 46**). Notons que les durées de vie de luminescence des complexes [EuL⁹]Na₃ et [EuL⁷]Na sont du même ordre de grandeur.

Tableau 45. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence des complexes [LnL⁹]Na₃ et [LnL⁷]Na₄ (Ln=Fu, Tb). Les facteurs préexponentiels sont indiqués entre parenthèses

(Ln=Eu, <u>Tb</u>). Les facteurs préexponentiels sont indiqués entre parenthèses.

Complexe τ^{300K} (ms) Φ^{300K} (%) H_2O D_2O H_2O D_2O [EuL⁹]Na₃ 1,52 (113) 0,58 (1401) 17,2 2,89 3,3 $[TbL^{9}]Na_{3}$ 1,97 3,5 1,03 5,5 [EuL⁷]Na 0,62 8 35 2,48 [TbL⁷]Na 1,48 2,53 31 53

Tableau 46. Calcul du nombre de molécules d'eau coordinées au complexe $[EuL^9]Na_3$ avec $\tau_{H2O} = 0,58$ ms (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

	$q_{{ m H}_{ m 2O}}$	
Horrocks et Sudnick ⁴¹	Parker et al. ⁴²	Horrocks et Supkowski ⁴³
1,5	1,4	1,2

La comparaison des durées de vie et des rendements quantiques de luminescence de [LnL⁹]Na₃ et [LnL⁷]Na à température ambiante (**Tableau 45**) indique que le remplacement des carboxylates par des phosphonates sur les bipyridines entraîne une diminution des propriétés spectroscopiques des complexes. En effet, l'introduction de groupements phosphonate doublement chargés tend à augmenter la densité de charge négative sur une face de la poche de chélation. Cela peut conduire à une interaction plus faible entre le lanthanide et le carboxylate coordiné (porté par le squelette glutamate), et au déplacement de ce dernier en faveur d'une molécule d'eau désactivante. Ainsi, la coexistence de deux espèces en solution peut être raisonnablement envisagé au vu des deux durées de vie mesurées dans l'eau pour l'europium (**Tableau 45**), l'une minoritaire (7%) sans molécule d'eau coordinée, l'autre majoritaire (93%) avec une molécule d'eau en première sphère (**Schéma 37**). L'existence d'une espèce mono *aqua*, où l'interaction entre l'azote central et le lanthanide serait également réduite, peut conduire à une diminution des propriétés spectroscopiques des chélates.

Schéma 37. Equilibre supposé en solution aqueuse entre deux formes du complexe [EuL⁹]Na₃, l'une avec une molécule d'eau coordinée, l'autre sans.

D'autre part, en comparant les spectres d'émission des ligands L^9Na_6 (bipyridine-phosphonate) et L^7H_4 (bipyridine-carboxylate), la bande de fluorescence à partir de l'état singulet $^1\pi\pi^*$ de plus haute énergie subit un déplacement bathochrome de 900 cm⁻¹. Nous pouvons nous attendre à un déplacement analogue de l'état triplet $^3\pi\pi^*$, celui-ci ayant été

estimé à 22100 cm⁻¹ (grâce à la phosphorescence de [GdL⁷]Na à 77K, voir Chapitre III), il devrait se trouver aux alentours de 21200 cm⁻¹ en passant aux phosphonates, c'est-à-dire seulement 800 cm⁻¹ au-dessus de l'état émetteur ⁵D₄ du terbium. Cette estimation suggère en première approche que le transfert en retour (métal → ligand) pourrait avoir une contribution importante dans le cas de [TbL⁹]Na₃ (en série phosphonate), expliquant ainsi ses caractéristiques amoindries par rapport à [TbL⁷]Na (en série carboxylate).

Il ressort de cette étude que la substitution des groupements carboxylate par des groupements phosphonate sur les unités bipyridiniques du ligand en série glutamique ne permet pas d'améliorer notoirement les propriétés spectroscopiques des complexes correspondants. Cela se traduit dans le meilleur des cas par des propriétés analogues (durées de vie) voire amoindries (rendements quantiques).

2. Passage à la phénanthroline.

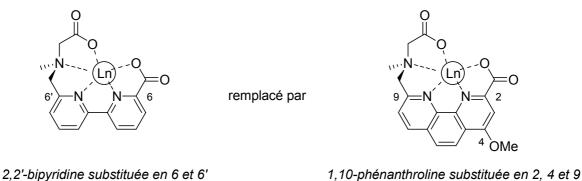




Figure 76. Bipyridine et phénanthroline substituées coordinées à un cation lanthanide Ln^{III}, ainsi que leurs précurseurs respectifs, la 6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 33 et la 9-bromométhyl-1,10-phénanthroline 46.

Comme nous l'avons vu précédemment, les complexes [LnL⁷]Na possèdent une bande d'absorption de plus basse énergie aux alentours de 32450 cm⁻¹ ($\lambda_{max} = 308$ nm). Bien que ce domaine soit accessible à l'aide d'une source pulsée adaptée (lampe flash au xénon, laser excimère XeCl...), le déplacement de la bande d'absorption de l'UV vers l'UV proche ou le visible revêt un intérêt tout particulier en permettant l'utilisation de sources d'excitation plus communes et moins intense, comme un laser à azote (émission à 337 nm). D'une part cette dernière serait moins pénétrante et destructrice pour les milieux biologiques étudiés, en particulier envers l'ADN. D'autre part l'incorporation d'une source moins demandeuse en énergie ne peut que favoriser le développement de systèmes d'analyse portatifs. C'est ce que nous avons tenté de réaliser en remplaçant les unités bipyridine par des chromophores de type phénanthroline (**Figure 76**).

2.1. Synthèse du précurseur phénanthrolinique.

La 1,10-phénanthroline et ses dérivés sont d'un grand intérêt pour leurs activités biologiques (activité cyctotoxique contre les cellules L1210 *in vitro*, activité thérapeutique contre les lymphomes *in vivo*), ¹⁵⁹ leurs propriétés de complexation et leur inclusion dans des macrocycles. Toutefois, seules quelques publications font état de dérivés monofonctionnalisés de la 2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline, communément appelée néocuproïne, qui peuvent présenter des propriétés fongistatiques importantes et offrir une voie d'incorporation sélective d'ions métalliques à des anticorps monoclonaux. 166

Nous allons exposer deux voies de synthèse de phénanthrolines dissymétriques ne nous ayant pas donnée entière satisfaction, puis en détailler une troisième qui nous a permis d'obtenir un intermédiaire phénanthrolinique susceptible d'être intégré à nos chélates.

¹⁵⁹ Mohindru, A.; Fisher, J. M.; Rabinovitz, M. *Biochem. Pharm.* **1983**, *32*, 3627.

¹⁶⁰ (a) Gillard, R. D. *Coord. Chem. Rev.* **1975**, *16*, 67. (b) Karayannis, N. M.; Speca, A. N.; Chasan, D. E.; Pytlewski, L. L. *Coord. Chem. Rev.* **1976**, *20*, 37. (c) Engbersen, J. F. J.; Koudijs, A.; Joosten, M. H. A.; van der Plas, H. C. *J. Heterocyclic Chem.* **1986**, *23*, 989.

¹⁶¹ (a) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A.; Tzimos, V. J. Heterocyclic Chem. 1982, 19, 1017. (b) Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. Chem. Rev. 1987, 87, 795. (c) Albrecht-Gary, A.-M.; Dietrich-Buchecker, C.; Saad, Z.; Sauvage, J.-P. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 1467.

¹⁶² Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 393.

¹⁶³ Newkome, G. R.; Theriot, K. J.; Gupta, V. K.; Fronczek, F. R.; Baker, G. R. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1766.

Quici, S.; Marzanni, G.; Cavazzini, M.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Gianolio, E.; Accorsi, G.; Armaroli, N.; Barigelletti, F. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2777.

¹⁶⁵ Blank, F. *Nature (London)* **1979**, *12*, 1207.

¹⁶⁶ Pollack, S. J.; Nakayama, G. R.; Schultz, P. G. Science 1988, 242, 1038.

2.1.1. Oxydation ménagée de la néocuproïne.

Dans le cadre de la préparation d'oligopyridines *bis*-fonctionnalisées, Ulrich et *al*. ont proposé la synthèse d'une 1,10-phénanthroline dissymétrique, substituée par un ester éthylique en position 2 et par un groupement bromométhyle en position 9 (**Schéma 38**). ¹⁶⁷

Schéma 38. Synthèse de la 2-carboéthoxy-9-bromométhyl-1,10-phénanthroline. 167

La néocuproïne est tout d'abord oxydée à chaud en son monoacide par du dioxyde de sélénium dans de la pyridine anhydre, puis estérifiée dans de l'éthanol en présence d'acide sulfurique concentré. L'intermédiaire formé est ensuite engagé dans une réaction de bromation radicalaire en présence de NBS et d'une quantité catalytique d'AIBN dans du benzène à reflux sous irradiation lumineuse. Après purification par HPLC préparative, le produit monobromé est isolé à hauteur de 17%. Ce rendement peut sembler modéré, en réalité il est tout à fait encourageant compte tenu des difficultés à obtenir des phénanthrolines dissymétriques. Nous n'avons toutefois pas exploité cette voie de synthèse malgré ses atouts, principalement en raison de la purification particulièrement difficile du produit par chromatographie sur colonne classique.

2.1.2. Réduction ménagée de la bis-ester-1,10-phénanthroline.

Comme la bromation radicalaire du monoester de la néocuproïne ne nous a pas donné entière satisfaction, nous avons opté pour son oxydation totale en diacide suivie de son estérification. La réduction sélective d'une seule fonction ester devrait ainsi nous donner accès à une phénanthroline dissymétrique possédant d'une part un ester et d'autre part un méthyle porteur d'un groupement nucléofuge afin de lui conférer des propriétés alkylantes (**Schéma 39**).

_

¹⁶⁷ Ulrich, G.; Bedel, S.; Picard, C.; Tisnès, P. Tetrahedron Lett. **2001**, 42, 6113.

¹⁶⁸ Wang, G.; Bergstrom, D. E. Synlett **1992**, 422.

Schéma 39. Synthèse envisagée de la 2-carbométhoxy-9-méthanesulfonyloxyméthyl-1,10-phénanthroline.

La formation en trois étapes de la 2,9-bis-(carbométhoxy)-1,10-phénanthroline à partir de la néocuproïne est décrite dans la littérature. Dans un premier temps, la 2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline est oxydée en son dialdéhyde par du dioxyde de sélénium à chaud dans du dioxanne contenant 4% d'eau, qui est lui-même oxydé en diacide dans de l'acide nitrique à 80% à reflux. Le diester méthylique correspondant est obtenu après estérification dans du méthanol préalablement saturé avec de l'acide chlorhydrique sec. Ces trois étapes permettent d'obtenir rapidement et simplement le diester recherché avec un rendement de 29%.

Parallèlement et afin de vérifier la généralité de cette méthode, nous nous sommes inspirés de la réduction ménagée de la 2,6-bis-(carbométhoxy)pyridine en son monoalcool. Celle-ci est faisable avec un très bon rendement en présence de borohydrure de sodium dans du méthanol à température ambiante¹⁷⁰ (**Schéma 40**). Nous avons essayé d'adapter ces conditions à notre substrat en modifiant le solvant et la température de réaction (**Tableau 47**).

Schéma 40. Réduction ménagée de la 2,6-bis-(carbométhoxy)pyridine. 170

Les premiers essais nous ont indiqué qu'il était préférable de déplacer au maximum l'équilibre de la réaction vers la formation des produits, quitte à former davantage de diol au détriment du monoalcool souhaité et du produit de départ recyclable. En effet, la séparation des produits par chromatographie sur colonne est plus aisée en l'absence du substrat de départ, la différence de polarité entre le diester et le monoalcool étant plus faible que celle

_

¹⁶⁹ Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A. J. Heterocyclic Chem. 1981, 18, 599.

¹⁷⁰ Jew, S.; Park, B.; Lim, D.; Kim, M. G.; Chung, I. K.; Kim, J. H.; Hong, C. I.; Kim, J.-K.; Park, H.-J.; Lee, J.-H.; Park, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 609.

entre le monoalcool et le diol. C'est pourquoi nous avons engagé 2,2 équivalents de borohydrure de sodium dans cette étape de réduction (**Schéma 39**).

Tableau 47. Mise au point de la monoréduction de la 2,9-bis-(carbométhoxy)-1,10-phénanthroline en présence de 2,2 éq. de NaBH₄.

Solvant	Température (°C)	Rendement (%)
МеОН	t.a.	-
MeOH	65	17-22
THF	60	12
Et_2O	35	-
CH_2Cl_2	40	13

La réaction n'évolue pas dans du méthanol à température ambiante, le substrat n'y étant que peu soluble. De meilleurs résultats ont été obtenus dans du méthanol porté à reflux pendant une heure (rendements de l'ordre de 20%). En passant à un solvant moins polaire et aprotique comme le THF, nous espérions diminuer la solubilité du monoalcool formé pour défavoriser la deuxième réduction conduisant au diol non désirée. En réalité le rendement de la réaction chute à 12% et il se forme un sous-produit qui n'a pas été identifié. Notons que la polarité de ce dernier est plus faible que celle du diester de départ et qu'il ne se forme pas dans les autres conditions réactionnelles testées. Lorsque l'on passe au diéthyléther, le point d'ébullition du mélange réactionnel est abaissé à 35°C et la réaction n'a pas lieu, ce qui semble être la conséquence directe de la faible solubilité des produits de départ dans ce solvant. Enfin, la réaction est possible dans du dichlorométhane à une température plus basse (40°C) que dans du THF (60°C), mais le rendement de la réduction reste du même ordre de grandeur (13%).

A ce stade, nous nous retrouvons face à une réaction qui nous permet certes d'obtenir une phénanthroline dissymétrique, mais dans des quantités limitées et avec une reproductibilité peu fiable. Il faut en effet qu'un maximum de diester de départ soit consommé en faveur du monoalcool voulu sans former une trop grande quantité de diol, le moment opportun pour arrêter la réaction est donc difficile à cerner par un simple suivi par CCM. D'autre part, la 2-carbométhoxy-9-hydroxyméthyl-1,10-phénanthroline doit encore subir une étape d'activation pour que sa fonction alcool devienne réactive vis-à-vis d'un nucléophile.

Dans le but de transformer le groupement hydroxyle porté par le carbone en position 9 de la phénanthroline, nous avons tenté de former le mésylate correspondant par une simple réaction avec du chlorure de mésyle en présence de triéthylamine dans du dichlorométhane à 0°C (**Schéma 39**). A cette température la réaction évolue peu, en laissant revenir le mélange réactionnel à température ambiante, nous observons par CCM la formation supposée du mésylate. Pour des temps de réaction supérieurs à une nuit et en présence d'un large excès de chlorure de mésyle (plus de 5 éq.), la réaction n'est que peu déplacée vers la formation du produit attendu. Cette conversion se révélant difficile, nous avons choisi d'abandonner cette voie de synthèse qui possède toutefois un potentiel intéressant et mériterait d'être optimisée en conséquence pour permettre la formation de phénanthrolines *bis*-fonctionnalisées en vue de leur intégration dans de nouveaux ligands.

2.1.3. Voie de la 8-nitroquinaldine.

Un article de la littérature¹⁷¹ décrit la formation d'une phénanthroline dissymétrique, la 2-carbométhoxy-4-hydroxy-9-méthyl-1,10-phénanthroline **44** en trois étapes à partir de la 8-nitroquinaldine (2-méthyl-8-nitroquinoline) avec un rendement global de 77% (**Figure 77**).

 $\textbf{Figure 77.} \ \ \textbf{Obtention de la 2-carbométhoxy-4-hydroxy-9-méthyl-1,10-phénanthroline 44 à partir de la 8-nitroquinaldine.}^{171}$

Ce composé simple d'accès présente les fonctionnalités souhaitées, à savoir un ester hydrolysable en acide carboxylique ou carboxylate en position 2 et un groupement méthyle en position 9 pouvant être activé par bromation radicalaire. A cela, s'ajoute une fonction hydroxyle en position 4 pouvant être protégée ou fonctionnalisée comme nous allons le voir.

-

¹⁷¹ Heindel, N. D.; Ohnmacht, C. J. *J. Heterocyclic Chem.* **1968**, *5*, 869.

Schéma 41. Synthèse de la 2-carbométhoxy-4-méthoxy-9-bromométhyl-1,10-phénanthroline 46.

La première étape consiste à réduire la 8-nitroquinaldine commerciale en 8-aminoquinaldine 42 (Schéma 41). De nombreux systèmes réducteurs ont été testés afin d'optimiser cette étape triviale de prime abord (Tableau 48). Les premiers essais ont été conduits dans des conditions classiques de réduction au dihydrogène catalysée par du palladium sur charbon dans un mélange éthanol/dichlorométhane dégazé à température ambiante. La réduction attendue a bien lieu, mais est accompagnée de la formation de sous-produits difficilement séparables de la 8-aminoquinaldine 42 par chromatographie sur colonne. La RMN ¹H semble nous indiquer qu'il s'agit de produits de réduction des noyaux aromatiques de la quinoline. La modification des conditions opératoires, de la concentration de la solution notamment, n'a pas permis de minimiser la formation de ces sous-produits indésirables.

Tableau 48. Mise au point de la réduction de la 8-nitroquinaldine en 8-aminooquinaldine 42.

Réactifs et conditions	Rendement (%)	Référence
H ₂ (5 bar), Pd/C 5% cat., EtOH/CH ₂ Cl ₂ , t.a.	42-62	-
Zn, NaOH aq., EtOH, reflux	-	172
Fe, HCl, EtOH/H ₂ O, reflux, 1h	54	173
Fe, HCl, EtOH/H ₂ O, reflux, 17h	30	173
Sm, NH ₄ Cl, MeOH, ultrasons	45	174
Na ₂ S ₂ O ₄ , H ₂ O/THF, 70°C	24	-
SnCl ₂ , HCl, Et ₂ O	86	175
HI 57 % aq., 90°C	95	177

Plusieurs types de réduction métallique ont été envisagés. Tout d'abord la réduction au zinc en milieu basique dans de l'éthanol à reflux¹⁷² ne permet pas d'observer la formation du

-

¹⁷² Piguet, C.; Bernardinelli, G.; Bocquet, B.; Quattropani, A.; Williams, A. F. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 7440.

produit 42 malgré la consommation du produit de départ. D'après la CCM, un produit de dégradation bien plus polaire se forme au détriment de l'aminoquinaldine voulue. La réduction au fer(0) en présence d'acide chlorhydrique concentré dans un mélange ethanol/eau à reflux¹⁷³ permet d'obtenir l'aminoquinaldine avec un rendement moyen (54%) après une heure de réaction. Si le temps de réaction est allongé, le rendement chute fortement (30% après 17 heures). Des résultats analogues sont obtenus par une réduction au samarium en présence de chlorure d'ammonium dans du méthanol sous ultrasons,¹⁷⁴ le rendement n'étant que de 45%. Un excès de dithionite de sodium dans un mélange eau/THF à chaud ne conduit à la formation de l'aminoquinaldine qu'à hauteur de 24%.

Deux alternatives de choix conduisant à la réduction efficace de la nitroquinaldine en aminoquinaldine 42 ont été trouvées. Selon une méthode décrite dans la littérature, ¹⁷⁵ l'ajout de chlorure d'étain(II) en solution dans de l'acide chloryhydrique concentré à une solution de 8-nitroquinaldine dans du diéthyléther permet d'obtenir après neutralisation et purification le produit 42 avec un très bon rendement (86%). Notons que la réaction est fortement exothermique et conduit rapidement au reflux du diéthyléther. L'acide iodhydrique à 57% dans l'eau à reflux est d'autre part connu pour réduire efficacement les nitropyridines en leurs aminopyridines correspondantes. ¹⁷⁶ Le meilleur résultat est ainsi obtenu à l'aide de ce réactif d'après la procédure décrite. ¹⁷⁷ Après deux heures de réaction à 90°C, la solution est neutralisée avec une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium, traitée avec une solution aqueuse de thiosulfate de sodium pour détruire le diiode formé puis extraite à l'acétate d'éthyle. Après purification par chromatographie sur colonne de silice, la 8-aminoquinaldine 42 est isolée avec un excellent rendement (95%). Notons que ce dernier système, bien qu'étant le plus efficace, nécessite l'utilisation d'acide iodhydrique, réactif difficile à conserver après ouverture, et coûteux.

Dans une deuxième étape, la 8-aminoquinaldine **42** est mise à réagir avec le diester méthylique de l'acétylènedicarboxylate dans du méthanol à l'abri de la lumière pendant une nuit. Après évaporation du solvant et filtration sur silice, le produit d'addition de Michael est

_

¹⁷³ Piguet, C.; Bünzli, J.-C. G.; Bernardinelli, G.; Bochet, C. G.; Froidevaux, P. J. Chem. Soc., Dalton Trans. **1995**, 83.

¹⁷⁴ Basu, M. K.; Becker, F. F.; Banik, B. K. Tetrahedron Lett. **2000**, 41, 5603.

¹⁷⁵ Norman, M. H.; Chen, N.; Chen, Z.; Fotsch, C.; Hale, C.; Han, N.; Hurt, R.; Jenkins, T.; Kincaid, J.; Liu, L.; Lu, Y.; Moreno, O.; Santora, V. J.; Sonnenberg, J. D.; Karbon, W. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4288.

¹⁷⁶ Bruce, W. F.; Perez-Medina, L. A. J. Am. Chem. Soc. **1947**, 69, 2571.

¹⁷⁷ Kumar, J. S. D.; Ho, M. M.; Toyokuni, T. Tetrahedron Lett. **2001**, 42, 5601.

obtenu sous la forme de l'énamine 43 de configuration *cis* avec un rendement quantitatif (Schéma 41).

L'étape finale conduisant à la formation de la phénanthroline **44** est une cyclisation thermique de l'intermédiaire **43** dans du diphényléther à reflux. Les conditions utilisées trouvent leurs racines dans la littérature. Le mécanisme que nous proposons se déroule *via* une acylation intramoléculaire mettant en jeu une substitution électrophile aromatique suivie de la perte d'une molécule de méthanol et de la réaromatisation du système (**Schéma 42**). Les conditions drastiques de cette réaction (260°C) nécessitent l'utilisation d'un chauffe-ballon adéquat pour obtenir un reflux homogène du mélange réactionnel. Après refroidissement à température ambiante, l'ajout de diéthyléther permet de cristalliser la plus grande partie du produit formé, la solution mère est quant à elle purifiée par chromatographie sur colonne de silice. La phénanthroline **44** est ainsi isolée avec un rendement de cyclisation de 83%.

De cette manière, la 2-carbométhoxy-4-hydroxy-9-méthyl-1,10-phénanthroline **44** est obtenue en trois étapes avec un rendement global de 79%. Nous avons donc mis au point des conditions opératoires nous donnant accès à cet intermédiaire clé avec une efficacité comparable à celle de la synthèse décrite dans la publication d'origine (77%). ¹⁷¹

Schéma 42. Mécanisme proposé pour la cyclisation thermique de l'intermédiaire 43.

Dans un premier temps, nous avons choisi de protéger la fonction hydroxyle de la phénanthroline **44** sous forme de méthoxy par une réaction d'alkylation avec de l'iodométhane dans des conditions classiques (K₂CO₃, CH₃CN, 80°C). La 4-méthoxy-1,10-phénanthroline **45** est obtenue avec un très bon rendement (95%) après purification. La bromation radicalaire finale est menée à bien en présence de NBS et une quantité catalytique d'AIBN dans du benzène sous irradiation lumineuse. Après 30 minutes, nous observons la formation de 37% de 9-bromométhyl-1,10-phénanthroline **46** et de 8% de 9-dibromométhyl-1,10-phénanthroline **47**. Notons que 48% de 9-méthyl-1,10-phénanthroline **45** de départ sont

-

¹⁷⁸ Cairns, H.; Cox, D.; Gould, K. J.; Ingall, A. H.; Suschitzky, J. L. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1832.

recyclés. Comme d'habitude, un bon compromis entre conversion et formation majoritaire du produit monobromé doit être trouvé, notamment grâce à un suivi minutieux par CCM de la distribution des produits au cours de la réaction. Notons que dans le cas de la phénanthroline, la purification par chromatographie sur colonne est plus délicate que pour les bipyridines présentées dans ce manuscrit, leurs propriétés physico-chimiques étant sensiblement différentes.

Nous avons maintenant entre les mains un intermédiaire intéressant qui nous permet d'incorporer le motif phénanthroline-carboxylate à un édifice moléculaire plus évolué comme le nouveau ligand $L^{10}H_4$ dont nous allons présenter la synthèse.

2.2. Synthèse du ligand L¹⁰H₄.

Schéma 43. Synthèse du ligand L¹⁰H₄.

Comme pour les bipyridines, la construction du ligand est présidée par l'incorporation des phénanthrolines par une étape d'alkylation du diester méthylique de l'acide glutamique 38 dans des conditions usuelles (base inorganique, acétonitrile à chaud). Après déprotonation du sel de ce dernier, 2,2 équivalents de 9-bromométhyl-1,10-phénanthroline 46 sont ajoutés. Après une nuit à 80°C, le brut réactionnel comporte de nombreux intermédiaires indiquant que la réaction est peu déplacée vers la formation du produit de dialkylation 48 (Schéma 43).

Une nouvelle portion de **46** (0,3 éq.) est donc ajoutée et la solution est chauffée pendant 24 heures. La réaction ne semble pas avoir beaucoup évolué d'après les CCM, et une multitude de produits résident en solution. Il est toutefois possible d'en extraire le produit attendu grâce à une chromatographie minutieuse sur colonne d'alumine, ce qui permet d'obtenir le composé **48** avec un de 14%.

Le produit de dialkylation 48 est obtenu avec un rendement très faible, à la faveur d'un produit secondaire qui en devient majoritaire. Ce dernier est moins polaire que 48 et a été complètement caractérisé par spectroscopie RMN ¹H et ¹³C, spectrométrie de masse FAB⁺ et analyse élémentaire. Il s'agit de la 9-méthoxyméthyl-1,10-phénanthroline 49, vraisemblablement obtenue par substitution nucléophile du groupement bromo de la 9-bromométhyl-1,10-phénanthroline 48 par une molécule de méthanol (Schéma 44). Ce dernier n'étant pas introduit dans le milieu réactionnel en début de réaction, il est intéressant d'essayer de trouver son origine.

Schéma 44. Réaction secondaire de méthanolyse conduisant à la formation de la 2-carbométhoxy-4-méthoxy-9-méthoxyméthyl-1,10-phénanthroline **49**.

En considérant les différents réactifs mis en jeu dans cette réaction, nous nous apercevons que plusieurs esters méthyliques sont présents, et peuvent conduire par hydrolyse à la génération de méthanol. Bien que les conditions soient strictement anhydres (solvant anhydre, réactifs et Schlenk préalablement séchés sous vide), le carbonate de potassium peut se décomposer en eau et dioxyde de carbone si sa deuxième basicité est atteinte. Cette source d'eau potentielle peut par conséquent favoriser l'hydrolyse de la 2-carbométhoxyphénanthroline 46 et/ou du diester méthylique de l'acide glutamique 38 accompagnée de la formation de méthanol

(**Schéma 44**), d'autant plus que la réaction est conduite à chaud (80°C). De plus, la présence d'eau pourrait se traduire par l'hydrolyse de la 9-bromométhyl-1,10-phénanthroline **46** en 9-hydroxyméthyl-1,10-phénanthroline que nous n'avons pas isolée.

D'autre part il est possible d'envisager la formation d'un lactame par cyclisation intramoléculaire du diester méthylique de l'acide glutamique **38** en pyroglutamate de méthyle (**Schéma 44**), même si nous ne nous trouvons pas dans les conditions adéquates pour permettre sa formation (réaction sans solvant, 160°C, 15 mbar).¹⁷⁹

Lorsque 38 est mis à réagir avec la 6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 33 dans des conditions analogues, le produit de dialkylation 39 est obtenu avec un rendement relativement élevé (67%) et aucun produit de méthanolyse n'est observé. Notons que, contrairement à la 2-carbométhoxy-9-bromométhyl-1,10-phénanthroline 46, la 6-bromo-6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 33 ne comporte pas de fonction ester, cette dernière étant introduite après l'étape d'alkylation par une réaction de carboéthoxylation. Il est donc raisonnable de penser que la fonction ester de la phénanthroline 46 est facilement hydrolysée en présence de traces d'eau, et que le méthanol généré *in situ* entre en compétition avec l'alkylation voulue. La modification de nature de la base employée (base de Hünig anhydre) n'améliore en rien cette étape.

Le ligand $\mathbf{L}^{10}\mathrm{H_4}$ est obtenu sous forme protonée après une saponification dans une solution hydro-alcoolique suivie d'une acidification à l'aide d'acide chlorhydrique 1N. Après évaporation des solvants, le ligand est cristallisé dans un mélange méthanol/diéthyléther, ce qui permet de l'isoler sous forme de chlorhydrate $\mathbf{L}^{10}\mathrm{H_4}\cdot4\mathrm{HCl}$ avec un rendement quasi quantitatif.

2.3. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques du ligand $L^{10}H_4$ et de ses complexes d'europium et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

_

¹⁷⁹ Napoletano, M.; Della Bella, D.; Fraire, C.; Grancini, G.; Masotto, C.; Ricciardi, S.; Zambon, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 589.

2.3.1. Ligand L¹⁰H₄.

Le spectre d'absorption UV-visible du ligand L¹⁰H₄ est caractéristique des ses fragments phénanthroliniques¹⁸⁰ et présente des maxima à 320, 274 et 240 nm avec des coefficients d'absorption molaire respectifs de 5100, 17000 et 15500 M⁻¹.cm⁻¹ (**Figure 78** et **Tableau** 49).

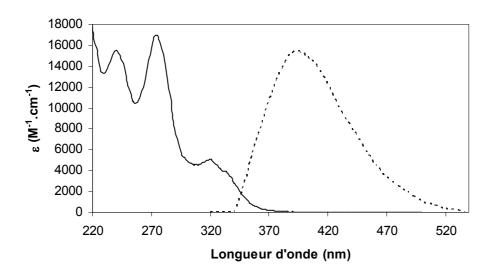


Figure 78. Spectres d'absorption (—) et d'émission (---, $\lambda_{exc.}$ =270 nm) du ligand L¹⁰H₄ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Par comparaison avec le ligand L^7H_4 comportant des bipyridines, notons tout d'abord que le maximum d'absorption du ligand $L^{10}H_4$ est déplacé de 1800 cm⁻¹ vers les hautes énergies et un effet hypochrome est observé. De plus, une large bande d'absorption vers les faibles énergies fait son apparition et s'étend jusqu'aux alentours de 25000 cm⁻¹ (400 nm). Elle est certes moins intense, mais permet dès à présent d'entrevoir les nouvelles possibilités offertes par les chromophores de type phénanthroline-carboxylate. Notons que les états singulets π – π * et n– π * de la 1,10-phénanthroline sont très proches, et que leurs positions respectives peuvent s'inverser selon le solvant utilisé. En effet, l'état n– π * est de plus basse énergie dans les solvants peu polaires, alors que c'est l'inverse dans l'eau. Dans notre cas, le groupement méthoxy peut cependant influer sur la position relative de ces niveaux.

Le spectre d'émission du ligand $L^{10}H_4$ comporte une large bande de fluorescence autour de 25400 cm⁻¹ (393 nm), similaire à celle observée en série bipyridinique (**Figure 78**), avec un

_

¹⁸⁰ Krumholz, P. J. Am. Chem. Soc. **1951**, 73, 3487.

¹⁸¹ Bandyopadhyay, B. N.; Harriman, A. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 1977, 73, 663.

épaulement aux alentours de 26500 cm⁻¹ (378 nm). Lorsqu'un délai suffisant est appliqué à la mesure du signal (40 μ s), toute fluorescence disparaît. Il s'agit vraisemblablement d'une émission à partir d'un état singulet (π – π * ou n– π *). Notons que le faible rendement quantique de fluorescence de la 1,10-phénanthroline dans les solvants hydrocarbonés résulte de la désactivation des états singulets n– π *, souvent facilitée par des voies non radiatives. De plus, le spectre d'excitation du ligand \mathbf{L}^{10} H₄ est raisonnablement superposable à son spectre d'absorption (**Figure 79**).

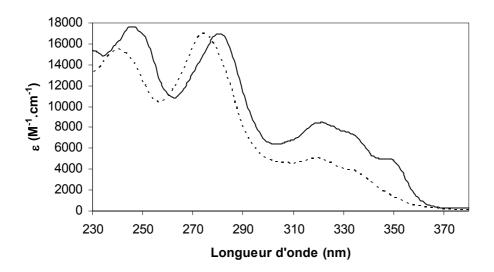


Figure 79. Spectres d'absorption (---) et d'excitation (---, $\lambda_{\text{\'em}}$ =395 nm) du ligand L¹⁰H₄ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

2.3.2. Complexes [EuL¹⁰]Na et [TbL¹⁰]Na.

Les deux bandes d'absorption les plus intenses du ligand $L^{10}H_4$ subissent un effet hyperchrome relativement important lors de la complexation des cations lanthanides Eu^{3+} ou Tb^{3+} (**Figure 80** et

Tableau 49). Aucun déplacement bathochrome n'est observé car le système phénanthrolinique possède une configuration *cis* immuable.

-

¹⁸² Joshi, H. S.; Jamshidi, R.; Tor, Y. Angew. Chem. Int. Ed. **1999**, 38, 2721.

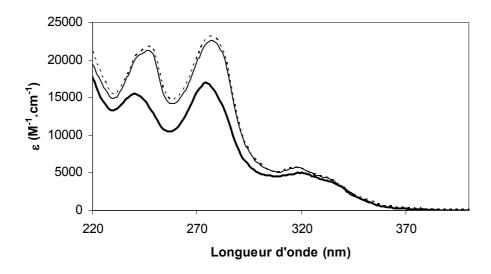


Figure 80. Spectres d'absorption du ligand $L^{10}H_4$ (—) et de ses complexes $[EuL^{10}]Na$ (—) et $[TbL^{10}]Na$ (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Tableau 49. Propriétés d'absorption UV-visible du ligand $L^{10}H_4$ et de ses complexes $[EuL^{10}]Na$ et $[TbL^{10}]Na$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	$\lambda_{max} (nm)$	$\varepsilon_{\text{max}} (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
$L^{10}H_4$	320	5100
	274	17000
	240	15500
[EuL ¹⁰]Na	318	5700
	277	22600
	246	21300
$[{ m Tb}{ m L}^{10}]{ m Na}$	318	5700
	277	23200
	247	21800

Le spectre d'émission du complexe d'europium [Eu L^{10}]Na est caractéristique de l'émission de l'ion Eu $^{3+}$, s'étend de 575 à 715 nm avec un maximum à 617 nm et présente une large bande de fluorescence autours de 26700 cm $^{-1}$ (375 nm) due à l'émission soit du ligand au sein du complexe soit du ligand partiellement ou totalement décomplexé (**Figure 81**). Cette bande d'émission, qui disparaît si un délai suffisant est appliqué, devient prépondérante sur le spectre d'émission du complexe de terbium [Tb L^{10}]Na (**Figure 81**). Ce dernier présente néanmoins les bandes associées aux transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ (J = 3-6) de l'ion Tb $^{3+}$ avec un maximum d'émission à 547 nm, mais elles sont de très faibles intensités par rapport à la fluorescence du ligand.

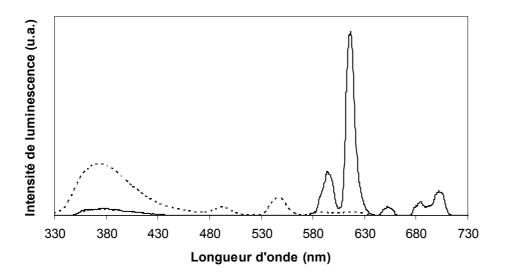


Figure 81. Spectres d'émission ($\lambda_{exc.}$ =277 nm) des complexes [EuL¹⁰]Na (—) et [TbL¹⁰]Na (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Pour essayer de comprendre ce phénomène, envisageons deux cas limites. D'une part la 1,10-phénanthroline a son état triplet de plus faible énergie situé à 22100 cm⁻¹. L'incorporation du motif 2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline à un ligand macrocyclique comme l'acide 10-[(9-méthyl-1,10-phénanthrol-2-yl)méthyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique mène à un déplacement bathochrome de faible amplitude (270 cm⁻¹) de son état triplet (Figure 82). Ces états triplets sont situés au dessus l'état émetteur ⁵D₄ du terbium(III).



Acide 10-[(9-méthyl-1,10-phénanthrol-2-yl)méthyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique

2,9-dicarboxy-4,7-diphényl-1,10-phénanthroline

Figure 82. Structure de l'acide 10-[(9-méthyl-1,10-phénanthrol-2-yl)méthyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique¹⁶⁴ et de la 2,9-dicarboxy-4,7-diphényl-1,10-phénanthroline.⁴⁶

D'autre part une phénanthroline-dicarboxylate substituée de type 2,9-dicarboxy-4,7-diphényl-1,10-phénanthroline^{46b} (**Figure 82**) possède un état triplet de plus faible énergie vers 19700 cm⁻¹,¹² c'est-à-dire en dessous de l'état émetteur ⁵D₄ du terbium(III). La substitution des groupements méthyles par des fonctions carboxylate, accompagnée de l'incorporation de deux groupements phényle, se traduit donc par un déplacement bathochrome non négligeable (> 2000 cm⁻¹) de l'état triplet du ligand.

Ainsi, l'état singulet et l'état triplet de plus basse énergie de l'acide 10-[(9-méthyl-1,10-phénanthrol-2-yl)méthyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique étant séparés de 5190 cm⁻¹, il est raisonnable d'envisager en première approximation un écart énergétique du même ordre de grandeur dans le cas du ligand L¹⁰H₄. D'après son spectre de fluorescence à température ambiante, l'état singulet du ligand L¹⁰H₄ se situe à 25400 cm⁻¹, la position de son état triplet peut donc être estimée à 20200 cm⁻¹, c'est-à-dire sous l'état émetteur ⁵D₄ (20400 cm⁻¹) de l'ion Tb³⁺. Cela se traduit en pratique par une très faible intensité d'émission à partir du cation Tb³⁺ en faveur de la fluorescence du ligand, qui peut également résulter d'un croisement intersystème peu efficace.

Les spectres d'absorption et d'excitation des complexes $[LnL^{10}]$ Na (Ln = Eu ou Tb) sont coïncidents (**Figure 83**), ce qui prouve que la luminescence provenant du cation lanthanide résulte bien d'un transfert d'énergie du ligand vers l'ion coordiné.³⁶

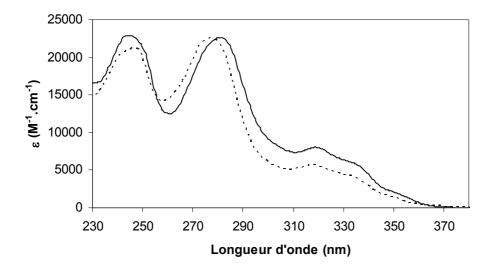


Figure 83. Spectres d'absorption (---) et d'excitation (—, $\lambda_{\text{ém.}}$ =617 nm) du complexe [EuL¹⁰]Na (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Le complexe [EuL¹⁰]Na présente une décroissance d'intensité d'émission monoexponentielle aussi bien dans l'eau que dans l'eau lourde, ce qui lui confère des durées de vie de luminescence respectives de 0,53 et 2,22 ms (**Tableau 50**). Ces valeurs, légèrement inférieures à celles du complexe d'europium basé sur les chromophores de type bipyridine-carboxylate [EuL¹]Na, restent au demeurant du même ordre de grandeur et permettent le calcul du nombre de molécules d'eau coordinée au cation Eu³+ (**Tableau 51**). Il en résulte une valeur moyenne de 1,4, ce résultat est analogue au complexe [EuL¹]Na et conduit à un

nombre de coordination de 9 autour du lanthanide. Les rendements quantiques de luminescence dans H₂O et D₂O sont également plus faibles que pour le composé de référence.

Tableau 50. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence des complexes [LnL¹⁰]Na et [LnL⁷]Na (Ln=Eu, Tb).

Complexe	τ ^{300K}	(ms)	Ф ³⁰⁰	OK (%)
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
[EuL ¹⁰]Na	0,53	2,22	5,6	8,2
[TbL ¹⁰]Na	0,80	-	< 0,1	-
[EuL ⁷]Na	0,62	2,48	8	35
[TbL ⁷]Na	1,48	2,53	31	53

Tableau 51. Calcul du nombre de molécules d'eau coordinées au complexe [EuL¹⁰]Na (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

	$q_{\scriptscriptstyle ext{H2O}}$	
Horrocks et Sudnick ⁴¹	Parker et al. 42	Horrocks et Supkowski ⁴³
1,5	1,4	1,2

Malgré la mauvaise disposition énergétique supposée de l'état triplet de plus basse énergie du ligand et de l'état émetteur de l'ion Tb³⁺, la durée de vie de luminescence du complexe de terbium [TbL¹⁰]Na reste appréciable (**Tableau 50**). Bien qu'il soit difficile de peupler efficacement l'état émetteur ⁵D₄ du terbium(III), la luminescence récoltée à partir de celui-ci présente une décroissance d'intensité normale, même si la durée de vie correspondante est diminuée (0,8 ms). Le rendement quantique du complexe de terbium pâtit quant à lui largement de la position énergétiquement peu favorable l'état triplet du ligand, sa valeur inférieure à 0,1. Cela ne fait que confirmer ce que laissait présager son spectre d'émission (**Figure 81**), à savoir une relaxation quantitative des états excités centrés sur le ligand et une part infime de luminescence à partir du cation lanthanide.

Ainsi, nous avons réussi à modifier la nature des chromophores au sein du ligand en série glutamique en passant du motif pyridine-carboxylate (ligand L⁷H₄) au motif phénanthroline-carboxylate (ligand L¹⁰H₄). Le principal avantage conféré aux complexes [LnL¹⁰]Na est l'extension de la bande d'absorption vers les faibles énergies, ce qui autorise leur excitation efficace dans l'UV proche, au delà de 350 nm. Dans ces conditions, le complexe d'europium [EuL¹⁰]Na possède en première approche des propriétés spectroscopiques analogues au

complexe [EuL⁷]Na en série bipyridinique. En contrepartie, le complexe de terbium [TbL¹⁰]Na perd toutes les caractéristiques exceptionnelles de [TbL⁷]Na, ce qui le rend inutilisable dans le développement de nouvelles application biomédicales.

3. Déplacement de la molécule d'eau coordinée.

Dans un dernier temps, nous avons tenté de déplacer la molécule d'eau coordinée au cation lanthanide en modifiant l'ossature du ligand dans le but d'augmenter les propriétés spectroscopiques des complexes d'europium et de terbium correspondants, au détriment des possibilités d'utilisation du complexe de gadolinium comme agent de relaxation (**Figure 84**).

NaOOC
$$COO^-$$
NaOOC COO^-

Figure 84. Structure des complexes [LnL¹¹] avec une unité pyridine-carboxylate et leur précurseur 54.

Ainsi, nous avons remplacé la fonction carboxylate portée par le squelette glutamate (bras coordinant monodentate) par un fragment anionique bidentate de type 2-carboxypyridine dans le but de reléguer la molécule d'eau aux sphères de coordination supérieures du lanthanide. La partie inférieure de la poche de chélation, formée par les deux unités bipyridine-carboxylate reliées par un atome d'azote central, a été conservée. De plus, mis à part les trois ponts méthylène portés par l'amine tertiaire centrale, cette modification structurale n'introduit pas d'oscillateur C-H à proximité de l'ion coordiné comme l'aurait fait une chaîne aliphatique équivalente, et évite donc l'apport de nouvelles voies de désactivation non radiatives possibles.

Le ligand $L^{11}H_3$ peut être construit de manière classique par alkylation, carboalkoxylation et hydrolyse à partir d'un précurseur facilement accessible, le 6-aminométhylpicolinate d'éthyle

54, dont la préparation est décrite dans la littérature. ¹⁸³ Il est à noter que cette voie synthétique permet d'obtenir rapidement un nouveau ligand qui ne compte toutefois pas de fonction activable permettant le greffage ultérieur de ses complexes sur une autre entité. Si leurs propriétés photo-physiques sont augmentées par rapport aux composés de référence [LnL⁷]Na, l'introduction d'une telle fonction devra être envisagée, par exemple en partant d'un dérivé fonctionnalisé de l'aminométhylpyridine **54**.

3.1. Synthèse du précurseur pyridinique.

L'acide dipicolinique (2,6-dicarboxypyridine) est obtenu à hauteur de 6% comme sousproduit de l'oxydation ménagée de la 2,6-lutidine en acide 6-méthylpicolinique décrite dans le Chapitre II.¹³¹ Une estérification standard dans de l'éthanol à reflux en présence d'une quantité catalytique d'acide sulfurique fournit efficacement le dipicolinate d'éthyle **50** (**Schéma 45**).

HOOC N COOH
$$\frac{\text{EtOH, H}_2\text{SO}_4 \text{ cat.}}{\text{reflux, 85}\%}$$
 $\frac{\text{EtOOC}}{\text{N}}$ $\frac{\text{NaBH}_4 (0,6 \text{ eq.})}{\text{EtOH, reflux, 49}\%}$ $\frac{\text{EtOH, reflux, 49}\%}{\text{EtOH, reflux, 49}\%}$ $\frac{\text{SOCl}_2, 0^{\circ}\text{C, 96}\%}{\text{SOCl}_2, 0^{\circ}\text{C, 96}\%}$ $\frac{\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2 (3,5 \text{ eq.})}{\text{EtOH, reflux, quant.}}$ $\frac{\text{N}^{\circ}\text{Na}^{+}}{\text{N}}$ $\frac{\text{COOEt}}{\text{SOOEt}}$ $\frac{\text{N}^{\circ}\text{Na}^{+}}{\text{COOEt}}$ $\frac{\text{N}^{\circ}\text{Na}^{+}}{\text{COOEt}}$ $\frac{\text{SOCl}_2, 0^{\circ}\text{C, 96}\%}{\text{SOOEt}}$ $\frac{\text{SOCl}_2, 0^{\circ}\text{C, 96}\%}{\text{SOOEt}}$ $\frac{\text{SOOEt}}{\text{SOOEt}}$ $\frac{\text{SOOED}}{\text{SOOEt}}$ $\frac{\text{SOOED}}{\text{SOOEt}}$ $\frac{\text{SOOED}}{\text{SOOED}}$ $\frac{\text{S$

Schéma 45. Synthèse du 6-aminométhylpicolinate d'éthyle 54.

La monoréduction du diester **50** est accomplie à l'aide de borohydrure de sodium dans de l'éthanol anhydre à reflux, et permet d'isoler avec un rendement de 49% l'intermédiaire dissymétrique, le 6-hydroxyméthylpicolinate d'éthyle **51**. Après dissolution et agitation dans du chlorure de thionyle à 0°C, **51** est convertit avec un très bon rendement en 6-chlorométhylpicolinate d'éthyle **52** par une réaction de substitution nucléophile interne S_Ni. 183

Une substitution nucléophile douce avec du phthalimidate de sodium dans du DMF à température ambiante permet d'introduire le groupement amino sous une forme protégée.

_

¹⁸³ Fornasier, R.; Milani, D.; Scrimin, P.; Tonellato, U. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1986, 233.

¹⁸⁴ Fife, T. H.; Przystas, T. J. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 2251.

Après purification par chromatographie sur colonne de silice, le produit 53 est isolé avec un rendement élevé (92%). La déprotection de la fonction amine est réalisée à l'aide d'un excès d'hydrazine dans de l'éthanol à reflux. Rapidement, un précipité blanc se forme massivement et signe la fin de la réaction. Il s'agit du produit résultant de l'ouverture du phthalimide avec l'hydrazine, le phthalhydrazide fortement insoluble. Après filtration, l'éthanol et l'excès d'hydrazine sont évaporés, le résidu est ensuite repris dans du dichlorométhane ce qui conduit à la précipitation du phthalhydrazide restant. Après filtration et évaporation du solvant, le 6-aminométhylpicolinate d'éthyle 54 est obtenu quantitativement sous la forme d'une huile présentant une pureté suffisante (RMN ¹H), et est engagé directement dans la réaction suivante car il semble se dégrader rapidement à l'air à température ambiante, vraisemblablement *via* l'oxydation de sa fonction amine primaire. Une solution serait de le stocker sous forme de sel, après formation du chlorhydrate correspondant par exemple.

Notons que dans la publication d'origine, 183 l'intermédiaire 53 est simplement extrait sans autre forme de purification avant d'être engagé dans l'étape finale d'ouverture du phthalimide, l'aminométhylpyridine 54 étant alors isolée avec un rendement beaucoup plus faible (45%). D'autre part, une plus faible quantité d'hydrazine est engagée dans le protocole décrit (1,7 éq.), ce qui ne permet pas selon les premiers essais effectués de déplacer suffisamment rapidement la réaction vers la formation des produits. En effet, une réaction prolongée à chaud en présence d'hydrazine peut conduire à l'aminolyse de l'ester éthylique de 53 ou 54 et à la formation de l'amide correspondant au détriment du produit souhaité. Enfin après filtration de la solution éthanolique, cette dernière est concentrée à un plus faible volume, et un ajout de diéthyléther conduit à une nouvelle précipitation de phthalhydrazide, qui est séparé du filtrat contenant le produit 54 par filtration. Cette technique nous a également semblé moins efficace que celle que nous avons adoptée. Ces modifications somme toute mineures et un effort de purification supplémentaire de l'intermédiaire 53 permettent d'accroître considérablement le rendement de formation du 6-aminométhylpicolinate d'éthyle 54, qui est obtenu en cinq étapes à partir de l'acide dipicolinique avec un rendement honorable de 37%.

3.2. Synthèse du ligand $L^{11}H_3$.

Schéma 46. Synthèse du ligand L¹¹H₃.

Comme auparavant, l'aminométhylpiridine 54 est alkylée avec la 6'-bromométhyl-2,2'-bipyridine 33 (2,2 éq.) en présence d'une base minérale (K₂CO₃) à chaud dans de l'acétonitrile anhydre pendant une nuit (Schéma 46). Après purification par chromatographie sur colonne d'alumine, l'intermédiaire 55 est obtenu aussi efficacement qu'en série glutamique, le rendement de la réaction étant similaire dans les deux cas (67%). Cela prouve par là même que la pureté de 54 était suffisante pour conduire au composé dialkylé 55. L'étape de carboéthoxylation est menée à bien dans des conditions classiques et conduit sans encombre au triester éthylique 56, avec un rendement sensiblement plus faible (45%) qu'en série glutamique ou malonique (60-68%). Cela peut provenir d'une plus grande sensibilité à l'hydrolyse de l'ester porté par le noyau pyridinique par rapport aux esters aliphatiques lors de cette étape. Notons qu'une perte substantielle de produit peut alors être envisagée lors de l'étape d'extraction en milieu acide, neutralisation et extraction additionnelle en milieu organique. La saponification finale des fonctions ester est suivie d'une acidification du milieu qui résulte en la précipitation du ligand sous la forme d'un chlorhydrate L¹¹H₃·4HCl avec un rendement de 42%.

Ainsi, le ligand L¹¹H₃ est obtenu en trois étapes à partir du 6-aminométhylpicolinate d'éthyle **54** avec un rendement de 13%. La quantité obtenue étant suffisante pour préparer les complexes de lanthanides(III) correspondants, les deux dernières étapes aux rendements inférieurs à 50% n'ont pas été davantage optimisées.

Schéma 47. Autre voie de synthèse envisageable donnait accès à l'intermédiaire 56.

Notons que nous aurions pu envisager de construire ce nouveau ligand *via* un intermédiaire présentant deux terminaisons 6-bromo-2,2'-bipyridine et un fragment 2-bromopyridine, dans le but d'introduire les trois fonction ester en une unique étape de carboalkoxylation (**Schéma 47**). A la lumière de la réactivité réduite des 2-bromopyridines rencontrée lors de la construction du ligand **L**⁵H₃ en série Tris-pyridine (voir Chapitre II), cette alternative, bien qu'attrayante, pourrait se révéler problématique.

3.3. Synthèse et caractérisation des complexes.

Les complexes d'europium, de terbium et de gadolinium(III) ont été obtenus en mettant en présence des quantités équimolaires de ligand L¹¹H₃ et de chlorure de lanthanide LnCl₃·6H₂O en solution dans un mélange méthanol/eau (**Schéma 48**). Après avoir porté la solution à 70°C pendant une heure, le pH est ajusté à 7,0-7,6 à l'aide d'une solution de soude à 0,5%. Après évaporation des solvants, le résidu est solubilisé dans du méthanol puis filtré sur Célite. L'ajout de diéthyléther conduit à la précipitation du complexe [LnL¹¹]·nH₂O, qui est isolé par centrifugation et séché sous pression réduite. Comme indiqué dans le **Tableau 52**, les rendements de formation des complexes sont très élevés (84-95%) et le nombre de molécules d'eau à l'état solide nous est fourni par l'analyse élémentaire. Notons que les complexes neutres [LnL¹¹] sont beaucoup plus solubles, en particulier dans le méthanol, que leurs

analogues en série glutamique [LnL⁷]Na comportant un bras terminé par une fonction carboxylate ionique.

Schéma 48. Synthèse des complexes [LnL¹¹]·nH₂O (Ln=Eu, Tb, Gd).

Tableau 52. Nombre n de molécules d'eau à l'état solide et rendements de formation des complexes $[LnL^{11}]\cdot nH_2O$.

Lanthanide	n	Rendement (%)
Eu	6	95
Tb	5	84
Gd	5	88

Les complexes ainsi obtenus ont été caractérisés par spectrométrie de masse FAB⁺, microanalyse et spectroscopie IR. Les spectres de masse enregistrés en mode positif présentent un pic moléculaire intense correspondant au complexe protoné [LnL¹¹ + H]⁺. Le spectre du complexe d'europium présente en particulier la distribution isotopique attendue, à savoir deux signaux à 725,2 et 727,1 avec des intensités respectives de 85 et 100%, confirmant ainsi sa nature mononucléaire.

3.4. Propriétés photo-physiques.

Les propriétés photo-physiques du ligand $L^{11}H_3$ et de ses complexes d'europium et de terbium(III) ont été déterminées en solution aqueuse tamponnée (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

3.4.1. Ligand L¹¹H₃.

Le spectre d'absorption UV-visible du ligand L¹¹H₃ présente deux maxima d'absorption à 287 et 240 nm avec des coefficients d'absorption molaire respectifs de 22300 et 18700 M⁻¹.cm⁻¹. La présence du fragment pyridine-carboxylate conduit à l'élargissement de la bande d'absorption principale vers les hautes énergies. Le spectre d'émission du ligand L¹¹H₃ présente quant à lui une large bande de fluorescence aux alentours de 25800 cm⁻¹ (387 nm) qui disparaît dès qu'un délai suffisant est imposé (**Figure 85**). Ces propriétés sont caractéristiques des unités bipyridine-carboxylate du ligand et sont tout à fait semblables à celles des composés présentant des chromophores de même nature, notamment les ligands L⁶H₄ et L⁷H₄.

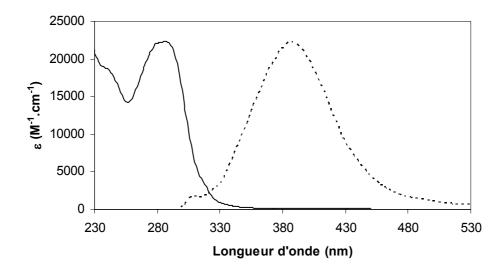


Figure 85. Spectres d'absorption (—) et d'émission (---, $\lambda_{exc.}$ =280 nm) du ligand $L^{11}H_4$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Pour une émission à 380 nm, le spectre d'excitation du ligand L¹¹H₃ présente deux maxima à 284 et 242 nm, concordant ainsi avec le spectre d'émission enregistré.

3.4.2. Complexes [EuL¹¹] et [TbL¹¹].

La complexation de l'europium ou du terbium(III) par le ligand L¹¹H₃ se traduit par l'apparition de deux bandes d'absorption distinctes à 297 et 273 nm dont les coefficients d'absorption molaires sont très proches (environ 9000 M⁻¹.cm⁻¹), ce qui révèle un effet hypochrome très intense. Notons l'élargissement général du spectre, et l'apparition d'un

épaulement relativement intense (environ 5000 M⁻¹.cm⁻¹) aux alentours de 320 nm (**Figure 86** et **Tableau 53**). Le déplacement bathochrome du maximum d'absorption, de l'ordre de 1170 cm⁻¹, est moins intense que celui observé en série aminomalonique ou glutamique (environ 2000 M⁻¹.cm⁻¹). Ces différents éléments constituent les signes avant-coureurs d'une complexation incomplète du ligand autour du lanthanide. Outre la bande d'absorption aux alentours de 37000 cm⁻¹ (270 nm) pouvant être attribuée à l'unité pyridinique, un maximum d'absorption haut en énergie vers 33300 cm⁻¹ (300 nm) et un épaulement vers les faibles énergies suggèrent raisonnablement la présence simultanée de bipyridines libres et de bipyridines coordinées.

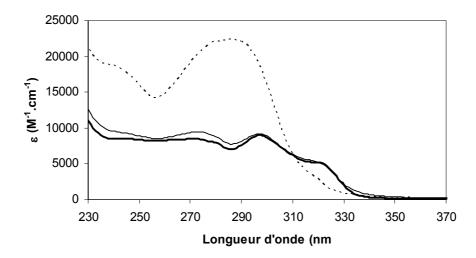


Figure 86. Spectres d'absorption du ligand $L^{11}H_3$ (---) et de ses complexes $[EuL^{11}]$ (—) et $[TbL^{11}]$ (—) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Tableau 53. Propriétés d'absorption UV-visible du ligand $L^{11}H_3$ et de ses complexes $[EuL^{11}]$ et $[TbL^{11}]$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Composé	λ_{max} (nm)	$\varepsilon_{\text{max}} (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
$L^{11}H_3$	287	22300
	240	18700
[Eu L ¹¹]	321	5100
	297	9200
	273	9500
[Tb L ¹¹]	318	5200
	297	9000
	272	8500

Les spectres d'émission des complexes [EuL¹¹] et [TbL¹¹] sont caractéristiques des transitions électroniques de leur ion lanthanide respectif (**Figure 87**). Sur l'exemple du complexe de

terbium(III), les spectres d'absorption et d'excitation de chaque complexe se superposent convenablement (**Figure 88**), ce qui traduit le fait que la luminescence détecté à partir du lanthanide provient bien d'un transfert d'énergie du ligand vers le métal coordiné.³⁶

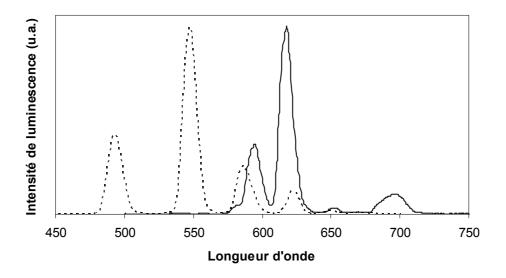


Figure 87. Spectres d'émission (λ_{exc} =297 nm) des complexes [EuL¹¹] (—) et [TbL¹¹] (---) (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

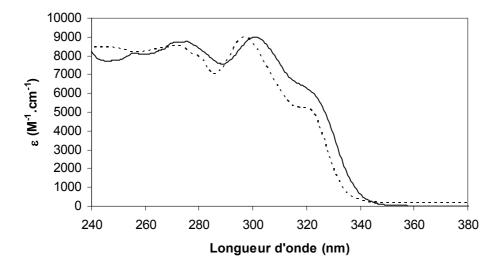


Figure 88. Spectres d'absorption (---) et d'excitation (—, $\lambda_{\text{ém.}}$ =547 nm) du complexe [TbL¹¹] (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Par comparaison avec le composé de référence L⁷H₄ en série glutamique que nous souhaitions optimiser, les propriétés de luminescence (durées de vie et rendements quantiques) des complexes [EuL¹¹] et [TbL¹¹] sont amoindries, en particulier celles du complexe de terbium(III) (**Tableau 54**). Le calcul du nombre de molécules d'eau coordinées en première sphère du cation fournit une valeur moyenne avoisinant trois (**Tableau 55**), alors que jusqu'à

présent nous nous trouvions dans une situation où le ligand ne laissait qu'un site vacant pour une unique molécule d'eau.

Tableau 54. Durées de vie et rendements quantiques de luminescence des complexes [LnL¹¹] et [LnL⁷]Na (Ln=Eu, Tb).

Complexe	$ au^{300 ext{K}}$	(ms)	Φ^{300}	OK (%)
	H_2O	D_2O	H_2O	D_2O
[EuL ¹¹]	0,32	2,18	2,4	2,8
$[TbL^{11}]$	0,83	1,78	1,4	2,1
[Eu L ⁷]Na	0,62	2,48	8	35
[TbL ⁷]Na	1,48	2,53	31	53

Tableau 55. Calcul du nombre de molécules d'eau coordinées aux complexes $[EuL^{11}]$ et $[TbL^{11}]$ (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

Complexe	$q_{\scriptscriptstyle ext{H2O}}$			
	Horrocks et Sudnick ⁴¹	Parker et al. 42	Horrocks et Supkowski ⁴³	
[EuL ¹¹]	2,8	2,9	2,6	
[TbL ¹¹]	2,7	2,9	-	

Ces résultats décevants laissent à penser que le ligand ne permet pas de saturer convenablement la première sphère de coordination du cation lanthanide. Bien qu'il soit structurellement de nature nonadentate, L¹¹H₃ ne joue que le rôle d'un ligand hexadentate, laissant la place libre à trois molécules d'eau. Nous pouvons alors imaginer la déstabilisation du complexe, accompagnée de la décomplexation d'une unité tridendate (bipyridine-carboxylate ou 2-carboxy-6-aminométhylpyridine) (**Figure 89**). D'après l'allure des spectres d'absorption des complexes (**Figure 86**), l'hypothèse du déplacement d'un bras bipyridine-carboxylate semble probable ; l'encombrement stérique généré par la présence du fragment pyridine-carboxylate reléguant la bipyridine non chélatée en seconde sphère de coordination du lanthanide.

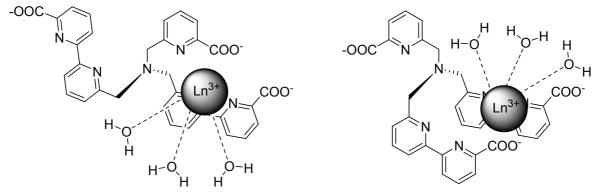


Figure 89. Possibilités de coordination incomplète dans les complexes [LnL¹¹(H₂O)₃].

Ainsi, sur l'exemple des trois ligands L⁹Na₆, L¹⁰H₄ et L¹¹H₃, nous avons démontré que notre approche synthétique permet la modification relativement aisée de la structure du ligand ciblé. Bien que cette étude n'ait pas apporté les améliorations escomptées, les résultats obtenus apportent des éléments de réflexion précieux pour la conception de nouveaux ligands visant à optimiser les propriétés spectroscopiques de leurs complexes de lanthanides.

Conclusion.

Conclusion.

Ce travail de thèse visant au développement de nouveaux chélates de lanthanides luminescents destinés au marquage de biomolécules s'est articulé autour de trois axes : la synthèse des ligands et de leurs complexes associés d'europium, terbium et gadolinium(III), l'étude de leurs propriétés spectroscopiques en solution aqueuse (absorption et émission, durées de vie et rendements quantiques de luminescence) et l'utilisation de ces composés en tant que marqueurs luminescents.

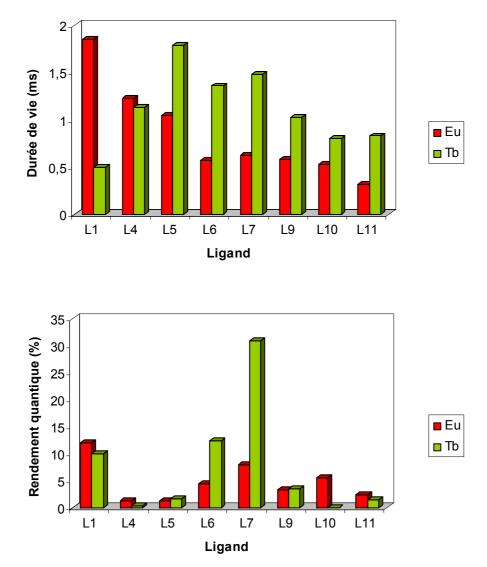


Figure 90. Récapitulatif des durées de vie et des rendements quantiques de luminescence des ligands étudiés (tampon Tris/HCl à 0,01 M, pH = 7,0).

En nous basant sur les travaux précurseurs effectués au laboratoire (ligand L¹), nous avons conçu quatre ligands incorporant des unités 6-carboxy-2,2'-bipyridine substituées en position

5' comme chromophores et centres chélatants (Chapitre II). Tout d'abord la préparation des ligands bis-tridentate L² et bis-tridentate L³ a été détaillée. Après complexation, ceux-ci n'ont conduit qu'à la formation d'oligomères insolubles, vraisemblablement à cause de la divergence des bras coordinants. Dans le but d'apporter plus de flexibilité au ligand et de favoriser son enroulement autour du lanthanide, nous avons éloigné les bipyridines du point d'ancrage à l'aide de ponts éther. Ainsi, nous avons synthétisé deux ligands nonadentates de symétrie C³ basés sur le Tris fonctionnalisé par des unités 6-carboxy-2,2'-bipyridine (ligand L⁴) ou 2-carboxypyridine (ligand L⁵). Lorsqu'ils sont parfaitement coordinés, leurs complexes d'europium et de terbium présentent des durées de vie supérieures à la milliseconde mais leurs rendements quantiques restent inférieurs à 2% en solution aqueuse (Figure 90), une décomplexation partielle ou totale du ligand peut en être la cause. Leur inconvénient majeur provient du fait que la fonction de greffage n'a pas pu être efficacement générée, compromettant ainsi les premiers essais de marquage de macromolécules biologiques.

Dans un deuxième temps, nous avons remodelé la structure des nos ligands en leur incorporant des unités 6-carboxy-2,2'-bipyridine, substituées en position 6' cette fois, dans le but de renforcer la chélation du lanthanide (Chapitre III). Nous avons construit deux ligands comportant un acide aminé comme squelette principal, en série aminomalonique (ligand L⁶) et en série glutamique (ligand L⁷). Comme chaque acide aminé comporte deux fonctions carboxylate, l'une pourra participer à la complexation et l'autre restera libre et donc disponible pour une possible activation ultérieure. Malgré des caractéristiques spectroscopiques intéressantes (Figure 90), les complexes obtenus avec L^6 présentent une fonction carboxylate résiduelle peu réactive. En série glutamique, les complexes formés avec L⁷ ont été convertis efficacement en complexes activés présentant une fonction de greffage (ester NHS). Malgré la présence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination, ils présentent des propriétés d'émission exceptionnelles en tant que marqueurs luminescents, en particulier le chélate de terbium qui possède une durée de vie proche de 1,5 ms et un rendement quantique supérieur à 30% dans l'eau à température ambiante. De plus, des déplacements de Stokes élevés (supérieurs à 14000 cm⁻¹) sont obtenus avec ces complexes, ainsi qu'une constante de stabilité supérieure à celle des complexes de l'EDTA à pH physiologique, fournissant ainsi des candidats potentiels pour le marquage de biomolécules.

Le Chapitre IV a été consacré aux premières applications des chélates activés en série glutamique. Une protéine modèle (la BSA) a tout d'abord été marquée par l'intermédiaire de ses résidus lysine avec les chélates activés (Eu³⁺, Tb³⁺), puis caractérisée (spectrométrie de masse, spectroscopie UV-visible) conduisant ainsi à un taux de marquage moyen compris entre sept et huit (nombre de chélates greffés par protéine). Les premières utilisations en microscopie de luminescence en temps résolu ont été illustrées par comparaison avec de l'immunoglobuline marquée avec une fluorophore organique (la fluorescéine). A l'aide des complexes activés sous la forme d'esters sulfo-NHS dont la solubilité est accrue, un composé inorganique formé de particules de silice fonctionnalisées a ensuite été marqué et caractérisé (MEB, EDX, MLTR). Les particules mixtes, couplées à la fois aux chélates d'europium et de terbium, révèlent un transfert d'énergie du terbium vers l'europium, la luminescence de ce dernier étant prépondérante. Enfin, les relaxivités du chélate de gadolinium ont été mesurées, ses propriétés étant comparables à celles de complexes mono aqua de référence utilisés en milieu hospitalier. Ces résultats ouvrent ainsi la voie à des applications selon une approche bimodale, basée sur l'observation simultanée de tissus en IRM (Gd³⁺) et en MLTR (Eu³⁺ ou Tb^{3+}).

Dans un dernier mouvement, des modifications structurelles ont été apportées aux chélates en série glutamique dans le but d'optimiser leurs propriétés (Chapitre V). Pour renforcer la chélation du lanthanide, la nature de la fonction anionique portée par les bipyridines en position 6 (carboxylate) a été variée en passant aux phosphonates (ligand L⁹). Les propriétés de luminescence de complexes obtenus sont diminuées (Figure 90), révélant un équilibre conduisant à la décomplexation partielle du ligand en faveur d'une molécule d'eau désactivante. Le remplacement des chromophores bipyridiniques par des chromophores phénanthroliniques (ligand L¹⁰) permet d'étendre notoirement le spectre d'absorption des chélates vers les faibles énergies (au-delà de 370 nm); le complexe d'europium conserve de bonnes caractéristiques spectroscopiques alors que le complexe de terbium présente un rendement quantique très faible dans l'eau à température ambiante (Figure 90). Enfin, la substitution du bras anionique coordinant porté par le squelette acide aminé (fonction carboxylate) par une unité bidentate de type 2-carboxypyridine (ligand \mathbf{L}^{11}) ne permet pas de déplacer la molécule d'eau présente en première sphère de coordination. Le remplacement d'une unité chélatante tridentate par trois molécules d'eau et donc la complexation partielle du ligand autour du lanthanide sont en effet observés; les propriétés spectroscopiques des complexes n'en sont que diminuées (Figure 90).

En conclusion, ces travaux de recherche ont conduit au développement de chélates de lanthanides basés sur le ligand L⁷ particulièrement prometteurs. Leurs propriétés spectroscopiques (Eu³⁺, Tb³⁺) et relaxométriques (Gd³⁺) très attrayantes ainsi que la présence d'une fonction de greffage efficace ont permis d'explorer leurs premières utilisations, notamment dans le domaine de la microscopie de luminescence en temps résolu. A la lumière des premières modifications structurelles proposées, une nouvelle génération de chélates avec des propriétés affinées peut émerger, fournissant ainsi des marqueurs fortement luminescents et facilement accessibles, destinés au monde de l'analyse biomédicale (dosages fluoroimmunologiques en temps résolu, immunohistochimie, hybridation *in situ*, cartographie de durées de vie…).

Partie expérimentale.

Partie expérimentale.

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Büchi Melting Point 535 avec des capillaires ouverts et ne sont pas corrigés.

Les spectres RMN 1 H (200 MHz) et 13 C (50 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AC 200. Les spectres RMN 1 H (300 MHz) et 13 C (75 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 300. Les spectres RMN 1 H (400 MHz) et 31 P (162 MHz) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au solvant non deutérié résiduel. Les constantes de couplage J sont données en hertz, la multiplicité des signaux est abrégée de la manière suivante : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet), sx (sextuplet), m (multiplet). Un signal large est précédé par br (broad).

Les spectres de masse ESI-TOF ont été enregistrés sur un spectromètre Mariner ESI-TOF (Applied Biosystems/PerkinElmer). Les spectres de masse FAB ont été enregistrés avec une matrice d'alcool m-nitrobenzylique. Les spectres de masse MALDI-TOF ont été enregistrés sur un spectromètre Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) avec une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre Nicolet 210 à partir de pastilles de KBr. Les intensités des bandes sont abrégées de la manière suivante : w (weak, faible), m (medium, moyenne), s (strong, forte). Un signal large est précédé par br (broad).

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Uvikon 933 (Kontron Instrument). Les spectres d'émission et d'excitation ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre PerkinElmer LS 50B équipé d'un photomultiplicateur R928 (Hamamatsu). Les durées de vie de luminescence (incertitude \pm 5%) ont été mesurées sur un spectrofluorimètre PTI QuantaMaster. Le rendements quantiques de luminescence (incertitude \pm 10%) ont été mesurés selon la procédure décrite par Haas et Stein¹²⁴ en utilisant comme références le dichlorure de ruthénium *tris*-bipyridine ($\Phi^{300K} = 0.028$ dans de l'eau non

dégazée)¹²⁶ et la rhodamine 6G ($\Phi^{300K} = 0,88$ dans de l'éthanol).¹²⁷ Un filtre à 390 nm a été utilisé pour éliminer la diffraction de l'onde d'excitation et ses harmoniques du second ordre.

Les purifications par chromatographie ont été effectuées avec du gel de silice 60 (0,063-0,200 mm, Merck) ou du gel d'oxyde d'aluminium 90 standardisé (activité II-III, Merck). Les chromatographies « flash » ont été effectuées avec du gel de silice 60 (40-63 µm, Merck).

L'acétonitrile (Riedel-de Haën) a été fîltré sur gel d'alumine (activité II-III, Merck) puis distillé sur P₂O₅. Le THF (Riedel-de Haën) a été distillé sur sodium/benzophénone. Le DMF (SDS) a été distillé sous pression réduite. La *N*,*N*-diisopropyléthylamine (Lancaster) a été distillée sur KOH. Le toluène (Carlo Erba) a été distillé sur sodium.

Le dichlorométhane (Riedel-de Haën), le chloroforme (Prolabo), le tétrachlorure de carbone (Prolabo), le *n*-hexane (Carlo Erba), le cyclohexane (Carlo Erba), le diéthyléther (Carlo Erba), le méthanol (Carlo Erba), l'éthanol (Carlo Erba), le diméthylsulfoxyde (SDS), la triéthylamine (Riedel-de Haën), le 1,2-dichloroéthane (SDS), le n-butanol (Prolabo), le Nbromosuccinimide (Fluka), l'azobisisobutyronitrile (Janssen Chimica), hexaméthylènetétramine (Prolabo), l'acide chlorhydrique min. 37% (Riedel-de Haën), l'hydroxyde de sodium (Fluka), le sulfate de magnésium (Riedel-de Haën), l'acétate de sodium (Prolabo), le sulfate de sodium (SDS), la Célite 545 (SDS), le bromure de benzyle (Fluka), le tris-(hydroxyméthyl)aminométhane 19 (Aldrich), l'hydrogénocarbonate de sodium (Aldrich), le chlorure d'europium hexahydraté (Janssen Chimica), le chlorure de terbium hexahydraté (Janssen Chimica), le chlorure de gadolinium hexahydraté (Janssen Chimica), le chlorhydrate d'aminomalonate d'éthyle 34 (Fluka), le N-hydroxysuccinimide (Janssen Chimica), le chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide (Acros), le gel de silice 3-aminopropyle (Sigma), le sel monosodique du N-hydroxysulfosuccinimide hydraté (Aldrich), le diéthylphosphite (Fluka), la triphénylphosphine (Janssen Chimica), le bromure de triméthylsilyle (Aldrich) et l'iodométhane (Prolabo) ont été utilisés sans purification préalable.

Le carbonate de sodium (SDS), le carbonate de potassium (Prolabo), l'iodure de tétrabutylammonium (Aldrich) et l'hydrure de sodium à 60% dans une huile minérale (Avocado) ont été flambés sous vide avant utilisation.

La 6-bromo-5'-méthyl-2,2'-bipyridine **2**,^{102,108} la 2-bromo-6-bromométhylpyridine **26**,¹²⁹ la 6-méthyl-2-carboéthoxypyridine,¹³¹ le chlorure de *bis*-(triphénylphosphine)palladium(II),¹⁸⁵ le *tétrakis*-(triphénylphosphine)palladium(0),¹⁸⁶ la 6-bromo-6'-bromomethyl-2,2'-bipyridine **33**,¹³² le chlorhydrate du diester méthylique de l'acide glutamique **38**,¹³⁶ le triflate de lanthane¹⁸⁷ et la 2-carboéthoxy-6-aminométhyl-pyridine **54**¹⁸³ ont été préparés selon les procédures décrites dans la littérature.

6-Bromo-5'-bromomethyl-2,2'-bipyridine (6).

A solution of 6-bromo-5'-methyl-2,2'-bipyridine **2** (2.0 g, 8.0 mmol), *N*-bromosuccinimide (1.79 g, 10.0 mmol) and AIBN (66 mg, 0.4 mmol) in 120 mL of CCl_4 was refluxed for 40 min. with irradiation with a conventional desk lamp. The solution was filtered hot over a thin layer of aluminium oxide, evaporated to dryness and **6** (1.80 g, 69%) was isolated by column chromatography (SiO_2 , 50/50 to 100/0 $CH_2Cl_2/hexane$).

mp 166-167°C.

 $R_f = 0.38 \text{ (SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.53 (s, 2H), 7.50 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.0 Hz), 7.67 (t, 1H, 3J = 8.0 Hz), 7.85 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 2.5 Hz), 8.37 (dd, 1H, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.0 Hz), 8.40 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz), 8.67 (d, 1H, 4J = 2.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 29.5, 119.9, 121.4, 128.3, 134.3, 137.7, 139.3, 141.7, 149.5, 154.5, 156.8.

ESI-TOF/MS: m/z 326.902 ([6 + H]⁺, 30%), 328.901 ([6 + H]⁺, 83%), 330.980 ([6 + H]⁺, 24%), 348.874 ([6 + Na]⁺, 45%), 350.876 ([6 + Na]⁺, 83%), 352.874 ([6 + Na]⁺, 32%).

Anal. Calcd for $C_{11}H_8Br_2N_2$: C, 40.28; H, 2.46; N, 8.54. Found: C, 39.91; H, 2.14; N, 8.22. IR (KBr, cm⁻¹): 1542 (s), 1431 (s), 1391 (m), 1156 (m).

_

¹⁸⁵ Dangles, O.; Guibé, F.; Balavoine, G. J. Org. Chem. 1987, 52, 4984.

¹⁸⁶ Four, P.; Guibé, F. J. Org. Chem. **1981**, 46, 4439.

Schumann, H.; Meese-Marktscheffel, J. A.; Dietrich, A. J. Organomet. Chem. 1989, 377, C5.

6-Bromo-5'-dibromomethyl-2,2'-bipyridine (7).

Compound 7 was obtained in 28% yield as a by-product of the radical bromination of 6-bromo-5'-methyl-2,2'-bipyridine 2.

mp 106-107°C.

 $R_f = 0.57 \text{ (SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 6.71 (s, 1H), 7.52 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.0 Hz), 7.69 (t, 1H, 3J = 8.0 Hz), 8.08 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 3.0 Hz), 8.39 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.0 Hz), 8.46 (d, 1H, 3J = 8.0 Hz), 8.77 (d, 1H, 4J = 2.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 36.9, 120.0, 120.2, 121.5, 128.3, 128.6, 136.0, 138.3, 139.4, 146.4, 149.5.

ESI-TOF/MS: m/z 406.814 ([7 + H]⁺, 100%), 428.788 ([7 + Na]⁺, 62%).

Anal. Calcd for C₁₁H₇Br₃N₂: C, 32.47; H, 1.73; N, 6.88. Found: C, 32.15; H, 1.41; N, 6.63.

IR (KBr, cm⁻¹): 3013 (w), 2923 (w), 1581 (m), 1546 (s), 1387 (s), 763 (s), 642 (s).

6-Bromo-5'-aminomethyl-2,2'-bipyridine (13).

A mixture of 6 (400 mg, 1.22 mmol) and hexamethylenetetramine (206 mg, 1.47 mmol) in 200 mL of CH₂Cl₂ was refluxed for 5 hours. Upon cooling the solution to –30°C, a white precipitate appeared, which was filtered and washed with CH₂Cl₂ and Et₂O. The solid was dissolved in a mixture of 2.8 mL of aqueous 36% HCl and 20 mL of ethanol and the solution was refluxed for 26 hours. 2 mL of a saturated solution of NaOH in water were added and the solution was extracted twice with 100 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness to give **13** (250 mg, 78%) as a white solid. mp >160°C dec.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 3.97 (s, 2H), 7.48 (dd, 1H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.5 Hz), 7.66 (t, 1H, ³J = 8.0 Hz), 7.80 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.36 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz), 8.38 (d, 1H, ³J = 8.5 Hz), 8.65 (d, 1H, ⁴J = 1.5 Hz).

 13 C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 43.5, 119.3, 120.9, 127.5, 135.5, 138.8, 139.0, 141.3, 148.1, 152.9, 157.0.

ESI-TOF/MS: m/z 263.993 ([13 + H]⁺, 97%), 265.996 ([13 + H]⁺, 100%), 285.979 ([13 + Na]⁺, 29%), 287.976 ([13 + Na]⁺, 29%).

Anal. Calcd for C₁₁H₁₀BrN₃: C, 50.02; H, 3.82; N, 15.91. Found: C, 49.58; H, 3.63; N, 15.73. IR (KBr, cm⁻¹): 3437 (br s), 2922 (w), 2852 (w), 1619 (m), 1583 (br s), 1546 (m), 1430 (m), 1384 (m), 1124 (m), 1074 (br m).

6-Bromo-5'-hydroxymethyl-2,2'-bipyridine (14).

A mixture of 6 (866 mg, 2.64 mmol) and NaOAc (5 g, 61 mmol) was dissolved in 20 mL of DMF and heated to 120°C for 3 hours. DMF was distilled under reduced pressure and the solid residue was dissolved in a mixture of 20 mL of methanol and 20 mL of water containing NaOH (1.5 g, 0.57 mol) and refluxed for 2 hours. The pH of the cooled solution was brought to 7 by careful addition of aqueous 10% HCl. Methanol was evaporated under reduced pressure resulting in the precipitation of a white solid. The aqueous layer was extracted twice with 75 mL of CH₂Cl₂ and the combined organic layer were dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. Purification by column chromatography (Al₂O₃, 100/0 to 95/5 CH₂Cl₂/MeOH) gave **14** (622 mg, 89%) as a white solid.

mp 112-113°C.

 $R_f = 0.39 \text{ (SiO}_2, 96/4 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.80 (s, 2H), 7.49 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz, ${}^{4}J$ = 1.0 Hz), 7.67 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz), 7.84 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz, ${}^{4}J$ = 2.0 Hz), 8.37 (dd, 1H, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz, ${}^{4}J$ = 1.0 Hz), 8.41 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 8.5 Hz), 8.65 (d, 1H, ${}^{4}J$ = 1.5 Hz).

 13 C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 62.6, 119.8, 121.4, 128.1, 135.9, 137.0, 139.4, 141.7, 148.0, 153.9, 157.1.

ESI-TOF/MS: m/z 264.979 ([14 + H]⁺, 35%), 266.981 ([14 + H]⁺, 38%), 286.963 ([14 + Na]⁺, 98%), 288.960 ([14 + Na]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{11}H_9BrN_2O$: C, 49.84; H, 3.42; N, 10.57. Found: C, 49.65; H, 3.11; N, 10.36.

IR (KBr, cm⁻¹): 3293 (br s), 2923 (w), 2855 (w), 1595 (m), 1567 (m), 1543 (s), 1432 (s), 1391 (m), 1125 (m), 1051 (s).

Tris-[(6'-Bromo-2,2'-bipyridine-5-yl)methyl]amine (15).

In a Schlenk tube under argon were dissolved compound **13** (176 mg, 0.67 mmol), **6** (482 mg, 1.47 mmol) and Na₂CO₃ (143 mg, 1.35 mmol) in 30 mL of dry acetonitrile. The solution was heated to 80°C for 2 days. The mixture was evaporated to dryness and the solid residue was partitioned between 50 mL of CH₂Cl₂ and 30 mL of water. The aqueous phase was further extracted with 50 mL of CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and evaporated to dryness. Purification by column chromatography (SiO₂, 100/0 to 99/1 CH₂Cl₂/MeOH) gave **15** (440 mg, 87%).

mp 146-147°C.

 $R_f = 0.28$ (SiO₂ previously treated with Et₃N, CH₂Cl₂).

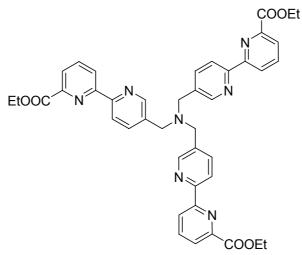
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 3.68 (s, 6H), 7.46 (d, 3H, ³J = 7.5 Hz), 7.65 (t, 3H, ³J = 7.5 Hz), 7.81 (dd, 3H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.33 (d, 3H, ³J = 7.0 Hz), 8.37 (d, 3H, ³J = 7.5 Hz), 8.65 (d, 3H, ⁴J = 2.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 55.3, 119.6, 121.3, 128.0, 134.6, 137.4, 139.2, 141.6, 149.6, 153.9, 157.0.

ESI-TOF/MS: m/z 759.962 ([15 + H]⁺, 6%), 781.925 ([15 + Na]⁺, 22%).

Anal. Calcd for $C_{33}H_{24}Br_3N_7$: C, 52.27; H, 3.19; N, 12.93. Found: C, 52.03; H, 3.07; N, 12.74. IR (KBr, cm⁻¹): 2921 (w), 1635 (br s), 1567 (m), 1545 (m), 1430 (s), 1384 (s), 1124 (m).

Tris-[(6'-Carboethoxy-2,2'-bipyridine-5-yl)methyl]amine (16).



A solution of **15** (224 mg, 0.29 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (42 mg, 0.059 mmol) in a mixture of 30 mL of methanol and 30 mL of triethylamine was heated to 70°C for 16 hours under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The solution was evaporated to dryness, the residue was dissolved in CH₂Cl₂, filtered over Celite and evaporated to dryness. Purification of the residue by column chromatography (SiO₂ flash previously treated with Et₃N, 100/0 to 98/2 CH₂Cl₂/MeOH) followed by the precipitation of the product in a CH₂Cl₂/Et₂O mixture gave compound **16** (73 mg, 33%) as a yellow solid.

mp > 270°C dec.

 $R_f = 0.29$ (SiO₂ previously treated with Et₃N, 99/1 CH₂Cl₂/MeOH)

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.47 (t, 9H, ³J = 7.0 Hz), 3.69 (s, 6H), 4.49 (q, 6H, ³J = 7.0 Hz), 7.87 (dd, 3H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz), 7.94 (t, 3H, ³J = 8.0 Hz), 8.11 (d, 3H, ³J = 7.5 Hz), 8.54 (d, 3H, ³J = 8.0 Hz), 8.56 (d, 3H, ³J = 7.5 Hz), 8.67 (s, br, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 14.3, 55.1, 61.9, 121.6, 124.1, 124.9, 134.6, 137.5, 137.9, 147.8, 149.5, 154.7, 156.1, 165.3.

ESI-TOF/MS: m/z 738.267 ([16 + H]⁺, 5%), 760.240 ([16 + Na]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{42}H_{39}N_7O_6$: C, 68.37; H, 5.33; N, 13.29. Found: C, 68.05; H, 5.13; N, 12.95. IR (KBr, cm⁻¹): 2964 (m), 2926 (m), 1716 (s, $v_{C=O}$), 1588 (m), 1451 (m), 1139 (s).

Tris-[(6'-Carboxy-2,2'-bipyridine-5-yl)methyl]amine hydrate (L²H₃·0.5 H₂O).

A solution of **16** (73 mg, 0.10 mmol) and NaOH (280 mg, 7 mmol) in a mixture of 5 mL of methanol and 5 mL of water was heated to 80°C for 2 hours. After cooling to room temperature, dilute aqueous HCl was slowly added until a white solid precipitated (pH \sim 4), which was isolated by centrifugation. The precipitate was washed with 5 mL of water, centrifuged and dried under vacuum to give $L^2H_3\cdot0.5H_2O$ (33 mg, 50%) as a white solid. mp >220°C dec.

¹H NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): δ 3.79 (m, 6H), 8.03-8.12 (m, 9H), 8.45-8.58 (m, 6H), 8.75 (m, 3H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): δ 54.6, 121.0, 123.8, 125.1, 135.5, 138.9, 140.4, 147.9 (2C), 150.7, 153.9, 165.7.

FAB⁺/MS: m/z 577.2 (10%), 608.2 ([$\mathbf{L}^2\mathbf{H}_3 - \mathbf{COOH}$]⁺⁺, 30%), 654.2 ([$\mathbf{L}^2\mathbf{H}_3 + \mathbf{H}$]⁺, 100%). Anal. Calcd for C₃₆H₂₇N₇O₆·0.5 H₂O: C, 65.25; H, 4.26; N, 14.80. Found: C, 65.61; H, 4.38; N, 14.64.

IR (KBr, cm⁻¹): 3411 (s), 1729 (br m, $\nu_{C=O}$), 1640 (w), 1619 (s, $\nu_{COO,asym.}$), 1556 (m), 1346 (m, $\nu_{COO,sym.}$).

Bis-[(6'-Bromo-2,2'-bipyridine-5-yl)methyl]ether (17).

In a Schlenk tube under argon were added compound **14** (90 mg, 0.34 mmol) and NaH (60% suspension in mineral oil, 19 mg, 0.48 mmol) in 15 mL of dry THF. The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. Compound **6** (140 mg, 0.43 mmol) was added and the

solution was heated to 80°C for 18 hours. After addition of 1 mL of water, the solvents were removed under reduced pressure. 10 mL of methanol were added on the solid and the mixture was refluxed for one hour. Upon slow cooling to 4°C, a white precipitate formed which was collected by filtration and dried under vacuum, to give **17** (146 mg, 84%) as a white solid. mp 192-193°C.

 $R_f = 0.78 \text{ (SiO}_2, 96/4 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH})$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.68 (s, 4H), 7.49 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.67 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.84 (dd, 2H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.38 (d, 2H, ³J = 7.0 Hz), 8.42 (d, 2H, ³J = 8.5 Hz), 8.65 (d, 2H, ⁴J = 2.0 Hz).

 13 C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 69.9, 119.8, 121.4, 128.1, 134.0, 136.6, 139.3, 141.7, 148.7, 154.3, 157.2.

ESI-TOF/MS: m/z 512.960 ([17 + H]⁺, 53%), 534.940 ([17 + Na]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{22}H_{16}Br_2N_4O$: C, 51.59; H, 3.15; N, 10.94. Found: C, 51.33; H, 2.85; N, 10.58.

IR (KBr, cm⁻¹): 2925 (w), 2867 (w), 1620 (w), 1569 (m), 1545 (m), 1429 (s), 1384 (s), 1125 (m), 1062 (s).

Bis-[(6'-Carboethoxy-2,2'-bipyridine-5-yl)methyl]ether (18).

A solution of 17 (135 mg, 0.26 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (37 mg, 0.05 mmol) in a mixture of 20 mL of methanol and 20 mL of triethylamine was heated to 70°C for 18 hours under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The solution was evaporated to dryness, the residue was dissolved in CH₂Cl₂, filtered over Celite and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (SiO₂ flash, 100/0 to 99/1 CH₂Cl₂/MeOH). The product still containing triphenylphosphine was precipitated in a CH₂Cl₂/hexane mixture to give compound 18 (51 mg, 39%) as a white solid.

mp 221-222°C.

 $R_f = 0.55 \text{ (SiO}_2, 96/4 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.41 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 4.44 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz), 4.53 (s, 4H), 7.82 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.90 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 8.07 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 8.47- 8.58 (m, 4H), 8.63 (s, br, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 14.3, 61.8, 69.8, 121.4, 124.1, 124.9, 133.7, 136.5, 138.0, 147.8, 148.5, 154.9, 156.1, 165.2.

ESI-TOF/MS: m/z 521.148 ([18 + Na]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{28}H_{26}N_4O_5$: C, 67.46; H, 5.26; N, 11.24. Found: C, 67.32; H, 5.17; N, 11.02. IR (KBr, cm⁻¹): 2926 (s), 2855 (s), 1737 (s, $\nu_{C=O}$), 1631 (m), 1590 (m), 1452 (m), 1369 (m), 1279 (s), 1140 (m), 1077 (s).

Bis-[(6'-Carboxy-2,2'-bipyridine-5-yl)methyl]ether hydrate (L³H₂·H₂O).

A solution of **18** (41 mg, 0.08 mmol) and NaOH (69 mg, 1.73 mmol) in a mixture of 10 mL of methanol and 2 mL of water was refluxed for 2 hours. The pH was brought to 3 with dilute aqueous HCl resulting in the precipitation of a white solid. The solid was isolated by centrifugation, washed with 5 mL of water and centrifuged. The aqueous layer was decanted and the solid dried under vacuum to give $L^3H_2\cdot H_2O$ (32 mg, 85%) as a white solid.

mp = 217-218°C.

¹H NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): δ4.75 (s, 4H), 8.02-8.22 (m, 6H), 8.58 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz), 8.60 (dd, 2H, 3J = 7.0 Hz, 4J = 2.0 Hz), 8.75 (m, 2H).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): *δ* 69.0, 121.3, 123.8, 125.1, 135.0, 137.9, 139.0, 147.6, 148.0, 152.8, 153.8, 165.8.

ESI-TOF/MS: m/z 242.278 ([L³H₂ + H₂O + Na + H]²⁺, 100%), 465.099 ([L³H₂ + Na]⁺, 19%). Anal. Calcd for C₂₄H₁₈N₄O₅·H₂O: C, 62.61; H, 4.38; N, 12.17. Found: C, 62.48; H, 4.42; N, 11.88.

IR (KBr, cm⁻¹): 2924 (w), 1620 (br s, $\nu_{COO,asym.}$), 1453 (m), 1384 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1121 (br m), 1082 (br m).

N,N-Dibenzyl-tris-(hydroxymethyl)aminomethane (20).

Benzyl bromide (4.3 mL, 36.2 mmol) was added to a solution of 50 mL of water containing *tris*-(hydroxymethyl)aminomethane **19** (2 g, 16.5 mmol), NaHCO₃ (3.05 g, 36.3 mmol) and

tetrabutylammonium iodide (610 mg, 1.7 mmol). The resulting biphasic system was heated to 100°C for 16 hours and then extracted twice with 50 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (Al₂O₃, 100/0 to 90/10 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **20** (1.514 g, 30%) as white crystals.

 $R_f = 0.36 \text{ (SiO}_2, 90/10 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

 1 H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 2.62 (s, 3H), 3.63 (s, 6H), 3.97 (s, 4H), 7.17-7.26 (m, 10H).

¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ57.2, 60.3, 75.4, 130.4, 130.6, 130.7, 133.4.

FAB⁺/MS: m/z 210.2 ([**20** – C₇H₇]⁺⁺, 25%), 302.1 ([**20** + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for C₁₈H₂₃NO₃: C, 71.73; H, 7.69; N, 4.65. Found: C, 71.48; H, 7.54; N, 4.35.

N,N-Dibenzyl-tris-[(6'-bromo-2,2'-bipyridine-5-yl)methoxymethyl]aminomethane (21).

In a Schlenk tube under argon were dissolved **11** (50 mg, 0.17 mmol), 6-bromo-5'-bromomethyl-2,2'-bipyridine **6** (180 g, 0.55 mmol) and tetrabutylammonium iodide (6 mg, 16 µmol) in 5 mL of dry DMF. NaH (60% dispersion in mineral oil, 30 mg, 0.75 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for 19 hours. 5 mL of H₂O was added and the mixture was extracted twice with 10 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was dried under vaccum and purified by column chromatography (SiO₂, 100/0 to 99/1 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **21** (150 mg, 87%) as a yellow solid.

 $R_f = 0.79 \text{ (SiO}_2, 95/5 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 3.71 (s, 6H), 4.03 (s, 4H), 4.44 (s, 6H), 7.01-7.36 (m, 10H), 7.44 (d, 3H, $^3J = 7.5$ Hz), 7.62 (t, 3H, $^3J = 8.0$ Hz), 7.65 (dd, 3H, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 2.5$ Hz), 8.29 (d, 3H, $^3J = 8.5$ Hz), 8.30 (d, 3H, $^3J = 7.0$ Hz), 8.54 (d, 3H, $^4J = 1.5$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 54.7, 64.5, 70.5, 70.8, 119.6, 121.0, 126.3, 127.79, 127.83, 128.2, 134.4, 136.0, 139.1, 141.5, 142.0, 148.3, 153.7, 157.0.

FAB⁺/MS: m/z 794.3 ([21 – C₁₁H₈N₂Br]⁺⁺, 25%), 1042.2 ([21 + H]⁺, 90%), 1044.2 ([21 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{51}H_{44}Br_3N_7O_3$: C, 58.75; H, 4.25; N, 9.40. Found: C, 58.45; H, 3.98; N, 9.20.

IR (KBr, cm⁻¹): 2906 (w), 2860 (w), 2360 (m), 1569 (m), 1545 (s), 1431 (s), 1123 (s), 1080 (s), 798 (s).

N,N-Dibenzyl-*tris*-[(6'-carboethoxy-2,2'-bipyridine-5-yl)methoxymethyl]aminomethane (22).

A solution of **21** (243 mg, 0.23 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (34 mg, 0.05 mmol) in a mixture of 20 mL of ethanol, 20 mL of triethylamine and 5 mL of 1,2-dichloroethane was heated to 70°C for 17 hours, under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The solution was evaporated to dryness, the residue was dissolved in CH₂Cl₂, filtered over Celite and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (Al₂O₃, CH₂Cl₂). The product still containing triphenylphosphine oxide was solubilized in 15 mL of CH₂Cl₂ and extracted twice with 5 mL of aqueous 3N HCl. The solution was neutralized with a saturated aqueous NaHCO₃ solution and extracted with three portions of 20 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness to give compound **22** (194 mg, 81%) as a yellow oil.

 $R_f = 0.31 \text{ (SiO}_2, 95/5 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.46 (t, 9H, ³J = 7.0 Hz), 3.73 (s, 6H), 4.03 (s, 4H), 4.46 (s, 6H), 4.49 (qd, 6H, ³J = 7.0 Hz), 7.02-7.34 (m, 10H), 7.71 (dd, 3H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.90 (t, 3H, ³J = 8.0 Hz), 8.08 (dd, 3H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.44-8.63 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 29.7, 54.8, 61.8, 64.6, 70.7, 71.0, 121.3, 124.0, 124.8, 126.3, 127.8, 128.2, 134.4, 136.1, 137.7, 142.0, 147.7, 148.3, 154.5, 156.2, 165.3.

FAB⁺/MS: m/z 360.2 (25%), 388.2 (17%), 1044.5 ([22 + Na]⁺, 100%), 1045.5 ([22 + Na]⁺, 100%), 1046.5 ([22 + Na]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{60}H_{59}N_7O_9$: C, 70.50; H, 5.82; N, 9.59. Found: C, 70.35; H, 5.60; N, 9.37. IR (KBr, cm⁻¹): 2962 (s), 2926 (s), 2855 (m), 1737 (s, $v_{C=O}$), 1718 (s, $v_{C=O}$), 1589 (m), 1576 (m), 1451 (s), 1417 (s), 1322 (s), 1260 (s), 1078 (br s), 1025 (br s), 798 (br s).

N,N-Dibenzyl-*bis*-[(6'-bromo-2,2'-bipyridine-5-yl)methoxymethyl]hydroxymethylaminomethane (23).

Compound **23** was obtained as a by-product of the trialkylation of **20** with **6**. $R_f = 0.62$ (SiO₂, 95/5 CH₂Cl₂/MeOH).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 3.47-3.78 (m, 6H), 3.95 (s, 4H), 4.45 (s, 4H), 7.08-7.28 (m, 10H), 7.43 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz), 7.61 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz), 7.65 (dd, 2H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 2.0 Hz), 8.31 (d, 4H, 3J = 8.5 Hz), 8.55 (d, 2H, 4J = 2.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ53.8, 61.4, 65.3, 70.2, 70.6, 119.5, 120.9, 126.7, 127.8, 128.17, 128.21, 134.0, 136.0, 139.1, 141.0, 141.4, 148.2, 153.7, 156.9.

 FAB^{+}/MS : m/z 548.2 ([23 – $C_{11}H_{8}N_{2}Br + 2 H]^{+}$, 20%), 796.3 ([23 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{40}H_{37}Br_2N_5O_3$: C, 60.39; H, 4.69; N, 8.80. Found: C, 60.15; H, 4.46; N, 8.74.

IR (KBr, cm⁻¹): 3441 (br s), 3019 (w), 2873 (m), 2360 (m), 1573 (m), 1542 (s), 1484 (m), 1452 (s), 1385 (s), 1121 (s), 1040 (s), 798 (s), 751 (s).

N,N-Dibenzyl-*tris*-[(6'-carboxy-2,2'-bipyridine-5-yl)methoxymethyl]aminomethane tetrahydrochloride hydrate (L⁴H₃·4HCl·H₂O).

A solution of **22** (194 mg, 0.19 mmol) and NaOH (30 mg, 0.75 mmol) in a mixture of 8 mL of methanol and 2 mL of water was heated to 60°C for 4 hours. The solution was evaporated to dryness, the resulting solid was dissolved in water and filtred over Celite. Dilute aqueous HCl was slowly added until a consequent precipitate appeared. Upon centrifugation, **L**⁴H₃·4HCl·H₂O (136 mg, 65%) was isolated as a pale white powder.

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ 3.74 (s, 6H), 4.08 (s, 4H), 4.51 (s, 6H), 7.04-7.15 (m, 6H), 7.24-7.30 (m, 4H), 7.76 (dd, 3H, ${}^{3}J$ = 8.5 Hz, ${}^{4}J$ = 2.0 Hz), 7.94 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz), 8.03 (d, 3H, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz), 8.30 (d, 3H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz), 8.32 (d, 3H, ${}^{3}J$ = 8.5 Hz), 7.49 (s, 3H).

FAB⁺/MS: m/z 847.2 ([L⁴H₃ - C₇H₇ + H]⁺, 25%), 938.2 ([L⁴H₃ + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{54}H_{47}N_7O_9\cdot 4HCl\cdot H_2O$: C, 58.86; H, 4.85; N, 8.90. Found: C, 58.69; H, 4.88; N, 8.82.

IR (KBr, cm⁻¹): 3445 (s), 1635 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1384 (m, $\nu_{\text{COO,sym.}}$), 1262 (w), 1096 (w). UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 242 (27600), 290 (32800).

$[EuL^4]\cdot 3H_2O.$

L⁴H₃·4HCl·H₂O (22 mg, 20.0 μmol) was suspended in a mixture of 30 mL of methanol and 10 mL of water and the pH was brought to 1-2 with dilute aqueous HCl. To this solution was added a mixture of EuCl₃·6H₂O (8 mg, 21.8 μmol) in 2.5 mL of methanol and 2.5 mL of water. The solution wad heated to 60°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the pH was brought to 7.5 with a 0.5% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [EuL⁴]·3H₂O (19.4 mg, 85%) was isolated as a white powder.

FAB⁺/MS: m/z 994.2 ([EuL⁴ - C₇H₇]⁺⁺, 24%), 996.6 ([EuL⁴ - C₇H₇]⁺⁺, 30%), 1086.2 ([EuL⁴ + H]⁺, 75%), 1088.1 ([EuL⁴ + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{54}H_{44}EuN_7O_9\cdot 3H_2O$: C, 56.84; H, 4.42; N, 8.59. Found: C, 56.77; H, 4.30; N, 8.27.

IR (KBr, cm⁻¹): 3429 (s), 2913 (w), 2860 (w), 1633 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1595 (m), 1457 (w), 1437 (w), 1384 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1096 (w), 1003 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 251 (24400), 305 (23400).

$[TbL^4]\cdot 2H_2O.$

L⁴H₃·4HCl·H₂O (22 mg, 20.0 μmol) was suspended in a mixture of 30 mL of methanol and 10 mL of water and the pH was brought to 1-2 with dilute aqueous HCl. To this solution was added a mixture of TbCl₃·6H₂O (8.2 mg, 22.0 μmol) in 2.5 mL of methanol and 2.5 mL of water. The solution wad heated to 60°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the pH was brought to 7.1 with a 0.5% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [TbL⁴]·2H₂O (17.6 mg, 78%) was isolated as a yellow powder.

FAB⁺/MS: m/z 1002.2 ([TbL⁴ – C₇H₇]⁺, 10%), 1094.1 ([TbL⁴ + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{54}H_{44}N_7O_9Tb\cdot 2H_2O$: C, 57.40; H, 4.28; N, 8.68. Found: C, 57.19; H, 3.95; N, 8.46.

IR (KBr, cm⁻¹): 3443 (s), 2924 (w), 2846 (w), 1635 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1587 (m), 1456 (w), 1384 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1255 (w), 1087 (w), 1017 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 250 (20600), 303 (20900).

$[GdL^4]\cdot 4H_2O.$

L⁴H₃·4HCl·H₂O (22 mg, 20.0 μmol) was suspended in a mixture of 30 mL of methanol and 10 mL of water and the pH was brought to 1-2 with dilute aqueous HCl. To this solution was added a mixture of GdCl₃·6H₂O (8 mg, 21.5 μmol) in 2.5 mL of methanol and 2.5 mL of water. The solution wad heated to 60°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the pH was brought to 7.0 with a 0.5% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [GdL⁴]·4H₂O (18.4 mg, 79%) was isolated as a yellow powder.

FAB⁺/MS: m/z 999.2 ([GdL⁴ - C₇H₇]⁺⁺, 20%), 1001.2 ([GdL⁴ - C₇H₇]⁺⁺, 30%), 1092.2 ([GdL⁴]⁺⁺, 80%), 1093.2 ([GdL⁴ + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{54}H_{44}GdN_7O_9\cdot 4H_2O$: C, 55.71; H, 4.50; N, 8.42. Found: C, 55.40; H, 4.18; N, 8.36.

IR (KBr, cm⁻¹): 3435 (s), 1636 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1458 (w), 1437 (w), 1384 (m, $\nu_{\text{COO,sym.}}$), 1088 (w), 1014 (w).

N,N-Dibenzyl-tris-[(6-bromo-pyridine-2-yl)methoxymethyl]aminomethane (27).

In a Schlenk tube under argon were dissolved **20** (182 mg, 0.60 mmol), 2-bromo-6-bromomethylpyridine **24** (500 mg, 1.99 mmol) and tetrabutylammonium iodide (22 mg, 0.06 mmol) in 15 mL of dry DMF. NaH (60 % dispersion in mineral oil, 109 mg, 2.73 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. 10 mL of H_2O was added and the mixture was extracted twice with 20 mL of CH_2Cl_2 . The combined organic layers

were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was dried under vaccum and purified by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂) to give compound **27** (368 mg, 75%) as a yellow oil.

 $R_f = 0.63 \text{ (SiO}_2, 98/2 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 3.79 (s, 6H), 4.07 (s, 4H), 4.51 (s, 6H), 7.08-7.19 (m, 6H), 7.25-7.36 (m, 10H), 7.48 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ54.7, 64.5, 71.3, 73.4, 119.8, 126.3, 126.5, 127.7, 128.2, 138.9, 141.1, 141.9, 160.3.

FAB⁺/MS: m/z 614.2 ([27 - C₁₄H₁₄N]⁺⁺, 20%), 616.2 ([27 - C₁₄H₁₄N]⁺⁺, 20%), 811.2 ([27 + H]⁺, 95%), 813.3 ([27 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{36}H_{35}Br_3N_4O_3$: C, 53.29; H, 4.35; N, 6.90. Found: C, 53.12; H, 4.27; N, 6.78.

IR (KBr, cm⁻¹): 3025 (w), 2921 (m), 2871 (m), 1583 (s), 1557 (s), 1439 (m), 1411 (s), 1155 (s), 1125 (s), 783 (m).

N,N-Dibenzyl-tris-[(6-carbobutoxy-pyridine-2-yl)methoxymethyl]aminomethane (28).

A solution of 27 (250 mg, 0.31 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (33 mg, 0.05 mmol) in a mixture of 10 mL of *n*-butanol and 5 mL of *N*,*N*-diisopropylethylamine and 3 mL of CH₂Cl₂ was heated to 120°C for 69 hours, under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The mixture was evaporated to dryness and the solid residue was partitioned between 20 mL of CH₂Cl₂ and 10 mL of water. The aqueous phase was further extracted with three partions of 20 mL of CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂) to give compound 28 (119 mg, 44%) as a yellow oil.

 $R_f = 0.36 \text{ (SiO}_2, 97/3 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 0.95 (t, 9H, ³J = 7.5 Hz), 1.44 (sx, 6H, ³J = 7.5 Hz), 1.77 (qt, 6H, ³J = 7.0 Hz), 3.83 (s, 6H), 4.08 (s, 4H), 4.39 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 4.65 (s, 6H), 7.02-7.29

(m, 10H), 7.56 (d, 3H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz), 7.72 (t, 3H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz), 7.95 (dd, 3H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz, ${}^{4}J$ = 0.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 13.7, 19.1, 30.6, 54.7, 64.6, 65.7, 71.4, 73.9, 123.5, 124.1, 126.3, 127.7, 128.2, 137.5, 141.9, 147.4, 159.4, 165.1.

 FAB^{+}/MS : m/z 801.2 ([**28** – OC₄H₉]⁺⁺, 10%), 875.2 ([**28** + H]⁺, 100%).

 $Anal.\ Calcd\ for\ C_{51}H_{62}N_4O_9;\ C,\ 70.00;\ H,\ 7.14;\ N,\ 6.40.\ Found:\ C,\ 69.71;\ H,\ 6.83;\ N,\ 6.10.$

IR (KBr, cm⁻¹): 3027 (w), 2960 (s), 2932 (m), 2873 (m), 1739 (s, $v_{C=O}$), 1717 (s, $v_{C=O}$), 1590 (m), 1454 (m), 1311 (s), 1289 (s), 1226 (s), 1138 (s), 1084 (m), 762 (m).

N,N-Dibenzyl-*bis*-[(6-bromo-pyridine-2-yl)methoxymethyl]hydroxymethylaminomethane (29).

Compound 29 was obtained as a by-product of the trialkylation of 20 with 24.

 $R_f = 0.23 \text{ (SiO}_2, 98/2 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 3.62-3.82 (m, 6H), 4.00 (s, 4H), 4.53 (s, 4H), 7.13-7.26 (m, 10H), 7.33 (d, 3H, ^{3}J = 8.5 Hz), 7.37 (d, 3H, ^{3}J = 8.0 Hz), 7.52 (t, 3H, ^{3}J = 7.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 54.0, 61.9, 65.4, 71.1, 73.3, 119.8, 126.7, 126.8, 128.2, 128.3, 139.0, 141.2, 141.4, 160.0.

FAB⁺/MS: m/z 453.3 ([29 – C₆H₅BrN – OH + H]⁺, 48%), 455.3 ([29 – C₆H₅BrN – OH + H]⁺, 50%), 640.2 ([29 + H]⁺, 50%), 642.2 ([29 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{30}H_{31}Br_2N_3O_3$: C, 56.18; H, 4.87; N, 6.55. Found: C, 55.84; H, 4.61; N, 6.32.

IR (KBr, cm⁻¹): 3421 (br s), 3019 (w), 2913 (w), 2860 (w), 1581 (s), 1556 (s), 1448 (s), 1411 (m), 1138 (s), 1107 (s), 791 (m).

2-Carboethoxy-6-bromomethylpyridine (30).

A solution of 2-carboethoxy-6-methylpyridine (4.0 g, 24.2 mmol), *N*-bromosuccinimide (4.3 g, 24.2 mmol) and AIBN (200 mg, 1.22 mmol) in 100 mL of benzene was irradiated for 2 hours with a conventional 100 W halogen lamp. After cooling to room temperature, the solution was filtered over a thin layer of aluminium oxide and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂) to give compound **30** (1.99 g, 34%) as a yellow oil.

 $R_f = 0.38 \text{ (SiO}_2, 99/1 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.43 (t, 3H, ³J = 7.0 Hz), 4.48 (q, 2H, ³J = 7.0 Hz), 4.65 (s, 2H), 7.68 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 7.86 (t, 1H, ³J = 7.5 Hz), 8.04 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): *δ* 14.1, 33.1, 61.8, 124.1, 126.8, 137.9, 147.7, 157.2, 164.5.

N,N-Dibenzyl-*tris*-[(6-carboxy-pyridine-2-yl)methoxymethyl]aminomethane tetrahydrochloride dehydrate (L⁵H₃·4HCl·2H₂O).

A solution of **28** (95 mg, 0.11 mmol) in a mixture of 4 mL of aqueous 37% HCl and 4 mL of water was heated to 60°C for 38 hours. The solution was then evaporated to dryness. Upon crystallisation in a MeOH/Et₂O mixture, $\mathbf{L}^5H_3\cdot 4HCl\cdot 2H_2O$ (96 mg, quant.) was isolated as a crystalline yellow powder.

¹H NMR (CD₃OD, 200 MHz): δ4.30 (s, 6H), 4.87 (s, 4H), 4.94 (s, 6H), 7.17-7.28 (m, 10H), 7.80-7.84 (m, 3H), 8.18-8.24 (m, 6H).

¹³C NMR (CD₃OD, 50 MHz): δ 57.9, 69.7, 71.6, 74.1, 127.1, 129.3, 130.2, 130.7, 131.4, 132.5, 145.2, 145.8, 156.7, 163.7.

 FAB^{+}/MS : m/z 707.3 ([$L^{5}H_{3} + H]^{+}$, 100%).

Anal. Calcd for $C_{39}H_{38}N_4O_9\cdot 4HCl\cdot 2H_2O$: C, 52.71; H, 5.22; N, 6.30. Found: C, 52.52; H, 4.98; N, 6.14.

IR (KBr, cm⁻¹): 3435 (s), 2966 (w), 2933 (w), 1636 (m, $v_{COO,asym.}$), 1439 (w), 1384 (m, $v_{COO,sym.}$), 1275 (w), 1076 (w), 1010 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 268 (14600).

N,N-[(6'-Bromo-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]aminomalonic acid diethyl ester (35).

In a Schlenk tube under argon were dissolved diethyl aminomalonate hydrochloride 34 (450 mg, 2.13 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (1.18 g, 8.54 mmol) in 150 mL of dry acetonitrile. The solution was heated to 80°C for 1 hour, 6-bromo-6'-bromomethyl-2,2'-bipyridine 33 (1.46 g, 4.45 mmol) was then added. The solution was heated to 80°C for 21 hours. The mixture was evaporated to dryness, 100 mL of CH_2Cl_2 and 20 mL of water were added, and the organic phase was separated. The aqueous phase was extracted twice with 20 mL of CH_2Cl_2 , and the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated to dryness. The resulting solid was purified by column chromatography (SiO_2 flash, 100/0 to 99/1 $CH_2Cl_2/MeOH$) to give compound 35 (794 mg, 56%) as a pale yellow powder.

 $R_f = 0.57 \text{ (SiO}_2, 97/3 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.26 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 4.22 (s, 4H), 4.23 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz), 4.47 (s, 1H), 7.43 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.5 Hz), 7.60 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.62 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.75 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 8.22 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.37 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ14.1, 58.0, 61.4, 67.1, 119.7 (2C), 123.4, 127.7, 137.4, 139.0, 141.4, 153.5, 157.4, 158.9, 168.1.

 FAB^{+}/MS : m/z 670.2 ([35 + H]⁺, 100%), 672.2 ([35 + H]⁺, 50%).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{27}Br_2N_5O_4$: C, 52.04; H, 4.07; N, 10.46. Found: C, 51.93; H, 3.93; N, 10.31.

N,N-[(6'-Carboethoxy-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]aminomalonic acid diethyl ester (36).

A solution of **35** (778 mg, 1.16 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (82 mg, 0.12 mmol) in a mixture of 75 mL of ethanol and 75 mL of triethylamine was heated to 70°C for 16 hours, under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The solution was evaporated to dryness, the resulting solid was dissolved in 75 mL of CH₂Cl₂ and filtered over Celite. The organic layer was washed with 15 mL of water and the aqueous layer was extracted twice with 20 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (SiO₂ flash, 99.5/0.5 to 90/10 CH₂Cl₂/MeOH). Fractions containing compound **36** and triphenylphosphine oxide were combined, evaporated to dryness, dissolved in 40 mL of CH₂Cl₂ and extracted four times with 10 mL of aqueous 3N HCl. The combined aqueous layers were neutralised with NaOH and extracted with 30 mL of CH₂Cl₂ three times. The resulting organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness to give compound **36** (522 mg, 68%) as a colourless oil.

 $R_f = 0.55$ (SiO₂, 90/10 CH₂Cl₂/MeOH).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.26 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 1.45 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 4.23 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz), 4.24 (s, 4H), 4.47 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz), 4.48 (s, 1H), 7.64 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.5 Hz), 7.80 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.91 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz), 8.09 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.40 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 0.5 Hz), 8.62 (dd, 2H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 14.1, 14.3, 58.0, 61.4, 61.8, 67.1, 120.0, 123.4, 124.2, 124.7, 137.5, 137.7, 147.7, 154.4, 156.5, 158.8, 165.3, 168.2.

 FAB^{+}/MS : m/z 496.2 ([**36** – $C_7H_{11}O_4$]⁺⁺, 35%), 656.1 ([**36** + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for C₃₅H₃₇N₅O₈: C, 64.11; H, 5.69; N, 10.68. Found: C, 63.81; H, 5.43; N, 10.43.

N,N-[(6'-Carboxy-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]aminomalonic acid trihydrochloride trihydrate ($L^6H_4\cdot 3HCl\cdot 3H_2O$).

A solution of **36** (103 mg, 0.16 mmol) and NaOH (50 mg, 1.25 mmol) in a mixture of 10 mL of methanol and 5 mL of water was heated to 70°C for 5 hours. The solution was evaporated to dryness and the resulting solid was dissolved in 8 mL of water. At 0°C, aqueous 1N HCl was slowly added until a consequent precipitate appeared (pH = 4-5). Upon centrifugation, $L^6H_4\cdot 3HCl\cdot 3H_2O$ (59 mg, 53%) was isolated as a white powder.

¹H NMR (NaOD/^tBuOH, 300 MHz): δ 3.75 (s, 4H), 4.04 (s, 1H), 6.84 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.15-7.26 (m, 4H), 7.32 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.42 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.56 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz).

¹³C NMR (NaOD/BuOH, 75 MHz): δ 60.3, 79.4, 119.9, 122.9, 124.1, 124.4, 138.2, 138.6, 152.8, 153.7, 154.0, 158.7, 172.3, 177.3.

FAB⁺/MS: m/z 544.2 ([L⁶H₄ + H]⁺, 20%).

Anal. Calcd for $C_{27}H_{21}N_5O_8\cdot 3HCl\cdot 3H_2O$: C, 45.87; H, 4.28; N, 9.91. Found: C, 45.75; H, 4.09; N, 9.78.

IR (KBr, cm⁻¹): 3443 (s), 2913 (w), 2846 (w), 1720 (m, $\nu_{C=O}$), 1622 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1448 (w), 1384 (m), 1356 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1249 (w), 1169 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ε_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 239 (20300), 288 (24800).

N,N-[(6'-Bromo-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]glutamic acid dimethyl ester (39).

In a Schlenk tube under argon were dissolved glutamic acid dimethyl ester hydrochloride **38** (470 mg, 2.22 mmol) and anhydrous K₂CO₃ (1.23 g, 8.90 mmol) in 100 mL of dry acetonitrile. The solution was heated to 80°C for 30 min. and 6-bromo-6'-bromomethyl-2,2'-bipyridine **33** (1.60 g, 4.88 mmol) was added. The solution was heated to 80°C for 23 hours. The mixture was evaporated to dryness, and the solid residue was partitioned between 100 mL of CH₂Cl₂ and 20 mL of water. The aqueous phase was further extracted twice with 20 mL of CH₂Cl₂, and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The resulting solid was purified by column chromatography (SiO₂ flash, 100/0 to 97/3 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **39** (995 mg, 67%) as a pale yellow solid.

 $R_f = 0.34 \text{ (SiO}_2, 98/2 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 2.06-2.20 (m, 2H), 2.39-2.68 (m, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.54-3.62 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.99-4.16 (m, 4H), 7.43-7.48 (m, 4H), 7.63 (t, 2H, 3J = 8.0 Hz), 7.71 (t, 2H, 3J = 8.0 Hz), 8.23 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz), 8.39 (d, 2H, 3J = 8.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 24.8, 30.3, 51.5, 57.2, 62.1, 119.6, 119.7, 123.5, 127.8, 137.3, 139.1, 141.5, 153.8, 157.4, 159.1, 173.1, 173.4.

 FAB^{+}/MS : m/z 670.2 ([**39** + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{27}N_5O_4Br_2$: C, 52.04; H, 4.07; N, 10.46. Found: C, 51.81; H, 3.85; N, 10.19.

N,N-[(6'-Carboethoxy-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]glutamic acid dimethyl ester (40).

A solution of compound **39** (995 mg, 1.49 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (150 mg, 0.21 mmol) in a mixture of 50 mL of ethanol and 50 mL of triethylamine was heated to 70°C for 15 hours, under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The solution was evaporated to dryness, and the resulting solid was dissolved in 100 mL of CH₂Cl₂ and filtered over Celite. The organic layer was washed with 20 mL of water, and the aqueous layer was extracted twice with 20 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The resulting solid was purified by column chromatography (SiO₂

flash, 99/1 to 90/10 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **40** (588 mg, 60%) as a slightly orange oil.

 $R_f = 0.30 \text{ (SiO}_2, 95/5 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.46 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 2.06-2.19 (m, 2H), 2.38-2.65 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.55-3.63 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 4.02-4.19 (m, 4H), 4.48 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz), 7.47 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.75 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.92 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 8.10 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz), 8.40 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz), 8.62 (d, 2H, ³J = 8.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 14.3, 24.8, 30.4, 51.5, 57.2, 61.8, 62.0, 119.9, 123.5, 124.2, 124.8, 137.3, 137.7, 147.8, 154.6, 156.5, 159.0, 165.4, 173.2, 173.5.

 FAB^{+}/MS : m/z 656.2 ([**40** + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for C₃₅H₃₇N₅O₈: C, 64.11; H, 5.69; N, 10.68. Found: C, 64.07; H, 5.55; N, 10.53.

N,N-[(6'-Carboxy-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]glutamic acid trihydrochloride ($L^7H_4\cdot 3HCl$).

A solution of compound **40** (588 mg, 0.90 mmol) and NaOH (144 mg, 3.60 mmol) in a mixture of 50 mL of methanol and 15 mL of water was heated to 70° C for 5 hours. The solution was evaporated to dryness, and the resulting solid was dissolved in 10 mL of water. Aqueous 2N HCl was slowly added until a consequent precipitate appeared (pH = 2-3). Upon centrifugation, $L^{7}H_{4}\cdot 3HCl$ (411 mg, 67%) was isolated as a pale yellow powder.

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 2.26-2.48 (m, 2H), 2.80-2.84 (m, 2H), 3.95-3.99 (m, 1H), 4.53- 4.81 (m, 4H), 7.47 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz), 7.63 (t, 2H, 3J = 8.0 Hz), 7.90 (t, 2H, 3J = 8.0 Hz), 8.02 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz), 8.42 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz), 8.58 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz).

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): δ 23.1, 32.1, 57.0, 67.0, 122.3, 125.1, 125.9, 126.1, 139.7, 140.1, 149.0, 154.1, 155.5, 156.1, 168.0, 173.7, 176.4.

FAB⁺/MS: m/z 572.5 ([L⁷H₄ + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{25}N_5O_8$ ·3HCl: C, 51.15; H, 4.14; N, 10.28. Found: C, 51.01; H, 4.43; N, 9.95.

IR (L^7 Na₄, KBr, cm⁻¹): 3429 (s), 1624 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1574 (s, $\nu_{COO,asym.}$), 1418 (m), 1385 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1267 (w), 1161 (w), 1003 (m).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 239 (20200), 288 (22300).

[EuL⁷]Na·5H₂O.

25·3HCl (60 mg, 88 μmol) was dissolved in a mixture of 30 mL of methanol and 30 mL of water. To this solution was added a mixture of EuCl₃·6H₂O (36 mg, 98 μmol) in 3 mL of methanol and 3 mL of water. The solution was heated to 70°C for 1 hour. After the mixture was cooled to room temperature, the pH was brought to 7.4 with a 5% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [EuL⁷]Na·5H₂O (62 mg, 85%) was isolated as a beige powder.

¹H NMR (CD₃OD/D₂O, 200 MHz, all signals appear as broad singlets): δ -19.15 (1H), -16.70 (1H), -8.62 (1H), -8.22 (1H), -4.90 (1H), -4.31 (1H), -3.46 (1H), -2.46 (1H), 1.47 (1H), 4.14 (1H), 6.34 (1H), 7.37 (1H), 8.11 (1H), 8.42 (1H), 9.45 (1H), 9.95 (1H), 10.15 (1H), 11.81 (2H), 12.47 (1H).

 FAB^{+}/MS : m/z 720.2 ([EuL⁷H + H]⁺, 80%), 722.2 ([EuL⁷H + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{21}NaN_5O_8Eu\cdot5H_2O$: C, 41.84; H, 3.75; N, 8.41. Found: C, 41.93; H, 3.62; N, 8.44.

IR (KBr, cm⁻¹): 3420 (s), 1619 (m, $v_{COO,asym.}$), 1574 (m, $v_{COO,asym.}$), 1460 (w), 1384 (m, $v_{COO,sym.}$), 1274 (w), 1187 (w), 1092 (w), 1013 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ε_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 253 (14400), 308 (19700).

Determination of the Stability Constant of the [EuL⁷]Na Complex. Solutions containing [EuL⁷]Na (5 μ M in 0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, and 0.1 M NaCl) and different

concentrations (10 μ M to 10 mM) of EDTA were kept for 2 days at 60°C and then at room temperature until the equilibrium was reached, which was confirmed by the absence of further changes in the absorption spectra. The concentrations of L^7H_4 and $[EuL^7]Na$ were determined by means of UV-vis absorption spectroscopy, and then the ratio between the conditional stability constants for the formation of the $[EuL^7]Na$ and [Eu(EDTA)] complexes was determined as described by Wu et $al.^{88}$

[TbL⁷]Na·4H₂O.

25·3HCl (40 mg, 59 μmol) was dissolved in a mixture of 30 mL of methanol and 30 mL of water. To this solution was added a mixture of TbCl₃·6H₂O (25 mg, 67 μmol) in 5 mL of methanol and 5 mL of water. The solution was heated to 70°C for 1 hour. After the mixture was cooled to room temperature, the pH was brought to 7.2 with a 1% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [TbL⁷]Na·4H₂O (46 mg, 95%) was isolated as a pale yellow powder.

FAB'/MS: m/z 668.2 ([Tb(L⁷Na) – CH₂COONa]⁻, 100%), 726.2 ([TbL⁷]⁻, 30%).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{21}NaN_5O_8Tb\cdot 4H_2O$: C, 42.40; H, 3.56; N, 8.53. Found: C, 42.28; H, 3.31; N, 8.38.

IR (KBr, cm⁻¹): 3428 (s), 1592 (s, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1574 (s, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1466 (m), 1416 (m), 1387 (s, $\nu_{\text{COO,sym.}}$), 1276 (m), 1166 (w), 1094 (w), 1014 (m).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 253 (15100), 308 (20800).

[GdL⁷]Na·3H₂O.

25·3HCl (30 mg, 44 μmol) was dissolved in a mixture of 25 mL of methanol and 25 mL of water. To this solution was added a mixture of GdCl₃·6H₂O (19 mg, 51 μmol) in 5 mL of methanol and 5 mL of water. The solution was heated to 70°C for 1 hour. After being cooled to room temperature, the pH was brought to 7.5 with a 0.5% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [GdL⁷]Na·3H₂O (30 mg, 85%) was isolated as a pale yellow powder.

FAB'/MS: m/z 667.2 ([Gd(L⁷Na) – CH₂COONa]', 100%), 725.2 ([GdL⁷]', 45%).

Anal. Calcd for $C_{29}H_{21}GdNaN_5O_8\cdot 3H_2O$: C, 43.44; H, 3.39; N, 8.73. Found: C, 43.35; H, 3.17; N, 8.55.

IR (KBr, cm⁻¹): 3422 (s), 1637 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1592 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1459 (w), 1419 (w), 1385 (m, $\nu_{\text{COO, sym.}}$), 1269 (w), 1168 (w), 1088 (w), 1008 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 253 (13600), 308 (19000).

[LaL⁷]Na·4H₂O.

25·3HCl (20 mg, 29 μmol) was dissolved in a mixture of 15 mL of methanol and 15 mL of water. To this solution was added a mixture of La(OTf)₃ (19 mg, 32 μmol) in 2.5 mL of methanol and 2.5 mL of water. The solution was heated to 70°C for 1 hour. After being cooled to room temperature, the pH was brought to 7.1 with a 0.5% NaOH solution in water. The solution was concentrated under reduced pressure until a precipitate appeared, THF was

then added to complete precipitation. Upon centrifugation, [LaL⁷]Na·4H₂O (18 mg, 76%) was isolated as a pale yellow powder.

¹H NMR (CD₃OD/D₂O, 400 MHz): δ 1.79-1.91 (m, 1H), 1.93-2.04 (m, 1H), 2.06-2.17 (m, 1H), 2.26-2.36 (m, 1H), 3.16 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 10.5 Hz), 4.25-4.60 (m, 4H), 7.61 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz), 7.66 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz), 8.07-8.19 (m, 4H), 8.21-8.37 (m, 4H), 8.44 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz), 8.48 (d, 1H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz).

FAB⁻/MS: *m/z* 706.3 ([LaL⁷]⁻, 100%)

Anal. Calcd for $C_{29}H_{21}LaN_5NaO_8\cdot 4H_2O$: C, 43.46; H, 3.65; N, 8.74. Found: C, 43.24; H, 3.36; N, 8.63.

IR (KBr, cm⁻¹): 3450 (s), 1636 (m, $v_{COO,asym}$), 1461 (w), 1421 (w), 1384 (m, $v_{COO,sym}$).

[EuL^{7*}]:5H₂O.

[EuL7]Na·5H2O (40 mg, 48 μ mol) was suspended in 6 mL of DMSO. *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (12 mg, 63 μ mol) and *N*-hydroxysuccinimide (7 mg, 61 μ mol) were added, and the solution was stirred at room temperature for 66 hours, resulting in the complete dissolution of the starting complex and in the formation of the product as a white precipitate. Upon centrifugation and drying at 50°C under vacuum for 2 hours, [EuL^{7*}]·5H₂O (31 mg, 71%) was isolated as a white powder.

FAB⁺/MS: m/z 720.1 ([EuL^{7*} – C₄H₄NO₂ + 2 H]⁺, 100%), 722.1 ([EuL^{7*} – C₄H₄NO₂ + 2 H]⁺, 100%), 817.1 ([EuL^{7*} + H]⁺, 30%), 819.1 ([EuL^{7*} + H]⁺, 30%).

Anal. Calcd for $C_{33}H_{25}EuN_6O_{10}\cdot 5H_2O$: C, 43.67; H, 3.89; N, 9.26. Found: C, 43.60; H, 3.80; N, 9.16.

IR (KBr, cm⁻¹): 3420 (s), 1739 (m, $\nu_{C=O}$), 1629 (s, $\nu_{COO,asym.}$), 1573 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1459 (w), 1384 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1013 (m).

[TbL^{7*}]·4H₂O.

[TbL⁷]Na·4H₂O (50 mg, 61 μmol) was suspended in 5 mL of DMSO. *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (13 mg, 68 μmol) and *N*-hydroxysuccinimide (9 mg, 78 μmol) were added, and the solution was stirred at room temperature for 138 hours, resulting in the complete dissolution of the starting complex and the formation of the product as a white precipitate. The product was isolated by centrifugation and washed with THF. An addition of THF to the mother liquor resulted in further precipitation of the product. Upon centrifugation and combination of the two precipitates, [EuL^{7*}]·4H₂O (49 mg, 90%) was isolated as a white powder.

 FAB^{+}/MS : m/z 726.2 ([EuL^{7*} – C₄H₄NO₂]⁺,15%), 825.5 ([EuL^{7*} + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{33}H_{25}N_6O_{10}Tb\cdot 4H_2O$: C, 44.21; H, 3.71; N, 9.29. Found: C, 44.01; H, 3.42; N, 9.29.

IR (KBr, cm⁻¹): 3433 (m), 1741 (m, $\nu_{C=O}$), 1624 (s, $\nu_{COO,asym.}$), 1594 (s, $\nu_{COO,asym.}$), 1574 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1464 (w), 1419 (w), 1375 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1188 (w), 1006 (m).

[GdL^{7*}]·3H₂O.

[GdL 7]Na·3H₂O (50 mg, 62 µmol) was suspended in 5 mL of DMSO. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (15 mg, 78 µmol) and N-hydroxysuccinimide (9 mg, 78 µmol) were added, and the solution was stirred at room temperature for 48 hours, resulting in the complete dissolution of the starting complex and the formation of the product as a white precipitate. The product was isolated by centrifugation and washed with THF. An addition of THF to the mother liquor resulted in further

precipitation of the product. Upon centrifugation and combination of the two precipitates, $[EuL^{7*}]\cdot 3H_2O$ (45 mg, 82%) was isolated as a white powder.

 FAB^{+}/MS : m/z 726.5 ([EuL^{7*} – C₄H₄NO₂ + H]⁺, 20%), 824.2 ([EuL^{7*} + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{33}H_{25}GdN_6O_{10}\cdot 3H_2O$: C, 45.20; H, 3.56; N, 9.37. Found: C, 45.02; H, 3.18; N, 9.21.

IR (KBr, cm⁻¹): 3435 (s), 1741 (w, $v_{C=O}$), 1623 (s, $v_{COO,asym.}$), 1573 (m, $v_{COO,asym.}$), 1465 (w), 1420 (w), 1376 (m, $v_{COO,sym.}$), 1014 (w).

[EuL^{7#}]·6H₂O.

[EuL⁷]Na·5H₂O (18 mg, 22 μmol) was suspended in 5 mL of DMSO. *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt hydrate (5 mg, 26 μmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (5 mg, 26 μmol) were added, and the solution was stirred at room temperature for 46 hours, resulting in the complete dissolution of the starting complex. THF was then added to precipitate the product. Upon centrifugation and drying under vacuum, [EuL^{7#}]·6H₂O (15 mg, 68%) was isolated as a white powder.

FAB $^+$ /MS: m/z 921.2 ([EuL $^{7\#}$ + H] $^+$, 100%).

IR (KBr, cm⁻¹): 3446 (s), 1739 (w, $\nu_{C=O}$), 1635 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1414 (w), 1384 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1222 (w, $\nu_{SO_2,asym.}$), 1045 (w, $\nu_{SO_2,sym.}$), 1017 (w).

$[TbL^{7\#}]\cdot 5H_2O.$

[TbL⁷]Na·4H₂O (45 mg, 55 μmol) was suspended in 10 mL of DMSO. *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt hydrate (14 mg, 60 μmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (12 mg, 63 μmol) were added, and the solution was stirred at room temperature for 92 hours, resulting in the complete dissolution of the starting complex. THF was then added to precipitate the product. Upon centrifugation and drying under vacuum, [TbL^{7#}]·5H₂O (45 mg, 81%) was isolated as a yellow powder.

FAB⁺/MS: m/z 682,2 ([TbL^{7#} – C₅H₃NNaO₇S]⁺⁺, 95%), 727,2 ([TbL^{7#} – C₄H₃NNaO₅S + H]⁺, 55%).

Anal. Calcd for $C_{33}H_{24}N_6NaO_{13}STb\cdot 5H_2O$: C, 38.99; H, 3.37; N, 8.27. Found: C, 39.20; H, 3.56; N, 8.39.

IR (KBr, cm⁻¹): 3447 (s), 1735 (w, $v_{C=O}$), 1624 (m, $v_{COO,asym.}$), 1388 (w, $v_{COO,sym.}$), 1231 (w, $v_{SO_2,asym.}$), 1043 (w, $v_{SO_2,sym.}$), 1014 (w).

[GdL^{7#}]·4H₂O.

$$\begin{array}{c|c} NaO_3S & O & COO^- \\ \hline N & COO^- \\ \hline N & N & COO^- \\ \end{array}$$

[GdL⁷]Na·3H₂O (19 mg, 24 μ mol) was suspended in 5 mL of DMSO. *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt hydrate (7 mg, 30 μ mol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*′-ethylcarbodiimide hydrochloride (5 mg, 26 μ mol) were added, and the solution was stirred at room temperature for 24 hours, resulting in the complete dissolution of the starting complex. THF was then added to precipitate the product. Upon centrifugation and drying under vacuum, [GdL^{7#}]·4H₂O (19 mg, 80%) was isolated as a yellow powder.

FAB⁺/MS: m/z 681,2 ([GdL^{7#} - C₅H₃NNaO₇S]⁺, 100%), 726,3 ([GdL^{7#} - C₄H₃NNaO₅S + H]⁺, 40%).

IR (KBr, cm⁻¹): 3442 (s), 1713 (w, $v_{C=O}$), 1635 (m, $v_{COO,asym.}$), 1414 (w), 1384 (m, $v_{COO,sym.}$), 1229 (w, $v_{SO_2,asym.}$), 1039 (w, $v_{SO_2,sym.}$), 1010 (w).

N,*N*-[(6'-Diethylphosphono-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]glutamic acid dimethyl ester (41).

In a Schlenk tube under argon were dissolved **39** (200 mg, 0.30 mmol), diethylphosphite (90 μL, 0.70 mmol) and triphenylphosphine (78 mg, 0.30 mmol) in 10 mL of anhydrous toluene containing 300 μL of anhydrous *N*,*N*-diisopropylethylamine. The solution was flushed with argon for 20 min. at room temperature. [Pd(PPh₃)₄] (34 mg, 0.03 mmol) was added and the solution was heated to 100°C for 16 hours. Diethyl phosphite (40 μL, 0.31 mmol) and [Pd(PPh₃)₄] (34 mg, 0.03 mmol) were then added and the solution was heated to 100°C for 16 hours. The mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by column chromatography (SiO₂ flash, 99/1 to 95/5 CH₂Cl₂/MeOH). Fractions containing **41** were evaporated, dissolved in 30 mL of CH₂Cl₂ and washed with 10 mL of water. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. Compound **41** (72 mg, 31%) was isolated as an oil.

 $R_f = 0.56 \text{ (SiO}_2, 90/10 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.35 (t, 12H, ³J = 7.0 Hz), 2.02-2.22 (m, 2H), 2.37-2.71 (m, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.54-3.61 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.01-4.17 (m, 4H), 4.18-4.36 (m, 8H), 7.47 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.73 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.81-7.97 (m, 4H), 8.32 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 8.59 (dt, 2H, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, ³J_{H-P} = ⁴J_{H-H} = 2.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ16.3, 16.4, 24.7, 30.3, 51.4, 57.1, 61.9, 63.0, 63.1, 119.6, 123.2 (2), 123.4, 127.4, 127.9, 136.7, 137.0, 137.2, 149.0, 153.5, 154.5, 156.5, 156.9, 159.0, 173.1, 173.4.

 31 P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 11.73.

N,N-[(6'-Ethylphosphono-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]glutamic acid sodium salt pentahydrate (L⁸Na₄·5H₂O).

41 (51 mg, 65 μ mol) was dissolved in 6 mL of an aqueous 0.05N NaOH solution. The solution was heated to 100°C for 19 hours. After cooling to room temperature, the aqueous layer was extracted with 5 mL of CH₂Cl₂ four times and evaporated to dryness. Upon precipitation in a H₂O/THF mixture, **L**⁸Na₄·5H₂O (45 mg, 79%) was isolated as a beige powder.

¹H NMR (D₂O/^tBuOH, 300 MHz): δ 1.18 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 2.06-2.27 (m, 2H), 2.37-2.58 (m, 2H), 3.50 (t, 1H, ³J = 7.5 Hz), 3.86-3.99 (m, 4H), 4.02-4.24 (m, 4H), 7.48 (d, 2H, ³J = 7.0 Hz), 7.59-7.81 (m, 10H).

¹³C NMR (D₂O/^tBuOH, 75 MHz): δ 16.4, 16.5, 27.8, 35.6, 59.8, 62.4, 62.5, 71.6, 121.2, 124.0, 124.1, 125.7, 127.1, 127.4, 138.0, 138.2, 138.5, 154.6, 155.0, 156.3, 156.6, 157.8, 160.6, 181.1, 183.6.

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ 10.17.

 FAB^{+}/MS : m/z 764.2 ([L⁸Na₄ – Na]⁺, 10%).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{31}N_5Na_4O_{10}P_2\cdot 5H_2O$: C, 42.43; H, 4.71; N, 7.98. Found: C, 42.35; H, 4.55; N, 7.78.

IR (KBr, cm⁻¹): 3450 (s), 1637 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1384 (m, $\nu_{\text{COO,sym.}}$), 1215 (w, $\nu_{\text{P=O}}$), 1149 (w), 1063 (w), 1030 (w).

N,N-[(6'-Phosphono-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]glutamic acid sodium salt dihydrate ($L^9Na_6\cdot 2H_2O\cdot NaBr$).

41 (65 mg, 83 μmol) and trimethylsilyl bromide (165 μL, 1.2 mmol) were dissolved in 10 mL of CH_2Cl_2 . The solution was stirred at room temperature under argon for 17 hours and evaporated to dryness. Trimethylsilyl bromide (165 μL, 1.2 mmol) and 10 mL of $CHCl_3$ were added, the solution was refluxed for 3 hours. After evaporation of the solvent, NaOH (20 mg, 0.5 mmol) and 5 mL of water were added and the solution was heated to 80°C for 31 hours. The solution was evaporated to dryness, the residue was solubilized in a mixture of methanol and water, and the product was precipitated by addition of THF. Upon centrifugation, $L^9Na_6\cdot 2H_2O\cdot NaBr$ (54 mg, 71%) was isolated as a yellow powder.

¹H NMR (D₂O/^tBuOH, 300 MHz): δ 2.06-2.18 (m, 2H), 2.36-2.48 (m, 2H), 3.45 (t, 1H, ^{3}J = 7.0 Hz), 4.03-4.21 (m, 4H), 7.51 (d, 2H, ^{3}J = 7.5 Hz), 7.67-7.87 (m, 10H).

¹³C NMR (D₂O/^tBuOH, 75 MHz): δ 27.5, 35.6, 59.1, 70.5, 121.5, 122.5, 124.9, 126.1, 126.4, 137.6, 137.7, 138.7, 155.4, 155.7, 155.8, 160.4, 163.4, 164.7, 181.2, 183.6.

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ 7.90.

Anal. Calcd for $C_{27}H_{21}N_5Na_6O_{10}P_2\cdot 2H_2O\cdot NaBr$: C, 35.47; H, 2.76; N, 7.66. Found: C, 35.75; H, 3.03; N, 7.62.

IR (KBr, cm⁻¹): 3451 (s), 1637 (m, $v_{COO,asym.}$), 1384 (m, $v_{COO,sym.}$), 1076 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 237 (11400), 289 (14700).

2-Methyl-8-aminoquinoline (42).

2-Methyl-8-nitroquinoline (2.11 g, 11.2 mmol) was dissolved in 34 mL of 57% HI solution in water. The solution was heated to 90°C for 2 hours. After cooling to room temperature, 100 mL of a saturated solution of NaHCO₃ in water was added, and the aqueous phase was extracted with 560 mL of EtOAc. The organic layer was then washed with 100 mL of a saturated solution of Na₂S₂O₃ in water and 100 mL of brine, dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, 100/0 to 99/1 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **42** (1.68 g, 95%) as a crystalline orange powder. All analyses correspond to those described in the literature.¹⁷¹

2-(2-Methyl-quinolin-8-ylamino)-butenedioic acid dimethyl ester (43).

2-Methyl-8-aminoquinoline **42** (1.68 g, 10.6 mmol) and dimethyl acetylenedicarboxylate (2 mL, 16.3 mmol) were dissolved in 30 mL of methanol. The solution was stirred at room temperature for 20 hours in the dark. The solvent was evaporated and the residue was purified by column chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂) to give compound **43** (3.18 g, quant.) as a yellow oil. All analyses correspond to those described in the literature.¹⁷¹

2-Carbomethoxy-4-hydroxy-9-methyl-1,10-phenanthroline (44).

43 (1.38 g, 4.6 mmol) was dissolved in 50 mL of Ph₂O. The solution was refluxed at 260°C for 20 min. After cooling to room temperature, 50 mL of Et₂O was added; the solution was then cooled to 0°C to complete crystallization of **44**. The solid was filtered and washed with Et₂O yielding compound **44** (844 mg, 3.1 mmol). The mother liquor was evaporated to dryness and the residue was purified by column chromatography (SiO₂, 100/0 to 95/5 CH₂Cl₂/MeOH) to give **44** (174 mg, 0.6 mmol). Upon combination of the two fractions, compound **44** (1.02 g, 83%) was isolated as a yellowish powder. All analyses correspond to those described in the literature. ¹⁷¹

2-Carbomethoxy-4-methoxy-9-methyl-1,10-phenanthroline (45).

In a Schlenk tube under argon were dissolved 2-carbomethoxy-4-hydroxy-9-methyl-1,10-phenanthroline **44** (2.04 g, 7.6 mmol), iodomethane (950 μ L, 15.3 mmol) and anhydrous K_2CO_3 (2.11 g, 15.2 mmol) in 60 mL of dry acetonitrile. The solution was heated to 80°C for 19 hours. The mixture was evaporated to dryness, and the solid residue was partitioned between 100 mL of CH_2Cl_2 and 15 mL of water. The aqueous phase was further extracted

four times with 15 mL of CH₂Cl₂, and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The resulting solid was purified by column chromatography (Al₂O₃, 99/1 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **45** (2.05 g, 95%) as a yellow solid.

 $R_f = 0.54 \text{ (Al}_2\text{O}_3, 98/2 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 2.91 (s, 3H), 4.06 (s, 3H), 4.12 (s, 3H), 7.47 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz), 7.77 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 7.83 (s, 1H), 8.08 (d, 1H, 3J = 7.5 Hz), 8.12 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 25.8, 52.8, 56.2, 102.9, 118.7, 122.2, 123.9, 126.9, 127.4, 136.0, 145.2, 146.1, 148.6, 160.1, 163.2, 166.5.

 FAB^{+}/MS : m/z 283.2 ([45 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for C₁₆H₁₄N₂O₃: C, 68.07; H, 5.00; N, 9.92. Found: C, 67.92; H, 4.93; N, 9.78.

2-Carbomethoxy-4-methoxy-9-bromomethyl-1,10-phenanthroline (46).

A solution of **45** (1 g, 3.5 mmol), *N*-bromosuccinimide (630 mg, 3.5 mmol) and AIBN (30 mg, 0.2 mmol) in 10 mL of benzene was irradiated for 30 min. with a 100 W halogen lamp. The mixture was evaporated to dryness and the residue was purified by a column chromatography (Al₂O₃, 50/50 CH₂Cl₂/hexane) to give compound **46** (468 mg, 37%) as a yellow solid.

 $R_f = 0.55 \text{ (Al}_2\text{O}_3, 99/1 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.06 (s, 3H), 4.12 (s, 3H), 4.93 (s, 2H), 7.77 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 7.83 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz), 8.17 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 8.21 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): *δ* 34.6, 53.0, 56.3, 103.3, 120.2, 122.4, 123.7, 127.0, 128.1, 137.1, 144.5, 145.9, 148.9, 157.6, 163.3, 166.2.

FAB⁺/MS: m/z 281.2 ([46 – Br]⁺⁺, 30%), 361.2 ([46 + H]⁺, 100%), 363.2 ([46 + H]⁺, 100%). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃BrN₂O₃: C, 53.21; H, 3.63; N, 7.76. Found: C, 52.94; H, 3.26; N, 7.51.

2-Carbomethoxy-4-methoxy-9-dibromomethyl-1,10-phenanthroline (47).

Compound 47 was obtained in 8% yield as a by-product of the radical bromination of 45. $R_f = 0.73$ (Al₂O₃, 99/1 CH₂Cl₂/MeOH).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 4.09 (s, 3H), 4.15 (s, 3H), 7.06 (s, 1H), 7.82 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 7.86 (s, 1H), 8.24 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 8.27 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 8.34 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): *δ* 42.4, 53.2, 56.4, 103.5, 121.2, 122.8, 122.9, 126.9, 128.9, 129.1, 138.2, 146.1, 149.1, 159.5, 163.4, 166.1.

FAB⁺/MS: m/z 280.3 ([47 – Br₂]⁺⁺, 15%), 359.2 ([47 – Br]⁺⁺, 48%), 361.2 ([47 – Br]⁺⁺, 50%), 441.1 ([47 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{16}H_{12}Br_2N_2O_3$: C, 43.67; H, 2.75; N, 6.37. Found: C, 43.40; H, 2.63; N, 6.05.

N,*N*-[(7-Methoxy-9-carbomethoxy-1,10-phenanthrol-2-yl)methyl]glutamic acid dimethyl ester (48).

In a Schlenk tube under argon were dissolved glutamic acid dimethyl ester hydrochloride **38** (96 mg, 0.45 mmol) and anhydrous K₂CO₃ (250 mg, 1.81 mmol) in 15 mL of dry acetonitrile. The solution was heated to 80°C for 10 min., and compound **46** (360 mg, 1 mmol) was added. The solution was heated to 80°C for 18 hours. Another portion of **46** (52 mg, 0.14 mmol) was added and the solution was heated to 80°C for 24 hours. The mixture was evaporated to dryness, and the solid residue was partitioned between 30 mL of CH₂Cl₂ and 10 mL of water. The aqueous phase was further extracted 4 times with 30 mL of CH₂Cl₂, and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The resulting solid

was purified by column chromatography (Al₂O₃, 100/0 to 99.3/0.7 CH₂Cl₂/MeOH) to give compound **48** (46 mg, 14%) as a yellow-orange powder.

 $R_f = 0.31 \text{ (Al}_2\text{O}_3, 95/5 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 2.17-2.28 (m, 2H), 2.61 (t, 2H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz), 3.44 (s, 3H), 3.71 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz), 3.83 (s, 3H), 4.06-4.19 (m, 12H), 4.45-4.70 (m, 4H), 7.82 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 9.0 Hz), 7.86 (s, 2H), 8.13 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 8.0 Hz), 8.18 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 9.0 Hz), 8.24 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 8.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ25.0, 29.7, 31.0, 51.4, 51.7, 53.0, 53.4, 56.3, 58.1, 62.4, 62.9, 103.1, 119.4, 122.3, 122.7, 122.8, 127.3, 127.4, 127.9, 136.8, 145.2, 146.1, 148.6, 149.0, 161.1, 161.3, 163.2, 163.3, 166.0, 166.4, 173.1, 173.6.

HR/MS: *m/z* for C₃₉H₃₇N₅O₁₀: 735.2540. Found: 735.2552.

2-Carbomethoxy-4-methoxy-9-methoxymethyl-1,10-phenanthroline (49).

Compound **49** was obtained as a by-product of the alkylation of glutamic acid dimethyl ester hydrochloride **38** with bromomethyl-phenanthroline **46**.

 $R_f = 0.62 \text{ (Al}_2\text{O}_3, 95/5 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}).$

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 2.98 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 7.40 (d, 1H, 3J = 8.0 Hz), 7.71 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 7.76 (s, 1H), 8.07 (d, 1H, 3J = 9.0 Hz), 8.13 (d, 1H, 3J = 8.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ28.4, 44.4, 52.7, 56.2, 103.1, 119.6, 120.3, 122.3, 127.0, 127.9, 136.8, 145.2, 146.0, 148.6, 154.7, 163.0, 166.2.

 FAB^{+}/MS : m/z 281.1 ([45 – OCH₃]⁺⁺, 38%), 313.1 ([45 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for C₁₇H₁₆N₂O₄: C, 65.38; H, 5.16; N, 8.97. Found: C, 65.27; H, 5.08; N, 8.79.

N,N-[(7-Methoxy-9-carboxy-1,10-phenanthrol-2-yl)methyl]glutamic tetrahydrochloride (L $^{10}H_4\cdot 4HCl$).

acid

A solution of compound **48** (29 mg, 0.04 mmol) and NaOH (8 mg, 0.2 mmol) in a mixture of 8 mL of methanol and 2 mL of water was heated to 70° C for 8 hours. The solution was evaporated to dryness, aqueous 1N HCl was added until the pH was acid and the resulting solution was evaporated to dryness. The residue was solubilized in methanol and the product was precipitated with Et₂O. Upon centrifugation, $L^{10}H_4$ ·4HCl (32 mg, 98%) was isolated as a yellow-orange powder.

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): δ 2.39-2.49 (m, 2H), 2.84 (t, 2H, ${}^{3}J$ = 7.0 Hz), 4.17 (t, 1H, ${}^{3}J$ = 7.5 Hz), 4.35 (s, 6H), 4.81-4.85 (m, 4H), 7.87 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 9.5 Hz),7.89 (s, 2H), 8.16 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 9.0 Hz), 8.18 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 8.5 Hz), 8.65 (d, 2H, ${}^{3}J$ = 9.0 Hz).

FAB⁺/MS: m/z 340.5 ([L¹⁰H₄ + 2H]²⁺, 20%), 680.2 ([L¹⁰H₄ + H]⁺, 80%).

IR (KBr, cm⁻¹): 3436 (s), 2924 (w), 2853 (w), 1635 (m, $\nu_{COO,asym.}$), 1507 (w), 1454 (w), 1384 (m, $\nu_{COO,sym.}$), 1235 (w), 1070 (w).

Anal. Calcd for $C_{35}H_{29}N_5O_{10}\cdot 4HCl$: C, 50.93; H, 4.03; N, 8.48. Found: C, 50.82; H, 4.15; N, 8.34.

UV-vis (0,01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ε_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 240 (15500), 274 (17000), 320 (5100).

6-[*N*,*N*-(6'-Bromo-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]aminomethylpyridine-2-carboxylic acid ethyl ester (55).

In a Schlenk tube under argon were dissolved 6-aminomethyl-pyridine-2-carboxylic acid ethyl ester **54** (321 mg, 1.78 mmol), 6-bromo-6'-bromomethylmethyl-2,2'-bipyridine **33** (1.285 g, 3.92 mmol) and anhydrous K₂CO₃ (739 mg, 5.35 mmol) in 30 mL of dry acetonitrile. The solution was heated to 80°C for 19 hours. The mixture was evaporated to dryness and the solid residue was partitioned between 20 mL of CH₂Cl₂ and 10 mL of water. The aqueous phase was further extracted with three portions of 20 mL of CH₂Cl₂ and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (Al₂O₃, 20/80 to 30/70 CH₂Cl₂/cyclohexane) to give compound **55** (800 mg, 67%) as a pale yellow solid.

 $R_f = 0.56$ (Al₂O₃, CH₂Cl₂).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.40 (t, 3H, ${}^{3}J = 7.0$ Hz), 3.99 (s, 4H), 4.13 (s, 2H), 4.44 (q, 2H, ${}^{3}J = 7.0$ Hz), 7.43 (dd, 2H, ${}^{3}J = 8.0$ Hz, ${}^{4}J = 1.0$ Hz), 7.56 (dd, 2H, ${}^{3}J = 7.0$ Hz, ${}^{4}J = 1.0$ Hz), 7.60 (t, 2H, ${}^{3}J = 8.0$ Hz), 7.75 (t, 2H, ${}^{3}J = 7.5$ Hz), 7.78 (t, 1H, ${}^{3}J = 8.0$ Hz), 7.89 (dd, 1H, ${}^{3}J = 8.0$ Hz, ${}^{4}J = 1.0$ Hz), 7.95 (dd, 1H, ${}^{3}J = 7.5$ Hz, ${}^{4}J = 1.0$ Hz), 8.24 (dd, 2H, ${}^{3}J = 8.0$ Hz, ${}^{4}J = 1.0$ Hz), 8.38 (dd, 2H, ${}^{3}J = 7.5$ Hz, ${}^{4}J = 1.0$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ14.3, 60.1, 60.2, 61.7, 119.6, 119.7, 123.4, 123.5, 125.8, 127.8, 137.2, 137.3, 139.1, 141.4, 147.6, 153.7, 157.3, 158.6, 160.6, 165.2.

FAB⁺/MS: m/z 599.2 ([55 – COOEt]⁺⁺, 15%), 601.2 ([55 – COOEt]⁺⁺, 30%), 603.2 ([55 – COOEt]⁺⁺, 15%), 673.2 ([55 + H]⁺, 50%), 675.2 ([55 + H]⁺, 100%), 677.2 ([55 + H]⁺, 50%). Anal. Calcd for $C_{31}H_{26}Br_2N_6O_2$: C, 55.21; H, 3.89; N, 12.46. Found: C, 54.98; H, 3.63; N, 12.13.

IR (KBr, cm⁻¹): 2959 (s), 2924 (s), 2853 (s), 1736 (m, $v_{C=O}$), 1640 (m), 1550 (m), 1576 (m), 1465 (m), 1451 (m), 1384 (m), 1262 (w), 1126 (w).

6-[N,N-(6'-Carboethoxy-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]aminomethylpyridine-2-carboxylic acid ethyl ester (56).

A solution of **55** (501 mg, 0.74 mmol) and [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (73 mg, 0.10 mmol) in a mixture of 25 mL of ethanol and 25 mL of triethylamine was heated to 70°C for 17 hours, under a continuous flow of CO at atmospheric pressure. The solution was evaporated to dryness, the residue was dissolved in CH₂Cl₂, filtered over Celite and evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (Al₂O₃, CH₂Cl₂). The product still containing triphenylphosphine oxide was solubilized in 20 mL of CH₂Cl₂ and was extracted three times with 5 mL of aqueous 3N HCl. The aqueous solution was neutralized with 15 mL of aqueous 3N NaOH and extracted with five portions of 15 mL of CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered, and evaporated to dryness to give compound **56** (223 mg, 45%) as a colourless oil.

 $R_f = 0.45$ (Al₂O₃, CH₂Cl₂).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.38 (t, 3H, ³J = 7.0 Hz), 1.43 (t, 6H, ³J = 7.0 Hz), 4.00 (s, 4H), 4.13 (s, 2H), 4.42 (q, 2H, ³J = 7.0 Hz), 4.44 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz),7.58 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 7.77 (t, 1H, ³J = 7.5 Hz), 7.79 (t, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.89 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz), 7.90 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.07 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.41 (dd, 2H, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 8.61 (dd, 2H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ14.2, 60.0, 60.1, 61.7, 119.9, 123.4 (2C), 124.1, 124.7, 125.8, 137.2, 137.3, 137.7, 147.6, 147.7, 154.5, 156.4, 158.5, 160.6, 165.20, 165.24.

 FAB^{+}/MS : m/z 587.2 ([56 - C₃H₅O₂]⁺, 30%), 661.2 ([56 + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for C₃₇H₃₆N₆O₆: C, 67.26; H, 5.49; N, 12.72. Found: C, 67.02; H, 5.33; N, 12.64.

6-[N,N-(6'-Carboxy-2,2'-bipyridine-6-yl)methyl]aminomethylpyridine-2-carboxylic acid tetrahydrochloride (L¹¹H₃·4HCl).

A solution of **49** (182 mg, 0.28 mmol) and NaOH (66 mg, 1.65 mmol) in a mixture of 18 mL of methanol and 5 mL of water was heated to 60°C for 17 hours. The solution was evaporated to dryness and the resulting solid was dissolved in 10 mL of water. Aqueous 2N HCl was slowly added until a consequent precipitate appeared. After centrifugation, the product was dissolved in methanol and filtered over Celite. L¹¹H₃·4HCl (83 mg, 42%) was isolated as a white powder.

¹H NMR (D₂O/^tBuOH, 200 MHz): δ 3.63 (s, 4H), 3.83 (s, 2H), 7.16 (d, 2H, ³J = 7.5 Hz), 7.41-7.53 (m, 3H), 7.64-7.72 (m, 8H), 7.79-7.83 (m, 2H).

FAB⁺/MS: m/z 577.3 ([L¹¹H₃ + H]⁺, 30%).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{24}N_6O_6$ ·4HCl: C, 51.54; H, 3.91; N, 11.63. Found: C, 51.46; H, 4.28; N, 11.49.

IR (KBr, cm⁻¹): 3420 (s), 3085 (m), 2921 (m), 2846 (m), 1723 (m, $v_{C=O}$), 1620 (m, $v_{COO,asym.}$), 1584 (m, $v_{COO,asym.}$), 1444 (m), 1384 (m, $v_{COO,sym.}$), 1345 (m), 1302 (m), 1258 (m), 1076 (w). UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ε_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 240 (18700), 287 (22300).

[EuL¹¹]·6H₂O.

 $L^{11}H_3\cdot 4HCl$ (22 mg, 30 µmol) was dissolved in a mixture of 10 mL of methanol and 10 mL of water, and EuCl₃.6H₂O (12 mg, 33 µmol) in 3 mL of methanol and 3 mL of water was added. The solution wad heated to 70°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the pH was brought to 7.0 with a 0.5% NaOH solution in water and the solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol, filtered over Celite and the product was precipitated with Et₂O. Upon centrifugation, [EuL¹¹]·6H₂O (24 mg, 95%) was isolated as a white powder.

 FAB^{+}/MS : m/z 725.2 ([EuL¹¹ + H]⁺, 85%), 727.1 ([EuL¹¹ + H]⁺, 100%).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{21}EuN_6O_6\cdot 6H_2O$: C, 44.67; H, 3.99; N, 10.08. Found: C, 44.59; H, 3.56; N, 9.91.

IR (KBr, cm⁻¹): 3436 (s), 1636 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1432 (w), 1384 (m, $\nu_{\text{COO,sym.}}$), 1258 (w), 1086 (w), 1016 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 273 (9500), 297 (9200), 321 (5100).

$[TbL^{11}]\cdot 5H_2O.$

L¹¹H₃·4HCl (20 mg, 28 μmol) was dissolved in a mixture of 10 mL of methanol and 10 mL of water, and TbCl₃.6H₂O (11 mg, 30 μmol) in 3 mL of methanol and 3 mL of water was added. The solution wad heated to 70°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the pH was brought to 7.1 with a 0.5% NaOH solution in water and the solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol, filtered over Celite and the product was precipitated with Et₂O. Upon centrifugation, [TbL¹¹]·5H₂O (19 mg, 84%) was isolated as a white powder.

FAB $^{+}$ /MS: m/z 733.4 ([TbL 11 + H] $^{+}$, 80%).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{21}N_6O_6Tb\cdot 5H_2O$: C, 45.27; H, 3.80; N, 10.22. Found: C, 44.97; H, 3.25; N, 10.02.

IR (KBr, cm⁻¹): 3434 (s), 1636 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1587 (m, $\nu_{\text{COO,asym.}}$), 1474 (w), 1384 (m, $\nu_{\text{COO,sym.}}$), 1262 (w), 1169 (w), 1083 (w), 1023 (w).

UV-vis (0.01 M Tris/HCl buffer, pH = 7.0, λ_{max} , nm (ϵ_{max} , M⁻¹.cm⁻¹)): 272 (8500), 297 (9000), 318 (5200).

[GdL¹¹]:5H₂O.

 $L^{11}H_3\cdot 4HCl$ (20 mg, 28 µmol) was dissolved in a mixture of 10 mL of methanol and 10 mL of water, and $GdCl_3.6H_2O$ (11 mg, 30 µmol) in 3 mL of methanol and 3 mL of water was added. The solution wad heated to 70°C for 1 hour. After cooling to room temperature, the pH was brought to 7.6 with a 0.5% NaOH solution in water and the solution was evaporated to dryness. The residue was dissolved in methanol, filtered over Celite and the product was precipitated with Et_2O . Upon centrifugation, $[GdL^{11}]\cdot 5H_2O$ (20 mg, 88%) was isolated as a white powder.

 FAB^{+}/MS : m/z 732.3 ($[GdL^{11} + H]^{+}$, 100%).

Anal. Calcd for $C_{31}H_{21}GdN_6O_6\cdot 5H_2O$: C, 45.36; H, 3.81; N, 10.24. Found: C, 44.97; H, 3.25; N, 10.02.

IR (KBr, cm⁻¹): 3435 (s), 1637 (m, $v_{\text{COO,asym.}}$), 1596 (m, $v_{\text{COO,asym.}}$), 1575 (m, $v_{\text{COO,asym.}}$), 1466 (w), 1384 (m, $v_{\text{COO,sym.}}$), 1260 (w), 1016 (w).

BSA-Ln Conjugates (Ln = Eu or Tb). Bovine serum albumin (10 mg, 0.15 μ mol) was dissolved in 500 μ L of 0.05 M borate buffer (pH = 7.0), and [LnL^{7*}] (Ln = Eu or Tb, 3.7 mg, 4.5 μ mol) was added to achieve a 30:1 label/protein reaction ratio. The solution was gently stirred at room temperature for 24 h, resulting in the complete dissolution of the activated lanthanide complex. The reaction mixture was concentrated to a low volume using a Centricon YM-30 centrifugal filter (Amicon, Millipore, Bedford, MA), and then *ca.* 1 mL of 0.01 M TRIS/HCl buffer (pH = 7.0) was added and the solution was concentrated again. The

procedure was repeated until the filtrate does not present any detectable lanthanide luminescence to remove the unbound label. The Ln-BSA conjugate was kept at 4°C in solution.

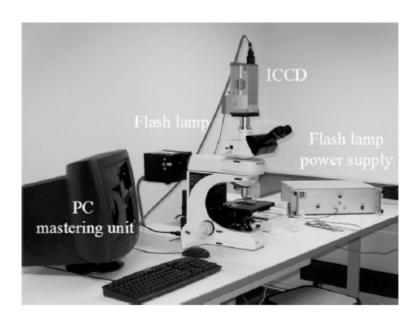
Imaging experiments were performed using an epifluorescence microscope (Olympus BX 60, Olympus Optical, Tokyo, Japan) modified for time-resolved luminescence measurements. 188 The microscope was equipped with an auxiliary pulsed excitation source (L7684 Xenon flash lamp, Hamamatsu Photonics K. K., Shimokanzo, Japan) triggered by an optical chopper located in the light emission pathway. The delay between sample excitation and luminescence measurement was controlled by modifying the phase or the speed of the chopper. The signal was acquired by means of an ultrasensitive, cryogenically cooled CCD camera (LN/CCD, Princeton Instruments, Roper Scientific, Trenton, NJ). BSA-Tb and fluorescein-labeled rabbit immunoglobulin spots (diameter ~ 800 µm) were deposited on silanized microscope glass slides (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) by means of a glass slide microarrayer (BioGene, Kimbolton, UK); the amount of labelled protein was evaluated from the volume of solution deposited in each spot (~ 3 nL). Time-resolved luminescence images were acquired with a 0.5 ms delay between the excitation of the sample and the acquisition of the luminescence signal, while no delay was used for the acquisition of prompt fluorescence images; to obtain a good signal-to-noise ratio, the overall acquisition time for each image was 60 s. Quantitative evaluation of the luminescence images was done using the Metamorph image analysis software package (Universal Imaging Corp., Downington, PA).

Time-resolved microscopy set-up. Conventional fluorescence microscopy images were obtained on a Leica DMLB fluorescence microscope equipped with a continuous 100 W mercury lamp and were recorded with a Hewlett-Packard digital camera. Time-resolved luminescence microscopy images were obtained on the same microscope with the following changes. The continuous mercury lamp was replaced by a xenon flash lamp (FlashMic system, Rapp Opto Electronic, Hamburg, Germany) delivering pulses of varying full width at half height (FWHH) from 4 to 400 μs. In all experiments described here a FWHH of 4 μs was used. The numerical camera was replaced by a gateable intensified CCD (ICCD) camera (model DH734-18F-03, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland) integrating a digital

_

Roda, A.; Guardigli, M.; Pasini, P. In *Bioluminescence and Chemiluminescence 2000*; Proceedings of the 11th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence; Case, J. F., Herring, P. J., Robison, B. H., Haddock, S. H. D., Kricka, L. J., Stanley, P. E.; Eds.; World Scientific Publishing Co.: Singapore, 2001; p 493.

delay generator (DDG) allowing for 5 ns optical gating. The ICCD camera was fitted with a C-mount adaptor to the binocular of the microscope and was monitored by a personal computer. Triggering of the flash lamp was mastered by the ICCD camera and delivered with a 5 V TTL output to the opto-coupler of the lamp. In a typical experiment, images were recorded on the CCD chip for a duration of 1 s, during which 10 illumination cycles were performed. Within a cycle, the flash is triggered by the DDG, a variable delay, δ , is then implemented before the intensifier is turned on for a period of time w (typically 5 ms). At time $\delta + w$, the intensifier is turned off until the beginning of the next cycle. For prompt fluorescence measurements, δ is set to 0.



Fluorescence emission spectra of the samples were recorded on a PerkinElmer LS 50B spectrofluorimeter equipped with a solid sample holder. Spectra were recorded in the phosphorescence mode of acquisition using 10 ms integration windows and a 0 ms delay time for fluorescence acquisition. Excitation was performed at 308 nm (maximum of absorption of the complexes) with a cut-off filter at 350 nm. Scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray analysis was performed on a JEOL JSM 840 apparatus.

Immunohistoluminescence. Mice were killed under pentobarbital deep anesthesia by perfusion through the left ventricle of 4% paraformaldehyde freshly prepared in phosphate buffer PBS 0.1M. Further fixation was made by maintaining the brains overnight in the same fixative. The tissues were next embedded in paraffin wax and sagittal sections (5 microns thick) were made using the microtome (Leica Instruments, Germany).

Sections were first deparaffinated in toluene followed by rehydration in ethanol and washed three times in distillated water. Tissue sections were incubated 60 minutes with [TbL⁷]Na (0.5) mg.mL⁻¹) at room temperature. The tissue sections were then washed three times with water. Sections were examined and analyzed with a DMLB fluorescence microscope equipped for time-resolved acquisition.

Proton Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion (NMRD). Profiles were recorded with a Field Cycling Relaxometer (Field Cycling Systems, Oradell, New Jersey, USA) working between 0.24 mT and 1.2 T on 0.6 mL solutions contained in 10 mm o.d. tubes. Proton relaxation rates were also measured at 0.235 T, 0.47 T, 0.94 T, 1.5 T on Minispec PC-110, PC-120, PC-140 and mq-60 (Bruker, Karlsruhe, Germany). The additional relaxation rates at 7.05 T were obtained on a Bruker AMX-300 (Bruker, Karlsruhe, Germany) spectrometer. ¹H NMRD data were fitted according to the theoretical innersphere model described by Solomon¹⁸⁹ and Bloembergen¹⁹⁰ and to the outersphere contribution described by Freed.¹⁹¹

Solomon, I. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559.
 Bloembergen, N. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 572.

¹⁹¹ Freed, J. H. J. Chem. Phys. **1978**, 68, 4034.

Résumé

De nombreux systèmes de détection non isotopiques ont été développés, comme les fluorophores organiques généralement associés à des techniques de microscopie de fluorescence conventionnelle. La sensibilité est suffisante pour de nombreuses applications en imagerie biologique (visualisation de tissus et cellules). Néanmoins leur utilisation est limitée par l'autofluorescence et la diffraction de lumière dans les milieux biologiques étudiés. La microscopie de luminescence en temps résolu a fait son apparition pour parer à ces limitations, grâce à l'application d'un délai approprié entre l'excitation de l'échantillon et la mesure du signal de luminescence.

Dès 1978, les complexes luminescents de lanthanides sont apparus comme des candidats intéressants en tant que marqueurs destinés à des applications biomédicales. Dans le cas de l'europium et du terbium, des temps de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde peuvent être obtenus, ce qui permet d'améliorer la résolution temporelle lors du traitement du signal tout en augmentant le rapport signal sur bruit.

Ainsi, nous avons synthétisé une série de ligands conçus autour de l'unité 6-carboxy-2,2'-bipyridine et étudié les propriétés photo-physiques de leurs complexes de lanthanides. Les complexes activés en série glutamique ont permis le marquage de différents composés (particules de silice, protéine modèle) conduisant à leur utilisation en microscopie de luminescence en temps résolu (Eu³⁺, Tb³⁺) et à l'étude de leur relaxivité (Gd³⁺). Nous avons également apporté les premières modifications à ces chélates dans le but d'affiner leurs propriétés aussi bien physico-chimiques (stabilité, solubilité) que spectroscopiques (absorption, émission, durées de vie, rendements quantiques de luminescence).

Abstract

Numerous non isotopic detection systems have been developed, as for instance organic fluorophores usually associated with conventional fluorescence microscopy. This technique is sensitive enough for many applications in the biological imaging field (visualization of tissues and cells). Nevertheless, their use is restricted by the autofluorescence of the observed biological samples and light scattering in the apparatus. Time resolved luminescence microscopy was proposed as an alternative to avoid these disadvantages, thanks to the introduction of a suitable delay between the excitation of the sample and the measurement of the luminescence signal.

As soon as 1978, luminescent lanthanide complexes appeared as interesting candidates as labels for biomedical applications. In the cases of europium and terbium complexes, luminescence lifetimes up to the millisecond can be obtained, leading to an improved temporal resolution in the treatment of the luminescence signal with a concomitant increase of the signal-to-noise ratio.

Thus, we have synthesized a set of ligands based on the 6-carboxy-2,2'-bipyridine unit and studied the photophysical properties of their lanthanide complexes. The activated complexes based on a functionalized glutamic acid skeleton allowed the labeling of different compounds (silica particles, model protein) leading to their use in time resolved luminescence microscopy (Eu³⁺, Tb³⁺) and to the study of their relaxivity (Gd³⁺). We have also modified these chelates in order to improve both their physicochemical (stability, solubility) and spectroscopic (absorption, emission, luminescence lifetimes, quantum yields) properties.