



THESE DE DOCTORAT
Pour obtenir le titre de :
Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Chimie

Par

Matthieu Starck

**Synthèse, propriétés photophysiques et marquage
biologique par des complexes de lanthanides luminescents**

*Laboratoire de Chimie Organique et de Spectroscopies Avancées
UMR 7515 CNRS*

Directeur de Thèse :
Dr. Raymond Ziessel

Co-directeur de Thèse :
Dr. Loïc Charbonnière

Soutenue publiquement le 8 septembre 2010

Devant la commission d'examen :

Pr. Anthony HARRIMAN

Dr. Yann BRETONNIERE

Pr. Michael CHETCUTI

Dr. Raymond ZIESSEL

Dr. Loïc CHARBONNIERE

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

A Samantha, Naya et Mila

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Organique et de Spectroscopies Avancées, situé à l'Ecole Européenne de Chimie Polymères et Matériaux de Strasbourg (Université de Strasbourg).

Je tiens à remercier le Dr. Raymond Ziessel de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et le Dr. Loïc Charbonnière pour m'avoir guidé et aidé tout au long de ces quatre années de recherche. C'est grâce à leur disponibilité, leur aide aussi bien au niveau théorique que technique que j'ai pu mener à bien ces travaux.

Je remercie également l'Europe pour le financement de ma thèse dans le cadre du projet « POC4Life : Multiparametric QDots bioassay for point of care diagnosis ».

J'adresse mes remerciements les plus respectueux au Pr. Anthony Harriman, au Dr. Yann Bretonnière et au Pr. Michael Chetcuti, d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie également l'entreprise Cézanne, en particulier Anne Incamps et Valérie Vallois, qui ont effectué les essais de marquage et de mesure de FRET, ainsi que toute l'équipe du Dr. Carlos Platas-Iglesias pour leur collaboration.

J'exprime toute ma gratitude au Dr. Michel Schmitt pour sa disponibilité à chaque fois que j'ai eu besoin de lui.

Un grand merci également à tous les membres du laboratoire pour leur participation à la bonne ambiance qui a régné durant ces années, les permanents : Dr. Antoinette De Nicola, Dr. Gilles Ulrich ; les assistants-ingénieurs : Alexandra et Delphine ; les étudiants en thèse : Jean-Hubert, Song-Lin, Sandra, Thomas, Denis ; les étudiants en stage : Elodie, Sébastien et Mustafa ; et les anciens : Batcha, Pascal, Stéphane, Alexandre H., le Dr. Franck Camerel, Soumyaditya, Alexandre L.

Je remercie chaleureusement ma famille, en particulier mes parents qui m'ont aidé tout au long de mon cursus, sans oublier Samantha et Naya qui ont fait preuve de beaucoup de patience lors de la période de rédaction.

Table des matières

1.	Introduction : Les lanthanides et leurs complexes.....	13
1.1.	Les lanthanides.....	15
1.1.1.	<i>La configuration électronique des lanthanides</i>	15
1.1.2.	<i>Les propriétés de luminescence des lanthanides</i>	16
1.1.3.	<i>Les ligands photosensibilisateurs</i>	17
1.2.	Les complexes de lanthanides	18
1.2.1.	<i>Quelques exemples de ligands.....</i>	18
1.2.2.	<i>Le ligand 2,2':6',2''-terpyridine</i>	19
1.2.3.	<i>Le ligand 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.....</i>	25
1.3.	Fonctionnalisations post-synthétiques sélectives des ligands.....	26
1.4.	Objectifs de ce travail.....	29
2.	Synthèses de complexes luminescents d'ions lanthanides basées sur la chimie de la trifluoropyridine.....	31
2.1.	Tests préliminaires de SNAr sur des groupes azaaromatiques polyfluorés.	34
2.1.1.	<i>SNAr sur la 2,4,6-trifluoropyridine : Synthèse du ligand L1.....</i>	35
2.1.2.	<i>SNAr sur la 2,4,6-trifluoropyrimidine : Synthèse du ligand L2.....</i>	36
2.1.3.	<i>SNAr sur la pentafluoropyridine : Synthèse du ligand L3.....</i>	37
2.1.4.	<i>Conclusion des tests préliminaires de SNAr sur les groupes azaaromatiques polyfluorés</i>	38
2.2.	SNAr régiosélectives des positions para et ortho de la 2,4,6-trifluoropyridine : synthèse des ligands	39
2.2.1.	<i>SNAr de l'atome de fluor en position para de la trifluoropyridine : synthèse de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine 14</i>	40
2.2.2.	<i>SNAr des atomes de fluors en position ortho de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine 4 : synthèse de la plate-forme bispyrazolylypyridine 18.</i>	41
2.2.3.	<i>Fonctionnalisation en position para de la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazolylypyridine 18 : synthèses des ligands L4, L5, et L6.</i>	42
2.3.	Les complexes de lanthanides	46
2.3.1.	<i>Synthèse des complexes</i>	46
2.3.2.	<i>Etude photophysique des complexes.....</i>	47

2.3.3.	<i>Etudes des propriétés thermodynamiques des complexes</i>	55
2.4.	Conclusion	65
3.	Application au marquage de matériel biologique	67
3.1.	Marquage d'anticorps	79
3.1.1.	<i>Résultat du marquage de l'anticorps GFR44 avec le complexe TbL6</i>	79
3.1.2.	<i>Activation directe de complexes issus du ligand L6</i> :.....	80
3.1.3.	<i>Synthèse des complexes LnL8 (Ln = La, Tb)</i>	81
3.1.4.	<i>Tests de marquage avec TbL8</i> :.....	86
3.2.	Dosage fluoroimmunologique TRACE[®]	89
3.3.	Synthèse d'un complexe de terbium biotinilé : TbL9	92
3.4.	Conclusion	94
4.	Optimisation des complexes	96
4.1.	Optimisation des propriétés d'absorption des ligands	98
4.1.1.	<i>Synthèse des plate-formes 4-bromo-2,6-bisindazol-1-yl-pyridine 48 et 49</i>	99
4.1.2.	<i>Synthèse des ligands L10 et L11</i>	100
4.1.3.	<i>Synthèse et étude des complexes</i>	102
4.2.	Optimisation de la stabilité de la cavité complexante	107
4.2.1.	<i>Synthèse des ligands L12, L13, L14 et L15</i>	108
4.2.2.	<i>Etude des propriétés photophysiques des ligands et des complexes</i>	112
4.3.	Synthèses de complexes avec un lien pour le marquage biologique	131
4.3.1.	<i>Synthèse des plate-formes 74 et 75</i>	132
4.3.2.	<i>Synthèse du complexe TbL16</i>	133
4.3.3.	<i>Synthèse du complexe TbL17</i>	134
4.3.4.	<i>Synthèse du complexe activé TbL18</i>	140
4.3.5.	<i>Propriétés photophysiques et stabilité du complexe TbL18 en milieu biologique</i>	141

4.4. Conclusion	143
Conclusion générale et perspectives	146
Conclusion générale	148
Perspectives	152
Partie Expérimentale	155
Annexes.....	203
Résumé.....	205
Abstract.....	205
Liste des ligands et des complexes.....	206

1. **Introduction : Les lanthanides et leurs complexes**

Ce chapitre d'introduction présente brièvement les propriétés de luminescence des ions lanthanides et insiste sur la nécessité de construire des ligands photosensibilisateurs pour permettre leur utilisation comme sondes luminescentes. En dernier lieu nous exposerons les objectifs de ce travail de thèse.

1.1. Les lanthanides

Les lanthanides sont les 14 éléments qui suivent le lanthane ($Z = 57$) dans la classification périodique. Ils font partie, avec les actinides, des éléments du bloc f . Ces composés sont connus sous le nom de « *Terres Rares* ». Contrairement à leur appellation, ces éléments sont largement répandus dans l'écorce terrestre, leur abondance varie du cérium, le 25^{ème} élément le plus abondant (60 ppm), au thulium et au lutécium, les moins abondants (0,5 ppm).

Leur nom vient du fait qu'on les a découverts au début du 19^{ème} siècle dans des minerais (d'où le nom de « terres », utilisé à l'époque pour les oxydes) peu courants à cette époque : *terres rares* signifiait donc « *minerais rares* ».

Sous forme élémentaire, les terres rares ont un aspect métallique et sont assez tendres, malléables et ductiles. Ils sont aussi généralement chimiquement assez réactifs, surtout à températures élevées ou lorsqu'ils sont finement divisés.

Les lanthanides sont présents à l'état de trace dans les organismes vivants et ne semblent jouer aucun rôle biologique particulier. Ce sont des acides de Lewis durs pouvant interagir spécifiquement avec certaines substances biologiques, du fait de leur forte affinité pour des atomes donneurs comme l'oxygène ou l'azote.

1.1.1. La configuration électronique des lanthanides

La configuration électronique de l'atome de lanthanide varie de $[\text{Xe}]4f^05d^16s^2$, correspondant au lanthane ^{57}La , à $[\text{Xe}]4f^{14}5d^16s^2$, correspondant à la configuration électronique du lutécium ^{71}Lu par remplissage successif des sous-couches $4f$.

Une diminution monotone du rayon ionique de l'ion Ln^{3+} est observée lorsque le numéro atomique augmente. Ce phénomène est connu sous le nom de *contraction lanthanidique* et provient de l'augmentation de la charge nucléaire. Cette contraction n'affecte que peu les propriétés physico-chimiques des lanthanides le long de la série. Deux des lanthanides, le lanthane La^{3+} et le lutécium Lu^{3+} , sont diamagnétiques, les autres sont paramagnétiques.

1.1.2. Les propriétés de luminescence des lanthanides

Les lanthanides procèdent des propriétés de luminescence singulières qui ont été discutées dans plusieurs revues récentes.¹ Ces propriétés photophysiques exceptionnelles des états excités des lanthanides trouvent leur origine dans les transitions électroniques internes $4f-4f$. Cependant ces transitions $4f-4f$ sont interdites par la règle de sélection de Laporte et parfois par la règle de sélection de spin. La probabilité de ces transitions est donc faible ce qui se traduit par des coefficients d'extinction molaire faibles, de 1 à 5 M⁻¹.cm⁻¹ et des temps de vie radiatifs entre la microseconde et la milliseconde.² Par ailleurs, la configuration électronique $4f$ des lanthanides génère de nombreux termes dont les énergies ont été déterminées à partir de la répulsion inter-électronique. Le couplage spin-orbite subdivise ces termes en différents niveaux J avec un écart typique de 1000 cm⁻¹.³ La Figure 1.1 représente le diagramme d'énergie partielle de l'ion europium Eu³⁺, résultant de la répulsion inter-électronique, du couplage spin-orbite et du champ de ligand dans le cas d'un complexe.

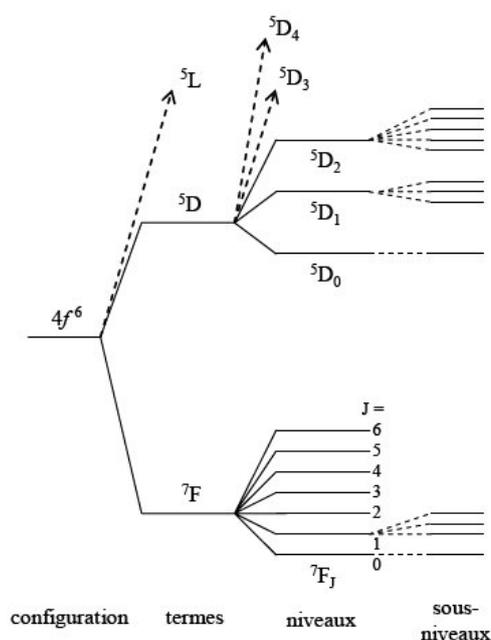


Figure 1.1. Diagramme d'énergie partielle de l'ion Eu³⁺, résultant de la répulsion inter-électronique, du couplage spin-orbite et du champ de ligand.

L'interdiction des transitions $4f-4f$ et le faible coefficient d'extinction molaire rend l'excitation directe des lanthanides difficile car elle nécessite l'emploi de sources d'excitation intenses. Un moyen de contourner ce problème est de procéder à l'excitation indirecte des lanthanides.

¹ a) Bünzli, J.-C. G.; Piguet, C.; *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 1048. b) Eliseeva, S. V.; Bünzli, J.-C. G.; *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 189. c) Bünzli, J.-C. G.; *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2729.

² Parker, D.; Williams, J. A. G.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 3613.

³ a) Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K.; *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 4412. b) Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K.; *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 4424. c) Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K.; *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 4443. d) Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K.; *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 4447. e) Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K.; *J. Chem. Phys.*, **1968**, 49, 4450.

1.1.3. Les ligands photosensibilisateurs

L'excitation indirecte des lanthanides est obtenue grâce à l'utilisation d'une antenne⁴ collectrice de photons. Le principe est l'utilisation de ligands possédant un système π prononcé et des coefficients d'extinction molaire élevés pour photosensibiliser le lanthanide (Figure 1.2).

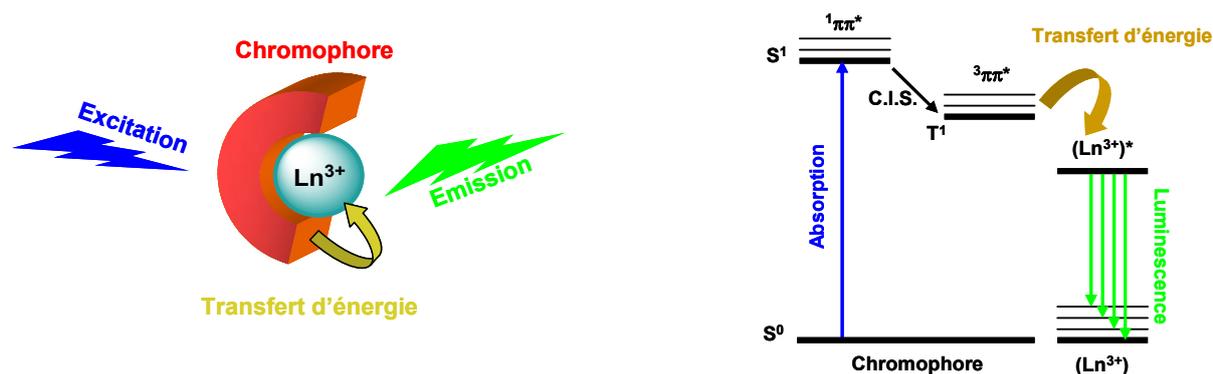


Figure 1.2. Représentation schématique de l'effet d'antenne conduisant à la luminescence d'un complexe de lanthanide et diagramme d'énergie conduisant à la luminescence du lanthanide. (C.I.S. = croisement inter-système, T.E. = transfert d'énergie du chromophore vers le lanthanide)

Dans un premier temps le ligand absorbe la lumière et passe de l'état fondamental singulet S^0 à l'état excité singulet S^1 , par un processus de croisement inter-système favorisé par l'effet d'atome lourd dû au lanthanide, le ligand passe de l'état singulet S^1 à l'état triplet T^1 ($^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$). Le ligand transfère ensuite l'énergie au lanthanide utilisé. Le lanthanide ainsi excité, émet la lumière pour revenir à son état fondamental.

De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance de ligands pour les complexes de métaux de transition luminescents (Ru, Os, Pt, Ir, ...).⁵ Le changement de ligands ou la modification des groupements électro-donneurs/électro-attracteurs de ces derniers permettent de moduler les propriétés photophysiques des complexes.

Dans ce cas, le rôle du ligand n'est pas, contrairement aux lanthanides, de photosensibiliser le métal mais de promouvoir le transfert de charge du métal vers le ligand pour parvenir aux états émetteurs de lumière.

⁴ a) Richardson, F. S.; *Chem. Rev.*, **1982**, 82, 541. b) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J.-M.; *Coord. Chem. Rev.*, **1993**, 123, 201. d) Weissmann, S. I.; *J. Chem. Phys.*, **1942**, 10, 214.

⁵ a) Williams, J. A. G.; *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 1783. b) Chi, Y.; Chou, P.-T.; *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 2007, 1421. c) De Cola, L.; Belser, P.; von Zelewsky, A.; Vögtle, F.; *Inorg. Chim. Acta*, **2007**, 360, 775. d) Hissler, M.; McGarrah, J. E.; Connick, W. B.; Geiger, D. K.; Cummings, S. D.; Eisenberg, R.; *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 208, 115. e) Castellano, F. N.; Pomestchenko, I. E.; Shikhova, E.; Hua, F.; Muro, M. L.; Rajapakse, N.; *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 1819. f) Cummings, S. D.; *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253, 449. g) Lamansky, S.; Djurovich, P.; Murphy, D.; Abdel-Razzaq, F.; Kwong, R.; Tsyba, I.; Bortz, M.; Mui, B.; Bau, R.; Thompson, M. E.; *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 1704.

1.2. Les complexes de lanthanides

1.2.1. Quelques exemples de ligands

De nombreuses revues décrivent l'utilisation de ligands photosensibilisateurs pour les lanthanides, en particulier les ligands possédant des sous-unités azaaromatiques,⁶ comme par exemple des ligands de type pyridine et bipyridine (Figure 1.3)

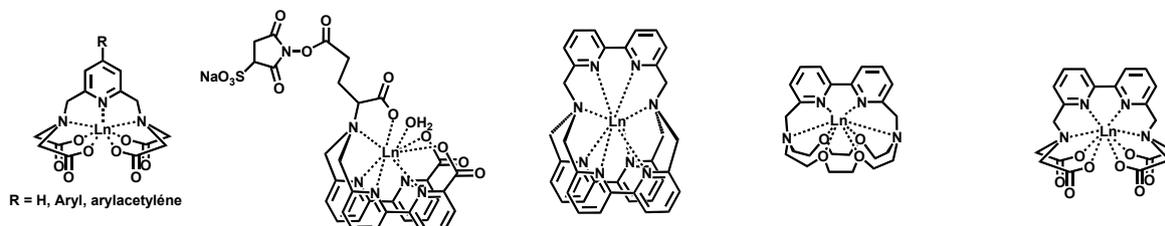


Figure 1.3. Quelques exemples de complexes de lanthanides obtenus à partir de ligands de type pyridine,⁷ et bipyridine.⁸

Plus récemment, de nombreuses recherches se sont focalisées sur les ligands de type terpyridine et bispyrazolypyridine car ils ont montré leur importance lors de la photosensibilisation d'ions lanthanides (Figure 1.4).

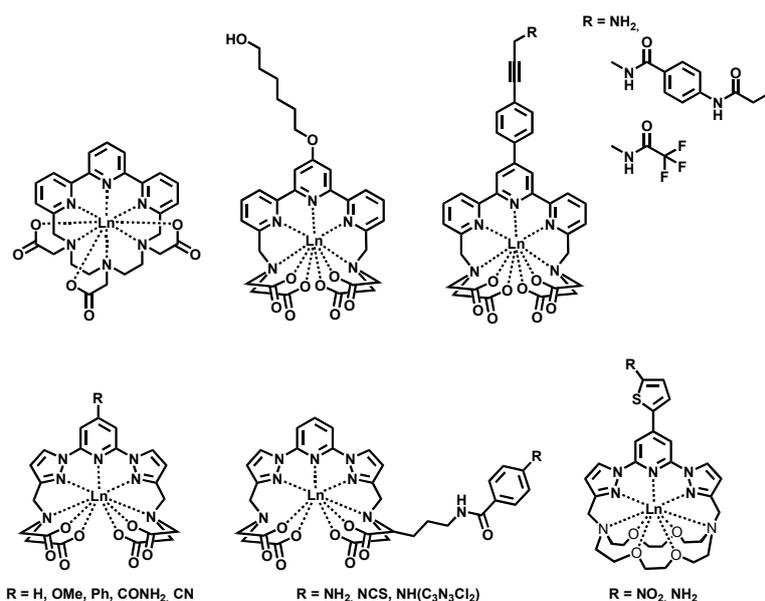


Figure 1.4. Quelques exemples de complexes de lanthanides obtenus à partir de ligands de type terpyridine⁹ et 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.¹⁰

⁶ a) Mukkala, V.-M.; Sund, C.; Kwiatkowski, M.; Pasanen, P.; Högberg, M.; Kankare, J.; Takalo, H.; *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 1621. b) Latva, M.; Takalo, H.; Mukkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. C.; Kankare, J.; *J. Lumin.*, **1997**, 75, 149. c) Hovinen, J.; Guy, P. M.; *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 404.

⁷ a) Takalo, H.; Hämmnen, E.; Kankare, J.; *Helv. Chim. Acta*, **1993**, 76, 877. b) Hemmilä, I.; Mukkala, V. M.; Latva, M.; Kiilholma, P.; *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1993**, 26, 283.

⁸ a) Mukkala, V.-M.; Kankare, J. J.; *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 1578. b) Alpha, B.; Lehn, J.-M.; Mathis, G.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1987**, 26, 266. c) Weibel, N.; Charbonnière, L. J.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 4888.

⁹ a) Hovinen, J.; *Chem. Biodivers.*, **2006**, 3, 296. b) Galaup, C.; Couchet, J. M.; Picard, C.; Tisnès, P.; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 6275. c) Poupart, S.; Boudou, C.; Peixoto, P.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 4165.

¹⁰ Halcrow, M. A.; *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, 249, 2880.

Les propriétés photophysiques des complexes de lanthanides obtenus à partir de tels ligands sont très intéressantes et ont motivé en grande partie les travaux effectués tout au long de ce travail.

Au vue de la grande diversité des ligands avec des chromophores poly-azaaromatiques, nous nous focaliserons, dans cette partie, uniquement sur les ligands de type 2,2':6',2''-terpyridine, et de type 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.

Bien que ces ligands soient prometteurs pour la photosensibilisation des ions lanthanides, leur utilisation est cependant limitée, non pas par leur synthèse, mais par la difficulté de les fonctionnaliser post-synthétiquement faisant d'eux des plate-formes peu versatiles.

Nous exposerons donc les différentes voies de synthèses de ces deux ligands. Et nous discuterons de la sélectivité lors de leur fonctionnalisation post-synthétique. Notons que dans ce chapitre, la numérotation des molécules est indépendante du reste du manuscrit.

1.2.2. Le ligand 2,2':6',2''-terpyridine

Le développement de la 2,2':6',2''-terpyridine a été très largement effectué entre la deuxième moitié des années 70 et la fin des années 80. Plusieurs revues expliquent les différentes voies de synthèses de la 2,2':6',2''-terpyridine.¹¹ Dans cette partie les différentes méthodologies de synthèse du chromophore terpyridine sont résumées.

1.2.2.1. Les méthodes de condensation

Les méthodes de condensation pour la préparation de la 2,2':6',2''-terpyridine reposent sur la formation des cycles pyridines soit centrale, soit périphériques. Sur l'ensemble des schémas de cette partie les cycles formés sont représentés en rouge.

- La méthodologie de Kröhnke¹²

La base de cette méthodologie est l'addition de Michael d'un sel de *N*-hétéropyridinium **1** (ou sel de Kröhnke) sur une cétone α,β -insaturée ou sur une énone **2** pour former la 1,5-ènedione **3** correspondante. La cyclisation en présence d'acétate d'ammonium est le résultat de la formation d'une dihydroxypyridine qui après oxydation formera la 2,2':6',2''-terpyridine voulue (*Figure 1.5*).

¹¹ a) Heller, M.; Schubert, U. S.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 947. b) Fallahpour, R.-A.; *Synthesis*, **2003**, 155.

¹² Kröhnke, F.; *Synthesis*, **1976**, 1.

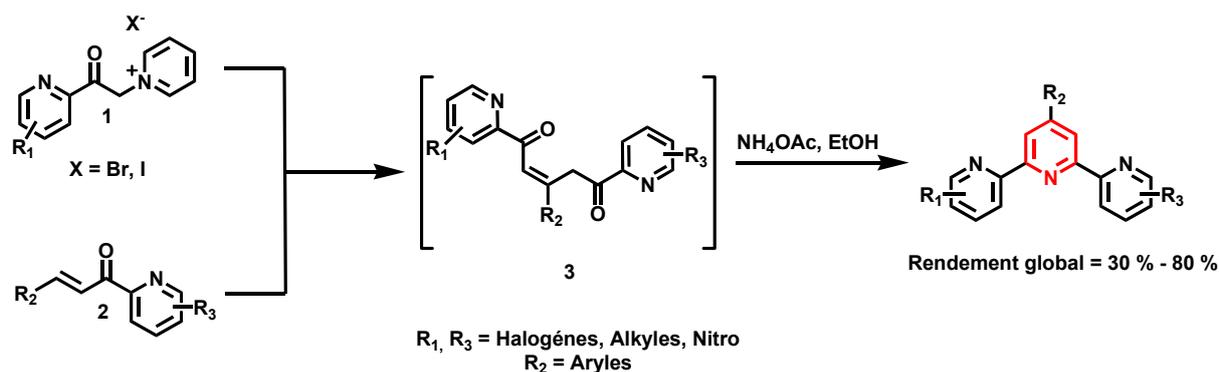


Figure 1.5. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthodologie de Kröhnke.

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'obtenir des 2,2':6',2''-terpyridine symétriques ou dissymétriques. Cependant cette méthode présente quelques désavantages : le substituant R_2 doit être aromatique et certaines fonctionnalisations ne sont pas compatibles avec les conditions de réaction.

- La méthodologie de Potts.¹³

La base de cette méthodologie est la réaction de la 2-acétyl-dithioacétale- α -oxocétène-pyridine **4** avec le 2-acétyl-pyridine énoilate de potassium **5**, pour former l'intermédiaire 1,5-ènedione **6**. Le composé **6** est converti en 2,2':6',2''-terpyridine par cyclisation avec l'acétate d'ammonium dans de l'acide acétique à reflux (Figure 1.6).

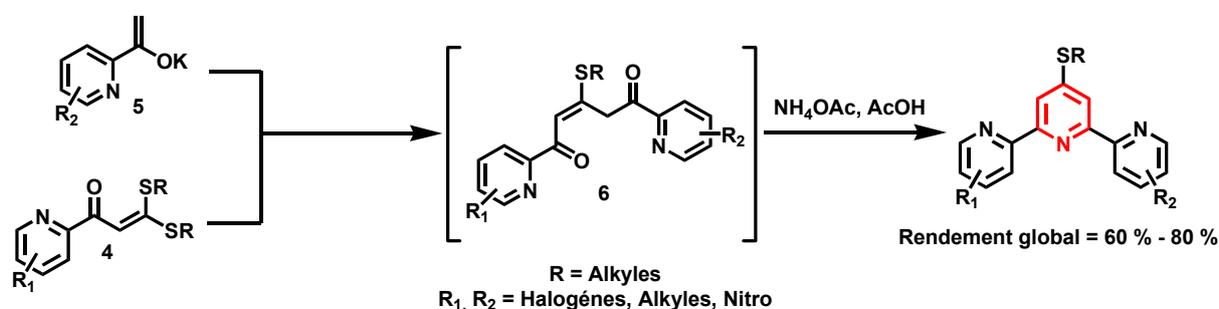


Figure 1.6. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthode de Potts.

- La méthode de Jameson¹⁴

Cette méthode consiste en la condensation de la (diméthylamino)énone pyridine **7** avec l'énoilate de potassium **5** de la 2-acétyl-pyridine. La cyclisation en présence d'acétate d'ammonium et d'acide acétique permet la cyclisation et la formation de la pyridine centrale avec la perte de la diméthylamine (Figure 1.7).

¹³ a) Potts, K. T.; Cipullo, M. J.; Ralli, P.; Theodoridis, G.; *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 3027. b) Potts, K. T.; Usifer, D. A.; Guadalupe, A.; Abruna, H. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 3961.

¹⁴ Jameson, D. L.; Guise, L. E.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 1999.

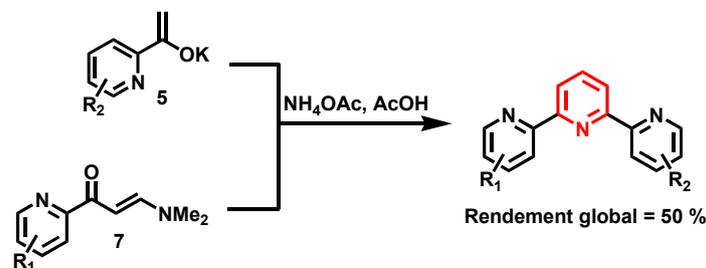


Figure 1.7. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthode de Jameson.

Une variante de cette méthode est la méthode de Zehnder¹⁵ qui fait réagir un sel de Kröhnke **1** avec un sel de Mannich¹⁶ **8** en présence d'acétate d'ammonium dans du méthanol. La perte du groupement diméthylammonium et du groupement pyridinium en présence d'acétate d'ammonium provoque la cyclisation et la formation de la pyridine centrale (Figure 1.8).

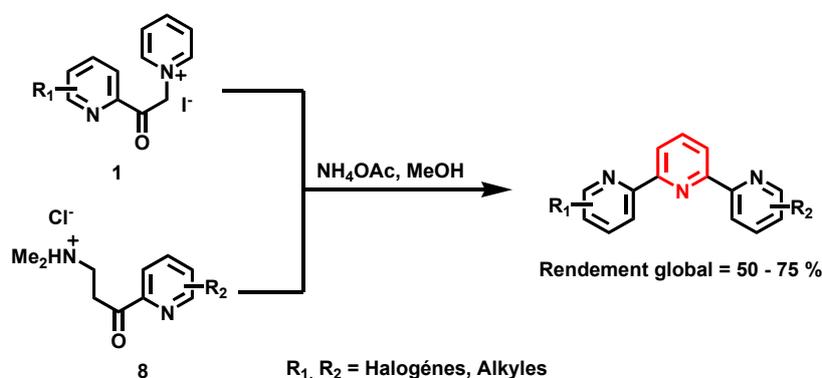


Figure 1.8. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthode de Zehnder.

- La méthode de Sasaki¹⁷

La méthode de Sasaki, bien qu'étant basée sur la méthode de Kröhnke, diffère par sa stratégie. En effet, l'étape clé de cette synthèse est la formation des pyridines périphériques de la 2,2':6',2''-terpyridine par condensation d'un sel de Kröhnke de type bis(pyridinium) **10**, formé à partir de la 2,6-diacétyl-pyridine **9**, avec des aldéhydes α,β -insaturés **11** en présence d'acétate d'ammonium (Figure 1.9).

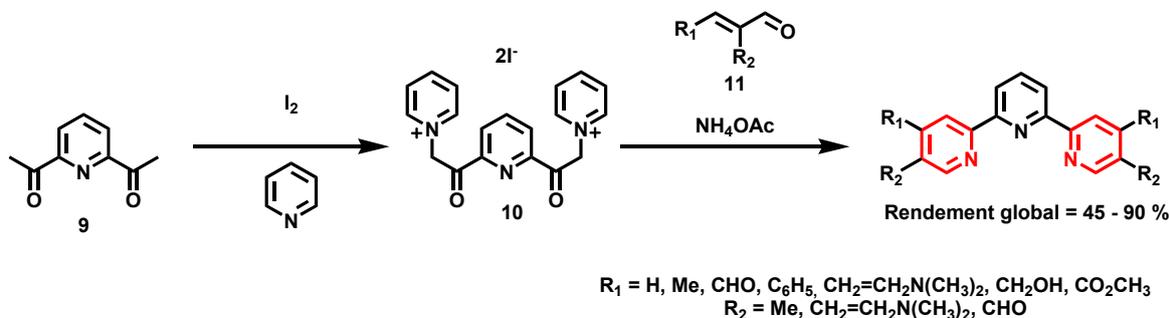


Figure 1.9. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthode de Sasaki.

¹⁵ Baum, G.; Constable, E. C.; Fenske, D.; Housecroft, C. E.; Kulke, T.; Neuburger, M.; Zehnder, M.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 945.

¹⁶ Constable, E. C.; Holmes, J. M.; McQueen, R. C. S.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1987**, 5.

¹⁷ Sasaki, I.; Daran, J. C.; Balavoine, G. G. A.; *Synthesis*, **1999**, 5, 815.

- Une nouvelle approche

Une nouvelle approche a été adoptée pour la préparation de 2,2':6',2''-terpyridine symétriques. Cette méthode a été développée par Adrian *et al.*¹⁸ qui permet l'obtention de 2,2':6',2''-terpyridine en quatre étapes avec de bon rendements. Cependant cette méthode n'est limitée qu'à deux exemples La base de cette méthode est la conversion de la 2,6-diacétyl-pyridine **9** en 2,6-bis(N-cyclohexylacétimidoyl)pyridine **12** par réaction avec la cyclohexylamine. La cyclisation de la bis-imide **12** avec une 3-bromo-propylamines **13**, protégée avec un groupement éthylène-tetraméthylsilyl permet d'obtenir la tetrahydropyridine **14**. La tetrachloration du composé **14** est effectuée en présence de N-Chlorosuccinimide (NCS) et donne le composé **15** qui sera converti en 2,2':6',2''-terpyridine en présence de méthanoate de sodium (*Figure 1.10*).

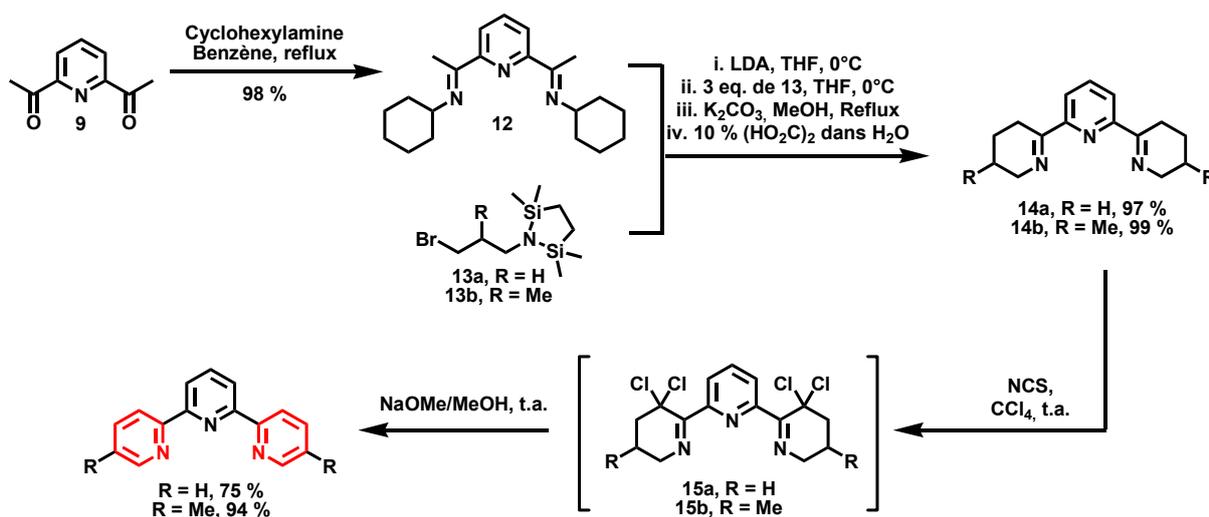


Figure 1.10. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthode d'Adrian *et al.*

1.2.2.2. Les méthodes de couplages croisés catalysés par des métaux

Il existe plusieurs types de couplages catalysés par des métaux ayant de nombreuses applications dans le domaine de la chimie organique.¹⁹ Certains de ces couplages sont appropriés pour la synthèse d'oligopyridines.

Parmi eux, on trouve des couplages catalysés au nickel,²⁰ au cuivre²¹ ou au palladium. Ce dernier type de couplage est de loin le plus utilisé pour la préparation d'oligopyridines, soit en

¹⁸ Adrian, J. C.; Hassib, L.; De Kimpe, N.; Keppens, M.; *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 2365.

¹⁹ Diederich, F.; Stang, P. J. in *Metal-catalyzed cross coupling reaction*; Wiley-VCH: Weinheim, **1998**.

²⁰ a) Kalinin, V. N.; *Synthesis*, **1992**, 413. b) Cotton, F. A.; Faut, O. D.; Goodgame, D. M. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 344. c) Iyoda, M.; Otsuka, H.; Sato, K.; Nisato, N.; Oda, M.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 80.

²¹ a) Uenishi, J.; Tanaka, T.; Wakabayashi, S.; Oae, S.; Tsukube, H.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 4625. b) Parks, J. E.; Wagner, B. E.; Holm, R. H.; *J. Organomet. Chem.*, **1973**, *56*, 53.

utilisant le couplage de Suzuki,²² qui permet le couplage un acide boronique aromatique et un halogénure aromatique, soit en utilisant le couplage de Stille.²³

La réaction de couplage croisé de Stille est la méthode la plus populaire pour la préparation de composés aromatiques ou hétérocycliques tels que la 2,2':6',2''-terpyridine. Cette popularité réside dans l'utilisation de « briques élémentaires », accessibles à l'échelle du gramme et pouvant permettre, dans le cas de la 2,2':6',2''-terpyridine, des fonctionnalisations sur la quasi-totalité des positions des entités pyridines avec de bons rendements. En général, les groupements nitro, carboxylate, carbonyl, cyano, ou pyridine-*N*-oxides, ne sont pas affectés par les conditions de réaction.²⁴

Le principe de ce couplage consiste en la réaction entre un composé de type stannique et un composé halogéné en présence de palladium (0) ou de palladium (II) et d'iodure de cuivre en quantités catalytiques. Deux stratégies peuvent être utilisées pour la préparation de la 2,2':6',2''-terpyridine (Figure 1.11). La première consiste en la réaction entre la 2,6-dihalogéno-pyridine **16**, qui constituera la pyridine centrale, avec la 2-(trialkylstannyl)pyridine **17**. La seconde stratégie est la réaction entre la 2,6-bis(trialkylstannyl)pyridine **18** et la 2-halo-pyridine **19**.

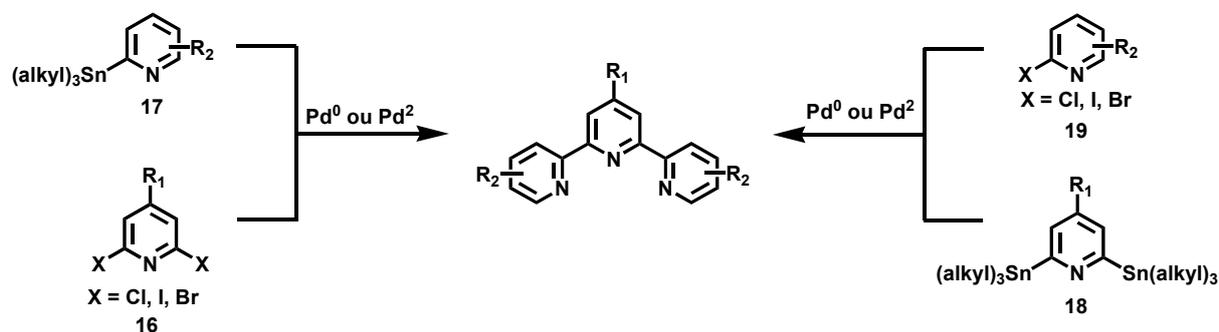


Figure 1.11. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par le couplage croisé de Stille.

1.2.2.3. Les autres méthodes de synthèse

D'autres méthodes pour la préparation de 2,2':6',2''-terpyridines sont également décrites telles que la méthode de Tohda, la méthode de Sauer ou la méthode de pyrolyse de sels d'hydrazonium.

²² Miyaura, N.; Suzuki, A.; *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457.

²³ a) Stille, J. K.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, 25, 508. b) Farina, V.; Krishnamurthy, V.; Scott, W. J.; *Org. React. (N.Y.)*, **1997**, 50, 1

²⁴ a) Cardenas, D. J.; Sauvage, J.-P.; *Synlett*, **1996**, 916. b) Fallahpour, R.-A.; *Synthesis*, **2000**, 1665. c) Heller, M.; Schubert, U. S.; *Synlett*, **2002**, 751. d) Bedel, S.; Ulrich, G.; Picard, C.; Tisnès, P.; *Synthesis*, **2002**, 1564. e) Ulrich, G.; Bedel, S.; Picard, C.; Tisnès, P.; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 6113.

- La méthode de Tohda²⁵

La méthode de Tohda consiste en la réaction du 1-méthyl-3,5-dinitro-pyridin-2-one **20**, qui est un composé déficient en électrons, avec la 2,6-diacétyl-pyridine **9** en présence d'ammoniaque pour donner la 5,5''-dinitro-2,2':6',2''-terpyridine (Figure 1.12)

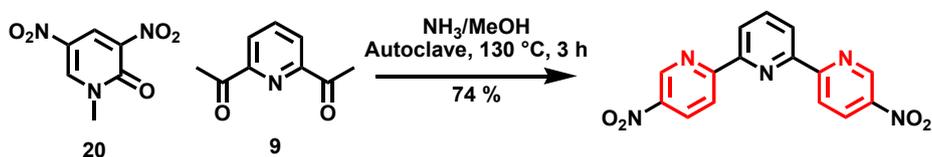


Figure 1.12. Synthèse de terpyridine par la méthode de Tohda.

L'utilisation de dérivés des composés **20** et **9** permettent la formation de terpyridines substituées par des groupements alkyles ou des aryles en position 4 et /ou 6 des pyridines périphériques ou en position 4 de la pyridine centrale.

- La méthode de Sauer²⁶

Cette méthode est basée sur la régiospécificité de la cyclocondensation des 1-(pyridin-2-yl)-méthanehydrazonamide **21**, substitués en position 6 de la pyridine avec les α -pyridylglyoxal **22** en présence d'éthanol, pour former des dérivés 3,5-di-(pyridin-2-yl)-[1,2,4]-triazines **23** pouvant être converti en 2,2':6',2''-terpyridine par des réactions de Diels-Alder inverses en présence de norborna-2,5-diène ou de dérivés stannins d'alcynes dans le 1,2-dichlorobenzène (Figure 1.13)

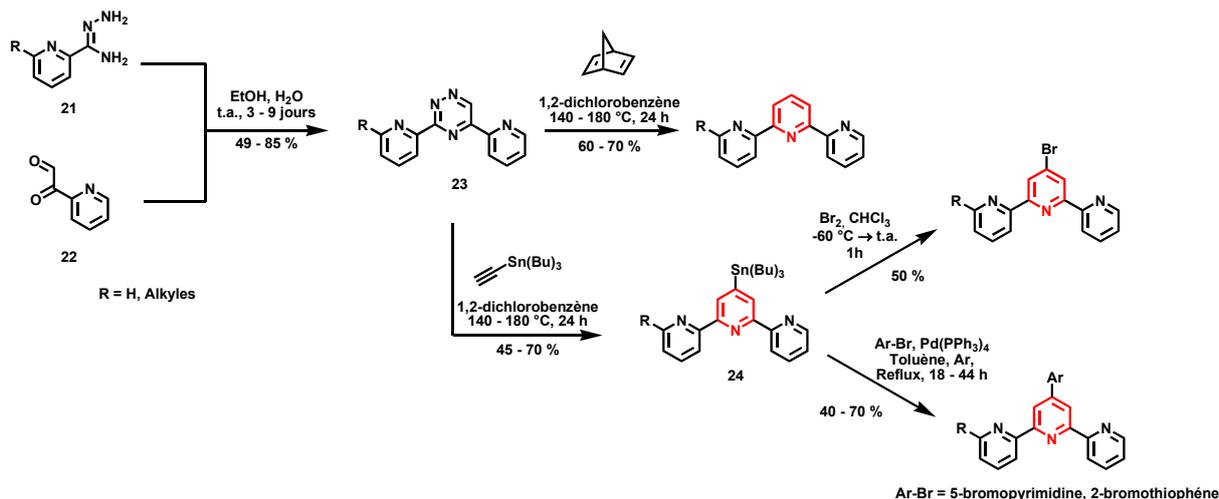


Figure 1.13. Synthèse de 2,2':6',2''-terpyridine par la méthode de Sauer.

²⁵ Tohda, Y.; Eiraku, M.; Nakagawa, T.; Usami, Y.; Ariga, M.; Kawashima, T.; Tani, K.; Watanabe, H.; Mori, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63, 2820.

²⁶ Pabst, G. R.; Sauer, J.; *Tetrahedron*, **1999**, 55, 5067.

- La méthode de pyrolyse des sels d'hydrazonium²⁷

L'exemple donné dans la littérature fait réagir la 6-méthyl-2-acétyl-pyridine **25** avec du *N,N*-diméthylhydrazine pour former la *N,N*-diméthylhydrazone **26** correspondante. La quaternisation de la fonction amine du composé **26** est obtenue avec du iodure de méthyle, pour former le iodure de *N,N,N*-triméthylhydrazonium qui sera directement converti en tétrafluoroborate de *N,N,N*-triméthylhydrazonium **27** par traitement avec du tétrafluoroborate de sodium. La pyrolyse de ce dernier permet de former la 6,6''-diméthyl-2,2':6',2''-terpyridine (Figure 1.14). Cette terpyridine est la seule qui peut être obtenue par cette méthode.

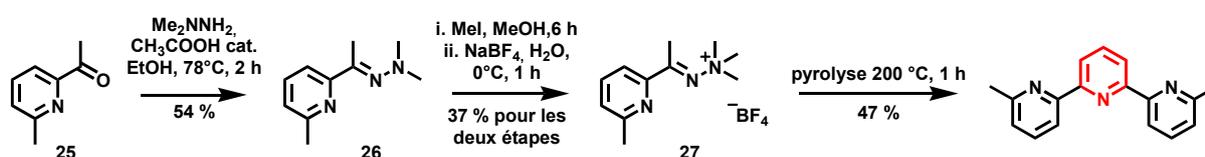


Figure 1.14. Synthèse de la 6,6''-diméthyl-2,2':6',2''-terpyridine par la méthode de pyrolyse des sels d'hydrazonium.

1.2.3. Le ligand 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine

Ce ligand est important car il peut être une alternative au chromophore 2,2':6',2''-terpyridine. A la différence de ce dernier, la préparation du chromophore 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine est peu décrite dans la littérature. Seulement une voie de synthèse semble exister. Cette voie de synthèse, décrite par Goldsby *et al.*²⁸ permet d'obtenir des ligands 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine symétriques ou asymétriques.

Cette méthode consiste en la substitution nucléophile aromatique (S_NAr) des dérivés halogènes (Br ou Cl) de la 2,6-dihalogène-pyridine **28** par des pyrazolates de potassium, généré *in-situ* à partir des pyrazoles correspondants et de KH ou de potassium solide. L'utilisation de 2 équivalents de pyrazolate de potassium permet l'obtention du ligand symétrique en une étape. L'utilisation de 1 équivalent permet de générer l'intermédiaire **29**, qui une fois réengagé dans une S_NAr avec un autre pyrazolate de potassium permet de rendre le ligand asymétrique (Figure 1.15).

L'obtention de ce ligand n'est pas chose aisée, sa préparation nécessite une température de réaction élevée (130°C) avec des solvants possédant des points d'ébullition élevés, tel que le diglyme et avec des temps de réaction généralement longs, de l'ordre de quelques jours.

²⁷ Newkome, G. R.; Fishel, D. L.; *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 1329.

²⁸ Jameson, D. L.; Goldsby, K. A.; *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4992.

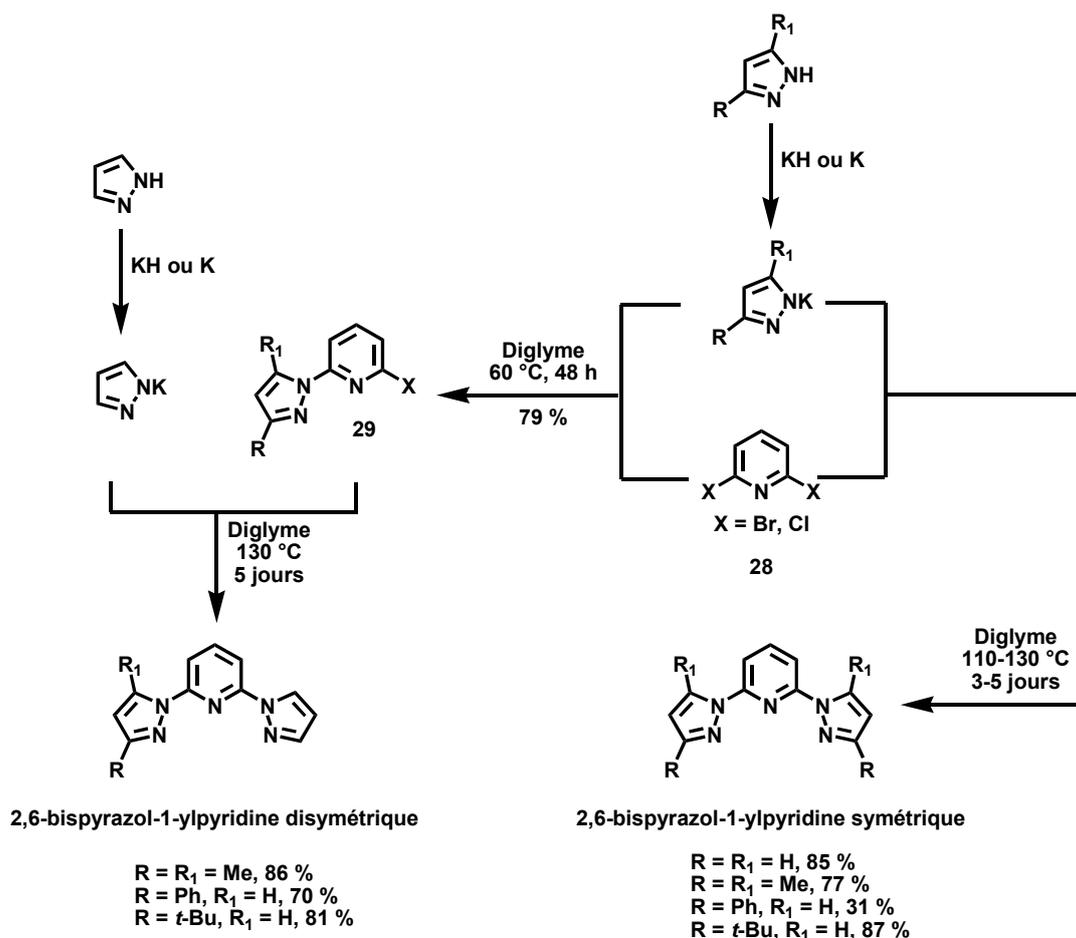


Figure 1.15. Synthèse des chromophores 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine symétriques et asymétriques effectuées par Goldsby *et al.*²⁸

1.3. Fonctionnalisations post-synthétiques sélectives des ligands

La fonctionnalisation post-synthétique sélective de ces chromophores a souvent été difficile à mettre en œuvre. En particulier pour le chromophore 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.

Depuis sa synthèse effectuée dans les années 90, deux articles seulement ont décrit la synthèse de dérivés halogénés de la 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.

Le premier décrit la dihalogénéation centrée sur les pyrazoles,²⁹ le second décrit la préparation de la 4'-iodo-2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.³⁰

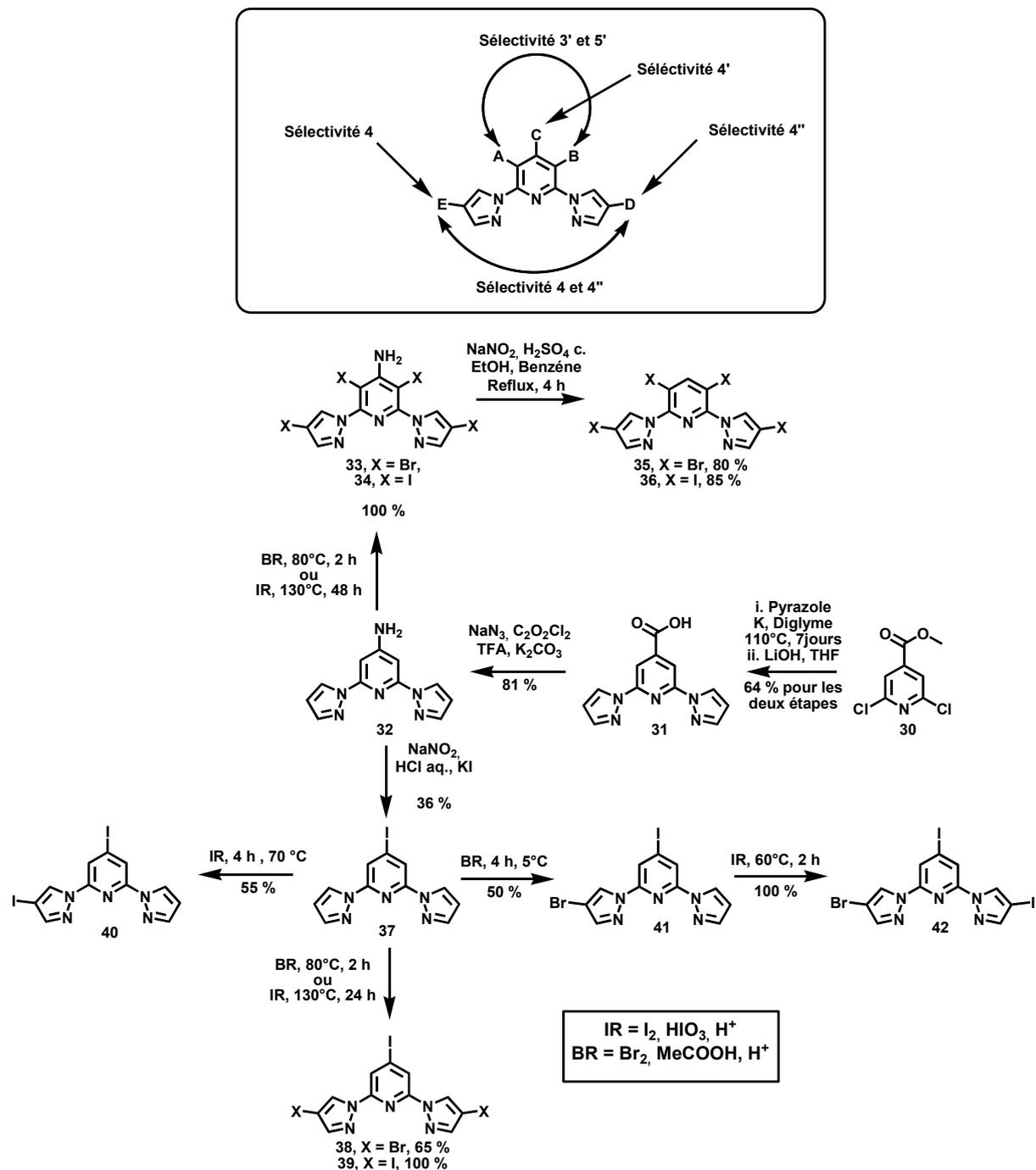
Plus récemment, Basak *et al.*³¹ ont mis au point une méthode permettant l'halogénéation de la 2,6-pyrazol-1-yl-pyridine, obtenue à partir du 2,6-dichloro-isonicotinate de méthyle **30** suivant la procédure décrite par Goldsby *et al.* et ils ont réussi à obtenir la régiosélectivité des réactions de bromation et de iodation sur (i) un des groupements pyrazoles, (ii) sur les deux

²⁹ Zoppellaro, G.; Baumgarten, M.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2888.

³⁰ Rajadurai, C.; Schramm, F.; Brink, S.; Fuhr, O.; Ghafari, M.; Kruk, R.; Ruben, M.; *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 10019.

³¹ Basak, S.; Hui, P.; Chandrasekar, R.; *Synthesis*, **2009**, 4042.

groupements pyrazoles, (iii) sur un des groupements pyrazoles et sur la pyridine centrale, (iv) sur les deux groupements pyrazoles et sur la pyridine centrale. La stratégie utilisée, représentée sur la *Figure 1.16*, permet des réactions sélectives sur les positions 3', 4, 4', 4'', et 5' de la 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.



*Figure 1.16. Représentation de la sélectivité des différentes positions du ligand 2,6-bis-pyrazol-1-yl-pyridine lors de réactions d'halogénations (haut) et schéma de synthèse des différents dérivés halogénés obtenus (bas).*³¹

A la différence du chromophore 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine, l'halogénéation post-synthétique sélective de la 2,2':6',2''-terpyridine n'est pas envisageable. Par contre l'ensemble des

méthodologies de synthèse permet d'obtenir plusieurs dérivés halogénés de la 2,2':6',2''-terpyridine sans toutes fois obtenir une différence de réactivité entre ces positions halogénées nécessaire pour permettre des fonctionnalisations post-synthétiques sélectives.

Certains exemples, repris par Heller et Schubert,^{11a} ont mis en évidence la possibilité d'obtenir des 2,2':6',2''-terpyridine mono-, di- ou tri-halogénées mais en règle générale ces halogénations sont obtenues à partir de terpyridines intermédiaires sophistiquées.³²

La stratégie utilisée pour activer les différentes positions de la terpyridine par des fonctionnalisations post-synthétiques est l'utilisation de réactifs halogénés susceptibles d'activer les groupements méthyles pour désactiver les autres.

La revue de Heller et Schubert^{11a} résume l'ensemble des 2,2':6',2''-terpyridine, possédant à la fois des groupements méthyles et des halogènes ainsi que les stratégies synthétiques utilisées pour les obtenir.

Suite aux diverses études menées sur les bipyridines,³³ une nouvelles approche a été envisagée pour permettre à la fois la préparation de la 2,2':6',2''-terpyridine et sa fonctionnalisation post-synthétique. Cette nouvelle approche utilise le couplage de Stille. La *Figure 1.17* présente un exemple pouvant être utilisé pour obtenir la 6-bromo-6''-méthyl-2,2':6',2''-terpyridine **47** à partir de la 6-méthyl-6'-stannyl-2,2'-bipyridine **43** et la 2,6-dibromo-pyridine **44**, ou de l'utilisation de dérivés 6-bromo-6''-méthyl-2,2'-bipyridine **45** et la 2-bromo-6-stannyl-pyridine **46**.³⁴

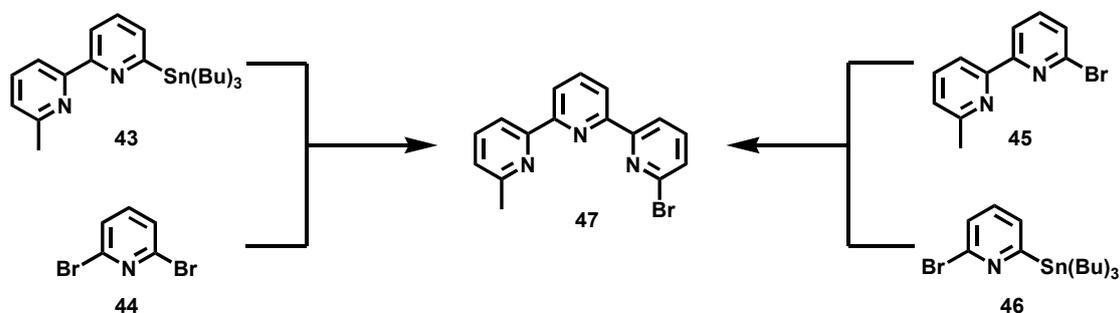


Figure 1.17. Exemples de préparations de la 2,2':6',2''-terpyridine dont les positions 6 et 6'' sont différenciées pour permettre des fonctionnalisations post-synthétiques.

Cette méthode permet de s'affranchir de la difficulté d'obtention des produits de départ et des problèmes de compatibilité des fonctions. Cependant même avec cette méthode, la fonctionnalisation post-synthétique de la terpyridine doit être envisagée en amont en fonction du choix des produits de départ.

³² a) Sauer, J.; Heldmann, D. K.; Pabst, G. R.; *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 313. b) Fallahpour, R.-A.; Neuburger, M.; Zehnder, M.; *New J. Chem.*, **1999**, 53.

³³ a) Kaes, C.; Katz, A.; Hosseini, M. W.; *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 3553. b) Newkome, G. R.; Paudler, W. W. in *Contemporary Heterocyclic Chemistry*; Wiley: New York, **1982**.

³⁴ Houghton, M. A.; Bilyk, A.; Harding, M. M.; Turner, P.; Hambley, T. W.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, 2725.

Si on compare ces deux chromophores, on peut donc facilement constater que la 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine peut-être aisément fonctionnalisée post-synthétiquement, et de façon sélective au gré des besoins.

Pour ce qui est de la 2,2':6',2''-terpyridine, bien que des fonctionnalisations post-synthétiques soient envisageables, il est néanmoins nécessaire de les prévoir en amont grâce au choix des réactifs de départ que ce soit avec les différentes stratégies de condensation, de couplages croisés, ou toute autre méthode utilisée pour la préparation de cette famille de ligands. La limite étant l'obtention des réactifs de départ et leur compatibilité avec les conditions de réaction utilisées pour la préparation de la 2,2':6',2''-terpyridine.

1.4. Objectif de ce travail

L'objectif de mes travaux de recherche a été la préparation de complexes de lanthanides avec des ligands bâtis sur le chromophore 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine. Les raisons ayant motivé ce choix sont d'une part l'aspect versatile de ce chromophore qui permet des fonctionnalisations post-synthétiques sélectives, mais également l'aptitude de ce type de chromophore à photosensibiliser les ions lanthanides.³⁵

L'application première de ces complexes est dans le domaine biomédical, particulièrement en tant que marqueur de matériel biologique. Cette application nous impose plusieurs contraintes telles que la stabilité des complexes en milieu biologique, de bonnes propriétés photophysiques, une bonne solubilité en milieu aqueux et surtout la présence d'un lien efficace vers le matériel biologique à marquer.

Ainsi mon manuscrit de thèse se divise en trois parties, la première présente la préparation de différents ligands possédant ce chromophore, et des complexes associés. La méthode utilisée pour la préparation du chromophore 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine est cependant différente de la méthode déjà existante, et est basée sur la chimie particulière de la 2,4,6-trifluoropyridine.

La seconde partie expose l'utilisation de ces complexes dans le cadre d'une application biologique bien particulière, le dosage d'antigène par une méthode fluoroimmulogique afin de permettre la détection précoce de certains cancers, en particulier le cancer du sein et le cancer du poumon.

Suite aux résultats obtenus que ce soit pour la préparation des complexes ou l'utilisation de ces complexes dans le domaine biologique, leur optimisation s'est avérée nécessaire. La troisième partie met en évidence les efforts déployés afin d'optimiser la stabilité en milieu biologique et les propriétés optiques de ces complexes.

³⁵ Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodriguez-Ubis, J.-C.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 613.

2. Synthèses de complexes luminescents d'ions lanthanides basées sur la chimie de la trifluoropyridine

Ce chapitre décrit la synthèse multi-étapes de ligands photosensibilisateurs nonadentates et de leurs complexes associés. Les travaux antérieurs effectués par Brunet *et al.* ont montré que les chromophores bispyrazolylpyridine³⁵ ou bispyrazolylpyrimidine³⁶ sont adéquats pour la photosensibilisation de lanthanides.

Les ligands que nous nous sommes proposés de synthétiser sont basés sur le chromophore bispyrazolylpyridine, et sont constitués d'une poche de complexation nonadentate, avec quatre fonctions carboxylates et cinq atomes d'azote, assurant la solubilité dans l'eau et la stabilité des complexes. Des fonctionnalisations spécifiques à des applications données seront obtenues par fonctionnalisation de la position para de la pyridine.

L'étape clé pour la synthèse de ces ligands réside dans la préparation de la plate-forme bispyrazolylpyridine (*Figure 2.1*) dont la position para de la pyridine centrale, portant un atome de brome, peut être facilement fonctionnalisée.

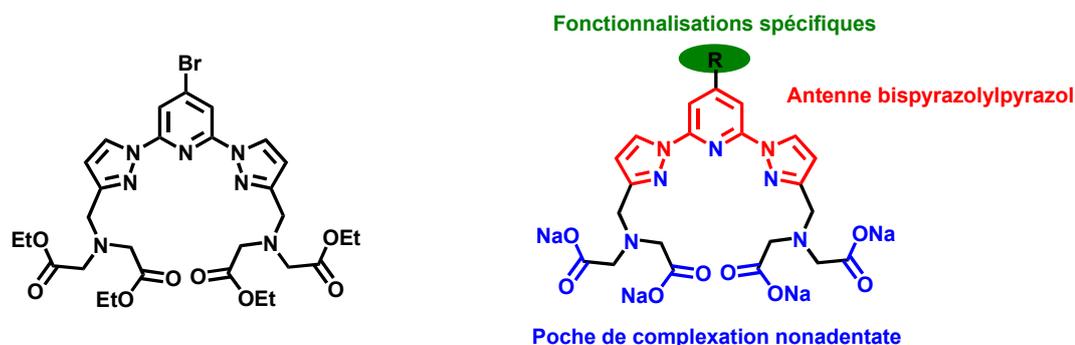


Figure 2.1. Structure moléculaire générale de la plate-forme bispyrazolylpyridine et des ligands.

La méthodologie pour accéder à cette plate-forme est différente de celle développée par Goldsby *et al.*²⁸ Cette méthode est basée sur la chimie particulière de la 2,4,6-trifluoropyridine, plus spécifiquement sur la différence de réactivité des positions ortho et para lors de réactions de substitutions nucléophiles aromatiques (S_NAr), et utilise des conditions de réaction plus douces, avec des temps de réaction plus courts.

Dans une première partie, nous exposerons les premiers tests de S_NAr effectués sur la 2,4,6-trifluoropyridine, ainsi que d'autres groupes azaaromatiques polyfluorés tels que la 2,4,6-trifluoropyrimidine et la pentafluoropyridine (*Figure 2.2*).

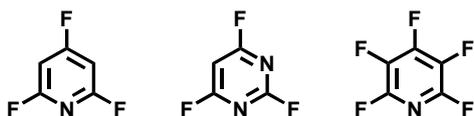


Figure 2.2. Structure de la 2,4,6-trifluoropyridine, de la 2,4,6-trifluoropyrimidine et de la pentafluoropyridine.

³⁶ Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodríguez-Ubis, J. C.; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 1091.

Dans une deuxième partie, nous présenterons la méthodologie qui nous a permis de différencier les positions ortho et para de la trifluoropyridine pour nous permettre la préparation de nos ligands.

La troisième partie de ce chapitre présente la préparation des complexes d'euprium et de terbium, ainsi que l'étude de leurs propriétés photophysiques et thermodynamiques.

2.1. Tests préliminaires de SNAr sur des groupes azaaromatiques polyfluorés.

Les travaux antérieurs de Schlosser *et al.* ont mis en évidence la chimie particulière de groupe di- et tri-halogène-pyridine lors de SNAr.³⁷ Ces travaux ont servi de base à notre étude. La SNAr que nous avons étudiée dans un premier temps est la substitution des atomes de fluor par le 3-éthylcarboxypyrazole **2**.³⁸ Ainsi, nous nous sommes proposés de préparer les ligands **L1**, **L2** et **L3** (Figure 2.3), ce qui a permis également l'étude de la stabilité des différents cœurs azaaromatiques substitués à chaque étape de la synthèse de ces ligands ainsi que leur influence sur les propriétés photophysiques des complexes.

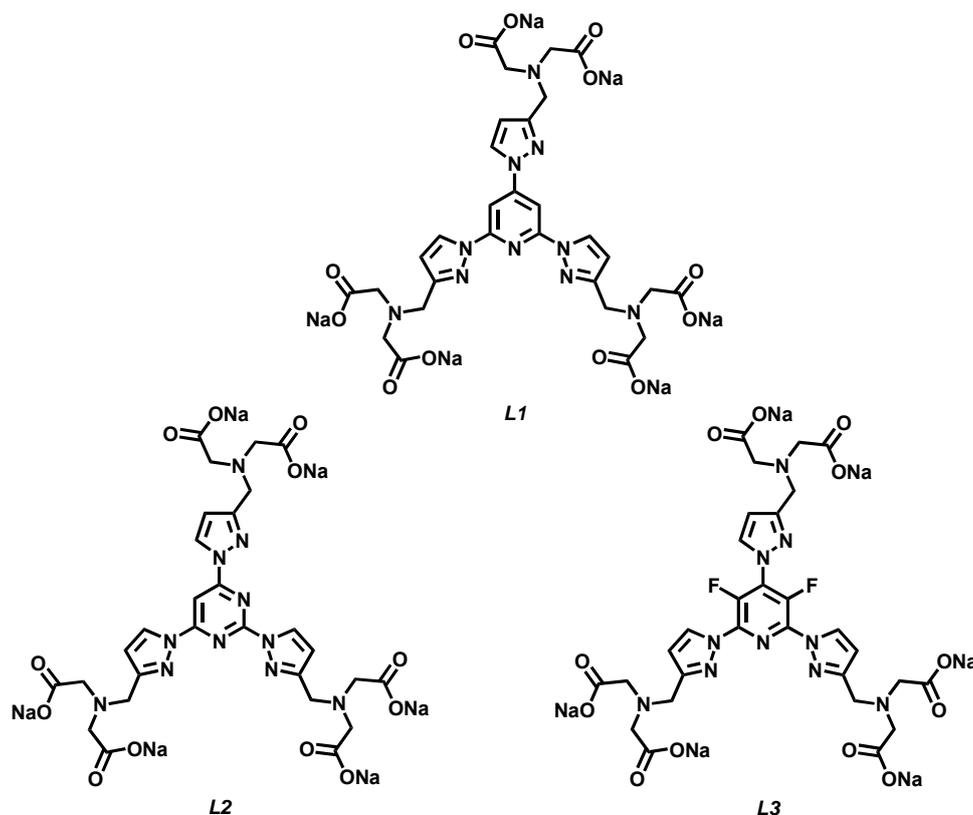


Figure 2.3. Structures moléculaires des ligands **L1**, **L2** et **L3**.

³⁷ Schlosser, M.; Rausis, T.; Bobbio, C.; *Org. Lett.*, **2004**, 7, 127.

³⁸ Fatin-Rouge, N.; Toth, E.; Perret, D.; Backer, R. H.; Merbach, A. E.; Bunzli, J.-C. G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122.

2.1.1. *SNAr* sur la 2,4,6-trifluoropyridine : Synthèse du ligand *L1*

Le ligand *L1* est composé de trois entités pyrazoles dont deux, en position 2 et 6 de la pyridine centrale, constituent avec celle-ci, la base bispyrazolopyridine de la poche de complexation du ligand. Le nombre de sites coordinants de la poche de coordination du ligand est complété à neuf par des entités carboxylates amenées par des bras iminodiacétates des entités pyrazoliques en position 2 et 6. La position para de la pyridine centrale est substituée par une troisième entité pyrazolique elle-même portant une sous-unité iminodiacétate. La synthèse de ce ligand se fait en 5 étapes à partir de la 2,4,6-trifluoropyridine *1* (Schéma 2.1).

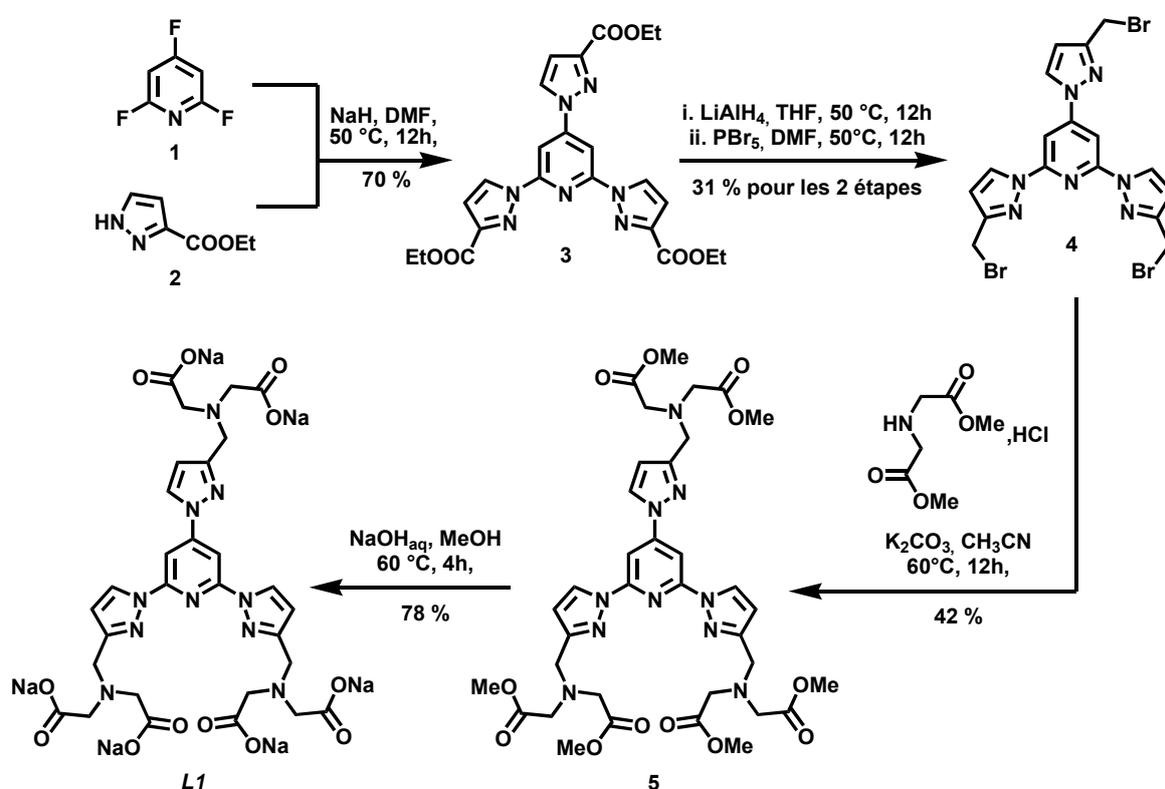


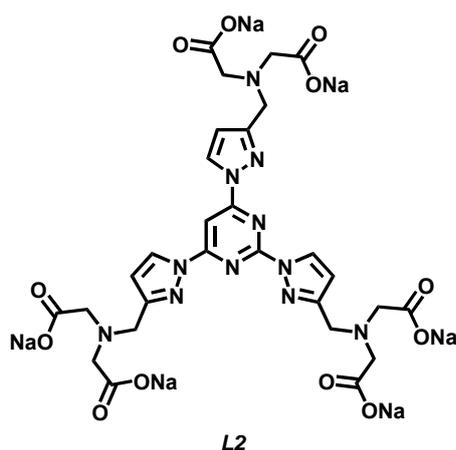
Schéma 2.1. Synthèse du ligand *L1*.

La première étape est la *SNAr* des trois atomes de fluors de la 2,4,6-trifluoropyridine *1*, en présence de 3-éthylcarboxypyrazole *2* et d'hydrure de sodium (NaH) pour former le triester *3* avec un rendement de 70 % après purification par chromatographie sur colonne. L'étape suivante de cette synthèse est la réduction du triester *3* en présence d'hydrure de lithium d'aluminium (LiAlH₄) pour donner le triol correspondant. En raison de sa polarité, ce composé ne sera pas isolé, mais directement converti en présence de PBr₅ en composé tribromé *4* avec un rendement de 31 % pour les deux étapes. La substitution nucléophile des atomes de bromes de *4* par le diméthyle iminodiacétate en présence de K₂CO₃ donne le

composé **5** avec un rendement de 48 % après purification par chromatographie sur colonne. La saponification des six fonctions esters méthyliques est réalisée en présence d'une solution de soude dans du méthanol. Le ligand **L1** est isolé sous la forme carboxylate de sodium avec un rendement de 78 % par précipitation avec du diéthyle éther (Et₂O) et du tétrahydrofurane (THF).

Cette synthèse montre que la substitution nucléophile aromatique sur la trifluoropyridine **1** avec le 3-éthylcarboxypyrazole **2** est faisable dans des conditions beaucoup plus douces que les SNAr effectuées sur les pyridines bromées ou chlorées.³⁵ De plus le cœur trispyrazolopyridine est stable tout au long de la synthèse. Notons également que la formation d'isomères résultants de la SNAr avec l'azote N-2 du pyrazolate n'est pas observée contrairement aux travaux antérieurs décrits dans la littérature.³⁹

2.1.2. SNAr sur la 2,4,6-trifluoropyrimidine : Synthèse du ligand L2



Le ligand **L2** est composé d'une pyrimidine centrale substituée en position 2, 4 et 6 par trois entités pyrazoliques portant des sous-unités iminodiacétates. Le but est d'étudier l'influence de la pyrimidine sur les propriétés photophysiques des complexes formés avec le ligand **L2** et d'appliquer la méthodologie de synthèse développée avec la 2,4,6-trifluoropyridine. Ainsi, la voie de synthèse envisagée pour préparer ce ligand est la même que celle utilisée pour le ligand **L1** (Schéma 2.2).

La première étape est l'étape de SNAr réalisée en présence du composé **2** et de NaH. Nous avons obtenu le triester **7** avec un rendement de 36% après purification. Le triester **7** est ensuite réduit en présence de LiAlH₄ dans du THF pour former le diol correspondant qui sera directement traité avec du PBr₅ dans le DMF pour former le composé tribromé **8**. Après purification, le produit attendu **8** n'a pas pu être isolé. Le produit majoritaire obtenu est le composé 4,6-bispyrazolopyridine **9** (46% après purification) certainement formé par une réduction sur la position 2 de la pyrimidine centrale par les hydrures de LiAlH₄. Ce composé ne pouvant pas être utilisé comme ligand, la synthèse a été stoppée à cette étape.

³⁹ Charbonnière, L. J.; Ziessel, R.; *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 6305.

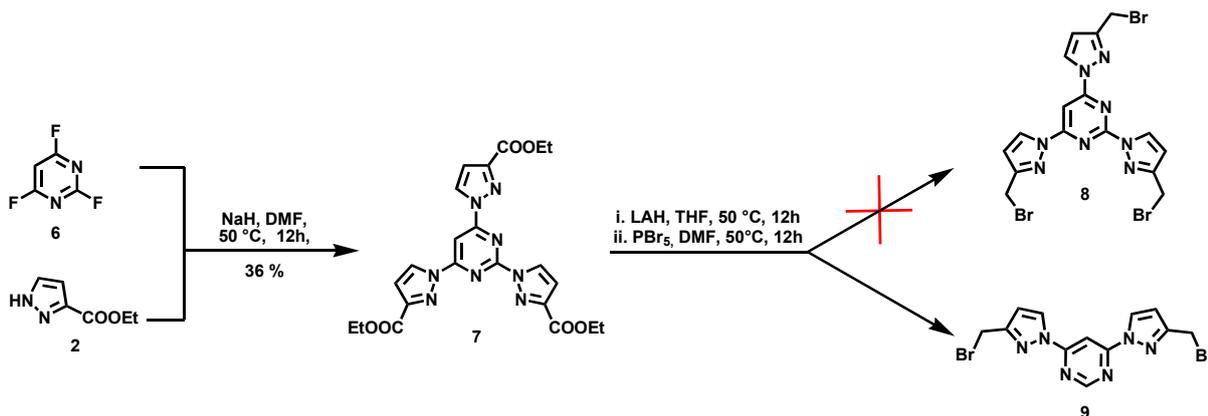
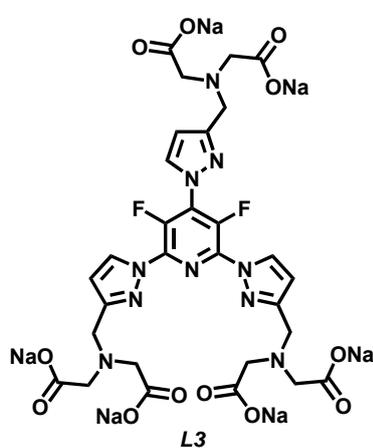


Schéma 2.2. Synthèse du composé 8 aboutissant au composé dibromé 9.

Notons que le rendement de la SNAr effectuée sur la trifluoropyrimidine est très inférieur à celui obtenu lors de la réaction sur la trifluoropyridine. La différence de réactivité entre la trifluoropyridine et la trifluoropyrimidine est ainsi mise en évidence. Par ailleurs, on peut également remarquer l'instabilité du cœur trispyrazolylpyrimidine dû à un effet électronique important sur la position 2 de la pyrimidine. La réaction de réduction en présence de LiAlH_4 favorise la SNAr du groupement pyrazolique en position 2 par un hydrure.

2.1.3. SNAr sur la pentafluoropyridine : Synthèse du ligand L3



La SNAr des atomes de fluors de la pentafluoropyridine par des entités pyrazoles a été décrite par Cornago *et al.*,⁴⁰ en utilisant des anions 3,5-diméthyl-pyrazolate. Leur étude définit l'ordre de réactivité des atomes de fluors sur la pentafluoropyridine, à savoir $4\text{-F} > 2\text{-F}/6\text{-F} > 3\text{-F}/5\text{-F}$. Par ailleurs, cette étude a mise en évidence une grande difficulté à contrôler la SNAr des atomes de fluors par les anions pyrazolates, se traduisant par un mélange de produits mono- à penta-substitués.

En utilisant ce résultat, nous avons cherché à préparer le ligand **L3**, constitué d'un cœur 3,5-difluoro-2,4,6-trispyrazolylpyridine. Les pyrazoles en position 2, 4 et 6 portent des sous-unités iminodiacétates. L'idée générale de cette synthèse est que l'utilisation du composé **2** peut favoriser la substitution des atomes de fluors en position ortho et para au détriment des atomes de fluors en position méta du fait de l'encombrement stérique provoqué par le

⁴⁰ Cornago, P.; Escolástico, C.; María, M. D. S.; Claramunt, R. M.; Fernández-Castaño, C.; Foces-Foces, C.; Fayet and J.-P.; Elguero, J.; *Tetrahedron*, **1996**, 52, 11075.

groupement ester éthylique du pyrazole. La synthèse de **L3** commence par la SNAr des atomes de fluors de la pentafluoropyridine **10** avec le composé **2** en présence de NaH dans du DMF, comme décrit précédemment. A l'issue de cette première étape, plusieurs mélanges complexes de produits ont été isolés, correspondants à différents isomères issus des réactions de mono-, di-, tri-, tetra- et penta-substitutions des atomes de fluors de la pentafluoropyridine par **2**. Ces isomères n'ont pas pu être isolés. Suite à la complexité des mélanges obtenus, nous avons décidé d'utiliser un excès de réactif nucléophile (*Schéma 2.3*). La pentafluoropyridine **10** réagit avec un excès de **2** et de NaH dans les mêmes conditions que précédemment afin d'obtenir le composé penta-substitué **11** comme produit majoritaire. Ce composé est isolé avec un rendement de 74 % après purification par chromatographie sur colonne. Les esters éthyliques de **11** sont hydrolysés en présence d'une solution aqueuse de NaOH dans du méthanol. Après traitement avec une solution de HCl 0,1 M, le penta-acide **12** formé est isolé sous forme d'un solide blanc par précipitation avec un rendement de 80 %.

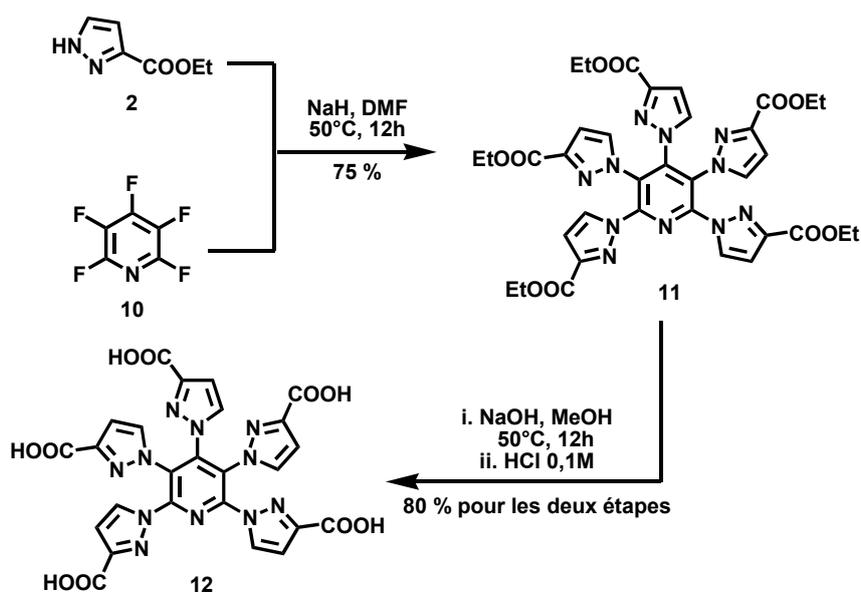


Schéma 2.3. Synthèse du composé 12.

A l'issue de ce test de SNAr sur la pentafluoropyridine **10**, notons que la régiosélectivité est difficile à contrôler et que le ligand **L3** n'a pu être synthétisé.

2.1.4. Conclusion des tests préliminaires de SNAr sur les groupes azaaromatiques polyfluorés

Ces différents tests ont montré que dans l'optique de la préparation de ligands avec une plateforme bispyrazolopyridine, substituée en position para de la pyridine centrale, la modification de la réactivité du fluorure en position 4 de la 2,4,6-trifluoropyridine est primordiale. L'utilisation de la pentafluoropyridine pour la formation d'une telle plateforme

est compromise du fait d'une réactivité trop peu différenciée entre les atomes de fluor en position ortho, méta et para. Enfin l'utilisation de la 2,4,6-trifluoropyrimidine pour la préparation de ligands avec une plate-forme bispyrazolypyrimidine n'est actuellement pas envisageable selon notre approche.

2.2. SNAr régiosélectives des positions para et ortho de la 2,4,6-trifluoropyrimidine : synthèse des ligands

Les résultats des tests préliminaires de SNAr ont montré que la 2,4,6-trifluoropyrimidine **1** est le meilleur candidat pour la préparation du cœur bispyrazolypyrimidine. Cependant la régiosélectivité lors de réaction de SNAr sur la trifluoropyrimidine **1** est inexistante ou difficile à contrôler lors de l'utilisation de dérivés pyrazoliques. Afin de mieux contrôler la régiosélectivité des SNAr sur les composés ortho et para substitués, il est nécessaire d'inverser la réactivité des positions ortho et para. Cette inversion de réactivité est effectuée en substituant l'atome de fluor en position para sur la 2,4,6-trifluoropyrimidine par un atome de brome, beaucoup moins réactif, pour former la 4-bromo-2,6-difluoropyrimidine. (Figure 2.4).^{37, 41}

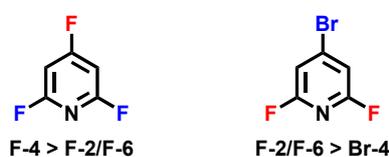


Figure 2.4. Représentation des sites les plus réactifs et les moins réactifs lors de SNAr sur la 2,4,6-trifluoropyrimidine et la 4-bromo-2,6-difluoropyrimidine.

Cette étape primordiale permet la préparation de la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazolypyrimidine **18** (Figure 2.5).

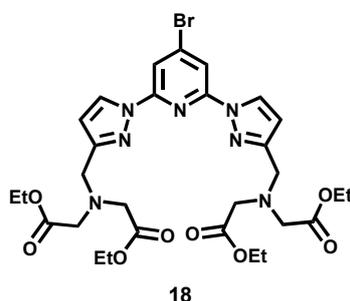


Figure 2.5. Structure moléculaire de la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazolypyrimidine **18**.

Cette plate-forme permettra par la suite d'envisager la synthèse des ligands **L4**, **L5**, et **L6** (Figure 2.6).

⁴¹ Cefalo, D. R.; Henderson, J. I.; Mokri, H. H.; US7087755, 2006.

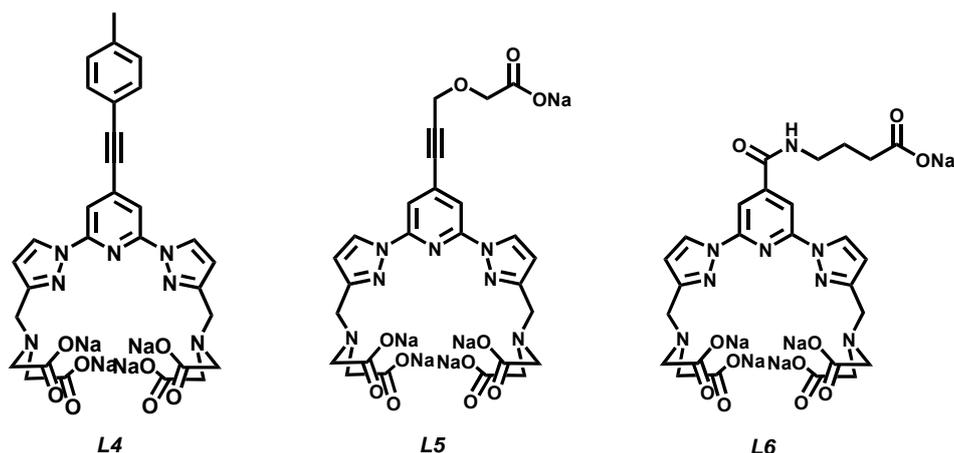


Figure 2.6. Structure moléculaire des ligands L4, L5, et L6.

2.2.1. SNAr de l'atome de fluor en position para de la trifluoropyridine : Synthèse de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine 14

La préparation de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine **14** a été décrite dans la littérature⁴¹ et se fait en deux étapes (Schéma 2.4). La première étape est une SNAr de l'atome de fluor en position para par de l'hydrazine monohydrate permettant d'obtenir la 2,6-difluoro-4-hydrazinopyridine **13** avec un rendement de 60 % après recristallisation dans l'acétate d'éthyle. Le composé **13** est ensuite engagé dans une réaction de type Sandmeyer, en présence de dibrome, permettant la substitution de l'hydrazine par un atome brome. La 4-bromo-2,6-difluoropyridine **14** résultante est isolée sous forme d'une huile incolore par distillation sous pression réduite avec un rendement de 70 %.

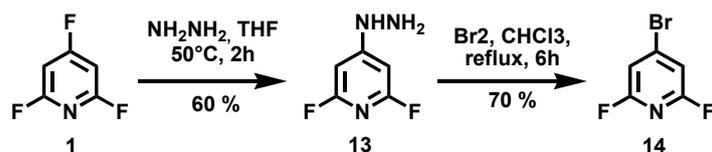


Schéma 2.4. Synthèse de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine 14.

Notons qu'à l'issue de la première étape, les deux isomères 2,6-difluoro-4-hydrazinopyridine **13** et 2,4-difluoro-6-hydrazinopyridine **15** se forment. L'étape de purification par recristallisation est importante car elle permet d'éliminer le composé **15** qui mènerait à la bromation sur l'une des positions ortho, aboutissant à un mélange de regio-isomères qui poserait des problèmes de réactivité et de purification dans les étapes ultérieures (Schéma 2.5).

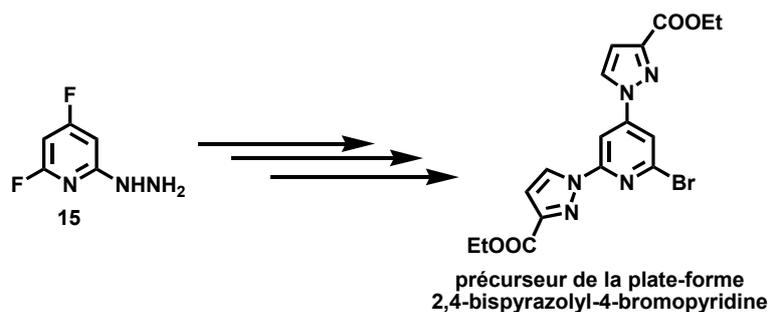


Schéma 2.5. Précurseur de la plate-forme 2,4-bispyrazolyl-6-bromopyridine obtenu à partir de 15.

2.2.2. SNAr des atomes de fluors en position ortho de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine 4 : Synthèse de la plate-forme bispyrazolylpyridine 18.

La plate-forme **18** est obtenue en trois étapes à partir du composé 4-bromo-2,6-difluoropyridine **14** (Schéma 2.6). La première étape est la SNAr des atomes de fluors en position ortho par le 3-éthylcarboxypyrazole **2**, en présence de NaH dans du DMF anhydre pour obtenir le diester **16** avec un rendement de 80 % après purification. L'étape suivante est la réduction des groupes esters éthyliques de **16** avec LiAlH₄ dans du THF anhydre pour obtenir le diol correspondant qui sera directement engagé dans une réaction de bromation avec PBr₃ dans du DMF anhydre pour former le composé tribromé **17** (60 % pour ces deux étapes). La dernière étape est la réaction d'alkylation avec le diéthyle iminodiacétate en présence de K₂CO₃ pour former la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazolylpyridine **18** avec un rendement de 87 % après purification.

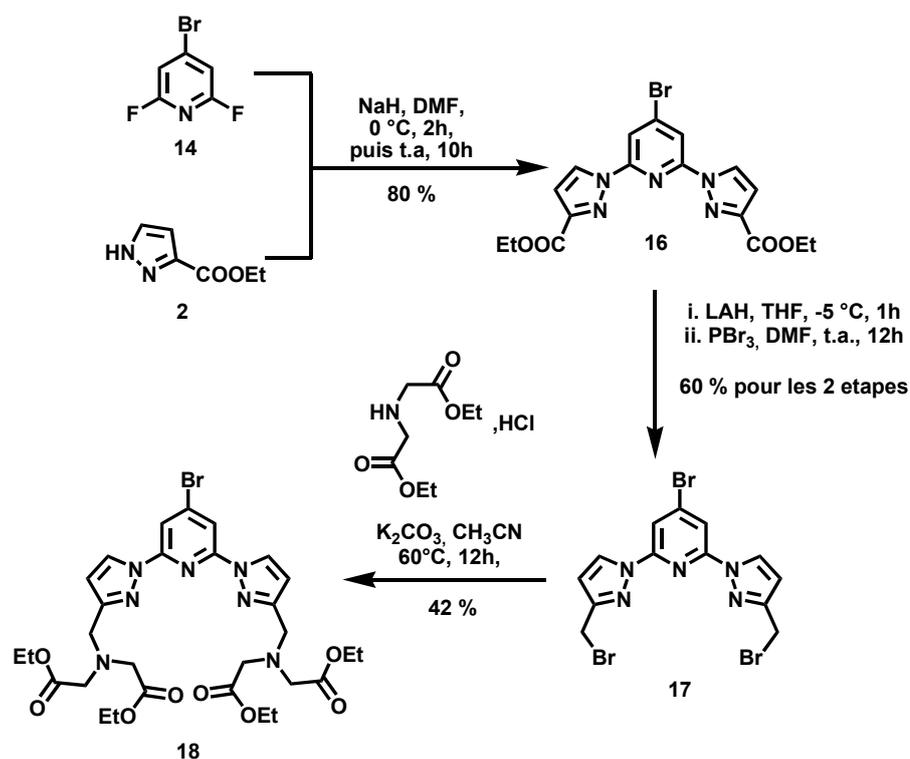


Schéma 2.6. Synthèse de la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazolylpyridine 18.

Le point important de cette synthèse est l'étape de réduction en présence de LiAlH_4 . Il est absolument nécessaire de travailler dans un ratio 2:1 de LiAlH_4 par rapport au diester **16** et à une température de -5°C afin de limiter la formation du diol **19**, résultant de la $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ de l'atome de brome par un hydrure. Du fait de la faible différence de polarité entre les composés issus de la réduction des esters, le diol **19** et son homologue bromé ne seront pas séparés et le mélange sera engagé dans la réaction de bromation avec du PBr_3 , pour former le composé dibromé **20**, séparable de son homologue bromé **17** par chromatographie sur colonne (Schéma 2.7).

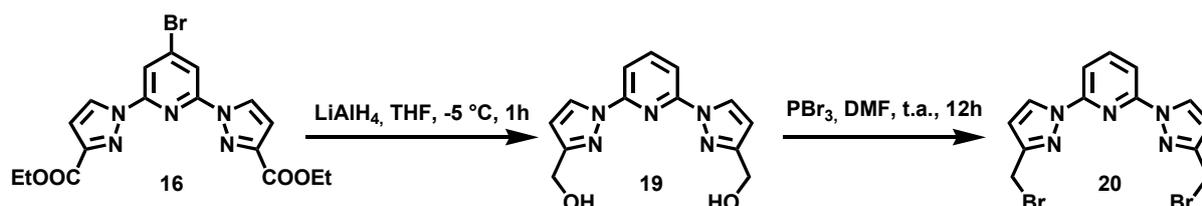


Schéma 2.7. Synthèse du composé dibromé **20**.

2.2.3. Fonctionnalisation en position para de la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazolypyridine **18** : Synthèses des ligands **L4**, **L5**, et **L6**.

Grâce à l'atome de brome en position para de la pyridine centrale de la plate-forme **18**, plusieurs réactions de type carboamidation,⁴² carboalkoxylation,⁴³ ou de couplage pallado-catalysés de type Sonogashira,⁴⁴ ou Suzuki⁴⁵ peuvent être effectuées afin de synthétiser des ligands possédant des fonctionnalisations spécifiques pour des applications données.⁴⁶ Les ligands que nous allons présenter dans cette partie sont les ligands **L4**, **L5**, synthétisés via le couplage de Sonogashira, et le ligand **L6**, synthétisé via une réaction de carboamidations.

2.2.3.1. Couplage pallado-catalysé de type Sonogashira : Synthèses des ligands **L4** et **L5**.

Pour la synthèse de ces ligands la réaction de couplage de Sonogashira nous a permis de lier directement une triple liaison sur la pyridine centrale de la plate-forme bispyrazolypyridine. Cette triple liaison permet d'augmenter la délocalisation électronique sur le chromophore bispyrazolypyridine ce qui peut avoir une influence non négligeable sur les propriétés photophysiques des complexes issus de ces ligands. Le premier couplage de Sonogashira que nous avons effectué nous a permis de synthétiser le ligand **L4**, préparé comme modèle de

⁴² a) El-ghayoury, A.; Ziessel, R.; *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 4473. b) Xu, J.; Burton, D. J.; *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 4346. c) Xu, J.; Burton, D. J.; *Org. Lett.*, **2002**, 4, 831.

⁴³ El-ghayoury, A.; Ziessel, R.; *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 7757.

⁴⁴ Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N.; *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 16, 4467.

⁴⁵ Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A.; *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 20, 3437.

⁴⁶ Kadjane, P.; Starck, M.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R.; Hildebrandt, N.; *FR5006*, **2008**.

composés plus élaborés. Puis, de la même manière, nous avons synthétisé le ligand **L5**, possédant une fonction acide carboxylique pour le marquage de matériel biologique (Figure 2.6).

- Synthèse du ligand **L4** :

La synthèse de ce ligand se fait en deux étapes à partir de la plate-forme bispyrazolopyridine **18** (Schéma 2.8). La première étape est la synthèse du composé **22** via un couplage de Sonogashira catalysé au palladium entre la plate-forme **18** et le tolylacétylène **21**. Le composé **22** est obtenu avec un rendement de 63 % après purification par chromatographie sur colonne. La deuxième étape est l'hydrolyse des groupes esters éthyliques de **22** en présence de NaOH pour former le ligand **L4** qui sera isolé sous sa forme carboxylate de sodium.

Notons que le composé **L4** ne possède pas de point d'ancrage évident pour le marquage de matériel biologique. L'entité tolylacétylène est utilisée pour déplacer l'absorption du ligand dans la région du visible et pour étudier son influence sur les propriétés photophysiques des complexes de lanthanides.

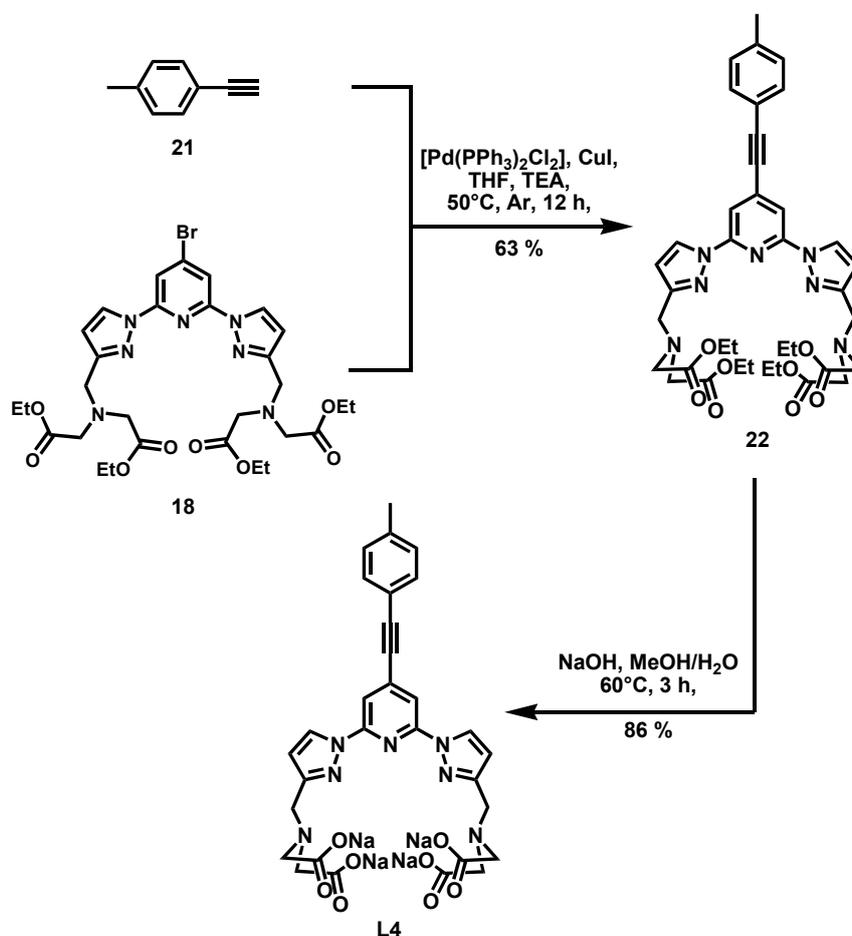


Schéma 2.8. Synthèse du ligand **L4**.

- Synthèse du ligand L5 :

Suite aux résultats obtenus avec le ligand tolylacétylène **L4**, nous avons décidé de préparer le ligand **L5** (Schéma 2.9), en utilisant les mêmes conditions de couplage entre la plate-forme bispyrazolylpyridine **18** et le 2-(2-propyloxy)-acétate d'éthyle **25**. Ce composé est obtenu par substitution nucléophile de l'alcool propargylique **23** sur le bromoacétate d'éthyle **24** avec un rendement de 47 % après purification par chromatographie sur colonne, en suivant la procédure décrite dans la littérature.⁴⁷ Le couplage de Sonogashira entre **18** et **25** permet d'obtenir le penta-ester éthylique **26** avec un rendement de 40 %. La dernière étape est la saponification des esters éthyliques de **26** en présence de NaOH, suivie d'une étape de neutralisation pour donner **L5**, isolé sous sa forme acide avec un rendement de 64 %.

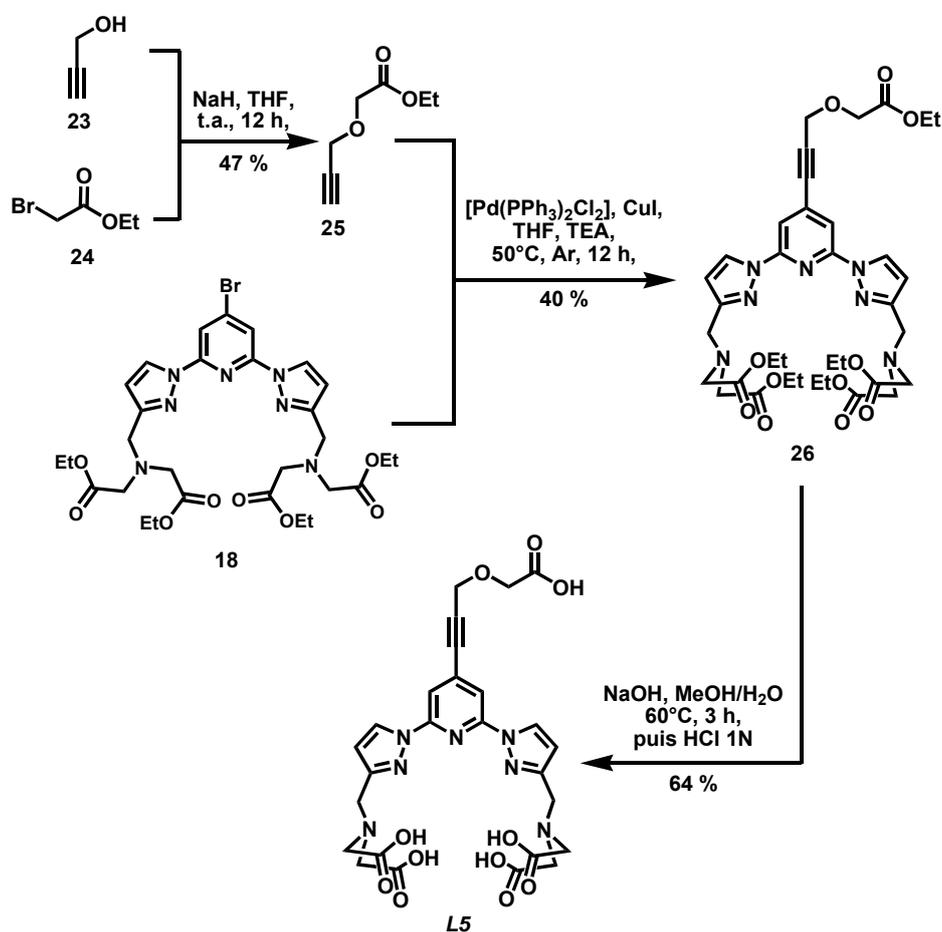


Schéma 2.9. Synthèse du ligand L5.

⁴⁷ Dinges, J. R.; Albert, D. H.; Arnold, L. D.; Ashworth, K. L.; Akritopoulou-Zanze, I.; Bousquet, P. F.; Bouska, J. J.; Cunha, G. A.; Davidsen, S. K.; Diaz, G. J.; Djuric, S. W.; Gasiiecki, A. F.; Gintant, G. A.; Gracias, V. J.; Harris, C. M.; Houseman, K. A.; Hutchins, C. W.; Johnson, E. F.; Li, H.; Marcotte, P. A.; Martin, R. L.; Michaelides, M. R.; Nyein, M.; Sowin, T. J.; Su, Z.; Tapang, P. H.; Xia, Z.; Zhang, H. Q.; *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2011.

L'intérêt de ce ligand est que le bras 2-(2-propyloxy)-acétate peut servir de lien pour le marquage de matériel biologique à travers une activation de l'acide en ester NHS par exemple.

2.2.3.2. Réaction de carboamidation : Synthèse du ligand L6.

En accord avec plusieurs observations de la littérature,³⁵ une fonctionnalisation avec un groupement formyl ou formamide en position para de la pyridine centrale confère d'excellentes propriétés photophysiques aux complexes de terbium et ceci en raison d'un positionnement favorable des niveaux énergétiques. Afin d'obtenir des complexes de lanthanides avec des propriétés optiques optimales, nous avons décidé d'explorer cette voie. La fonctionnalisation par un amide en position para de la pyridine a été obtenue par une réaction de carboamidation sur l'atome de brome de la plate-forme **18**. Le but de cette synthèse est d'obtenir un marqueur d'anticorps avec un lien covalent de taille adaptée (5 ou 6 atomes de carbone) pour un marquage efficace. La préparation du ligand **L6** résulte de la réaction de carboamidation avec un acide aminé, l'aminobutyrate d'éthyle **27**. L'utilisation d'un acide aminé présente un double avantage : en une seule étape, la fonction amide en position para de la pyridine centrale est insérée ainsi qu'une fonction ester, excellent précurseur pour une fonction de marquage. La synthèse de **L6** se fait en deux étapes à partir de la plate-forme **18** (Schéma 2.10).

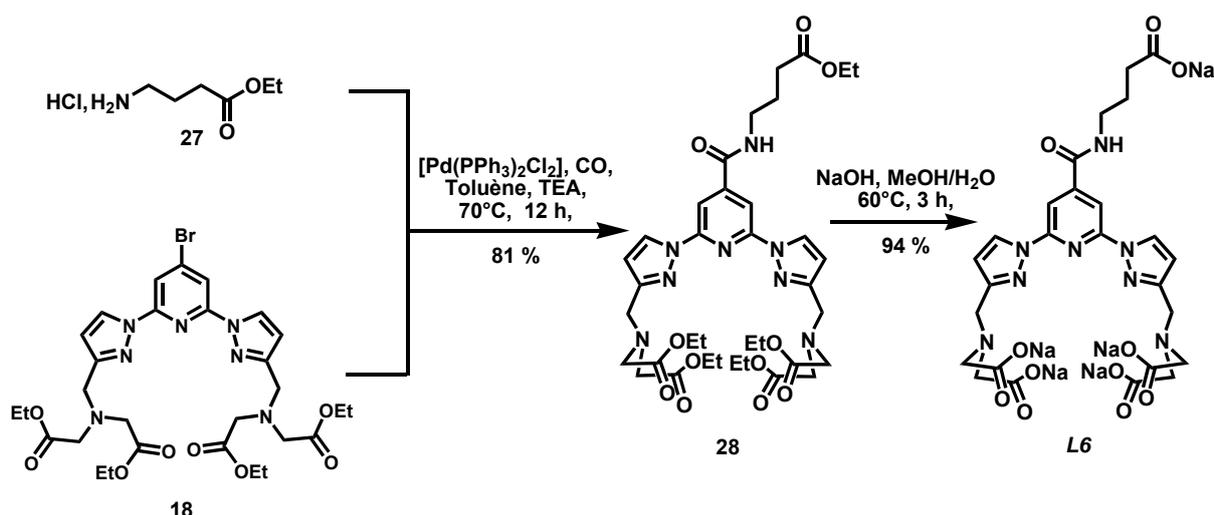


Schéma 2.10. Synthèse du ligand L6.

La première étape est la réaction de carboamidation entre les composés **18** et **27** catalysée par du palladium. Cette réaction permet d'obtenir **28** avec un rendement de 81 % après purification. La deuxième étape est l'hydrolyse des groupements esters en présence de NaOH

qui permet d'obtenir **L6**, isolé sous la forme carboxylate de sodium avec un rendement de 94%.

2.2.3.3. synthèse du ligand L7

Afin de pouvoir comparer l'influence des différentes fonctionnalisations en position para de la pyridine centrale sur les propriétés optiques des complexes au complexe de base décrit dans la littérature, nous avons également préparé le ligand **L7**.³⁵ Les complexes issus de ce ligand nous serviront de référence. La synthèse du ligand **L7** se fait en deux étapes à partir du composé dibromé **20** suivant la méthode décrite précédemment (*Schéma 2.11*). La première étape est la réaction d'alkylation avec l'imino-di-*o*-acétate d'éthyle en présence de K_2CO_3 dans l'acétonitrile. Après purification, l'intermédiaire **29** est isolé avec un rendement de 54 %. La dernière étape est la saponification des esters éthyliques de **29** en présence de NaOH pour former le ligand **L7**, isolé sous sa forme carboxylate de sodium avec un rendement de 93 %.

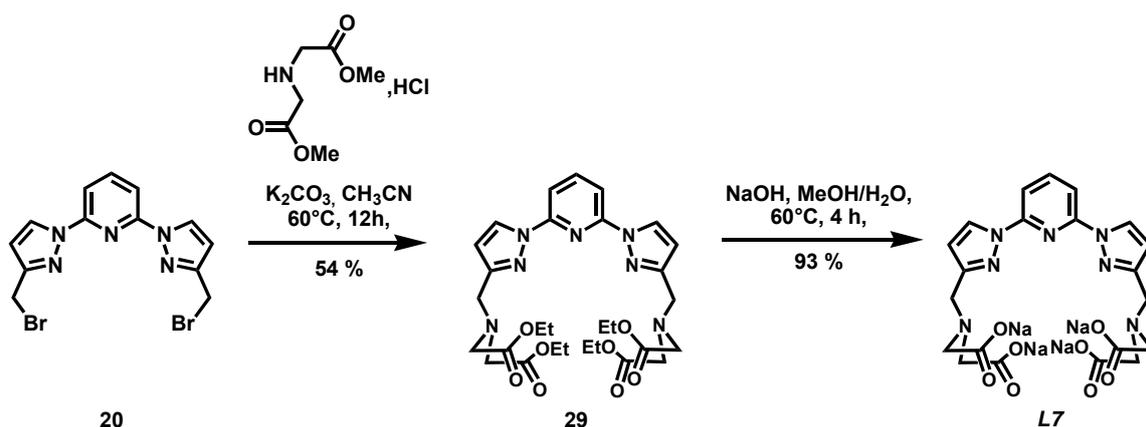


Schéma 2.11. Synthèse du ligand L7.

2.3. Les complexes de lanthanides

2.3.1. Synthèse des complexes

Les complexes de lanthanides sont tous préparés selon le même protocole. Les ligands sont mélangés avec 1,1 équivalents de sels de lanthanides ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$ et $TbCl_3 \cdot 6H_2O$). Les mélanges sont chauffés pendant 4 heures à 60 °C puis évaporés à sec. Les résidus sont dissous dans 0,5 mL d'une solution eau/méthanol (1/1) puis précipités par addition progressive d' Et_2O et de THF. Les rendements des réactions de complexation sont reportés dans le *Tableau 2.1*.

Tableau 2.1. Rendements des réactions de complexation .

	<i>L1</i>	<i>L4</i>	<i>L5</i>	<i>L6</i>	<i>L7</i>
Europium	quantitatif	92 %	92 %	81 %	85 %
Terbium	98 %	96 %	77 %	84 %	75 %

2.3.2. Etude photophysique des complexes

Les paramètres importants de cette étude sont ε_λ , ϕ_{H_2O} , ϕ_{D_2O} , τ_{H_2O} , τ_{D_2O} , et q représentant respectivement les coefficients d'extinction molaires à la longueur d'ondes λ du maximum d'absorption, les rendements quantiques de luminescence dans l'eau et dans l'eau lourde (D₂O), les temps de vie de luminescence dans l'eau et dans le D₂O, et le nombre d'hydratation du complexe calculé en utilisant les équations standards.

- Le coefficient d'extinction molaire ε

Le coefficient d'extinction molaire ε représente une constante intrinsèque d'un composé qui permet de déterminer la capacité d'un composé à absorber la lumière grâce à la loi de Beer-lambert (équation [1])

$$d.o. = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \times l \times c \quad \text{ou} \quad \varepsilon = \frac{d.o.}{l \times c} \quad [1]$$

L'absorbance, ou densité optique $d.o.$ d'un composé, est définie comme le logarithme du rapport des intensités lumineuses du rayon incident, noté I_0 , et du rayon transmit I au travers de l'échantillon à la longueur d'onde λ . L'absorbance est proportionnelle à la longueur l (en cm) du chemin optique parcourue par la lumière au sein de l'échantillon et à la concentration c (en M.L⁻¹) du composé au sein de l'échantillon.

- Le rendement quantique de luminescence ϕ

Le rendement quantique de luminescence d'un composé est défini comme le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés (équation [2])

$$\phi = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} \quad [2]$$

Les rendements quantiques de luminescence ont été calculés selon la procédure conventionnelle,⁴⁸ par comparaison avec des composés de référence dont les spectres d'émission couvrent le même domaine spectral que celui du composé étudié. Les références utilisées sont le [Ru(bipy)₃]Cl₂ dans l'eau non dégazée ($\phi = 2,8\%$)⁴⁹ et le crésyl violet dans le méthanol ($\phi = 55\%$)⁵⁰ pour les complexes d'euporium, la Rhodamine 6G (R6G) dans l'eau ($\phi = 76\%$)⁵⁰ et [TbL(H₂O)]Na.H₂O dans l'eau ($\phi = 31\%$)^{8c} pour les complexes de terbium. Le calcul des rendements de luminescence est donné par l'équation [3], dans laquelle n correspond à l'indice de réfraction du solvant, S à la surface de luminescence corrigée, A à l'absorbance, I_{λ}^0 à l'intensité incidente à la longueur d'onde λ et ϕ au rendement quantique (l'indice ref correspond aux valeurs de la référence).

$$\frac{\phi}{\phi_{ref}} = \frac{n^2}{n_{ref}^2} \times \frac{S}{S_{ref}} \times \frac{1-10^{-A_{ref}}}{1-10^{-A}} \times \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda_{ref}}^0} \quad [3]$$

En utilisant des solutions suffisamment diluées (densité optique < 0,05), et la fonction de correction de l'intensité du faisceau en fonction de la longueur d'onde d'excitation fournie par le constructeur du spectromètre, l'équation [3] peut se simplifier pour donner l'équation [4].

$$\frac{\phi}{\phi_{ref}} = \frac{n^2}{n_{ref}^2} \times \frac{S}{S_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A} \quad [4]$$

L'erreur estimée des rendements quantiques de luminescence est de $\pm 15\%$.⁵¹

- Durée de vie de luminescence τ et nombre d'hydratation q

Les temps de vie de luminescence de l'état émetteur des ions d'euporium et de terbium en solution aqueuse sont généralement longs, typiquement entre 0,1 et 2,0 ms pour l'euporium et 0,4 à 5,0 ms pour le terbium. Il est à signaler que ces temps de vies sont fortement influencés par la nature du ligand coordonné au lanthanide. Les mesures des temps de vie dans l'eau (τ_{H_2O}) et dans le D₂O (τ_{D_2O}) sont des paramètres importants car ils déterminent la capacité d'un ligand à protéger l'ion lanthanide de son environnement. En solution aqueuse, l'altération de la luminescence des ions lanthanides peut être observée. Cette désactivation est générée par un phénomène oscillatoire dû aux molécules d'eau pouvant être coordonnées

⁴⁸ Haas, Y.; Stein, G.; *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 3668.

⁴⁹ Nakamaru, K.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1982**, 55, 2697.

⁵⁰ Olmsted, J.; *J. Phys. Chem.*, **1979**, 83, 2581.

⁵¹ Valeur, B. in *Molecular Fluorescence*; Wiley: Weinheim, **2002**, p 161.

directement au lanthanide, en particulier pour les oscillateurs O-H présents dans les molécules d'eau.⁵² Ce phénomène non radiatif provoque le dépeuplement des états excités luminescents du lanthanide. La désactivation vibrationnelle est beaucoup moins efficace lorsque les oscillateurs O-H sont remplacés par des oscillateurs O-D.⁵³ Ainsi, le nombre d'hydratation q , correspondant au nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination peut être déterminé grâce à l'équation [5] développée par Horrocks et Sundnick.⁵²

$$q_{H_2O} = A \times \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) \quad [5]$$

Dans cette équation A représente la sensibilité du lanthanide à être désactivé par ces oscillateurs O-H. Cependant cette équation tient compte de l'ensemble des molécules d'eau coordonnées au lanthanide, sans distinction entre la première et seconde sphère de coordination. La contribution des oscillateurs en seconde sphère peut être prise en compte pour la détermination du nombre d'hydratation. L'équation [5] doit être modifiée pour donner l'équation [6].^{54, 55}

$$q_{H_2O} = A \times \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - B \right) \quad [6]$$

Dans cette équation A représente la sensibilité du lanthanide à être désactivé par ces oscillateurs O-H, le terme B est un terme correcteur correspondant à la contribution des oscillateurs O-H présents en deuxième sphère de coordination. Le *Tableau 2.2* donne les valeurs de A et de B données dans la littérature.

Tableau 2.2. Valeurs des constantes A et B dans le cas des complexes d'euprimum et de terbium.

Auteurs	Eu		Tb	
	A	B	A	B
Horrocks et Sudnick ⁵²	1,05	—	4,2	—
Parker <i>et al.</i> ⁵⁴	1,2	0,25	5	0,06
Horrocks et Supkowski ⁵⁵	1,11	0,31	—	—

⁵² a) Horrocks, W. DeW; Sudnick, D. R.; *Acc. Chem. Res.*, **1981**, *14*, 384. b) Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 334.

⁵³ Stein, G.; Würzberg, E.; *J. Chem. Phys.*, **1975**, *62*, 208.

⁵⁴ 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.

⁵⁵ Supkowski, R. M.; Horrocks, W. D. W.; *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, *340*, 44.

- Propriétés photophysiques des complexes

Les travaux antérieurs³⁵ sur les complexes d'euprium et de terbium formés à partir du ligand bispyrazolypyridine **L7** nous ont servi de référence pour notre étude. Seule la substitution en position para de la pyridine varie en fonction de la nature du ligand. Ainsi par comparaison, nous avons pu mettre en évidence les effets des différentes fonctionnalisations en position para de la pyridine sur les propriétés photophysiques des complexes.

La *Figure 2.7* représente la superposition des spectres d'absorption UV/Visible et d'émission des complexes **LnL7** (Ln = Eu et Tb).

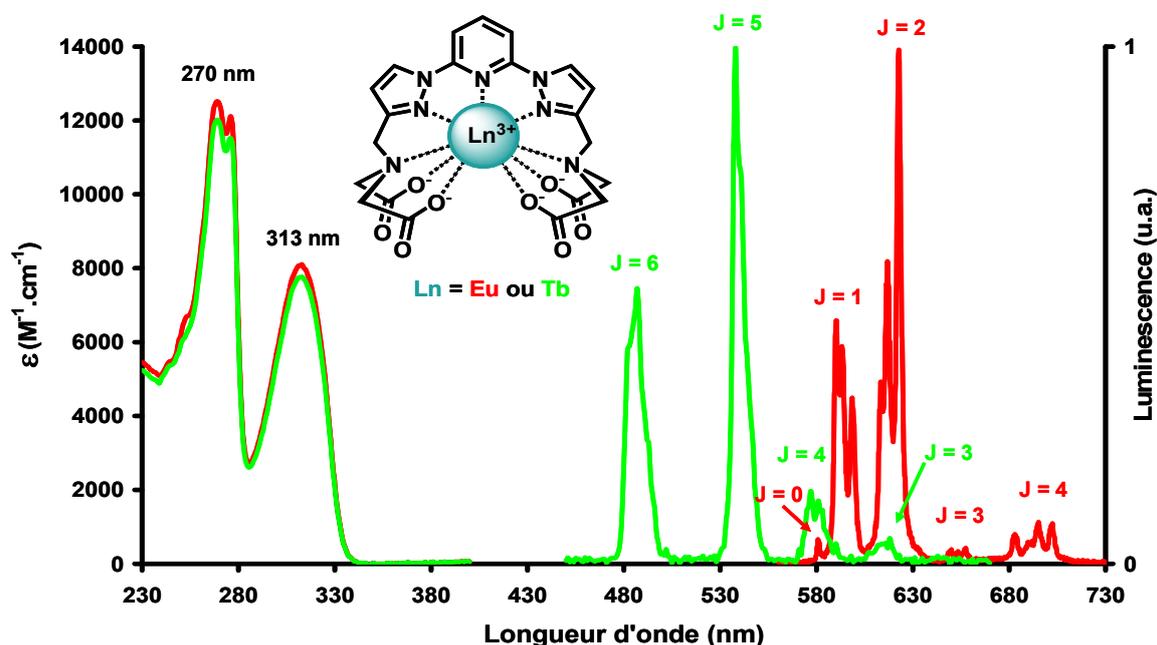


Figure 2.7. Spectres d'absorption UV/Visible et d'émissions des complexes TbL7 et EuL7.

Les spectres d'absorption de ces complexes présentent des bandes d'absorption intense autour de 270 nm ($\epsilon_{270\text{nm}} = 12000$ M⁻¹.cm⁻¹) et une bande à 313 nm ($\epsilon_{313\text{nm}} = 8000$ M⁻¹.cm⁻¹), caractéristiques du chromophore bispyrazolypyridine complexé aux lanthanides. L'excitation dans la bande de plus basse énergie ($\lambda_{\text{exc}} = 313$ nm) permet d'obtenir les spectres d'émission caractéristiques de l'euprium avec les transitions électroniques $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ (J = 0 à 4), et du terbium avec les transitions électroniques $^5D_4 \rightarrow ^7F_J$ (J = 3 à 6).

Les données spectroscopiques sont celles données par Brunet *et al.*³⁵ et sont résumées dans le *Tableau 2.3*.

Tableau 2.3. Propriétés d'absorption et d'émission des complexes TbL7 et EuL7 mesurées en solution aqueuse.³⁵

Complexe de lanthanide	Absorption		Emission				
	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ (ms)		$\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ (%)	q	
			H ₂ O	D ₂ O			
EuL7	270	12300	1,3	2,45	13	0,4 ^a	0,2 ^b
	313	8100					
TbL7	270	11200	2,73	3,30	60	0,3 ^a	0,0 ^b
	313	7800					

a) calculé selon Horrocks et Sudnick⁵², b) calculé selon Parker et al.⁵⁴

A partir de ces données nous avons pu comparer les propriétés photophysiques des complexes d'euprium et de terbium préparés avec les ligands **L1**, **L4**, **L5** et **L6**. Les données photophysiques sont résumées dans le Tableau 2.4. Ces complexes présentent des spectres d'absorption UV/Visible similaires à ceux observés par Brunet *et al.*³⁵ (Figure 2.8). Pour un même ligand, la nature du lanthanide complexé n'influe pas sur la position des bandes d'absorption.

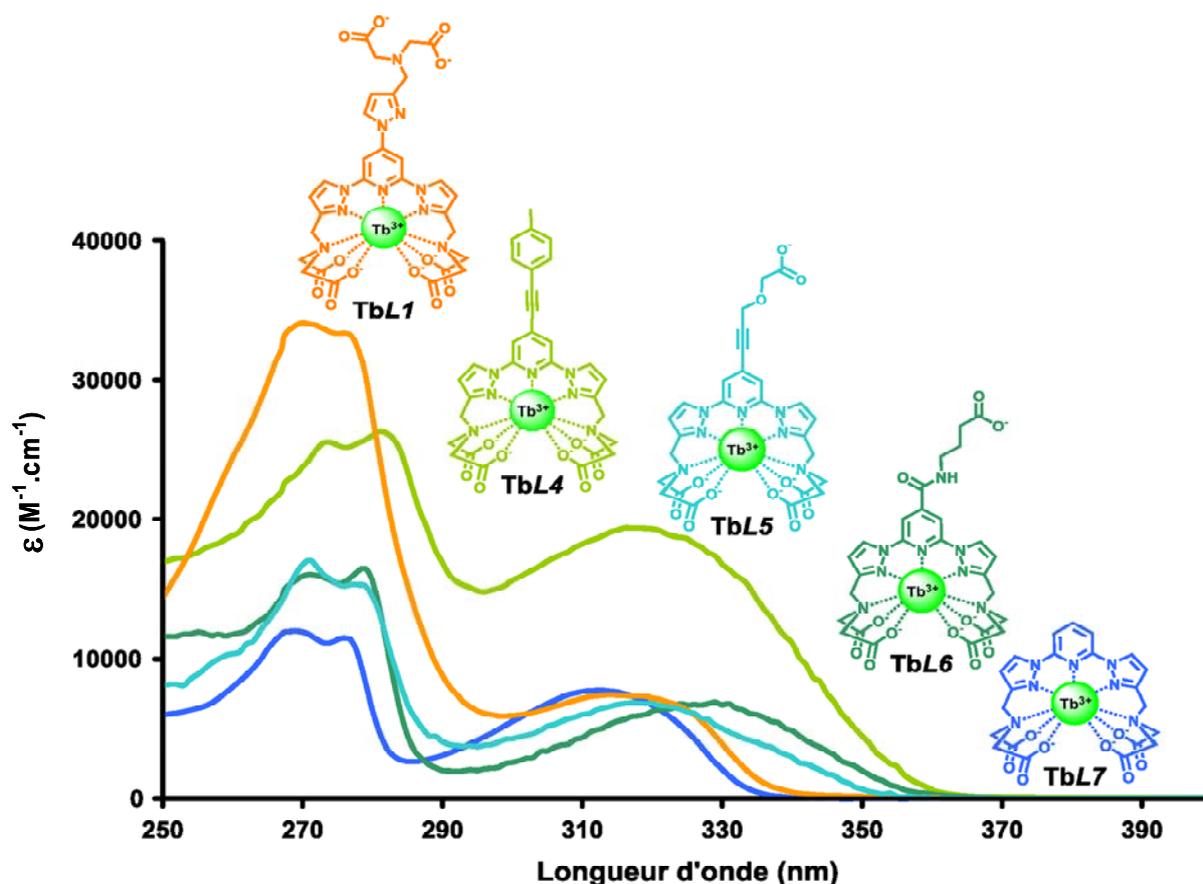
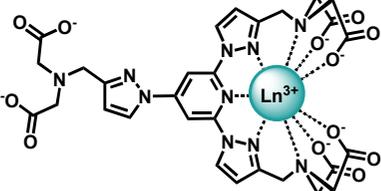
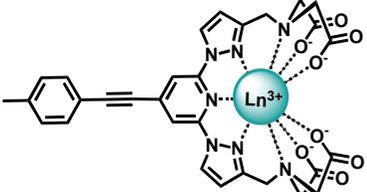
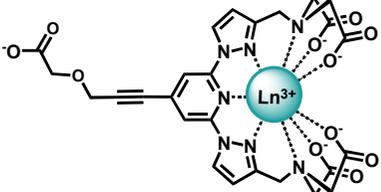
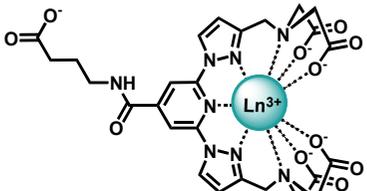


Figure 2.8. Superposition des spectres d'absorption UV/Visible des complexes TbL1, TbL4, TbL5, TbL6 et TbL7 dans l'eau ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ M, tampon tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).

Tableau 2.4. Propriétés photophysiques des complexes en solution aqueuse.

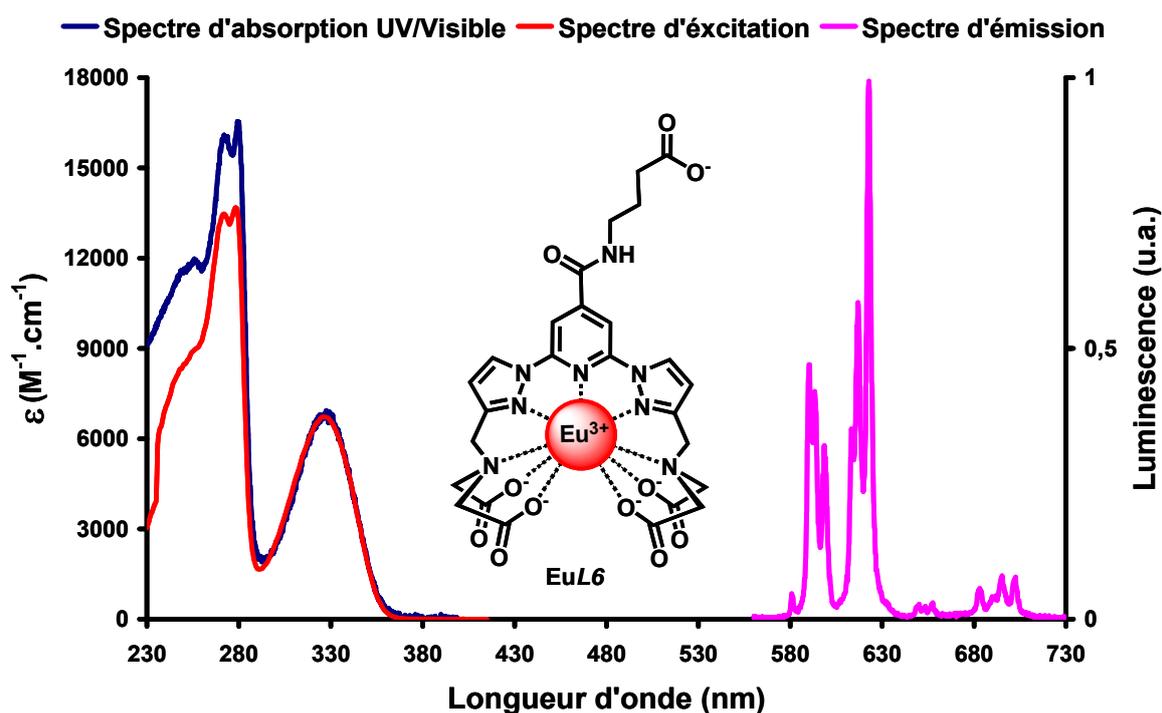
Complexes de lanthanide	Absorption		Emission					
	λ_{abs} (nm)	ε ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ (ms)		ϕ (%)		q	
			H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O		
	EuL1	273 317	30700 6600	0,99	2,03	4,5 ^a	10 ^a	0,5 ^c ; 0,3 ^d ; 0,2 ^e
	TbL1	273 317	30000 6600	1,58	3,06	13 ^b	28 ^b	1,3 ^c ; 1,2 ^d
	EuL4	273 318	18500 20300	1,3	2,4	15 ^a	32 ^a	0,4 ^c ; 0,1 ^d ; 0 ^e
	TbL4	273 318	25500 19200	1,3	2,2	3,4 ^b	6,1 ^b	-
	EuL5	269 318	15700 6500	1,4	2,4	4,5 ^a	6,2 ^a	0,3 ^c ; 0 ^d ; 0 ^e
	TbL5	269 318	17500 6800	2,5	3	19 ^b	22 ^b	0,3 ^c ; 0,3 ^d
	EuL6	271 327	16000 6600	1,4	2,5	12 ^a	32 ^a	0,3 ^c ; 0,1 ^d ; 0 ^e
	TbL6	271 327	16000 6900	2,8	3,1	94 ^b	≈ 100 ^b	0,3 ^c ; 0 ^d

a) mesuré par rapport au $[\text{Ru}(\text{Bipy})_3]\text{Cl}_2$ ⁴⁹, b) mesuré par rapport à R6G⁵⁰, c) calculé selon Horrocks et Sudnick⁵², d) calculé selon Parker et al.⁵⁴, e) calculé selon Horrocks et Supkowski⁵⁵

Les bandes d'absorption intenses autour 270 nm sont faiblement déplacées ($\Delta_{\lambda_{abs}} \approx \pm 3$ nm) par l'introduction d'une fonction en position para de la pyridine centrale, cependant la bande d'absorption située à 313 nm sur les complexes modèles **LnL7**, présente un déplacement bathochrome remarquable (de 4 à 14 nm vers les basses énergies) en fonction de la fonctionnalisation en position para de la pyridine.

De manière générale dans les complexes fonctionnalisés, les bandes d'absorptions autour de 270 nm sont plus intenses que dans le cas des complexes modèles **LnL7** ($\epsilon_{270nm} = 12000$ $M^{-1}.cm^{-1}$). Pour les complexes **LnLI**, ces bandes sont beaucoup plus importantes ($\epsilon_{273nm} = 30000$ $M^{-1}.cm^{-1}$), ce qui est dû à la somme de l'absorption du chromophore bispyrazolypyridine et de l'absorption du troisième groupement pyrazole.

Pour les complexes **LnL4**, on observe une augmentation importante de l'absorption de la bande de plus faible énergie ($\epsilon_{318nm} \approx 20000$ $M^{-1}.cm^{-1}$), ceci est dû à l'addition de l'absorption du chromophore bispyrazolypyridine et de l'absorption de l'entité tolylacétylène.



*Figure 2.9. Spectre d'absorption UV/Visible, d'excitation ($\lambda_{em} = 615$ nm) et d'émission ($\lambda_{exc} = 327$ nm, résolution = 5 Å, filtre passe haut 390 nm) pour le complexe **EuL6** en solution ($c = 5.10^{-5}$ M, tampon tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).*

La *Figure 2.9* représente la superposition des spectres absorption UV/Visible, d'émission ($\lambda_{exc} = 327$ nm) et d'excitation ($\lambda_{em} = 615$ nm) pour le complexe **EuL6**. Pour chacun des complexes, l'excitation dans la bande d'absorption de plus basse énergie permet d'obtenir leurs spectres d'émission du lanthanide utilisé. Les spectres d'excitation obtenus pour une

émission à $\lambda = 615$ nm dans le cas des complexes d'euporium et pour une émission à $\lambda = 545$ nm pour les complexes de terbium sont superposables aux spectres d'absorption, ce qui traduit le fait que l'émission observée à partir de l'euporium ou du terbium provient bien d'un transfert d'énergie de l'état excité du ligand vers les états excités luminescents des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} .

Les complexes d'euporium présentent tous des propriétés de luminescence attendues, les temps de vie dans l'eau s'échelonnent de 1 ms à 1,4 ms, la décroissance de la luminescence est mono-exponentielle pour chacun des complexes, ce qui suggère la présence d'une seule espèce en solution. Les valeurs des rendements quantiques sont comprises entre 4,5 % et 15 % dans l'eau. Le calcul du nombre d'hydratation q montre l'absence de molécule d'eau en première sphère de coordination, caractéristique d'une bonne protection du lanthanide par les ligands.

Les complexes de terbium présentent dans l'ensemble des résultats variables. Les complexes **TbL1** et **TbL4** présentent des temps de vie inférieurs à 2 ms. Le calcul du nombre d'hydratation indique la présence d'une molécule d'eau en première sphère de coordination.

Le complexe **TbL4** présente un rendement quantique dans l'eau très inattendu (3,4 %). Ce faible rendement quantique peut être expliqué par un de transfert d'énergie en retour,⁵⁶ du terbium vers le ligand (*Figure 2.10*). En effet, lorsque l'état triplet T^1 centré sur le ligand est proche en énergie de l'état émetteur du lanthanide, un transfert d'énergie de l'état émetteur du lanthanide vers l'état triplet T^1 peut avoir lieu à température ambiante, conduisant à la desexcitation non radiative du ligand (vibrations) et une baisse de la luminescence du lanthanide.

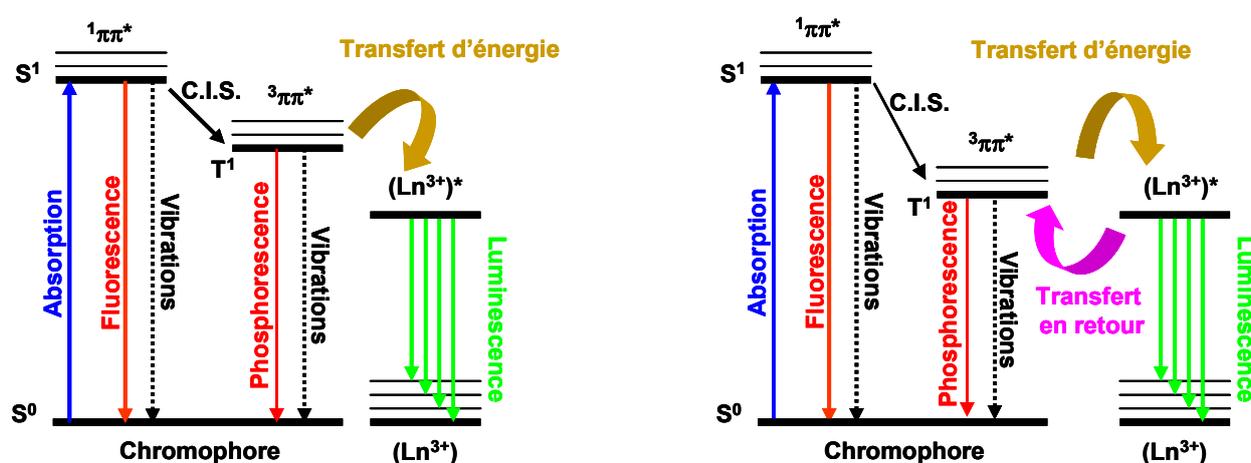


Figure 2.10. Diagramme d'énergie favorisant un transfert d'énergie de l'antenne vers le lanthanide (gauche) et favorisant un transfert d'énergie de l'antenne vers le lanthanide, puis un transfert d'énergie en retour du lanthanide vers l'antenne (droite).

⁵⁶Charbonnière, L. J.; Balsiger, C.; Schenk, K. J.; Bünzli, J.-C. G.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 505.

Ce phénomène est particulièrement observé dans le cas du terbium. La détermination du nombre d'hydratation en cas de transfert en retour ne peut pas être faite.

Le complexe **TbL5**, contrairement au complexe **TbL4** possède de bonnes propriétés photophysiques aussi bien au niveau du temps de vie (2,5 ms dans l'eau) qu'au niveau du nombre d'hydratation ($q = 0,3$) ou au niveau du rendement quantique (19 %). Le dernier complexe de terbium, **TbL6** présente, pour sa part, des propriétés photophysiques exceptionnelles, avec un temps de vie dans l'eau de 2,8 ms et un rendement quantique de 94 %. Le calcul du nombre d'hydratation montre l'absence de molécule d'eau en première sphère de coordination. A l'issue de cette étude, le complexe **TbL6** semble posséder tous les critères requis pour le marquage de matériel biologique.

Cependant, avant les essais de marquages biologiques, l'étude des propriétés thermodynamiques des complexes doit être faite afin de confirmer la stabilité des complexes en milieu biologique.

2.3.3. Etudes des propriétés thermodynamiques des complexes

Cette étude a été nécessaire pour déterminer plusieurs constantes thermodynamiques des complexes de lanthanides formés avec la poche de complexation bispyrazolylpyridine. Les constantes visées sont les constantes de protonation et les constantes de stabilité du ligand **L7** et des complexes de lanthanides **LnL7**. Cette étude est importante car elle met en évidence la stabilité des complexes en milieu biologique. Dans un premier temps, les dosages en spectroscopie UV/Visible du complexes **TbL7** en présence d'EDTA et d'ions phosphates ont permis d'évaluer la constante de stabilité du complexe. Par la suite, une étude potentiométrique en collaboration avec l'équipe du Dr. Carlos Platas-Iglesias⁵⁷ a été effectuée sur les complexes **LnL7** (Ln = La, Nd, Eu, Ho, et Lu) pour déterminer les valeurs des constantes de protonation du ligand et des constantes de stabilité des complexes. La structure des complexes en solution a également été modélisée dans le cadre de cette collaboration.

2.3.3.1. Etude de la stabilité par dosage en spectroscopie UV/Visible

La stabilité de la poche bispyrazolylpyridine vis-à-vis des ions lanthanides a été déterminée sur le complexe **TbL7**. Ce dosage permet de quantifier la décomplexation du terbium par fluorométrie. L'idée de ce dosage est d'utiliser des agents pouvant entrer en compétition avec le ligand **L7** dans le mécanisme de complexation. Le premier agent envisagé

⁵⁷ Mato-Iglesias, M.; Rodriguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.; Starck, M.; Kadjane, P.; Ziessel, R.; Charbonnière, L.; *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 1507.

est l'EDTA, dont l'affinité avec les lanthanides est bien connue.⁵⁸ Nous avons étudié l'évolution de l'absorption UV/Visible du complexe **TbL7** en présence de quantités variables d'EDTA au cours du temps. L'affinité des lanthanides avec des ligands phosphonates a également été reportée dans la littérature,⁵⁹ l'étude de l'évolution de l'absorption UV/Visible du complexe **TbL7** dans le tampon phosphate 0,1 M a été ensuite réalisée.

- Etude de la stabilité dans le tampon Tris-HCl 0.01 M avec des proportions variables d'EDTA :

La solution est une solution de **TbL7** ($c = 6.00 \times 10^{-5}$ M) dans un tampon de Tris-HCl 0,01 M, pH = 7,0 ($\tau = 2,72$ ms). Des solutions contenant des concentrations variables d'EDTA (0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 100 équivalents, pH = 7,0) ont été préparées. Le suivi de l'absorption UV/Visible du complexe **TbL7** dans les différentes solutions a été fait quelques minutes après l'addition d'EDTA et après 3 jours.

Juste après le mélange (*Figure 2.11*), l'influence de l'EDTA est significative pour les fortes concentrations (de 1 à 100 équivalents). Les bandes d'absorption à $\lambda = 313$ nm, 273 nm et 269 nm, correspondant à l'absorption du complexe, se déplacent vers $\lambda = 300$ nm, 245 nm et 239 nm respectivement, ce qui correspond aux bandes d'absorption du ligand libre.³⁵

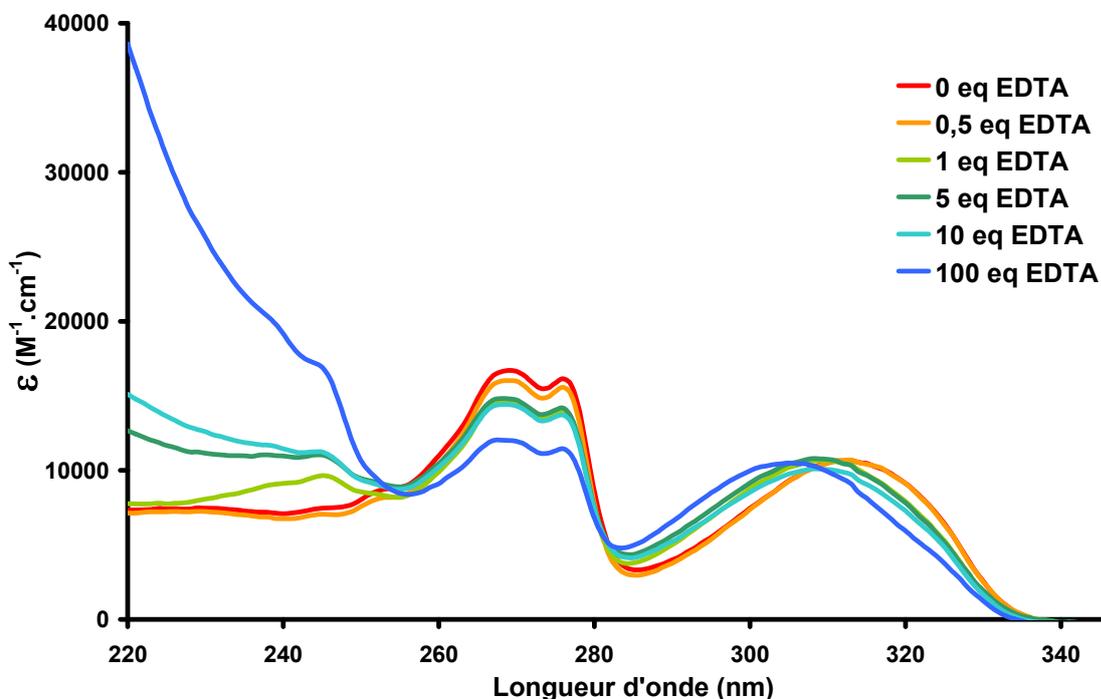


Figure 2.11. Évolution de l'absorption de la solution du complexe TbL7 ($c = 6.00 \times 10^{-5}$ M, dans le tampon Tris/HCl, 0.01 M, pH = 7,0) en fonction de la concentration en EDTA juste après le mélange.

⁵⁸ a) Caravan, P.; Hedlund, T.; Liu, S.; Sjoeborg, c. S.; Orvig, C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 11230. b) Chapon, D.; Morel, J.-P.; Delangle, P.; Gateau, C.; Pecaut, J.; *Dalton Trans.*, **2003**, 2745. c) Lacoste, R. G.; Christoffers, G. V.; Martell, A. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 2385.

⁵⁹ Nash, K. L.; Horwitz, E. P.; *Inorg. Chim. Acta*, **1990**, *169*, 245.

A partir de 3 jours (Figure 2.12), pour des concentrations comprises entre 5 et 100 équivalents en EDTA, les bandes d'absorptions du ligand libre s'affinent et augmentent en intensité. Au delà de 3 jours, pour ces concentrations en EDTA, le système n'évolue plus. Le complexe est totalement dissocié. L'équilibre est donc atteint au bout de 3 jours.

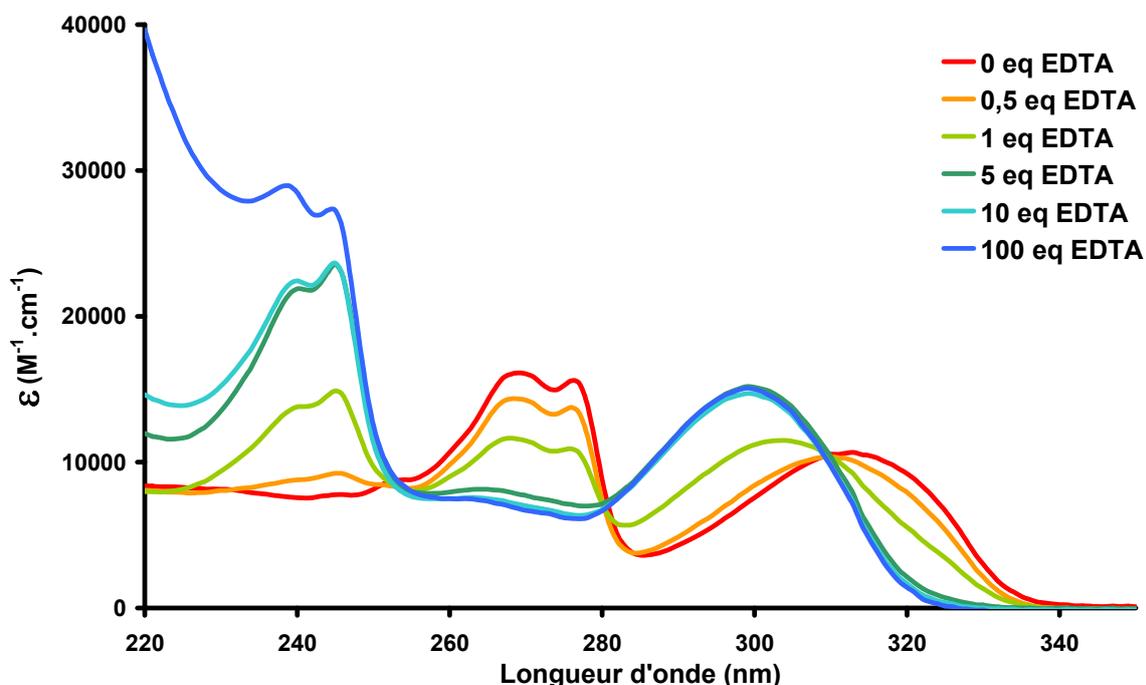


Figure 2.12. Évolution de l'absorption de la solution du complexe TbL7 ($c = 6.00 \times 10^{-5} M$, dans le tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0) en fonction de la concentration en EDTA après 3 jours.

Pour chaque ajout d'EDTA, les spectres UV/Visible permettent de déterminer de la concentration [ML] en complexe présent dans les solutions ainsi que la concentration [L] en ligand libre résultant de cette décomplexation, ce qui permet de calculer le pourcentage de dissociation à l'équilibre (Tableau 2.5).

Tableau 2.5. Evolution des concentrations en complexe [ML] et en ligand libre [L] à $t = 3$ jours.

EDTA	$d.o._{313}$	$[ML]_0 / \text{mol.L}^{-1}$	$[ML] / \text{mol.L}^{-1}$	$[L] / \text{mol.L}^{-1}$	% dissociation
0	0.633	6.00×10^{-5}	6.00×10^{-5}	0	0
0.5	0.598	5.98×10^{-5}	4.85×10^{-5}	1.13×10^{-5}	19.0
1	0.544	5.96×10^{-5}	3.36×10^{-5}	2.60×10^{-5}	43.6
5	0.46	5.83×10^{-5}	1.27×10^{-5}	4.55×10^{-5}	78.1
10	0.424	5.66×10^{-5}	5.91×10^{-6}	5.07×10^{-5}	89.6
100	0.267	3.75×10^{-5}	0	3.75×10^{-5}	100.0

A l'équilibre, pour 1 équivalent d'EDTA, on observe environ 50 % de dissociation. La constante de stabilité du complexe est donc proche voire identique à celle d'un complexe

EDTA-Tb dans ces conditions de pH et de salinité ce qui correspond à $\log(K_{EDTA-Tb}) \approx 16,5$.⁶⁰

- Etude de la stabilité du complexe dans le tampon Phosphate 0.1 M:

L'évolution de l'absorption UV/Visible du complexe **TbL7** ($C = 4,45 \cdot 10^{-5}$ M) dans le tampon phosphate 0.1 M à pH 7.0 a été mesurée (Figure 2.13). Le spectre UV/Visible de la solution de **TbL7**, à $t = 0$, montre les bandes caractéristiques du complexe mais également celles du ligand libre. Il semble que le complexe se dissocie partiellement dans le tampon phosphate 0,1 M.

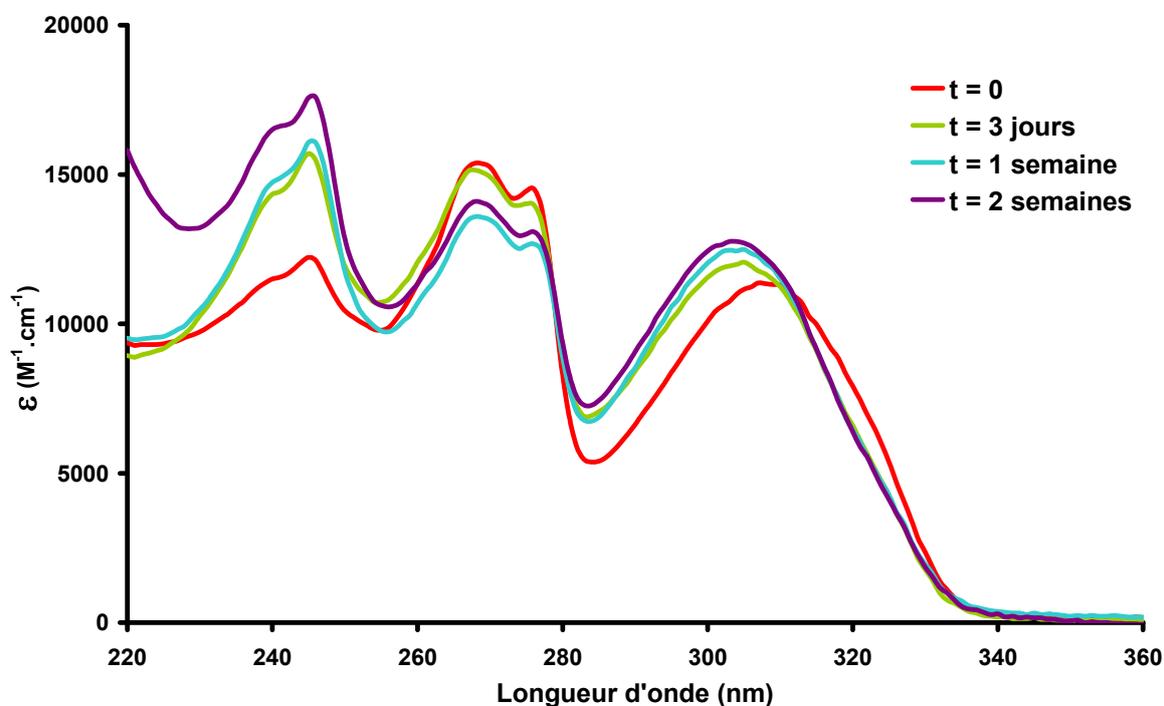


Figure 2.13. Evolution de l'absorption UV/Visible du complexe **TbL7**, $c = 4,45 \cdot 10^{-5}$ M, dans le tampon phosphate 0.1 M (pH = 7.0) au cours du temps.

2.3.3.2. Etude potentiométrique

Ces travaux réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Carlos Platas-Iglesias⁵⁷ ont permis de compléter l'étude de la stabilité des complexes avec la poche bispyrazolylpyridine. La stabilité thermodynamique d'un complexe métallique K_{ML} est donnée par l'équation [7] :

⁶⁰ Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; Smith, R. M.; *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*, version 8.0 for windows, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program : Gaithersburg, MD, 2004.

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad [7]$$

où [M], [L], et [ML] sont les concentrations à l'équilibre de l'ion métallique, du ligand déprotoné et du complexe respectivement. A faible pH, la protonation du complexe doit être prise en compte. Cette protonation est caractérisée par la constante de protonation du complexe K_{MH_iL} , exprimé par l'équation [8] :

$$K_{MHL} = \frac{[MH_iL]}{[MH_{i-1}L][H^+]} \text{ avec } i=1, 2, \dots \quad [8]$$

Pour calculer la constante de stabilité des complexes, la constante de protonation du ligand K_i est également nécessaire (équation [9]) :

$$K_i = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad [9]$$

Les constantes de protonation du ligand **L7** ainsi que les constantes de stabilité des complexes formés avec différents lanthanides (Ln = La, Nd, Eu, Ho, et Lu) ont été obtenues par dosage potentiométrique sur une gamme de pH comprise entre 2 et 12. Les constantes et leur déviation standard sont résumées dans le *Tableau 2.6*

Tableau 2.6. Constantes de protonation de **L7** et de l'EDTA, constantes de stabilités et valeurs de pM^a des complexes d'ions Ln^{3+} (Ln = La, Nd, Eu, Ho et Lu, 25 °C, I = 0,1 M (KCl)). La valeur entre parenthèses correspond à la déviation standard.

	L7	EDTA ⁶⁰		L7	EDTA
log K_1	9,42(6)	10,17	pLa	12,8	13,6
log K_2	7,96(5)	6,11	pNd	14,3	14,7
log K_3	2,70(6)	2,68	pEu	14,4	15,5
log K_4	2,02(5)		pHo	14,9	16,8
			pLu	13,7	18,0
log K_{LaL7}	14,56(9)	15,46			
log K_{LaHL7}	3,93(2)				
log K_{NdL7}	16,03(1)	16,56			
log K_{NdHL7}	3,22(1)				
log K_{EuL7}	16,18(2)	17,32			
log K_{EuHL7}	3,68(2)				
log K_{HoL7}	16,68(2)	18,60			
log K_{HoHL7}	3,44(2)				
log K_{LuL7}	15,42(2)	19,80			
log K_{LuHL7}	3,84(2)				

a) Valeurs de pM définies par $pM = -\log[M]_{libre}$; $pH = 7,4$ pour $[M^{III}] = 1 \mu M$, $[L7] = 10 \mu M$

- Constantes de protonation du ligand L7

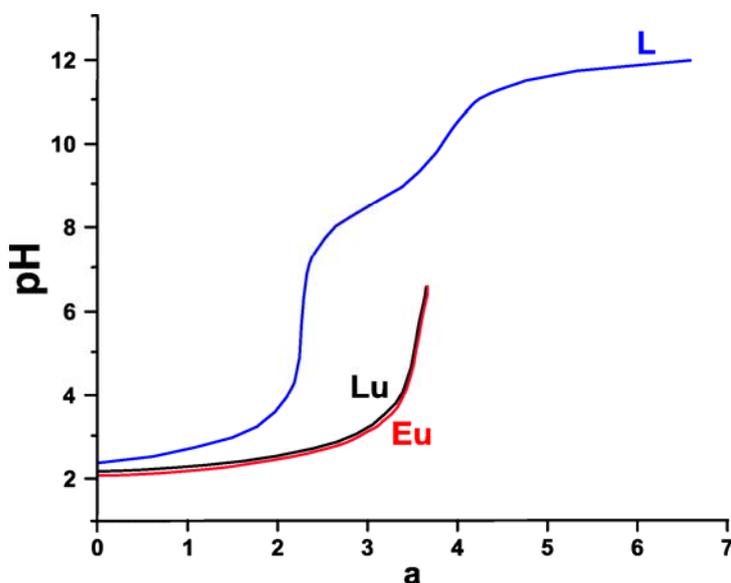


Figure 2.14. Courbe expérimentale de dosage potentiométrique du ligand L7 avec et sans ions lanthanides. « a » correspond au nombre d'équivalent de OH⁻ par nombre d'équivalent de ligand.

La courbe potentiométrique du ligand indique deux sites acides forts et deux sites acides faibles (Figure 2.14). Les données du Tableau 2.6 montrent que pour un pH inférieur à 3,7 deux protons ont été dosés, pour la zone de pH comprise entre 3,7 et 8,5, un proton a été détecté, et un quatrième proton est présent dans la zone de pH comprise entre 8,5 et 10,5.

En comparaison avec l'EDTA,⁶⁰ la première constante de protonation ($\log K_1$) est plus faible, alors que la deuxième constante ($\log K_2$) est plus importante. Pour le ligand L7, les deux premiers pK sont attribués respectivement à la protonation des deux amines tertiaires. Dans le cas de l'EDTA, la proximité des deux amines rend la seconde protonation plus difficile du fait de la répulsion électrostatique des deux protons. Pour L7, l'éloignement des deux amines conduit à une répulsion plus faible, et la seconde protonation est moins influencée par la première. Le second pK est alors plus élevé que celui de l'EDTA. La comparaison des constantes de protonation du ligand avec celles de l'EDTA suggère que les troisième et quatrième constantes de stabilité correspondent à la protonation des groupes carboxylates.

- Constantes de protonation et de stabilité des complexes LnL7

Le dosage potentiométrique a été également réalisé en présence d'une quantité équimolaire d'ion Ln³⁺ dans le but de déterminer les constantes de stabilité des complexes. La courbe du dosage avec les ions (mélange équimolaire Ln³⁺/ligand) (Figure 2.14) montre un point d'inflexion pour $a = 4$ ($a =$ mole de HO⁻ par mole de ligand), tel qu'on l'espérait pour la

formation de l'espèce $[\text{LnL7}]^-$. La forme mono-protonée des complexes a été détectée au-delà de la zone de pH étudiée pour l'ensemble des ions Ln^{3+} . Le diagramme de distribution des espèces pour le complexe d'Europium (*Figure 2.15*) montre la présence du complexe mono-protoné en solution pour un pH inférieur à 6, puis la dissociation du complexe apparaît en dessous de $\text{pH} = 4$.

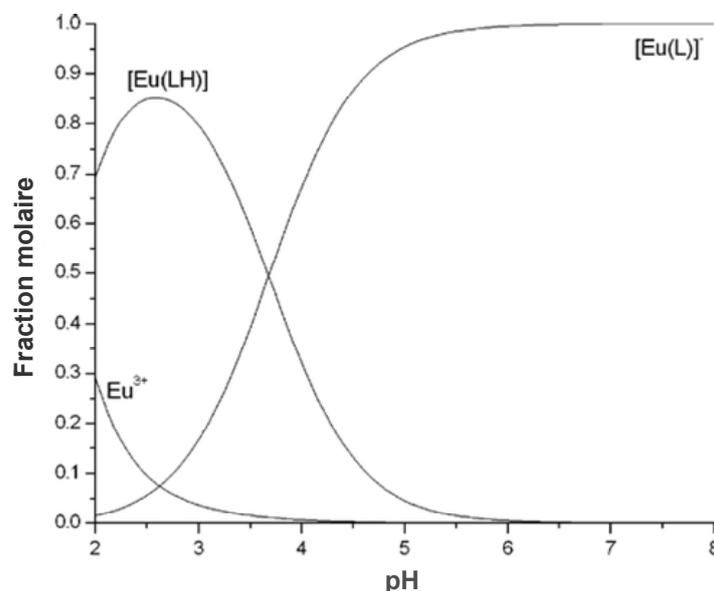


Figure 2.15. Diagramme de distribution des espèces pour le système EuL7 , 1:1 $\text{Eu}^{\text{III}}/\text{L7}$; $[\text{Eu}^{\text{III}}] = 3 \text{ mM}$, $\mu = 0,1 \text{ M (KCl)}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Les valeurs de $\log K_{\text{ML}}$ obtenues pour les complexes LnL7 (*Tableau 2.6*) augmentent le long de la série des lanthanides de La^{III} à Ho^{III} ($\Delta \log K_{\text{ML}} = \log K_{\text{HoL7}} - \log K_{\text{LaL7}} = 2,08$) puis décroissent de Ho^{III} à Lu^{III} ($\Delta \log K_{\text{ML}} = \log K_{\text{HoL7}} - \log K_{\text{LuL7}} = 1,26$), alors que les valeurs de $\log K_{\text{MHL}}$ restent constantes le long de la série des lanthanides. La *Figure 2.16* illustre l'évolution de la stabilité des complexes de lanthanides LnL7 .

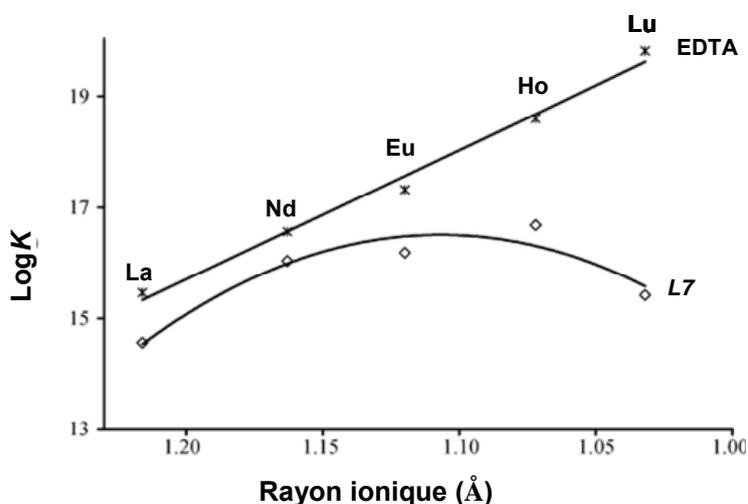


Figure 2.16. Évolution des constantes de stabilité des complexes LnL7 (valeurs de $\log K_{\text{ML}}$) pour le ligand L7 et pour l'EDTA en fonction du rayon ionique des cations lanthanides.

Les constantes de stabilité augmentent le long de la série des lanthanides puis atteignent un plateau, et finalement diminuent. Les valeurs de $\log K_{ML}$ obtenues pour les complexes avec les plus gros ions lanthanides étudiés ($Ln = La, Nd$ et Eu) sont légèrement inférieures à celles déterminées pour les complexes d'EDTA alors que pour le complexe de Lu^{III} , le complexe d'EDTA est nettement plus stable. L'augmentation de la stabilité des complexes de lanthanide souvent observée le long de la série est attribuée à l'augmentation de la densité de charge des ions métalliques. Ainsi, le profil de la stabilité des complexes de **LnL7** observé suggère une meilleure affinité entre les sites coordinants proposés par la structure du ligand et les sites de coordination nécessaires pour les plus gros ions lanthanides, ce qui se traduit par cette forte diminution de stabilité pour les ions lanthanides plus petits, comparé à l'EDTA, qui est plus flexible et peut s'adapter aux ions de petite taille.

Les constantes de stabilité thermodynamiques seules ne sont pas suffisantes pour comparer les différentes stabilités des complexes en milieu physiologique. De plus, la comparaison des constantes de stabilité des complexes avec différentes stœchiométries est dénuée de sens. Afin d'avoir une idée plus réaliste de la stabilité des complexes, les constantes de stabilité conditionnelles, ou encore les valeurs de pM , doivent être prises en compte. Les valeurs de pM sont définies par $pM = -\log[M]_{libre}$ et ont été calculées pour un $pH = 7,4$, pour $[M^{III}] = 1\mu M$, $[L] = 10\mu M$. Ces valeurs ont été comparées à celles obtenues avec les complexes d'EDTA (*Tableau 2.6*). Les données montrent que les valeurs de pM des complexes **LnL7** sont légèrement inférieures à celles des complexes d'EDTA pour les ions lanthanides les plus larges (La, Nd , et Eu), alors que pour les ions les plus petits, les valeurs de pM calculées indiquent clairement que les complexes **LnL7** sont moins stables que leurs équivalents avec l'EDTA.

2.3.3.3. Structure moléculaire des complexes en solution

Brunet *et al.*³⁵ ont utilisé les mesures de temps de vie de luminescence pour déterminer le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination q sur les complexes **EuL7** et **TbL7**. Ils ont pu déterminer qu'il n'y a pas de molécule d'eau en première sphère de coordination des lanthanides ($0,1 < q < 0,2$ pour le complexe d'euporium et $0,0 < q < 0,1$ pour le complexe de terbium). Les calculs DFT effectués par l'équipe du Dr. Platas-Iglesias⁵⁷ montrent une conformation avec un minimum d'énergie pour une symétrie C_2 dans laquelle les 9 sites de coordination de l'ion Ln^{3+} sont directement liés aux 9 atomes donneurs disponibles sur le ligand (*Figure 2.17*). Les calculs prévoient que les cycles

pyrazoles sont légèrement hors du plan de la pyridine ($15,4^\circ$ - $16,2^\circ$ obtenu à partir de la géométrie moléculaire optimisée en solution aqueuse) afin de réduire l'encombrement stérique des protons H-2 et H-4.

Deux des groupements acétates sont placés très nettement au-dessus et en-dessous du plan de l'unité tridentate bispyrazolylpyridine, les deux groupements acétates restants sont situés légèrement au dessus et en-dessous de ce même plan. La conformation adoptée par les quatre bras acétates induit une chiralité des complexes $[\text{LnL7}]$, et deux formes énantiomériques des complexes sont possibles, de configurations absolues Δ ou Λ .⁶¹

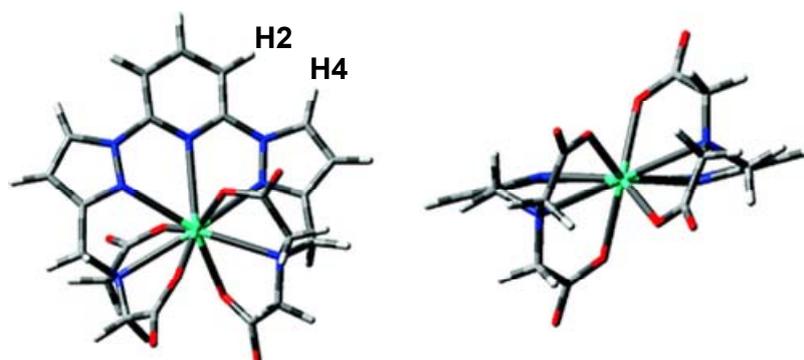


Figure 2.17. Structure du ligand L7 et deux vues de la configuration d'énergie minimum pour le système $[\text{EuL7}]$ obtenues par les calculs sur le model B3LYP/6-31G(d)⁶² en solution aqueuse.

Les longueurs de liaisons calculées entre l'ion lanthanide et les atomes donneurs du ligand diminuent le long de la série des lanthanides (Tableau 2.7), tel que cela peut être généralement observé avec les complexes de lanthanides, du fait du phénomène de contraction des lanthanides le long de la série.⁶³

Les géométries optimisées sous vide montrent des longueurs de liaisons Ln-N_{PY} et Ln-N_{PYZ} (N_{PY} = atome d'azote de la pyridine, N_{PYZ} = atomes d'azote des pyrazoles) plus longues que celles généralement observées pour des complexes avec neuf sites de coordination et avec une unité chélatante tridentate telle que la terpyridine,⁶⁴ alors que les distances des liaisons Ln-O sont proches de celles observées dans le cas de lanthanides coordonnés avec des ligands polyamino-carboxylates.⁶⁵ En solution, les longueurs de liaisons Ln-N_{PY} et Ln-N_{PYZ} sont plus courtes qu'en phase gazeuses d'environ 0,10 et 0,07 Å respectivement, alors que les longueurs de liaison Ln-O sont légèrement augmentées, ce qui est plus en accord avec les valeurs expérimentales typiques obtenues pour des complexes de lanthanide à l'état solide.

⁶¹ Jensen, K. A.; *Inorg. Chem.*, **1970**, *9*, 1.

⁶² Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J.; *J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 10439.

⁶³ Seitz, M.; Oliver, A. G.; Raymond, K. N.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 11153.

⁶⁴ Berthet, J.-C.; Miquel, Y.; Iveson, P. B.; Nierlich, M.; Thuery, P.; Madic, C.; Ephritikhine, M.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2002**, 3265.

⁶⁵ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B.; *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2293.

Tableau 2.7. Longueurs des liaisons (Å) de l'environnement de coordination des lanthanides calculées suivant le model B3LYP/6-31G(d)⁶² pour les complexes [LnL7].

	La		Nd		Eu	
	vide	solution	vide	solution	vide	solution
Ln-N _{PY}	3,093	2,992	3,035	2,937	2,993	2,903
Ln-N _{PYZ}	2,804	2,713	2,742	2,658	2,695	2,622
Ln-N _{AM}	2,856	2,869	2,799	2,814	2,758	2,777
Ln-O _{hp}	2,481	2,498	2,424	2,440	2,376	2,394
Ln-O _{dp}	2,444	2,483	2,392	2,437	2,348	2,392

	Ho		Yb		Lu	
	vide	solution	vide	solution	vide	solution
Ln-N _{PY}	2,953	2,858	2,932	2,838	2,928	2,833
Ln-N _{PYZ}	2,647	2,574	2,618	2,547	2,610	2,542
Ln-N _{AM}	2,718	2,745	2,695	2,725	2,688	2,716
Ln-O _{hp}	2,320	2,338	2,281	2,299	2,269	2,287
Ln-O _{dp}	2,296	2,338	2,261	2,302	2,249	2,292

N_{PY} = atome d'azote de la pyridine, N_{PYZ} = atomes d'azote des pyrazoles, N_{AM} = atomes d'azote des amines, O_{hp} = atome d'oxygène des carboxylates hors du plan, O_{dp} = atomes d'oxygène des carboxylates dans le plan

La Figure 2.18 montre les longueurs de liaison optimisées en solution aqueuse pour les différents complexes [LnL7] avec celles estimées en utilisant les rayons ioniques décrits par Shannon⁶⁶ pour un nombre de coordination de neuf et les distances de liaisons optimisées en solution aqueuse pour le complexe de La^{III}. Pour une série de complexes d'une même structure avec de faibles interactions électrostatiques, on peut espérer une variation linéaire des longueurs de liaison Ln-(atomes donneurs) avec le rayon ionique de l'ion lanthanide. Cependant, les distances de liaison Ln-N ont une déviation positive lorsque le rayon ionique des lanthanides diminue. Cet effet est compensé par la longueur des liaisons Ln-O, qui présentent une déviation négative lorsque le rayon ionique diminue.

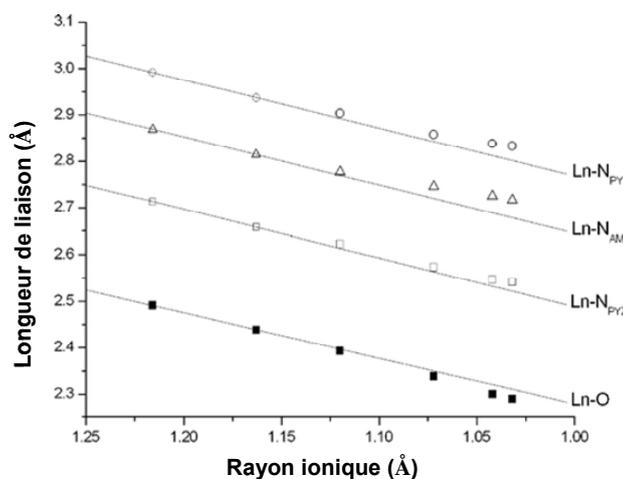


Figure 2.18. Longueurs de liaison de l'environnement de coordination du métal en solution aqueuse pour les complexes [LnL7] sur le model B3LYP/6-31G(d)⁶² en fonction du rayon ionique. Les droites correspondent aux droites théoriques calculées selon Shannon⁶⁶ N_{PY} = atome d'azote de la pyridine, N_{PYZ} = atomes d'azote des pyrazoles, N_{AM} = atomes d'azote des amines, O = atome d'oxygène des carboxylates.

⁶⁶ Shannon, R. D.; *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, **1976**, A32, 751.

Ces résultats suggèrent que l'unité tridentate bispyrazolylpyridine est adéquate pour complexer les ions lanthanides larges comme l'euprium et le terbium, mais lorsque le rayon ionique diminue, le volume de la cavité complexante devient trop grand pour les cations, ce qui provoque de plus fortes interactions vers les entités carboxylates. Le profil de la stabilité observée le long de la série des lanthanides pour les complexes de La à Ho est en accord avec cette observation. Le maximum de stabilité est observé pour le rayon ionique de Ho, où l'équilibre entre le volume occupé par le cation et la taille de la cavité complexante est optimum. Pour les cations plus petits, les interactions électrostatiques avec les atomes d'oxygènes des carboxylates augmentent, au détriment de la coordination avec l'unité bispyrazolylpyridine, ce qui diminue la stabilité de l'ensemble, comme cela a été montré avec l'étude potentiométrique.

2.4. Conclusion

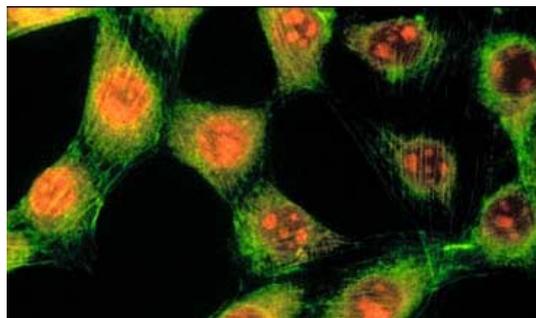
Dans ce chapitre, une voie de synthèse basée sur un jeu de substitutions nucléophiles aromatiques sélectives des atomes de fluors de la 2,4,6-trifluoropyridine a permis une synthèse aisée, rapide et efficace de la plate-forme 4-bromo-2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine **18**. Cette plate-forme possède l'avantage de pouvoir être fonctionnalisée post-synthétiquement contrairement à la chimie déjà développée sur ce type de plate-forme. A partir de cette plate-forme la synthèse de ligands avec des fonctionnalisations spécifiques en position 4 de la pyridine centrale a été effectuée.

Les complexes d'euprium et de terbium préparés à partir de ces ligands ont des propriétés photophysiques intéressantes en particulier pour le complexe **TbL6**. Son rendement quantique dans l'eau est quantitatif, le déclin de la luminescence est mono-exponentiel avec un temps de vie long (2,8 ms), ce qui suggère la présence d'une seule et unique espèce en solution, sans molécule d'eau présente en première sphère de coordination du terbium. Par ailleurs, l'étude de la stabilité de la poche de complexation montre une bonne stabilité du complexe de terbium ($\log k_{ML} \approx 16$).

3. Application au marquage de matériel biologique

L'analyse de molécules bioactives (protéines, enzymes, acides nucléiques...) par des méthodes immunologiques est devenue très rapidement une technique standard d'analyse du fait de sa spécificité et de sa sensibilité. Le principe des dosages immunologiques réside dans la détermination de la présence ou de la concentration d'un composé particulier, en général un antigène, à l'aide de molécules bioactives marquées, généralement des anticorps, se liant spécifiquement avec ce dernier.⁶⁷

La méthode classique est l'analyse radioimmunologique,⁶⁸ utilisée dans le cadre d'analyses immunologiques ou pour l'imagerie médicale. Les marqueurs utilisés pour ce type de dosage sont des marqueurs radioactifs.⁶⁹ Cette méthode est extrêmement sensible mais présente de sérieux inconvénients du fait de l'utilisation d'isotopes radioactifs (un permis spécial et un laboratoire adapté sont nécessaires, des problèmes de santé peuvent être causés par les radiations, la durée de vie des systèmes de dosage est limitée par le temps de demi-vie des isotopes radioactifs). Pour ces raisons, des méthodes alternatives ont vu le jour, telles que les analyses enzymatiques,⁷⁰ et les analyses avec des composés luminescents. En biologie, l'ensemble de ces sondes trouvent leur application dans le domaine de l'imagerie médicale, en particulier en microscopie de luminescence (*Figure 3.1*).



*Figure 3.1. Image du marquage d'une cellule de souris par un marqueur de type Bodipy en microscopie de fluorescence.*⁷¹

Le domaine de la détection d'analyte⁷² est également un domaine de prédilection pour de tels composés, notamment avec le marquage de nucléosides, nucléotides et d'acides nucléiques,⁷³ dans le but d'étayer les méthodes actuelles de séquençage de l'ADN, d'analyse de chromosomes, ou de réaction en chaîne de polymérase pour la reconstruction de matériel

⁶⁷ Gudgin Dickson, E. F.; Pollak, A.; Diamandis, E. P.; *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1995**, 27, 3.

⁶⁸ Eckert, H. G.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1976**, 15, 525.

⁶⁹ a) Jurisson, S. S.; Lydon, J. D.; *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2205. b) Anderson, C. J.; Welch, M. J.; *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2219. c) Liu, S.; Edwards, D. S.; *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2235.

⁷⁰ a) Lequin, R. M.; *Clin. Chem.*, **2005**, 51, 2415. b) Engvall, E.; Perlmann, P.; *Immunochemistry*, **1971**, 8, 871. c) Van Weemen, B. K.; Schuur, A. H. W. M.; *FEBS Lett.*, **1971**, 15, 232. d) Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. E.; *J. Clin. Pathol.*, **1978**, 31, 507.

⁷¹ www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Image-Gallery/Image-Detail.2632.html

⁷² Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y.; *Chem. Rev.*, **2009**, 110, 2620.

⁷³ Krickal, L. J.; Fortina, P.; *Clin. Chem.*, **2009**, 55, 670.

génétique. Ces composés luminescents sont également utilisés pour la vectorisation de médicaments (*Figure 3.2*).

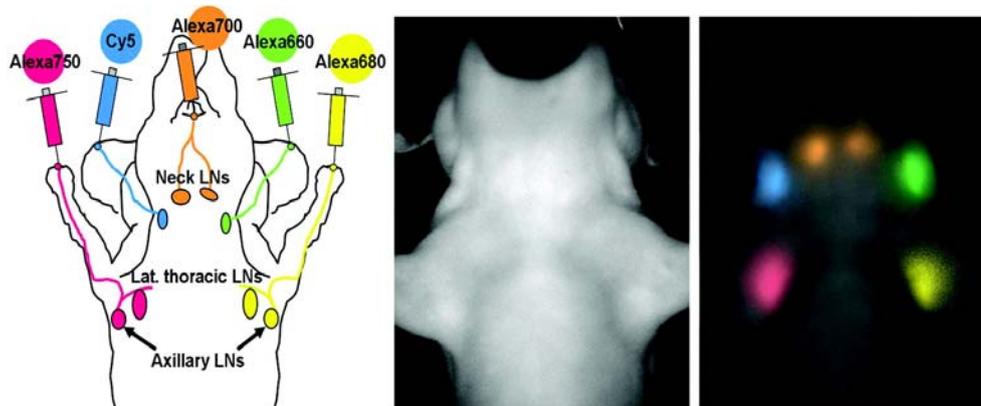


Figure 3.2. Exemple d'application : l'imagerie par fluorescence mettant en évidence le drainage de la lymphe vers les ganglions lymphatiques de la région du cou et de la tête d'une souris, les sites d'injections des différents fluorophores et le drainage lymphatique espéré (à gauche), une image en lumière blanche (milieu) et une image après drainage lymphatique en fluorescence (à droite) sont représentées.⁷²

Les composés luminescents à intérêt biologique peuvent être divisés en deux grandes catégories, les fluorophores organiques, les luminophores inorganiques tels que les quantum dots (QDots) et les complexes de lanthanides.

- Les fluorophores organiques⁷⁴

Les fluorophores organiques sont des composés qui : (i) fluorescent à partir d'un état excité singulet, ou (ii) phosphorescent à partir d'un état excité triplet. Le diagramme de Perrin-Jablonski schématise les différents mécanismes de transition électronique aboutissant aux différentes émissions (*Figure 3.3*)

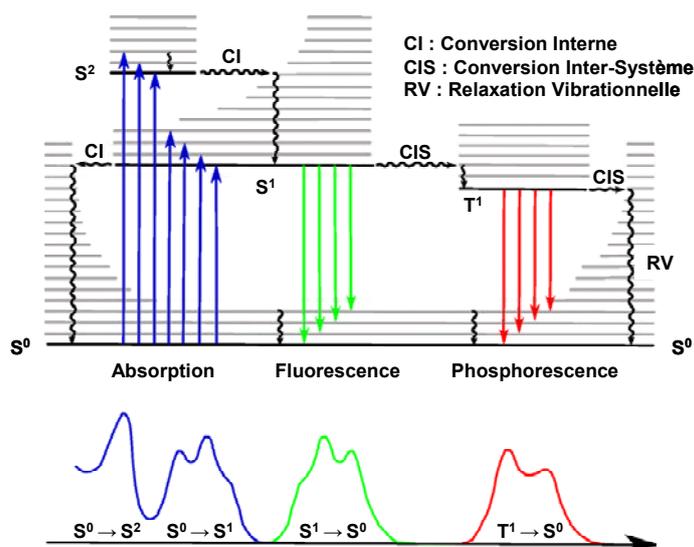


Figure 3.3. Diagramme de Perrin-Jablonski.

⁷⁴ Gonçalves, M. S. T.; *Chem. Rev.*, **2008**, *109*, 190.

Ces composés organiques possèdent, en général, des propriétés photophysiques intéressantes tels qu'un coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique important, ce qui leur confèrent une brillance ($\text{brillance} = \epsilon_{\lambda_{\text{max}}} \times \phi$) nettement supérieure à $1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour les composés les plus communément utilisés en biologiques.⁷⁵

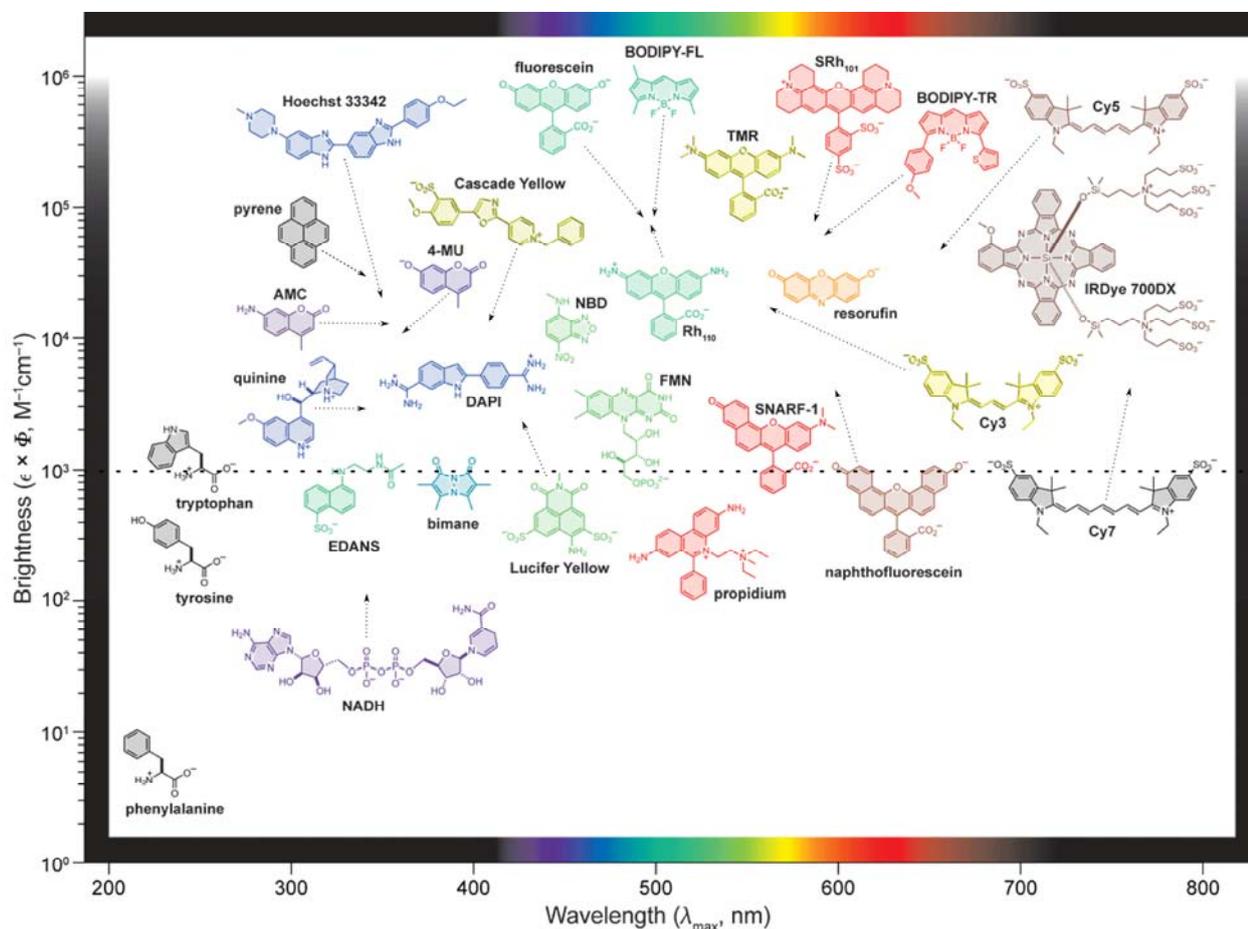


Figure 3.4. Représentation de la brillance des fluorophores ($\text{brillance} = \epsilon_{\lambda_{\text{max}}} \times \phi$) en fonction de leur maximum d'absorption (λ_{max}) pour la majorité des fluorophores utilisés en milieu biologique. La couleur de la structure indique la longueur d'onde maximum d'émission (λ_{em}).⁷⁵ Dans certains cas, et dans un souci de clarté seulement les entités responsables de la fluorescence de certaines molécules sont représentées. La séparation discontinue montre que la majeure partie des fluorophores organiques utilisés comme marqueurs pour les analyses biologiques ont une brillance nettement supérieure à $1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Cependant ces fluorophores ont un faible déplacement de Stokes (différence entre la longueur d'onde d'absorption maximum et la longueur d'onde d'émission maximum) ce qui peut provoquer l'auto-neutralisation de leur fluorescence par transfert d'énergie. De plus beaucoup de ces composés absorbent (et, à cause du faible déplacement de Stokes, émettent) dans un domaine spectral où certaines molécules bioactives absorbent et émettent également (Figure 3.5).

L'absorption des molécules bioactives et leur éventuelle émission, ainsi que la diffusion de la lumière qu'elles provoquent au sein de l'échantillon, ou la désactivation des fluorophores par

⁷⁵ Lavis, L. D.; Raines, R. T.; *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, 142.

transfert d'énergie et l'auto-luminescence du milieu, et parfois même la formation d'agrégats induite par la polarité des marqueurs, diminue la sensibilité de la détection de la fluorescence de ces composés. Un moyen d'augmenter la sensibilité de détection est d'utiliser des marqueurs émettant dans le proche infrarouge, gamme spectrale où le milieu biologique est éteint. Quelques exemples de composés sont décrits dans la littérature.⁷⁶

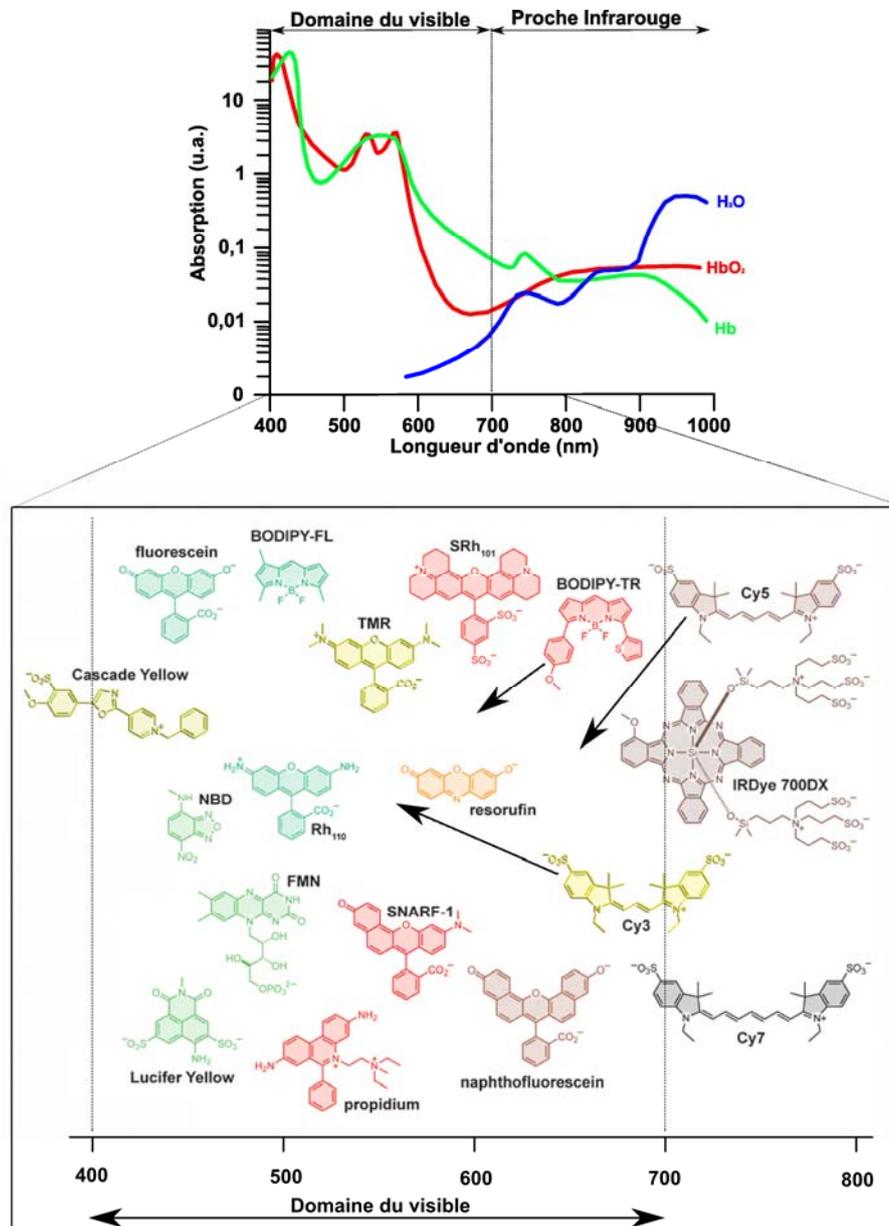


Figure 3.5. Comparaison de l'absorption d'éléments du milieu biologique (ici l'hémoglobine⁷⁷) avec l'absorption maximum de certains marqueurs utilisés pour les analyses immunologiques par fluorescence. La majeure partie de ces composés absorbe dans la zone d'absorption maximum de l'hémoglobine.

⁷⁶ a) Rao, J.; Dragulescu-Andrasi, A.; Yao, H.; *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2007**, *18*, 17. b) Yang, Y.; Lowry, M.; Xu, X.; Escobedo, J. O.; Sibrian-Vazquez, M.; Wong, L.; Schowalter, C. M.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Warner, I. M.; Strongin, R. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 8829.

⁷⁷ Weissleder, R.; *Nat Biotech*, **2001**, *19*, 316.

- Les QDots⁷⁸

Les QDots sont des nanocristaux luminescents semi-conducteurs. Leur composition chimique, leur taille et leur forme ainsi que de leur fonction de surface déterminent leurs propriétés photophysiques pour des applications biologiques spécifiques (*Figure 3.6*). Bien que la fonctionnalisation spécifique de ces nanoparticules ait été difficile, plusieurs revues et articles mettent en évidence leur importance dans le domaine biomédical.⁷⁹

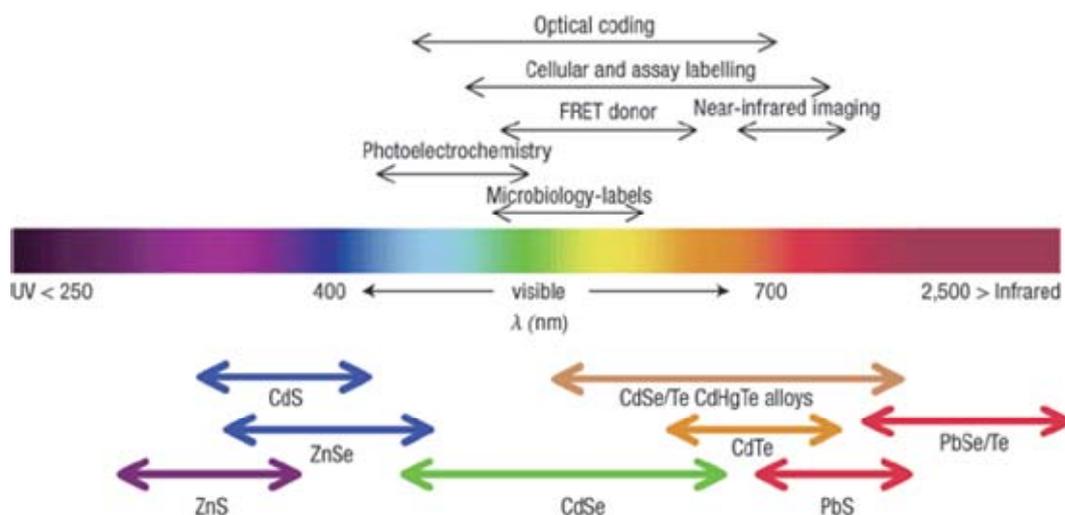


Figure 3.6. Corrélation entre les propriétés photophysiques résultant de la composition chimique des Qdots et leurs domaines d'applications.

Bien que ces composées présentent des propriétés optiques prometteuses pour les applications biologiques, leur taille peut parfois poser problème pour le marquage de molécules bioactives.

- Les complexes luminescents de lanthanides

Les propriétés photophysiques des complexes de lanthanides sont importantes pour les applications biologiques que ce soit au niveau de la microscopie de luminescence ou pour la détection d'analyte et la vectorisation de médicament. En effet, à la différence des fluorophores organiques ou des QDots, leur temps de vie de luminescence est long, pouvant atteindre plusieurs millisecondes. Cette propriété permet en particulier des analyses en temps résolu. Le principe de l'analyse en temps résolu est d'instaurer un délai entre l'excitation du marqueur et l'acquisition du signal de luminescence. Ceci permet de discriminer la fluorescence du milieu biologique, et de n'enregistrer que le signal correspondant à la luminescence du complexe de lanthanide greffé sur un anticorps par exemple (*Figure 3.7*).

⁷⁸ Green, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4129.

⁷⁹ a) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H.; *Nat. Mater.*, **2005**, *4*, 435. b) Biju, V.; Itoh, T.; Anas, A.; Sujith, A.; Ishikawa, M.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *391*, 2469. c) Frasco, M. F.; Chaniotakis, N.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, *396*, 229.

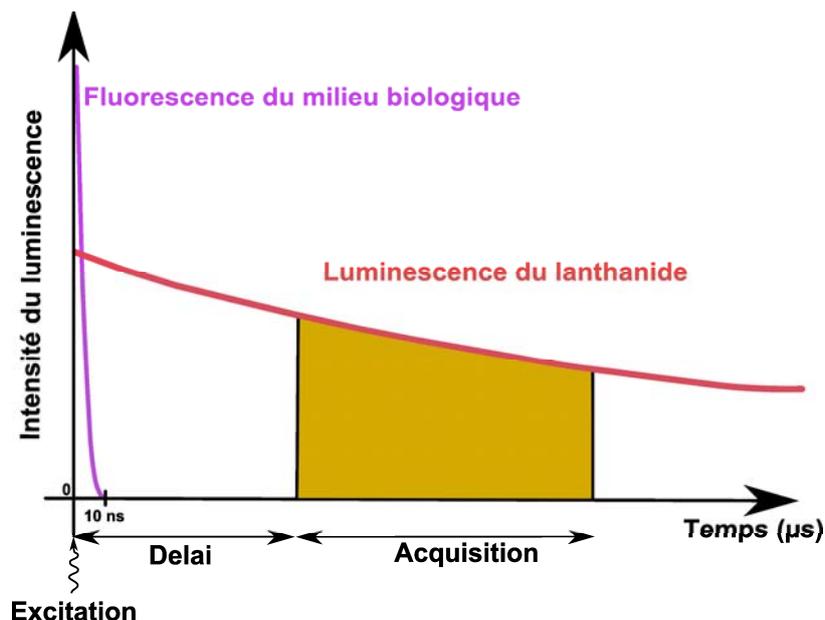


Figure 3.7. Principe de l'acquisition en temps résolu. La fluorescence du milieu décroît plus vite que celle du lanthanide. Instaurer un délai avant l'acquisition du signal permet de discriminer la fluorescence du milieu biologique et de n'enregistrer que le signal correspondant au lanthanide.

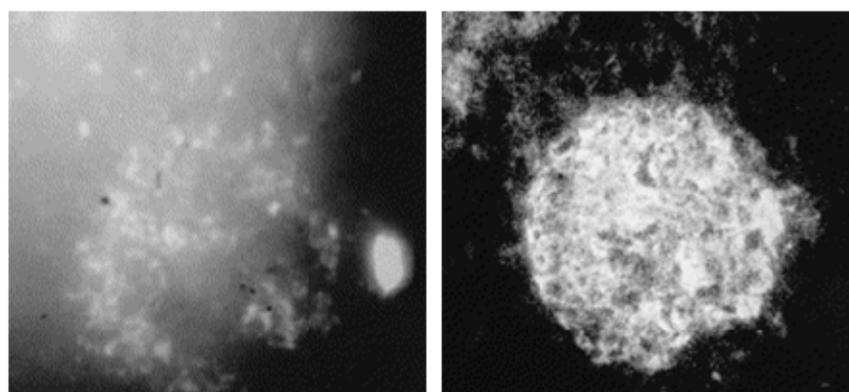


Figure 3.8. Exemple d'application d'analyse en temps résolu : image en microscopie de luminescence d'une coupe de tissus pancréatique marqué avec un complexe d'euprimum. A gauche, l'image montre la luminescence détectée directement après l'excitation. Notons l'importance de la fluorescence du milieu dans le quart supérieur gauche et une fluorescence non spécifique dans le quart inférieur droit correspondant à un artefact causé par la présence d'un morceau de verre. A droite, la même image en utilisant le temps résolu. La fluorescence du milieu a complètement disparu et le contour du tissu pancréatique est bien défini.⁸⁰

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'excitation du lanthanide est issue d'un transfert d'énergie intramoléculaire du ligand vers l'ion émetteur. Cette propriété permet entre autre de moduler la longueur d'onde d'excitation en fonction de la nature du ligand utilisé. Cette propriété associée au large déplacement de Stokes est un grand avantage car il est possible d'utiliser un ligand qui absorbe dans une région où le milieu biologique n'a pas d'activité photophysique et d'observer l'émission des lanthanides dans la région des basses énergies du spectre électromagnétique (cas du terbium, de l'euprimum, du samarium et du dysprosium), ou dans le proche infrarouge (cas du néodyme, de l'ytterbium et de l'erbium).

⁸⁰ Rulli, M.; Kuusisto, A.; Salo, J.; Kojola, H.; Simell, O.; *J. Immunol. Methods*, **1997**, *208*, 169.

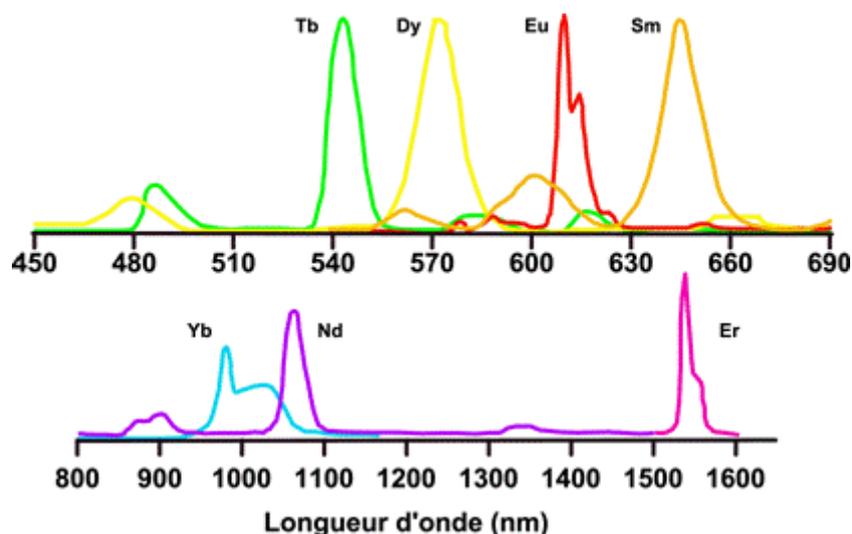


Figure 3.9. Spectres d'émission des différents lanthanides usuels dans le visible (haut) et le proche infrarouge (bas).^{1c}

- Le FRET

Le FRET, de l'anglais Fluorescence Resonance Energy Transfer est un processus de transfert d'énergie non-radiatif à partir d'un donneur dans l'état excité vers un accepteur dans son état fondamental au travers d'interactions dipôle-dipôle. (Figure 3.10).⁸¹

Pour que le transfert d'énergie soit efficace, l'orientation relative entre le donneur et l'accepteur, le recouvrement spectral de l'absorption de l'accepteur avec l'émission du donneur, ainsi que la capacité de ces dipôles à entrer en résonance sont des paramètres à prendre en compte dans ce mécanisme de transfert d'énergie. L'équation de Förster (équation [10]) permet à partir des données spectroscopiques de la luminescence du donneur et de l'absorption de l'accepteur, de déterminer la distance R_0 , appelé rayon de Förster, et représentant la distance pour laquelle 50 % de l'énergie de l'état excité du donneur est transférée à l'accepteur :

$$R_0^6 = 8,79 \times 10^{-5} \cdot n_r^{-4} \cdot \phi_D \cdot \kappa^2 \cdot J(\lambda) \quad [10]$$

Dans cette équation, n_r correspond à l'indice de réfraction du milieu, ϕ_D au rendement quantique de luminescence du donneur, κ^2 généralement fixé à 2/3 définie l'orientation relative entre le donneur et l'accepteur. Le dernier terme $J(\lambda)$ représente l'intégrale de recouvrement spectrale entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur défini par l'équation [11] :

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} f_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda \quad [11]$$

⁸¹ a) Clegg, R. M.; *Reviews in Molecular Biotechnology*, **2002**, 82, 177. b) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 4563.

avec $\varepsilon_A(\lambda)$ correspondant au coefficient d'extinction molaire de l'accepteur, et $f_D(\lambda)$ est l'intensité de luminescence normalisée, pour la longueur d'onde λ . A partir du rayon de Förster, l'efficacité du transfert d'énergie E_{FRET} est donnée par l'équation [12] :

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad [12]$$

où r est la distance entre l'accepteur et le donneur et R_0 est le rayon de Förster déterminé pour le couple donneur/accepteur. Ainsi plus r est important moins le transfert d'énergie est efficace. L'espacement spatial entre l'accepteur et le donneur doit être de quelques Ångstrom à quelques nanomètres

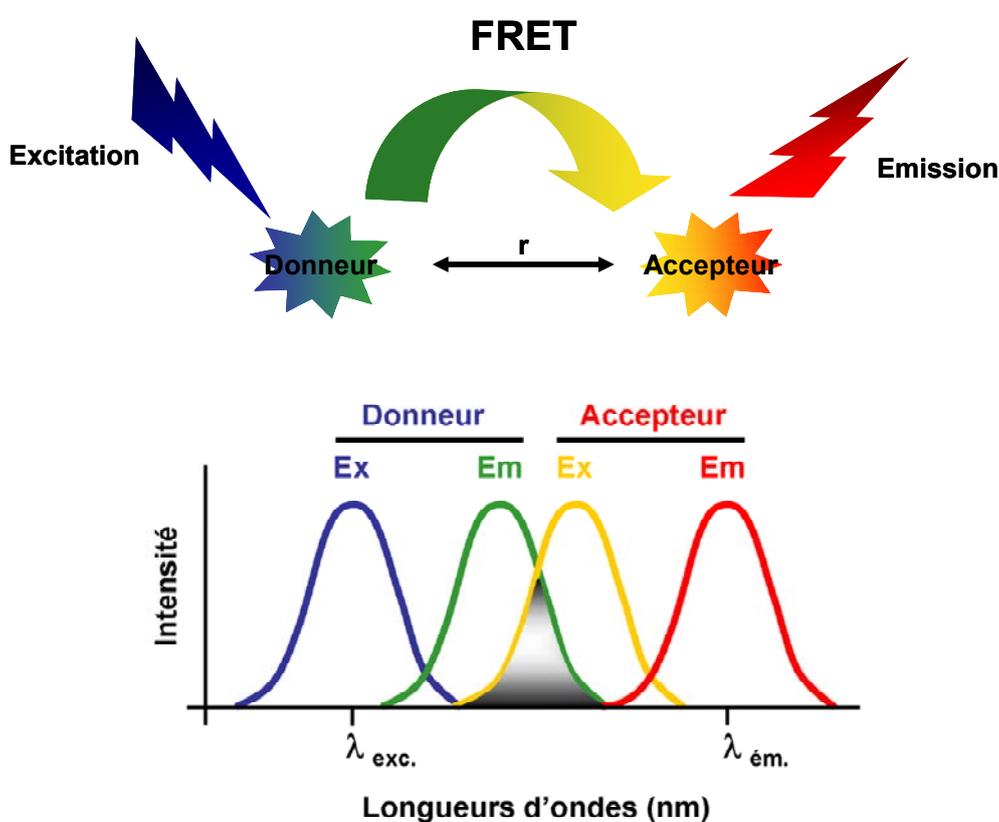


Figure 3.10. Représentation schématique du processus de FRET : l'état excité du donneur transfère l'énergie de manière non radiative à l'accepteur situé à une distance r de quelques Ångstrom. L'accepteur libère cette énergie par luminescence ou sous forme non radiative. La partie grisée des spectres correspond au recouvrement spectral $J(\lambda)$. Un bon recouvrement spectral assure un transfert d'énergie efficace.

Ce processus s'est avéré être un avantage certain pour un large panel d'applications biologiques,⁸² car la modulation du signal d'émission peut être effectuée en fonction de la paire donneur/accepteur utilisée, permettant diverses configurations de FRET qui est une technique de choix pour les analyses fluoroimmunologiques.⁸³

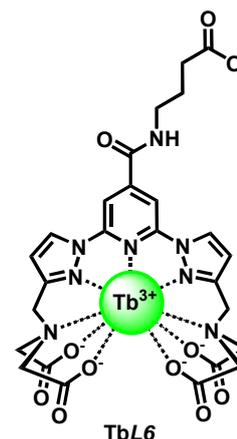
⁸² a) Pazos, E.; Vazquez, O.; Mascarenas, J. L.; Vazquez, M. E.; *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 3348. b) Morris, M. C.; *Cell Biochem. Biophys.*, **2010**, 56, 19. c) Wang, Y.; Wang, N.; *Integr. Biol.*, **2009**, 1, 565.

⁸³ Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M.; *Nat. Biotechnol.*, **2003**, 21, 1387.

- Application biologique pour les complexes de lanthanides

Les travaux de Hildebrandt et Löhmannsröben⁸⁴ en collaboration avec notre laboratoire⁸⁵ ont montré un intérêt tout particulier dans le développement d'un système permettant le processus de FRET, bâti sur la paire donneur/accepteur de type complexe de lanthanide/QDots. Ces travaux, ont mis en évidence l'efficacité du transfert d'énergie de ce type de système pour les analyses fluoroimmunologiques en temps résolu.⁸⁶

La préparation des complexes de lanthanides décrite dans le chapitre 2, a pour principal objectif d'obtenir un complexe permettant un dosage fluoroimmunologique d'antigènes en utilisant cette configuration de FRET. De l'ensemble des complexes préparés précédemment, le complexe **TbL6** est celui qui présente les meilleures propriétés photophysiques, à savoir un temps de vie de luminescence de 2,8 ms, un rendement quantique important (94 %) et une forte brillance (6500 M⁻¹.cm⁻¹) Ce complexe a donc été sélectionné comme sonde luminescente pour ce type d'analyse.



La configuration recherchée pour ce dosage est une variante de celle utilisée pour la technologie dite TRACE[®] (de l'anglais « Time Resolved Amplified Cryptate Emission »), ou encore appelée HTRF[®] (de l'anglais « Homogeneous Time Resolved Fluorescence »)⁸⁷ pour laquelle, le complexe **TbL6** sert de donneur et un QDot sert d'accepteur. Le principe du dosage TRACE[®] sera expliqué ultérieurement.

Ses deux entités sont couplées sur des anticorps spécifiques (l'anticorps GFR44⁸⁸ est celui portant le complexe **TbL6**, et l'anticorps G15,⁸⁸ celui portant le Qdot) de l'antigène recherché, ici l'antigène carcino-embryonnaire (ACE).⁸⁹

L'ACE est un élément contenu normalement dans l'organisme, constitué d'une protéine et d'un sucre. Plus précisément l'ACE est normalement présent à l'intérieur du tissu embryonnaire. Chez l'adulte il existe en faibles quantités qui seraient excrétées par les épithéliums glandulaires normaux (tissu composant les glandes endocrines). Il s'agit d'un marqueur des tumeurs, peu spécifique, utilisé pour la surveillance des cancers, particulièrement du poumon, du sein, côlon et du rectum.⁹⁰

⁸⁴ Hildebrandt, N.; Löhmannsröben, H.-G.; *Curr. Chem. Biol.*, **2007**, *1*, 167.

⁸⁵ Hildebrandt, N.; Charbonnière, L. J.; Beck, M.; Ziessel, R. F.; Löhmannsröben, H.-G.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 7612.

⁸⁶ Charbonnière, L. J.; Hildebrandt, N.; *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 3241.

⁸⁷ Bazin, H.; Trinquet, E.; Mathis, G.; *Reviews in Molecular Biotechnology*, **2002**, *82*, 233.

⁸⁸ Bjerner, J.; Olsen, K. H.; Børner, O. P.; Nustad, K.; *Clin. Chem. Lab. Med.*, **2005**, *42*, 208.

⁸⁹ Gold, P.; Freedman, S. O.; *J. Exp. Med.*, **1965**, *122*, 467

⁹⁰ www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/antigene-carcino-embryonnaire-502.html

Lorsque l'antigène est présent, l'association GFR44-ACE-G15 se fait et permet la proximité du complexe TbL6 et du QDot. Le signal obtenu par le processus de FRET du QDot, porté par l'anticorps G15 est alors observé en temps résolu, dans le cas contraire, le signal du QDot n'apparaît pas. (Figure 3.11)

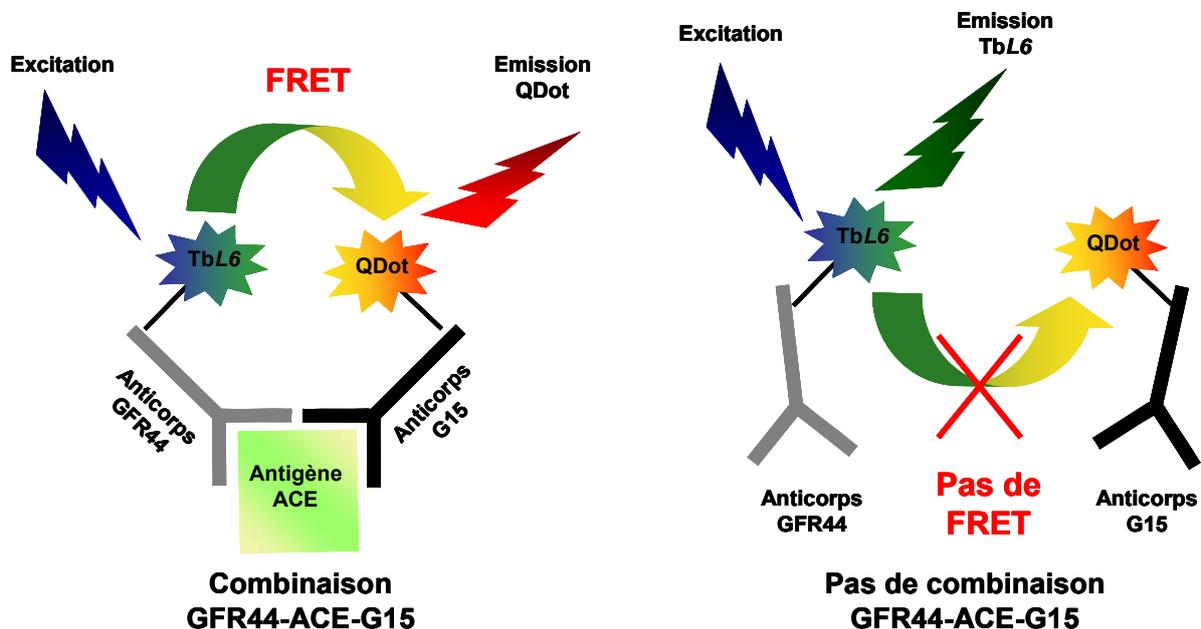


Figure 3.11. Principe du FRET dans le cadre du dosage fluoroimmunoologique en temps résolu avec le complexe TbL6 et le QDot.

La première partie de ce chapitre présente les résultats des tests de marquage d'anticorps GFR44 avec **TbL6**. Ces tests n'étant pas concluants, la préparation de son homologue **TbL8** portant sur le lien butyrate une fonction activée NHS a été effectuée. Avant de tester ce complexe en milieu biologique, des tests de marquage sur des billes d'acrylates, constituant un bon modèle de matériel biologique, nous ont permis de faire une étude en temps résolu avec ce complexe.

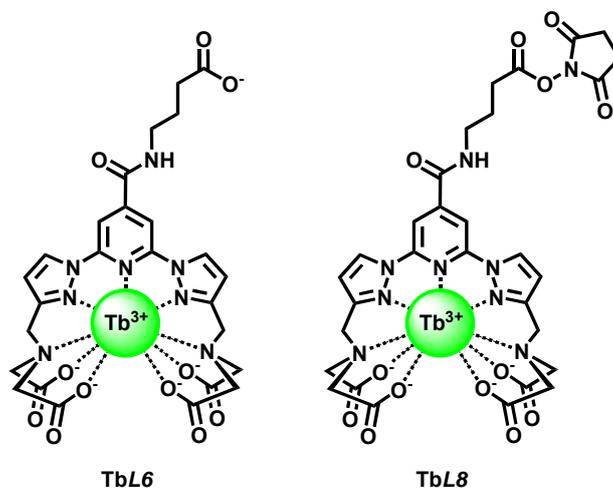


Figure 3.12. Comparaison des structures moléculaires des complexes TbL6 et TbL8.

La seconde partie décrit les résultats des tests de dosages fluoroimmunologiques avec le complexe **TbL8** obtenus par l'entreprise Cézanne dans le cadre du contrat européen « POC4Life : Multiparametric QDots bioassay for point of care diagnosis ».

La troisième partie de ce chapitre expose la préparation du ligand **L9** portant un lien vers le matériel biologique dérivé de la biotine.

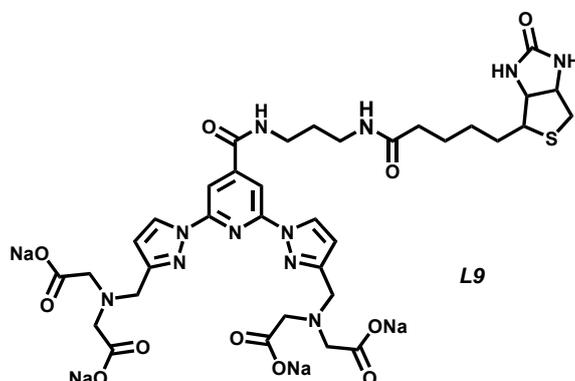


Figure 3.13. Structure moléculaire du ligand L9

3.1. Marquage d'anticorps

Pour permettre le dosage de l'antigène ACE,⁸⁹ le marquage de l'anticorps GFR44⁸⁸ est donc nécessaire. La réaction de marquage a été réalisée par l'entreprise Cézanne suivant la procédure mise au point par leurs soins. Le complexe **TbL6** est couplé avec l'anticorps GFR44 en solution tampon carbonate à pH = 8,3. La purification de l'anticorps marqué est effectuée par chromatographie d'exclusion stérique en tampon Tris/HCl à pH = 7,5.

3.1.1. Résultat du marquage de l'anticorps GFR44 avec le complexe TbL6

Les résultats obtenus ont montré que le signal correspondant à l'anticorps marqué est très faible. De ces résultats, deux hypothèses sont envisageables : le marquage n'a pas fonctionné, ou le marquage a fonctionné, mais la cavité complexante n'est pas stable en milieu sérique.

Afin de pouvoir choisir parmi ces deux hypothèses, un test simple a été effectué, consistant en l'ajout d'une solution de sels de terbium (TbCl₃.6H₂O dans le tampon Tris/HCl 0,1 M, pH = 7,0) sur l'anticorps supposé marqué, et d'enregistrer le signal en fonction de la concentration de terbium ajouté. La comparaison du signal obtenu avec le signal de GFR44 seul, permet de définir dans quel cas de figure se situe ce test.

La Figure 3.14 représente l'évolution de la luminescence de l'anticorps GFR44 marqué avec **TbL6** et l'évolution de la luminescence de l'anticorps GFR44 seul en fonction de la concentration de terbium ajouté.

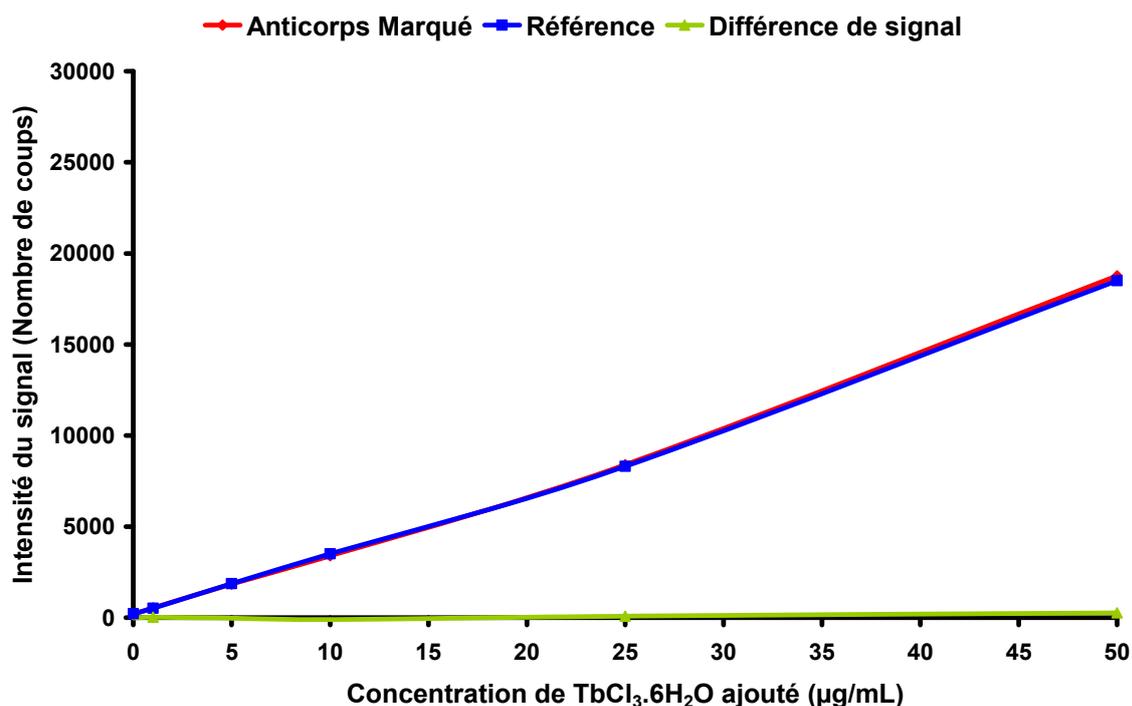


Figure 3.14. Résultat du marquage de l'anticorps GFR44 par TbL6, la courbe rouge correspond au signal enregistré pour l'anticorps GFR44 marqué, la courbe bleu est la courbe de référence et correspond au bruit de fond provoqué par l'anticorps GFR44 seul et l'ajout du terbium, la courbe verte est la différence algébrique de la courbe de l'anticorps marqué et de la courbe de référence.

Les courbes obtenues sont superposables, la courbe correspondant à la différence algébrique du signal enregistré pour l'anticorps GFR44 marqué et le bruit de fond généré par l'addition des sels de terbium sur l'anticorps GFR44 seul montre qu'il n'y a pas de signal. Ce test montre que l'ajout de terbium n'influe en rien sur le signal ce qui suggère que l'anticorps n'a effectivement pas été marqué par le complexe **TbL6**.

L'introduction d'une fonction activée sur le lien butyrate doit donc être envisagée pour permettre l'utilisation de ce complexe comme marqueur de matériel biologique. La fonction d'activation que nous avons choisie est l'ester N-hydroxysuccinimide (NHS) bien connu pour favoriser la bioconjugaison.⁹¹

3.1.2. Activation directe de complexes issus du ligand L6 :

Le caractère paramagnétique du terbium ne nous permet pas de suivre l'avancement de l'estérification par spectroscopie RMN. Du fait du caractère diamagnétique du lanthane, la préparation du complexe **LaL6** a été nécessaire afin de suivre la formation de la fonction d'activation ester NHS par spectroscopie RMN. Le complexe **LaL6** est obtenu par réaction du ligand **L6** avec 1,1 équivalents de $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ dans l'eau. **LaL6** est isolé avec un rendement de 80 % par précipitation dans le méthanol avec Et_2O et THF.

⁹¹ Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V.; *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827.

Afin de former l'ester activé NHS sur le lien butyrate permettant d'obtenir le complexe activé **LaL6***, deux méthodes d'activation ont été appliquées (*Schéma 3.1*).

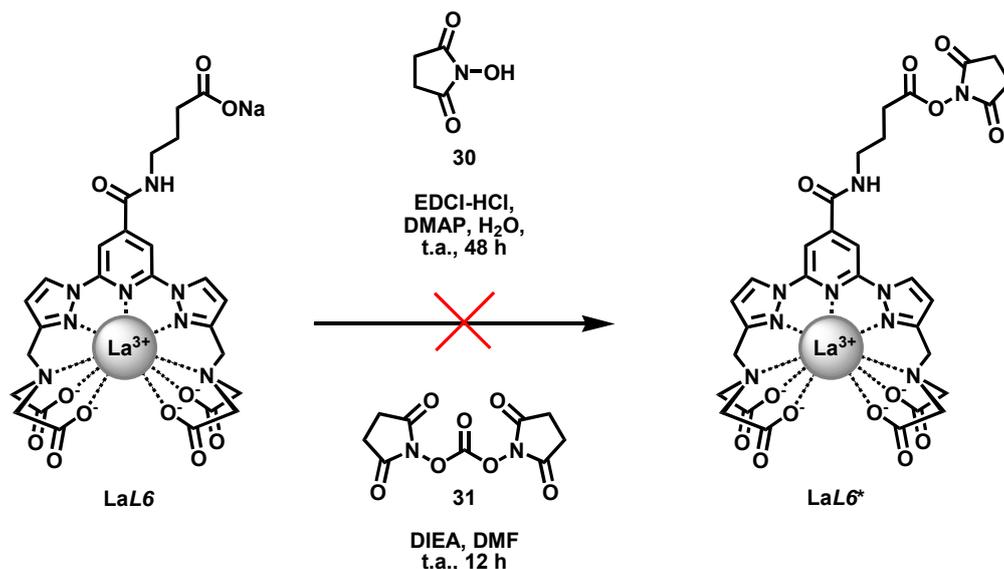


Schéma 3.1. Fonctionnalisation de l'ester activé NHS sur le complexe LaL6.

La première utilise le 1-éthyle-3-(3'-diméthylamino)carbodiimide hydrochloré (EDCI-HCl) comme agent de couplage et la N-hydroxysuccinimide **30** en présence de diméthylaminopyridine (DMAP). La seconde, utilise le disuccinimide-carbonate (DSC) **31** en présence de diisopropylethylamine (DIEA).

Dans les deux cas, le complexe activé n'a pu être isolé. Le suivi par spectroscopie RMN du proton nous indique la présence de multiples signaux correspondants à l'ester NHS. Ces signaux suggèrent que la formation d'esters NHS a lieu également sur les bras iminodiacétates. L'activation du complexe n'ayant pas donné les résultats voulus, une nouvelle voie de synthèse a été envisagée, et consiste en la préparation du ligand **L8**.

3.1.3. Synthèse des complexes LnL8 ($\text{Ln} = \text{La}, \text{Tb}$)

3.1.3.1. Synthèse du ligand **L8**

En considérant les résultats décrits dans la partie précédente, nous avons envisagé la synthèse du ligand **L8** (*Figure 3.12*), de structure similaire à **L6**. La différence réside dans la présence de la fonction d'activation NHS sur le lien butyrate avant la réaction de complexation. Pour cette synthèse, la plate-forme 2,6-bispyrazolylpyridine **18** doit être modifiée. La préparation de la plate-forme **32** a été effectuée (*Figure 3.15*).

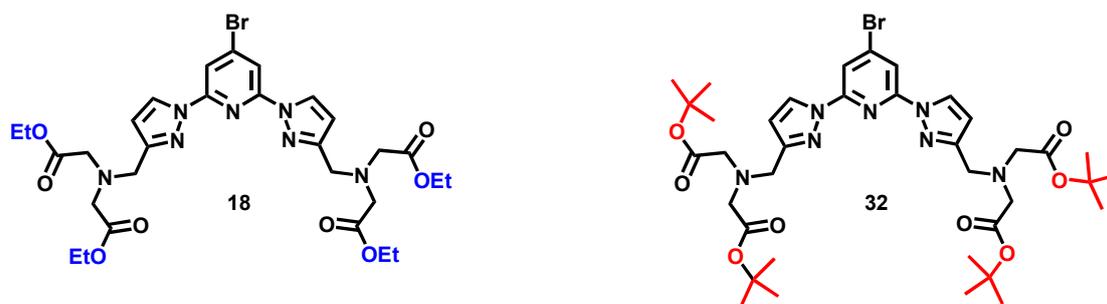


Figure 3.15. Structures moléculaires des plate-formes 4-bromo-2,6-bispyrazolylpyridine **18** et **32**.

La différence entre les deux plate-formes est la présence sur les entités iminodiacétates de groupements protecteurs *tert*-butyles, au lieu des groupements protecteurs éthyles. Le changement de groupements protecteurs constitue l'étape clé de la synthèse du ligand **L8**, car il permet d'obtenir une protection orthogonale entre le lien butyrate et les fonctions iminodiacétates. Cette orthogonalité est essentielle pour la synthèse car elle permet la déprotection sélective du lien butyrate et les travaux décrits par Ihara *et al.*⁹² ont montré que l'ester NHS est stable en présence d'acide trifluoroacétique (TFA), réactif nécessaire pour l'hydrolyse des esters *tert*-butyles.

La synthèse du ligand **L8** se fait en cinq étapes à partir du composé **17** (Schéma 3.2). La première étape est la réaction de substitution nucléophile des atomes de brome terminaux du composé **17** par l'iminodiacétate de *tert*-butyle en présence de K₂CO₃ pour former la plate-forme **32**, isolée avec un rendement de 85 % après chromatographie sur colonne. La réaction de carboamidation du composé **32** par le composé **27**, catalysée par du palladium, est ensuite réalisée pour obtenir le composé **33** avec un rendement de 54 % après purification. L'étape suivante est la saponification du groupement ester éthylique du lien butyrate en présence de NaOH pour former l'intermédiaire **34** avec un rendement de 70 % après purification par chromatographie sur colonne. La réaction entre **34** et le DSC **31** en présence de DIEA dans le DCM a été effectuée en adaptant un protocole décrit dans la littérature,⁹³ et donne le précurseur **35** du ligand **L8** avec un rendement de 52 % après purification par chromatographie sur colonne. L'hydrolyse des esters *tert*-butyliques de **35** est réalisée avec TFA dans le chloroforme. Le ligand **L8** est isolé sous sa forme acide avec un rendement de 65 % après précipitation par l'éther de pétrole.

⁹² Ihara, T.; Takeda, Y.; Jyo, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1772.

⁹³ Kvach, M. V.; Ustinov, A. V.; Stepanova, I. A.; Malakhov, A. D.; Skorobogaty, M. V.; Shmanai, V. V.; Korshun, V. A.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2107.

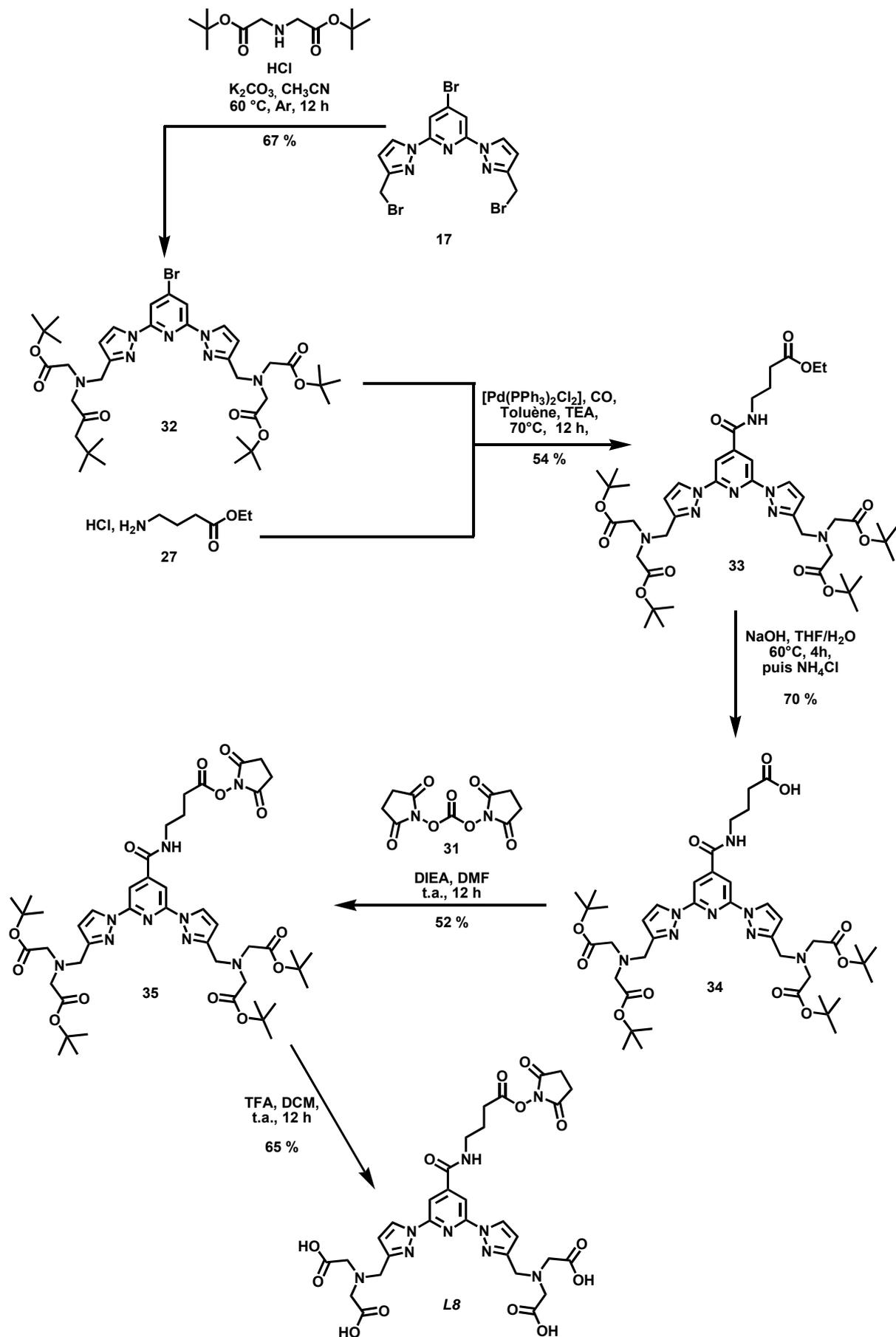


Schéma 3.2. Synthèse du ligand L8.

3.1.3.2. Synthèse des complexes LaL8 et TbL8 :

Les complexes de lanthane et de terbium **LaL8** et **TbL8** sont obtenus par réaction entre le ligand **L8** et 1,1 équivalent de $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ respectivement, en présence de TEA, dans le méthanol. Les complexes sont isolés sous forme de sels de TEA par précipitation dans le méthanol par Et_2O et THF, avec un rendement de 80 % chacun.

3.1.3.3. Etude du complexe LaL8 :

Le caractère diamagnétique du lanthane nous permet de suivre la réaction de complexation, et de vérifier par spectroscopie RMN du proton que l'ester activé NHS est stable lors de cette réaction. La *Figure 3.16* représente la superposition des spectres RMN obtenus pour le ligand **L8** et pour le complexe **LaL8**. L'attribution des différents signaux observés est faite sur la *Figure 3.16*.

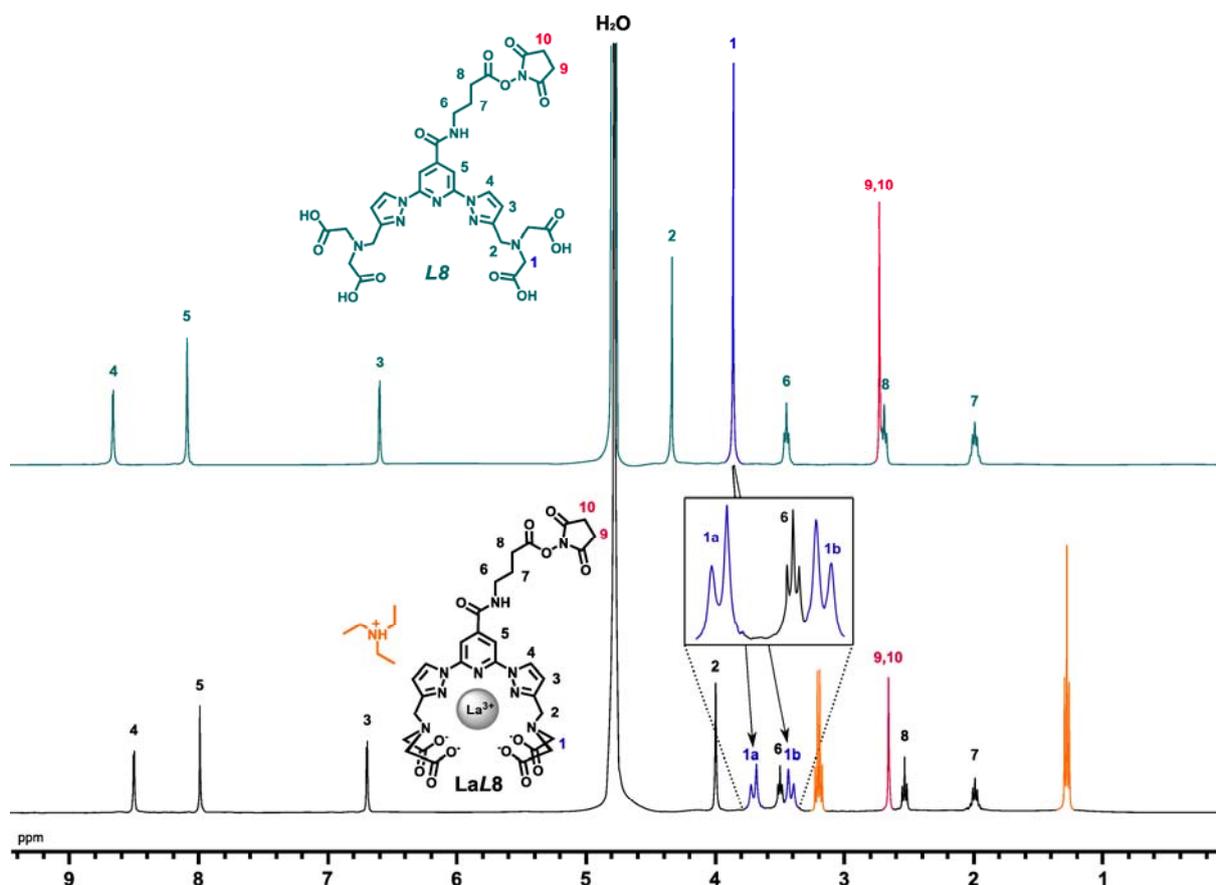


Figure 3.16. Superposition des spectres ¹H RMN (D₂O, 400 MHz) du ligand L8 et du complexe LaL8.

Lors de la complexation avec le lanthane, le singulet correspondant aux protons H-1 disparaît et un système AB annoté 1a et 1b apparaît. Ce signal est caractéristique de la rigidification de la poche de complexation autour du lanthane lors de la complexation. Le pic correspondant

aux protons H-9 et H-10 de l'ester NHS initialement à 2,7 ppm est déplacé vers 2,6 ppm. Le triplet à 1,3 ppm et le quadruplet à 3,2 ppm correspondent aux signaux des groupements éthyles du sel de triéthylamonium, contre-ion du complexe **LaL8**. La spectrométrie de masse de ce complexe présente le pic à $m/z = 862$ qui correspond à $[\text{LaL8}]^-$.

La présence de l'ester NHS sur les complexes **LaL8** et **TbL8** est confirmée par spectroscopie infrarouge qui présente trois bandes situées à 1812, 1790 et 1732 cm^{-1} , pouvant être attribuées à l'ester NHS (*Figure 3.17*).

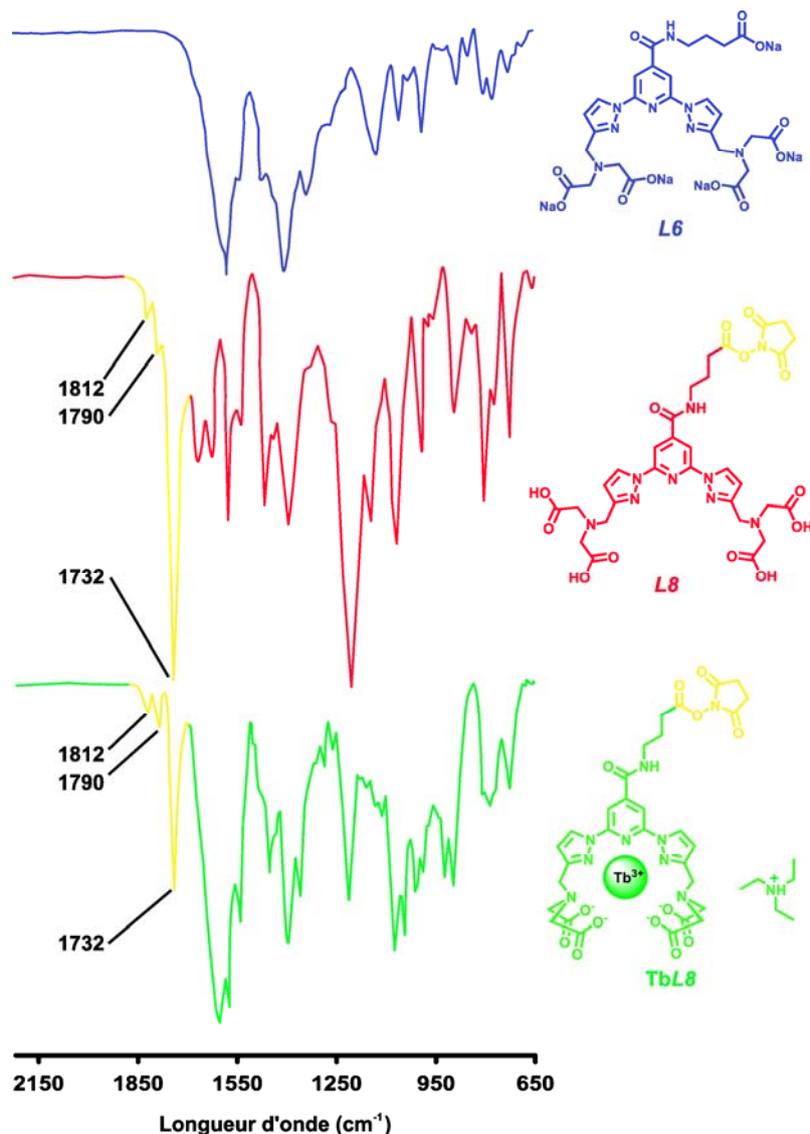


Figure 3.17. Comparaison des spectres infrarouges des ligands L6 et L8 et du complexe TbL8. Ces spectres montrent la présence de l'ester NHS sur le ligand L8 et le complexe TbL8 grâce aux trois bandes à 1812, 1790 et 1732 cm^{-1} . Ces bandes sont absentes du spectre obtenu pour le ligand L6.

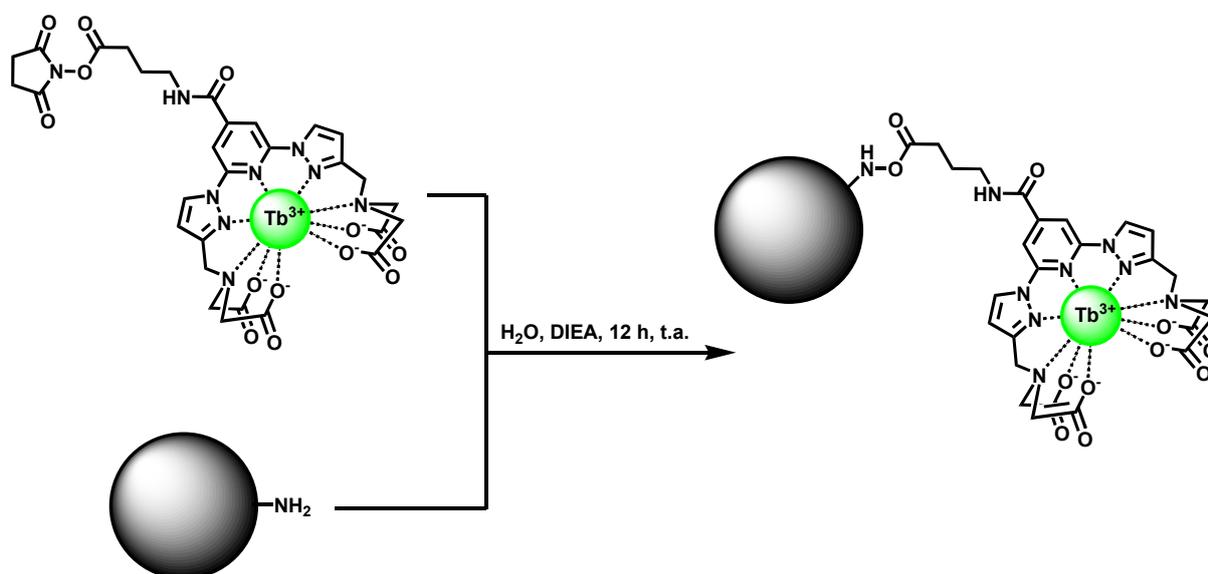
Cette étude a montré que le lien butyrate porte l'ester NHS et que la préparation du ligand **L8** portant l'ester NHS est réalisable avant la complexation. Le complexe **TbL8** ayant été formé de la même manière le lien butyrate de **TbL8** porte également l'ester NHS. La spectrométrie de masse et la spectroscopie infrarouge l'ont confirmée.

3.1.4. Tests de marquage avec **TbL8** :

3.1.4.1. Test préliminaire de marquages : marquage des billes d'acrylates

Afin de vérifier que le complexe peut être utilisé comme marqueur biologique, nous avons effectué un test de marquage. Les supports que nous nous sommes proposés de marquer sont des billes d'acrylates de diamètre moyen 200 μm , présentant sur leur surface des groupements amines. Ce test permet à la fois de vérifier que le complexe **TbL8** est un marqueur potentiel mais également de mettre en évidence la possibilité d'effectuer des analyses par microscopie de luminescence en temps résolu avec ce complexe.

Le marquage des billes s'effectue en mélangeant les billes d'acrylates avec une solution de **TbL8** dans l'eau en présence de DIEA (*Schéma 3.3*). Les billes sont isolées par filtration après des lavages successifs à l'eau, au méthanol, au THF et à Et_2O .

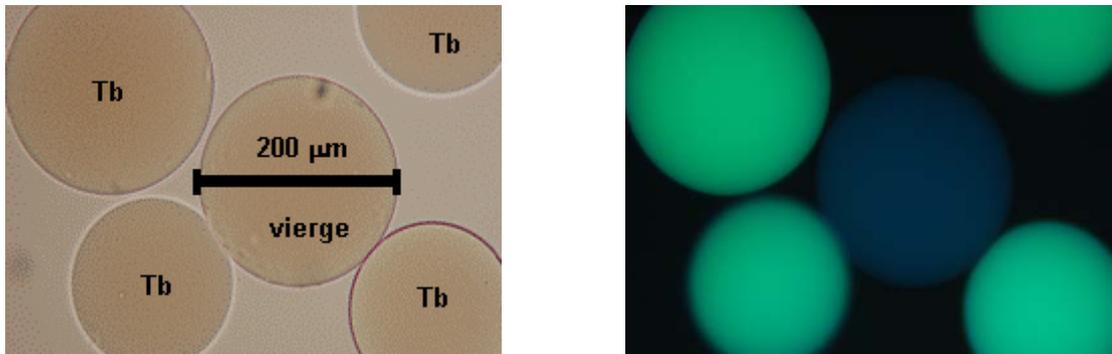


*Schéma 3.3. Marquage des billes d'acrylate avec le complexe **TbL8**.*

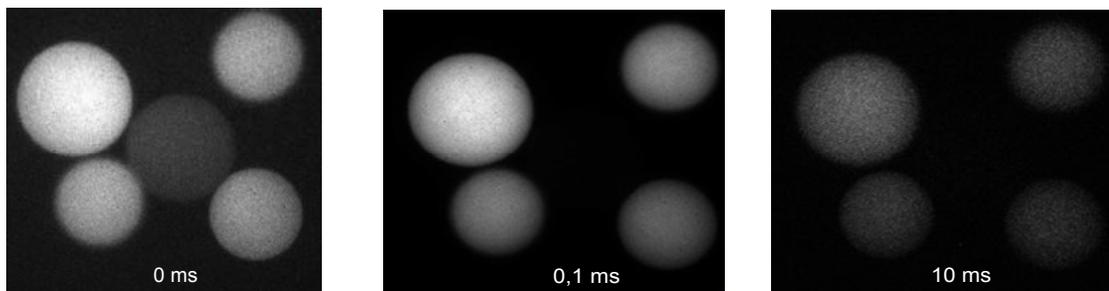
La *Figure 3.18* représente les photographies des billes d'acrylates obtenues par microscopie en mode transmission et en mode luminescence. L'acquisition du signal de luminescence en temps résolu a également été effectuée avec des délais de 0 ms, 0,1 ms et 10 ms (*Figure 3.19*). L'analyse en temps résolu montre que pour une acquisition sans délai, le signal enregistré correspond à la luminescence des billes marquées et à la fluorescence de la bille vierge. Après un délai de 0,1 ms, le signal enregistré correspond uniquement au signal des billes marquées. Notons que les billes marquées avec le complexe **TbL8** sont toujours visibles après un délai de 10 ms.

L'évolution de la luminescence des billes marquées en fonction du délai imposé avant l'acquisition du signal nous a permis de déterminer que le temps de vie de luminescence du

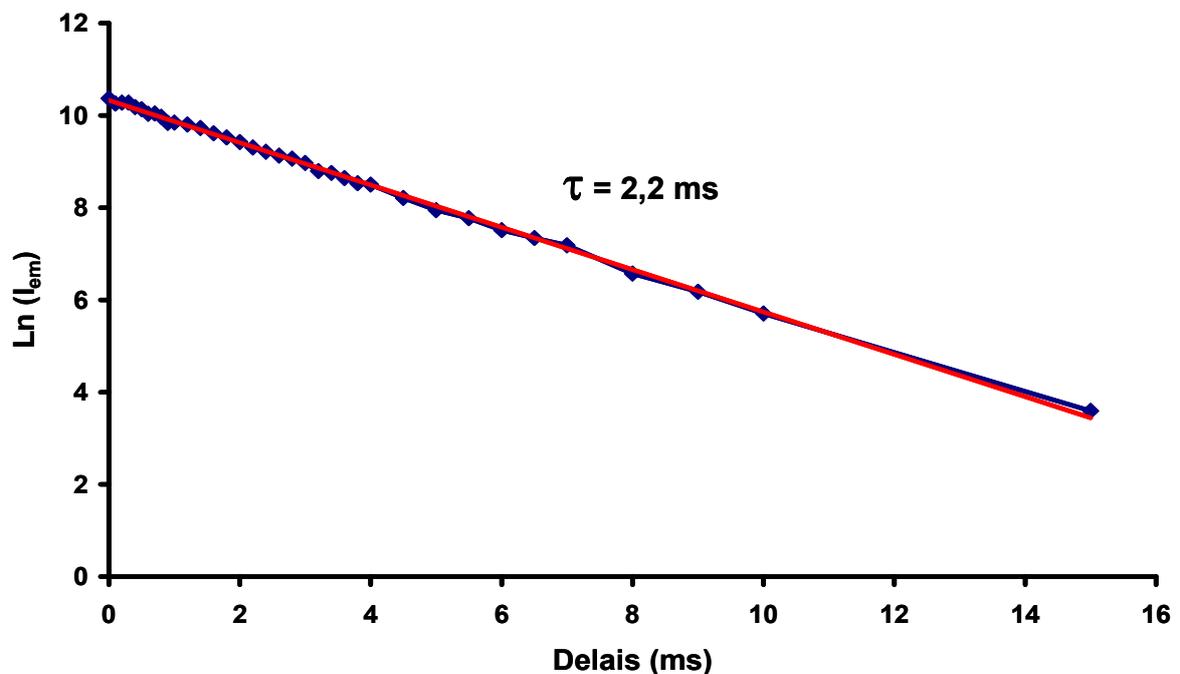
complexe **TbL8** lorsqu'il est greffé sur les billes d'acrylates est de 2,2 ms (*Figure 3.20*). A ce jour notre équipement ne nous permet pas la détermination du rendement quantique du système billes-**TbL8**.



*Figure 3.18. Photographies des billes d'acrylates obtenues par microscopie en mode transmission (gauche) et en mode luminescence (droite). Au centre se trouve la bille vierge, les billes en périphérie sont les billes marquées avec **TbL8**.*



*Figure 3.19. Photographie en microscopie de luminescence en temps résolu des billes d'acrylates. Au centre se trouve la bille vierge, les billes à la périphérie sont les billes marquées avec **TbL8**.*



*Figure 3.20. Détermination du temps de vie de luminescence du complexe **TbL8** lors du marquage des billes d'acrylates.*

3.1.4.2. Marquage de l'anticorps GFR44 avec le complexe TbL8

Le marquage d'anticorps avec le complexe **TbL8** a été effectué dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats obtenus ont montré un taux de marquage insuffisant pour pouvoir utiliser ce complexe comme marqueur biologique. Le test de l'ajout de terbium sur l'anticorps supposé marqué a été réalisé dans le but de vérifier la stabilité de la cavité complexante en milieu biologique. Ce simple test révèle des résultats différents de ceux observés avant l'ajout de terbium (*Figure 3.21*).

La différence algébrique de la courbe du signal de l'anticorps marqué et de la courbe du bruit de fond montre que pour un ajout de sel de terbium inférieur à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, l'augmentation du signal du complexe **TbL8** porté par l'anticorps est remarquable. Au-delà de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, un palier est atteint. L'ensemble des cavités vides, correspondant aux ligands **L8** greffés sur l'anticorps sont à nouveau complexées avec le terbium. Ce test montre cette fois que le marquage de l'anticorps a bien eu lieu mais que la cavité complexante n'est pas suffisamment stable en milieu biologique, ce qui se traduit par le relargage de l'ion métallique en milieu sérique et donc par une absence de signal correspondant à l'anticorps marqué avec le complexe **TbL8**. L'ajout de la solution de terbium en milieu aqueux permet de reformer les complexes après réaction de marquage.

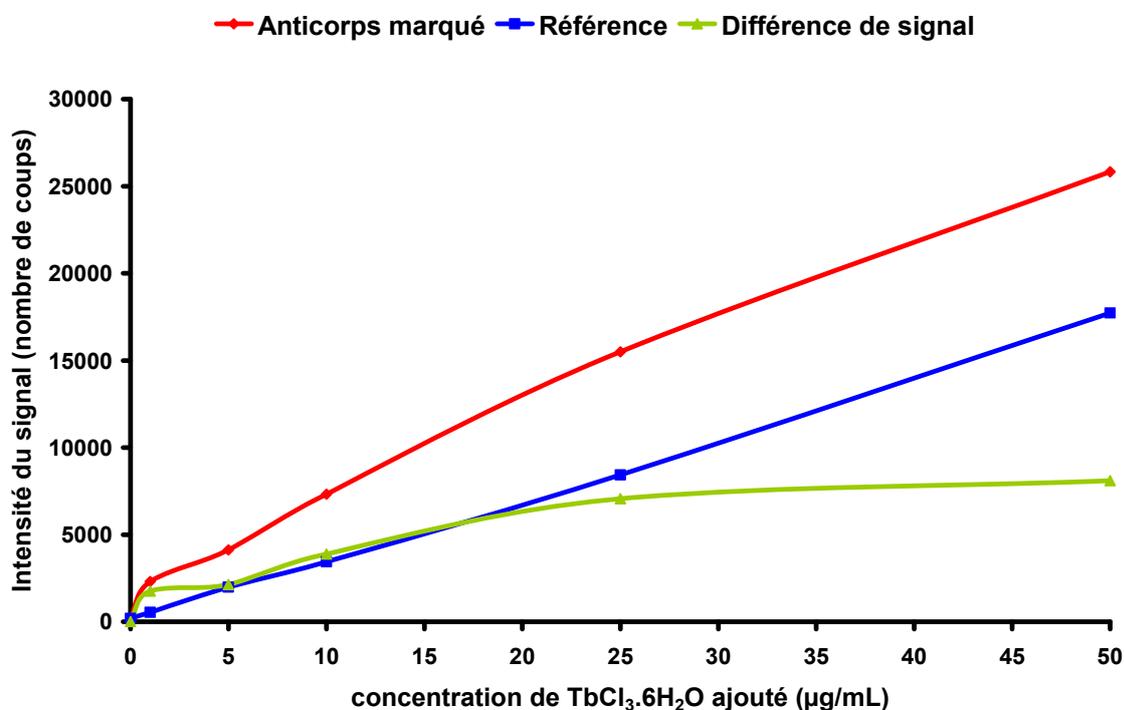


Figure 3.21. Résultat du marquage de l'anticorps GFR44 par le complexe TbL8 effectué par l'entreprise Cézanne, la courbe rouge correspond au signal enregistré pour l'anticorps GFR44 marqué, la courbe bleue est la courbe de référence et correspond au bruit de fond provoqué par l'anticorps GFR44 seul et l'ajout du terbium, la courbe verte est la différence algébrique de la courbe de l'anticorps marqué et de la courbe de référence.

La stabilité du complexe a été étudiée avec la détermination de son temps de vie de luminescence dans différents milieux. Cette méthode est une très bonne indication de la stabilité du complexe dans ces différentes conditions. Les résultats sont résumés dans le *Tableau 3.1.*

Tableau 3.1. Détermination de la stabilité du complexe TbL8 par la mesure de son temps de vie de luminescence dans divers milieux.

Milieux	τ (ms)
H ₂ O	2,8
Phosphate 0,1 M, pH = 7,0	2,8
Tris/HCl 0,1 M, pH = 7,0	2,8
Tris 0,1 M/EDTA 10 mM	0,6
Tris/HCl 50 mM / Sérum 50%	0,2

Ces mesures montrent que le complexe **TbL8** est stable dans l'eau et dans les tampons phosphate (0,1 M, pH = 7,0) et Tris/HCl (0,1 M, pH = 7,0), alors que pour une forte concentration d'EDTA et en présence de sérum, les temps de vie chutent considérablement. La chute du temps de vie est le résultat du relargage de l'ion métallique dans le milieu et du phénomène de « quenching » par des cations endogènes (Cu^{II}, Mn^{II}) dans le cas du sérum. Ces résultats corroborent les observations faites dans le chapitre précédent et confirme que la cavité complexante n'est pas stable en milieu sérique.

3.2. Dosage fluoroimmunologique TRACE[®]

3.2.1.1. Principe du dosage

Pour ce type d'analyse, la combinaison du temps résolu avec l'utilisation du FRET permet l'identification du signal de l'accepteur par discrimination des signaux parasites provenant du milieu biologique. Dans ce système, l'étude en temps résolu permet de distinguer la partie de la luminescence provenant de la fluorescence du milieu et du bruit de fond, du signal enregistré par transfert d'énergie à partir du terbium.

En effet, le peuplement des états excités de l'accepteur proviennent de l'énergie des états excités du terbium, dont le temps de vie est long. Le transfert d'énergie engendre un signal sur l'accepteur qui persiste après plusieurs dizaines de microsecondes.

Ainsi, si l'association anticorps-antigène-anticorps a lieu, la fluorescence de l'accepteur avec un temps de vie long est observée en temps résolu. Dans le cas contraire, seule la luminescence du donneur est observée en temps résolu.

Les phénomènes de transfert d'énergie lors d'un dosage avec la technologie TRACE[®] peuvent être représentés par le diagramme suivant (Figure 3.22).

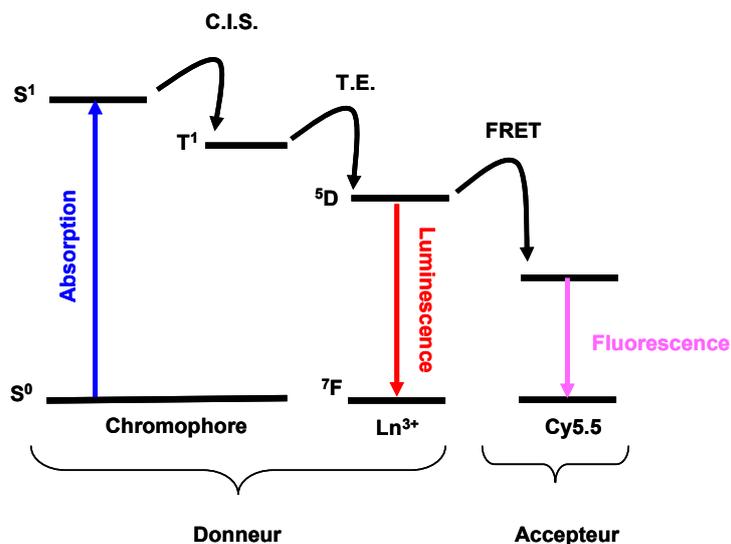


Figure 3.22. Transfert d'énergie intra- et intermoléculaire lors du dosage fluoroimmunologique TRACE[®], le donneur est soit le complexe TbL8 soit le cryptate d'euporium, l'accepteur est la cyanine Cy5.5.

Le but de ce dosage est de vérifier si le complexe **TbL8** peut être utilisé comme donneur d'énergie pour le processus de FRET et d'observer son influence sur le signal résultant de ce processus.

Le complexe **TbL8** greffé sur l'anticorps GFR44⁸⁸ est le système donneur et le système accepteur est le fluorophore cyanine Cy5.5⁹⁴ greffé sur l'anticorps G15⁸⁷ (système de référence commercial).⁸⁸ La référence utilisée pour la comparaison de l'efficacité du transfert d'énergie par le processus de FRET est un dérivé du cryptate d'euporium tris-bipyridine [Eu(TBP)], décrit dans la littérature,⁹⁵ couplé à l'anticorps GFR44.

Notons que l'accepteur pour ce dosage est la cyanine Cy5.5 et non pas un QDot. La raison est que ce dernier est actuellement en cours de développement.

3.2.1.2. Résultats du dosage

Pour ce dosage, trois expériences ont été réalisées. La première correspond à l'expérience de FRET avec le système de référence, ce qui nous donne accès à un modèle, la seconde est réalisée avec le donneur **TbL8** sans ajout de terbium après marquage de l'anticorps support, la troisième est réalisée avec le donneur **TbL8** avec ajout de terbium après marquage de l'anticorps support. Les résultats pour ces trois expériences sont reportés sur la Figure 3.23.

⁹⁴ Withrow, K. P.; Newman, J. R.; Skipper, J. B.; Gleysteen, J. P.; Magnuson, J. S.; Zinn, K.; Rosenthal, E. L.; *Technol Cancer Res Treat*, **2008**, 7, 61.

⁹⁵ a) Mathis, G.; *Clin. Chem.*, **1993**, 39, 1953. b) Lopez-Crapez, E.; Bazin, H.; Andre, E.; Noletti, J.; Grenier, J.; Mathis, G.; *Nucleic Acids Res. Suppl.*, **2001**, 29, 70.

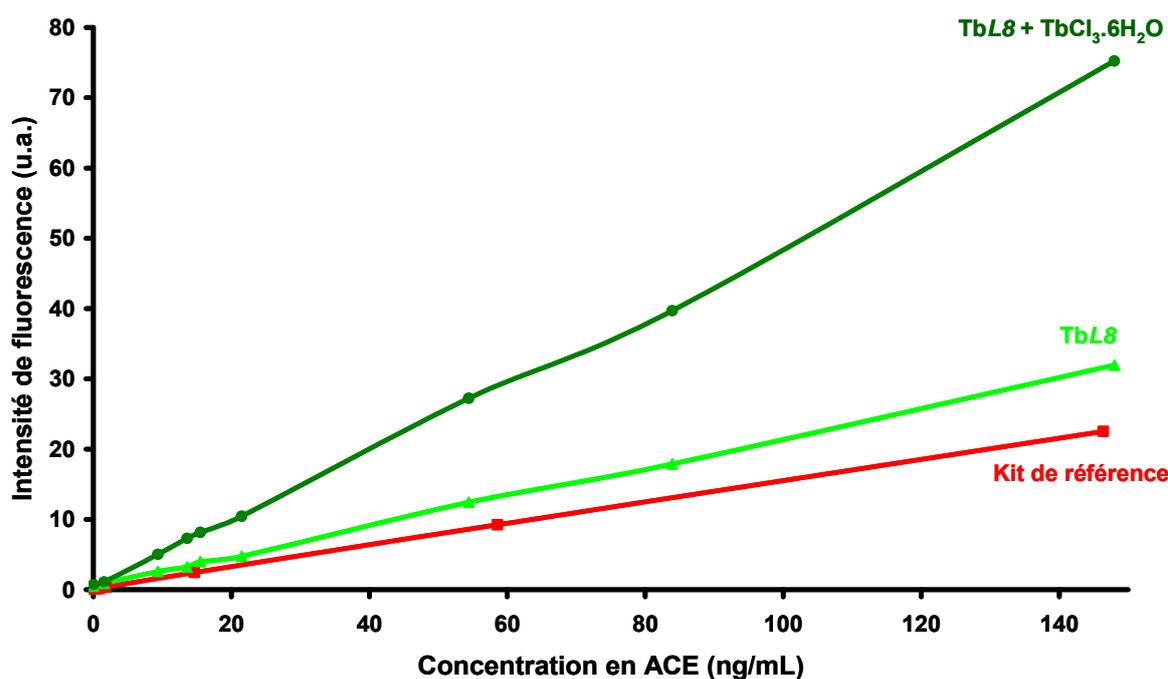


Figure 3.23. Détection de l'antigène ACE par dosage fluoroimmunologique TRACE[®] en utilisant le complexe TbL8 ou le kit de référence. L'augmentation du signal de fluorescence de la cyanine Cy5.5 est largement augmentée lors de l'ajout de terbium lors du dosage avec TbL8.

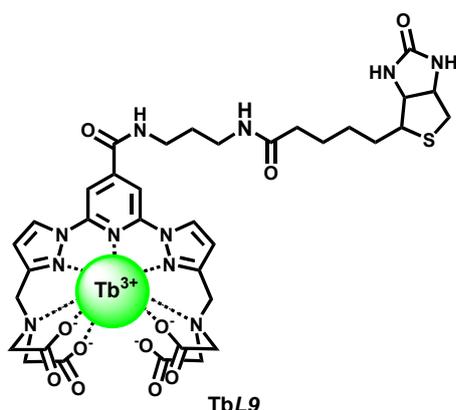
Les résultats obtenus montrent que l'utilisation du complexe **TbL8** augmente le signal du FRET d'environ 35 % en comparaison avec le kit de référence. L'ajout de sel de terbium après le marquage de l'anticorps support de **TbL8** provoque l'augmentation du signal du FRET d'un facteur 2, ce qui confirme la décomplexation partielle du complexe **TbL8** lors du marquage.

Les résultats obtenus avec ce dosage montrent que le complexe **TbL8** est plus efficace que le cryptate d'euporium. Ceci est dû, d'après les équations [10] à [12], à un rendement quantique du complexe **TbL8** supérieur au cryptate d'euporium utilisé comme donneur dans le kit de référence.

Par ailleurs, le recouvrement spectral entre l'émission de complexe **TbL8** et l'absorption de la cyanine Cy5.5 peut être meilleur que le recouvrement spectral de l'émission du cryptate d'euporium et de l'absorption de la cyanine Cy5.5.

La décomplexation partielle du complexe **TbL8** ayant été mise en évidence, l'optimisation de la cavité complexante doit être envisagée.

3.3. Synthèse d'un complexe de terbium biotinilé : TbL9



De nombreux travaux⁹⁶ ont mis l'accent sur l'intérêt de la grande affinité biotine/avidine dans le domaine des biotechnologies (dosage fluoroimmunologique, microscopie, imagerie médicale, détection de protéine...).

Nous nous sommes donc proposé de préparer le complexe de terbium **TbL9**. Ce complexe est construit avec le chromophore bispyrazolylpyridine et possède un

lien biotine. La biotine est séparé du chromophore par un espaceur propylènediamine, relié au chromophore par une fonction amide en position para de la pyridine centrale.

La synthèse du ligand **L9** se fait en cinq étapes à partir de la plate-forme **18** (Schéma 3.4). La première étape est la réaction de carboamidation catalysée au palladium entre la plate-forme **18** et la propylènediamine monoprotégée **38**. Ce dernier est préparé à partir de la propylènediamine **36** et du *ditert*-butyle dicarbonate **37** suivant la procédure décrite dans la littérature.⁹⁷ Le composé **39** est isolé avec un rendement de 60 % par chromatographie sur colonne. Le groupement protecteur Boc de **39** est ensuite enlevé en présence de TFA dans le DCM pour former le composé **40**. A partir de ce composé, deux voies de synthèse sont envisagées pour l'insertion du lien biotine.

La première est le couplage de type peptidique entre le composé **40** et la biotine **41** en présence d'EDCI-HCl et de DMAP dans le méthanol. Cette voie de synthèse est longue (plus de 36 heures) et la réaction est incomplète. Le composé biotinilé **43** n'a pas pu être isolé par cette méthode.

La deuxième voie de synthèse est le couplage peptidique entre le composé **40** et la biotine activée par un ester NHS **42**, en présence de TEA dans le DMF pour former le composé **43**. La préparation de la biotine NHS **42** se fait à partir de la biotine **41** et du composé **30** en présence d'EDCI-HCl et de DMAP dans le DMF. La biotine NHS **42** est isolée avec un rendement de 70 % après purification par chromatographie sur colonne. L'étape de purification du composé **43** s'est avérée difficile et les analyses par spectroscopie RMN du

⁹⁶ a) Green, N. M.; *Biochem. J.*, **1963**, *89*, 585. b) Charbonnière, L. J.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R. F.; Löhmansröben, H.-G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12800. c) Barnhill, H. N.; Claudel-Gillet, S.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. J.; Wang, Q.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7799. d) Gu, J.-Q.; Shen, J.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H.; *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 6589.

⁹⁷ Saari, W. S.; Schwering, J. E.; Lyle, P. A.; Smith, S. J.; Engelhardt, E. L.; *J. Med. Chem.*, **1990**, *33*, 97.

proton montrent la présence de biotine libre **41**, probablement issue d'une hydrolyse partielle de l'ester activé **42**.

En envisageant que la purification du ligand **L9** permettra l'élimination de la biotine **41** du milieu, la saponification des bras iminodiacétates du précurseur biotinilé **43** a été effectuée en présence de NaOH. Le ligand **L9** est obtenu par précipitation dans le méthanol par Et₂O et THF.

Les analyses RMN du ligand montrent cependant que la biotine libre provenant de l'étape précédente n'a pas pu être éliminée et la synthèse du complexe **TbL9** n'a pas été effectuée.

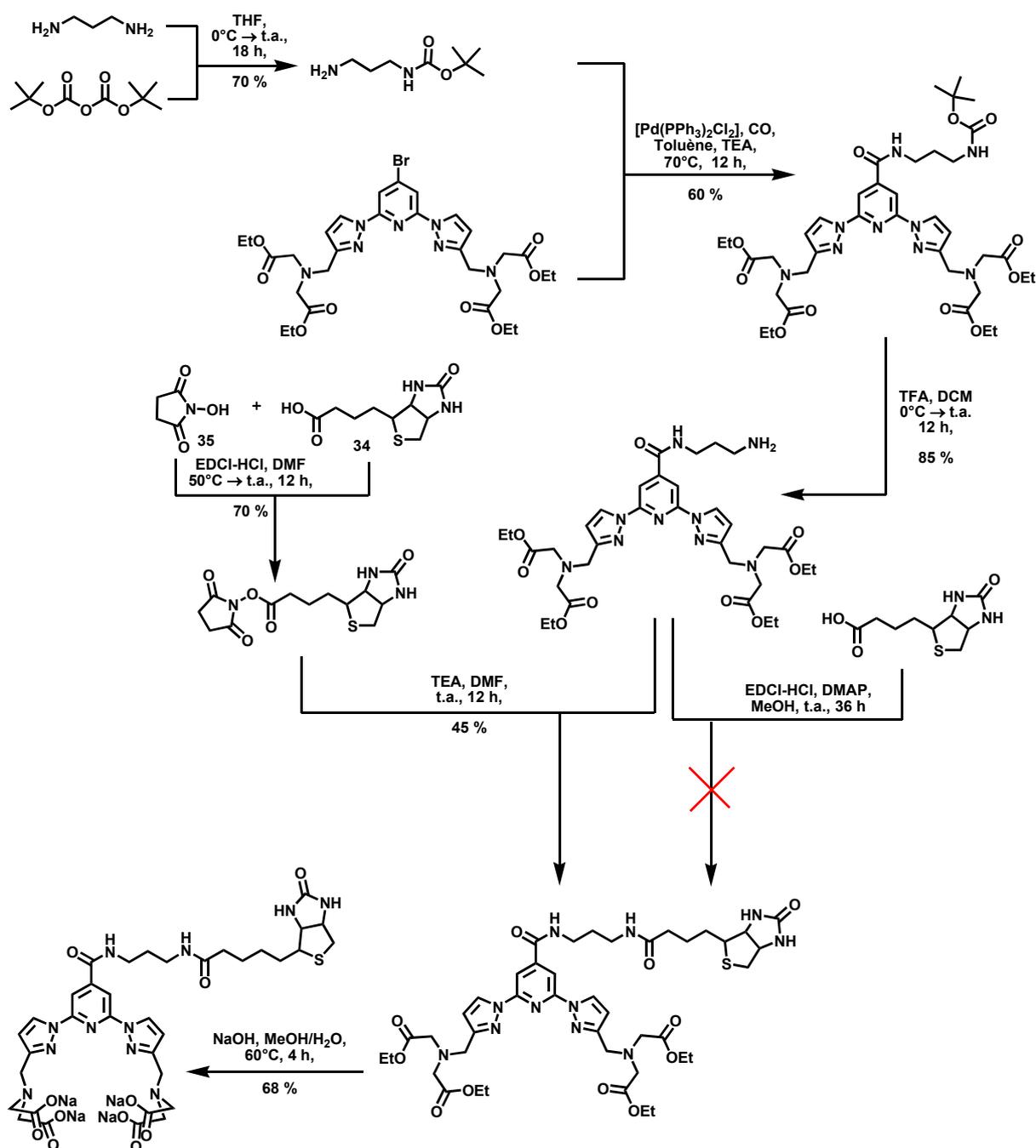


Schéma 3.4. Synthèse du ligand **L9**.

3.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'absence d'une fonction ester activé de type NHS sur le complexe **TbL6** ne permet pas le marquage biologique dans les conditions utilisées par l'entreprise Cézanne. Par ailleurs l'obtention de la fonction activée NHS sur le lien butyrate n'est pas envisageable à partir de ce complexe de lanthanide.

Avec la préparation du ligand **L8**, nous avons mis au point une stratégie de synthèse qui nous a permis d'obtenir l'activation NHS avant la réaction de complexation. De plus le complexe de lanthane **LaL8** a montré sa stabilité dans l'eau.

Les tests préliminaires de marquage ont révélé que le couplage du complexe **TbL8** activé NHS permet de marquer les amines primaires présentes sur les billes d'acrylates, utilisées comme modèle de matériel biologique. L'analyse en microscopie de luminescence en temps résolu a montré que le complexe **TbL8** greffé sur le support possède un temps de vie de 2,2 ms du même ordre de grandeur que celui déterminé en solution (2,8 ms, tampon tris/HCl à pH = 7,0).

Les essais de marquage d'anticorps effectués par l'entreprise Cézanne avec le complexe **TbL8** ont confirmé que le marquage avec la fonction activée NHS est efficace. Ces essais ont également montré que la cavité complexante n'est pas stable en milieu sérique.

Les essais de dosage fluoroimmunologique effectués par l'entreprise Cézanne ont montré que le signal de FRET observé avec le complexe **TbL8** est 35 % plus important que celui observé avec le kit de référence. L'ajout de terbium sur les anticorps marqués avec **TbL8** permet de reformer les complexes et provoque l'augmentation du signal d'un facteur 2.

Ces résultats nous ont conduit à envisager une optimisation de la cavité complexante dans l'objectif d'obtenir un complexe avec des propriétés photophysiques intéressantes et une stabilité importante en milieu biologique.

Par ailleurs, la préparation du ligand **L9** contenant un bras biotine est accessible avec la méthodologie utilisée. Cependant les méthodes de purification conventionnelles à notre portée n'ont pas permis sa purification. Par ailleurs l'optimisation de la stratégie de synthèse pour ce ligand reste à développer et peut permettre l'obtention d'un complexe de terbium biotinilé avec des propriétés photophysiques intéressantes.

Il est à noter que la méthodologie utilisée pour la préparation du ligand **L9** peut permettre l'obtention d'un ligand possédant un lien avec une fonction amine terminale obtenu à partir du composé **40**.

4. Optimisation des complexes

Les résultats présentés dans les chapitres précédents montrent que plusieurs complexes ont des propriétés structurales et photophysiques très intéressantes pour le marquage de matériel biologique, en particulier le complexe **TbL8** qui possède des propriétés photophysiques exceptionnelles (chapitre 2). Cependant, les essais de marquage ont révélé un manque de stabilité des complexes en milieu sérique (chapitre 3). Par ailleurs, le déplacement de l'absorption du ligand dans la région du visible serait un plus pour l'application visée. En effet l'excitation des complexes dans la région du visible est techniquement plus facile à mettre en œuvre et nécessite un appareillage moins coûteux. Ce chapitre décrit les efforts développés pour améliorer les propriétés d'absorption des ligands et la stabilité des complexes en milieu sérique. En tenant compte des résultats obtenus lors des essais d'optimisation, la préparation de nouveaux complexes a été entreprise.

4.1. Optimisation des propriétés d'absorption des ligands

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les modifications que nous avons apportées en position para de la pyridine centrale influe fortement sur les propriétés d'émission des complexes, mais n'ont qu'un impact faible sur le déplacement de l'absorption des ligands dans le domaine du visible de la gamme spectrale. Pour un déplacement efficace de l'absorption dans le domaine du visible, il est nécessaire de modifier le chromophore. Les contraintes imposées sont de conserver les bras chélatants afin de conserver la stabilité en milieu aqueux, et de ne pas affecter les propriétés photophysiques. Ces contraintes sont difficiles à respecter car la modification du chromophore peut provoquer des contraintes stériques sur le ligand, et influencer la stabilité des complexes et/ou la capacité du ligand à photosensibiliser le lanthanide. Ceci peut se traduire par des variations importantes des rendements quantiques et des temps de vie des états excités. La modification du chromophore que nous avons envisagé ici est l'utilisation du groupement **indazole** au lieu du groupement **pyrazole** pour former les plate-formes bisindazol-1-yl-pyridine **48** et **49** (Figure 4.1).

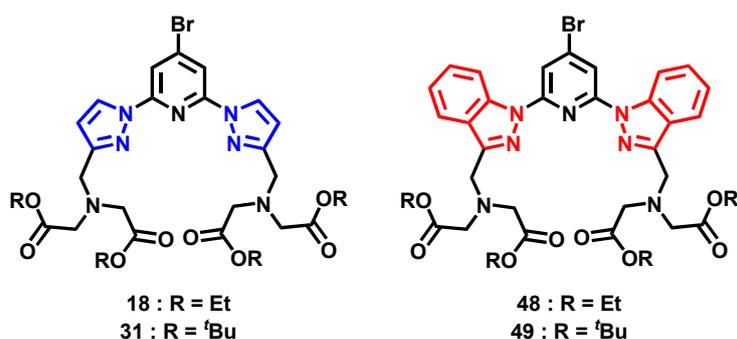


Figure 4.1. Structures moléculaires des plate-formes 4-bromo-2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine et des plate-formes 4-bromo-2,6-bisindazol-1-yl-pyridine.

Le choix de l'entité indazole repose sur la présence d'un cycle aromatique fusionné au cycle pyrazolique, ce qui permet d'augmenter la délocalisation électronique et de déplacer son absorption vers les basses énergies. De plus la méthodologie développée avec les entités pyrazole peut être facilement adaptée aux entités indazoles. A partir de ces plate-formes, les réactions de carboamidation et de couplage de type Sonogashira ont permis respectivement les synthèses des ligands **L10** et **L11** (Figure 4.2).

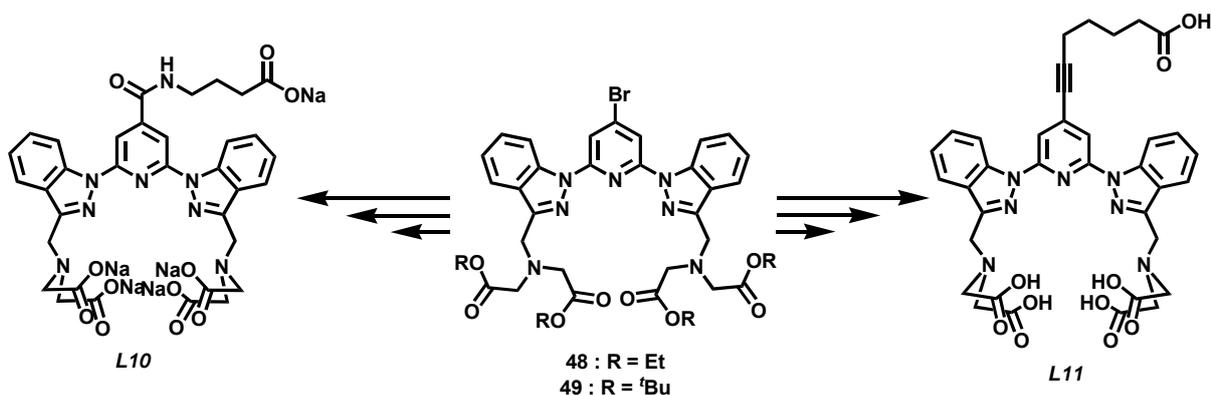


Figure 4.2. Structure moléculaire des plate-formes 4-bromo-2,6-bisindazol-1-yl-pyridine **48** et **49** et des ligands **L10** et **L11**.

Les propriétés photophysiques des différents complexes de lanthanides préparés à partir de ces ligands ont été étudiées.

4.1.1. Synthèse des plate-formes 4-bromo-2,6-bisindazol-1-yl-pyridine **48** et **49**

La synthèse de ces plate-formes est similaire à celle des plate-formes **18**, développée dans le chapitre 2, et **31**, développée dans le chapitre 3 (Schéma 4.1). Ces synthèses nécessitent au préalable la préparation du 3-éthylcarboxyindazole **45**. Ce composé est obtenu suivant la procédure décrite dans la littérature,⁹⁸ par une réaction d'estérification sur l'acide 3-carboxyindazole **44** en présence d'éthanol et de H₂SO₄ concentré. La S_NAr sélective des atomes de fluors du composé **14** par l'indazolate **45**, est réalisée par réaction avec NaH en milieu anhydre. Le diester **46** est obtenu avec un rendement de 94 % après purification. La réduction des groupements esters de **46** en présence de LiAlH₄ dans du THF permet d'obtenir le diol qui est converti en composé tribromé **47** avec un rendement de 35 % pour les deux étapes. La dernière étape est l'alkylation des bromes terminaux en présence de K₂CO₃ avec le diéthyle iminodiacétate pour obtenir la plate-forme **48** et l'iminodiacétate de *tert*-butyle pour la plate-forme **49**. Les deux ligands ont été obtenus avec des rendements respectifs de 56 % et 84 % après purification.

⁹⁸ Schmidt, A.; Merkel, L.; Eisfeld, W.; *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2124.

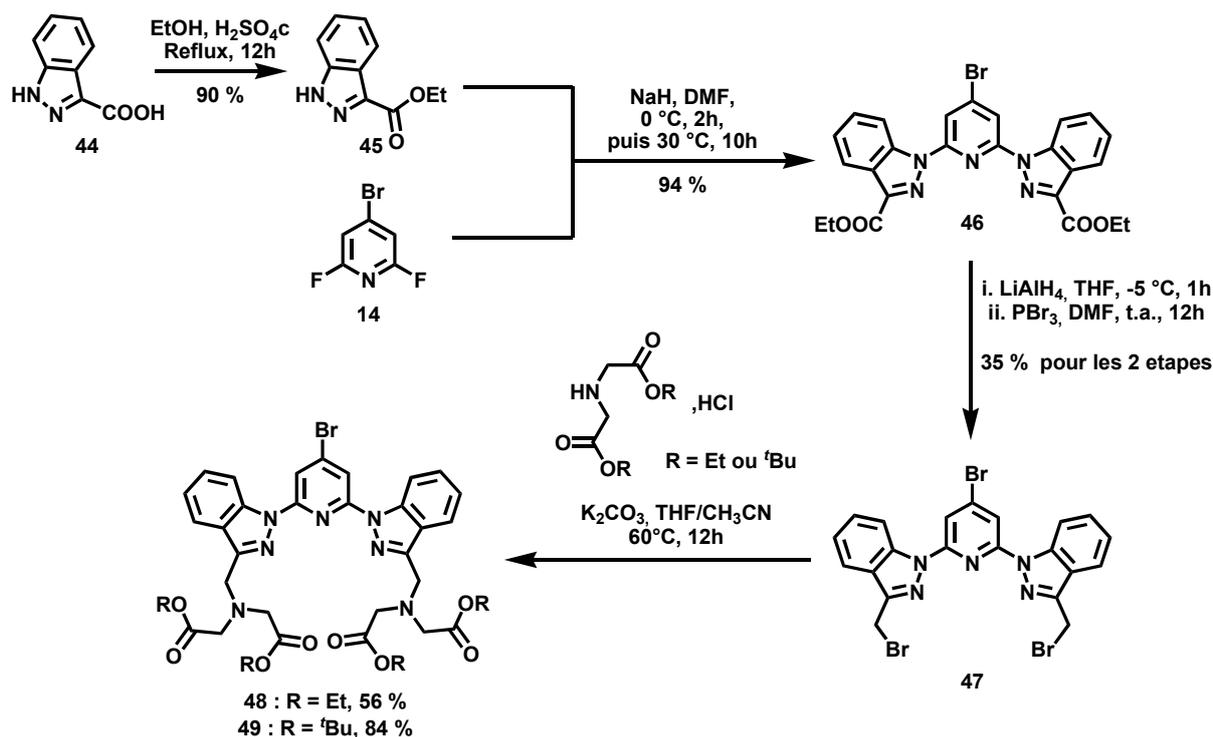


Schéma 4.1. Synthèse des plate-formes 4-bromo-2,6-bisindazol-1-yl-pyridine 48 et 49.

Comme nous l'avons observé lors de la préparation des plate-formes bispyrazolylpyridine, la réduction des groupements esters en présence de LiAlH_4 doit impérativement être contrôlée, au niveau de la température (-5°C), du temps de réaction (1 heure) et des quantités de LiAlH_4 ajoutées (strictement 2 équivalents, ajouté par portion), afin de limiter la $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ de l'atome de brome en position 4 de la pyridine centrale par un hydruure conduisant au composé dibromé **50** (Schéma 4.2).

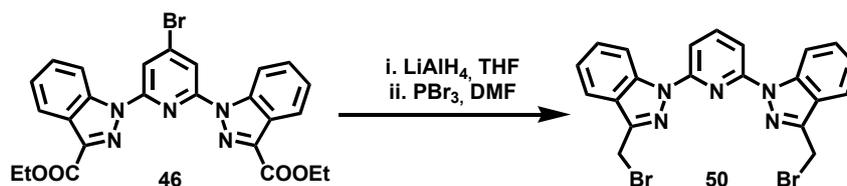


Schéma 4.2. Synthèse du composé dibromé 50.

4.1.2. Synthèse des ligands L10 et L11

A partir des plate-formes **48** et **49**, les réactions de carboamidation ou de couplage de type Sonogashira peuvent être effectuées afin de préparer des ligands possédant une chaîne souple avec une fonction activable adaptée au marquage biologique.

- Réaction de carboamidation : synthèse du ligand L10

Par analogie avec le complexe **TbL6** nous avons préparé le ligand **L10** qui présente en position para de la pyridine centrale une fonction amide. L'intérêt de cette synthèse est d'obtenir un complexe de terbium avec des rendements quantiques élevés et des temps de vie de luminescence et une bande d'absorption dans le domaine du visible. La synthèse de **L10** se fait en deux étapes à partir de la plate-forme **48** (Schéma 4.3).

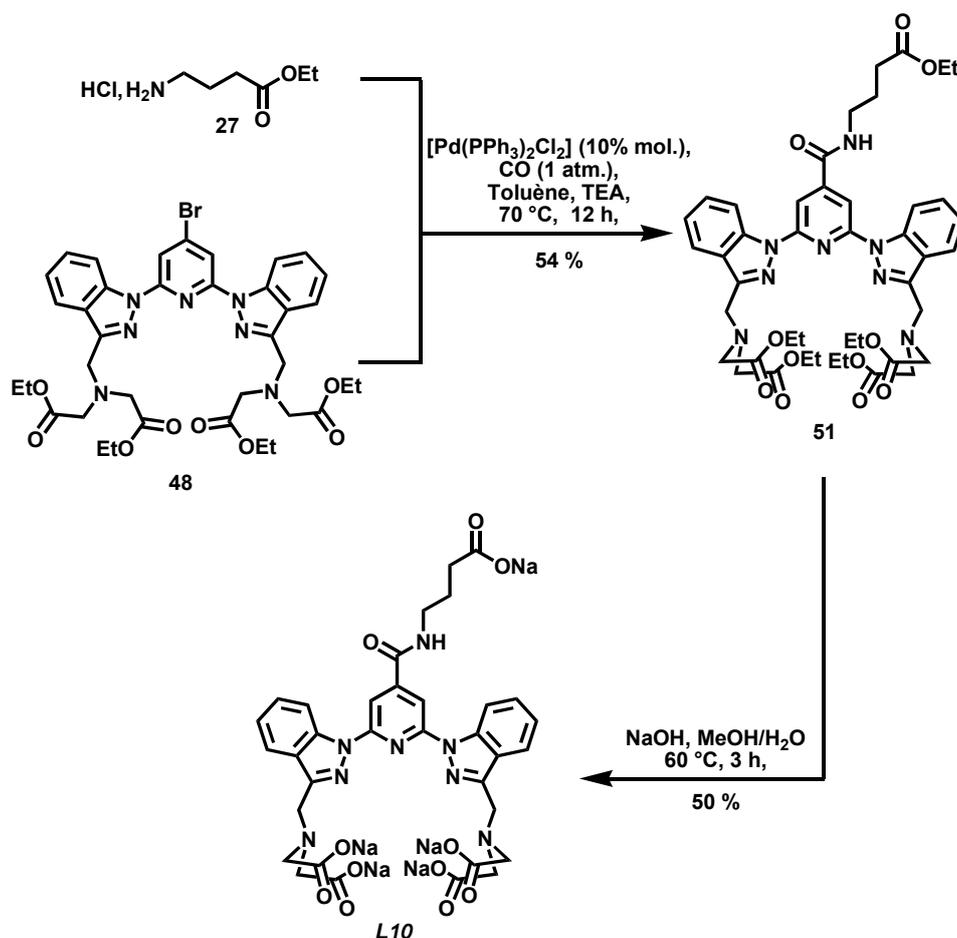


Schéma 4.3. Synthèse du ligand L10.

La première étape est la réaction de carboamidation entre les composés **48** et **27**, sous atmosphère de CO, catalysée au palladium pour former le composé **51** avec un rendement de 54 % après purification. L'hydrolyse des groupements esters éthyliques en présence de NaOH permet d'isoler le ligand **L10** sous sa forme carboxylate de sodium avec un rendement de 50 %. Le rendement moyen de la saponification peut être expliqué par la faible solubilité du composé **51**.

- Couplage pallado-catalysé de type Sonogashira : synthèse du ligand L11

La synthèse de **L11** (Schéma 4.4) débute par la réaction de couplage de Sonogashira entre la plate-forme **49** et l'acide 6-heptynoïque **52**. Ce couplage catalysé au palladium permet d'obtenir **53** avec un rendement de 40 %. L'étape suivante est l'hydrolyse des ester *tert*-butyles en présence de TFA pour donner **L11** sous sa forme acide avec un rendement de 52 %.

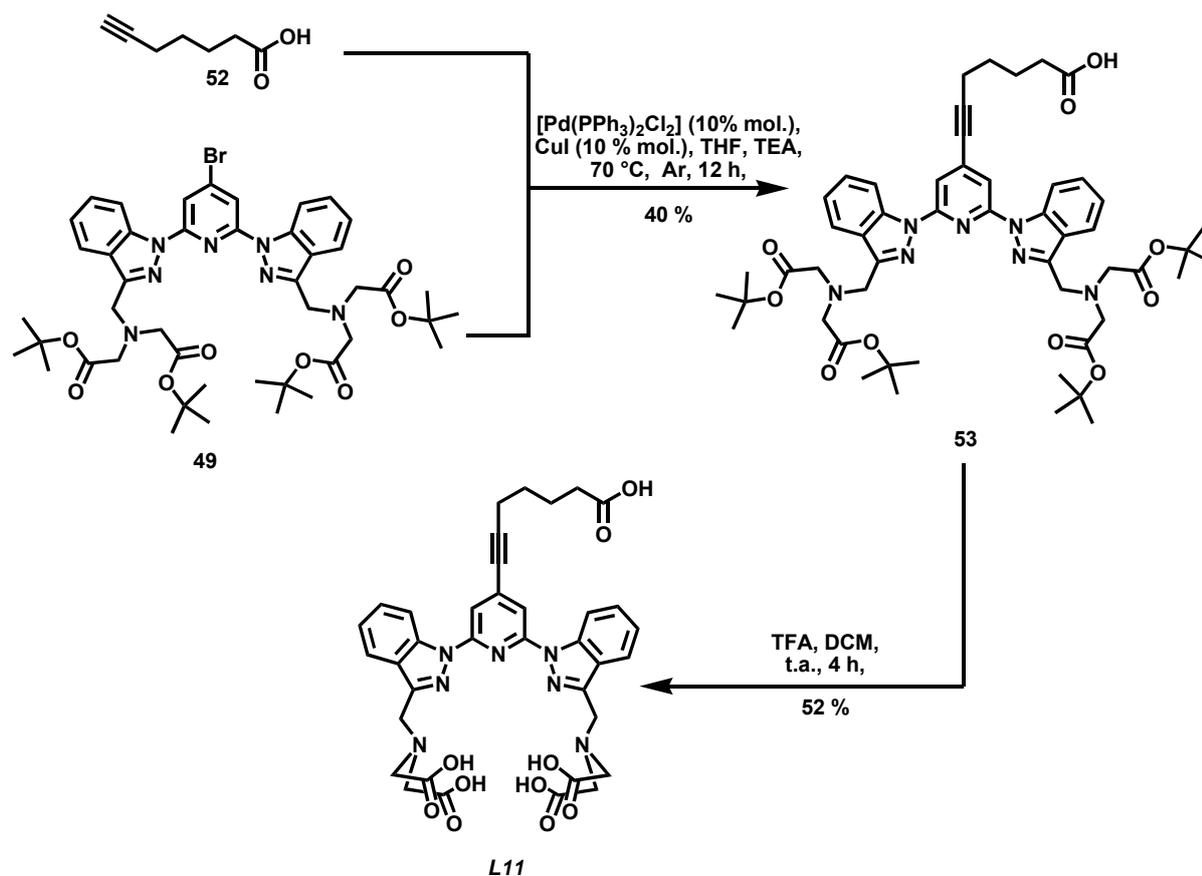


Schéma 4.4. Synthèse du ligand L11.

L'utilisation de l'acide 6-heptynoïque permet après conversion en ester activé NHS⁹¹ (chapitre 3) et complexation d'obtenir une sonde lumineuse adaptée au marquage d'anticorps.

4.1.3. Synthèse et étude des complexes

- Synthèse des complexes

Les complexes d'euprium et de terbium ont été obtenus en accord avec la procédure définie dans le chapitre 2. Les complexes **EuL10**, **TbL10** et **TbL11** ont été obtenus avec des rendements de 97 %, 78 %, et 72 % respectivement.

- Propriétés photophysiques des complexes

En solutions diluées ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ M, Tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0), les complexes formés avec **L10** et **L11** présentent une forte bande d'absorption à 360 nm ($\epsilon \approx 10000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), et une bande d'absorption plus fine à 320 nm ($\epsilon \approx 10000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ces spectres sont singulièrement différents des spectres obtenus pour les complexes basés sur la plate-forme bispyrazolopyridine. La superposition des spectres d'absorption UV/Visible des complexes de terbium **TbL10** et **TbL11** (Figure 4.3) montre que la substitution sur la position para de la pyridine centrale de la fonction amide par une fonction acétylène n'affecte que peu les bandes d'absorption du chromophore bisindazolpyridine.

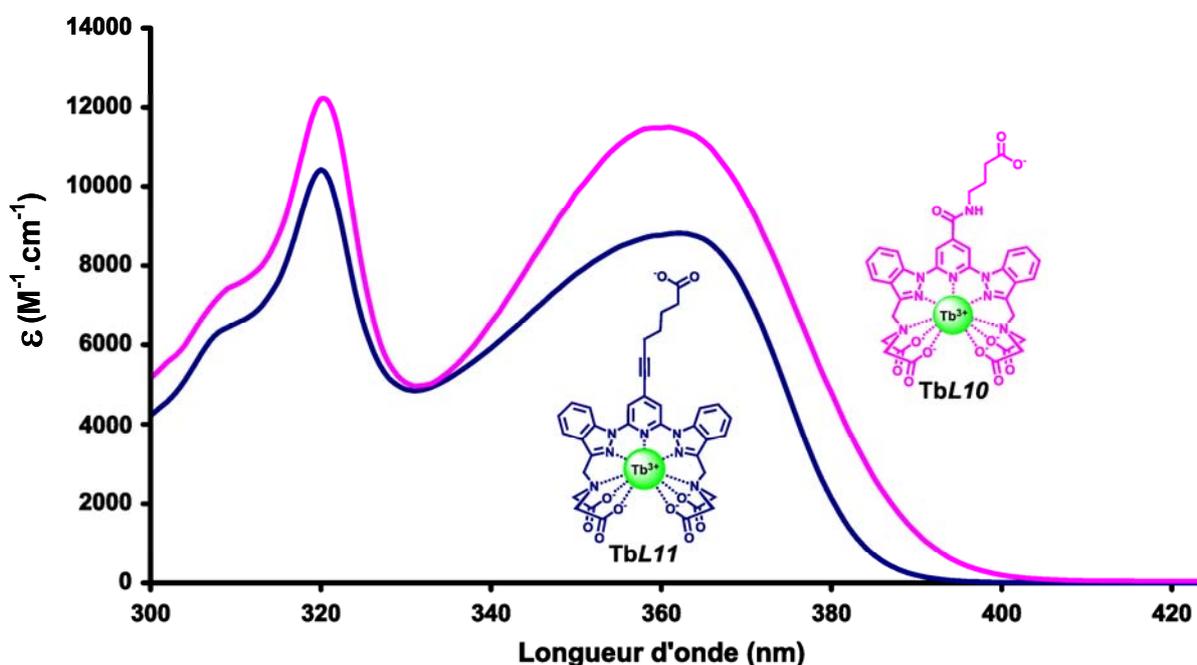


Figure 4.3. Superposition des spectres d'absorption UV/Visible des complexes **TbL10** et **TbL11** en solution aqueuse ($c = 5 \times 10^{-5}$ M, Tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).

L'excitation des complexes dans la bande de plus basse énergie ($\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm) permet d'obtenir les spectres d'émissions caractéristiques des lanthanides utilisés. La Figure 4.4 illustre cette observation avec le complexe d'euprium **EuL10**. Le spectre d'excitation obtenu pour une émission à $\lambda = 615$ nm est superposable au spectre d'absorption et montre ainsi que l'émission observée à partir de l'euprium provient bien d'un transfert d'énergie de l'état excité du ligand vers les états excités luminescents des ions Eu^{3+} .

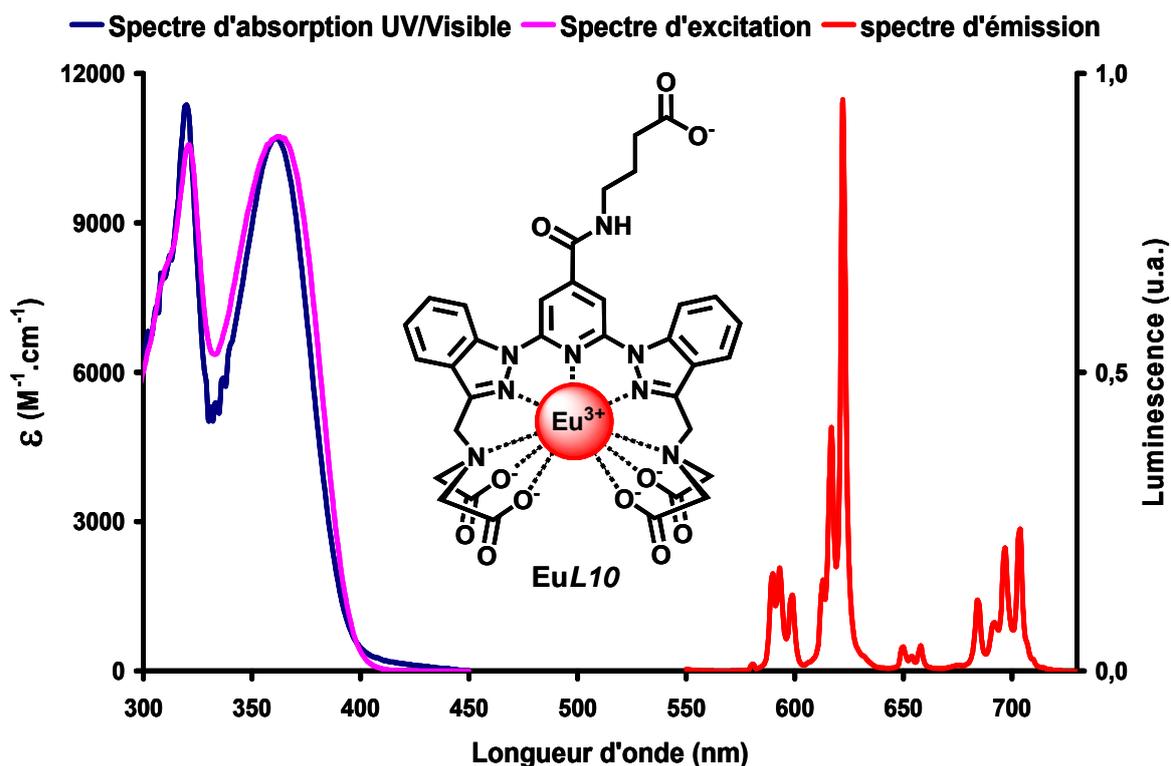


Figure 4.4. Superposition des spectres d'absorption, d'excitation ($\lambda_{exc} = 615 \text{ nm}$) et d'émission ($\lambda_{em} = 360 \text{ nm}$, résolution : 5\AA , filtre passe haut 390 nm) du complexe **EuL10** en solution aqueuse ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, Tampon Tris/HCl, $0,01 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$).

Les données photophysiques des complexes sont résumées dans le *Tableau 4.1*

Tableau 4.1 Propriétés photophysiques des complexes **EuL10, **TbL10** et **TbL11** en solution aqueuse.**

Complexes de lanthanide	Absorption		Emission				
	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ (ms)		ϕ (%)		q
			H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	
EuL10	320	11400	1,1	1,8	16 ^a	34 ^a	0,3 ^c ; 0,1 ^d ; 0 ^e
	360	10700					
TbL10	320	12700	0,7	1,1	25 ^b	46 ^b	-
	360	11400					
TbL11	320	11400	0,9	1,4	35 ^b	55 ^b	-
	360	8800					

a) mesuré par rapport au $[\text{Ru}(\text{Bipy})_3]\text{Cl}_2^{49}$, b) mesuré par rapport à R6G^{50} , c) calculé selon Horrocks et Sudnick⁵², d) calculé selon Parker et al.⁵⁴, e) calculé selon Horrocks et Supkowski⁵⁵

Le complexe d'euprium **EuL10** présente des propriétés intéressantes avec des temps de vie de luminescence dans l'eau et dans le D₂O au delà de la milliseconde (1,1 ms et 1,8 ms respectivement). Le rendement quantique de ce complexe est bon ($\phi_{\text{H}_2\text{O}} = 16 \%$), ce qui suggère une bonne protection de l'ion europium dans la cavité complexante. Cette

observation est confirmée par la détermination du nombre d'hydratation q indiquant qu'aucune molécule d'eau n'est présente en première sphère de coordination de l'euporium.

Le complexe de terbium **TbL10** a des propriétés spectroscopiques inattendues. Son rendement quantique de luminescence de 25 % dans l'eau est singulièrement différent de la valeur observée pour une fonction amide en position para de la pyridine centrale substituée en position 2 et 6 par des pyrazoles (94 % pour le complexe **TbL6**). Ce résultat peut s'expliquer par le phénomène de transfert en retour du terbium vers le ligand.⁵⁶ En effet, l'augmentation de la délocalisation électronique apportée par les indazoles diminue le niveau énergétique de l'état triplet T^1 du chromophore permettant un transfert d'énergie en retour de l'état émetteur du lanthanide vers l'état triplet T^1 .

Le complexe **TbL11** présente un bon rendement quantique de luminescence (35 %), le temps de vie de ce complexe reste cependant faible comparé aux temps de vie des complexes basés sur le chromophore bispyrazolylpyridine. Il n'est pas à exclure ici que le phénomène de transfert ait également lieu.

La détermination du nombre de molécule d'eau en première sphère basée sur les temps de vie mesurés ici n'a donc pas de sens car les différentes équations définies dans le chapitre 2 ne prennent pas en compte l'effet du transfert en retour sur le temps de vie de luminescence.

Malgré ces observations, les complexes **TbL10** et **TbL11** ont des temps de vie de luminescence suffisamment longs pour permettre leur utilisation pour les dosages fluoroimmunologiques en temps résolu. Les brillances de ces nouveaux complexes ont été comparées à la brillance du complexe **TbL6** (Tableau 4.2)

Tableau 4.2. Comparaison des valeurs de brillance des complexes EuL10, TbL10 et TbL11 avec la valeur de brillance du complexe TbL6.

complexes	λ_{abs} (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ_{H_2O} (%)	Brillance ($M^{-1}.cm^{-1}$)
TbL6	327	6900	94	6486
EuL10	360	10700	16	1712
TbL10	360	11400	25	2850
TbL11	360	8800	35	3080

Ces données montrent que ces complexes ont une brillance nettement inférieure à celle du complexe **TbL6**. Cependant les valeurs de brillance obtenues sont supérieures à 1000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Ces complexes sont donc des candidats potentiels pour le marquage de matériel biologique. Le dernier paramètre à prendre en compte pour leur utilisation en milieu biologique est leur stabilité en milieu aqueux. Une série de tests qualitatifs de stabilité ont été réalisés sur le complexe **TbL10**.

- Tests qualitatifs de stabilité

L'étude de la stabilité de la poche de complexation bisindazolyropyridine a été effectuée de manière qualitative avec le complexe **TbL10** (Figure 4.5) dans différents tampons à pH = 7,0. Les résultats de ces tests sont résumés dans le *Tableau 4.3*.

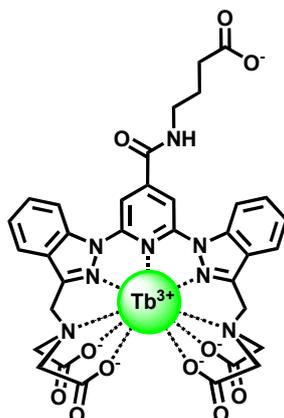


Figure 4.5. Structure du complexe TbL10.

Tableau 4.3. Données photophysiques durant le test qualitatif de stabilité du complexe TbL10 dans différents tampons à pH = 7,0 ($c = 5 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{exc} = 360$ nm, filtre passe haut 395 nm).

Tampon, pH = 7,0	λ_{max} (nm)	ϵ ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	ϕ_{H_2O} (%)	τ (ms)
Tris/HCl 0,01 M	320	12100	22%	0,67
	360	10800		
Tris/HCl 0,01 M + 10mM EDTA	320	Dissociation totale		
	360			
Tris/HCl 0,01 M + 0.4 M KF	320	Dissociation totale		
	360			
Phosphate 0,1 M	320	Dissociation totale		
	360			
H ₂ O	320	12700	25%	0,73
	360	11500		

La dissociation totale du complexe est observée en présence d'EDTA, de KF et de Phosphate, révélant la faible stabilité des complexes en milieu biologique. Cette diminution de la stabilité dans les différents tampons testés peut être associée à l'augmentation de l'encombrement stérique entre les cycles benzyliques des entités indazoles et les protons en position méta de la pyridine centrale. Cette gêne stérique empêche la coplanarité de la pyridine et des entités indazoles du chromophore bisindazolyropyridine, rendant les interactions entre le cation et le chromophore tridentate très faible. Le cation peut donc être très facilement décomplexé.

4.2. Optimisation de la stabilité de la cavité complexante

Les complexes présentés dans le chapitre 2 sont stables en milieu aqueux. Cependant, les tests de marquage effectués en milieu biologique (chapitre 3) montrent une décomplexation partielle ou totale du lanthanide. Une modification de la cavité complexante est donc nécessaire pour augmenter la stabilité des complexes en milieu biologique. Au vue de la grande affinité entre les lanthanides et des ligands mono- et di-phosphonates,⁹⁹ nous avons voulu introduire des entités phosphonates sur la poche coordinante.

Les premiers essais que nous avons réalisés dans cette étude ont été effectués à partir de la 2,6-dibromométhyl-pyridine, beaucoup plus simple que le chromophore bispyrazolylpyridine, ce qui nous a permis de mettre au point la méthodologie de synthèse pour l'introduction de deux ou quatre entités phosphonates sur la poche complexante et de préparer les ligands **L12** et **L13** (Figure 4.6).

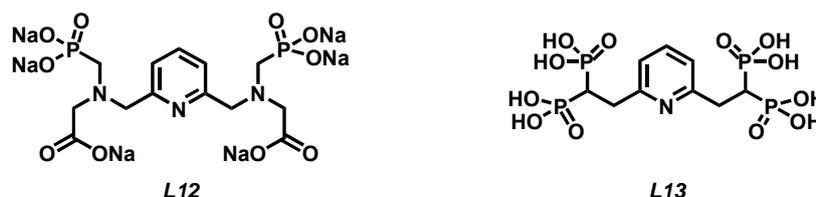


Figure 4.6. Structures moléculaires des ligands **L12** et **L13**.

Puis, nous avons transposé cette méthodologie sur le chromophore bispyrazolylpyridine afin d'obtenir les ligands **L14** et **L15** (Figure 4.7).

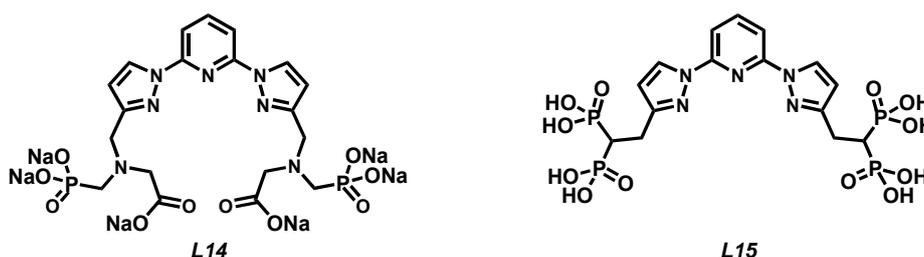


Figure 4.7. Structures moléculaires des ligands **L14** et **L15**.

La seconde partie est l'étude des propriétés photophysiques des complexes obtenus à partir de ces ligands.

⁹⁹ a) Comby, S.; Imbert, D.; Chauvin, A.-S.; Bunzli, J.-C. G.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F.; *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 7369. b) Alexandratos, S. D.; Trochimczuk, A. W.; Crick, D. W.; Horwitz, E. P.; Gatrone, R. C.; Chiarizia, R.; *Macromolecules*, **1996**, *29*, 1021.

4.2.1. Synthèse des ligands L12, L13, L14 et L15

Pour réaliser l'incorporation de deux ou quatre entités phosphonates sur la poche de complexation, il est nécessaire de remplacer les bras iminodiacétates par des bras amine-N,N-(carboxyméthyle)(méthylène)phosphonate) ou glyphosates, et méthylène diphosphonates respectivement.

4.2.1.1. Utilisation du bras glyphosate : Synthèse du ligand L12

La synthèse du ligand **L12** se fait en 2 étapes. La première étape est la synthèse du précurseur **57** du bras glyphosate. La seconde étape est la substitution nucléophile des bromes de la 2,6-dibromométhyl-pyridine **62**¹⁰⁰ par le composé mixte **57**.

- Préparation du précurseur 57 du bras glyphosate :

Cette étape est l'étape clé pour la préparation du ligand **L12**. La synthèse du bras glyphosate (*Schéma 4.5*) commence par la substitution nucléophile du groupement alcool du diéthyle hydroxyméthylphosphonate **54** avec l'anhydride triflique tel que cela a été décrit dans la littérature,¹⁰¹ pour former le composé **55**, avec un rendement de 80 %. Deux voies de synthèse sont alors envisageables. La voie A permet d'obtenir le composé **57** en une étape par la substitution nucléophile du groupement triflate de **55** par la glycine ester **56** en présence de DIEA dans du DCM anhydre, pour former le glyphosate d'éthyle **57** avec un rendement de 45 % après purification par chromatographie sur colonne. La voie B, inspirée des travaux de Aime *et al.*,¹⁰² permet d'obtenir **57** en trois étapes. La première étape est la substitution nucléophile du groupement triflate de **55** par la benzylamine **58** dans du DCM anhydre pour former l'amine secondaire **59** avec un rendement de 81 % après purification sur colonne. Le composé **59** réagit ensuite avec le bromoacétate d'éthyle **60**, en présence de K₂CO₃, pour former le précurseur **61** avec un rendement de 93 % après purification par chromatographie sur colonne. Ce composé est ensuite débenzylé par hydrogénation avec du formate d'ammonium, en présence de palladium (10 %) sur charbon pour donner **57** avec un rendement de 85 %.

¹⁰⁰ Baker, W.; Buggle, K. M.; McOmie, J. F. W.; Watkins, D. A. M.; *J. Chem. Soc.*, **1958**, 3594.

¹⁰¹ Xu, Y.; Flavin, M. T.; Xu, Z.-Q.; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 7697.

¹⁰² Aime, S.; Botta, M.; Garino, E.; Crich, S. G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sisti, M.; *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 2609.

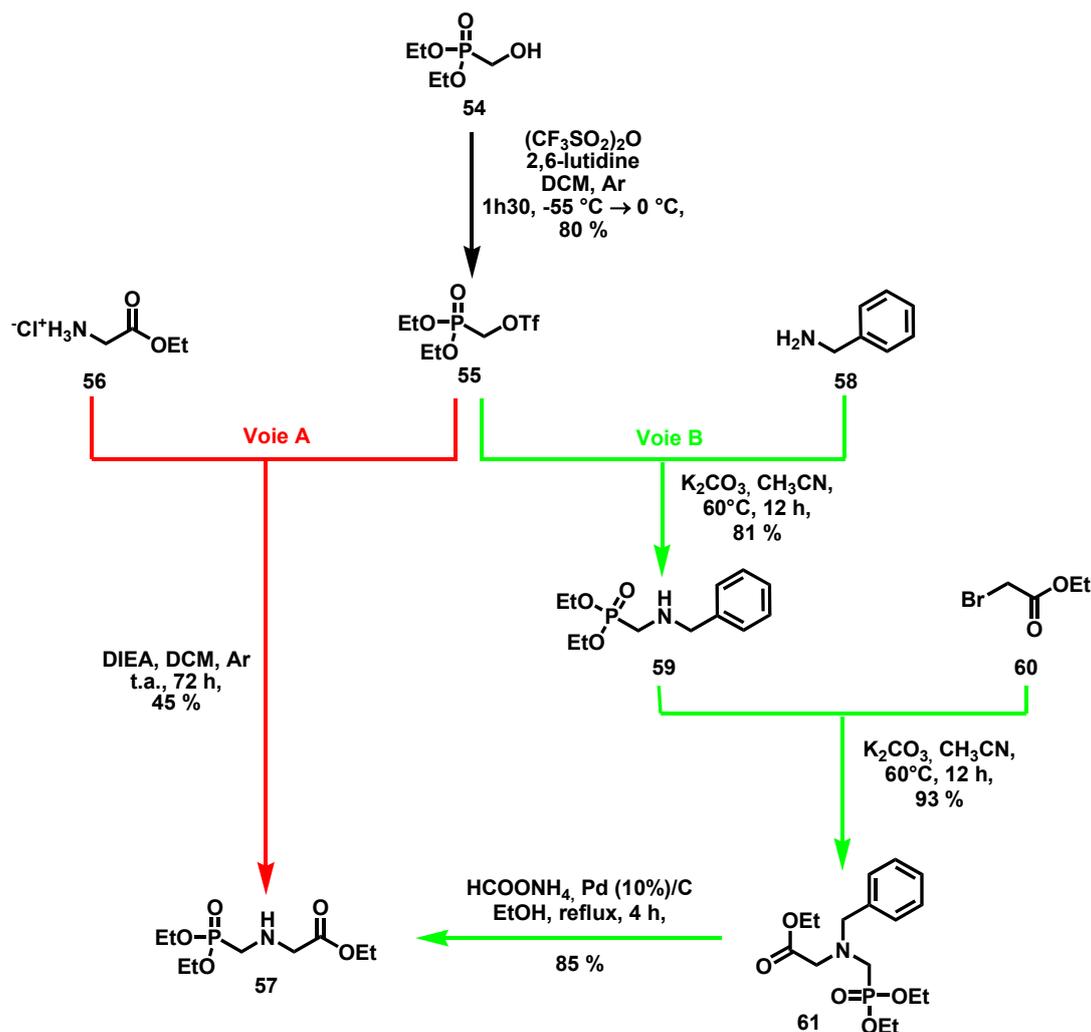


Schéma 4.5. Différentes voies de synthèse du précurseur **57**.

La voie A présente l'avantage d'obtenir directement le précurseur **57**. Cependant la purification sur colonne de ce composé est difficile à cause de sa polarité et de l'absence de chromophore facilitant le suivi de la purification. Ces remarques expliquent l'obtention du composé **57** avec un rendement global de 36 %. La voie B est plus longue, mais les étapes de purifications sont bien plus simples car les intermédiaires sont beaucoup moins polaires et la présence du chromophore benzyle facilite grandement le suivi des différentes étapes de purification. Cette voie de synthèse permet d'obtenir le composé **57** avec un rendement global de 64 %.

- Synthèse de **L12** :

La synthèse du ligand **L12** se fait en 3 étapes à partir de la 2,6-dibromométhyl-pyridine **62** et du composé **57** (Schéma 4.6).

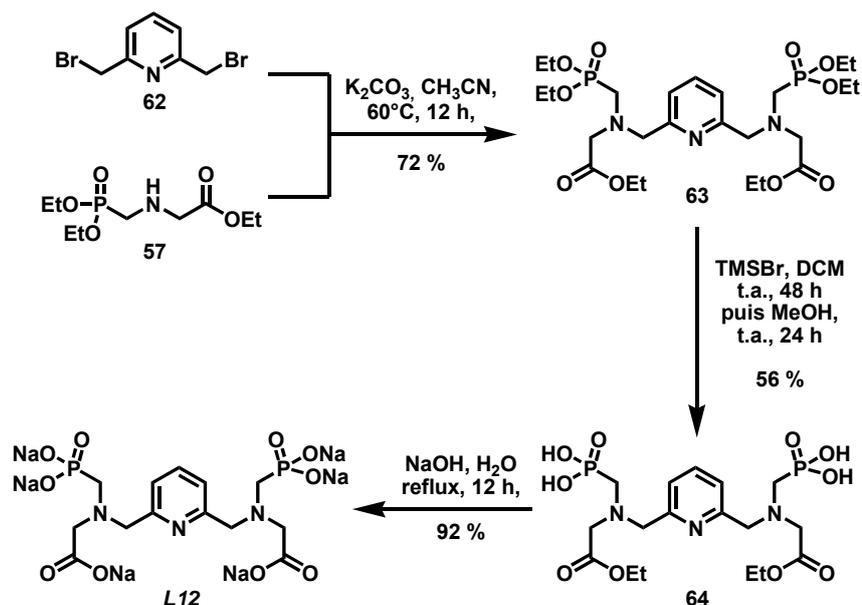


Schéma 4.6. Synthèse du ligand **L12**.

La première étape est la substitution nucléophile des atomes de brome de **62** par **57** en présence de K_2CO_3 pour former le composé **63** avec un rendement de 72 % après purification par chromatographie sur colonne. La déprotection des groupements diéthyle-phosphonates de **63** est ensuite réalisée en présence de TMSBr dans du DCM,¹⁰³ et permet d'obtenir le diester **64** avec 56 % de rendement après neutralisation dans du méthanol et précipitation avec Et_2O . La saponification des groupements esters de **64** avec une solution de NaOH dans l'eau permet d'obtenir **L12** avec un rendement de 92 % après précipitation dans le méthanol par ajouts successifs de THF et d' Et_2O .

4.2.1.2. Utilisation du bras méthylène diphosphonate : synthèse du ligand **L13**

La voie la plus simple pour obtenir le ligand **L13** est d'utiliser le tétraéthyle méthylènediphosphonate **65** (Schéma 4.7) et le composé **62**. La première étape de cette synthèse est la préparation *in-situ* de l'anion **66**, à partir de **65** dans du THF anhydre, en présence de NaH comme décrit dans la littérature,¹⁰⁴ suivie par une addition progressive de **62** pour synthétiser l'intermédiaire **67** avec un rendement de 20 % après purification par chromatographie sur colonne. La déprotection des quatre groupements diéthyle-phosphonates est effectuée par TMSBr pour donner **L13** sous sa forme acide avec un rendement de 82 % après précipitation dans le méthanol par addition progressive d' Et_2O .

¹⁰³ Gajda, A.; Gajda, T.; *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1233.

¹⁰⁴ Chaleix, V.; Lecouvey, M.; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 703.

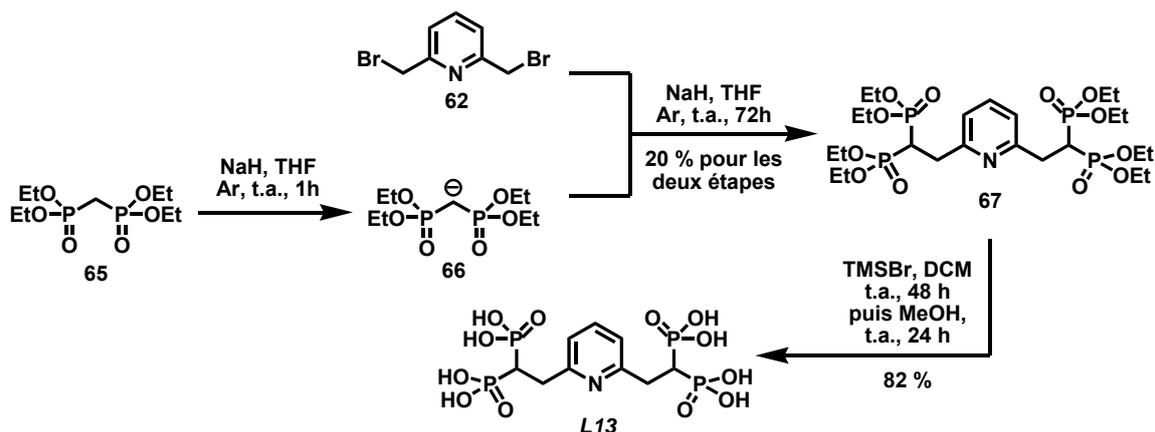


Schéma 4.7. Synthèse du ligand L13.

4.2.1.3. Transposition des méthodologies de synthèse : synthèses des ligands L14 et L15

Les méthodologies de synthèse développées pour les ligands L12 et L13 ont été appliquées sur le chromophore bispyrazolypyridine 20 pour préparer les ligands L14 et L15.

- Utilisation du bras glyphosate : synthèse du ligand L14

La synthèse du ligand L14 se fait en trois étapes à partir du composé 20 et du précurseur 57 des bras glyphosate (Schéma 4.8).

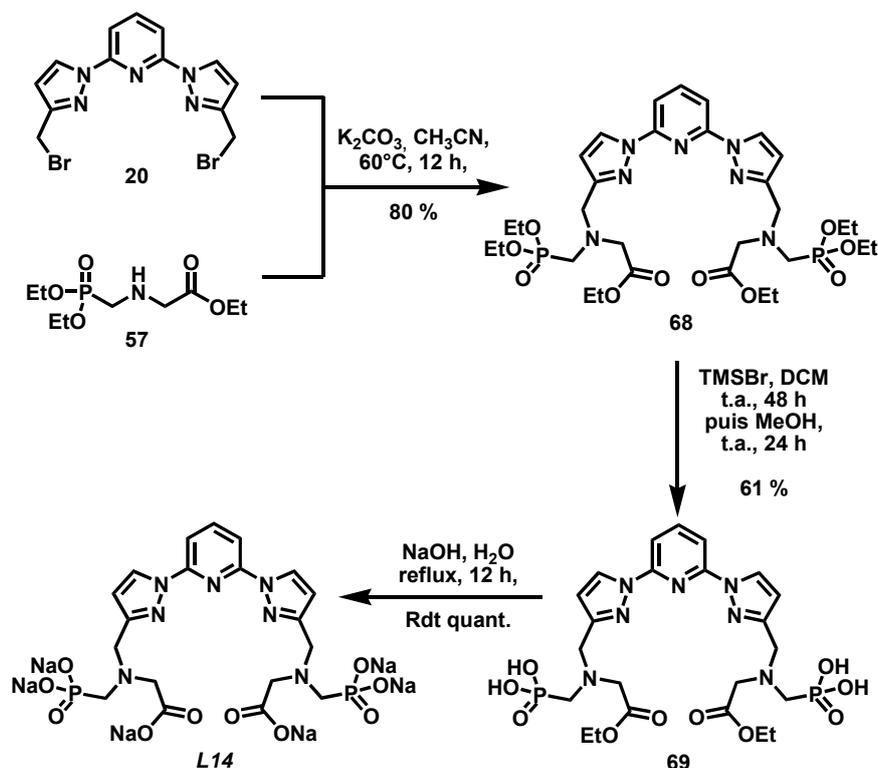


Schéma 4.8. Synthèse du ligand L14.

La première étape est la substitution nucléophile des atomes de brome de **20** par **57**, en présence de K_2CO_3 pour former le composé **68** avec un rendement de 80 % après purification par chromatographie sur colonne. Les groupements diéthyle-phosphonates sont sélectivement hydrolysés en utilisant $TMSBr$ dans du DCM . Le composé **69** est isolé après précipitation dans le méthanol par Et_2O . La saponification des esters éthyliques de l'intermédiaire **69** en présence d'une solution de $NaOH$ permet d'isoler le ligand **L14** avec un rendement quantitatif après précipitation dans le méthanol par THF et de Et_2O .

- Utilisation du bras méthylène diphosphonate : synthèse du ligand **L15**

La synthèse du ligand **L15** (Schéma 4.9) commence par la préparation *in-situ* de l'anion **66**, dans les mêmes conditions que décrites précédemment, puis l'addition progressive du composé **20** sur l'anion **66** permet d'obtenir le composé **70** avec un rendement de 20 % après purification par chromatographie sur colonne. Après la déprotection des groupements diéthyle-phosphonates avec $TMSBr$, le ligand **L15** est isolé sous sa forme acide avec un rendement de 80% par précipitation avec Et_2O .

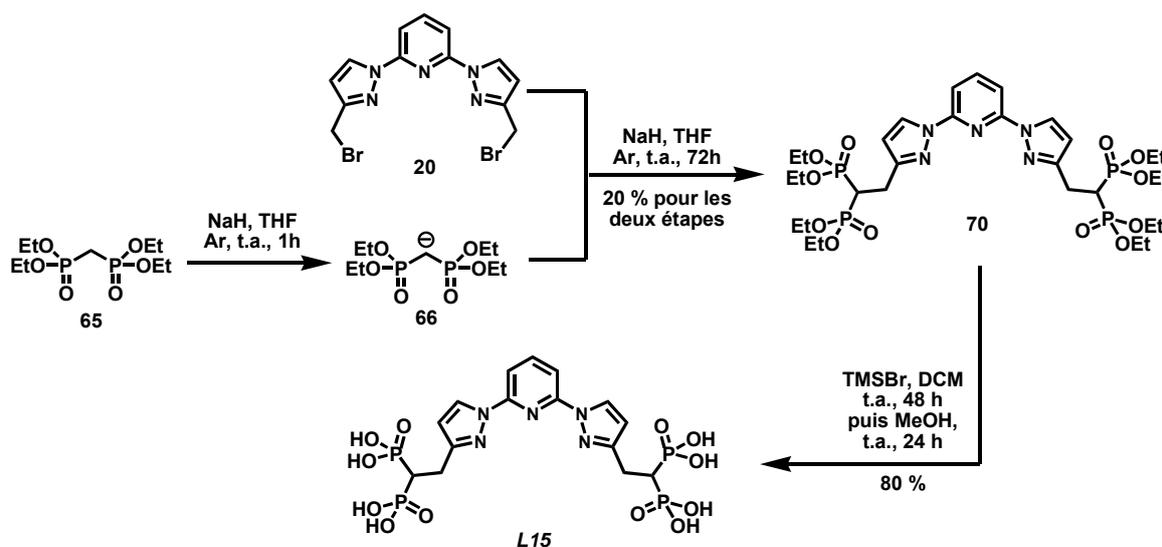


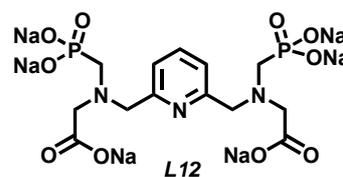
Schéma 4.9. Synthèse du ligand **L15**.

4.2.2. Etude des propriétés photophysiques des ligands et des complexes

4.2.2.1. Etude des propriétés photophysiques du ligand **L12**

Les dosages d'une solution de **L12** ($c = 0,96 \times 10^{-4}$ M dans $Tris/HCl$, 0,1 M, $pH = 7,0$) par des solutions de sel de terbium ($TbCl_3 \cdot 6H_2O$, $c = 7,67 \times 10^{-3}$ M) et de sel d'euporium ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$, $c = 1,01 \times 10^{-3}$ M) ont permis de déterminer les

différents processus mis en jeu dans la réaction de complexation entre le ligand et les ions lanthanides.



- Dosage UV/Visible du ligand L12

La Figure 4.8 montre l'évolution des spectres d'absorption UV/Visible de la solution de **L12** en fonction de l'ajout de la solution de terbium. En solution aqueuse, à pH neutre, le ligand libre montre une forte bande d'absorption à $\lambda = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon_{260\text{nm}} = 2200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) correspondant aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur la pyridine.⁶ Au fur et à mesure que la solution de terbium est ajoutée, la bande d'absorption à $\lambda = 260 \text{ nm}$ se déplace vers 267 nm ($\epsilon_{267\text{nm}} = 2150 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Ce déplacement bathochrome résulte de la complexation du ligand **L12** par l'ion Tb^{3+} . Au-delà de un équivalent, la bande d'absorption à 267 nm s'élargit. Cet élargissement est probablement dû à la diffraction de la lumière provoquée par la formation d'agrégats dans le milieu.

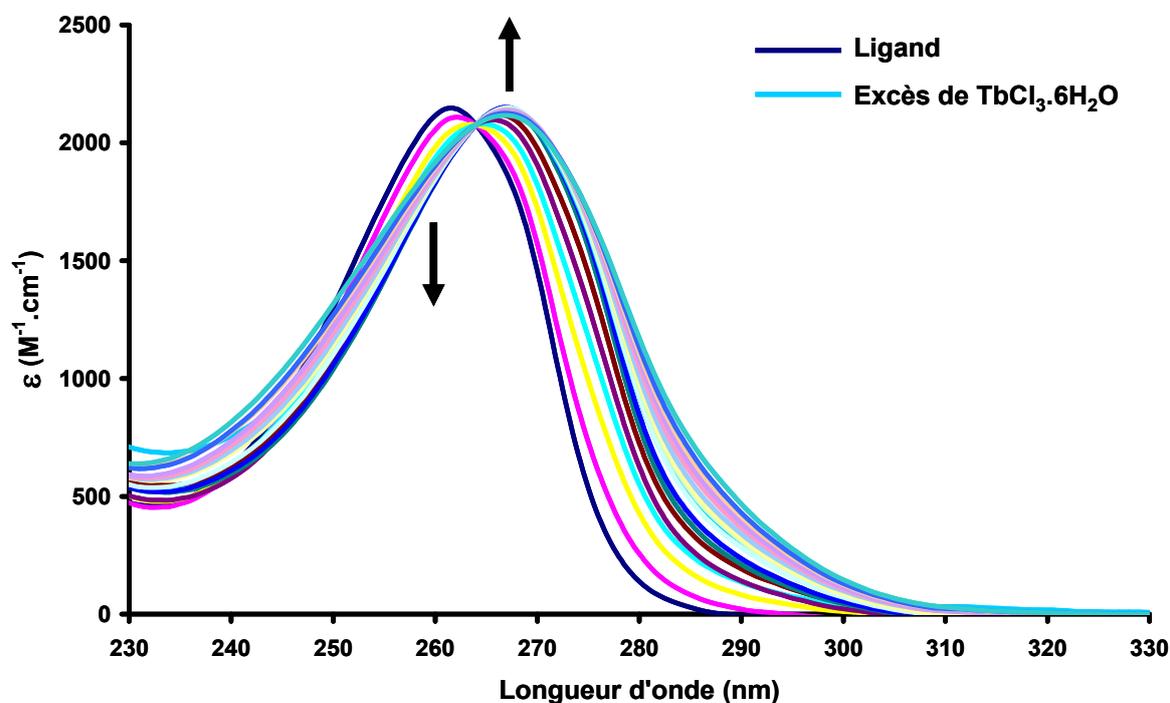


Figure 4.8. Evolution de l'absorption UV/Visible du ligand **L12** ($c = 0,96 \times 10^{-4} \text{ M}$) lors du dosage avec une solution de $\text{TbCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 7.67 \times 10^{-4} \text{ M}$) dans le tampon Tris/HCl , $0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$.

Le profil du dosage de la solution du ligand **L12** par la solution d'europlum est similaire à celui du dosage du ligand **L12** avec la solution de terbium (Figure 4.9). La bande d'absorption du ligand libre à $\lambda = 260 \text{ nm}$ ($\epsilon_{260\text{nm}} = 2200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) est déplacée à $\lambda = 267 \text{ nm}$ ($\epsilon_{267\text{nm}} = 2220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) lors de l'ajout de la solution d'europlum. Comme nous l'avons remarqué pour le dosage avec la solution de terbium, pour un excès d'europlum un élargissement de la bande d'absorption du complexe est également observé.

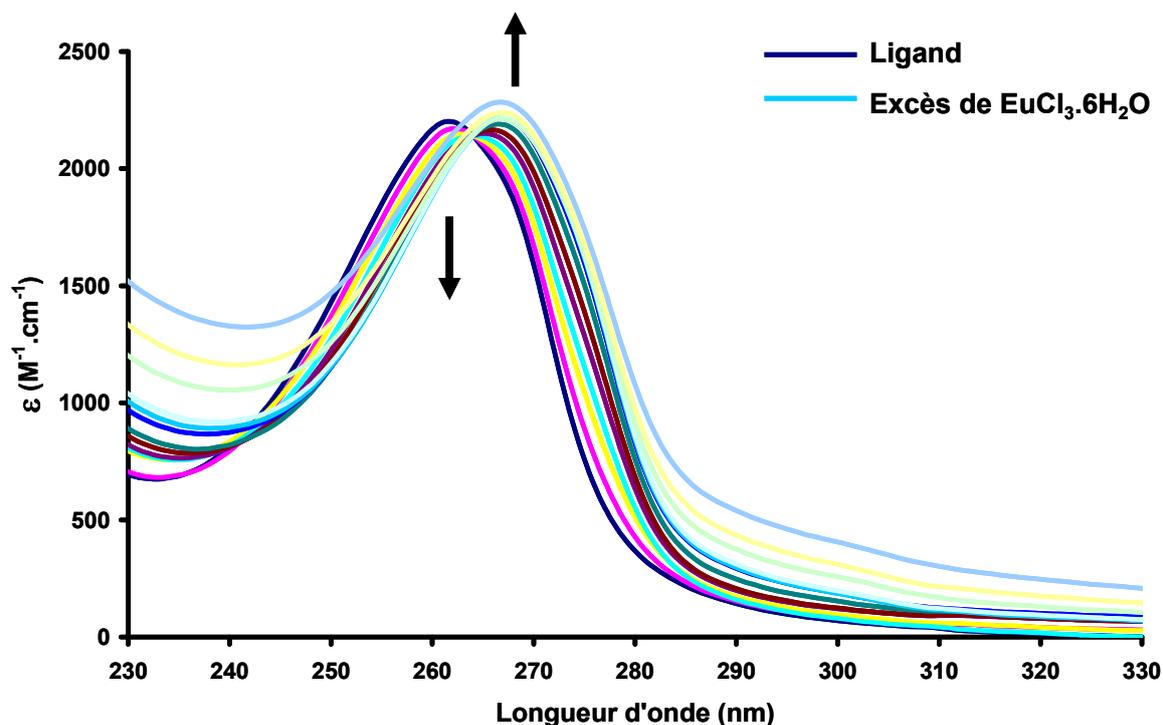


Figure 4.9. Evolution de l'absorption UV/Visible de L12 ($c = 0,96 \times 10^{-4} \text{ M}$) lors du dosage avec une solution de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1,01 \times 10^{-3} \text{ M}$) dans Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0).

- Dosage fluorométrique du ligand L12

L'évolution de la luminescence des bandes d'émission du terbium pendant le dosage est représentée (Figure 4.10).

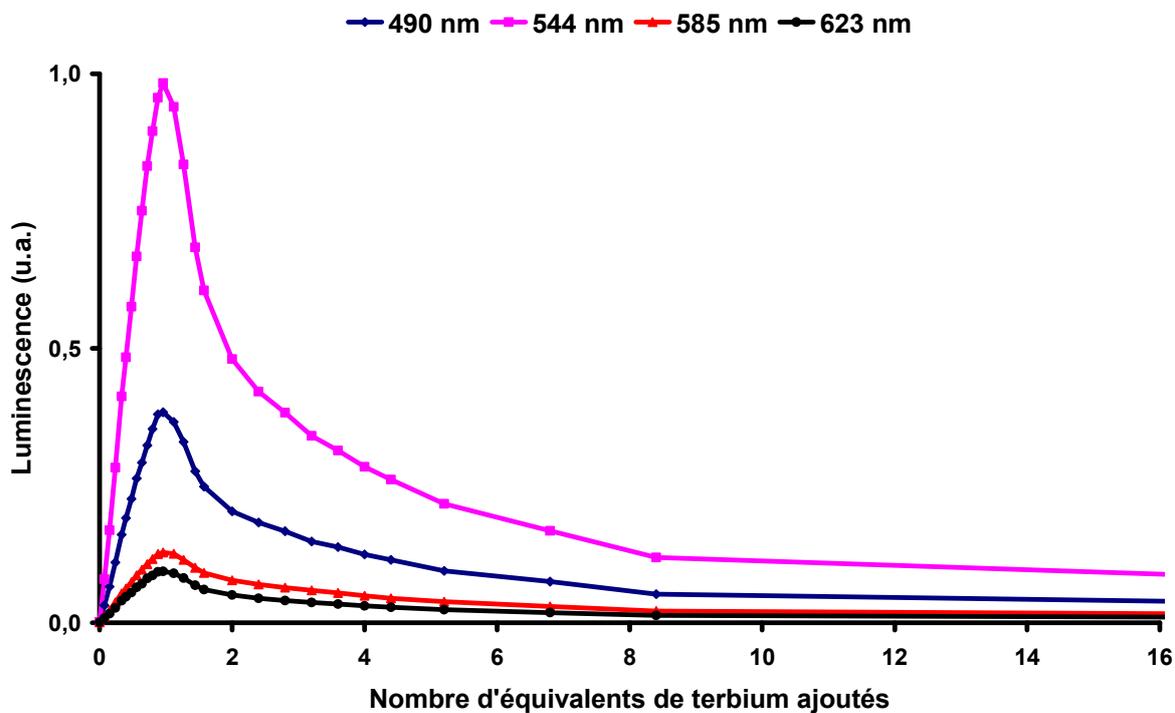


Figure 4.10. Evolution de l'intensité de la luminescence pour différentes bandes d'émission du terbium ($\lambda_{exc} = 267 \text{ nm}$, filtre passe haut 395 nm) lors du dosage du ligand L12 ($c = 0,96 \times 10^{-4} \text{ M}$, dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0) par une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,82 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Jusqu'à 1 équivalent de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pour chaque bande d'émission du terbium, la luminescence augmente rapidement de façon linéaire. Après 1 équivalent, la luminescence est fortement diminuée jusqu'à 2 équivalents de terbium ajoutés puis la décroissance de la luminescence se ralentit.

L'analyse de ce dosage par le logiciel SPECFIT¹⁰⁵ (Figure 4.11), montre d'après l'analyse factorielle, que l'évolution des spectres correspond à la présence d'une espèce 1/1 $\text{Tb}^{\text{III}}/\text{L12}$ jusqu'à 1 équivalent. La décroissance rapide observée entre 1 et 2 équivalents correspond à la formation d'une espèce 3/2 $\text{Tb}^{\text{III}}/\text{L12}$. Au delà de 2 équivalents, l'espèce 3/2 disparaît et une espèce 2/1 $\text{Tb}^{\text{III}}/\text{L12}$ apparaît.

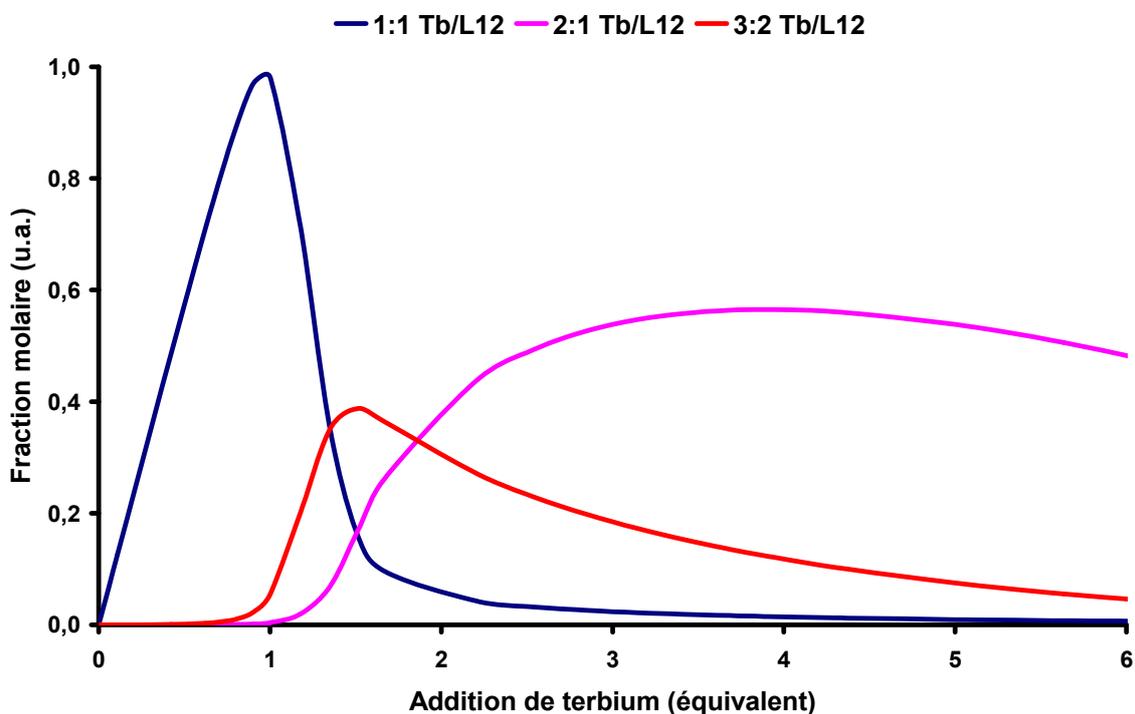


Figure 4.11. Diagramme de distribution des espèces pour le système TbL12 obtenu par analyse factorielle avec le programme SPECFIT¹⁰⁵ pour le dosage fluorométrique du ligand L12 ($c = 0,96 \times 10^{-4} \text{ M}$, dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0) par une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,82 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Les observations faites grâce au calcul de SPECFIT sont décrites schématiquement sur la Figure 4.12. Elles ont été confirmées par les mesures des temps de vie de luminescence effectuées durant le dosage. Expérimentalement, jusqu'à 1 équivalent de terbium, le déclin de la luminescence est mono-exponentiel avec un temps de vie $\tau_1 = 1,47 \text{ ms}$ correspondant à l'espèce 1/1. Après l'équivalence, l'excès de terbium favorise la formation de l'espèce 3/2. Le déclin de la luminescence est mono-exponentiel avec un temps de vie $\tau_2 = 1,14 \text{ ms}$. Puis un large excès de terbium provoque la formation de l'espèce 2/1 avec un temps de vie

¹⁰⁵ Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D.; *Talanta*, **1985**, 32, 251.

$\tau_3 = 0,47$ ms au détriment de l'espèce 3/2 qui tend à disparaître au fur et à mesure que le terbium est ajouté.

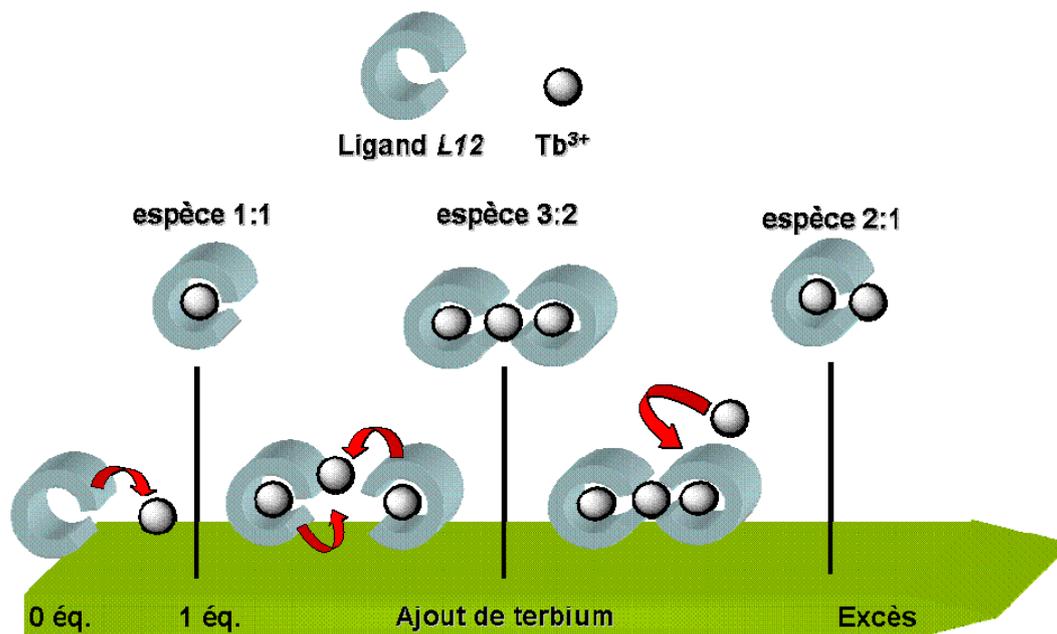


Figure 4.12. Description schématique de la formation des différentes espèces 1:1, 3:2, et 2:1 au cours du dosage du ligand L12 par les sels de terbium.

L'évolution de la luminescence pour le dosage avec la solution d'euporium a le même profil que pour le dosage du ligand L12 par la solution de terbium (Figure 4.14).

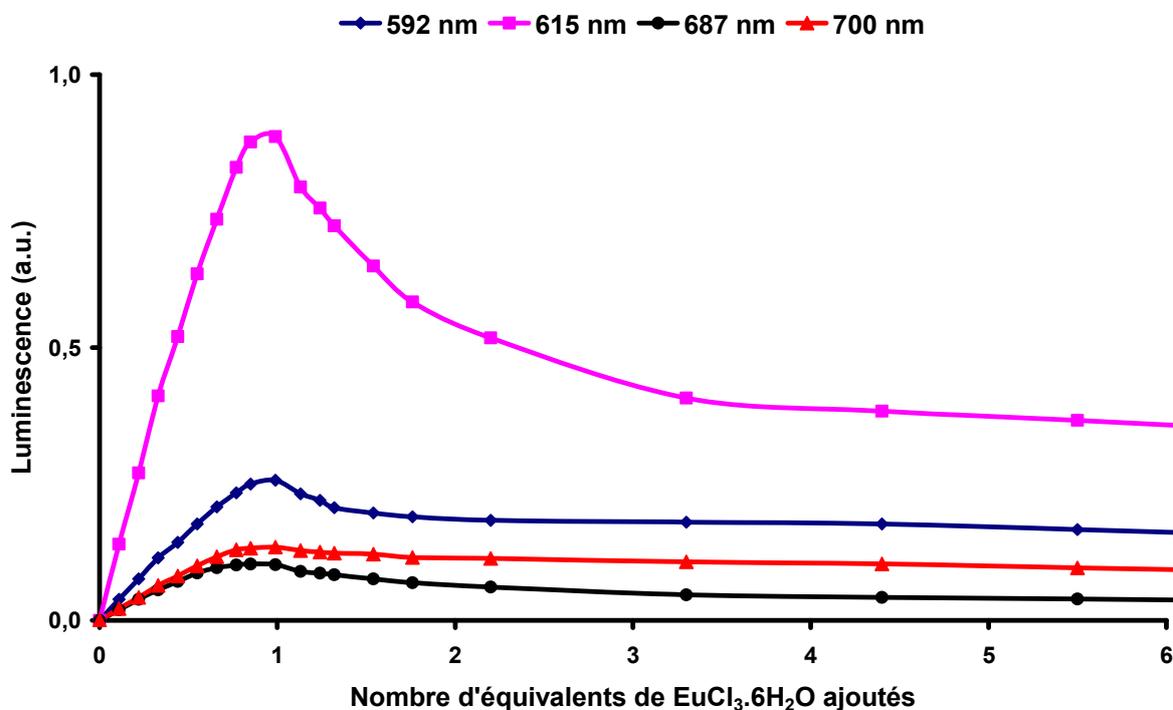


Figure 4.13. Evolution de l'intensité de luminescence pour différentes bandes d'émission de l'euporium ($\lambda_{exc} = 267$ nm, filtre passe haut 395 nm) lors du dosage du ligand L12 ($c = 0,96 \times 10^{-4}$ M) par une solution de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1,01 \times 10^{-3}$ M) dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0.

Cependant le déclin de la luminescence au cours du dosage est plus compliqué à interpréter. Jusqu'à 1 équivalent, le déclin de la luminescence est bi-exponentiel, avec un temps de vie $\tau_1 = 0,45$ ms et un second temps de vie plus long $\tau_2 = 0,80$ ms. De 1,1 équivalents à 2,2 équivalents, le déclin de la luminescence est bis-exponentiel avec les temps de vie de $\tau_3 = 0,29$ ms et $\tau_4 = 0,52$ ms. Au-delà de 2,2 équivalents, le déclin de la luminescence est bi-exponentiel, avec des temps de vie $\tau_5 = 0,18$ ms et $\tau_6 = 0,40$ ms.

L'analyse de l'évolution des spectres d'émission avec le logiciel SPECFIT n'a pas permis l'identification des différentes espèces observées dans ce dosage. Nous n'avons donc pas pu faire de corrélations avec les résultats observés dans le cas du dosage avec la solution de terbium.

Cependant, cette évolution complexe du déclin de la luminescence au cours de ce dosage suggère que deux mécanismes de complexation se déroulent simultanément. Le premier mécanisme peut être la formation des espèces observées durant le dosage avec les sels de terbium. Le second mécanisme peut être la formation d'isomères de configuration.

En effet, l'évolution du rayon ionique le long de la série des lanthanides pour un degré d'oxydation III et pour un nombre de coordination de 9⁶⁶ montre que le rayon ionique de l'ion Eu^{3+} est sensiblement plus grand (1,120 Å) que celui de l'ion Tb^{3+} (1.095 Å).

Par analogie avec l'étude de la structure moléculaire du complexes **TbL7** en solution (Chapitre 2), effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr. Carlos Platas-Iglesias,⁵⁷ on peut penser que dans le cas du terbium, l'équilibre entre le volume occupé par le cation et la taille de la cavité complexante est optimale.

Dans le cas de l'euprium, le rayon ionique étant un plus grand, il est raisonnable de penser que le cation se situe plus vers les bras glyphosates que vers la pyridine. Le rayon ionique du cation favoriserait un espacement des bras plus important que dans le cas du terbium, diminuant ainsi les interactions entre les groupements carboxylates et phosphonates des bras glyphosates.

Les interactions moins fortes au niveau des ces groupements pourraient favoriser la formation de différents isomères par réarrangements des bras glyphosates autour de l'ion Eu^{3+} (*Figure 4.14*).

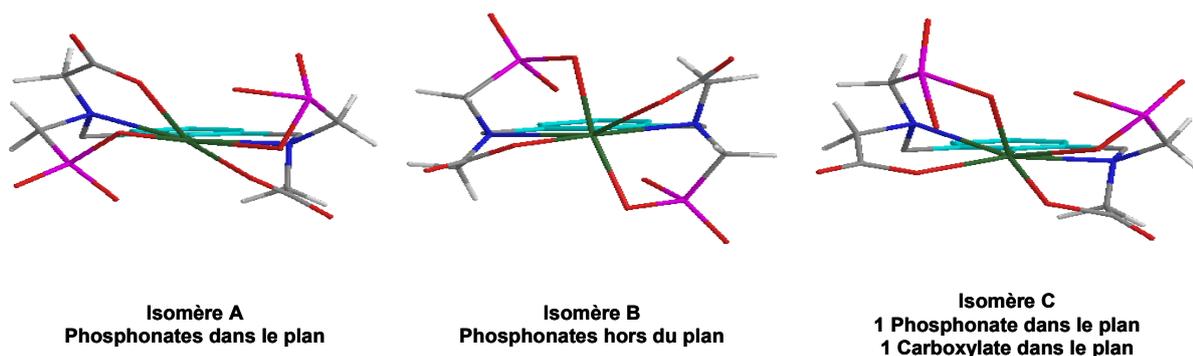


Figure 4.14. Représentation d'isomères possibles pour le complexe EuL12. Modélisation des configurations d'énergie minimales obtenues avec le logiciel Chem3D. L'euporium est représenté en vert, les oxygènes en rouge, les azotes en bleu foncé, les phosphores en violet, les carbones en gris, la pyridine en bleu clair et les hydrogènes en blanc. Les phosphores sont monodentates, conformément aux études antérieures.¹⁰⁶

Avec ce postulat, une explication du déclin de la luminescence complexe observé pour le système **EuL12** peut être faite. Jusqu'à 1 équivalent, les temps de vie de luminescence $\tau_1 = 0,45$ ms et $\tau_2 = 0,80$ ms peuvent être attribués aux espèces isométriques 1/1 Eu/**L12**. L'un de ces isomères ayant la configuration la moins favorable, un réarrangement rapide doit s'opérer vers les autres isomères moins encombrés. Du fait de la rapidité de ce réarrangement, le temps de vie de cet isomère n'est pas mesurable. La détermination des proportions des espèces luminescentes pour chaque mesure de temps de vie montre un mélange d'isomères dans les proportions 70:30 (70 % pour l'isomère avec $\tau_1 = 0,45$ ms). La différence non négligeable entre les temps de vie τ_1 et τ_2 montre que la position des phosphonates dans le plan ou hors du plan de la pyridine influe sur la protection de l'ion métallique dans la cavité complexante de son environnement, notamment des molécules d'eau venant se coordonner en première sphère de l'euporium.

Entre 1,1 et 2 équivalents, les temps de vie de $\tau_3 = 0,29$ ms et $\tau_4 = 0,52$ ms laissent supposer la formation des espèces 3/2 Eu/**L12** formées à partir des isomères A et B.

Enfin, pour un large excès d'euporium, les temps de vie $\tau_5 = 0,18$ ms et $\tau_6 = 0,40$ ms correspondent à la formation des espèces 2/1 Eu/**L12**.

Il est à noter que l'explication faite pour le système **EuL12** est hypothétique. Des analyses complémentaires sont à envisager afin de détailler avec exactitude ce mécanisme complexe, car la détection du troisième isomère tout au long du dosage n'est pas faisable avec l'appareillage à notre disposition (la déconvolution du déclin de la luminescence tri-exponentiel est difficile à paramétrer si les temps de vie sont trop proches).

¹⁰⁶ Purgel, M.; Baranyai, Z.; de Blas, A.; Rodriguez-Blas, T.; Bányai, I.; Platas-Iglesias, C.; Tóth, I.; *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 4370.

4.2.2.2. Synthèse et étude des propriétés photophysiques des complexes LnL12 (Ln = La, Eu et Tb)

- Synthèse des complexes LnL12 (Ln = La, Eu et Tb)

La synthèse des complexes est effectuée suivant la procédure décrite dans le chapitre 2. Les complexes **LaL12**, **EuL12** et **TbL12** ont été obtenus avec les rendements respectifs de 89%, 92% et 91%.

- Etude du complexe LaL12

La synthèse du complexe de lanthane nous a permis de suivre la complexation par spectroscopie RMN du proton (Figure 4.15).

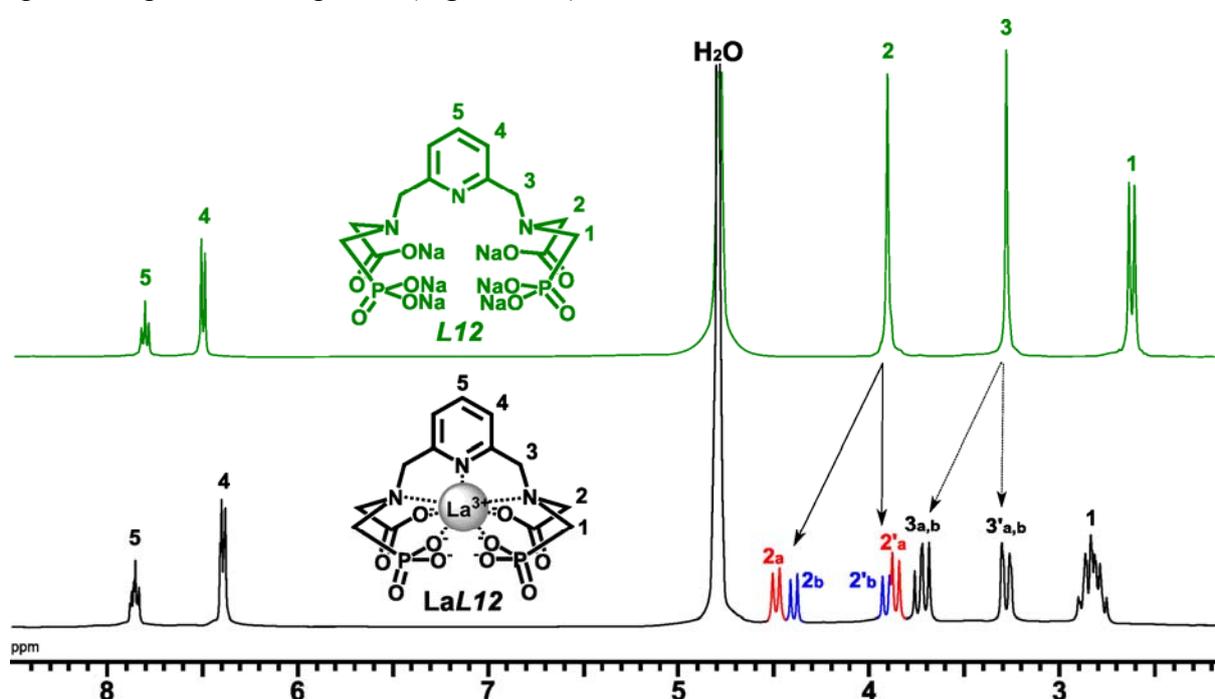


Figure 4.15. Comparaison des spectres ^1H RMN (D_2O , 400 MHz) du ligand **L12** et du complexe **LaL12**. Les travaux antérieurs décrits dans la littérature¹⁰⁷ et l'interprétation des spectres NOESY et COESY du complexe **LaL12** ont permis l'attribution des différents signaux.

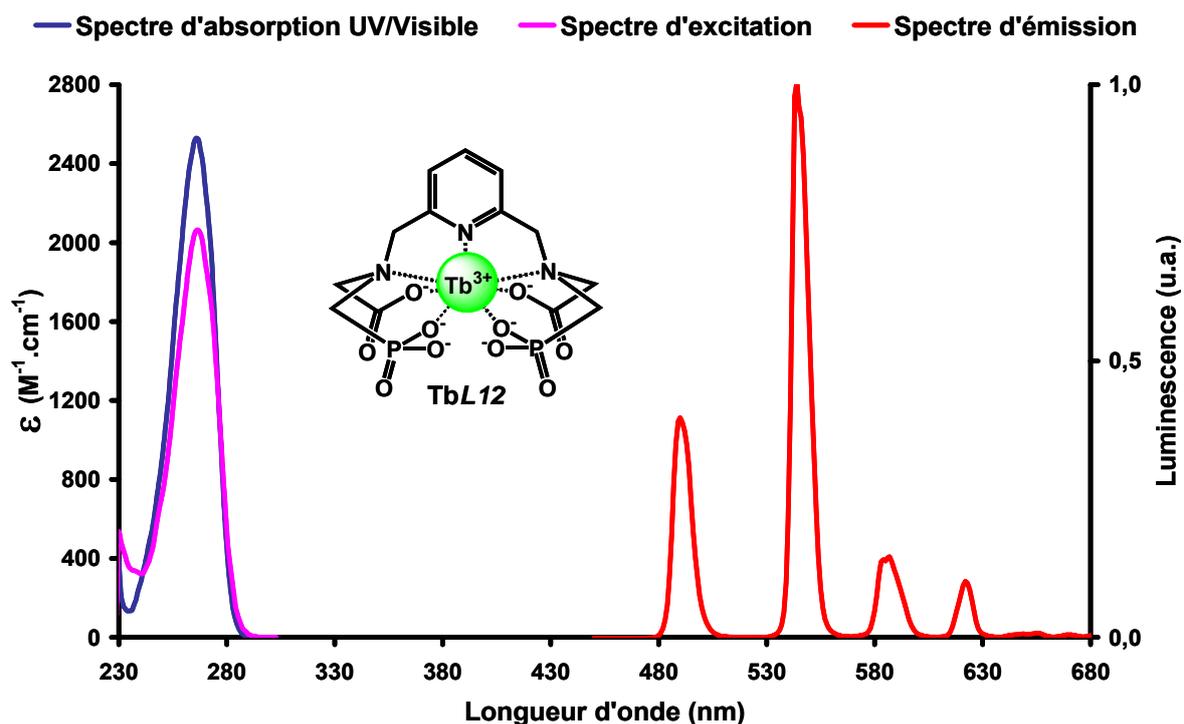
Le spectre RMN de **L12** montre cinq signaux distincts. L'attribution de ces signaux est effectuée sur la Figure 4.15. Le dédoublement du signal correspondant aux protons H-1 provient du couplage avec le ^{31}P ($S = \frac{1}{2}$, $^2J_{\text{HP}} = 12$ Hz). La comparaison du spectre RMN du ligand **L12** et du complexe **LaL12** montre que les signaux sont fortement perturbés. Par la complexation, la superposition de signaux dans la région aromatique, l'apparition de quatre

¹⁰⁷ Laurent, S.; Vander Elst, L.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 6230.

systèmes AB pour les protons H-2 et H-3, et la formation de multiplets complexes pour les protons H-1 montrent la coordination de l'ion La^{3+} avec le ligand. Cette étude RMN permet par ailleurs de confirmer l'hypothèse des différents isomères (signaux marqués en rouge et en bleu sur la *Figure 4.15*), émise lors de l'étude des propriétés photophysiques du ligand. Les intensités relatives montrent la présence de ces isomères en proportion 60/40. Cette observation est confirmée par la RMN du phosphore (D_2O , référence interne Brucker : H_3PO_4 85 % dans D_2O) qui présente 2 pics à 18,5 ppm et 18,3 ppm, avec les mêmes intensités relatives.

- Etude des complexes *EuL12* et *TbL12*

La *Figure 4.16* représente la superposition des spectres d'absorption UV/Visible, d'excitation et d'émission obtenus pour le complexe *TbL12* en solution aqueuse ($c = 5 \times 10^{-4}$ M dans tris/HCl 0,1 M, pH = 7,0).



*Figure 4.16. Superposition des spectres d'absorption, d'excitation ($\lambda_{em} = 544$ nm) et d'émission ($\lambda_{ex} = 267$ nm, filtre passe haut 390 nm) du complexe *TbL12* en solution aqueuse ($c = 5 \times 10^{-4}$ M, Tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).*

Les données photophysiques obtenues avec ces complexes en solution aqueuse sont résumées dans le *Tableau 4.4*.

Tableau 4.4. Propriétés photophysiques des complexes EuL12 et TbL12 en solution aqueuse.

Complexes de lanthanide	Absorption				Emission		
	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ (ms)		ϕ (%)		q
			H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	
EuL12	267	2550	0,45 1,00	2,07	2 ^a	12.5 ^a	1,8 ^c ; 1,8 ^d ; 1,6 ^c 0,5 ^c ; 0,3 ^d ; 0,2 ^e
TbL12	267	2500	1,47	2,93	14,5 ^b	32,5 ^b	1,4 ^c ; 1,4 ^d

a) mesuré par rapport au [Ru(Bipy)₃]Cl₂⁴⁹, b) mesuré par rapport à R6G⁵⁰, c) calculé selon Horrocks et Sudnick⁵², d) calculé selon Parker et al.⁵⁴, e) calculé selon Horrocks et Supkowski⁵⁵

La première observation que l'on peut faire à la vue de ces données est que les coefficients d'extinction molaires de ces complexes sont relativement faibles ($\epsilon_{267 \text{ nm}} = 2500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Pour les deux complexes, les spectres d'absorption UV/Visible et les spectres d'excitation sont relativement superposables, ce qui confirme un bon transfert d'énergie vers les ions lanthanides.

Pour le complexe **TbL12**, le déclin de la luminescence est mono-exponentiel avec un temps de vie de luminescence dans l'eau de 1,5 ms, ce qui correspond aux données obtenues lors du dosage du ligand **L12** avec une solution de terbium, et de 3 ms dans l'eau lourde. Son rendement quantique est de 14,5 %. Le calcul du nombre d'hydratation montre qu'une molécule d'eau est présente en première sphère de coordination.

Pour le complexe **EuL12**, le déclin de la luminescence est bi-exponentiel dans l'eau avec des temps de vie de luminescence $\tau_1 = 0,45 \text{ ms}$ et $\tau_2 = 1,00 \text{ ms}$, montrant la présence de deux espèces avec des valeurs proches de celles obtenues dans le tampon Tris/HCl lors du dosage du ligand **L12** avec les sels d'euporium. Lors de l'utilisation de l'eau lourde, les oscillateurs O-H provenant des molécules d'eau du milieu sont remplacés par de oscillateurs O-D qui n'ont pas d'effet désactivant, le déclin de la luminescence mesuré est celui de l'isomère A et de l'isomère B, sans pouvoir faire de distinction entre les deux, se traduisant par la mesure du déclin de la luminescence mono-exponentiel dans l'eau lourde avec un de temps de vie de 2,07 ms.

La détermination du nombre d'hydratation pour ces deux espèces permet d'émettre l'hypothèse que nous sommes en présence de deux isomères en solution, et que pour un de ces isomères, deux molécules d'eau sont coordonnées sur la première sphère de l'ion Eu^{3+} , et pour l'autre, il n'y a pas de molécules d'eau en première sphère de coordination.

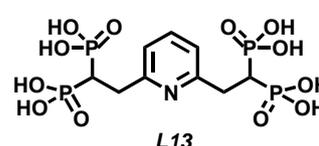
La détermination de ces deux nombres d'hydratation corrobore les observations faites lors du dosage du ligand **L12** avec la solution d'euporium, à savoir la position des phosphonates dans le plan ou hors du plan de la pyridine influe sur la protection de l'ion métallique du milieu.

Par ailleurs le programme de calcul du déclin de la luminescence a permis de définir que ces deux isomères coexistent avec la proportion 60/40 (60 % pour l'isomère avec $\tau_1 = 0,45$ ms).

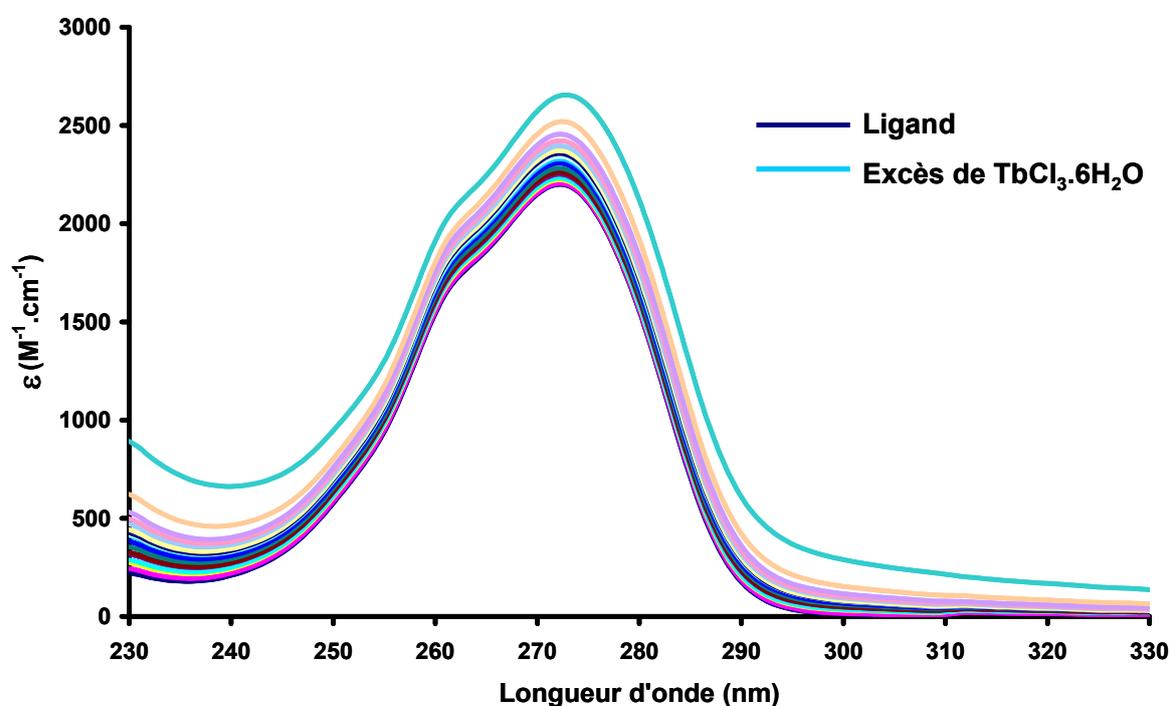
Avec cette étude, nous pouvons conclure que les bras glyphosates permettent la complexation du ligand **L12** avec des ions lanthanides, aboutissant majoritairement à la formation d'espèces 1/1 Ln/**L12**.

4.2.2.3. Etudes des propriétés photophysiques du ligand **L13**

Les dosages d'une solution de **L13** ($c = 1,00 \times 10^{-4}$ M dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0) par des solutions de sel de terbium ($\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $c = 7,67 \times 10^{-3}$ M) et de sel d'euporium



($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $c = 1,01 \times 10^{-3}$ M) sont beaucoup plus compliqués que pour le ligand **L12**. La *Figure 4.17* montre l'évolution des spectres d'absorption UV/Visible du ligand **L13** lors du dosage avec la solution de terbium.



*Figure 4.17. Evolution de l'absorption UV/Visible de **L13** ($c = 1,00 \times 10^{-4}$ M) lors du dosage avec une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 7,67 \times 10^{-4}$ M) dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0.*

Dans l'eau, à pH neutre, le ligand libre présente une forte bande d'absorption située à 272 nm ($\epsilon_{272 \text{ nm}} = 8200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) correspondant aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur la pyridine. Au cours du dosage avec la solution de terbium, les bandes d'absorption augmentent en intensité et s'élargissent de plus en plus. Ce phénomène est caractéristique de la formation d'agrégats dans la solution. Après quelques ajouts, la solution de ligand devient trouble et la formation d'un précipité est observée. Les mêmes observations ont été faites lors du dosage avec la solution d'euporium.

Les travaux de Plabst et Bein¹⁰⁸ ont montré que l'utilisation de l'acide 1,4-phénylènebis(méthylidyne)tetrakisphosphonique, représenté ci-après, est un ligand favorisant la formation de réseau métal-organique.

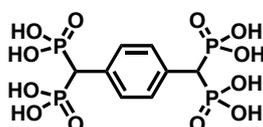
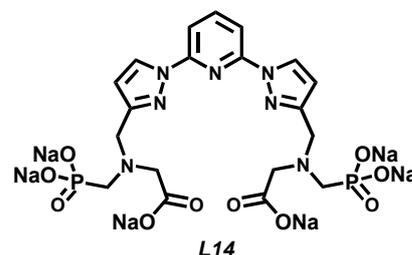


Figure 4.18. Structure moléculaire de l'acide 1,4-phénylènebis(méthylidyne)tetrakisphosphonique.¹⁰⁸

Dans notre étude, le ligand **L13** semble se comporter de la même manière. Ce bras doit donc favoriser la formation d'espèces oligomériques au détriment du complexe monomérique attendu. Ainsi l'utilisation de bras méthylène diphosphonates pour stabiliser les complexes en milieu biologique s'avère difficile à exploiter. Les investigations plus approfondies sont nécessaires pour comprendre le mode de complexation de ce ligand et la nature des clusters obtenus. Il en est de même pour le ligand **L15** qui possède les même bras de complexation.

4.2.2.4. Etude des propriétés photophysiques du ligand **L14**

Les dosages d'une solution du ligand **L14** ($c = 5,65 \times 10^{-5} \text{ M}$ dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0) par des solutions de sel de terbium ($\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $c = 5,20 \times 10^{-4} \text{ M}$) et de sel d'euporium ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $c = 5,06 \times 10^{-4} \text{ M}$) ont été réalisés.



- Dosage UV/Visible du ligand **L14**

La Figure 4.19 décrit l'évolution des spectres d'absorption UV/Visible lors du dosage de la solution du ligand **L14** par la solution de terbium. L'évolution des spectres d'absorption UV/Visible au cours du dosage avec la solution d'euporium est similaire (Figure 4.20).

¹⁰⁸ Plabst, M.; Bein, T.; *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 4331.

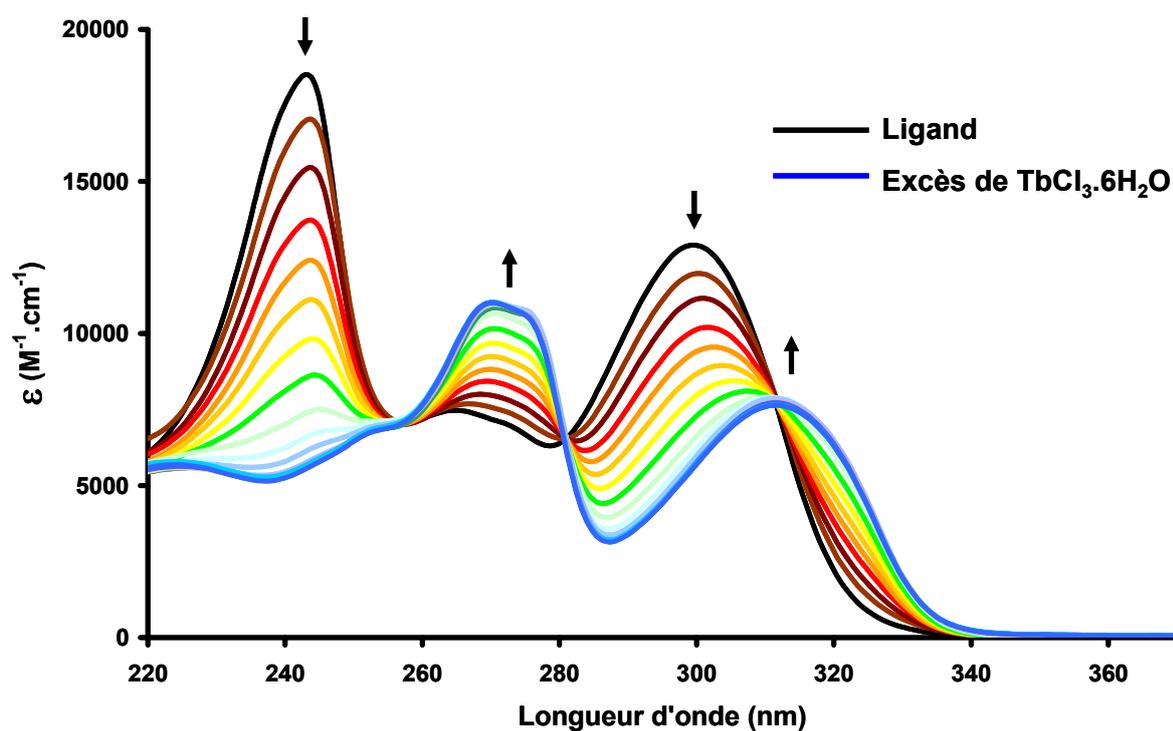


Figure 4.19. Evolution de l'absorption UV/Visible de L14 ($c = 5,65 \times 10^{-5} M$) lors du dosage avec les sels de terbium ($TbCl_3 \cdot 6H_2O$, $c = 5,20 \times 10^{-4} M$) dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0.

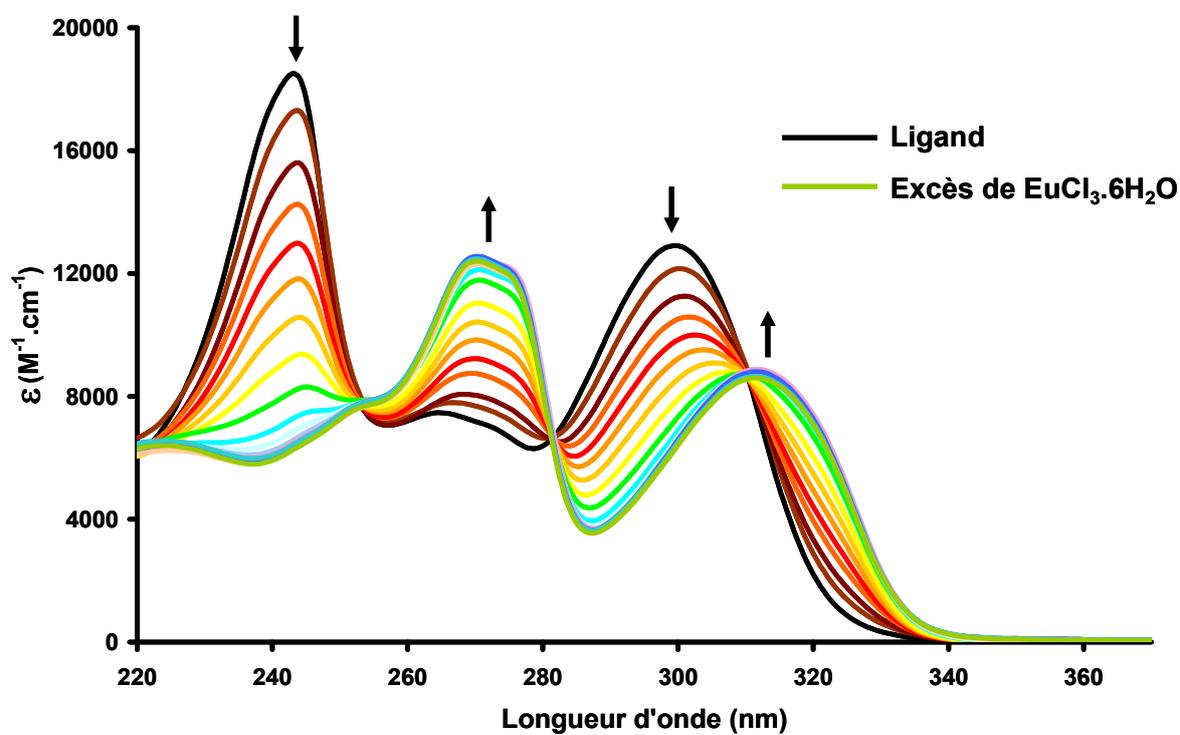
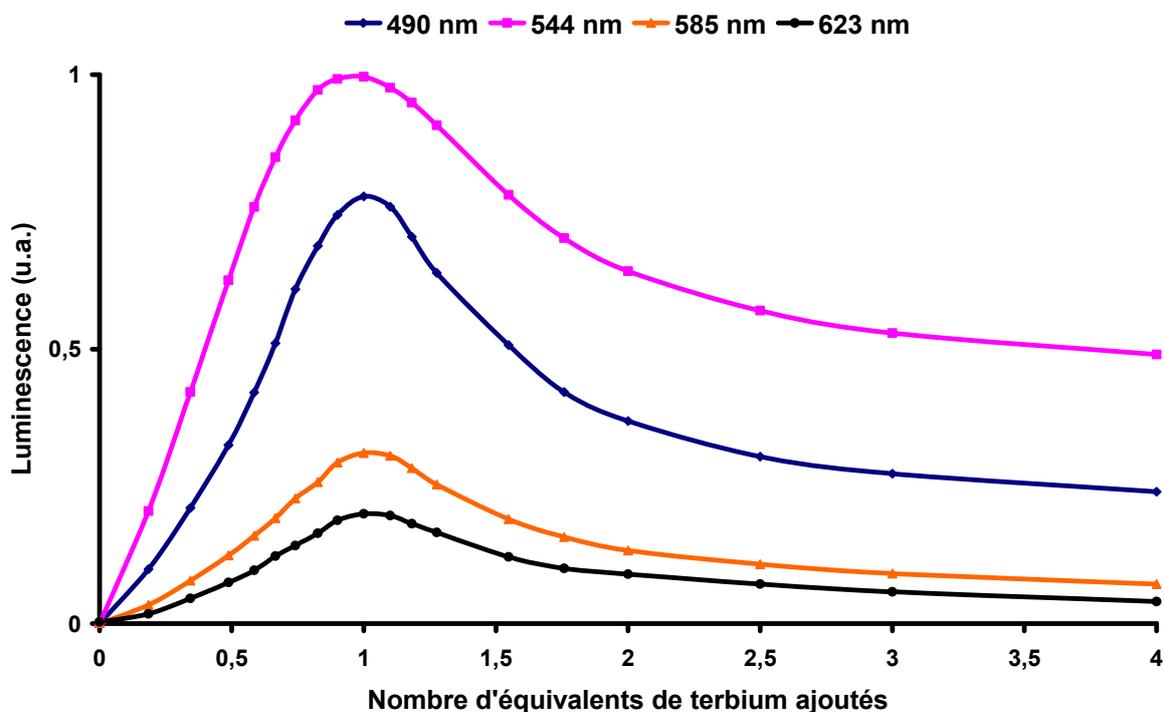


Figure 4.20. Evolution de l'absorption UV/Visible de L14 ($c = 5,65 \times 10^{-5} M$) lors du dosage avec les sels d'euprium ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$, $c = 5,06 \times 10^{-4} M$), dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0

En solution aqueuse, à pH neutre, le ligand libre montre de fortes bandes d'absorption à $\lambda = 244 \text{ nm}$ ($\epsilon_{244 \text{ nm}} = 18500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et $\lambda = 300 \text{ nm}$ ($\epsilon_{300 \text{ nm}} = 12900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) correspondant aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur le chromophore bispyrazolylpyridine.³⁵ Au fur et à mesure que la solution de lanthanide est ajoutée, la bande d'absorption à $\lambda = 244 \text{ nm}$ disparaît et une bande d'absorption apparaît vers 272 nm ($\epsilon_{272 \text{ nm}} = 11000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans le cas du terbium et $\epsilon_{272 \text{ nm}} = 12500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans le cas de l'euporium). La bande d'absorption à $\lambda = 300 \text{ nm}$ se déplace vers 312 nm ($\epsilon_{312 \text{ nm}} = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour le terbium et $\epsilon_{312 \text{ nm}} = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour l'euporium). L'apparition de la bande à 272 nm et le déplacement bathochrome de la bande d'absorption à 300 nm vers 312 nm résultent de la complexation du ligand **L14** avec les ions lanthanides (Ln = Eu et Tb). Notons que l'on observe le déplacement bathochrome lors de l'ajout d'incrément. Au-delà de 1 équivalent, les spectres d'absorptions obtenus sont superposables et aucune modification notable n'est observée.

- Dosage fluorométrique du ligand **L14**

La *Figure 4.21* présente l'évolution de l'intensité de la luminescence en fonction de la quantité de terbium ajoutée lors du dosage de la solution de ligand **L14** ($c = 5,65 \times 10^{-5} \text{ M}$) par les sels de terbium ($c = 5,20 \times 10^{-4} \text{ M}$) dans le tampon tris/HCl $0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$.



*Figure 4.21. Evolution de l'intensité de la luminescence pour différentes bandes d'émission du terbium ($\lambda_{\text{ex}} = 267 \text{ nm}$, filtre passe haut 395 nm) lors du dosage de **L14** ($c = 5,65 \times 10^{-4} \text{ M}$) par une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 5,20 \times 10^{-4} \text{ M}$) dans le tampon Tris/HCl, $0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$.*

Jusqu'à 1 équivalent de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pour chaque bande d'émission du terbium, l'intensité de luminescence augmente rapidement. Après 1 équivalent, l'intensité diminue lentement. Le déclin de la luminescence est mono-exponentiel avec un temps de vie de 3,0 ms jusqu'à 1 équivalent. De 1 à 2 équivalents de terbium ajouté, le déclin de la luminescence est bi-exponentiel, avec le temps de vie long de 3 ms et un temps de vie plus court variant entre 1,4 ms et 0,6 ms. Pour un excès de terbium (au-delà de 2 équivalents), le déclin de la luminescence est bi-exponentiel, avec le temps de vie long de 3 ms et un temps de vie plus court de 0,6 ms. Le temps de vie de luminescence de 3 ms, retrouvé tout au long de ce dosage correspond au complexe mononucléaire **TbLI4**. Le temps de vie de 0,6 ms peut être attribué à l'espèce 2/1 Tb/LI4, déjà observée lors du dosage de la solution de ligand **LI2** avec une solution de terbium. Les temps de vie mesurés entre 1 et 2 équivalents sont difficiles à attribuer, mais peuvent correspondre à des intermédiaires qui mèneront à l'espèce 2/1 au-delà de 2 équivalents.

L'analyse de ce dosage avec SPECFIT ne montre que la formation du complexe **TbLI4**. La correspondance avec les autres espèces observées entre 1 et 2 équivalents n'a pas pu être déterminée. La *Figure 4.22* présente l'évolution de l'intensité de la luminescence en fonction de la quantité d'euporium ajouté lors du dosage de la solution de ligand **LI4** ($c = 5,65 \cdot 10^{-5}$ M) par les sels d'euporium ($c = 5,06 \cdot 10^{-4}$ M) dans le tampon tris/HCl 0,1 M.

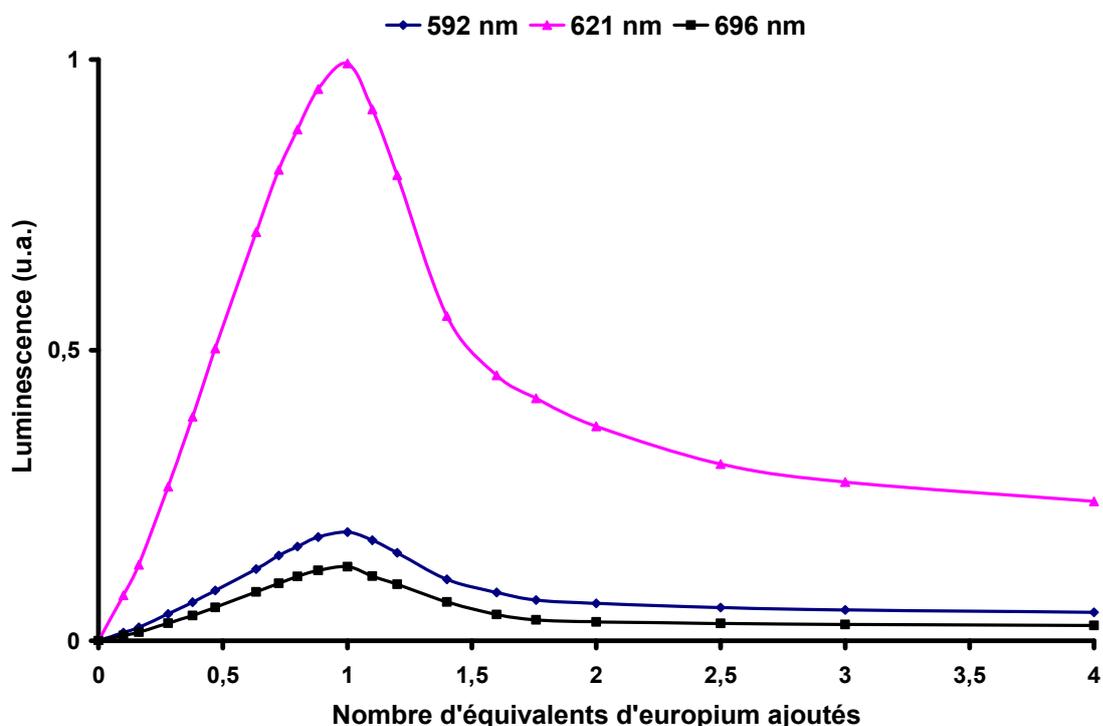


Figure 4.22. Evolution de l'intensité de la luminescence pour différentes bandes d'émission de l'euporium ($\lambda_{\text{ex}} = 267$ nm, filtre passe haut 395 nm) lors du dosage de LI4 ($c = 5,65 \times 10^{-4}$ M) par une solution de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 5,06 \times 10^{-4}$ M) dans le tampon Tris/HCl, 0,1 M, pH = 7,0.

L'évolution du déclin de la luminescence avec la solution d'euporium n'a pas le même profil que dans le cas du terbium. Jusqu'à 0,8 équivalent, le déclin de la luminescence est mono-exponentiel avec un temps de vie de 1,3 ms. Entre 0,8 et 1,1 équivalents, le déclin de la luminescence est bi-exponentiel, avec un temps de vie long de 1,3 ms et un temps de vie plus court de 0,4 ms. Au-delà de 1,2 équivalents, le déclin de la luminescence est bi-exponentiel avec un temps de vie long variant de 1,1 ms à 0,8 ms et un temps de vie court de 0,4 ms. Le temps de vie de 1,3 ms peut être attribué au complexe **EuL14**. Le temps de vie court de 0,4 ms peut correspondre à l'espèce 2/1 Eu/**L14**. La variation du temps de vie long autour de 1 équivalent d'euporium ajouté est plus compliquée à interpréter et la correspondance avec les espèces définies par l'analyse de ce dosage avec le logiciel SPECFIT est peu concluante. La formation d'isomères n'est pas à exclure.

En résumé, ces dosages montrent clairement que la formation d'une espèce 1/1 Ln/**L14** jusqu'à 1 équivalent de sels de lanthanide ajouté est privilégiée. Au-delà de 1 équivalent, plusieurs espèces sont susceptibles de se former, rendant l'interprétation difficile.

4.2.2.5. Synthèse et étude des propriétés photophysiques des complexes LnL14 (Ln = La, Eu et Tb)

- Synthèse des complexes

La synthèse des complexes est effectuée suivant la procédure décrite dans le chapitre 2. Les complexes **LaL14**, **EuL14** et **TbL14** ont été obtenus avec les rendements respectifs de 91 %, 85 % et 75 %.

- Etude du complexe **LaL14**

La synthèse du complexe de lanthane nous a permis de suivre la complexation par spectroscopie RMN du proton. Les spectres RMN du ligand **L14** et du complexe **LaL14** présentent sept signaux distincts dont l'attribution est décrite sur la *Figure 4.23*. Le dédoublement du signal correspondant aux protons H-1 provient du couplage avec le ^{31}P ($S = \frac{1}{2}$, $^2J_{\text{HP}} = 12 \text{ Hz}$).

Lors de la complexation, les pics correspondants aux protons H-6 et H-7 de la pyridine centrale ne subissent pas l'influence de la présence du lanthane dans la cavité complexante. En revanche, les protons H-4 et H-5 des groupements pyrazoles sont légèrement déblindés suite au changement de conformation du ligand induit par le métal lors de la

complexation.³⁶ Les pics de la région aliphatiques, quant à eux, sont très fortement perturbés, montrant ainsi la coordination de l'ion La^{3+} avec le ligand.

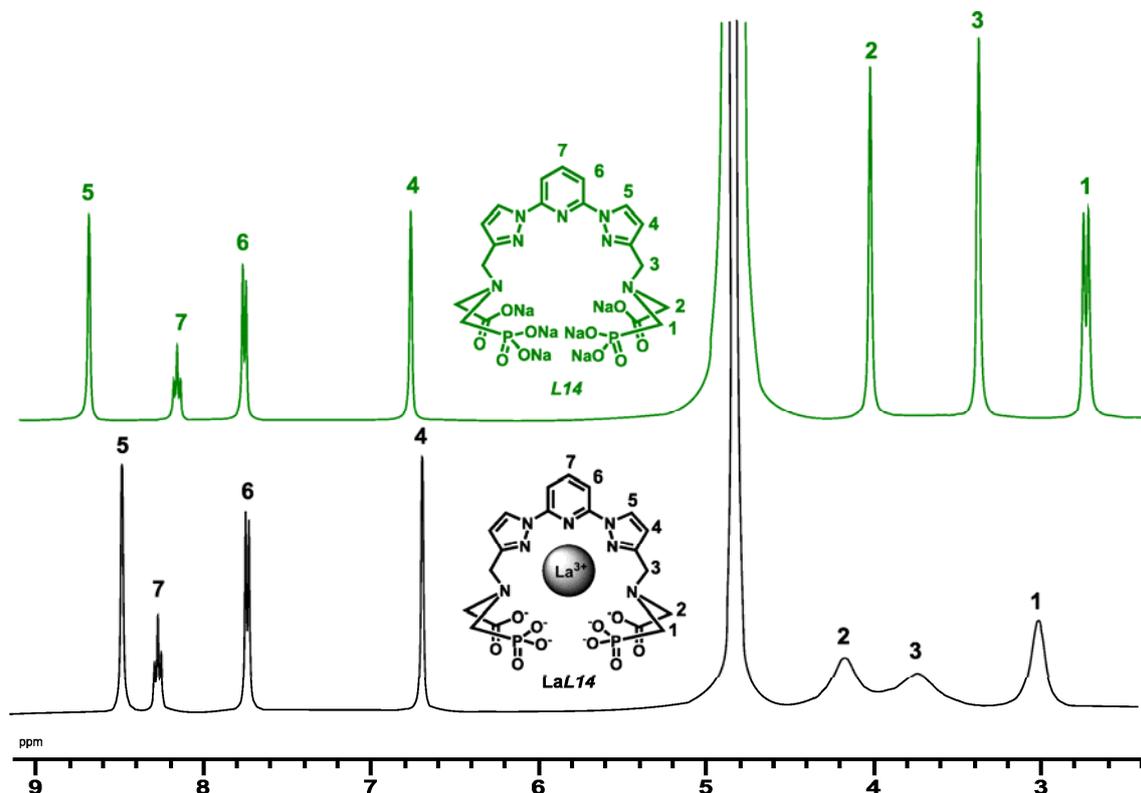


Figure 4.23. Comparaison des spectres ^1H RMN (D_2O , 400 MHz) du ligand L14 et du complexe LaL14.

Même si la RMN du phosphore montre un unique pic à 18,1 ppm, la présence de différents isomères n'est pas à exclure. L'élargissement des signaux dans la zone aliphatique peut être interprété comme un échange rapide entre différentes formes. L'étude par spectroscopie RMN du proton à température variable faite sur le complexe **LaL14** illustre cette observation (Figure 4.24).

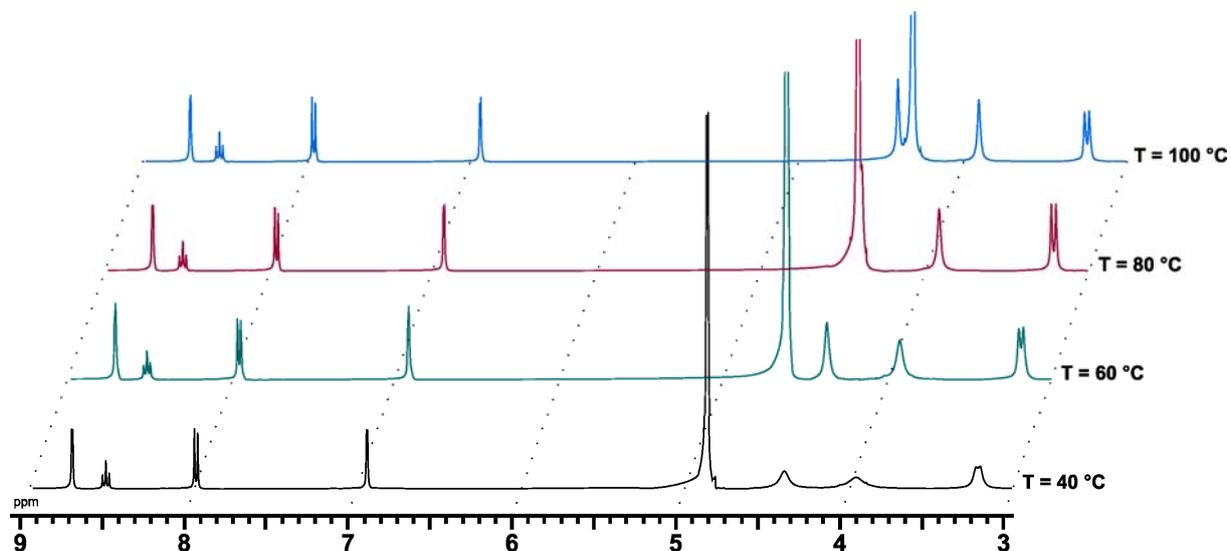


Figure 4.24. Superposition des spectres ^1H RMN (400 MHz, D_2O) à température variable (40 °C à 100 °C) du complexe LaL14. Les spectres sont calibrés sur les signaux correspondant aux protons H-6 et H-7.

La superposition des spectres RMN obtenue en température variable montre que l'augmentation de la température n'a que peu d'incidence sur la forme et la multiplicité des signaux correspondant aux protons du chromophore. Par contre, les signaux dans la région aliphatique s'affinent et sont de mieux en mieux résolus avec l'augmentation de la température.

Cette étude met donc en évidence la formation d'isomère lors de la complexation du ligand **L14** par des ions lanthanides. Le spectre effectué après retour à température ambiante est identique au spectre initial du complexe **LaL14**.

- Etude des complexes **EuL14** et **TbL14**

La Figure 4.25 représente la superposition des spectres d'absorption UV/Visible, d'excitation et d'émission obtenus pour le complexe **EuL14** en solution aqueuse ($c = 5 \times 10^{-5}$ M, dans le tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).

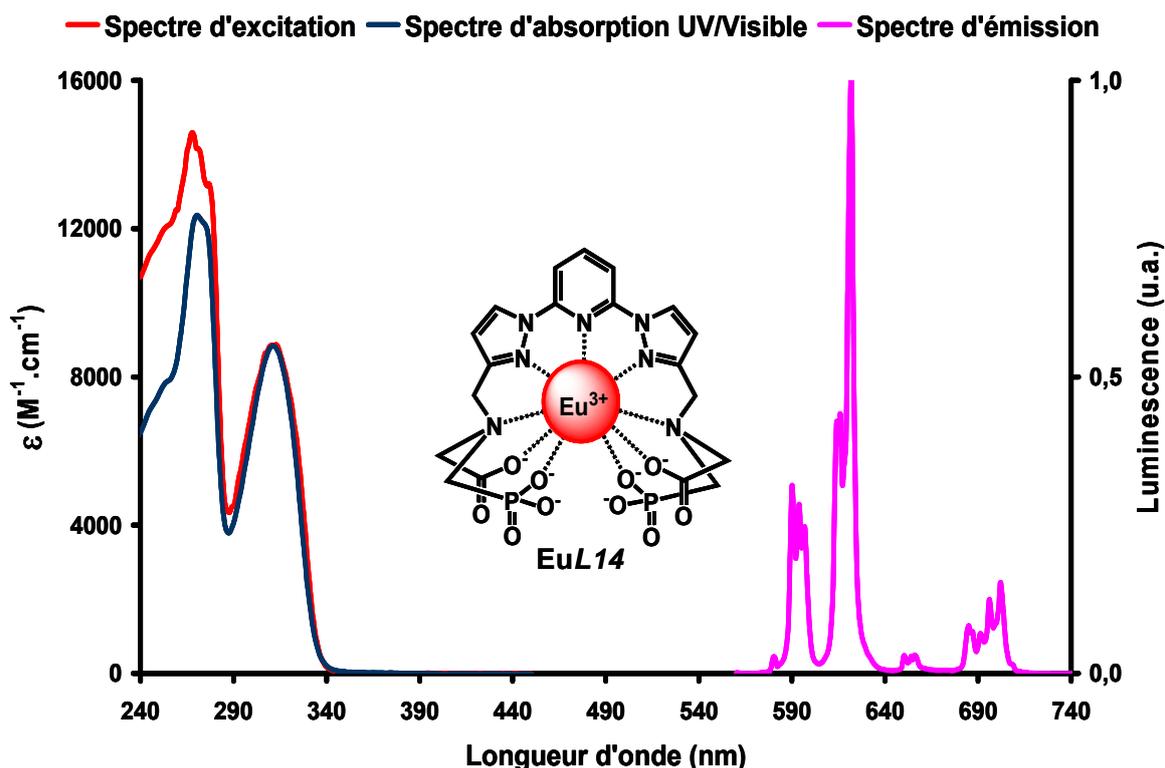


Figure 4.25. Superposition des spectres d'absorption, d'excitation ($\lambda_{em} = 621$ nm) et d'émission ($\lambda_{ex} = 312$ nm, résolution : 5Å, filtre passe haut 390 nm) du complexe **EuL14** en solution aqueuse ($c = 5 \times 10^{-5}$ M, Tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).

En solutions diluées, les complexes formés avec **L14** présentent une bande d'absorption intense à 272 nm ($\epsilon_{272 \text{ nm}} = 12350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour le complexe **EuL14** et $\epsilon_{272 \text{ nm}} = 11080$

$M^{-1}.cm^{-1}$ pour le complexe **TbL14**) et une bande moins intense à 312 nm ($\epsilon_{312\text{ nm}} = 8780 M^{-1}.cm^{-1}$ pour le complexe **EuL14** et $\epsilon_{312\text{ nm}} = 7740 M^{-1}.cm^{-1}$ pour le complexe **TbL14**) correspondant aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur le chromophore bispyrazolylpyridine. Les spectres d'absorption UV/Visible et les spectres d'excitation obtenus pour le complexe **EuL14** ($\lambda_{em} = 621\text{ nm}$) et pour le complexe **TbL14** ($\lambda_{em} = 544\text{ nm}$) sont superposables. Les émissions observées à partir de l'euporium ou du terbium proviennent bien d'un transfert d'énergie de l'état excité du ligand vers les états excités luminescents des ions Ln^{3+} , comme l'atteste le spectre d'excitation.

Les propriétés photophysiques des complexes **EuL14** et **TbL14** sont résumées dans le *Tableau 4.5*.

Tableau 4.5. Propriétés photophysiques des complexes EuL14 et TbL14 en solution aqueuse.

Complexes de lanthanide	Absorption		Emission				q
	λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	τ (ms)		ϕ (%)		
			H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	
EuL14	272 312	12350 8780	1,2	2,1	5 ^a	24 ^a	0,4 ^c ; 0,1 ^d ; 0,1 ^e
TbL14	272 312	11080 7740	2,9	3,4	48 ^b	79 ^b	0,4 ^c ; 0,1 ^d

a) mesuré par rapport au [Ru(Bipy)₃]Cl₂⁴⁹, b) mesuré par rapport à R6G⁵⁰, c) calculé selon Horrocks et Sudnick⁵², d) calculé selon Parker et al.⁵⁴, e) calculé selon Horrocks et Supkowski⁵⁵

Le complexe **EuL14** a un temps de vie de luminescence de 1,2 ms dans l'eau pour un rendement quantique de 5 %. La détermination du nombre d'hydratation montre qu'il n'y a pas de molécule d'eau en première sphère de coordination de l'euporium.

Le complexe **TbL14** a un temps de vie de luminescence de 2,9 ms et un rendement quantique dans l'eau important ($\phi_{H_2O} = 48\%$), le nombre d'hydratation déterminé pour ce complexe montre également qu'aucune molécule d'eau n'est présente en première de coordination du terbium.

La stabilité des complexes a été étudiée avec la détermination du temps de vie de luminescence du complexe **TbL14** dans différents milieux. Cette méthode permet de juger de la stabilité du complexe dans ces différentes conditions. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec l'entreprise Cézanne. Les résultats sont résumés dans le *Tableau 4.6*.

Tableau 4.6. Détermination de la stabilité du complexe TbL14 par la mesure de son temps de vie de luminescence dans divers milieux.

milieux	τ (ms)
H ₂ O	3,4
Phosphate 0,1 M, pH = 7,0	3,1
Tris/HCl 0,1 M, pH = 7,0	3,3
Tris 0,1 M/EDTA 10 mM	3,2
Tris/HCl 50 mM / Sérum 50%	2,8
Tris 0,1 M / KF 400 mM	3,1

Pour l'ensemble des tampons testés, le temps de vie de luminescence ne change pas ($\tau \approx 3$ ms) y compris en milieu sérique. La poche de complexation formée avec le chromophore bispyrazolylpyridine et les bras de complexation glyphosates semble être une très bonne alternative pour améliorer la stabilité des complexes en milieu biologique.

4.3. Synthèses de complexes avec un lien pour le marquage biologique

La stabilité des complexes en milieu biologique a été optimisée par l'utilisation des bras de complexation de type glyphosates. Cependant les complexes formés ne possèdent pas de lien utilisable pour le marquage biologique.

Afin de permettre l'insertion d'un lien pour le marquage biologique, la préparation des plate-formes 4-bromo-2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine **74** et **75** (Figure 4.26) est nécessaire.

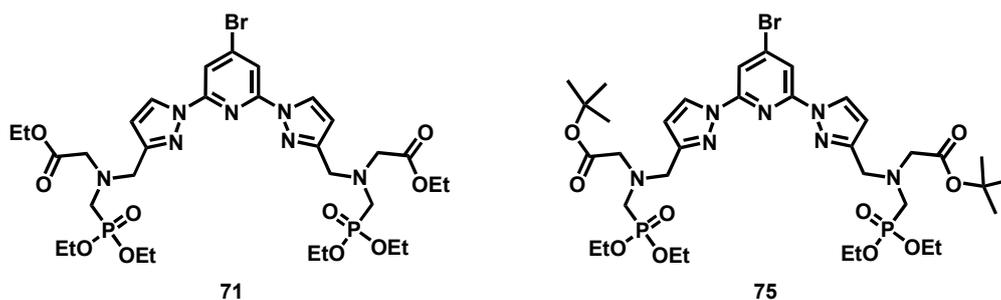


Figure 4.26. Structures moléculaires des plate-formes 71 et 75.

A partir de ces plate-formes, les synthèses des complexes **TbL16**, avec un lien hetpynoïque et **TbL17**, avec un lien butyrate, (Figure 4.27) ont été tentée. Ces synthèses se sont avérées être difficiles et nous ont conduites à la préparation du complexe **TbL18**.

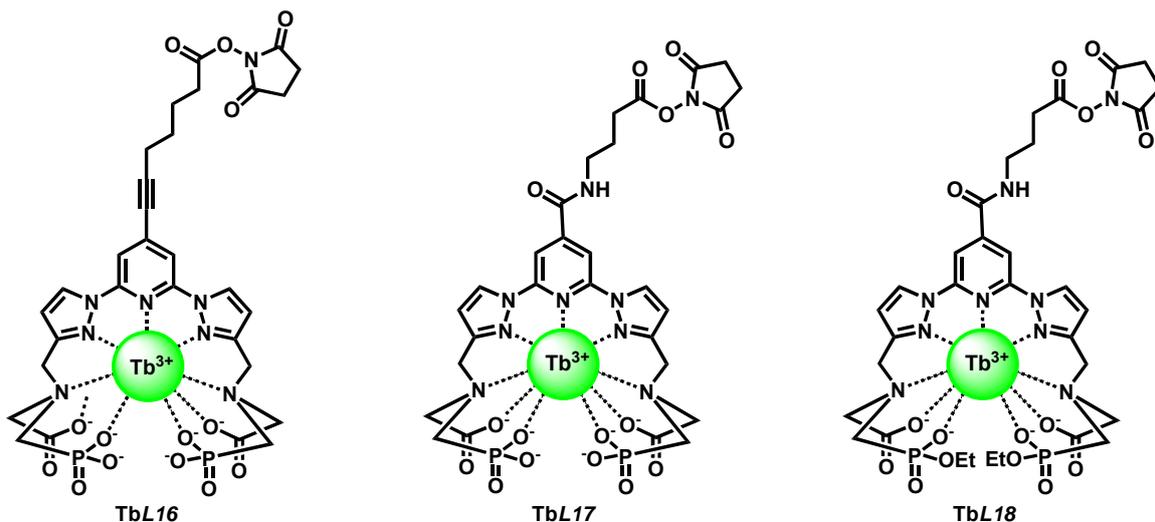


Figure 4.27. Structure moléculaire des complexes TbL16, TbL17 et TbL18.

4.3.1. Synthèse des plate-formes 74 et 75

Les synthèses de ces deux plate-formes, décrites dans le Schéma 4.10 sont similaires. Ces plate-formes sont obtenues en une étape à partir du composé **17** et du glyphosate d'éthyle **57**, pour la plate-forme **74** et à partir du composé **17** et du glyphosate de *tert*-butyle **73**. Le Schéma 4.10 rappelle la synthèse des différents glyphosates **57** et **73**. Le composé **17** réagit avec les glyphosates d'alkyles **57** et **73** en présence de K_2CO_3 dans l'acétonitrile. Les plate-formes **74** et **75** sont obtenues avec des rendements de 60 % et 78 % respectivement.

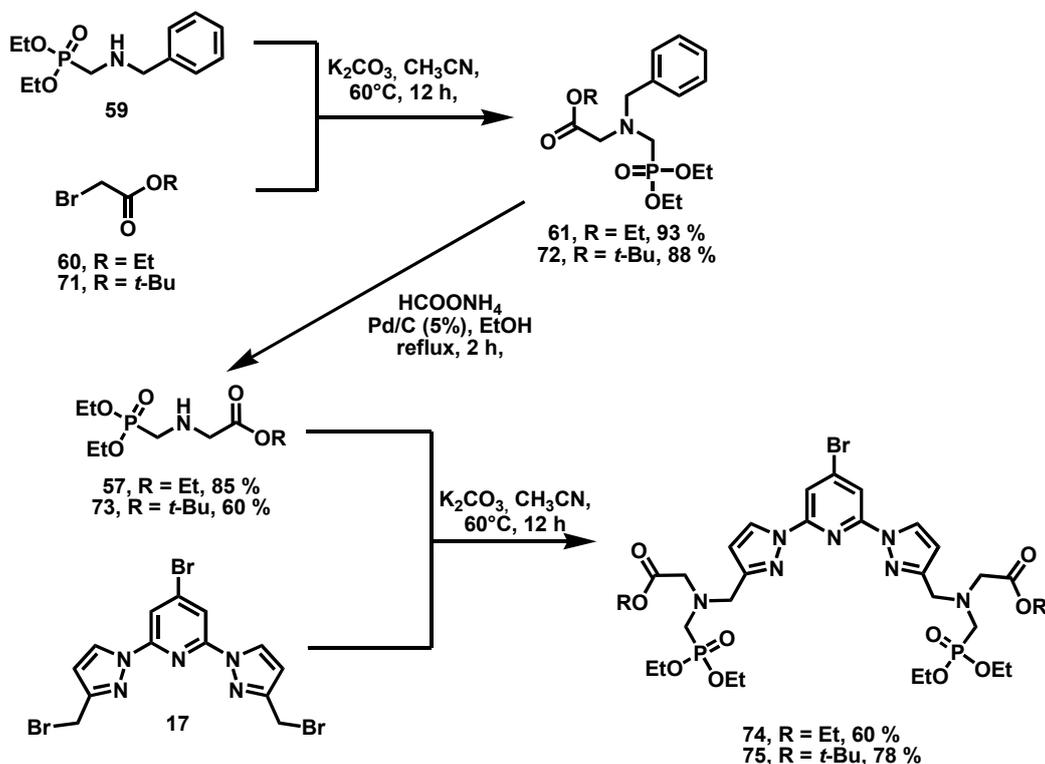


Schéma 4.10. Synthèses des plate-formes 74 et 75

La préparation du glyphosate **73** est unique car elle permet la présence d'esters *tert*-butyles sur la poche de complexation. Ces groupements protecteurs sont intéressants car ils ont la particularité d'être stables en milieu basique et sont hydrolysés en présence de TFA, contrairement à leurs homologues éthyliques, souvent utilisés comme groupements protecteurs des carboxylates des liens pour le marquage biologiques, qui sont stables en présence de TFA et saponifiés en présence de NaOH. Cette orthogonalité permet d'envisager une déprotection sélective de l'une ou de l'autre fonction, dépendamment des pré-requis pour les synthèses ultérieures.

4.3.2. Synthèse du complexe *TbL16*

La synthèse du ligand **L16** (Schéma 4.11) débute par un couplage de Sonogashira entre la plate-forme **75** et l'acide 6-heptynoïque **52**. Ce couplage catalysé au palladium permet d'obtenir le composé **76** avec un rendement de 62 %. La deuxième étape est l'hydrolyse des ester *tert*-butyles et des groupements diéthyle-phosponates afin d'obtenir le ligand **L16**. Différentes méthodes ont été testées et se sont soldées par la dégradation du composé **76** avec l'utilisation du TMSBr ou par la formation du produit **77** résultant de l'hydrolyse partielle des groupements diéthyle-phosponates pour former des groupements éthyle-phosponates.

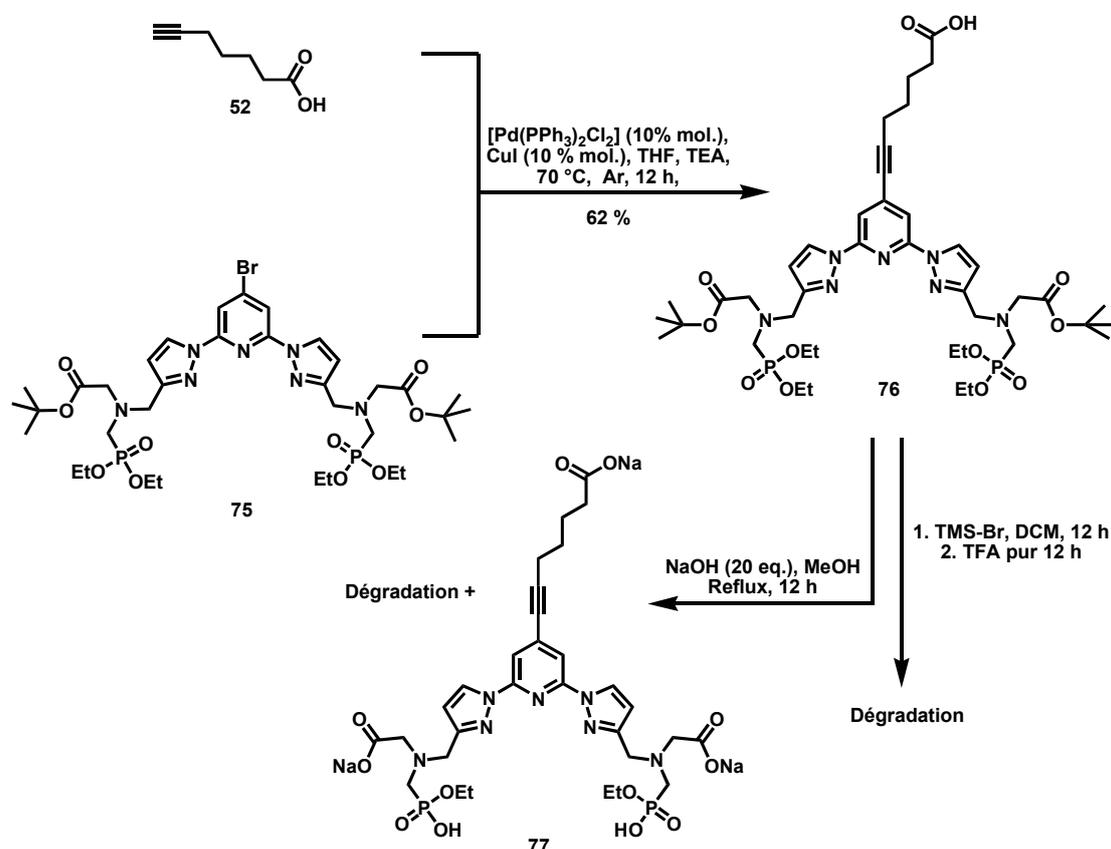


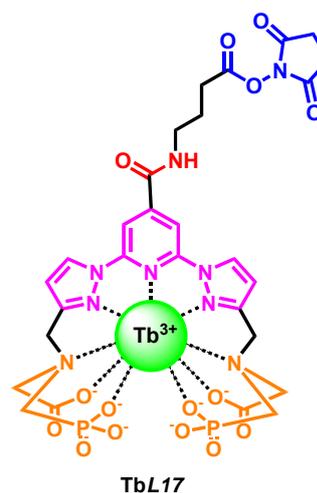
Schéma 4.11. Dégradation du composé **76** et/ou formation du composé **77** lors de la synthèse du ligand **L16**.

L'utilisation d'un excès de NaOH dans les mêmes conditions que Märkl *et al.*¹⁰⁹ ne permet pas l'hydrolyse totale des diéthyle-phosphonates, mais conduit à une dégradation importante des composés.

4.3.3. Synthèse du complexe **TbL17**.

La synthèse de ce complexe tient compte de l'ensemble des observations faites précédemment, à savoir :

- (i) la présence du **chromophore 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine**, antenne efficace pour la sensibilisation des ions lanthanides.
- (ii) **la fonction amide** en position 4 de la pyridine centrale permettant d'avoir un rendement quantique élevé.
- (iii) **les bras de complexation glyphosates** pour une bonne stabilité du complexe en milieu biologique
- (iv) l'activation du lien butyrate sous la forme d'**un ester NHS**, adéquat pour le marquage d'anticorps.



Deux voies de synthèse peuvent être envisagées. Soit la formation de l'ester NHS se fait avant la réaction de complexation, soit la réaction de complexation est effectuée avant la formation de l'ester NHS. Ces deux voies de synthèse ont été explorées.

4.3.3.1. Synthèse du complexe après la formation de l'ester NHS.

La préparation du ligand **L17** portant l'ester NHS avant la réaction de complexation paraît la plus efficace, suites aux observations faites lors de la synthèse du complexe **TbL8** (Chapitre 3). Cependant cette voie de synthèse impose une nouvelle contrainte : il est impératif que les différents groupements protecteurs puissent être enlevés sélectivement. Dans ce but, nous avons choisi la plate-forme **75** comme point de départ. Cette plate-forme possède des carboxylates protégés par des esters *tert*-butyles dont la déprotection est orthogonale à la déprotection de l'ester éthylique du lien butyrate. Par ailleurs, l'étude effectuée pour la synthèse du complexe **TbL8** a montré que l'ester NHS résiste à l'hydrolyse des esters *tert*-butyles en présence de TFA. La déprotection de l'ester éthylique du lien butyrate devra donc se faire avant la déprotection des ester *tert*-butyles, suivi de la formation de l'ester NHS sur le lien butyrate. Il ne reste plus qu'à définir l'ordre de déprotection des groupements

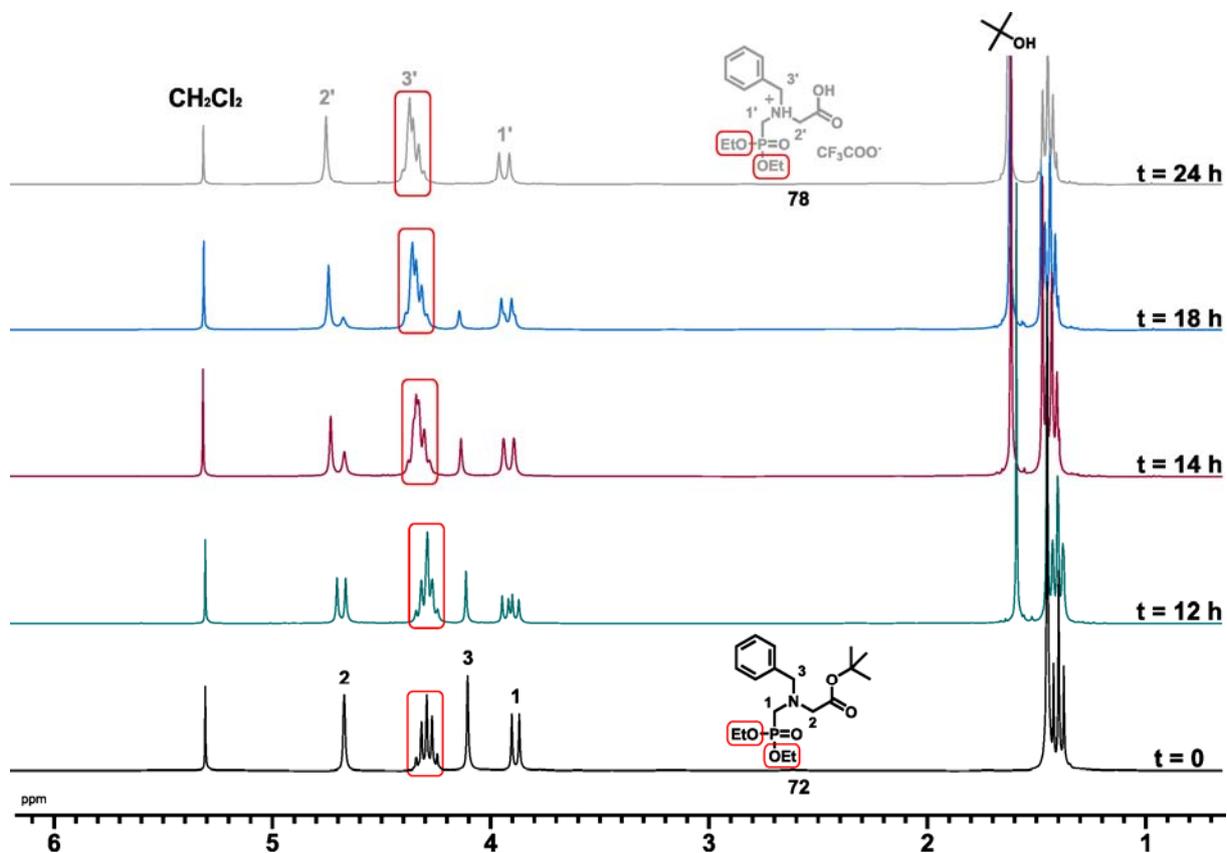
¹⁰⁹ Märkl, G.; Gschwendner, K.; Rötzer, I.; Kreitmeier, P.; *Helv. Chim. Acta*, **2004**, 87, 825.

diéthyle-phosphonates. Les investigations faites pour la préparation du complexe **TbL16** ont montré que l'hydrolyse des groupements diéthyle-phosphonates provoque également l'hydrolyse des esters *tert*-butyles. Ce point n'est pas un problème si l'hydrolyse des groupements diéthyle-phosphonates se produit en présence de TFA, ou si l'ester NHS résiste à la déprotection au TMSBr. Les tests de déprotection des groupements diéthyle-phosphonates en présence de TFA et l'étude de la stabilité de l'ester NHS en présence de TMSBr ont donc été réalisés.

- Test de déprotection des groupements diéthyle-phosphonates en présence de TFA.

Afin de vérifier l'effet du TFA sur les groupements diéthyle-phosphonates, un test a été effectué sur le composé **72**. Ce produit est mis en présence d'un excès de TFA dans du DCM, et l'avancée de la réaction est suivi par la RMN du proton (*Figure 4.28*).

Le spectre RMN du composé **72** dans la région aliphatique présente 6 signaux. L'attribution de ces signaux est effectuée sur la *Figure 4.28*. Le triplet vers 1,3 ppm et le quadruplet vers 4,1 ppm correspondent aux protons des groupements diéthyle-phosphonates. Le singulet vers 1,5 ppm correspond aux protons de l'ester *tert*-butyle.



*Figure 4.28. Superposition de la région aliphatique des spectres RMN du proton (300 MHz, CD₂Cl₂) obtenus lors du test de stabilité des groupements diéthyle-phosphonates de **72** en présence d'un excès de TFA.*

Après 12 heures de réaction, plusieurs modifications du spectre sont observées. L'ensemble des signaux caractéristiques du composé **72** ont diminués en intensité et de nouveaux signaux apparaissent correspondant à l'acide formé par l'hydrolyse de l'ester *tert*-butylique. La formation de l'alcool *tert*-butyle est également observée (singulet à 1,6 ppm). Notons l'utilisation d'un excès de TFA conduit *exclusivement* à la formation de l'acide **78**, sans déprotection des diéthyle-phosphonates. A l'issue de ce test, nous pouvons dire que la déprotection des groupements diéthyle-phosphonates par le TFA n'est pas envisageable, il est donc nécessaire d'envisager une déprotection des diéthyle-phosphonates avec du TMSBr et de vérifier alors la stabilité de l'ester NHS en présence de ce réactif.

- Etude de la stabilité de l'ester NHS en présence de TMSBr

Afin de vérifier la stabilité de l'ester NHS en présence de TMSBr, la préparation du composé **79** a été effectuée. Ce composé est obtenu en une étape (*Schéma 4. 12*) à partir de l'acide **78** et du DCS **31**, en présence de DIEA. L'ester NHS **79** est isolé avec un rendement de 86 % après purification sur colonne.

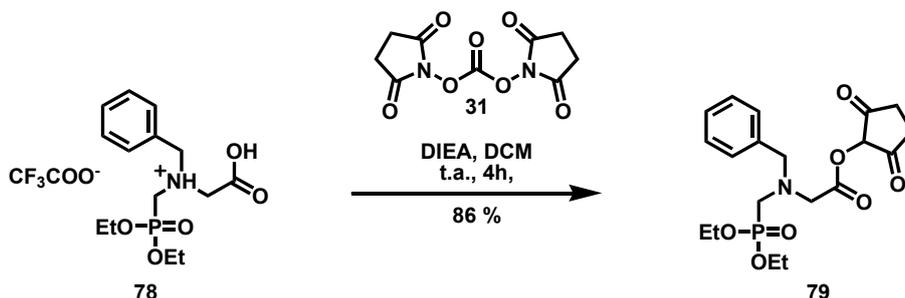


Schéma 4. 12. Synthèse du composé 79.

La stabilité de l'ester NHS est vérifiée par RMN du proton (*Figure 4.29*) lors de la déprotection des diéthyle-phosphonates est effectuée en présence de TMSBr, dans du DCM. Le spectre RMN de l'ester NHS présente 6 signaux distincts dans la région des protons aliphatiques, dont l'attribution est décrite sur la *Figure 4.29*.

Après 12 heures de réaction, le spectre RMN montre que les signaux sont fortement perturbés, ce qui est du à l'hydrolyse des groupements diéthyle-phosphonates. Un signal situé à 2,7 ppm apparaît, ce signal correspond au NHS libre, résultant de l'hydrolyse de l'ester NHS. Après 12 heures de réaction, l'hydrolyse des diéthyle-phosphonates est incomplète, les signaux dans le pied du pic attribué à l'ester NHS correspondent aux différents intermédiaires résultant de cette hydrolyse. En fin de réaction et après neutralisation, le pic correspondant à l'ester NHS n'intègre pas pour quatre protons ce qui prouve que l'ester NHS n'est pas stable en présence de TMSBr.

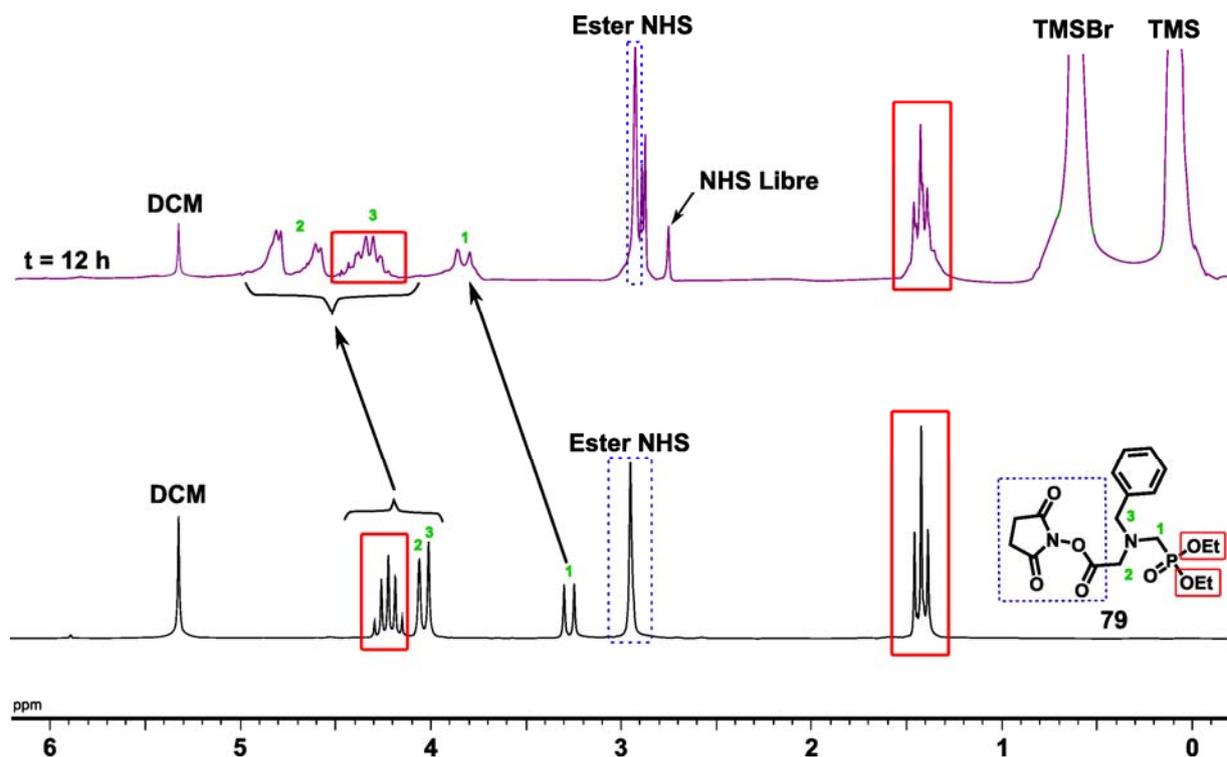


Figure 4.29. Superposition de la région aliphatique des spectres RMN du proton (300 MHz, CD_2Cl_2) obtenus lors du test de stabilité du groupement ester NHS de **79** en présence de TMSBr.

- Conclusion des tests préliminaires :

Ces deux tests montrent que la formation de l'ester activé NHS sur le ligand avant la complexation par l'ion terbium n'est pas envisageable. Ainsi pour obtenir le complexe activé **TbL17**, le ligand doit être complexé avec le terbium en premier, suivi de l'activation du lien butyrate par la formation de l'ester NHS.

4.3.3.2. Synthèse du complexe avant la formation de l'ester NHS.

- Synthèse du ligand **L17** via la plate-forme bispyrazolopyridine **75**

La synthèse du ligand **L17** se fait en trois étapes à partir de la plate-forme **75** (Schéma 4.13). La première étape est la réaction de carboamidation entre **75** et **27**, sous atmosphère de CO, en présence de palladium pour former l'intermédiaire **80** avec un rendement de 72 % après purification. Les déprotections des groupements diéthyle-phosphonates et des esters *tert*-butyles de **80** sont réalisées successivement par ajout de TMSBr, puis de TFA dans le DCM pour former le composé **81**. Après évaporation, le résidu est précipité dans le méthanol par Et_2O et THF. Les analyses par spectroscopie RMN du proton ont montré que ce résidu ne correspond pas au produit attendu, mais à un mélange de produits résultant de déprotections partielles des groupements diéthyle-phosphonates et des esters *tert*-butyles.

La solubilité limitée de ce mélange de produit dans le DCM ne nous a pas permis de compléter la déprotection des groupements protecteurs restants avec le TMSBr et le TFA. Des essais de déprotection dans le TMSBr pur ou avec d'autres solvants ont également été réalisés mais sans succès.

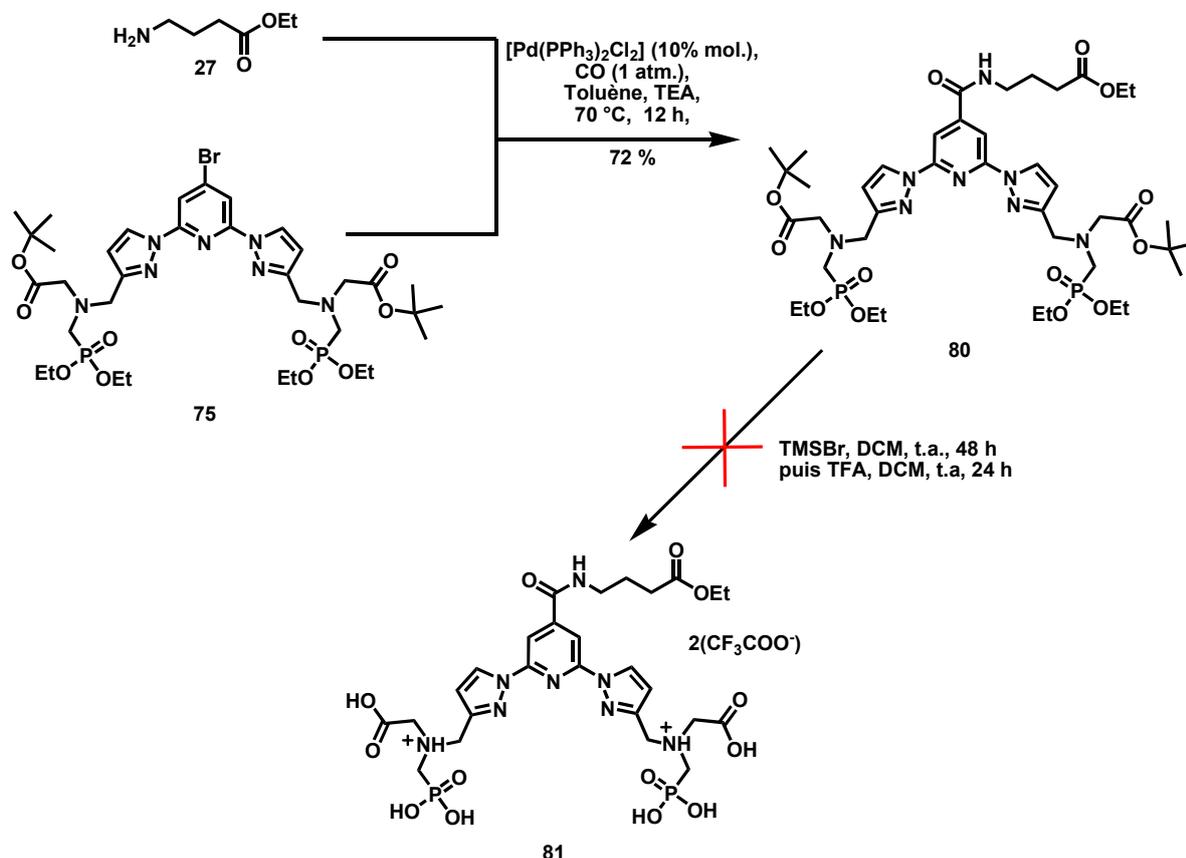


Schéma 4.13. Tentative de synthèse du ligand **L17** via la plate-forme 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine **75**.

- Synthèse du ligand **L17** via la plate-forme 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine **71**

La synthèse du ligand **L17** se fait en trois étapes à partir de la plate-forme **71** (Schéma 4.14). La première étape est la réaction de carboamidation entre **71** et **27**, sous atmosphère de CO, en présence de palladium pour former l'intermédiaire **82** avec un rendement de 77 % après purification. La déprotection des groupements diéthyle-phosphonates est réalisée avec TMSBr dans du DCM et permet d'obtenir le composé **83** avec un rendement de 78 % après précipitation dans le méthanol par Et₂O et THF. La saponification des groupements esters éthyliques est réalisée en présence de NaOH dans l'eau pour former le Ligand **L17**. Ce composé sera isolé par précipitation dans le méthanol par Et₂O et THF.

Les analyses du précipité montrent qu'une partie des esters éthyliques n'a pas été saponifiée. Cette réaction incomplète s'explique par l'utilisation du TMSBr à l'étape précédente. L'utilisation de TMSBr génère du HBr qui provoque la protonation de la plate-forme. Lors de

l'ajout de NaOH, une partie est consommée dans la neutralisation de ces sites protonés. Une fois les sites déprotonés, la quantité de NaOH restante n'est plus suffisante pour permettre la saponification complète des groupements esters éthyliques. Le précipité est donc dissout à nouveau dans de l'eau, et NaOH est ajouté pour compléter la saponification des groupements esters restants. Les analyses effectuées sur le produit obtenu montrent que la réaction de saponification est cette fois complète, mais également que la fonction amide reliant le lien butyrate à la plate-forme a été rompu, conduisant au produit **84**.

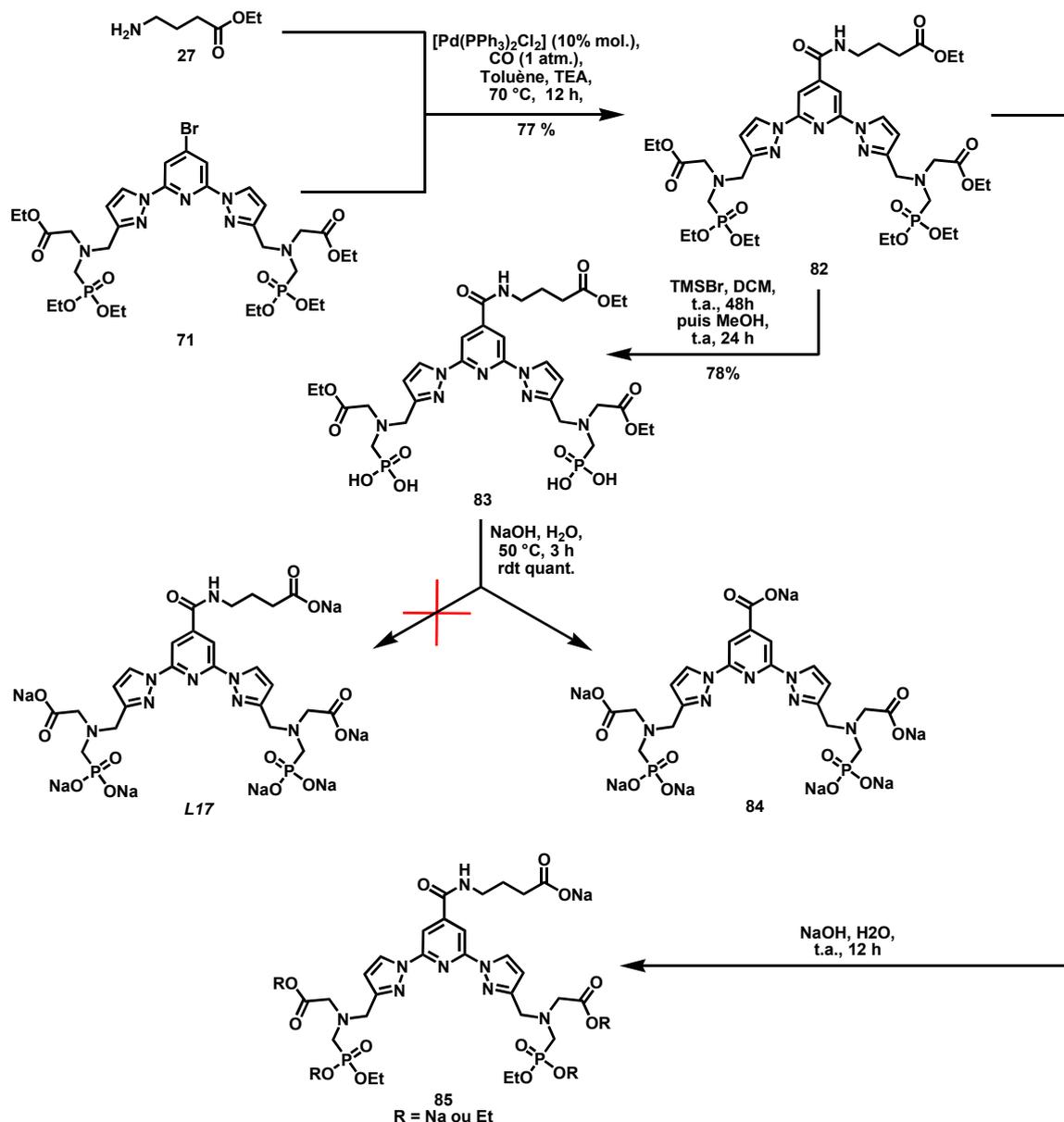


Schéma 4.14. Synthèses du ligand L17 conduisant aux produits **84** et **85**.

La méthodologie utilisée pour cette synthèse n'est donc pas la bonne car elle provoque la protonation de la plate-forme avec l'utilisation de TMSBr, et nous oblige par la suite à utiliser un excès de soude. Cet excès de soude engendre par la suite la perte du lien butyrate. Après l'utilisation de TMSBr, la neutralisation du milieu avec une solution diluée de NaOH a été

envisagée. Le problème de cette neutralisation est la formation de sels NaBr. Du fait de la bonne solubilité du composé **83** dans les solvants protiques tel que l'eau, le méthanol, ou l'éthanol, la purification de ce composé par précipitation n'a pas été possible. La présence de ces sels et la sensibilité de la fonction amide à la présence d'un excès de NaOH ne nous permettent pas d'obtenir le ligand **L17** à partir du composé **83**.

Afin d'obtenir le ligand **L17**, une nouvelle voie de synthèse est envisagée (*Schéma 4.14*), débutant par la saponification des esters éthyliques en présence de 3,3 équivalents de NaOH puis par l'hydrolyse des groupements diéthyle-phosphonates. Le composé **82** est donc engagé dans une réaction de saponification en présence de NaOH dans un mélange eau/méthanol (50/50). Après évaporation, le résidu est dissout dans un minimum de méthanol est un précipité blanc est obtenu par addition d'Et₂O et de THF. Les analyse de ce composé montrent que la déprotection des esters éthyliques est partielle et qu'une partie des groupements diéthyle-phosphonates a été mono-déprotégé pour former le composé **85**.

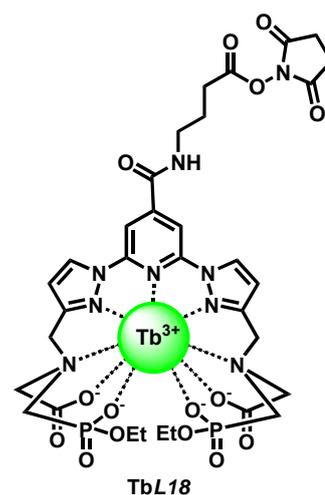
4.3.4. Synthèse du complexe activé **TbL18**.

Les tentatives pour obtenir le complexe **TbL17** ont été infructueuses, mais les résultats obtenus montrent que la préparation d'un ligand avec des groupements éthyle-phosphonates et la fonction d'activation NHS sur le lien butyrate peut être envisagée. Nous nous sommes donc proposés de préparer le complexe **TbL18**.

A la différence du ligand **L17**, le ligand **L18** possède des bras de types glyphosates sous forme éthyle-phosphonates. Pour ce complexe, la formation de l'ester NHS avant complexation n'est pas envisageable, car il n'est pas possible d'obtenir une déprotection sélective de l'ester du lien butyrate.

La synthèse du complexe **TbL18** est décrite sur le *Schéma 4.15*. Elle se fait en trois étapes. La première étape est la saponification des trois esters éthyliques et de deux groupements éthyle-phosphonates du composé **82** en présence de NaOH dans du THF.

Le ligand **86** est isolé après précipitation dans le méthanol par Et₂O et THF avec un rendement de 75 %. L'étape suivante est la complexation du composé **86** avec les sels de terbium TbCl₃.6H₂O dans l'eau pour obtenir le complexe **87** avec un rendement de 79 % après précipitation dans le méthanol par Et₂O et THF. Le complexe **TbL18** est obtenu avec un rendement de 49 % par réaction du complexe **87** avec le tétrafluoroborate de



N,N,N',N'-tetramethyl(succinimido)uronium (TSTU)⁹¹ en présence de DIEA dans un mélange DMF/eau (9/1) tel que décrit dans la littérature.¹¹⁰

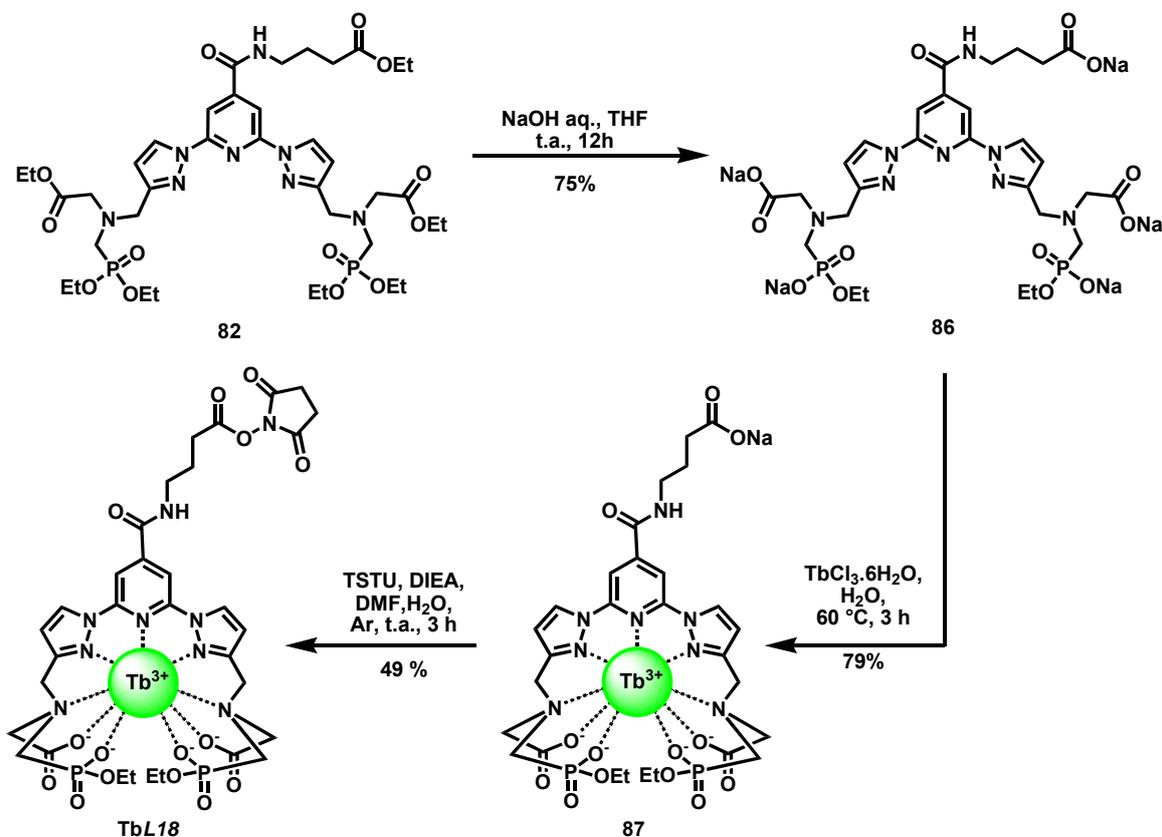


Schéma 4. 15. Synthèse du complexe **TbL18**.

La formation de l'ester NHS a été confirmée en spectroscopie infrarouge avec la présence des bandes caractéristiques à 1812 et 1780 cm^{-1} . Notons que la préparation du complexe de lanthane n'a pas été faite faute de temps. La position de l'ester NHS, sur le lien butyrate et/ou sur les carboxylates de la cavité complexante, ne peut pas être affirmée.

4.3.5. Propriétés photophysiques et stabilité du complexe **TbL18** en milieu biologique.

La Figure 4.30 représente la superposition des spectres d'absorption UV/Visible, d'émission ($\lambda_{\text{ex}} = 327\text{ nm}$), et d'excitation ($\lambda_{\text{em}} = 544\text{ nm}$) obtenu pour le complexe **TbL18** en solution aqueuse ($c = 5,37 \times 10^{-5}\text{ M}$, tampon Tris/HCl, $0,01\text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$).

En solution diluée, le complexe **TbL18** présente une bande d'absorption intense à 273 nm ($\epsilon_{273\text{ nm}} = 17800\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et une bande moins intense à 327 nm ($\epsilon_{327\text{ nm}} = 6700\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) correspondant aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur le chromophore bispyrazolylpyridine. Le spectre d'absorption UV/Visible et le spectre d'excitation obtenus

¹¹⁰ Bannwarth, W.; Knorr, R.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 1157.

pour une émission à $\lambda_{em} = 544$ nm sont superposables. L'émission observée à partir du terbium provient bien d'un transfert d'énergie de l'état excité du ligand vers les états excités luminescents de l'ions Tb^{3+} .

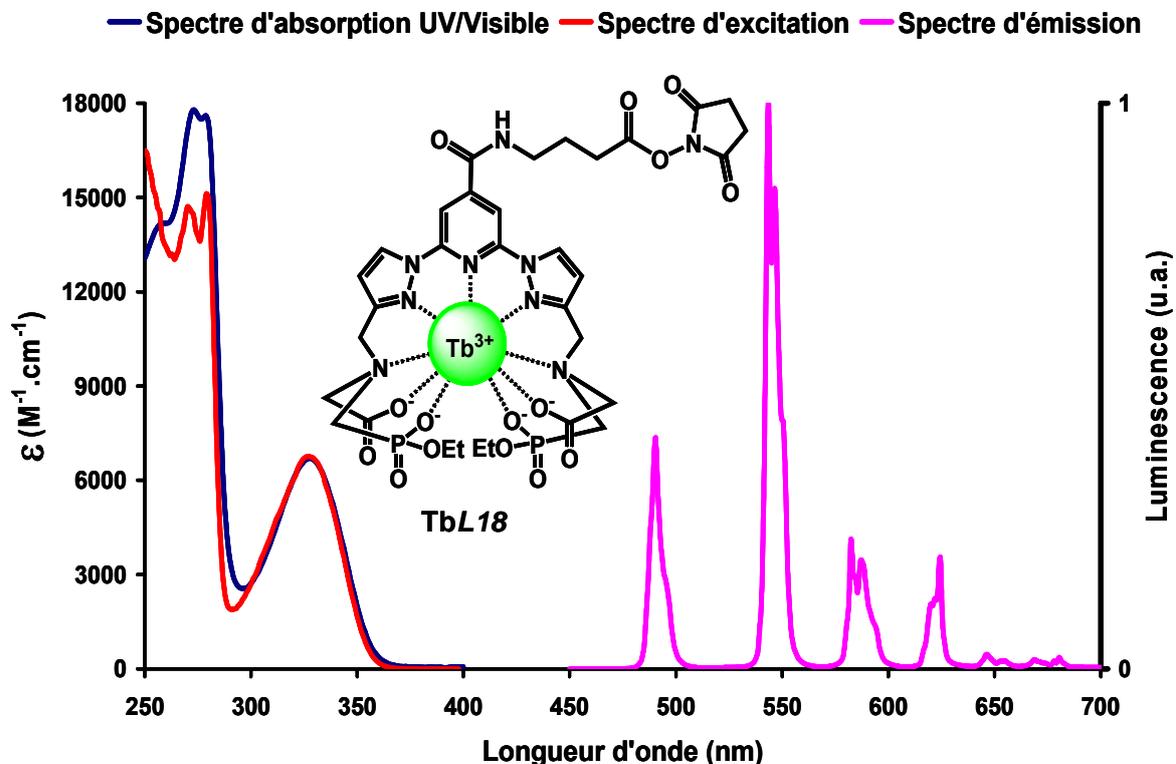


Figure 4.30. Superposition des spectres d'absorption, d'excitation ($\lambda_{em} = 544$ nm) et d'émission ($\lambda_{ex} = 327$ nm, filtre passe haut 390 nm) du complexe **TbL18** en solution aqueuse ($c = 5,37 \times 10^{-5}$ M, tampon Tris/HCl, 0,01 M, pH = 7,0).

Notons que les intensités des bandes d'absorption du complexe **TbL18** sont du même ordre de grandeur que celle du complexe **TbL6** ($\epsilon_{273\text{ nm}} = 16000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{327\text{ nm}} = 6900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les données photophysiques obtenues pour ce complexe sont résumées dans le *Tableau 4.7*.

Tableau 4.7. Propriétés photophysiques du complexe TbL18 en solution aqueuse.

Complexes de lanthanide	Absorption		Emission				q
	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	τ (ms)		ϕ (%)		
			H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O	
TbL18	273	17800	2,7	3,4	65 ^a	94 ^a	0,3 ^b ; 0,1 ^c
	327	6700					

a) mesuré par rapport à R6G⁵⁰, b) calculé selon Horrocks et Sudnick⁵², c) calculé selon Parker et al.⁵⁴

Le complexe **TbL18** a un temps de vie de luminescence de 2,7 ms et un rendement quantique dans l'eau important ($\phi_{H_2O} = 65\%$), le nombre d'hydratation déterminé pour ce complexe

montre qu'aucune molécule d'eau n'est présente en première de coordination du terbium. Les propriétés photophysiques de ce complexe sont intéressantes. Pour pouvoir utiliser ce complexe comme marqueur, celui-ci doit être stable en milieu biologique.

La stabilité des complexes a été étudiée avec la détermination du rendement quantique de luminescence du complexe **TbL18** dans différents milieux. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec l'entreprise Cézanne. Les résultats sont résumés dans le *Tableau 4.8*.

Tableau 4.8. Détermination de la stabilité du complexe TbL18 par la mesure de son rendement quantique dans divers milieux.

milieux	ϕ (%)
Phosphate 0,1 M, pH = 7,0	47*
Tris/HCl 0,1 M, pH = 7,0	50*
Tris/HCl 50 mM / Sérum 50%	7*

* La valeur du rendement quantique dans l'eau ($\phi_{H_2O} = 65\%$) a servi de référence pour la détermination des rendements quantiques dans les autres milieux.

La chute de rendement quantique avec l'utilisation du sérum montre que ce complexe n'est pas stable en milieu biologique. La présence de éthyle-phosphonates sur le bras de complexation ne permet pas d'obtenir un complexe suffisamment stable pour permettre son utilisation en milieu biologique.

4.4. Conclusion

Les efforts que nous avons développés pour déplacer l'absorption des ligands dans le domaine du visible ont été fructueux comme le montre les propriétés photophysiques des complexes obtenus à partir des ligands **L10** et **L11**. Ces complexes possèdent un chromophore 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine qui absorbe fortement à 360 nm. Cependant ces complexes présentent plusieurs inconvénients tels que leur solubilité restreinte en milieu aqueux, le phénomène de transfert d'énergie en retour avec les complexes de terbium, et une faible stabilité pour le marquage biologique. A l'heure actuelle, beaucoup reste à faire sur ce type de complexes pour leur permettre une bonne solubilité en milieu aqueux et améliorer leurs stabilités. Les éventuelles pistes sont la modification des bras chélatants, ou l'insertion sur la structure du ligand des fonctions solubilisantes telles que des entités polyéthylèneglycol (PEG).

Afin d'améliorer la stabilité des complexes en milieu biologique l'insertion d'entités phosphonates sur la poche de complexation a été développée. L'utilisation du méthylène diphosphonate qui permet l'insertion de quatre entités phosphonates n'ayant pas fournis les

résultats attendus, les investigations se sont tournées vers l'utilisation de bras complexants glyphosates. La méthodologie de synthèse développée a permis d'isoler et de caractériser le complexe **TbL14** possédant des propriétés photophysiques très intéressantes, avec un temps de vie long, et constant quelque soit le milieu, y compris en milieu sérique.

A partir de ces résultats, la préparation de nouveaux complexes possédant un lien pour le marquage de matériel biologique a été tentée et s'est avérée difficile. Les premiers essais de synthèse et l'expérience acquise dans les chapitres précédents nous ont contraints à nous diriger vers une poche de complexation possédant des bras glyphosates avec des groupements éthyle-phosphonates tel que le complexe **TbL18**. Cependant, même si les propriétés photophysiques de ce complexe sont intéressantes dans l'eau comme un temps de vie de 2,7 ms et un rendement quantique $\phi_{H_2O} = 65 \%$, la faible stabilité de ce complexe en milieu sérique ne permet pas son utilisation comme marqueur biologique.

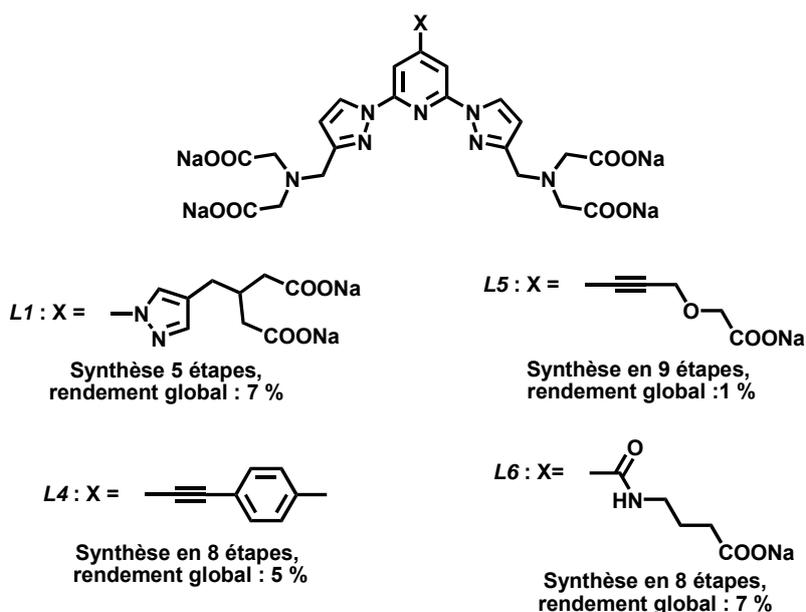
Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Ce travail de thèse a été consacré à la préparation de marqueurs luminescents à base d'ions lanthanides. Ces complexes sont bâtis à partir d'un chromophore de type 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine et sont constitués d'une poche de complexation nonadentate. Nous avons montré que ce type de ligand est adéquat pour la photosensibilisation des ions lanthanides, en particulier le terbium. Cependant la synthèse dite classique de la 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine, développée par Goldsby *et al.*²⁸ dans les années 90, utilise des conditions de réactions rudes, aussi bien au niveau des réactifs, qu'au niveau des températures et des temps de réaction.

Nous avons mis au point une nouvelle voie de synthèse qui nous a permis d'obtenir l'antenne 2,6-bis-pyrazol-1-yl-pyridine avec des conditions douces de réaction. Cette méthodologie est basée sur des réactions de substitutions nucléophiles aromatiques avec la 2,4,6-trifluoropyridine.

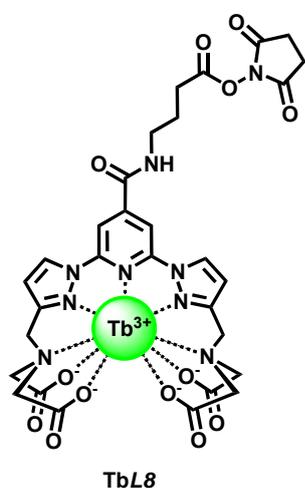
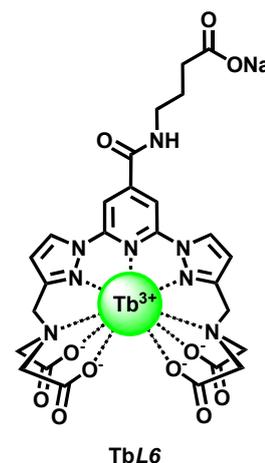
En se basant sur les travaux effectués par l'équipe de Schlosser,³⁷ nous avons pu différencier les positions 2 et 6 de la position 4 et substituer l'atome de fluor sur cette dernière position par un atome de brome. Ainsi nous avons pu préparer un ligand dont le cœur 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine porte un atome de brome en position 4', et peut-être aisément substitué grâce à des réactions de couplage croisés,^{44,45} à des réactions de carboamidation⁴² ou de carboalkoxylation,⁴³ permettant ainsi d'obtenir des complexes de lanthanides avec des fonctionnalisations spécifiques sur la position 4' de l'antenne bispyrazolylypyridine.



Les propriétés photophysiques des complexes de terbium et/ou d'euporium en solution aqueuse sont très intéressantes :

- Les rendements quantiques de luminescence s'échelonnent entre 4,5 et 12 % pour les complexes d'euporium et entre 3,5 et 100 % pour les complexes de terbium.
- Les temps de vie de luminescence sont longs, entre 1 et 1,5 ms pour les complexes d'euporium et jusqu'à 3 ms pour les complexes de terbium.
- La poche de complexation ciblée à la caractéristique de bien protéger l'ion lanthanide du milieu comme le montre le nombre d'hydratation q inférieur ou égal à 1 pour l'ensemble des complexes.
- La détermination de la stabilité de la poche de complexation, effectuée par l'équipe du Dr Carlos Platas-Iglesias,⁵⁷ a mis en évidence une bonne stabilité des complexes en milieu aqueux avec des constantes de stabilité proche de celle des complexes de référence EDTA-Ln.⁶⁰

Parmi eux, le complexe **TbL6** se distingue par (i) son rendement quantique de luminescence quantitatif qui trouve son origine dans la présence d'une fonction amide entre le lien butyrate et la plate-forme 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine, (ii) son temps de vie de luminescence de 2,8 ms en milieu aqueux, et (iii) une brillance importante ($6500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). De plus le lien butyrate semble être adapté pour le marquage de matériel biologique. Ce complexe a été sélectionné comme marqueur de molécules bioactives. Cependant son utilisation dans le domaine du marquage de matériel biologique nécessite la présence d'une fonction sur le lien butyrate qui favorise la formation



d'une liaison covalente entre le complexe et la molécule bioactive. Afin de respecter cette condition, le complexe **TbL8** a été synthétisé en douze étapes avec un rendement global de 1,4 %. Ce complexe a été utilisé dans des dosages fluoroimmunologiques d'antigène avec la technologie TRACE[®], particulièrement pour la détection de l'antigène ACE. Ce type de dosage est basé sur l'utilisation du temps résolu et d'un processus de transfert d'énergie par résonance (FRET) d'un donneur d'énergie vers un accepteur d'énergie de type cyanine.

Les résultats ont montré un taux de marquage important et les tests de dosages fluoroimmunologiques avec la technologie TRACE[®] ont montré que le système **TbL8**/Cy5.5 est plus efficace que le système de référence [**Eu(TBP)**]/Cy5.5. Cependant, ces tests ont également mis en évidence la stabilité limitée de la poche de complexation en milieu sérique et la décomplexation d'une partie des ions Tb³⁺.

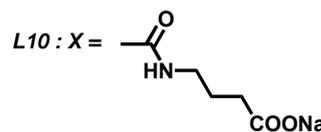
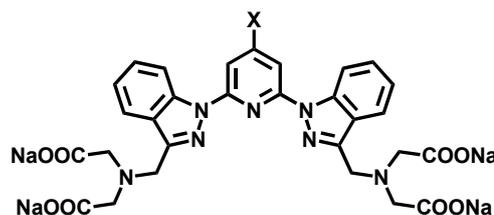
L'ensemble des résultats obtenus ont mis l'accent sur certaines imperfections pouvant être corrigées grâce à une optimisation des ligands. Les points que nous avons cherchés à optimiser sont d'une part les propriétés optiques des complexes, en déplaçant leur absorption dans le domaine du visible, et d'autre part la stabilité de la cavité complexante en milieu sérique.

L'optimisation de l'absorption des complexes a été effectuée grâce à la préparation de ligand avec l'antenne 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine, en utilisant la méthode mise au point pour l'antenne 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine.

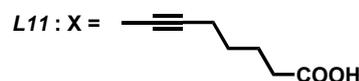
Grâce à la présence d'un cycle aromatique fusionné au cycle pyrazolique, l'utilisation des entités indazoles, permet d'augmenter la délocalisation électronique et de déplacer son absorption vers les basses énergies. Ainsi nous avons réussi à déplacer l'absorption des complexes de 327 nm vers 360 nm.

Le problème de cette modification est que l'utilisation de ces groupements aromatiques favorise le transfert d'énergie en retour des états excités du terbium vers l'état triplet des ligands. Malgré ce transfert en retour, les propriétés photophysiques de ces complexes restent intéressantes, avec des temps de vie proches de la milliseconde, des rendements quantiques de 25 % pour **TbL10** et de 35 % pour **TbL11**, et une brillance supérieure à 1000 M⁻¹.cm⁻¹.

A la différence des complexes de terbium, le complexe d'euporium **EuL10** ne subit pas le transfert d'énergie en retour et ses propriétés photophysiques sont également très intéressantes. Ce complexe possède un temps de vie de luminescence de 1,1 ms, avec un rendement quantique de 16 % et le nombre d'hydratation inférieur à 1 montre une bonne protection de l'euporium par la cavité complexante.

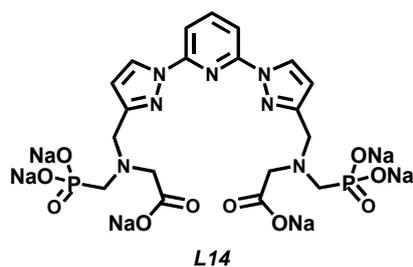
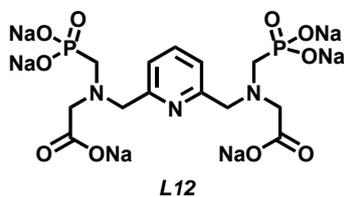


Synthèse en 8 étapes,
rendement global : 2 %



Synthèse en 8 étapes,
rendement global : 2 %

Bien que les propriétés photophysiques de ces complexes permettent leur utilisation en tant que marqueur biologique, leur utilisation dans le domaine des biotechnologies est cependant limitée par leur manque de solubilité en milieu aqueux.



L'optimisation de la stabilité des complexes en milieu sérique est obtenue grâce à l'utilisation de bras chélatants de type glyphosate qui ont permis l'insertion de deux atomes de phosphores pentavalents dans la cavité complexante.

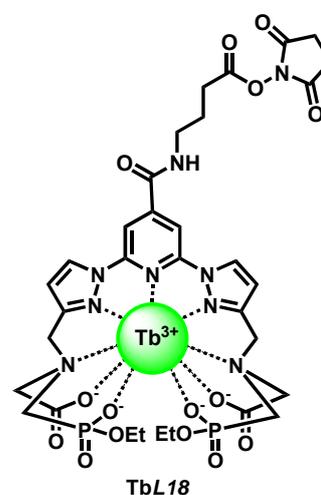
Le ligand **L12**, qui possède un cycle pyridine, moins élaboré que le chromophore avec 2,6-bispyrazol-1-ylpyridine, nous a servi de modèle et est obtenu en sept étapes avec un rendement global de 24 %. Les propriétés photophysiques des complexes de **TbL12** et **EuL12** ne sont

pas intéressantes pour le marquage de matériel biologique du fait de leur faible brillance, mais les travaux antérieurs effectués sur ce type de ligands montrent qu'ils peuvent être utilisés pour la préparation de complexes de gadolinium, pouvant servir d'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique nucléaire.¹⁰⁷

La méthodologie utilisée pour le ligand **L12** a été étendue pour la synthèse du ligand **L14**, obtenu en onze étapes avec un rendement global de 11 %. Le complexe **TbL14** obtenu possède des propriétés photophysiques très intéressantes, avec un rendement quantique de 48 % et un temps de vie 2,9 ms, constant quelque soit le milieu, y compris en milieu sérique, ce qui montre la stabilité des complexe en milieu biologique.

A partir des résultats obtenus avec le complexe **TbL14**, la préparation de nouveaux complexes possédant un lien pour le marquage de matériel biologique a été tentée et s'est avérée difficile. Les différentes tentatives que nous avons effectuées, et l'expérience acquise sur ce type de composé, nous ont contraints à nous diriger vers une poche de complexation possédant des bras glyphosates avec des groupements éthyle-phosphonates tel que le complexe **TbL18**, obtenu en quatorze étapes avec un rendement global de 1,5 %.

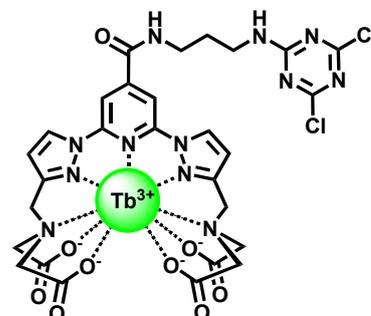
Cependant, même si les propriétés photophysiques de ce complexe sont intéressantes comme son temps de vie dans l'eau de 2,7 ms et un rendement



quantique $\phi_{H_2O} = 65 \%$, la faible stabilité de ce complexe en milieu sérique ne permet pas son utilisation comme marqueur biologique.

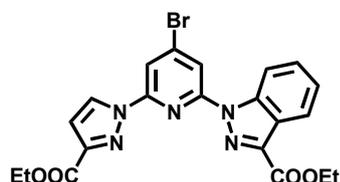
Perspectives

Avec la méthodologie que nous avons mis au point, la préparation d'un marqueur avec un temps de vie de luminescence long, un rendement quantique élevé et un lien possédant une fonction amine activée avec la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine peut être envisagée pour permettre le marquage d'anticorps et des dosages fluoroimmunologiques avec d'autres technologies que la technologie TRACE[®].¹¹¹



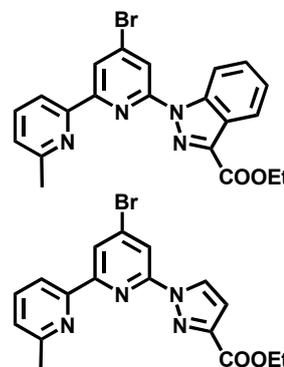
La synthèse de ligands hybrides pyrazole/indazole serait intéressante pour les raisons suivantes :

- Déplacer l'absorption des complexes dans le domaine du visible
- Augmenter considérablement le coefficient d'extinction molaire des complexes



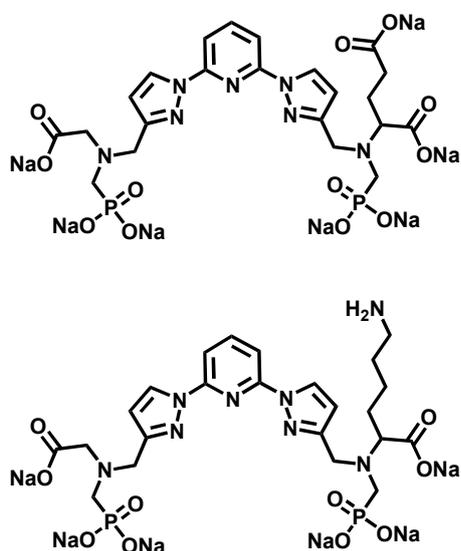
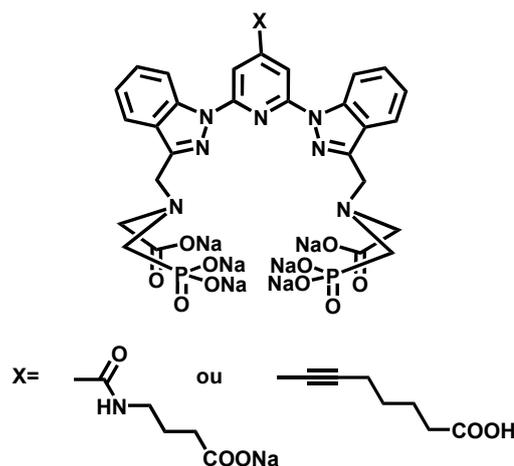
Le premier chromophore auquel nous pouvons penser est la 2-indazol-1-yl-6-pyrazol-1-yl-pyridine, en procédant par deux substitutions nucléophiles aromatiques successives de la 4-bromo-2,6-difluoro-pyridine, avec le pyrazolate d'éthyle, puis avec l'indazolate d'éthyle, ou l'inverse, avec la méthode que nous avons mis au point.

Le second chromophore peut être la préparation de la 6'-indazol-1-yl-2,2'-bipyridine ou de la 6'-pyrazol-1-yl-2,2'-bipyridine, en débutant par la mono substitution nucléophile aromatique d'un des atomes de fluors de la 4-bromo-2,6-difluoro-pyridine par le pyrazolate d'éthyle ou l'indazolate d'éthyle suivie d'une substitution nucléophile aromatique avec l'anion formé à partir de la 2-bromo-6-méthyl-pyridine en présence de butyl-lithium par exemple.



¹¹¹ Mukkala, V. M.; Takalo, H.; Liitti, P.; Hemmilä, I.; *J. Alloys Compd.*, **1995**, 225, 507.

L'utilisation du glyphosate comme bras chélatants pour des ligands ayant comme base la 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine peut être une bonne alternative pour améliorer la solubilité des complexes associés en milieu aqueux. Ainsi nous pourrions obtenir des complexes possédant une bonne stabilité en milieu sérique, de bons rendements quantiques, des temps de vie longs, et surtout une absorption déplacée vers la région visible du spectre électromagnétique.



Certains travaux ont montré que la présence du lien vers les molécules bioactive sur un des bras de complexation peut être envisagée.¹¹¹ Ainsi, la préparation de glyphosates à partir de l'acide glutamique ou de la lysine peut permettre d'accéder à des ligands possédant, sur les bras chélatants, des fonctions dédiées au marquage biologique soit de type carboxylate soit de type amine.

Le lien pour le marquage biologique étant sur le bras de complexation, la position 4' est donc libre d'accès, ce qui peut permettre la préparation d'une antenne plus élaborée à partir des chromophores 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine ou 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine.

Partie Expérimentale

Material and methods: Column chromatography and flash chromatography were performed by using silica (0.0063-0.200mm. Merck) or silica gel (40-63 μm . Merck) or on standardised aluminium oxide (Merck. Activity II-III). Acetonitrile and DCM were filtered over aluminium oxide and distilled over P_2O_5 . DMF, NEt_3 and DIEA were distilled over KOH, under reduced pressure. THF and Diethylether were distilled over sodium and benzophenone. Toluene was distilled over sodium.

Absorption and emission spectroscopy: UV/Vis absorption spectra were recorded on a Shimadzu UV3600 spectrometer. Emission and excitation spectra were recorded on a Perkin-Elmer LS50B (working in the phosphorescence mode) or a FL 920 Edinburgh instrument. When necessary a Hamamatsu R928 photomultiplier was used. Luminescence decays were obtained on the FL 920 Edinburgh instrument over temporal windows covering at least five decay times. Luminescence quantum yield were measured according to conventional procedures,⁴⁸ with diluted solutions (optical density < 0.05), by using $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ in nondegassed water ($\Phi=2.8\%$)⁴⁹ or Cresyl Violet in methanol ($\Phi=55\%$),⁵⁰ for Eu complexes and Rhodamine 6G in nondegassed water ($\Phi=76\%$),⁵⁰ or $[\text{TbL}(\text{H}_2\text{O})]\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ in nondegassed water ($\Phi=31\%$)^{8c} for Tb complexes as references, with the necessary correction for refractive index of the media used.⁵¹ Estimated errors are $\pm 15\%$. Spectrometric titrations were performed according to the literature.¹¹² Hydration number (q) were obtained by using equation [6], in which $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ and $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ refer to the measured luminescence decay lifetime (in ms) in water or deuterated water, respectively by using $A = 1.05$ and $B = 0$,⁵² $A = 1.11$ and $B = 0.31$ ⁵⁵ or $A = 1.2$ and $B = 0.25$,⁵⁴ respectively, for Eu, and $A = 4.2$ and $B = 0$ ⁵² or $A = 5$ and $B = 0.06$,⁵⁴ respectively, for Tb (estimated error ± 0.2 water molecules).

NMR spectroscopy: ^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR spectra were recorded on Bruker AC 200, Avance 300 and Avance 400 spectrometer working at 200, 300, and 400 MHz respectively. Chemical shifts are given in ppm, relative to the residual protonated solvent.

Conventional fluorescence microscopy: Conventional fluorescence microscopy images were obtained on a Leica DMLB fluorescence microscope equipped with a continuous 100 W mercury lamp and were recovered with a Hewlett Packard digital camera. Time-resolved luminescence microscopy images were obtained on the same microscope with the following

¹¹² L. J. Charbonnière, R. Schurhammer, S. Mameri, G. Wipff, R. F. Ziessel, *inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 7151.

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 μ s. In all experiments described here FWHH of 4 μ s was used. The numerical camera was replaced by an ICCD camera (model DH734-18F-03, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland) integrating a digital delay generator allowing 5 ns optical gating. The ICCD was fitted with C-mount adaptor to the bimolecular of the microscope and was monitored by a personal computer. Triggering of the flash lamp was mastered by the ICCD and delivered with 5 V TTL output to the opto-coupler of the lamp. In the typical experiment, images were recovered 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 ω (typically 5 ms). At time $\delta + \omega$, the intensifier is turned off until the beginning of the next cycle. For prompt fluorescence measurements δ is set to 0.

FRET experiments on KRYPTOR instrument: A homogeneous sandwich fluoroimmunoassay using time resolved amplified cryptate emission (TRACE) technology was set up. G15 monoclonal antibody was coupled to Cy5.5 fluorophore (GE Healthcare) and GFR44 monoclonal antibody was labelled with the donor: europium cryptate (BRAHMS reference kit commercially available), **TbL8**, and **TbL8** with TbCl_3 (5 μ g/mL). The coupling reactions with Europium cryptate and AF680 were performed according to the manufacturers' coupling protocols.

TbL8 was dissolved in DMF with a concentration of 3786 nmol/mL and an absorbance ratio R_z at two wavelengths (327nm/280nm) of 0.42. **TbL8** was coupled with GFR44 antibody (5.7 mg/mL) with an initial molar ratio (TbL8/GFR44) of 30, in carbonate buffer pH=8.3 for 1h. Then purification of the conjugate was performed by size exclusion chromatography on Sephadex G25 (GE Healthcare) with TRIS/HCl buffer pH=7.5. The final molar ratio obtained was 11.8 (TbL8/GFR44) with a yield of 43.6 %.

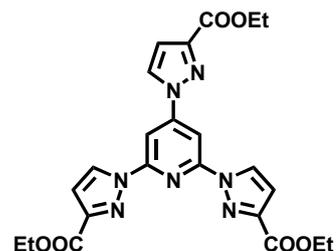
The stock Cya5.5-conjugated antibody and donor cryptate-conjugated antibody solutions were diluted to respectively 6.25 μ g/mL and 0.5 μ g/mL with assay buffer [0.1M Tris buffer, 0.1% bovine serum albumin, 0.3 mg/mL nonspecific mouse IgG, pH 7.1] prior to use. Standards used were taken from the commercial kit.

The immunoassay was performed by incubating 70 μ L of sample/calibrator, 40 μ L of Cya5.5-conjugated antibody solution and 40 μ L of donor-conjugated antibody solution at 37°C on

BRAHMS Kryptor automate (Cezanne SAS), according to the manufacturer's instructions. The reaction time of the assay was 39 min.

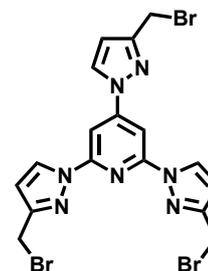
Compounds 2,³⁸ 14,⁴¹ 15,⁴¹ 20,³⁵ 38,⁹⁷ 45,⁹⁸ 55,¹⁰² 57,¹⁰² 59,¹⁰² 72,¹⁰² 73¹⁰² have been prepared according to experimental procedures described in the literature. Compounds 1, 6, 10, 21, 23, 24, 27, 31, 36, 37, 44, 52, 54, 56, 58, 60, 65, 71 are commercially available.

Synthesis of 3: To a solution of **1** (1 g, 7.5 mmol) and **2** (3.5 g, 24.75 mmol) in freshly distilled DMF (50ml), under an Ar atmosphere, was quickly added NaH (1.05 g, 60% in oil, 26.25 mmol). The solution was stirred at room temperature for 12 hours. The solvent was distilled off and the resulting yellowish oil was



dissolved in water (30 mL) and neutralised with concentrated HCl. The aqueous phase was extracted with DCM (3 × 15 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄, and concentrated to dryness to afford a pale rose solid. Purification by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH 100/0 to 99.8/0.2) afforded the pure product **3** as a white powder (2.6 g, 70%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.578 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 8.43 (s, 2H), 8.28 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.0 (d, J = 2.9 Hz, 2H), 4.47 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.46 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.45 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.44 (t, J = 7.2 Hz, 6H); ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 14.3, 61.5, 61.6, 101.0, 110.7, 111.7, 128.7, 129.1, 146.9, 147.2, 150.5, 150.9, 161.6, 161.8; IR (ATR, cm⁻¹) 3598 (w), 3523 (w), 3129 (w), 2983 (w), 2939 (w), 2907 (w), 1715 (s), 1613 (s), 1593 (m), 1524 (m), 1462 (s), 1448 (m), 1291 (m), 1231 (s), 1216 (s), 1177 (s), 1125 (m), 1048 (s), 1021 (s), 987 (m), 974 (s), EI/MS (DCM/MeOH): m/z 494.1 (M + H⁺, 100%); Elemental analysis calculated for C₂₃H₂₃N₇O₆: C, 55.98, H, 4.70, N, 19.87. Found: C, 55.73, H, 4.51, N, 19.62.

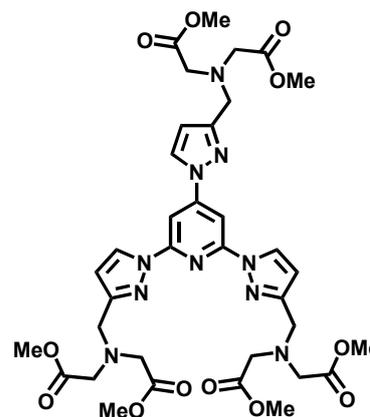
Synthesis of 4: to a solution of **3** (250 mg, 0.4 mmol) in anhydrous THF (30 mL) under Ar atmosphere, was added LiAlH₄ (54 mg, 1.40 mmol) in small amounts at 0 °C. The heterogeneous solution was heated at 50 °C during 12 hours and excess of LiAlH₄ was quenched with saturated solution of NH₄Cl (40 mL). The solution was filtered



over celite. The filtrate was concentrated to dryness and the residue was washed with THF. The resulting insoluble was filtrated off and the THF layer was concentrated to dryness to

afford triol compound (156 mg) as a white solid. The white solid was dissolved in freshly distilled DMF (6 mL) under Ar atmosphere. PBr_5 (810 mg, 1.89 mmol) was added, and the solution was heated at 50 °C during 12 hours. The solvent was distilled off and the resulting orange oil was dissolved in DCM (10 mL). DCM layer was washed with water (3×5 mL), dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduce pressure to afford a brown solid. Purification by column chromatography (SiO_2 DCM/MeOH 100/0 to 90/10) afforded the pure product **4** as a white powder (70 mg, 31% for the two steps). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.50 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 8.13 (s, 2H), 6.64 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 4.57 (s, 6H), ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 24.2, 24.5, 98.4, 108.0, 108.4, 109.5, 128.6, 150.1, 151.1, 152.4; IR (ATR, cm^{-1}) 3141 (w), 3124 (w), 1617 (s), 1591 (s), 1530 (m), 1468 (s), 1390 (s), 1226 (m), 1211 (m), 1045 (s), 981 (m), 974 (m), EI/MS (DCM/MeOH): m/z 558.0 ($\text{M}+\text{H}^+$, 95%), 556.0 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%), 554.0 ($\text{M}+\text{H}^+$, 30%), 478.0 ($[\text{M}+\text{H}^+]-\text{Br}$, 30%), 476.0 ($[\text{M}+\text{H}^+]-\text{Br}$, 60%), 474.0 ($[\text{M}+\text{H}^+]-\text{Br}$, 30%); Elemental analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{Br}_3\text{N}_7$: C, 36.72, H, 2.54, N, 17.63. Found: C, 36.55, H, 2.31, N, 17.42.

Synthesis of 5: **4** (70 mg, 0.12 mmol), anhydrous K_2CO_3 (69 mg, 0.5 mmol) and dimethyl iminodiacetate hydrochloride (79 mg, 0.4 mmol) were dissolved in anhydrous acetonitrile (15 mL) under Ar atmosphere. The heterogeneous solution was heated at 60 °C during 12 hours. Excess of K_2CO_3 was filtered off and the solvent was distilled off to afford colorless oil. Purification by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH 100/0 to 98/2) afforded the pure product **5** as a white powder

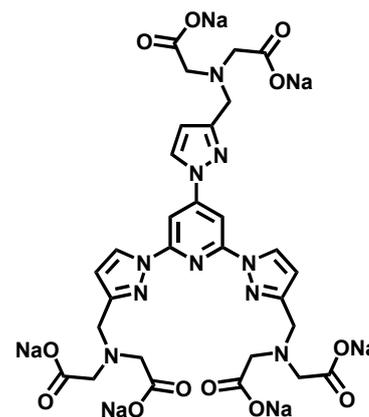


(40.2 mg, 42%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.50 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.09 (s, 2H), 6.63 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 4.06 (s, 6H), 3.72 (s, 18H), 3.65 (s, 12H); ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 29.8, 31.0, 51.6, 51.7, 54.5, 97.9, 108.6, 109.7, 128.3, 128.5, 150.3, 151.3, 153.1, 153.5, 171.5, 171.6.; IR (ATR, cm^{-1}) 3127 (w), 3005 (w), 2991 (w), 2953 (w), 2849 (w), 1733 (s), 1612 (s), 1590 (m), 1535 (m), 1490 (w), 1471 (s), 1436 (m), 1390 (m), 1342 (w), 1275 (m), 1261 (m), 1197 (s), 1180 (s), 1151 (s), 1047 (m), 1011 (m), 970 (s). EI/MS (DCM/MeOH): m/z 792.2 (M, 100%). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$: C, 52.76, H, 5.57, N, 17.58. Found: C, 52.95, H, 5.79, N, 17.85.

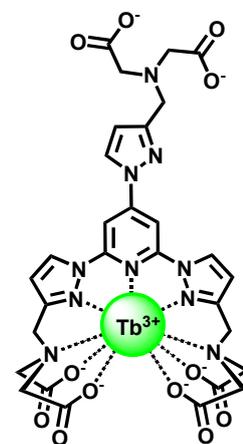
Synthesis of *LI*: to a solution of **5** (150 mg, 0.2 mmol) in methanol (20 mL), was added a solution of NaOH (64 mg, 1.6 mmol) in water (20 mL). The reaction mixture was heated at 60 °C during 4 hours. Solvents were distilled off under reduced pressure and the residue was dissolved in a minimum of hot methanol and ***LI*** was precipitated as a white powder with THF (132 mg, 78%).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.75 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 8.67 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.12 (s, 2H), 6.59 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.80 (s, 4H), 3.15 (s, 12H); ¹³C {¹H}

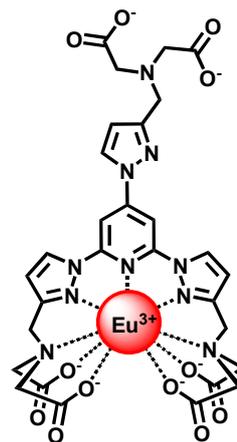
NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 53.5, 53.9, 60.9, 61.3, 99.2, 110.3, 111.1, 130.5, 131.7, 151.9, 152.6, 155.0, 155.7, 179.4, 179.6; IR (ATR, cm⁻¹) 3358 (br), 2925 (w), 1583 (s), 1532 (m), 1471 (m), 1394 (s), 1325 (s), 1254 (m), 1127 (w), 1053 (w), 982.36 (w). Elemental analysis calculated for (C₂₉H₂₆N₁₀O₁₂)Na₆·5H₂O: C 37.27, H 3.88, N 14.99. Found: C 37.60, H 3.28, N 14.20. ESI/MS (MeOH/H₂O, negative mode): m/z 821.1 ([M-Na]⁺, 100%), 399.0 ([M-2Na]²⁺, 50%), 258.3 ([M-3Na]³⁺, 20%). Calculated for (C₂₉H₂₆N₁₀O₁₂)Na₆·5H₂O: C, 37.27, H, 3.88, N, 14.99. Found: C, 37.60, H, 3.28, N, 14.20.



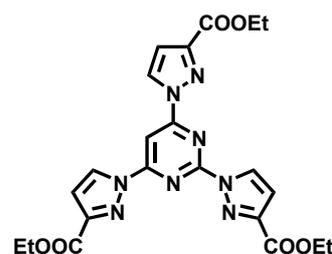
Na₃[TbLI]: ***LI*** (35 mg, 41.4 μmol) and TbCl₃·6H₂O (15.47 mg, 41.4 μmol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heating for 1 hour at 60 °C. The solution was concentrated to dryness under reduce pressure. The residue was dissolved in a minimum of methanol and THF was added to afford the complex as pale yellow powder. Upon centrifugation, the complex ***Na₃[TbLI]*** (38.7 mg, 100%) was isolated. IR (ATR, cm⁻¹) 3379 (br), 2955 (w), 1582 (s), 1535 (s), 1502 (m), 1458 (m), 1391 (s), 1331 (m), 1249 (m). Elemental analysis Calculated for (C₂₉H₂₆N₁₀O₁₂Tb)Na₃·6H₂O: C 33.41, H 3.67; N 13.43; measured: C 33.30; H 3.45; N 13.50. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 911.1 ([M-Na]⁺, 80 %), 444.0 ([M-2Na]²⁺, 20 %), 288.5 ([M-3Na]³⁺, 10 %)



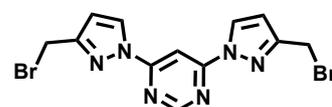
Na₃[EuLI]: ***LI*** (35 mg, 41.4 μmol) and $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15.17 mg, 41.4 μmol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heating for 1 hour at 60 °C. The solution was concentrated to dryness under reduce pressure. The residue was dissolved in a minimum of methanol and THF was added to afford the complex as pale yellow powder. Upon centrifugation, the complex ***Na₃[EuLI]*** (37.6 mg, 98%) was isolated. IR (ATR, cm^{-1}) 3372 (br), 2955 (w), 1582 (s), 1535 (m), 1500 (w), 1478 (w), 1457 (m), 1392 (s), 1331 (m), 1249 (m). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{Eu})\text{Na}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: C 33.06, H 3.83; N 13.29; measured: C 32.8; H 3.79; N 13.03. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 906.1 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 35 %), 905.1 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 100 %), 903.1 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 85 %) 441.0 ($[\text{M}-2\text{Na}^+]^{2-}$, 20 %), 439.0 ($[\text{M}-2\text{Na}^+]^{2-}$, 15 %)



Synthesis of 7: 2,4,6-trifluoropyrimidine **6** (500 mg, 3.7 mmol) and **2** (1.71 g, 12.21 mmol) were dissolved in freshly distilled DMF (25 mL). NaH (518 mg, 60% in oil, 12.95 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature, under Ar atmosphere during 12 hours. The solvent was distilled off and the residue was dissolved in DCM (20 mL) and water (20 mL). Organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (3 \times 10 mL). The combined organic extracts were dried over Na_2SO_4 , and concentrated to dryness. Purification by column chromatography (SiO_2 DCM/MeOH 100/0 to 99.5/0.5) afforded the pure product **7** as white solid (650 mg, 36%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.75 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 8.61 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 6.99 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 4.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 4.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 14.3, 61.6, 61.7, 95.1, 111.1, 111.3, 130.0, 131.0, 148.1, 148.5, 154.6, 160.1, 161.5, 161.6; IR (ATR, cm^{-1}) 3587 (w), 3473 (w), 3134 (w), 3095 (w), 2983 (w), 2939 (w), 2907 (w), 1716 (s), 1586 (s), 1528 (m), 1454 (m), 1435 (s), 1377 (s), 1327 (m), 1304 (s), 1257 (s), 1206 (s), 1181 (m), 1159 (m), 1141 (m), 1115 (w), 1097 (w), 1048 (m), 1035 (m), 1018 (m).

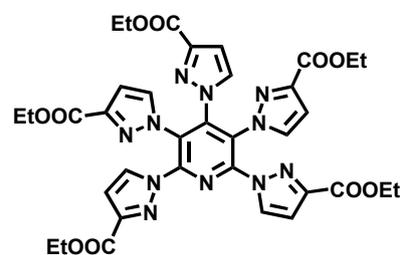


Synthesis of 9: to a solution of **6** (300 mg, 0.6 mmol) in anhydrous THF (30 mL) under Ar atmosphere, was added



LiAlH₄ (80 mg, 2.1 mmol) in small amounts at 0 °C. The heterogeneous solution was left at room temperature during 12 hours and excess of LiAlH₄ was quenched with saturated solution of NH₄Cl (40 mL). The solution was filtrated over celite. The filtrate was concentrated to dryness and the residue was washed with THF. The resulting insoluble was filtrated off and the THF layer was concentrated to dryness to afford alcohol compound (105 mg) as a white solid. The white solid was dissolved in freshly distilled DMF (10 mL) under Ar atmosphere. PBr₅ (329 mg, 1.20 mmol) was added, and the solution was left at room temperature during 12 hours. The solvent was distilled off and the resulting brown solid was dissolved in DCM (20 mL). DCM layer was washed with saturated NaHCO₃ solution (1×10 mL) and water (2×10 mL), dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduce pressure to afford a brown solid. Purification by column chromatography (SiO₂ DCM 100%) afforded the pure product **8** as a white powder (46 mg, 43% for the two steps). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.78 (s, 1H), 8.55 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 8.36 (s, 1H), 6.58 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 4.55 (s, 4H); ¹³C {¹H} NMR (75MHz, CDCl₃) δ 24.2, 95.7, 109.2, 129.3, 153.7, 158.0, 158.5; IR (ATR, cm⁻¹) 3162 (w), 3127 (w), 3023 (w), 2923 (w), 2853 (w), 1596 (s), 1539 (s), 1466 (s), 1425 (w), 1396 (s), 1381 (s), 1314 (m), 1283 (m), 1230 (m), 1207 (m), 1142 (m), 1128 (m), 1042 (s), 998 (m), 988 (m).

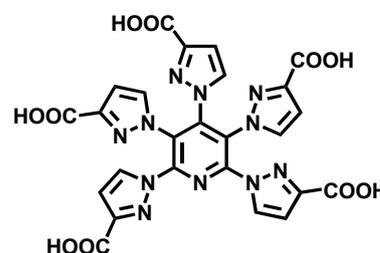
Synthesis of 11: pentafluoropyridine **10** (500 mg, 3 mmol), and **2** (2.31 g, 16.5 mmol) were dissolved in freshly distilled DMF (20 mL) under Ar atmosphere. NaH (660 mg, 60% in oil, 16.5 mmol) was added and the heterogeneous solution was stirred at room temperature during 12 hours. The solvent



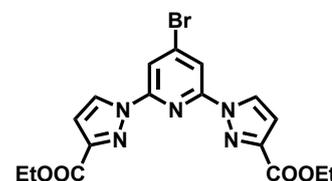
was distilled of and the residue was dissolved in DCM (20 mL) and water (20 mL). Organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (3×10 mL). The combined organic extracts were dried over Na₂SO₄, and concentrated to dryness to afford pale yellow solid. Purification by column chromatography (SiO₂ DCM/MeOH 100/0 to 99.5/0.5) afforded the pure product **11** as white solid (1.4 g, 60%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 6.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.34 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 4.32 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 4.28 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.34 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.34 (t, J = 7.2Hz, 6H), 1.32 (t, J = 7.2 6H); ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 14.0, 14.2, 14.3, 61.2, 61.3, 61.4, 110.1, 110.2, 110.8, 122.7, 131.5, 134.0, 135.7, 146.3, 146.6, 146.7, 148.1, 148.9, 161.0, 161.2, 161.6, IR

(ATR, cm^{-1}) 3248 (w), 3112 (w), 2985 (w), 2939 (w), 1727 (s), 1583 (w), 1525 (w), 1474 (m), 1445 (w), 1380 (s), 1328 (w), 1301 (w), 1260 (s), 1189 (s), 1152 (m), 1094 (w), 1053 (m), 1022 (m), 980 (m), 970 (m).

Synthesis of 12: **11** (600 mg, 0.8 mmol) and NaOH (176 mg, 4.4 mmol) were dissolved in 20 mL of methanol/water (1/1). The solution was stirred at 50 °C during 12 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was dissolved in a minimum of water and precipitated by addition of ethanol. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.70-7.10 (m, 6H), 6.67-6.39 (m, 6H),



Synthesis of 16: In round bottom schlenk flask with freshly distilled DMF (100 mL), **14** (2.89 g; 14.9 mmol) and **2** (4.17 g; 29.8 mmol), under argon atmosphere, was added NaH (60% in oil, 1.32 g; 32.8 mmol). Solution was stirred during 2 hours at 0 °C.

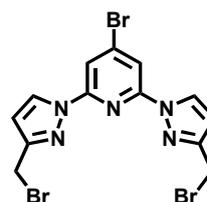


Solvent was distilled off and the residue was dissolved in DCM (100 mL), washed with (3 \times 100 mL) of water and brine. Organic layer was dried with Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness. Crude product was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/00 \rightarrow 99.5/0.5) to afford **16** (5.22 g; 80 %) as a white solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.55 (d; $J = 2.6$ Hz; 2 H); 8.28 (s; 2 H); 7.01 (d; $J = 2.6$ Hz; 2 H); 4.46 (q; $J = 7.1$ Hz; 4 H); 1.44 (t; $J = 7.2$ Hz; 6 H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 14.3, 61.5, 110.7, 114.6, 128.6, 137.4, 146.9, 149.7, 161.7. IR (cm^{-1} , ATR): ν 1774 (w); 1720 (s); 1595 (s); 1577 (s); 1525 (m); 1458 (s); 1427 (m). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{O}_4$: C 47.02; H 3.71; N 16.13. Found: C 46.82; H 3.57; N 15.72. FAB $^+$ /MS m/z : 435.0 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%); 433 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%).

Synthesis of 17 and 20: In round bottom schlenk flask under argon atmosphere with **16** (3.07 g; 7.07 mmol) and distilled THF (130 mL) at -5 °C, LiAlH_4 (0.54 g; 14.1 mmol) was added in small portion. After complete addition of LiAlH_4 , heterogeneous solution was stirred at -5 °C during 1 hour, then hydrolysed with saturated NH_4Cl solution until two phases appeared, then filtrated on celite and concentrated to dryness to obtain a white solid. White residue was dissolved in hot THF, then filtrated. Filtrat was concentrated to dryness to afford the corresponding diols (Br in 4-position, and H in 4-position, 1.76 g of crude product, 5.03

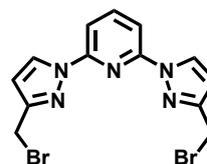
mmol). Diols were dissolved in distilled DMF (100 mL), PBr₃ (1.42 mL; 15.1 mmol) was added at room temperature. Solution was stirred at room temperature during 12 hours. Solvent was distilled off and the residue was dissolved in a H₂O/CH₂Cl₂ solution then neutralised with NaHCO₃. Aqueous phase was extracted with DCM (4 × 200 mL). Combined organic phases were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Crude product was purified by flash chromatography on silica gel (DCM 100%) to afford **17** (1.45 g; 60%) and **20** (0.764g; 30%) as white solids.

Product 17: ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.45 (d; *J* = 2.6 Hz; 2 H); 8.00 (s; 2 H); 6.56 (d; *J* = 2.6 Hz; 2 H); 4.54 (s; 4 H). ¹³C {¹H} RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 24.5, 108.7, 113.0, 128.7, 140.0, 149.5, 152.7. IR (cm⁻¹, ATR): ν 1649 (w); 1608 (m); 1601 (m); 1586 (s); 1525 (s); 1467 (s); 1458 (s).

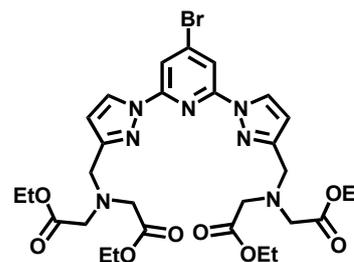


Elemental analysis calculated for C₁₃H₁₀Br₃N₅: C 32.80; H 2.12; N 14.71; Found: C 32.70; H 1.92; N 14.45. FAB⁺/MS; *m/z*: 473.0 ([M+H]⁺; 30%); 475.0 ([M+H]⁺; 100%); 477.0 ([M+H]⁺; 96%).

Product 20: ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.49 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H); 7.93 (AB, *J*_{AB} = 7.05, ν_oδ = 5.35, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 4.56 (s, 4H). ¹³C {¹H} RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 24.7, 108.1, 109.7, 128.3, 141.5, 149.6, 152.0.



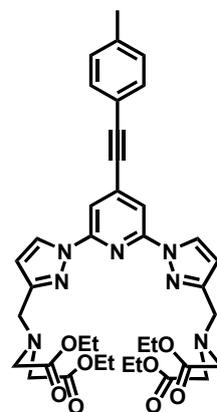
Synthesis of 18: In a round bottom flask with a THF (50 mL)/CH₃CN (90 mL), were dissolved **17** (0.8 g; 1.68 mmol), and diethyl iminodiacetate (0.66 mL; 3.70 mmol). K₂CO₃ (0.93 g; 6.72 mmol) was added. Heterogeneous solution was stirred at 50 °C overnight then filtered. Filtrate was concentrated under reduced pressure and the residual oil was dissolved in DCM (100



mL) and washed with water (3 × 100 mL) and brine. Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness. Flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:00 to 98:2) afforded pure product **18** (1.01 g; 87%) as colourless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.44 (d; *J* = 2.6 Hz; 2 H); 7.97 (s; 2 H); 6.55 (d; *J* = 2.6 Hz; 2 H); 4.18 (q; *J* = 7.2 Hz; 8 H); 4.04 (s; 4 H); 3.62 (s; 8 H); 1.28 (t; *J* = 7.2 Hz; 12 H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 51.3, 54.6, 60.5, 108.8, 112.2, 128.1, 136.4, 150.3, 153.6, 171.0. IR (cm⁻¹, ATR): ν 1733 (s); 1588 (s); 1575 (s); 1538 (m); 1464 (s); 1387 (s). Elemental analysis

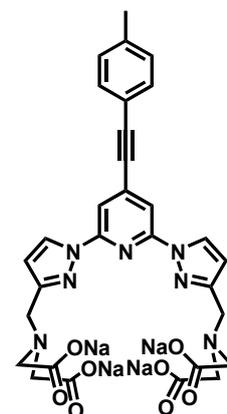
calculated for $C_{29}H_{38}BrN_7O_8$: C 50.29; H 5.53; N 14.16; measured: C 49.89; H 5.28; N 13.81. FAB⁺/MS, m/z: 693.2 ([M+H]⁺; 100%); 691.2 ([M+H]⁺; 100%).

Synthesis of **22: **18**** (120 mg, 0.173 mmol) and tolylacetylene **21** (24.2 mg, 0.208 mmol) were dissolved in anhydrous THF (10 mL) and triethylamine (6 mL) under argon atmosphere. [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (7.2 mg, 0.010 mmol) was added. The solution was degassed during 30 minutes then CuI (3.2 mg, 0.017 mmol) was added. Solution was heated at 50 °C during 24 hours. Solvents were distilled off under reduced pressure to afford dark brown oil. Residual oil was dissolved in DCM (30 mL) and washed with water (3 × 15 mL). Organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced



pressure. Pure product **22** (80 mg, 63%) was isolated by chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 99.75:0.25 to 99.5:0.5) as a colourless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (d; J = 2.5 Hz; 2H), 7.86 (s; 2H), 7.44 (d; J = 7.9 Hz; 2H), 7.18 (d; J = 7.9 Hz; 2H), 6.5 (d; J = 2.5 Hz; 2H), 4.17 (q; J = 7.2 Hz; 8H), 4.04 (s; 4H), 3.62 (s; 8H), 2.40 (s; 3H), 1.26 (t; J = 7.2 Hz; 12H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.1; 21.5; 51.3; 54.5; 60.4; 86.0; 95.2; 108.4; 110.8; 118.7; 127.9; 129.2; 131.9; 136.6; 139.7; 149.9; 152.9; 171.0. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3126 (w); 2981 (w); 2936 (w); 2228 (w); 2207 (w); 1738 (s); 1606 (s); 1553 (s); 1538 (m); 1513 (w); 1464 (s); 1389 (s); 1299 (w); 1259 (w); 1188 (s); 1153 (s); 1096 (w); 1028 (s). Elemental analysis calculated for C₃₈H₄₅N₇O₈: C 62.71; H 6.23; N 13.47; measured: C 62.36; H 5.93; N 13.19. EI/MS (Neat), m/z: 728.3 ([M]⁺, 100 %).

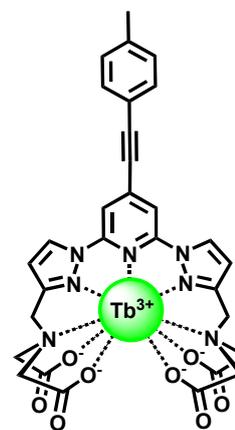
Synthesis of Ligand **L4: **22**** (80 mg, 0.11 mmol) was dissolved in 20 mL of a solution MeOH/Water (1:1) and NaOH (22 mg, 0.55 mmol) was added. Solution was stirred at 60 °C during 3 hours. Solvents were distilled off. The pale yellow residue was dissolved in 0.5 mL of water and 4 mL of MeOH. **L4** (66.5 mg, 86%) was precipitated as a white powder with a drop-wise addition of THF. ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 8.34 (s; 2H); 7.43 (s; 2H); 7.26 (d; J = 7.5 Hz; 2H); 7.02 (d; J = 7.5 Hz; 2H); 6.39 (s; 2H); 3.62 (s; 4H); 3.03 (s; 8H); 2.15 (s; 3H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz,



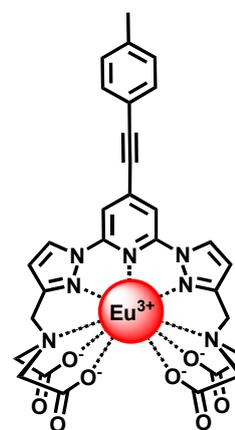
D₂O): δ 20.8; 51.3; 57.8; 85.8; 95.5; 109.3; 110.4; 117.7; 127.3; 129.2; 132.0; 136.5; 140.7; 149.1; 153.2; 178.9. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3365 (br); 2926 (w); 2210 (w); 1586 (s); 1553 (s); 1532 (w); 1466 (m); 1405 (s); 1327 (s); 1258 (m); 1211 (w); 1123 (m); 1049 (m); 1021 (m).

Elemental analysis calculated for $(C_{30}H_{25}N_7O_8)Na_4 \cdot 4H_2O$: C 46.46; H 4.29; N 12.64; measured: C 46.30; H 3.85; N 12.43. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 680.1 ($[M-Na^+]$, 70 %), 211.3 ($[M-3Na^+]^{3-}$, 100%).

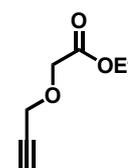
Na[TbL4]: L4 (20 mg, 28 μ mol) and TbCl₃·6H₂O (10.6 mg, 28 μ mol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heated at 60 °C during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. Na[TbL4] was isolated by centrifugation as a white powder (21.7 mg, 96%). IR (ATR, cm⁻¹): ν 3390 (br); 3007 (w); 2987 (w); 2921 (w); 2213 (w); 2020 (w); 1602 (s); 1557 (m); 1533 (m); 1470 (w); 1436 (w); 1393 (s); 1213 (w); 1107 (w). Elemental analysis calculated for $(C_{30}H_{25}N_7O_8Tb)Na \cdot 4H_2O$: C 41.63, H 3.84; N 11.33; measured: C 41.42; H 3.55; N 11.04. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 770.4 ($[M-Na^+]$, 100 %).



Na[EuL4]: L4 (13.8 mg, 19.6 μ mol) and EuCl₃·6H₂O (7.2 mg, 19.6 μ mol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heated at 60 °C during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. Na[EuL4] was isolated by centrifugation as a white powder (14.1 mg, 91%) IR (ATR, cm⁻¹): ν 3390 (br); 2992 (w); 2911 (w); 2221 (w); 2018 (w); 1616 (s); 1603 (s); 1553 (m); 1529 (m); 1470 (m); 1432 (m); 1396 (s); 1354 (m); 1258 (w); 1228 (w); 1107 (w). Elemental analysis calculated for $(C_{30}H_{25}N_7O_8Eu)Na, 2NaCl$: C 39.89, H 2.79; N 10.85; measured: C 39.47; H 2.66; N 10.60. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 765.0 ($[M-Na^+]$, 30 %), 764.0 ($[M-Na^+]$, 100 %), 762.0 ($[M-Na^+]$, 80 %).

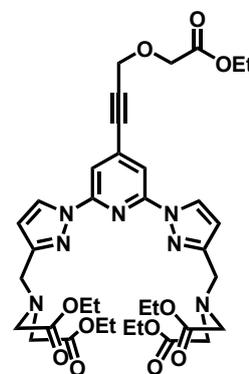


Synthesis of 25: To a solution of propargyl alcohol **23** (1.77 ml, 30 mmol) in anhydrous THF (80 mL) under argon atmosphere, was added NaH (60% in mineral oil, 1.32 mg, 33 mmol). Solution was left under stirring 1 hour at room temperature. Bromoethyl acetate **24** (4.02 ml, 35 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under argon atmosphere, at room temperature during 12 hours. Solvent was distilled



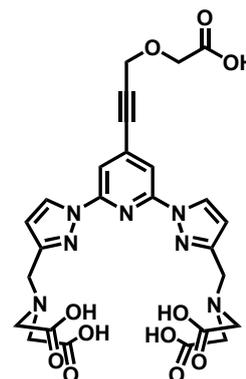
off to give yellow oil. The residual oil was dissolved in diethylether (40 mL) and washed with water (3 × 20 mL). Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness to yield colourless oil. Pure product **25** (2 g, 47%) was obtained after flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/Et₂O 100:0 to 96:4). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 4.27 (d; J = 2.4 Hz; 2H); 4.19 (q; J = 7.1 Hz; 2H); 4.15 (s; 2H); 2.45 (t; J = 2.4 Hz; 1H); 1.26 (t; J = 7.1 Hz; 3H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.1; 58.2; 60.9; 66.2; 75.5; 78.5; 169.8. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3278 (m); 2984 (w); 2909 (w); 2118 (w); 1748 (s); 1448 (m); 1429 (m); 1382 (m); 1370 (m); 1349 (m); 1275 (m); 1249 (m); 1206 (s); 1116 (s); 1025 (s). Elemental analysis calculated for C₇H₁₀O₃: C 59.14; H 7.09; measured: C 58.78; H 6.84. EI/MS (Neat), m/z 142.0 ([M]⁺, 100%).

Synthesis of 26: **18** (300 mg, 0.43 mmol) and **25** (148 mg, 1.04 mmol) were dissolved in anhydrous THF (20 mL) and triethylamine (15 mL) under argon atmosphere. [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (18 mg, 0.026 mmol) was added. The solution was degassed during 30 minutes then CuI (8.2 mg, 0.043 mmol) was added. Solution was heated at 50 °C during 24 hours. Solvents were distilled off under reduced pressure to afford dark brown oil. Residual oil was dissolved in DCM (30 mL) and washed with water

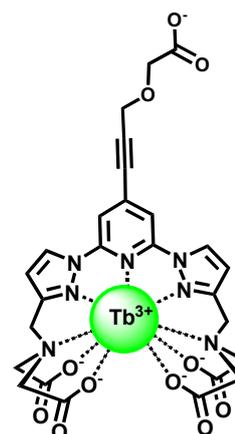


(3 × 15 mL). Organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. Pure product **26** (130 mg, 40%) was isolated by chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 98:2) as a colourless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.43 (d; J = 2.6 Hz; 2H); 7.8 (s; 2H); 6.51 (d; J = 2.6 Hz; 2H); 4.25 (s; br; 2 × 2H); 4.24 (q; J = 7.2 Hz; 2H); 4.16 (q; J = 7.2 Hz; 8H); 4.0 (s; 4H); 3.6 (s; 8H); 1.29 (t; J = 7.2 Hz; 3H); 1.25 (t; J = 7.2 Hz; 12H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.1; 14.2; 51.4; 54.6; 58.7; 60.5; 61.1; 66.5; 84.4; 89.6; 108.6; 111.1; 127.9; 135.4; 150.1; 153.3; 169.7; 171.0. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3126 (w); 2982 (w); 2935 (w); 2907 (w); 2105 (w); 1735 (s); 1610 (m); 1555 (m); 1536 (m); 1464 (m); 1388 (m); 1269 (w); 1188 (s); 1152 (s); 1118 (s); 1027 (s); 977 (s); 946 (m). Elemental analysis calculated for C₃₆H₄₇N₇O₁₁: C 57.36, H 6.28; N 13.01; measured: C 56.94; H 5.67; N 12.74. EI/MS (Neat), m/z 754.2 ([M+H]⁺, 100 %).

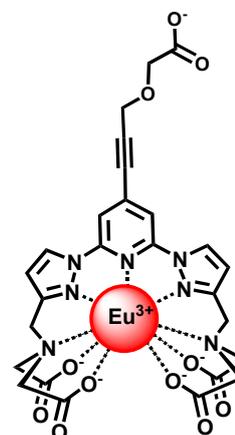
Synthesis of Ligand *L5*: 26 (130 mg, 0.17 mmol) was dissolved in MeOH (20 mL) NaOH (41 mg, 1.03 mmol) in 4 mL of water was added. Solution was stirred at 60 °C during 3 hours. Solvents were distilled off to afford brown oil. Residual oil was dissolved in water (10 mL) and 0.1 M HCl solution was added until pH = 4-5 and *L5* precipitated (67 mg, 64%) as a white solid. ¹H NMR (D₂O, 300 MHz) : δ 12.4 (s; 4H); 8.7 (s; 2H); 7.6 (s; 2H); 6.5 (s; 2H); 4.5 (s; 2H); 4.1 (s; 2H); 3.8 (s; 4H); 3.36 (s; 8H). ¹³C {¹H} NMR (D₂O, 300 MHz): δ 54.3; 57.1; 58.7; 66.6; 86.4; 90.3; 107.7; 110.1; 130.7; 136.4; 151.8; 153.3; 178.0; 178.2. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3410 (br); 2923 (w); 2852 (w); 1729 (s); 1611 (s); 1558 (m); 1457 (s); 1388 (s); 1217 (s); 1109 (s); 1055 (s). Elemental analysis calculated for C₂₆H₂₇N₇O₁₁·H₂O: C 49.45, H 4.63; N 15.52; measured: C 49.90; H 4.04; N 15.38. EI/MS (Neat), m/z 614.1 ([M+H]⁺, 100 %).



(NH₄)₂[Tb*L5*] : *L5* (30 mg, 49 μmol) and TbCl₃·6H₂O (18,2 mg, 49 μmol) were dissolved in water (10 mL). 0,1 M solution of NH₄OH was added until pH = 8. The solution was heated at 60 °C during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. (NH₄)₂[Tb*L5*] was isolated by centrifugation as a brown powder (30 mg, 77%). IR (ATR, cm⁻¹): ν 3243 (br); 2922 (s); 2338 (w); 2117 (w); 1575 (m); 1534 (m); 1474 (s); 1428 (s); 1393 (m); 1356 (s); 1231 (s); 1103 (m); 1066 (m); 1039 (m). Elemental analysis calculated for (C₂₆H₂₂N₇O₈Tb)(NH₄)₂·7H₂O: C 33.45, H 4.60; N 13.44; measured: C 33.59; H 4.77; N 13.56. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 790.0 ([M-NH₄⁺]⁻, 80 %).

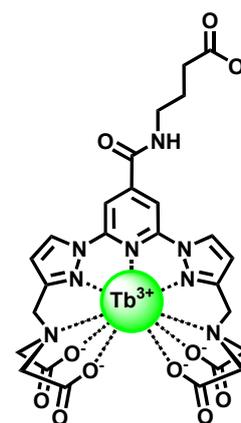


Na₂[Eu*L5*] : *L5* (10 mg, 17 μmol) and EuCl₃·6H₂O (6.2 mg, 17 μmol) were dissolved in water (10 mL). 0.1 M solution of NaOH was added until pH = 8. The solution was heated at 60 °C during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. Na₂[Eu*L5*] was isolated by centrifugation as a brown powder (30 mg, 77%). IR (ATR, cm⁻¹): ν 3390 (br); 3007 (w); 2990 (w); 2161 (w); 2023 (w); 1594 (m); 1533 (s); 1446 (s); 1427 (s); 1393 (m);

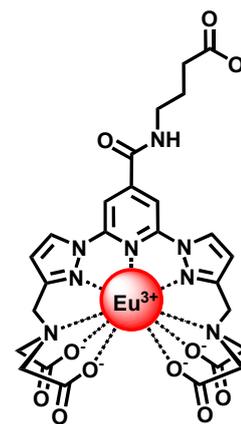


4H); 3.27 (s; 8H); 3.45 (t; $J = 7.2$ Hz; 2H); 2.29 (t; $J = 7.2$ Hz; 2H); 1.91 (qt; $J = 7.2$ Hz; 2H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, D_2O): δ 25.8; 35.4; 40.5; 51.3; 58.7; 68.3; 107.3; 110.0; 130.0; 150.2; 165.0; 167.1; 179.4; 183.1. IR (ATR, cm^{-1}): ν 3276 (br); 2934 (w); 1568 (s); 1462 (m); 1403 (s); 1327 (m); 1123 (m); 1051 (m). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_{11})\text{Na}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: C 37.60, H 4.25; N 13.49; measured: C 37.43; H 3.96; N 13.24. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 347.1 ($[\text{M}-2\text{Na}^+]^{2-}$, 80 %), 223.6 ($[\text{M}-3\text{Na}^+]^{3-}$, 100 %).

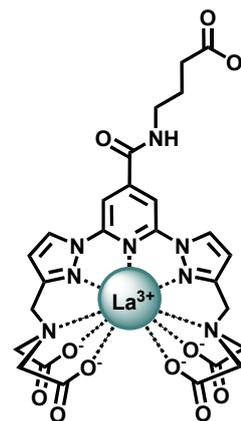
$\text{Na}_2[\text{TbL6}]$: **L6** (29 mg, 39.1 μmol) and $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (14.6 mg, 39.1 μmol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heated at 60 $^\circ\text{C}$ during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. $\text{Na}_2[\text{TbL6}]$ was isolated by centrifugation as a white powder (27.4 mg, 84%). IR (ATR, cm^{-1}): ν 3355 (br); 2953 (w); 1586 (m); 1568 (m); 1537 (m); 1392 (m); 1356 (m); 1282 (s); 1259 (s); 1232 (w); 1124 (s); 1060 (s); 1039 (s); 1008 (w). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{Tb})\text{Na}_2$: C 33.80, H 3.66; N 11.65; measured: C 33.93; H 3.83; N 12.17. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 807.1 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 70 %), 392.1 ($[\text{M}-2\text{Na}^+]^{2-}$, 100 %).



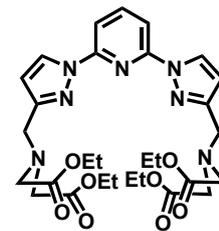
$\text{Na}_2[\text{EuL6}]$: **L6** (15 mg, 20.2 μmol) and $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.4 mg, 20.2 μmol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heated at 60 $^\circ\text{C}$ during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. $\text{Na}_2[\text{EuL6}]$ was isolated by centrifugation as a white powder (13,5 mg, 81%). IR (ATR, cm^{-1}): 3363 (br); 2960 (w); 1587 (m); 1567 (m); 1537 (m); 1391 (m); 1355 (m); 1282 (s); 1257 (s); 1230 (w); 1124 (s); 1067 (s); 1037 (s); 1009 (w). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{Eu})\text{Na}_2$: C 33.52, H 4.00; N 12.03; measured: C 33.28; H 3.73; N 11.72. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 801.0 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 100 %), 799.1 ($[\text{M}-\text{Na}^+]$, 90 %), 389.5 ($[\text{M}-2\text{Na}^+]^{2-}$, 40 %), 388.0 ($[\text{M}-2\text{Na}^+]^{2-}$, 35 %).



Na₂[LaL6]: L6 (45 mg, 60.7 mmol) and La(NO₃)₃·6H₂O (26.3 mg, 60.7 mmol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heated at 60 °C during 3 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. Na₂[LaL6] was isolated by centrifugation as a white powder (39.2 mg, 80%). ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8.53 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H); 8.02 (s, 2H); 6.71 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H); 4.01 (s, 4H); 3.75-3.43 (m, 10H); 2.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H); 1.95 (qi, *J* = 7.5 Hz, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O): δ 25.6; 35.4, 40.6, 56.0; 63.6; 107.2; 109.7; 131.2; 149.5; 150.2; 154.4; 166.7; 180.6; 183.1. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3267 (w); 3103 (w); 2916 (w); 1568 (s); 1537 (s); 1494 (m); 1390 (s); 1352 (s); 1283 (m); 1230 (m); 1128 (w); 1063 (w). Elemental analysis calculated for (C₂₆H₂₅N₈O₁₁La)Na₂·5H₂O: C 34.68, H 3.92; N 12.44; measured: C 34.37; H 3.58; N 12.10. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), *m/z* 382.0 ([M-2Na⁺]²⁻, 100 %).

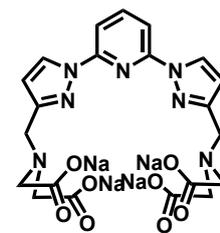


Synthesis of 29: In a round bottom flask with a THF (50 mL)/CH₃CN (100 mL), were dissolved **20** (764 mg; 1.92 mmol), and diethyl iminodiacetate (0.76 mL; 4.23 mmol). K₂CO₃ (1.05 g; 7.68 mmol) was added. Heterogeneous solution was stirred at 50 °C overnight then filtered. Filtrate was concentrated under reduced pressure and the residual oil was



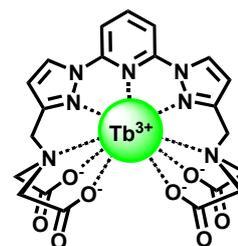
dissolved in DCM (100 mL) and washed with water (3 × 100 mL) and brine. Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness. Flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:00 to 98:2) afforded pure product **29** (602 mg; 54%) as white solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (d; *J* = 2.6 Hz ; 2H), 7.78 (m; 2H); 7.75 (s, 1H); 6.5 (d; *J* = 2.6 Hz; 2H); 4.13 (q; *J* = 7.1 Hz; 8H); 4.01 (s; 4H); 3.59 (s; 8H); 1.22 (t; *J* = 7.1 Hz; 12H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ 14.2; 51.4; 54.5; 60.5; 108.3; 109.7; 127.8; 141.1; 149.1; 152.9; 171.1. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3127 (w); 2982 (w), 2937 (w), 2907 (w), 2874 (w), 1732 (s), 1648 (w), 1606 (m), 1586 (m); 1533 (m); 1470 (s); 1415 (w), 1390 (s), 1283 (m), 1264 (m), 1228 (m), 1186 (s), 1148 (s), 1096 (m), 1072 (w), 1027 (s), 975 (s). Elemental analysis calculated for C₂₉H₃₉N₇O₈: C 56.76, H 6.41; N 15.98; measured: C 56.51; H 6.21; N 15.78. EI/MS (solid), *m/z* 614.0 ([M]⁺, 100 %).

Synthesis of Ligand L7: 29 (602 mg, 0.98 mmol) was dissolved in 30 mL of a solution MeOH/Water (1:1) and NaOH (196 mg, 4.9 mmol) was added. Solution was stirred at 60 °C during 12 hours. Solvents were distilled off. The pale yellow residue was dissolved in 0.5 mL of water and 1 mL of MeOH. **L7** (535 mg, 93%) was precipitated as a white powder



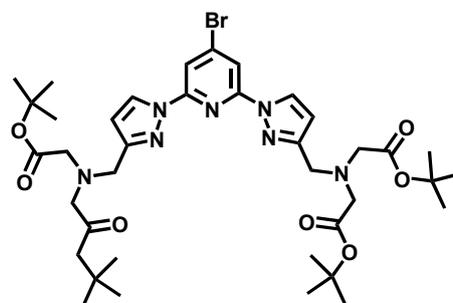
with a drop-wise addition of THF. ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 8.56 (d; J = 2.3 Hz; 2H); 8.04 (t; J = 8.0 Hz; 1H); 7.63 (d; J = 8.0 Hz; 2H); 6.60 (d; J = 2.3 Hz, 2H); 3.86 (s; 4H); 3.21 (s; 8H). ¹³C {¹H} NMR (75 MHz, D₂O): δ 50.3; 57.7; 109.2, 109.9; 129.6; 142.6; 149.5; 153.3; 179.1. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3363 (br); 2932 (w), 1575 (s); 1530 (m); 1473 (s); 1401 (s), 1387 (s), 1327 (s) 1286 (m), 1258 (m), 1128 (m), 1049 (m), 982 (m). Elemental analysis calculated for (C₂₁H₁₉N₇O₈)Na₄·5H₂O: C 37.12, H 4.30; N 14.43; measured: C 36.83; H 4.28; N 14.28. ESI/MS (Negative mode, MeOH/H₂O), m/z 566 ([M-Na⁺]⁻, 60 %), 173.4 ([M-3Na⁺]³⁻, 100 %).

Na[TbL7]: L7 (29.5 mg, 50.1 μmol) and TbCl₃·6H₂O (18.7 mg, 50.1 μmol) were dissolved in water (10 mL). The solution was heated at 60 °C during 4 hours. Water was distilled off and the residue was dissolved in 0.5 mL of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. Na[TbL7] was isolated by



centrifugation as a pale yellow powder (25.6 mg, 75%). IR (cm⁻¹, ATR): ν 3378 (br); 2982 (w), 1579 (s); 1535 (m); 1482 (m); 1464 (m), 1389 (s), 1353 (m), 1317 (m) 1257 (w), 1228 (w), 1176 (w), 1127 (w), 1105 (w), 1068 (m), 1037 (m), 1001 (m), 975 (s). Elemental analysis calculated for (C₂₁H₁₉N₇O₈Tb)Na·4H₂O: C 33.57, H 3.62; N 13.05; measured: C 33.30; H 3.36; N 12.81. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 656 ([M-Na⁺]⁻, 100 %).

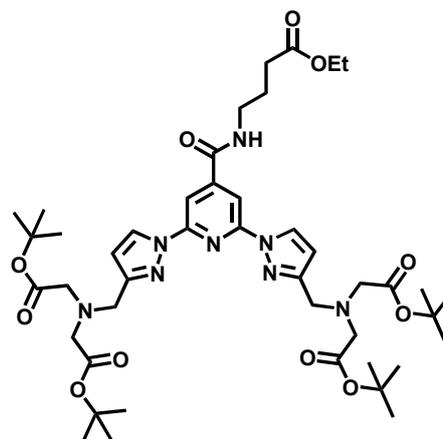
Synthesis of 32: In round bottom schlenk flask under argon were dissolved **17** (180 mg; 0.37 mmol), di-tert-butyl iminodiacetate (200 mg; 0.81 mmol) and K₂CO₃ (200 mg; 1.47 mmol) in distilled CH₃CN (20 mL) and THF (10 mL). The reaction mixture was heated at 50 °C for 14 hours and filtered. The filtrate was concentrated to



dryness. The resulting oil was dissolved in 100 mL of CH₂Cl₂. The organic phase was washed with water (3 × 100 mL), and brine (100 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated. Flash

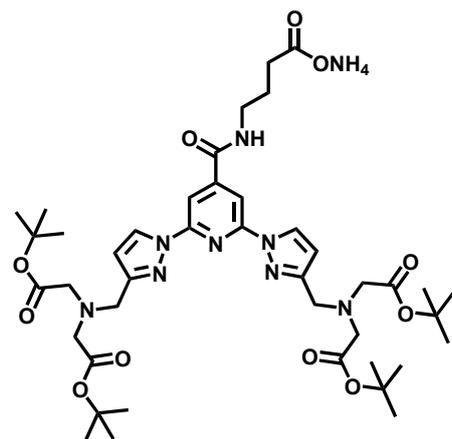
chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:00 to 99.7:0.3) afford pur compound **32** (250 mg, 85 %) as a colourless oil. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8.42 (d; *J* = 2.5 Hz; 2 H); 8.00 (s; 2 H); 6.55 (d; *J* = 2.6 Hz; 2 H); 4.00 (s; 4 H); 3.48 (s; 8 H); 1.46 (s; 36 H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 170.2; 153.7; 150.2; 136.2; 127.9; 111.9; 108.7; 80.8; 55.2; 50.8; 28.0. IR (ATR, cm⁻¹): ν 1732 (s); 1589 (s); 1575 (s); 1539 (m); 1465 (s); 1391 (s); 1367 (s). Elemental analysis calculated for C₃₇H₅₄BrN₇O₈: C 55.22; H 6.76; N 12.18; found C 54.92; H 6.57; N 11.68. EI/MS (Neat) m/z: 805.2 ([M]; 100%); 803.3 ([M]; 100%).

Synthesis of 33: **32** (480 mg, 0.61 mmol) and **27** (204 mg, 1.22 mmol) were dissolved in distilled toluene (10 mL) and triethylamine (10 mL). [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (86 mg, 0.061 mmol) was added. The solution was heated at 100 °C under CO atmosphere during 24 hours. Solution was filtered over celite and solvents concentrated to dryness to give a pale yellow oil. Oil was dissolved in DCM (30 mL) and washed with water (3×15 ml). Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under

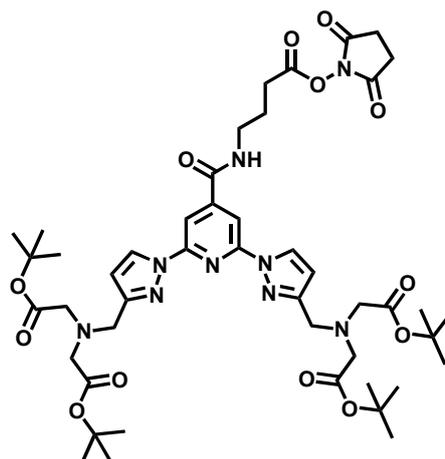


reduced pressure. **33** (288 mg, 54%) was isolated by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 99.5:5) as colourless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.43 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H); 8.1 (s, 2H); 6.53 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H); 4.06 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H); 3.99 (s, 4H); 3.52 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H); 3.47 (s, 8H); 2.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H); 1.97 (qi, *J* = 7.1 Hz, 2H); 1.44 (s, 36H), 1.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.3; 24.5; 28.2; 31.7; 39.8; 51.3; 55.4; 60.5; 81.1; 106.8; 108.8; 128.0; 147.7; 150.7; 153.8; 164.9; 170.5; 173.5; 173.7. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3330 (br), 2978 (w), 2930 (w), 2851 (w), 1731 (m), 1659 (m), 1618 (m), 1570 (m), 1535 (m), 1463 (m), 1391 (m), 1368 (m), 1312 (w), 1282 (w), 1552 (w), 1217 (m), 1142 (s), 1045 (m), 978 (m), 912 (m). Elemental analysis calculated for C₄₄H₆₆N₈O₁₁: C 59.85; H 7.53; N 12.69; found C 59.67; H 7.33; N 12.53. FAB⁺/MS m/z: 883.3 ([M+H⁺]; 100%).

Synthesis of 34: **33** (96 mg, 0.11 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and 1 mL of aqueous solution of NaOH (10 mg, 0.24 mmol) was added. Solution was stirred at 60 °C during 3 hours. Solvents were distilled off and the residue was dissolved CH₂Cl₂ (10 mL) washed with an NH₄Cl saturated solution in water (3×5 mL). Aqueous phase was washed with CH₂Cl₂ (3×10 mL). Combined organic phases were evaporated to dryness to afford a white solid mixed with colourless oil. The residue was purified by flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:00 to 98:2) to afford **34** (65 mg, 70 %) as a white solid after drying under reduced pressure. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.47 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H); 8.22 (s, 2H); 6.53 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H); 4.01 (s, 4H); 3.54 (m, 2H); 3.50 (s, 8H); 2.54 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H); 2.00 (qi, *J* = 6.0 Hz, 2H); 1.46 (s, 36H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 28.3; 33.3; 40.1; 51.5; 55.8; 81.5; 107.3; 108.9; 128.3; 147.9; 150.6; 153.7; 164.4; 170.8; 178.3. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3330 (w); 2979 (w); 2931 (w); 2850 (w); 1731 (s); 1659 (m); 1618 (m); 1570 (s); 1535 (m); 1463 (s); 1391 (s); 1311 (w); 1252 (m); 1216 (s); 1142 (s); 1045 (m); 978 (m). Elemental analysis calculated for (C₄₂H₆₁N₈O₁₁)NH₄·3H₂O: C 55.56; H 7.44; N 12.34; found C 54.47; H 7.73; N 12.69. ESI/MS (CH₃CN/H₂O/TFA 1%) *m/z*: 853.3 ([M - NH₄⁺]; 100%).

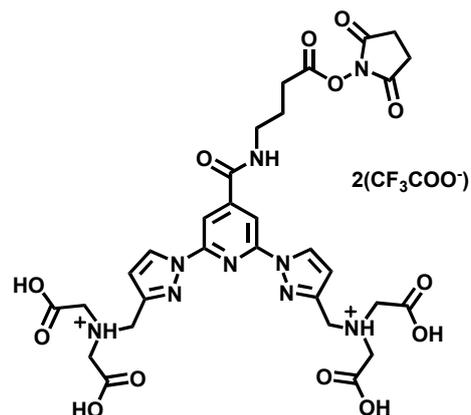


Synthesis of 35: In a schlenk tube under argon, **34** (85 mg, 0.097 mmol) was dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL). DSC **31** (30 mg, 0.12 mmol) and the DIEA (34 μL, 0.195 mmol) were added. Reaction mixture was stirred at room temperature during 4 hours and 10 mL of CH₂Cl₂ were added. The organic phase was washed with water (2×10 mL), HCl 1N (2×10 mL) and brine (2×10 mL). The combined organic phase was dried over Na₂SO₄, and concentrated to dryness. Flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH 100:00 to 95:5) afford pure **16** (47.7 mg, 52 %) as a white solid. ¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz): δ 8.47 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H); 8.12 (s, 2H); 6.57 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H); 4.04 (s, 4H); 3.61 (q, *J* = 6.4Hz, 2H); 3.51 (s, 8H); 2.85 (s, 4H); 2.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H); 2.15 (qi, *J* = 7.2 Hz, 2H); 1.46 (s, 36H). ¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 24.4; 25.6, 28.2; 28.5;



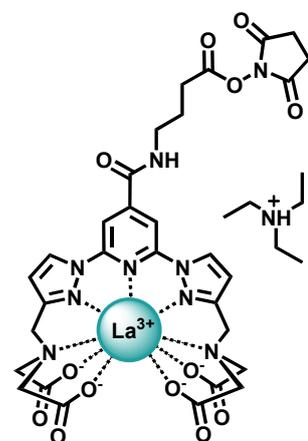
38.9; 51.2; 55.3; 81.1; 106.7; 108.8; 128.0; 147.2; 150.7; 153.7; 165.0; 168.2; 169.2; 170.4. IR (cm⁻¹, ATR): ν 2979 (w); 2926 (w); 2851 (w); 1812 (w); 1785 (w); 1733 (s); 1666 (w); 1618 (w); 1570 (m); 1534 (m); 1462 (m); 1391 (m); 1367 (m); 1310 (w); 1284 (w); 1249 (w); 1208 (s); 1141 (s); 1067 (m); 1045 (m); 978 (m). Elemental analysis calculated for C₄₆H₆₅N₉O₁₃·H₂O: C 56.95; H 6.95; N 12.99; found C 56.68; H 6.53; N 12.67. EI/MS (Neat): m/z 952.3 ([M], 100%).

Synthesis of Ligand L8: **35** (40 mg, 42 μ mol) was dissolved in CH₃Cl (5ml) and TFA (0.3 mL) was added. Reaction mixture was stirred at room temperature. Upon the reaction crude L11 precipitated as a yellow oil. After CH₃Cl/TFA phase removed by decantation, the residual oil was triturated in diethyl ether to afford **LII** (26 mg, 65%) as a white precipitate. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 8.68 (s, 2H); 8.25 (s, 2H); 6.61 (s, 2H); 4.35 (s, 4H);



3.87 (s, 8H); 3.45 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H); 2.74 (s, 4H), 2.70 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H); 2.2 (qi, $J = 7.0$ Hz, 2H); IR (cm⁻¹, ATR): ν 2977 (w); 1812 (w); 1777 (w); 1733 (s); 1659 (w); 1620 (w); 1571 (m); 1530 (m); 1459 (m); 1429 (w); 1387 (m); 1325 (m); 1251 (w); 1200 (s); 1139 (m); 1064 (m); 989 (m). Not enough products for ¹³C NMR experiment. Elemental analysis calculated for (C₃₀H₃₅N₉O₁₃)(CF₃COO⁻)₂·3H₂O: C 40.44; H 4.09; N 12.48; found C 40.35; H 4.14; N 12.54. EI/MS (acetone/MeOH 10%): m/z 362.5 ([M-2H⁺-2(CF₃COOH)]²⁻, 100%).

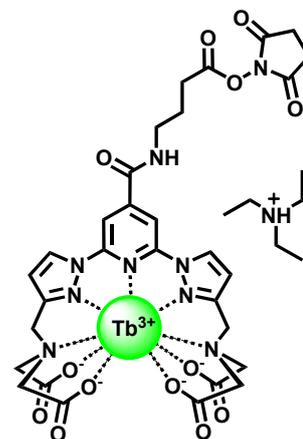
Et₃NH[LaL8]: **L8** (4.6 mg, 4.8 μ mol) and La(NO₃)₃·6H₂O (2.1 mg, 4.8 μ mol) were dissolved in MeOH (4 mL). Et₃N (4 μ L, 28.8 μ mol) was added. The solution was stirred at room temperature during 2 hours. Diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. **Et₃NH[LaL8]** was isolated by centrifugation as a white powder (3.7 mg, 80 %). ¹H NMR (D₂O, 400 MHz): δ 8.50 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H); 7.99 (s, 2H); 6.69 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H); 3.99 (s, 4H); 3.55 (AB sys, $J_{AB} = 16.8$ Hz, $\delta_{\nu AB} = 114.4$,



8H); 3.49 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H); 3.19 (q, $J = 7.4$ Hz, 6H); 2.65 (s, 4H); 2.53 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H); 1.98 (qi, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.27 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H). IR (cm⁻¹, ATR): ν 3340 (w); 3129 (w);

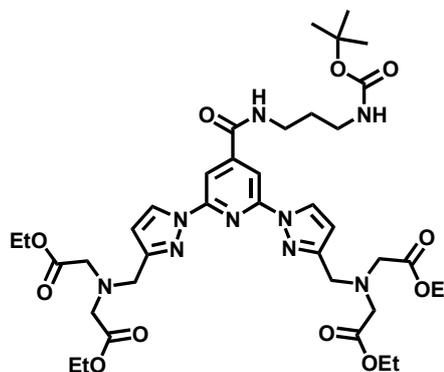
2932 (w); 1727 (w); 1615 (s); 1570 (s), 1537 (s); 1446 (s); 1396 (s); 1307 (s); 1231 (m); 1206 (m); 1087 (w); 1033 (w). Elemental analysis calculated for $(C_{30}H_{29}N_9O_{13}La)HNEt_3 \cdot 4H_2O \cdot NaCl$: C 41.53, H 4.55; N 13.45; measured: C 41.23; H 4.15; N 13.21. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 862.5 ($[M-N^+HEt_3]^-$, 100 %).

Et₃NH[TbL8]: **L8** (7.5 mg, 7.8 μmol) and TbCl₃·6H₂O (3.2 mg, 8.6 μmol) were dissolved in MeOH (4 mL). Et₃N (6.5 μL, 47.1 μmol) was added. The solution was stirred at room temperature during 2 hours. Diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. ***Et₃NH[TbL8]*** was isolated by centrifugation as a white powder (6.1 mg, 80 %). IR (cm⁻¹, ATR): ν 3390 (w); 3256 (w); 2977 (w); 2936 (w); 1812 (w); 1780 (w); 1732 (m); 1596 (s); 1568 (s), 1537 (m); 1443 (m); 1386 (s); 1354 (m); 1279 (w); 1254 (w); 1205 (m); 1153 (w), 1125 (w); 1105 (w),



1066 (m); 1037 (m). Elemental analysis calculated for $(C_{30}H_{29}N_9O_{13}Tb)HNEt_3 \cdot 4H_2O \cdot NaCl$: C 40.75, H 4.46; N 13.20; measured: C 40.53; H 4.21; N 12.91. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 882.1 ($[M-N^+HEt_3]^-$, 100 %).

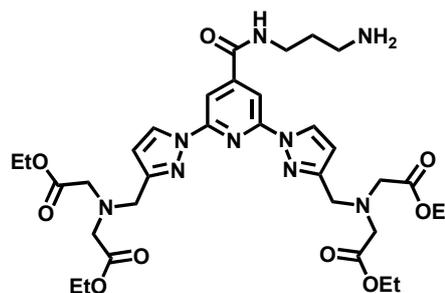
Synthesis of 39: **18** (100 mg, 0.14 mmol) and **38** (50.3 mg, 0.29 mmol) were dissolved in distilled toluene (10 mL) and triethylamine (10 mL). $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ (9.8 mg, 0.014 mmol) was added. The solution was heated at 100 °C under CO atmosphere during 12 hours. Solution was filtered over celite and solvents concentrated to dryness to give a pale yellow oil. Oil was dissolved in DCM (30 mL) and washed with water



(3 × 15 ml). Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. **39** (70 mg, 60%) was isolated by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 95:5) as colourless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.45 (d, J = 2.6 Hz, 2H); 8.13 (s, 2H); 6.52 (d, J = 2.6 Hz, 2H); 4.16 (q, J = 7.2 Hz, 8H); 4.02 (s, 4H); 3.61 (s, 8H); 3.54 (q, J = 7.0 Hz, 2H); 3.24 (t, J = 7.0 Hz, 2H); 2.16 (broad s, 1H); 1.76 (t, J = 7.0 Hz, 2H); 1.44 (s, 9H); 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 12H). ¹³C {¹H} NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 171.1; 164.8; 156.8; 153.3; 150.6; 147.5; 128.1; 108.6; 106.8; 79.6; 60.6; 53.4; 51.5; 30.0; 28.4; 14.2. IR (ATR,

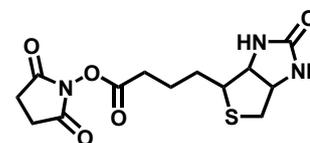
cm⁻¹): ν 3341 (br), 3126 (w), 3060 (w), 2980 (m), 2934 (m), 1737 (s), 1671 (m), 1618 (m), 1570 (s), 1533 (s), 1462 (s), 1389 (s), 1366 (s), 1303 (m), 1270 (s), 1251 (s), 1188 (s), 1155 (s), 1096 (m), 1027 (s). Elemental analysis calculated for C₃₈H₅₅N₉O₁₁: C 56.08, H 6.81; N 15.49; measured: C 55.73; H 6.51; N 15.38. ESI/MS (positive mode, Acetone/H₂O) m/z: 814.2 ([M+H]⁺, 100%).

Synthesis of 40: **39** (35 mg, 43 μ mol) was dissolved in DCM (10 mL). TFA (20 μ L, 0.26 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature during 12 hours. The solvent was removed under reduced pressure to yield pale yellow oil. Residual oil was dissolved in DCM (10 mL) and washed with water (3 \times 10 mL).



Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **22** (26 mg, 85%). ¹H NMR (MeOD, 300 MHz): δ 8.81 (d, J = 2.0 Hz, 2H); 8.24 (s, 2H); 6.75 (d, J = 2.0 Hz, 2H); 4.56 (s, 4H), 4.25 (q, J = 7.2 Hz, 8H); 4.18 (s, 8H); 3.54 (t, J = 7.0 Hz, 2H); 3.06 (t, J = 7.0 Hz, 2H); 2.06 (t, J = 7.0 Hz, 2H); 1.18 (t, J = 7.2 Hz, 12H). ¹³C {¹H} NMR (MeOD, 300 MHz): δ 168.0; 150.3; 148.2; 147.6; 129.2; 109.9; 107.3; 61.6; 53.8; 51.5; 37.0; 36.6; 29.5; 27.3; 13.0. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3271 (br), 3060 (br), 2987 (m), 1744 (s), 1672 (s), 1620 (m), 1571 (m), 1531 (m), 1460 (m), 1385 (m), 1301 (w), 1196 (s), 1179 (s), 1132 (s), 1052 (m), 1018 (m). Elemental analysis calculated for C₃₃H₄₇N₉O₉: C 55.53, H 6.64; N 17.66; measured: C 55.23; H 6.41; N 17.58. ESI/MS (positive mode, Acetone/H₂O) m/z: 714.2 ([M+H]⁺, 100%)

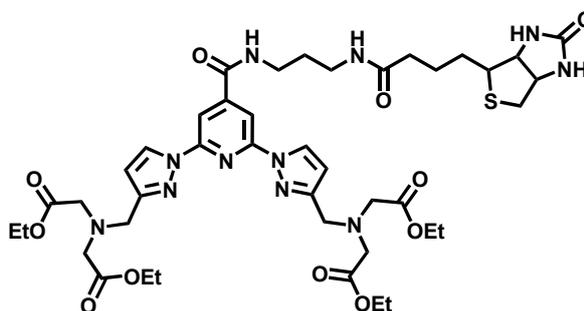
Synthesis of 42: In a schlenk tube under argon was added **41** (100 mg, 0.41 mmol) and freshly distilled DMF (10 mL). The solution was heated at 50 °C until complete dissolution. After return at



room temperature, NHS (57 mg, 0.50 mmol) and EDCI-HCl (94 mg, 0.50 mmol) were added. The solution was stirred at room temperature under argon atmosphere during 12 hours. The solvent was distilled off to afford a white solid. The residue was dissolved in DCM (20 mL) and washed with water (3 \times 10 mL). Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **42** (98 mg, 70%) as a white solid. ¹H NMR (d₆-DMSO, 300 MHz) δ 1.3 to 1.8 (m, 6H), 2.67 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.80 (s, 4H), 2.85 (m, 2H),

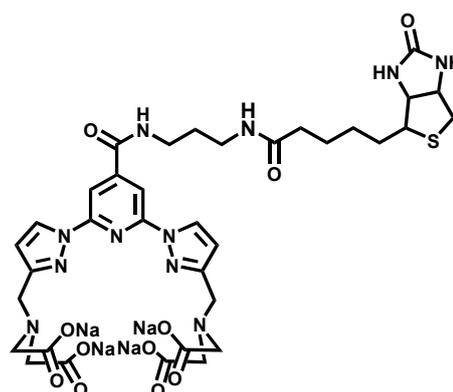
3.09 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 4.30 (m, 2H), 6.36 (s, 1H), 6.42 (S, 1H) ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz) δ 24.8; 25.9; 28.0; 28.3; 30.4; 55.4; 55.7; 59.6; 61.4; 163.1; 169.4; 170.7. IR (ATR, cm^{-1}): ν 3341 (br), 3226 (br), 3117 (w), 2940 (w), 2918 (w), 2877 (w), 1818 (m), 1787 (m), 1746 (m), 1728 (s), 1697 (s), 1553 (w), 1464 (m), 1435 (m), 1422 (m), 1368 (m), 1209 (s), 1070 (S), 1061 (s) 1047 (s). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C 49.26, H 5.61; N 12.31; measured: C 49.44; H 5.81; N 12.45. ESI/MS (positive mode, Acetone/ H_2O) m/z : 341.2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%)

Synthesis of 43: **40** (26 mg, 36 μmol) was dissolved in DMF (10 ml) and triethylamine (30 μL). **42** (15 mg, 44 μmol) was added. The solution was stirred at room temperature during 12 hours. The solvent was removed under reduced pressure to give a white residue.



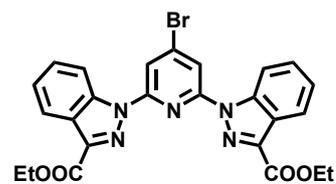
The residue was dissolved in DCM (20 mL), washed with water (3×10 mL). Organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 99:1 to 95:5) afforded **43** and biotin **41**. NMR Spectra could not be explained clearly, some signals are characteristic of **43** and other characteristic of biotin **41**. **43** was use directly for the next step with out further analysis.

Ligand L10: **19** (126 mg, 0.16 mmol) was dissolved in 40 mL of a solution MeOH/Water (1:1) and NaOH (39 mg, 0.98 mmol) was added. Solution was stirred at 60 $^\circ\text{C}$ during 3 hours. Solvents were distilled off and the residue was dissolved in water (20 mL) and washed with DCM (3×10 ml). Aqueous phase was evaporated to dryness to afford a pale yellow solid. The pale yellow residue was dissolved in 0.5 mL of



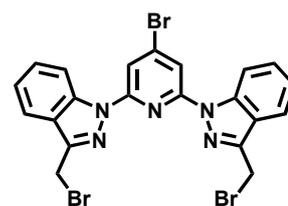
water and 4 mL of MeOH. **L9** (113 mg, 95%) was precipitated as a fine yellow powder upon a drop-wise addition of THF and diethylether. We observed the presence of the biotine **41** after several precipitations in NMR spectra which could not be clearly explained.

Synthesis of 46: In a round bottom schlenk flask under argon were dissolved **14** (680 mg, 3.5 mmol) and **45** (1.46 g, 7.7 mmol) in 30 mL of freshly distilled DMF. The solution was cooled to 0 °C and NaH (60 % in oil, 308 mg, 7.7 mmol) was added. Reaction mixture



was left at room temperature then heated at 40 °C during 5 hours. After 5 hours, a white precipitate was formed. Solution was separated by centrifugation and addition of water in the liquid phase gave a second precipitate, separated by centrifugation. The combined solid was dissolved in 40 mL of CH₂Cl₂/water (1:1), organic phase was extracted and the aqueous phase was washed with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). Combined organic phases were dried over Na₂SO₄, and concentrated to dryness to afford **46** (1.75 g, 94 %) as a white powder. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); 8.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H); 8.31 (s, 2H); 7.56 to 7.45 (m, 4H); 4.62 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H); 1.56 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). ¹³C {¹H} RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 14.4; 61.7; 114.7; 115.8; 122.5; 124.8; 125.1; 128.8; 136.5; 139.2; 140.0; 151.9; 162.1. IR (ATR, cm⁻¹) ν 3089 (w), 2966 (w), 2929 (w), 1748 (s), 1709 (s), 1613 (w), 1593 (s), 1574 (s), 1564 (s), 1501 (m), 1491 (m), 1476 (w), 1444 (s), 1417 (s), 1383 (m), 1370 (m), 1348 (m), 1288 (w), 1258 (s), 1208 (w), 1189 (m), 1173 (s), 1162 (s), 1149 (m), 1122 (m), 1108 (s), 1063 (m), 1029 (s), 1013 (m), 968 (w), 937 (w). Elemental analysis calculated for C₂₅H₂₀BrN₅O₄: C 56.19, H 3.77; N 13.11; measured: C 56.47; H 4.01; N 12.95. EI/MS (Neat), *m/z* 537.5 ([M]⁺, 100 %), 535.5 ([M]⁺, 100 %), 533.5 ([M]⁺, 30 %).

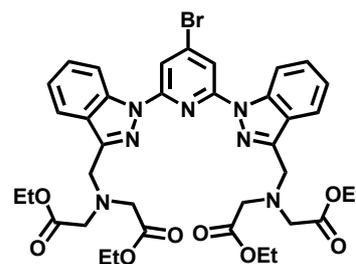
Synthesis of 47: In round bottom schlenk flask under argon were dissolved **46** (1.7 g, 3.2 mmol) in 120 mL of anhydrous THF. The reaction mixture was cooled to -10 °C and LiAlH₄ (240 mg, 6.4 mmol) was added in small portion and stirred during 2 hours at -10



°C. The reaction was quenched with a minimum of saturated solution of NH₄Cl until the formation of a white precipitate. The precipitate was filtered off and the solution concentrated to dryness. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with water (3×25 mL). Organic phase was dried over Na₂SO₄, and concentrated to dryness to yield a mixture of the corresponding diols (Br in 4-position, and H in 4-position, 1.12 g of crude product) as a white solid directly use for the next step. The white solid (1.12 g) was dissolved in freshly distilled DMF (50 mL) and PBr₃ (0.6 mL, 6.3 mmol) was added at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature during 14 hours. The solvent was removed under pressure to yield a yellowish residue. The residue was dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂ and

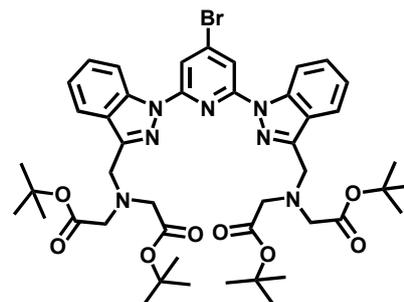
neutralised with a saturated solution of NaHCO₃ (10 mL). The aqueous phase was extracted and washed with CH₂Cl₂ (4×20 mL). Combined organic phases were washed with brine (50 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness to afford the crude products. Flash chromatography over silica gel (toluene/petroleum ether (75:25) yield the pure product **47** (420 mg, 35% for the 2 steps) as a pale yellow solid. Formation of **50** was observed but not isolated. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); 8.04 (s, 2H); 7.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H); 7.54 à 7.37 (m, 4H); 4.90 (s, 4H). ¹³C{¹H} RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 23.2; 113.8; 115.1; 120.7; 123.4; 124.5; 128.8; 139.1; 140.1; 145.7; 152.3. IR (ATR, cm⁻¹) ν 3104 (w), 1612 (s), 1586 (m), 1565 (m), 1507 (m), 1437 (m), 1420 (m), 1385 (w), 1347 (m), 1259 (s), 1216 (w), 1186 (m), 1087 (s), 1069 (s), 1012 (s), 892 (w), 866 (w), 854 (w), 795 (s). Elemental analysis calculated for C₂₁H₁₄Br₃N₅: C 43.78; H 2.45; N 12.16; Found: C 43.43; H 2.07; N 11.86. FAB⁺/MS; *m/z*: 573.1 ([M+H]⁺; 30%); 575.2 ([M+H]⁺; 100%); 577.1 ([M+H]⁺; 90%).

Synthesis of 48: In round bottom schlenk flask under argon were dissolved **47** (420 mg, 0.73 mmol), diethyl iminodiacetate (304 mg, 1,61 mmol) and K₂CO₃ (400 mg; 2.92 mmol) in anhydrous CH₃CN (50 mL) and THF (25 mL). The reaction mixture was heated at 60 °C during 15 hours and filtered. The filtrate was concentrated to dryness. The resulting oil was



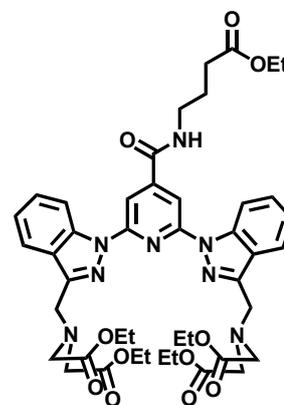
dissolved in 20 mL of CH₂Cl₂. Organic phase was washed with water (3 × 10 mL), and saturated NaCl solution (10 ml), then dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:00 to 98:2) afford a pure **48** (322 mg, 56 %) as a white solid. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H); 7.97 (s, 2H); 7.50 - 7.26 (m, 4H); 4.40 (s, 4H); 4.19 (q, *J* = 7.0 Hz, 8H), 3.67 (s, 8H); 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 12H). ¹³C{¹H} RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 14.21; 50.3; 54.7; 60.5; 112.8; 114.5; 121.7; 122.7; 125.6; 128.3; 135.4; 139.7; 146.8; 152.4; 170.9. IR (ATR, cm⁻¹) ν 2986 (w), 2905 (w), 1732 (s), 1610 (w), 1586 (w), 1569 (s), 1518 (w), 1438 (s), 1346 (m), 1264 (w), 1236 (w), 1187 (s), 1136 (s), 1070 (s), 1025 (m), 981 (m). Elemental analysis calculated for C₃₇H₄₂Br₃N₇O₈: C 56.06; H 5.34; N 12.37; Found: C 56.24; H 5.59; N 12.59. EI/MS (Neat) *m/z*: 793.0 ([M]⁺; 100%); 791.0 ([M]⁺; 100%).

Synthesis of 49: In round bottom schlenk flask under argon were dissolved **47** (90 mg, 0.16 mmol), *di**tert*-butyl iminodiacetate (84.2 mg, 0.34 mmol) and K₂CO₃ (43 mg; 0.31 mmol) in anhydrous CH₃CN (10 mL) and THF (5 mL). The reaction mixture was heated at 80 °C during 14 hours and filtered. The filtrate was concentrated to dryness. The resulting oil was dissolved in 50 mL of CH₂Cl₂.



Organic phase was washed with water (2 × 25 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Flash chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:00 to 98:2) afford a pure **49** (100 mg, 84 %) as a colourless oil. ¹H RMN (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); 8.21 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H); 7.98 (s, 2H); 7.50 à 7.26 (m, 4H); 4.38 (s, 4H); 3.53 (s, 8H); 1.45 (s, 36H). ¹³C{¹H} RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 28.2; 51.0; 55.7; 81.2; 112.9; 114.6; 122.0; 122.9; 125.9; 128.4; 135.5; 139.8; 147.3; 152.7; 170.4. (ATR, cm⁻¹) ν 2990 (w), 2908 (w), 1735 (s), 1612 (w), 1585 (w), 1572 (s), 1517 (w), 1442 (s), 1347 (m), 1259 (w), 1233 (w), 1190 (s), 1135 (s), 1072 (s), 1023 (m), 980 (m). Elemental analysis calculated for C₄₅H₅₈Br₃N₇O₈: C 59.73; H 6.46; N 10.84; Found: C 59.52; H 6.28; N 10.92. EI/MS (Neat) *m/z*: 905.3 ([M]⁺; 100%); 903.3 ([M]⁺; 100%).

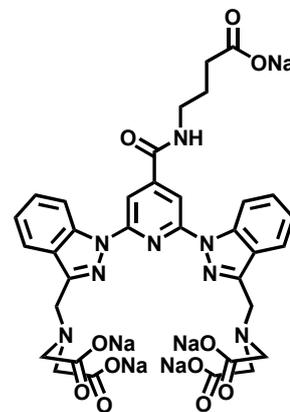
Synthesis of 51: **48** (90 mg, 0.11 mmol) and **27** (38 mg, 0.23 mmol) were dissolved in distilled toluene (10 mL) and triethylamine (10 mL). [Pd(PPh₃)₂Cl₂] (8 mg, 0.011 mmol) was added. The solution was heated at 100 °C under CO atmosphere during 24 hours. Solution was filtered over celite and solvents concentrated to dryness to give a pale yellow oil. Oil was dissolved in CH₂Cl₂ (30 mL) and washed with water (3×15 ml). Organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. **51** (98 mg,



54%) was isolated by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100:0 to 99.4:0.6) as yellowish oil. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H); 8.17 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H); 8.15 (s, 2H); 7.50-7.28 (m, 4H); 7.18 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H); 4.41 (s, 4H); 4.18 (q, *J* = 7.2 Hz, 10H); 3.68 (s, 8H); 3.62-3.55 (m, 2H); 2.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H); 2.03 (qt, *J* = 7.2 Hz, 2H); 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 15H). ¹³C{¹H} RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 14.1; 24.5; 31.9; 39.8; 50.6; 54.8; 60.6; 107.6; 114.5; 121.6; 122.7; 125.6; 128.3; 139.7; 146.5; 146.7; 152.8; 165.2; 171.1; 173.5. IR (ATR, cm⁻¹): ν 3329 (br); 3127 (w); 2985 (w); 2934 (w); 1732 (s); 1669 (m); 1613

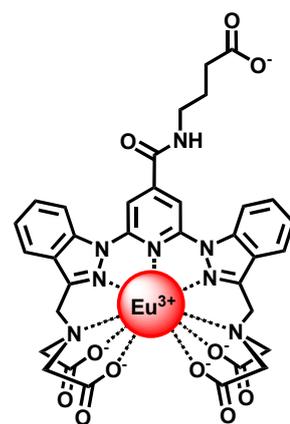
(m); 1571 (m); 1533 (m); 1466 (s); 1389 (s); 1302 (w); 1261 (w); 1187 (s); 1156 (s); 1092 (w); 1030 (s). Elemental analysis calculated for $C_{44}H_{54}N_8O_{11}$: C 60.68, H 6.25; N 12.87; measured: C 60.55; H 6.78; N 14.64. EI/MS (Neat), m/z 871.2 ($[M+H]^+$, 100 %).

Synthesis of Ligand *L10*: 51 (50 mg, 57 μ mol) was dissolved in 20 mL of MeOH/water (1/1). NaOH (14 mg, 0.34 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 60 °C during 4 hours. Solvent was removed and the residue was dissolved in water (20 mL). Aqueous phase was washed with CH_2Cl_2 (3x10 ml). Water was removed to afford a pale yellow residue. The residue was dissolved in water (0.5 mL) and ***L10*** (24 mg, 50 %) was obtained as a fine pale brown powder by addition of MeOH, THF and diethyl ether. 1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 8.35 (s, 2H); 7.95 (s, 2H); 7.80 (s, 2H);



7.50-7.36 (m, 4H); 4.08 (s, 4H); 3.27 (m, 10H); 2.30 (m, 2H); 1.88 (m, 2H). $^{13}C\{^1H\}$ RMN (50 MHz, D_2O): δ 25.7; 35.3; 40.4; 49.3; 58.7; 107.7; 114.4; 121.5; 123.4; 125.7; 129.0; 139.0; 145.8; 146.7; 152.0; 166.9; 179.2; 183.0. IR (cm^{-1} , ATR): ν 3390 (s); 1604 (s); 1580 (s); 1555 (w); 1439 (s); 1406 (s); 1328 (w); 1198 (w); 1129 (w); 1069 (w). Elemental analysis calculated for $(C_{34}H_{29}N_8O_{11})Na_5 \cdot 5H_2O$: C 43.88, H 4.22; N 12.04; measured: C 43.54; H 3.88; N 11.71. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 397.2 ($[M-2Na^+]^{2-}$, 75 %), 257.1 ($[M-3Na^+]^{3-}$, 35 %).

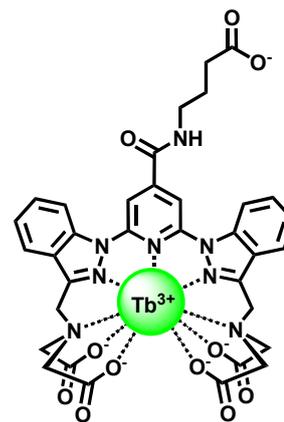
$Na_2[EuL10]$: *L10* (7.7 mg, 8.8 μ mol) and $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ (3.24 mg, 8.8 μ mol) were dissolved in water (10 mL) and heated at 60 °C during 3 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was dissolved in a minimum of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation. **$Na_2[EuL10]$** was isolated by centrifugation as a white powder (7.9 mg, 97%). IR (cm^{-1} , ATR) : ν 3369 (br), 2940 (w), 1590 (s), 1565 (s), 1531 (m), 1444 (m), 1401 (s), 1352 (m), 1270 (w), 1208 (w), 1198 (w), 1115 (m), 1071 (m), 1006 (w)., Elemental analysis



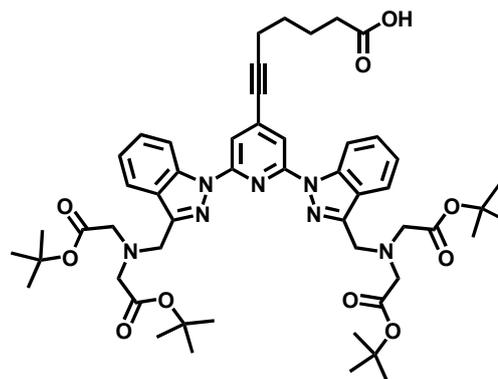
calculated for $(C_{34}H_{29}N_7O_{10}Eu)Na_2 \cdot 3H_2O$: C 42.25, H 3.44, N 11.59; measured: C 42.13; H 3.35; N 11.44. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 901.3 ($[M-Na^+]^-$, 90 %), 899.2 ($[M-Na^+]^-$, 75 %), 439.1 ($[M-2Na^+]^{2-}$, 30 %), 438.0 ($[M-2Na^+]^{2-}$, 25 %).

Na₂[TbL10]: **L10** (10 mg, 11.9 μmol) and $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4.44 mg, 11.9 μmol) were dissolved in water (10 mL) and heated at 60 °C during 3 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was dissolved in a minimum of water. MeOH, THF and diethylether were added drop-wise to start the complex precipitation.

Na₂[TbL10] was isolated by centrifugation as a white powder (8.6 mg, 78%). IR (cm^{-1} , ATR) : ν 3374 (br), 2937 (w), 1589 (s), 1562 (s), 1532 (m), 1436 (m), 1400 (s), 1342 (m), 1274 (w), 1214 (w), 1196 (w), 1111 (m), 1070 (m), 1012 (w). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{Tb})\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 42.25, H 3.44, N 11.59; measured: C 42.13; H 3.35; N 11.44. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 907.3 ($[\text{M}-\text{Na}]^-$, 35 %), 442.4 ($[\text{M}-2\text{Na}]^{2-}$, 90 %).



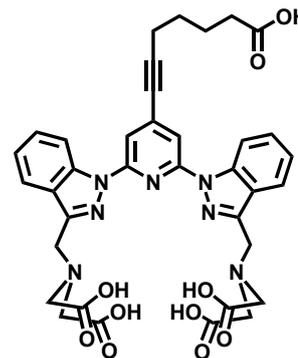
Synthesis of 53: In a schlenk tube were dissolved **49** (100 mg; 0.11 mmol), 6-heptynoic acid **52** (17 μL ; 0.13 mmol), $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ (8.40 mg; 0.01 mmol), anhydrous THF (10 mL) and freshly distilled Et_3N (6 mL). The reaction mixture was degassed during 15 minutes, and CuI (3.4 mg; 0.02 mmol) was added. Reaction was heated at 40 °C during 72 hours.



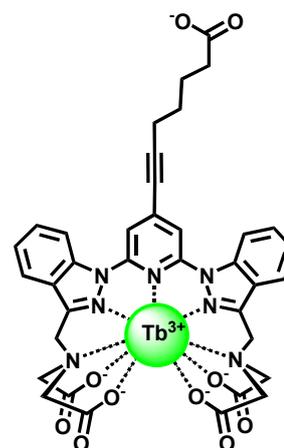
Solvent was concentrated to dryness and the residue

was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL). Organic phase was washed with water (2×50 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. Flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:00 to 95:5) afford **53** (41 mg, 40 %) as a colourless oil. ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 8.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); 8.16 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H); 7.82 (s, 2H); 7.82 à 7.26 (m, 4H); 4.41 (s, 4H); 3.56 (s, 8H); 2.54-2.42 (m, 4H); 1.87-1.71 (m, 4H); 1.48 (s, 36H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (50 MHz, CDCl_3) : δ 8.6; 19.3; 24.5; 27.9; 28.3; 45.0; 50.1; 55.7; 79.3; 81.2; 95.7; 112.3; 114.7; 121.7; 122.5; 125.7; 128.1; 136.4; 139.8; 146.4; 152.3; 170.5. IR (cm^{-1} , ATR): ν 3329 (br); 3125 (w); 2988 (w); 2929 (w); 2110 (w; $\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1734 (s); 1658 (m); 1608 (m); 1581 (s), 1558 (w), 1435 (s), 1403 (s), 1332 (w), 1192 (w), 1133 (w), 1070 (w). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{62}\text{H}_{57}\text{N}_7\text{O}_{10}$: C 65.73; H 7.11; N 10.32 measured: C 65.88; H 7.19, N 10.43. EI/MS (Neat) m/z : 949.2 ($[\text{M}-\text{H}]^+$; 100%).

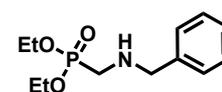
Synthesis of Ligand *L11*: **53** (40 mg, 42 μmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (3 mL) and TFA (1.5 mL). The reaction mixture was stirred during 4 hours at room temperature and evaporated to dryness. The residue was dissolved in MeOH (0.5 mL), and **L11** (20.8 mg, 52 %) was precipitated by addition of diethyl ether and isolated as a pale brown powder. ^1H RMN (CD_3OD , 200 MHz): δ 8.47 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H); 8.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H); 7.65 (s, 2H); 7.42-7.24 (m, 4H); 4.53 (s, 4H); 3.72 (s, 8H); 2.47-2.30 (m, 4H); 1.77-1.63 (m, 4H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (50 MHz, CDCl_3): δ 20.0; 25.5; 29.0; 34.5; 47.9; 55.5; 79.5; 98.0; 114.0; 115.9; 121.6; 124.9; 126.8; 130.0; 138.2; 140.8; 141.3; 153.1; 170.0; 177.5. IR (cm^{-1} , ATR): ν 3390 (s), 2328 (w; $\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 1604 (s), 1580 (s), 1555 (w), 1439 (s), 1406 (s), 1328 (w), 1198 (w), 1129 (w), 1069 (w). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{10}\cdot\text{H}_2\text{O}$: C 58.22; H 4.89; N 13.20 measured: C 57.97; H 4.76, N 12.92. ESI/MS (positive mode, Acetone/ H_2O) m/z : 726.3 ($[\text{M}-\text{H}]^+$; 100%).



$\text{Na}_2[\text{TbL11}]$: **L11** (10 mg, 10.5 μmol) was dissolved in water (10 mL). The solution was basified ($\text{pH} = 8$) using an aqueous solution of NaOH 0.1 M. $\text{TbCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3.9 mg, 10.5 μmol) was added. Reaction mixture was heated at 60 $^\circ\text{C}$ during 3 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was dissolved in a minimum of MeOH and THF was added drop-wise to start the complex precipitation. **$\text{Na}_2[\text{TbL11}]$** was isolated by centrifugation as a yellow powder (6.7 mg, 72%). IR (cm^{-1} , ATR) : ν 3367 (br), 2917 (w), 2330 (w; $\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$); 1603 (s); 1578 (s), 1545 (m), 1435 (m); 1342 (w); 1405 (m), 1344 (m), 1213 (w); 1106 (m), 1071 (m). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{Tb})\text{Na}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C 44.14, H 3.70; N 10.01; measured: C 44.47; H 3.89; N 10.18. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 902.3 ($[\text{M}-\text{Na}]^-$, 35 %), 439.4 ($[\text{M}-2\text{Na}]^{2-}$, 100 %).

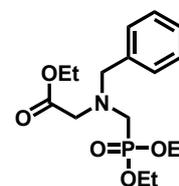


Synthesis of 59: to a solution of benzylamine **58** (6.5 g, 60.5 mmol) and K_2CO_3 (6.7 g, 48.4 mmol) in anhydrous acetonitrile (30 ml) under argon atmosphere, was added **55** (3.26 g, 12.1 mmol). The solution was heated during 12 hours at 60 $^\circ\text{C}$. Excess of K_2CO_3 was filtered off. The solvent was removed in vacuo and the residue was partitioned between DCM (20 ml) and water (10 ml). The organic layer was



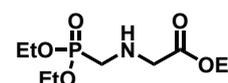
extracted and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100/0 to 96/4) afforded **59** as pale yellow oil (2.52g, 81%). ¹H RMN (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.31 (m, 5H); 4.14 (m, 4H); 3.87 (s, 2H); 2.95 (d, J = 10 Hz, 2H); 1.66 (br s, 1H); 1.33 (t, J = 6 Hz, 6H). ¹³C{¹H} RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 139.4, 128.4, 128.2, 127.2, 62.1 (d, ²J (C,P)= 6 Hz), 54.8 (d, ²J (C,P)= 15 Hz), 44.2 (d, ¹J (C,P)= 155 Hz). ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 24.66. Analyses correspond to literature description, no more analysis done.

Synthesis of 61: to a solution of **59** (0.91 g, 3.52 mmol) and K₂CO₃ (0.9 g, 7.04 mmol) in anhydrous acetonitrile (10 ml) under argon atmosphere, was added ethyl bromoacetate **60** (1.18 g, 7.04 mmol). The solution was heated during 12 hours at 60 °C. Excess of K₂CO₃ was filtered off. The solvent was



removed in vacuo and the residue was partitioned between DCM (20 ml) and water (10 ml). The organic layer was extracted and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100/0 to 99/1) afforded **59** as pale yellow oil (1.13 g, 93%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.31 (m, 5H); 4.12 (m, 4H); 3.93 (s, 2H); 3.58 (s, 2H); 3.16 (d, J = 10 Hz, 2H); 1.33 (m, 6H). ¹³C{¹H} RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 171.0, 138.2, 129.1, 128.3, 127.4, 62.0 (d, ²J (C,P)= 6 Hz), 60.3, 59.7 (d, ²J (C,P)= 12 Hz), 54.5 (d, ²J (C,P)= 6 Hz), 48.6 (d, ¹J (C,P)= 161 Hz), 16.5 (d, ²J (C,P)= 6 Hz), 14.2. ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 24.81. Elemental analysis calculated for C₁₆H₂₆NO₅P: C 55.97, H 7.63; N 4.08; measured: C 55.81; H 7.65; N 3.97. EI/MS (Neat), m/z 344.5 ([M+H]⁺, 100 %).

Synthesis of 57: Route A. To a solution of **55** (4.9g, 18.2 mmol) in anhydrous DCM (50 ml) and freshly distilled NEt₃ (3 ml), was added ethyl



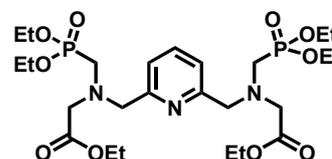
glycine ester **56** (2.12 g, 15.2 mmol). The solution was stirred under argon during 72 hours at r.t. The solvent was removed under vacuum and the residue was partitioned between DCM (20 ml) and water (10 ml). The organic layer was extracted and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and

concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 94:6) afforded **57** (2.09g, 45%) as colourless oil.

Route B: In a round bottom flask **61** (1.13 g, 3.29 mmol) was dissolved in EtOH (15 ml). Ammonium formate (1.11 g, 16.5 mmol) dissolved in H₂O (2 ml) was added, followed by 10 % Pd/C (0.36 g, moistened with 0.5 ml H₂O). The mixture was stirred and heated to reflux for 1 hour. Another portion of ammonium formate (1.11g, 16.5 mmol) was added and reflux maintained for further 1 hour. The catalyst was removed by filtration over celite and the filtrate evaporated in vacuo. The residue was partitioned between DCM (20 ml) and 10% aq. Na₂CO₃ (10 ml). Organic layer was separated, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated, obtaining **57** (0.71 g, 85 %) as colourless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.06 (m, 6 H), 3.37 (d, *J* = 1.1 Hz, 2 H), 2.92 (d, *J* = 12.5 Hz, 2 H), 2.08 (s, 1H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6 H), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H); ¹³C {¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 171.8, 62.3 (d, ²*J*(C,P)= 6 Hz), 60.9, 51.4 (d, ²*J*(C,P)= 15 Hz), 46.8, 44.5 (d, ¹*J*(C,P)= 155 Hz), 16.5 (d, ²*J*(C,P)= 6 Hz), 14.2; ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 26.27; EI-MS, (MeOH) *m/z*: 253.1 ([M]⁺, 100%); Elemental analysis calculated for C₉H₂₀NO₅P: C, 42.69; H, 7.96; N, 5.53; Found: C, 42.32, H, 7.52, N, 5.13.

Synthesis of 63: To a solution of **62** (328 mg, 1.24 mmol) in anhydrous CH₃CN (10 ml), in presence of K₂CO₃ (680 mg, 4.93 mmol), was added **57** (690 mg, 2.72 mmol). The mixture was heated at 60 °C under argon atmosphere during 12 hours. The

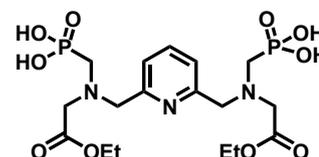


solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a solution of DCM (20 ml) and water (10 ml). The organic layer was extracted and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 97:3) yielded compound **63** as a yellow oil (548 mg, 72 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.31 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 4.01 (q, *J* = 7.1 Hz, 8 H), 3.95 (q, *J* = 7.1 Hz, 4 H), 3.89 (s, 4 H), 3.62 (s, 4 H), 3.07 (d, *J* = 10 Hz, 4 H); 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 12 H), 1.11 (t, *J* = 7.1 Hz, 6 H); ¹³C {¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 171.0, 158.2, 137.2, 121.6, 62.1 (d, ²*J*(C,P)= 6 Hz), 61.7 (d, ²*J*(C,P)= 10 Hz), 60.5, 55.5 (d, ²*J*(C,P)= 6 Hz), 49.4 (d, ¹*J*(C,P)= 160 Hz), 16.6 (d, ²*J*(C,P)= 6 Hz), 14.3; ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 24.66; IR (cm⁻¹, ATR): ν 2983 (w), 2931 (w), 2906 (w), 2871 (w), 1735 (m), 1680 (w), 1592 (w), 1576 (w), 1519 (w), 1445 (w), 1391 (w), 1370 (w), 1295 (w), 1229 (m), 1191 (m), 1163 (w),

1097 (w), 1047 (m), 1020 (s), 960 (s). Elemental analysis calculated for $C_{25}H_{45}N_3O_{10}P_2$: C 49.26; H 7.44; N 6.89 measured: C 49.64; H 7.32, N 7.14. ESI/MS (Acetone/ H_2O , positive mode), m/z 610.2 ($[M+H]$, 100%).

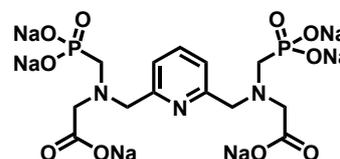
Synthesis of 64: In a schlenk tube, was added a solution of **63** (500 mg, 0.82 mmol) in DCM (5 ml), and TMS-Br (2.51 g, 16.4 mmol).

The mixture was stirred at room temperature during 24 hours and a second crop of TMS-Br (2.51 g, 16.4 mmol) was added. The



mixture was stirred for 24 hours. Solvents was distilled off under reduce pressure. The residue was dissolved in MeOH (5 ml) and the mixture was stirred at r.t. during 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH (5 ml) and the mixture was stirred at room temperature during 24 hours. Solvent was distilled off under reduced pressure and the residue was dissolved in a minimum of MeOH. Addition of diethyl ether resulted in the precipitation of **64** as a white solid (230 mg, 56%). 1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 8.02 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H), 4.88 (s, 4 H), 4.45 (s, 4 H), 4.26 (q, $J = 7.2$ Hz, 4 H), 3.58 (d, $J = 11.5$ Hz, 4 H); 1.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 6 H); ^{13}C $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 75 MHz): δ 166.9, 149.5, 140.5, 125.0, 66.0, 63.6, 55.1, 51.2 (d, $^1J(C,P) = 160$ Hz), 13.1; ^{31}P $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 7.41; IR (cm^{-1} , ATR): ν 2983 (w), 1735 (m), 1680 (w), 1592 (w), 1576 (w), 1445 (w), 1229 (m), 1191 (m), 1163 (w), 1047 (m), 1020 (s), 960 (s). Elemental analysis calculated for $(C_{17}H_{28}N_3O_{10}P_4) \cdot 2H_2O$: C 38.52; H 5.88; N 7.91 measured: C 38.10; H 5.53, N 7.53. ESI/MS (Acetone/ H_2O , positive mode), m/z 498.2 ($[M+H]^+$, 100%).

Synthesis of ligand LI2: **64** (230 mg, 0.46 mmol) was dissolved in water (10 ml) and NaOH (185 mg, 4.63 mmol) was added. The solution was refluxed during 12 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was



dissolved in a minimum of MeOH. THF and diethyl ether were added to precipitate **LI2** as a pale brown solid (245 mg, 92%). 1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 7.81 (t, $J = 7.7$ Hz, 1 H), 7.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 3.09 (s, 4 H), 3.28 (s, 4 H), 2.63 (d, $J = 11.6$ Hz, 4 H); ^{13}C $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 75 MHz): δ 165.3, 156.5, 138.5, 123.4, 60.7 (d, $^2J(C,P) = 6$ Hz), 59.2 (d, $^2J(C,P) = 6$ Hz), 53.6 (d, $^1J(C,P) = 140$ Hz); ^{31}P $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 16.2; IR (cm^{-1} , ATR): ν 3167 (br), 2810 (br), 1674 (m), 1591 (s), 1412 (s), 1330 (m), 1242 (w), 1067 (s), 969 (s).

Elemental analysis calculated for $(C_{13}H_{15}N_3O_{10}P_2)Na_6 \cdot 2H_2O$: C 25.63; H 3.14; N 6.90 measured: C 25.46; H 3.02, N 6.71. ESI/MS (Acetone/ H_2O , negative mode), m/z 263.5 ($[M-2Na]^2$, 50%), 168 ($[M-3Na]^3$, 100%).

$Na_3[LaL12]$: To a solution of Ligand **L12** (49 mg, 85 μ mol) in H_2O (30 ml) was added $LaCl_3 \cdot 6H_2O$ (30 mg, 85 μ mol). The mixture was heated at 60 $^{\circ}C$ during 3 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H_2O . Successive addition of THF, MeOH, and Et_2O resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give complex $Na_3[LaL12]$ (48 mg, 89%) as a mixture of two isomers.

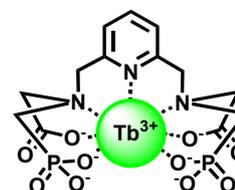


Isomer 1 1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 7.85 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H), 7.39 (d, $J = 6$ Hz, 2 H), 4.17 (AB, $J_{AB} = 14.4$ Hz, 4 H), 3.51 (AB, $J_{AB} = 14.4$ Hz, 4 H), 2.95 – 2.7 (m, 4H); ^{13}C $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 50 MHz): δ 180.1, 157.0, 140.0, 123.1, 62.7, 56.7, 54.8; ^{31}P $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 18.47,

Isomer 2 1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 7.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H), 7.39 (d, $J = 5.7$ Hz, 2 H), 4.15 (AB, $J_{AB} = 14.6$ Hz, 4 H), 3.50, (AB, $J_{AB} = 14.6$ Hz, 4 H), 2.95 – 2.7 (m, 4H); ^{13}C $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 50 MHz): δ 180.5, 157.1, 140.1, 123.1, 62.9, 56.8, 54.9; ^{31}P $\{^1H\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 18.21;

IR (cm^{-1} , ATR): ν 3365 (br), 2952 (br), 1579 (m), 1467 (w), 1398 (m), 1332 (m), 1231 (w), 1110 (m), 1051 (s), 983 (m), 966 (m), 908 (m); Elemental analysis calculated for $(C_{13}H_{15}N_3O_8La)Na_3 \cdot 3H_2O$: C 22.40, H 3.04; N 6.03; measured: C 22.30; H 2.72; N 5.81. ESI/MS (negative mode, MeOH/ H_2O), m/z 620 ($[M-Na^+]$, 100 %), 298.3 ($[M-2Na^+]^2$, 20 %).

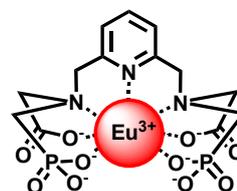
$Na_3[TbL12]$: To a solution of Ligand **L12** (15.3 mg, 27 μ mol) in H_2O (10 ml) was added $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ (10 mg, 27 μ mol). The mixture was heated at 60 $^{\circ}C$ during 3 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H_2O . Successive



addition of THF, MeOH, and Et_2O resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give complex $Na_3[TbL12]$ (16 mg, 91%). IR (cm^{-1} , ATR): ν 3354 (br), 2957 (br), 1591 (m), 1520 (w), 1467 (w), 1398 (m), 1332 (w), 1239 (w), 1113 (m), 1051 (s), 968 (m), 905 (w); Elemental analysis calculated for $(C_{13}H_{15}N_3O_8Tb)Na_3 \cdot H_2O$: C 24.51, H 3.01; N 6.59; measured: C 24.13; H 2.99; N 6.60.

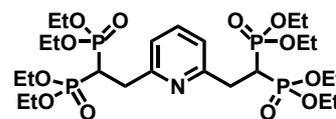
ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 308.1 ([M-2Na⁺]²⁻, 100 %), 198.0 ([M-3Na⁺]³⁻, 70 %).

Na₃[EuL12]: To a solution of Ligand **L12** (15 mg, 26 μmol) in H₂O (10 ml) was added EuCl₃·6H₂O (9.6 mg, 26 μmol). The mixture was heated at 60 °C during 3 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H₂O. Successive addition of



THF, MeOH, and Et₂O resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give complex Na₃[EuL12] (15.7 mg, 92%). IR (cm⁻¹, ATR): ν 3364 (br), 2906 (br), 1590 (m), 1512 (w), 1469 (w), 1399 (m), 1332 (w), 1231 (w), 1110 (m), 1052 (s), 967 (m), 910 (w); Elemental analysis calculated for (C₁₃H₁₅N₃O₈Eu)Na₂·4H₂O: C 22.11, H 3.43; N 5.95; measured: C 22.24; H 3.19; N 6.11. ESI/MS (negative mode, MeOH/H₂O), m/z 305.5 ([M-2Na⁺]²⁻, 100 %), 304.5 ([M-2Na⁺]²⁻, 90 %).

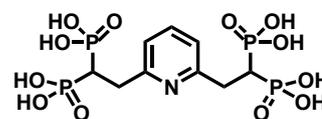
Synthesis of 67: In a schenk tube under argon was dissolved tetraethyl methylenediphosphonate **65** (717 mg, 2.50 mmol) in anhydrous THF (10 ml). NaH (180 mg, 60 % in mineral oil, 4.5



mmol) was added at 0°C. The mixture was stirred under argon at 0°C to room temperature for 1 hour to generate anion **66 in-situ**. **62** (300 mg, 1.13 mmol) was added and the solution was stirred under argon, at room temperature during 72 hours. Solvent was removed under reduced pressure and the residue was partitioned in DCM (20 ml) and NH₄Cl_{sat.} (20 ml). The organic layer was decanted and the aqueous phase was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Purification by column chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 95:5) afforded **67** as a white solid (136 mg, 20 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.00 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 4.05 (m, 16 H), 3.36 (m, 6 H), 1.20 (m, 24 H); ¹³C {¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 157.4 (t, ³*J*(C,P) = 5.9 Hz), 136.5, 121.4, 62.5 (dd, ²*J*(C,P) = 20.6 Hz, ³*J*(C,P) = 6.8 Hz), 35.0 (t, ¹*J*(C,P) = 133 Hz), 33.2 (dd, ²*J*(C,P) = 4.6 Hz, ²*J*(C,P) = 4.0 Hz), 16.3 (d, ³*J*(C,P) = 5.9 Hz); ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 23.56; IR (cm⁻¹, ATR): ν 2982 (w), 2932 (w), 2907 (w), 1592 (w), 1576 (w), 1477 (w), 1456 (w), 1441 (w), 1392 (w), 1246 (s), 1203 (w), 1162 (m), 1097 (m), 1014 (s), 953 (s). Elemental analysis calculated for (C₂₅H₄₉NO₁₂P₄)·H₂O: C

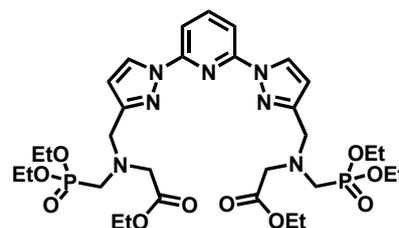
43.05; H 7.37; N 2.01 measured: C 42.83; H 7.10, N 1.88. ESI/MS (Acetone/H₂O, positive mode), m/z 680.2 ([M+H]⁺, 100%).

Synthesis of Ligand L13: In a schlenk tube, containing a solution of **67** (270 mg, 0.39 mmol) in DCM (5 ml), was added TMS-Br (1.22 g, 7.9 mmol). The mixture was stirred at room temperature



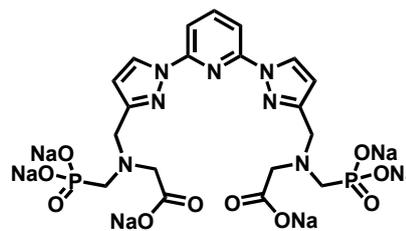
during 24 hours and a second crop of TMS-Br (1.22 g, 7.9 mmol) was added. The mixture was stirred for 24 hours. Solvents were distilled off under reduce pressure. The residue was dissolved in MeOH (5 ml) and the mixture was stirred at room temperature during 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure, the residue was dissolved in MeOH (5 ml) and the mixture was stirred at room temperature during 24 hours. The solvent was distilled under reduced pressure and the residue was dissolved in a minimum of MeOH. Addition of diethyl ether led to the precipitation of compound **L13** as a pale red solid (148 mg, 82%). ¹H NMR (D₂O, 300 MHz): δ 8.35 (t, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 3.56 (td, *J* = 15.7 Hz, *J* = 6.9 Hz, 4 H), 2.84 (tt, *J* = 22.4 Hz, *J* = 6.7 Hz, 2 H); ¹³C {¹H} NMR (D₂O, 75 MHz): δ 154.1 (t, ³*J*(C,P) = 6.3 Hz), 133.5, 118.4, 33.6 (t, ¹*J*(C,P) = 135 Hz), 33.2 (dd, ²*J*(C,P) = 4.8 Hz, ²*J*(C,P) = 4.1 Hz); ³¹P {¹H} NMR (D₂O, 161 MHz): δ 17.95; IR (cm⁻¹, ATR): ν 2734 (br), 1646 (m), 1624 (m), 1540 (w), 1461 (w), 1166 (m), 1134 (m), 989 (s), 946 (s), 903 (s), 794 (s). Elemental analysis calculated for (C₉H₁₇NO₁₂P₄)·4H₂O: C 20.50; H 4.78; N 2.66 measured: C 20.68; H 4.85, N 2.66. ESI/MS (Acetone/H₂O, positive mode), m/z 456.0 ([M+H]⁺, 100%).

Synthesis of Compound 68: To a solution of **20** (200 mg, 0.50 mmol) and K₂CO₃ (276 mg, 2.02 mmol) in anhydrous CH₃CN (5 ml) under argon, was added **57** (256 mg, 1.0 mmol). The mixture was stirred at 60°C during 12 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was



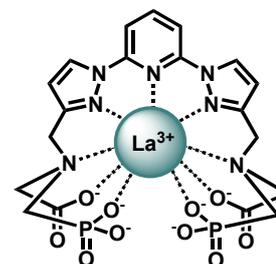
dissolved in a solution of DCM (20 ml) and water (10 ml), the organic layer was separated and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 97:3) yielded compound **68** as a yellow oil (300 mg, 80 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 2 H), 7.76 (AB, *J*_{AB} = 19.8 Hz, νδ = 19.22 Hz, 2H), 7.69 (s, 1 H), 6.44 (d, *J* = 2.6 Hz, 2 H), 4.05 (m, 12 H), 3.97 (s, 4 H), 3.58 (s, 4

Synthesis of ligand *L14*: 69 (140 mg, 0.22 mmol) was dissolved in 10 ml of a solution of EtOH/water (8:2) and NaOH (89 mg, 2.22 mmol) was added. The mixture was heated at reflux during 12 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was dissolved in



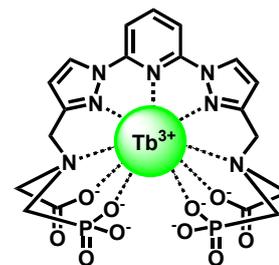
a minimum of MeOH. THF and diethyl ether were added to precipitate *L14* as a white solid (153 mg, 98%). ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 8.57 (s, 2 H), 8.05 (s, 1 H), 7.64 (s, 1 H), 6.66 (s, 1 H), 3.90 (s, 4 H), 3.40 (s, 4 H), 2.60 (s, 4 H) ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 75 MHz): δ 168.3, 153.8, 149.4, 142.6, 129.6, 109.6, 109.4, 59.3, 53.7 (d, $^1J(\text{C},\text{P}) = 140$ Hz), 52.1; ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 16.10; IR (cm^{-1} , ATR): ν 3174 (br), 1669 (w), 1586 (m), 1529 (m), 1473 (m), 1406 (m), 1383 (m), 1329 (w), 1061 (s), 968 (s). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{P}_2)\text{Na}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C 29.13; H 4.89; N 12.51 measured: C 29.26; H 4.52, N 12.44. ESI/MS (MeOH/ H_2O , negative mode), m/z 329.5 ($[\text{M}-2\text{Na}]^{2-}$, 20%), 212.0 ($[\text{M}-3\text{Na}]^{3-}$, 100%).

***Na*₃[*LaL14*]**: To a solution of Ligand *L14* (10 mg, 14 μmol) in H_2O (5 ml) was added $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 14 μmol). The mixture was heated at 80 $^\circ\text{C}$ during 72 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H_2O . Successive addition of THF, MeOH, and Et_2O resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and



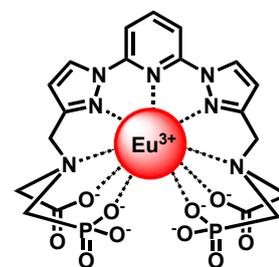
dried under vacuum to give complex $\text{Na}_3[\text{LaL14}]$ (10 mg, 91%) as a white solid. ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 8.45 (s, 2H), 8.21 (AB, $J_{AB} = 109.8$ Hz, $\text{vo}\delta = 42.67$ Hz, 2H), 7.71 (s, 1 H), 6.65 (s, 1 H), 4.09 (br, s, 4 H), 3.66 (br s, 4 H), 2.94 (br s, 4H); ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 50 MHz): δ 161.0, 155.5, 148.7, 144.13, 130.8, 108.7, 108.3, 64.8, 57.8, 56.0; ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 18.08; IR (cm^{-1} , ATR): ν 3350 (br), 2977 (w), 1607 (m), 1583 (m), 1534 (w), 1475 (w), 1402 (w), 1347 (w), 1312 (w), 1225 (w), 1117 (s), 1066 (s), 989 (m). Elemental analysis calculated for $(\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{P}_2\text{La})\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 29.63; H 2.75; N 12.73 measured: C 29.89; H 2.59, N 13.00. ESI/MS (MeOH/ H_2O , negative mode), m/z 730.0 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100%), 364.3 ($[\text{M}-\text{H}-\text{Na}]^{2-}$, 35%)

Na₃[TbL14]: To a solution of Ligand **L14** (20 mg, 28 μmol) in H₂O (10 ml) was added TbCl₃·6H₂O (10.6 mg, 28 μmol). The mixture was heated at 80 °C during 72 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H₂O. Successive addition of THF, MeOH, and Et₂O resulted in the



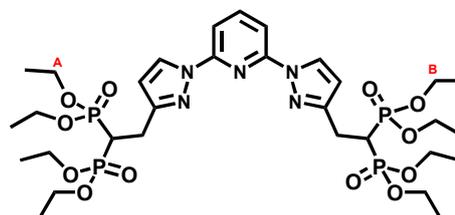
formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give complex Na₃[TbL14] (17 mg, 75%) as a white solid. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3351 (br), 1600 (m), 1588 (m), 1527 (w), 1474 (m), 1387 (m), 1332 (w), 1232 (w), 1053 (s), 977 (m). Elemental analysis calculated for (C₁₉H₂₀N₇O₁₀P₂Tb)Na₂·H₂O: C 28.8; H 2.68; N 12.41 measured: C 28.93; H 2.79, N 12.21. ESI/MS (MeOH/H₂O, negative mode), m/z 772.0 ([M-H]⁻, 100%), 374.3 ([M-H-Na]²⁻, 50%).

Na₃[EuL14]: To a solution of Ligand **L14** (20 mg, 28 μmol) in H₂O (10 ml) was added EuCl₃·6H₂O (12.7 mg, 28 μmol). The mixture was heated at 80 °C during 72 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H₂O. Successive addition of THF, MeOH, and Et₂O resulted in the



formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give complex Na₃[EuL14] (21.8 mg, 95%) as a white solid. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3347 (br), 1603 (m), 1585 (m), 1527 (w), 1475 (m), 1389 (m), 1330 (w), 1230 (w), 1115 (m), 1054 (s), 978 (m). Elemental analysis calculated for (C₁₉H₂₀N₇O₁₀P₂Eu)Na₂·H₂O: C 29.13; H 2.70; N 12.52 measured: C 28.79; H 2.70, N 12.39. ESI/MS (MeOH/H₂O, negative mode), m/z 766.0 ([M-H]⁻, 100%), 764.0 ([M-H]⁻, 90%), 371.3 ([M-H-Na]²⁻, 50%), 370.3 ([M-H-Na]²⁻, 45%).

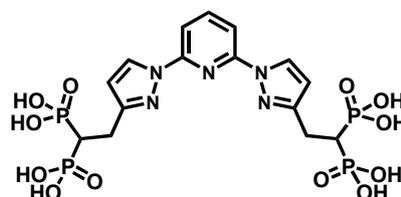
Synthesis of 70: In a schenk tube under argon was dissolved tetraethyl methylenediphosphonate **65** (766 mg, 2.66 mmol) in anhydrous THF (10 ml) at 0°C and NaH (217 mg, 60 % in mineral oil, 5.32 mmol) was



added. The mixture was stirred under argon and warmed to room temperature for 1 hour. **20** (480 mg, 1.21 mmol) was added and the solution was stirred under argon, at room temperature during 72 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between DCM (20 ml) and NH₄Cl (20 ml). The organic layer was extracted and the aqueous phase was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic

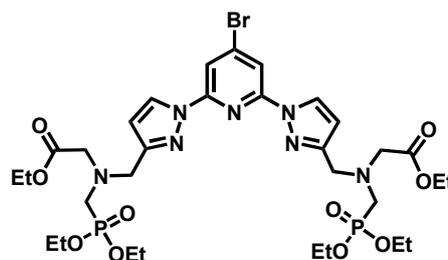
layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated. Purification by column chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 95:5) afforded **70** as a white solid (190 mg, 20 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 2 H), 7.8 (AB, *J*_{AB} = 21 Hz, *ν*δ = 20.1 Hz, 2 H), 7.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 6.34 (d, *J* = 2.6 Hz, 2 H), 4.13 (m, 16 H), 3.23 (m, 6 H), 1.24 (m, 24 H); ¹³C {¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 153.5 (t, ³*J*(C,P) = 7.7 Hz), 150.0, 141.2, 127.5, 108.7, 107.9, 62.8 (d, ²*J*(C_A,P) = 10.4 Hz), 62.7 (d, ²*J*(C_B,P) = 10.7 Hz), 36.4 (t, ¹*J*(C,P) = 133.2 Hz), 24.7, 16.4 (d, ³*J*(C,P) = 6.8 Hz). ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 24.15; IR (cm⁻¹, ATR): *ν* 2982 (w), 2937 (w), 2907 (w), 1605 (m), 1586 (m), 1471 (s), 1387 (m), 1314 (w), 1244 (s), 1163 (w), 1097 (w), 1016 (s), 968 (s), 944 (s). Elemental analysis calculated for C₃₁H₅₃N₅O₁₂P₄·2H₂O: C 43.92; H 6.78; N 8.26 measured: C 43.62; H 6.94, N 8.04. ESI/MS (Acetone/H₂O, positive mode), *m/z* 812.1 ([M+H]⁺, 100%).

Synthesis of ligand *L15*: In a schlenk tube, was added a solution of **27** (180 mg, 0.22 mmol) in DCM (2 ml), TMS-Br (680 mg, 4.44 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature during 24 hours and a second



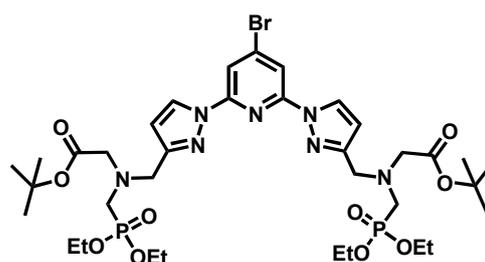
crop of TMS-Br (680 mg, 4.44 mmol) was added. The mixture was stirred for 24 hours. Solvents were distilled under reduce pressure. The residue was dissolved in MeOH (2 ml) and the mixture was stirred at room temperature during 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in MeOH (2 ml). The mixture was stirred at room temperature during 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in a minimum of MeOH. Addition of diethyl ether led to the precipitation of compound ***L15*** as a white solid (103 mg, 80%). ¹H NMR (D₂O, 300 MHz): δ 8.42 (s, 2 H), 7.84 (AB, *J*_{AB} = 71 Hz, *ν*δ = 34.1 Hz, 2 H), 7.51 (s, 1 H), 6.54 (s, 2 H), 3.29 (td, ¹*J* = 16.3 Hz, ²*J* = 6.4 Hz, 4 H), 2.77 (tt, ¹*J* = 22.6 Hz, ²*J* = 5.5 Hz, 2 H); ¹³C {¹H} NMR (D₂O, 75 MHz): 155.4, 149.3, 143.2, 130.3, 109.7, 109.2, 39.1 (t, ¹*J*(C,P) = 126 Hz), 25.0; ³¹P {¹H} NMR (CDCl₃, 161 MHz): δ 20.43; IR (cm⁻¹, ATR): *ν* 3139 (br), 2901 (br), 1606 (w), 1588 (w), 1536 (w), 1474 (w), 1457 (w), 1309 (w), 1317 (w), 1284 (w), 1226 (m), 1166 (m), 1133 (m), 1059 (m), 989 (s), 947 (s), 910 (s), 794 (s). Elemental analysis calculated for C₁₅H₂₁N₅O₁₂P₄·4H₂O: C 27.33; H 4.43; N 10.62 measured: C 27.36; H 4.75, N 10.59. ESI/MS (Acetone/H₂O, positive mode), *m/z* 588.4 ([M+H]⁺, 100%).

Synthesis of 74: To a solution of **17** (348 mg, 0.73 mmol) and K_2CO_3 (371 mg, 2.93 mmol) in anhydrous CH_3CN (10 ml) and THF (2 ml) under argon, was added **57** (370 mg, 1.46 mmol). The mixture was stirred at $60^\circ C$ during 12 hours. The solvent was removed under vacuum



and the residue was dissolved in a solution of DCM (20 ml) and water (10 ml), the organic layer was separated and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 98:2) yielded compound **74** as a yellow oil (363.6 mg, 60 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8.36 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 7.86 (s, 2H), 6.47 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 4.14 – 4.03 (m, 12 H), 3.98 (s, 4H), 3.58 (s, 4 H), 3.16 (d, $J = 10.8$ Hz, 2 H), 1.25 (t, $J = 7$ Hz, 12 H), 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 6 H), ^{13}C $\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 170.8, 153.6, 150.3, 136.5, 128.1, 112.2, 108.9, 62.1 d, $^3J(C,P) = 7$ Hz), 60.4, 55.0 d, $^3J(C,P) = 6$ Hz), 52.9 d, $^3J(C,P) = 11$ Hz), 49.0 (d, $^1J(C,P) = 160$ Hz), 16.5 (d, $^3J(C,P) = 6$ Hz), 14.3. ^{31}P $\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 161 MHz): δ 24.46. ; IR (cm^{-1} , ATR): ν 3109 (w), 2982 (w), 2932 (w), 2907 (w), 2868 (w), 1735 (s), 1589 (s), 1575 (s), 1537 (m), 1464 (s), 1388 (s), 1369 (m), 1238 (m), 1189 (s), 1164 (m), 1144 (w), 1097 (m), 1022 (s), 963 (s). Elemental analysis calculated for $C_{31}H_{48}BrN_7O_{10}P_2$: C 45.37; H 5.90; N 11.95 measured: C 44.96; H 5.68, N 11.58. EI/MS (Neat), m/z 821.2 ($[M+H]^+$, 100 %), 819.2 ($[M+H]^+$, 100 %), 741.2 ($[(M-Br)+H]^+$, 35 %).

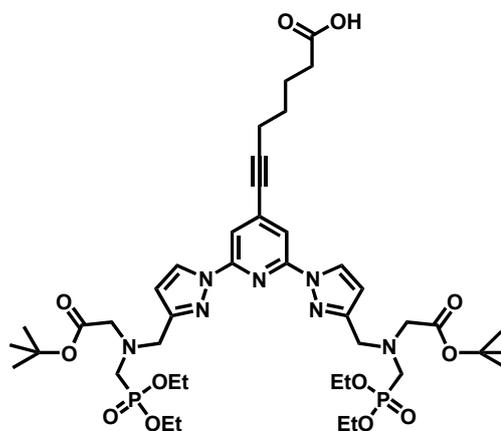
Synthesis of 75: To a solution of **17** (762 mg, 1.60 mmol) and K_2CO_3 (813 mg, 6.40 mmol) in anhydrous CH_3CN (20 ml) under argon, was added **73** (900 mg, 3.02 mmol). The mixture was stirred at $60^\circ C$ during 12 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was



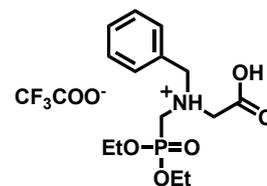
dissolved in a solution of DCM (20 ml) and water (10 ml), the organic layer was separated and the aqueous layer was washed with DCM (3×10 ml). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated to dryness. Purification by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 98:2) yielded compound **75** as a yellow oil (1.09 g, 78 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8.23 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 7.71 (s, 2H), 6.32 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 3.98 – 3.92 (m, 8 H), 3.84 (s, 4H), 3.33 (s, 4 H), 3.02 (d, $J = 10.4$ Hz, 2 H), 1.27 (s, 18 H),

1.12 (t, $J = 7$ Hz, 12 H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 170.0, 153.6, 150.3, 136.3, 128.0, 112.0, 108.8, 81.0, 61.9 d, $^3J(\text{C,P}) = 6.5$ Hz), 55.7 d, $^3J(\text{C,P}) = 6$ Hz), 52.7 d, $^3J(\text{C,P}) = 11$ Hz), 48.8 (d, $^1J(\text{C,P}) = 160$ Hz), 28.2, 16.5 (d, $^3J(\text{C,P}) = 6$ Hz). ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 161 MHz): δ 24.46. ; IR (cm^{-1} , ATR): ν 3110 (w), 2987 (w), 2931 (w), 2905 (w), 2871 (w), 1735 (s), 1589 (s), 1575 (s), 1537 (m), 1464 (s), 1388 (s), 1369 (m), 1238 (m), 1189 (s), 1164 (m), 1144 (w), 1097 (m), 1022 (s), 963 (s). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{BrN}_7\text{O}_{10}\text{P}_2$: C 47.95; H 6.44; N 11.18 measured: C 48.16; H 6.42, N 11.38. EI/MS (Neat), m/z 877.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100 %), 875.3 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100 %).

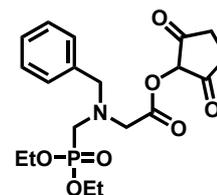
Synthesis of 76: In a schlenk tube were dissolved **75** (200 mg; 0.23 mmol), 6-heptynoic acid **52** (34.4 μL ; 0.27 mmol), $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ (16 mg; 0.02 mmol), anhydrous THF (15 mL) and freshly distilled Et_3N (9 mL). The reaction mixture was degassed during 30 minutes, and CuI (4 mg; 0.02 mmol) was added. Reaction was heated at 50°C during 12 hours. Solvent was concentrated to dryness and the residue was dissolved in DCM (20 mL). Organic phase was washed with water (2×10 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated. Flash chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:00 to 98:2) afford **76** (130 mg, 62 %) as a colourless oil. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 7.74 (s, 2H), 6.46 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 4.19 – 4.1 (m, 8 H), 4.02 (s, 4H), 3.50 (s, 4 H), 3.25 (d, $J = 11$ Hz, 2 H), 2.50 – 2.36 (m, 4 H), 1.88 – 1.62 (m, 4 H), 1.45 (s, 18 H), 1.29 (t, $J = 7$ Hz, 12 H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 175.9, 170.1, 152.9, 150.1, 137.2, 127.7, 111.3, 108.5, 96.4, 81.1, 79.2, 62.3 d, $^3J(\text{C,P}) = 6.5$ Hz), 55.8 d, $^3J(\text{C,P}) = 6$ Hz), 52.6 d, $^3J(\text{C,P}) = 10$ Hz), 48.8 (d, $^1J(\text{C,P}) = 160$ Hz), 46.0, 35.5, 28.2, 27.5, 24.1, 19.2, 16.5 (d, $^3J(\text{C,P}) = 6$ Hz). ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 161 MHz): δ 25.23. IR (cm^{-1} , ATR): ν 2979 (m), 2932 (m), 2869 (w), 2236 (w), 1727 (s), 1610 (s), 1553 (s), 1535 (m), 1464 (s), 1390 (s), 1367 (s), 1213 (s), 1154 (s), 1050 (s), 1022 (s), 964 (s). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{P}_2$: C 54.72; H 7.11; N 10.63 measured: C 54.39; H 6.84, N 10.24. ESI/MS (negative mode, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$), m/z 921.3 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100 %).



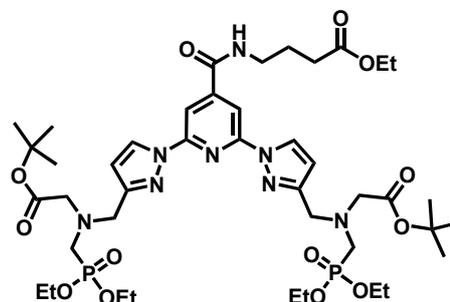
Synthesis of 78: To a solution of **72** (140 mg, 0.38 mmol) in chloroform (1.5 ml) was added TFA (280 μ l, 3.76 mmol). The solution was stirred at room temperature during 24 hours. Precipitation with petroleum ether permit to isolate **78** as a white powder (168 mg, 100 %). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.51 (m, 5 H), 4.71 (s, 2 H), 4.33 (m, 6 H), 3.89 (d, $J = 14$ Hz, 2H), 1.41 (t, $J = 7.0$ Hz, 6 H).



Synthesis of 79: to a solution of **78** (168 mg, 0.39 mmol) in DCM (10 ml) was added DIEA (200 μ l, 1.17 mmol). DSC **31** (120 mg, 0.47 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for 4 hours. DCM (10 ml) and H_2O (20 ml) were added. Organic layer was extracted and washed with HCl 1M (2×10 ml) and with aqueous NaCl (2×10 ml). Organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness. Purification by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH, 100/0 to 97/3) afforded pur product **79** as a pale yellow solid (139 mg, 86 %). ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 7.33 (m, 5 H), 4.11 (m, 4 H), 3.95 (s, 2H), 3.90 (s, 2 H), 3.16 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 2.84 (s, 4 H), 1.31 (t, $J = 7.0$ Hz, 6 H).



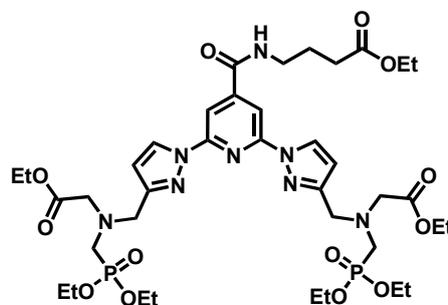
Synthesis of 80: **75** (150 mg, 0.17 mmol) and **27** (76 mg, 0.46 mmol) were dissolved in distilled toluene (20 mL) and triethylamine (20 mL). $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ (16 mg, 0.022 mmol) was added. The solution was heated at 70 $^\circ\text{C}$ under CO atmosphere during 12 hours. Solution was filtered over celite and solvents concentrated to dryness



to give a pale yellow oil. Oil was dissolved in DCM (30 mL) and washed with water (3×15 ml). Organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. **80** (117 mg, 72%) was isolated by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 98:2) as colourless oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.44 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 8.21 (s, 2H), 7.42 (t, $J = 5$ Hz, 1 H), 6.49 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 4.14 – 4.01 (m, 8 H), 4.04 (s, 4H), 3.53 (s, 4 H), 3.53 (q, $J = 7$ Hz, 2H), 3.22 (d, $J = 11$ Hz, 2 H), 2.42 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 1.98 (m, 2 H), 1.45 (s, 18 H), 1.30 (t, $J = 7$ Hz, 12 H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 173.4, 170.2, 164.6, 153.4, 150.7, 147.4, 127.9, 108.5, 107.0, 81.2, 62.1 (d, $^3J(\text{C},\text{P}) = 7$ Hz), 60.6, 56.0 (d, $^3J(\text{C},\text{P}) = 6$ Hz), 53.0 (d, $^3J(\text{C},\text{P}) = 11$ Hz), 48.8 (d, $^1J(\text{C},\text{P}) = 160$ Hz), 39.8, 31.9, 28.2, 24.5, 16.5 (d, $^3J(\text{C},\text{P}) = 6$ Hz), 14.2. ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 161 MHz): δ 24.94. IR (cm^{-1} , ATR):

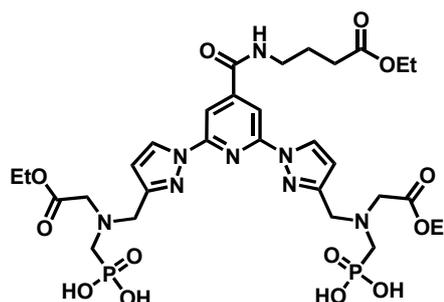
ν 3279 (w), 2979 (w), 2929 (w), 2856 (w), 1731 (m), 1668 (w), 1618 (w), 1570 (m), 1536 (m), 1462 (m), 1390 (m), 1368 (m), 1308 (w), 1214 (m), 1156 (m), 1098 (w), 1050 (m), 1024 (s), 964 (m). Elemental analysis calculated for $C_{42}H_{68}N_8O_{13}P_2$: C 52.82; H 7.18; N 11.73 measured: C 52.69; H 6.82, N 11.48. EI/MS (Neat), m/z 955.3 ($[M]^+$, 100 %).

Synthesis of 82: **71** (300 mg, 0.37 mmol) and **27** (135 mg, 0.80 mmol) were dissolved in distilled toluene (20 mL) and triethylamine (20 mL). $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ (16 mg, 0.022 mmol) was added. The solution was heated at 70 °C under CO atmosphere during 12 hours. Solution was filtered over celite and solvents concentrated to dryness



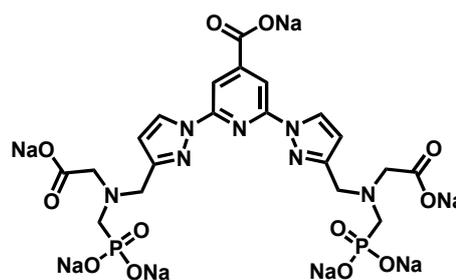
to give a pale yellow oil. Oil was dissolved in DCM (30 mL) and washed with water (3 × 15 ml). Organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. **82** (253 mg, 77 %) was isolated by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 100:0 to 96:4) as colourless oil. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.38 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 8.13 (s, 2H), 7.67 (t, $J = 5$ Hz, 1 H), 6.43 (d, $J = 2.5$ Hz, 2 H), 4.13 – 4.00 (m, 14 H), 3.98 (s, 4H), 3.59 (s, 4 H), 3.46 (q, $J = 6$ Hz, 2H), 3.17 (d, $J = 11$ Hz, 2 H), 2.37 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 1.93 (m, 2 H), 1.24 (q, $J = 7$ Hz, 18 H), 1.17 (t, $J = 7$ Hz, 3 H). ^{13}C $\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 173.4, 170.8, 164.6, 153.1, 150.5, 147.5, 127.9, 108.3, 107.0, 62.1 (d, $^3J(C,P) = 7$ Hz), 60.5, 60.4, 55.0 (d, $^3J(C,P) = 6$ Hz), 53.5, 53.0 (d, $^3J(C,P) = 11$ Hz), 48.7 (d, $^1J(C,P) = 160$ Hz), 39.7, 31.8, 24.4, 16.4 (d, $^3J(C,P) = 6$ Hz), 14.2. ^{31}P $\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 161 MHz): δ 24.61. IR (cm^{-1} , ATR): ν 3278 (w), 2982 (w), 2933 (w), 2908 (w), 2868 (w), 1733 (m), 1667 (w), 1618 (w), 1570 (m), 1535 (m), 1463 (m), 1389 (m), 1368 (m), 1307 (w), 1211 (m), 1190 (m), 1166 (m), 1097 (w), 1047 (m), 1023 (s), 963 (m). Elemental analysis calculated for $C_{38}H_{60}N_8O_{13}P_2$: C 50.78; H 6.73; N 12.47, measured: C 50.55; H 6.50, N 12.29. EI/MS (Neat), m/z 898.2 ($[M]^+$, 100 %).

Synthesis of 83: In a schlenk tube, was added a solution of **82** (36 mg, 41 μ mol) in DCM (1 ml), TMS-Br (0.11 ml, 0.81 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature during 24 hours and a second crop of TMS-Br (0.11 ml, 0.81 mmol) was added. The mixture was stirred for 24 hours and



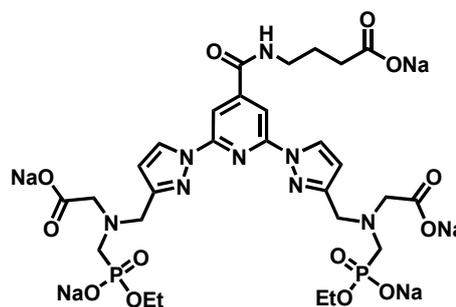
solvents were distilled under reduce pressure. The residue was dissolved in MeOH (1 ml) and the mixture was stirred at room temperature during 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH (1 ml) and the mixture was stirred at room temperature during 24 hours. The Solvent was distilled under reduced pressure and the residue was dissolved in a minimum of MeOH. Addition of diethyl ether led to the precipitation of compound **83** as a white solid (25 mg, 78 %). ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 8.50 (s, 2 H), 7.83 (s, 1 H), 6.73 (s, 2 H), 4.38 (s, 4 H), 4.26- 4.09 (m, 6 H), 3.61 – 3.41 (m, 10 H), 2.48 (m, 2H), 1,95 (m, 2H) 1.17 (m, 9 H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 173.4, 170.8, 164.6, 153.1, 150.5, 147.5, 127.9, 108.3, 107.0, 62.1 (d, $^3J(\text{C},\text{P})= 7$ Hz), 60.4, 55.0 (d, $^3J(\text{C},\text{P})= 6$ Hz), 53.5, 53.0 (d, $^3J(\text{C},\text{P})= 11$ Hz), 48.7 (d, $^1J(\text{C},\text{P}) = 160$ Hz), 39.7, 31.8, 24.4, 14.2. ESI/MS (MeOH/ H_2O , negative mode, High resolution), m/z 787.2498 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calc 787.2503).

Synthesis of 84: **83** (50 mg, 55 μmol) was dissolved in 10 ml of a solution of EtOH/water (8:2) and NaOH (22 mg, 0.55 mmol) was added. The mixture was heated at 50°C during 12 hours. The solution was concentrated to dryness and the residue was dissolved in a minimum of MeOH. THF and diethyl ether were added to precipitate



84 as a white solid (43 mg, 100 %). ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 8.68 (s, 2H), 7.99 (s, 2H), 6.73 (s, 2H), 3.99 (s, 4 H), 3.39 (s, 4 H), 2.95 (d, $J = 10$ Hz, 4 H).

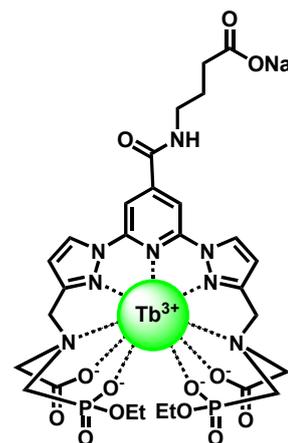
Synthesis of 86: **82** (20 mg, 0.22 μmol) was dissolved in 2 ml of a solution of H_2O /THF (50/50) and NaOH (4.5 mg, 0.11 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature during 12 hours. THF and diethyl ether were added to precipitate **86** as a white solid (13.7 mg, 72 %). ^1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ



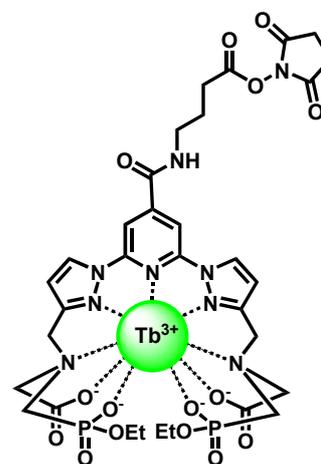
8.56 (s, 2 H), 7.85 (s, 1 H), 6.59 (s, 2 H), 4.10 – 4.00 (m, 4 H), 4.94 (s, 4 H), 3.40 – 3.35 (m, 6 H), 3.25 (d, $J = 10$ Hz, 4 H), 2.24 (m, 2H), 1,85 (m, 2H) 1.22 (t, $J = 7$ Hz, 6 H). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 75 MHz): δ 184.5, 182.6, 178.2, 153.7, 150.1, 147.8, 129.9, 109.4, 107.2, 63.6 (d, $^3J(\text{C},\text{P})= 7$ Hz), 58.1, 52.2 (d, $^3J(\text{C},\text{P})= 11$ Hz), 47.3 (d, $^1J(\text{C},\text{P}) = 160$ Hz), 40.1, 35.0, 25.4, 15.6 (d, $^3J(\text{C},\text{P})= 7$ Hz). ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 161 MHz): δ 28.36. IR (cm^{-1} , ATR):

ν 3375 (br), 2980 (w), 2928 (w), 1655 (m), 1568 (s), 1535 (m), 1459 (m), 1387 (s), 1325 (m), 1215 (m), 1162 (w), 1098 (w), 1047 (s), 1020 (s), 968 (s). Elemental analysis calculated for $(C_{28}H_{35}N_8O_{13}P_2)Na_5 \cdot 2H_2O$: C 37.18; H 4.35; N 12.39, measured: C 36.94; H 4.17, N 12.29. ESI/MS (MeOH/H₂O, negative mode), m/z 845.3 ($[M-Na]^-$, 35 %), 411.1 ($[M-2Na]^{2-}$, 100 %), 266.4 ($[M-3Na]^{3-}$, 15 %).

Synthesis of 87: To a solution of **86** (22 mg, 25 μ mol) in H₂O (10 ml) was added TbCl₃·6H₂O (9.5 mg, 25 μ mol). The mixture was heated at 60 °C during 3 hours. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in a minimum of H₂O. Successive addition of THF, MeOH, and Et₂O resulted in the formation of a precipitate, which was collected by centrifugation and dried under vacuum to give complex **87** (19 mg, 79 %) as a white solid. IR (cm⁻¹, ATR): ν 3342 (br), 2982 (w), 2892 (w), 1661 (m), 1621 (s), 1568 (m), 1547 (m), 1532 (m), 1494 (w), 1474 (w), 1438(w), 1386 (m), 1353 (m), 1283 (w), 1193 (m), 1070 (m), 1037 (s), 1008 (w). ESI/MS (MeOH/H₂O, negative mode, High resolution), m/z 935.5918 ($[M-Na]^-$, calc 935.5956).



Synthesis of TbL18: To a solution of **87** (9mg, 9.4 μ mol) in DMF (0.9 mL) and H₂O (0.1 ml, was added, DIEA (5 μ l) and TSTU (3.1 mg, 10.3 μ mol). The solution was stirred during 4 hours at room temperature. Ethyl acetate was added to force the precipitation of **TbL18** as white solid (4.8 mg, 49 %). IR (cm⁻¹, ATR): ν 3370 (br), 3114 (w), 2976 (w), 2891 (w), 1812 (w), 1780 (w), 1737 (m), 1621 (s), 1568 (m), 1538 (m), 1476 (w), 1439 (m), 1387 (m), 1353 (m), 1254 (w), 1186 (m), 1068 (m), 1035 (s), 1009 (w). ESI/MS (MeOH/H₂O, negative mode, High resolution), m/z 1010.1289 ($[M-Na]^-$, calc 1010.1294).



Annexes

Résumé

Ce travail de thèse a consisté en la synthèse multi-étape et convergente de nouveaux marqueurs luminescents à base d'ions lanthanides possédant une antenne de type 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine et des bras chélatants iminodiacétates.

La première partie du projet a été la synthèse de ligands possédant des fonctionnalisations en position 4' pouvant influencer les propriétés photophysiques des complexes et utilisables comme lien vers des molécules bioactives. Les complexes de lanthanides obtenus ont des rendements quantiques de luminescence variant de 4,5 % à 12 % pour les complexes d'euporium et de 3,5 à 100 % pour les complexes de terbium. Leurs temps de vie de luminescence varient de 1 à 1,5 ms pour les complexes d'euporium et peuvent atteindre 3 ms pour les complexes de terbium.

La seconde partie du projet est axée sur l'utilisation de ces complexes comme marqueur de molécules bioactives, le but étant de mettre au point un dosage fluoroimmunologique de l'antigène ACE en utilisant le temps résolu et le transfert d'énergie par résonance (FRET) d'un donneur d'énergie, un complexe de lanthanide, vers un accepteur d'énergie de type cyanine. Les résultats obtenus sont très encourageants et nous nous sommes focalisés sur l'optimisation des complexes.

La troisième partie de ce projet expose les efforts mis en œuvre afin d'optimiser les propriétés photophysiques et la stabilité des complexes en milieu biologique. L'optimisation des propriétés photophysiques des complexes est obtenue par modification de l'antenne, avec la synthèse de l'antenne 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine qui permet d'obtenir l'absorption des complexes dans la région proche du visible du spectre électromagnétique. L'optimisation de la stabilité des complexes en milieu biologique est obtenue par l'utilisation de bras chélatants de type glyphosate.

Mot-clé : marqueurs luminescents, 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine, bras chélatants iminodiacétates, ions lanthanides, dosages fluoroimmunologiques, temps résolu, FRET, antigène ACE, 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine, bras chélatants glyphosates.

Abstract

The aim of this thesis was the multi-step synthesis of new luminescent dyes based on lanthanide ions with a core based on 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine and chelating arms such as iminodiacetate.

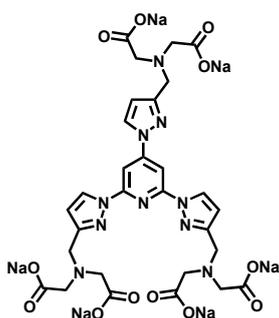
The first part of this project was the synthesis of ligands with functionalisation in 4' position of the antenna which can strongly influence the photophysical properties of the complexes and is useful for biomolecule labelling. Lanthanide complexes obtained have quantum yields between 4.5 % and 12 % for europium complexes and between 3.5 % and 100% for terbium complexes. Luminescence lifetime decays vary between 1 and 1.5 ms for europium complexes and can reach 3 ms for terbium complexes.

The second part of this project was focused on biological application of these lanthanide markers, in particular fluoroimmunoassays of antigen CEA, using time resolved measurement and fluorescence resonance energy transfer from a donor, a lanthanide chelate, to an acceptor, a cyanine. Results obtained were promising and we focus our effort to the optimisation of the photophysical properties of complexes and stability of complexes in biological media.

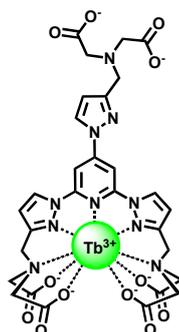
In the third part, optimisation of photophysical properties of complexes was achieved with the synthesis of the antenna 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine which displace the absorption of complexes to the visible part of the electromagnetic spectrum. Optimisation of the complexes stability was obtained using glyphosate type chelating arms.

Keywords: luminescent dyes, 2,6-bispyrazol-1-yl-pyridine, iminodiacetate chelating arms, lanthanides ions, fluoroimmunassays, time resolved measurement, FRET, antigen CEA, 2,6-bisindazol-1-yl-pyridine, glyphosate chelating arms.

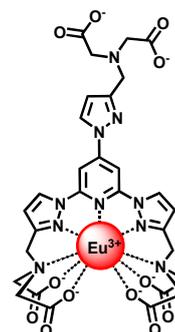
Liste des ligands et des complexes



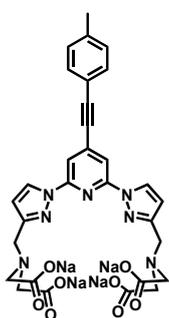
L1



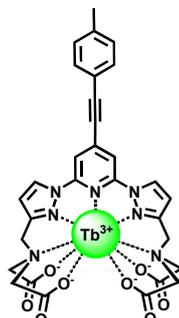
TbL1



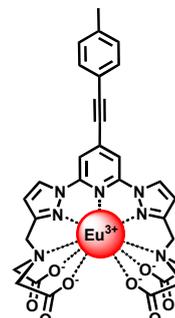
EuL1



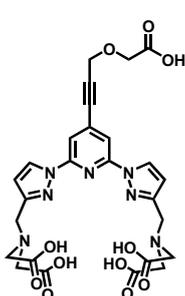
L4



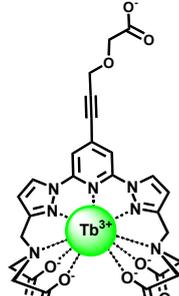
TbL4



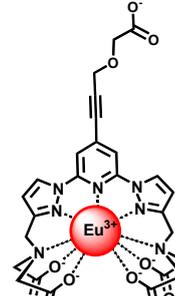
EuL4



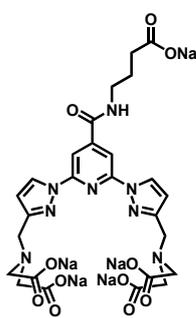
L5



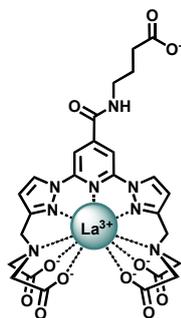
TbL5



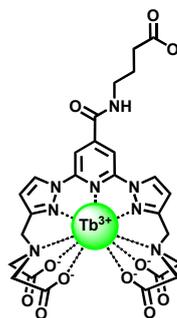
EuL5



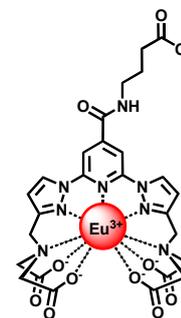
L6



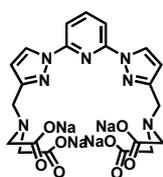
LaL6



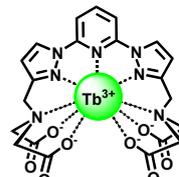
TbL6



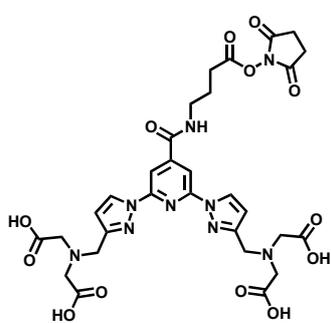
EuL6



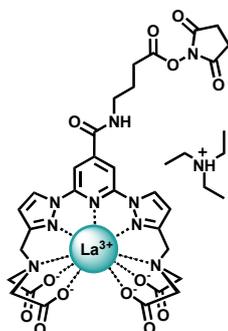
L7



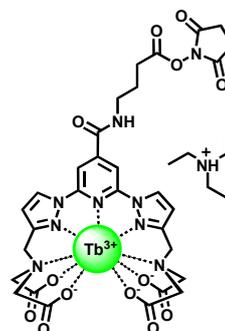
TbL7



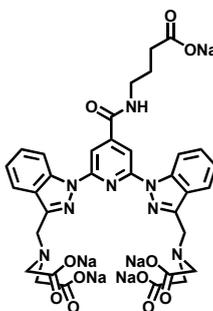
L8



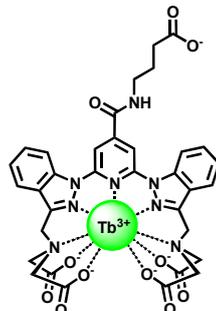
LaL8



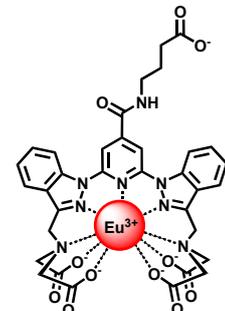
TbL8



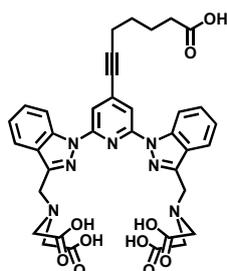
L10



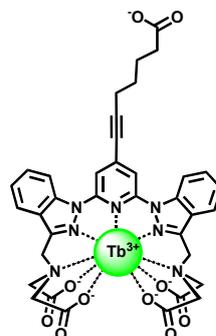
TbL10



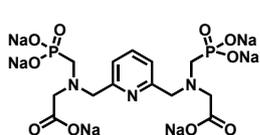
EuL10



L11



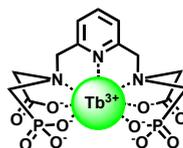
TbL11



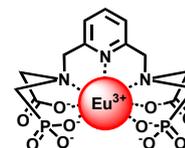
L12



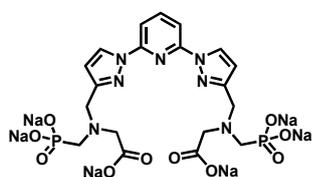
LaL12



TbL12



EuL12



L14



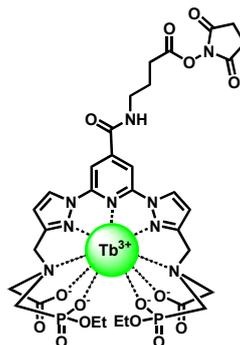
LaL14



TbL14



EuL14



TbL18

COMMUNICATION ORALE

“New synthetic strategies for the design of highly luminescent lanthanide markers” Poster at meeting Cost D38 Warsaw, Metal-based system for molecular imaging application, 24-27 avril 2009, Starck, M.; Kadjane, P.; Ziessel, R.; Charbonnière, L.

“Synthesis and spectroscopic properties of new lanthanide complexes” Week of organometallic chemistry study (GECOM Concoord 2009), 24-29 May 2009, Albé, France.

PUBLICATIONS

1. “Divergent approach to a large variety of versatile luminescent lanthanide complexes”. Kadjane, P.; Starck, M.; Camerel, F.; Hill, D.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 4601-4603.
2. “Solution structure and dynamics, stability, and NIR emission properties of lanthanide complexes with a carboxylated bispyrazolylpyridinyl ligand”. Mato-Iglesias, M.; Rodriguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.; Starck, M.; Kadjane, P.; Ziessel, R., Charbonnière, L. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 1507-15018.
3. “Complexes luminescents d’ions lanthanides, leur synthèse, leurs applications au marquage, à l’absorption à deux photons et à la détection de cations”; Kadjane, P.; Starck, M.; Charbonnière, L.J; Ziessel, R.; Hildebrandt, N.; *B5006FR*, **2008**