



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : **Chimie**

SYNTHÈSE DE COMPLEXES LUMINESCENTS À BASE D'IONS LANTHANIDES POUR LE MARQUAGE DE BIOMOLECULES

Application au diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Présentée et soutenue publiquement par

Katia NCHIMI NONO

Le 09 novembre 2012

| | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|
| Prof. David PARKER | Durham University | Rapporteur externe |
| Prof. Eva JAKAB TOTH | CBM Orléans | Rapporteur externe |
| Prof. Valérie HEITZ | Université de Strasbourg | Examineur |
| Prof. Laurence SABATIER | ECPM de Strasbourg | Invité |
| Dr. Loïc CHARBONNIÈRE | CNRS Strasbourg | Directeur de thèse |

À ma mère,

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Loïc Charbonnière de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire pendant trois ans. Tout au long de cette période, il n'a pas ménagé sa disponibilité et j'ai pu bénéficier de son encadrement quotidien, malgré les multiples responsabilités qui lui incombent.

Loïc, au-delà de l'assistance théorique et pratique que tu m'as apportée, ainsi que de ton immense contribution à ce manuscrit, je retiendrais surtout ton impressionnante culture scientifique et tes qualités humaines. Merci.

Je voudrais remercier les membres du jury, les professeurs David Parker, Eva Jakab Toth, Valérie Heitz et Laurence Sabatier qui me font l'honneur d'examiner mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également à la Commission Européenne pour son financement dans le cadre du projet (7th Framework Programme, HEALTH2009, NANOGNOSTICS Research Project No. 242264).

Je remercie une seconde fois le Prof. Laurence Sabatier et son équipe, notamment Shakir Shakir pour leur grande implication dans ce projet. Ils ont participé à la valorisation et à la compréhension de nos systèmes à travers les expériences de purification, caractérisation et marquage de biomolécules.

Je salue également tous les partenaires du projet NANOGNOSTICS, en particulier le Pr. Niko Hildebrandt coordonnateur du projet, les docteurs Jens Dervedde et Thomas Hug pour la collaboration sur le marquage des biomolécules, et le Dr. Piotr Cywinski et Frank Morgner avec qui les expériences de FRET ont été réalisées.

Toujours pour sa contribution à ce travail, je remercie le Dr. Carlos Platas-Iglesias qui a effectué des calculs de DFT et des études en potentiométrie.

Je remercie également chaleureusement Alexandre Lecointre pour son travail de synthèse et pour toutes les autres tâches ingrates du laboratoire qu'il a souvent accepté d'assumer. J'adresse des remerciements aux autres permanents du groupe : Dr. Cécile Christine (pour ta bonne humeur, nos échanges enrichissants et cette Bonne Nourriture que nous partageons), le Dr. Zouhair Asfari (pour ta présence paternelle et bienfaitante) et le Dr. Aline Nonat (EndNote n'a plus de secrets pour moi, grâce à toi). Merci également à Pascale, Anne et Sylvie.

Je salue les étudiants stagiaires qui se sont succédés au laboratoire, notamment Bérangère Godde avec qui j'ai travaillé durant son stage de M1. Bérangère, ce fut un immense plaisir de travailler avec toi et ton amitié vaut bien mille publications. Tu me l'as démontré à travers ton soutien longtemps après ton départ du laboratoire et pendant cette période de rédaction.

Je salue toutes les autres personnes que j'ai eu l'honneur de rencontrer et de côtoyer au laboratoire depuis le début de ma thèse : Fanny, Mika, Sabah, Seher, Rachid, Bachir, Mama, Amandine (qui a supporté mes chants pendant un an...), Alexandre S., Benjamin, Mireia, Thiru, Mohamadou, Parastoo. Je tiens à remercier particulièrement Akram pour son amitié, sa bonne humeur et tous les petits gâteaux.

Plus qu'un merci, j'exprime ma profonde gratitude à mes parents, papa Isaac et maman Claire, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi depuis de longues années. Vous rendre fiers, tel est le carburant qui m'a fait avancer.

Merci aussi à ma sœur Cynthia et à mes frères : Steeve, Michael et Dany. Steeve, merci pour tout ton investissement dans la mise en page de ce manuscrit. Je suis sûre que cela n'a pas été vain. Tata Flore, merci d'être cette deuxième maman pour moi et je te suis reconnaissante pour tout ton amour.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance au Dr. Paul Stéphane Bell, qui m'a apporté son soutien tout au long de la rédaction de cette thèse. PS, ta modestie et ta générosité n'ont d'égale que ton intelligence. Continue de faire le bien autour de toi.

Merci Nicolas, pour tes relectures, ta patience et ta gentillesse malgré ma rudesse, quelques fois.

Thanks a lot to you Dave, for all. It started almost nine years ago in Yaoundé I, with you. Merci à toi Prisca. Ton amitié fidèle est un véritable cadeau. J'espère pouvoir être là pour toi comme tu l'as été pour moi depuis cinq ans.

Enfin, merci aux personnes qui me pardonneront de ne pas les citer, tout en sachant la place privilégiée qu'elles occupent dans mon cœur.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|------------|
| Avant-propos | 5 |
| Chapitre I : Introduction..... | 7 |
| I. Généralités sur les lanthanides..... | 11 |
| II. But principal du projet..... | 25 |
| III. Bibliographie..... | 45 |
| Chapitre II : Ligands multifonctionnels | 51 |
| I. Etude du ligand L_p et de ses complexes..... | 54 |
| II. Etude de ligands phosphonates activés..... | 81 |
| III. Conclusion..... | 103 |
| IV. Bibliographie..... | 105 |
| Chapitre III : Application au marquage et au FRET | 109 |
| I. Marquage de biomolécules | 115 |
| II. Transfert d'énergie | 135 |
| III. Conclusion..... | 159 |
| IV. Bibliographie..... | 161 |
| Chapitre IV: Optimisation de la luminescence | 163 |
| I. Optimisation de la photosensibilisation | 169 |
| II. Synthèse de complexes dinucléaires | 205 |
| III. Conclusion..... | 225 |
| IV. Bibliographie..... | 227 |
| Conclusion générale et perspectives..... | 229 |
| Annexes | 235 |
| Partie expérimentale..... | 237 |
| Abréviations..... | 265 |
| Publications et communications | 267 |

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme ».

François Rabelais

Avant-propos

Née de sa soif d'apprendre et de comprendre, la science est rapidement devenue le moyen par lequel l'Humanité a pu aller au-devant de grandes découvertes et d'inventions remarquables. C'est donc avec elle et grâce à elle que les sociétés sont en perpétuelle évolution, avec pour objectif l'amélioration de leurs conditions de vie. Une motivation moins déclarée se dessine pourtant aujourd'hui dans une volonté grandissante de prendre le contrôle de ce qui nous entoure, de ce que nous faisons et depuis peu de ce que nous sommes.

Sans remettre en cause le caractère bienfaisant de la recherche à qui l'on doit une meilleure qualité de vie et plus de confort, il est nécessaire aujourd'hui de se poser la question de savoir si sa diffusion et son utilisation ne sont pas parfois inappropriées.

Tout en étant conscient de ce que les méfaits de la science sont toujours plus médiatisés que ses avantages, le scientifique a le devoir aujourd'hui d'être responsable de ses découvertes et de se poser la question non pas de savoir jusqu'où il peut aller, mais plutôt jusqu'où il peut s'aventurer sans se perdre. Pas de savoir ce qu'il peut faire, mais de déterminer si ce qu'il fait est bien, moral.

CHAPITRE I : Introduction

Sommaire

| | |
|---|-----------|
| I. Généralités sur les lanthanides | 11 |
| 1. Propriétés fondamentales des ions lanthanides | 11 |
| 1.1 Caractéristiques électroniques..... | 12 |
| 1.1.1 Propriétés spectroscopiques | 12 |
| 1.1.2 Propriétés magnétiques..... | 15 |
| 1.2 Photosensibilisation des lanthanides | 15 |
| 1.3 Caractéristiques stériques, géométriques et de coordination | 18 |
| 2. Application des complexes de lanthanides | 19 |
| 2.1 Catalyse asymétrique | 19 |
| 2.2 Diagnostic biomédical..... | 20 |
| 2.2.1 Agents de contraste pour l'IRM | 20 |
| 2.2.2 Sondes luminescentes | 22 |
| | |
| II. But principal du projet | 25 |
| 1. La maladie d'Alzheimer..... | 25 |
| 1.1 Les plaques amyloïdes..... | 27 |
| 1.2 Les protéines Tau | 29 |
| 2. Dosages immunologiques..... | 30 |
| 3. Transfert d'énergie de type FRET | 32 |
| 3.1 Mécanisme du transfert d'énergie | 32 |
| 3.2 Vitesse du transfert d'énergie..... | 33 |
| 3.3 Efficacité du transfert d'énergie..... | 36 |
| 3.4 Traitement du signal | 37 |
| 4. Les nanocristaux semi-conducteurs | 39 |
| | |
| III. Bibliographie | 45 |

I. Généralités sur les lanthanides

Les lanthanides désignent les éléments de la classification périodique dont le numéro atomique (Z) va de 57 (Lanthane) à 71 (Lutétiun). Ils sont au nombre de 15 et complètent avec le Scandium et l'Yttrium la famille des « terres-rares ». Cette dénomination ne renvoie pas à leur abondance relative, puisqu'ils sont largement répandus sous formes d'oxydes dans la croûte terrestre.^[1] Elle fait plutôt écho aux difficultés de séparation qui entourent leur exploitation.

C'est au sein de minerais tels que la *cérite*, la *monazite* ou la *bastnaésite*, sous la forme de mélanges complexes^[1] et difficiles à séparer, qu'ils font leur apparition au 19^{ème} siècle.^[2] Après le traitement chimique des minerais visant à isoler les terres-rares des autres composants, les processus de séparation du mélange de leurs oxydes reposent en grande partie sur leur différence de taille.^[3] En effet, même si on retrouve chez les lanthanides qui appartiennent à la fois à la même période et au même groupe de la classification périodique une unicité de caractéristiques électroniques, l'augmentation du numéro atomique se traduit par une diminution des rayons atomique et ionique, connue sous l'expression « *contraction lanthanidique* ».

De nombreux documents de la littérature décrivent de façon détaillée lesdits procédés de séparation ; nous nous intéresserons surtout à la description succincte de l'ensemble des propriétés intrinsèques des lanthanides notamment lorsqu'ils sont à l'état d'ion, au sein de complexes de coordination.

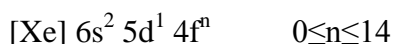
1. Propriétés fondamentales des ions lanthanides

Il existe un large éventail de possibilités pour la mise en œuvre et l'exploitation des lanthanides. Ils peuvent être utilisés sous la forme d'oxydes^[4] ou bien associés à des ligands et/ou des polymères^[5] au sein de dispositifs fonctionnels. Toutefois l'intérêt que l'on peut retrouver chez ces procédés réside essentiellement dans les propriétés intrinsèques des éléments métalliques.

1.1 Caractéristiques électroniques

La famille des lanthanides peut encore être définie comme l'ensemble des éléments de la classification périodique dont la sous-couche $4f$ est en cours de remplissage,^[6] exception faite du lanthane et du lutétium.

La configuration électronique générale pour ces 15 éléments à l'état atomique est la suivante :



L'orbitale $4f$ est en réalité plus proche du noyau que les orbitales $5d$ et $6s$ déjà remplies à l'état élémentaire. Par conséquent, les électrons qu'elle contient sont très peu influencés par l'environnement car protégés par les couches électroniques supplémentaires. D'un élément au suivant, de gauche à droite de la série, avec l'augmentation du numéro atomique se produit une augmentation de la charge apparente du noyau. La force d'attraction entre le noyau et les électrons devient plus importante, ce qui explique le phénomène de *contraction lanthanidique* précédemment introduit.

Malgré cette différence de taille, les lanthanides ont des propriétés électroniques très similaires. Par exemple, ils perdent tous facilement trois électrons pour donner des ions trivalents Ln(III) . Cet état d'oxydation pour lequel les lanthanides ont une configuration électronique à couche externe saturée est le plus stable et le plus fréquemment rencontré, malgré quelques exceptions pour le Cérium,^[7] l'Europium^[8], le terbium^[9] ou le samarium^[10], stables aux états d'oxydations (II) et (IV).

Dans tous les cas, ce sont les électrons $4f$ des lanthanides qui leur confèrent des propriétés optiques et magnétiques particulièrement intéressantes.

1.1.1 Propriétés spectroscopiques

La luminescence des ions lanthanides est attribuée aux transitions électroniques internes des électrons $4f$. C'est la nature de ces orbitales atomiques qui est à l'origine de l'intérêt porté aux propriétés spectroscopiques des lanthanides :

➤ Les transitions $f-f$ faisant intervenir des orbitales de même symétrie sont interdites par la règle de sélection de Laporte^[11] ou règle de parité. Le retour à l'état fondamental des ions excités est un processus défavorisé, ce qui donne aux états excités des temps de vie de luminescence très longs.

➤ Les électrons $4f$ qui interviennent dans la luminescence des ions lanthanides sont proches du noyau et n'interagissent pas avec les orbitales moléculaires du ligand. Ils sont très peu perturbés par l'environnement et produisent en retournant à l'état fondamental des raies d'émissions fines et caractéristiques pour chacun des ions en fonction des niveaux d'énergie impliqués.

Parmi les quinze ions lanthanides, seuls trois n'ont pas leurs propriétés de luminescence décrites dans la littérature :

- Le Lanthane et le Lutécium : ces éléments ne peuvent pas abriter des transitions électroniques, puisque l'orbitale $4f$ est vide chez le premier, et saturée par des électrons appariés chez le second.

- Le Prométhéum : cet élément possède 4 électrons f non-appariés et est certainement fluorescent. Cependant, il est radioactif et ne possède pas d'isotope stable, ce qui rend complexe sa caractérisation spectroscopique.

Pour les autres principaux ions lanthanides luminescents, les niveaux énergétiques et les termes spectroscopiques en solution ont été déterminés à partir de la répulsion inter-électronique :

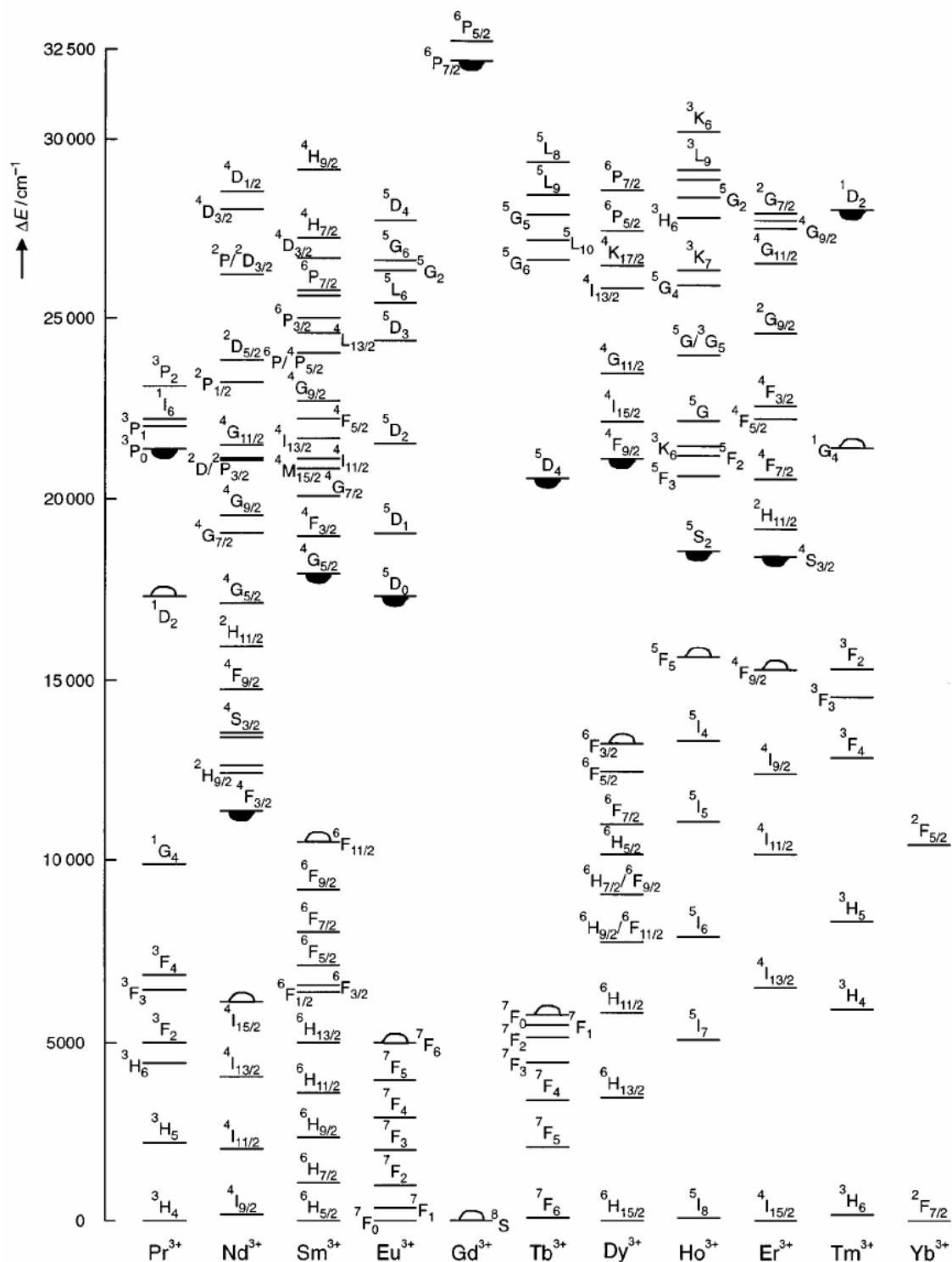


Diagramme 1.1 : Niveaux d'énergie des principaux ions lanthanides luminescents en solution aqueuse. Les niveaux luminescents les plus bas sont représentés en blanc (◐) et les niveaux fondamentaux en noir (◑)^[12].

Excepté le Gadolinium dont le premier état excité est très haut en énergie et difficilement accessible en spectroscopie de luminescence classique, les lanthanides émettent

à des longueurs d'ondes distinctives allant de la région visible du spectre électromagnétique à l'infrarouge lointain (Figure 1.1) :

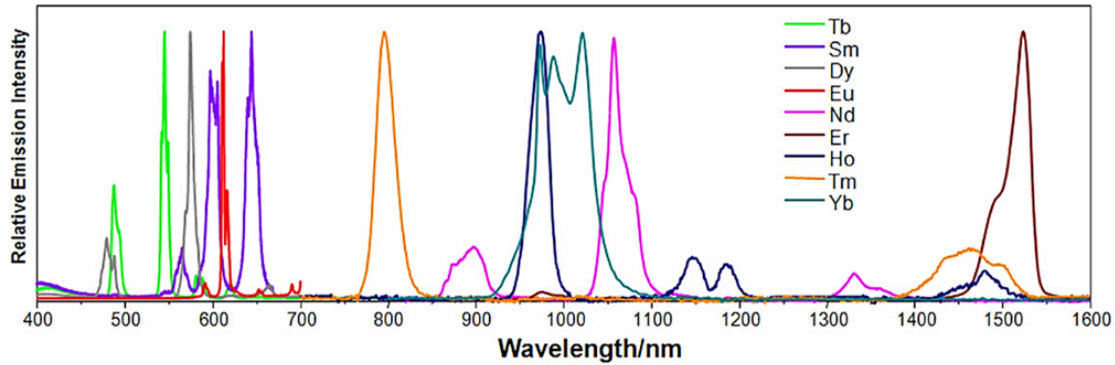


Figure 1.1 : Spectres d'émission normalisés des principaux ions lanthanides luminescents.

Cette représentation normalisée des spectres d'émission souligne bien qu'en plus de leurs temps de vie élevés, les ions lanthanides ont une signature spectrale qui les distingue non seulement les uns des autres, mais également des autres complexes de métaux de transitions ou des fluorophores organiques.

1.1.2 Propriétés magnétiques

Exception faite du Lanthane et du Lutécium, les lanthanides dont les électrons $4f$ sont célibataires ou partiellement appariés sont fortement paramagnétiques. À l'instar des propriétés de luminescence des lanthanides, leurs propriétés magnétiques sont très avantageuses, puisqu'elles ne sont pas affectées par leur environnement. Leur utilisation est d'ailleurs très prisée pour la fabrication de supraconducteurs,^[13] d'aimants permanents, et pour des applications en imagerie (en tant que sondes magnétiques ou agents de contraste).

1.2 Photosensibilisation des lanthanides

Les propriétés spectroscopiques avantageuses des lanthanides, notamment leur temps de vie de luminescence longs et leurs raies d'émission caractéristiques ont été présentées dans les paragraphes antérieurs. L'origine de ces singularités favorables réside dans le caractère interdit des transitions électroniques mises en jeu.

Pour la même raison, l'accès à la luminescence des lanthanides dont les coefficients d'extinction molaire sont très faibles (inférieurs à $3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),^[14] via une excitation directe est restreint par la nécessité d'utilisation de sources d'énergie puissantes telles les LASERs, avec

des résultats parfois insatisfaisants. Cet obstacle peut cependant être surmonté par le recours à une excitation indirecte.

Certains chromophores organiques conjugués à hauts coefficients d'absorption molaire sont susceptibles de collecter des photons lorsqu'ils sont irradiés, ensuite de les transférer à des ions lanthanides lorsqu'ils sont suffisamment proches dans l'espace. Sous l'effet de cette photosensibilisation (effet d'antenne), les cations voient leurs niveaux d'énergie luminescents peuplés, et la molécule passe à un état excité. Le retour à l'état fondamental se traduit par l'émission caractéristique de l'ion métallique.

Cette sensibilisation par effet d'antenne est schématisée ci-dessous :

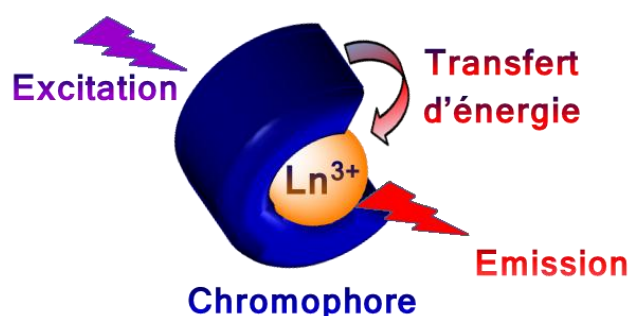


Schéma 1. Représentation de l'effet d'antenne.

La première étape de ce processus est l'absorption d'un photon par le ligand. Selon l'étendue du système conjugué et la nature des substituants des dérivés aromatiques, celle-ci peut se faire soit dans l'UV soit dans le visible. Elle se traduit par le passage de la molécule de son état fondamental S_0 à un état excité plus haut en énergie S_1 , puisque une transition vers un état triplet impliquant une conversion de spin est défavorisée. Il est également possible d'observer des transitions de type $S_0 \rightarrow S_2$, mais grâce à des phénomènes de conversion la molécule excitée retourne rapidement à l'état S_1 .

À partir de cet état il existe en général plusieurs chemins de désexcitation radiatifs ou non-radiatifs du ligand. On peut observer la luminescence du ligand à travers l'émission d'un photon lors du retour à l'état fondamental S_0 . Cependant la transition $S_1 \rightarrow S_0$ peut également se produire de manière non-radiative par conversion interne.

Par ailleurs, les composés organiques coordonnés aux lanthanides peuvent passer de leur état singulet S_0 à un état triplet T_1 plus faible en énergie lors d'un croisement intersystème. Ce processus implique une conversion de spin et peut être facilité par effet d'atome lourd.

Lorsque les niveaux d'énergies du ligand et la distance entre le chromophore et l'ion lanthanide sont en adéquation, il peut se produire un transfert d'énergie de T_1 vers les niveaux d'énergie luminescents des ions lanthanides.

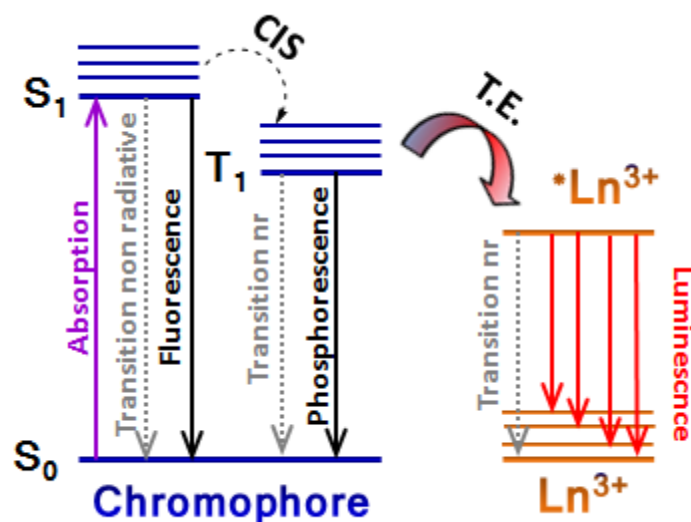


Schéma 1.2 : Représentation de l'effet d'antenne.

La représentation de l'ensemble des mécanismes envisageables lors de ce processus de sensibilisation des lanthanides à l'aide du diagramme de Jablonski (Schéma 1.2) souligne l'existence de nombreuses autres voies de désexcitation compétitives susceptibles en fonction de la nature du système d'amoinrir l'efficacité de l'effet d'antenne. Cette efficacité est appréciée quantitativement à travers de la détermination du rendement quantique de luminescence (Φ).

Si la différence d'énergie entre les niveaux impliqués est trop grande (idéalement elle doit être inférieure à 5000 cm^{-1}),^[15] le processus de transfert d'énergie est défavorisé par rapport à la luminescence du ligand à partir de son état triplet (phosphorescence). Cependant si cette différence d'énergie est trop faible (inférieure à 1850 cm^{-1}),^[16] on observe également une mauvaise sensibilisation du lanthanide, à cause d'un transfert d'énergie en retour vers l'état T_1 .

Pour la sensibilisation des lanthanides qui émettent dans des régions différentes du spectre électromagnétique, les niveaux d'énergie sollicités sont différents d'un cation à un autre. La nécessité d'avoir à chaque fois une adéquation énergétique entre l'ion et l'antenne explique le développement de plusieurs familles de ligands selon que l'on recherche une sensibilisation dans le visible (Eu, Tb) ou dans l'infrarouge (Nd, Er, Yb).

1.3 Caractéristiques stériques, géométriques et de coordination

La variation du rayon ionique des lanthanides trivalents, gouvernée par le phénomène de contraction lanthanidique précédemment explicité va influencer la formation de leurs complexes, notamment leur géométrie de coordination et leur réactivité :^[17] les éléments en début de séries sont les plus gros et ont des nombres de coordination plus élevés en solution.

Ce phénomène est pertinemment illustré à travers l'étude de quelques complexes de lanthanides avec des ligands de type cyclopentadiényle pour lesquels des travaux ont permis de mettre en évidence plusieurs structures et une corrélation certaine vis-à-vis de la taille des cations.^[18]

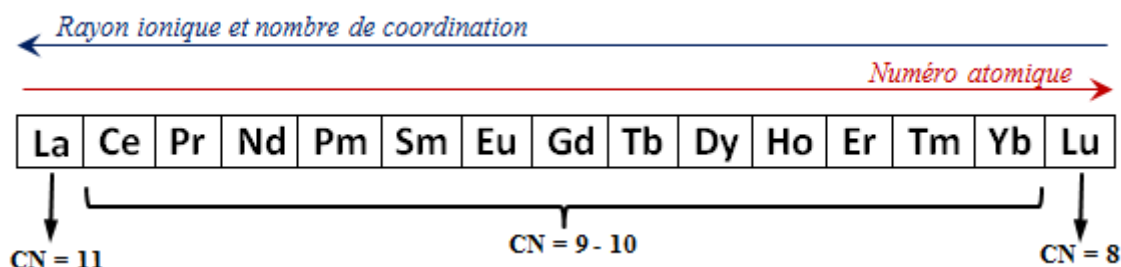


Schéma 1.3 : Noms, numéros atomiques et configurations électroniques des lanthanides, où [Xe] est la configuration électronique du Xenon.

Comme cela a déjà été souligné en amont, contrairement aux éléments *d* les ions lanthanides sont très peu influencés par leur environnement électronique. Le champ des ligands n'impose pas de contraintes aux directions des orbitales, par conséquent il en résulte une absence de géométries de coordination préférentielles au sein de leurs complexes de coordination. Le motif de coordination est surtout influencé par des facteurs stériques.

En revanche, la nature des liaisons entre les lanthanides et leurs ligands est essentiellement ionique. C'est une interaction qui est d'autant plus forte que le ligand associé a un caractère électronégatif et dur. En effet, les lanthanides sont très électropositifs, et selon la classification de Pearson, ce sont des acides « durs ». ^[19-20] Ils ont une affinité plus importante à l'égard de ligands à atomes riches et donateurs d'électrons (O, Halogènes) que pour des ligands à atomes « mous » (S, P).

C'est ainsi qu'on assiste à l'émergence de ligands assez variés en fonction de l'application visée par l'utilisation des ions lanthanides. Par exemple, pour la formation de complexes suffisamment stables en milieux aqueux, sont privilégiés les ligands à bases dures

tels que les dérivés carboxyliques ou phosphoniques, puisqu'ils sont susceptibles de déplacer les molécules d'eau pour lesquelles les cations Ln(III) ont une forte affinité.

2. Application des complexes de lanthanides

L'intérêt porté aux lanthanides dans le cadre de ma thèse est principalement motivé par leurs propriétés de luminescence et leurs transitions électroniques. Cependant d'autres caractéristiques associées à ces cations possèdent un fort potentiel pour le développement d'applications diverses.

2.1 Catalyse asymétrique

Les lanthanides sont des acides de Lewis, et de cette propriété découle leur activité catalytique. Historiquement, cette application a été mise en évidence par Danishefsky et ses collaborateurs^[21] en 1983 lors d'une réaction de Diels-Alder. C'est une cyclo-addition stéréosélective et son activation par un complexe d'Europium (Schéma 1.4) permet d'obtenir des excès énantiomériques de l'ordre de 60 %.

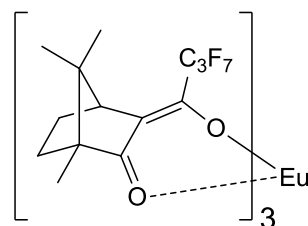


Schéma 1.4. : Structure du complexe $[Eu(hfc)_3]$ dérivé du 3-heptafluoropropylhydroxyméthylène-(+)-camphorate (hfc).

On peut cependant relever que le français Kagan fut l'un des pionniers de l'utilisation des lanthanides en synthèse organique, grâce à ses travaux novateurs sur la synthèse de l'iodure de Samarium (SmI_2) et l'étude de leurs applications en synthèse organique.^[22-23]

Par la suite, Kobayashi a également contribué au développement de catalyseurs à base de sels de terres-rares, dont des triflates ($Ln(OTf_3)$) modifiés par des ligands chiraux pour les réactions d'aldolisation en milieux aqueux.^[24-28]

Il existe enfin d'autres complexes de lanthanides qui ont démontré une bonne activité catalytique à l'égard des réactions stéréosélectives.^[29-32]

2.2 Diagnostic biomédical

L'imagerie médicale qui consiste en la visualisation des organes et des tissus est un outil de référence pour l'établissement de diagnostic, le suivi de l'évolution de maladies ou la mesure de l'efficacité d'un traitement. Parmi les techniques existantes aujourd'hui, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est largement répandue, tandis que l'élaboration de sondes hautement luminescentes constitue un défi stimulant.^[33] Des complexes à base d'ions lanthanides peuvent permettre le développement de ces deux applications.

2.2.1 Agents de contraste pour l'IRM

L'Imagerie par Résonance Magnétique est une technique d'exploration médicale permettant d'obtenir des images et des coupes anatomiques, à partir de la répartition des protons des molécules d'eau dans la région étudiée. Elle se base sur le comportement des spins nucléaires associés à ces noyaux lorsqu'ils sont soumis à des champs magnétiques externes.

Le premier est en général un champ permanent très intense (\mathbf{B}_0) sous l'effet duquel on assiste à une précession des dipôles nucléaires autour d'un axe de même direction que le champ permanent, selon deux orientations opposées. On associe l'une ou l'autre de ces orientations à des niveaux d'énergie des noyaux. À l'état macroscopique, il existe en général une différence de population entre ces niveaux, et la magnétisation macroscopique \mathbf{M}_0 qui résulte de la somme de toutes les magnétisations nucléaires est orientée dans la même direction que le champ.

L'application d'un second champ magnétique pulsé \mathbf{B}_1 perpendiculaire à \mathbf{B}_0 , et de fréquence appropriée (fréquence de Larmor) entraîne une variation du moment magnétique global qui résulte du passage des noyaux d'un état d'énergie à un autre. Cette perturbation ne dure que le temps d'un pulse, et lorsque le champ de radiofréquence B_1 redevient nul, le système retourne à son état d'équilibre. On assiste à une mise en résonance des protons et l'énergie accumulée est restituée à travers l'émission d'une onde magnétique de même fréquence que \mathbf{B}_1 .

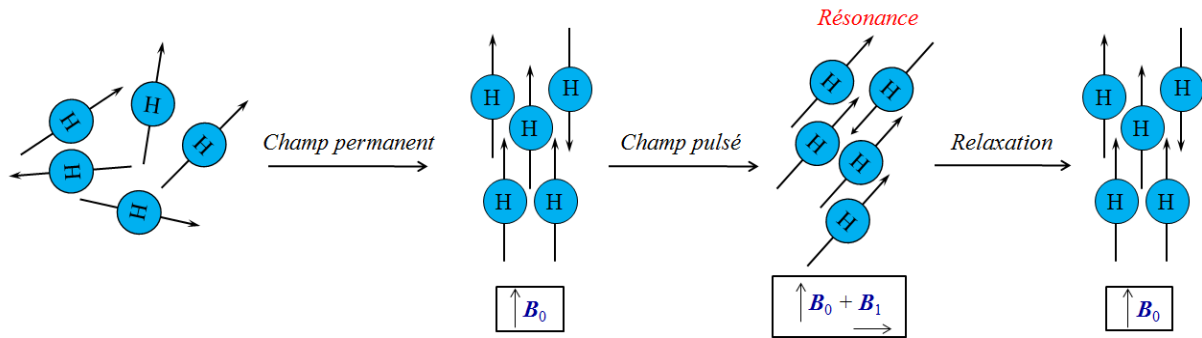


Schéma 1.5 : Représentation du processus de relaxation des protons lors d'une expérience d'IRM.

L'intensité de ce signal dépend de la concentration en protons. Il est ainsi possible d'obtenir une image tridimensionnelle de la région étudiée grâce à la répartition inégale en protons et donc à la différence d'intensité des signaux émis. L'intensité du signal enregistré dépend également des temps de relaxation des protons et donc de l'environnement chimique. Cependant la résolution de ces images est en général insuffisante. Elle peut être améliorée soit en augmentant l'intensité des champs magnétiques, soit à travers l'administration d'agents de contraste.

En IRM il s'agit de composés paramagnétiques susceptibles d'accroître le contraste des clichés en interagissant avec les molécules d'eau environnantes. L'efficacité de ces agents de contraste se mesure par leur relaxivité, soit leur contribution à la vitesse de relaxation des protons comme formalisé dans l'équation ci-dessous :

$$\left(\frac{1}{T_i}\right)_{tot} = \left(\frac{1}{T_i}\right)_{dia} + \left(\frac{1}{T_i}\right)_{para} \quad [1.1]$$

La description du phénomène de relaxation nucléaire faite par F. Bloch^[34] montre que le temps de relaxation peut-être décomposé en deux termes : un temps de relaxation longitudinal T_1 et un temps de relaxation transversal T_2 . Avec un nombre important d'électrons non appariés ($S = 7/2$), le Gadolinium Gd(III) paramagnétique permet d'accroître significativement T_1 , ce qui lui vaut d'être l'élément le plus exploité pour le développement d'agents de contraste.

Cependant, à l'instar de nombreux ions métalliques, le Gadolinium est très toxique^[35] et nécessite pour son utilisation en imagerie *in vivo* d'être encapsulé au sein de complexes cinétiquement inertes et thermodynamiquement stables. Ainsi la conception de ligands

organiques facilement excrétés occupe une place importante dans le développement de cette application.

Les chélatants du Gadolinium impliqués dans la formation d'agents de contrastes sont pour la plupart octadentates, ce qui laisse au moins un site de coordination vacant en première sphère de coordination pour l'échange avec les molécules d'eau. En outre, compte tenu du caractère acide du Gd(III), les ligands les plus utilisés appartiennent à la famille des polyaminocarboxylates linéaires ou cycliques dont quelques exemples sont donnés au schéma 1.6.

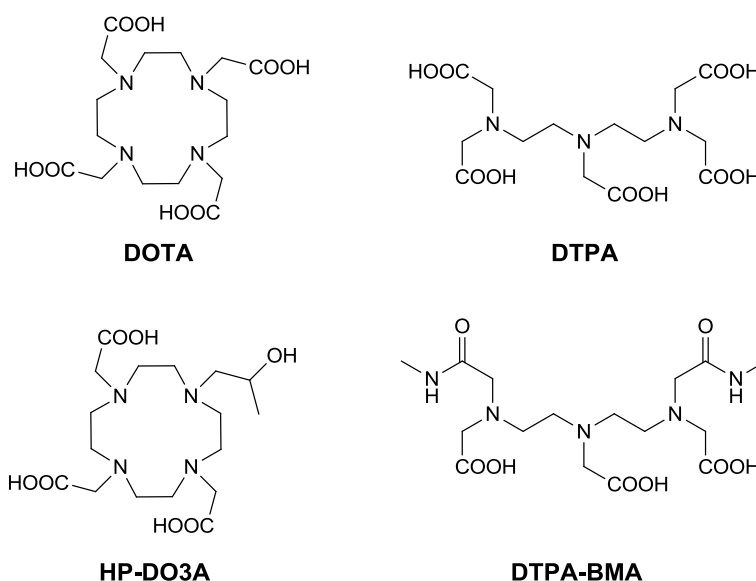


Schéma 1.6 : Structure des chélatants du Gd (III) de quelques agents de contraste usuels.

D'autres ions lanthanides ou même métaux de transition sont utilisés pour la conception d'agents de contrastes, mais le DOTAREM[®] complexe basé sur l'association du ligand DOTA et d'un cation Gd(III) est aujourd'hui l'un des composés les plus utilisés en milieu hospitalier du fait de sa stabilité remarquable et de son importante relaxivité.

2.2.2 Sondes luminescentes

Afin de réaliser le diagnostic ou le suivi spécifique de certaines substances lors d'analyses biomédicales, l'usage de sondes associées à des marqueurs biologiques est très répandu.

Malgré la sensibilité importante associée à l'utilisation de radiopharmaceutiques, du fait de leur toxicité élevée et des difficultés de manipulation, de stockage et d'élimination

qu'elles entraînent, on assiste à une recrudescence du développement des systèmes de détection basés sur l'utilisation de complexes stables luminescents.

Ce procédé a débuté avec l'utilisation de fluorophores organiques. Ce sont des composés qui après une excitation appropriée émettent de la lumière soit par fluorescence soit par phosphorescence (lorsqu'ils sont associés à des métaux lourds). L'intérêt porté à cette classe de composé pour l'imagerie est motivé par leurs propriétés spectroscopiques intéressantes. Avec des rendements quantiques de luminescence quasi-quantitatifs pour certains et des coefficients d'absorption molaire très élevés, ces composés confèrent aux sondes qu'ils constituent une brillance exceptionnelle (Figure 1.2).^[36]

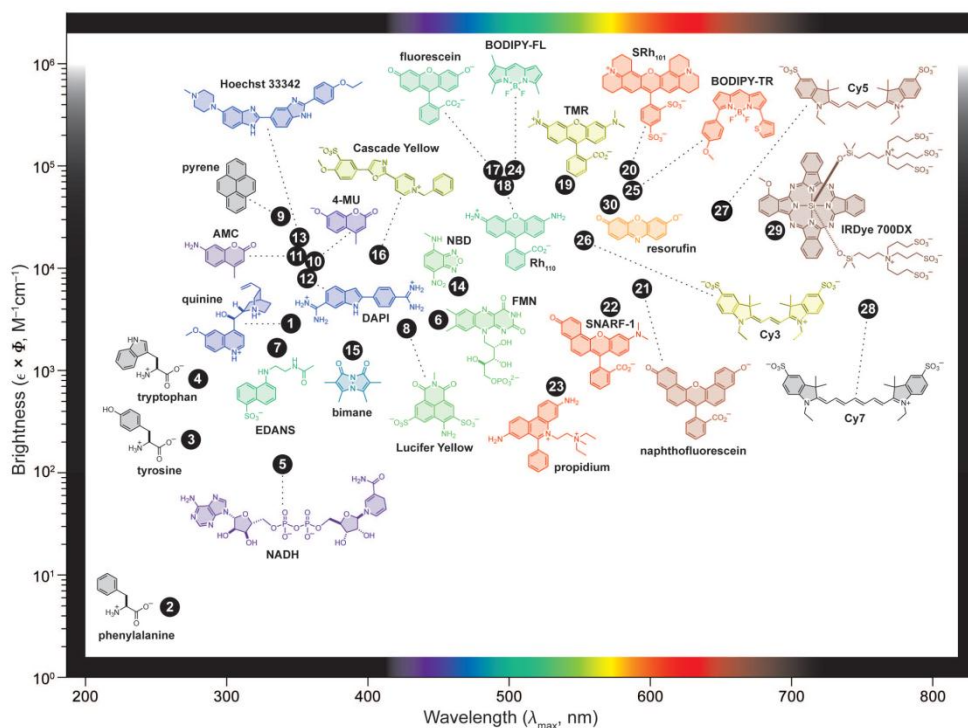


Figure 1.2 : Représentation de la brillance ($\epsilon \times \Phi$) de certains fluorophores en fonction de la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}). Par souci de clarté, seuls les fragments luminescents sont représentés pour quelques molécules.

Toutefois cette technique de détection voit son utilisation modérée par plusieurs facteurs, dont la faible sensibilité qui l'accompagne. En effet, la gamme d'absorption des fluorophores organiques usuels chevauche celle des chromophores présents dans les milieux biologiques (Tryptophane, Tyrosine, Porphyrine, Phtalocyanine). L'autofluorescence à l'origine d'un important bruit de fond du milieu d'étude accroît donc la complexité du traitement du signal.

Même si l'utilisation des chromophores émettant dans la région proche infra-rouge permet de contourner cet écueil (puisque les milieux biologiques y absorbent très peu), le photoblanchiment constitue une limitation supplémentaire associée à l'utilisation des fluorophores organiques en imagerie optique. Cette perte de luminescence à laquelle sont sujets les dérivés aromatiques affecte fortement l'efficacité des systèmes dont ils sont la base.

Grâce à un effet d'atome lourd qui va stabiliser les états excités triplets des chélatants, les complexes luminescents à base d'ions lanthanides sont beaucoup plus résistants à cette dégradation photoinduite. De plus, notamment pour certains complexes d'euprium et de terbium, les temps de vie de luminescence sont exceptionnellement longs (de l'ordre de la milliseconde) et permettent de s'affranchir de l'autofluorescence des milieux biologiques à travers l'instauration d'un délai suffisant entre l'excitation de l'échantillon et la mesure de son signal de luminescence. C'est le principe de la détection en temps résolu (Schéma 1.7).

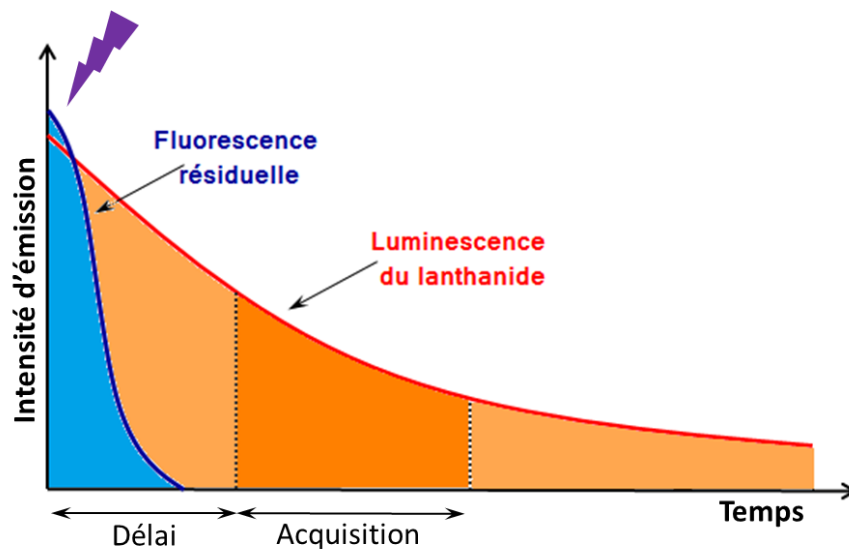


Schéma 1.7 : Représentation du principe de la luminescence en temps résolu.

Dans le cadre de l'application au diagnostic médical, les lanthanides peuvent donc être des indicateurs efficaces lors des dosages fluoroimmunologiques.

II. But principal du projet

Le but de ce projet de thèse est la synthèse de nouveaux ligands multifonctionnels pour la complexation d'ions lanthanides, dans l'optique du développement d'un diagnostic précoce et original de la maladie d'Alzheimer. Cette stratégie s'appuie sur la détection quantitative et simultanée des principaux biomarqueurs de la maladie, à travers des analyses fluoroimmunologiques en temps résolu, et grâce à un transfert d'énergie entre des complexes luminescents à base d'ions lanthanides et des nanoparticules luminescentes.

1. La maladie d'Alzheimer

Avec environ un million de personnes atteintes en France en 2008, et 200 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, la maladie d'Alzheimer décrite pour la première fois par le neurologue Alois Alzheimer en 1901 est un problème de santé majeur, de par son caractère particulièrement persistant et handicapant.

C'est une affection neurodégénérative occasionnée par des lésions du tissu cérébral indépendantes du vieillissement normal du cerveau. Ces lésions entraînent un déclin des fonctions cognitives dont la mémoire, le mouvement ou encore la décision, en un processus continu et irréversible qui conduit entre autres à la démence sénile. Une analyse comparative du cerveau d'une personne saine et celui d'une personne de même âge atteinte de la maladie d'Alzheimer montre d'ailleurs une atrophie saisissante due à la disparition de cellules qui se produit pendant l'évolution de la maladie (Schéma 1.8).

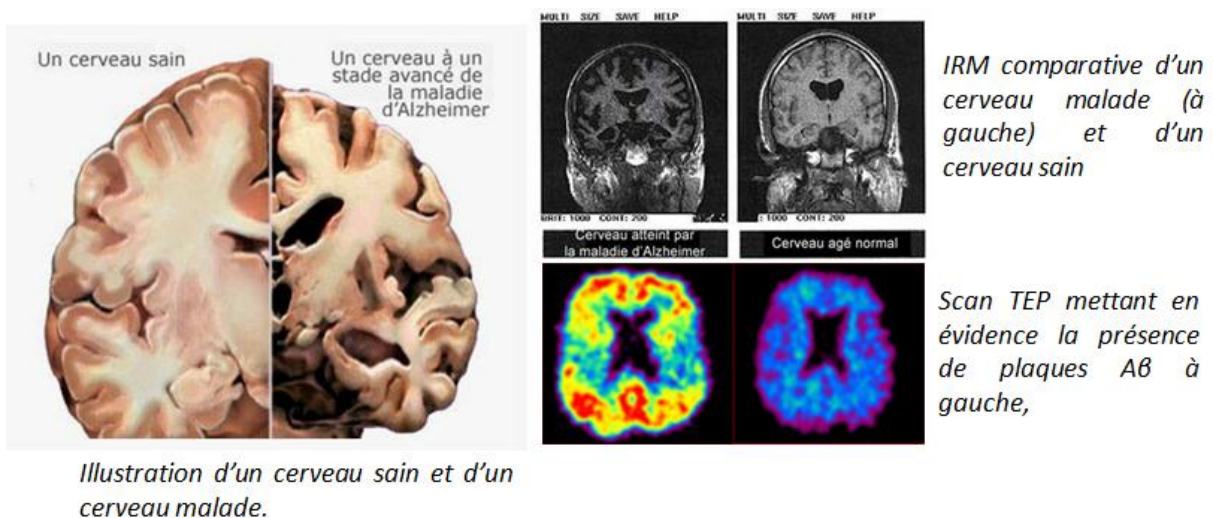


Schéma 1.8 : Représentations comparées des changements du cerveau lors du développement de la maladie d'Alzheimer.

Il existe une classification de la maladie en fonction de l'état d'avancement de la dégénérescence neuronale, allant d'un stade léger où malgré son développement la maladie passe inaperçue, à un stade sévère où les personnes atteintes perdent toute autonomie. On estime que le développement de la maladie précède l'apparition des premiers symptômes cliniques (troubles de la mémoire et du comportement) de plusieurs décennies,^[37-38] mais seulement quelques années s'écoulent en général entre le début de ces symptômes et le décès des patients.

Le caractère irréversible de la dégénérescence exclut la mise en œuvre d'un traitement étiologique. Qu'à cela ne tienne, la précocité du diagnostic est cruciale pour cette pathologie puisque grâce à une prise en charge adaptée, il est possible de retarder le processus de dégénérescence des neurones et ainsi de rallonger l'espérance de vie des personnes atteintes. Le traitement symptomatique le plus répandu consiste à administrer des agents cholinergiques dont l'action sur l'acétylcholine (neurotransmetteur) permet de réparer les déficits cognitifs.^[39]

Le pronostic univoque de la maladie d'Alzheimer est en général post-mortem et résulte d'une analyse détaillée du cerveau au microscope.^[40] Il est cependant possible d'avancer *ante-mortem* des diagnostics dont la fiabilité va dépendre des approches sur lesquelles ils reposent.

L'approche la plus historique a longtemps reposé essentiellement sur des outils d'évaluation des fonctions cognitives peu spécifiques, regroupés en une approche pluridisciplinaire qui associe des démarches neurologiques, psychiatriques, gériatriques et orthophoniques. Cette méthodologie présente de nombreux inconvénients dont une longue période d'observation du patient ou une spécificité insuffisante. En effet, si elle permet de distinguer la maladie d'Alzheimer des autres causes de démence telles qu'un dysfonctionnement de la glande thyroïde ou une dépression, elle ne permet pas d'écarter l'éventualité d'autres maladies neurodégénératives (maladie de Binswanger, maladie de Parkinson).

Une alternative à cette stratégie est la réalisation d'un examen d'imagerie du cerveau (IRM, TEP) qui permettrait d'évaluer l'état du patient et d'écarter ces autres maladies liées au cerveau et dont les symptômes sont similaires à ceux de la maladie d'Alzheimer. Cependant cet examen n'est pas toujours concluant, puisqu'à un stade léger du développement de la maladie, il n'est pas évident de mettre en évidence une diminution du volume du cortex.

L'approche biologique du diagnostic de la maladie d'Alzheimer est l'une des plus prometteuses, puisqu'elle consiste à rechercher non pas les conséquences de la maladie, mais

à en identifier directement les causes. Plusieurs protéines nocives mises en évidence chez les victimes de la maladie d'Alzheimer sont suspectées d'en être les biomarqueurs. On compte parmi elles l'apolipoprotéine E, ou encore l'alpha synucléine, qui est également impliquée dans la maladie de Parkinson.

Mais les principales entités biologiques qui sont fortement et concomitamment désignées responsables du processus de détérioration et d'extermination des cellules nerveuses qui se produit chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont les plaques amyloïdes bêta et les protéines Tau^[41] comme le suggère le schéma 1.9 qui donne une allure de l'évolution du taux de ces protéines en fonction du stade de la maladie, en la comparant avec l'intégrité neuronale.

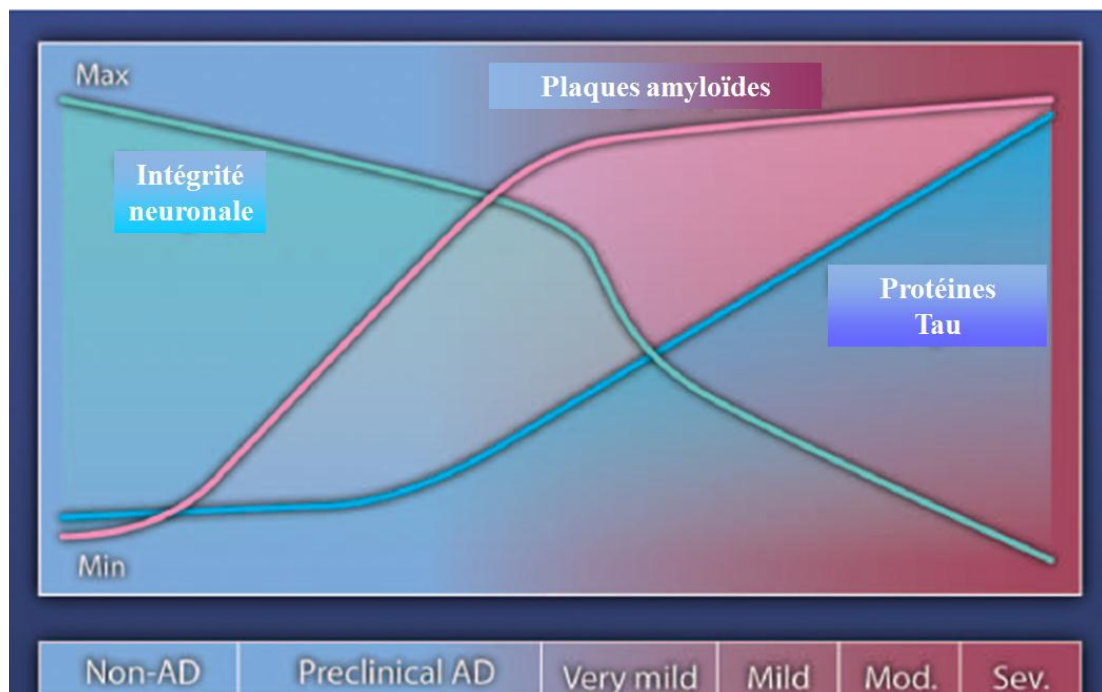


Schéma 1.9 : Allure de la variation des concentrations des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer.^[41]

1.1 Les plaques amyloïdes

L'APP (Amyloïde Precursor Protein) est une protéine transmembranaire dont le clivage par les sécrétases permet d'obtenir d'autres protéines impliquées dans le mécanisme d'activation de la transcription de l'information génétique. En fonction des sécrétases responsables du premier clivage (α , β , ou γ), plusieurs peptides de nature et de fonctions différentes peuvent être obtenus. Tandis que l'alpha-amyloïde est une protéine essentielle

dans le système cholinergique ou encore pour la plasticité neuronale,^[42] la bêta-amyloïde localisée dans le cerveau a pour effet de bloquer la transmission synaptique.

L'examen au microscope du tissu neuronal des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer montre une accumulation extracellulaire de cette protéine, plus connue sous le nom de plaque amyloïde.

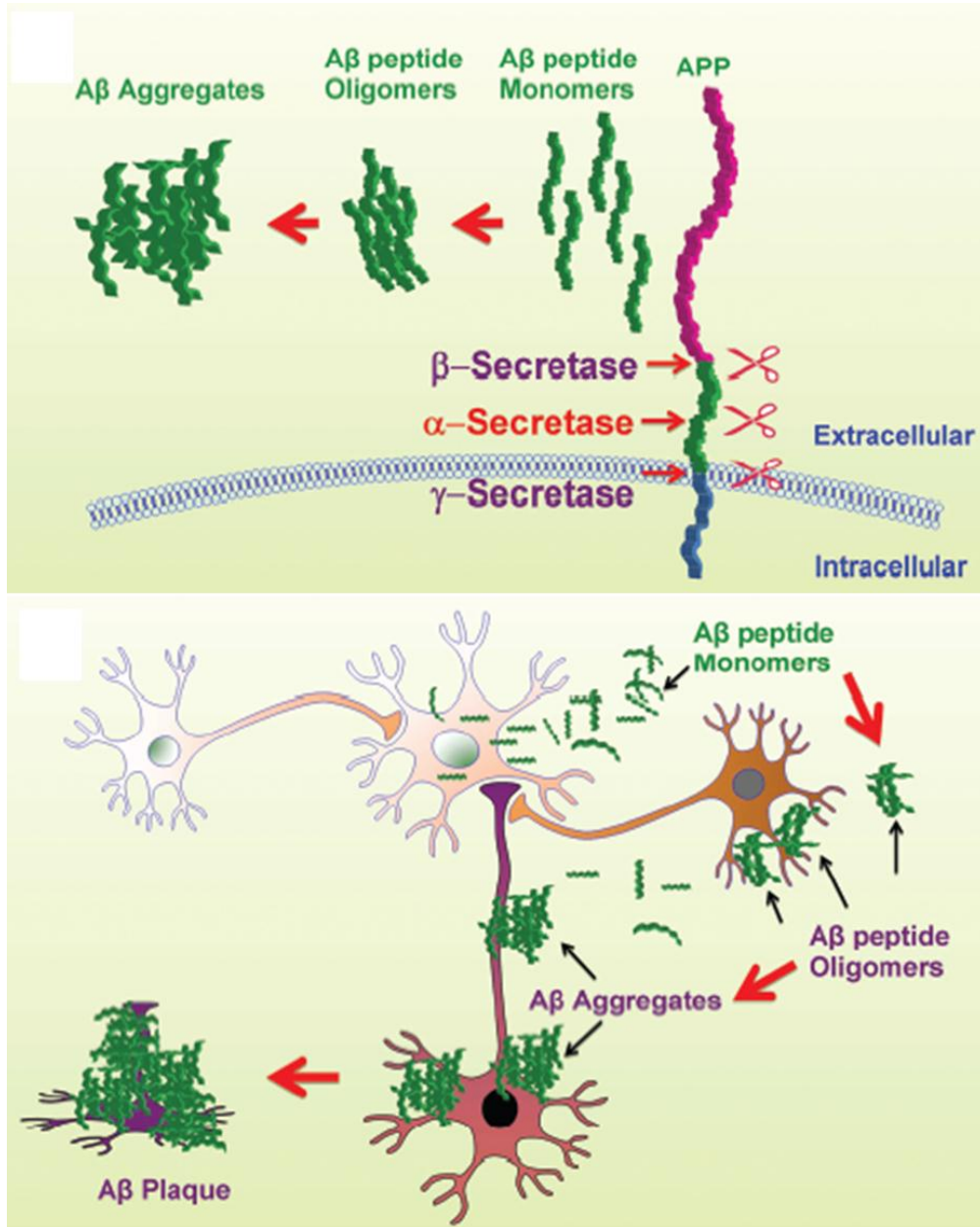


Schéma 1.10 : En haut : Représentation schématique du mécanisme d'action des sécrétases sur l'APP.
En bas : représentation schématique de la formation de plaques A β .^[42]

Il a été démontré que l'accumulation de ces protéines défectueuses dans le cerveau survient plusieurs décennies avant l'apparition des symptômes cliniques de la maladie.^[43] Ces

plaques seraient plus faciles à mettre en évidence dans la mesure où elles sont décelables à l'extérieur des cellules.

1.2 Les protéines Tau

Tandis que la présence des plaques bêta-amyloïdes est une indication extracellulaire de la maladie d'Alzheimer, le lien entre les protéines Tau et la dégénérescence neuronale réside dans la structure interne de la cellule.

Le rôle normal des protéines Tau est de garantir la stabilité de la structure tubulaire^[44-45] dans les cellules, et elles sont particulièrement abondantes dans les neurones^[46] où elles permettent d'assurer le transport des protéines des axones vers les zones synaptiques. Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, il est courant d'observer une désorganisation du système de transport de l'information et une désintégration de la structure tubulaire. Ce phénomène est imputable à une hyperphosphorylation des protéines Tau qui s'enchevêtrent alors et deviennent incapables d'assurer leur rôle structurant et stabilisant des cellules des neurones.

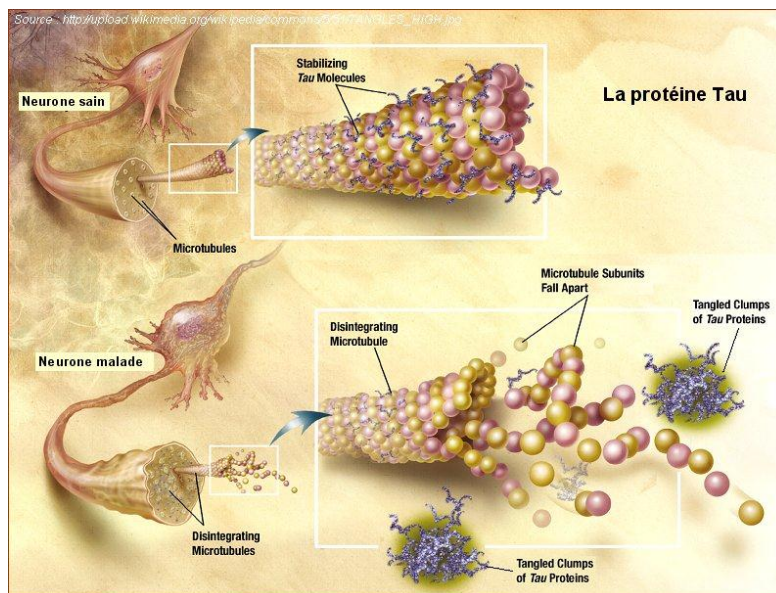


Schéma 1.11 : En haut, protéine Tau normale observée chez les patients sains. En bas, protéine Tau anormale entraînant la dégénérescence.

Avec la désignation de ces deux marqueurs biologiques probables, beaucoup de travaux ont été menés afin de développer des méthodes d'analyses et d'identification afin de réaliser un diagnostic fiable, précoce et sensible.

Une technique très répandue actuellement consiste à réaliser une ponction lombaire chez les patients afin d'analyser le liquide céphalo-rachidien, en complément des examens

d'imagerie du cerveau. C'est une substance dans laquelle baigne le cerveau et on y suspecte des variations significatives du niveau des biomarqueurs de la maladie. Cette procédure est cependant complexe et douloureuse.

Une étude récente s'est intéressée à l'étude des concentrations des protéines exprimées dans le sang chez un groupe de personnes, incluant des individus susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer (facteurs génétiques, maladies cardiovasculaires). La comparaison des résultats a fait apparaître une différence entre les concentrations de certaines protéines chez les personnes saines et chez les personnes qui ont commencé à présenter les symptômes de la maladie quatre à six années plus tard. Ce résultat a suggéré aux auteurs la présence de biomarqueurs moléculaires spécifiques de la dégénérescence dans le plasma, des années avant qu'il ne soit possible d'avancer un diagnostic clinique.

Dix-huit protéines ont été recensées par le biais de cette étude,^[47] dont cinq semblent particulièrement importantes. Et le but du projet NANOGNOSTICS est de permettre la détection simultanée de ces biomarqueurs à partir d'échantillons sanguins et à travers des analyses fluoroimmunologiques remarquablement sensibles.

2. Dosages immunologiques

Les antigènes sont des macromolécules dont la présence dans un organisme est associée à un agent pathogène. Ils sont reconnus de façon spécifique par les anticorps du système immunitaire hôte. Dans l'optique de la réalisation de diagnostics *in vitro*, des analyses immunologiques qui consistent à rechercher qualitativement et quantitativement la présence d'antigènes responsables de pathologies peuvent être réalisées. Elles reposent sur la mise en évidence d'une réponse immunitaire lors du dosage d'un antigène par un anticorps ou inversement.

Les analyses immunologiques peuvent être classées selon leur format (homogène ou hétérogène) ou selon la nature de l'interaction des anticorps avec les antigènes (compétitive ou non compétitive).

Le format le plus utilisé actuellement est celui des essais en phase hétérogène qui implique l'utilisation d'un support d'immobilisation des anticorps à l'instar de la méthode ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) qui est commercialisé sous forme de kit prêt à l'emploi, que ce soit pour des anticorps génériques ou spécifiques.^[48]

Les analyses immunologiques en phase hétérogène présentent l'avantage d'avoir un faible bruit de fond et donc une sensibilité satisfaisante. Cependant leur mise en œuvre

comprend de nombreuses étapes dans le processus de traitement (incubation, lavages) et nécessite des heures voir plusieurs jours de traitement^[49] qui en font une méthode trop longue.

La réalisation d'immunoessais dans un format homogène où toutes les espèces sont en solution est en général plus avantageuse. D'une part les analyses sont beaucoup plus rapides et plus simples à exécuter en l'absence d'étapes de lavage ou de séparation des espèces.^[50] D'autre part cette alternative nécessite une plus faible consommation de réactifs.

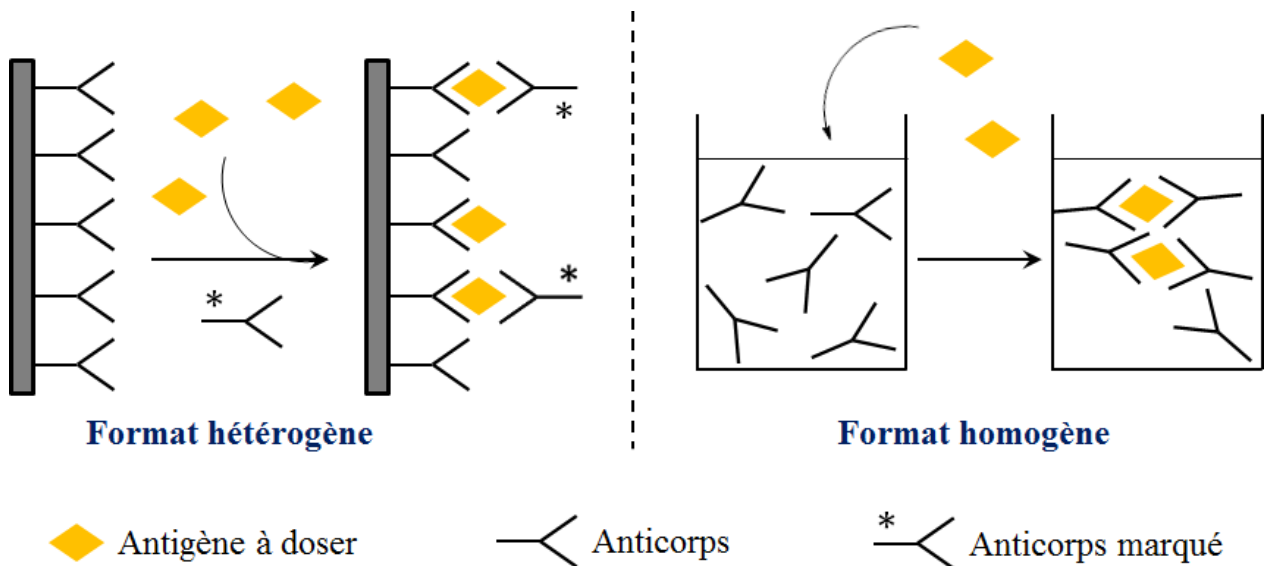


Schéma 1.12 : Exemple de dosages hétérogène (gauche) et homogène (droite).

On peut également classer les essais immunologiques selon que la formation de l'immunocomplexe soit compétitive ou non. Dans le premier cas de figure, un antigène marqué par un traceur est mis en compétition avec d'autres antigènes non-modifiés tandis que le nombre d'anticorps susceptibles d'intervenir lors du processus de reconnaissance reste fixe. C'est un mode de détermination indirect puisque la concentration de l'analyte est inversement proportionnelle à l'intensité du signal du traceur.

A contrario pour les essais non-compétitifs, au sein desquels deux anticorps forment un complexe sandwich autour d'un antigène, l'augmentation du signal du traceur traduit une augmentation de la proportion d'analyte et sa concentration est alors déterminée de façon directe.

Ce système présente l'avantage d'être plus sensible mais également plus sélectif que son analogue compétitif.

Les protéines sont en général constituées d'acides aminés peu luminescents, et donc difficile à suivre. Leur détection peut être facilitée par l'introduction d'émetteurs luminescents

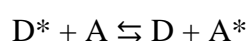
ou radioactifs. Nous visons ici le développement d'une technique basée sur un transfert d'énergie entre des traceurs associés aux anticorps et aux antigènes lors de la formation d'un immunocomplexe.

En travaillant à l'élaboration de traceurs à base d'ions lanthanides, nous pensons pouvoir tirer profit de leurs propriétés spectroscopiques pour accroître la sensibilité des analyses au travers de mesures de luminescence en temps résolu.

3. Transfert d'énergie de type FRET

L'acronyme anglais FRET (Förster Resonance Energy Transfert) désigne un transfert d'énergie non-radiatif entre plusieurs molécules dont un donneur d'énergie et un accepteur d'énergie.

Lorsque deux molécules aux propriétés spectroscopiques différentes (longueurs d'onde d'absorption ou coefficients d'absorption molaire) sont à proximité et que le mélange est soumis à une excitation appropriée, elles absorbent de l'énergie. Les processus de désexcitations probables à partir des états excités sont la fluorescence ou la phosphorescence lors du retour à l'état fondamental. Une autre voie de désexcitation est un transfert d'énergie entre les deux composés. Ce transfert d'énergie se fait généralement du composé dont l'énergie de l'état excité est la plus élevée, il s'agit donc du donneur (D), vers la seconde entité qui devient accepteur d'énergie (A).



Le phénomène d'auto-désexcitation observé lors de l'excitation de certains chromophores organiques^[51] en solutions concentrées correspond justement à un transfert d'énergie où le donneur et l'accepteur d'énergie sont de même nature.

Dans ce cas, le processus est réversible. Par contre, dans des systèmes faisant intervenir des entités dont les niveaux d'énergie sont différents, le transfert d'énergie qui devient irréversible se traduit par une extinction de la luminescence du donneur.

3.1 Mécanisme du transfert d'énergie

Le mécanisme de cet échange correspond à une série d'interactions de type dipôle-dipôle entre l'état excité du donneur et l'état fondamental de l'accepteur tel que décrit par le physicien Theodore Förster^[52] (schéma 1.13).

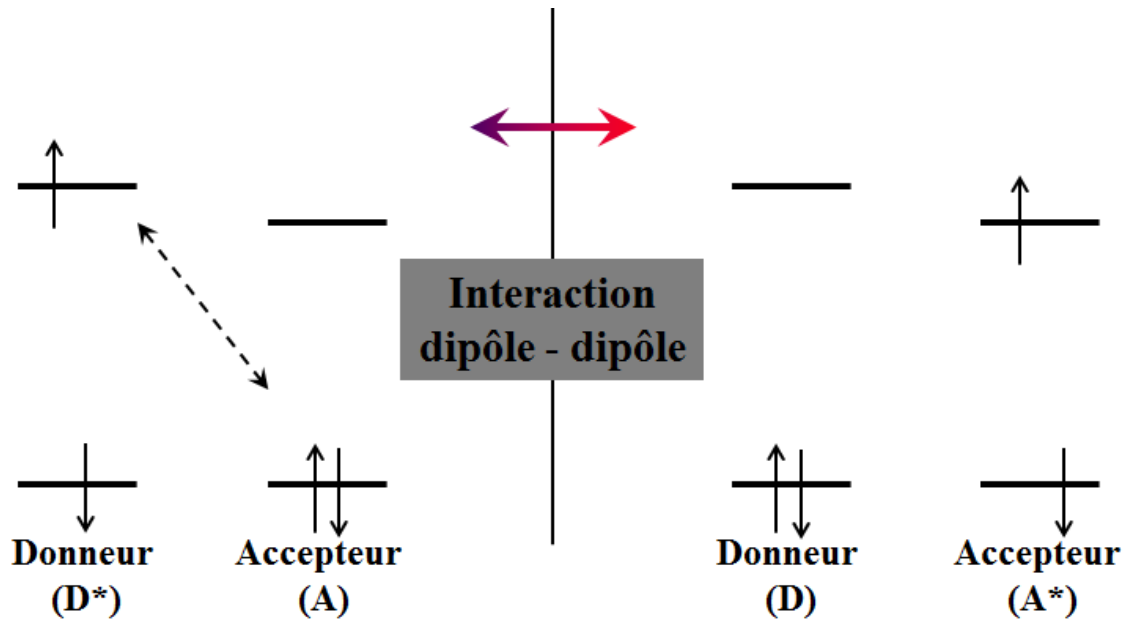


Schéma 1.13 : Représentation schématique du processus de FRET.

Contrairement à ce que stipule la théorie de Dexter sur le transfert d'énergie, il ne s'agit pas d'un échange d'électron entre les deux molécules, mais d'une interaction qui ne nécessite pas forcément que les deux molécules soient en contact. La distance spatiale qui les sépare est un paramètre déterminant pour la vitesse et l'efficacité du transfert.

3.2 Vitesse du transfert d'énergie

La vitesse du transfert d'énergie (k_T) décroît rapidement avec l'augmentation de la distance du fait d'une dépendance en R^{-6} comme le montre l'équation 1.2.

$$k_T = \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \Phi_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV} \tau_D R^6} \quad [1.2]$$

Les termes n , τ_D , κ^2 , Φ_D , et J dans cette équation représentent respectivement l'indice de réfraction du milieu, le temps de vie de luminescence du donneur d'énergie, le facteur d'orientation des dipôles, le rendement quantique du donneur et l'intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

- L'indice de réfraction du milieu (n):

La théorie de Förster sur le transfert d'énergie le décrit comme une interaction entre dipôles électriques. La dépendance du champ électrique produit par un oscillateur et de la

longueur d'onde d'une radiation à l'indice de réfraction permet à Förster de l'introduire dans l'équation. Lors des expériences de FRET, le milieu n'est pas toujours isotrope, ainsi la valeur de n est en général une moyenne comprise entre 1,33 et 1,6.^[53-54]

- Le temps de vie de luminescence du donneur (τ_D):

Il est mesuré en l'absence de l'accepteur d'énergie.

- Le facteur d'orientation (κ^2):

Il dépend de l'orientation relative des moments électriques associés à l'excitation du donneur et de l'accepteur.

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad [1.3]$$

Dans cette équation, θ_T représente l'angle entre les moments de transition électriques du donneur et de l'accepteur d'énergie, tandis que θ_A et θ_D sont les angles formés par chacun des dipôles avec la ligne qui relie leurs deux centres (voir schéma 1.14).

La valeur maximale de κ^2 est atteinte lorsque les vecteurs des deux moments de transitions sont orientés selon la même direction ($\kappa^2 = 4$). La valeur minimale quant à elle correspond à deux directions opposées ($\kappa^2 = 0$).

Lorsque les chromophores sont de forme sphérique (ce qui est le cas pour les lanthanides), ils peuvent diffuser très rapidement et adopter toutes les orientations possibles. Le terme κ^2 peut alors être remplacé par 2/3.

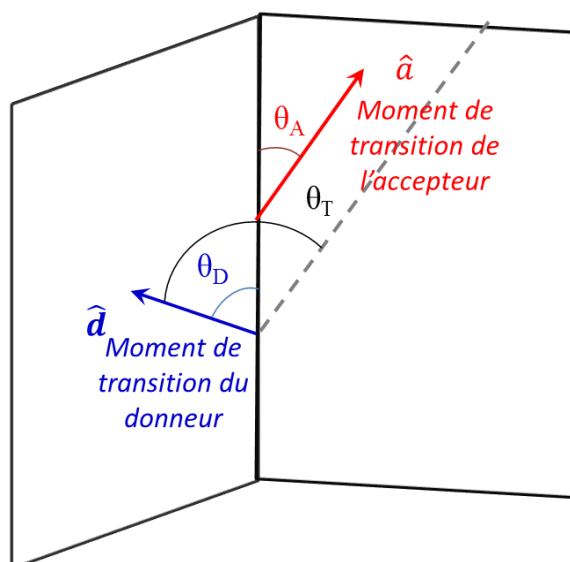


Schéma 1.14 : Illustration des angles θ_A , θ_D et θ_T .

- Le rendement quantique d'émission du donneur (Φ_D) :

Le rendement quantique pour un donneur donné dépend de l'environnement et donc du milieu dans lequel s'effectue les expériences de FRET. Les valeurs élevées de Φ_D améliorent l'efficacité du transfert d'énergie, tout comme les temps de vie de luminescence élevés pour les donneurs. Grâce à leur temps de vie élevés et leurs bons rendements quantiques, les complexes de lanthanides, notamment ceux à base de terbium apparaissent comme d'excellents donneurs d'énergie.

- L'intégrale de recouvrement (J) :

Le mécanisme du transfert d'énergie selon le modèle Förster consiste en une interaction dipôle-dipôle et n'implique pas de recouvrement des orbitales du donneur et de l'accepteur d'énergie. Il est néanmoins nécessaire d'avoir un chevauchement important de leurs spectres d'émission et d'absorption respectifs.

Un système faisant intervenir deux colorants organiques (Alexa488 et Cy5) est pris en exemple (figure 1.3) pour illustrer cette intégrale de recouvrement.

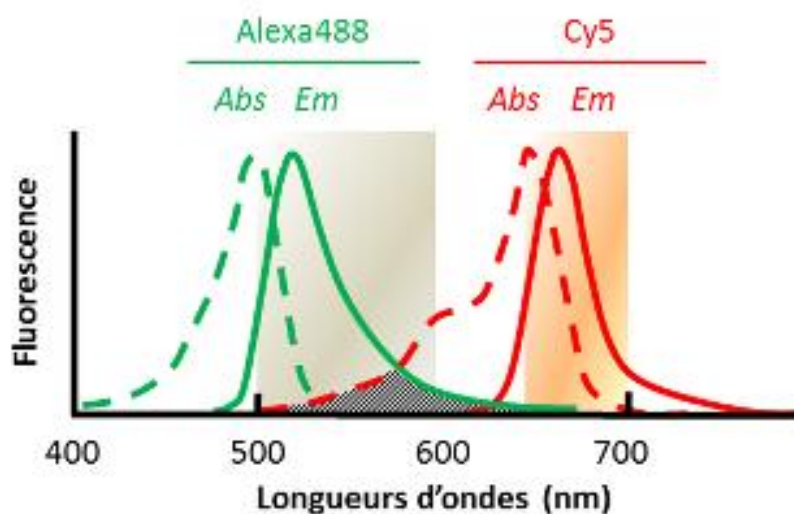


Figure 1.3 : Spectres d'excitation et d'émission des colorants Alexa 488 et Cy5 normalisés.

Pour un couple donneur-accepteur donné, cette aire peut être déterminée tel qu'exprimé à l'équation 1.4.

$$J = \frac{\int F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^{-4}d\lambda}{\int F_D(\lambda)d\lambda} \quad [1.4]$$

Le terme $F_D(\lambda)$ représente l'intensité de luminescence normalisée du donneur d'énergie à la longueur d'onde λ . Son augmentation entraîne une augmentation de la valeur de l'intégrale et donc de la vitesse du transfert d'énergie.

L'équation 1.4 fait également intervenir le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur (ϵ_A) soit sa faculté à absorber les photons. Il dépend lui aussi de la longueur d'onde.

Le rayon de Förster R_0 est également un paramètre important lorsqu'on décrit un transfert d'énergie de type Förster. C'est la distance pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50 % et sa détermination expérimentale pour un système donné fait intervenir l'intégrale de recouvrement des spectres, mais aussi le rendement quantique de luminescence du donneur Φ_D .

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D J}{128\pi^5 n^4 N_{AV}} \quad [1.5]$$

3.3 Efficacité du transfert d'énergie

Le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur d'énergie est en compétition avec la propre fluorescence du donneur, mais aussi avec d'autres voies de désactivation radiatives ou non. Les vitesses associées à ces phénomènes sont respectivement k_F et k_D . Elles permettent de calculer l'efficacité du transfert :

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_F + k_D} \quad [1.6]$$

Le traitement théorique du modèle de Förster permet également de dériver une deuxième formule de calcul pour l'efficacité du transfert en introduisant le rayon de Förster R_0 .

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad [1.7]$$

Dans l'optique de la réalisation de dosages fluoroimmunologiques, nous nous intéressons au marquage de plusieurs anticorps distincts mais de même spécificité par un couple de traceurs luminescents donneur/accepteur.

En absence de l'analyte, l'excitation du donneur d'énergie ne conduit qu'à la luminescence de ce dernier. Par contre, lorsque l'antigène est présent, il peut y avoir

formation d'un complexe sandwich, ce qui aura pour conséquence de rapprocher dans l'espace les deux différents traceurs (Schéma 1.15).

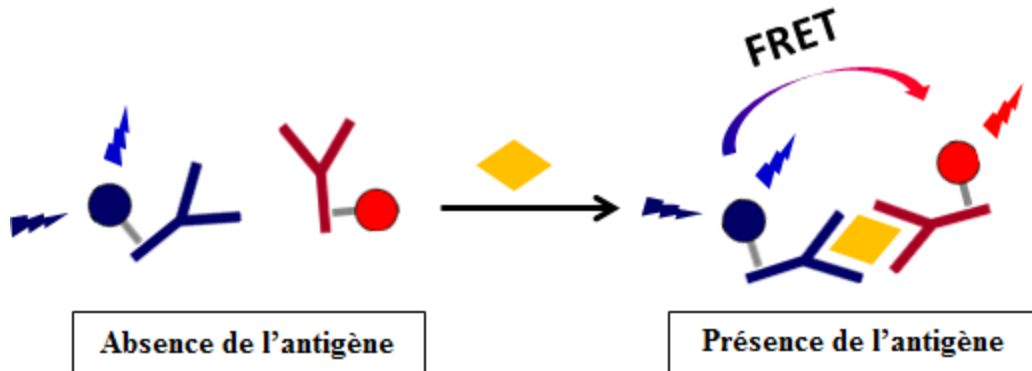


Schéma 1.15 : Formation d'un immunocomplexe et transfert d'énergie entre les traceurs.

Dans cette configuration, l'excitation du donneur conduit à la luminescence de l'accepteur consécutive au transfert d'énergie. Selon l'efficacité du transfert, on observe une diminution de l'intensité d'émission du donneur au profit de celle de l'accepteur, mais aussi des variations des temps de vie de luminescence des deux entités.

Une simplification de la compréhension de ce qu'est l'efficacité du transfert d'énergie permet d'ailleurs d'établir des équations de calcul en fonction de la valeur de ces trois paramètres pour le donneur en absence et en présence (DA) de son accepteur.

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 1 - \frac{\Phi_{DA}}{\Phi_D} \quad [1.6]$$

3.4 Traitement du signal

Lorsque les deux entités utilisées sont fluorescentes, on peut mesurer les propriétés de luminescence du donneur en présence et en absence d'accepteur d'énergie, ou plutôt celles de l'accepteur d'énergie, et ces deux stratégies devraient conduire au même résultat.

Cependant de nombreuses erreurs expérimentales peuvent entacher les mesures, notamment lorsque le couple donneur/accepteur est mal choisi.

À titre d'exemple considérons un système déjà décrits dans la littérature^[55] faisant intervenir des colorants organiques classiques que sont la rhodamine rouge et le DsRed2. Ce sont des hétérocycles aromatiques peu coûteux et à fort coefficients d'absorption molaire. Leurs spectres d'absorption sont très similaires, de même que leurs spectres d'émission, puisque les déplacements de Stokes ne valent que quelques nanomètres (figure 1.4). Lorsqu'on superpose leurs spectres normalisés, on observe donc un excellent recouvrement

spectral, mais également une importante interférence. Dans cette configuration la mise en évidence ou la caractérisation d'un transfert d'énergie s'avère très complexe.

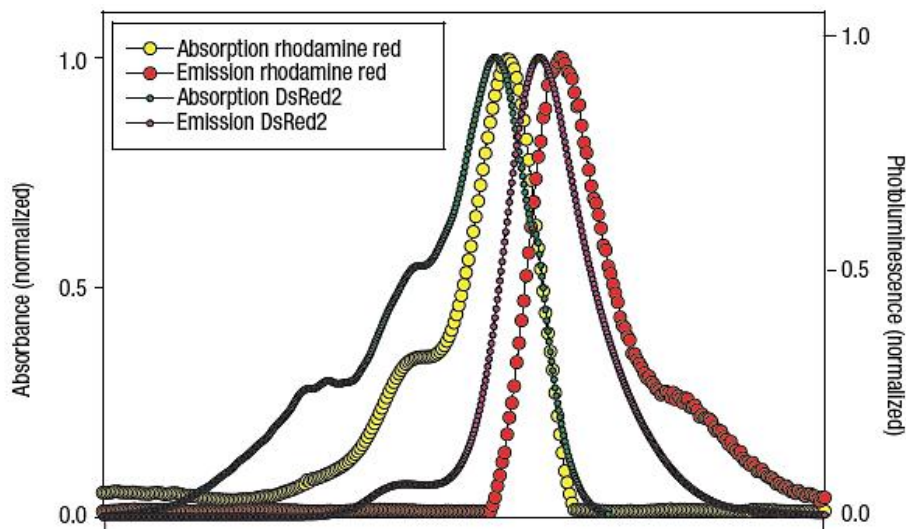


Figure 1.4 : Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine rouge et de DsRed2, deux colorants organiques.

En effet, en se basant sur l'équation 1.6, le calcul de l'efficacité du transfert d'énergie pourrait se faire en mesurant uniquement la luminescence du donneur seul, puis sa luminescence en présence de l'accepteur. Cependant l'allure des spectres des deux composés montre qu'il y aura toujours une contribution de l'accepteur d'énergie au signal enregistré après excitation du donneur, même si l'on ne s'intéresse qu'au maximum d'émission de ce dernier, et vice-versa.

Il est donc souhaitable pour les expériences de FRET que l'émission de l'accepteur d'énergie se situe dans une région où celle du donneur n'est pas détectée. Ce critère peut être satisfait par l'utilisation de complexes luminescents à base d'ions lanthanides.

Leurs spectres d'émission finement résolus présentent des plages disponibles pour l'observation de la luminescence d'accepteurs d'énergie avec un minimum d'interférences. L'euprium et le terbium sont particulièrement intéressants car en plus de leurs bandes d'émissions bien séparées, leurs raies d'émission s'étendent sur une grande partie du spectre visible (Figure 1.5). Ils peuvent donc permettre de sensibiliser un large éventail d'accepteurs d'énergie.

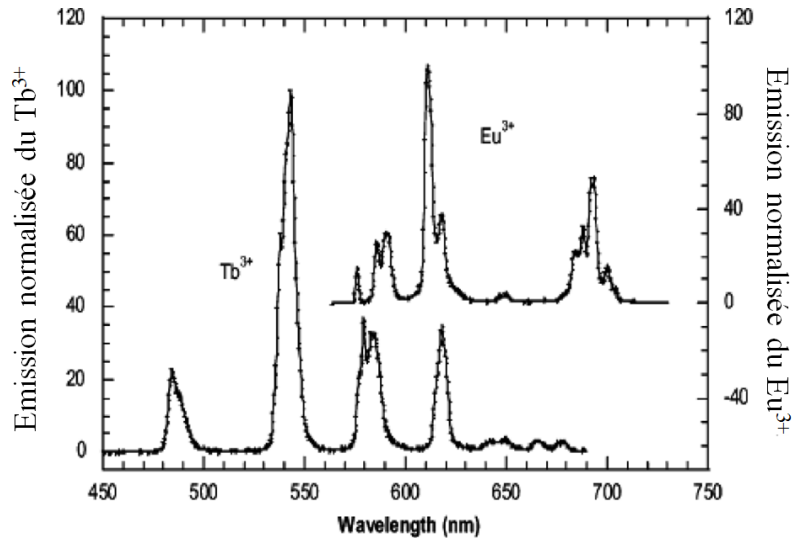


Figure 1.5 : Raies d'émission du terbium et de l'euporium.

L'efficacité du transfert d'énergie dépend également à travers l'intégrale de recouvrement des spectres de la capacité du donneur à absorber de l'énergie (équation 1.4). À cet égard, les nanocristaux semi-conducteurs luminescents dont les coefficients d'absorption moléculaires sont élevés apparaissent comme des accepteurs d'énergie de choix.^[56]

4. Les nanocristaux semi-conducteurs

Encore appelés Quantum Dots (QDs), les nanocristaux semi-conducteurs sont des nanoparticules de formes plus ou moins sphériques et de taille nanométrique (de 1 à 12 nm de diamètre)^[57] contenant un faible nombre d'atomes.^[57] Ils sont constitués d'un cœur inorganique autour duquel est rajoutée une couche protectrice qui peut également permettre de les stabiliser^[58] ou de les fonctionnaliser^[59] (schéma 1.16).

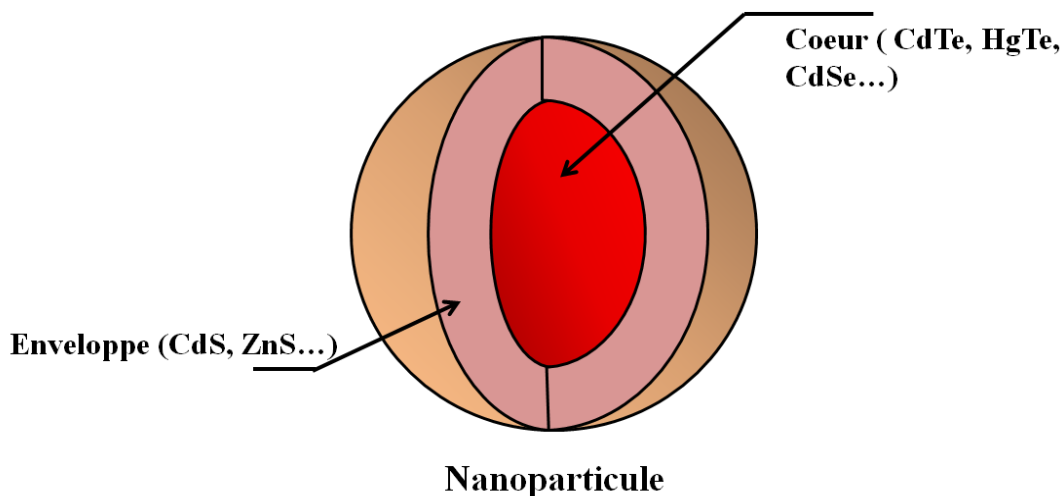


Schéma 1.16 : Représentation schématique des Quantum Dots.

C'est cependant le noyau inorganique qui abrite l'ensemble des propriétés de luminescence exceptionnelles de ces objets moléculaires. Ce cœur est obtenu après une étape de nucléation des substrats et la taille de la particule va dépendre du temps de réaction pendant lequel on assiste à une croissance du cristal.

Au sein de solides classiques qu'ils soient isolants ou conducteurs, les électrons se répartissent au sein de deux bandes dont une pour les énergies permises (bande de valence) et l'autre pour les énergies interdites (bandes de conduction). En ce qui concerne les nanocristaux qui possèdent un nombre fini d'atomes, on observe l'apparition de niveaux d'énergies discrets et séparés, du fait du confinement quantique.

Lorsqu'il est soumis à une photoexcitation, un électron de la HOMO peut être promu dans la LUMO créant un trou dans la bande de valence. Le retour à l'état fondamental se fait lors de la recombinaison trou-électron et il y a émission d'un photon.

La différence entre la bande de valence et la bande de conduction varie en fonction de la taille des particules (schéma 1.17). Ainsi le contrôle du diamètre des nanocristaux permet d'avoir accès à des composés dont la luminescence s'étend sur une large gamme spectrale.

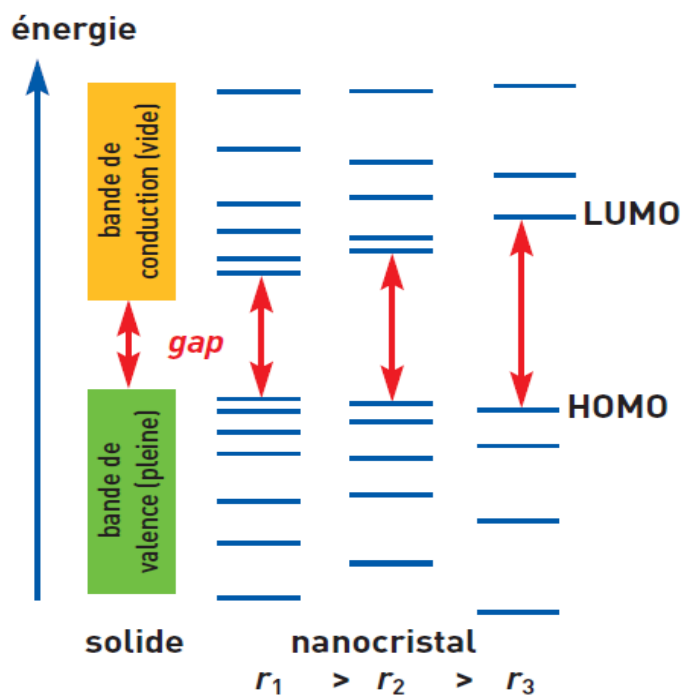


Schéma 1.17 : Représentation des niveaux d'énergie discrets des nanocristaux semi-conducteurs.

Cette variation des propriétés de luminescence des nanocristaux en fonction de leur taille est très avantageuse parce qu'elle permet d'envisager la détection simultanée de plusieurs interactions (marqueurs) pour le diagnostic. Il en résulte un gain important de temps

et de sensibilité. Ce qui pourrait être exploité pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer à travers la détection simultanée de plusieurs marqueurs biologiques.

Le principe repose sur la détection de plusieurs analytes à travers la mise en évidence de transferts d'énergie de type FRET d'un donneur d'énergie vers plusieurs accepteurs. Ce système a été éprouvé avec succès lors d'une expérience de FRET avec des complexes luminescents à base de terbium comme donneurs d'énergie et des nanocristaux de CdTe et de CdSe de tailles et donc des propriétés de luminescence différentes.^[60]

Cette étude a été menée en phase homogène et la forte interaction non covalente entre la streptavidine et la biotine a été exploitée afin de garantir le rapprochement des donneurs et des accepteurs d'énergie en solution. Les complexes de terbium ont ainsi été greffés sur la streptavidine, tandis que des dérivés biotinylés ont été rajoutés à la surface des différents nanocristaux (schéma 1.18).

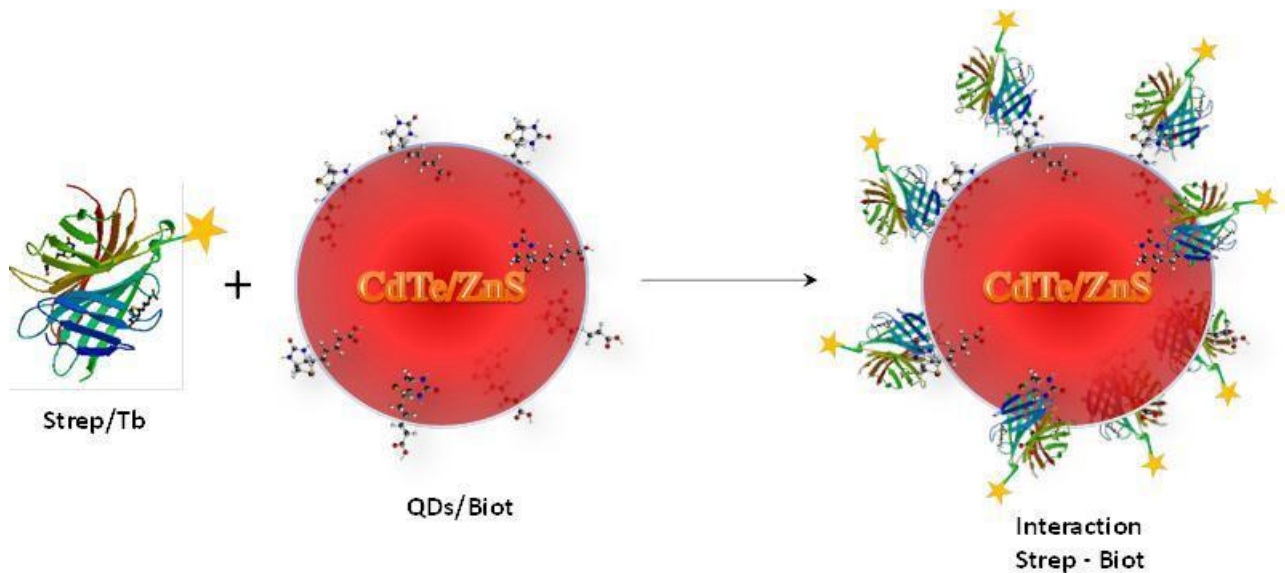


Schéma 1.18 : Reconnaissance entre des nanocristaux biotinylés et des complexes luminescents greffés à la streptavidine.

Le choix de nanocristaux émettant respectivement à 529, 565, 604, 653 et 712 nm permet d'une part d'assurer un bon recouvrement de leurs spectres d'absorption avec le spectre d'émission caractéristique des complexes de terbium, mais également de minimiser les interférences entre leurs bandes d'émission et celles du terbium (Figure 1.6).

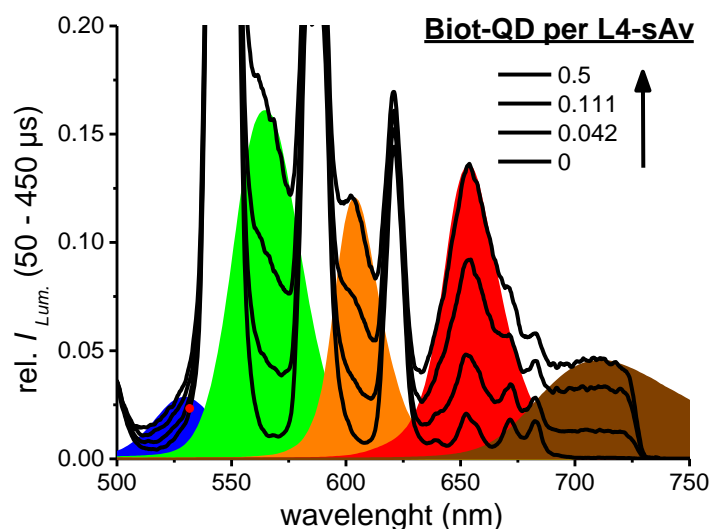


Figure 1.6 : Représentations des spectres d'émission d'un complexe de terbium et de plusieurs nanocristaux de tailles différentes.

Tandis que les complexes de terbium ont des temps de vie de luminescence de l'ordre de la milliseconde, ceux des nanocristaux sont tous beaucoup plus faibles (nanoseconde). Néanmoins lorsque des quantités croissantes de ces nanocristaux biotynylés sont rajoutées à une solution contenant les complexes de terbium, on observe lors de l'excitation des derniers non seulement une augmentation de l'intensité de luminescence des nanoparticules, mais également une augmentation de leurs temps de vie que l'on pourrait attribuer à un transfert d'énergie.

D'autres travaux ont été menés dans ce sens^[61-63] et l'effectivité du transfert d'énergie pour des couples lanthanide/QDs avec des complexes luminescents de terbium et d'euporium comme donneurs d'énergie et des nanocristaux semiconducteurs de tailles variées comme accepteurs d'énergie a été confirmée.

À la suite de ces résultats prometteurs, notre objectif tout au long de ces travaux a été de développer des ligands pour l'obtention de complexes d'ions lanthanides dont l'utilisation dans ces expériences et leur application au diagnostic pourraient donner des résultats optimisés en terme d'efficacité du transfert d'énergie et de sensibilité lors des dosages d'antigènes. Un intérêt particulier est porté à la luminescence du terbium et de l'euporium. Ces deux métaux du milieu de la série qui émettent dans le visible peuvent avoir des rendements quantiques de luminescence satisfaisants et des temps de vie exceptionnellement longs, même comparés aux autres ions lanthanides. Ces caractéristiques sont particulièrement avantageuses pour l'optimisation du FRET (équations 1.2 et 1.4).

La conception des ligands implique quant à elle la prise en compte du critère de photosensibilisation des ions d'intérêt, mais également celui de la stabilité de leurs complexes en milieu physiologique, et de l'aptitude à se lier spécifiquement à des cibles biologiques.

Ainsi la première partie du projet a consisté en la synthèse de ligands acycliques multifonctionnels et en la synthèse puis la caractérisation de leurs complexes. Afin d'optimiser à la fois les propriétés de coordination et la luminescence des complexes, de nouvelles familles de ligands ont été synthétisées en opérant des modifications structurales sur l'entité chromophorique de base.

Pour l'ensemble de ces composés originaux, seront présentés dans ce manuscrit la synthèse organique, les procédés de complexation ainsi que les caractérisations physico-chimiques. Quelques complexes ont ensuite pu être utilisés soit pour le marquage de matériel biologique, soit au cours d'expériences de FRET en présence d'accepteurs d'énergie.

III. Bibliographie

- [1] Cotton, F. A.; Wilkinson, G. In *Advanced Inorganic Chemistry*; Fifth ed.; John Wiley and Sons: New York, 1988.
- [2] Jørgensen, C. K. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *139*, 1.
- [3] Favre-Réguillon, A.; Sorin, A.; Pellet-Rostaing, S.; Bernier, G.; Lemaire, M. C. R. *Chimie* **2007**, *10*, 994.
- [4] Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R. *Trends Anal. Chem.* **2012**, *31*, 144.
- [5] Binnemans, K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4283.
- [6] Bünzli, J.-C. G. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *39*, 53.
- [7] Buchler, J. W.; De Cian, A.; Fischer, J.; Kihn-Botulinski, M.; Paulus, H.; Weiss, R. J. *Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3652.
- [8] Garcia, J.; Allen, M. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, n/a.
- [9] Josse, M.; Dubois, M.; El-Ghozzi, M.; Avignat, D. *J. All. Comp.* **2004**, *374*, 213.
- [10] Du, Z.; Zhang, Y.; Yao, Y.; Shen, Q. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7639.
- [11] Schriver, D. F.; Atkins, P. W. In *Inorganic Chemistry*; Third ed.; Oxford University Press: New York, 1999.
- [12] Stein, G.; E., W. *J. Chem. Phys* **1975**, *62*, 208.
- [13] Yavari, A. R.; Weiss, F. *Europhys. Lett.* **1987**, *4*, 1315.
- [14] Bunzli, J.-C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048.
- [15] Comby, S.; Bünzli, J.-C. G. In *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*; Elsevier: 2007; Vol. Volume 37.
- [16] Latva, M.; Takalo, H.; Mikkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75*, 149.
- [17] Kobayashi, S.; Nagayama, S.; Busujima, T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9221.
- [18] Kobayashi, S. In *Lanthanides: Chemistry and Use in Organic Synthesis*; Springer-Verlag: Berlin, 1999.
- [19] Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3533.
- [20] Lehn, J.-M. In *Supramolecular Chemistry : Concepts and Perspectives*; VCH: Weinheim, 1995.
- [21] Bednarski, M.; Maring, C.; Danishefsky, S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3451.
- [22] Namy, J. L.; Girard, P.; Kagan, H. B. *Nouv. J. Chim.* **1977**, *1*, 5.
- [23] Girard, P.; Namy, J. L.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2693.

- [24] Kobayashi, S. *Chem. Lett.* **1991**, 20, 2187.
- [25] Kobayashi, S.; Hachiya, I. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1625.
- [26] Kobayashi, S.; Hachiya, I. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3590.
- [27] Kobayashi, S. *Synlett* **1994**, 1994, 689.
- [28] Kobayashi, S. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1999, 15.
- [29] Evans, D. A.; Nelson, S. G.; Gagne, M. R.; Muci, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9800.
- [30] Giardello, M. A.; Conticello, V. P.; Brard, L.; Gagne, M. R.; Marks, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10241.
- [31] Giardello, M. A.; Yamamoto, Y.; Brard, L.; Marks, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3276.
- [32] Uotsu, K.; Sasai, H.; Shibasaki, M. *Tetrahedron-Assymetr.* **1995**, 6, 71.
- [33] Thibon, A.; Pierre, V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 107.
- [34] Friebolin, H. In *Basic One-and-Two-Dimensional NMR Spectroscopy*; VCH: Berlin, 1991.
- [35] Luckey, T. D.; Venugopal, B. In *Metal Toxicity in Mammals*; Plenum: New York, 1977; Vol. 1.
- [36] Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142.
- [37] Perrin, R. J.; Fagan, A. M.; Holtzman, D. M. *Nature* **2009**, 461, 916.
- [38] Jack, C. R.; Knopman, D. S.; Jagust, W. J.; Shaw, L. M.; Aisen, P. S.; Weiner, M. W.; Petersen, R. C.; Trojanowski, J. Q. *Lancet Neurol.* **2010**, 9, 119.
- [39] Daniel, V.; Daniel, K. V.; Kuwar, P. S.; Singh, N. In *Advances In The Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease : A Review*, 2009.
- [40] Mucke, L. *Nature* **2009**, 461, 895.
- [41] Jucker, M.; Walker, L. C. *Ann. Neurol.* **2011**, 70, 532.
- [42] Petsko, G. A.; Ringe, D.; Sanlaville, C. In *Structure et Fonction des Protéines*; De Boeck Université: Bruxelles, 2004.
- [43] Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. M. *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, 77sr1.
- [44] Drechsel, D. N.; Hyman, A. A.; Cobb, M. H.; Kirschner, M. W. *Mol. Biol. Cell* **1992**, 3, 1141.
- [45] Gustke, N.; Trinczek, B.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. *Biochem.* **1994**, 33, 9511.
- [46] Binder, L. I.; Frankfurter, A.; Rebhun, L. I. *J. Cell. Biol.* **1985**, 101, 1371.

- [47] Ray, S.; Britschgi, M.; Herbert, C.; Takeda-Uchimura, Y.; Boxer, A.; Blennow, K.; Friedman, L. F.; Galasko, D. R.; Jutel, M.; Karydas, A.; Kaye, J. A.; Leszek, J.; Miller, B. L.; Minthon, L.; Quinn, J. F.; Rabinovici, G. D.; Robinson, W. H.; Sabbagh, M. N.; So, Y. T.; Sparks, D. L.; Tabaton, M.; Tinklenberg, J.; Yesavage, J. A.; Tibshirani, R.; Wyss-Coray, T. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1359.
- [48] Zhang, H.; Wang, S.; Fang, G. *J. Immunol. Methods* **2011**, *368*, 1.
- [49] Lottspeich, F.; Zorbas, H. In *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag: Berlin 1998.
- [50] Wild, D. In *The Immunoassay Handbook*; Second ed.; Nature Pub. Group: London, 2001.
- [51] Turro, N. J. In *Modern Molecular Photochemistry*; Benjamin Cumings Ca Ed: California, 1978.
- [52] Förster, T. *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55.
- [53] Steinberg, I. Z. *Ann. Rev. Biochem.* **1971**, *40*, 83.
- [54] Moog, R. S.; Kuki, A.; Fayer, M. D.; Boxer, S. G. *Biochem.* **1984**, *23*, 1564.
- [55] Van der Meer, B. W.; Coker, G.; Chen, S. Y. S. In *Resonance Energy Transfer: Theory and Data*; VCH: Cambridge, 1994.
- [56] Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435.
- [57] Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545.
- [58] Han, M.; Gao, X.; Su, J. Z.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631.
- [59] Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* **1998**, *281*, 2013.
- [60] Geißler, D.; Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. F.; Butlin, N. G.; Löhmansröben, H.-G.; Hildebrandt, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1396.
- [61] Härmä, H.; Soukka, T.; Shavel, A.; Gaponik, N.; Weller, H. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *604*, 177.
- [62] Hildebrandt, N.; Charbonnière, L. J.; Beck, M.; Ziessel, R. F.; Löhmansröben, H.-G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7612.
- [63] Charbonnière, L. J.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R. F.; Löhmansröben, H.-G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12800.

CHAPITRE II :

Etude de ligands multifonctionnels

Sommaire

| | |
|---|------------|
| I. Étude du ligand modèle L_p et de ses complexes..... | 54 |
| 1. Synthèse du ligand..... | 54 |
| 1.1 Synthèse de la poche de sensibilisation..... | 54 |
| 1.2 Insertion des éléments de coordination..... | 56 |
| 2. Caractérisation du ligand L_p par spectrométrie RMN..... | 58 |
| 3. Caractérisation spectroscopique du ligand L_p..... | 60 |
| 3.1 Principes généraux..... | 60 |
| 3.1.1 Spectroscopie d'absorption..... | 60 |
| 3.1.2 Spectroscopie d'émission..... | 60 |
| 3.2 Etude du ligand L_p | 64 |
| 3.2.1 Titration UV-Vis du ligand L_p par une solution de Eu^{3+} | 64 |
| 3.2.2 Titration UV-Vis du ligand L_p par une solution de Tb^{3+} | 66 |
| 3.2.3 Titration en émission du ligand par une solution de Tb^{3+} | 69 |
| 3.3 Etude des complexes d'euporium et de terbium..... | 70 |
| 3.3.1 Etude des propriétés spectroscopiques des complexes..... | 72 |
| 3.3.2 Etude des propriétés thermodynamiques du ligand et des complexes..... | 77 |
| II. Étude des ligands phosphonates fonctionnalisés..... | 81 |
| 1. Insertion d'une chaîne latérale..... | 81 |
| 1.1 Synthèse du ligand L_1 | 82 |
| 1.2 Synthèse du ligand L_2 | 87 |
| 2. Activation des groupements fonctionnels..... | 90 |
| 2.1 Activation du ligand L_1 | 90 |
| 2.1.1 Activation des précurseurs..... | 91 |
| 2.1.2 Hydrolyse sélectives des précurseurs activés..... | 92 |
| 2.2 Etude de la cinétique de dégradation du ligand activé..... | 97 |
| 3. Caractérisations spectroscopiques de ligands fonctionnalisés... 99 | 99 |
| 3.1 Titration en absorption du ligand L_1 par le Tb^{3+} | 100 |
| 3.2 Titration en émission du ligand L_1 par le Tb^{3+} | 101 |
| 3.3 Propriétés des complexes de Tb..... | 101 |
| III. Conclusion..... | 103 |
| IV. Bibliographie..... | 105 |

Le choix des antennes pour la photosensibilisation des lanthanides est une étape décisive dans l'exploitation de leurs propriétés de luminescence puisque, selon la nature du métal utilisé, les niveaux d'énergie mis en jeu changent. L'obtention d'un système efficace passe donc après le choix des cations par une conception adéquate des ligands.

L'euprium et le terbium sont les deux lanthanides dont la luminescence nous apparaît la plus avantageuse, grâce à leurs temps de vie et leurs rendements quantiques de luminescence importants, même lorsqu'ils sont comparés à d'autres terre-rares. Leurs bandes d'émission se situent principalement dans la région visible et la photosensibilisation de ces derniers en spectroscopie de luminescence classique nécessite de les associer à des ligands dont les maxima d'absorption et d'émission se situent dans l'UV. Généralement il s'agit de composés macrocycliques ou non qui comprennent une ou plusieurs unités azaaromatiques conjuguées.^{[1]-[2]}

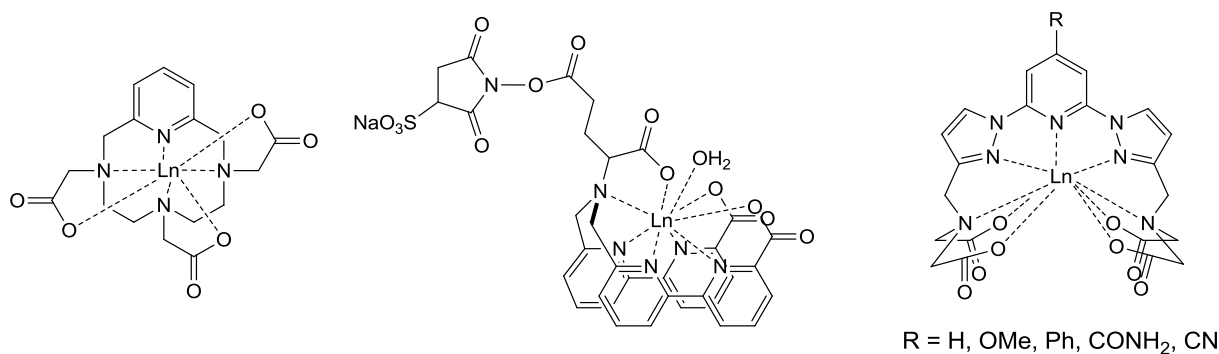


Schéma 2.1 : Exemples de complexes de lanthanides luminescents avec des ligands azaaromatiques.

Nous nous sommes intéressés à la plate-forme de type 2,6-bispyrazolyl-1-yl-pyridine, qui a déjà été l'objet de plusieurs travaux mettant en évidence son aptitude à la sensibilisation des lanthanides.^[3] En effet, la majeure partie des complexes dérivés de cette entité décrits dans la littérature sont dotés de propriétés de luminescence avantageuses, notamment pour le terbium.^[4,5] Cependant leur utilisation pour des applications biologiques est en général limitée par une stabilité insuffisante des complexes en milieux biologiques.^[5]

Nous avons donc développé une série de nouveaux ligands dans laquelle cette plateforme contient des dérivés phosphonates dont le caractère de bases dures et la charge négative élevée permettraient d'accroître la stabilité des complexes en milieu aqueux, tout en préservant les propriétés de luminescence.

Dans un premier temps, nous présenterons la synthèse de cette plateforme et d'un ligand polyaminophosphonaté inédit **L_p**. Ce ligand n'est pas le candidat idéal pour le développement de marqueurs, puisqu'il ne possède pas de groupements réactifs et son application au marquage est donc limitée. Cependant, il nous servira de « modèle »

représentatif des ligands de cette famille car il présente l'avantage d'être plus facilement accessible à travers une synthèse convergente de quelques étapes, tandis que la stratégie synthétique permettant d'accéder aux ligands trifonctionnels est plus longue. De plus, à travers sa complexation et la caractérisation de ses complexes, il nous sera possible d'évaluer l'influence du remplacement des unités de coordination carboxylates (L_c) par des phosphonates sur l'ensemble des propriétés de cette famille de ligands.

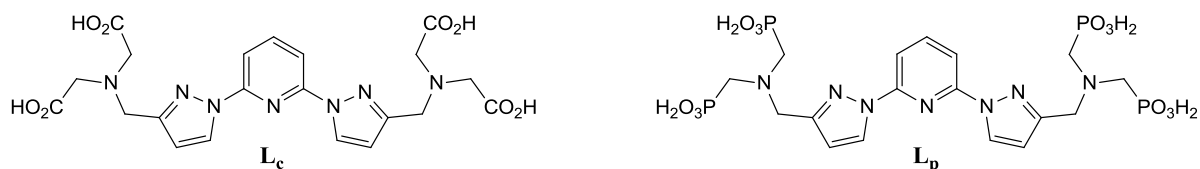


Schéma 2.2 : Ligands carboxylate (L_c) et ligand phosphonate (L_p) non fonctionnalisés.

I. Étude du ligand modèle L_p et de ses complexes

1. Synthèse du ligand

Le ligand L_p est obtenu en deux temps dont le premier consiste en la synthèse de l'entité de photosensibilisation, suivi de l'insertion des éléments de coordination.

1.1 Synthèse de la poche de sensibilisation

Mon travail de thèse a débuté par la synthèse de la poche de photosensibilisation 2,6-bispyrazolylpyridine avec un atome d'hydrogène en para de la pyridine. Cette stratégie synthétique décrite dans la littérature⁶ consiste dans un premier temps en un jeu de substitutions nucléophiles aromatiques régiosélectives, à partir de la 2,4,6-trifluoropyridine.

Les premières étapes de synthèse se basent sur les travaux réalisés par l'équipe de Schlosser^[6] sur la réactivité des pyridines halogénées.

Si l'on compare les différents sites susceptibles de subir une réaction de substitution avec des composés nucléophiles sur la trifluoropyridine **1**, la position 4 de la pyridine est plus accessible et plus réactive que les positions 2 et 6. En effet, malgré un effet attracteur favorable plus important en position ortho, le doublet électronique libre de l'azote engendre une forte répulsion électronique lors de l'approche du nucléophile. Cette répulsion électronique et la gêne stérique qui l'accompagne vont défavoriser la réaction de substitution en positions 2 et 6.

Le nucléophile choisi pour cette réaction est l'hydrazine, qui joue également un rôle de base afin de piéger les protons générés dans le milieu et de déplacer l'équilibre réactionnel. L'utilisation de deux équivalents d'hydrazine dans le THF permet de conduire la réaction avec une bonne régiosélectivité et d'isoler le composé **2** avec un rendement satisfaisant après purification.

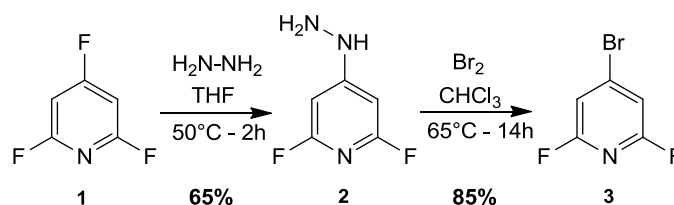


Schéma 2.3 : Synthèse de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine.

Une réaction de Sandmeyer qui permet de synthétiser des halogénures d'aryle à partir de sels de diazonium est ensuite réalisée sur le composé **2** en présence de dibrome et conduit au produit ciblé avec un rendement de 85%.

Ce jeu de substitutions ayant permis la transformation de la trifluoropyridine de départ en un substrat monobromé est déterminant pour l'introduction contrôlée des autres noyaux aromatiques. En effet, lors des réactions de substitutions nucléophiles aromatiques de dérivés halogénés, la vitesse de réaction diminue avec l'augmentation du numéro atomique et de l'électronégativité.^[7] Les fluorures plus électronégatifs que les bromures sont donc plus réactifs. Cette différence de réactivité va permettre d'obtenir majoritairement le produit de substitution en positions 2 et 6 de la pyridine lors de la réaction du composé **3** avec l'amidure aromatique de l'ester pyrazolique **4** préalablement synthétisé.^[8]

Une base forte est cependant requise pour générer un nucléophile suffisamment réactif à partir du composé **4**. Ainsi la réaction se déroule en présence d'hydrure de sodium dans le diméthylformamide (DMF) à température ambiante. En quelques heures, le composé **5** est obtenu après extraction des composés organiques suivie d'un simple lavage au méthanol.

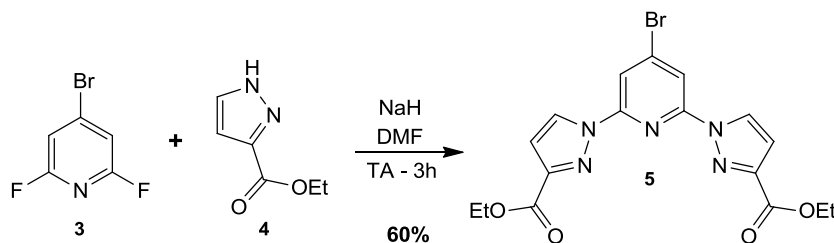


Schéma 2.4 : Substitution nucléophile aromatique de la 4-bromo-2,6-difluoropyridine.

La coplanarité des trois cycles aromatiques permet une extension de la délocalisation électronique à l'ensemble des trois noyaux et garantit une bonne absorption de la lumière. Par la suite il s'agira d'associer cette poche de photosensibilisation à des éléments de coordination adaptés.

1.2 Insertion des éléments de coordination

Pour leur caractère de bases dures susceptibles d'accroître la force de leur association aux cations lanthanides, des dérivés phosphonates ont été choisis pour remplacer les carboxylates. La préparation de l'intermédiaire ciblé est réalisée en deux étapes en s'appuyant sur des données de la littérature.

La première étape est une suite de deux condensations dont celle du benzaldéhyde avec du formaldéhyde, selon une variante de la réaction de Mannich^[9] qui conduit à une imine. En présence de diéthylphosphite, l'addition sur l'imine va permettre de former une amine secondaire. Une seconde condensation de l'aldéhyde et de la phosphite génère le composé **7**. Cette amine tertiaire subit dans la deuxième étape une réaction d'hydrogénation catalysée par du Palladium sur charbon pour conduire à l'aminobis(méthyle-diéthylephosphonate) **8**.

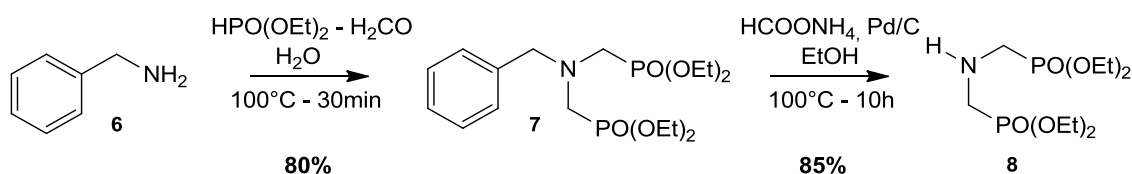


Schéma 2.5 : Synthèse de l'amine secondaire phosphonatée.

L'incorporation de l'amine **8** sur la plate-forme de photosensibilisation peut se faire entre autre par le biais d'une réaction de substitution nucléophile. Il est nécessaire au préalable de modifier la réactivité du composé **5**. La réduction totale des esters pyrazoliques suivie d'une réaction de bromation permet d'obtenir un bromure d'alkyle suffisamment réactif.

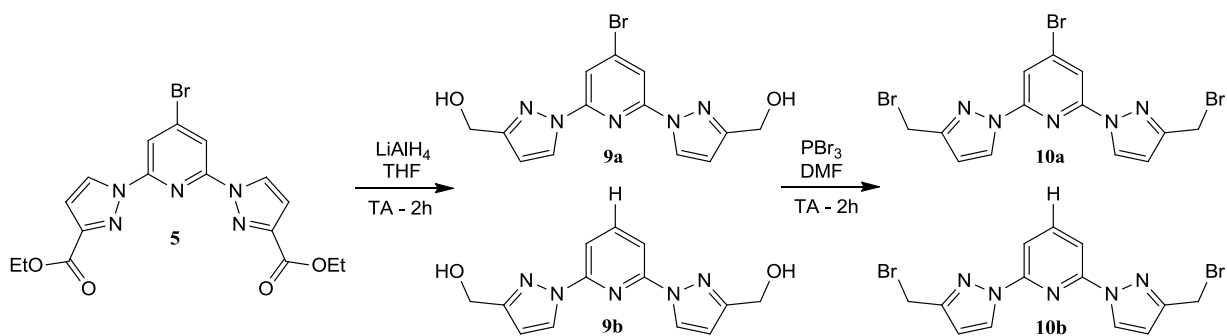


Schéma 2.6 : Synthèse des plates-formes dibromée et tribromée.

Sous l'action de l'hydruire de lithium aluminium, on observe la réduction du diester éthylique en diol (**9a**) conformément à ce qui est attendu avec de tels substrats. En outre, l'analyse du produit de réaction suggère également la formation du produit de la substitution de l'atome de brome par un atome d'hydrogène (**9b**). Afin d'optimiser la réaction et de minimiser la formation de produits secondaires, plusieurs modifications ont été effectuées notamment :

- L'abaissement de la température et du temps de réaction
- L'ajout minutieux de l'agent réducteur

Ces précautions n'ont malheureusement pas permis de contrôler la réaction ou d'éviter la formation du produit **9b**.

Sans étape de purification pour cette réaction de réduction des esters, le mélange des deux diols est soumis à une réaction de bromation en présence de tribromophosphine. Au terme de celle-ci, une purification par chromatographie sur colonne permet d'isoler les composés **10a** et **10b**. C'est l'intermédiaire **10b** qui est engagé dans la suite de la synthèse permettant d'obtenir le ligand **L_p**.

Une autre voie de synthèse de cet intermédiaire dibromé est envisageable à partir de la 2,6-difluoropyridine commerciale.

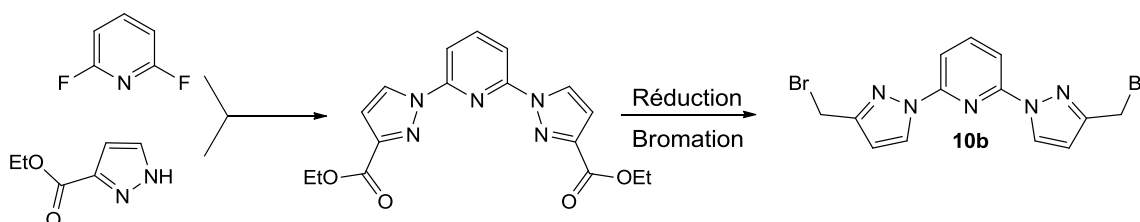


Schéma 2.7 : Alternative pour la synthèse de la plate-forme dibromée **10b**.

Cette stratégie pourrait permettre non seulement de limiter le nombre d'étapes de synthèse et de minimiser la formation de produits secondaires, mais également d'accroître le rendement global de synthèse du ligand L_p . La stratégie de synthèse adoptée au début a cependant été menée à son terme.

Ainsi après la formation de la plate-forme **10b**, une réaction de substitution nucléophile est réalisée en faisant intervenir deux équivalents de l'amine secondaire **8** qui porte les esters phosphoniques. La réaction s'effectue en plusieurs heures à reflux de l'acétonitrile, en présence de carbonate de potassium. Le composé **11** obtenu après purification est hydrolysé en milieu acide (HCl, 6M) pour donner le ligand nonadentate L_p sous la forme d'un chlorure d'ammonium.

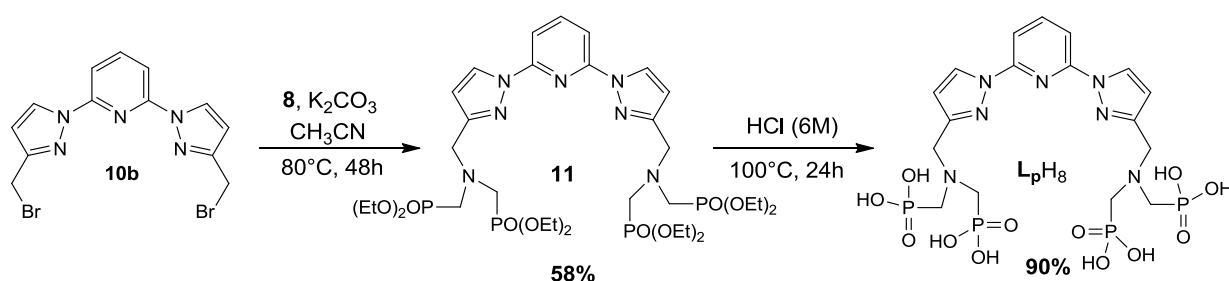


Schéma 2.8 : Synthèse du ligand « modèle » L_p .

Le ligand ainsi obtenu sous forme de poudre brune a pu être caractérisé entre autres grâce à la spectrométrie RMN.

2. Caractérisation du ligand L_p par spectrométrie RMN

La caractérisation du ligand L_p par spectroscopie RMN du proton (1H) montre la signature particulière des protons en alpha des phosphonates, dont le couplage avec l'atome de phosphore (^{31}P ; $S = 1/2$) conduit à un dédoublement des signaux. Les protons des $-CH_2$ en gamma des phosphonates beaucoup plus proches de la plateforme aromatique sont eux davantage déblindés et sortent sous la forme d'un singulet à gauche du pic de HDO à 4,97 ppm. Les 7 protons aromatiques apparaissent à champs faibles, regroupés en 4 signaux dont deux doublets pour les protons pyrazoliques et un doublet associé à un triplet pour les protons de la pyridine centrale.

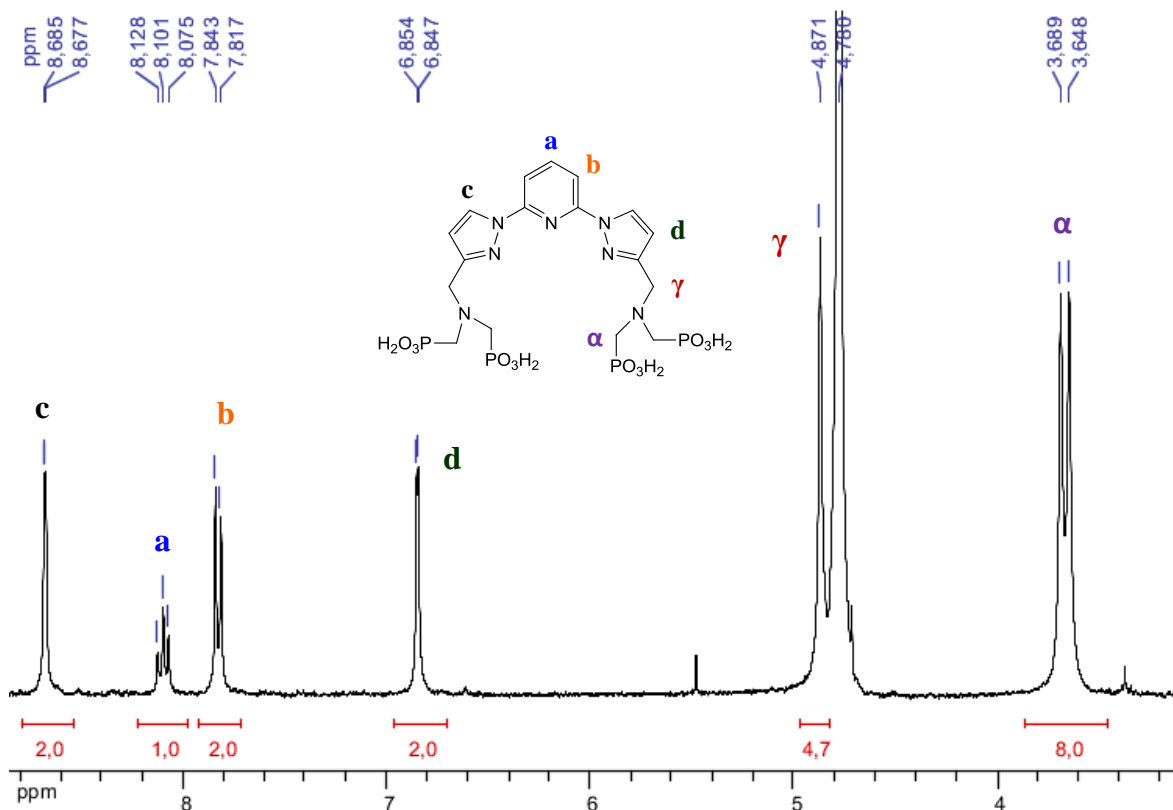


Figure 2.1 : Spectre RMN ^1H du ligand L_p (D_2O , 300 MHz, t.a.).

Le spectre RMN du phosphore quant à lui ne présente qu'un seul pic 9,98 ppm qui atteste de la formation d'une seule espèce.

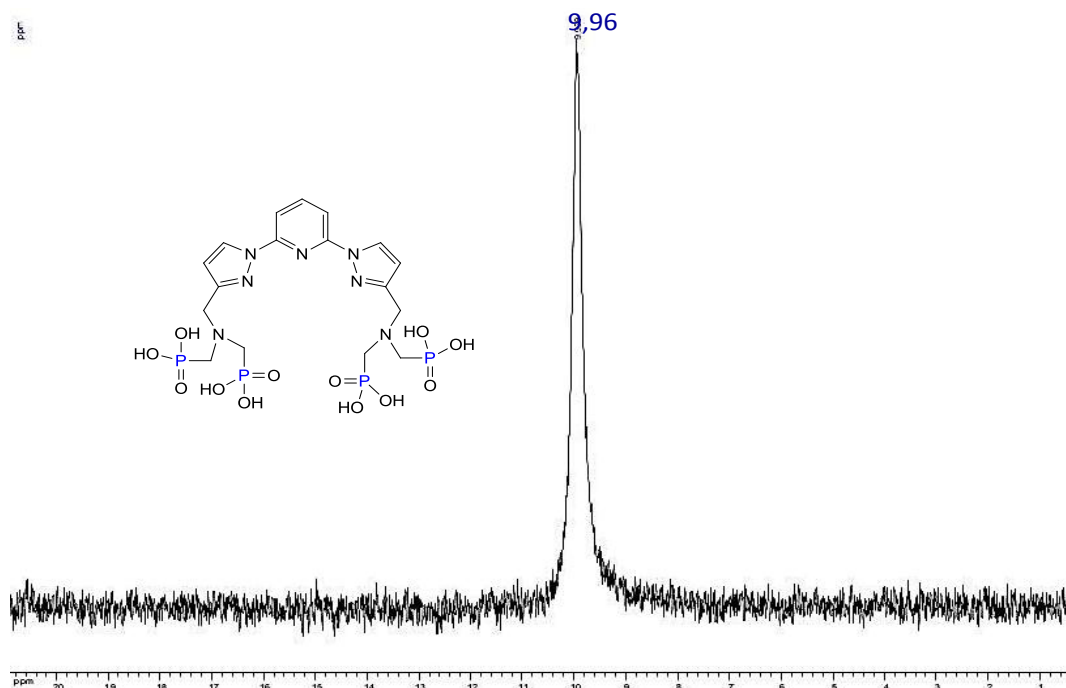


Figure 2.2 : Spectre RMN ^{31}P de L_p (D_2O , 400 MHz, t.a.).

3. Caractérisation spectroscopique du ligand L_p

3.1 Principes généraux

3.1.1 Spectroscopie d'absorption

À l'aide d'un spectromètre d'absorption UV-Visible, les spectres d'absorption qui consistent en un tracé de l'absorbance ou densité optique (d.o.) en fonction de la longueur d'onde sont systématiquement mesurés sur les ligands en solution au cours de ma thèse. Cette manipulation apporte des informations sur la nature des niveaux d'énergie et des transitions électroniques susceptibles d'être observées sur la plage de balayage.

Ces bandes sont caractérisées par leurs maxima d'absorption (λ_{max}). Quantitativement, à partir de la concentration exacte de l'échantillon étudié, il est possible de déterminer le coefficient d'absorption molaire associé à chaque longueur d'onde caractéristique (ϵ). Cette constante intrinsèque est donnée par la loi de Beer-Lambert (équation [2.1]) qui permet de calculer l'absorbance, soit le rapport entre l'intensité lumineuse incidente et l'intensité transmise. Cette équation fait intervenir plusieurs paramètres dont :

- l (cm), la longueur du trajet optique
- ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), le coefficient d'extinction molaire
- C ($mol \cdot L^{-1}$), la concentration de l'échantillon étudié en solution.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon \cdot l \cdot C \quad [2.1]$$

Les spectres d'absorption permettent de repérer les bandes où le ligand ou le complexe absorbe le plus et cette information est nécessaire pour l'investigation des propriétés d'émission.

3.1.2 Spectroscopie d'émission

Les spectres d'émission correspondent aux transitions électroniques radiatives lors du retour à l'état fondamental d'un échantillon après son irradiation à une longueur d'onde donnée, généralement celle où l'absorption est maximale. L'intensité de ces spectres est liée à la nature de l'échantillon, à sa concentration, et aux réglages de l'appareil de mesure. Cependant la détermination d'autres paramètres tels que le temps de vie, le rendement quantique de luminescence ou le nombre d'hydratation dépendent uniquement des systèmes étudiés selon les solvants, et permettent de les caractériser de façon intrinsèque.

- **Le temps de vie τ :**

L'excitation d'une substance donnée par irradiation lumineuse et son absorption de photons se traduit par le passage de l'entité de son état fondamental à un état excité. Lorsque cesse l'irradiation, la population des états excités retournent à l'état fondamental et cette désexcitation peut se traduire par l'émission de lumière. L'intensité de ce signal décroît de façon exponentielle en fonction du temps (équation [2.2]).

$$I_{em}(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad [2.2]$$

Plus long est le temps de vie de luminescence τ , moins rapide sera le déclin de la luminescence pour une espèce donnée. En ce qui concerne les chromophores organiques fluorescents, ce temps est généralement très court (quelques nanosecondes), tandis que les temps de vie de luminescence de complexes d'euporium ou de terbium par contre sont beaucoup plus longs, de l'ordre de la milliseconde. Ils varient cependant pour chacun de ces ions en fonction de l'environnement et de l'hydratation du complexe.

- **Le rendement quantique de luminescence Φ :**

Le rendement quantique de luminescence pour un composé est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés.

$$\Phi = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} \quad [2.3]$$

Il est compris entre 0 et 1 et peut être exprimé en pourcentage. Lorsqu'il s'agit tout simplement de phénomènes de fluorescence, les valeurs de rendements quantiques peuvent atteindre 100%, contrairement à la luminescence de lanthanides dont le rendement est souvent réduit par les autres voies de désexcitations compétitives.

Le calcul des rendements quantiques (Φ) peut s'effectuer selon une méthode qui consiste à comparer l'intégrale des spectres d'émission des composés étudiés (S) à celles de composés de références (S_{ref}), dont les rendements quantiques (Φ_{ref}) sont connus.^[10] Les absorbances des échantillons (A) et celles des solutions de référence (A_{ref}) doivent cependant être déterminées, et les rendements quantiques sont liés par la formule suivante :

$$\frac{\Phi}{\Phi_{ref}} = \frac{n^2}{n_{ref}^2} \times \frac{S}{S_{ref}} \times \frac{1-10^{A_{ref}}}{1-10^A} \times \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda_{ref}}^0} \quad [2.4]$$

Dans cette équation, n représente l'indice de réfraction du milieu. Lorsque la référence et l'échantillon sont en solution dans le même solvant, la suppression de ce rapport simplifie l'équation. I_{λ}^0 représente l'intensité du faisceau incident à la longueur d'onde λ . Lorsque les mesures sont faites avec des solutions suffisamment diluées ($A \leq 0,05$), et les spectres mesurés dans les mêmes conditions d'excitation et d'émission (intensité du rayonnement incident normalisé), on obtient l'équation [2.5] où il est possible de ne tenir compte que de l'absorbance et de l'intégrale d'émission pour le calcul des rendements quantiques.

$$\frac{\Phi}{\Phi_{ref}} = \frac{S}{S_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A} \quad [2.5]$$

Cette méthode est cependant entachée d'une erreur absolue estimée à $\pm 15\%$.^[11]

Pour le calcul des rendements quantiques de luminescence des complexes de terbium dans l'eau, la référence utilisée est la Rhodamine 6G ($\Phi = 76\%$ dans H_2O pour $\lambda_{ex} = 488$ nm)^[12], tandis que celle utilisée pour les complexes d'euporium est le complexe Ruthénium tris bipyridine chlorure ($\Phi = 4\%$ dans H_2O pour $\lambda_{ex} = 450$ nm).^[13]

- **Le nombre d'hydratation q :**

Au sein des complexes de coordination en solution aqueuse, il est courant que la coordination du ligand autour d'un cation soit complétée par une ou plusieurs molécules d'eau. Le nombre de ces molécules d'eau en première sphère de coordination est appelé nombre d'hydratation.

Ce nombre est un paramètre important lors de l'étude de complexes de lanthanides luminescents. En effet à l'instar des oscillateurs de type X-H ($X = C, N, O \dots$), les molécules d'eau liées aux lanthanides fournissent un chemin de désexcitation non-radiatif des états excités, à travers un couplage des niveaux d'énergie luminescents avec les niveaux d'énergie vibrationnels des oscillateurs X-H.^[14] Il en résulte une dégradation des propriétés de luminescence des complexes, à la fois au niveau de l'intensité d'émission, du temps de vie des états excités et du rendement quantique de luminescence.

Plusieurs auteurs se sont penchés sur le calcul du nombre d'hydratation q . Freeman le premier au cours de ses travaux sur les chlorures d'euporium et de terbium souligne la différence entre les valeurs des temps de vie de luminescence des états excités dans l'eau (H_2O) et l'eau lourde (D_2O).^[15] Par la suite, Heller^[16] met en évidence la concordance entre le nombre de quanta OH et la différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental,

ouvrant la voie à l'étude de l'effet de la substitution isotopique sur les vitesses de désactivation non-radiatives.

En effet, les oscillateurs O-D dont les quantas sont plus petits que ceux des O-H sont beaucoup moins efficaces dans le processus de désexcitation vibrationnel.

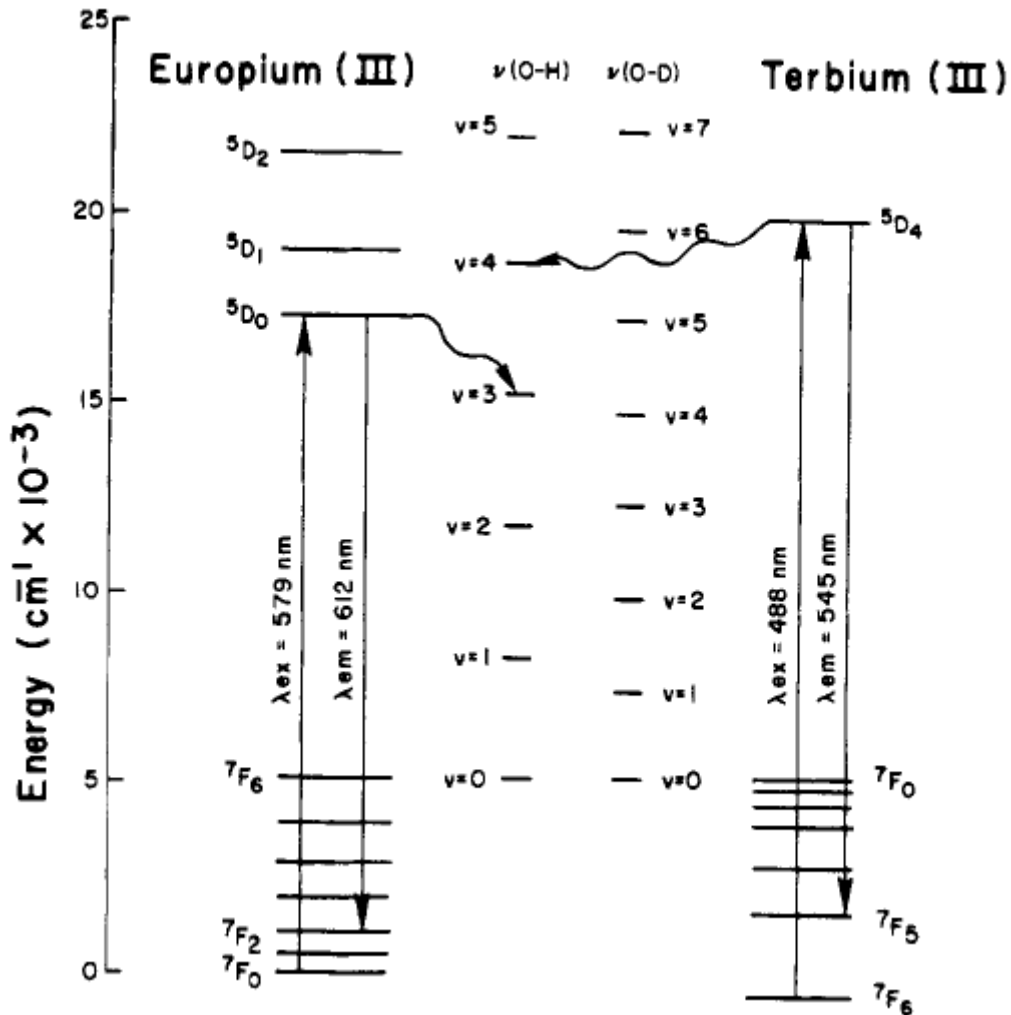


Figure 2.3 Représentation des niveaux d'énergie des transitions électroniques de l'euporium (III) et du terbium (III), ainsi que des quantas associées aux vibrations O-H et O-D. ^[15]

À partir de cette observation, Horrocks et Sudnick ont développé une formule empirique permettant de calculer le nombre de molécules d'eau au sein des complexes de lanthanides, grâce à leurs travaux sur la différence entre les temps de vie de luminescence des complexes de lanthanides selon qu'ils soient en solution dans des solvants protonés ou deteurés. ^[15]

$$q = A \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} \right) \quad [2.6]$$

Le terme A dans cette équation est une constante dont la valeur est propre à chaque cation. Elle représente la facilité avec laquelle les états excités vont subir une désactivation vibrationnelle et il a été démontré que l'efficacité de cette désexcitation est inversement proportionnelle à la différence d'énergie entre l'état excité luminescent et l'état fondamental.^{[17],[18]}

Les valeurs de A pour les complexes d'euporium et de terbium déterminées par Horrocks et Sudnick^[15] tiennent compte de l'ensemble des oscillateurs X-H associés au complexe, sans distinction entre la première ou la seconde sphère de coordination.

Une autre étude menée par Parker et ses collaborateurs apporte une amélioration à l'équation [2.6] en faisant une distinction entre la contribution des oscillateurs en première sphère (A), et celle des oscillateurs non coordonnés au métal notamment les molécules de solvant (B).^[19]

$$q = A \left(\frac{1}{\tau_{H_2O}} - \frac{1}{\tau_{D_2O}} - B \right) \quad [2.7]$$

Les valeurs de ces constantes pour l'euporium et le terbium sont données dans le tableau suivant :

| | Terbium | Euporium |
|----------|----------------|-----------------|
| A | 1,2 | 5 |
| B | 0,25 | 0,06 |

Tableau 2.1 : Valeur des constantes A et B pour l'euporium et le terbium.

3.2 Etude du ligand L_p

3.2.1 Titrage UV-Vis du ligand L_p par une solution de Eu^{3+}

Une première expérience avec le ligand L_p a consisté à mesurer une série de spectres d'absorption lors de l'ajout de quantités croissantes d'une solution d'euporium à une solution de ligand.

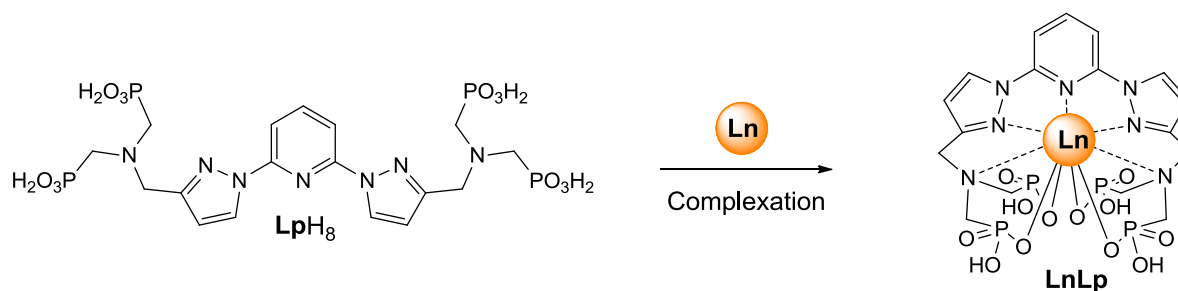


Schéma 2.9 : Schéma général de complexation.

Ce titrage fait apparaître des variations importantes entre les allures des spectres d'absorption du ligand libre et ceux correspondant à des espaces métalliques.

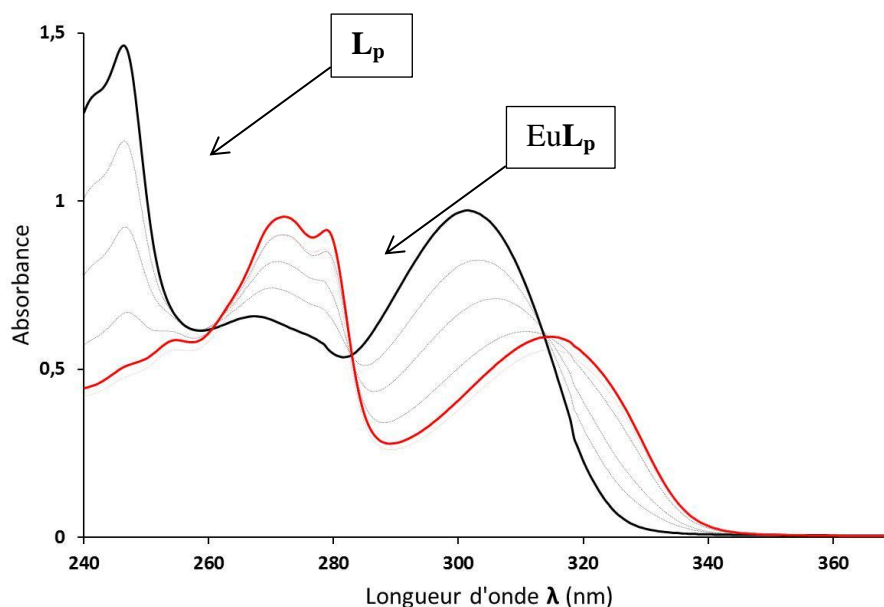


Figure 2.4 : Evolution des spectres d'absorption de L_p ($c = 4,69 \times 10^{-5}$ M), dans un tampon TRIS/HCl 0,01M à pH 7,0 lors de l'addition de $EuCl_3 \cdot 6H_2O$. La correction de dilution n'est pas effectuée.

En absence de métal, le spectre d'absorption montre un premier pic intense à 247 nm qui est attribué à un mélange de transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ de la pyridine et des pyrazoles. Le spectre présente également un pic significatif d'absorption à 303 nm qui peut être attribué quant à lui à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$.

Lors de l'ajout de la solution métallique et de la formation des complexes de coordination, on observe des variations continues des spectres d'absorption mesurés. Dans un premier temps survient une diminution drastique puis un déplacement du pic d'absorption à 247 nm vers la droite. On observe également un déplacement bathochrome important du pic à 303 nm, dont la valeur maximale est atteinte à 315 nm et caractérise le complexe 1:1 qui correspond à l'association d'un ligand et d'un cation.

Une autre modification importante est le placement bathochrome important de la bande à 247 nm lors de la formation du complexe. Au point équivalent, le dédoublement à peine perceptible chez le ligand devient plus marqué et suggère deux contributions distinctes à 272 nm et 279 nm. Cette observation est caractéristique des complexes de coordination des dérivés pyrazoliques.^[20]

3.2.2 Titration UV-Vis du ligand L_p par une solution de Tb^{3+}

Un titrage similaire a également été réalisé à partir d'une solution du ligand dans un tampon par une solution de terbium cette fois. Des résultats semblables ont été obtenus comme le montre l'ensemble des spectres d'absorptions représentés à la figure 2.5.

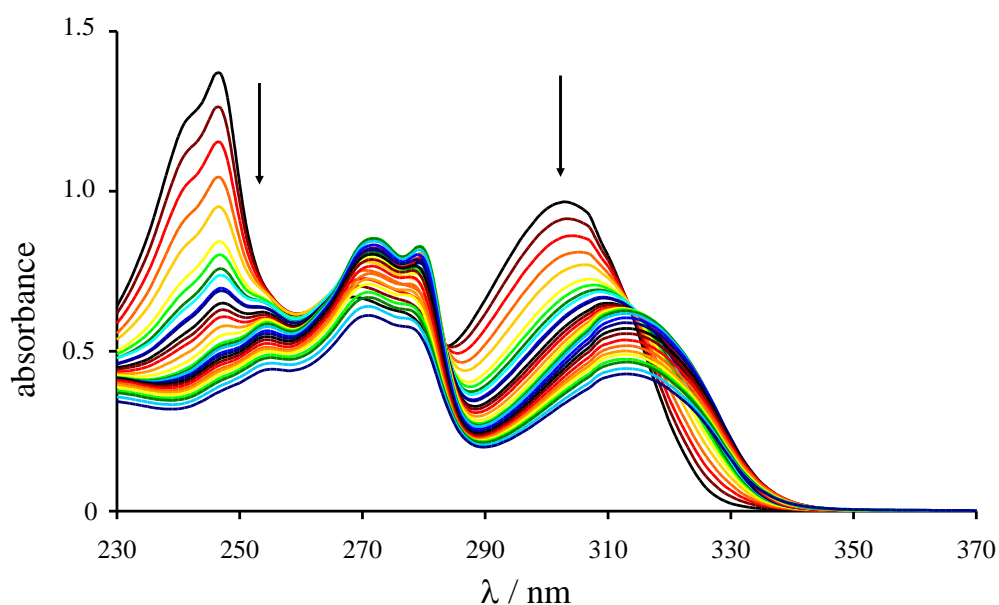


Figure 2.5 : Evolution des spectres d'absorption de L_p ($c = 4,69 \times 10^{-5}$ M, TRIS/HCl 0,01M à pH 7,0) lors de l'addition de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$. La correction de dilution n'est pas effectuée.

Les données apportées par cette expérience ont été utilisées pour faire un tracé de la variation de la densité optique en fonction du rapport métal/ligand à 237 et 283 nm. On observe plusieurs variations monotones qui suggèrent l'existence d'au moins trois espèces métalliques.

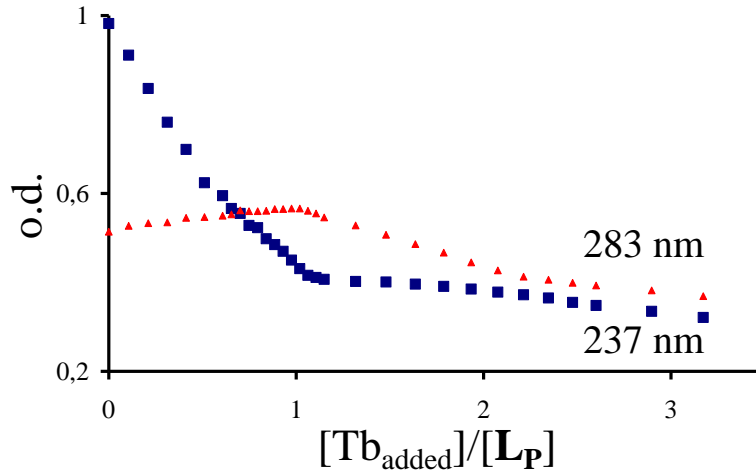
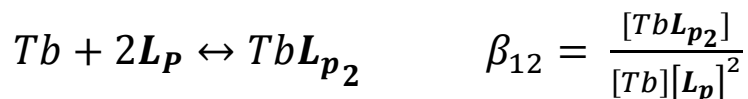
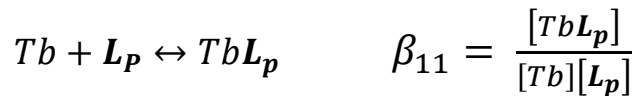


Figure 2.6 : Evolution de l'absorbance à 237 et 283 nm.

Ces résultats ont également été analysés à l'aide du logiciel SPECFIT par proposition de modèles de formation de plusieurs espèces afin d'expliquer ces variations irrégulières de l'absorbance. Une convergence entre les données calculées et les données expérimentales a été obtenue pour le modèle à trois espèces métalliques suivant :



- La première espèce ML est celle attendue et correspond à une proportion stœchiométrique du ligand et du cation.
- Le complexe M₂L correspond à une espèce où le même ligand serait associé à deux cations. Ce complexe est susceptible de se former lorsque le Tb(III) est en large excès dans la solution. La participation partielle des phosphonates à la complexation du métal au sein d'une complexe de stoechiométrie 1:1 laisse la possibilité aux groupements -OH non coordonnés et électronégatifs d'interagir avec d'autres cations.
- Le complexe ML₂ suggère la complexation d'un cation par deux ligands en même temps. Il se forme lorsque le ligand est en excès.

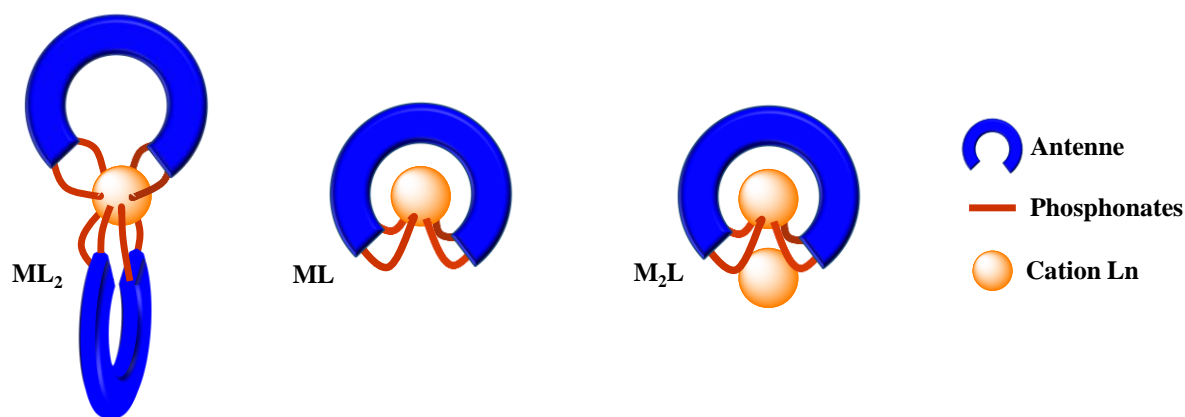


Schéma 2.10 : Représentation schématique d'exemples pour les espèces susceptibles de se former en solution.

Il a également été possible de faire converger les données du titrage afin de recalculer les spectres attendus pour chacune des espèces présentes en solution :

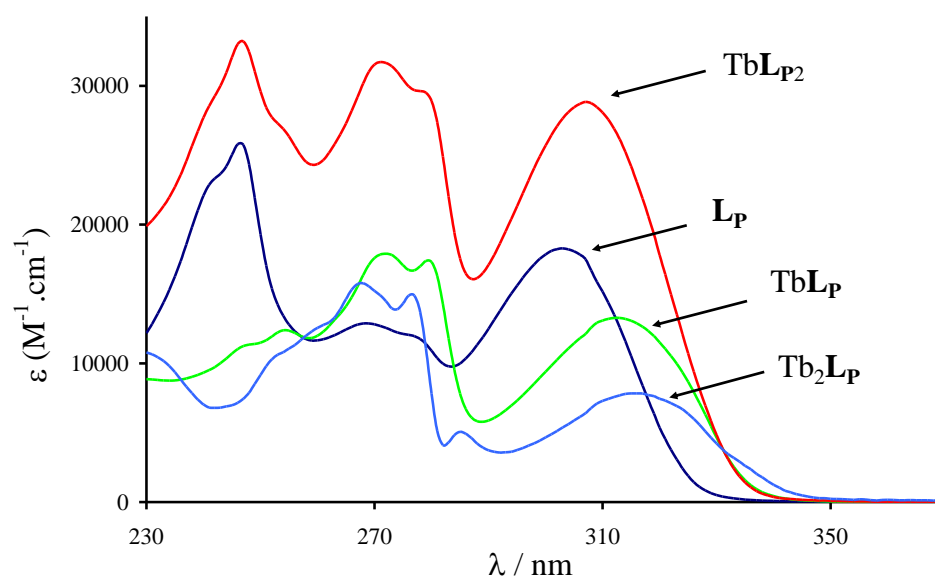


Figure 2.7 : Spectres d'absorption UV-Vis calculés des espèces qui se forment en solution lors du titrage de L_p par une solution de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ dans un tampon TRIS à 0,01 M, pH = 7,0.

Ces résultats indiquent assez logiquement une plus forte absorbance pour le complexe ML_2 puisque le nombre de chromophores organiques y est plus important. De même, l'exaltation de la bande d'absorption autour de 295 nm suggère que les deux noyaux pyrazoliques de chaque ligand qui participe à la coordination du métal central adoptent une position *cis* par rapport à la pyridine, contrairement à ce qui est entendu pour le ligand libre. Cependant, on observe très peu de changements au niveau de la bande à 247 nm, attribuée à la

transition aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ du ligand. Cela pourrait indiquer qu'au sein de cette espèce, le cation est encore plus déplacé vers les entités phosphonates et augurer une moins bonne sensibilisation de l'euprium et du terbium par rapport aux espèces ML . Il n'est donc malheureusement pas possible d'envisager une synergie entre l'augmentation de l'absorption et l'augmentation de la luminescence des lanthanides pour ce système.

3.2.3 Titration en émission du ligand par une solution de Tb^{3+}

Le même titrage du ligand par une solution de Tb(III) a été suivi par spectroscopie de fluorescence, en observant les spectres d'émission du Tb de 450 à 700 nm. Les échantillons ont été excités à 300 nm à chaque fois.

Les résultats du traitement des données avec le logiciel SPECFIT confirment la formation de trois espèces métalliques. Le tracé de l'intensité d'émission en fonction de la quantité de terbium ajouté a montré deux tendances : une augmentation constante et régulière de l'intensité d'émission avec l'augmentation de la concentration de terbium jusqu'à ce qu'une proportion stœchiométrique du ligand et du métal soit atteinte. Ensuite, au-delà de ce point d'équivalence, l'addition de terbium a pour effet de diminuer l'intensité d'émission.

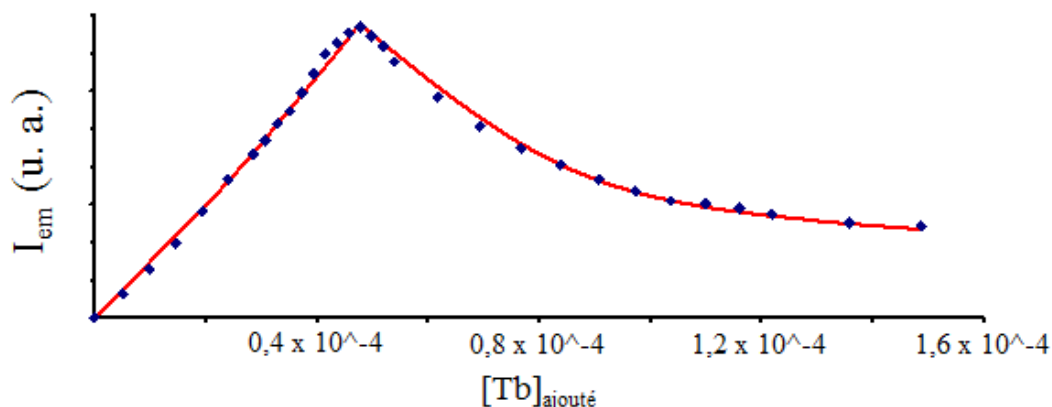


Figure 2.8 : Evolution de l'intensité d'émission mesurée à 545 nm ($\lambda_{exc} = 300$ nm) lors de l'addition d'une solution de $TbCl_3$ à une solution du ligand L_p à une concentration de $5,28 \times 10^{-4}$ M. Les valeurs expérimentales sont en bleu (◆), et les valeurs calculées en rouge (—).

Un diagramme donnant la proportion relative des espèces métalliques en fonction de la concentration de métal ajouté au cours du titrage a également pu être établi (Figure 2.9). Il montre la prédominance de l'espèce M_2L au début du titrage, lorsque le ligand est en excès et jusqu'à la demi-équivalence. Cette espèce disparaît rapidement au profit du complexe 1:1 beaucoup plus stable et dont la formation est quasi-quantitative à l'équivalence. Avec l'addition supplémentaire de métal, la prédominance du complexe ML décroît lentement, tandis que se forme le complexe M_2L .

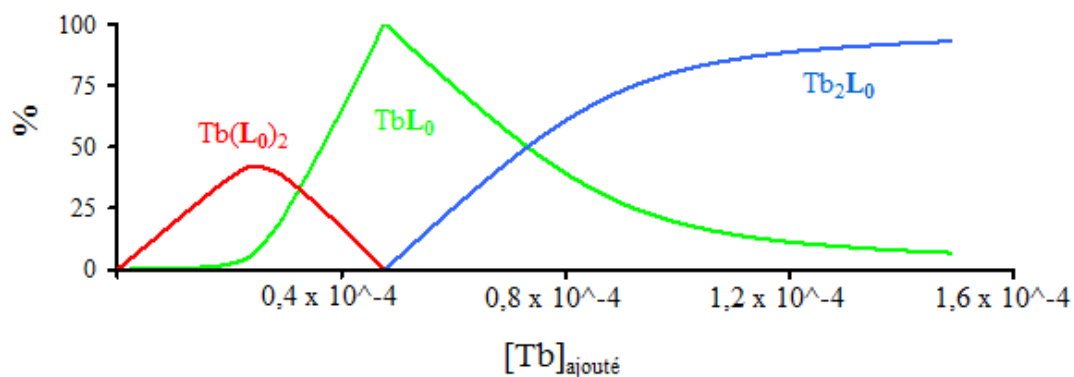


Figure 2.9 : Diagramme de prédominance des espèces métalliques en fonction de la concentration en Tb(III) pendant le titrage.

Ces observations sont en accord avec une constante de stabilité thermodynamique très élevée pour le complexe ML . Dans ces conditions il n'est pas très pertinent de calculer la constante de stabilité associée à la formation du complexe directement à l'aide des concentrations de chacune des espèces à l'équilibre. Pour la détermination de cette grandeur thermodynamique, nous utiliserons des méthodes indirectes par compétition dans les sections ultérieures.

3.3 Etude des complexes d'euprium et de terbium

De façon générale, les complexes à base de ligands acycliques phosphonates du manuscrit sont tous préparés selon le même protocole.

À une solution aqueuse du ligand dont le pH est ajusté à 7 par ajout d'une solution de NaOH (1M), on rajoute une solution contenant 1 équivalent du chlorure de lanthanide ($LnCl_3$) en solution dans l'eau. Le mélange est ensuite chauffé à 40 °C pendant une heure. Après refroidissement du milieu réactionnel et neutralisation du milieu réactionnel par ajout d'une solution de soude, l'ajout de non-solvant (THF, Diéthyléther, Méthanol) permet de précipiter les complexes. Le mélange des deux phases est enfin centrifugé afin d'isoler les complexes sous forme de poudre après séchage.

En ce qui concerne le ligand L_p , les complexes suivant ont été synthétisés :

| Complexes | TbL_pNa | EuL_pNa | GdL_pNa |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| Rendements | 100% | 88% | 80% |

Tableau 2.2 : Rendements de synthèse des complexes du ligand L_p .

En se plaçant dans des conditions rigoureusement stœchiométriques, les spectres ^1H , ^{13}C et ^{31}P d'un complexe 1:1 avec le lanthane ont pu être obtenus. Les autres complexes ont été caractérisés par analyse élémentaire, spectroscopie infra rouge et spectrométrie de masse.

- Caractérisation par spectrométrie RMN du complexe LaL_p

Un mélange 1:1 du ligand L_p et de chlorure de lanthane dans une solution de D_2O (pD = 10,5) a été réalisé et les spectres RMN de la solution ainsi obtenue ont été mesurés :

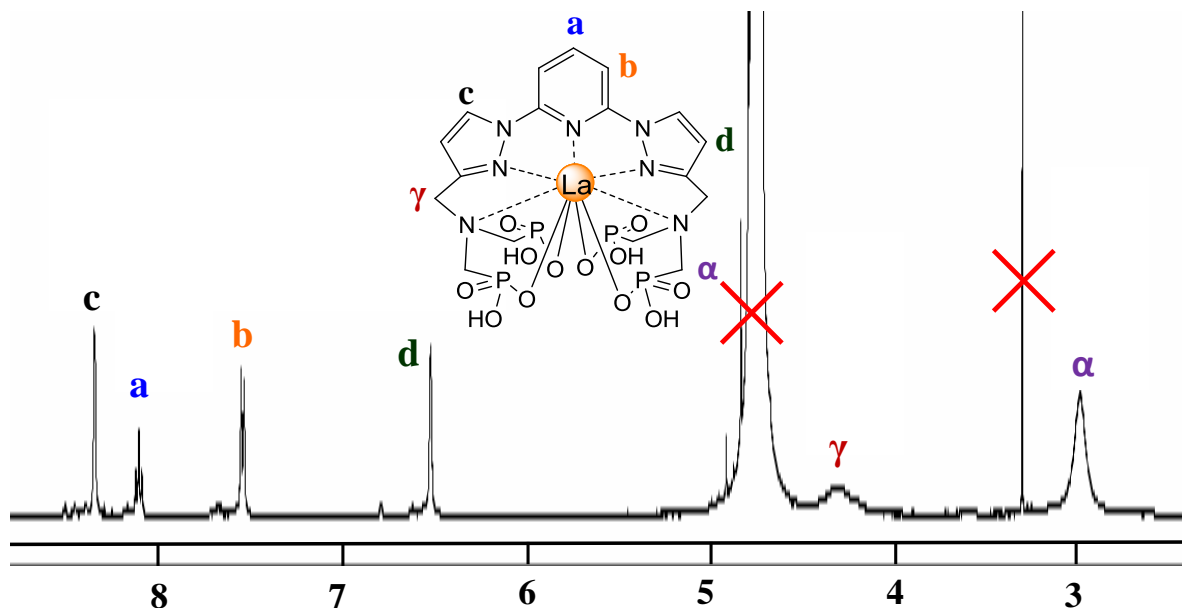


Figure 2.10 : Spectre RMN ^1H du complexe LaL_p (D_2O , 400 MHz, t.a.).

La comparaison du spectre du complexe de lanthane et du spectre du ligand libre (Figure 2.1) montre un déplacement des pics vers les champs forts. Cette observation est en accord un changement conformation du ligand entre la forme libre et celle complexée du ligand. Cette diminution du déplacement chimique est particulièrement marquée pour les protons en alpha du phosphore, puisque sous l'effet de la complexation des phosphonates, ils se retrouvent dans le cône de blindage de la plateforme conjuguée.

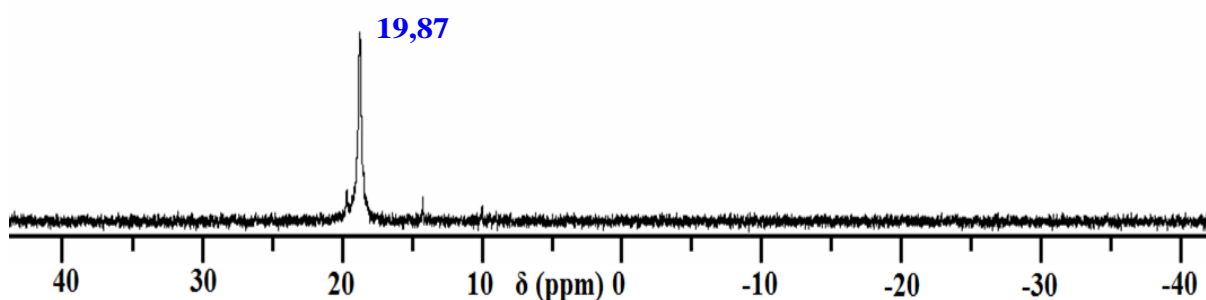


Figure 2.11 : Spectre RMN ^{31}P du complexe LaL_p (D_2O , 400 MHz, t.a.).

Le spectre du phosphore ne montre qu'un seul pic et atteste de la formation d'une seule espèce métallique. Ce pic est aussi significativement déplacé vers la droite. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la diminution de la densité électronique suite à la participation des doublets libres des atomes d'oxygène à la coordination du métal.

- Caractérisation par spectrométrie de masse du complexe EuL_p

Le complexe a été synthétisé selon le protocole décrit précédemment et a été analysé par spectrométrie de masse, selon la méthode d'ionisation par électro-nébulisation. Le pic majoritaire dont la valeur de m/z est égale à 793,94 est attribué au complexe de l'anion EuL_pH₄⁻. Lorsqu'on réalise un zoom sur cette région du spectre et que l'on compare les différents pics à obtenus expérimentalement à ceux obtenus après des calculs théoriques, on observe une concordance parfaite de la distribution isotopique pour l'ion Eu³⁺ (¹⁵¹Eu : 92 % et ¹⁵³Eu : 100 %).

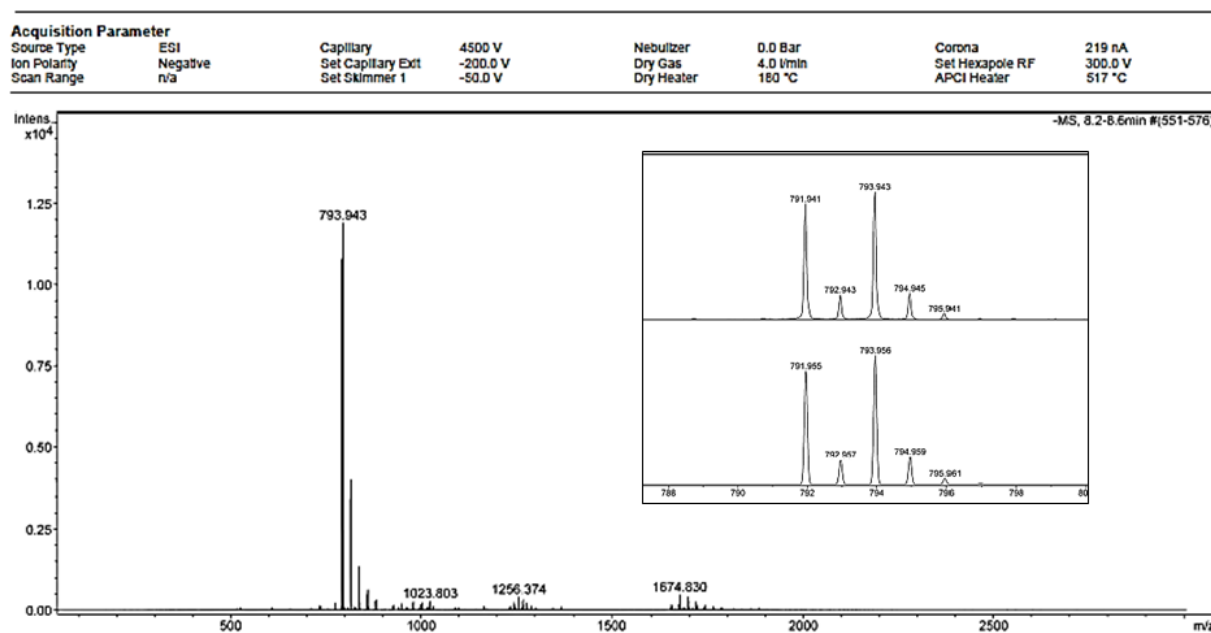


Figure 2.12 : Spectre de masse (ESI) du complexe EuL_p. En encadré distribution isotopique mesurée (en haut) et calculée (en bas) pour le pic de l'ion [EuL_pH₄]⁻ à m/z = 793,943.

Les propriétés de luminescence des complexes d'euprium et de terbium ont été étudiées.

3.3.1 Etude des propriétés spectroscopiques des complexes

Les complexes isolés de terbium et d'euprium du ligand L_p ont été caractérisés par spectroscopies d'absorption et d'émission. La figure 2.13 représente la superposition des

spectres d'absorption et d'excitation des complexes, ainsi que les émissions caractéristiques de deux lanthanides.

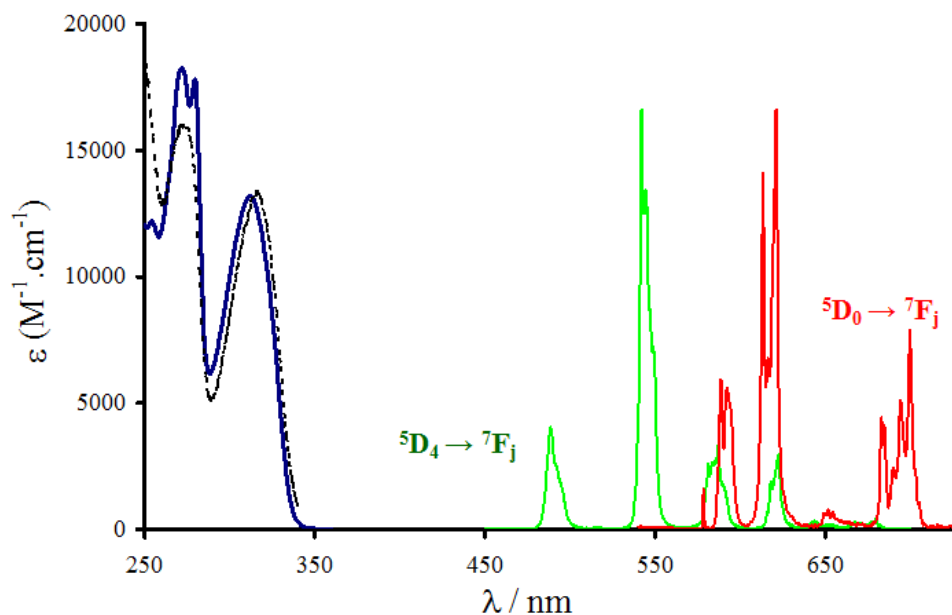


Figure 2.13 : Spectres d'absorption (—) et d'excitation (....) du complexe de terbium, et spectres d'émission des complexes de terbium (—) et d'euporium (—) normalisés.

Les spectres d'émission ont été obtenus après excitation au maximum d'absorption des complexes (315 nm). On observe les bandes caractéristiques des transitions électroniques $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ ($j = 0$ à 4) de l'euporium et des transitions $^5D_4 \rightarrow ^7F_j$ ($j = 6$ à 1) du terbium.

Ces résultats ont été complétés par la détermination des temps de vie et des rendements quantiques de luminescence. L'ensemble de ces données est présenté dans le tableau ci-dessous :

| | λ_{\max} (nm) | ϵ_{\max} ($M^{-1}.Cm^{-1}$) | τ_{H_2O} | τ_{D_2O} | q | Φ |
|------------------------|--------------------------|---|---------------|---------------|---|--------|
| L_p | 300 | 17 000 | 1,74 ns | - | - | - |
| EuL_p | 273 280 315 | 17500 17050 12050 | 1,50 ms | 2,25 ms | 0 | 4 % |
| TbL_p | 273 280 315 | 18200 17050 12050 | 3,28 ms | 4,32 ms | 0 | 37 % |

Tableau 2.3 : Récapitulatif des données spectroscopiques du ligand **L_p** et de ses complexes d'euporium et de terbium.

Lorsque l'on compare les propriétés de luminescence des complexes du ligand L_p à celles obtenues pour son analogue carboxylique L_c (270 et 313 nm),^[21] on note un léger déplacement des bandes d'absorption vers le rouge pour le ligand phosphonaté, bien que l'unité de photosensibilisation soit strictement la même.

En ce qui concerne les temps de vie, ceux des complexes d'euprium varient très peu, tandis qu'il y a une augmentation sensible des temps de vie du complexe de Tb avec le ligand L_p .

| | λ_{\max} (nm) | ϵ_{\max} ($M^{-1}.Cm^{-1}$) | τ_{H_2O} | τ_{D_2O} | q | Φ |
|-----------------|--------------------------|---|---------------|---------------|---|--------|
| Eu L_c | 270 313 | 12300 8100 | 1,30 ms | 2,45 ms | 0 | 13 % |
| Tb L_c | 270 313 | 11200 7200 | 2,73 ms | 3,30 ms | 0 | 60 % |

Tableau 2.4 : Récapitulatif des données spectroscopiques des complexes d'euprium et de terbium du ligand L_c .

Les rendements quantiques de luminescence quant à eux sont dramatiquement réduits dans les deux cas. Cela pourrait résulter d'un trop grand déplacement du cation vers les bras phosphonates, une augmentation de la distance entre le chromophore et le cation, et par conséquent une diminution de l'efficacité de la photosensibilisation.

Cette hypothèse a été confirmée par des études de DFT (effectuées en collaboration avec l'équipe du Dr. Carlos Platas-Iglesias) sur le complexe d'euprium pour lequel des calculs basés sur la répartition de la densité électronique ont été effectués pour obtenir la structure d'un complexe d'euprium avec le ligand L_p . Deux conformations d'énergie minimale obtenues sont représentées sur la figure 2.14. La première correspond à un complexe où le ligand est complètement déprotoné ($[EuL_p]^{5-}$), et la seconde est un complexe une fois protoné $[EuL_pH]^{4-}$.

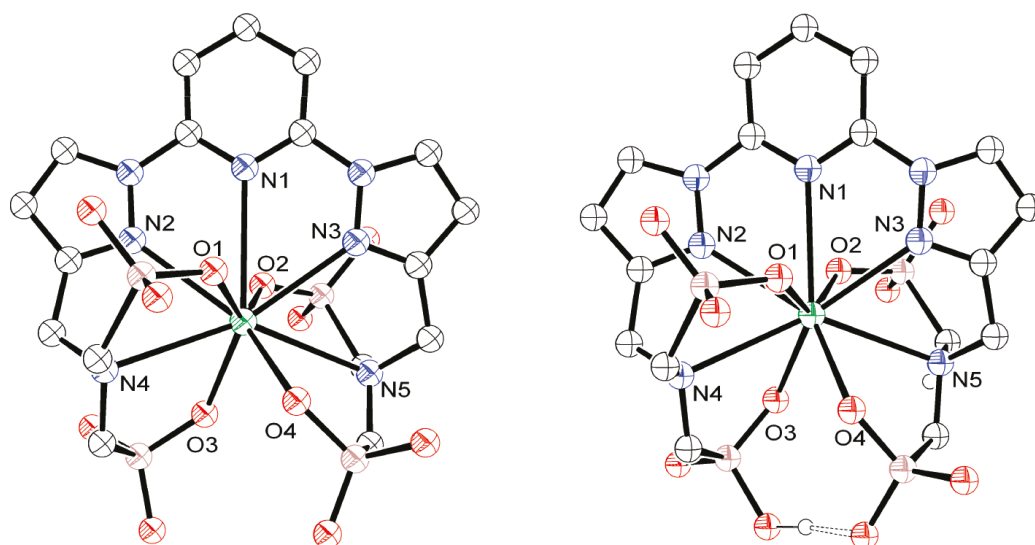


Figure 2.14 : Structures obtenues par calculs de DFT (B3LYP/6-31G^[22]) en solutions aqueuse pour les complexes $[\text{EuL}_p]^{5-}$ et $[\text{EuL}_p\text{H}]^{4-}$. Certains atomes d'hydrogène ont été omis pour des besoins de clarté.

Ce résultat confirme la formation d'un complexe nonadentate, avec la contribution de l'unité aromatique tridentate, des deux amines tertiaires, et la participation d'un atome d'oxygène par phosphonate à la coordination du lanthanide. De plus, les atomes d'oxygène non coordinants des phosphonates pointent vers l'extérieur de la cavité et sont susceptibles d'empêcher la coordination de molécules d'eau en première sphère à travers la gêne stérique. Cependant il convient de souligner qu'ils ont tendance à induire une importante hydratation de la seconde sphère de coordination des complexes qu'ils forment,^{[23],[24],[25]} notamment à cause de leur charge négative élevée.

Les distances entre le centre métallique et les atomes qui participent à la coordination ont été déterminées pour les complexes présents en solution à pH physiologique. Elles sont regroupées au sein du tableau 2.5.

| | $[\text{EuL}_p]^{5-}$ | $[\text{EuL}_p\text{H}]^{4-}$ | $[\text{EuL}_p\text{H}_2]^{3-}$ |
|-------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Eu-N1 | 3,054 | 2,891 | 2,878 |
| Eu-N2 | 2,747 | 2,625 | 2,626 |
| Eu-N3 | 2,717 | 2,612 | 2,604 |
| Eu-N4 | 2,965 | 2,912 | 2,958 |
| Eu-N5 | 2,905 | 2,902 | 2,866 |
| Eu-O1 | 2,381 | 2,366 | 2,479 |
| Eu-O2 | 2,377 | 2,361 | 2,326 |
| Eu-O3 | 2,345 | 2,421 | 2,322 |
| Eu-O4 | 2,359 | 2,350 | 2,399 |

Tableau 2.5 : Longueurs des liaisons (Å) de l'environnement de coordination du métal calculées par DFT selon le modèle B3LYP/6-31G pour le complexe EuL_p sous trois états de protonation différents.

Il apparaît à la lecture de ce tableau que les distances entre le cation et les atomes d'azote de la plate-forme tridentate sont beaucoup les plus longues que celles entre le métal et les atomes d'oxygène des phosphonates. Ce déplacement des cations vers les phosphonates au détriment de l'antenne pourrait expliquer une photosensibilisation moyennement efficace. Cependant ces calculs théoriques correspondent à des complexes dans le vide.

Lorsque les complexes sont en solution, la prise en compte des effets de solvation peut conduire à des valeurs sensiblement différentes, à l'instar de ce qui est observé avec le complexe d'euprium du ligand L_c .^[21]

Pour ce complexe, 5 groupes d'atomes coordinants sont considérés. Il s'agit de l'atome d'azote de la pyridine (N_{py}), des atomes d'azote des pyrazoles (N_{pyr}), des atomes d'azote des amines primaires (N_{AM}), des atomes d'oxygènes dans le plan (O_{dp}) et ceux en dehors du plan (O_{hp}). Les valeurs reportées au sein du tableau 2.6 montrent une diminution des distances entre les atomes d'azote de la plateforme et une augmentation de la distance avec les atomes d'oxygène des carboxylates lorsqu'on passe d'une configuration où le complexe est dans le vide à celle où il est en solution.

En outre, on note pour les deux complexes que les distances entre les atomes d'azote et le métal sont un peu plus élevées que dans le cas des complexes avec des ligands tridentates comme les terpyridines.^[26]

| | [EuL _c] ⁻ (Vide) | [EuL _c] ⁻ (En solution) |
|---------------------|--|---|
| Eu-N _{py} | 2,993 | 2,903 |
| Eu-N _{pyr} | 2,695 | 2,622 |
| Eu-N _{AM} | 2,758 | 2,777 |
| Eu-O _{hp} | 2,376 | 2,394 |
| Eu-O _{dp} | 2,348 | 2,392 |

Tableau 2.6 : Longueurs des liaisons (Å) de l'environnement de coordination du métal calculées par DFT selon le modèle B3LYP/6-31G pour le complexe EuL_c.

3.3.2 Etude des propriétés thermodynamiques du ligand et des complexes

Ces études ont été menées afin d'évaluer la stabilité des complexes du ligand L_p et de vérifier si les complexes de lanthanides de cette famille de composés sont suffisamment résistants pour des applications en milieu physiologique.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la détermination de la constante de stabilité thermodynamique. Elle est associée à la formation du complexe à partir du ligand et du cation libre :



Les concentrations sont celles des espèces à l'équilibre.

Pour la détermination de cette grandeur, nous avons procédé selon deux méthodes dont la première repose sur des mesures potentiométriques, et la deuxième sur la spectroscopie d'émission.

3.3.2.1 Détermination de la constante de stabilité par potentiométrie

Les résultats décrits dans cette section sont le fruit d'une collaboration avec le Dr Carlos Iglesias-Platas et son équipe, de même que les calculs qui ont permis d'obtenir des structures de complexes en solution décrites dans les sections précédentes.

Dans l'équation [2.8], les concentrations sont celles des espèces libres à l'équilibre. Cependant lorsqu'on est en solution aqueuse, la complexation du métal est en compétition avec la protonation. Le calcul de la constante de stabilité implique la détermination préalable des constantes de protonation du ligand ainsi que celles associées à la protonation du complexe.

- **Détermination des pK_A du ligand**

Les constantes de protonation sont associées aux équilibres acido-basiques du ligand. Leurs valeurs ont été obtenues par une combinaison de titrages par absorption UV-Vis et de titrages potentiométriques en fonction du pH.

Sur les multiples protonations susceptibles de se produire lorsque le ligand L_p^{8-} complètement déprotoné est en solution aqueuse, seules les constantes associées aux six premiers équilibres ont pu être déterminées (Tableau 2.7).

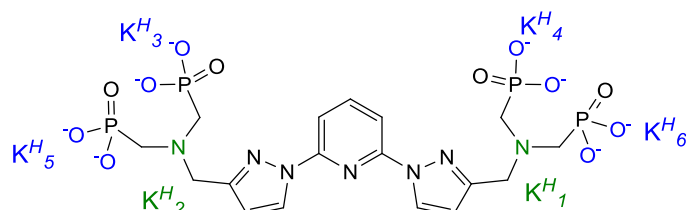


Schéma 2.11 : Représentation du Ligand L_p et quelques sites de protonation.

Elles correspondent respectivement aux protonations des amines tertiaires, et aux premières protonations des quatre entités phosphonates. Les autres constantes font intervenir des espèces qui n'existent pas en solution dans la gamme de pH étudiée.

| $\text{Log}K^{H_1}$ | $\text{Log}K^{H_2}$ | $\text{Log}K^{H_3}$ | $\text{Log}K^{H_4}$ | $\text{Log}K^{H_5}$ | $\text{Log}K^{H_6}$ |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 11,82 | 9,17 | 6,87 | 5,81 | 4,75 | 1,48 |

Tableau 2.7 : Valeur des constantes de protonation du ligand L_p déterminées par potentiométrie.

- **Détermination des pK_A du complexe**

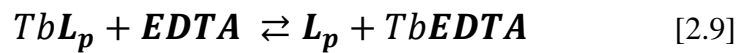
Les calculs de DFT menés par l'équipe du Dr. Carlos Platas-Iglesias ont montré en ce qui concerne le complexe de L_p avec l'euprium l'existence d'au moins deux formes protonées. Il est donc impératif de tenir compte de ces équilibres de protonation du complexe pour la détermination pertinente d'une constante de stabilité par potentiométrie.

Cependant, la précipitation systématique des complexes à pH acide (inférieur à 4) ne nous a pas permis de mener à bien cette étude, et la détermination de la constante de stabilité des complexes par potentiométrie n'était pas possible. Nous nous sommes donc intéressés à l'alternative qu'est la compétition avec un ligand : l'EDTA.

3.3.2.2 Détermination de la constante de stabilité par compétition avec l'EDTA

Tandis que les études potentiométriques consistaient en une compétition entre la complexation du cation lanthanide et les protons présents en solution aqueuse, il s'agit ici de mettre le ligand L_p en compétition avec un autre chélatant pour la coordination des lanthanides. L'éthylène diamine tétraacide acétique (EDTA) a été sélectionné pour cette manipulation car il est réputé pour former des complexes très stables en milieu physiologique, et également parce qu'avec une denticité élevée et des acides durs, ce ligand a une affinité importante à l'égard des cations lanthanides.^{[27],[28],[29]}

L'ajout de ce ligand compétiteur à une solution du complexe de terbium va engendrer un nouvel équilibre qui correspond à la formation d'un complexe avec l'EDTA :



Cette compétition a été suivie par spectroscopie d'émission, à partir d'un complexe de terbium TbL_p ($c = 4,95 \times 10^{-5}$ M) dans une solution de tampon TRIS/HCl (0,01 M) à pH = 7,4.

De l'équilibre de l'équation [2.9] on dérive une formule de calcul de la constante de stabilité conditionnelle du complexe avec le ligand L_p en fonction de la constante de stabilité conditionnelle du complexe avec l'EDTA.

$$K_{L_p cond} = K_{EDTA cond} \frac{[EDTA][TbL_p]}{[L_p][TbEDTA]} \quad [2.10]$$

La comparaison des constantes de stabilité conditionnelles n'est pas très pertinente, puisque leurs valeurs sont déterminées en fonction du pH de la solution. Il existe cependant une relation entre ces constantes conditionnelles et la constante de stabilité thermodynamique absolue :^[30]

$$K_{cond} = K \times \alpha$$

$$\text{avec } \alpha = (1 + K_1^H[H^+] + K_1^H K_2^H [H^+]^2 + \dots)^{-1} \quad [2.11]$$

Cette formule prend en compte les différentes constantes de protonation des ligands. Celles de l'EDTA sont données dans la littérature,^[31] tandis que celles du ligand L_p ont pu être déterminées par potentiométrie.

À des solutions de complexe de terbium ont été rajoutées des concentrations croissantes d'EDTA (0,1 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 eq ...) et les spectres d'émission des solutions correspondantes ont été mesurés, mettant en évidence la décomplexation du complexe TbL_p à travers la diminution puis la disparition complète des bandes d'émission caractéristiques du terbium. Le traitement des données de ce titrage par le logiciel SPECFIT a permis d'obtenir la constante de stabilité conditionnelle puis de calculer une constante de stabilité thermodynamique absolue ($\log K = 20,4 \pm 0,4$).

Ce résultat est satisfaisant et accrédite la thèse d'un effet stabilisateur des complexes par remplacement des carboxylates ($\log K = 16,18 \pm 0,02$) par des phosphonates.^[21]

II. Étude des ligands phosphonates fonctionnalisés

Après la synthèse d'un ligand modèle et représentatif de la famille de marqueurs phosphonates auxquels ce travail de thèse s'intéresse, la contribution des entités phosphonates à la stabilité des complexes et l'influence sur les propriétés spectroscopiques ont pu être estimées. Nous nous intéressons par la suite à l'obtention de ligands suffisamment réactifs pour permettre une interaction covalente, forte et spécifique en milieu biologique avec les biomarqueurs auxquels nous souhaitons lier les complexes. Pour ce faire, nous allons étudier l'introduction d'une chaîne latérale puis son activation en vue de réaliser le marquage de biomolécules.

1. Insertion d'une chaîne latérale

Le jeu de substitutions nucléophiles aromatiques décrit en première partie a permis d'obtenir le composé **10b**, précurseur du ligand **L_p**. Il a également conduit à l'obtention du composé **10a**, substrat où la position *para* de la pyridine est différenciée des autres positions par la présence d'un atome de brome. C'est grâce à la réactivité particulière de cette position qu'il sera possible d'effectuer des modifications fonctionnelles de la plate-forme de photosensibilisation. En effet, les bromures d'aryle sont des composés aisément modifiés par des réactions de couplage avec des dérivés aromatiques (couplage de Suzuki^{[32]-[33]}), ou non (couplage de Heck^[34]).

Il convient au préalable de greffer les éléments de coordination lors d'une réaction de substitution nucléophile avec l'aminophosphonate **8**. Cette réaction est réalisée en présence de carbonate de potassium K_2CO_3 et le produit de bis-substitution des bromures d'alkyle est majoritairement obtenu.

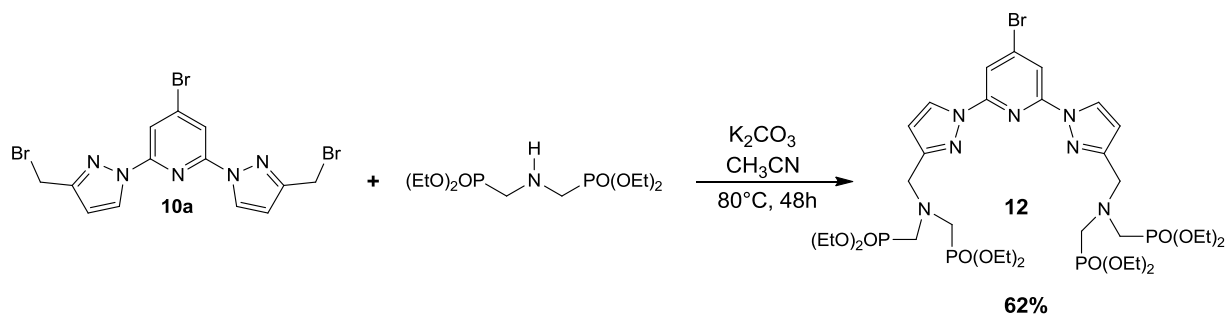


Schéma 2.12 : Insertion des groupements aminophosphonates au sein de la plateforme tribromée **10a**.

Par la suite, deux chaînes aliphatiques distinctes ont été greffées au composé **12**. L'utilisation de chaînes aliphatiques l'une se terminant par un groupement acide carboxylique l'autre par une amine primaire a conduit aux ligands **L₁** et **L₂** respectivement.

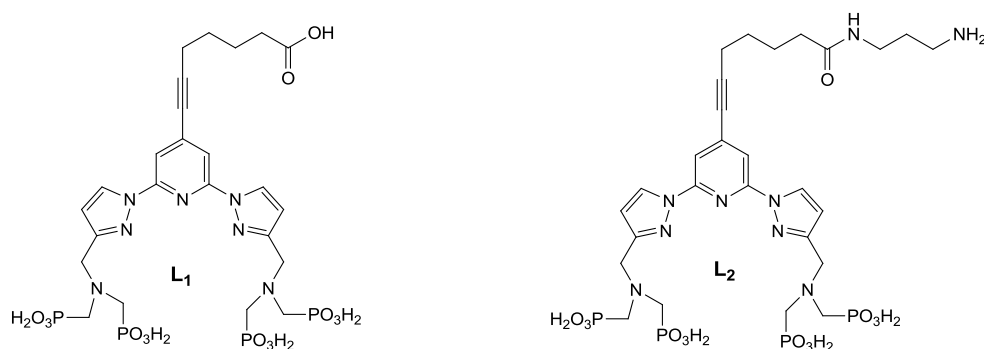


Schéma 2.13 : Formules semi-développées des ligands **L₁** et **L₂**.

1.1 Synthèse du ligand **L₁**

Dans le cadre de la synthèse des ligands **L₁** et **L₂**, nous nous sommes intéressés à un couplage de type Sonogashira,^[35] faisant intervenir un alcyne terminal et un bromure d'aryle. Ce couplage $sp-sp^2$ est rendu possible par l'action catalytique du Pd(II) et du Cu(I) en présence de triéthylamine, qui joue le rôle de base et de solvant.

Le choix de l'alcyne pour le ligand **L₁** s'est porté sur l'acide 6-heptynoïque qui est par ailleurs un bon candidat pour un large éventail de réactions de couplages organométalliques.^{[36]-[37]} L'acide heptynoïque est particulièrement intéressant dans le cadre de notre projet car il possède un groupement acide carboxylique. Grâce à la réactivité de cette fonction, il serait possible de greffer d'autres dérivés organiques, ou d'activer le ligand, facilitant ainsi les réactions avec des biomolécules qui portent des groupements nucléophiles.

Il est impératif de conduire cette réaction de couplage sous atmosphère parfaitement inerte et en absence d'eau afin de prévenir l'oxydation du cuivre (I), mais surtout de minimiser la formation de produit secondaires de réaction. En effet, en présence d'oxydant tels que le dioxygène de l'air (O_2), le palladium et le cuivre permettent également de catalyser les réactions de dimérisation des alcynes vrais lors d'une réaction de couplage de Glaser.^[38]

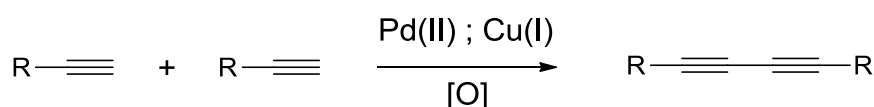


Schéma 2.14 : Réaction de dimérisation des alcynes vrais catalysée par le palladium et le cuivre.

La réaction de couplage de Sonogashira entre le bromure d'aryle **12** et l'acide 6-heptynoïque a été effectuée dans le THF anhydre et la solution a été longuement dégazée à l'aide d'un flux continu d'argon avant l'introduction du co-catalyseur. Après une nuit de réaction à reflux, ainsi qu'une étape de purification du résidu par chromatographie sur colonne, le composé **14** a pu être obtenu avec un rendement satisfaisant.

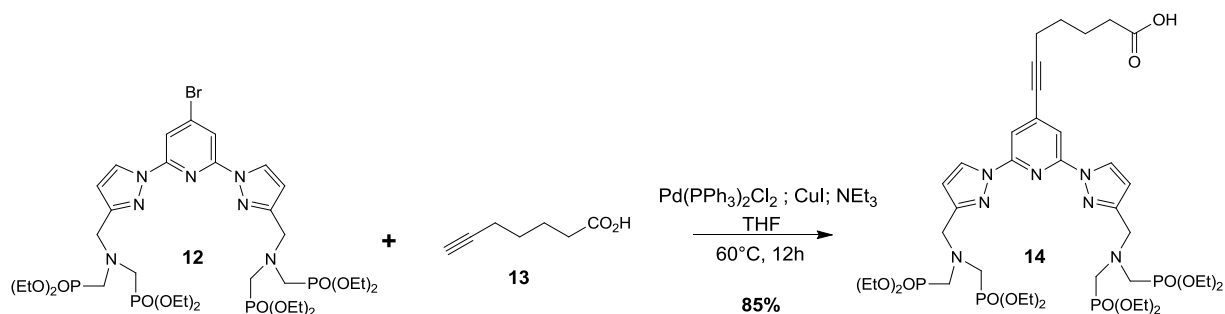


Schéma 2.15 : Couplage de Sonogashira de **12** avec l'acide 6-heptynoïque.

Pour la déprotection des esters phosphoniques, plusieurs méthodes ont été explorées. Dans un premier temps nous avons reconduit les conditions expérimentales qui avaient donné des résultats satisfaisants lors de la synthèse du ligand **L_p**.

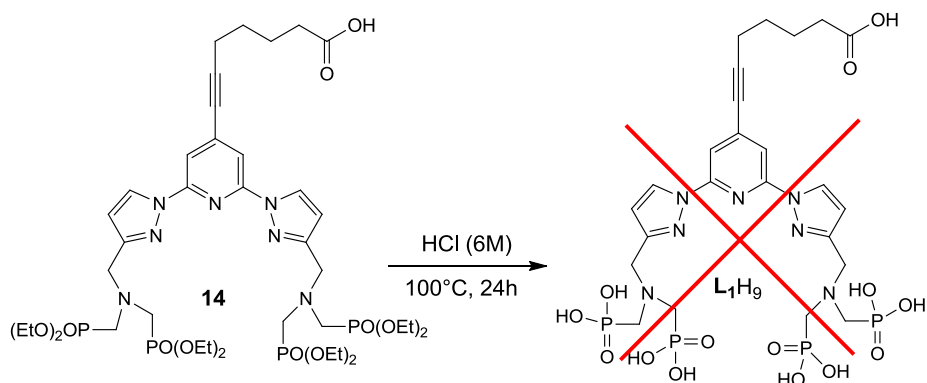


Schéma 2.16 : Déprotection des esters phosphoniques.

Malheureusement cette stratégie a conduit à l'obtention d'un composé très peu soluble que nous n'avons pas réussi à caractériser. Nous nous sommes alors tournés vers une voie de déprotection plus douce, faisant intervenir du bromure de triméthylsilane à température ambiante dans le dichlorométhane.^[39]

Dans la première partie de la réaction, grâce au caractère très oxophile des silanes et à l'utilisation d'un excès de réactif, les groupements éthyliques sont substitués par des groupements OSiMe₃.

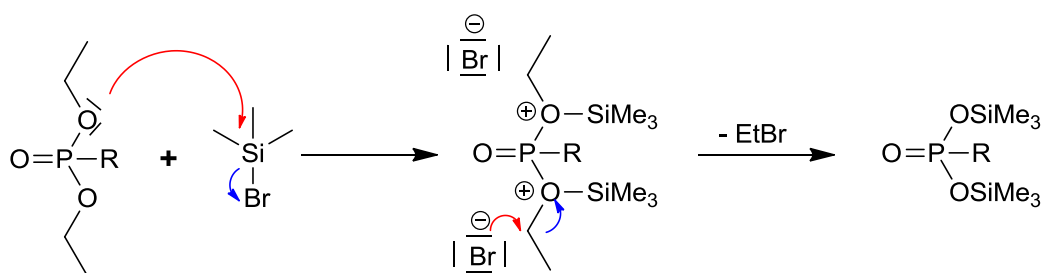


Schéma 2.17 : Mécanisme de déprotection des esters phosphoniques.

On rajoute ensuite du méthanol au mélange réactionnel qui va rentrer en compétition avec les atomes d'oxygène dans le milieu pour la formation des liaisons O-Si et ainsi hydrolyser les phosphoesters silyliques.

La comparaison des spectres RMN ^1H du précurseur (bleu) et du produit de la réaction (gris) de la figure 2.15 montre effectivement la disparition des triplets et quadruplets correspondants respectivement aux $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$ des esters éthyliques ; ainsi qu'un déplacement des signaux en alpha et gamma des atomes de phosphore vers les champs forts. Ceci augure un effet attracteur plus prononcé des groupements phosphonates, en accord avec ce qui est attendu.

On retrouve également les protons correspondants aux quatre familles de protons aliphatiques de la chaîne latérale et pour l'ensemble des signaux observés les intégrations sont cohérentes.

Cependant, on note l'apparition d'un singulet de 3 protons à 3,7 ppm, ainsi qu'un autre singulet d'un proton à champs faibles, avec les protons aromatiques ($\delta = 6,87$ ppm).

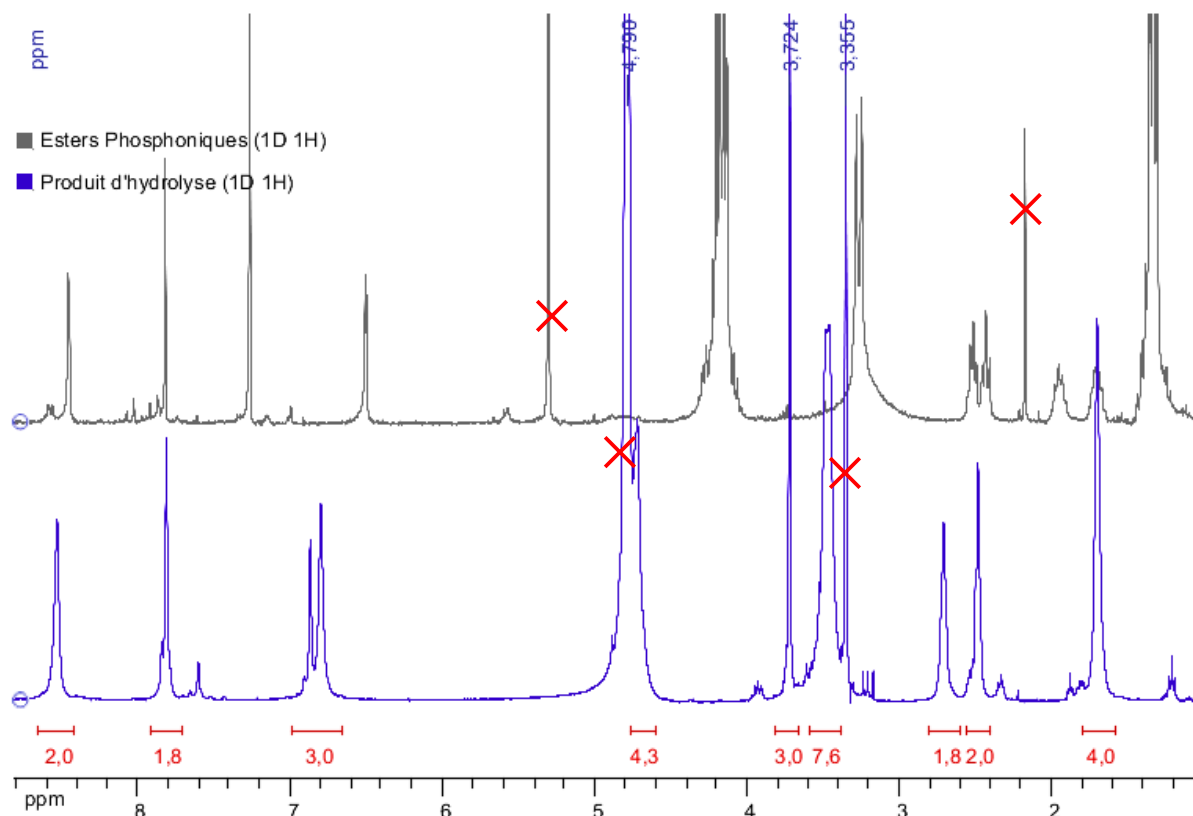


Figure 2.15 : Spectres RMN ^1H du composé **14** (bleu) et du produit de la réaction avec TMSBr (gris).

Ces informations suggèrent la formation du produit d'addition d'une molécule de méthanol sur la triple liaison et la formation d'un éther d'énol.

Cette intuition a été confirmée par les caractérisations RMN en ^{13}C et en ^{31}P .

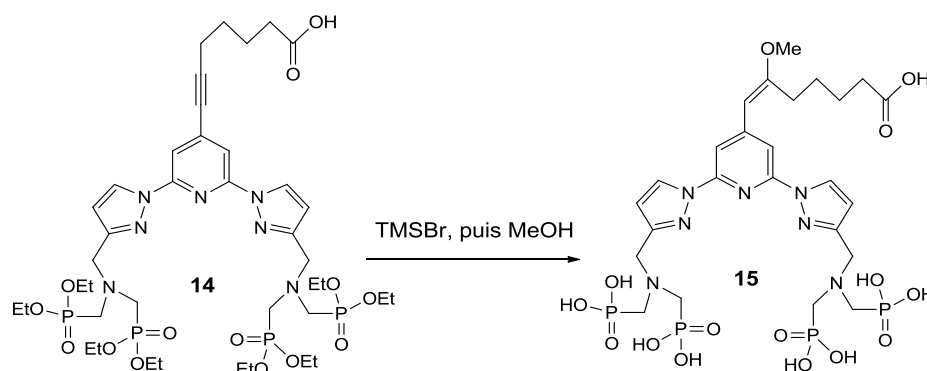


Schéma 2.19 : Formation du produit secondaire lors de la déprotection des phosphesters.

La solvolysse de la triple liaison pourrait s'expliquer par la libération d'une grande quantité de protons dans le milieu lors de l'addition du méthanol. En effet les réactions d'additions sur les alcynes sont catalysées par des acides et pour éviter la formation de produits de dégradations tels que le composé **15**, une base a été introduite afin de neutraliser

quantitativement l'acide formé dans le milieu réactionnel pendant la réaction de déprotection par action du TMSBr.

A cet effet, La 2,6-diméthylpyridine encore appelée lutidine a été choisie, puisqu'il s'agit d'une part, d'une base faible et encombrée très peu nucléophile et qu'elle ne risque pas de participer à la dégradation de la triple liaison. D'autre part, elle est soluble en milieu organique, ce qui permet de l'introduire dans le milieu en début de réaction. Cependant, l'inconvénient majeur lié à son utilisation, est la difficulté de son élimination du milieu réactionnel.

Le pK_A de la lutidine a une valeur de 6,6.^[40] Elle est nettement supérieure à celles correspondant à trois des constantes d'acidité des phosphonates, telles que déterminées par les études potentiométriques menées sur le ligand L_p (voir tableau 1.4). En présence de lutidine, il y aura une prototropie entre les hydroxydes des phosphonates et l'atome d'azote de la lutidine, et le ligand sera donc sous une forme déprotonée, associé à un ou plusieurs cations lutidinium.

D'autres bases ont été testées (triéthylamine, pyridine) afin d'évaluer leur facilité d'élimination du milieu réactionnel, mais elles ont toutes conduit à des résultats médiocres.

Un exemple de la littérature décrit la déprotection douce des phosphoesters en présence de collidine^[41] ou 2,4,6-triméthylpyridine, molécule très semblable à la lutidine. Cependant, son élimination se fait par échange de cation lors de l'addition d'une solution d'hydroxyde de soude. Cette manipulation ne serait pas sans risque pour l'intégrité de la molécule à cause de la réactivité de la triple liaison. De plus, la 2,6-diméthylpyridine est une base moins toxique que son homologue trois fois méthylée.

La seule alternative trouvée jusqu'ici est la multiplication des lavages du produit de réaction par le méthanol qui permet de réduire considérablement la proportion de lutidine. Le ligand L_1 est isolé dans ces conditions sous forme de poudre brune.

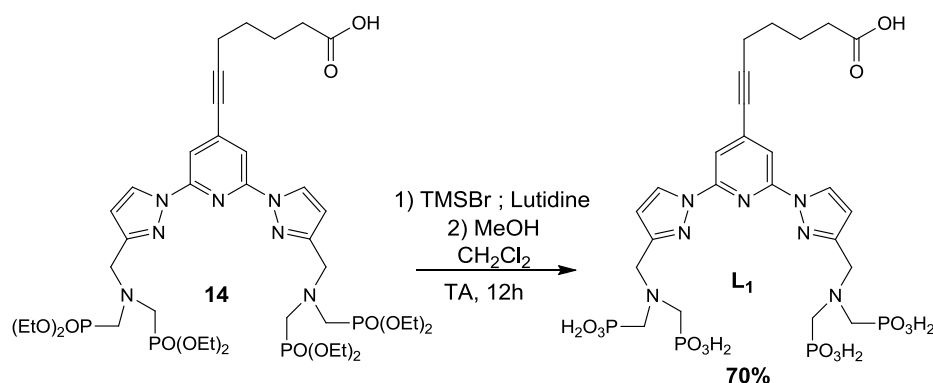


Schéma 2.20 : Déprotection des phosphoesters et synthèse du ligand L_1 .

1.2 Synthèse du ligand L₂

Le ligand L₂ diffère du ligand L₁ par le fait que la chaîne alkyle se termine ici par une amine et non un acide carboxylique. Cette variation au niveau de la chaîne latérale permet d'envisager d'autres voies d'activation et de fonctionnalisation. En outre, la taille de l'espaceur pourrait avoir une influence sur les réactions de marquage des protéines.

Dans un premier temps, un autre substrat pour la réaction de couplage de Sonogashira a été préparé en incorporant une diamine protégée de l'acide heptynoïque.

La stratégie de synthèse convergente adoptée consiste en une monoprotection préalable de la propylène diamine **16**. La diamine a été introduite en solution dans le chloroforme, puis à température ambiante, une autre solution de di-terbutylcarbonate dans le chloroforme a été ajoutée. L'utilisation d'un seul équivalent du carbonate permet d'isoler le composé **17** au bout de quatre heures de réaction, tel que décrit par la littérature.^[42] Ce composé a ensuite été engagé dans une réaction de couplage peptidique avec l'acide 6-heptynoïque. L'activation de l'acide carboxylique a été réalisée avec le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) comme agent de couplage, en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et de diisopropyléthylamine (DIEA), ce qui a permis d'obtenir l'amide **18**.

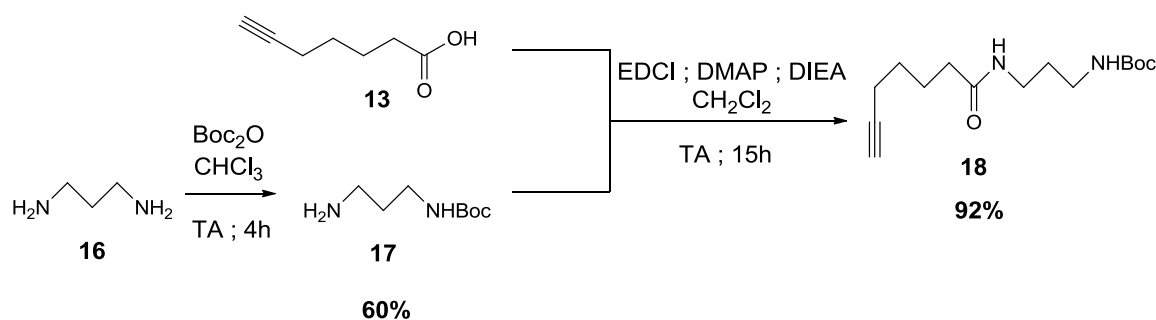


Schéma 2.21 : Synthèse d'un intermédiaire nucléophile protégé pour le couplage de Sonogashira.

Cet alcyne intermédiaire en ensuite couplé au composé **12** lors d'un couplage de Sonogashira. La réaction a eu lieu dans le THF anhydre et le palladium et le cuivre ont permis de catalyser la réaction. On isole le composé **19** avec un rendement de 88%.

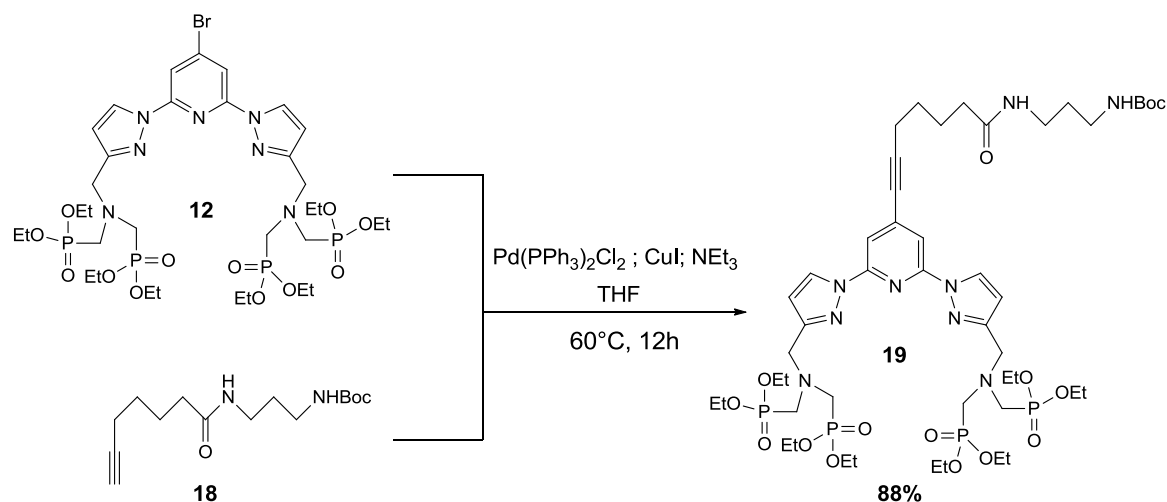


Schéma 2.22 : Déprotection des phosphoesters et synthèse du ligand **L₂**.

La déprotection sélective de l'amine terminale a pu être réalisée par action d'acide trifluoroacétique et le composé est isolé après simple évaporation du solvant sous forme de sel de triflate. L'hydrolyse des phosphoesters en présence d'un large excès de TMSBr et de lutidine conduit à l'obtention du ligand **L₂** avec un rendement de 80% pour les deux étapes.

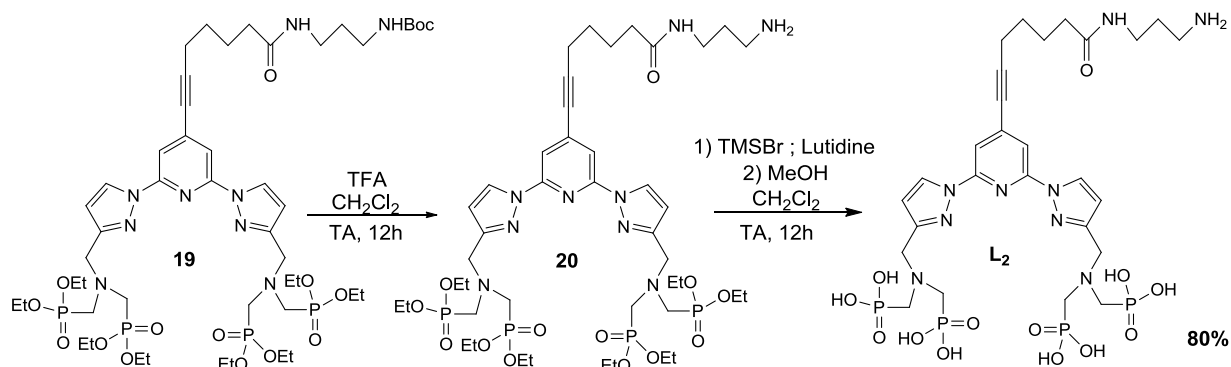


Schéma 2.23 : Déprotection des phosphoesters et synthèse du ligand **L₂**.

Le spectre RMN ¹H de ce ligand fait apparaître les signaux caractéristiques des protons des pyrazoles et de la pyridine centrale dans la région des champs faibles. Malgré la complexité de la région des faibles déplacements chimiques, nous avons pu attribuer les signaux des familles de protons aliphatiques. Ce dernier a pu être caractérisé par spectroscopie RMN ¹H.

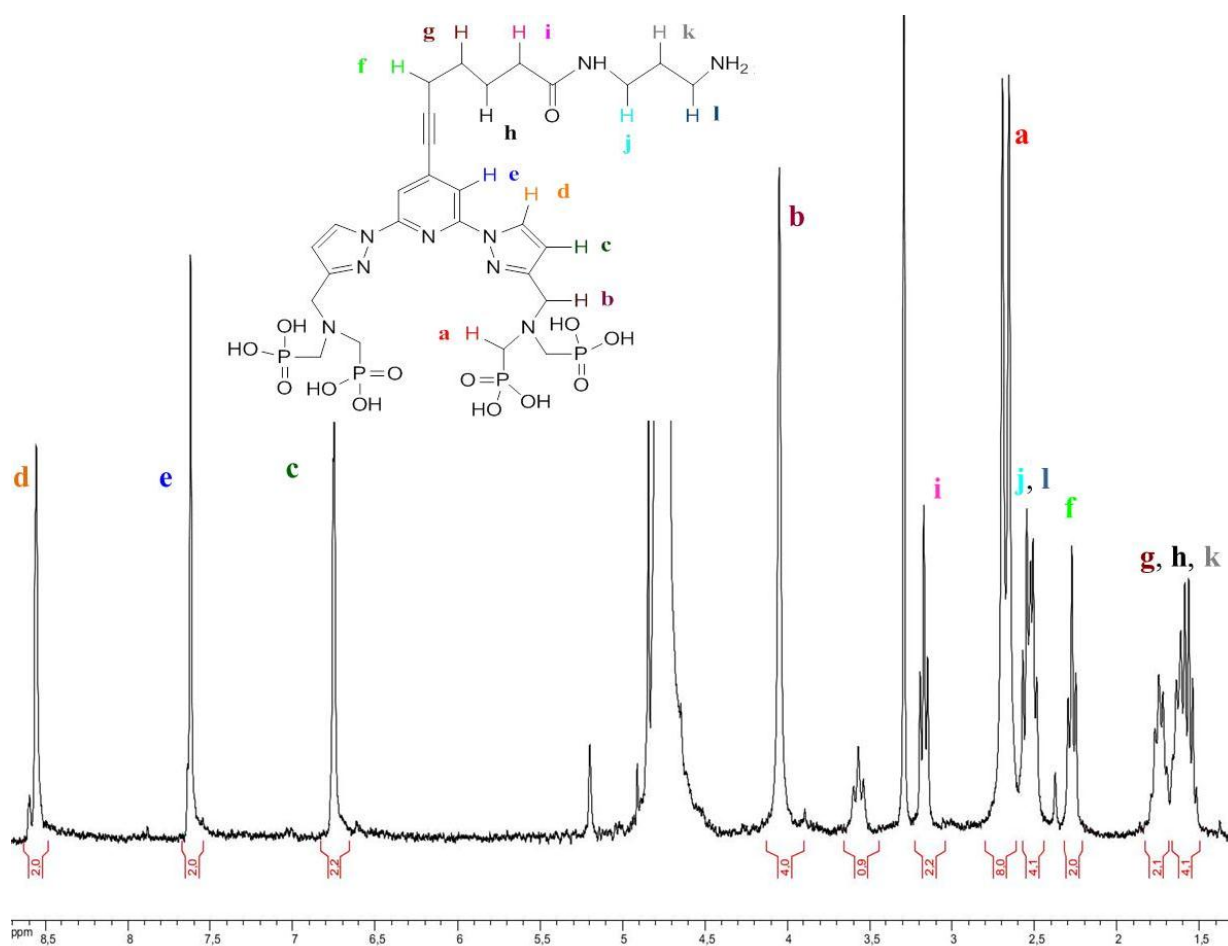


Figure 2.16 : Spectre RMN ^1H du ligand L_1 (D_2O , 300 MHz, t.a.).

Le ligand L_2 diffère du ligand L_1 par deux paramètres déterminants pour les réactions de marquage qui sont la longueur de l'espaceur et la nature du groupement réactif.

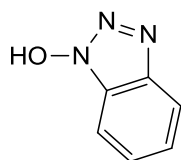
La distance entre la protéine et le marqueur n'est pas anodine. Si elle est trop courte, il pourrait en effet y avoir une perturbation de l'activité biologique, à cause d'un encombrement stérique ou d'une autre interaction avec le site actif. Si l'espaceur au contraire est trop grand, la distance entre les marqueurs des différents anticorps dans l'hypothèse de la formation d'un immunocomplexe sandwich (voir Schéma 1.15) le sera d'autant plus, et entrainera une diminution de l'efficacité du transfert d'énergie (équation [1.7]).

En ce qui concerne la taille de l'espaceur, le ligand L_1 possède une chaîne latérale en C7, tandis que celle du ligand L_2 est plus longue de 3 atomes de carbone et 2 atomes d'azote, mais il est difficile de prédire laquelle de ces deux distances est optimale pour le transfert d'énergie.

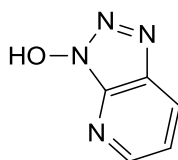
2. Activation des groupements fonctionnels

L'activation des acides carboxyliques se fait à travers l'introduction d'un meilleur groupement partant que le $-OH$ en alpha du carbonyle. Cette transformation peut se faire *in situ* en présence de l'amine ou alors en isolant l'intermédiaire réactif au préalable. C'est cette méthode qui sera retenue dans le cadre de notre travail pour l'activation des marqueurs, puisqu'elle réduit le risque de dégradation des protéines et de formation de produits secondaires.

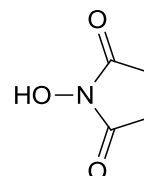
Parmi les différentes fonctions susceptibles d'améliorer la réactivité des acides carboxyliques (halogénures d'acyles, anhydrides...), les esters d'alcools aromatiques sont particulièrement avantageux car ils réagissent en général proprement dans des conditions relativement douces. Ils sont formés à partir d'alcools aromatiques ou cycliques stabilisés par la délocalisation électronique ou des groupements électroattracteurs (Schéma 2.24).



Hydroxy benzotriazole
HOBt



1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOAt



N-hydroxysuccinimide
HOSu

Schéma 2.24 : Quelques alcools utilisés pour l'activation des acides carboxyliques.

Pour l'activation du ligand L_1 , c'est l'alcool HOSu que nous retiendrons car en plus de sa réactivité, il présente l'avantage d'être soluble en milieu aqueux et il est facilement éliminé du milieu réactionnel à travers des lavages avec une solution aqueuse.

2.1 Activation du ligand L_1

Les esters NHS sont obtenus en faisant réagir l'acide carboxylique avec l'agent de couplage *N,N'*-disuccinimidyl carbonate (DSC). Le choix du solvant dépend de la nature des réactifs, puisqu'il doit permettre de les solubiliser pour la réaction. L'agent de couplage DSC est soluble en milieu organique, mais en milieu aqueux il s'hydrolyse facilement pour redonner l'alcool. *A contrario*, le ligand L_1 n'est pas du tout soluble dans les solvants organiques, et sa solubilité en milieu aqueux augmente avec le pH de la solution. Afin d'améliorer sa solubilité en milieu organique, de l'hydroxyde de tetrabutyl ammonium a été introduit à une solution aqueuses du ligand L_1 . Tandis que l'anion va permettre de déprotoner les phosphonates, le cation va accroître l'affinité du ligand à l'égard des solvants organiques.

Après élimination d'eau, le sel obtenu a ainsi pu être dissous dans l'acétonitrile, solvant dans lequel s'effectue bon nombre des réactions de couplage des ester NHS, ^{[43]-[44]} en présence de triéthylamine.

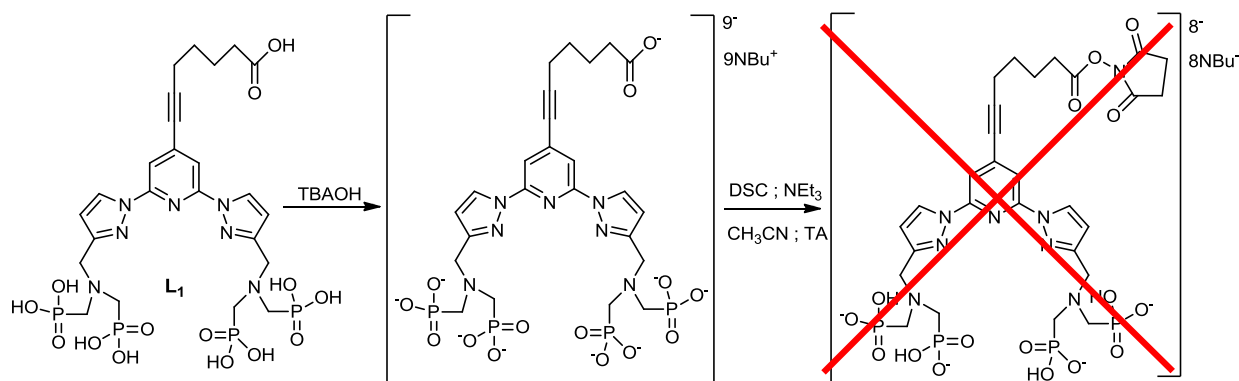


Schéma 2.25 : Synthèse d'un ester activé à partir des sels de phosphonates.

Cependant, le produit attendu n'a pas pu être isolé dans ces conditions. L'échec de stratégie pourrait être dû à une compétition entre les phosphonates et le groupement carboxylate lors de l'attaque du groupement réactif. Si l'on envisage plutôt une catalyse acide de cette réaction d'estérification, il se posera plutôt le problème de la faible nucléophilie du groupement acide carboxylique qui sera lui aussi protoné. L'alternative trouvée consiste à introduire le groupement activé avant la déprotection des esters phosphoniques.

2.1.1 Activation des précurseurs

Pour cette réaction, le composé **14** a été mis en solution dans l'acétonitrile en présence de triéthylamine et un léger excès de DSC a été rajouté à la solution sous atmosphère contrôlée. La réaction a lieu à température ambiante et au bout de deux heures, le mélange réactionnel est évaporé à sec.^[45] Le résidu huileux obtenu est dissous dans le dichlorométhane et lavé à l'aide d'une solution saturée en chlorure d'ammonium. Ce lavage aqueux permet non seulement d'hydrolyser l'excès de DSC n'ayant pas réagi, mais également d'éliminer les produits secondaires de réaction et les sels d'ammonium. C'est ainsi que l'ester activé **21** a pu être isolé après évaporation du solvant sans purification supplémentaire.

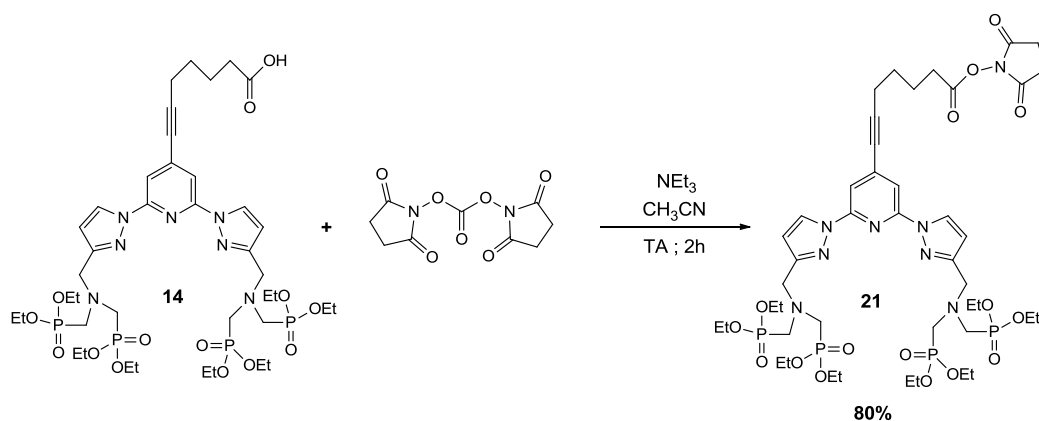


Schéma 2.26 : Activation de l'acide carboxylique du composé **14** en ester NHS.

Le composé **20**, précurseur du ligand **L₂** a également pu être activé lors de sa réaction avec l'agent de couplage DSC dans des conditions similaires :

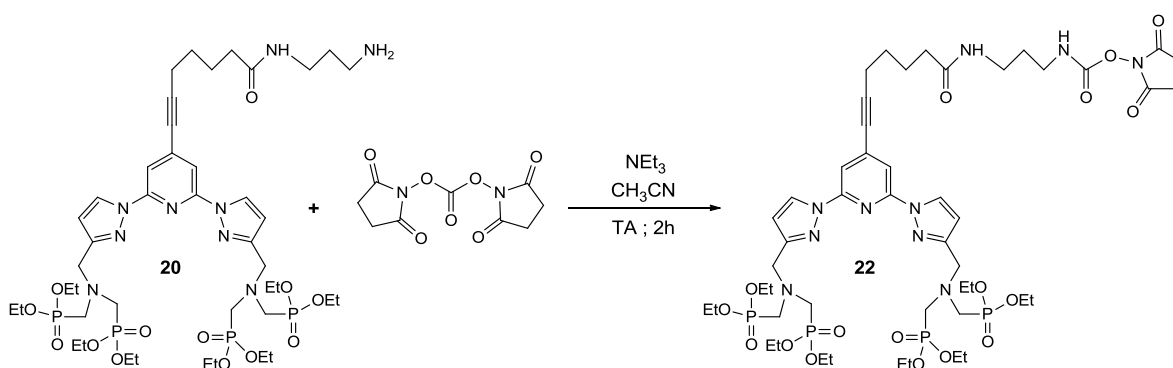


Schéma 2.27 : Activation de l'amine primaire du composé **20** en carbamate NHS.

Cette réaction d'activation consiste en la formation d'un carbamate activé, qui pourrait donc réagir avec des groupements nucléophiles.

2.1.2 Hydrolyse sélectives des précurseurs activés

Les groupements N-hydroxysuccinimidyl portés par les composés **21** et **22** sont très réactifs et pourraient aisément être hydrolysés par des variations de température et/ou de pH. Il était donc important de réaliser l'hydrolyse sélective des esters phosphoniques dans des conditions particulièrement douces. Le mode opératoire adopté consistait une fois de plus à faire réagir le précurseur phosphonaté avec un large excès de TMSBr, en présence de lutidine et à température ambiante.

Un premier test a été effectué avec l'intermédiaire **21**. Cependant malgré les précautions prises durant le traitement du milieu réactionnel, la fonction activée a été hydrolysée lors de l'ajout de méthanol, et le produit de trans-estérification a alors été obtenu. Il a donc fallu

mettre au point une nouvelle méthode de traitement du milieu réactionnel et les paramètres modifiés sont énumérés ci-dessous :

- Le nombre d'équivalents de TMSBr introduit dans le milieu réactionnel a été réduit de moitié, passant ainsi de 10 à 5 équivalents par fonction à hydrolyser.
- Le temps de réaction a lui aussi été réduit de moitié.
- La solvolysse est réalisée en une étape d'ajout-évaporation du méthanol à température ambiante
- L'excès de lutidine non complexé est éliminé par lavage au dichlorométhane

Ces opérations ont permis d'isoler le ligand **L₃**, analogue activé du ligand **L₁** sous la forme d'un sel de lutidinium.

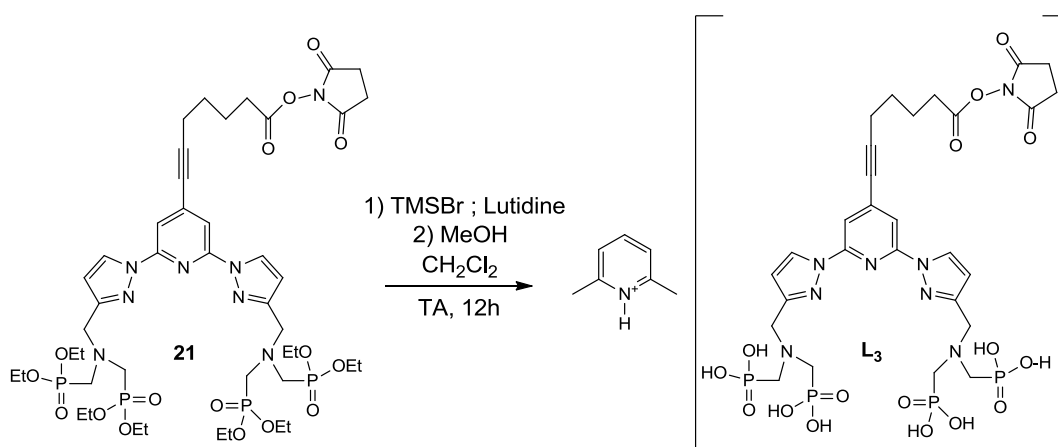


Schéma 2.28 : Réaction d'hydrolyse des esters phosphoniques en présence de la fonction réactive ester NHS.

Ce résultat est confirmé par les analyses en spectrométrie RMN (¹H et ³¹P), mais aussi en spectrométrie de masse ou en spectroscopie infra rouge.

- Caractérisation par spectrométrie RMN du ligand **L₃**

Malgré sa faible solubilité, le ligand **L₃** a pu être partiellement dissous dans D₂O. Le spectre RMN ¹H enregistré dans ces conditions est constitué en majorité de pics fins et bien résolus. Dans la région des champs forts, le pic intense à 2,96 ppm qui intègre pour 4 protons est attribué aux -CH₂ de la fonction ester N-succinimide. La comparaison de cette valeur à celle obtenue dans le cas d'un hydroxysuccinimide (2,79 ppm) dans le même solvant confirme la présence de l'ester activé. On observe également dans la même région un singulet à 2,09 ppm. Il est attribué aux -CH₃ de la lutidine rémanente, de même que le doublet à 6,75 ppm. L'intégration de ces signaux de la lutidine suggère qu'il reste une mole de lutidine pour deux moles de ligands. Les 8 protons aliphatiques en alpha du phosphore sont caractérisés par le

doublet à 2,34 ppm, tandis que les protons des $-CH_2$ en alpha des pyrazoles font un singulet de 4 protons à 3,71 ppm.

En ce qui concerne les protons aromatiques des noyaux pyrazoliques et de la pyridine centrale, ils sont répartis en trois familles de protons équivalents apparaissant sous la forme de deux doublets et d'un singulet.

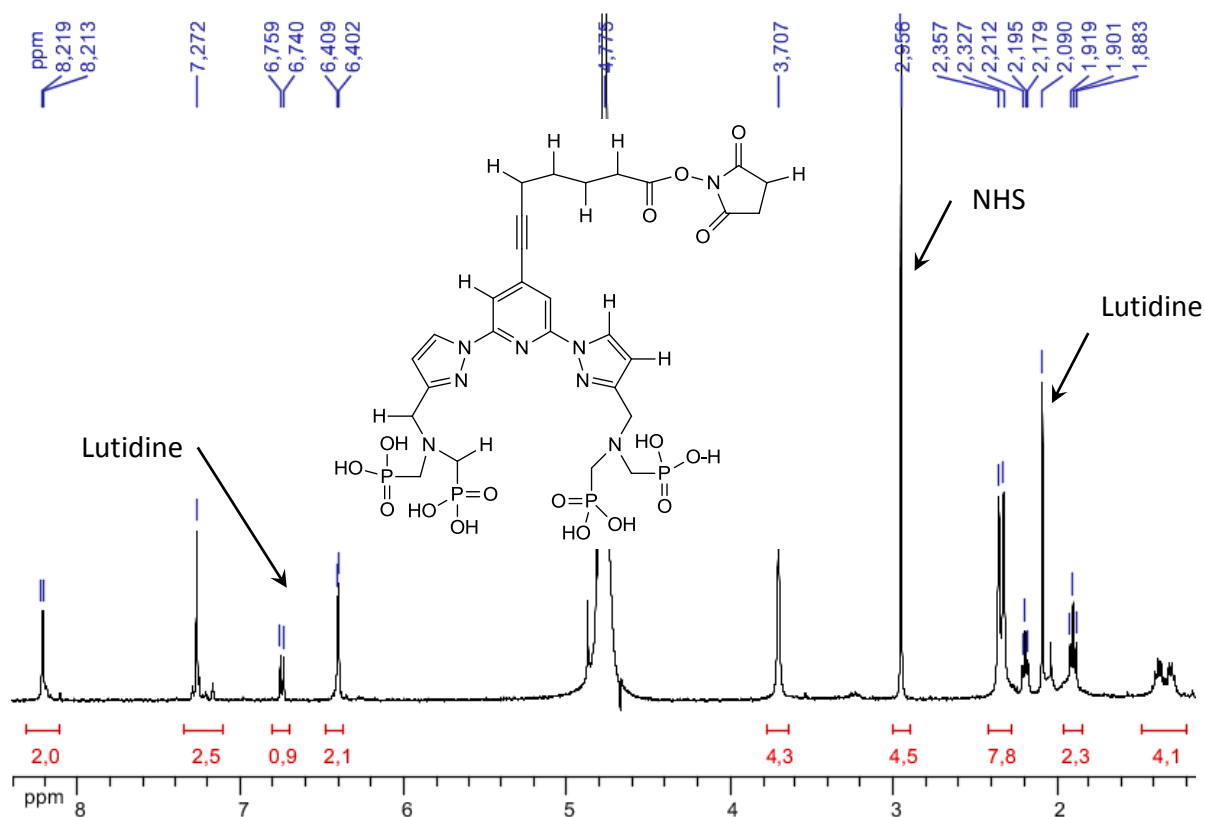


Figure 2.17 : Spectre RMN 1H du ligand L_3 (D_2O , 400 MHz, t.a.).

Une analyse RMN du même échantillon réalisée après plusieurs heures montre qu'il y a hydrolyse de l'ester en solution dans D_2O (déplacement du pic à 2.96 ppm à 2.70 ppm).

Les conditions réactionnelles similaires à celles ayant conduit au ligand L_3 ont été reprises pour d'hydrolyse sélective des esters phosphoniques du composé **21** dont l'amine est activée en carbamate.

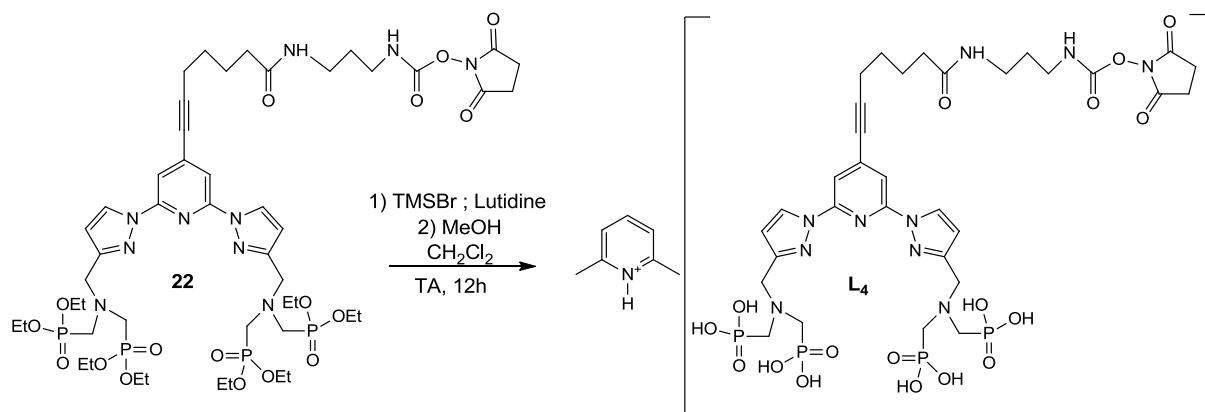


Schéma 2.29 : Réaction d'hydrolyse des esters phosphoniques en présence de l'amine activée en carbamate.

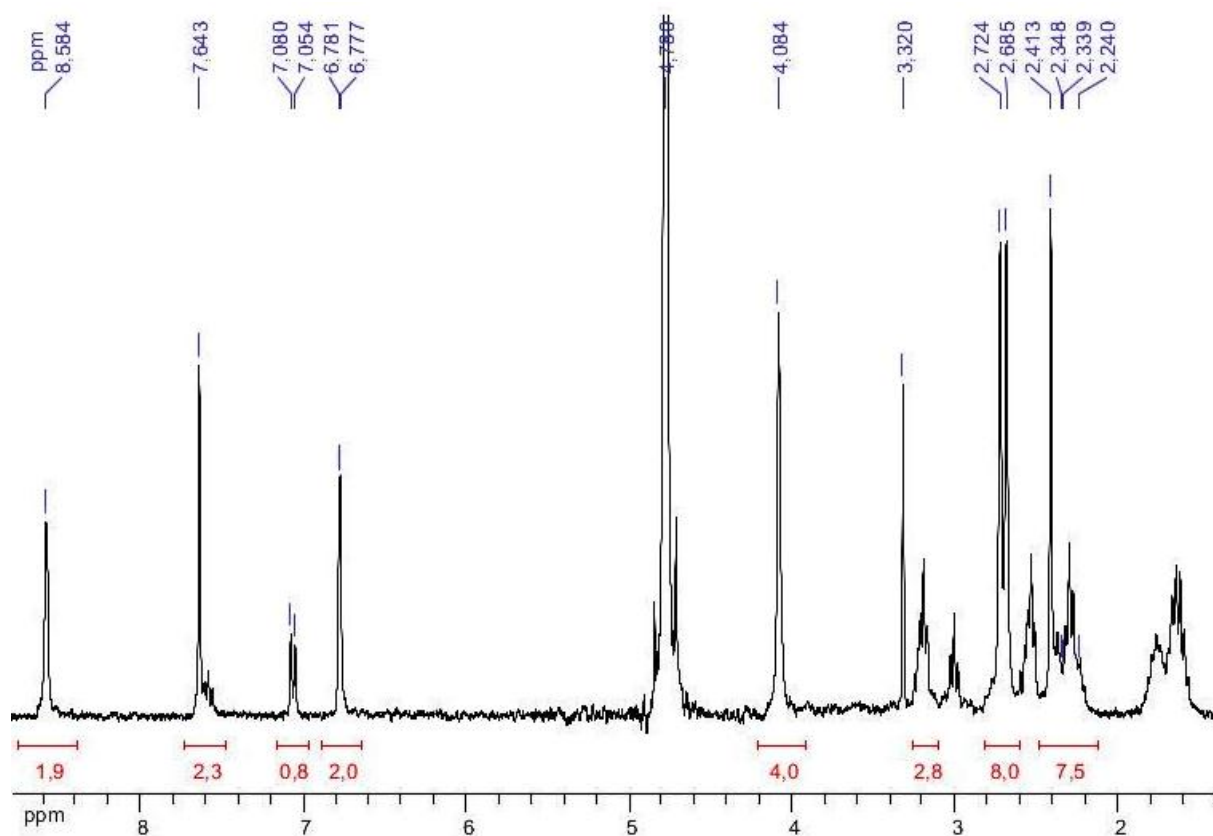


Figure 2.18 Spectre RMN ¹H du ligand L₄ (D₂O, 300 MHz, t.a.).

- Analyse par HPLC du ligand L₃ :

Cette étude a consisté à analyser le produit de déprotection des esters phosphoniques afin de confirmer la formation du ligand L₃ et son association à la lutidine par chromatographie liquide à haute pression. Compte tenu de la polarité importante du chélatant, les études ont été réalisées sur des colonnes en phase inverse (C18) dans des conditions de

séparation préalablement optimisées. Lors de l'exécution du programme deux solvants ont été utilisés ; l'eau acidifiée avec 0,1% (v/v) en TFA (solvant A) et un mélange d'acétonitrile avec 0,1% (v/v) en TFA (solvant B). Ce dernier a montré qu'il pouvait améliorer l'allure des chromatogrammes.

Le mélange à purifier a été dissous dans de l'eau ultrapure à une concentration d'environ 10^{-6} M puis quelques microlitres de cette solution ont été injectés. Les meilleurs résultats ont été obtenus à partir d'un programme faisant alterner des phases d'élution en mode isocratique et en mode gradient sur une durée totale de 25 minutes. Le chromatogramme obtenu est représenté à la figure 2.19.

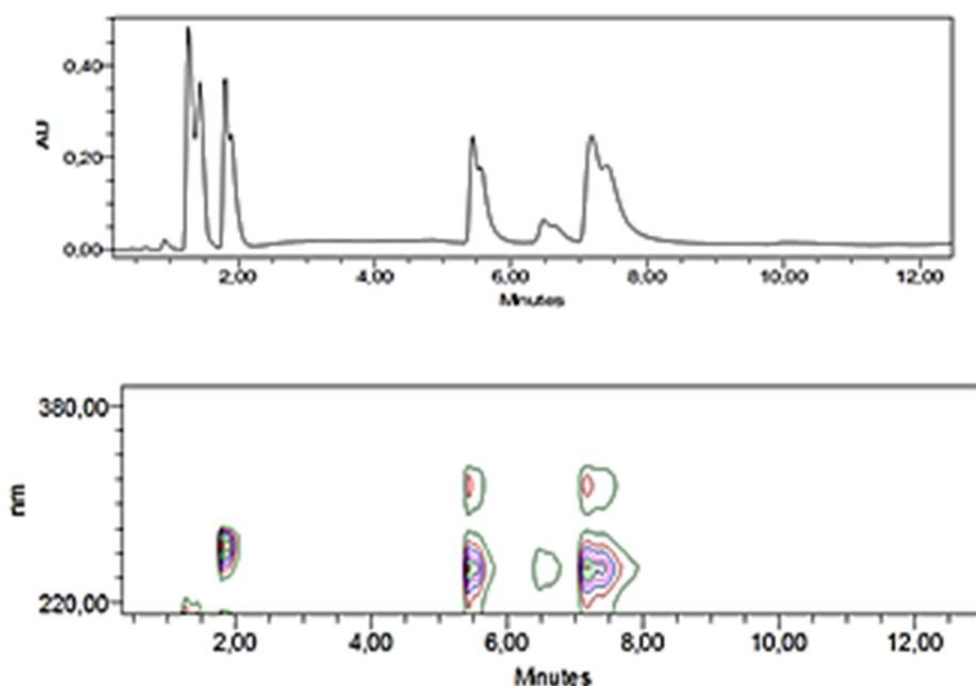


Figure 2.19 : En haut : chromatogramme obtenu lors de l'analyse du ligand L_3 par HPLC (détection à 210 nm). En bas : Variation de l'absorption au cours de l'élution.

L'analyse des constituants du mélange se fait à l'aide d'un détecteur UV-Vis et la partie supérieure de chromatogramme montre l'évolution de l'absorbance de la solution injectée en fonction du temps. Il y apparaît 4 pics principaux caractérisés par des temps de rétention différents. Au-delà de 8 minutes d'élution, il n'y a plus d'absorption significative.

La partie inférieure du chromatogramme qui donne le profil d'absorption de chacun des pics séparés fournit elle aussi des informations intéressantes. Par exemple, l'absence d'absorption significative pour le premier pic et son temps de rétention très faible indiquent qu'il correspond à des sels ou à des résidus inintéressants. Le second pic quant à lui absorbe uniquement autour de 260 nm, tandis que les autres produits ont des profils d'absorption

similaires qui vont jusqu'à 340 nm. Au cours de la séparation, la lutidine donc est éluée la première, suivie du ligand **L₃** et d'éventuels produits de dégradation.

Ces suppositions ont pu être vérifiées à travers la collecte des pics à des moments stratégiques. Les produits séparés ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et les valeurs de m/z obtenues sont recensées dans le tableau 2.8 :

| Pic | Temps de retention | Rapport m/z | Maximum d'absorption (nm) | Identification |
|-----|--------------------|-------------|---------------------------|----------------------|
| 1 | 1,5 min | - | - | Pic d'injection |
| 2 | 2 min | 108 | ≈ 260 | Lutidine |
| 3 | 5,5 min | 770 | ≈ 250, 340 | L₁ |
| 4 | 6,5 min | 785 | ≈ 250 | Ester méthylique |
| 5 | 7,5 min | 867 | ≈ 250, 340 | L₃ |

Tableau 2.8 : Attribution des pics identifiés par spectrométrie de masse pour les fractions isolées après HPLC.

La formation du ligand **L₁** pourrait s'expliquer par l'hydrolyse de l'ester activé lorsqu'il est mis en solution dans l'eau. Tandis que le quatrième pic résulterait d'une réaction de trans-estérification lors de l'étape de méthanolyse.

Cette analyse par HPLC confirme la formation du ligand **L₃**, mais elle met également en évidence la facilité de dégradation de la fonction réactive lorsque des nucléophiles faibles sont présents en solution. Afin de mieux appréhender les réactions de marquage des protéines, nous avons au préalable mené une étude de la cinétique d'hydrolyse de cet ester.

2.2 Etude de la cinétique de dégradation du ligand activé

Les réactions de marquage des protéines se déroulent pour la plupart en milieux aqueux. Cependant l'hydrolyse de l'ester activé en milieu aqueux a été mise en évidence dans la section précédente. Avant la mise en œuvre des réactions de marquage, il nous semblait pertinent de déterminer la durée de vie du groupement ester activé. Cette étude a été réalisée dans trois solvants distincts correspondants à des milieux acide, neutre et basique.

- Milieu neutre : Eau ultrapure (pH = 6,5)
- Milieu acide : 0,1% de TFA a été rajouté à de l'eau ultra pure (pH = 4)

- Milieu basique : Solution aqueuse de carbonate d'ammonium $c = 200$ mM (pH = 9,7)

Le suivi de la dégradation du ligand L_3 a été effectué à des temps d'analyse différents grâce à la spectrométrie de masse MALDI-TOF, en fonction de l'intensité des pics enregistrés. Il convient à ce stade d'en rappeler le principe.

De façon générale, la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui consiste à ioniser un échantillon et ensuite à séparer les différentes fractions contenues dans l'analyte en fonction de leur rapport masse sur charge m/z . L'échantillon est vaporisé sous pression réduite avant son introduction dans le spectromètre^[46] où a lieu son ionisation. En fonction de la technique utilisée, il existe plusieurs méthodes d'analyses en spectrométrie de masse, parmi lesquelles la MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Absorption). C'est une technique qui est utilisée pour l'analyses de grosses molécules telles que les protéines ou même pour la caractérisation de l'ADN^[47] ou les sucres et glycoconjugués.^[48] Elle nécessite l'incorporation de l'analyte au sein d'une matrice qui va le protéger d'une irradiation directe qui pourrait causer une fragmentation. Cette matrice permet également l'ionisation des molécules d'échantillon puisqu'elle absorbe à la longueur d'onde d'irradiation de la source LASER.

Expérimentalement, l'échantillon est mis en solution dans un solvant et mélangé à un large excès de la matrice appropriée. Une goutte du mélange est déposée sur la cible, puis séchée à l'air ou sous un flux d'azote. Le dépôt solide est alors irradié par une source LASER, on assiste à un transfert d'énergie de la matrice vers l'échantillon à analyser qui se décolle par désorption. Les particules chargées sont accélérées vers le détecteur par un champ électrique. La mesure du temps de vol (TOF – Time Of Flight) permet de calculer le rapport m/z .

Malheureusement tout au long de notre étude, la cristallisation du dépôt n'intervenait qu'après une dizaine de minutes. Une limitation de ce travail sera donc la difficulté d'évaluer le début de l'hydrolyse de l'ester. De plus, la cristallisation du dépôt n'étant pas nécessairement homogène, nous avons calculé pour chacune des analyses un ratio d'intensité afin de déterminer la proportion de ligand activé et de produit d'hydrolyse.

$$\alpha = \frac{I(H)}{I(H) + I(A)} ; \beta = \frac{I(A)}{I(H) + I(A)}$$

Le terme $I(H)$ représente l'intensité du pic correspondant à la fraction hydrolysée et $I(A)$ correspond au ligand activé non dégradé. En milieu basique, il n'a pas été possible de

suivre une évolution de ces ratios puisque le ligand était complètement hydrolysé dès la première mesure. En milieu acide et neutre, nous avons pu dresser les courbes d'évolution suivantes :

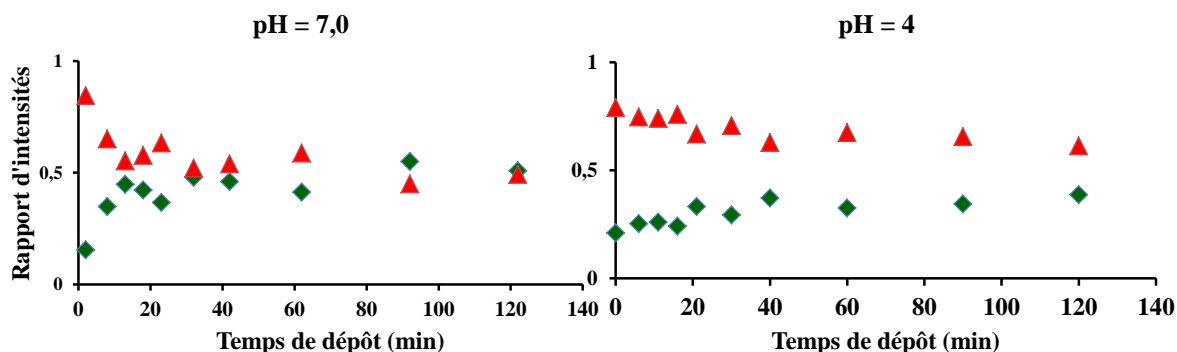


Figure 2.20 : Proportion de chélatant hydrolysé (en vert) et de chélatant non-hydrolysé (en rouge) en fonction du temps en solution et du pH du milieu.

Il apparaît clairement que le ligand **L₃** est moins vite hydrolysé en milieu acide qu'en milieu neutre et que sa dégradation est presque instantanée en milieu basique. Le temps de demi-vie moyen de la fonction activée est supérieur à 30 minutes en milieu neutre, ce qui nous permet d'envisager des réactions de marquage de protéines dans ces conditions et les techniques que nous développerons ultérieurement tiendront compte de cette observation.

3. Caractérisations spectroscopiques de ligands fonctionnalisés

Les ligands **L₁**, **L₂**, **L₃** et **L₄** synthétisés dans les sections précédentes diffèrent de par leur composition élémentaire et leur réactivité. Cependant ils possèdent tous le même système conjugué qui consiste en une plate-forme pyridinebispyrazolyl à laquelle est rattachée une triple liaison. Cette extension de délocalisation électronique par rapport au ligand modèle **L_p** pourrait engendrer des variations significatives des propriétés spectroscopiques des complexes de lanthanide. En ce qui concerne le ligand **L₂** et son analogue activé **L₄**, ils ne représentent pas de très bon candidats pour les réactions avec les biomolécules, malgré leur espaceur plus long, puisque la fonction d'activation de l'amine est très peu stable et s'hydrolyse très vite dans l'eau. Ainsi nous nous intéresserons principalement aux propriétés de luminescence des ligands **L₁**. Dans un premier temps, un titrage en absorption et en émission a été réalisé à partir du ligand **L₁** avec une solution de sel de terbium. Puis le complexe isolé du terbium avec le ligand **L₁** a été caractérisé.

Comme pour le ligand « modèle » L_p nous avons dans un premier temps réalisé un dosage en absorption et en émission du ligand par un sel de terbium en solution dans un tampon TRIS/HCl (pH = 7,0 à 0,01M).

3.1 Titration en absorption du ligand L_1 par le Tb^{3+}

À une solution du ligand L_1 dans un tampon TRIS, des quantités croissantes d'une solution de $TbCl_3$ ($c = 5 \times 10^{-4}$ M) ont été rajoutées et les spectres d'absorption des différents mélanges ont été mesurés tels que présentés sur la figure 2.21.

Le premier spectre mesuré correspond à la solution de ligand seul et il montre la présence d'une bande large et intense dont le maximum est situé à 256 nm et une bande de plus faible intensité à 320 nm que l'on peut attribuer aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. On observe un décalage du spectre d'absorption du ligand L_1 vers le rouge, ainsi qu'un déplacement hyperchrome de la bande de plus haute énergie (à 256 nm) lorsqu'on le compare au profil d'absorption du ligand L_p (à 247 nm). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'extension de la délocalisation électronique du système à la triple liaison adjacente.

L'ajout de la solution de terbium et la complexation de ce dernier sont caractérisés par un déplacement bathochrome des maxima d'absorption jusqu'à la formation du complexe 1 :1 ou on n'observe plus que l'effet de la dilution.

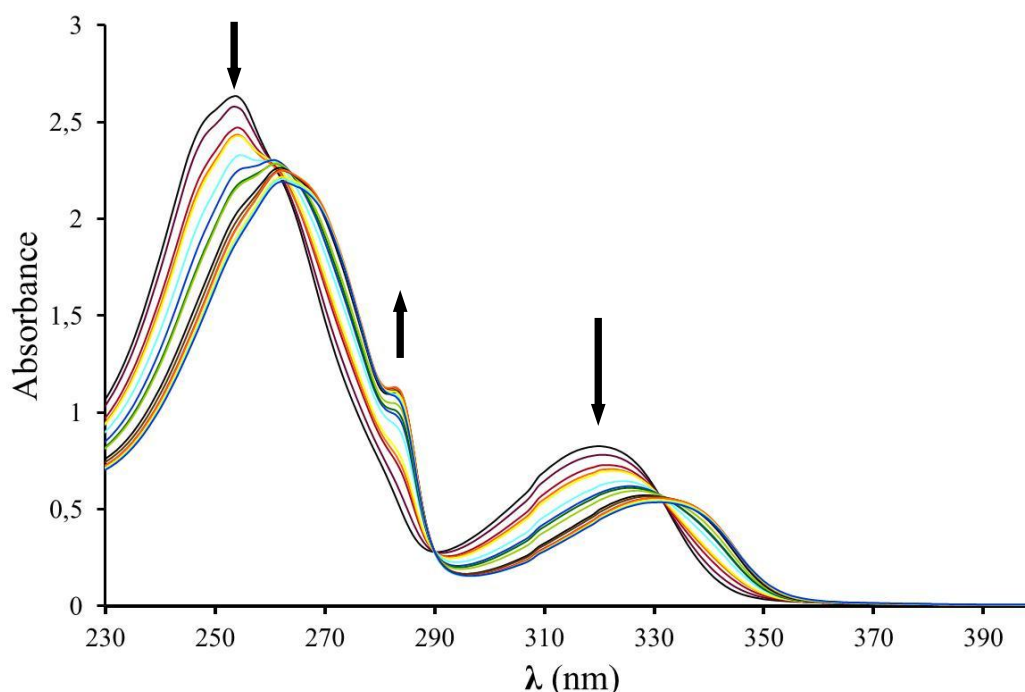


Figure 2.21 : Evolution du spectre d'absorption UV-Visible du ligand L_1 avec l'addition d'une solution de $TbCl_3 \cdot H_2O$ à pH = 7,4. L'intensité d'absorption n'est pas corrigée pour la dilution.

3.2 Titration en émission du ligand L_1 par le Tb^{3+}

En parallèle à la mesure des spectres d'absorption, les spectres d'émission ont été mesurés. Ils ont montré une augmentation du maximum d'émission avec l'ajout de terbium jusqu'à l'équivalence.

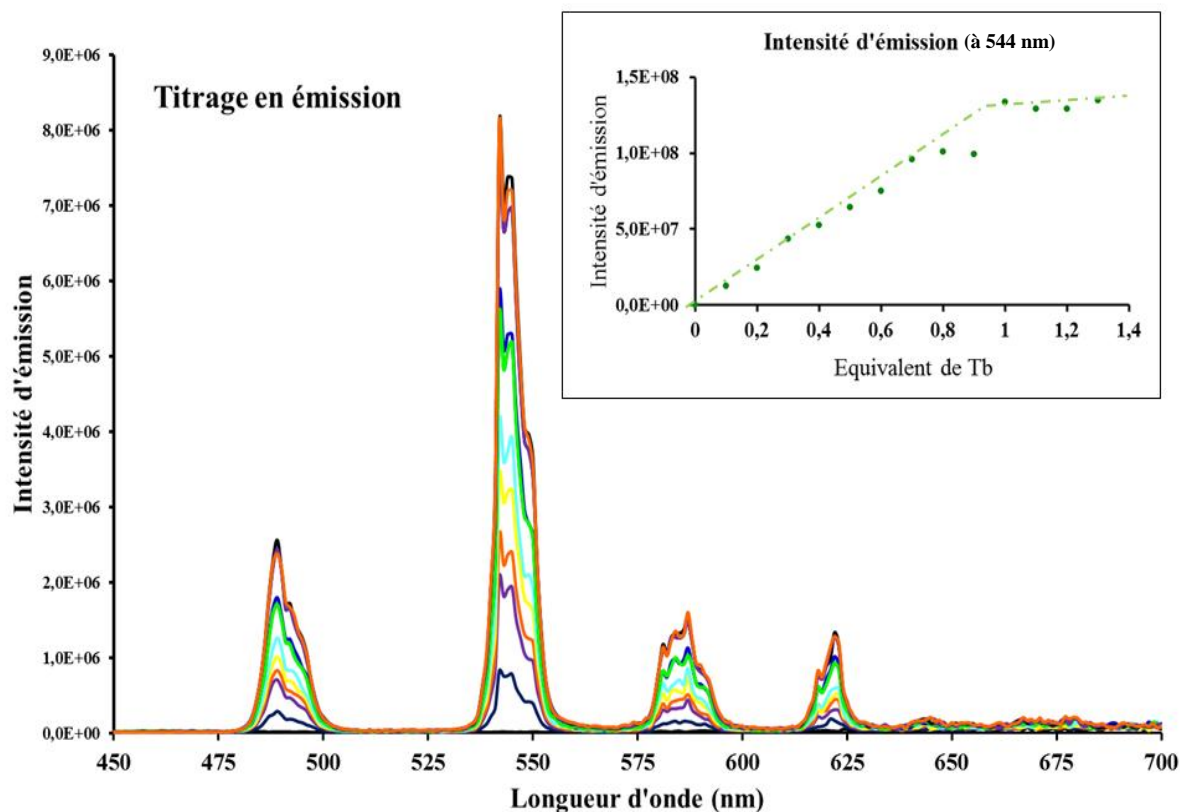


Figure 2.22 : Evolution du spectre d'émission ($\lambda_{exc} = 328$ nm) du ligand L_1 avec l'addition d'une solution de $TbCl_3 \cdot H_2O$ ($[L_1] = 5 \times 10^{-5}$ M ; $[Tb^{3+}] = 5,12 \times 10^{-4}$ M) à pH = 7,4. L'intensité d'émission n'est pas corrigée pour la dilution. En encadré, variation de l'intensité d'émission mesurée à 544 nm en fonction du nombre d'équivalent de terbium ajouté en solution.

3.3 Propriétés des complexes de Tb

Le complexe de terbium du ligand L_1 a été synthétisé. Ses spectres d'absorption, d'excitation et d'émission ont été mesurés en solution aqueuse et sont représentés à la figure 2.23 :

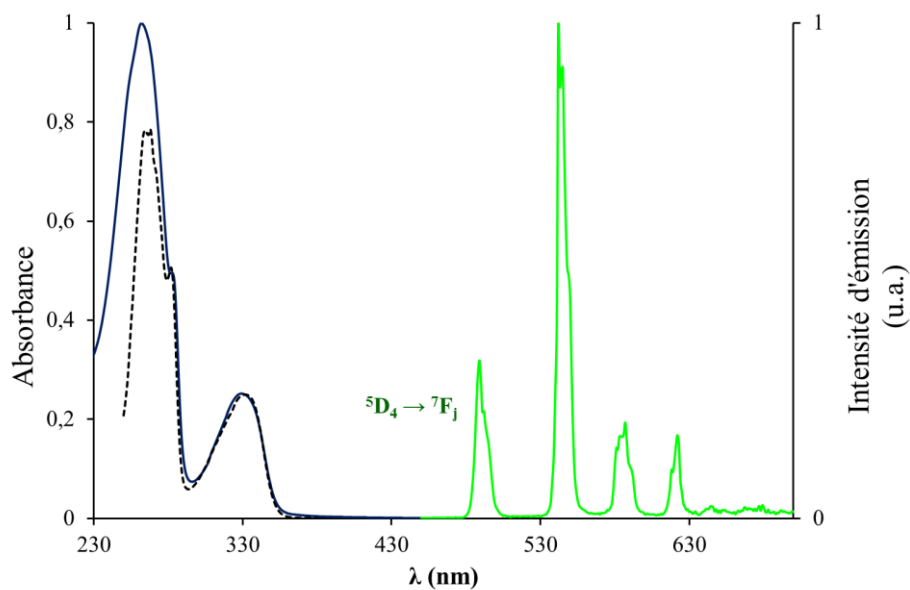


Figure 2.23 : Spectre d'absorption (—), d'excitation (....) et d'émission (—) du complexe **TbL₁** ($c = 1,82 \times 10^{-5} \text{M}$).

| | λ_{abs} (nm) | ϵ_{max} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ | q | Φ |
|------------------------|--------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----|--------|
| L₁ | 254 320 | 51050 16030 | 1,91 ns | - | - | - |
| TbL₁ | 263 280 328 | 47880 24520 12110 | 2,60 ms | 3,69 ms | 0,1 | 24 % |

Tableau 1.7 : Récapitulatif des données spectroscopiques du ligand **L₁** et de son complexe de terbium.

III. Conclusion

Le but de cette première partie était de synthétiser des ligands aptes à la fois à la coordination de l'euporium et du terbium, à leur photosensibilisation et à la formation de complexes à haut potentiel vis-vis du marquage de biomolécules. Nous avons pu démontrer avec le ligand modèle L_p que les groupements aminophosphonates étaient particulièrement efficaces pour la coordination des lanthanides à travers la détermination d'une constante de stabilité très élevée pour le complexe de terbium. Par ailleurs, ce même complexe présente des propriétés de luminescence avantageuses en milieux aqueux et des temps de vie de luminescence remarquablement longs. Afin d'exploiter ces caractéristiques attrayantes dans le cadre d'essais fluoro-immunologiques, il était nécessaire de rendre les complexes réactifs à l'égard de biomolécules. Pour ce faire l'insertion de groupements réactifs a été réalisée avec succès.

IV. Bibliographie

- [1] Siaugue, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Favre-Réguillon, A.; Wintgens, V.; Madic, C.; Foos, J.; Guy, A. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2003**, *156*, 23.
- [2] Remuinan, M. J.; Roman, H.; Alonso, M. T.; Rodriguez-Ubis, J. C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 1099.
- [3] Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodriguez-Ubis, J.-C. *Photochem. Photobiol. Sci* **2002**, *1*, 613.
- [4] Kadjane, P.; Starck, M.; Camerel, F.; Hill, D.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. c. *J. Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4601.
- [5] Starck, M.; Kadjane, P.; Bois, E.; Darbouret, B.; Incamps, A.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. *J. Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9164.
- [6] Schlosser, M.; Rausis, T.; Bobbio, C. *Org. Lett.* **2004**, *7*, 127.
- [7] Schlosser, M.; Rausis, T. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 1240.
- [8] Fatin-Rouge, N.; Tóth, É.; Perret, D.; Backer, R. H.; Merbach, A. E.; Bünzli, J.-C. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10810.
- [9] Mannich, C.; Krösche, W. *Arch. Pharm.* **1912**, *250*, 647.
- [10] Haas, Y.; Stein, G. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3668.
- [11] Valeur, B. In *Molecular Fluorescence*; Wiley: Weinheim, 2002.
- [12] Olmsted, J. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 2581.
- [13] Ishida, H.; Tobita, S.; Hasegawa, Y.; Katoh, R.; Nozaki, K. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2449.
- [14] Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 334.
- [15] Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 384.
- [16] Freeman, J. J.; Crosby, G. A.; Lawson, K. E. *J. Mol. Spectrosc.* **1964**, *13*, 399.
- [17] Kropp, J. L.; Windsor, M. W. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 2769.
- [18] Kropp, J. L.; Windsor, M. W. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 1599.
- [19] Beeby, A.; M. Clarkson, I.; S. Dickins, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; S. de Sousa, A.; A. Gareth Williams, J.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 493.
- [20] Kadjane, P.; Charbonnière, L.; Camerel, F.; Lainé, P.; Ziessel, R. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 119.
- [21] Mato-Iglesias, M.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.; Starck, M.; Kadjane, P.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. c. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1507.

- [22] Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 10439.
- [23] Aime, S.; Gianolio, E.; Corpillo, D.; Cavallotti, C.; Palmisano, G.; Sisti, M.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 615.
- [24] Mato-Iglesias, M.; Balogh, E.; Platas-Iglesias, C.; Toth, E.; de Blas, A.; Rodriguez Blas, T. *Dalton Trans.* **2006**, 5404.
- [25] Kotek, J.; Lebdušková, P.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.; Geraldès, C. F. G. C.; Maschmeyer, T.; Lukeš, I.; Peters, J. A. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5899.
- [26] Berthet, J.-C.; Miquel, Y.; Iveson, P. B.; Nierlich, M.; Thuery, P.; Madic, C.; Ephritikhine, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 3265.
- [27] Caravan, P.; Hedlund, T.; Liu, S.; Sjöberg, c. S.; Orvig, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11230.
- [28] Chapon, D.; Morel, J.-P.; Delangle, P.; Gateau, C.; Pecaut, J. *Dalton Trans.* **2003**, 2745.
- [29] Lacoste, R. G.; Christoffers, G. V.; Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2385.
- [30] Wu, S. L.; Horrocks, W. D. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 394.
- [31] Martell, A. E. In *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York, 1974; Vol. 1.
- [32] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3437.
- [33] Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866.
- [34] Heck, R. F.; Nolley, J. P. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320.
- [35] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.
- [36] Stephens, R. D.; Castro, C. E. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313.
- [37] Dieck, H. A.; Heck, F. R. *J. Organomet. Chem.* **1975**, *93*, 259.
- [38] Batsanov, A. S.; Collings, J. C.; Fairlamb, I. J. S.; Holland, J. P.; Howard, J. A. K.; Lin, Z.; Marder, T. B.; Parsons, A. C.; Ward, R. M.; Zhu, J. *J. Org. Chem.* **2004**, *70*, 703.
- [39] Gajda, A.; Gajda, T. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1233.
- [40] Rappoport, Z. In *CRC Handbook of Tables for Organic Compounds Identification*; Third ed.; CRC Press Inc.: Florida, 1984.
- [41] Smits, J. P.; Wiemer, D. F. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8807.
- [42] Toussaint, M.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Maurice, T.; Melnyf, P. *Med. Chem.* **2010**, *6*, 355.
- [43] Højfeldt, J. W.; Gothelf, K. V. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9556.
- [44] Kokubo, T.; Sassa, S.; Kaiser, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 606.

- [45] Burgada, R.; Bailly, T.; Lecouvey, M.; Larue, V.; Leroux, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2001, 349.
- [46] Johnson, W. A. In *Invitation to Organic Chemistry*; Jones and Bartlett Publishers Inc.: Sudbury, 1999.
- [47] Gut, I. G. *Hum. Mutat.* **2004**, 23, 437.
- [48] Harvey, D. J. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 226, 1.

CHAPITRE III :

Application au marquage et au FRET

Sommaire

| | |
|--|------------|
| I. Marquage de biomolécules | 115 |
| 1. Marquage chimique de la streptavidine | 117 |
| 1.1 Mise au point des conditions expérimentales | 118 |
| 1.2 Réaction de marquage | 120 |
| 1.3 Caractérisation du produit de marquage | 120 |
| 2. Marquage chimique des anticorps Dreg55..... | 122 |
| 2.1 Détermination de la concentration des anticorps..... | 122 |
| 2.2 Caractérisation des anticorps..... | 123 |
| 2.3 Réaction de couplage et détermination du taux de marquage | 125 |
| 3. Marquage chimique des anticorps Dreg200 | 130 |
| 3.1 Spectre de masse de MALDI-TOF de Dreg200 | 130 |
| 3.2 Couplage de L ₃ et détermination du taux de marquage..... | 131 |
| 4. Marquage chimique de la L-selectine | 132 |
| 4.1. Caractérisation de l'antigène par HPLC | 132 |
| 4.2. Caractérisation de l'antigène par spectrométrie de masse | 133 |
| 4.3. Réaction et détermination du taux de marquage | 133 |
| II. Transfert d'énergie..... | 135 |
| 1. Etude du chélatant biotinylé | 136 |
| 1.1 Synthèse du ligand | 136 |
| 1.2 Caractérisation du ligand | 138 |
| 1.3 Etudes des propriétés spectroscopiques du ligand biotinylé | 140 |
| 2. Expériences de transfert d'énergie | 143 |
| 2.1 Choix du solvant | 143 |
| 2.2 Evaluation du FRET - Généralités..... | 146 |
| 2.3 Utilisation de la Cyanine 5 (Cy5)..... | 147 |
| 2.4 Utilisation de nanocristaux luminescents..... | 152 |
| III. CONCLUSION | 159 |
| IV. Bibliographie | 161 |

Grâce à leurs propriétés photo-physiques avantageuses, les complexes à base d'ions lanthanides sont des composés de choix pour des applications en imagerie ou comme marqueurs de biomolécules. Les ligands multifonctionnels synthétisés précédemment ont permis d'obtenir des complexes dont les propriétés de luminescence en solution aqueuse sont suffisamment satisfaisantes pour envisager leur application au diagnostic de la maladie d'Alzheimer. La stratégie élaborée dans le cadre du projet NANOGNOSTICS consiste en la détection quantitative de certains marqueurs biologiques de la maladie à travers la formation d'immunocomplexes. L'utilisation d'anticorps marqués par un couple donneur/accepteur adéquat et la mise en évidence d'un transfert d'énergie de type FRET permettraient d'évaluer quantitativement et précisément la concentration des antigènes.

En plus de leur rôle d'antenne adaptée à la photosensibilisation efficace des lanthanides, une deuxième caractéristique importante des ligands synthétisés est leur aptitude à réagir avec des biomolécules. C'est ainsi qu'au terme de la synthèse des ligands multifonctionnels polyphosphonatés, de la synthèse des complexes et de leur caractérisation, le ligand activé **L₃** a été choisi pour l'étude des réactions de marquages des biomolécules ciblées dans le cadre du projet.

Par la suite, une série d'expérience a été menée avec un complexe de terbium de la famille des ligands développés dans le rôle de donneur d'énergie, afin de mettre en évidence un transfert d'énergie de type FRET avec différents accepteurs d'énergie fluorescents.

I. Marquage de biomolécules

Le marquage des protéines est une opération qui consiste à introduire au sein des polymères d'acides aminés dont sont formées ces biomolécules, des entités porteuses d'informations spécifiques (radioactivité, magnétisme, luminescence) qui vont permettre leur détection. Cette transformation est un outil puissant de compréhension du fonctionnement ou encore de l'étude des interactions entre les biomolécules à partir duquel il est possible de développer de nombreuses applications *in vivo* ou *in vitro*. Selon la nature des traceurs utilisés et leur mode d'incorporation aux protéines, on peut distinguer plusieurs techniques d'observation.

Le marquage génétique, par exemple qui consiste en une modification d'un gène de la protéine, est une technique très attrayante grâce à laquelle les mécanismes de fonctionnement et les propriétés dynamiques *in vivo* des protéines sont élucidés.^[1-3] L'inconvénient majeur de cette méthode, qui fait principalement appel à de grosses protéines fluorescentes (à l'instar de la GFP) est qu'en général ces dernières peuvent altérer la fonction du matériel auquel elles sont associées.^[4]

Les marqueurs chimiques apparaissent alors comme un moyen de contourner cet écueil. Des techniques permettant de greffer des composés organiques aux biomolécules ont ainsi vu le jour et aidées par le développement des domaines auxiliaires de la chimie organique tels que la radiocristallographie ou la biologie moléculaire, ces méthodes permettent un meilleur contrôle de la sélectivité de l'association biomolécule/traceur.^[5]

Il existe deux principaux types de marquages chimiques, selon la nature de l'encrage aux cibles biologiques :

- L'élaboration d'un site d'interaction entre la biomolécule et le traceur
- La formation d'une liaison covalente.

La première option est envisageable lorsqu'il y a une grande affinité et une grande spécificité dans le processus de reconnaissance entre la biomolécule ciblée et son marqueur, comme c'est le cas entre la biotine et la streptavidine.^[6] Il s'agit de la plus forte interaction connue aujourd'hui en biologie et ce système a été largement utilisé pour des études de fixation de substrats à des biomolécules.

La synthèse des marqueurs non-covalents est cependant très complexe, puisqu'elle nécessite la prise en compte de plusieurs paramètres dont la nature des interactions électroniques, stériques, mais également des interactions hydrophobes, plus difficiles à maîtriser.

Le marquage à travers la formation d'une liaison covalente permet quant à lui de développer un large éventail de marqueurs biologiques dont la synthèse est plus accessible et permet de moduler davantage le taux de marquage.

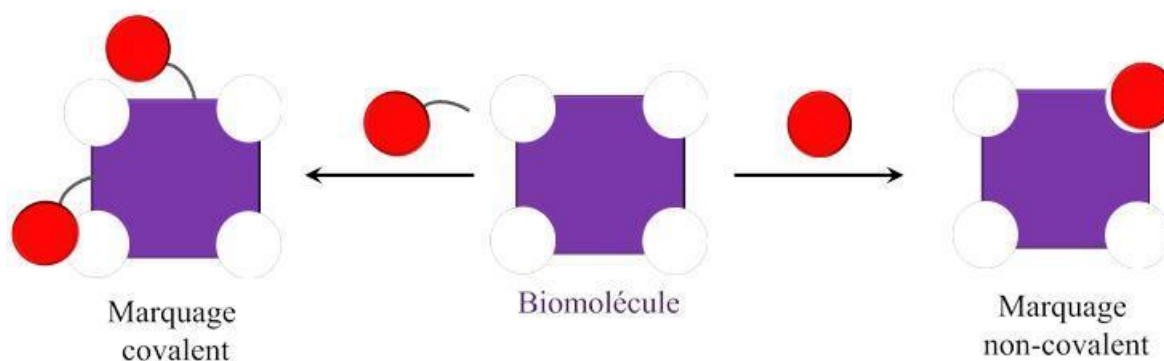


Schéma 3.1 : Représentation schématique d'un marquage covalent et d'un marquage non-covalent.

L'utilisation de composés organiques associés à des métaux pour le marquage de peptides ou d'anticorps est très répandue grâce à la diversité d'applications dont regorgent ces éléments. Tandis que des cations tels que le gadolinium (Gd^{3+}) ou le magnésium (Mn^{2+}) sont incorporés au sein de quelques agents de contraste pour l'IRM,^[7,8] des radionucléides émetteurs de positrons tels que le gallium (^{68}Ga) ou le cuivre (^{64}Cu) permettent de faire de l'imagerie par Tomographie par Emission de Positrons (TEP).^[9,10] L'implication de ces métaux dans le développement de marqueurs passe par leur association à des chélatants dits bifonctionnels.

Il s'agit de petites molécules comportant deux parties distinctes : une partie chargée d'assurer la formation de complexes stables avec les métaux et une autre partie grâce à laquelle les complexes sont susceptibles de réagir avec des biomolécules en formant une liaison covalente.^[11,12] Dans le cas de l'utilisation des cations lanthanides luminescent, on peut parler de chélatants trifonctionnels, puisque la photosensibilisation des ions est une préoccupation prépondérante lors de la conception du ligand.

La réaction chimique entre les marqueurs et les cibles biologiques est facilitée par la présence d'une fonction réactive au sein du ligand. Dans le cadre de ce travail, le marqueur sélectionné est le ligand L_3 qui possède un ester activé N-hydroxysuccinimidyl. Ce groupement le rend extrêmement réactif vis-à-vis des protéines portant des groupements nucléophiles libres.

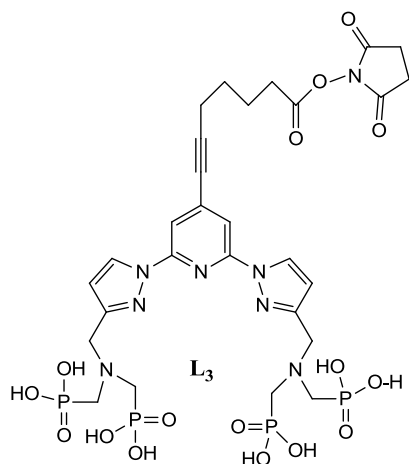


Schéma 3.2 : Formule développée du ligand activé **L₃**.

Un exemple de résidus nucléophiles que l'on retrouve dans un grand nombre de protéines est la lysine. Il s'agit d'un acide aminé qui possède une chaîne principale à 6 atomes de carbones et deux amines primaires, dont une en position α et l'autre en position ϵ de l'acide carboxylique.

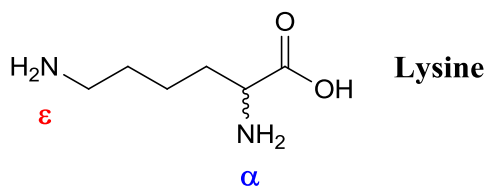


Schéma 3.3 : Formule développée de la lysine.

C'est en général l'amine en position ϵ qui pointe à la surface des protéines et son accessibilité accroît sa réactivité en tant que nucléophile à l'égard des groupements activés. Ainsi le greffage d'un ligand à des protéines peut impliquer la formation d'une liaison peptidique entre les résidus de lysines qui y sont abondamment représentés et des substrats réactifs. Avant de procéder au marquage des anticorps et antigènes ciblés dans le cadre du projet, une étude de marquage de la streptavidine, une protéine classique et bien connue, a été réalisée afin d'évaluer le comportement du ligand activé, sa réactivité et sa stabilité dans des milieux physiologiques. Il sera également question pour cette réaction test de réaliser une optimisation des paramètres déterminants de la réaction.

1. Marquage chimique de la streptavidine

La streptavidine est protéine une tétramérique de fort poids moléculaire (4 x 13000 Da) isolée à partir des bactéries du genre streptomyces.^[13] Comme l'avidine, une protéine toxique dont elle est très proche, la streptavidine a une très forte constante d'affinité avec la

biotine ($K_d \approx 10^{-15} \text{mol}^{-1}$)^[14] ce qui vaut à ce couple substrat/récepteur d'être souvent utilisé pour le diagnostic et pour l'étude d'interactions spécifiques en milieu biologique.

À la surface de chacune des sous-unités de la streptavidine se trouvent 24 résidus de types lysines et donc au moins autant d'amines libres. Ces groupes vont permettre de greffer des composés organiques à travers la formation d'une liaison peptidique. Afin de garantir le succès et le contrôle de la réaction entre le ligand **L₃** et cette protéine, nous avons dans un premier temps effectué une mise au point des paramètres expérimentaux déterminants de cette réaction.

1.1 Mise au point des conditions expérimentales

Les paramètres à contrôler sont principalement la nature du solvant, la concentration des réactifs et le temps de réaction.

1.1.1 Choix du solvant - pH de la solution

Le solvant de la réaction de marquage doit naturellement permettre de solubiliser le chélatant et la protéine. Dans notre cas il s'agira d'un milieu aqueux puisque le ligand **L₃** et ses complexes sont insolubles dans les solvants organiques. En outre, même si l'hydrolyse rapide des esters activés de type N-hydroxysuccinimide a été mise en évidence dans l'eau,^[15] l'étude de la cinétique de dégradation du ligand activé a montré que le contrôle du pH de la solution permettait de modérer le processus d'hydrolyse. Pour l'ensemble des expériences de couplage, il conviendra donc de travailler en milieu tamponné et le choix du couple acido-basique dépendra du pH idéal à la coexistence des entités nucléophiles et du substrat réactif en solution.

En effet la réaction de marquage correspond à une substitution du groupement N-Hydroxysuccinimidyl de l'ester activé par une entité nucléophile. En ce qui concerne la streptavidine, les nucléophiles les plus réactifs sont les amines primaires de lysine. En plus de leur caractère nucléophile ces fonctions chimiques possèdent également des propriétés acido-basiques. Sous certaines conditions de pH, les amines libres en milieu aqueux pourraient se protoner et former des ammoniums très peu réactifs à l'égard de substrats électrophiles. Le pKa de la lysine étant de 9,18,^[16] plus élevé sera le pH de la solution et plus réactive sera la streptavidine. Cependant, l'étude cinétique de l'hydrolyse de la fonction réactive du ligand **L₃** a montré que la stabilité du ligand augmentait avec l'acidité du milieu. Un compromis approprié à ces variations antagonistes consiste à travailler en milieu tamponné entre un pH de 8 et 9,5.^[17]

1.1.2 Concentration en protéine et proportions du chélate

En théorie il y a un nombre important de groupements amines à la surface de la protéine susceptibles de réagir avec le ligand L_3 . On pourrait donc envisager d'introduire dans le milieu réactionnel un large excès de chélatant afin de faire réagir tous les sites potentiellement accessibles. De plus, un taux de marquage élevé pourrait augmenter le signal de luminescence par protéine et faciliter la détection. Cependant un nombre excessif de chélatants greffés à une biomolécule pourrait avoir des conséquences néfastes sur les applications visées, puisqu'une modification de l'activité de la biomolécule, notamment en ce qui concerne les processus de reconnaissance spécifiques, pourrait en résulter. En outre, un marquage excessif pourrait également entraîner la dégradation des propriétés de luminescence des complexes du fait de l'auto-absorption,^[18] même si ce phénomène est valable surtout pour les fluorophores aromatiques dont le déplacement de Stokes est faible.

Au cours de la manipulation, la consommation du ligand peut résulter de deux réactions de substitution nucléophile qui sont en compétition. La première est la réaction de marquage visée et le réactif est la streptavidine. La seconde pour laquelle le nucléophile est l'eau correspond à l'hydrolyse de la fonction activée pour conduire au ligand L_1 dont la réactivité à l'égard des amines est très faible.

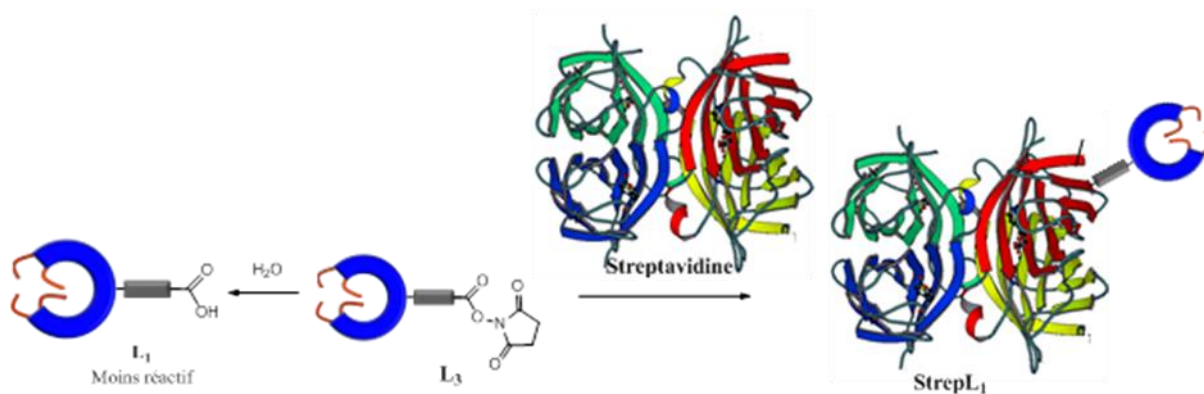


Schéma 3.4 : Réaction d'hydrolyse de l'ester activé (à gauche) et formation d'une liaison peptidique entre le ligand et les résidus de lysines portés par le streptavidine (droite).

Afin de favoriser la première réaction qui fait intervenir la biomolécule, il est souhaitable de minimiser la proportion de solvant et donc d'avoir un milieu où la concentration en protéine est élevée.

1.1.3 Temps de réaction

Le taux de marquage des biomolécules est davantage dépendant de la proportion de ligands que du temps de réaction. Ainsi compte tenu de la réactivité du ligand, quelques

heures de réaction à température ambiante suffisent à la consommation totale du ligand que ce soit lors du greffage à la protéine ou lors de son hydrolyse.

1.2 Réaction de marquage

Pour la réaction de marquage, une solution de streptavidine de concentration 50 μM a été préparée dans un tampon bicarbonate d'ammonium ($c = 0,02 \text{ M}$; $\text{pH} = 8,05$). À température ambiante, 40 équivalents du ligand par tétramère de streptavidine ont été rajoutés et le mélange réactionnel laissé sous agitation pendant deux heures. Au bout de ce temps de réaction, le mélange est concentré par ultrafiltration. Le seuil en poids moléculaire de la membrane des tubes utilisés à cet effet était de 1000 Da. Cette opération de concentration permet donc non seulement d'éliminer les sels, mais aussi la lutidine résiduelle provenant de l'ultime étape de déprotection de L_3 et l'excès de chélatant n'ayant pas réagi ($M = 866 \text{ g. mol}^{-1}$) ou ayant été hydrolysé ($M = 769 \text{ g. mol}^{-1}$).

Lorsqu'une solution de terbium est rajoutée aux retentats recueillis au début du lavage, les spectres d'absorption mesurés pour ces mélanges sont constitués de bandes autour de 280 et 328 nm. Les spectres d'émission mesurés correspondants faisaient également apparaître les pics caractéristiques des transitions $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ ($j = 6 \rightarrow 3$) du terbium. Cette technique a été utilisée pour contrôler la purification du produit de la réaction et afin de s'assurer de l'élimination de toutes les petites molécules. Les opérations de centrifugations ont été répétées jusqu'à ce que l'intensité d'absorption et d'émission des mélanges centrifugats/terbium soient négligeables.

1.3 Caractérisation du produit de marquage

Après la purification, nous avons procédé à la caractérisation de la protéine par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le but de cette étude était de déterminer si effectivement la protéine avait été marquée et le cas échéant de calculer un taux de marquage.

Le spectre de masse obtenu après analyse du produit purifié a été comparé à celui de la streptavidine non modifiée mesuré dans les mêmes conditions et il montre l'apparition d'au moins trois nouvelles espèces. Les valeurs de déplacement des pics par rapport à celui de la streptavidine native indiquent la formation de composés où la streptavidine est marquée une, deux ou trois fois.

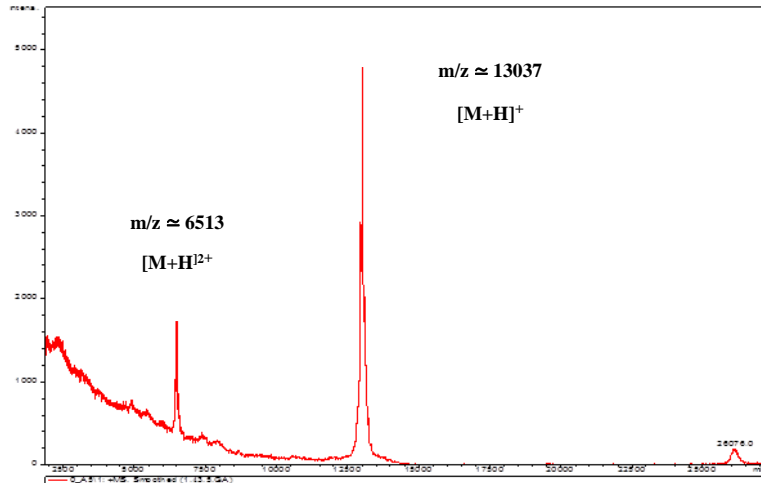


Figure 3.1 : Spectre de masse MALDI-TOF de la streptavidine avant la réaction de marquage.

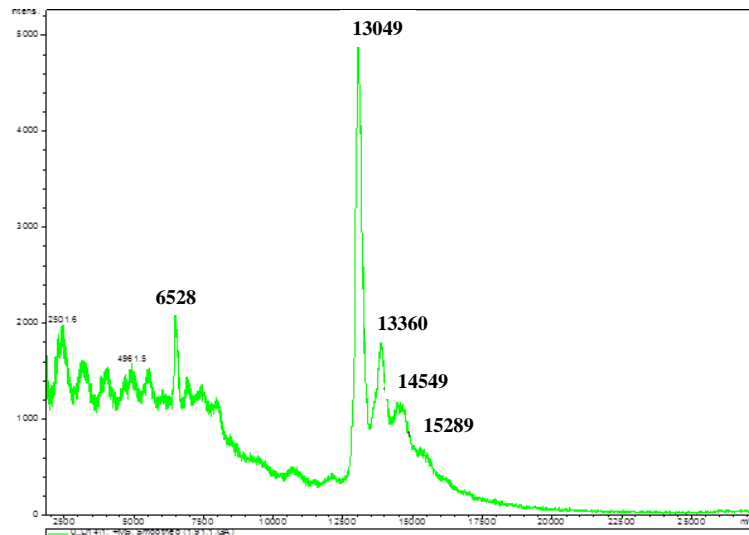


Figure 3.2 : Spectre de masse MALDI-TOF de la streptavidine après la réaction de marquage.

Compte tenu de la proportion de streptavidine non-marquée restante, le rendement correspondant à la réaction de couplage est très faible et cet essai pourrait être optimisé. Cependant le but de cette manipulation était surtout de s'assurer que le ligand L_3 pouvait être greffé de façon covalente à des biomolécules. Ce résultat permet donc de passer au marquage des anticorps ciblés dans le cadre du projet.

Une étude a permis d'identifier quelques biomolécules impliquées dans le processus de dégénérescence de neurones, notamment en ce qui concerne la régulation endothéliale.^[19] Nous avons pu réaliser des réactions de marquage impliquant quelques-unes d'entre elles notamment :

- La L-sélectine, biomarqueur de la maladie d'Alzheimer

- Dreg 55, anticorps anti L-sélectine
- Dreg 200, anticorps anti L-sélectine

Les études de marquage effectuées par la suite sont le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Laurence Sabatier du DSA/IPHC.

2. Marquage chimique des anticorps Dreg55

Dreg55 est un anticorps anti L-Sélectine qui nous a été fourni en solution par les partenaires du projet (Dr. Jens Dervede, Hôpital Charité de Berlin). Les études de leur marquage ont donc débuté par la détermination de la concentration exacte de l'échantillon reçu.

2.1 Détermination de la concentration des anticorps

Pour la détermination de la concentration de l'anticorps, la méthode utilisée est celle de Bradford.^[20] C'est une technique basée sur la mesure de l'absorbance d'un colorant (le bleu de Coomassie) dont le maximum d'absorption varie selon qu'il est sous sa forme libre ou fixé à des protéines.

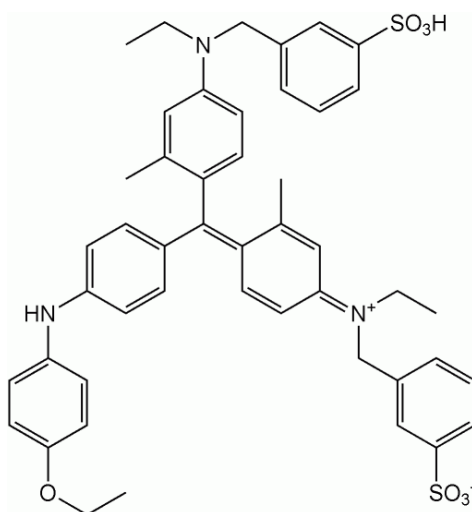


Schéma 3.5 : Formule développée du bleu de Coomassie.

Lorsque le bleu de Coomassie est en milieu acide, la solution a une coloration jaune ou verte et les sulfonates sont sous leur forme protonée. Le maximum d'absorption est alors situé entre 465 et 470 nm. Lorsque la molécule se lie aux protéines, elle est sous sa forme déprotonée, la solution prend une coloration bleue et son maximum d'absorption est à 595 nm. La mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde est donc une indication de la concentration de protéine dans le milieu.

Plusieurs standards ont été testés et une courbe de calibration linéaire dans la gamme de concentration visée a été obtenue avec l'albumine sérique de bœuf (BSA) :

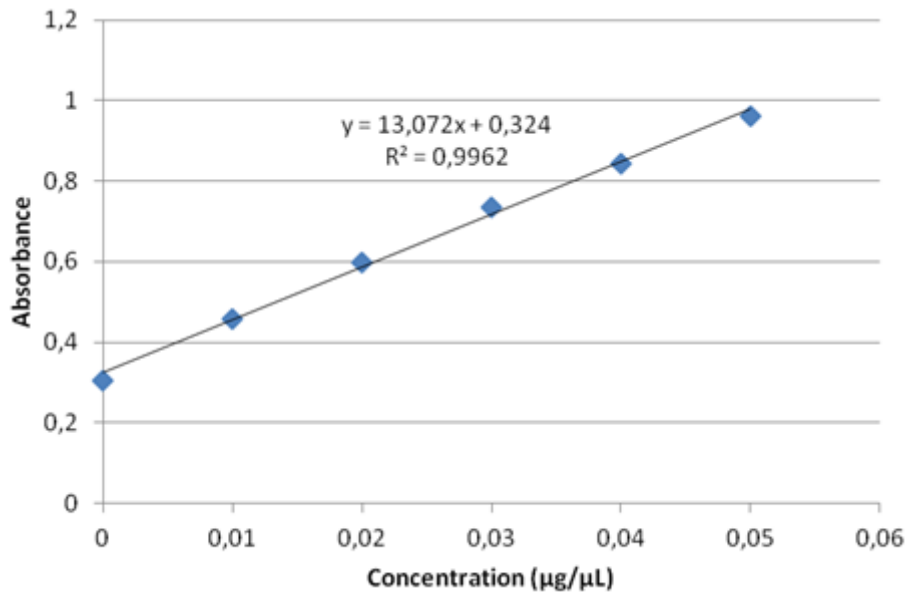


Figure 3.3 : Courbe de calibration obtenue avec la BSA comme standard du test de Bradford.

Le calcul de la concentration de l'anticorps ainsi déterminée a donné une valeur de $3,9 \pm 0,2$ mg/mL, en accord avec la valeur mesurée par nos collaborateurs allemands (4,0 mg/mL).

2.2 Caractérisation des anticorps

Avant de procéder à leur marquage, nous avons souhaité caractériser les anticorps. D'une part parce qu'il y a très peu d'informations à leur sujet dans la littérature, d'autre part parce qu'il était important d'avoir des analyses de référence à comparer aux produits de réaction avec le chélatant après la réaction de marquage.

2.2.1 Analyse HPLC

Une méthode d'analyse a été développée au laboratoire spécialement pour la caractérisation de l'anticorps. La séparation a été effectuée par chromatographie en phase inverse à l'aide d'une colonne de perfusion. La température de la colonne a été fixée à 50 °C et deux solvants ont été utilisés pour l'élution : une solution aqueuse contenant 0,1% de TFA (solvant A) et une solution d'acétonitrile contenant elle aussi la même proportion de TFA (solvant B). L'élution a été suivie à travers la détection de l'absorbance à 210 nm et le

chromatogramme obtenu montre la présence d'un seul pic significatif que l'on attribue à l'anticorps.

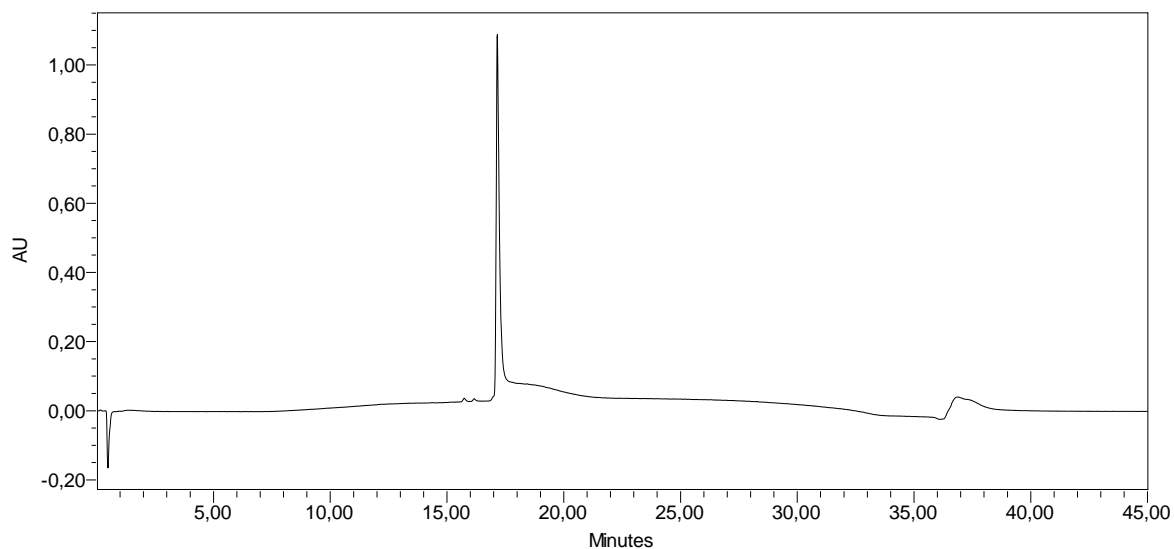


Figure 3.4 : Chromatogramme HPLC de l'anticorps Dreg55.

2.2.2 Analyse par spectrométrie de masse

Le spectre de masse MALDI-TOF enregistré pour des valeurs de m/z comprises entre 20 000 et 190 000 (figure 3.5) a montré deux larges pics prédominants et un troisième pic de plus faible intensité.

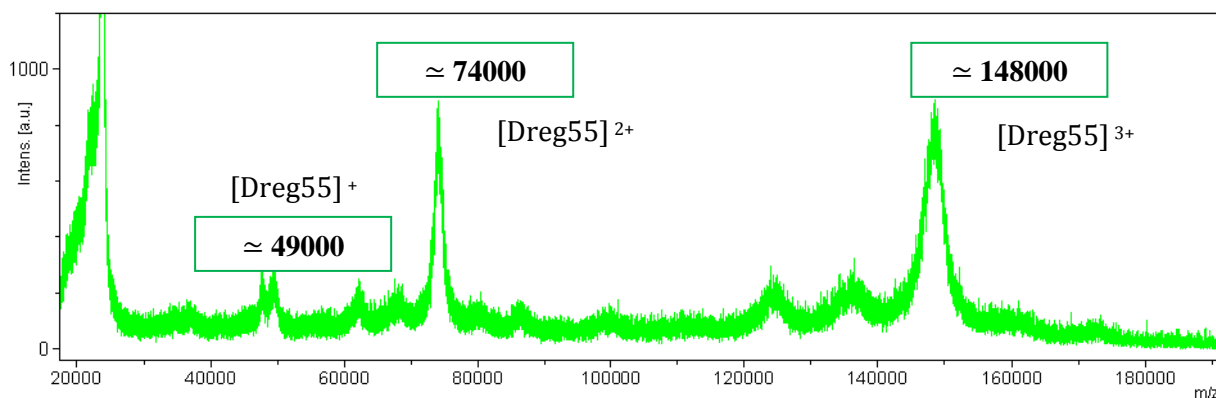


Figure 3.5 : Spectre de masse MALDI de Dreg55.

On constate alors que les pics de plus faibles valeurs de m/z sont des diviseurs du pic à 150000 Da. Cette observation pourrait s'expliquer en attribuant ces trois signaux à des espèces une fois, deux fois et trois fois chargées.

La masse de l'anticorps est alors estimée à 148 000 Da.

2.3 Réaction de couplage et détermination du taux de marquage

Pour cette réaction, à une solution d'anticorps on a rajouté 25 équivalents du ligand **L**₃. Le pH du mélange a été maintenu à 7,3 grâce à l'utilisation d'un tampon PBS et le milieu réactionnel a été soumis à agitation à température ambiante pendant une heure puis purifiée par ultracentrifugation.

Afin de déterminer le taux de marquage, rapport molaire entre le marqueur et la protéine, le produit de la réaction a été caractérisé par des analyses en spectrométrie de masse et en spectroscopie d'émission.

2.3.1 Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Le spectre de masse obtenu par une analyse MALDI-TOF du produit de marquage a été superposé entre 20000 Da et 190 000 Da à celui correspondant à l'anticorps non-modifié. La comparaison entre les valeurs des pics des deux échantillons montre qu'ils ne sont pas superposables et fait apparaître un décalage des pics vers les hautes masses après la réaction. Cette augmentation de la masse moléculaire de l'anticorps est en accord avec l'addition d'une ou plusieurs molécules de ligands sur l'anticorps.

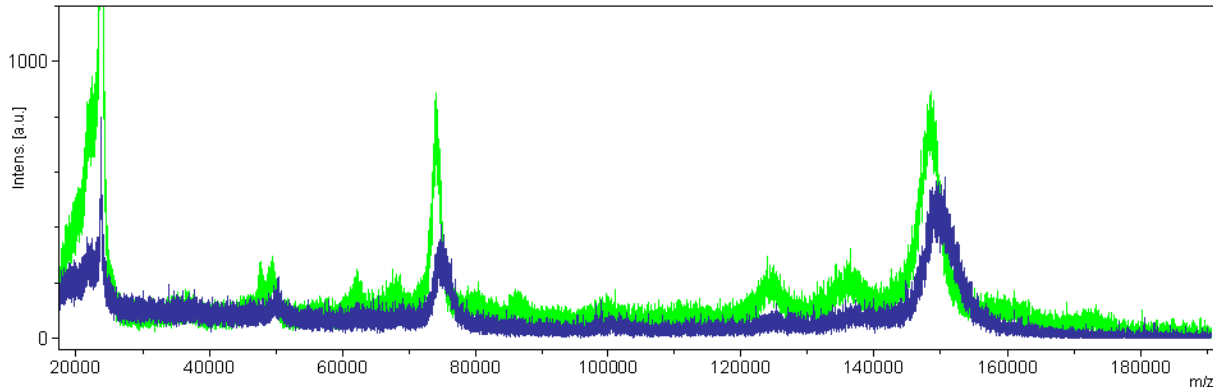


Figure 3.6 : Superposition des spectres de masse MALDI-TOF du produit de la réaction de marquage de Dreg55 (bleu) et de l'anticorps (vert).

Un zoom centré sur le pic mono-chargé permet d'estimer une augmentation de la masse du produit de 1800 Da.

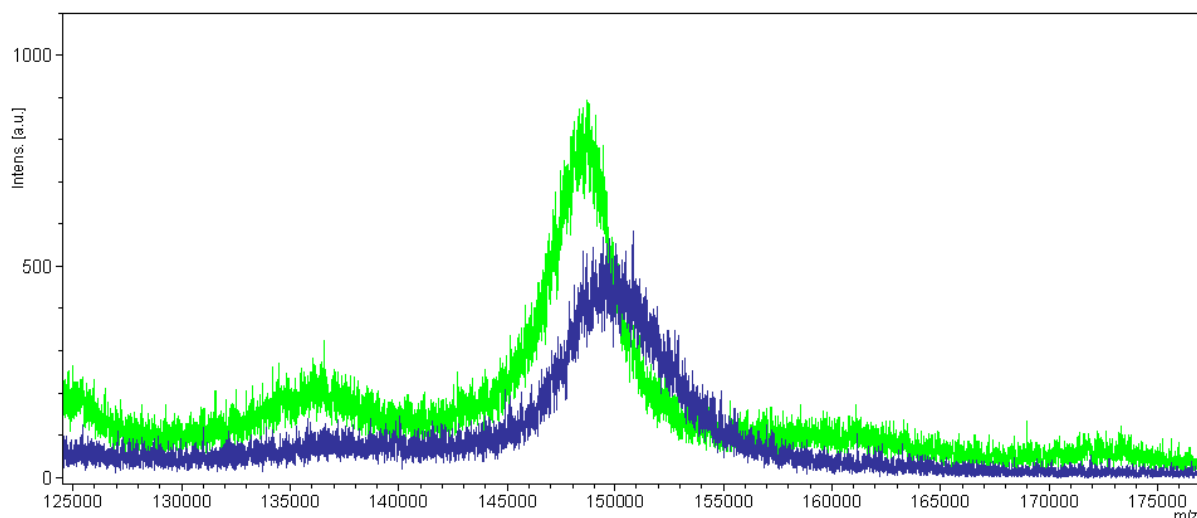


Figure 3.7 : Zoom du spectre de masse MALDI-TOF du produit de la réaction de marquage de Dreg55 autour du pic correspondant à une espèce monocationique.

Cette valeur pourrait correspondre à un taux de marquage moyen de 2 ligands par anticorps.

2.3.2 Analyse par spectroscopie d'émission

Nous avons pu mettre en évidence la modification du poids moléculaire de l'anticorps suite à la réaction de marquage. Cependant le chélatant trifonctionnel a également une signature particulière en spectroscopie que ce soit d'absorption, ou d'émission. Après la réaction de marquage, la signature spectrale (absorption et émission) de l'anticorps est susceptible d'être modifiée par la présence de chromophores supplémentaires. Il est envisageable de mesurer les contributions du ligand libre aux propriétés spectroscopiques de la biomolécule ainsi modifiée. Cependant, pour les spectres d'absorption comme pour les spectres d'émission la faible sensibilité et le bruit de fond rendraient complexe le traitement des signaux enregistrés.

L'utilisation d'un ion lanthanide luminescent pour révéler sélectivement le ligand à travers la formation d'un complexe pourrait faciliter la détermination d'un taux de marquage à travers des mesures de luminescence. Nous avons choisi d'utiliser une solution de terbium, puisque c'est le cation dont les complexes avec le ligand L_3 présentent les propriétés de luminescence les plus avantageuses.

Ainsi dans un premier temps, une solution du mélange réactionnel a été injectée sur une colonne de HPLC. La fraction contenant l'anticorps a été collectée et diluée dans un

tampon TRIS/HCl ($c = 0,01 \text{ M}$; $\text{pH} = 7,4$). On a ensuite réalisé le dosage du mélange par une solution de TbCl_3 dans le même tampon ($c = 4,2 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Pour chacun des ajouts, l'échantillon était excité à 328 nm, maximum d'absorption du complexe de terbium du ligand L_3 et les spectres d'émission mesurés entre 400 et 750 nm. Au fur et à mesure de l'ajout de terbium, on assistait à l'apparition des bandes caractéristiques des transitions $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ du terbium.

Le tracé du maximum de l'intensité d'émission relevé autour de 544 nm en fonction du nombre de mole de terbium ajouté montre dans un premier temps une augmentation linéaire significative de la luminescence, puis une variation plus faible à la fin du titrage.

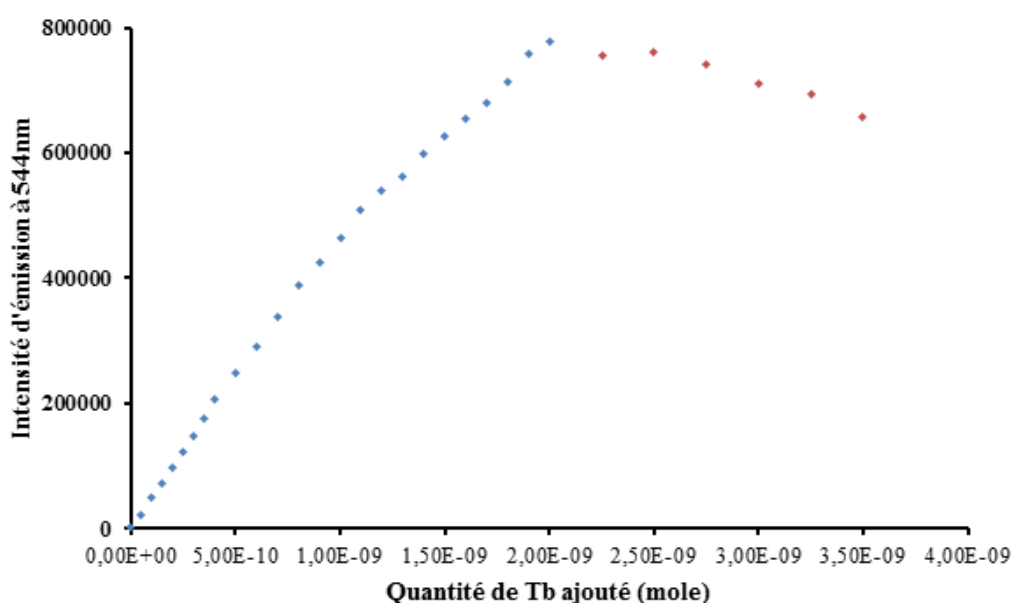


Figure 3.8 : Titrage du produit de la réaction de marquage de l'anticorps Dreg55 par une solution de terbium.

En posant l'hypothèse que l'équilibre correspondant à la formation d'un complexe 1:1 entre le terbium et les chélatants liés à l'anticorps est atteint au point d'intersection entre les deux droites, on arrive à un taux de marquage d'environ 5 ligands par anticorps.

On note donc une différence entre le taux de marquage estimé par spectrométrie de masse et le résultat du titrage fluorimétrique. On peut alors envisager une surévaluation du nombre de chélatants rattachés à la biomolécule pour la deuxième méthode, compte tenu de la possibilité de formation d'espèces polymétalliques comme le complexe M_2L . Tout comme il est possible que le dosage de Bradford donne une valeur erronée de la concentration de la protéine.

Afin d'estimer la fiabilité du résultat du titrage en émission, nous avons préparé une solution à partir des données du titrage pour laquelle l'intensité de luminescence est maximale

et qui devrait alors correspondre à la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1. Les spectres d'émission et d'excitation mesurés se sont avérés conformes aux profils obtenus à partir du complexe de terbium avec le ligand non activé L_1 .

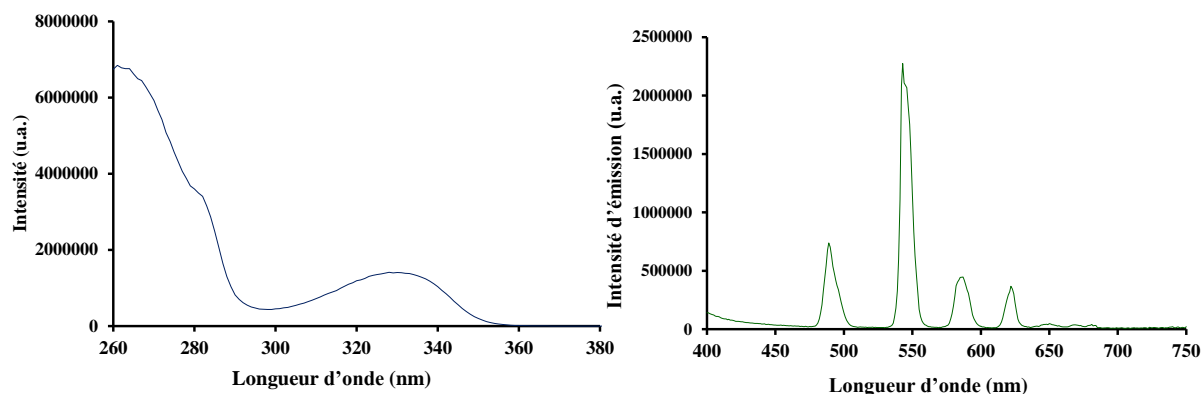


Figure 3.9 : Spectre d'excitation de l'anticorps marqué à gauche (—) et spectre d'émission à droite (—) pour une excitation à 328 nm après addition d'un équivalent de terbium.

Le temps de vie de luminescence du terbium a été calculé en excitant l'échantillon à 328 nm et à partir de la décroissance de l'intensité d'émission à 544 nm, une courbe de décroissance monoexponentielle a été obtenue. Le temps de vie de luminescence associé τ_1 a été estimé à 1,6 ms. On relève donc une différence importante entre la luminescence du complexe de terbium ainsi obtenu et celle des complexes de terbium du ligand L_1 dont la valeur (2,6 ms) était sensiblement plus importante. Cette différence pourrait s'expliquer de deux manières :

- Pendant le titrage du produit de marquage, l'ajout de terbium pourrait conduire à la formation de complexes polymétalliques avec le ligand à la surface de la biomolécule. Le temps de vie observé serait donc une valeur moyenne.
- Lors du greffage du ligand sur la biomolécule, les différents résidus d'acides aminés présents pourraient influencer la complexation et conduire à la contribution d'oscillateurs de type X-H à la coordination du terbium. Ces groupes d'atomes pourraient fournir un autre chemin de désexcitation du terbium et ainsi expliquer la diminution du temps de vie.

La fiabilité de la valeur du taux de marquage obtenue à travers ce titrage en spectrométrie d'émission peut être remise en question. Afin de confirmer le résultat obtenu par spectrométrie de masse MALDI-TOF, nous avons analysé le produit de marquage à l'aide d'une troisième méthode.

2.3.3 Spectrométrie de masse (ESI)

Cette méthode d'ionisation par électro-spray consiste à analyser des échantillons après leur injection à travers une aiguille fine à l'intérieur de laquelle un potentiel électrique est appliqué. Cette méthode d'ionisation relativement douce permet elle aussi d'analyser de grosses molécules en évitant leur fragmentation,^[21] mais à la différence de l'ionisation MALDI, elle conduit à la formation d'espèces de charges élevées (ionisations multiples).

Avant l'analyse du produit de la réaction de marquage, un test a été effectué avec l'anticorps Dreg55. Le chromatogramme obtenu fait apparaître plusieurs pics avec des états de charge élevés. Malgré la faible résolution du chromatogramme, il est possible d'évaluer la masse de l'anticorps à 148 kDa, en accord avec les résultats obtenus par l'analyse MALDI.

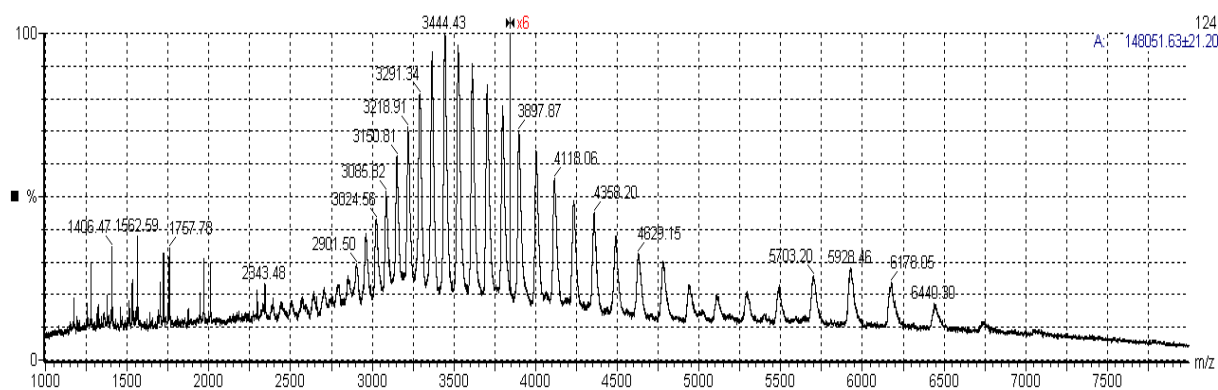


Figure 3.10 : Spectre de masse ESI⁺ de l'anticorps Dreg55.

L'analyse du produit de marquage par la même technique faisait apparaître un décalage du spectre de masse d'environ 1000 Da, ce qui pourrait correspondre à un taux de marquage d'un ligand par anticorps (Figure 3.11). Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus à travers les deux premières méthodes de détermination du taux de marquage. Cependant il est très important de noter que pour cette technique on observe une forte diminution de l'intensité des signaux de la biomolécule après la fixation du ligand **L**₃. Cette observation peut s'expliquer par la charge négative élevée du ligand (potentiellement **L**₁⁸⁻), alors que seuls les ions positifs sont détectés et l'on peut penser que les anticorps fortement marqués seront beaucoup moins bien détectés par cette technique. Malheureusement les essais ESI en mode négatif n'ont pas donné de résultats concluants.

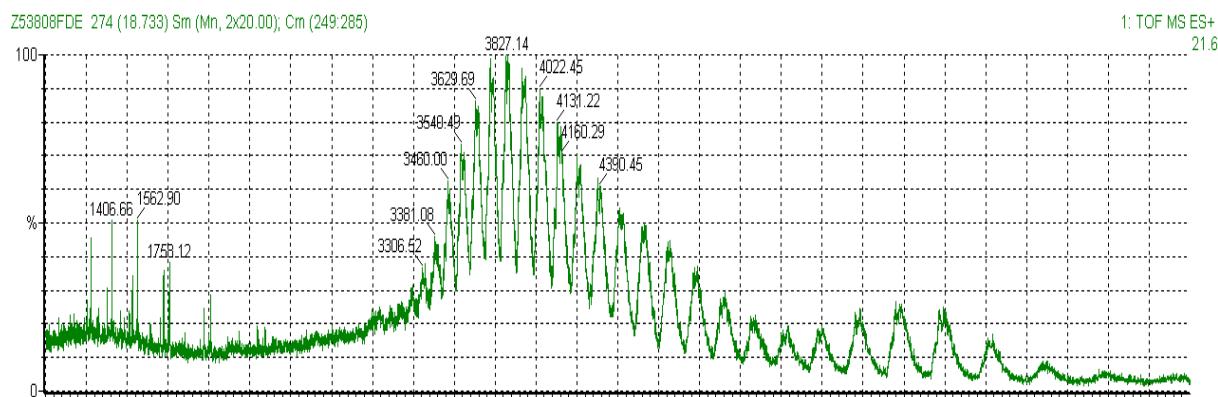


Figure 3.11 : Spectre de masse ESI⁺ de l'anticorps Dreg55 après la réaction de marquage.

3. Marquage chimique des anticorps Dreg200

Dreg200 est un anticorps spécifique de la L-sélectine qui a été retenu au même titre que Dreg55 dans le cadre du projet. Il a été fourni par les partenaires du projet (Dr. Jens Dervede ; Hôpital Charité de Berlin) en solution dans un tampon PBS (8mg/mL).

Avant la réalisation d'une réaction de marquage avec le ligand activé, l'anticorps a été caractérisé par spectrométrie de masse.

3.1 Spectre de masse de MALDI-TOF de Dreg200

L'anticorps a été analysé après élimination des sels et le spectre de masse obtenu est présenté à la figure 3.12. Il présente trois pics majoritaires dont les valeurs suggèrent une masse de 150 000 Da pour l'anticorps.

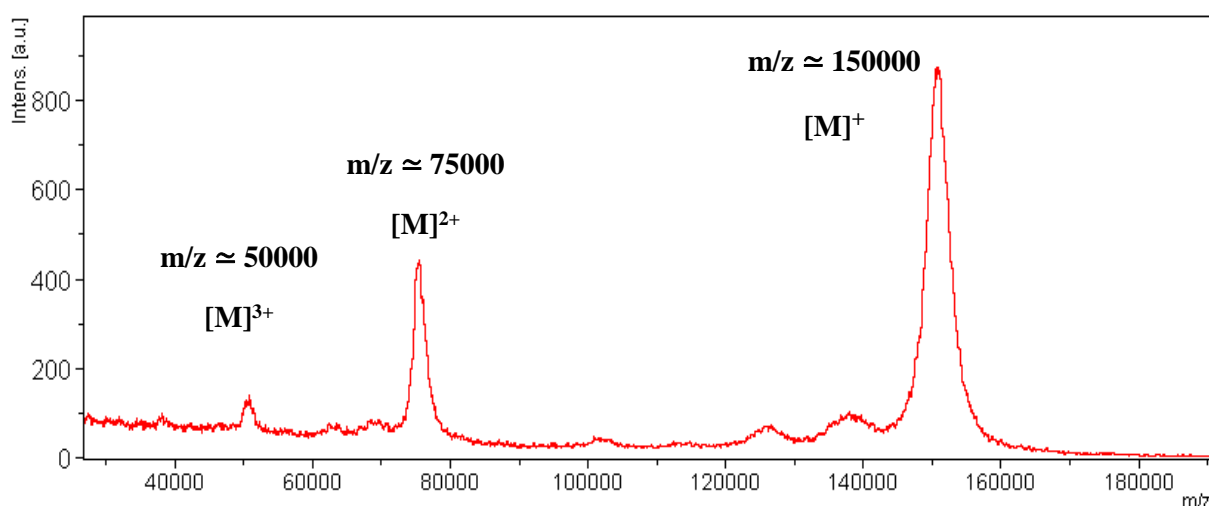


Figure 3.12 : Spectre MALDI⁺ de l'anticorps Dreg200.

3.2 Couplage de L₃ et détermination du taux de marquage

La réaction de marquage a été réalisée sur 200 µg d'anticorps, soit 25 µL de la solution fournie ($n = 1,32$ nmol). À cette solution on a rajouté 200 équivalents du ligand L₃ sous la forme d'un sel de lutidinium, puis le pH du milieu réactionnel a été ajusté à 7,3 par addition d'une solution tampon de PBS et le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure.

L'excès de chélatant n'ayant pas réagi ou hydrolysé a été éliminé par ultrafiltration à travers une série de lavages avec une solution tampon TRIS/HCl à pH = 7,4 et à l'aide de tubes vivapsin500 dont le seuil en poids moléculaire est de 30kDa.

La solution ainsi isolée a été analysée par spectrométrie de masse et par un titrage en émission du ligand à l'aide d'une solution de terbium.

3.2.1 Analyse par spectrométrie de masse

Une partie de la solution obtenue après la réaction a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF après une étape d'élimination des sels sur colonne. Le spectre de masse obtenu montre un déplacement de pics d'une valeur d'environ 8000 Da. Cette valeur correspond à un taux de marquage de 10 chélatants par anticorps.

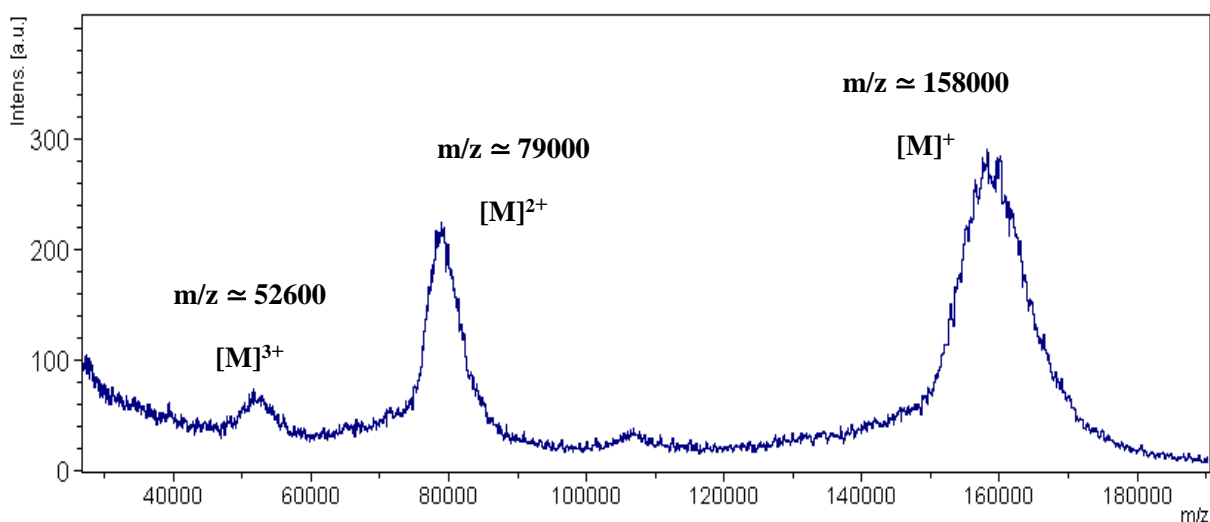


Figure 3.13 : Spectre de masse MALDI⁺ de l'anticorps Dreg200 après la réaction de marquage.

3.2.2 Analyse par spectroscopie d'émission

Un titrage sur environ $3,8 \times 10^{-11}$ moles d'anticorps marqué a été effectué à partir d'une solution de TbCl₃ de concentration 10^{-6} M. Comme illustré à la figure 3.14, on observe avec l'ajout de terbium une augmentation linéaire de l'intensité d'émission mesurée à 544 nm

suivie d'un plateau autour de 8×10^{-8} mol. Le point équivalent a été déterminé à l'intersection entre les deux droites et le taux de marquage correspondant était de 21 chélatants par anticorps. Cette valeur dénote une surévaluation par rapport à ce qui a été obtenu par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

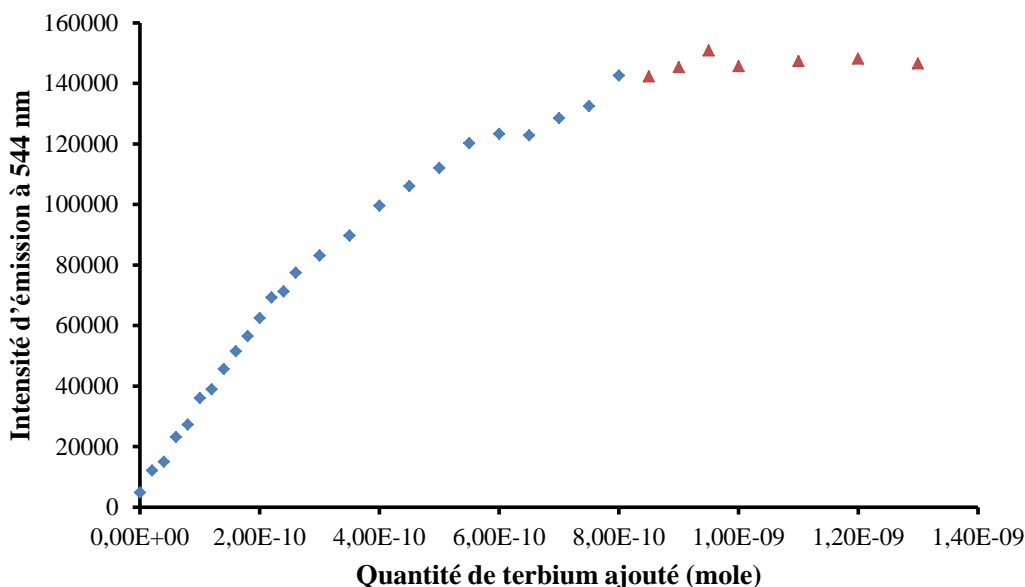


Figure 3.14 : Titrage du produit de la réaction de marquage de l'anticorps Dreg200 avec une solution de terbium.

4. Marquage chimique de la L-sélectine

Après le marquage des anticorps, nous nous sommes intéressés au marquage de l'antigène. Cette opération permet d'envisager la possibilité d'un dosage d'antigènes par compétition.

50 μ L de L-sélectine recombinante humaine nous ont été fournis par les partenaires du projet (Hôpital Charité de Berlin) et préalablement aux expériences de marquage, une caractérisation de l'échantillon par HPLC et par spectrométrie de masse a été réalisée.

4.1. Caractérisation de l'antigène par HPLC

L'échantillon a été analysé par HPLC à l'aide d'une colonne de perfusion avec un mélange de solvants eau et acétonitrile. Le chromatogramme obtenu est représenté sur la figure 3.15 et montre malgré une ligne de base irrégulière l'apparition d'un seul pic significatif au bout de 18 minutes d'éluion.

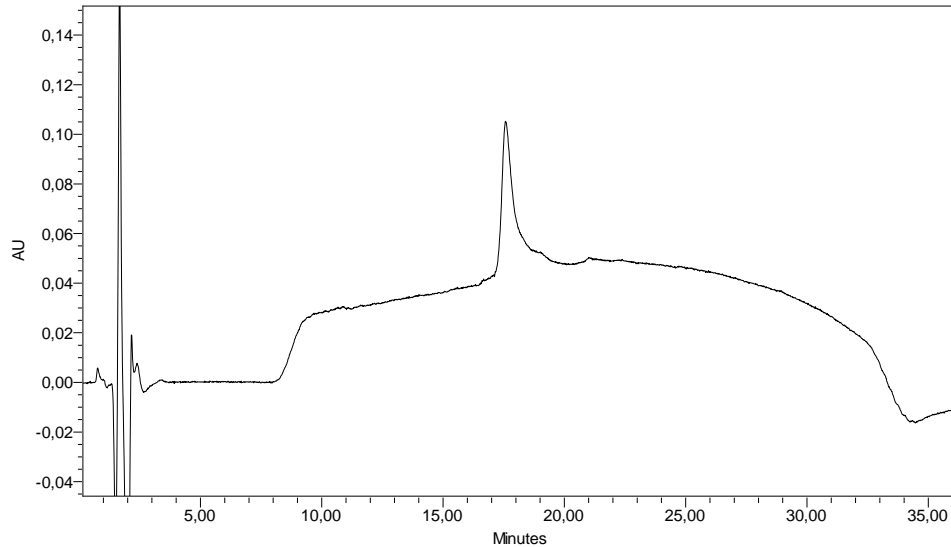


Figure 3.15 : Chromatogramme HPLC de l'anticorps L-sélectine.

4.2. Caractérisation de l'antigène par spectrométrie de masse

L'antigène a été analysé par MALDI-TOF après une étape d'élimination des sels contenus dans la solution. Le spectre de masse fait apparaître un pic large et majoritaire qui permet d'estimer la masse de l'antigène à 72 kDa.

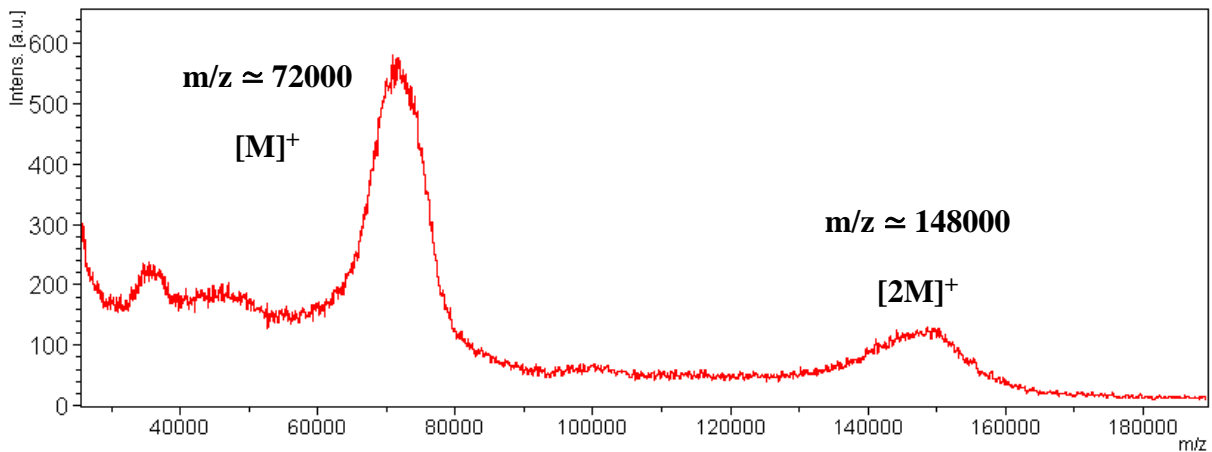


Figure 3.16 : Spectre de masse MALDI⁺ de la L-sélectine.

4.3. Réaction et détermination du taux de marquage

La réaction de marquage a été réalisée à partir de 10 μL de la solution de L-sélectine auxquels on a rajouté 15 équivalents de ligand L_3 dissous dans une solution d'eau légèrement acidifiée (pH = 3) par ajout de HCl. Le pH du milieu est ensuite ajusté à 7,3 par addition

d'une solution tampon PBS et le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant une heure.

La réaction est traitée par élimination des sels contenus dans le solvant et purification sur une colonne de filtration dont le seuil en poids moléculaire est de 7 kDa. Le produit recueilli a été ensuite analysé par spectrométrie de masse et par spectrométrie d'émission.

La superposition des spectres de masses obtenus avant et après la réaction de marquage montre un décalage dont la valeur peut être estimée à 2000 Da. Ce résultat indique un taux de marquage moyen de trois chélatants par antigène.

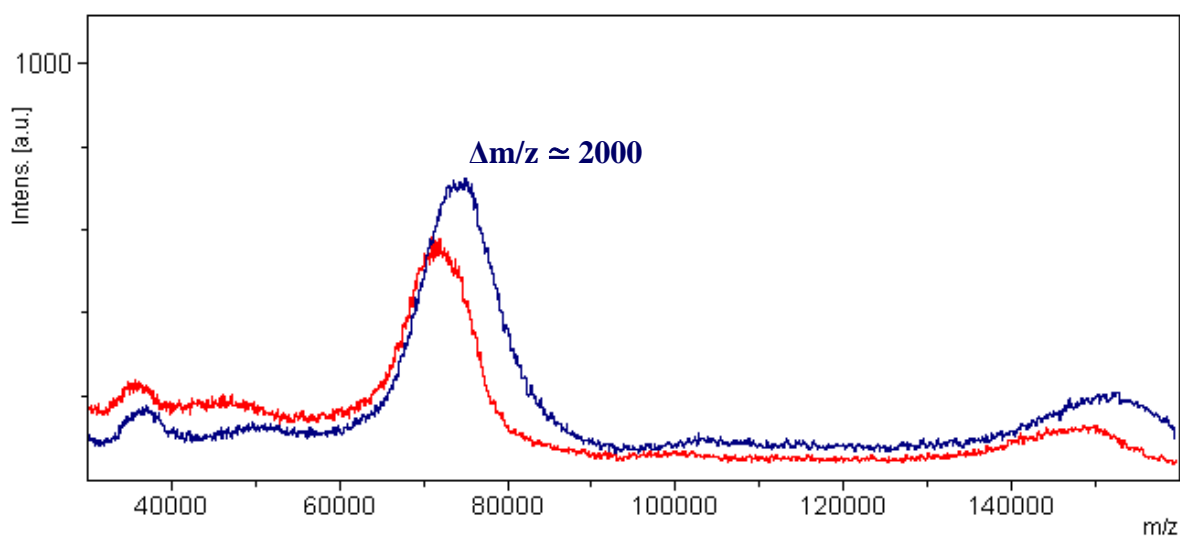


Figure 3.17 : Superposition des spectres de masse de la L-sélectine avant (—) et après (—) la réaction de marquage.

La première partie de ce travail a permis de marquer plusieurs biomolécules, d'évaluer l'efficacité des réactions, mais également de caractériser les produits obtenus à travers la détermination des taux de marquage associés. Ainsi malgré l'hydrolyse rapide de l'ester activé N-hydroxysuccinimidyl porté par le ligand **L**₃, il permet de satisfaire le critère de greffage au matériel biologique. Dans la deuxième partie du chapitre, nous nous intéressons au comportement du ligand et de son complexe de terbium comme donneurs pendant des expériences de transfert d'énergie.

II. Transfert d'énergie

Pour étudier le transfert d'énergie de type FRET des complexes de terbium vers d'autres accepteurs, il est important de s'assurer de la possibilité de les rapprocher dans l'espace à une distance où le transfert d'énergie peut être évalué et de s'affranchir des phénomènes de diffusion des molécules (interactions non-spécifiques). Avant la mise en place d'un système de transfert d'énergie de type FRET sur les antigènes et les anticorps auxquels ce projet de diagnostic s'intéresse, il nous a semblé pertinent d'étudier un système modèle faisant intervenir uniquement les donneurs et accepteurs d'énergie.

Cependant si en présence des marqueurs biologiques le rapprochement des traceurs luminescents se fait grâce à la formation d'immunocomplexes (Figure 1.15), l'obtention d'un système modèle réaliste nécessite d'introduire une interaction spécifique entre les éléments qui le constituent. Parmi les systèmes envisageables, le plus populaire est le couple biotine-streptavidine au sein duquel on retrouve une interaction non-covalente avec une constante d'affinité remarquablement élevée. Cette association spécifique peut être mise à profit pour la conception d'un système modèle selon deux stratégies :

- L'utilisation de donneurs greffés à la streptavidine et d'accepteurs biotinylés
- L'utilisation de donneurs biotinylés et d'accepteurs greffés à la streptavidine

La deuxième possibilité nous a paru particulièrement avantageuse, puisque de nombreux colorants potentiellement accepteurs d'énergie sont disponibles dans le commerce, greffés à des biomolécules, dont la streptavidine.

La synthèse d'un chélatant biotinylé a alors été menée au laboratoire et a conduit au ligand **L₅**.

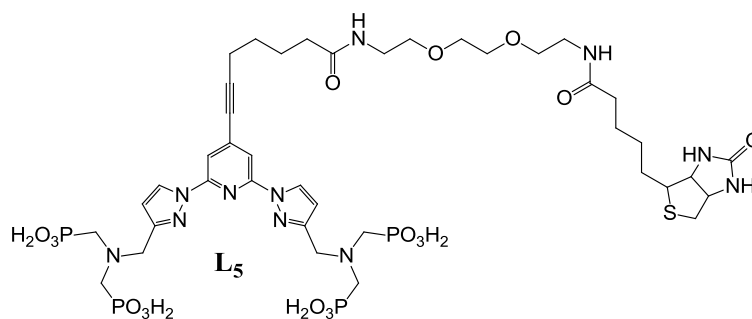


Schéma 3.6 : Formule développée du ligand biotinylé **L₅**.

1. Etude du chélatant biotinylé

La biotine encore appelée vitamine B₈ est constituée d'un noyau de type imidazolone et d'un noyau thiolane accolés, avec une chaîne latérale en C5 qui porte à son extrémité un groupement acide carboxylique. C'est en général à travers cette fonction que la biotine est rattachée à des biomolécules ou à d'autres composés organiques.

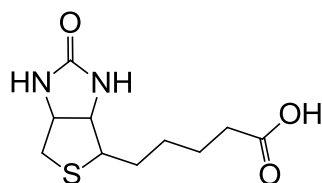


Schéma 3.7 : Formule développée de la vitamine B8 ou biotine.

1.1 Synthèse du ligand

La stratégie synthétique adoptée pour l'obtention du ligand **L₅** implique la condensation d'un espaceur intermédiaire avec la biotine. Afin de faciliter la réaction de couplage peptidique entreprise, la fonction acide carboxylique a été activée à travers la formation un ester N-hydroxysuccinimide et le composé **23** a alors été obtenu.^[22]

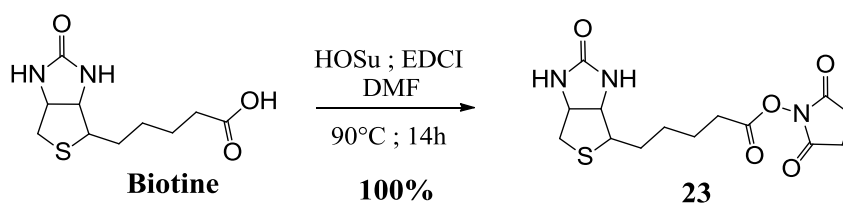


Schéma 3.8 : Réaction d'activation de la biotine.

Par ailleurs, l'intermédiaire nucléophile a été préparé par une réaction de monoprotection d'une chaîne bis-aminotriéthylèneglycol **24** par un groupement *ter*butylcarbonate.^[23]

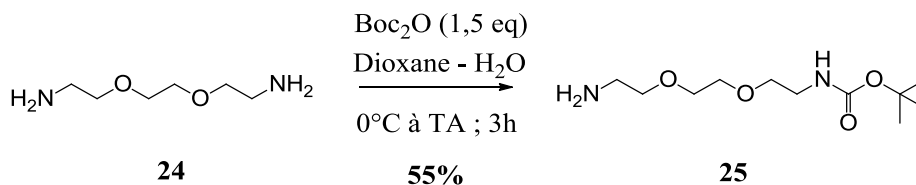


Schéma 3.9 : Protection partielle de la diamine **23**.

La condensation entre les composés **23** et **25** permet d'obtenir un dérivé biotinylé avec un espaceur suffisamment long pour préserver l'affinité importante de la biotine à l'égard de

la streptavidine. Cette réaction a eu lieu dans le méthanol en présence de diisopropyl éthylamine et le composé **26** est obtenu après purification par chromatographie sur colonne.

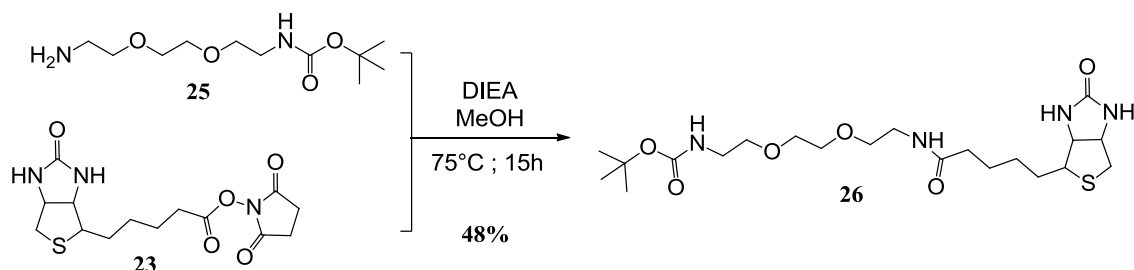


Schéma 3.10 : Couplage de la biotine activée avec la chaîne diaminée.

L'action de l'acide trifluoroacétique à température ambiante permet de déprotéger l'amine avec un rendement quantitatif sous forme de triflate d'ammonium.

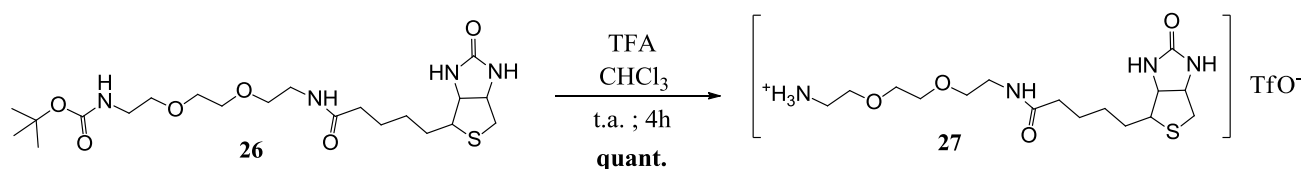


Schéma 3.11 : Réaction de déprotection de l'amine.

Le composé **27** obtenu qui est un bon nucléophile va ensuite être engagé dans une réaction de condensation avec la poche de fonctionnalisation phosphonatée **14**. Ce couplage peptidique a lieu en présence de l'agent de couplage EDCI et d'une base.

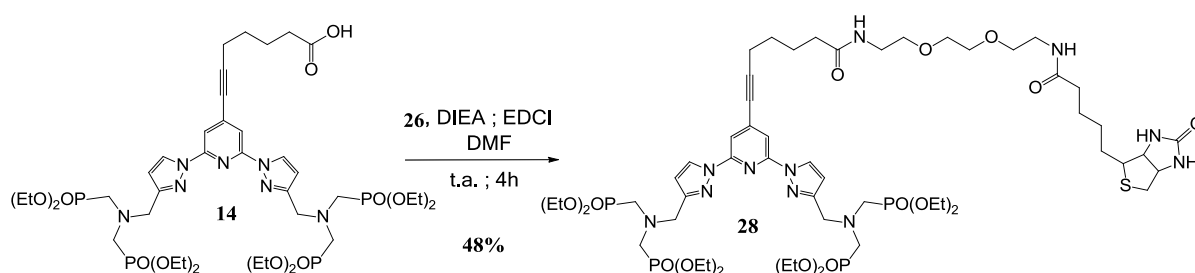
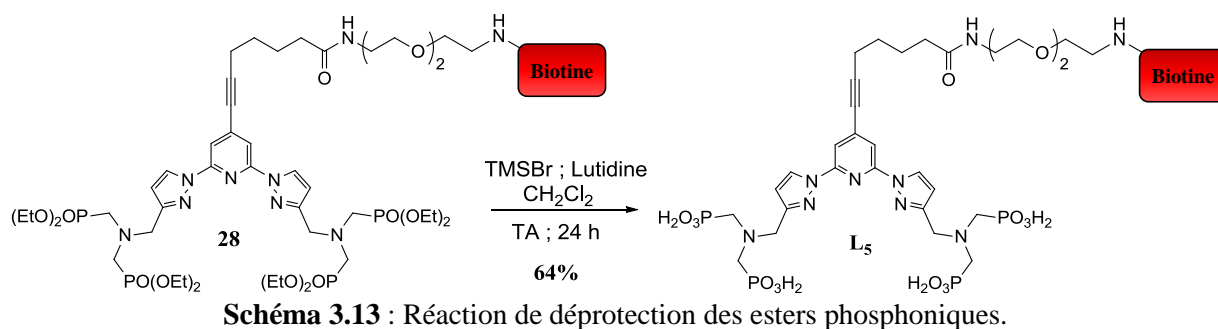


Schéma 3.12 : Couplage peptidique entre le composé **14** et l'espaceur biotinylé.

L'ultime étape de la synthèse de ce ligand portant un dérivé biotinylé a été l'hydrolyse sélective des esters phosphoniques. Comme pour les autres ligands trifonctionnels, cette réaction a été réalisée par l'action du bromure de triméthylsilane à température ambiante et en présence d'un excès de lutidine.



La lutidine a pu être entièrement éliminée du milieu réactionnel par échange de cation lors de la neutralisation du mélange à travers l'ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium. Après ajustement du pH, l'addition de méthanol permet de faire précipiter le ligand **L₅**.

1.2 Caractérisation du ligand

Le ligand **L₅** fonctionnalisé à travers l'introduction d'un dérivé biotinylé a pu être caractérisé entre autres par spectrométrie RMN ¹H, ¹³C et ³¹P.

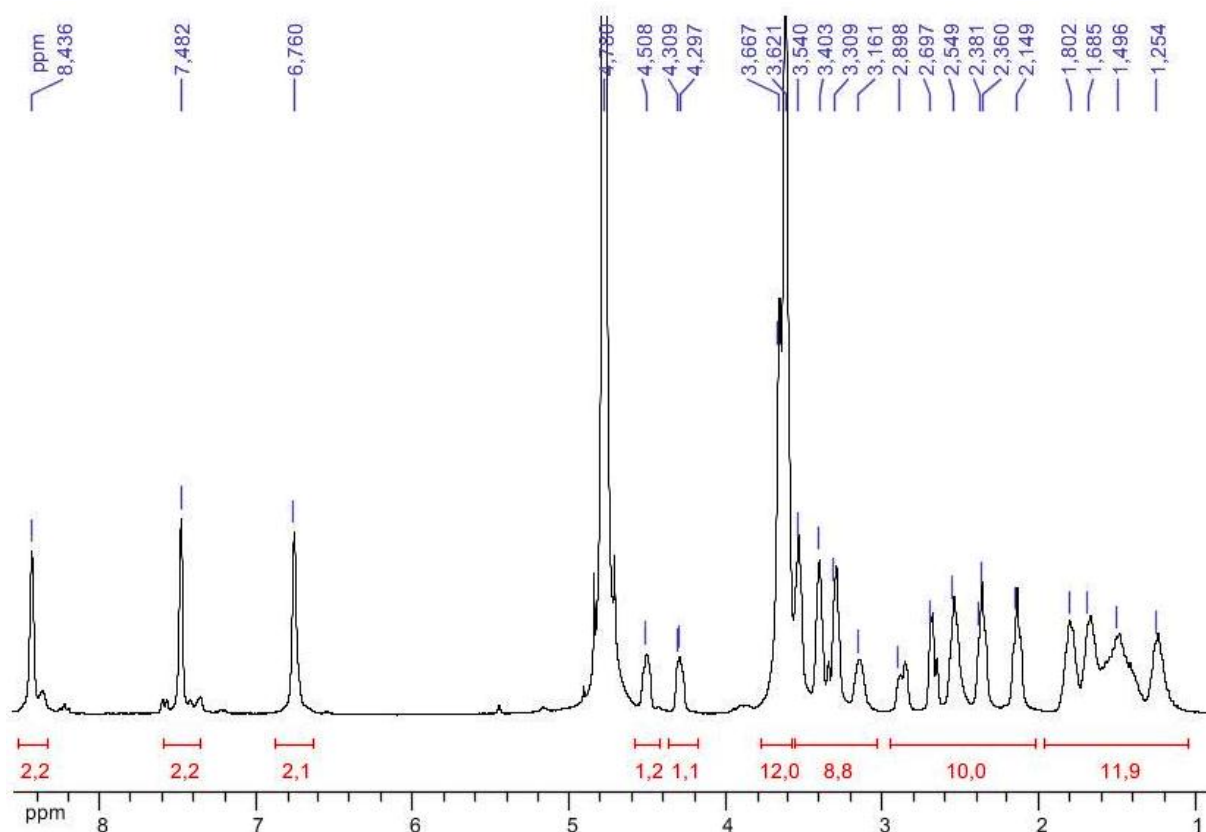


Figure 3.18 : Spectre RMN ¹H du ligand biotinylé **L₅** (D₂O, 300 MHz, t.a.).

La région des protons aliphatiques du spectre est assez complexe du fait de la présence de 20 familles de protons non-échangeables dont les déplacements chimiques sont

relativement proches. On peut cependant attribuer les massifs à 4,31 ppm et 4,51 ppm aux protons $-CH$ de la jonction du cycle imidazolone-thiolane de la biotine. Les protons des groupements $-CH_2$ en alpha et gamma des atomes de phosphore apparaissent entre 3,54 ppm et 3,7 ppm sous la forme d'un massif qui intègre pour les 12 protons correspondants. Les 31 protons aliphatiques restant sont répartis entre les autres signaux tel que le suggère la valeur de leurs intégrales.

Dans la région des protons aromatiques, on retrouve les signaux caractéristiques des protons des pyrazoles (6,76 ppm et 8,44 ppm) et du singulet de la pyridine centrale (7,48 ppm).

La possibilité d'avoir des mélanges de produits phosphonaté est exclue grâce au spectre du phosphore qui ne montre qu'un pic à 7,16 ppm, conformément à l'hypothèse de la formation d'un seul produit phosphoré.

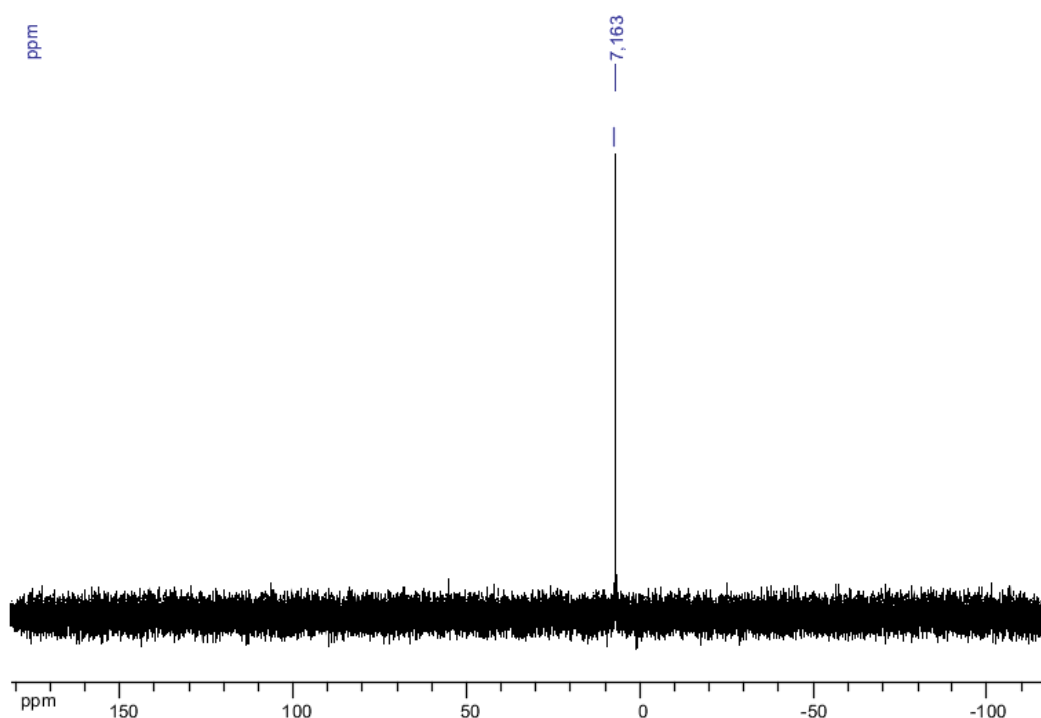


Figure 3.19 : Spectre RMN ^{31}P du ligand biotinylé L_5 (D_2O , 400 MHz, t.a.).

Le but de la synthèse du ligand L_5 était d'obtenir un composé possédant une forte affinité pour différents accepteurs d'énergie en absence de liaison covalente entre les deux entités. Si l'on compare la structure du ligand L_5 à celle des ligands multifonctionnels précédemment synthétisés, seule la nature de la chaîne latérale est modifiée. L'unité de photosensibilisation restant strictement la même, les propriétés de luminescence des

complexes d'ions lanthanides ne devraient donc pas être altérées. Il convient cependant de vérifier cette hypothèse avant d'entamer les expériences de transfert d'énergie.

1.3 Etudes des propriétés spectroscopiques du ligand biotinylé

1.3.1 Titration du ligand par une solution de Tb^{3+}

Une solution du ligand L_5 dans un tampon TRIS/HCl ($c = 0,01\text{ M}$; $pH = 7,0$) a été préparée et dosée à travers l'ajout de quantités croissantes d'une solution de terbium dans le même solvant. Pour chacun des mélanges, les spectres d'absorption et d'émission ont été mesurés.

1.3.1.1. Propriétés d'absorption

Les propriétés d'absorption du ligand L_5 sont très similaires à celles du ligand L_1 avec l'ion terbium puisque la plate-forme conjuguée est strictement la même pour les deux. On observe donc pour le ligand libre une forte absorption à 262 nm due à un mélange des transitions $n \rightarrow \pi^*$ et des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, ainsi qu'une bande de plus faible énergie à 321 nm attribuée aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Lorsque le terbium est rajouté à la solution, il est rapidement complexé et la transition à 262 nm se fait moins intense, suggérant la contribution du doublet libre de l'azote central à la coordination du lanthanide.

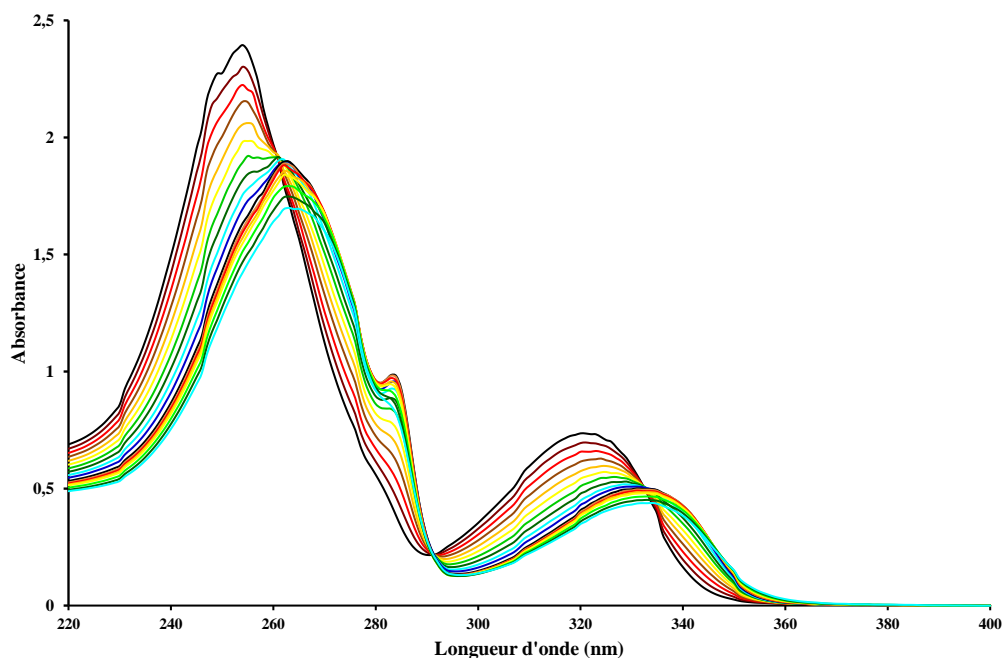


Figure 3.20 : Evolution du spectre d'absorption du ligand L_5 lors de l'addition de quantités croissantes de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ ($[L_5] = 5,04 \times 10^{-5}\text{ M}$; $[Tb^{3+}] = 5,33 \times 10^{-4}\text{ M}$; TRIS/HCl 0,01M à pH 7,0). La dilution n'est pas corrigée.

On observe également un déplacement bathochrome de l'ensemble des bandes d'absorption et l'apparition d'un épaulement à 283 nm. L'état excité le plus faible en énergie se retrouve à 328 nm lorsque le ligand est entièrement complexé et seuls des effets de dilution sont observés avec des ajouts supplémentaires de terbium.

1.3.1.2. Propriétés d'émission

Les spectres d'émission mesurés avec l'ajout de terbium montrent une augmentation monotone de l'intensité des bandes caractéristiques du terbium. En même temps, la contribution du ligand à l'émission de l'échantillon qui s'étend jusqu'à 450 nm diminue de façon continue, jusqu'à devenir complètement nulle. Après ce qui va être déterminé comme le point équivalent de la courbe de titrage, l'ajout supplémentaire de terbium se traduit par une diminution de l'intensité de luminescence qu'on pourrait attribuer soit à la dilution, soit à la formation d'une espèce moins luminescente.

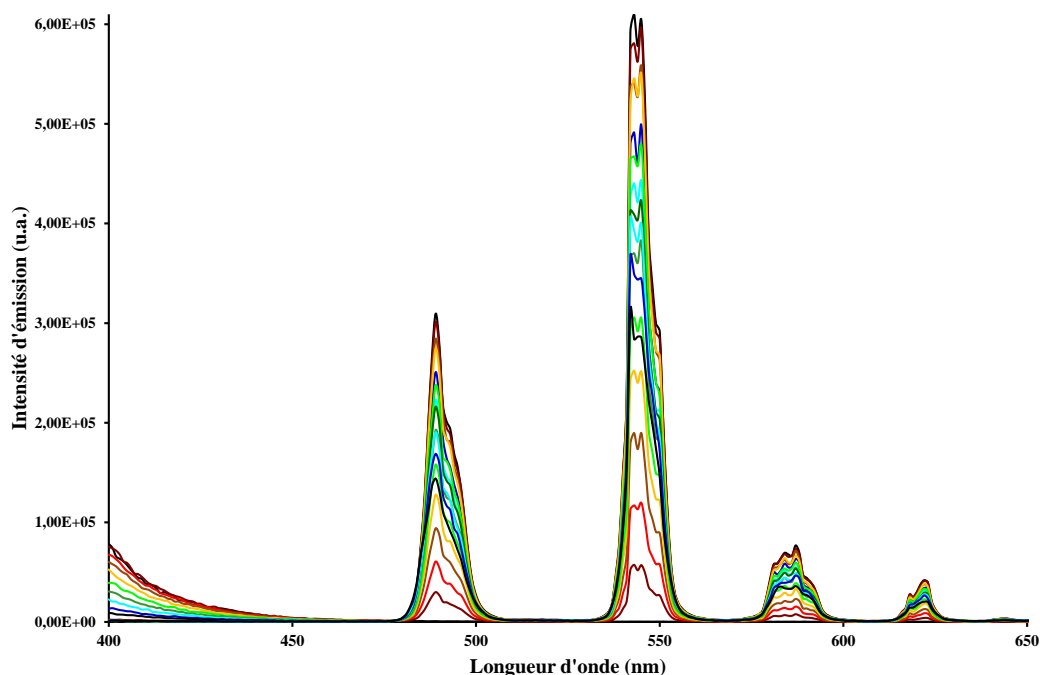


Figure 3.21 : Evolution du spectre d'émission du ligand L_5 ($\lambda_{ex} = 330$ nm) lors de l'addition de quantités croissantes de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ ($[L_5] = 5,04 \times 10^{-5}$ M ; $[Tb^{3+}] = 5,33 \times 10^{-4}$ M ; TRIS/HCl 0,01M à pH 7,0).

Les données obtenues par ce titrage ont pu être analysées à l'aide du logiciel de calculs SPECFIT et une convergence a été obtenue pour un modèle de formation de deux espèces métalliques uniquement dont les complexes ML et M_2L .

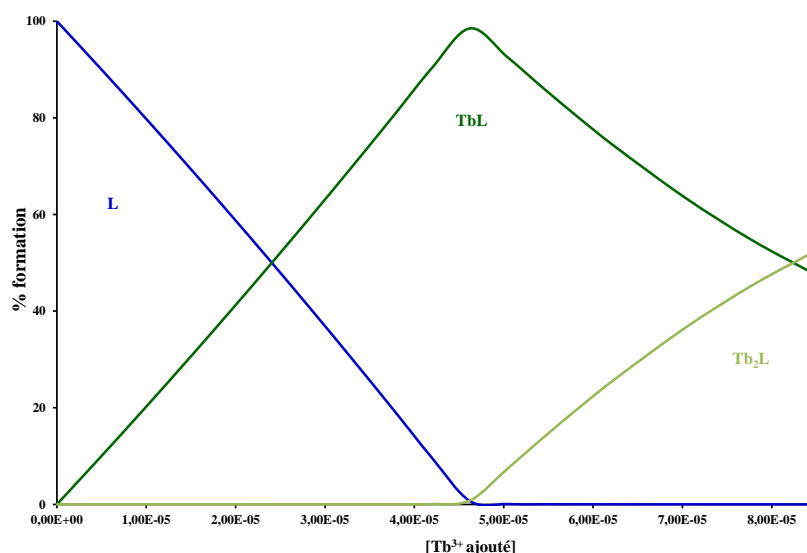


Figure 3.22 : Diagramme de distribution des espèces formées durant le titrage du ligand L_5 ($c = 5,04 \times 10^{-5}$ M) par une solution de terbium.

Il apparaît clairement que le complexe TbL_5 (espèce ML) est formé presque exclusivement lorsque le ligand et le métal sont en solution dans des proportions stœchiométriques.

1.3.2 Caractérisation du complexe TbL_5

Le complexe de terbium avec le ligand biotinylé a été synthétisé par l'ajout d'un équivalent d'une solution de $TbCl_3$ à une solution du ligand biotinylé dans l'eau ($pH = 7,4$). Après ajout de méthanol, une poudre blanche a été obtenue et caractérisée notamment à travers la mesure des spectres d'émission du ligand et du complexe de terbium. Ils sont en tous points semblables à ceux obtenus pour le ligand L_1 et son complexe de terbium. Pour ce qui est des autres données spectroscopiques déterminées pour le ligand biotinylé, elles sont réunies dans le tableau 3.1.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus lors de la caractérisation du complexe de terbium avec le ligand L_1 fait apparaître une légère dégradation des propriétés de luminescence suite à l'ajout d'un dérivé de biotine. Non seulement elle se traduit par une plus faible absorption (diminution de ϵ), mais également par une diminution du rendement quantique de luminescence (diminution de Φ). Cependant, l'interaction avec la chaîne latérale ne semble pas influencer la coordination du cation par les phosphonates, puisque le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination est inchangé.

| | λ_{\max} (nm) | ϵ_{\max} (M ⁻¹ .cm ⁻¹) | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms) | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms) | q | Φ |
|------------------------|--------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---|--------|
| L₅ | 260 321 | 11200 | - | - | - | - |
| TbL₅ | 262 328 | 29500 8400 | 2,16 ms | 2,92 ms | 0 | 19 % |

Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des données photophysiques déterminées pour le ligand **L₅** et son complexe de terbium.

2. Expériences de transfert d'énergie

Les travaux entrepris afin de mettre en évidence un transfert d'énergie des complexes de terbium vers différents accepteurs d'énergie ont été effectués par les partenaires du projet NANOGNOSTICS en Allemagne (Université de Potsdam). Dans un premier temps, les propriétés spectroscopiques du complexe de terbium avec le ligand biotinylé ont été mesurées dans différents solvants, afin d'évaluer la stabilité du complexe et de déterminer le milieu qui conviendrait le mieux à la réalisation des expériences.

2.1 Choix du solvant

Des solutions du complexe ont été préparées dans plusieurs solvants dont l'eau et une solution tampon TRIS/HCl (pH = 7,4). Un tampon borate (pH = 8,4) et un tampon TBS (Tris Buffer Saline) ont également servi à la préparation de solutions de TbL₅.¹ Tandis que les nanocristaux sont vendus par la société Invitrogen, en solution dans un tampon borate, l'intérêt du tampon TBS réside dans sa capacité à simuler des conditions physiologiques. Toujours à cet effet, les propriétés de luminescence du complexe ont été mesurées avant et après ajout de BSA. Le rôle de cette protéine est de prévenir l'adsorption des biomolécules (notamment en ce qui concerne les nanocristaux) à la surface des parois des tubes dans lesquels les expériences de FRET sont réalisées. Pour chacun des huit échantillons équimolaires ainsi préparés, les spectres d'excitation et d'émission ont été mesurés.

La superposition des spectres d'excitation montre que le profil caractéristique du ligand complexé est conforme aux attentes lorsque le complexe est en solution dans l'eau et dans le tampon TRIS. L'addition de BSA a pour effet de diminuer fortement l'intensité

¹ La composition des différentes solutions tampon est donnée dans la partie expérimentale.

mesurée dans les mêmes conditions mais aucun déplacement des maxima n'est observé. On peut donc dire que le métal reste complexé.

Dans les tampons TBS et Borate et avec l'ajout de BSA, on observe des déplacements des maxima des bandes d'excitation qui suggèrent une décomplexation partielle ou totale du terbium.

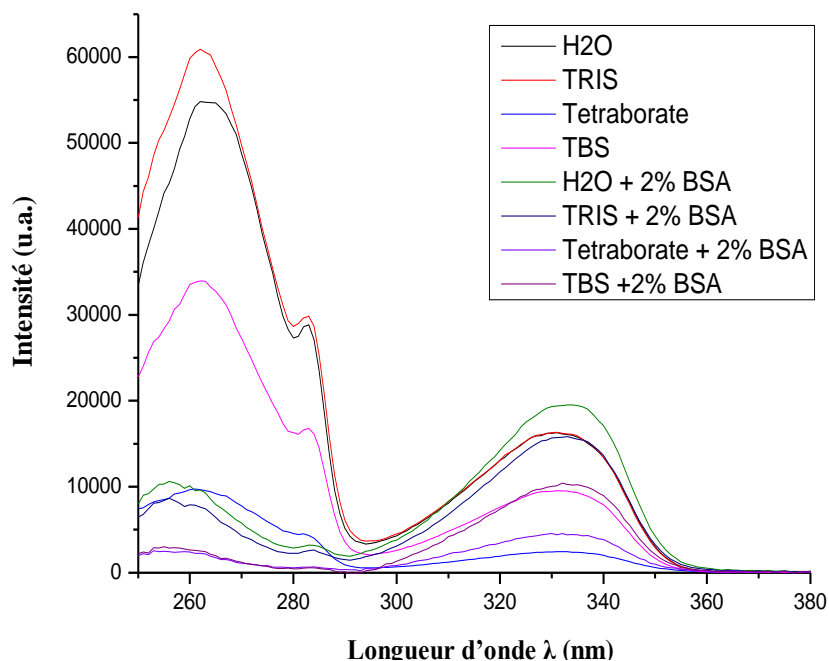


Figure 3.23 : Spectres d'excitation du complexe TbL_5 mesurés dans différents solvants, avec ou sans addition de BSA.

Une tendance similaire est observée en ce qui concerne la variation des spectres d'émission mesurés entre 450 et 750 nm.

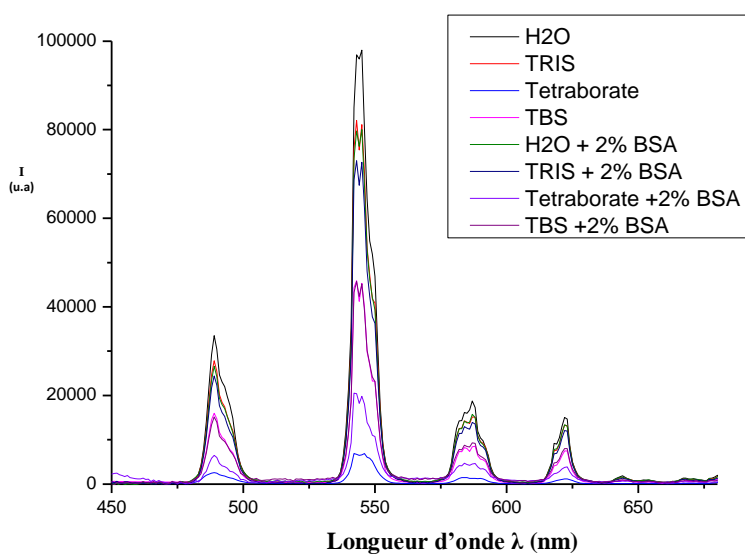


Figure 3.24 : Spectres d'émission du complexe TbL_5 ($\lambda_{ex} = 337nm$) mesurés dans différents solvants, avec ou sans addition de BSA.

Les temps de vie de luminescence ont également été déterminés selon un modèle de décroissance biexponentielle. Les proportions de chacune des composantes ont été calculées à partir de la valeur des coefficients pré-exponentiels.

| Solvant | A1 | τ_1 (ms) | A2 | τ_2 (ms) |
|----------------------|------|---------------|------|---------------|
| Eau | 6 % | 0,88 | 94 % | 3,13 |
| Eau+ 2% BSA | 20 % | 0,18 | 80 % | 2,6 |
| TRIS | 2 % | 0,97 | 98 % | 2,67 |
| TRIS + 2% BSA | 21 % | 1,86 | 79 % | 2,36 |
| Tetraborate | 83 % | 0,55 | 17 % | 1,71 |
| Tetraborate + 2% BSA | 98 % | 0,8 | 2 % | 3,34 |
| TBS | 80 % | 1,67 | 20 % | 2,3 |
| TBS + 2% BSA | 11 % | 0,72 | 89 % | 2,1 |

Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des temps de vie de luminescence du complexe TbL₅ en fonction du solvant.

Lorsque le complexe est en solution dans l'eau et dans le tampon TRIS, la composante dont le temps de vie est le plus élevé est majoritaire et sa valeur moyenne ($\tau_1 = 2,6 \pm 0,5$ ms) correspond à celle obtenue pour le complexe TbL₅ tel que caractérisé précédemment. Dans le tampon tétraborate, avec ou sans ajout de BSA, les temps de vie sont extrêmement courts et reflètent soit la décomplexation du complexe biotinylé, soit la formation d'espèces ternaires aux propriétés de luminescence moins avantageuses. Enfin en ce qui concerne le tampon TBS, l'addition de BSA améliore sensiblement les propriétés de luminescence (absorbance, émission), mais aussi le temps de vie de luminescence moyen du mélange.

Il ressort de cette étude comparative que les propriétés du complexe dépendent étroitement du milieu dans lequel ils sont solubilisés. Les expériences de FRET qui suivront seront ainsi réalisées dans des tampons différents afin de comparer l'influence de ces derniers dans le traitement du signal.

Les premières expériences ont été réalisées avec un colorant organique greffé à la streptavidine (Cy5-Strep) comme accepteur d'énergie. Ensuite, les conditions expérimentales ainsi mises au point ont été transposées à l'utilisation de nanocristaux semi-conducteurs luminescents, les quantum dots (QDs).

2.2 Evaluation du FRET - Généralités

Les expériences de FRET ont été réalisées à partir de microplaques dont les puits sont remplis par les échantillons à analyser. Le signal mesuré provient de l'ensemble des fluorophores contenus dans les puits. En ce qui concerne l'évaluation du transfert d'énergie, deux démarches peuvent être entreprises indépendamment ou en synergie.

La première consiste à quantifier les variations d'émission. Il s'agit en général de mesurer la diminution de l'intensité d'émission du donneur,^[24] l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur d'énergie, ou de calculer le rapport entre les intensités d'émission de l'accepteur et du donneur d'énergie.^[25] Ce ratio est particulièrement pertinent pour des expériences où le bruit de fond est important ou quand l'augmentation du signal de l'accepteur est faible. Il permet aussi de fournir des données indépendantes du facteur de dilution qui est le même pour le donneur et l'accepteur d'énergie, et de la concentration des espèces en solution.

La deuxième démarche consiste à mesurer les décroissances du signal de luminescence en fonction du temps pour chacune des espèces en solution.^[26] La fenêtre de temps choisie doit être suffisamment grande pour montrer l'extinction de la luminescence de tous les fluorophores. Pour les expériences réalisées dans le cadre de cette étude, la décroissance de l'intensité des signaux de luminescence est mesurée entre 0 et 8 ms ou 10 ms après l'excitation des échantillons. Au maximum d'émission du complexe TbL₅ (544 nm) et en absence d'accepteur, la courbe de décroissance obtenue qui correspond à un temps de vie long peut être considérée comme une référence. La diminution de la pente de cette courbe ou la diminution de l'intensité d'émission du donneur d'énergie au sein des mélanges contenant des quantités croissantes d'accepteur est associée à un transfert d'énergie de type FRET. Ce transfert se traduit également par l'apparition d'un temps de vie de luminescence de l'accepteur en présence du donneur plus long que pour l'accepteur seul. L'efficacité du transfert d'énergie (η) peut d'ailleurs être calculée à partir des valeurs des intensités d'émissions ou des temps de vie du donneur en présence de l'accepteur d'énergie (I_{DA} et τ_{DA}) ou en absence de ce dernier (I_D et τ_D).

$$\eta = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad [3.1]$$

2.3 Utilisation de la Cyanine 5 (Cy5)

Les cyanines sont des dérivés organiques appartenant à la famille des polyméthines. En bout de chaîne, les cyanines possèdent deux atomes d'azote dont un chargé positivement et chacun d'eux appartient à un hétérocycle. L'intérêt de ces colorants est leur importante absorption dans la région visible du spectre de la lumière ainsi que leurs propriétés de luminescence (rendements quantiques) remarquables dans le visible et le proche infrarouge. De nombreuses applications - dont l'imagerie *in vivo* - sont ainsi développées sur la base de leur luminescence et de leur caractère biocompatible.^[27] Les propriétés de luminescence de ces composés dépendent du nombre de groupements méthine de la chaîne centrale ainsi que de la nature des hétérocycles aromatiques. Dans le cadre de cette étude une cyanine Cy5 portant deux dérivés de type imidazolium a été choisie comme accepteur d'énergie.

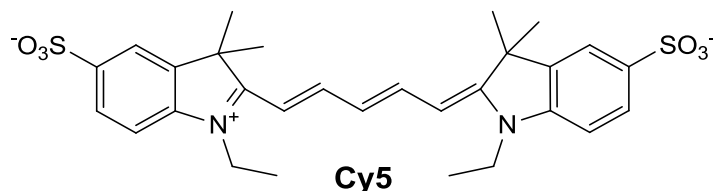


Schéma 3.14 : Formule développée de la cyanine 5 utilisée comme accepteur d'énergie.

Le spectre d'absorption de la cyanine 5 est dominé par une bande de forte intensité autour de 650 nm et son maximum d'émission se situe à environ 670 nm. Ces caractéristiques spectrales permettent non seulement d'obtenir un bon recouvrement entre l'absorption du colorant et l'émission de l'ion terbium dans le vert, mais aussi d'éviter une interférence entre les spectres d'émission du donneur et de l'accepteur lors de la mesure du signal de transfert d'énergie.

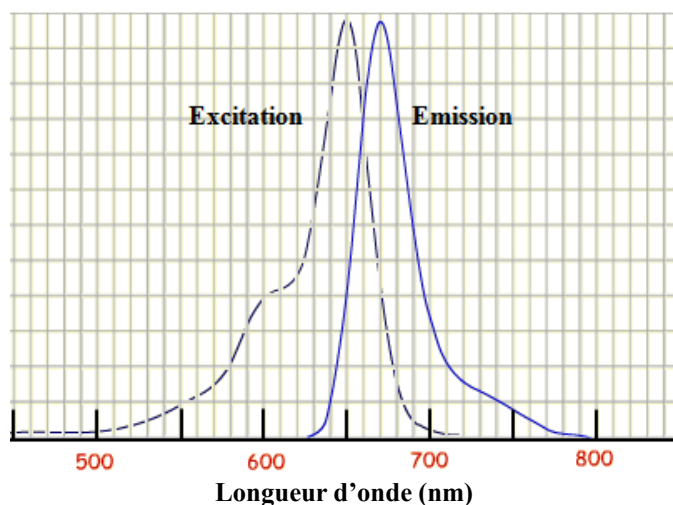


Figure 3.25 : Spectres d'excitation et d'émission normalisés de la Cyanine5.

L'étude du transfert d'énergie a été réalisée à partir du complexe de terbium TbL₅ comme donneur d'énergie et de solutions de cyanine greffée à la streptavidine. Le transfert d'énergie a été apprécié à la fois en fonction de la variation des intensités d'émission des donneurs et des accepteurs, et en fonction de l'évolution de leurs temps de vie de luminescence. L'influence du solvant sera également mise en évidence en réalisant les analyses pour un même couple donneur/accepteur dans des tampons différents, avec ou sans ajout de BSA.

2.3.1 Milieu Tampon TRIS

Le complexe de terbium biotinylé ($c = 2 \text{ nM}$) a été mis en solution dans un tampon TRIS/HCl et on y a ensuite ajouté la cyanine streptavidinylée (Cy5-Strep) dans des proportions variables dont 0,025, 0,1, 0,15 et 0,2 équivalents. Pour chacun des mélanges et après un temps d'incubation de quelques heures, la décroissance de l'intensité d'émission de luminescence après excitation à 337 nm a été mesurée pour le donneur et pour l'accepteur d'énergie en fonction du temps. Des solutions contenant chacune uniquement le complexe de terbium (donneur en absence de l'accepteur) et uniquement le colorant (accepteur en absence du donneur) ont également été préparées et les décroissances des intensités d'émission pour chacune d'elles mesurées à titre de référence.

En ce qui concerne la luminescence du colorant seul, on observe une décroissance rapide de son intensité d'émission quelle que soit la concentration. Cette chute rapide est en accord avec un temps de vie court (quelques nanosecondes pour la cyanine). La solution du complexe de terbium présente quant à elle une décroissance de luminescence beaucoup plus lente (courbe en noir sur la figure 3.26) sans ajout de colorant en accord avec un temps de vie de luminescence élevé (de l'ordre de la milliseconde).

Pour les mélanges contenant des quantités croissantes du colorant, les mesures enregistrées au maximum d'émission du complexe montrent une diminution de l'intensité d'émission par rapport au signal de référence. La similitude des courbes de décroissance ne permet cependant pas d'associer une diminution du temps de vie à cette variation ou d'exclure un effet de la dilution.

Pour ce qui est du signal mesuré au maximum d'émission de la cyanine, il est possible de mettre en évidence d'une part l'augmentation de l'intensité du signal par rapport à la référence mesurée en absence de terbium et d'autre part d'observer une modification du profil de décroissance des courbes auquel on peut alors attribuer deux tendances :

- La première est une décroissance rapide de l'intensité d'émission de même pente que celle obtenue en absence de donneur d'énergie. Il est possible d'attribuer cette contribution à l'excitation directe de la cyanine.
- La deuxième tendance consiste en une diminution plus lente du temps de vie, qui pourrait résulter du transfert d'énergie.

Cette constatation n'est cependant pas suffisante pour de l'attribution univoque de la variation des intensités d'émission à un transfert d'énergie, puisque qu'il y a une contribution évidente du complexe de terbium au signal enregistré à cette longueur d'onde.

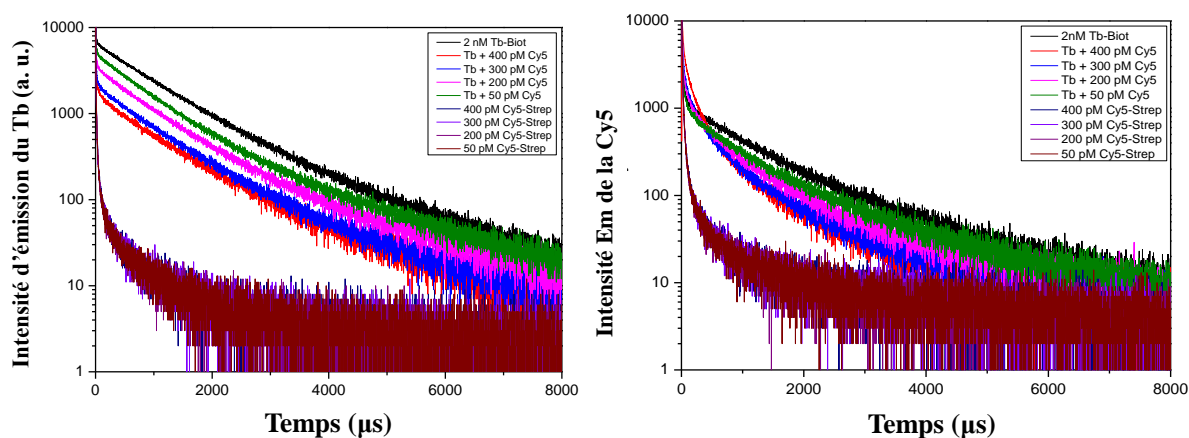


Figure 3.26 : Décroissance de l'intensité d'émission du complexe de terbium (à gauche, $\lambda_{em} = 544$) et de la cyanine (à droite, $\lambda_{em} = 670$ nm) après excitation des échantillons en solution dans le tampon TRIS à 337 nm.

Le calcul du rapport des intensités d'émission de l'accepteur et du donneur entre 50 et 500 μ s permettant de prendre en compte la dilution a été effectué. La représentation de ce ratio (figure 3.27) en fonction du nombre de moles de cyanine ajouté met en évidence une augmentation significative de l'intensité d'émission de l'accepteur d'énergie après un délai de 50 μ s entre l'excitation de l'échantillon et la mesure du signal.

Le rapport entre l'intensité d'émission de l'accepteur d'énergie à la fin du titrage et celle du début du titrage (≈ 6) correspond à une augmentation du signal de 600 %. On peut raisonnablement attribuer ce résultat à un transfert d'énergie de type FRET.

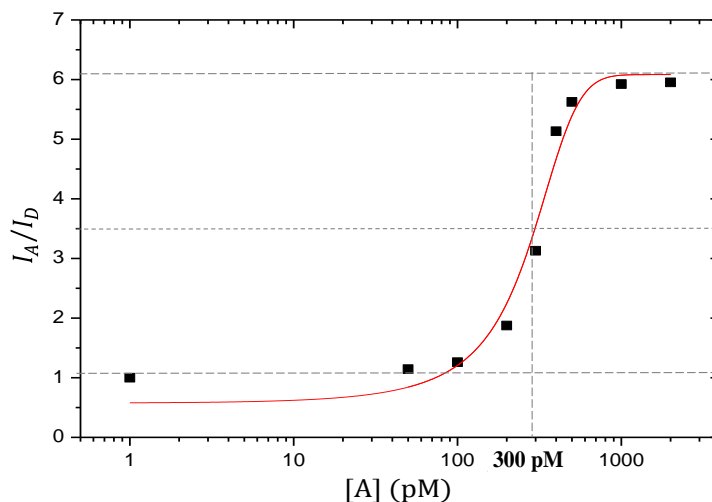


Figure 3.27 : Rapport entre l'intensité d'émission de la cyanine mesurée à 670 nm et du terbium mesuré à 544 nm en fonction de l'ajout de cyanine ($\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm). Les intensités ont été mesurées entre 50 et 500 μs .

2.3.2 Milieu Tampon TRIS + BSA (0,2 %)

Le signal de FRET est extrait à travers le tracé de la courbe donnant le rapport entre les intensités d'émission de la cyanine et du complexe de terbium accumulées en temps résolu (de 50 à 800 μs) en fonction de la quantité de cyanine ajoutée à la solution. Cette courbe traduit une augmentation de près de 500 % de l'intensité d'émission de la cyanine que l'on peut attribuer au transfert d'énergie.

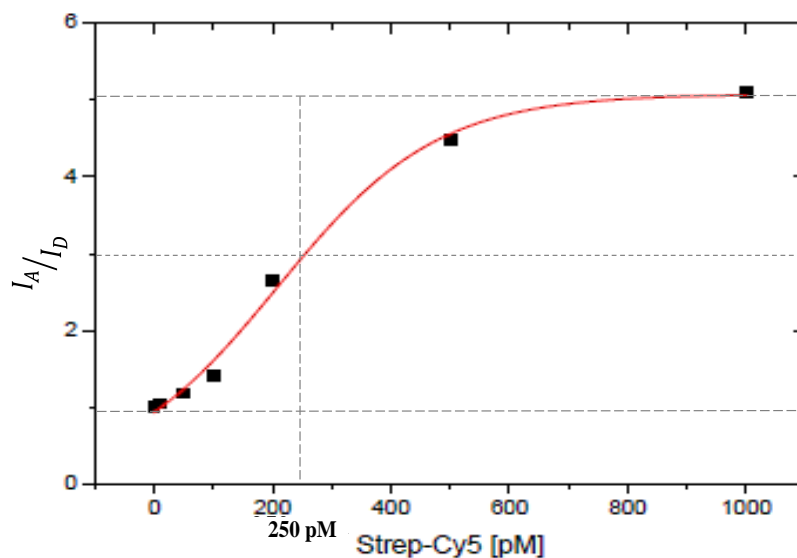


Figure 3.28 : Tracé du rapport de l'intensité d'émission de l'accepteur sur celle du donneur en fonction de la concentration en accepteur et en temps résolu (entre 50 et 800 μs).

2.3.3 Milieu Tampon TBS + BSA (0,2 %)

Ce troisième tampon a été utilisé pour sa capacité à reproduire les conditions salines physiologiques. Dans ces conditions, des mélanges de la solution de terbium avec des ajouts de cyanine de 0,1 à 1 équivalent ont été préparés. Le tracé du rapport des intensités d'émission en fonction du temps ou de la concentration en colorant confirme un transfert d'énergie du complexe de terbium vers la cyanine.

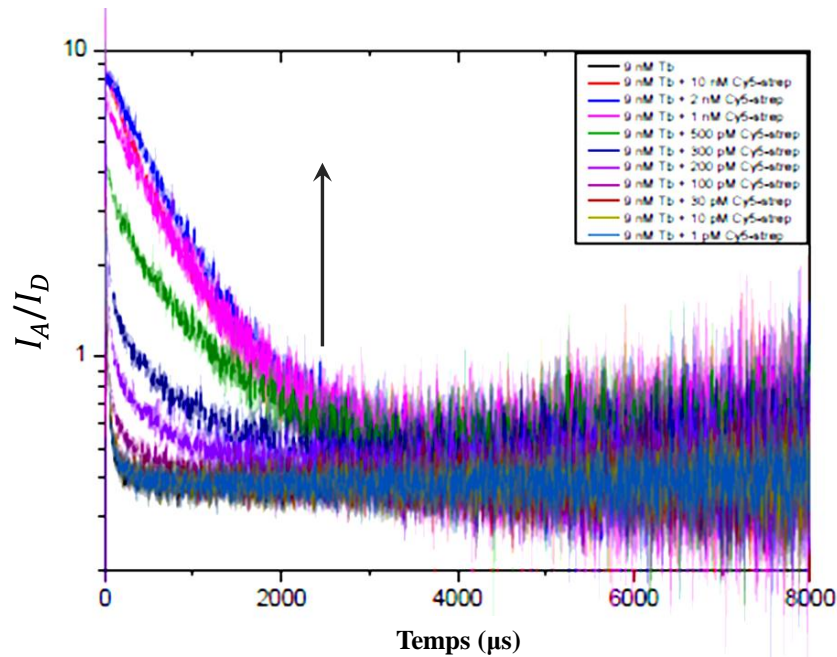


Figure 3.29 : Représentation de l'intensité d'émission de la cyanine sur celle du complexe de Tb (9nM) après excitation des échantillons à 337 nm.

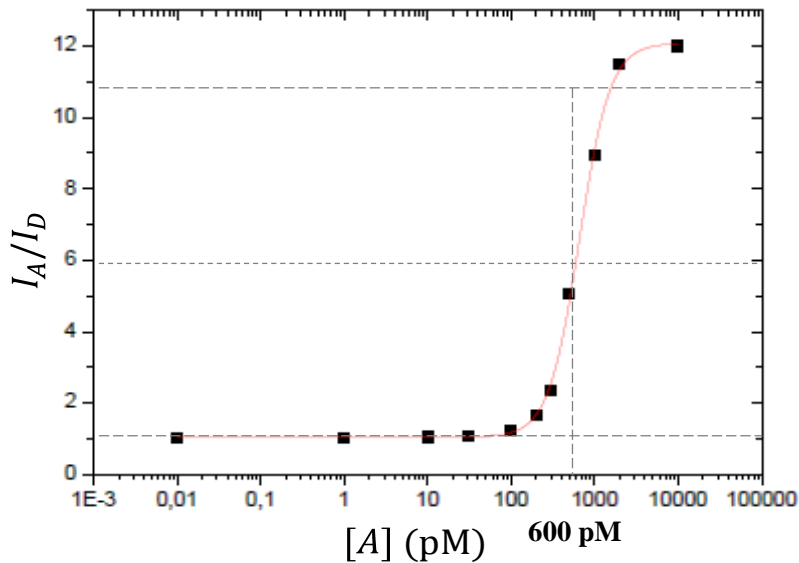


Figure 3.30 : Tracé du rapport de l'intensité d'émission de l'accepteur sur celle du donneur en fonction de la concentration en accepteur et en temps résolu (de 150 à 1000 μs).

Cette augmentation du signal d'émission du colorant peut une fois de plus être attribuée à un transfert d'énergie du complexe de terbium vers la cyanine.

L'effectivité d'un transfert d'énergie de type FRET du complexe de terbium dans un système avec un colorant organique comme accepteur d'énergie a donc été démontrée dans les trois milieux étudiés.

2.4 Utilisation de nanocristaux luminescents

Nous avons réalisé les expériences de cette section avec des nanocristaux semi-conducteurs dont les propriétés photophysiques sont différentes comme accepteurs d'énergie. Dans un premier temps nous avons utilisé des nanocristaux dont le maximum d'émission est à 655 nm et dans un second temps des nanocristaux dont le maximum d'émission est à 705 nm.

2.4.1 Nanocristaux QD655

Le maximum d'émission de ces cristaux est situé vers 655 nm et leur spectre d'absorption s'étend de la région UV au visible (300 à 650 nm).

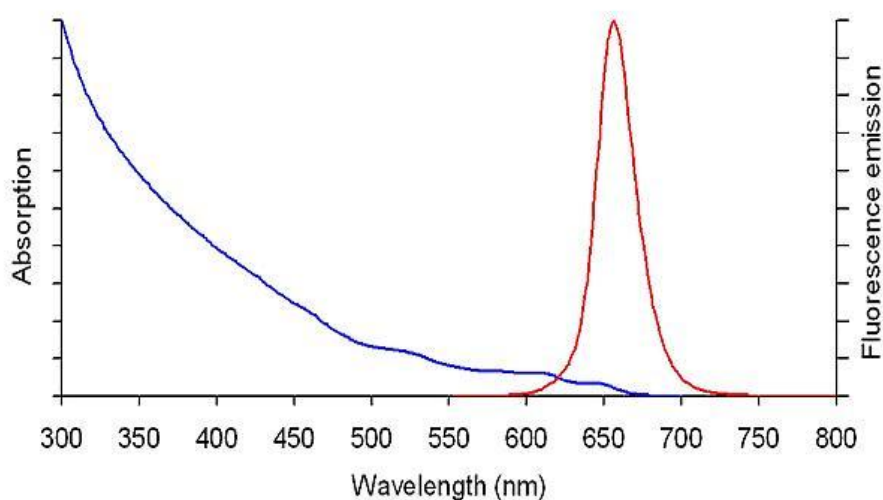


Figure 3.31 : Représentation du spectre d'absorption (—) et du spectre d'émission (—) des nanocristaux QD655.

L'échantillon que nous avons utilisé est commercialisé en solution par Invitrogen. Tandis que pour les colorants utilisés précédemment chaque molécule de colorant est liée à une seule biomolécule, il y a 5 à 10 streptavidines à la surface de chaque particule. L'équivalence en nombre de moles ne correspond donc pas nécessairement à une équivalence en nombre de sites de reconnaissance spécifique.

2.4.1.1 Milieu Tampon TRIS

Pour l'expérience, une solution du complexe de Tb (50 nM) a été préparée dans un tampon TRIS (pH = 7,4) et les nanocristaux ont été dilués avec le même solvant. Plusieurs mélanges ont été préparés en ajoutant des proportions croissantes de QD-Strep à une solution du complexe de terbium. Après incubation, chacun des mélanges a été excité à 337 nm et le signal d'émission du complexe de terbium mesuré. La représentation des décroissances de l'intensité de luminescence mesurée au maximum d'émission du terbium en fonction du temps pour les différents ajouts ne fait pas apparaître de variations significatives de l'intensité d'émission. On note tout de même une légère diminution du temps de vie de luminescence (diminution de la pente du déclin de luminescence).

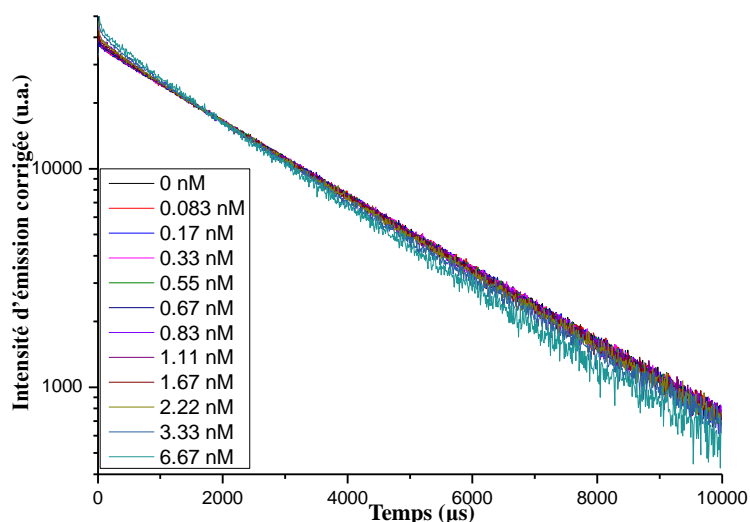


Figure 3.32 : Représentation de l'intensité d'émission du donneur (50 nM, $\lambda_{\text{ex}} = 337$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 544$ nm) en fonction du temps à différentes concentrations d'accepteur (de 0 à 6,67 nM).

A contrario, la représentation des décroissances de l'intensité d'émission à 655 nm en fonction du temps pour les différents ajouts fait apparaître une augmentation du signal provenant des nanocristaux.

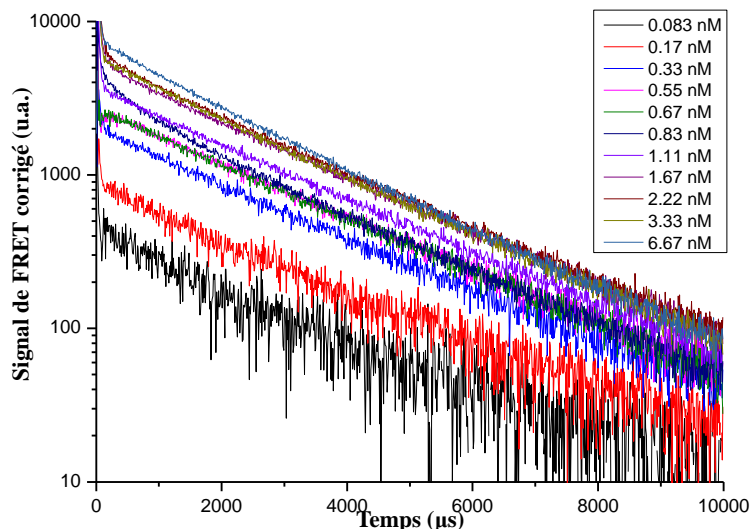


Figure 3.33 : Représentation de l'intensité d'émission de l'accepteur en fonction du temps à différentes concentrations de l'accepteur.

Cependant, le tracé du rapport entre l'intensité d'émission de l'accepteur et du complexe de terbium montre que cette augmentation est linéaire et suggère qu'elle pourrait résulter non pas d'un transfert d'énergie du complexe de terbium, mais de l'excitation directe des nanocristaux dont la concentration augmente.

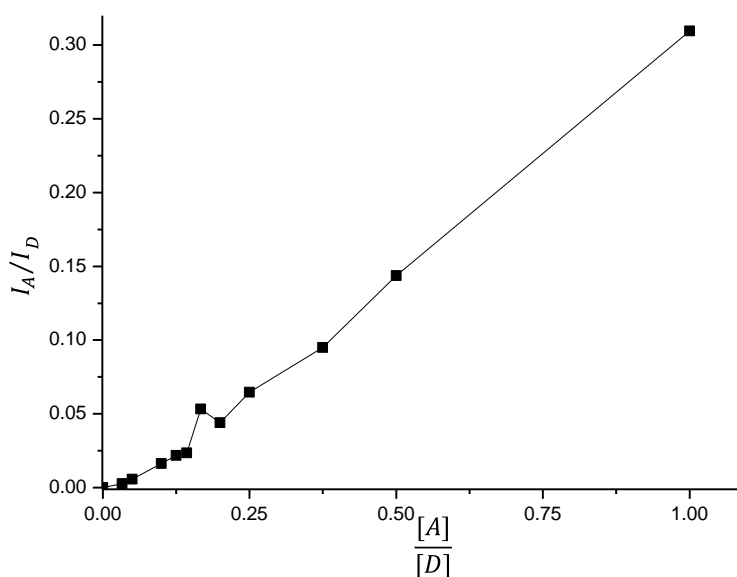


Figure 3.34 : Tracé du rapport de l'intensité d'émission de QD655-Strep sur celle du complexe Biot-Tb (50 nM) en fonction de la concentration en QD655-Strep (de 0 à 6,67 nM) de 50 à 500 μ s.

2.4.1.2 Milieu Tampon Borate + BSA (0,2 %)

Les conditions de mesure du FRET ont été modifiées pour le même couple Tb/QD-Strep sur une plus faible quantité de complexe (9 nM) et en passant d'un milieu tampon TRIS à un milieu tampon Borate auquel est rajouté la BSA afin de minimiser les phénomènes

d'adsorption sur les membranes. Certes, il a été démontré précédemment que les propriétés du complexe de terbium ne sont pas très avantageuses dans ce tampon, mais c'est dans ces conditions que les nanocristaux sont commercialisés.

Malheureusement avec l'augmentation de la proportion de nanocristaux en solution, la variation de l'intensité d'émission du complexe de terbium et la diminution de son temps de vie ne sont pas suffisamment significatifs pour conclure à un FRET. En ce qui concerne le rapport des intensités de l'accepteur et du donneur (figure 3.35), son augmentation linéaire ne permet pas non plus d'exclure un phénomène d'excitation directe.

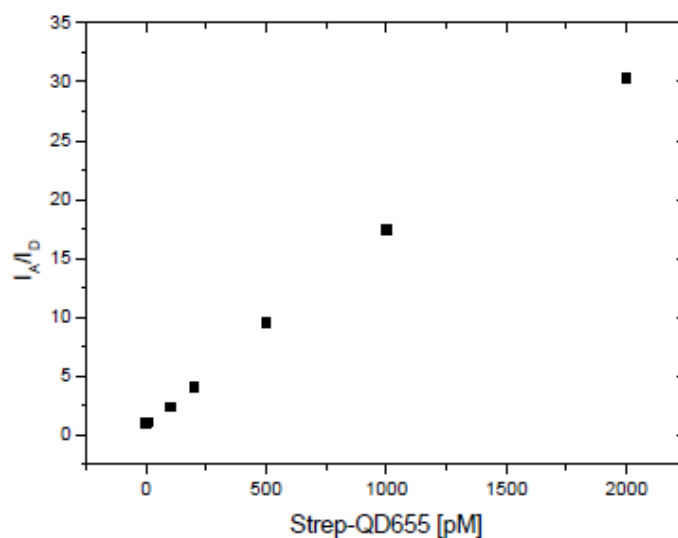


Figure 3.35 : Tracé du rapport de l'intensité d'émission de QD655-Strep (de 0 à 2 nM) sur celle du complexe Biot-Tb (9 nM) en fonction de la concentration en accepteur et en temps résolu (de 50 à 500 μ s).

Dans les conditions expérimentales, il n'a pas été possible de mettre en évidence sans ambiguïtés un transfert d'énergie entre le complexe de terbium et des nanocristaux QD655 streptavidinylés, indépendamment du milieu d'étude. D'autres expériences de FRET ont été menées avec des nanocristaux dont les propriétés de luminescence diffèrent de celles de QD655-Strep.

2.4.2 Utilisation de nanocristaux QD705-Strep

Le maximum d'émission des nanocristaux QD705 est davantage déplacé vers le rouge par rapport aux nanocristaux QD655.

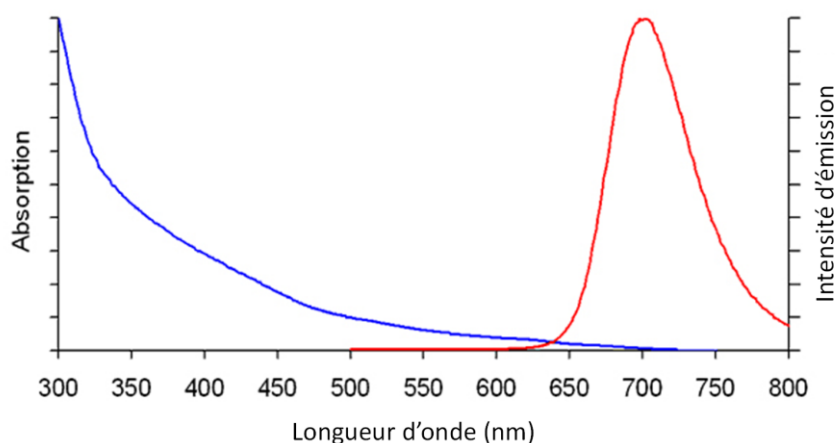


Figure 3.36 : Représentation du spectre d'absorption (—) et du spectre d'émission (—) des nanocristaux QD705.

À défaut de résoudre le problème de l'excitation simultanée de l'accepteur et du donneur d'énergie, son utilisation permet d'avoir une meilleure ségrégation des spectres d'émission du donneur et de l'accepteur d'énergie, ce qui confère une plus grande précision aux calculs de FRET.

Plusieurs essais ont été effectués en faisant varier les conditions expérimentales dont la nature du tampon et les meilleurs résultats ont été obtenus à partir d'un échantillon du complexe TbL₅ (9 nM) en solution dans un tampon borate + BSA (0,2 %). Des mélanges contenant des quantités croissantes de Strep-QD705 de 1 pM à 2 nM ont été préparés et, après une période d'incubation de trois heures, la décroissance de l'intensité de luminescence à 705 nm a été mesurée. La mesure du signal d'émission d'une solution de terbium dans les mêmes conditions confirme que pour ce couple donneur/accepteur, la contribution du donneur au signal enregistré au maximum d'émission de l'accepteur est négligeable.

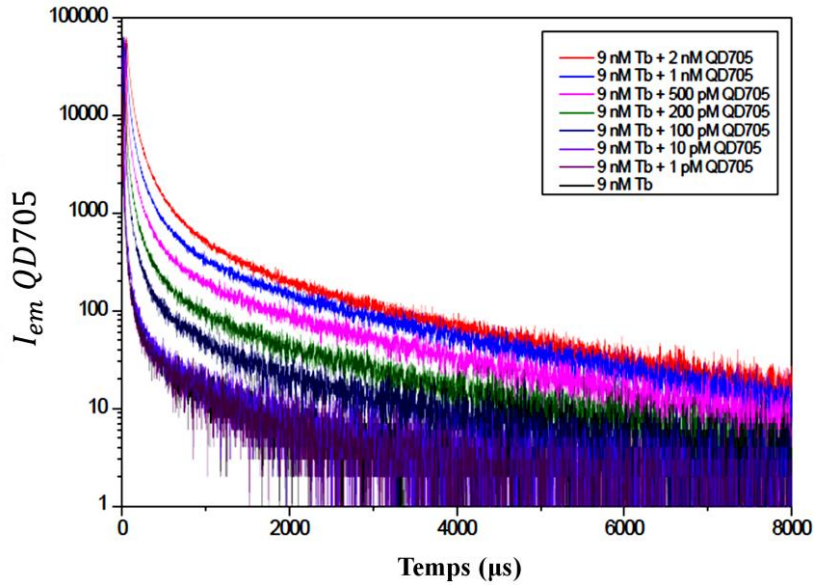


Figure 3.37 : Courbes de décroissance de l'intensité d'émission des nanocristaux QD705 en fonction du temps après excitation à 337 nm pour des mélanges Tb/QD avec des proportions croissantes de QD705.

Cette figure montre également une augmentation de l'intensité d'émission avec la concentration en accepteur. Cependant lorsque le ratio I_A/I_D a été mesuré en fonction du nombre de moles de QD705, une dépendance linéaire qui est corrélable à l'augmentation de la concentration en accepteur est apparue.

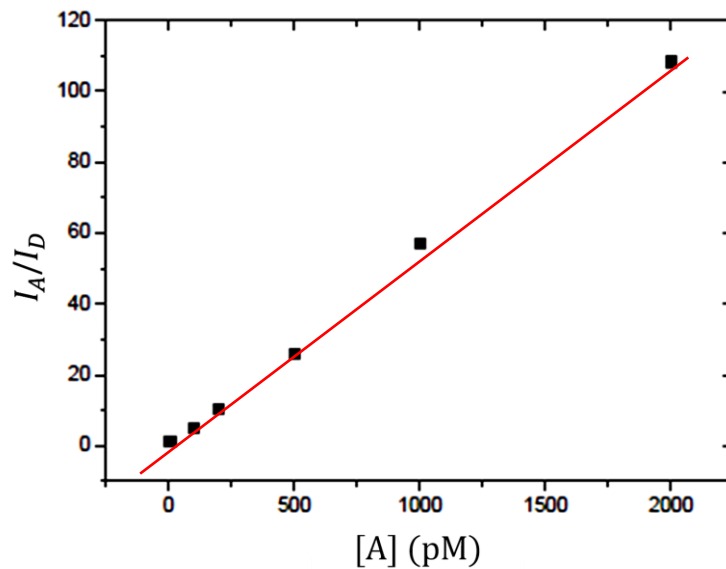


Figure 3.38 : Tracé du rapport de l'intensité d'émission de l'accepteur (QD705) sur celle du donneur en fonction de la concentration en accepteur de 50 à 500 μ s.

Afin d'éliminer la dépendance de ce résultat à la concentration des nanocristaux, une méthode alternative a été utilisée pour l'extraction du signal de FRET. Cette méthode consiste à soustraire du signal de luminescence mesuré pour l'accepteur en présence du donneur le

signal d'émission de l'accepteur seul. Le rapport différentiel ainsi obtenu a été représenté en fonction de la quantité de QD705 et la courbe correspondante est représentée sur la figure 3.39.

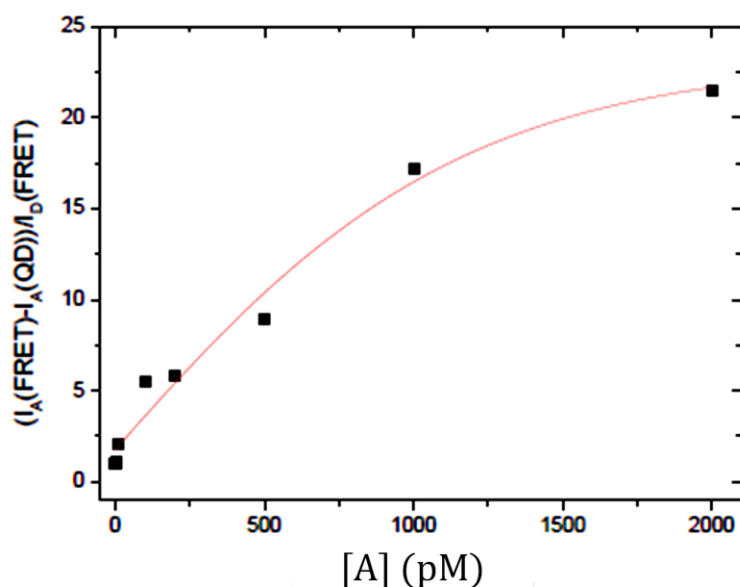


Figure 3.39 : Tracé du rapport différentiel de l'intensité d'émission de l'accepteur (QD705) sur celle du donneur en fonction de la concentration en accepteur et en temps résolu.

Cette figure montre également que l'équivalence n'a pas été atteinte lors de ce titrage, ce qui pourrait également expliquer les variations linéaires précédemment observées. L'augmentation de l'intensité des nanocristaux est cependant très importante (près de 1000%) et même si l'intensité du signal de FRET est relativement faible, le transfert d'énergie peut être mis en évidence dès le début du titrage, pour de faibles concentrations en accepteur. Afin de confirmer cette hypothèse, il est cependant souhaitable de réaliser d'autres titrages jusqu'à atteindre un plateau caractéristique de l'équivalence donneur/accepteur d'énergie.

III. CONCLUSION

Le ligand activé L_3 synthétisé dans la première partie de cette thèse a été utilisé dans le chapitre qui s'achève pour des réactions de marquage des biomolécules. Malgré la réaction d'hydrolyse de la fonction réactive en milieu aqueux, la formation d'une liaison covalente entre le ligand et plusieurs biomolécules a été mise en évidence. Il s'agissait notamment d'un antigène (L-sélectine) et de deux anticorps spécifiques de ce biomarqueur de la maladie d'Alzheimer. Grâce à la purification des produits de réaction par chromatographie à haute précision (HPLC), puis à leur caractérisation par des mesures photophysiques et par spectrométrie de masse, des taux de marquage ont pu être associés à chaque réaction. Les anticorps marqués par le ligand sont susceptibles d'être utilisés lors de dosages fluoroimmunologiques en vue de détecter quantitativement les biomarqueurs de la maladie. En effet, dans l'hypothèse d'un transfert d'énergie de type FRET et en présence d'accepteurs d'énergie appropriés, l'ajout de terbium à une solution des anticorps marqués pourrait conduire à un transfert d'énergie.

L'efficacité de cette interaction dipôle-dipôle dépend cependant étroitement du système (choix du donneur et de l'accepteur d'énergie), de la nature de l'interaction (distance), mais aussi des conditions de mesure. C'est la raison pour laquelle une série d'expériences visant la mise en évidence d'un transfert d'énergie d'un complexe de terbium luminescent vers différents accepteurs d'énergie potentiels a été réalisée avant une application au diagnostic. Grâce à l'interaction spécifique entre la biotine et la streptavidine, des expériences de FRET ont été réalisées avec succès en solution dans des solvants représentatifs de milieux physiologiques avec un colorant organique comme accepteur d'énergie. L'utilisation de nanocristaux semi-conducteurs a rendu le traitement du signal un peu plus complexe puisque le meilleur tampon pour ces derniers (le tampon Borate) cause la dégradation des propriétés de luminescence du complexe de terbium. Mais grâce à la mesure en temps résolu rendue possible par l'utilisation des lanthanides, un signal de FRET a pu être mis en évidence. La suite de ces études consistera à transposer les conditions expérimentales mises au point à un système faisant intervenir les anticorps marqués par des complexes de terbium et des nanocristaux accepteurs d'énergie en présence de la biomolécule ciblée.

IV. Bibliographie

- [1] van Roessel, P.; Brand, A. H. *Nat. Cell. Biol.* **2002**, *4*, E15.
- [2] Lippincott-Schwartz, J.; Snapp, E.; Kenworthy, A. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**, *2*, 444.
- [3] Wouters, F. S.; Verveer, P. J.; Bastiaens, P. I. H. *Trends Cell. Biol.* **2001**, *11*, 203.
- [4] Lisenbee, C. S.; Karnik, S. K.; Trelease, R. N. *Traffic* **2003**, *4*, 491.
- [5] Miller, L. W.; Cornish, V. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 56.
- [6] Strömqvist, J.; Nardo, L.; Broekmans, O.; Kohn, J.; Lamperti, M.; Santamato, A.; Shalaby, M.; Sharma, G.; Di Trapani, P.; Bondani, M.; Rigler, R. *Eur. Phys. J. Special Topics* **2011**, *199*, 181.
- [7] Geraldès, C. F. G. C.; Laurent, S. *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, *4*, 1.
- [8] Bottrill, M.; Kwok, L.; Long, N. J. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 557.
- [9] Shokeen, M.; Anderson, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 832.
- [10] Tanaka, K.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 815.
- [11] De León-Rodríguez, L. M.; Kovacs, Z. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *19*, 391.
- [12] Fichna, J.; Janecka, A. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *14*, 3.
- [13] Tausig, F.; Wolf, F. J. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1964**, *14*, 205.
- [14] Chaiet, L.; Wolf, F. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1.
- [15] Lomant, A. J.; Fairbanks, G. *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 243.
- [16] Fasman, G. D. In *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*; CRC Press: Boca Raton, 1989.
- [17] Brinkley, M. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2.
- [18] Dika, I.; Malval, J.-P.; Soppera, O.; Bardinal, V.; Barat, D.; Turck, C.; Spangenberg, A.; Bruyant, A. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *515*, 91.
- [19] Corsi, M.; Licastro, F.; Porcellini, E.; Dogliotti, G.; Galliera, E.; Lamont, J.; Innocenzi, P.; Fitzgerald, S. *Biogerontology* **2011**, *12*, 451.
- [20] M., R. I. In *Protein Analysis and Purification*; Second ed.; Birkhäuser: Boston, 2005.
- [21] El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2009**, *44*, 210.
- [22] Becker, J. M.; Wilchek, M.; Katchalski, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68*, 2604.
- [23] Wendeln, C.; Rinnen, S.; Schulz, C.; Kaufmann, T.; Arlinghaus, H. F.; Ravoo, B. J. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5880.
- [24] Sokol, D. L.; Zhang, X.; Lu, P.; Gewirtz, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 11538.

- [25] Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J. M.; Adams, J. A.; Ikura, M.; Tsien, R. Y. *Nature* **1997**, 388, 882.
- [26] Bastiaens, P. I. H.; Squire, A. *Trends Cell. Biol.* **1999**, 9, 48.
- [27] Gurfinkel, M.; Thompson, A. B.; Ralston, W.; Troy, T. L.; Moore, A. L.; Moore, T. A.; Gust, J. D.; Tatman, D.; Reynolds, J. S.; Muggenburg, B.; Nikula, K.; Pandey, R.; Mayer, R. H.; Hawrysz, D. J.; Sevick-Muraca, E. M. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 94.

CHAPITRE IV :

Optimisation de la luminescence

Sommaire

| | |
|--|------------|
| I. Optimisation de la photosensibilisation | 169 |
| 1. Synthèse et caractérisation du ligand L₆ | 170 |
| 1.1 Synthèse du ligand L ₆ | 170 |
| 1.2 Propriétés spectroscopiques du ligand L ₆ et de ses complexes d'Eu ³⁺ et de Tb ³⁺ | 172 |
| 2. Synthèse et caractérisation du ligand L₇ | 175 |
| 2.1 Synthèse du ligand | 175 |
| 2.2 Caractérisation spectroscopique | 177 |
| 3. Complexes de lanthanides dans la série terpyridine | 182 |
| 3.1 Synthèse de la terpyridine | 184 |
| 3.2 Insertion des éléments de coordination | 186 |
| 3.3 Synthèse de ligands pour le marquage des biomolécules | 188 |
| 3.3.1 Synthèse du ligand L ₈ | 188 |
| 3.3.2 Synthèse du ligand L ₉ | 190 |
| 3.3.1 Caractérisation spectroscopique du ligand L ₈ | 191 |
| 3.4 Étude de l'influence de la substitution de la terpyridine | 197 |
| 3.4.1 Insertion d'un groupement électroattracteur | 198 |
| 3.4.2 Insertion d'un groupement électrodonneur | 200 |
| II. Synthèse de complexes hétérodinucléaires | 205 |
| 1. Synthèse du ligand | 205 |
| 2. Etude des propriétés photophysiques | 209 |
| 3. Caractérisation du système par spectrométrie de masse | 217 |
| 3.1 Ligand libre | 217 |
| 3.2 Titrage du ligand avec une solution d'euporium | 219 |
| 4. Caractérisation du système par spectroscopie RMN | 220 |
| 4.1. Spectres RMN ¹ H du titrage du ligand L ₁₂ | 220 |
| 4.1.1. Analyse de la région des champs faibles | 221 |
| 4.1.2. Analyse de la région des champs forts | 222 |
| 4.2. Spectres RMN ³¹ P du titrage du ligand L ₁₂ | 223 |
| III. CONCLUSION | 225 |
| IV. Bibliographie | 227 |

Le but du projet NANOGNOSTICS est de développer une technique de diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer à partir de la détection simultanée de ses biomarqueurs. Pour ce faire, nous nous intéressons à la mise en évidence d'un transfert d'énergie de type Förster lors d'analyses fluoroimmunologiques. C'est dans ce cadre que la synthèse de complexes luminescents à base d'ions lanthanides a été réalisée. Ces complexes aux propriétés spectroscopiques intéressantes sont susceptibles d'être des donneurs d'énergie efficaces dans un système de FRET, avec des nanocristaux semi-conducteurs luminescents comme accepteurs d'énergie.

Dans la première partie du travail, nous avons pu développer une série de ligands basés sur une plate-forme de type pyridine bispyrazolyl, associée à des groupements aminophosphonates. La photosensibilisation des lanthanides est assurée par cette plateforme hautement conjuguée, tandis que les groupements phosphonates permettent de former des complexes suffisamment stables en milieu physiologique. Les complexes d'euprium et de terbium de ces ligands ont été synthétisés et nous avons pu déterminer leurs propriétés spectroscopiques.

Le ligand **L₃** dont les propriétés de luminescence, de stabilité et de réactivité semblaient les plus avantageuses a été utilisé pour le marquage de biomolécules parmi lesquelles la L-sélectine qui appartient à la famille des marqueurs biologiques ciblés dans le cadre de ce projet. La synthèse du ligand **L₅** pour lequel l'incorporation d'un dérivé biotinylé accroît l'affinité avec la streptavidine a permis d'étudier le transfert d'énergie entre les complexes de terbium de cette famille de ligands et divers accepteurs d'énergie. Une interaction certaine a été mise en évidence, mais l'efficacité du transfert pour les nanocristaux est extrêmement faible, ce qui ne permet pas d'envisager son adoption pour le diagnostic comme souhaité.

Dans la troisième partie de ce travail, il sera question d'améliorer le système, notamment à travers l'optimisation des propriétés de luminescence et de la stabilité des complexes de lanthanides.

I. Optimisation de la photosensibilisation

Les ligands décrits dans la première partie du travail ont pour la plupart des spectres d'absorption situés dans la région UV du spectre électromagnétique, ce qui correspond à des énergies élevées. Leur excitation nécessite des dispositifs parfois coûteux susceptibles d'endommager le matériel biologique qui absorbe dans cette région du spectre.^{[1],[2]} Dans un premier temps, nous avons souhaité synthétiser des ligands dont les maxima d'absorption sont davantage déplacés vers le visible.

Pour ce faire, une des possibilités est d'étendre la délocalisation du système conjugué à travers l'introduction de chromophores additionnels sur la plateforme de base. C'est ainsi que les ligands **L₆** et **L₇** ont été synthétisés. Ils correspondent à l'insertion d'un groupement phényle en para de la plateforme de base et au remplacement des groupements pyrazoles par des indazoles. L'utilisation d'une unité terpyridine comme antenne pour la photosensibilisation a permis de synthétiser des ligands fonctionnalisés (**L₈** et **L₉**), mais aussi des ligands à partir desquels il nous sera possible d'étudier l'effet de la substitution de la plateforme de sensibilisation par des groupements électrodonneurs ou électroattracteurs (**L₁₀** et **L₁₁**).

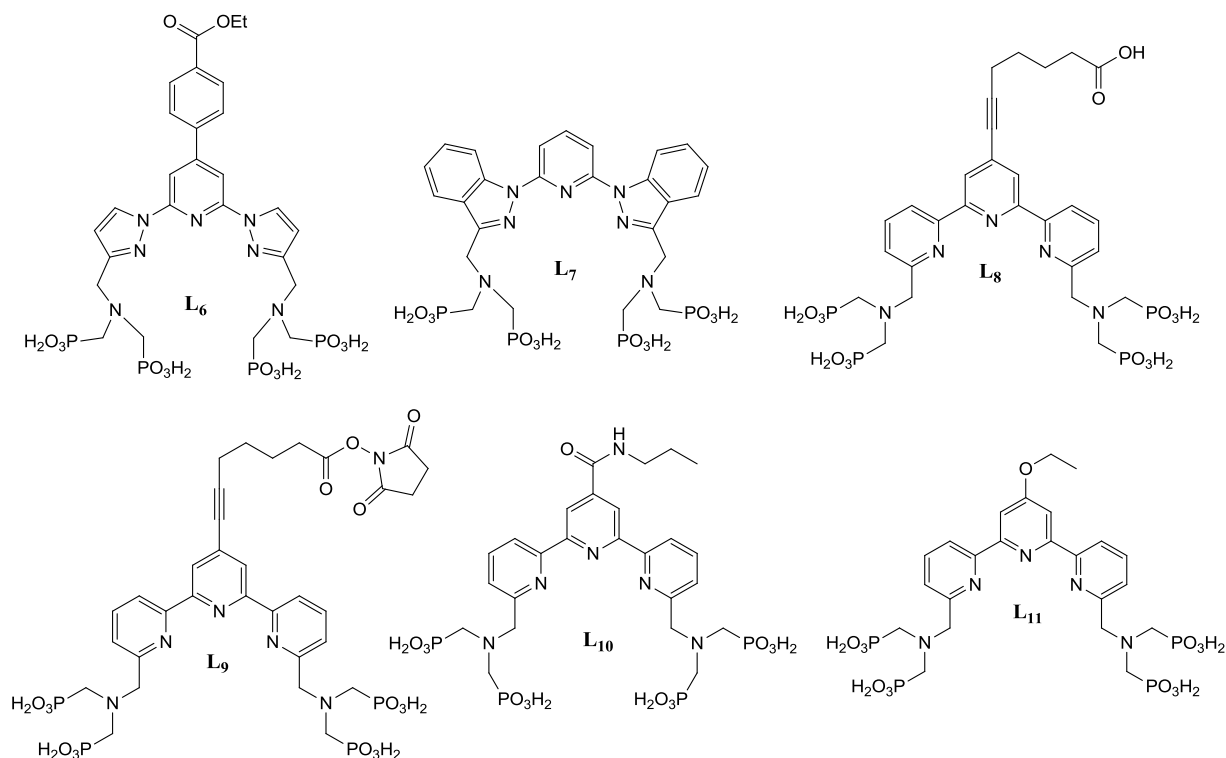


Schéma 4.1 : Formules développées des ligands pour l'optimisation de la luminescence des complexes.

1. Synthèse et caractérisation du ligand L₆

1.1 Synthèse du ligand L₆

La stratégie synthétique adoptée pour la synthèse du ligand L₆ consiste en une réaction de Suzuki^[3,4] entre l'intermédiaire **12** qui possède un atome de brome en para de la pyridine et un autre composé aromatique sous la forme d'un acide boronique. Par définition, la réaction de Suzuki est une réaction de condensation de deux groupements de type aryle à travers la formation d'une liaison carbone-carbone. Elle a été décrite pour la première fois par les chimistes Akira Suzuki et Norio Miyaura en utilisant comme catalyseur un complexe de palladium tetrakis triphenylphosphine.

Le catalyseur subit plusieurs étapes d'oxydoréduction dont une addition oxydante et une élimination réductrice qui permettent de le régénérer au terme de la réaction. L'addition oxydante s'effectue avec le premier groupement aryle qui est en général introduit sous la forme d'un halogénure. Le second groupement aromatique est introduit sous la forme d'un sel d'acide ou d'un ester boronique. La formation d'un anion de bore quaternaire permet d'augmenter le caractère nucléophile de l'intermédiaire et par conséquent favorise la réaction de transmétalement avec le complexe de palladium. Une élimination réductrice permet ensuite d'obtenir le produit de condensation :

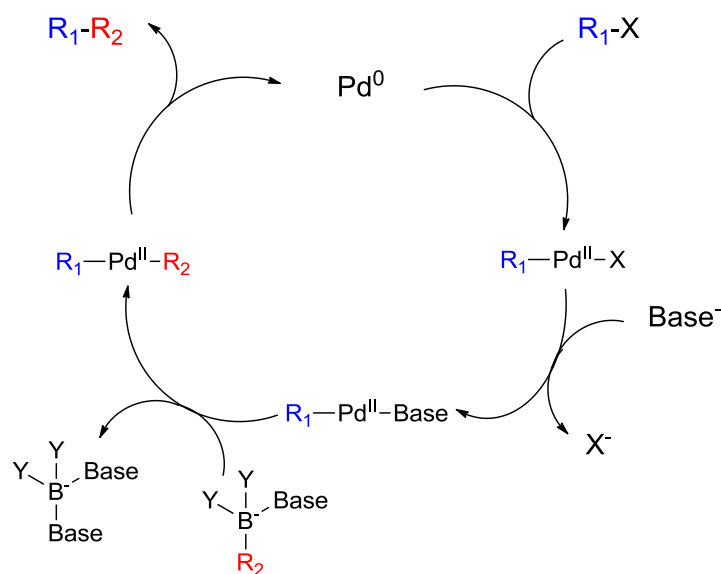


Schéma 4.2 : Cycle catalytique de la réaction de Suzuki.

Pour la synthèse du ligand L₆, nous avons fait réagir le composé **12** avec l'ester pinacolique de l'acide 4-éthoxycarbonylphényl boronique en présence de carbonate de

potassium dans le toluène. Au bout d'une nuit de réaction, le bromure est complètement consommé et le composé **30** est obtenu avec un rendement de 75%.

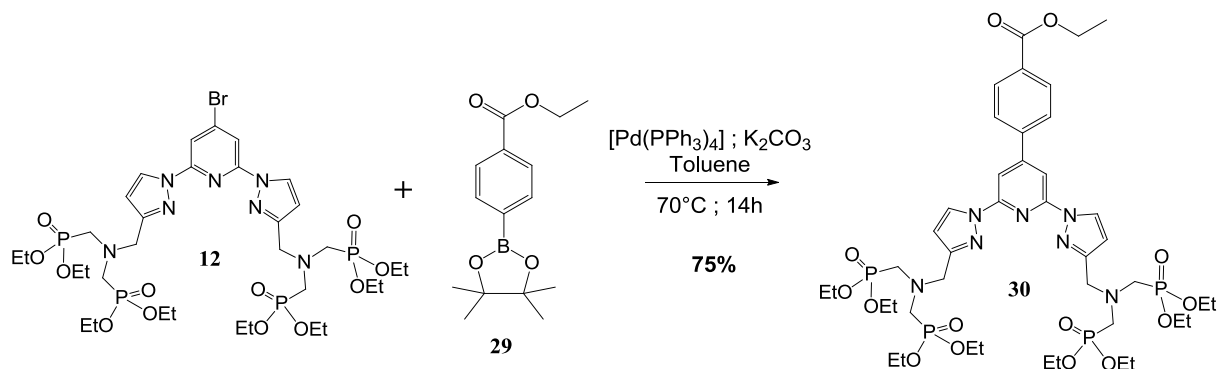


Schéma 4.3 : Couplage de Suzuki avec le composé **12**.

Selon la stratégie adoptée, l'hydrolyse du composé **30** conduit à deux produits différents. Par l'action d'une solution concentrée d'acide chlorhydrique, on assiste à l'hydrolyse totale des esters de la molécule, tandis que par action de TMSBr, seuls les esters phosphoniques sont hydrolysés.

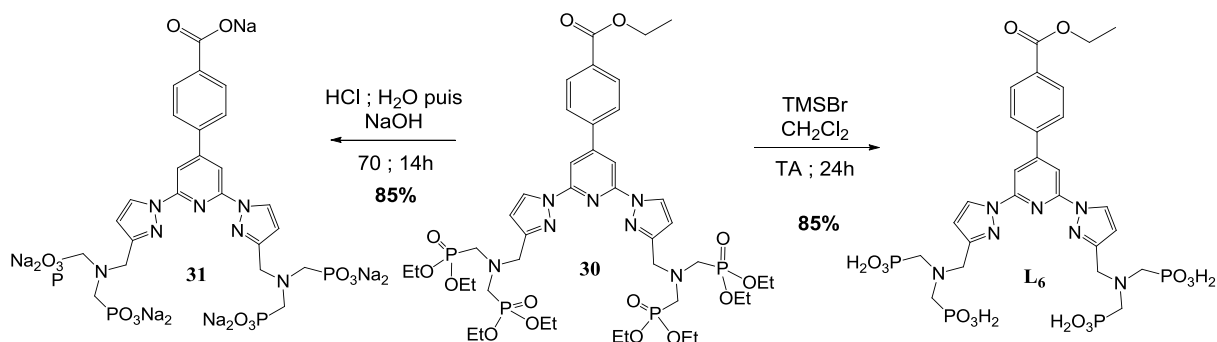


Schéma 4.4 : Hydrolyses totale (gauche) et partielle (droite) du composé **30**.

Le ligand **L₆** ainsi obtenu est malheureusement très peu soluble dans les solvants aqueux ou dans les solvants organiques. Pour sa caractérisation en spectrométrie RMN (1H , ^{13}C et ^{31}P), de la triéthylamine a été rajouté à une suspension du précipité dans le DMSO.

La caractérisation du ligand a été complétée par les spectres de masse et les analyses élémentaires. Nous nous sommes ensuite intéressés à la détermination de ses propriétés spectroscopiques.

1.2 Propriétés spectroscopiques du ligand L_6 et de ses complexes d' Eu^{3+} et de Tb^{3+}

Un titrage du ligand L_6 en solution dans un tampon TRIS ($c = 0,01 \text{ M}$; $\text{pH} = 7,03$) a été réalisé à partir d'une solution de terbium dont des quantités croissantes ont été ajoutées au ligand jusqu'à un large excès (3 équivalents). Pour chacune des solutions, les spectres d'absorption et d'émission ont été mesurés.

Lorsque l'on compare les bandes d'absorption du ligand L_6 (Figure 4.1) qui possède un groupement aromatique supplémentaire en position para de la pyridine, à celles du ligand modèle L_p , il apparaît un léger déplacement des bandes d'absorption vers le rouge. Cette observation semble cohérente avec l'addition d'un chromophore supplémentaire. Le déplacement bathochrome est particulièrement marqué pour la bande des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de plus haute énergie qui passe de 243 nm au sein du ligand L_p à 251 nm pour le ligand L_6 . Pour ce dernier, on note également l'apparition d'une bande supplémentaire de forte intensité à 270 nm. Par contre l'épaule caractéristique de la complexation des pyrazoles est très peu influencé par l'addition d'un substituant aromatique, puisqu'il se situe autour de 278 nm, comme dans le cas du ligand L_p . Enfin l'état excité S_1 du complexe de terbium avec le ligand L_6 est caractérisé par une faible bande d'absorption à 328 nm.

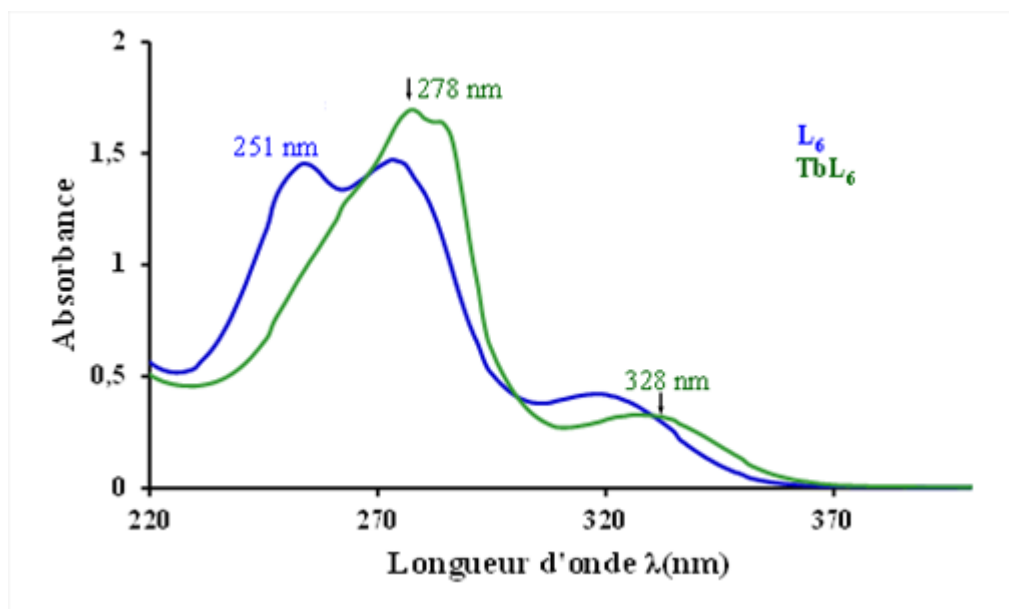


Figure 4.1 : Superposition des spectres d'absorption du ligand L_6 ($c = 3,96 \times 10^{-5} \text{ M}$) et de son complexe de terbium ($c = 3,6 \times 10^{-5} \text{ M}$).

Le titrage en émission montre une augmentation continue de l'intensité d'émission du terbium jusqu'à l'équivalence :

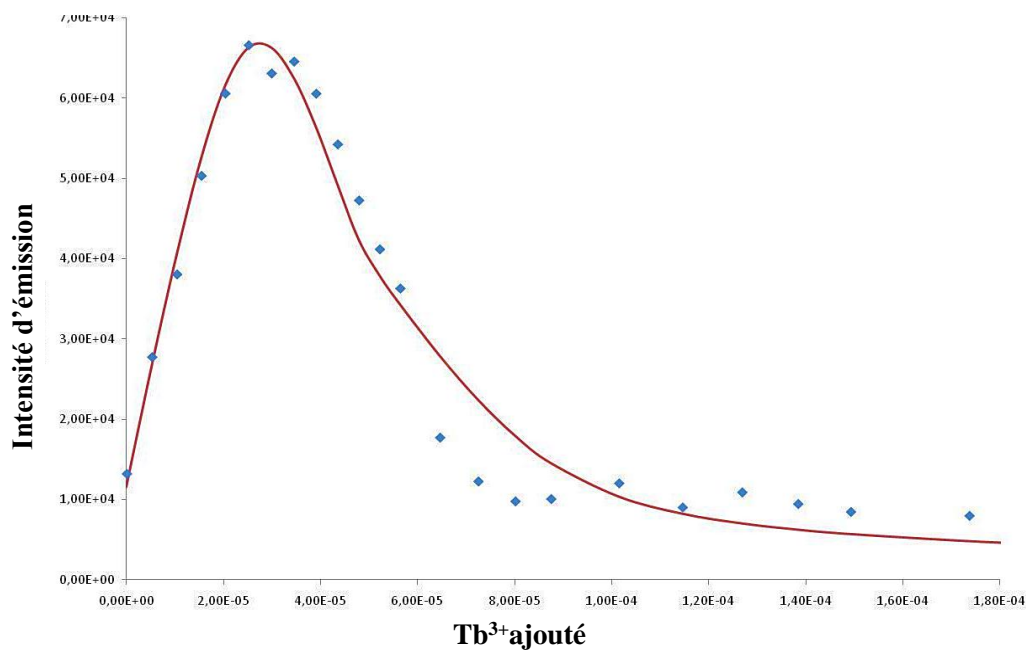


Figure 4.2 : Evolution de l'intensité d'émission mesurée à 489 nm ($\lambda_{exc} = 319$ nm) lors de l'addition d'une solution de $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ à une solution du ligand ($[L_6] = 3,96 \times 10^{-5} M$; $[Tb^{3+}] = 5,08 \times 10^{-4} M$; TRIS/HCL 0,01 M à pH 7,4) et des valeurs calculées (—).

A l'aide du logiciel SPECFIT, un diagramme de répartition des espèces a pu être établi en fonction de la concentration de terbium en solution. Il fait apparaître trois espèces métalliques distinctes similaires à celles observées pour le ligand modèle L_p .

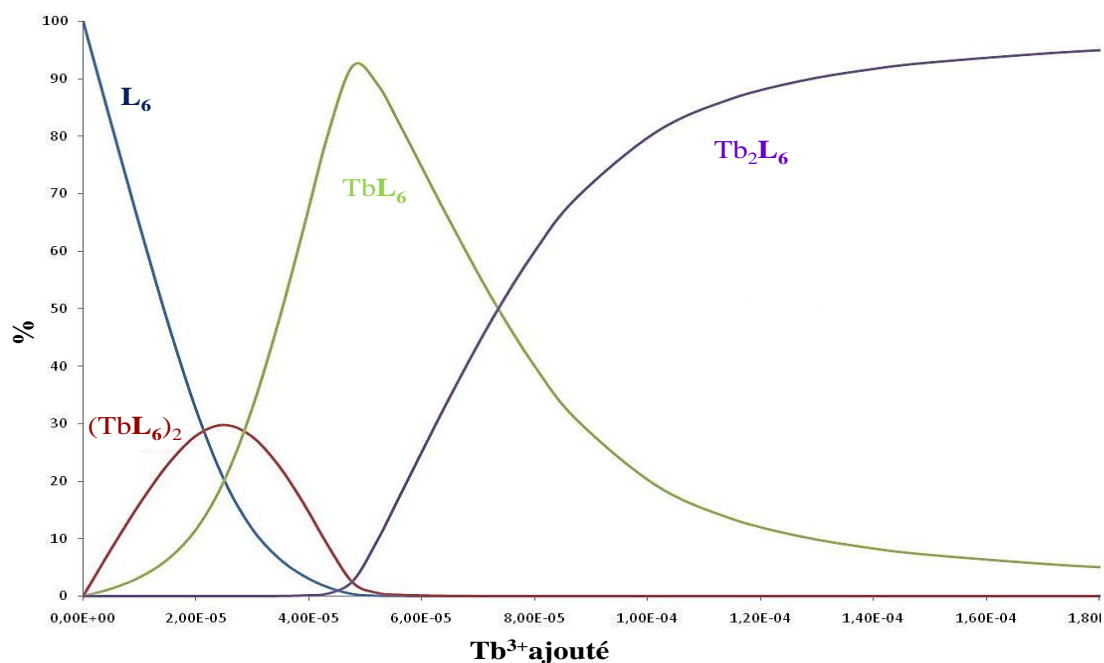


Figure 4.3 : Diagramme de répartition des espèces calculées par le logiciel SPECFIT avec les données du titrage du ligand L_6 par une solution de terbium.

Pour chacun des ajouts et parallèlement aux mesures des spectres d'absorption et d'émission, les temps de vie de luminescence du terbium ont été mesurés selon un modèle monoexponentiel et quelques valeurs sont reportées dans le tableau ci-après :

| | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|
| Nombre d'équivalent | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |
| Temps de vie (ms) | 0,98 | 0,68 | 0,59 | 0,54 | 0,49 |

Tableau 4.1 : Temps de vie de luminescence des solutions du dosage en fonction du nombre d'équivalent de terbium ajouté ($\lambda_{\text{ex}} = 328 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$).

Le temps de vie le plus important correspond à la formation d'une espèce ML_2 au début du titrage. Avec l'ajout de métal et la formation d'un complexe 1:1, le temps de vie de luminescence chute considérablement pour atteindre à l'équivalence une valeur assez médiocre, surtout lorsqu'elle est comparée à celles des complexes dérivés de la poche pyridine bis-pyrazole pour le même cation métallique.

La synthèse des complexes isolés de ce ligand aurait permis de mieux comprendre ce système, à travers la détermination du temps de vie dans l'eau lourde par exemple, ou du rendement quantique de luminescence. À la lumière des résultats présentés dans cette section, il apparaît que l'ajout d'un groupement benzoïque aromatique directement en position para de la pyridine permet d'étendre la délocalisation du système électronique conjugué, et ce malgré l'encombrement stérique entre les 4 protons en α de la jonction entre les deux cycles (Schéma 4.5).

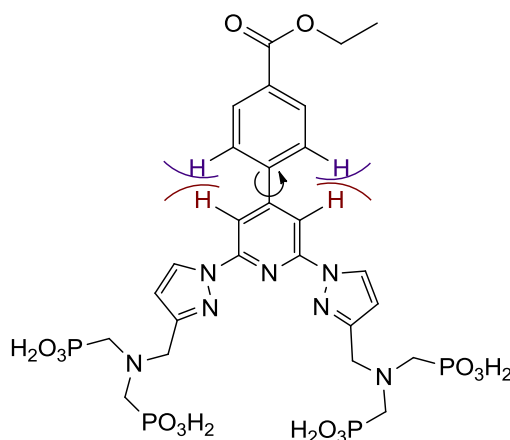


Schéma 4.5 : Représentation schématique de l'encombrement stérique entre la plateforme de photosensibilisation et le substituant aromatique.

Cependant, les temps de vie de luminescence du complexe de terbium sont très faibles, bien que les maxima d'absorption du ligand et du complexe soient déplacés vers le visible. Ces temps de vie courts pour les états excités peuvent être dus à un transfert d'énergie en retour du cation vers l'état triplet du ligand.^[5] Le ligand **L₆** n'est donc pas adapté à la formation de complexes de lanthanides suffisamment stables et luminescents pour une application au FRET.

2. Synthèse et caractérisation du ligand **L₇**

2.1 Synthèse du ligand

Le ligand **L₇** est obtenu à partir de la 2,6-difluoropyridine et de l'ester éthylique de l'acide indazolique dont la synthèse est décrite dans la littérature.^[6] L'assemblage des noyaux aromatiques en vue d'obtenir la plateforme de photosensibilisation est réalisé lors d'une réaction de substitution nucléophile aromatique des atomes de fluor de la pyridine par les indazoles. Cette réaction se déroule dans le DMF à température ambiante, en présence de deux équivalents d'ester et de NaH. Le composé **35** est obtenu après quatre heures de réaction avec un rendement de 54 %.

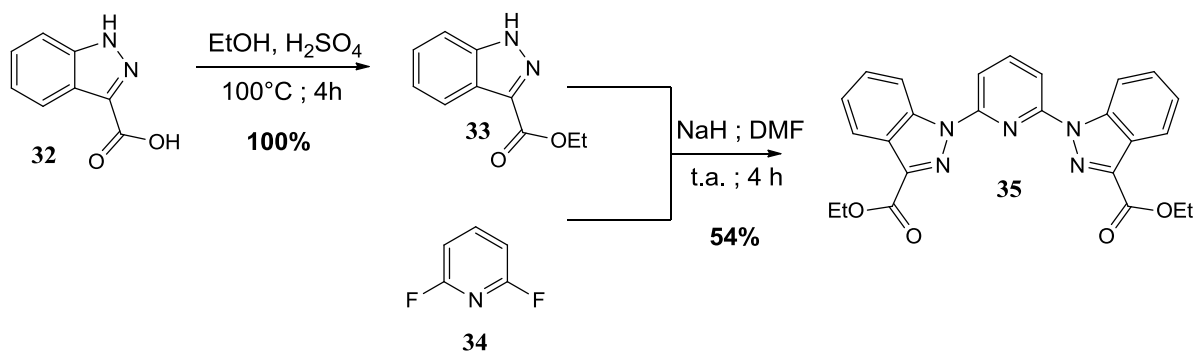


Schéma 4.6 : Synthèse de la plateforme de photosensibilisation du ligand **L₇**.

La réduction des esters est réalisée par l'action de LiAlH_4 et en une heure de réaction sous atmosphère inerte, le produit de départ est entièrement consommé. Le traitement de la réaction permet d'isoler le diol **36** sans purification supplémentaire avec un rendement de 85 %. Une réaction de bromation a ensuite été réalisée par l'action de la tribromophosphine. La réaction est catalysée par le DMF distillé qui joue également le rôle de solvant et après une purification du mélange réactionnel, on recueille le produit disubstitué avec un rendement de 55%.

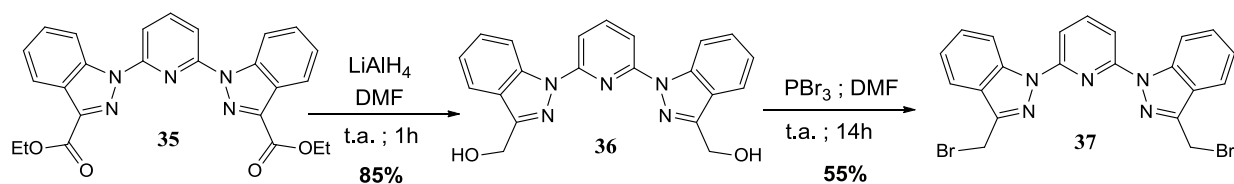


Schéma 4.7 : Réaction de réduction des esters suivie de la bromation du diol.

La présence des atomes de brome au sein du composé **37** ainsi formé va faciliter l'insertion des phosphonates à travers une réaction de substitution nucléophile sous atmosphère inerte et en présence de carbonate de potassium. Le produit de disubstitution **38** est isolé après purification sous la forme d'une huile jaune (Schéma 4.8).

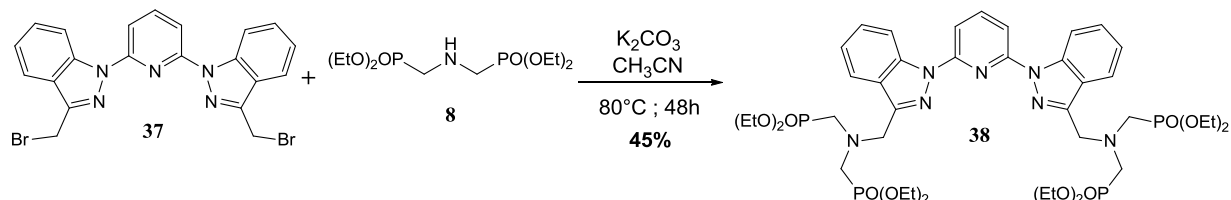


Schéma 4.8 : Insertion des groupements méthylaminophosphonates.

La déprotection par le bromotriméthylsilane conduit au ligand **L7** sous forme de poudre brune (Schéma 4.9).

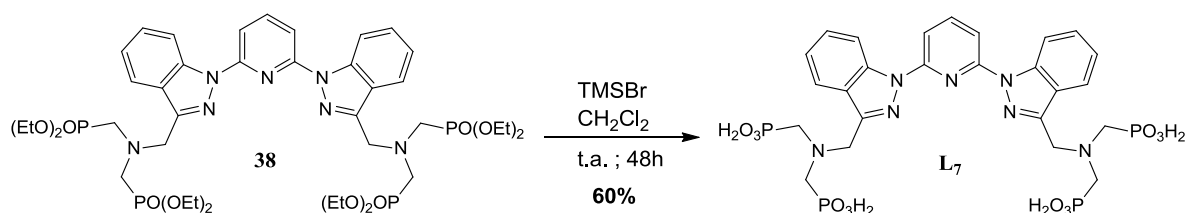


Schéma 4.9 : Synthèse du ligand **L7**.

Le ligand a pu être caractérisé en RMN par les spectres de proton, de carbone et de phosphore.

Le spectre RMN ^1H du ligand **L7** dans D_2O est représenté sur la figure 4.4 et montre cinq signaux sous la forme de pics bien résolus que l'on peut attribuer aux 23 protons non-échangeables de la molécule. Les 8 protons en α des atomes de phosphore sont équivalents et apparaissent sous la forme d'un doublet avec une constante de couplage de $^2J_{\text{P-H}}$ 11,6 Hz. Les protons en γ apparaissent quant à eux sous la forme d'un singulet à 4,27 ppm.

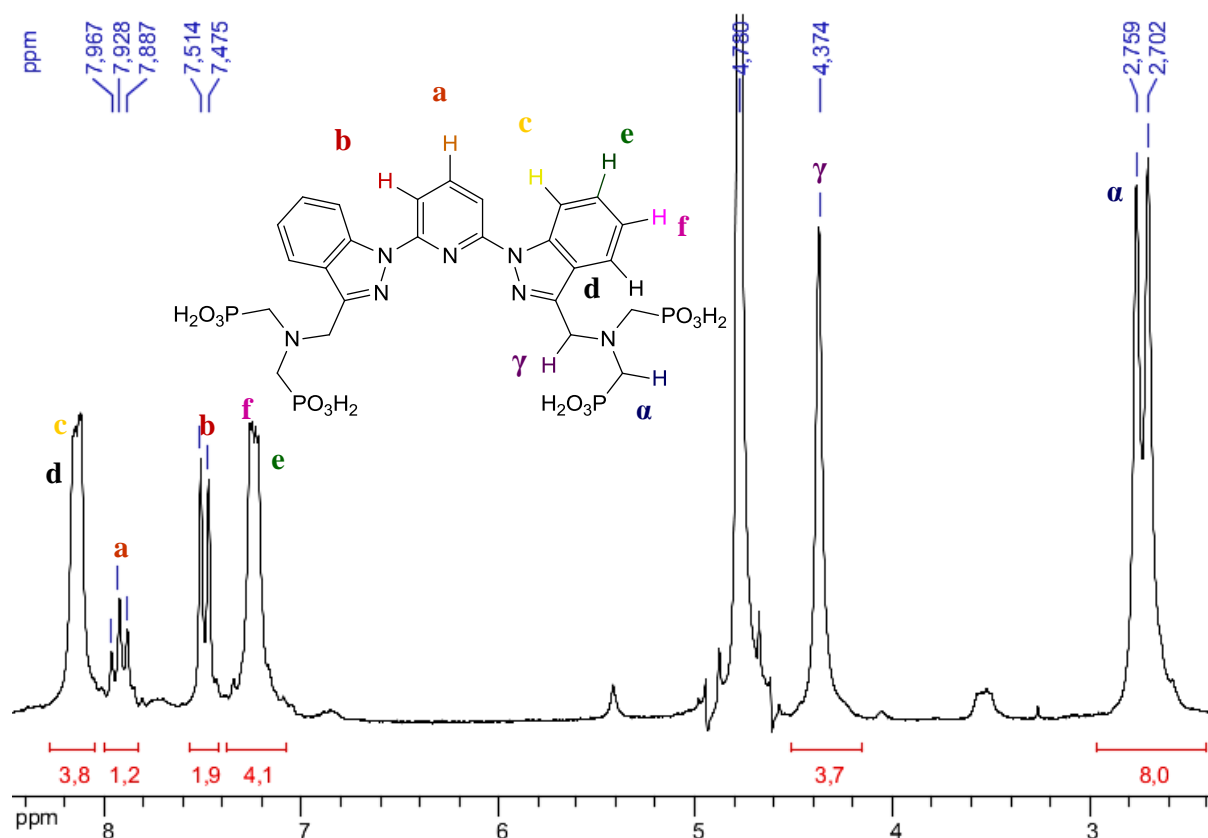


Figure 4.4 : Spectre RMN ^1H du ligand L_7 (D_2O , 200 MHz, t.a.).

La région des champs faibles du spectre comporte quatre pics que l'on attribue aux protons aromatiques. Les multiplets à 7,25 et 8,14 intègrent pour les 8 protons des systèmes AA'XX' des indazoles tandis que les trois protons de la pyridine centrale sortent sous la forme d'un système AX₂ caractéristique.

2.2 Caractérisation spectroscopique

Dans un premier temps, le spectre d'absorption du ligand L_7 a été mesuré en solution dans un tampon TRIS. La comparaison entre le spectre obtenu pour ce ligand et celui obtenu pour le ligand L_p montre un déplacement bathochrome des maxima d'absorption, conformément à ce qui est attendu pour le remplacement des pyrazoles par les indazoles qui comportent un nombre d'électrons conjugués plus élevé. On observe également une légère augmentation de la valeur du coefficient d'extinction molaire aux maxima d'absorption de la bande de transition $\pi \rightarrow \pi^*$.

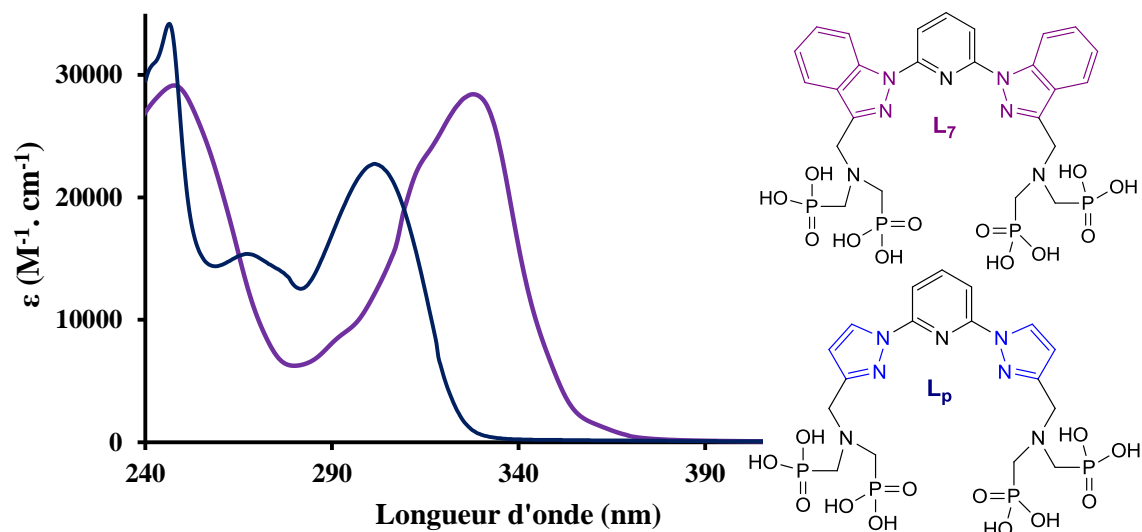


Figure 4.5 : Superposition des spectres d'absorption des ligands L_p (—) et L_7 (—) en solution dans un tampon TRIS/HCl (pH = 7,4).

Un titrage du ligand a été réalisé à partir d'une solution d'euprium et pour chacun des mélanges, on a pu mesurer les spectres d'absorption. Au fur et à mesure du titrage, une faible diminution de l'intensité de la bande d'absorption à 248 nm est observée. Cette décroissance s'accompagne d'un déplacement hypsochrome et le maximum d'absorption atteint une valeur de 236 nm à l'équivalence. La seconde bande à 330 nm dont l'épaule est très subtil décroît progressivement en intensité avec l'addition de métal et à l'équivalence deux contributions apparaissent clairement à 317 et 341 nm.

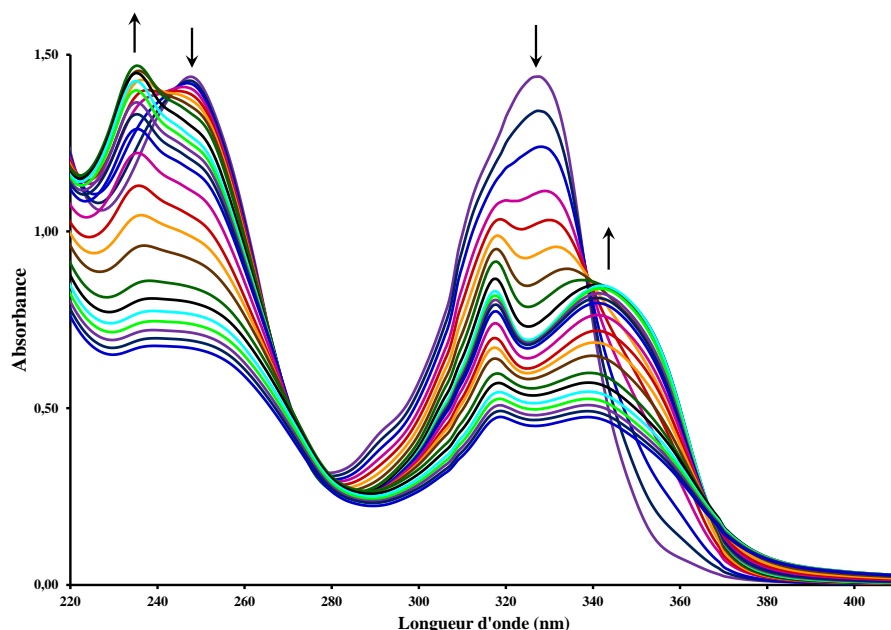


Figure 4.6 : Evolution du spectre d'absorption UV-Visible du ligand L_7 avec l'addition d'une solution d' $EuCl_3 \cdot H_2O$ à pH = 7,4. L'intensité d'absorption n'est pas corrigée pour la dilution.

Les mêmes variations sont observées lorsqu'on réalise le titrage avec une solution de terbium et l'ensemble des données a été analysé à l'aide du logiciel SPECFIT. Pour un modèle théorique de formation de trois espèces métalliques, une convergence a pu être obtenue et le diagramme de répartition des espèces à la figure 4.7 a été établi en fonction de la concentration en métal en solution.

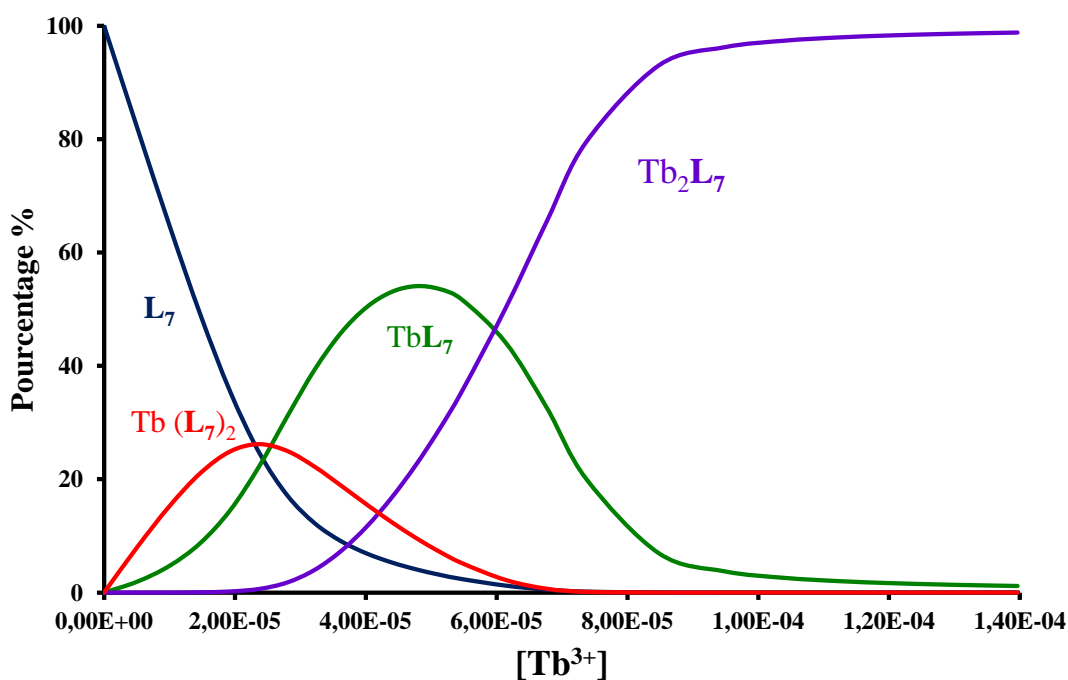


Figure 4.7 : Diagramme de répartition des espèces calculées avec le logiciel SPECFIT pour les données du titrage du ligand L_7 ($c = 5,17 \times 10^{-5}M$) avec une solution de terbium ($c = 5,08 \times 10^{-4}M$).

Le modèle adopté correspond à la formation de trois espèces métalliques comme celles décrites pour le ligand L_p . Cependant contrairement à ce qui avait été observé pour ce dernier, pour un mélange équimolaire de ligand et de terbium, le complexe 1:1 n'est pas exclusivement formé et on a un mélange des trois espèces avec le ligand libre. Ce résultat pourrait s'expliquer par la formation d'un complexe 1:1 moins stable dans le cas du ligand L_7 . Cette instabilité peut être attribuée à la déstabilisation de l'unité tridentate consécutive à la gêne stérique entre les protons de la pyridine centrale et des groupements indazoles.

Les spectres d'émission ont également été mesurés tout au long du titrage pour l'ajout d'euprium et de terbium. Dans le cas du terbium, on observe une augmentation constante de l'intensité d'émission à 544 nm, jusqu'à l'équivalence où l'espèce ML est majoritaire. Avec l'addition supplémentaire de terbium, l'intensité d'émission diminue tandis que le complexe ML disparaît au profit de l'espèce M_2L qui est beaucoup moins luminescente.

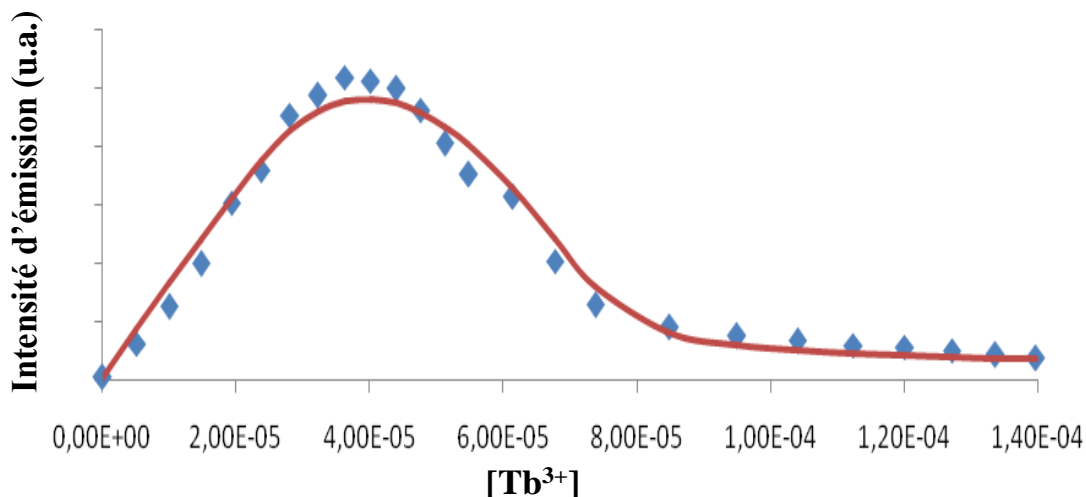


Figure 4.8 : Evolution de l'intensité d'émission mesurée à 544 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm) lors de l'addition d'une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($[\text{L}_7] = 5,17 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Tb}^{3+}] = 5,08 \times 10^{-4} \text{ M}$; TRIS/HCL 0,01 M à pH 7,4) et des valeurs calculées (—).

En ce qui concerne le titrage avec une solution d'euprium, les variations d'intensité du spectre d'émission sont similaires, mais on note de faibles changements dans l'intensité relative des raies d'émission des bandes $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ et des bandes $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$. Cette observation peut être attribuée à un changement de symétrie autour du cation selon la formation de l'une ou l'autre des espèces.

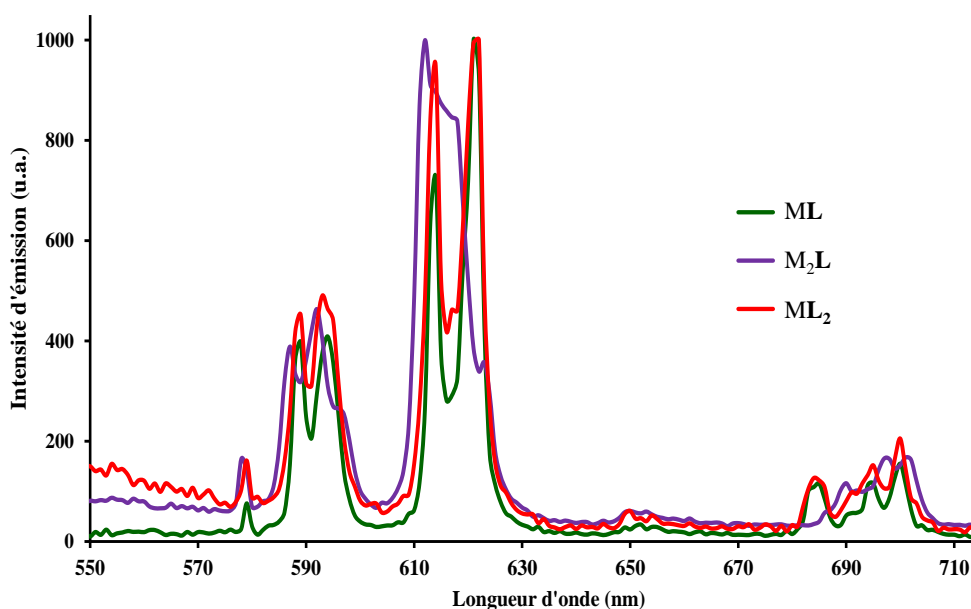


Figure 4.9 : Spectres d'émission des espèces métalliques calculés à partir du logiciel SPECFIT pour les données du titrage du ligand L_7 par une solution d' Eu^{3+} .

Les complexes d'euprium et de terbium ont été synthétisés à partir de mélanges de solutions des cations métalliques et de solutions du ligand dans des conditions strictement

stoéchiométriques afin de minimiser la formation des espèces M_2L et ML_2 . Des poudres jaunes ont été obtenues dans les deux cas de figure et les propriétés de luminescence de ces complexes isolés ont été étudiées.

Dans un premier temps nous avons mesuré les spectres d'absorption pour chacun des complexes. Les spectres obtenus avaient la même allure que celle des spectres calculés à l'aide du logiciel SPECFIT pour l'euprimum et le terbium, mais l'intensité d'absorption du complexe de terbium était un peu plus faible que celle du complexe d'euprimum (Tableau 4.2). Cette différence pourrait cependant être attribuée à la faible solubilité des complexes dans l'eau qui entache le calcul des concentrations des solutions d'une erreur relativement importante.

Les spectres d'émission ont également été mesurés et ils présentent les bandes caractéristiques attendues pour chacun des ions (Figure 4.10) :

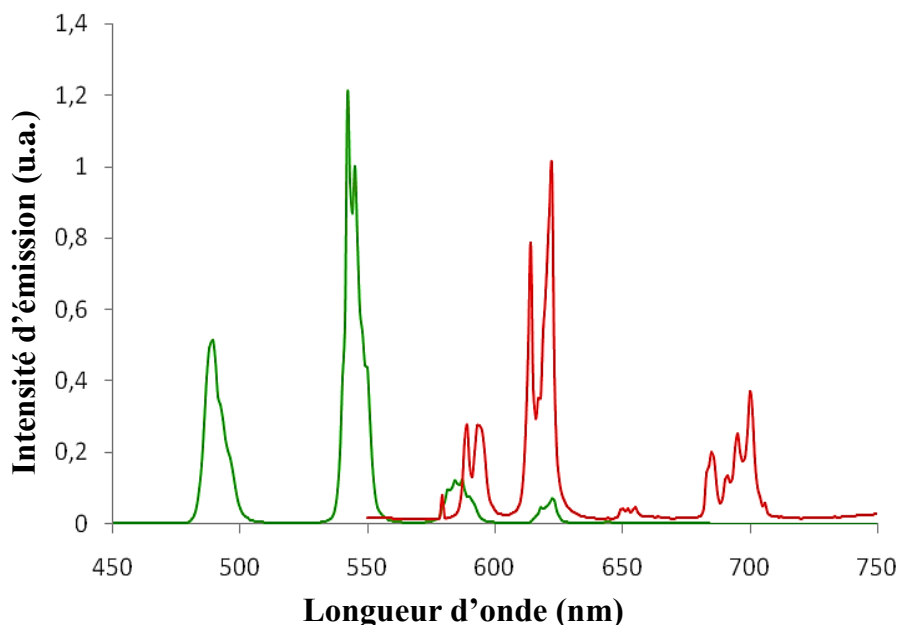


Figure 4.10 : Spectres d'émission des complexes isolés avec l'euprimum (—) et le terbium (—) du ligand L_7 .

Les temps de vie de luminescence dans l'eau et dans l'eau lourde ont également été mesurés et l'ensemble des données calculées est résumé dans le tableau ci-après :

| | λ_{max} (nm) | ϵ_{max} (M ⁻¹ .cm ⁻¹) | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms) | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms) | q | Φ |
|------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|--------|
| EuL₇ | 336 | 16294 | 1,06 ms | 1,81 ms | 0,2 | 6 % |
| | 317 | 9776 | | | | |
| | 345 | 10397 | | | | |
| TbL₇ | 336 | 12212 | 0,91 ms | 1,28 ms | 0,3 | 21 % |
| | 317 | 7335 | | | | |
| | 345 | 7884 | | | | |

Tableau 4.2 : Tableau récapitulatif des paramètres spectroscopiques des complexes EuL₇ et TbL₇.

Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus pour le ligand modèle **L_p**, on note une amélioration du rendement quantique de luminescence pour le complexe d'euporium, mais sa valeur de 6% reste insuffisante pour des expériences de FRET. Pour ce qui est du complexe de terbium, on note malheureusement une dégradation des propriétés spectroscopiques, à la fois en ce qui concerne le rendement quantique et les temps de vie de luminescence. Cette mauvaise sensibilisation pourrait s'expliquer par le fait que l'état triplet du ligand **L₇** soit plus faible en énergie que celui du ligand **L_p** et donc plus près de l'état émetteur ⁵D₄ du terbium. Cette proximité entre les niveaux d'énergie pourrait faciliter la désexcitation du terbium *via* un transfert d'énergie en retour vers l'état triplet du ligand.^[7]

Cette hypothèse pourrait être confirmée par le calcul de la valeur de l'énergie de l'état triplet du ligand, à travers la synthèse d'un complexe de gadolinium et la mesure de sa phosphorescence à basse température.

Par ailleurs il est possible d'envisager la fonctionnalisation du ligand **L₇** à travers l'introduction de substituants aromatiques ou non en para de la pyridine centrale. Cette modification de la plateforme de sensibilisation pourrait permettre d'améliorer les propriétés photophysiques des complexes d'euporium et de terbium.

3. Complexes de lanthanides dans la série terpyridine

Toujours dans l'optique de l'amélioration des propriétés de luminescence de nos complexes de terbium et d'euporium, nous nous sommes intéressés à l'utilisation d'une plateforme de type terpyridine pour la photosensibilisation des lanthanides. Ces travaux ont conduit à la synthèse de plusieurs nouveaux ligands phosphonates.

Les terpyridines et leurs dérivés constituent une classe de composés dont les propriétés ont été largement étudiées, notamment en chimie de coordination.^[8] Leurs complexes de coordination sont dotés de propriétés photophysiques avantageuses,^[9,10] et de propriétés catalytiques^[11] ou électrochimiques^[12] qui trouvent des applications dans des domaines variés. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéressons à la fois aux propriétés de coordination et de photosensibilisation de ces ligands tridentates.

La synthèse de la 2,2':6',6'' terpyridine a été décrite pour la première fois par Morgan et Burstall^[13] et elle a été obtenue en chauffant à 340 °C un mélange de pyridine et de FeCl₃. La terpyridine non substituée ainsi obtenue est constituée de trois pyridines reliées deux à deux en positions *ortho*. Les 18 électrons π sont conjugués et les trois cycles aromatiques sont en général coplanaires. Trois conformations sont envisageables en fonction des positions relatives des pyridines prises deux à deux :

- La conformation *trans - trans*
- La conformation *cis - trans*
- La conformation *cis - cis*

La conformation *cis-cis* est la moins favorable en termes d'énergie, à cause de la répulsion stérique entre les hydrogènes des positions méso et de la répulsion électronique des doublets libres des azotes. Elle est cependant stabilisée dans les solvants polaires^[14] ou en présence de cations avec lesquels la terpyridine forme des complexes avec un mode de coordination tridentate.

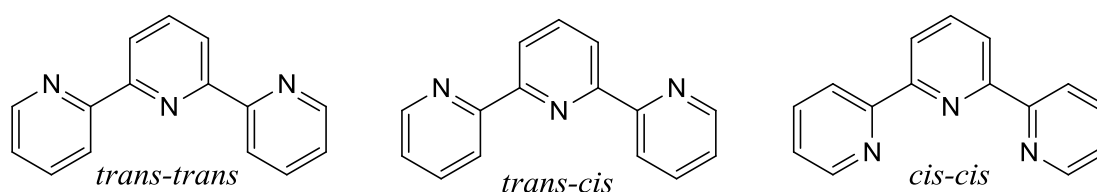


Schéma 4.10 : Différentes conformations possibles de la terpyridine.

Pour la coordination des lanthanides, la formation de composés discrets de stœchiométrie 1:1 nécessite l'incorporation d'éléments de coordination supplémentaires. Il sera donc question d'adopter une synthèse qui permette d'obtenir des dérivés de terpyridines substitués. La première phase de ce travail a consisté en la synthèse de la plate-forme de photosensibilisation.

3.1 Synthèse de la terpyridine

L'obtention de dérivés de 2,2':6',6'' terpyridine a été longuement étudiée en chimie organique et plusieurs méthodes de synthèses ont été développées. Afin de pouvoir introduire des groupements fonctionnels sur la plateforme et de greffer les ligands synthétisés à des biomolécules, nous nous sommes surtout intéressés à des méthodologies où la pyridine centrale serait substituée en position *para*. Notre intérêt s'est donc porté sur une méthode de synthèse de dérivés de terpyridines symétriques réalisée à partir de l'acide picolinique et nous nous en sommes inspirés pour la suite de nos travaux.^[15]

La première étape de synthèse consiste en une réaction d'estérification du composé **39** en présence d'éthanol et d'acide sulfurique en quantité catalytique. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 24 heures et le diester éthylique **40** est isolé après extraction de la phase aqueuse sous la forme d'une huile avec un rendement de réaction quasi-quantitatif (Schéma 4.11).

Une double réaction de Claisen est ensuite réalisée en présence d'acétone et d'hydrure de sodium dans le THF anhydre. L'action de cette base forte permet de générer un énolate suffisamment réactif dont la double condensation avec le composé **40** va conduire à la formation d'un précipité orange vif. L'acidification du mélange permet lors du traitement de la réaction d'isoler la 1,3,5-tricétone **41**.

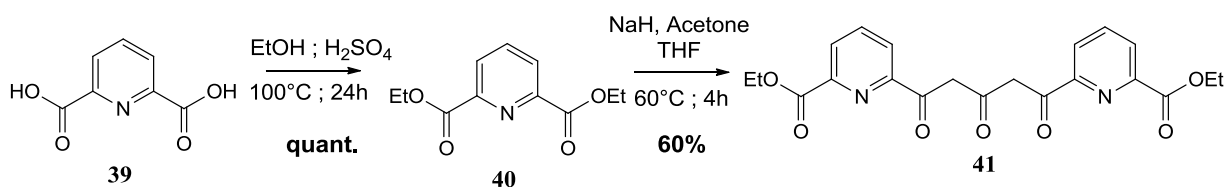


Schéma 4.11 : Synthèse de la tricétone **41** à partir de l'ester dipicolinique.

La formation d'un cycle aromatique à 6 atomes entre les deux pyridines en fin de chaîne pourrait être réalisée à travers une cyclisation intramoléculaire de la tricétone. En effet en milieu acide, plusieurs équilibres céto-énoliques s'établissent et génèrent des espèces où l'atome d'oxygène est suffisamment nucléophile pour initier une cétonisation intramoléculaire. La présence d'acide catalyse également l'élimination d'une molécule d'eau et un cycle à 6 modérément stable est alors obtenu.

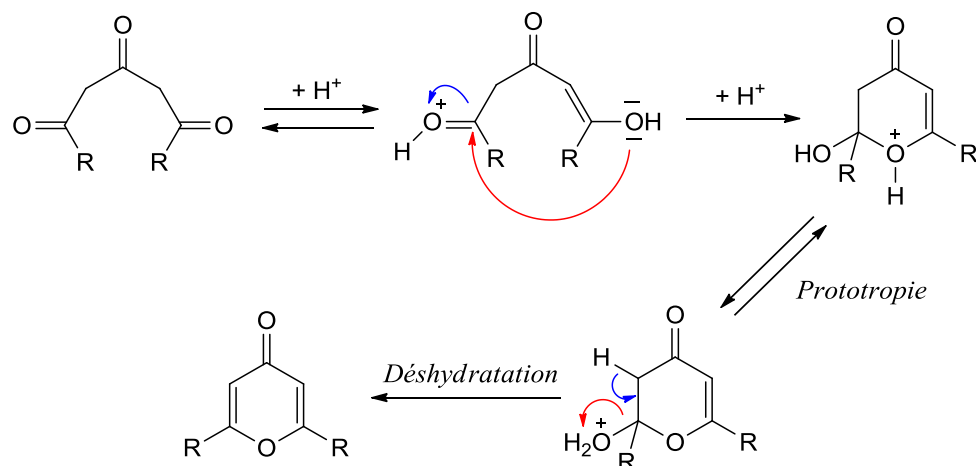


Schéma 4.12 : Mécanisme de cyclisation des tricétones en pyranones catalysée par un acide.

Le pyranone formé est très réactif et lorsque la réaction a lieu en présence d'ammonium ou d'amine primaire, l'atome d'oxygène intracyclique est aisément substitué. Une pyridone stabilisée par effet mésomère est alors obtenue.

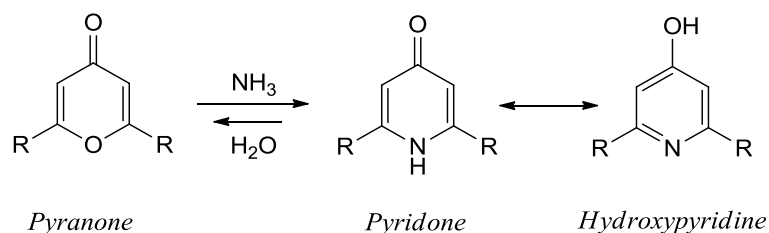


Schéma 4.13 : Formation d'une pyridine à partir d'un noyau pyranone en présence d'ammoniac.

Selon le même mécanisme, nous avons fait réagir la tricétone **41** avec un large excès d'acétate d'ammonium à reflux de l'éthanol. Au bout de deux heures de réaction et après consommation du produit de départ, plusieurs produits sont formés et après traitement de la réaction puis purification par chromatographie sur colonne, on arrive à isoler la terpyridine **42** sous la forme d'une poudre jaune, avec un rendement cependant assez faible pour cette seule étape.

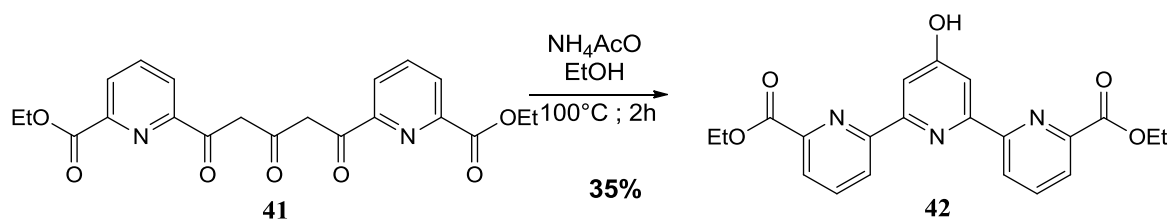


Schéma 4.14 : Synthèse de la terpyridine lors de la cyclisation intramoléculaire de la tricétone **41**.

Ce rendement médiocre peut être attribué à la formation de plusieurs produits secondaires durant l'étape de cyclisation, ou encore à la formation d'amide. L'augmentation du temps de réaction ne permet malheureusement pas d'améliorer le rendement de cette étape.

Afin d'introduire un groupement nucléofuge en position *para* de la pyridine centrale, une réaction de substitution de l'hydroxyle par un atome de brome a été réalisée par action de PBr_5 dans le DMF. Le pentabromure de phosphine a été synthétisé *in situ* à partir d'un mélange de PBr_3 et de Br_2 , puis le mélange réactionnel contenant la terpyridine **42** en solution dans le DMF est chauffé à 60°C pendant une nuit. Après évaporation et purification par chromatographie sur colonne, le composé **43** est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement satisfaisant pour cette étape.

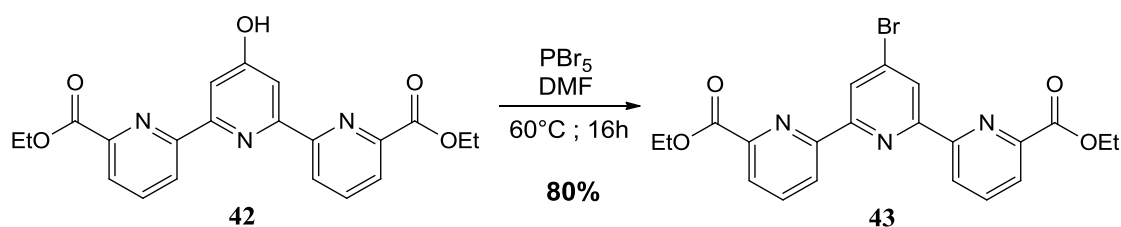


Schéma 4.15 : Réaction de substitution de l'hydroxyle par un atome de brome.

3.2 Insertion des éléments de coordination

Tout comme pour les ligands en série pyridine-bispyrazole, il était important de modifier la réactivité de la terpyridine à l'égard des nucléophiles en vue de l'insertion des phosphonates. Pour ce faire, une réaction de réduction des esters éthyliques pour donner les alcools correspondants était envisagée. La réaction a donc été tentée en utilisant 2 équivalents de LiAlH_4 . Compte tenu du caractère exothermique de cette réaction, l'ajout de l'agent réducteur au milieu réactionnel se faisait à basse température (0°C) et précautionneusement en plusieurs fois.

Malgré ces dispositions préventives, on a observé à plusieurs reprises à ce stade l'apparition d'une coloration verte persistante. Après neutralisation du réducteur avec du chlorure d'ammonium, la solution devenait jaune et les produits de réduction et de substitution de l'atome de brome par un atome d'hydrogène étaient obtenus en mélange avec d'autres produits secondaires difficiles à purifier.

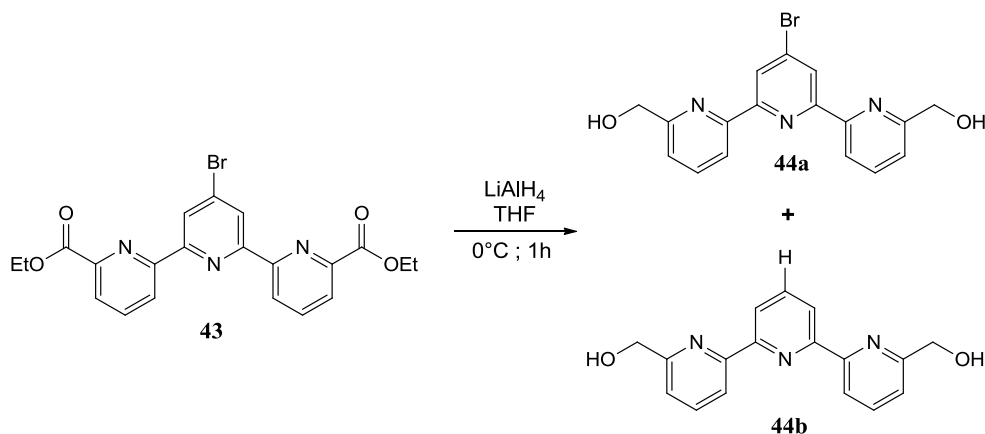


Schéma 4.16 : Réduction des esters de la terpyridine **43** par action de LiAlH₄.

La formation de complexes d'aluminium^[16] avec la terpyridine pourrait expliquer à la fois le rendement faible et la coloration inattendue du mélange réactionnel.

Cette hypothèse nous a amené à envisager la réduction des esters à travers l'utilisation d'un agent plus doux et moins coordonnant comme NaBH₄. La réaction a été réalisée cette fois dans l'éthanol et à reflux pendant deux heures, jusqu'à consommation complète du produit de départ. Dans ces conditions, il est possible d'éviter la formation du produit de substitution de l'atome de brome et seul le diol **44a** est obtenu avec un rendement de 60% après purification. Le composé **44a** est ensuite engagé dans une réaction de bromation par l'action de PBr₃ et la terpyridine tribromée **45** est obtenue au bout de quelques heures de réactions.

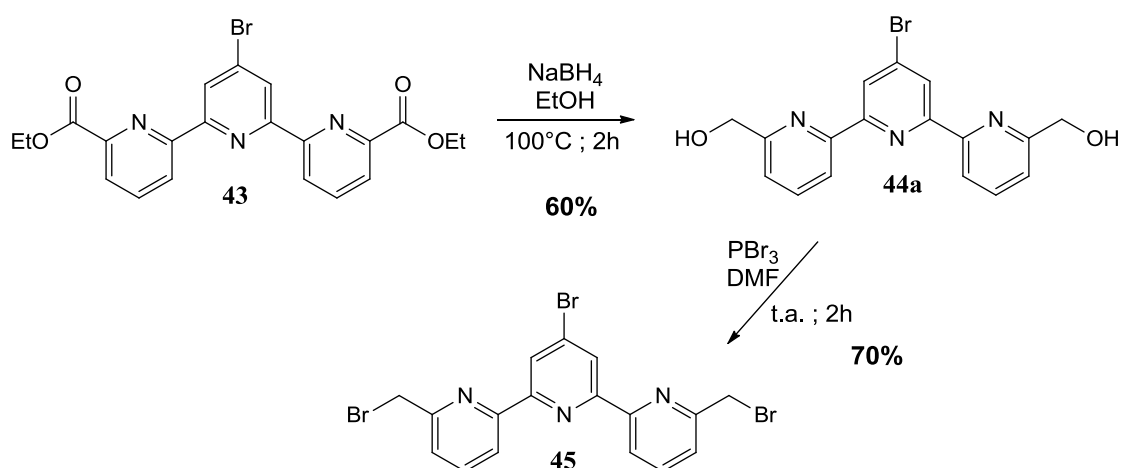


Schéma 4.17 : Réaction de réduction des esters de la terpyridine **43** par action de NaBH₄ et bromation des alcools.

La réaction du composé **45** avec l'amine **8** en présence de carbonate de potassium permet d'obtenir le produit de disubstitution tétraphosphonaté.

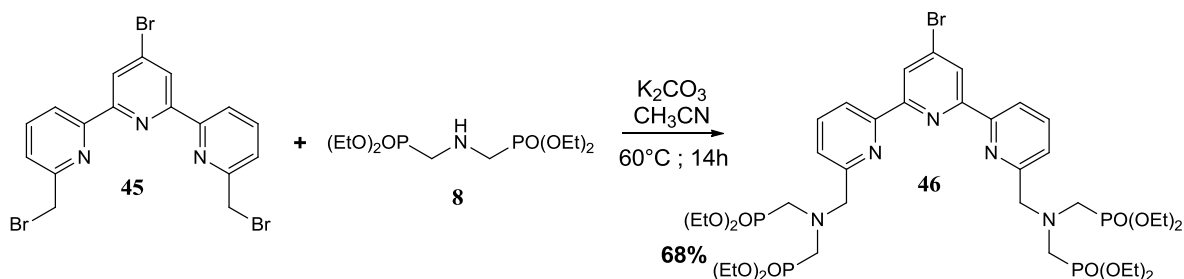


Schéma 4.18 : Insertion des groupements aminophosphonaté.

À partir du composé **46**, la réactivité particulière des bromures d'alkyle permet d'envisager l'introduction d'autres dérivés qui permettraient soit de greffer les complexes du ligand à des biomolécules, soit d'influencer les propriétés de luminescence de la plateforme de photosensibilisation.

3.3 Synthèse de ligands pour le marquage des biomolécules

Dans un premier temps, nous avons réalisé une réaction de Sonogashira avec l'acide heptynoïque, conduisant à la synthèse de deux nouveaux ligands dont l'un est activé en ester N-hydroxysuccinimidyl.

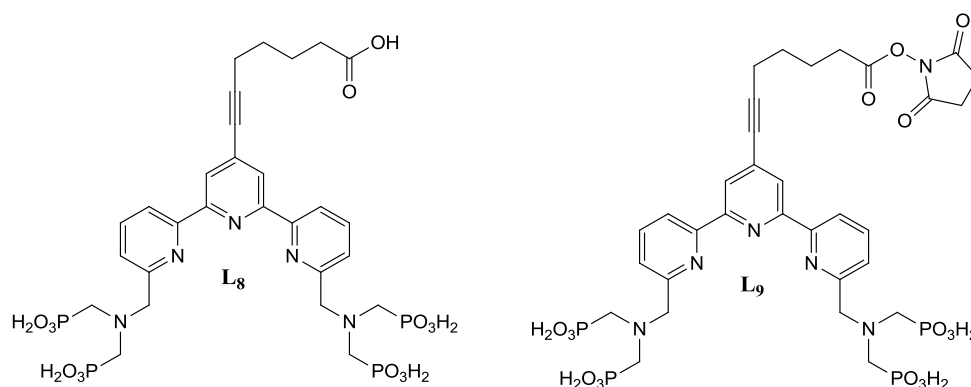


Schéma 4.19 : Ligands dérivés de terpyridine phosphonaté portant des espaceurs réactifs.

3.3.1 Synthèse du ligand **L₈**

Le ligand **L₈** est obtenu en deux étapes dont la première est un couplage de type Sonogashira^[17] avec l'acide heptynoïque. La réaction est catalysée par un complexe de Palladium (II) et co-catalysée par le cuivre (I) en présence de triéthylamine. Cette expérience est réalisée en milieu parfaitement anhydre et sous atmosphère inerte et le composé **47** a pu être isolé sous la forme d'une huile brune.

La déprotection des phosphoesters éthyliques a été réalisée par action de TMSBr et en présence de lutidine à température ambiante et le ligand **L₈** a été isolé sous la forme d'une poudre brune.

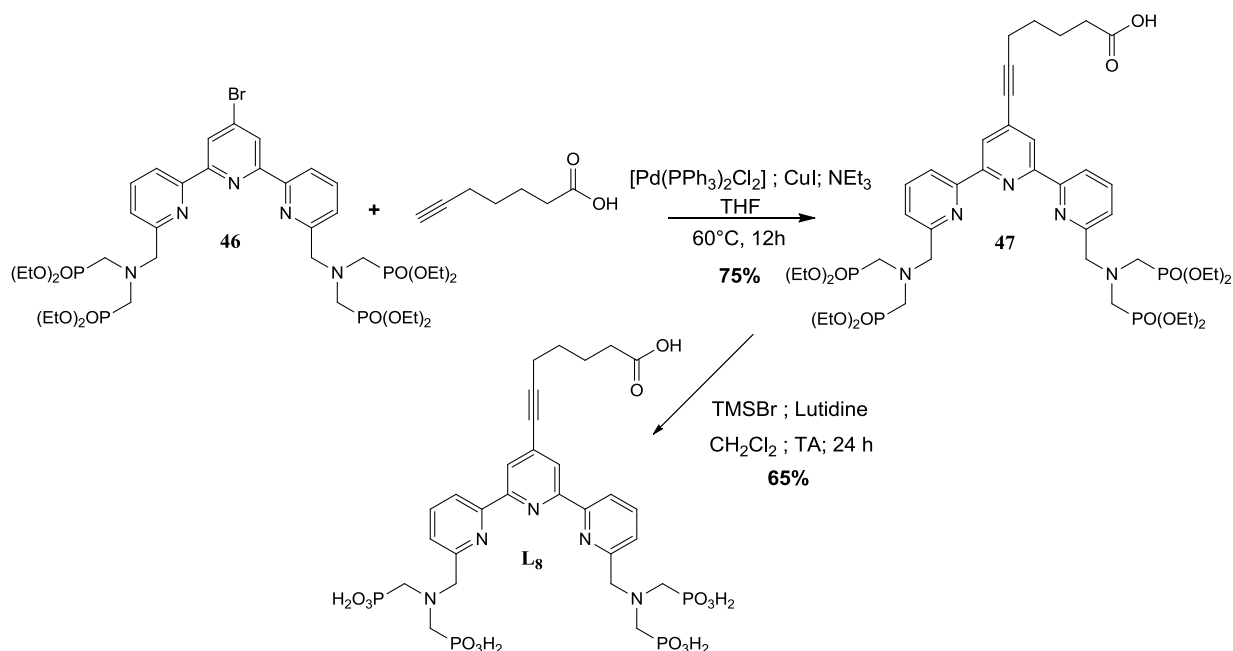


Schéma 4.20 : Synthèse du ligand **L₈**.

Plusieurs lavages au méthanol ont été réalisés afin d'éliminer la lutidine et le ligand purifié a été caractérisé.

Le spectre RMN ^1H obtenu est présenté à la figure 4.11. Dans la région des protons aliphatiques, le pic du méthanol à 3,28 et le pic résiduel de l'eau à 4,79 ppm sont prédominants. On distingue cependant trois signaux bien résolus à 1,81 ppm, 2,32 ppm et 2,56 ppm attribuables aux 8 protons des $-\text{CH}_2$ de l'espaceur heptynoïque. Dans le même domaine de déplacements chimiques, le pic caractéristique des 8 protons en α de l'atome de phosphore apparaît sous la forme d'un doublet à 3,52 ppm et les $-\text{CH}_2$ en position γ fortement déblindés sous la forme d'un singulet à 4,92 ppm.

Dans la région des protons aromatiques, les signaux sont encore très larges mais leurs multiplicités et les valeurs des intégrations permettent d'attribuer partiellement les signaux des protons de la terpyridine.

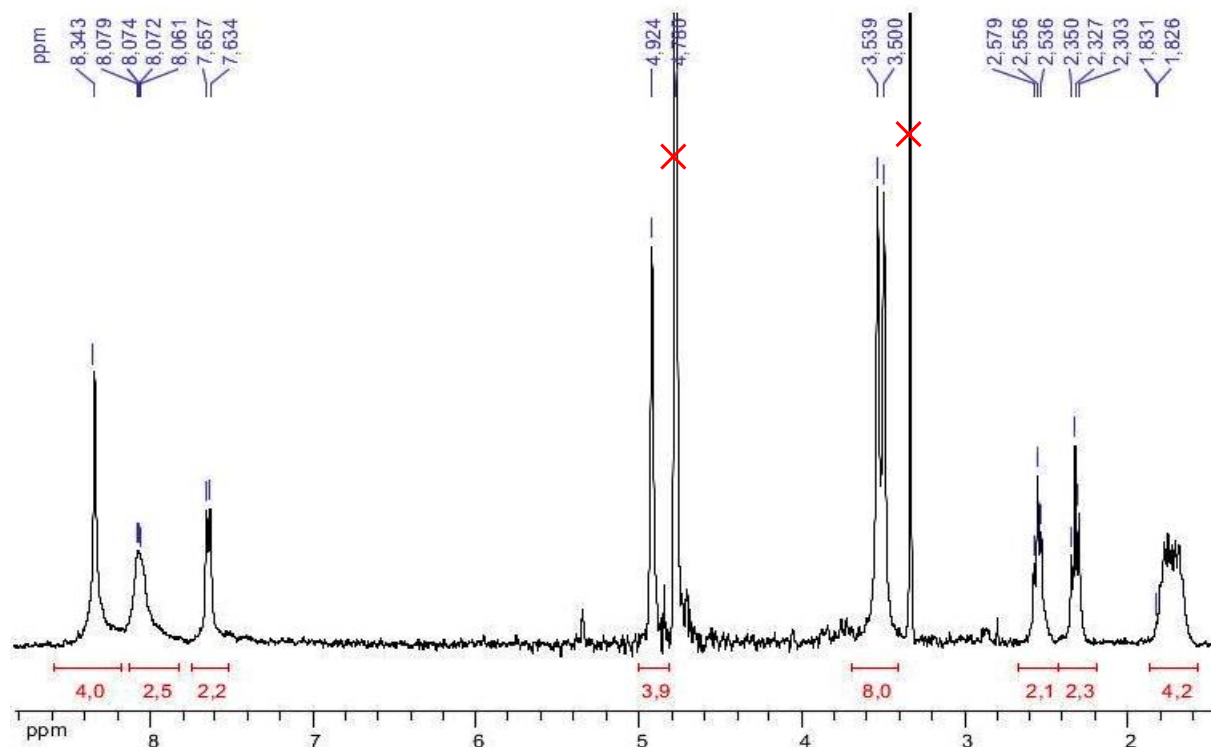


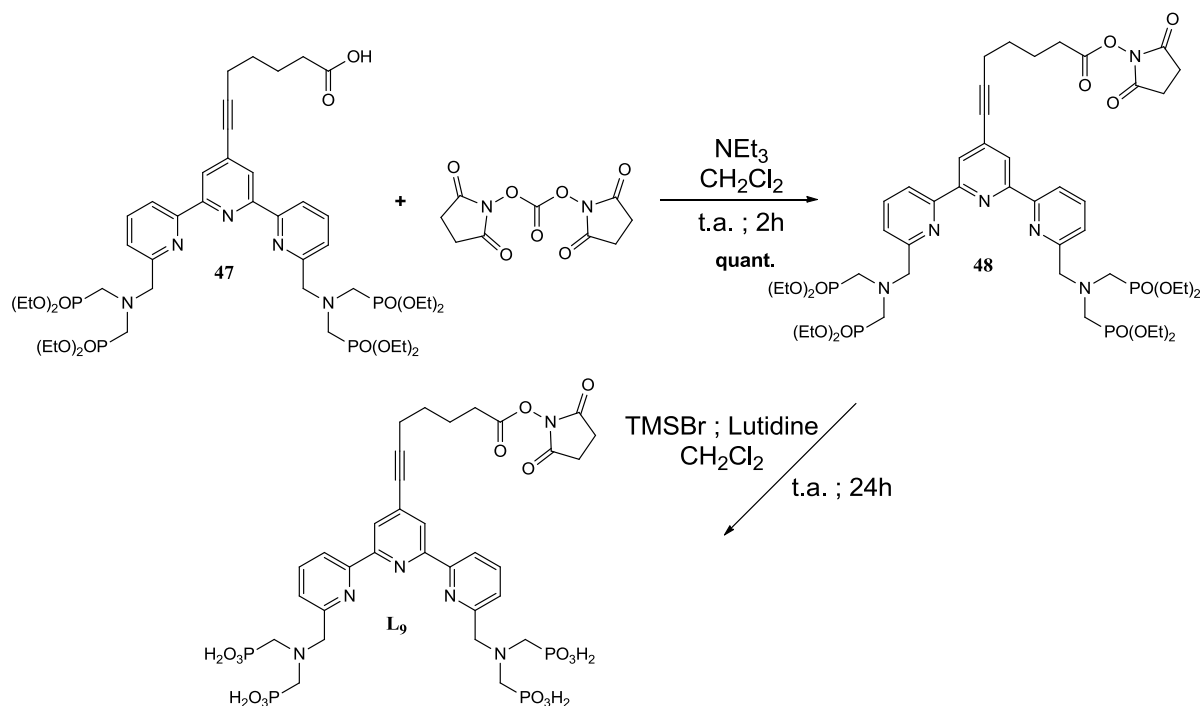
Figure 4.11 : Spectre RMN ^1H (D_2O , 300 MHz, t.a.) du ligand L_8 .

En outre, le spectre RMN du phosphore fait état d'un pic à 7,85 ppm qui atteste bien de la formation d'un seul produit d'hydrolyse des esters.

3.3.2 Synthèse du ligand L_9

Ce ligand diffère de L_8 uniquement par l'activation de l'acide carboxylique en ester NHS. Suivant la méthodologie développée pour le ligand L_3 , la réaction d'activation a eu lieu avant l'étape de déprotection des esters phosphoniques.

Le composé **47** est mis en solution dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine et l'agent de couplage est ajouté en léger excès (Schéma 4.21). Au bout d'une heure d'agitation à température ambiante, le produit de départ est entièrement consommé, l'intermédiaire activé **48** est isolé. Sa déprotection a été réalisée par action de triméthylbromosilane en présence de lutidine et le ligand L_9 a pu être isolé sous forme de sel de lutidinium.

Schéma 4.21 : Synthèse du ligand activé **L₉**.

Malgré la domination des signaux de la lutidine, le spectre RMN ^1H du ligand montre bien la formation d'un composé comportant la fonction ester activé, du fait de la présence d'un singulet de 4 protons à 2,70 ppm.

3.3.1 Caractérisation spectroscopique du ligand **L₈**

Compte tenu de la faible stabilité de la fonction activée de **L₉** en solution aqueuse et puisque les chromophores sont les mêmes pour les ligands **L₈** et **L₉**, les propriétés spectroscopiques en solution ne seront étudiées que pour le ligand **L₈** et ses complexes.

Des titrages spectroscopiques en absorption et en émission du ligand en solution dans un tampon TRIS ont été réalisés à l'aide de solutions d'euprium et de terbium.

Le spectre d'absorption du ligand libre présente trois pics significatifs d'absorption dont un très intense à 244 nm, un pic d'intensité moyenne à 274 nm et un troisième pic de faible intensité à 315 nm. Avec l'addition de métal et la formation des complexes, la bande à 244 nm, que l'on peut attribuer à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de la terpyridine avec une contribution des transitions $n \rightarrow \pi^*$, diminue fortement, ce qui confirme la contribution des doublets électroniques libres des trois atomes d'azotes à la coordination des ions lanthanides. La bande d'absorption à 274 nm est légèrement déplacée vers les faibles énergies et présente à l'équivalence deux contributions distinctes à 285 et 295 nm. Le même phénomène est observé

pour la bande d'absorption dont le maximum était à 315 nm pour le ligand libre et qui laisse apparaître un épaulement avec deux contributions à 331 et 344 nm.

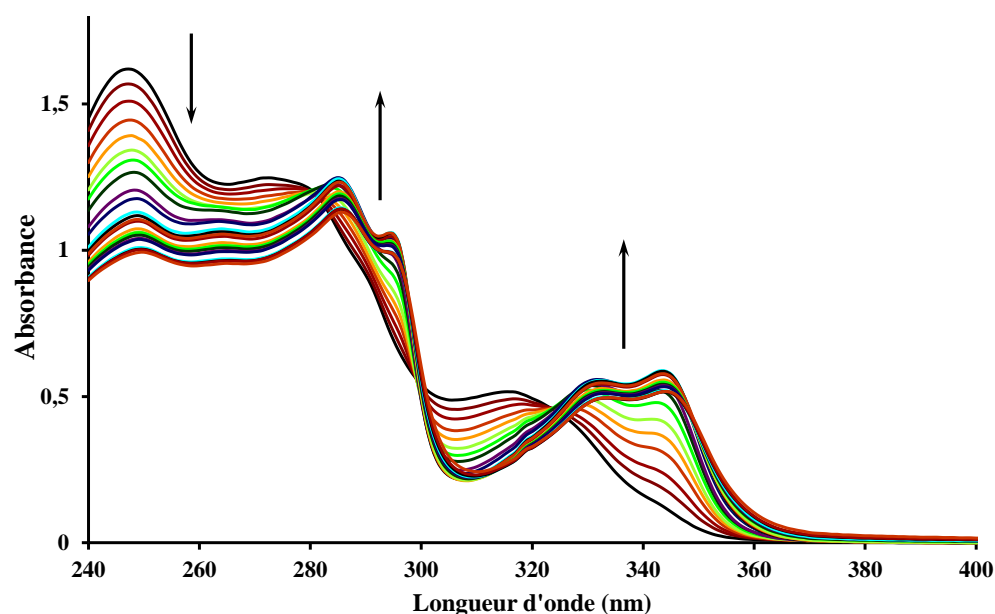


Figure 4.12 : Evolution du spectre d'absorption UV-Visible du ligand **L₈** avec l'addition d'une solution d' $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($[\text{L}_8] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Eu}^{3+}] = 6,11 \times 10^{-4} \text{ M}$) à $\text{pH} = 7,4$. L'intensité d'absorption n'est pas corrigée pour la dilution.

Il est également intéressant de remarquer que contrairement à ce qui a été obtenu en série pyrazolique, les coefficients d'absorption des complexes du ligand **L₈** sont plus importants que ceux du ligand libre.

En effet, lorsque l'on compare les spectres d'absorption obtenus pour le ligand **L₈** à ceux de **L₁** où les pyridines sont remplacées par des pyrazoles, on remarque que le ligand libre **L₁** a un coefficient d'absorption plus élevé que celui de l'analogue avec la plateforme terpyridine. L'état excité S_1 du ligand **L₁** ($\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$) est proche de celui du ligand **L₈** ($\lambda_{\text{max}} = 316 \text{ nm}$), mais les coefficients d'absorption associés sont très différents pour chaque ligand ($16030 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour **L₁** et $10210 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour **L₈**).

Cette tendance est inversée lors de la complexation puisque le maximum d'absorption des complexes de lanthanides du ligand **L₈** est à 343 nm, tandis que chez les analogues du ligand **L₁** il est beaucoup plus faible (328 nm). De même, les coefficients d'absorption des complexes de la terpyridine sont plus élevés (Figure 4.13).

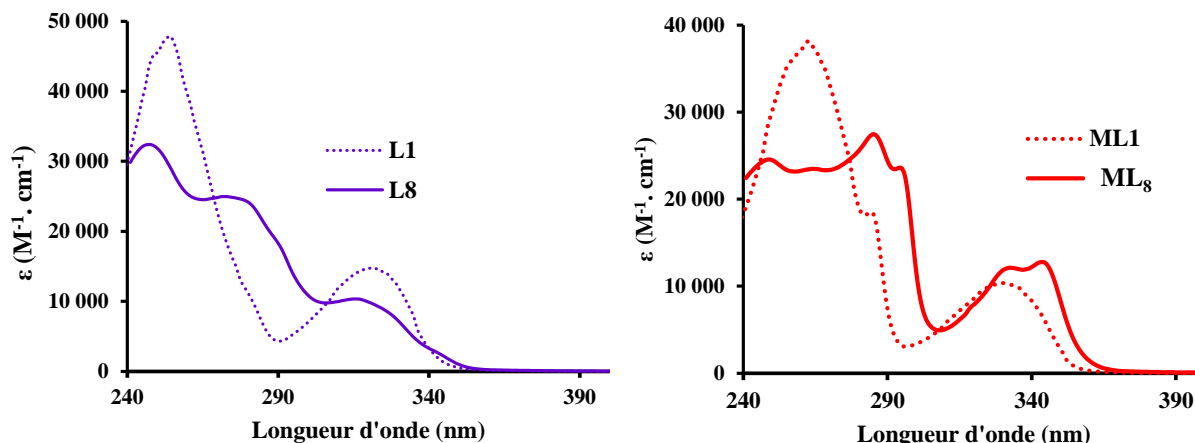


Figure 4.13 : Comparaison des spectres d'absorption des ligands L_1 (....) et L_8 (—) à gauche ainsi que de leurs complexes respectifs TbL_1 (.....) et TbL_8 (—) à droite.

Les données du titrage du ligand par une solution d'euprium ont été analysées avec le logiciel SPECFIT et la convergence a été obtenue pour un modèle de formation de deux espèces (Figure 4.14).

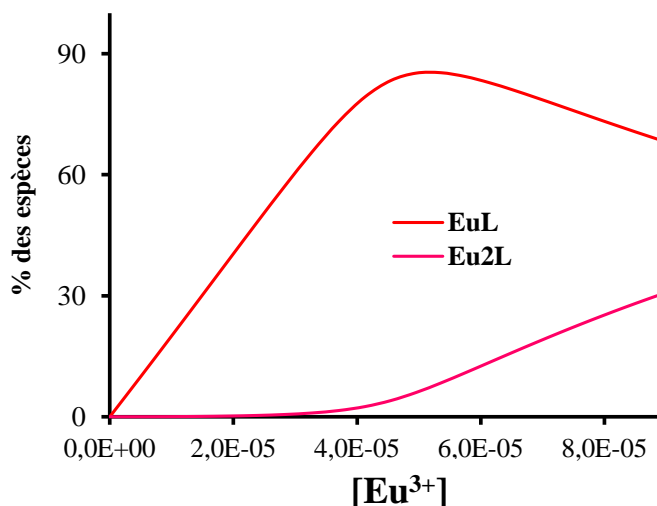


Figure 4.14 : Diagramme de répartition des espèces calculées avec le logiciel SPECFIT pour les données du titrage du ligand L_8 lors de l'addition d'une solution d'euprium.

Au début du titrage et jusqu'à l'équivalence, on observe uniquement la formation d'un complexe 1:1. L'addition supplémentaire de cation conduit à la formation d'un complexe 2:1 qui est cependant beaucoup moins stable.

L'espèce ML_2 n'apparaît pas tout au long de ce titrage, contrairement à ce qui avait été observé avec les ligands de la série pyridine-bispyrazole. Cette constatation peut aisément s'expliquer à partir de la différence entre les valeurs des angles dièdres de chacune des deux plateformes.

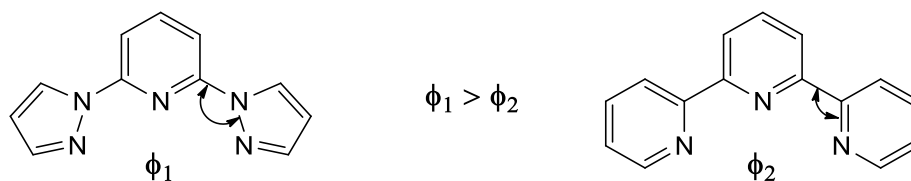


Schéma 4.22 : Comparaison des angles dièdres des plateformes pyridine-bispyrazole et terpyridine.

L'angle dièdre associé au ligand **L**₈ est plus petit que celui du ligand **L**₁, ce qui ne lui permet pas de former un complexe **ML**₂ qui implique la coordination de deux ligands autour d'un même cation.

Les spectres d'émission ont été mesurés parallèlement et dans le cas de la formation des complexes d'euprium, seules des variations d'intensité d'émission étaient observées (Figure 4.15). Cela signifie qu'une fois le métal inséré dans la plateforme de coordination, il n'y a pas de décomplexation de l'espèce **ML** et que sa géométrie de coordination ne varie pas avec la coordination supplémentaire d'un cation par les phosphonates.

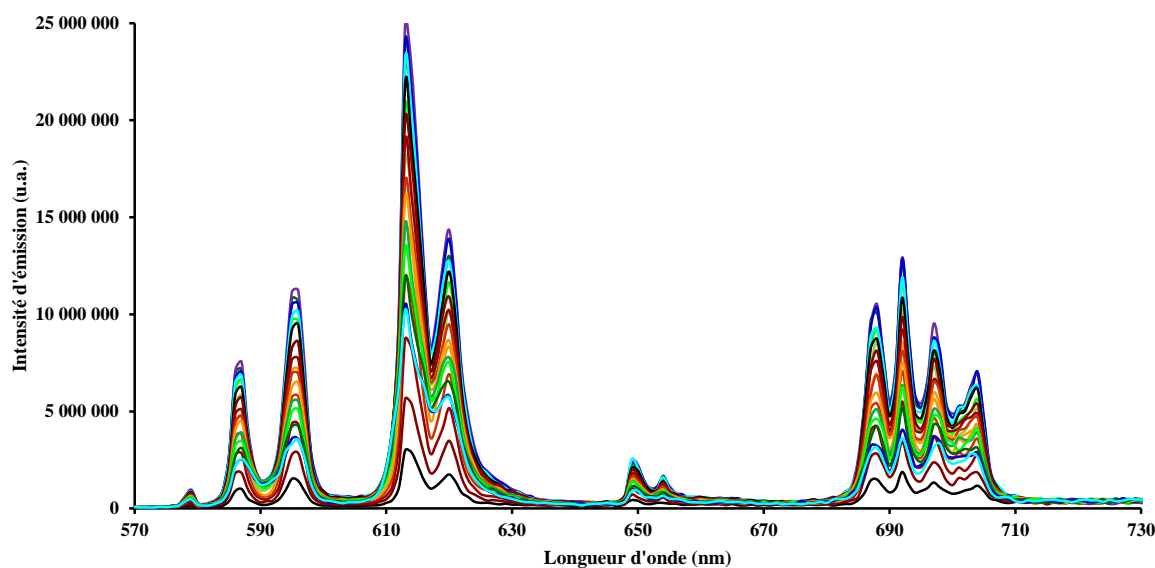


Figure 4.15 : Evolution du spectre d'émission ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) du ligand **L**₈ avec l'addition d'une solution d' $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($[\text{L}_8] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{Eu}^{3+}] = 6,11 \times 10^{-4} \text{ M}$) à $\text{pH} = 7,4$. L'intensité d'émission n'est pas corrigée pour la dilution.

En théorie le maximum d'émission devrait être atteint à l'équivalence pour la formation totale d'un complexe de stœchiométrie 1:1. Il y a cependant une différence entre la valeur de la concentration théorique et celle déterminée à partir du point d'inflexion (Figure 4.16). Cette anomalie pourrait résulter d'une imprécision au niveau du calcul des concentrations des solutions de ligand et métal.

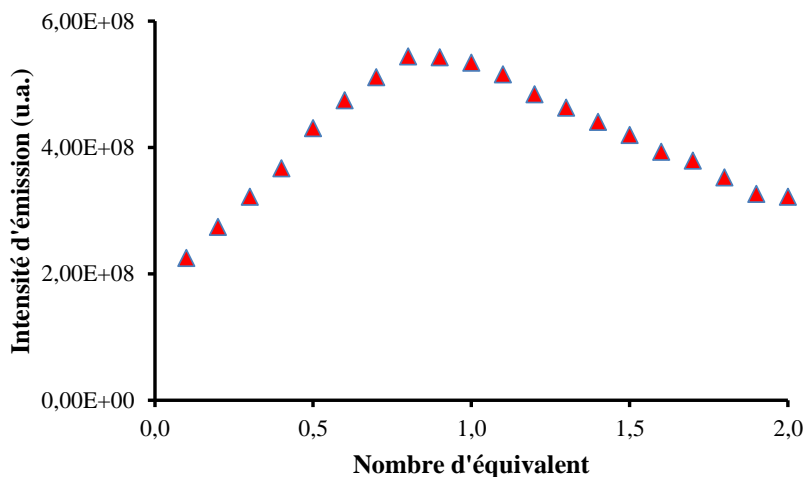


Figure 4.16 : Evolution de l'intensité d'émission mesurée à 615 nm lors de l'addition d'une solution de $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($[\text{L}_8] = 5 \times 10^{-5} \text{M}$; $[\text{Eu}^{3+}] = 6,11 \times 10^{-4} \text{M}$; TRIS/HCl 0,01 M à pH 7,4 ; $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$).

Les complexes d'euporium et de terbium ont été synthétisés et caractérisés par leurs spectres d'absorption et d'émission.

En ce qui concerne le complexe d'euporium, les spectres mesurés correspondent à ceux calculés par le logiciel sur la base d'un modèle à deux espèces métalliques.

Spectres d'absorption mesurés et calculés

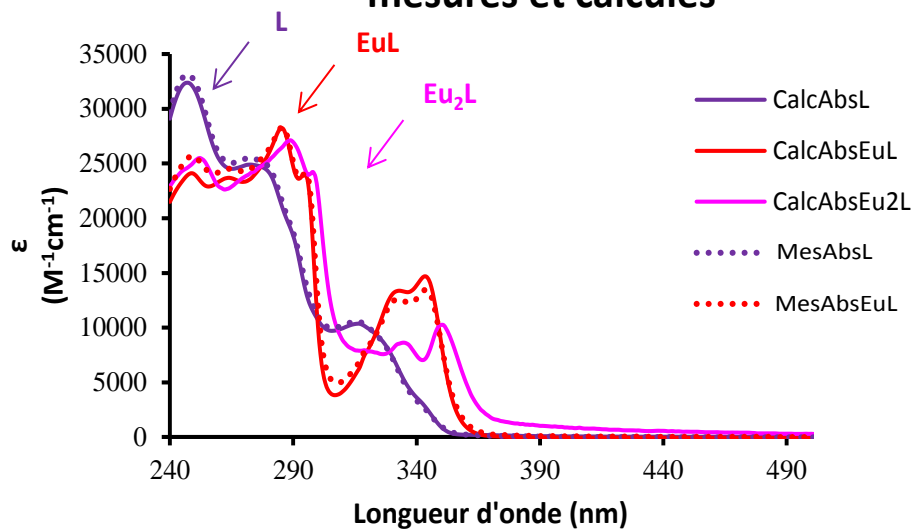


Figure 4.17 : Comparaison entre les spectres mesurés et les spectres calculés pour le ligand L_8 avec le complexe d'euporium.

Les spectres d'émission des deux complexes montrent les raies caractéristiques des transitions $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ ($6 < j < 3$) pour le terbium et $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_j$ ($0 < j < 4$) pour l'euporium.

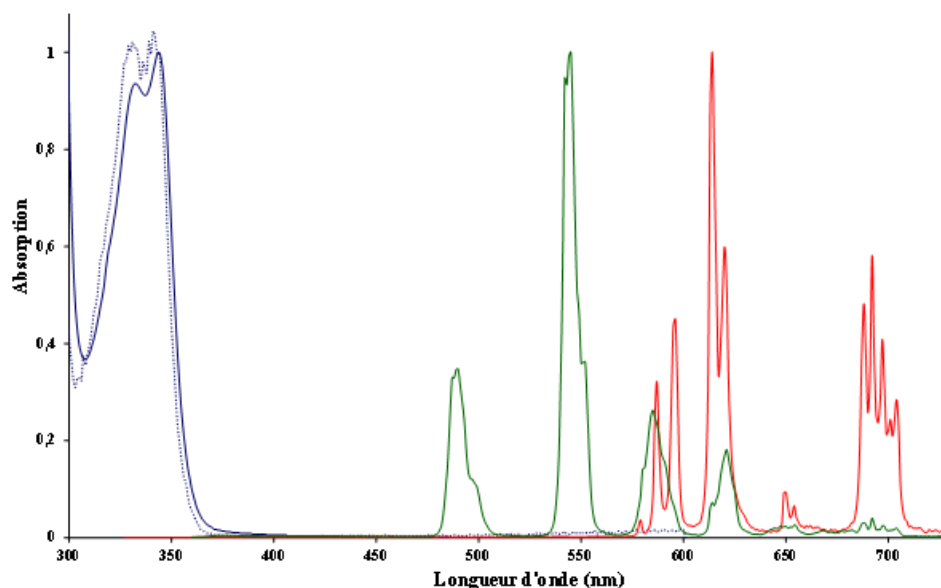


Figure 4.18 : Spectres d'absorption (—) et d'excitation (....) du complexe d'euporium et spectres d'émission normalisés des complexes de terbium (—) et d'euporium (—).

Les temps de vie des états excités ainsi que les rendements quantiques de luminescence dans l'eau et dans l'eau lourde ont été déterminés afin de calculer le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination. L'ensemble des données déterminées lors de l'étude spectroscopique du ligand et de ses complexes est rassemblé dans le tableau ci-après :

| | λ_{abs} (nm) | ϵ_{max} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms) | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms) | q | Φ |
|------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---|--------|
| L₈ | 245 | 32450 | - | - | - | - |
| | 273 | 25120 | - | - | - | - |
| | 316 | 10420 | - | - | - | - |
| EuL₈ | 284 | 28000 | - | - | - | - |
| | 332 | 12510 | 1,35 ms | 2,01 ms | 0 | 19 % |
| | 342 | 14500 | - | - | - | - |
| TbL₈ | 285 | 27410 | - | - | - | - |
| | 332 | 10550 | 1,29 ms | - | - | - |
| | 343 | 14790 | - | - | - | - |

Tableau 4.3 : Récapitulatif des données spectroscopiques du ligand **L₈** et de ses complexes d'euporium et de terbium.

Ces données font apparaître une efficacité remarquable du ligand **L₈** pour la photosensibilisation de l'euporium. Les valeurs de temps de vie des états excités des complexes en solution sont très élevées, de même que le rendement quantique de luminescence ou les coefficients d'absorption, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces

complexes d'euprium dans le cadre des expériences de FRET. En revanche les propriétés de luminescence du complexe de terbium sont beaucoup moins avantageuses notamment en ce qui concerne les temps de vie de luminescence. Ces mauvaises propriétés de luminescence pourraient provenir d'une inadéquation entre l'état triplet du ligand et les niveaux d'énergie du terbium.

Nous avons souhaité évaluer l'influence de la substitution de la terpyridine sur les propriétés spectroscopiques des ligands phosphonates, puisqu'elles conditionnent les niveaux mis en jeu lors du processus de photosensibilisation des lanthanides par effet d'antenne.

3.4 Étude de l'influence de la substitution de la terpyridine

Les propriétés optiques des complexes luminescents de lanthanides en particulier et de métaux lourds en général sont liées à la nature du métal complexé, à la nature du chromophore organique, mais aussi à la nature et à la position des substituants portés par le ligand. Cette influence a notamment été étudiée pour quelques complexes luminescents d'iridium^[18], qui ont montré que les performances d'un système pouvaient être fondamentalement changées avec le remplacement d'un atome ou groupe d'atomes par un autre. En ce qui concerne les ligands utilisés comme antennes pour la photosensibilisation des lanthanides, une étude a montré que la présence de groupements électro-attracteurs pouvait accroître l'efficacité de la photosensibilisation des lanthanides, notamment en ce qui concerne les complexes de terbium pour lesquels des rendements de luminescence quasi quantitatifs ont été obtenus.^[19]

Afin d'évaluer l'influence de la substitution de l'antenne, des groupements électro-donneurs et des groupements électro-attracteurs ont donc été introduits en position para de la pyridine centrale (Schéma 4.23) et les complexes d'euprium et de terbium obtenus ont été caractérisés.

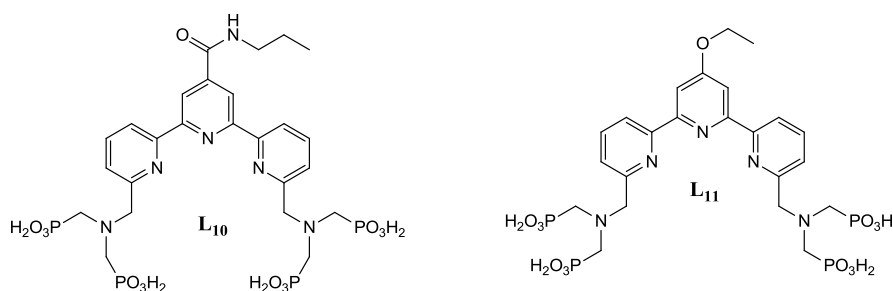


Schéma 4.23 : Formule développée des ligands L₁₀ et L₁₁.

3.4.1 Insertion d'un groupement électroattracteur

Nous nous sommes intéressés à la synthèse du ligand **L**₁₀ au sein duquel une fonction amide est reliée directement à la terpyridine.

3.4.1.1 Synthèse du ligand **L**₁₀

L'introduction d'un groupement carbonyle en position *para* de la pyridine centrale a été réalisée à travers une réaction de carboamidation.^[20] C'est une réaction qui permet de former des dérivés carbonylés à partir d'halogénures aryliques^[21] ou vinyliques.^[22] Elle est catalysée par un complexe de Palladium en présence d'un flux de monoxyde de carbone et d'une amine primaire qui joue le rôle de nucléophile et de base.

Pour la synthèse du ligand **L**₁₀, la terpyridine **46** a été mise en solution dans un mélange de toluène et de triéthylamine auquel on a rajouté un excès de propylamine et des quantités catalytiques de [Pd(PPh₃)₂Cl₂]. On a fait passer un flux continu de monoxyde de carbone au sein du milieu réactionnel et le mélange a été chauffé à 100°C pendant une nuit ce qui a permis d'isoler le composé **49**, produit de l'insertion de l'amide après traitement du milieu réactionnel. On a réalisé la déprotection des esters phosphoniques en présence de bromure de triméthylsilane. Un excès de lutidine a été ajouté dans le milieu réactionnel afin de neutraliser l'acide formé et d'éviter l'hydrolyse de l'amide. Le ligand **L**₁₀ a été isolé sous forme de sel de lutidinium après évaporation des composés volatils et une série de lavage du précipité par du méthanol.

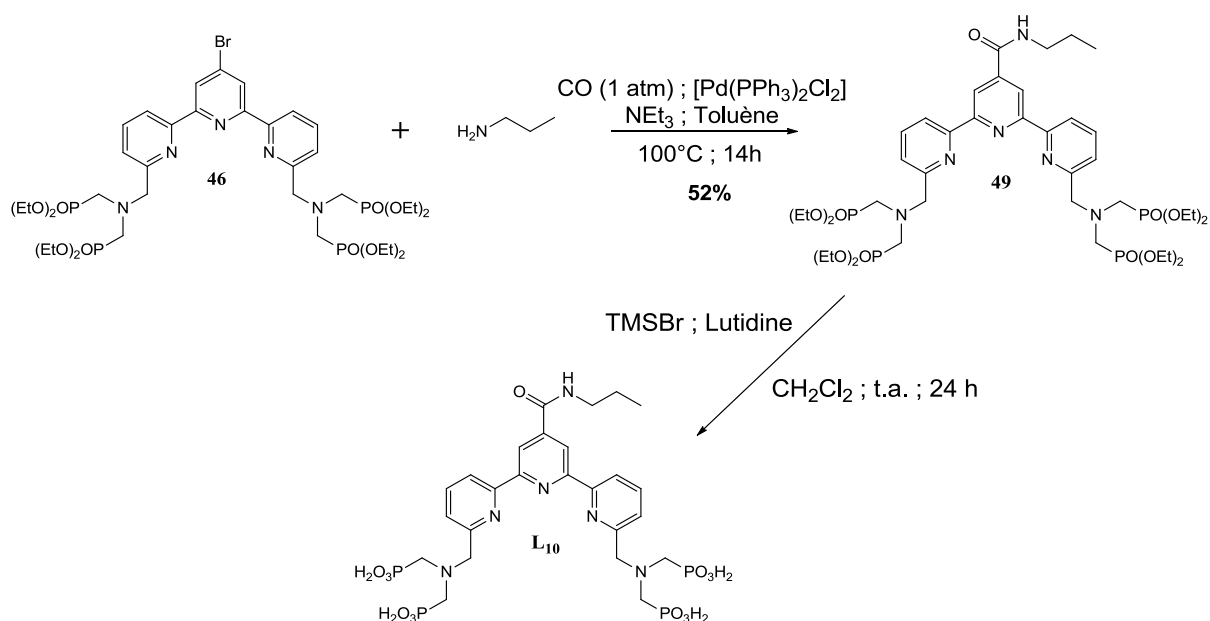


Schéma 4.24 : Synthèse du ligand **L**₁₀.

3.4.1.2 Caractérisation spectroscopique

Les propriétés spectroscopiques du ligand L_{10} et de ses complexes de terbium et d'euporium isolés ont été étudiées en solution dans un tampon TRIS/HCl (pH = 7,4). Les spectres d'absorptions et d'émission du ligand libre et des deux complexes sont représentés sur la figure 4.19.

Le spectre d'absorption du ligand libre présente trois bandes à 233 nm, 273 nm et 319 nm dans la gamme de longueur d'onde étudiée. Lors de la complexation, les maxima de ces bandes sont déplacés vers le rouge et la bande de transition $\pi \rightarrow \pi^*$ centrée sur le métal se retrouve à 332 nm. On remarque aussi que les coefficients d'absorption du ligand et de ses complexes sont assez faibles, surtout lorsqu'on les compare aux valeurs obtenues pour le ligand L_8 dont la pyridine centrale était substituée par un alcynes.

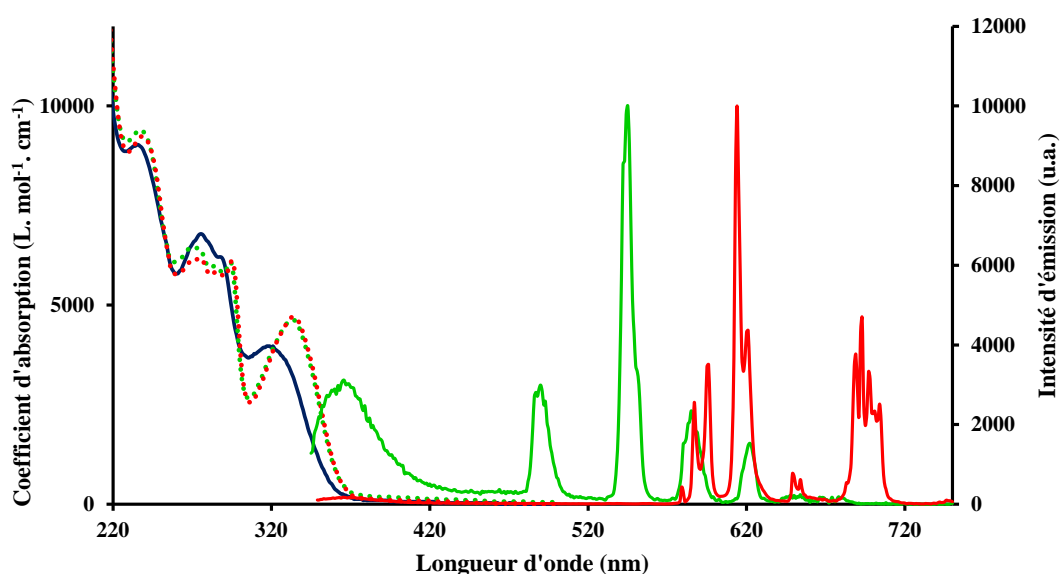


Figure 4.19 : Spectres d'absorption (—) du ligand et des complexes d'euporium (....) et de terbium (....), spectres d'émission ($\lambda_{ex} = 320$ nm) des complexes d'euporium (—) et de terbium (—).

Les spectres d'émission des complexes d'euporium et de terbium mesurés lors de l'excitation des solutions à 320 nm présentent les bandes caractéristiques pour chacun des ions, mais en ce qui concerne le terbium, on observe également une bande d'émission à 342 nm que l'on peut attribuer au ligand. Cette bande d'émission persiste même lorsqu'un excès de terbium est rajouté à la solution. Cela pourrait indiquer un mauvais croisement inter-système lors du processus de photosensibilisation. Cette hypothèse est renforcée par le faible rendement quantique de luminescence du complexe de terbium dans l'eau dont le calcul donne une valeur de 0,3%.

Par ailleurs, la mesure des temps de vie de luminescence dans l'eau fait apparaître deux espèces aux temps de vie extrêmement faibles pour des ions terbium ($\tau_1 = 0,1$ ms (37%) et $\tau_2 = 0,5$ ms (63%)). En plus de l'éventuel transfert d'énergie en retour vers le ligand, la présence de l'espèce au temps de vie très court pourrait résulter d'une décomplexation partielle ou totale du ligand dans le domaine de dilution ($2,6 \times 10^{-6}$ M) et de pH (7,4) des mesures. Une seconde hypothèse est un phénomène de transfert de charge interne du ligand.^[23]

En ce qui concerne le complexe d'euporium, la valeur du rendement quantique dans l'eau est de 7%. Les temps de vie mesurés dans l'eau et dans l'eau lourde sont également plus élevés que ceux du terbium. L'ensemble des paramètres spectroscopiques déterminés pour le ligand **L₁₀** et ses complexes sont présentées dans le Tableau 4.4.

| | λ_{abs} (nm) | ϵ_{max} (M ⁻¹ .cm ⁻¹) | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms) | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms) | q | Φ |
|-------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|--------|
| L₁₀ | 235 | 9020 | - | - | - | - |
| | 275 | 6780 | | | | |
| | 319 | 3970 | | | | |
| EuL₁₀ | 237 | 9400 | $\tau_1 = 1,49$ 70% | 2,21 | 0,2 | 7 % |
| | 274 | 6440 | | | | |
| | 334 | 4640 | | | | |
| TbL₁₀ | 239 | 9230 | $\tau_1 = 0,18$ 40% | $\tau_1 = 0,5$ 30% | - | 0,3 % |
| | 274 | 6180 | | $\tau_2 = 1,3$ 70% | | |
| | 334 | 4700 | | $\tau_2 = 0,59$ 60% | | |

Tableau 4.4 : Récapitulatif des données spectroscopiques du ligand **L₁₀** et de ses complexes d'euporium et de terbium.

En somme, les propriétés de luminescence du complexe de terbium sont assez mauvaises, et même si le complexe d'euporium présente toujours un rendement quantique intéressant, la substitution de la pyridine par un groupement attracteur d'électrons entraîne une dégradation des propriétés de luminescence.

3.4.2 Insertion d'un groupement électrodonneur

Afin d'évaluer l'influence de la substitution de la pyridine centrale et après l'insertion d'un groupe attracteur d'électrons, nous nous sommes intéressés à l'insertion d'un groupe

riche en électron. Il s'agissait d'un alcool éthylique, ce qui nous a conduits à la synthèse du ligand **L₁₁** (schéma 4.23).

3.4.2.1 Synthèse du ligand **L₁₁**

La voie de synthèse retenue pour le ligand portant un groupe donneur consiste en une réaction de Mitsunobu qui permet de réaliser la substitution nucléophile des alcools. Cette transformation est activée par la formation d'un ion phosphonium en présence d'un dérivé azodicarboxylate. Le mélange réactionnel est chauffé à 100°C sous agitation magnétique et au bout 14 heures, la réaction n'évolue plus. Le solvant est alors éliminé et le résidu huileux restant est purifié en deux fois par chromatographie sur colonne. Le diester **50** est isolé sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 60%.

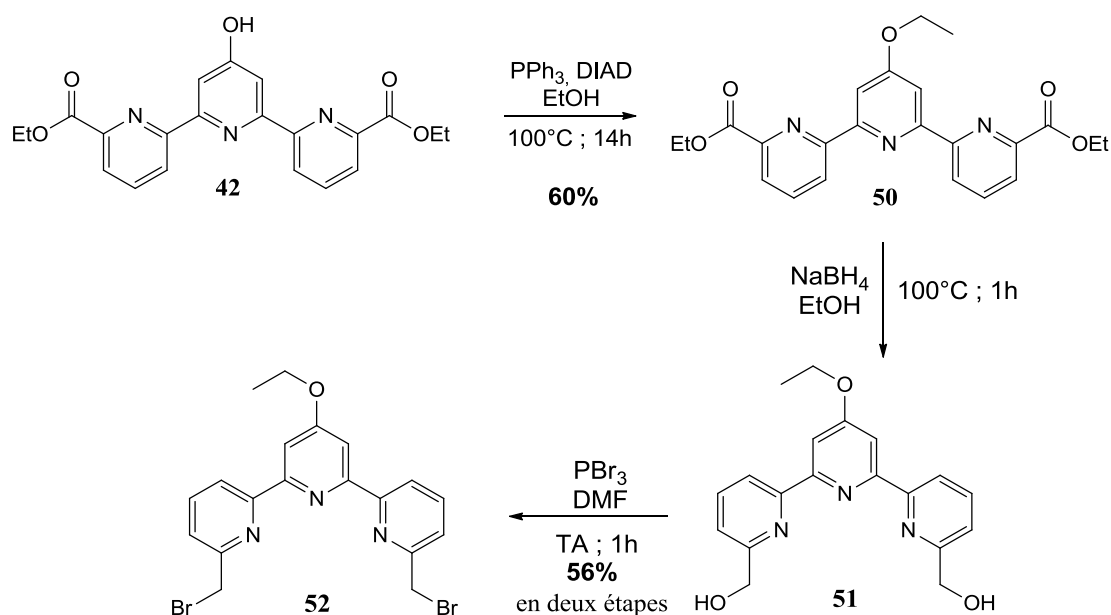


Schéma 4.25 : Réaction de Mitsunobu avec la terpyridine **42** suivie de la réduction des esters éthyliques et de la bromation des alcools.

Afin de faciliter la réaction d'insertion des aminophosphonates, le diester éthylique a été soumis à une réaction de réduction par action de NaBH_4 pour conduire au diol correspondant. Le composé **51** est isolé après traitement du mélange réactionnel et la réaction de bromation par l'action de PBr_3 dans le DMF distillé à température ambiante a suivi sans purification supplémentaire. Au bout d'une heure de réaction, l'acide formé dans le milieu a été neutralisé par une solution saturée en NaHCO_3 et le précipité a été solubilisé par l'addition de dichlorométhane suivie de l'extraction. Le mélange isolé après évaporation a été purifié

par chromatographie sur colonne et la terpyridine dibromée **52** a été isolée avec un rendement de 56% pour les deux étapes.

L'insertion des éléments de coordination a ensuite été réalisée à travers une réaction de substitution nucléophile des atomes de brome par l'amine secondaire **8**. Cette transformation a eu lieu dans l'acétonitrile en présence de carbonate de potassium et, au bout de 48 heures de réaction, la terpyridine de départ est entièrement consommée. L'évaporation du solvant et la purification du résidu huileux obtenu permettent d'isoler le précurseur du ligand **L₁₁** avec un rendement de 49%. Enfin, une réaction d'hydrolyse des esters éthyliques conduit au ligand **L₁₁** avec un rendement quasi-quantitatif.

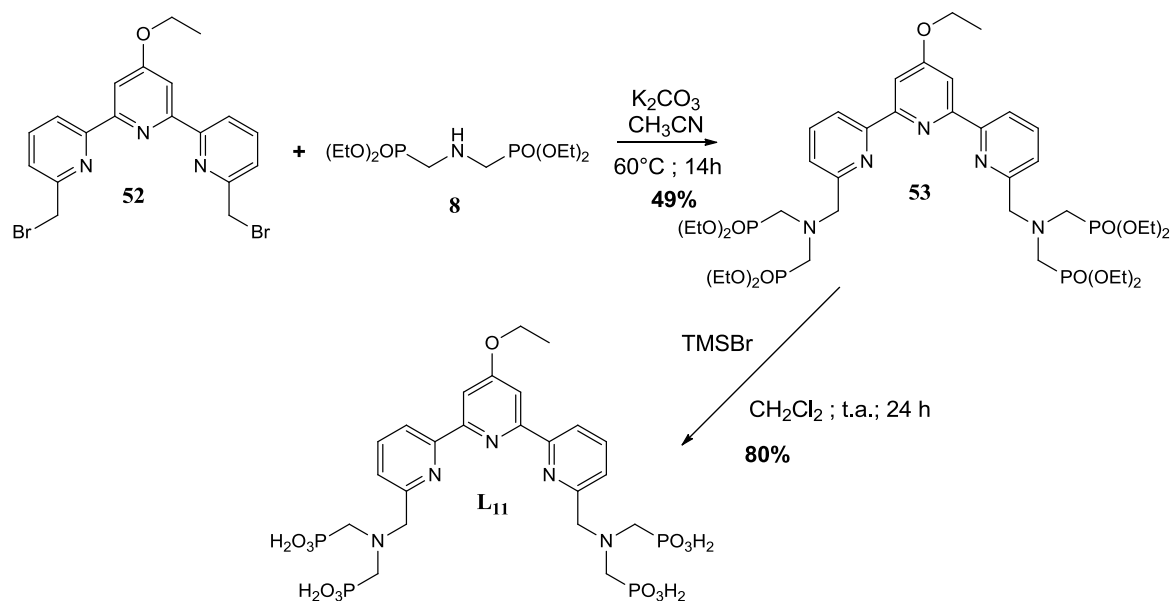


Schéma 4.25 : Synthèse du ligand **L₁₁**.

3.4.2.2 Caractérisation spectroscopique du ligand **L₁₁** et des complexes

Les complexes d'euprium et de terbium ont été préparés à partir des mélanges de solutions du ligand libre et des sels de $TbCl_3$ et $EuCl_3$ dans une solution tampon TRIS/HCl (pH = 7,4). Les spectres d'absorption du ligand libre et des deux complexes de concentrations connues ont été mesurés (Figure 4.21).

Le spectre d'absorption du ligand libre présente deux bandes majeures à 242 nm et 284 nm. Lors de la complexation, on observe un léger déplacement bathochrome des deux pics, avec un effet hyperchrome prononcé pour la bande de plus grande énergie qui passe de 242 à 245 nm. On note aussi l'apparition d'un épaulement dont le maximum se situe autour de 314 nm au sein des complexes. Si l'on effectue une comparaison avec les résultats obtenus avec le ligand **L₈** dont la pyridine centrale était substituée par un groupement attracteur

d'électron, les spectres d'absorption des ligands L_{11} sont décalés vers les hautes énergies, mais leurs coefficients d'absorption molaires leur confèrent un intérêt supérieur.

Après excitation à 330 nm, les complexes d'euprium et de terbium présentent une forte luminescence en solution aqueuse et les spectres d'émissions mesurés présentent les bandes caractéristiques pour chacun des ions, tel que représenté à la figure 4.21.

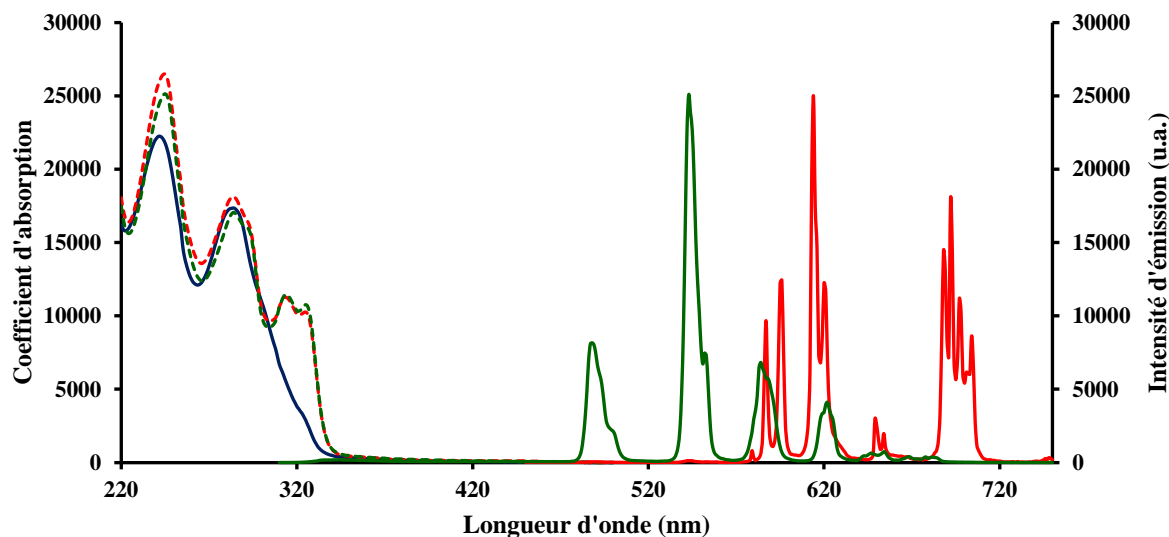


Figure 4.21 : Spectres d'absorption du ligand (—) et des complexes d'euprium (....) et de terbium (....) et les spectres d'émission ($\lambda_{ex} = 320$ nm) normalisés des complexes d'euprium (—) et du terbium (—) du ligand L_{11} .

Le rendement quantique de luminescence du complexe de terbium dont le calcul donne une valeur de 30% est beaucoup plus élevé que ceux des autres complexes avec des ligands de type terpyridine. Cela désigne une photosensibilisation particulièrement efficace de cet ion. Cependant les temps de vie de luminescence dans l'eau et dans l'eau lourde dont les valeurs sont respectivement 0,91 ms et 1,71 ms sont faibles. On peut attribuer ces valeurs de temps de vie faibles à un transfert d'énergie en retour de l'état excité du terbium vers le ligand.

Le rendement quantique de luminescence du complexe d'euprium est plus faible (7%), mais les temps de vie de luminescence sont plus élevés (1,55 ms dans l'eau et 2,49 ms dans D_2O) et le nombre de molécules d'eau en première sphère de coordination est nul.

| | λ_{abs} (nm) | ϵ_{max} (M ⁻¹ .Cm ⁻¹) | $\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms) | $\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms) | q | Φ |
|-------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|--------|
| L₁₁ | 242 284 | 22250 17360 | - | - | - | - |
| EuL₁₁ | 245 285 314 | 26490 18030 11460 | 1,55 | 2,49 | 0,2 | 7 % |
| TbL₁₁ | 245 285 314 | 25140 16970 11460 | 0,91 | 1,71 | - | - |

Tableau 4.5 : Récapitulatif des données spectroscopiques du ligand **L₁₁** et de ses complexes d'euporium et de terbium.

II. Synthèse de complexes hétérodinucléaires

Nous nous sommes également intéressés dans le cadre de cette thèse à la synthèse d'un ligand ditopique basé sur l'association de deux plateformes de type pyridine-bispyrazole reliées à travers une triple liaison. Les plateformes sont substituées l'une par des groupements aminophosphonates et l'autre par des groupements aminocarboxylates. D'après les expériences préliminaires sur la stabilité des différents sites de coordination, cette différenciation devrait permettre de contrôler les réactions de complexation et d'introduire sélectivement des ions lanthanides dans un site puis dans l'autre.

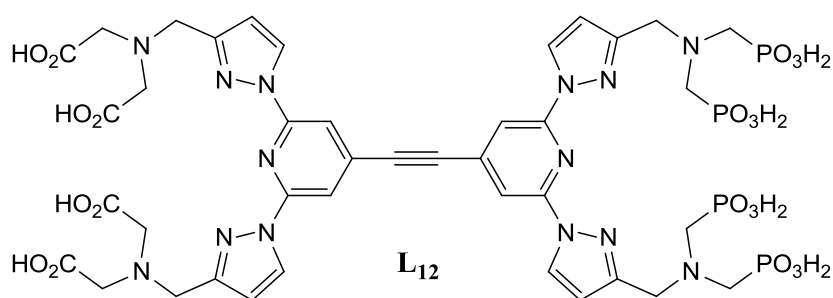


Schéma 4.26 : Formule développée du ligand ditopique **L₁₂**.

1. Synthèse du ligand

Le ligand ditopique **L₁₂** a été obtenu par un couplage de Sonogashira pour lequel l'alcyne vrai a été préparé à partir de la poche tétraphosfonate **12**. Une réaction de couplage entre cet intermédiaire et le triméthylsilyl acétylène a été réalisée sous l'action catalytique du palladium (0) et en présence de triéthylamine. L'alcyne silylé **54** a été isolé après purification au bout de 14 heures de réaction, puis une réaction de déprotection par l'action de fluorure de tétrabutylamonium conduit à l'alcyne vrai **55**.

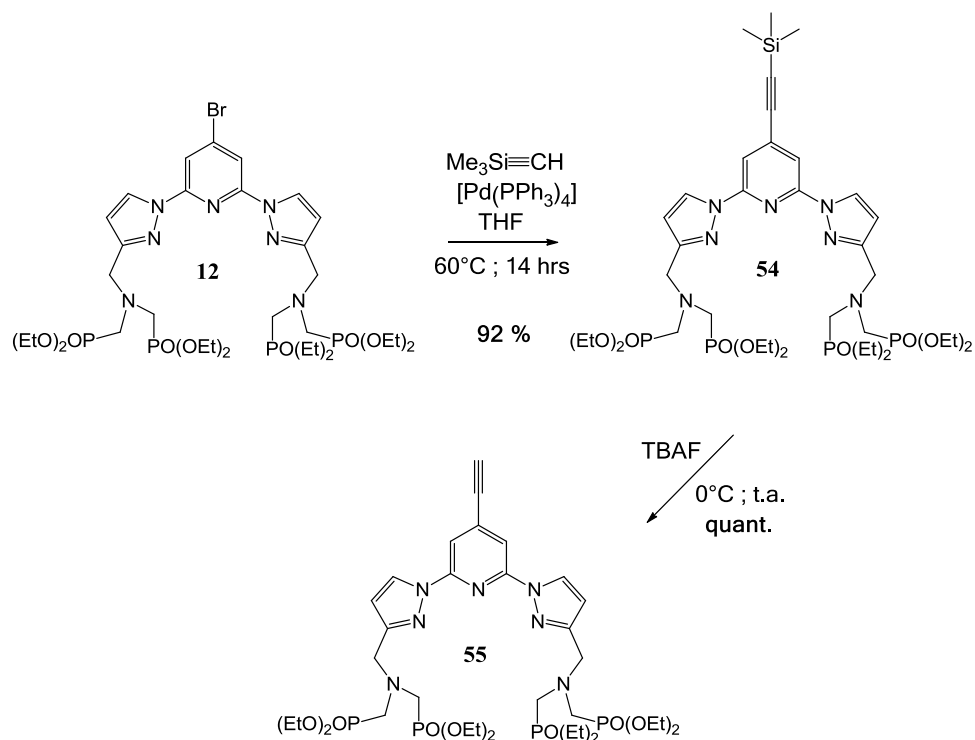


Schéma 4.27 : Synthèse de l'alcyne vrai **55**.

Le précurseur carboxylé a été préparé selon le mode opératoire décrit dans la littérature à partir de la plateforme tribromée **10a** et d'une amine secondaire bis carboxylée **56**. La réaction de substitution de la plateforme tribromée a été réalisée en présence de carbonate de potassium dans l'acétonitrile.^[24]

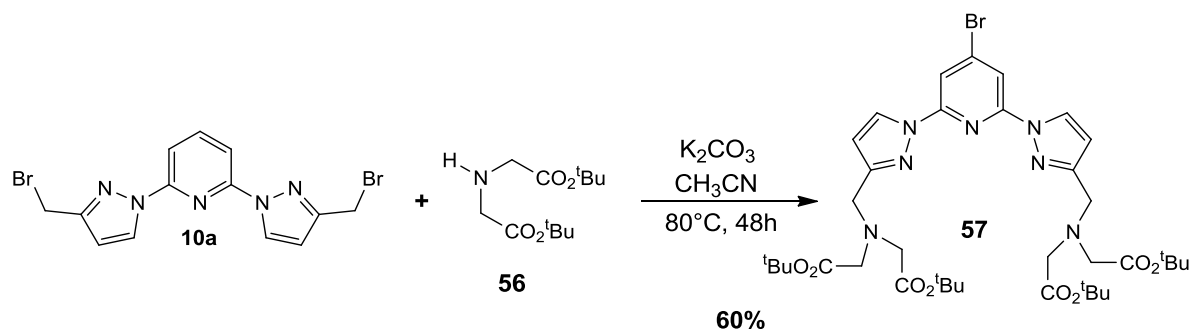


Schéma 4.28 : Synthèse du précurseur carboxylé **57**.

La réaction de condensation entre le précurseur carboxylé **57** et le précurseur phosphonaté **55** a été réalisée à travers un couplage de Sonogashira catalysé par le palladium en présence de cuivre.

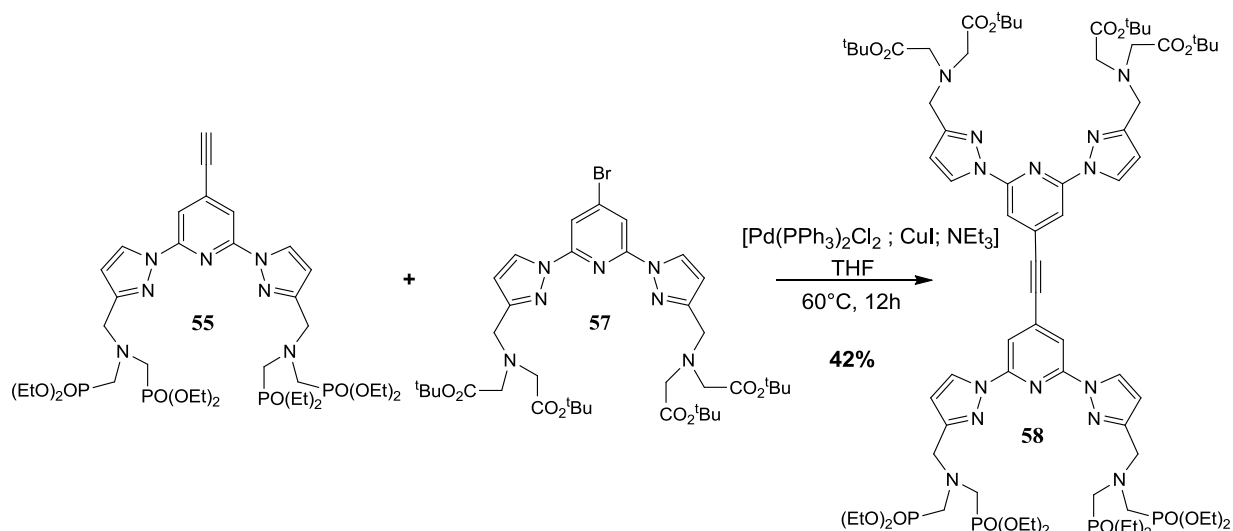
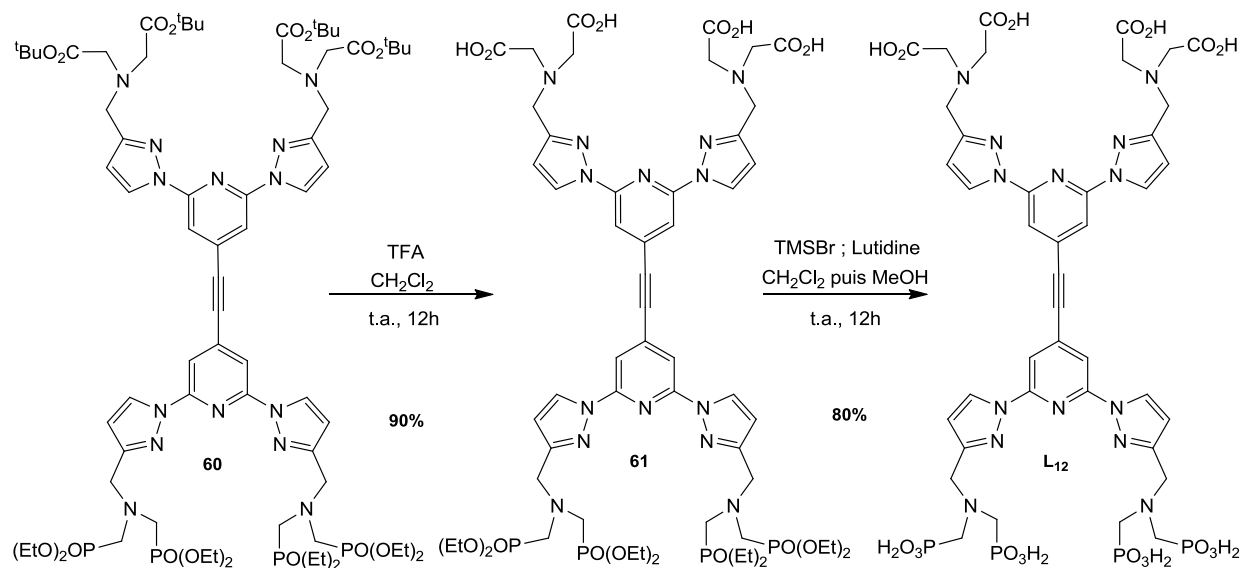


Schéma 4.29 : Réaction de condensation entre les deux précurseurs.

Le ligand ditopique **L₁₂** a ensuite pu être obtenu en deux étapes de déprotection des esters. La première consiste en l'hydrolyse des esters éthyliques des carboxylates dans le dichlorométhane en présence d'acide trifluoroacétique. Le composé correspondant a été isolé avec un rendement quasi-quantitatif après une nuit à température ambiante. Ensuite les esters phosphoniques ont été hydrolysés par l'action du bromure de triméthylsilane en présence d'un excès de lutidine, ce qui a permis d'obtenir le ligand **L₁₂**.

Schéma 4.30 : Synthèse du ligand **L₁₂**.

Le ligand **L₁₂** a pu être caractérisé par spectroscopie RMN du proton.

- Caractérisation du ligand par RMN du proton :

Le spectre RMN du proton du ligand **L**₁₃ est constitué de 10 signaux (Figure 4.22). Parmi ceux-ci, il est possible d'attribuer le singulet à 2,34 ppm, le doublet à 7,50 et le triplet à 7,85 aux protons de la lutidine n'ayant pas pu être éliminée du produit final.

Les protons des deux plateformes conjugués sont très peu différenciés et apparaissent sous la forme de 4 pics qui intègrent pour 12 protons dans la région des champs faibles. Les déplacements chimiques des protons des deux pyridines devraient conduire à deux singulets distincts de 2 protons chacun. Cependant leurs déplacements chimiques sont très proches et on leur attribue le singulet à 7,85 ppm qui intègre pour 4 protons.

En ce qui concerne les groupements pyrazoliques, les protons en position 5 sont peu différenciés et conduisent à un multiplet de 4 protons à 8,62 ppm, tandis que ceux en position 4 donnent deux pics qui intègrent chacun pour deux protons.

Enfin, les protons des groupes $-CH_2$ en alpha des atomes de phosphore à 2,75 ppm se distinguent des $-CH_2$ en alpha des carbones des acides carboxyliques à 3,21 ppm par leur dédoublement particulier ($^2J_{P-H} = 11,3$ Hz).

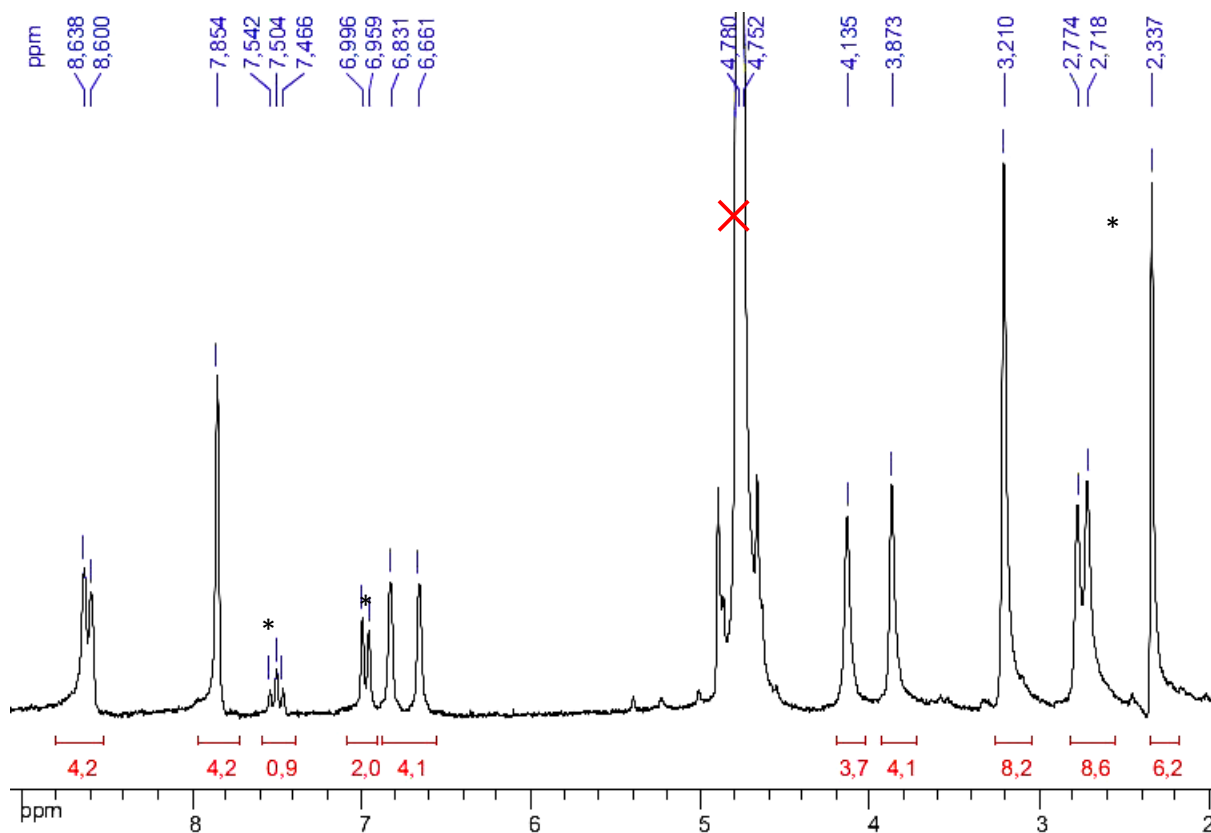


Figure 4.22 : Spectre RMN 1H du ligand **L**₁₂ (D_2O , 300 MHz, t.a.) * = lutidine.

2. Etude des propriétés photophysiques

2.1 Ligand libre

Le ligand ditopique a été étudié en solution dans un tampon TRIS/HCl ($c = 0,01\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$) et son spectre d'absorption a été mesuré (Figure 4.23). Il fait apparaître plusieurs bandes d'absorption distinctes. Les plus intenses sont celles à 252 nm et 284 nm et elles peuvent être attribuées respectivement à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Par rapport au spectre du ligand L_1 , on note donc la présence d'une bande d'absorption supplémentaire. L'état excité S_1 du ligand libre quant à lui est caractérisé par une bande d'absorption dont le maximum est à 330 nm, soit un décalage vers le rouge de seulement quelques nanomètres par rapport au ligand L_1 .

Par ailleurs les coefficients d'absorption molaire du ligand ditopique sont beaucoup plus élevés que ceux des ligands de la poche pyridine-bispyrazole substitués par un alcyne. Cette constatation peut s'expliquer par le fait que le nombre de chromophores est deux fois plus important au sein du ligand L_{12} que dans les autres ligands. D'autre part, grâce à la jonction du cycle avec un alcyne, on peut envisager un système électronique davantage délocalisé que si l'on considère les antennes isolées. Le spectre de fluorescence du ligand montre une large bande dont le maximum est situé à 400 nm.

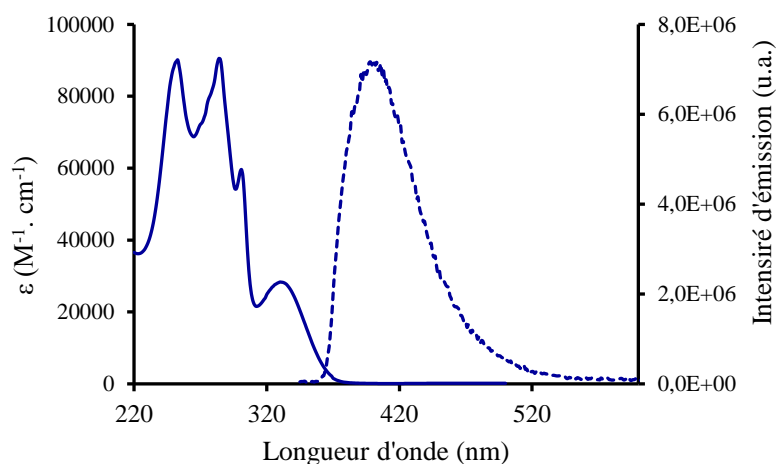


Figure 4.23 : Spectre d'absorption du ligand L_{12} (—) et d'émission (....) ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm) en solution dans un tampon TRIS/HCl ($c = 0,01$ M ; $\text{pH} = 7,4$).

Le temps de vie de fluorescence de l'état excité du ligand a été mesuré et sa valeur égale à 4,0 ns correspond à celles attendues pour les états singulets des chromophores organiques.

2.2 Titration du ligand L₁₂ en spectrométrie d'absorption

Afin de mieux comprendre le mode de complexation des ions lanthanides par le ligand ditopique et les propriétés de luminescence des complexes obtenus, nous avons réalisé dans un premier temps le titrage du ligand L₁₂ par trois solutions de sels d'euprimum (EuCl₃), de terbium (TbCl₃) et de néodyme (Nd(NO₃)₃). Ce dernier est un ion dont la luminescence est située entre 800 et 1400 nm. Il a été utilisé afin de vérifier l'aptitude du ligand ditopique à la photosensibilisation des ions lanthanides émettant dans le proche infrarouge.

À une solution du ligand dans le tampon TRIS, des quantités croissantes de solutions des sels métalliques ont été ajoutées et les spectres d'émission des différents mélanges mesurés. Pour les trois ions, les variations enregistrées pour les spectres d'absorption étaient quasiment identiques.

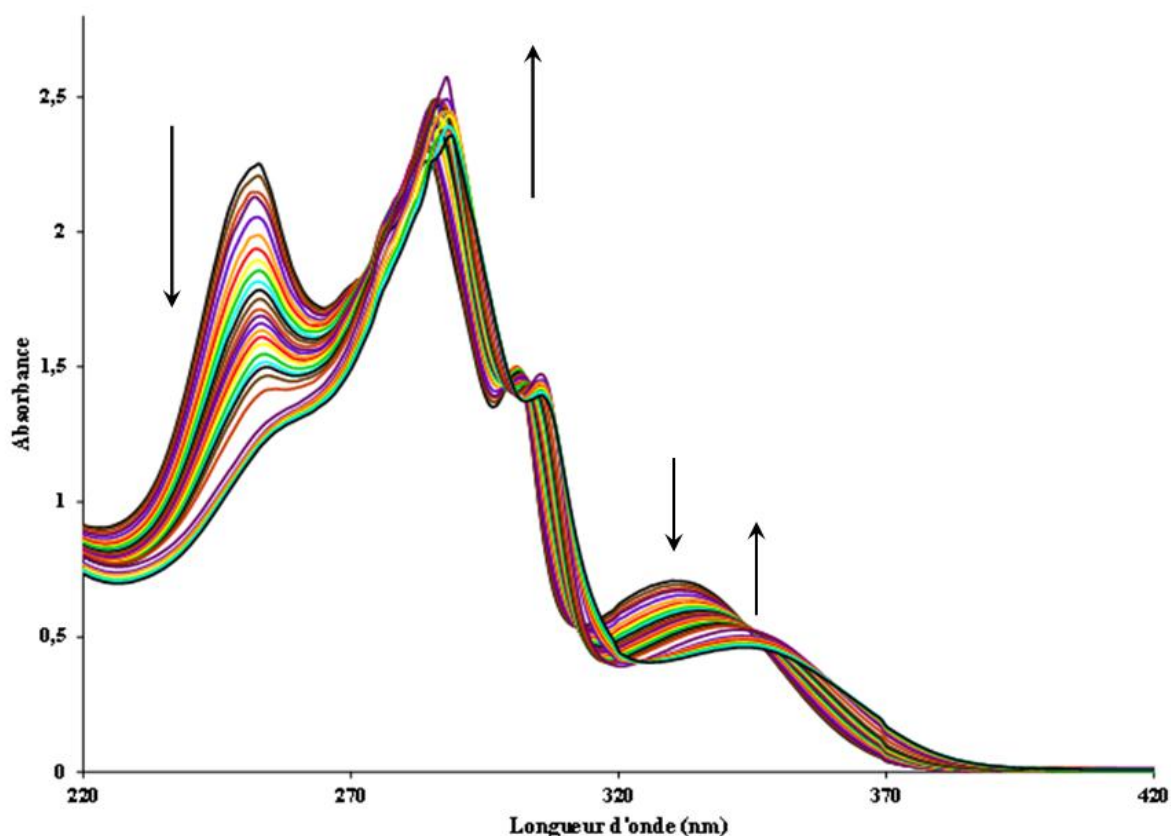


Figure 4.24 : Evolution du spectre d'absorption UV-Visible du ligand L₁₂ ($c = 2,49 \times 10^{-5} \text{ M}$) avec l'addition d'une solution d'EuCl₃.6H₂O ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$) à pH = 7,4. L'intensité d'absorption n'est pas corrigée pour la dilution.

Lors de la complexation du métal, les maxima d'absorption des bandes à 252 et 284 nm sont très peu déplacés. Tandis que l'intensité de la première diminue considérablement, la seconde croît de façon monotone jusqu'à deux équivalents de métal rajoutés. Au-delà de cette

proportion, on observe uniquement une variation monotone de l'intensité d'absorption et le maximum de la bande ne varie plus avec l'ajout de métal. Ce maximum est déplacé de 284 nm pour le ligand libre à 286 nm pour les complexes M_2L , un déplacement relativement faible qui suggère que la conformation du ligand sous sa forme libre est très proche de celle qu'il adopte lors de la complexation des lanthanides. Une telle caractéristique pourrait s'expliquer par l'encombrement stérique entre les phosphonates et les carbonates. En effet, pour la plupart des ligands synthétisés précédemment, les noyaux aromatiques adoptent une configuration *trans*, du fait de la répulsion entre les doublets non liants des azotes. Au sein du ligand ditopique, la répulsion entre les phosphonates et les carbonates l'emporterait sur celle des doublets non-liants.

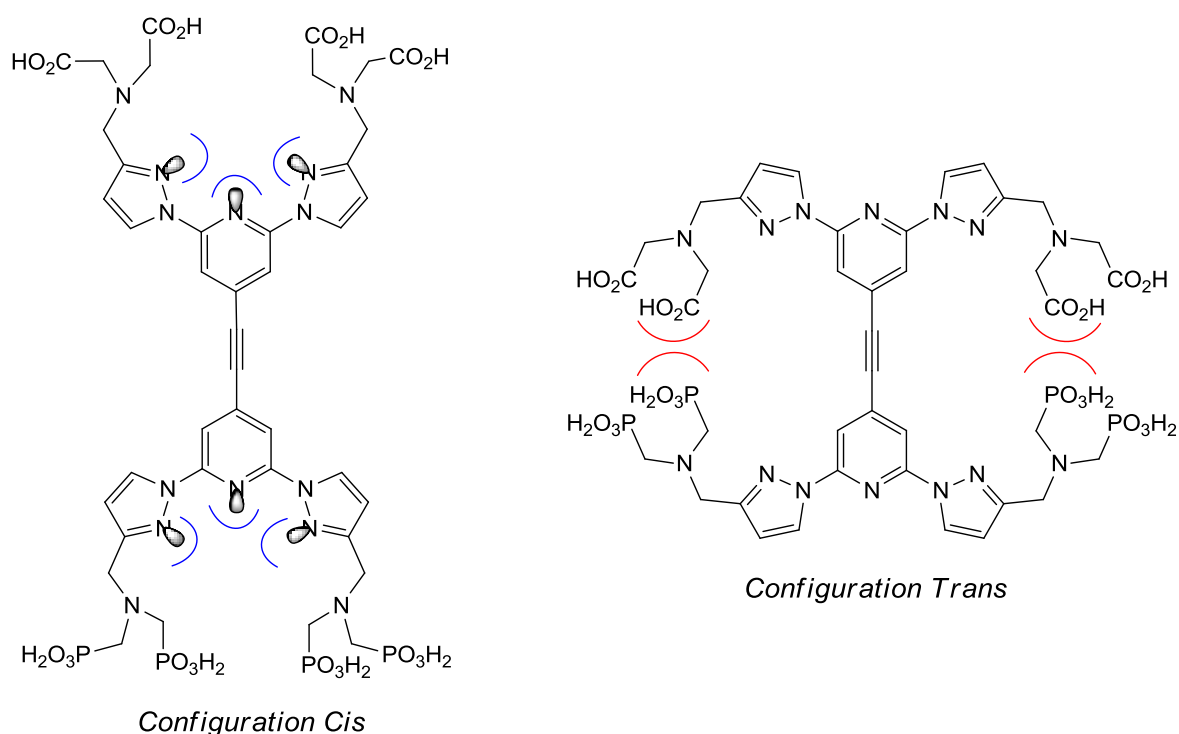


Schéma 4.31 : Configurations cis et trans du ligand L_{12} .

À partir des données de ce titrage en absorption un traitement avec le logiciel SPECFIT a permis de faire apparaître un modèle de formation de trois espèces métalliques lors du titrage. La première espèce correspond à la formation d'un complexe ML qui est exclusivement formé pour un équivalent de métal, tandis que la proportion de ligand libre devient nulle. Cette espèce pourrait correspondre à l'insertion du métal dans le site de coordination phosphonaté. Au-delà de cette proportion et avec l'addition supplémentaire de métal, l'espèce M_2L apparaît. Dans les conditions de l'expérience, une espèce M_3L qui pourrait correspondre à la coordination de deux cations pour le site phosphonaté et d'un

cation pour le site carboxylé se forme et devient majoritaire à partir de 2,5 équivalents de lanthanide.

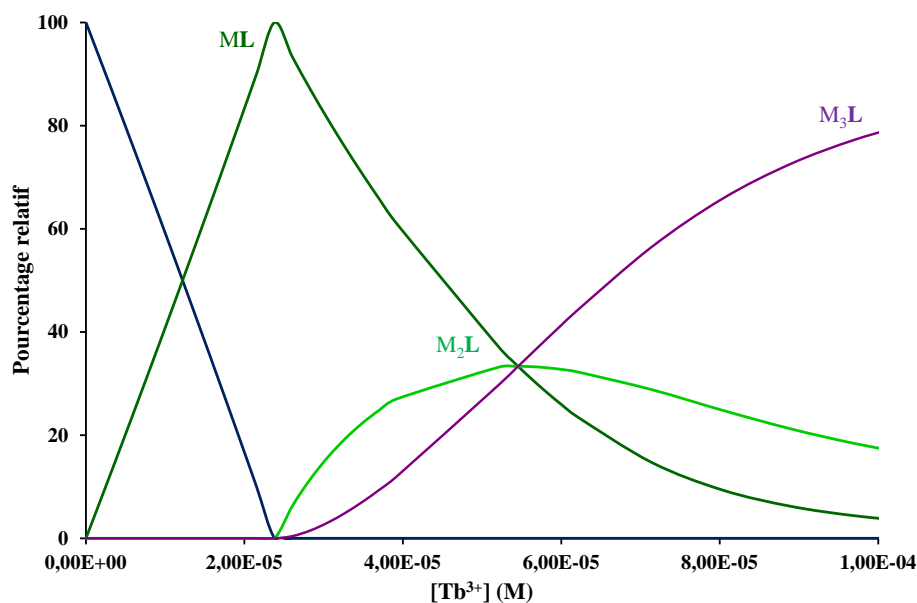


Figure 4.25 : Diagramme de répartition des espèces calculées avec le logiciel SPECFIT pour les spectres d'absorption mesurés lors du titrage du ligand L_{12} ($c = 2,49 \times 10^{-5}$ M) en solution dans un tampon TRIS/HCl ($c = 0,01$ M ; $\text{pH} = 7,4$ par une solution de TbCl_3 ($c = 4,98 \times 10^{-4}$ M).

Toujours à l'aide du logiciel SPECFIT, les spectres d'absorption de chacune des espèces métalliques en solution ont été calculés.

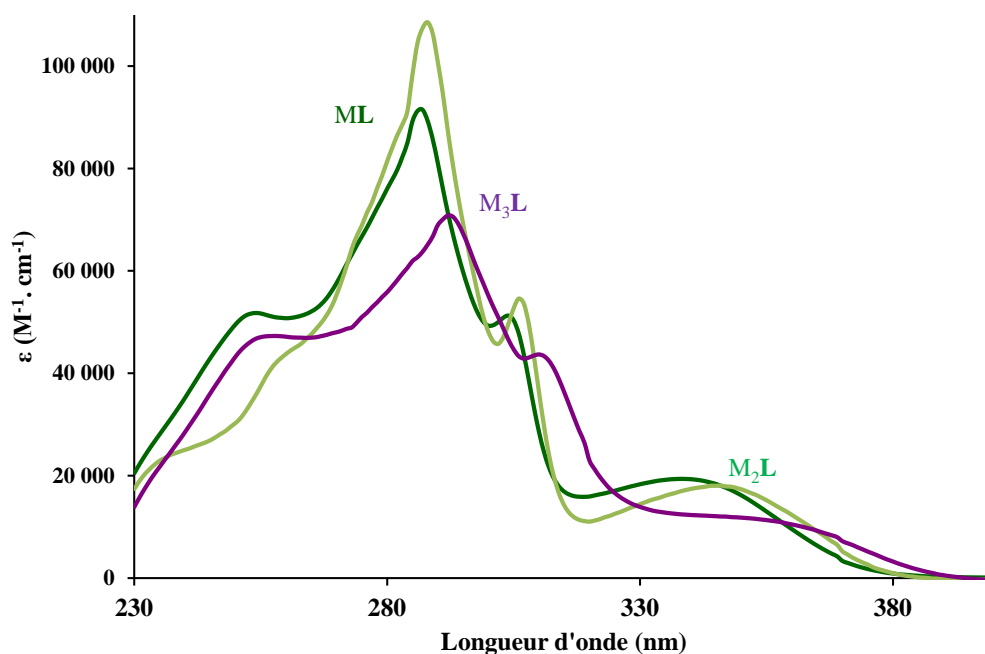


Figure 4.26 : Spectres d'absorption calculés des complexes formés lors du titrage du ligand L_{12} ($c = 2,49 \times 10^{-5}$ M) en solution dans un tampon TRIS/HCl ($c = 0,01$ M ; $\text{pH} = 7,4$) par une solution de TbCl_3 ($c = 4,98 \times 10^{-4}$ M).

2.3 Titration du ligand L₁₂ en spectrométrie d'émission

Pour chacun des ions europium, néodyme et terbium, les spectres d'émission de solutions du ligand ditopique auquel des proportions variables de sels métalliques ont été rajoutées ont été mesurés.

2.3.1 Evolution du spectre d'émission avec l'addition d'europium

En absence de cation, le spectre d'émission mesuré pour une solution du ligand L₁₃ excité à 330 nm présente une seule bande dont le maximum est à 400 nm. Lorsqu'une solution d'europium est ajoutée, on observe la diminution de l'intensité de cette bande, tandis qu'apparaissent les raies caractéristiques des transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ de l'europium. L'intensité de la bande à 400 nm diminue de façon constante et atteint une valeur négligeable pour l'ajout de 2 équivalents d'europium par ligand. *A contrario*, l'intensité d'émission de l'europium croît et atteint sa valeur maximale pour 2 équivalents d'europium ajoutés. Par la suite, l'intensité d'émission décroît indépendamment de l'effet de dilution.

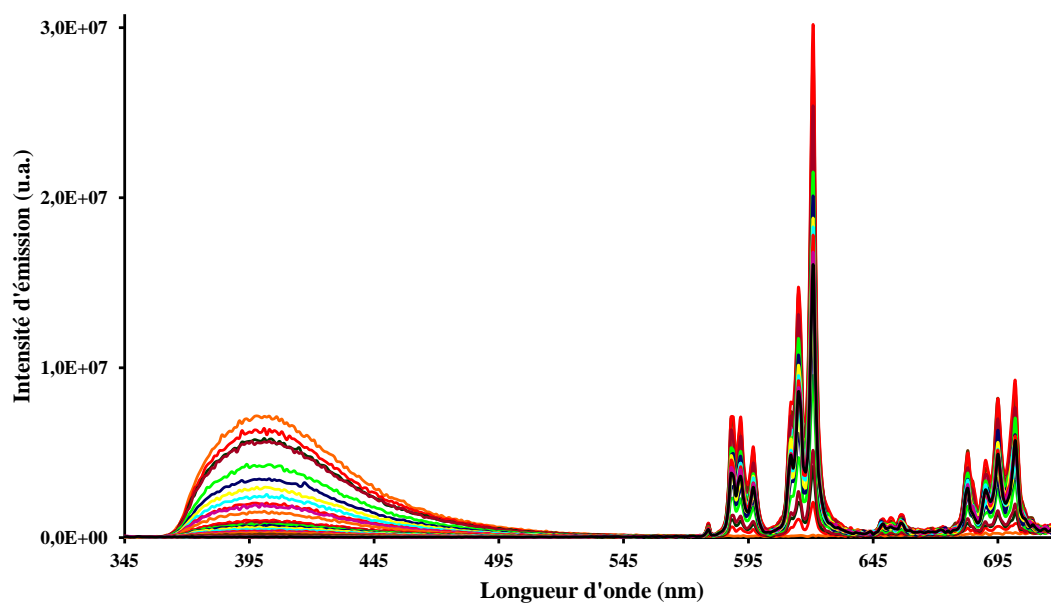


Figure 4.27 : Evolution du spectre d'émission d'une solution du ligand L₁₂ ($c = 2,49 \times 10^{-5} \text{ M}$) lors de l'addition d'une solution d' $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$) à $\text{pH} = 7,4$ après excitation à 330 nm.

Une telle variation des spectres d'émission est en accord avec la formation d'un complexe ML puis d'un complexe M₂L où les deux ions sont sensibilisés par les antennes.

Les temps de vie de luminescence du complexe d'europium ont également été mesurés pour des proportions d'ion métallique déterminantes. Les valeurs obtenues selon un modèle monoexponentiel sont reportées au sein du tableau suivant :

| Nombre d'équivalent | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Temps de vie (ms) | 1,21 ± 0,08 | 1,12 ± 0,01 | 1,18 ± 0,01 | 1,16 ± 0,01 | 1,15 ± 0,01 | 1,13 ± 0,01 |

Tableau 4.6 : Temps de vie de luminescence des complexes EuL_{12} mesurés à 621 nm après excitation à 330 nm au cours du titrage.

2.3.2 Evolution du spectre d'émission avec l'addition de terbium

L'évolution des spectres d'émission des mélanges du ligand ditopique avec des quantités croissantes de terbium est représentée sur la figure 4.28. On observe également au début du titrage une diminution de la bande d'émission du ligand au profit de l'apparition des bandes correspondant aux transitions $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ de l'ion Tb^{3+} . L'intensité des bandes d'émission atteint sa valeur maximale pour 1 équivalent de terbium. Avec l'ajout supplémentaire de terbium, il y a une forte diminution de l'intensité d'émission mesurée au maximum (544) jusqu'à 2 équivalents, puis une diminution beaucoup plus faible jusqu'à la fin du titrage. Les trois tendances dans la variation d'intensité d'émission à 544 nm pourraient correspondre aux formations successives des complexes ML , M_2L et M_3L .

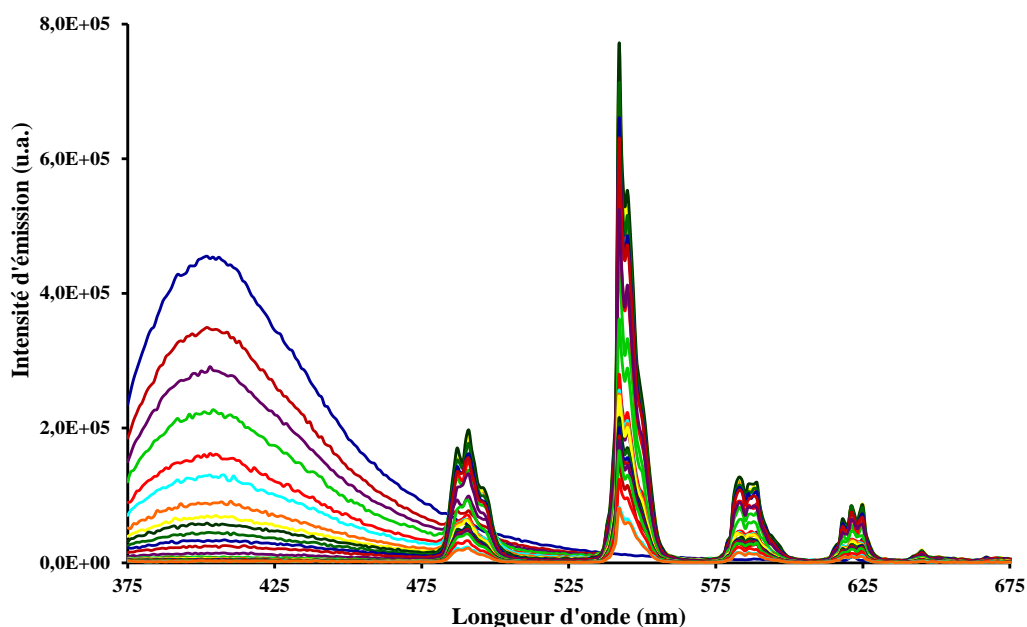


Figure 4.28 : Evolution du spectre d'émission d'une solution du ligand L_{12} ($c = 2,49 \times 10^{-5} \text{ M}$) lors de l'addition d'une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 4,98 \times 10^{-4} \text{ M}$) à $\text{pH} = 7,4$ après excitation à 330 nm.

Compte tenu de l'affinité préférentielle des lanthanides à l'égard des phosphonates par rapport aux carboxylates, on peut s'imaginer que le complexe **ML** correspond à l'insertion du terbium dans le site de coordination phosphonaté. Par ailleurs, une explication à la diminution de l'intensité d'émission avec la complexation du second site serait la possibilité d'un transfert d'énergie intramoléculaire d'un ion terbium vers le second. Une autre possibilité serait que la complexation du second site de coordination modifie l'état triplet de telle sorte qu'un transfert d'énergie en retour du terbium vers le ligand soit favorisé.

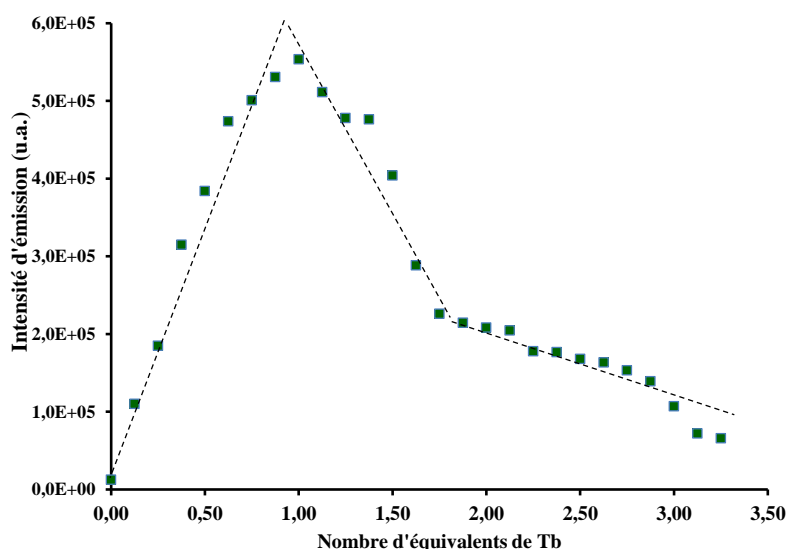


Figure 4.29 : Intensité d'émission mesurée à 544 nm pour une solution du ligand **L₁₂** ($c = 2,49 \times 10^{-5}$ M) lors de l'addition d'une solution de $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 4,98 \times 10^{-4}$ M) à pH = 7,4 en fonction du nombre d'équivalent de métal ajouté ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm).

Les temps de vie de quelques mélanges ont été mesurés parallèlement et les valeurs obtenues sont regroupées au sein du Tableau 4.7.

| | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,25 | 1,5 |
|---------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| τ_1 (ms) | $0,41 \pm 0,01$ (100%) | $0,37 \pm 0,01$ (84%) | $0,36 \pm 0,01$ (82%) | $0,34 \pm 0,01$ (81%) | $0,30 \pm 0,01$ (68 %) | $0,29 \pm 0,01$ (60%) |
| τ_2 (ms) | - | $1,03 \pm 0,01$ (16%) | $1,02 \pm 0,01$ (18%) | $1,01 \pm 0,01$ (19%) | $1,14 \pm 0,01$ (32 %) | $0,96 \pm 0,01$ (40%) |

Tableau 4.7 : Temps de vie de luminescence des complexes TbL_{12} ($\lambda_{\text{ex}} = 544$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm) en fonction du nombre d'équivalent.

La composition biexponentielle des temps de vie de luminescence des mélanges confirme la formation de plusieurs espèces métalliques distinctes pendant le titrage. Cependant, les proportions calculées ne correspondent pas aux valeurs obtenues précédemment grâce aux données du titrage en spectroscopie d'absorption UV-Vis. Cette différence pourrait provenir de la formation d'espèces polymétalliques plus complexes mises en évidence par la suite par spectrométrie de masse.

2.3.3 Evolution du spectre d'émission avec l'addition de néodyme

La solution de néodyme utilisée pour cette expérience a été préparée à partir d'un sel de $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3$. Les raies d'émission caractéristiques observées pour cet ion correspondent à des transitions $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_J$ ($J = 9/2$ et $11/2$). Elles sont respectivement à 890 et 1064 nm. Un détecteur infrarouge a été utilisé pour ces mesures.

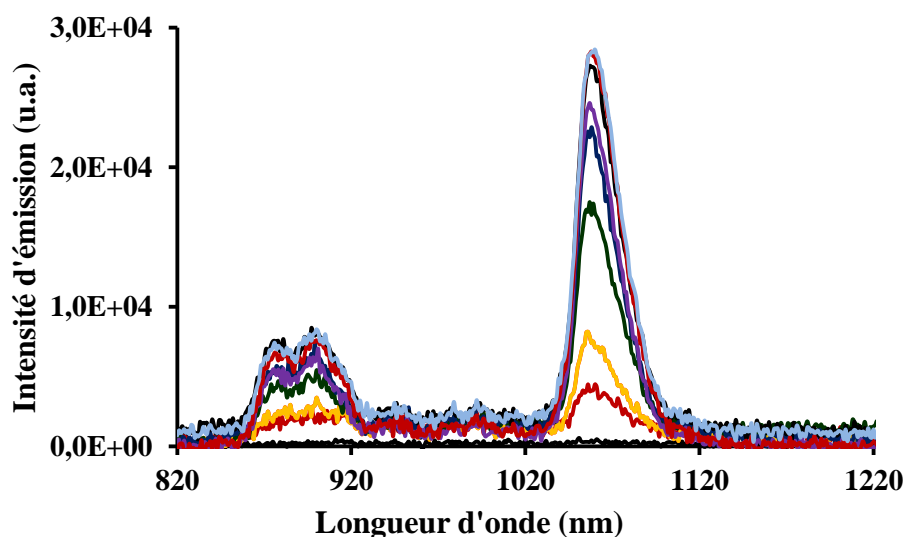


Figure 4.30 : Evolution du spectre d'émission d'une solution du ligand L_{12} ($c = 2,49 \times 10^{-5} \text{M}$) lors de l'addition d'une solution de $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 5,2 \times 10^{-4} \text{M}$) à $\text{pH} = 7,4$ ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{nm}$).

On observe une augmentation monotone de l'intensité d'émission avec l'addition de néodyme tout au long du titrage et ce jusqu'à deux équivalents où les seules variations sont liées à la dilution. Les temps de vie n'ont cependant pas pu être mesurés parce que nous ne disposons pas d'une source d'excitation appropriée pour la mesure de temps de vie courts dans le proche infrarouge.

3. Caractérisation du système par spectrométrie de masse

L'étude du ligand ditopique en spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurence Sabatier (DSA/IHPC). Elle a consisté dans un premier temps en la caractérisation du ligand libre, puis en un titrage avec une solution d'euporium, afin de mettre en évidence les différentes espèces métalliques suggérées par le traitement des spectres d'absorption.

3.1 Ligand libre

L'analyse du ligand ditopique libre en solution dans l'eau a été réalisée par la méthode d'ionisation par électrospray (ESI) en mode négatif. Le spectre de masse obtenu, représenté sur la figure 4.31, montre plusieurs pics dont le plus intense se situe à 583,1 m/z.

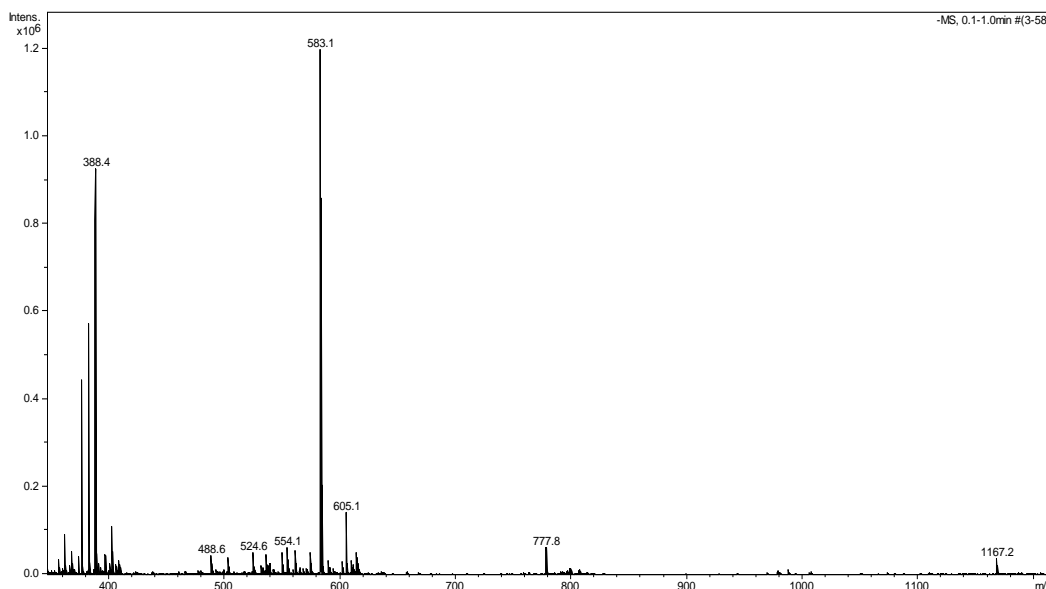


Figure 4.31 : Spectre de masse (ESI) du ligand L_{12} en solution dans l'eau ultrapure ($c = 2,8 \times 10^{-4}M$).

Cette espèce majoritaire correspond au ligand libre (dont la masse molaire à l'état complètement déprotoné est de 1156,8 g/mol) 10 fois protoné et dont la charge globale est -2 ($[LH_{10}]^{2-}$).

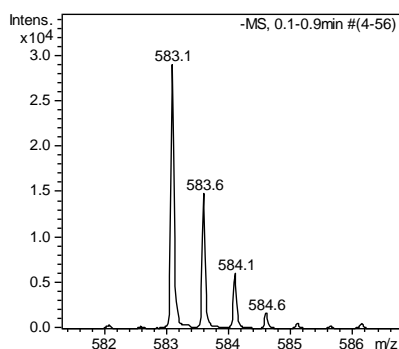


Figure 4.32 : Agrandissement du spectre de masse (ESI) du ligand L_{12} en solution dans l'eau ultrapure ($c = 2,8 \times 10^{-4} M$) autour du pic de l'ion L^{2-} .

Le pic à 388,4 de plus faible intensité pourrait quant à lui correspondre au ligand 9 fois protoné LH_9^{3-} .

On observe aussi sur le même spectre deux pics peu intenses à 777,8 et 1167,2. Ils correspondent à des adduits du ligand de charges différentes. La formation de cette espèce secondaire du ligand en solution proviendrait d'un arrangement supramoléculaire de deux ligands résultant de l'interaction entre les noyaux aromatiques. Les zooms de ces deux pics correspondent d'ailleurs parfaitement aux spectres de masse calculés.

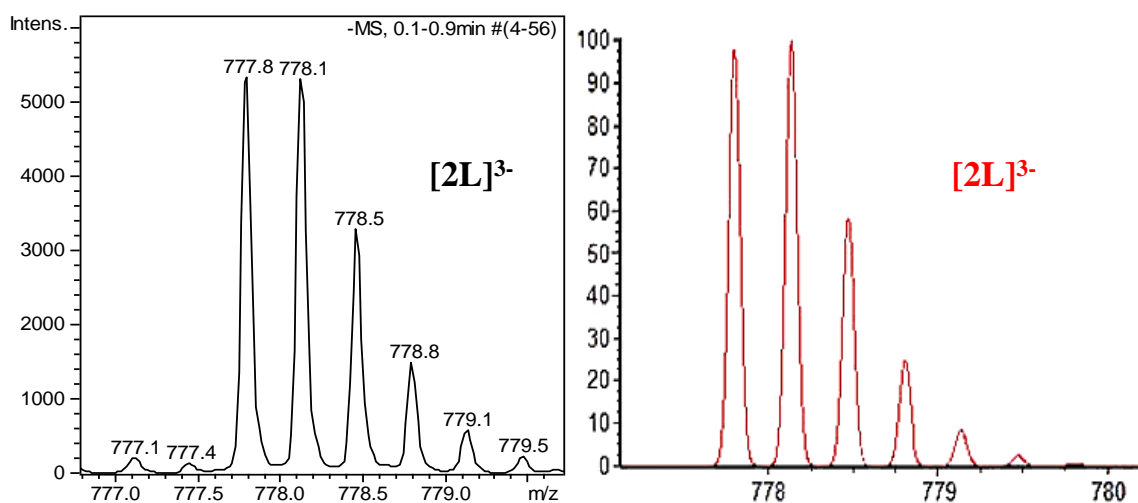


Figure 4.33 : Agrandissement du spectre de masse (ESI) pour les pics correspondants à l'espèce $[2L]^{3-}$ (à gauche en noir) et spectre calculé par simulation pour la même espèce (à droite en rouge).

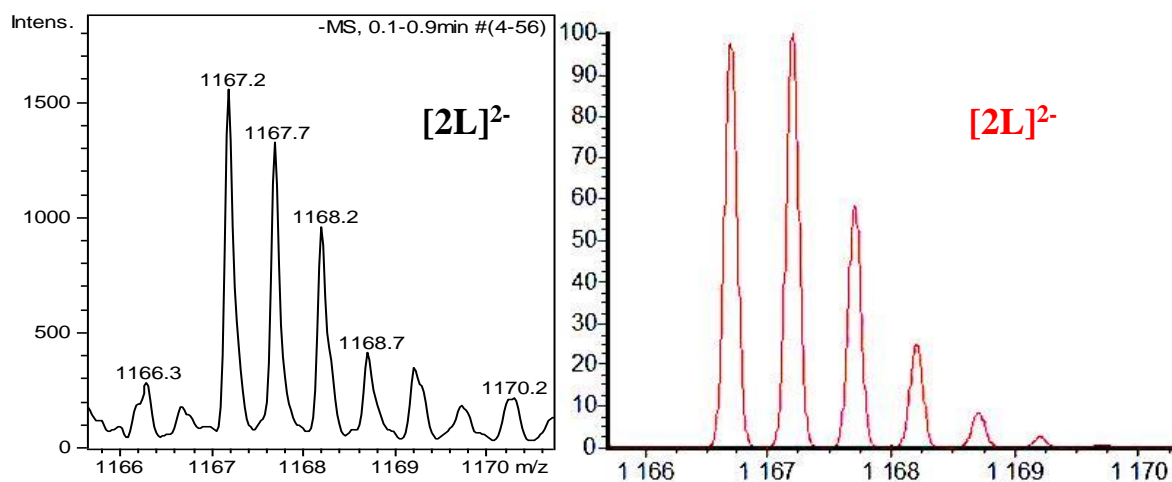


Figure 4.34 : Agrandissement du spectre de masse (ESI) pour les pics correspondants à l'espèce $[2L]^{2-}$ (à gauche en noir) et spectre calculé par simulation pour la même espèce (à droite en rouge).

3.2 Titration du ligand avec une solution d'euporium

Le pH de la solution a été fixé à 6,7 en mettant le ligand et le sel d'euporium EuCl_3 en solution dans un tampon acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, $c = 10 \text{ mM}$). 9 mélanges ont été préparés en faisant varier la proportion d'euporium ajouté de 0 à 2 équivalents et pour chacun des mélanges, les spectres de masses ont été mesurés en ESI.

Pour chacune des espèces identifiées, l'intensité du pic m/z a été relevée tout au long du titrage en fonction des ajouts d'euporium. Un diagramme de répartition a été établi à partir de l'évolution de ces intensités normalisées par rapport au maximum de chaque espèce (Figure 4.34).

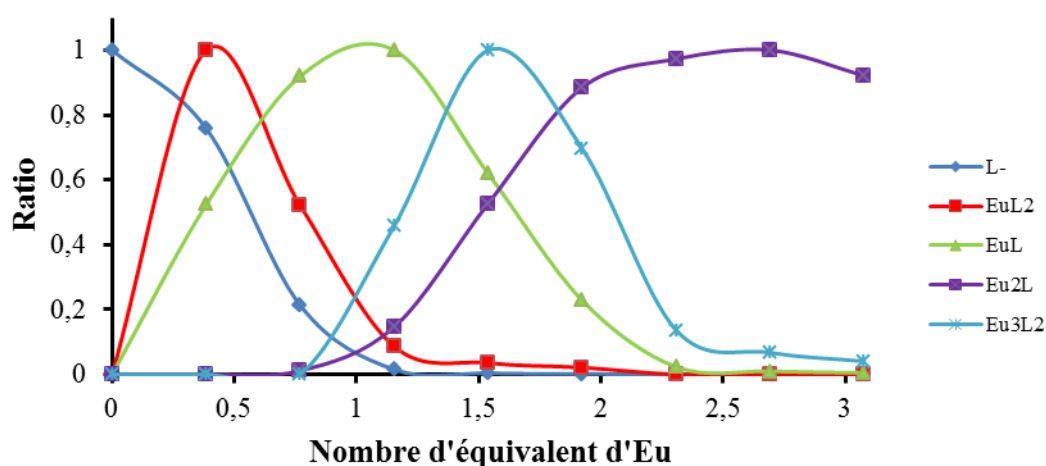


Figure 4.34 : Evolution des intensités normalisées des espèces identifiées au cours du dosage du ligand L_{12} ($c = 1,11 \times 10^{-3} \text{ M}$) par EuCl_3 ($c = 9,96 \times 10^{-4} \text{ M}$) en solution dans un tampon acétate d'ammonium ($c = 10 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6,7$).

Au fur et à mesure du titrage, plusieurs espèces métalliques apparaissent, notamment les espèces ML et M_2L qui avaient déjà été observées lors du titrage en spectrométrie d'absorption, mais aussi des espèces plus complexes telles que L_2 , ML_2 et M_3L_2 . Ces deux dernières espèces pourraient correspondre à des complexes formés à partir du dimère précédemment mis en évidence par spectrométrie de masse.

Pour l'ensemble des complexes identifiés, le nombre d'équivalent d'euporium pour lequel l'intensité du pic est maximale est en concordance avec le rapport métal/ligand correspondant.

4. Caractérisation du système par spectroscopie RMN

Afin de déterminer le site de coordination sollicité pour la formation d'un complexe ML , nous avons réalisé un titrage d'une solution du ligand avec un sel paramagnétique de lanthane ($LaCl_3$). Pour chacun des ajouts, les spectres RMN du proton 1H et du phosphore ^{31}P ont été mesurés immédiatement après l'ajout, puis après quelques heures afin de vérifier que le système avait atteint à chaque fois l'équilibre.

4.1. Spectres RMN 1H du titrage du ligand L_{12}

Tout au long du titrage, on enregistre de nombreuses modifications dans l'allure du spectre du ligand libre (Figure 4.22).

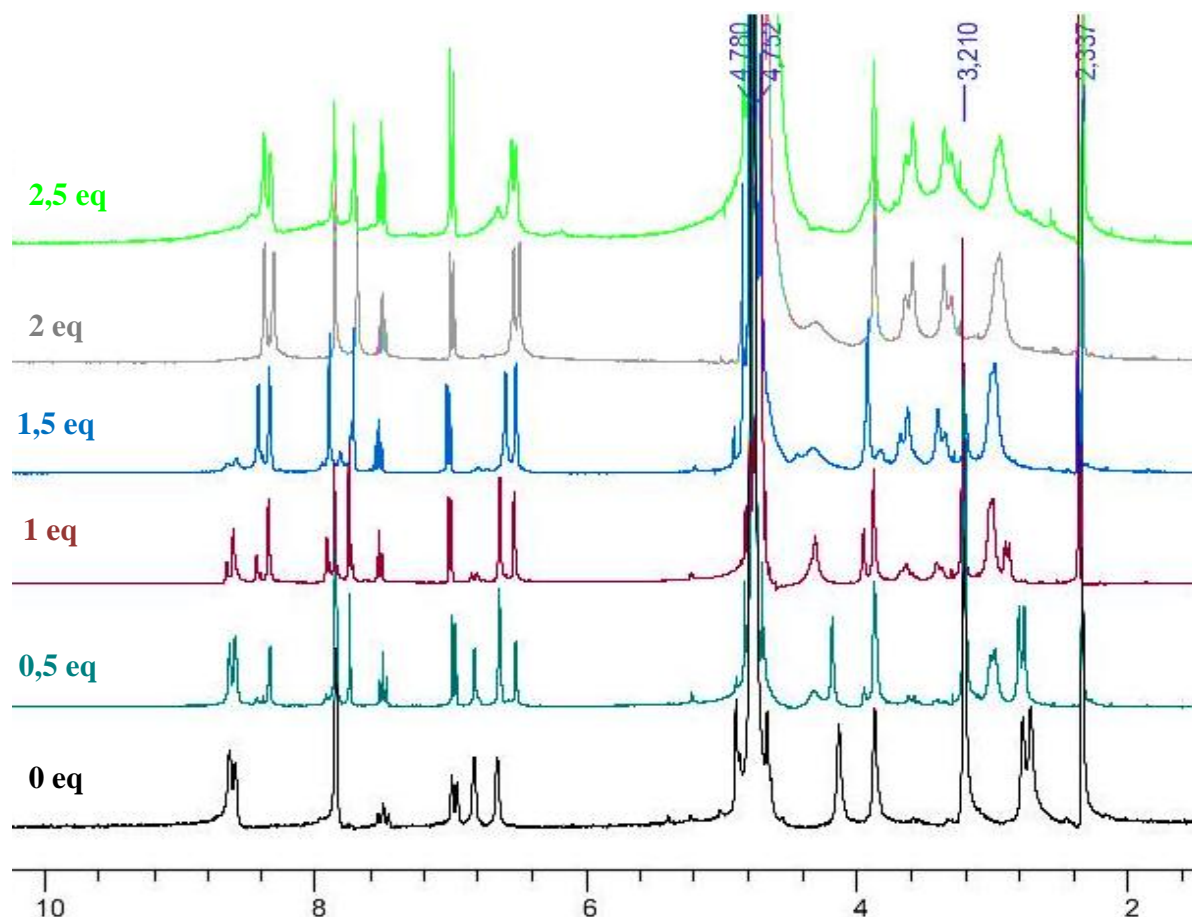


Figure 4.35 : Evolution des spectres RMN ^1H (D_2O , t.a., 300 MHz et 400 MHz) du ligand L_{12} ($c = 5 \times 10^{-6}$ M) lors de l'addition d'une solution de $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,14$ M) en solution dans D_2O .

Afin de faciliter l'interprétation, on analysera séparément les régions des protons aromatiques et des protons aliphatiques.

4.1.1. Analyse de la région des champs faibles

Le premier mélange a été obtenu par ajout de 0,5 équivalent de lanthane et pour cette solution, on remarque un éclatement des signaux des protons des pyrazoles et des pyridines. Pour un équivalent de lanthane ajouté, on distingue deux jeux de familles de protons attribuables à chacun des deux sites de coordination. Cette discrimination nouvelle et les variations des déplacements chimiques de certains protons indiquent que le lanthane s'insère dans un site de coordination et que le second est laissé vacant.

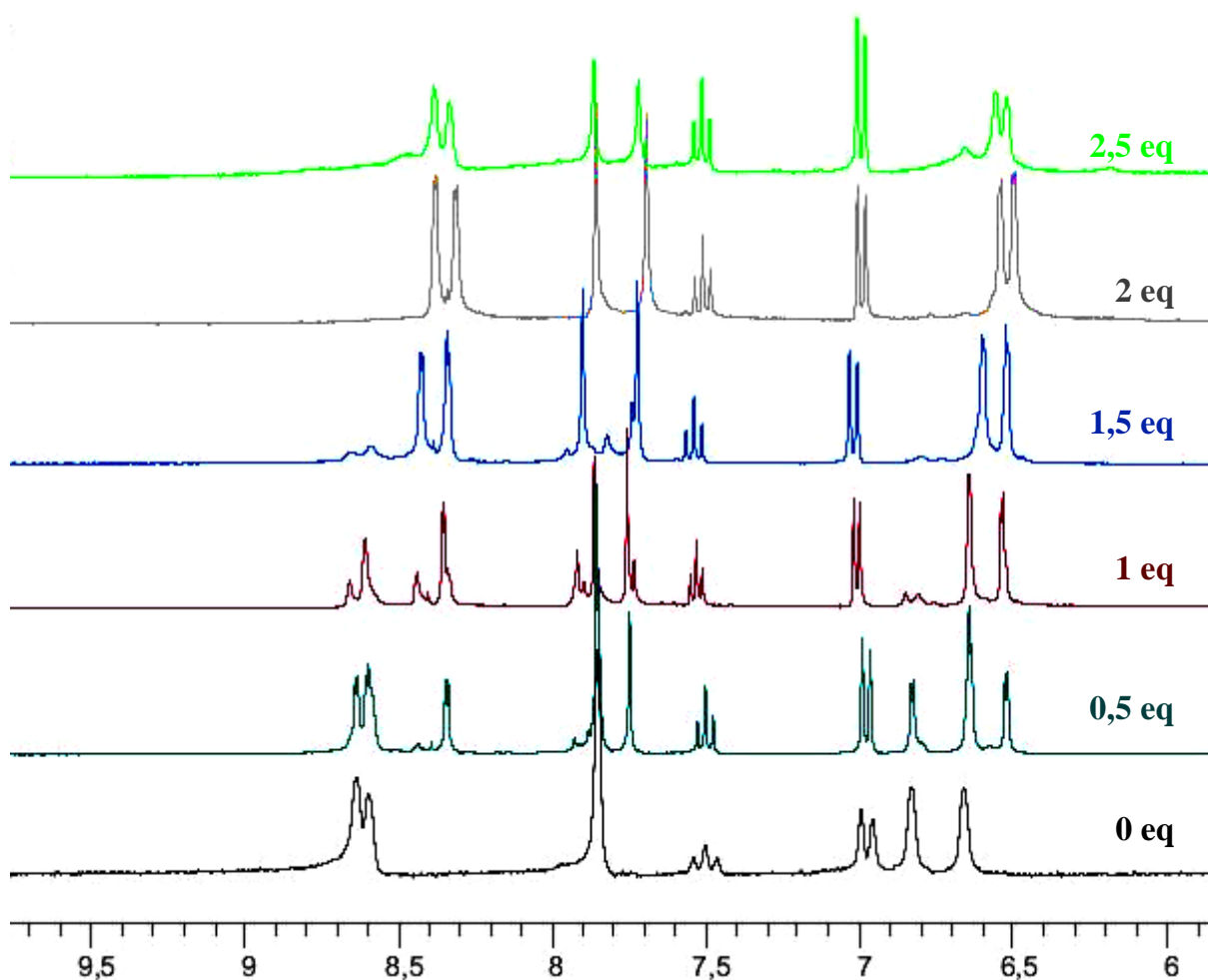


Figure 4.36 : Agrandissement de la région des protons aromatiques des spectres RMN ^1H (D_2O , t.a., 300 MHz et 400 MHz) du ligand L_{12} ($c = 5 \times 10^{-6}$ M) lors de l'addition d'une solution de $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,14$ M) en solution dans D_2O .

Avec l'ajout de lanthane supplémentaire jusqu'à deux équivalents, les déplacements chimiques des protons des deux différentes poches redeviennent proches, exceptés pour les protons des pyridines qui passent d'un singulet large de 4 protons au sein du ligand libre à deux singulets de 2 protons lorsque le lanthane est inséré dans les deux sites de coordination.

4.1.2. Analyse de la région des champs forts

L'analyse approfondie de la région des protons aliphatiques permet d'attribuer la première complexation au site portant des groupements phosphonates. En effet le singulet attribué aux 8 protons en alpha des carboxylates à 3,21 ppm est très peu influencé par l'ajout de lanthane jusqu'à 1 équivalent. Par contre le doublet des protons en alpha des phosphonates est déplacé de 2,75 ppm au sein du ligand libre à 3 ppm après l'ajout d'un équivalent de lanthane et il varie très peu avec l'addition de lanthane supplémentaire.

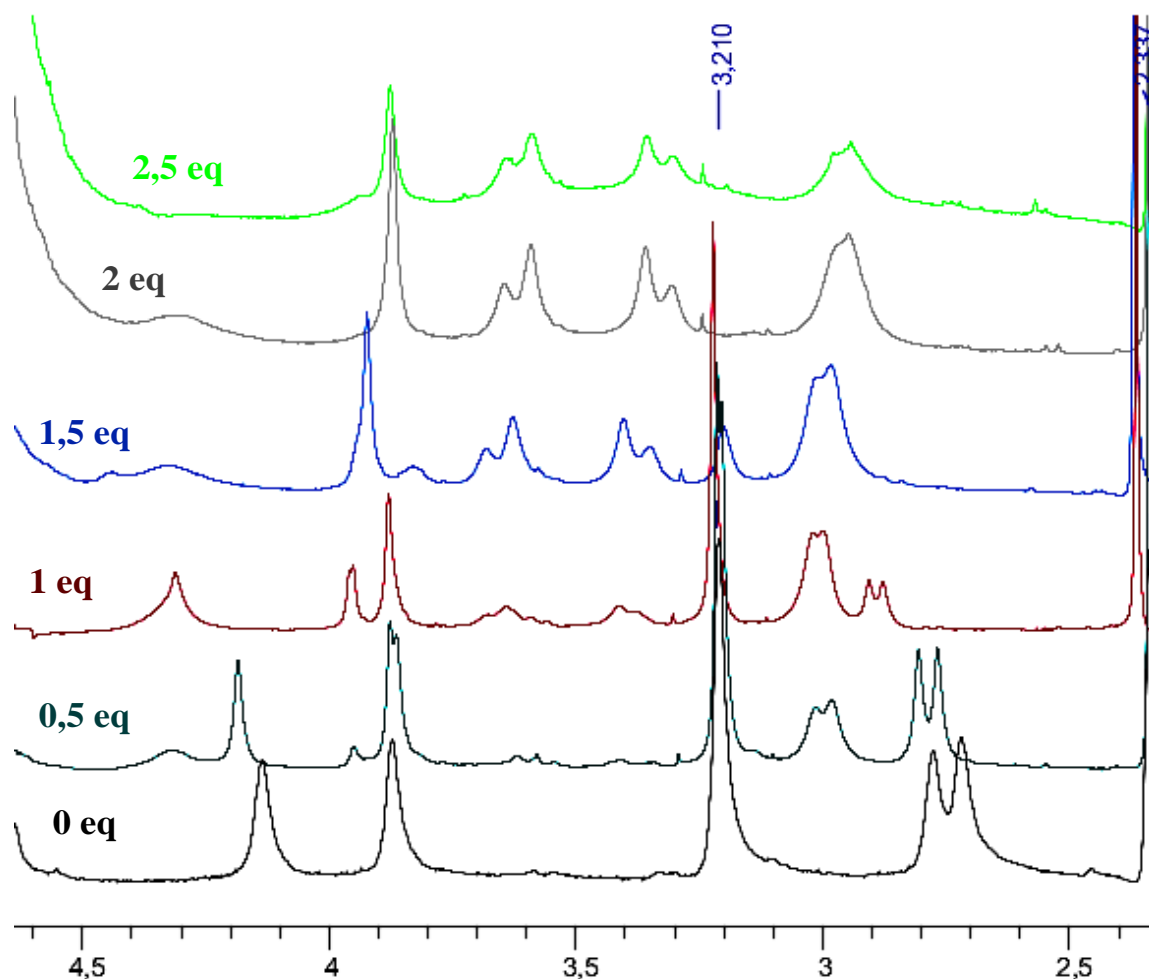


Figure 4.37 : Agrandissement de la région des protons aliphatiques des spectres RMN ^1H (D_2O , t.a., 300 MHz et 400 MHz) du ligand L_{12} ($c = 5 \times 10^{-6}$ M) lors de l'addition d'une solution de $\text{LaCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,14$ M) en solution dans D_2O .

Les protons en alpha des carboxylates eux ne sont influencés que pour des ajouts de lanthane supérieurs à 1 équivalent, ce qui correspond au début de la complexation de ce second site. On observe alors l'apparition de deux doublets caractéristiques des protons en position axiale ou équatoriale au sein des complexes de géométrie C_2 formé avec la poche carbonatée. ^[25]

4.2. Spectres RMN ^{31}P du titrage du ligand L_{12}

Le spectre du ligand libre présente un seul pic à 7,57 ppm. Avec l'addition du lanthane, on voit apparaître un deuxième pic dans la zone des champs fort à 17,72 ppm. Pour l'ajout d'un équivalent de lanthane, seul ce pic est représenté sur le spectre. Il correspond donc à la formation d'une seule espèce. Et puisqu'il est déplacé par rapport à la valeur de référence pour le ligand libre, on peut attribuer l'espèce correspondante au complexe ML où le cation est complexé uniquement par les phosphonates. Ce résultat vient confirmer les

suppositions des études préliminaires selon lesquelles l'affinité des lanthanides est plus importante à l'égard des phosphonates que des carbonates.

Pour l'addition de lanthane au-delà d'un équivalent, le spectre RMN du phosphore présente toujours un seul pic donc la valeur δ n'est pas modifiée par rapport au complexe ML. L'insertion du métal dans le site de complexation carbonaté a donc une influence négligeable sur les atomes de phosphores, ce qui confirme l'indépendance des deux sites de coordination et la force de l'interaction phosphonates – lanthanides.

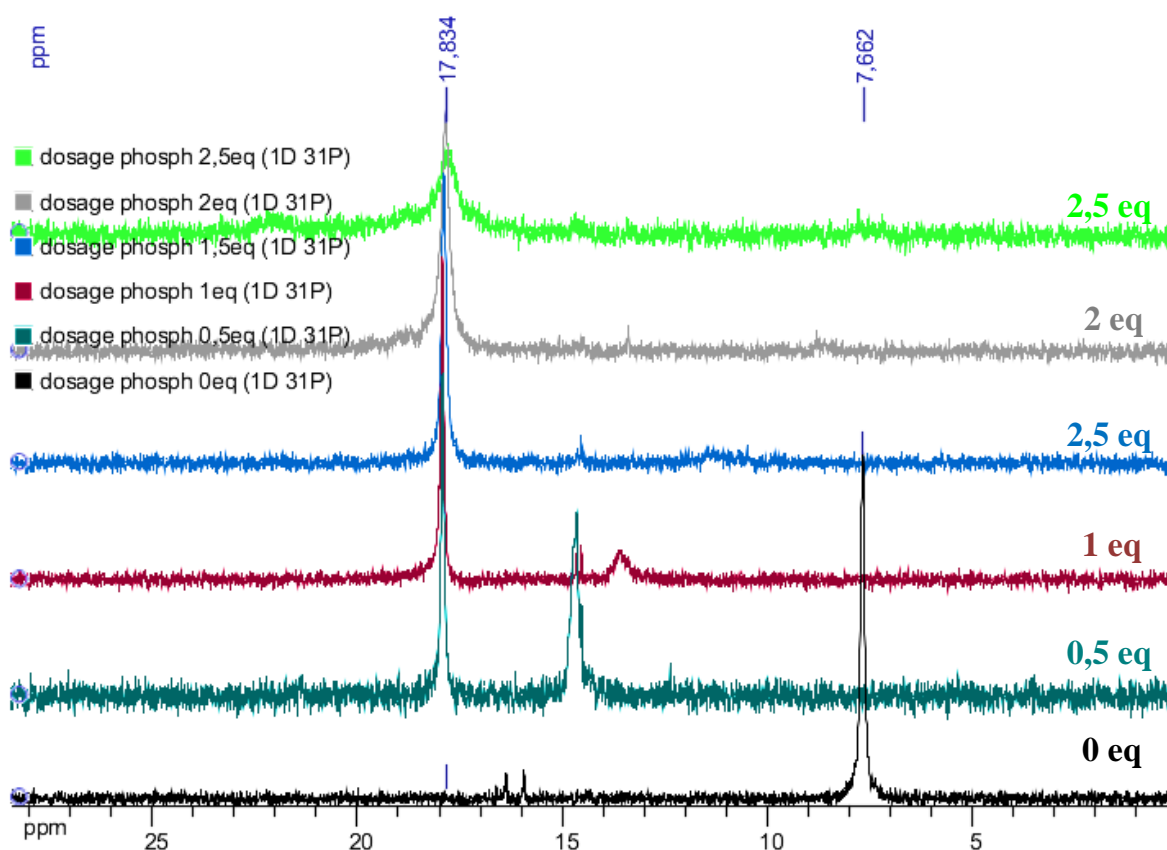


Figure 4.38 : Evolution des spectres RMN du phosphore ^{31}P (D_2O , t.a., 162 MHz) du ligand L_{12} ($c = 5 \times 10^{-6}\text{M}$) lors de l'addition d'une solution de LaCl_3 ($c = 0,14\text{M}$) en solution dans D_2O .

III. CONCLUSION

A partir du ligand L_3 dont les complexes de terbium sont de bons candidats pour le marquage de biomolécules et le transfert d'énergie, de nombreux paramètres sont susceptibles d'être modifiés afin d'améliorer la qualité des propriétés de luminescence ou la stabilité des marqueurs en milieu aqueux. La modification de l'antenne par extension de la délocalisation électronique ou grâce à la substitution des dérivés aromatiques par des groupes électrodonneurs ou électroaccepteurs a conduit à un large éventail de ligands aux propriétés photophysiques variées. La caractérisation des complexes d'euporium et de terbium montre qu'il est possible de déplacer significativement les maxima d'absorption vers le visible, région où l'excitation est plus aisée, mais cette modification a pour effet de réduire la qualité de la luminescence des complexes de terbium. Cette observation peut s'expliquer soit par un transfert d'énergie en retour du cation vers l'état triplet du ligand, soit tout simplement une faible stabilité des complexes. En revanche en ce qui concerne les complexes d'euporium, des complexes fortement luminescents ont pu être obtenus, notamment à partir des ligands de la famille des terpyridines.

Un ligand ditopique original a également été synthétisé afin d'étudier les transferts d'énergie intramoléculaires entre des ions lanthanides luminescents. La caractérisation de ce ligand à travers plusieurs techniques d'analyse a fourni des résultats inattendus et prometteurs. La synthèse des complexes isolés homométalliques et hétérométalliques avec des ions euporium, terbium et néodyme, ainsi que leur caractérisation est en cours au laboratoire et devrait permettre une meilleure compréhension de ce système.

IV. Bibliographie

- [1] Ravanat, J.-L.; Douki, T.; Cadet, J. *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 88.
- [2] Douki, T.; Cadet, J. *Biochem.* **2001**, *40*, 2495.
- [3] Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 3437.
- [4] Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866.
- [5] J. Charbonniere, L.; Balsiger, C.; J. Schenk, K.; G. Bunzli, J.-C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 505.
- [6] Schmidt, A.; Merkel, L.; Einfeld, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 2124.
- [7] Latva, M.; Takalo, H.; Mikkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodríguez-Ubis, J. C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75*, 149.
- [8] Constable, E. C. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Emeléus, H. J., Ed.; Academic Press: 1986; Vol. Volume 30, p 69.
- [9] De Angelis, F.; Fantacci, S.; Sgamelotti, A.; Cariati, F.; Roberto, D.; Tessore, F.; Ugo, R. *Dalton Trans.* **2006**, 852.
- [10] Lar, C.; Roiban, G.-D.; Crășneanu, R.; Mihalca, I.; Bogdan, E.; Terec, A.; Grosu, I. *Cent. Eur. J. Chem.* **2011**, *9*, 218.
- [11] Dannacher, J. J. *J. Mol. Catal. A: Chem* **2006**, *251*, 159.
- [12] Bolink, H. J.; Cappelli, L.; Coronado, E.; Gaviña, P. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5966.
- [13] Morgan, G. T.; Burstall, F. H. *J. Chem. Soc.* **1932**, 20.
- [14] G. B. Drew, M.; J. Hudson, M.; B. Iveson, P.; L. Russell, M.; Liljenzin, J.-O.; Sklberg, M.; Spjuth, L.; Madic, C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 2973.
- [15] Kadjane, P.; Platas-Iglesias, C.; Ziessel, R.; Charbonniere, L. *J. Dalton Trans.* **2009**, 5688.
- [16] Bellavance, P. L.; Corey, E. R.; Corey, J. Y.; Hey, G. W. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 462.
- [17] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.
- [18] Wang, R.; Deng, L.; Zhang, T.; Li, J. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6833.
- [19] Starck, M.; Kadjane, P.; Bois, E.; Darbouret, B.; Incamps, A.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. *J. Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9164.
- [20] Schoenberg, A.; Bartoletti, I.; Heck, R. F. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3318.
- [21] El-ghayoury, A.; Ziessel, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4473.
- [22] Xu, J.; Burton, D. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4346.

- [23] Sivakumar, S.; Reddy, M. L. P.; Cowley, A. H.; Vasudevan, K. V. *Dalton Trans.* **2010**, 39, 776.
- [24] Kadjane, P.; Starck, M.; Camerel, F.; Hill, D.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. c. J. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 4601.
- [25] Mato-Iglesias, M.; Rodríguez-Blas, T.; Platas-Iglesias, C.; Starck, M.; Kadjane, P.; Ziessel, R.; Charbonnière, L. c. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 1507.

Conclusion générale

Perspectives

Tout au long de ce travail de thèse, plusieurs ligands multifonctionnels nonadentates ont été synthétisés pour la complexation d'ions lanthanides luminescents. L'objectif principal de ce projet était de développer une famille de marqueurs luminescents pour l'analyse fluorologique optique *ex-vivo* appliquée à la détection précoce des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer. C'est dans ce contexte que notre intérêt s'est porté sur l'euporium et le terbium, lanthanides dont les raies d'émissions sont situées dans le visible et dont les rendements quantiques de luminescence sont relativement élevés.

La prise en compte des difficultés d'excitation directe des terres-rares en général, de leur caractère d'acides durs et de la sensibilité de leur propriétés de luminescence à l'égard de leur environnement de coordination nous a conduit à l'élaboration d'un ligand nonadentate de type polyaminophosphonaté, incorporant une plateforme organique hautement conjuguée de type pyridine-bis-pyrazolyl. Une synthèse convergente de ce ligand a été développée, suivie de l'étude de ses propriétés thermodynamiques.

Les constantes de protonation associées au ligand ont été déterminées par potentiométrie et les valeurs obtenues ont confirmé la prédominance d'espèces à fortes charges négatives à pH physiologiques. Associée au caractère de bases dures des groupements phosphonates, l'importante attraction électrostatique entre le ligand L_p et les cations lanthanides trivalents devrait conférer aux complexes résultant une stabilité accrue, comparée à des systèmes similaires. La détermination de la constante de stabilité thermodynamique du complexe de terbium avec le ligand L_p par compétition avec l'EDTA a permis de confirmer cette hypothèse.

La synthèse des complexes d'euporium et de terbium a également été réalisée et la détermination des propriétés de luminescence de ces composées a montré une photosensibilisation efficace de l'antenne, notamment pour le terbium dont le complexe possède des temps de vie très élevés, même en milieu physiologique. La structure d'un complexe d'euporium a été calculée avec la DFT confirme que le métal se situe bien à l'intérieur de la poche de photosensibilisation tridentate, garantissant ainsi une proximité bénéfique pour l'effet d'antenne. Cette structure met également en évidence le repliement des groupements phosphonates autour du cation, qui prévient efficacement la coordination de molécules de solvant et donc la désactivation non-radiative à travers des oscillateurs de type X-H.

Forts de ces résultats encourageants pour le ligand modèle, nous avons développé une voie de synthèse alternative permettant de fonctionnaliser la plateforme de sensibilisation et de coordination à travers l'introduction de groupements réactifs. Cette modification a été entreprise afin de permettre aux ligands et à leurs complexes d'interagir avec des cibles biologiques. Les ligands **L**₁ et **L**₂ ont été synthétisés grâce à une réaction de couplage de la plateforme de photosensibilisation à un alcyne vrai. L'addition de ce fragment insaturé n'est pas sans conséquences sur les propriétés photophysiques du ligand et des complexes, puisque l'extension de la délocalisation électronique déplace les maxima d'absorption du ligand vers le rouge. Les propriétés d'émission des complexes de terbium sont également influencées par cette modification, mais elles restent avantageuses pour les applications ciblées.

Afin de faciliter les réactions de marquage avec des biomolécules, la fonction acide carboxylique du ligand **L**₁ a été activée en ester et l'amine primaire du ligand **L**₂ en carbamate, ce qui a permis d'obtenir les ligands activés **L**₃ et **L**₄ correspondants. En ce qui concerne le carbamate, sa trop grande réactivité n'a pas permis de l'étudier en solution. Le ligand **L**₃ par contre, bien qu'ayant un temps de demi-vie court en milieu aqueux a pu être caractérisé malgré la présence de la lutidine dont l'utilisation est indispensable afin de réaliser la dernière étape de déprotection sélective des esters phosphoniques.

L'aptitude de ce ligand trifonctionnel au marquage des molécules biologiques a été éprouvée avec succès avec plusieurs protéines dont la streptavidine et surtout la biotine avec laquelle le ligand **L**₅ a été isolé et dont les propriétés photophysiques ont été déterminées. Cette caractérisation montre que la luminescence du complexe de terbium reste avantageuse, malgré l'association du ligand à la biomolécule.

À partir du complexe de terbium de ce ligand, il a été possible de mener des expériences de transfert d'énergie avec divers accepteurs d'énergie luminescents dont plusieurs colorants organiques et des nanocristaux semi-conducteurs luminescents. Compte tenu de la forte affinité entre la biotine et la streptavidine, et afin d'assurer une proximité spatiale suffisante entre les deux fluorophores, des échantillons commerciaux de ces accepteurs d'énergie greffés à la streptavidine ont été utilisés pour les dosages de solutions du complexe biotinylé dans plusieurs solvants aqueux. Ces solvants ont été sélectionnés soit pour leur aptitude à préserver les propriétés de luminescence du complexe de terbium (tampon TRIS/HCl pH = 7,4) et à mimer des conditions physiologiques (tampon TBS pH = 7,4) soit pour leur aptitude à solubiliser les nanocristaux (tampon borate pH = 8,4) et à empêcher leur adsorption à la surface des membranes des puits utilisés pour la mesure du signal (addition de

BSA). Une augmentation des intensités d'émission des accepteurs d'énergie consécutive au FRET a pu être mise en évidence pour différents accepteurs d'énergie pour chacun de ces systèmes simplifiés.

Dans l'optique de la transposition à un système de détection d'antigènes, des réactions de marquages de biomolécules d'intérêt à l'instar de la L-sélectine, marqueur biologique de la maladie d'Alzheimer et de deux anticorps spécifiques que sont Dreg55 et Dreg200 ont été réalisées à partir du ligand activé L_3 . Les biomolécules marquées ainsi obtenues ont pu être caractérisées après purification par spectrométrie de masse et fluorométrie d'émission, ce qui a conduit à la détermination de taux de marquage assez satisfaisants. La mise en évidence d'un transfert d'énergie de type FRET entre ces entités et des récepteurs adéquats marqués par des nanocristaux semi-conducteurs devrait permettre de valider cette méthode de diagnostic applicable à des échantillons de sang.

Par ailleurs, compte tenu du faible signal de FRET enregistré pour certains accepteurs d'énergie, nous nous sommes intéressés au développement de complexes de lanthanides dont aux propriétés de luminescence (temps de vie de luminescence, rendements quantiques, stabilité en milieu aqueux) seraient plus avantageuses. Plusieurs nouvelles familles de ligands ont donc été élaborées soit par l'ajout d'un substituant aromatique sur la plateforme du ligand modèle L_p (synthèse du ligand L_6), soit par remplacement de groupements pyrazoles par des indazoles (synthèse du ligand L_7).

Dans le premier cas, les propriétés de luminescence du complexe de terbium sont particulièrement mauvaises et ne permettent pas d'envisager l'utilisation de ce ligand pour des applications en imagerie. En ce qui concerne le ligand L_7 , il y a une diminution de l'efficacité de la sensibilisation pour le terbium mais une amélioration sensible des propriétés du complexe d'euporium. Même si les résultats ne semblent pas suffisants pour l'application des complexes en imagerie optique, il est intéressant de noter un déplacement important des maxima d'absorption pour ce ligand vers le visible et la synthèse d'un ligand analogue fonctionnalisé en position *para* de la pyridine est à envisager.

Une autre famille de ligands a été développée à travers l'association d'une plateforme de type terpyridine à des groupements aminophosphonates. Ces ligands se sont avérés particulièrement efficaces pour la photosensibilisation de l'euporium, notamment le ligand L_8 dont le complexe d'euporium a un rendement quantique de luminescence d'environ 20% dans l'eau. Les ligands L_{10} et L_{11} quant à eux ont permis d'étudier l'effet de l'introduction de groupements électroattracteurs ou électrodonneurs sur les chromophores organiques.

Enfin, la synthèse d'un ligand ditopique associant des dérivés phosphonates d'une part et des dérivés carboxylés d'autre part a été réalisée. L'étude de ce ligand par spectroscopie RMN, spectrométrie de masse et spectroscopies d'absorption et d'émission a donné des résultats intéressants, notamment en ce qui concerne la complexation sélective des lanthanides par le site de coordination phosphonaté ou la sensibilisation de métaux émettant dans le proche infrarouge (Nédodyme). La synthèse de complexes hétérodinucléaires actuellement à l'étude au laboratoire et la caractérisation approfondie du ligand **L₁₂** devraient permettre d'étudier des phénomènes de transfert d'énergie intramoléculaire.

Annexes

Partie expérimentale

Experimental part

Material and methods

- *Solvents and reagents*

The solvents used for the reactions were either free-water commercially available or dried in the laboratory:

- THF was distilled over sodium and benzophenone
- CH₃CN was dried over an alumina oxide column
- DMF, NEt₃ and DIEA were distilled over KOH under reduced pressure
- Toluene was distilled over sodium.

Deuterated solvents were stored at 4°C.

All other commercially available reagents were used without any further purification.

Thin Layer Chromatography was carried out on thin layer chromatography plates provided by Merck, aluminium sheets bearing silica gel 60 F₂₅₄. Column chromatography was performed using silica gel provided by Merck (40 – 63 μm).

- *Analysis and characterizations*

NMR Spectroscopy:

NMR spectra were recorded at room temperature on Bruker AC 200 (200 MHz) and Avance 300 (300 MHz) for ¹H and ¹³C and Avance 400 (400 MHz) for ³¹P. The chemical shifts of the signals are given in ppm (relative to the residual peak of used deuterated solvent). The multiplicity of signals are given for the ¹H NMR spectra (s: singlet, d: doublet, dd: doublet of doublet, t: triplet, q: quadruplet, m: multiplet). The coupling constants *J* are given in Hertz (Hz). The data were analysed with *NMR Notebook* software (2.70 version)

Mass spectrometry:

The ESI spectra were recorded either by the Service d'Analyse de l'Université de Strasbourg, or by the group of Prof. Laurence Sabatier on a Bruker Daltonics micro-TOF device. The MALDI-TOF spectra were recorded by the group of Prof. Laurence Sabatier on an Ultraflex or an Autoflex III device from Bruker Daltonics.

Infrared spectroscopy:

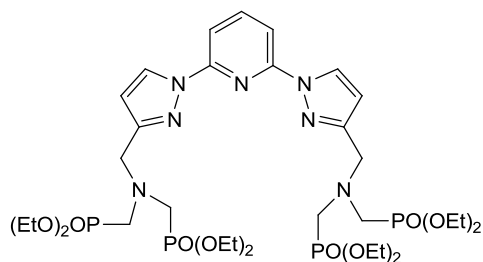
The spectra were recorded with a Perkin-Emmer Spectrum One device by the ATR (Attenuated Total Reflectance) method.

Absorption and emission spectroscopy:

The UV-Vis absorption spectra were recorded on a Specord 205 spectrometer and the samples in solution are analyzed in 1 cm quartz cells.

Emission spectra, excitation spectra and luminescence lifetimes were recorded on a Horiba Jobin Yvon Fluoromax or Edinburg Instrument FL5920 spectrometer. Luminescence quantum yields were measured according to conventional procedures^[1] with diluted solutions (optical density < 0.05) by using [Ru(bipy)₃]Cl₂ in non-degassed water ($\Phi = 4\%$)^[2] for Eu complexes and Rhodamine 6G in nondegassed water ($\Phi = 76\%$)^[3] for Tb complexes with the correction for the refractive index of the medium.^[4] Relative errors are estimated to be $\pm 15\%$. Hydration numbers (q) were calculated from equation 2.7.^[5]

Compound 11:



Formula: C₃₃H₅₉N₇O₁₂P₄

Molecular weight: M = 869.76 g. mol⁻¹.

To a solution of compound **10a** (282 mg, 0.89 mmol) dissolved in acetonitrile (20 mL), dry K₂CO₃ (333 mg, 2.42 mmol) was added and the mixture was refluxed for 30 min. Compound **8** (160 mg, 0.4 mmol) was added and the mixture was refluxed for 48 h. The remaining potassium carbonate was removed by filtration and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting oily residue was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 100/0 to 90/10, R_f = 0.70 at 90/10) to give compound **11** (200 mg, 0.23 mmol) as a yellowish oil (yield: 58%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 7.69-7.95 (m, 3H), 6.54 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 4.15 (m, (16+4H)), 3.23 (d, ²*J*_{P-H} = 10Hz, 8H), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 24H).

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 24.56.

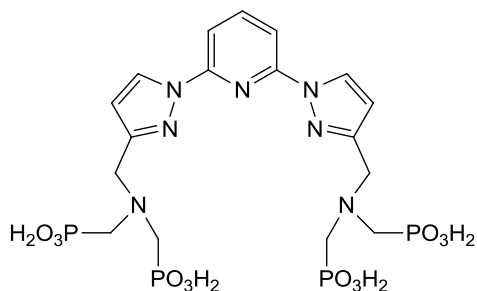
¹³C NMR (CDCl₃, 75MHz): δ 152.6, 150.0, 141.2, 127.7, 109.0, 108.6, 62.0 (t, *J* = 7.0 Hz), 52.6 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 224.0 Hz), 49.0, 16.5 (d, *J* = 5.8 Hz).

ESI⁺/MS (CH₂Cl₂): *m/z* = 869.5.

Anal. Calcd for C₃₃H₅₉N₇O₁₂P₄: C, 45.57; H, 6.84; N, 11.27. Found: C, 46.52; H, 7.05; N, 11.43.

IR (cm⁻¹, ATR): ν 3468 (w, O-H), 2980 (w, C_{sp3}-H), 2907 (w), 1605 (m, C=N), 1585 (C=C)

Ligand L_p:



Formula: C₁₇H₂₇N₇O₁₂P₄

Molecular weight: M = 645.33 g. mol⁻¹.

Compound **11** (180 mg, 0.21 mmol) was dissolved in 6N HCl solution (40 mL) and was refluxed for 24 h. The solvent was removed under vacuum and the solid was washed in THF to give **L_p** (120 mg, 0.19 mmol) as a pale brown powder (yield: 83%).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz): δ 8.68 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 7.80-8.15 (m, 3H), 6.85 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 4.87 (s, 4H), 3.67 (d, ²*J*_{P-H} = 12.5 Hz, 8H).

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ 9.95.

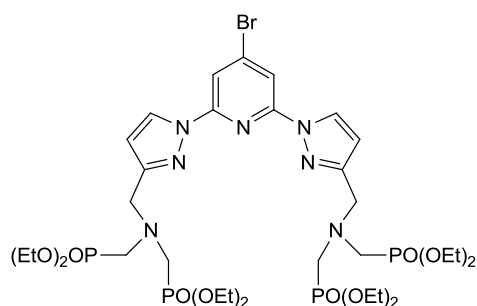
^{13}C NMR (D_2O , 100 MHz): δ 148.7, 144.2, 142.5, 130.0, 110.6, 110.5, 53.2, 51.1 (d, $J = 137$ Hz).

ESI/MS (H_2O): $m/z = 644.07$ (100%) ; calcd, 644.33 for L_pH^{7-} .

Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{12}\text{P}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C, 29.18; H, 4.32; N, 14.01. Found: C, 29.39 ; H, 4.45 ; N, 13.82.

IR (cm^{-1} , ATR): ν 3417 (w, O-H), 1604 (m, C=N), 1587 (m, C=C_{Ar}), 1470 (s, C=N), 1388 (m, P=O), 1148 (s, P-O), 774 (s).

Compound 12:



Formula: $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{BrN}_7\text{O}_{12}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 948.65 \text{ g. mol}^{-1}$.

To a solution of compound **10b** (614 mg, 1.29 mmol) dissolved in acetonitrile (60 mL), dry K_2CO_3 (717 mg, 5.16 mmol) was added and the mixture was refluxed for 30 min. Compound **8** (900 mg, 2.84 mmol) was added and the mixture was refluxed for 48 h. The remaining potassium carbonate was removed by filtration and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting oily residue was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/0 to 90/10, $R_f = 0.13$ at 95/15) affording compound **12** (730 mg, 0.80 mmol) as a yellowish oil (yield: 62 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.84 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 8.0 (s, 2H), 6.6 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 4.2 (m, 20H), 3.2 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 10$ Hz, 8H), 1.3 (t, $J = 7.0$ Hz, 24H).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 23.98.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 153.2, 150.4, 136.53, 128.0, 112.2, 109.1, 62.06 (d, $J = 6.8$ Hz), 53.91 (t, $J = 8.8$ Hz), 50.01 (dd, $J = 159.4$ Hz), 16.51 (d, $J = 6.0$ Hz).

ESI⁺ /MS (CH_2Cl_2): $m/z = 949.3$ ($[\mathbf{12} + \text{H}]^+$, 100 %).

Anal. Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{BrN}_7\text{O}_{12}\text{P}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 41.00; H, 6.26; N, 10.14. Found: C, 40.83; H, 6.44; N, 9.95.

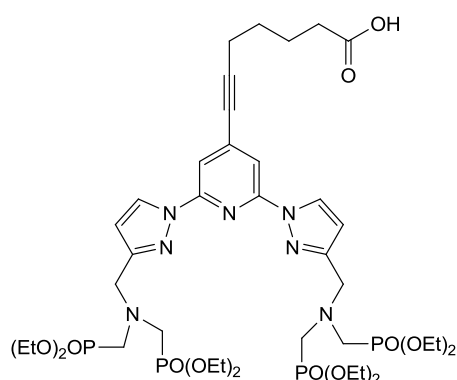
Compound 14:

Formula: $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 993.89 \text{ g. mol}^{-1}$.

Compound **12** (1.12 g, 1.2 mmol), 6-heptynoic acid 90% (182 mg, 1.44 mmol), and $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ (42 mg, 0.06 mmol) were dissolved in distilled THF (80 mL) and distilled

Et₃N (24 mL) and the solution was degassed with Nitrogen for 30 minutes. CuI (22.9 mg, 0.1



mmol) was added and the mixture was stirred for 14h at 60°C. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH, 95/5, R_f = 0.13 at 95/15) to afford compound **14** (1.01 g, 1.02 mmol) as a brown oil (yield: 85%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.5 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 7.8 (s, 2H), 6.50 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 4.17 (m, 20H), 3.3 (d, ²*J*_{P-H} = 10 Hz, 8H), 2.5 (m, 2H), 2.4 (m, 4H), 2.0 (m, 2H), 1.3 (t, *J* = 7.0 Hz, 24H).

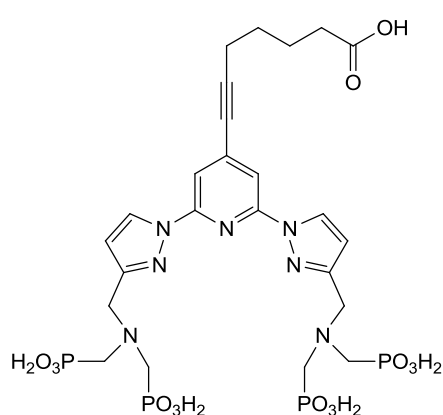
³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 22.20.

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 206.94, 175.38, 152.06, 150.0, 137.37, 127.67, 111.35, 108.82, 96.63, 62.21 (d, *J* = 7.0 Hz), 58.33, 50.07 (dd, *J* = 159.9 Hz and *J* = 9.4 Hz), 27.19, 24.04, 19.39, 19.11, 16.46 (d, *J* = 6.1 Hz).

ESI⁺/MS (CH₂Cl₂): *m/z* = 994,4 ([**14** + H]⁺, 60 %).

Anal. Calcd for C₄₀H₆₇N₇O₁₄P₄: C, 48.34 ; H, 6.79 ; N, 9.86. Found: C, 48.52 ; H, 7.12 ; N, 9.65.

Ligand L₁:



Formula: C₂₄H₃₅N₇O₁₄P₄

Molecular weight: M = 769.47 g. mol⁻¹.

To a solution of compound **14** (460 mg, 0.46 mmol) in dichloromethane (5 mL), 2,6-dimethylpyridine (2.24 mL, 19.32 mmol) was added, and the mixture stirred 10 minutes at room temperature. TMSBr (2.47 mL, 18.71 mmol) was then added, and the solution stirred for two days. 2,6-dimethylpyridine (2.24 mL, 19.32 mmol) and TMSBr (2.47 mL, 18.71 mmol) were added and allowed to react two more days. Excess TMSBr was removed under vacuum, giving a white solid which was dissolved in methanol (40 mL). The solution was stirred at room temperature for 24 hours, and the methanol was removed under vacuum. The solid was dissolved in water by addition of NaOH solution until pH = 7.0, and addition of methanol resulted in the precipitation of a pale brown powder which was dried under vacuum to give **L₁** (220 mg; 0.26 mmol) (yield: 56%).

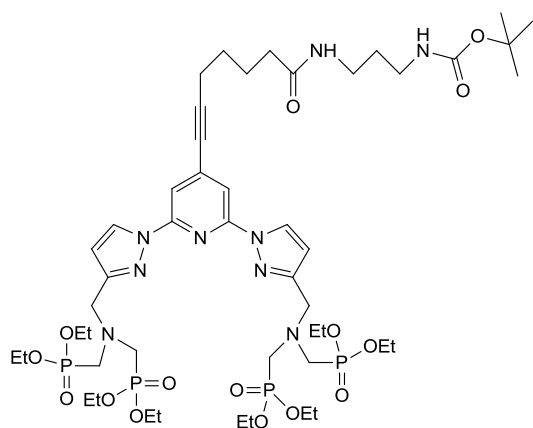
^1H NMR (D_2O -NaOD, 300 MHz): δ 8.7 (s, 2H), 7.8 (s, 2H), 6.8 (s, 2H), 3.3 (m, 8H), 2.5 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.2 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.7 (m, 4H).

^{31}P NMR (D_2O -NaOD, 162 MHz): δ 6.77.

^{13}C NMR (D_2O -NaOD, 75 MHz): δ 183.68, 149.50, 138.01, 130.51, 112.80, 110.57, 109.2, 99.00, 77.82, 53.44 (d, $J = 9.8$ Hz), 53.15, 36.98, 27.55, 25.31, 18.70.

IR (cm^{-1} , ATR): ν 3215 (m, O-H), 2232 (w, Csp), 1611 (s, C=O), 1556 (m, C=C aromatic), 1318 (w, P=O), 1074 (s, P-O), 742.07 (s).

Compound 19:



Formula: $\text{C}_{48}\text{H}_{83}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 1150.12 \text{ g. mol}^{-1}$.

A solution of compound **12** (400 mg, 0.42 mmol), compound **18** (191 mg, 0.67 mmol), and $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ (15 mg, 0.021 mmol) in distilled THF (20 mL) and distilled Et_3N (8 mL) was degassed with Argon flux during 30 minutes. CuI (8 mg, 0.04 mmol) was added and the mixture was stirred for 15h at 60°C . The solvent was removed

under reduced pressure and the resulting oil was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/0 to 97/3, $R_f = 0.10$ at 90/10) affording compound **19** (428 mg, 0.37 mmol) as yellowish oil (yield: 88 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.44 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 7.72 (s, 2H), 6.52 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 4.28 – 3.93 (m, 20H), 3.34 – 3.06 (m, 12H), 2.47 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.92 – 1.75 (m, 2H), 1.74 – 1.54 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.31 (t, 24 H, $J = 7.1$ Hz).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 24.50.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 172.9, 152.5, 137.3, 127.8, 111.2, 108.6, 96.6, 79.2, 78.6, 62.1, 62.0, 53.9, 49.9 (d, $J = 159.4$ Hz), 37.0, 36.1, 35.8, 30.2, 28.4, 27.9, 25.0, 19.3, 16.4 (d, $J = 6.1$ Hz).

ESI⁺/MS (CH_2Cl_2): $m/z = 1172.5$ ($[\mathbf{19}+\text{Na}]^+$, 100 %).

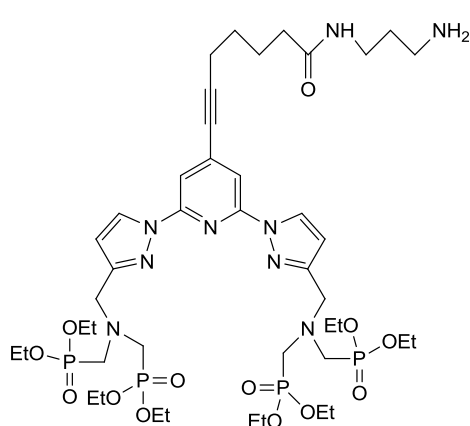
Anal. Calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{83}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{P}_4 \cdot 2\text{MeOH}$: C, 49.46; H, 7.55; N, 10.38. Found C, 49.31; H, 7.39; N, 10.01.

Compound 20:

Formula: $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 1050.0 \text{ g. mol}^{-1}$.

To a solution of compound **19** (120 mg, 0.10 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added trifluoroacetic acid (78 μ L, 1 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 15



hours. After drying under reduced pressure we obtain triflate salts of compound **20** (150 mg) as a brown oily residue.

^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 8.66 – 8.55 (m, 2H), 7.63 (s, 2H), 6.51 (m, 2H), 4.19 – 3.93 (m, 16 H), 3.28 – 3.07 (m, 14H), 3.01 – 2.79 (m, 2H), 2.54 – 2.39 (m, 2H), 2.27 – 2.13 (m, 2H), 2.01 – 1.85 (m, 2H), 1.81 – 1.66 (m, 2H), 1.65 – 1.52 (m, 2H), 1.26 – 1.20 (m, 24

H).

^{31}P NMR (CD_3OD , 161.9 MHz): δ 24.83.

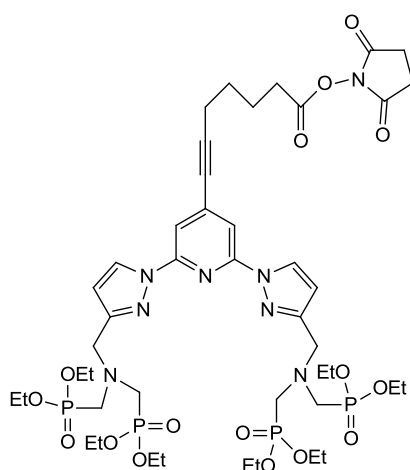
ESI⁺/MS (CH_2Cl_2): m/z = 1051.18 ($[\mathbf{20}+\text{H}]^+$, 100%).

IR (cm^{-1} , ATR): ν 2158 (w, Csp), 1676 (s, C=O), 1200 (w, P=O), 1015 (w, PO), 797.

Compound 21:

Formula: $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{N}_8\text{O}_{16}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 1090.97 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.



To a solution of compound **14** (300 mg, 0.30 mmol) in 45 mL of dichloromethane, N-N'-Disuccinimidyl carbonate (175 mg, 0.58 mmol) and NEt_3 (240 μ L) were added. The mixture was stirred at room temperature under inert atmosphere for 12 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the oily residue dissolved in dichloromethane. The solution was washed four times with an aqueous solution of NH_4Cl . The organic phase was washed with brine and dried to give compound **21**

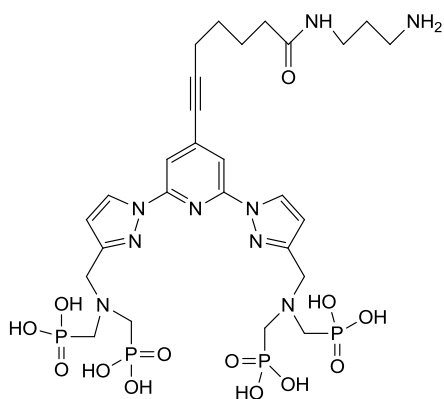
(320 mg, 0.29 mmol) as a yellowish oil (yield: 97%).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.44 (d, $J = 2.7 \text{ Hz}$, 2H) 7.73 (s, 2H), 6.52 (d, $J = 2.7 \text{ Hz}$, 2H), 4.03 – 4.24 (m, 20 H), 3.21 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 10.1 \text{ Hz}$, 8 H), 2.83 (s, 4H), 2.68 (t, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 2H), 2.52 (t, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 2H), 1.87 – 2.01 (m, 2H), 1.70 – 1.83 (m, 2H), 1.31 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 24

H). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 24.49.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 169.21, 168.37, 152.74, 150.24, 137.23, 127.90, 111.34, 108.81, 95.95, 79.03, 62.14 (d, $J = 7.2$ Hz), 53.46, 50.06 (dd, $J = 158.4$ Hz, $J = 9.7$ Hz), 30.59, 27.38, 25.72, 23.92, 19.22, 16.58 (d, $J = 6.1$ Hz).

Ligand L_2 :



Formula: $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{P}_4$

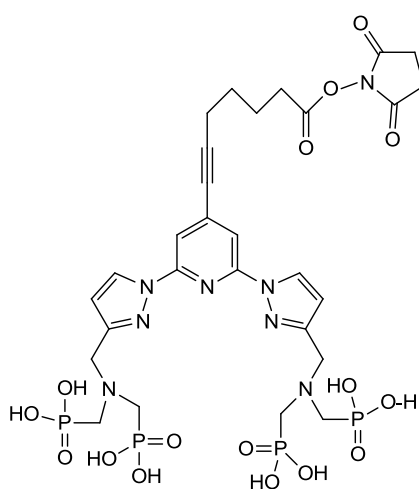
Molecular weight: $M = 825.58 \text{ g. mol}^{-1}$.

To a solution of compound **20** (150 mg) in dichloromethane (10 mL) 2,6-dimethylpyridine (388 mg, 4 mmol) was added, and the mixture was stirred 10 minutes at room temperature. TMSBr (464 mL, 3.34 mmol) was then added, and the solution stirred during two days. Excess TMSBr and solvent was removed under vacuum, giving a white solid that was dissolved in methanol (10 mL) and subsequently evaporated under reduced pressure without heating. The white solid was washed several times with dichloromethane and methanol in order to remove excess lutidine, affording **L₂** (65 mg, 0.08 mmol) with a yield of 80 % for two steps.

^1H NMR (D_2O -NaOD, 300 MHz): δ 8.50 (s, 2H), 7.56 (s, 2H), 6.69 (s, 2H), 3.99 (s, 4H), 3.51 (t, $J = 9.0$ Hz, 1 H), 3.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.61 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 11.7$ Hz, 8 H), 2.51 - 2.43 (m, 4 H), 2.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 1.81 - 1.70 (m, 2H), 1.70 - 1.54 (m, 4 H).

^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz): δ 16.77.

Ligand L_3 :



Formula: $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_{16}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 866.54 \text{ g. mol}^{-1}$.

To a solution of compound **21** (400 mg, 0.37 mmol) in dichloromethane (10 mL) 2,6-dimethylpyridine (2.12 mL, 18.34 mmol) was added, and the mixture stirred 10 minutes at room temperature. TMSBr (1.94 mL, 14.67 mmol) was then added, and the solution stirred during two days. Excess TMSBr and solvent were removed under vacuum, giving a white solid that was dissolved in

methanol (10 mL) and subsequently evaporated under reduced pressure without heating. The white solid was washed several times with dichloromethane and dried under vacuum affording **L₃** as a lutidinium monophosphonate salt.

¹H NMR (D₂O-NaOD, 200 MHz): δ 8.18 (s, 2H), 7.22 (m, 2H), 6.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 6.37 (s, 2H), 3.66 (s, 4H), 2.91 (s, 4H), 2.30 (d, ²*J*_{P-H} = 12.1 Hz, 8H), 2.15 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.28 (m, 4H).

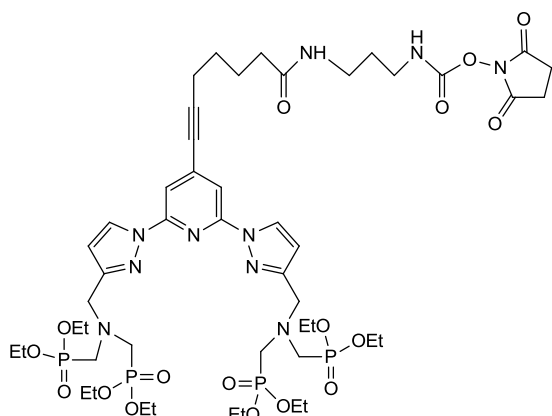
³¹P NMR (D₂O-NaOD, 162 MHz): δ 16.89.

ESI /MS : *m/z* = 865.15 ([**L₃**-H]⁺, 30%) ; (*m/z* = 768,1 [**L₁**-H]⁺, 70%).

Anal. Calcd for C₂₈H₃₈N₈O₁₆P₄·C₇H₉N₄H₂O: C, 40.20 ; H, 5.30 ; N, 12.05 ; Found : C, 40.26 ; H, 5.24 ; N, 12.07.

IR (cm⁻¹, ATR): ν 2157 (w, Csp), 1837, 1781(s, C=O), 1736 (m, C=O), 1611(s, C=O), 1203 (w, P=O), 785 (s).

Compound 22:



Formula: C₄₈H₇₈N₁₀O₁₇P₄

Molecular weight: M = 1191.08 g. mol⁻¹.

To a solution of compound **20** (57 mg, 0.05 mmol) in 15 mL of dichloromethane, N-N'-disuccinimidyl carbonate (27 mg, 0.09 mmol) and NEt₃ (50 μL) were added. The mixture was stirred at room temperature under inert atmosphere for 12 hours. The solvent was

removed under reduced pressure and the oily residue dissolved in dichloromethane. The solution was washed four times with an aqueous solution of NH₄Cl. The organic phase was washed with brine and dried to give compound **22** (50 mg, 0.04 mmol) as a yellowish oil (yield: 80%).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.45 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H) 7.73 (s, 2H), 6.52 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 4.03 – 4.26 (m, 20 H), 3.44 – 3.10 (m, 12 H), 2.79 (s, 4H) 2.50 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.50 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.48 – 1.08 (m, 26 H).

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 24.49.

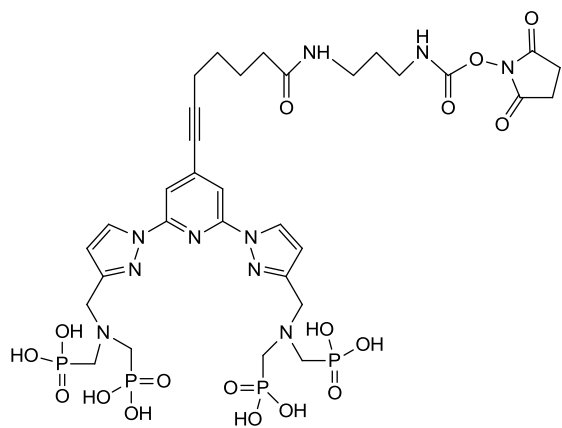
¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 205.2, 195.1, 186.1, 180.2, 173.8, 170.0, 152.7, 150.0, 128.0, 111.4, 108.9, 62.3 (d, *J* = 6.9 Hz), 54.1, 53.9, 50.2 (dd, *J* = 159 Hz, *J* = 8.4 Hz), 38.9, 36.3, 29.8, 28.1, 25.7, 25.3, 19.5, 16.7 (d, *J* = 6.2 Hz).

ESI⁺/MS: m/z = 1213.45 ([**22**+Na]⁺, 100%).

Ligand L₄:

Formula: C₃₂H₄₆N₁₀O₁₇P₄

Molecular weight: M = 966.66 g. mol⁻¹.



To a solution of compound **22** (50 mg, 0.042 mmol) in dichloromethane (10 mL) 2,6-dimethylpyridine (204 mg, 2.1 mmol) was added, and the mixture stirred 10 minutes at room temperature. TMSBr (232 mL, 1.68 mmol) was then added, and the solution was stirred for two days. Excess TMSBr and solvent were removed under vacuum, giving a white solid that were dissolved in methanol (10 mL)

and subsequently evaporated under reduced pressure without heating. The white solid was washed several times with dichloromethane to remove lutidine, affording **L₄** as a lutidinium salt.

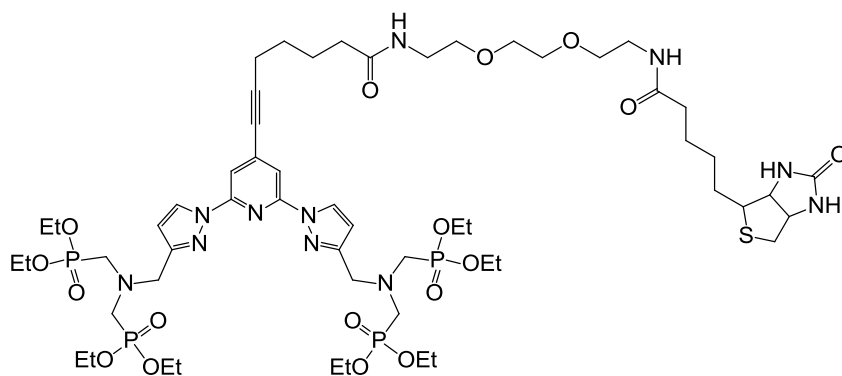
¹H NMR (D₂O-NaOD, 300 MHz): δ 8.58 (s, 2H), 7.64 (m, 2H), 6.78 (s, 2H), 4.08 (s, 4H), 3.20 (m, 2H), 3.01 (m, 2H), 2.7 (d, ²J_{P-H} = 11.2 Hz, 8H), 2.54 (m, 2H), 2.41 (s, 4H), 2.30 (m, 2H), 1.89 – 1.47 (m, 6H).

³¹P NMR (D₂O-NaOD, 162 MHz): δ 16.68.

ESI/MS: m/z = 965.2 ([**L₄H₇**]⁻, 40%).

IR (cm⁻¹, ATR): ν 1611 (F, C=O NHS), 1203 (F, P=O), 987 (F, P-O), 795 (s).

Compound 28:



Formula:

C₅₆H₉₅N₁₁O₁₇P₄S

Molecular weight: M = 1350.38 g. mol⁻¹.

To a solution of compound **14** (293 mg, 0.29 mmol) and compound **26** (144 mg,

0.29 mmol) in DMF (5 mL), was added EDCI (68 mg, 0.35mmol) and DMAP (43 mg, 0.35

mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL). The mixture was stirred for 20 hrs at r.t. and was concentrated under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in dichloromethane, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness under vacuum. Purification of the crude product was performed by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH gradient from 100:0 to 90:10) yielding compound **28** (338 mg, 85%) as an oil.

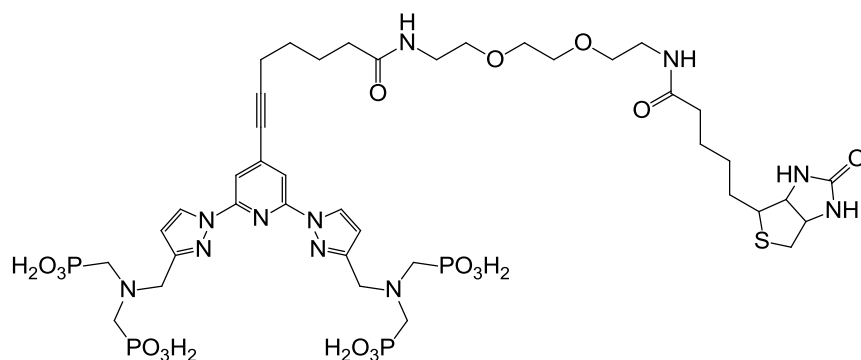
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.40 (d, *J* = 2.4 Hz, 2 H), 7.66 (s, 2H), 6.79 (s, br, 1H), 6.63 (s, br, 1H), 6.46 (d, *J* = 2.7 Hz, 2 H), 6.40 (s, br, 1H), 6.00 (s, br, 1H), 4.44 (s, br, 1H), 4.26 (s, br, 1H), 4.09 (qt, *J* = 7.2 Hz, 16 H), 4.03 (s, 4 H), 3.49 (m, br, 4H), 3.37 (s, br, 4H), 3.26 (s, br, 4H), 3.17 (d, ²*J*_{P-H} = 10.2 Hz, 8 H), 3.07 (s, 1H), 2.92-2.60 (m, 2H), 2.43 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 2.26-2.11 (m, 4H), 1.90-1.50 (m, 8H), 1.50-1.30 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 24 H).

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 24.50.

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 173.4, 173.0, 159.8, 152.5, 150.0, 137.3, 127.8, 111.1, 108.7, 96.8, 78.5, 70.2, 70.1, 69.9, 69.7, 62.2 (d, *J* = 6.8 Hz), 61.9, 60.3, 55.7, 55.6, 50.0 (dd, *J* = 159.0 Hz, *J* = 8.5 Hz), 40.5, 39.2, 39.1, 36.4, 35.8, 35.0, 29.7, 25.7, 25.6, 25.5, 25.0, 16.5 (d, *J* = 6.0 Hz).

ESI+/MS (CH₂Cl₂): *m/z* = 1372.6 ([**28**+Na], 89%).

Ligand L₅:



Formula:

C₄₀H₆₃N₁₁O₁₇P₄S

Molecular weight: M = 1125.95 g. mol⁻¹.

In a 50 mL rounded bottom flask, compound **28** (385 mg, 0.29 mmol)

was dissolved in dichloromethane (10 mL). 2,6-dimethylpyridine (1.5 mL, 12.9 mmol) and TMSBr (1.5 mL, 11.4 mmol) was added. The solution was stirred at r.t. for 14 hrs. The solvent were removed under reduced pressure, the resulting residue was taken up with MeOH (10 mL) and stirred for 30 minutes at r.t.. The evaporation, dissolution procedure was repeated with MeOH (10 mL) and the solution was stirred for 2 hrs at r.t. The solvent was removed under vacuum and the residue was washed with MeOH and CH₂Cl₂ and ligand **L₅** was collected by centrifugation and dried under vacuum with 64% yield (206 mg).

^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 8.71 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.82 (s, 2H), 6.86 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 4.85 (s, 4H), 4.51 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.62 (m, 14H), 3.54 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.40 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.29 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.16 (m, 1H), 2.92-2.82 (m, 1H), 2.70 (s, 1H), 2.57 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.81 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.65-1.35 (m, 4H), 1.24 (m, 2H).

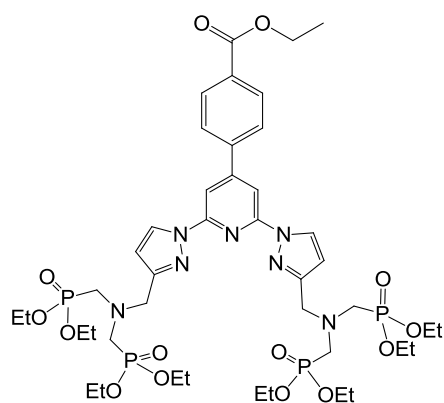
^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz): δ 7.15.

^{13}C NMR (D_2O , 75 MHz): δ 176.5, 165.1, 148.8, 144.6, 137.5, 129.9, 112.0, 110.8, 98.7, 78.0, 69.5, 68.9, 62.0, 60.2, 55.3, 53.2, 52.0, 50.3, 39.7, 39.0, 38.9, 35.4, 35.3, 27.9, 27.6, 27.1, 25.1, 24.9, 18.7, 18.6.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{N}_{11}\text{P}_4\text{O}_{17}\text{S}$, $2\text{H}_2\text{O}$: C, 41.35; H, 5.81; N, 13.26. Found: C, 41.54; H, 5.56; N, 12.76.

IR (cm^{-1} , ATR): ν 3278 (w, br), 2929 (w), 1611 (m), 1552 (m), 1460 (m), 1390 (m), 1328 (w), 1195 (s), 1047 (s), 987 (m), 938 (s), 775 (m, br).

Compound 30:



Formula: $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 1017.91 \text{ g. mol}^{-1}$.

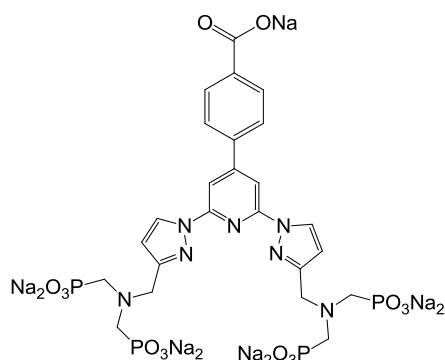
A schlenk tube containing compound **12** (410 mg, 0.43 mmol), 4-ethoxycarbonylphenylboronic acid pinacol ester **29** (132 mg, 0.48 mmol), and dry K_2CO_3 (140 mg, 1.0 mmol), dissolved in distilled toluene, was degazed with N_2 for 30 min. To this solution was added $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (25 mg, 0.02 mmol). The mixture was stirred for 14 h at 70°C . The remaining K_2CO_3 was removed by filtration and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was directly purified by column chromatography over silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient from 100:0 to 94:6) yielding compound **30** (326 mg, 75%) as a colourless oil.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.50 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.01 (s, 2H), 7.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.55 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 4.4 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.10 (s, 4H), 4.13 (qt, $J = 7.1$ Hz, 16H), 3.21 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 10.1$ Hz, 8H), 1.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 24H).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 24.51.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 166.3, 153.2, 153.0, 150.8, 142.1, 131.7, 130.5, 128.1, 127.4, 108.9, 107.3, 62.2 (d, $J = 6.8\text{Hz}$), 61.5, 54.3 (t, $J = 7.3\text{Hz}$), 50.2 (dd, $J = 159.8, 8.6\text{Hz}$), 16.7 (d, $J = 6.0\text{ Hz}$), 14.6.

Compound 31:



Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{Na}_9\text{O}_{14}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 963.27\text{ g. mol}^{-1}$.

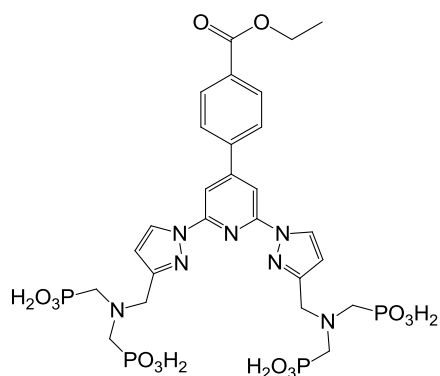
Compound **30** (278 mg, 0.27 mmol) was dissolved in 6N HCl solution (10 mL) and was refluxed during 14 h. The solution was concentrated under vacuum. Successive addition of THF, MeOH, and Et_2O resulted in the formation of a precipitate that was collected by centrifugation and dried to yield compound **31** as a white powder.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.45 (s, 2H), 7.86 (m, 2H), 7.71 (m, 4H), 6.72 (s, 2H), 4.05 (s, 4H), 2.69 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 11.6\text{ Hz}$, 8H).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 17.41.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 174.6, 153.9, 153.0, 149.9, 138.3, 137.5, 129.6, 129.5, 126.6, 110.0, 106.6, 54.8 (dd, $J = 144.0, 8.8\text{ Hz}$), 53.6 (t, $J = 6.8\text{ Hz}$).

Ligand L_6 :



Formula: $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 793.49\text{ g. mol}^{-1}$.

Compound **30** (95 mg, 0.093 mmol) was dissolved in dichloromethane (10 mL) and TMSBr (520 μL , 3.92 mmol) was added. The solution was stirred at r.t. for 24 h. A second addition of TMSBr (520 μL , 3.92 mmol) was made and the mixture was stirred at r.t. for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure, the resulting residue was taken up with MeOH (10 mL) and stirred for 2 h at room temperature. The evaporation, dissolution procedure was repeated with MeOH (10 mL) and the solution was stirred for 24 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum and the residue was taken up in a minimum of MeOH with some drops of NEt_3 to increase the pH and dissolve the ligand. Addition of CH_2Cl_2 resulted in the formation of a precipitate, which was

collected by centrifugation and dried under vacuum to afford ligand **L₆** with 75% yield (55 mg).

¹H NMR (D₂O, 200 MHz): δ 8.43 (s, 2H), 7.45 (m, br, 6H), 6.71 (s, 2H), 4.65 (s, 4H), 4.23 (m, br, 2H), 3.55 (d, ²J_{P-H} = 11.1 Hz, 8H), 3.16 (q, J = 7.2 Hz, 12H, Et₃N), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (t, J = 7.2 Hz, 18H, Et₃N).

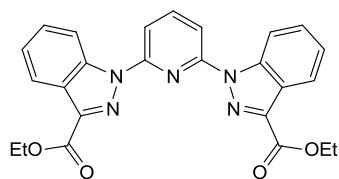
³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 7.21.

ESI/MS: m/z = 792.1 ([LH₇]⁺, 85%), 603.1 ([M-2(CH₂PO(OH)₂)]⁻, 100%).

Anal. Calcd. for C₂₆H₃₅N₇O₁₄P₄(NEt₃)₂·3H₂O: C, 43.47; H, 6.82; N, 12.01. Found : C, 43.65; H, 6.85; N, 11.82.

IR (cm⁻¹, ATR): ν 22 (w, C_{sp}), 1713 (m), 1609 (m, C=O), 1580 (m, C=C aromatic), 1556 (m), 1462 (s), 1387 (m), 1278 (m), 1155 (s), 1041 (s, P-O).

Compound 35:



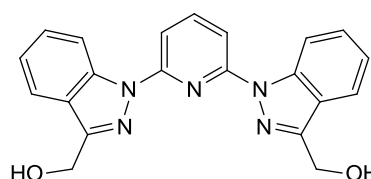
Formula: C₂₅H₂₁N₅O₄

Molecular weight: M = 455.47 g. mol⁻¹.

A schlenk tube under N₂ containing compound **33** (3.60 g, 18.9 mmol), 2,6-difluoropyridine **34** (1.00 g, 8.7 mmol), distilled DMF (100 mL) was stirred at 0°C. To this solution was added NaH (60%) (760 mg, 18.9 mmol). The mixture was then stirred for 14 h at 70°C and the solvent was removed under vacuum. The resulting residue was dissolved in dichloromethane, washed with water and brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed in vacuo. The resulting solid was triturated in methanol and a filtration yielded compound **35** (2.13 g, 54%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.65 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 8.32 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 8.09 (3, 3H), 7.47 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 4.59 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 1.54 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

Compound 36:



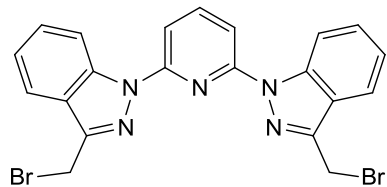
Formula: C₂₁H₁₇N₅O₂

Molecular weight: M = 371.39 g. mol⁻¹.

A schlenk tube under N₂, containing compound **35** (2.10 g, 4.61 mmol) dissolved in distilled THF, was stirred at -15°C. To this solution was added slowly LiAlH₄ (380 mg, 10.0 mmol). The mixture was then stirred for 1 h at r.t. and 20 mL of a saturated NH₄Cl solution was added to quench. The solid was

removed by filtration on Celite-545[®], and the solvent was removed under vacuum to give compound **36** (1.47 g, 85%) as a white solid.

Compound 37:



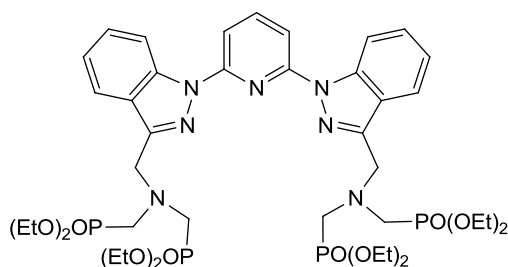
Formula: C₂₁H₁₅Br₂N₅O₂

Molecular weight: M = 497.19 g. mol⁻¹.

In a schlenk tube under N₂ containing compound **35** (1.45 g, 3.90 mmol) dissolved in distilled DMF (120 mL), was added PBr₃ (1.10 mL, 11.7 mmol). The mixture was stirred at room temperature during 14 h. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting slurry was taken up with CH₂Cl₂ and washed with water, saturated NaHCO₃ solution and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂) to give compound **37** (1.07 mg, 55%) as a white solid.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.00-7.82 (m, 5H), 7.54-7.34 (m, 4H), 4.93 (s, 4H).

Compound 38:



Formula: C₄₁H₆₃N₇O₁₂P₄

Molecular weight: M = 969.87 g. mol⁻¹.

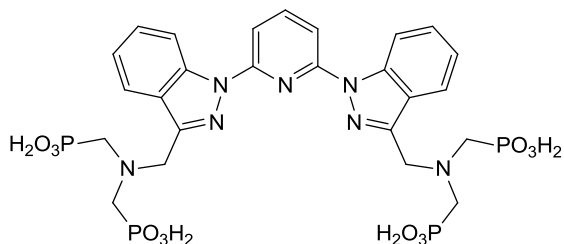
A schlenk tube containing compound **37** (1.00 g, 2.01 mmol), compound **8** (1.40 g, 4.4 mmol), and dry K₂CO₃ (1.12 g, 8.10 mmol), dissolved in distilled CH₃CN, was stirred for 48 h at 60°C. The remaining K₂CO₃ was removed by filtration and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH gradient from 100:00 to 94:6) yielding compound **38** (1.2 mg, 45%) as a colourless oil.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.95 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.42 (s, 4H), 4.07 (m, 16H), 3.28 (d, ²*J*_{P-H} = 10.6 Hz, 8H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 24H).

Ligand L₇:

Formula: C₂₅H₃₁N₇O₁₂P₄

Molecular weight: M = 745.45 g. mol⁻¹.



Compound **38** (260 mg, 0.27 mmol) was dissolved in 6N HCl solution (10 mL) and was refluxed during 24 h. At room temperature a precipitate appears which was collected by centrifugation. The solid was washed in methanol and CH₂Cl₂ to give **L₇** (132 mg, 66%)

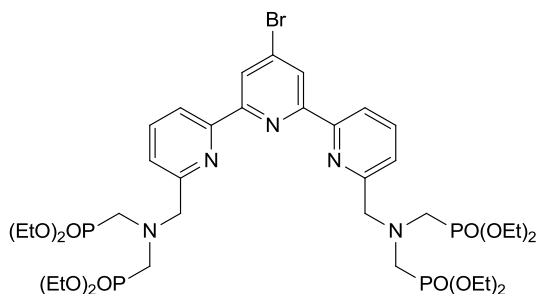
as a yellow powder.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 8.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.18 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.50 (s, 4H), 3.16 (d, ²*J*_{P-H} = 10.6 Hz, 8H).

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 19.53.

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 151.4, 145.4, 141.6, 138.7, 128.2, 125.3, 122.5, 122.1, 113.6, 110.0, 52.4 (t, *J* = 8.0Hz), 51.6 (dd, *J* = 150.5, 4.7Hz).

Compound 46:



Formula: C₃₇H₆₀BrN₅O₁₂P₄

Molecular weight: M = 970.70 g. mol⁻¹.

A schlenk tube containing compound **45** (375 mg, 0.75 mmol), compound **8** (477.6 mg, 1.51 mmol), and dry K₂CO₃ (415.6 mg, 3.01 mmol), dissolved in 40 mL of acetonitrile, was stirred for 14 h at 60°C. The remaining K₂CO₃ was removed by filtration and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH gradient from 100:00 to 90:10) yielding compound **46** (500 mg, 0.52 mmol) as a yellowish oil with a yield of 68%.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.56 (s, 2H), 8.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.8 (dd, *J*=*J*'=7.9 Hz, 2H), 7.59 (d, *J*=7.9 Hz, 2H), 4.20 (s, 4H), 4.02 - 4.17 (m, 16H), 3.26 (d, ²*J*_{P-H} = 9.7 Hz, 8H), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 24 H).

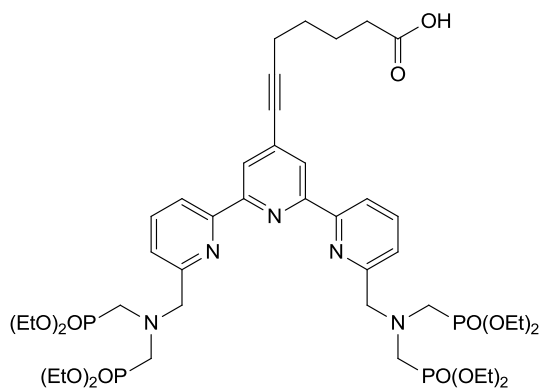
³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 24.39.

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ 16.48 (d, *J* = 6.0 Hz), 50.31 (dd, *J* = 158.1 Hz and *J* = 8.2 Hz), 62.00 (d, *J* = 7.0 Hz), 62.31, 119.83, 123.94, 124.29, 134.76, 137.36, 153.98, 156.53, 158.10.

ESI⁺/MS : $m/z = 994.2$ ($[M+Na]^+$, 75%).

Anal. Calcd. for $C_{37}H_{60}BrN_5O_{12}P_4 \cdot 3H_2O$: C, 43.37; H, 6.49; N, 6.83. Found: C, 43.03; H, 5.99; N, 6.88.

Compound 47:



Formula: $C_{44}H_{69}N_5O_{14}P_4$

Molecular weight: $M = 1015.94 \text{ g. mol}^{-1}$.

A schlenk tube containing compound **46** (380 mg, 0.39 mmol), 6-heptynoic acid 90% (66 mg, 0.47 mmol), $[Pd(PPh_3)_4]$ (14.04 mg, 0.02 mmol) dissolved in 25 mL of distilled THF and 8 mL of distilled NEt_3 was degazed with argon for half an hour. To this solution was added CuI (7.62 mg, 0.04 mmol). The mixture was stirred for 48 h at $60^\circ C$ and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in dichloromethane, washed with water and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to dryness under vacuum. Purification of the crude product was performed by column chromatography over silica gel ($CH_2Cl_2/MeOH$ gradient from 100:0 to 90:10) yielding compound **47** (300 mg, 0.30 mmol) as an oil with a yield of 75%.

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 8.46 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.42 (s, 2H), 7.81 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 4.23 (s, 4H), 4.03 – 4.19 (m, 16H), 3.33 (d, $J = 9.7$ Hz, 8H), 2.50 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.41 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 24 H).

^{31}P NMR ($CDCl_3$, 162 MHz): δ 24.69.

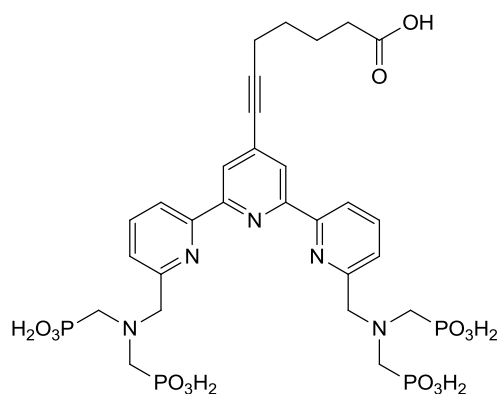
^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz): δ 16.46 (d, $J = 6.1$ Hz), 19.21, 24.27, 27.48, 33.78, 50.16 (dd, $J = 158.4$ Hz and $J = 8.7$ Hz), 62.17 (d, $J = 7.1$ Hz), 80.12, 94.91, 119.60, 123.03, 124.00, 133.87, 137.30, 154.98, 155.40, 157.73, 175.37, 207.08.

Ligand L₈:

Formula: $C_{28}H_{37}N_5O_{14}P_4$

Molecular weight: $M = 791.51 \text{ g. mol}^{-1}$.

Compound **47** (100 mg, 0.98 mmol) was dissolved in dichloromethane (10 mL) with lutidine (600 μL , 4.9 mmol) and $TMSBr$ (520 μL , 3.92 mmol) was added. The solution was stirred at r.t. for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure, the resulting residue was taken up with $MeOH$ (20 mL) and stirred for 2 h at room temperature. The evaporation, dissolution



procedure was repeated with MeOH (20 mL). The solvent was removed under vacuum and the addition of methanol resulted in the precipitation of a brown powder. After several washing steps with methanol, ligand **L₈** was obtained (150 mg, 65%).

¹H NMR (D₂O, 300 MHz): δ 1.73 (m, 4 H), 2.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.52 (d, ²*J*_{P-H} = 12.1 Hz, 8H), 4.92 (s, 4H), 7.65 (d, *J* = 7.5 Hz,

2H), 8.07 (m, 2H), 8.35 (m, 4H).

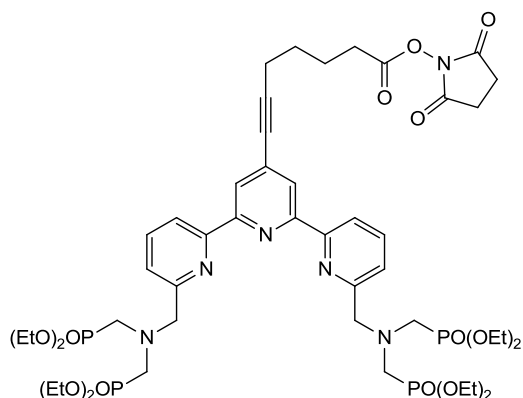
³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ 7.85.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 18.7, 25.1, 27.3, 36.4, 52.3 (d, *J*_{P-C} = 127 Hz), 60.0, 65.8, 122.3, 122.4, 124.4, 125.3, 134.8, 139.5, 154.8, 156.9, 182.9, 197.4.

ESI/MS: *m/z* = 790.1 ([**LH₈**]⁺, 15%), 617.1 ([**LH₈** - (CH₂PO₃H₂)]⁺, 100%).

Anal. Calcd. for C₂₈H₃₇N₅O₁₄P₄•H₂O: C, 41.54; H, 4.86; N, 8.65. Found: C, 41.79; H, 5.14; N, 8.18.

Compound 48:



Formula: C₄₈H₇₂N₆O₁₆P₄

Molecular weight: M = 1113.01 g. mol⁻¹.

To a solution of compound **47** (260 mg, 0.26 mmol) in 30 mL of dichloromethane, N-N'-Disuccinimidyl carbonate (117 mg, 0.39 mmol) and NEt₃ (140 μL) were added. The mixture was stirred at room temperature under inert atmosphere for 12 hours. The solvent was removed under

reduced pressure and the oily residue dissolved in dichloromethane. The solution was washed four times with an aqueous solution of NH₄Cl. The organic phase was washed with brine and dried to give compound **48** (260 mg, 0.23 mmol) as a yellowish oil (yield: quant.).

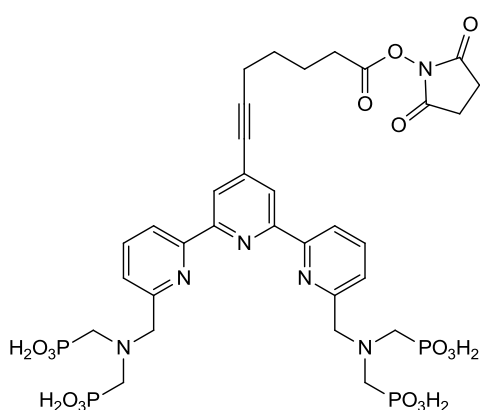
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 24H), 1.77 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 2.69 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 3.27 (d, ²*J*_{P-H} = 9.5Hz, 8H), 4.10 (q, *J* = 7.1Hz, 16H), 4.20 (s, 4H), 7.58 (d, *J* = 7.8Hz, 2H), 7.80 (dd, *J* = 7.7Hz, 2H), 8.37 (s, 2H), 8.44 (d, *J* = 8.2Hz, 2H).

³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ 24.47.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 16.5 (d, $J = 6.1$ Hz), 19.2, 23.9, 25.5, 27.4, 30.5, 50.28 (dd, $J = 158.6$ Hz, $J = 7.5$ Hz), 62.1, 67.7, 94.2, 119.6, 122.9, 123.9, 128.4, 132.0, 133.7, 137.3, 154.9, 155.4, 157.9.

ESI $^+$ /MS: $m/z = 1152.4$ ($[\text{LH}_8 + \text{K}]^+$, 10%), 617.1 ($[\text{LH}_8 - (\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2) + \text{Na}]^+$, 100%).

Ligand L₉:



Formula: $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 888.59$ g. mol $^{-1}$.

Compound **48** (260 mg, 0.24 mmol) was dissolved in dichloromethane (10 mL) with lutidine (1400 μL , 11.7 mmol) and TMSBr (1240 μL , 9.4 mmol) was added. The solution was stirred at r.t. for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure, the resulting residue was taken up with MeOH (20 mL) and stirred for 2 h at room temperature. The evaporation, dissolution procedure was repeated with MeOH (20 mL). The solvent was removed under vacuum and the addition of methanol allowed the precipitation of a brown powder. After few washing steps with methanol, ligand **L₉** was obtained as a lutidinium salt (100 mg).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): 8.46 (m, 2H with lutidine), 7.55 (m, 2H with lutidine), 8.19 (m, 4H), 7.71 (m, 2H), 4.98 (s, 4H), 3.62 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 12.2$ Hz, 8H), 2.88 (s, 4H), 1.75 (m, 2H), 2.79 (m, 2H), 2.64 (m, 6.5H with lutidine), 1.89 (m, 2H).

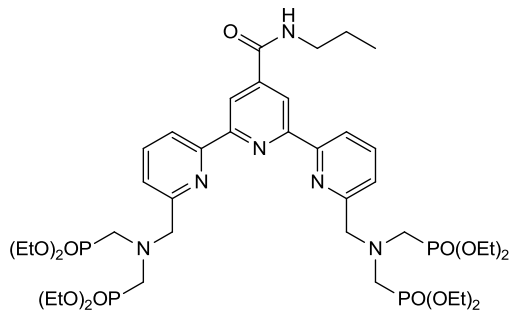
^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz): δ 8.37.

Compound 49:

Formula: $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 976.91$ g. mol $^{-1}$.

Compound **46** (580 mg, 0.60 mmol) was dissolved in a mixture of dried toluene (5 mL) and triethylamine (5 mL). Distilled propylamine (7.08 g, 120 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (42 mg, 0.06 mmol) was added to the flask, and a continuous flux of carbon monoxide was injected to the solution. After one night of stirring and heating at 100 $^\circ\text{C}$, Pd (0) precipitate has been removed after filtration and the volatile components eliminated under reduced pressure. The oily residue remaining was purified by flash chromatography, affording compound **49** (300 mg, 0.31 mmol) as a brown oil (yield: 52%).

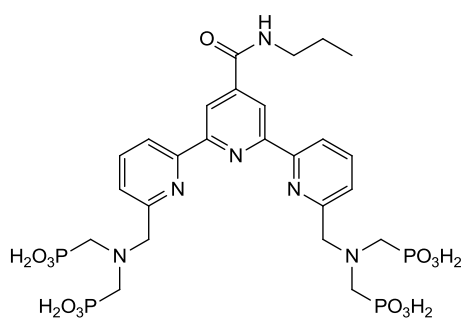


^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 9.00 (s, 2H), 8.49 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.44 (s, 1H), 7.82 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.5 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.24 (s, 4H), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 16H), 3.47 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.3 (d, $^2J_{\text{P-H}} = 8.9$ Hz, 8H), 1.71 (q, $J = 7.2$ Hz, 24H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.98 (q, $J = 7.1$ Hz, 3H).

^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 24.66.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 165.3, 157.6, 156.2, 155.0, 137.5, 123.8, 120.9, 119.8, 118.5, 62.0, 50.3 (d, $J = 159.6$ Hz), 42.0, 22.8, 16.5, 11.6.

Ligand **L**₁₀:



Formula: $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 752.48 \text{ g. mol}^{-1}$.

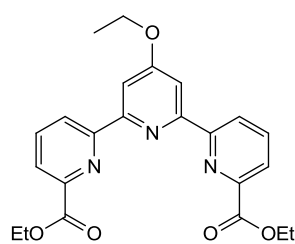
To a solution of compound **49** (150 mg, 0.15 mmol) in 15 mL of dichloromethane were added lutidine (825 mg, 7.7 mmol) and TMSBr (943mg, 6.2 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 15 hours. After this period, the volatile compounds were eliminated under reduced pressure, and the resulting white solid was dissolved in 10 mL of methanol. The solution was evaporated subsequently at room temperature and this last operation was repeated 4 times. The solid remaining has been washed with dichloromethane and with methanol affording ligand **L**₁₀ as a lutidinium salt (80 mg) with a yield of 62%.

^1H NMR (D_2O , 200 MHz): 8.53 (m, 2H), 8.11 (m, 4H), 7.48 (m, 6H), 3.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 8H), 3.18 (m, 2H), 1.58 (m, 2H), 0.90 (m, 3H). The 4 missing protons are probably under the solvent peak.

Compound **50**:

Formula: $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$

Molecular weight: $M = 421.45 \text{ g. mol}^{-1}$.



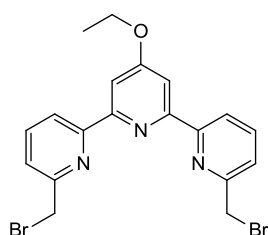
Pyridine **42** (600 mg, 1.56 mmol) was dissolved in 150 mL of ethanol and the solution was heated at reflux during 30 minutes. Triphenylphosphine (600 mg, 2.3 mmol) and DIAD (463 mg, 2.3 mmol) were then added and the mixture stirred and refluxed for 14 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the

oily residue purified by flash chromatography to give the compound as a white solid (400 mg, 0.95 mmol) with a yield of 60%.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.75 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 2H), 8.14 (s, 2H), 8.12 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 0.8$, 2H), 7.96 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.49 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 4.33 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.47 (m, 9H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 167.3, 165.3, 156.3, 147.8, 137.6, 125.0, 124.4, 108.4, 64.0, 61.8, 14.6, 14.4.

Compound 52:



Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}$

Molecular weight: $M = 463.17$ g. mol^{-1} .

The diester **50** (400 mg, 0.95 mmol) was dissolved in 100 mL of ethanol, NaBH_4 (144 mg, 3.8 mmol) was added and the mixture was heated at refluxing temperature for one hour. After cooling, the solvent was removed under reduced pressure and the solid obtained was dissolved in dichloromethane. The organic phase was washed with NH_4Cl saturated solution and product **51** was isolated as a white solid. Compound **51** was subsequently dissolved in dry DMF and PBr_3 (270 mg, 7.12 mmol) was added drop wise at room temperature. After one hour of stirring, the pH was adjusted to 7 by addition of a solution of NaHCO_3 , and then the aqueous solution was extracted with dichloromethane (3x150 mL). The organic phases were mixed and the solvent removed under reduced pressure. The oily residue was purified by flash chromatography, affording compound **52** (250 mg, 0.54 mmol) as a white solid in 56% yield for the two steps.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 8.25 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.79 (s, 2H), 7.57 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 4.64 (s, 4H), 4.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.52 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

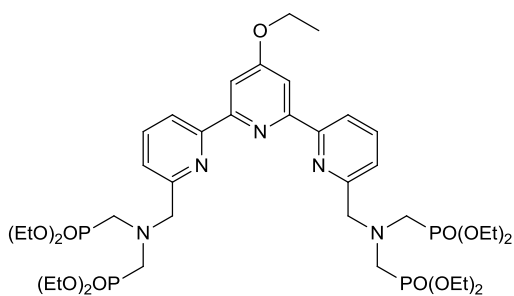
^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ 167.1, 156.6, 156.1, 155.8, 137.7, 123.4, 120.5, 107.5, 63.9, 34.2, 14.8.

Compound 53:

Formula: $\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_4$

Molecular weight: $M = 935.85$ g. mol^{-1} .

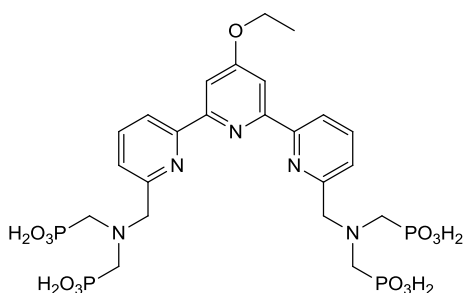
A schlenk tube containing compound **52** (150 mg, 0.33 mmol), compound **8** (317 mg, 0.68 mmol), and dry K_2CO_3 (179 mg, 1.3 mmol), dissolved in 300 mL of acetonitrile, was stirred for 14 h at 60°C . The remaining K_2CO_3 was removed by filtration and the solvent was



removed under reduced pressure. The resulting residue was directly purified by column chromatography over silica gel (CH₂Cl₂/MeOH gradient from 100:00 to 90:10) yielding compound **53** (100 mg, 0.11 mmol) as a yellowish oil with a yield of 34%.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 7.97 (s, 2H), 7.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.19 (m, 22 H), 3.31 (d, *J* = 10.2 Hz, 8H), 1.49 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 24 H).

Ligand L₁₁:



Formula: C₂₃H₃₃N₅O₁₃P₄

Molecular weight: M = 711.43 g. mol⁻¹.

To a solution of compound **53** (80 mg, 0.09 mmol) in 15 mL of dichloromethane was added TMSBr (547 mg, 3.6 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 15 hours. After this period, the volatile compounds were eliminated under reduced pressure, and the resulting white solid was dissolved in 10 mL of methanol. The mixture was allowed to react at room temperature during 10 hours and then the solvent was eliminated affording ligand **L₁₁** (50 mg, 0.07 mmol) with a yield of 80 %.

¹H NMR (D₂O, 300 MHz): δ 7.75 (m, 4H), 7.97 (s, 2H), 7.57 (m, 2H), 7.34 (d, 2H), 4.01 (m, 4H), 2.53 (m, 8H), 2.40 (m, 2H), 1.16 (m, 3 H).

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz): δ 7.82.

HPLC analysis

A Waters 2695 Alliance separation module equipped with a Waters 2996 photo array detector was used.

Analysis of ligand L₃:

Column: Symmetry C18 Waters; 4.6 x 75 mm (3.5 μ m)

Elution program: Solvent A = H₂O + 0.1% TFA (v/v) ; Solvent B = CH₃CN+ 0.1% TFA (v/v)

| Phase | Elution time | Flow rate | Mode | Solvents proportion |
|---------|--------------|------------|-----------|-------------------------------|
| Phase 1 | 3 min | 0.5 mL/min | Gradient | A : 95% → 86% B : 5% → 14% |
| Phase 2 | 17 min | 0.5 mL/min | Isocratic | A : 86% B : 14% |
| Phase 3 | 5 min | 0.5 mL/min | Gradient | A : 95% B : 5% |

Analysis of ligand L₃:

Column: Symmetry C18 Waters; 4.6 x 75 mm (3.5 μ m)

Elution program: Solvent A = H₂O + 0.1% TFA (v/v) ; Solvent B = CH₃CN+ 0.1% TFA (v/v)

| Phase | Elution time | Flow rate | Mode | Solvents proportion |
|---------|--------------|------------|-----------|-------------------------------|
| Phase 1 | 3 min | 0.5 mL/min | Gradient | A : 95% → 86% B : 5% → 14% |
| Phase 2 | 17 min | 0.5 mL/min | Isocratic | A : 86% B : 14% |
| Phase 3 | 5 min | 0.5 mL/min | Gradient | A : 95% B : 5% |

Analysis of Dreg55:

Column: Poros R1 1x 150mm (10 μ m) column (Applied Biosystems)

Elution program: Solvent A = H₂O + 0.1% TFA (v/v) ; Solvent B = CH₃CN+ 0.1% TFA (v/v)

| Phase | Elution time | Flow rate | Mode | Solvents proportion |
|---------|--------------|------------|-----------|--|
| Phase 1 | 5 min | 0.4 mL/min | Isocratic | A : 95% B : 5% |
| Phase 2 | 25 min | 0.4 mL/min | Gradient | A : 95% \rightarrow 15% B : 5% \rightarrow 85% |
| Phase 3 | 1 min | 0.4 mL/min | Gradient | A : 15% \rightarrow 05% B : 85% \rightarrow 95% |
| Phase 4 | 3 min | 0.4 mL/min | Isocratic | A : 05% B : 95% |

Analysis of L-selectin:

Column: Symmetry C18 3.5 μ m, 4.6 x 75 mm column (Waters)

Elution program: Solvent A = H₂O + 0.1% TFA (v/v) ; Solvent B = CH₃CN+ 0.1% TFA (v/v)

| Phase | Elution time | Flow rate | Mode | Solvents proportion |
|---------|--------------|------------|-----------|--|
| Phase 1 | 5 min | 0,5 mL/min | Isocratic | A : 95% B : 5% |
| Phase 2 | 25 min | 0,5 mL/min | Gradient | A : 95% \rightarrow 15% B : 5% \rightarrow 85% |
| Phase 3 | 1 min | 0,5 mL/min | Gradient | A : 15% \rightarrow 05% B : 85% \rightarrow 95% |
| Phase 4 | 3 min | 0,5 mL/min | Isocratic | A : 05% B : 95% |
| Phase 5 | 10 min | 0,5 mL/min | Gradient | A : 05% \rightarrow 95% B : 95% \rightarrow 05% |

FRET experiments: Buffers composition

| PBS buffer (for 0.8 kg of H₂O) | | Borate Buffer (for 1 kg of H₂O) | |
|--|----------|---|----------|
| Salt | Quantity | Salt | Quantity |
| NaCl | 8 g | H ₃ BO ₃ | 12.41 g |
| KCl | 0.2 g | KCl | 14.91 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 g | NaOH | 8 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.24 g | - | - |

- [1] Haas, Y.; Stein, G. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3668.
- [2] Ishida, H.; Tobita, S.; Hasegawa, Y.; Katoh, R.; Nozaki, K. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2449.
- [3] Olmsted, J. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 2581.
- [4] Valeur, B. In *Molecular Fluorescence*; Wiley: Weinheim, 2002.
- [5] Beeby, A.; M. Clarkson, I.; S. Dickins, R.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; S. de Sousa, A.; A. Gareth Williams, J.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 493.

Abréviations

| | |
|-------|---|
| ADN | Acide Désoxyribo-Nucléique |
| APP | Amyloïd Precursor Protein |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| CIS | Croisement Inter-Système |
| DFT | Density Functional Theory |
| DIEA | Diisopropyl Ethyl Amine |
| DMF | Diméthylformamide |
| DMSO | Diméthyl sulfoxide |
| DSA | Département des Sciences Analytiques |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| ESI | Electron Spray Ionization |
| FRET | Förtster Resonance Energy Transfer |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| HOMO | Highest Occupied Molecular Orbital |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| IPHC | Institut Pluri-Disciplinaire Hubert-Curien |
| LASER | Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation |
| LUMO | Lowest Unoccupied Molecular Orbital |
| MALDI | Matrix Assisted Light Desorption Ionization |
| NHS | N-hydroxysuccinimidyl |
| QD | Quantum Dots |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| TBS | Tris Buffer Saline |
| TEP | Tomographie par Emission de positrons |
| TFA | Trifluoro Acetic Acid |
| TMSBr | Triméthylbromosilane |
| TOF | Time of flight |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| UV | Ultraviolet |

Publications et communications

Communications par affiche :

« *Designing Ligands for the Synthesis of Luminescent Terbium and Europium Complexes* »

Avril 2012, Tarragone, Espagne
European f-Element Network

« *Luminescent Lanthanide Complexes Highly Stable in Biologic Media* »

Juin 2011, Santa Fe, USA
26th Rare Earth Research Conference

« *Looking at new antenna for luminescent lanthanide complexes* »

April 2010, Tübingen, Allemagne
Workshop COST D38 Action

Communications orales :

« *Synthesis and characterization of luminescent lanthanide labels* » (Anglais)

Août 2012, Udine, Italie
8th International Conference on f-Elements

« *Complexes luminescents d'ions lanthanides : application au FRET* »
(Français)

Janvier 2012, Strasbourg, France
Journées de Chimie de Coordination de la Société Chimique de France

Publications :

1. K. Nchimi Nono, A. Lecointre, M. Regueiro-Figueroa, C. Platas-Iglesias, L. J. Charbonnière, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1689.

« *Nonmacrocyclic Luminescent Lanthanide Complexes Highly Stable in Biological Media* »

2. L. Charbonnière, C. Christine, K. Nchimi Nono, A. Lecointre, French Patent application number 11/59210.

« *Chélatants Bifonctionnels Phosphonatés* »

Synthèse de complexes luminescents à base d'ions lanthanides pour le marquage de biomolécules

Résumé :

Ce travail de thèse visait la conception de marqueurs à base d'ions lanthanides pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer, à travers un transfert d'énergie avec des nanocristaux semi-conducteurs luminescents. Notre choix s'est porté sur des ligands polyaminophosphonates de type pyridine-bis-pyrazolyl rendus réactifs vis-à-vis des biomolécules par la présence de groupements activés.

Nous présentons la synthèse d'un ligand modèle incorporant seulement l'unité de photosensibilisation tridentate et des groupes phosphonates. À partir de ce ligand, les complexes d'euprium et de terbium synthétisés ont été caractérisés. Une grande stabilité et des propriétés de luminescence avantageuses ont été mises en évidence par nos études, notamment en ce qui concerne le complexe de terbium. Une méthode synthèse de ligands de ce type, fonctionnalisés par la présence de groupements réactifs a été développée et le marquage de biomolécules dont des marqueurs de la maladie d'Alzheimer a été réalisé avec succès.

La synthèse d'un autre ligand phosphonate associé de façon covalente à la biotine et l'utilisation de son complexe de terbium comme donneur d'énergie a permis de réaliser des expériences de transfert d'énergie avec divers accepteurs luminescents dont des nanocristaux semi-conducteurs.

Mots clés : lanthanides, FRET, maladie d'Alzheimer, nanocristaux semi-conducteurs, biotine.

Abstract:

This work aimed at the design of markers with lanthanides ions for the early diagnosis of the Alzheimer's disease, through an energy transfer with luminescent quantum dots. Our choice focused on polyaminophosphonated ligands bearing a pyridine-bis-pyrazolyl moiety and made reactive towards biomolecules by the presence of activated groups.

We present in the synthesis of a model ligand incorporating only the tridentate photosensitization unit and phosphonate moieties. From this ligand, europium and terbium complexes have been synthesized and characterized. An important stability and advantageous luminescence properties were revealed by our studies, especially for the terbium complex.

Then a method of synthesis of ligands of this type, functionalized by the presence of reactive groups was developed and labeling experiments were carried out with several biomolecules among which some Alzheimer's disease biomarkers.

The synthesis of another ligand linked covalently to biotin and the use of the corresponding terbium complex allow the study of FRET with various luminescent energy acceptors among which some quantum dots.

Key words: lanthanides, FRET, Alzheimer disease, quantum dots, biotin.