



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Chimie-Biologie-Santé

Présentée et soutenue par Ghassan BECHARA
Le 5 juillet 2010

Titre : *Ligands macrocycliques d'ions Lanthanide : Synthèse et évaluation comme marqueurs luminescents*

JURY

M. Paul Louis FABRE
M. Franck SUZENET
M. Hervé BAZIN
M. Claude PICARD

Professeur UPS-Toulouse
MCF, HDR-Université d'Orléans
Ingénieur, HDR-Cis bio international
DR CNRS, UPS-Toulouse

Président
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Sciences de la Matière*
Unité de recherche : *LSPCMIB - UMR 5068, 31062 Toulouse cedex 9*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. Claude PICARD*
Rapporteurs : *Franck SUZENET et Hervé BAZIN*

A la mémoire de

Mon oncle Miled

et

Métropolitte Boulos BANDALI

Remerciements,

J'ai effectué ce travail de thèse au laboratoire de Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique dirigé par M. Michel Baltas.

Je voudrais remercier M. Paul Louis FABRE, M. Hervé BAZIN et M. Franck SUZENET pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de porter ce jugement sur ce travail de thèse.

Je remercie mon gentil directeur de thèse, M. Claude PICARD, de m'avoir accepté au sein de son équipe et qui m'a enrichi par ses conseils et son expérience.

Merci aussi à ma deuxième famille (membres de l'équipe), Chantal, Béa, Nadine (Incité), Eric, Alex et à tous les SPCMI Biens : Alain, Marie, Chantal Z., Chantal C., Jean Marc, Evelyne, Sébastien, Corinne, Marie Pierre...

Pour terminer, je voudrais remercier ma famille, en particulier mes parents et mes frères, pour m'avoir soutenu pendant ces années pas toujours faciles, ainsi que tous mes amis qui se reconnaîtront ici.

Comment pourrais je ne pas citer et remercier ma mignonne « M.S.B » Suzanne.

Choukran Jazilan

Table des Matières

Table des Matières

Table des Matières

Introduction générale.....	13
Chapitre I : Marqueurs fluorescents et complexes de Lanthanides.....	17
I Marqueurs fluorescents	19
I.1. Introduction	19
I.2. Fluorophores organiques	21
I.3. Fluorophores inorganiques.....	23
I.4. Fluorophores organométalliques	24
II Luminescence des ions lanthanide.....	28
II.1. Effet d'antenne.....	30
II.2. Processus de désactivation non radiative.....	32
III Edifices Ln(III) luminescents	35
III.1. Les cryptands.....	36
III.2. Les macrocycles multibranchés.....	37
III.3. Les ligands acycliques.....	38
III.4. Les podands	39
IV Applications des complexes Ln(III) fluorescents en biologie.....	40
IV.1. Sondes à pH.....	40
IV.2. Sondes à anions	41
IV.3. Sondes à cations	43
IV.4. Dosages d'activités enzymatiques.....	44
IV.5. Hybridation d'oligonucléotides.....	49
IV.6. Fluoroimmunodosages	50
IV.7. Imagerie de fluorescence.....	51
IV.8. Sondes bimodales pour l'imagerie	54
V Objectifs de ce travail	56
VI Bibliographie.....	60
Chapitre II : Synthèse de ligands macrocycliques à motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique et intégrant un chromophore intracyclique.....	65
I Introduction	67
II Rappels bibliographiques sur les voies d'accès aux polyazamacrocycles.....	71
II.1. Stratégie 1 : Cyclisation / Alkylation.....	71
II.2. Stratégie II : Alkylation/Cyclisation	80
II.3. Bilan de la revue bibliographique	83

Table des Matières

III Préparation du synthon tétraester dérivé de la triéthylènetétraamine.....	85
III.1. Première voie d'accès étudiée	85
III.2. Seconde voie d'accès étudiée	87
IV Macrocycles (Poly) Pyridines L ₁ -L ₃	97
IV.1. Précurseurs hétérocycliques dibromés	97
IV.2. Réactions de Macrocyclisation.....	101
IV.3. Obtention des Ligands L ₁ -L ₃	108
V Macrocycles bifonctionnels Pyridine et 2,2'-Bipyridine L ₄ et L ₅	110
V.1. Précurseurs hétérocycliques dibromés.....	110
V.2. Obtention des ligands L ₄ et L ₅	114
VI Macrocycles dérivés du motif mixte Pyridine-Pyrazole L ₆ -L ₈	116
VI.1. Précurseurs hétérocycliques dibromés	116
VI.2. Réactions de Macrocyclisation.....	120
VI.3. Obtention des ligands L ₆ -L ₈	124
VII Conclusion	126
VIII Bibliographie	128
Chapitre III : Etude des propriétés photophysiques des complexes Eu³⁺, Tb³⁺ dérivés des ligands macrocycliques à motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique.....	133
I Macrocycles incorporant un chromophore pyridine (L ₁), bipyridine (L ₂ , L ₅), terpyridine (L ₃).....	135
I.1. Propriétés d'absorption des ligands et de leurs complexes avec Eu ³⁺ et Tb ³⁺	139
I.2. Propriétés de luminescence des complexes Eu ³⁺ et Tb ³⁺	141
I.3. Stabilité des complexes en solution aqueuse	160
II Macrocycles incorporant un chromophore pyridine-pyrazole (L ₆), pyridine-pyrazole-pyridine (L ₇), pyrazole-pyridine-pyrazole (L ₈).....	169
II.1. Propriétés d'absorption des ligands et de leurs complexes Eu ³⁺ et Tb ³⁺	171
II.2. Propriétés photophysiques des complexes Eu ³⁺ et Tb ³⁺	172
II.3. Application de la technique de LRET au cas du complexe L ₆ Tb.....	176
III Conclusion	182
IV Bibliographie	186
Chapitre IV : Synthèse et propriétés photophysiques de complexes Eu(III) et Tb(III) dérivés du DOTA incorporant un chromophore extracyclique à motif N,C-pyrazolyl-pyridine	189

Table des Matières

I Schéma de synthèse.....	192
II Synthèse des ligands	195
II.1. Synthèse des chromophores N,C-pyrazolypyridine	195
II.2. Synthèse du DO3AtBu (87).....	199
II.3. Synthèse des ligands L ₉ , L ₁₀ , L ₁₁	200
III Propriétés photophysiques des ligands L ₉ , L ₁₀ et L ₁₁ et de leurs complexes Eu ³⁺ et Tb ³⁺	202
III.1. Spectres d'absorption des ligands L ₉₋₁₁ et de leurs complexes.....	202
III.2 Propriétés de luminescence des ligands libres et de leurs complexes Gd ³⁺	203
III.3. Propriétés de luminescence des complexes Eu ³⁺ et Tb ³⁺	206
IV Cinétiques de complexation des ligands L ₉₋₁₁ en tampon Tris, 50 mM pH 7,4.	211
V Etude comparative des propriétés luminescentes de complexes Tb(III) dérivés de ligands à motif N,C-pyrazolypyridine.....	212
VI Conclusion.....	214
VII Bibliographie.....	215
Chapitre V : Partie expérimentale.....	217
I Général	219
II Partie synthèse des composés	220
III Partie Photophysique	276
IV Bibliographie	281
Conclusion générale	283

Introduction

Introduction générale

Introduction

Introduction

Les complexes fluorescents d'ions lanthanide (notamment Eu^{3+} et Tb^{3+}) présentent des durées de vie d'émission particulièrement longues ($\tau > 100 \mu\text{s}$ en solution aqueuse et à température ambiante), autorisant ainsi des détections résolues dans le temps. Cette propriété a permis à cette catégorie de marqueurs fluorescents de connaître depuis plusieurs années un fort développement au niveau d'applications biologiques et biomédicales : études d'interactions entre biomolécules, fluoroimmunosages, microscopie de fluorescence, Elle permet en effet de s'affranchir totalement des interférences dues à la fluorescence naturelle ($< 10 \text{ ns}$) des différents composants des milieux biologiques.

Un complexe Ln(III) fluorescent efficace doit être évidemment caractérisé par une durée de vie d'émission et un rendement quantique élevés. Cependant, d'autres caractéristiques telles que solubilité et stabilité cinétique du complexe en milieu aqueux peuvent être critiques et doivent être contrôlées si l'on s'intéresse à des applications en milieu biologique. Ces différentes contraintes expliquent le nombre relativement peu élevé de complexes Ln^{3+} exploités à ce jour pour ce type d'applications.

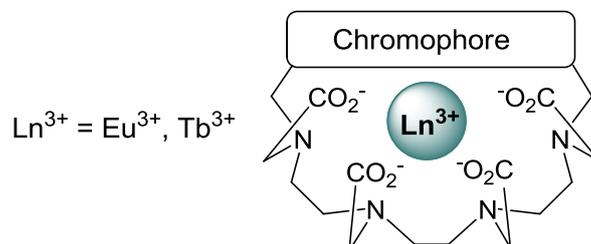
Dans ce contexte, nos recherches ont porté sur la synthèse de 11 nouveaux ligands macrocycliques polyaminocarboxyliques intégrant un chromophore intracyclique ou extracyclique et sur l'étude des propriétés photophysiques des complexes Eu(III) et Tb(III) correspondants.

Dans le premier chapitre introductif, nous présenterons l'intérêt de l'utilisation de la fluorescence des complexes organiques d'ions lanthanide et nous décrirons les différents processus directement impliqués au niveau de leurs propriétés de fluorescence. Après avoir établi les différents critères à prendre en compte pour l'élaboration de ligands efficaces pour la photosensibilisation des ions Eu(III) et Tb(III) en milieu aqueux, nous présenterons quelques exemples choisis de l'utilisation de ces complexes dans les domaines de la bioanalyse. Nous terminerons ce chapitre par la présentation des différents ligands que nous avons prévus de synthétiser.

Le second chapitre sera consacré à la synthèse de macrocycles de 15 à 21 chaînons dérivés d'un squelette acide triéthylène tétraamine tétraacétique (TTTA) assurant la solubilité

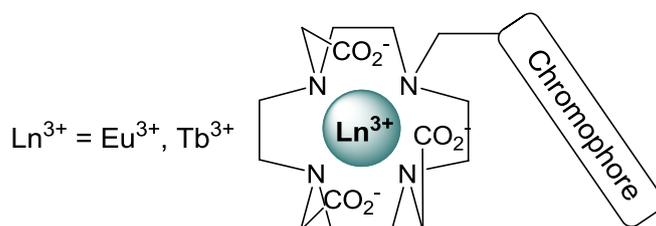
Introduction

et la stabilité des complexes en milieu aqueux et d'un motif chromophore (mono, bi, tri-hétérocycle) intracyclique permettant de collecter la lumière et de transférer l'énergie à l'ion lanthanide.



Dans un troisième chapitre, nous présenterons les propriétés photophysiques des complexes d'euprium(III) et de terbium(III) dérivés de ces ligands : durées de vie et rendements quantiques d'émission, constantes de vitesse des processus de désactivation non radiatifs dépendants ou non de la température. La technique de fluorescence sera également mise à profit pour évaluer la stabilité de ces complexes dans différents milieux aqueux et biologiques. Dans une dernière partie, nous utiliserons l'un de ces complexes pour une expérience de technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence.

Nous nous intéresserons dans le chapitre suivant à la synthèse de trois ligands macrocycliques dérivés du cyclène (1,4,7,10-tétraazacyclododécane) fonctionnalisés par trois groupements acide acétique et un motif chromophore *N,C*-pyridine-pyrazole. Les propriétés de fluorescence de leurs complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} seront également décrites et commentées.



Le dernier chapitre de ce manuscrit regroupera les protocoles expérimentaux que nous avons utilisés pour l'obtention de ces différents ligands et de leurs intermédiaires.

**Chapitre I : Marqueurs fluorescents et
complexes de Lanthanides**

Chapitre I

Chapitre I

Dans une introduction générale intitulée "marqueurs fluorescents" nous essaierons de classer et de décrire les différentes catégories de marqueurs fluorescents disponibles pour des applications dans le domaine de la biologie, en mettant l'accent sur leurs limitations pour ce type d'applications. Après avoir relevé dans cette première partie l'intérêt des complexes organiques d'ions lanthanides fluorescents dû à leur très longue durée de vie d'émission à température ambiante et en milieu aqueux, nous décrirons les différents phénomènes d'activation et de désactivation photophysiques impliqués pour cette famille de fluorophores. Nous donnerons ensuite un aperçu des différentes classes de ligands utilisés pour la complexation et la photosensibilisation des ions lanthanide en milieu aqueux et nous essaierons de convaincre le lecteur de la potentialité de ces complexes comme outils de diagnostic fluorescent dans le domaine de la biologie par quelques exemples pertinents. Nous introduirons ensuite la notion relativement récente de sondes bimodales associant deux techniques d'analyse dont la technique de fluorescence, et nous concluons ce chapitre par la présentation des objectifs de nos travaux et des molécules que nous avons prévues de synthétiser dans ce cadre.

I Marqueurs fluorescents

I.1. Introduction

La fluorescence est un processus dans lequel un atome ou une molécule absorbe de la lumière à une longueur d'onde et la réémet très rapidement à une autre longueur d'onde. Dans cette technique, les domaines d'excitation et d'émission recouvrent les domaines UV-Visible et proche IR. Parmi les méthodes physiques d'investigation, la fluorescence est caractérisée par sa grande sensibilité d'analyse (jusqu'à la visualisation de molécules uniques) et ses résolutions (spectrale, spatiale, temporelle et d'orientation). Par ailleurs, associée à une instrumentation optique adaptée, la mesure de fluorescence peut être envisagée en terme de spectroscopie et de microscopie optique.

La spectroscopie de fluorescence en général s'est donc avérée être une méthode de détection efficace et relativement accessible pour résoudre des problèmes analytiques

Chapitre I

complexes dans des domaines tels que les sciences de l'environnement, le diagnostic médical et la biologie. Dans le cadre d'applications biologiques, l'utilisation de marqueurs fluorescents est une technique d'analyse de choix: elle permet la détection et le suivi en temps réel d'espèces d'intérêt biologique.

A titre d'exemples nous citerons les applications suivantes:

- Dosages immunologiques, dosages d'ions bioactifs et d'analytes.
- Cinétiques enzymatiques.
- Etude de protéines (changements de conformation induits par des variations du milieu, distances, sites de liaison,). et d'acides nucléiques (puces à ADN, hybridation, photoclivage,).
- Mise en évidence d'interactions protéine-ligand, protéine-acide nucléique, protéine-sucre.
- Etude de membranes biologiques (caractérisation de la bicouche, micropolarité, microviscosité, ...).
- Triage de cellules vivantes (cytométrie en flux)
- Etude de cellules vivantes (perméabilité de la membrane, endocytose, activité cytotoxique, cycle cellulaire, dynamique des compartiments cellulaires, ...).
- Etude du protéome et du génome dans la cellule vivante à l'aide de protéines rapporteurs fluorescentes (les applications de la GFP -Green Fluorescent Protein- ont été couronnées par le prix Nobel de chimie décerné à O. Shimomura, M. Chalfie et R. Tsien en 2008).

La mise en œuvre de la grande majorité de ces applications

(i) fait intervenir différentes techniques de fluorescence: par exemple le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) utilisé pour mesurer la diffusion de protéines dans la cellule, le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) utilisé pour détecter des interactions moléculaires, le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) utilisé pour l'interprétation des images d'intensité.

(ii) nécessite l'emploi de marqueurs de fluorescence (fluorophores) en mettant à profit leurs caractéristiques optiques (coefficient d'extinction molaire, longueur d'onde d'absorption, longueur d'onde d'émission, durée de vie de l'état excité (τ), rendement quantique de fluorescence (Φ)).

En dehors des biomolécules fluorescentes (GFP par exemple), on peut distinguer trois grandes familles de fluorophores: 1) composés organiques, 2) composés inorganiques (Quantum Dots), 3) composés organométalliques.

I.2. Fluorophores organiques

La plupart des sondes fluorescentes disponibles pour des applications biologiques et biomédicales sont des molécules organiques (fluorophores). Il suffit pour cela de se reporter au catalogue "Molecular probes"⁽¹⁾ qui met à la disposition de biologistes et de biochimistes des biomarqueurs fluorescents, souvent fonctionnalisés mais à des prix souvent dissuasifs. Quelques exemples de ces fluorophores organiques ont été rassemblés dans la figure 1.

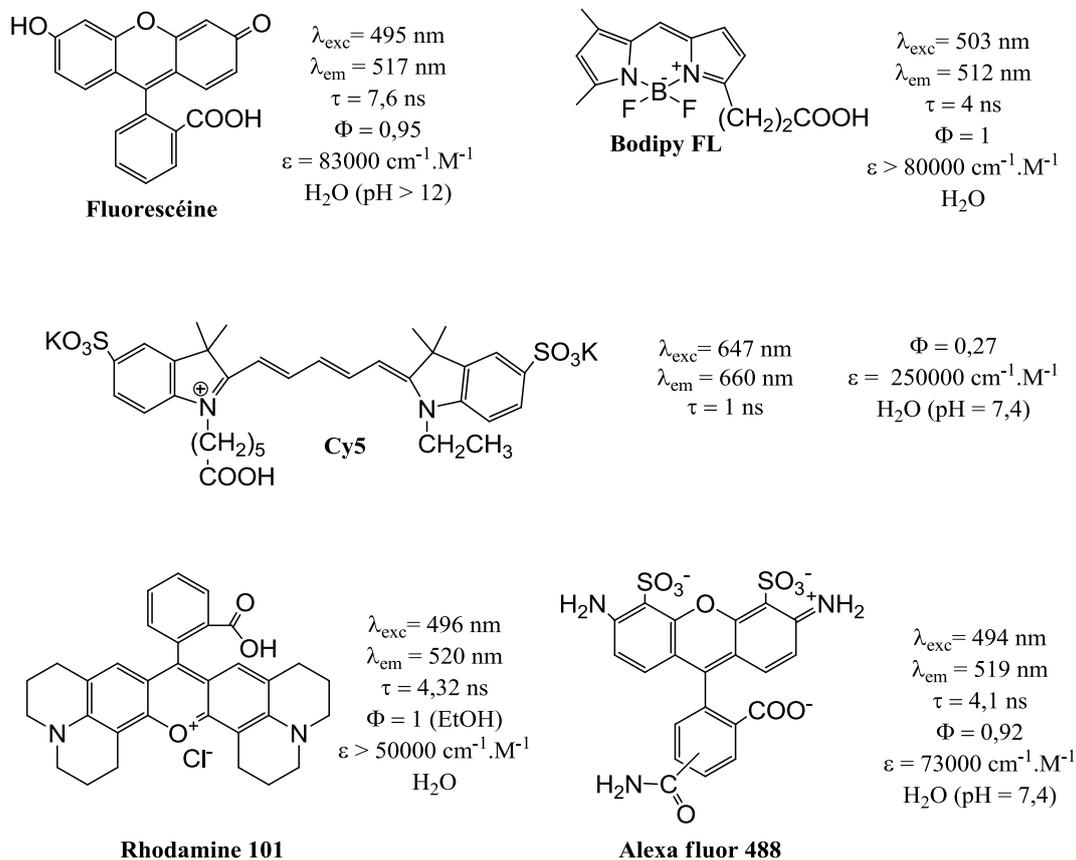


Figure 1. Exemples de fluorophores organiques et leurs caractéristiques de fluorescence.

Bien que largement utilisés, ces fluorophores souffrent encore de quelques défauts qui diminuent leur champ d'action dans le domaine de la biologie. On peut citer notamment :

(i) Leur faible déplacement de Stokes, c'est-à-dire que leurs bandes d'absorption et d'émission sont très proches en énergie. Dans les exemples donnés (Figure 1), ce déplacement

Chapitre I

de Stokes est compris entre 348 et 974 cm^{-1} . Le signal mesuré peut ainsi être parasité par la bande de diffusion Rayleigh (réémission, à la même longueur d'onde, d'une petite fraction de la lumière excitatrice) et la sensibilité de la mesure diminuée par la présence de phénomènes de réabsorption. Dans le cas de la technique de transfert d'énergie FRET utilisant deux fluorophores organiques, on peut avoir une excitation directe de l'accepteur.

(ii) Leur bande d'émission large qui recouvre un domaine d'une centaine de nanomètres, ceci limite la possibilité d'utiliser plusieurs sondes fluorescentes lors d'une même expérience (dosages multiplex).

(iii) Leur sensibilité au phénomène de photoblanchiment (photobleaching), qui est un processus irréversible de destruction de la molécule fluorescente lors d'une exposition prolongée aux rayonnements. Lors d'une irradiation par une source lumineuse, une molécule fluorescente à l'état excité peut soit émettre un photon, soit être impliquée dans une réaction photochimique qui va entraîner sa dégradation et empêcher ainsi son retour à un état excitable. Ces réactions peuvent se produire au sein de la molécule fluorescente, entre molécules fluorescentes ou avec d'autres molécules présentes dans le milieu (par exemple avec l'oxygène sous forme de radicaux libres). A chaque fois qu'on excite un fluorophore, celui-ci fluoresce de moins en moins jusqu'à extinction de la fluorescence. La fluorescéine, l'acridine orange ou le BODIPY ont une cinétique de photoblanchiment rapide. Ainsi par exemple, seulement 17% de l'intensité initiale de fluorescence de la fluorescéine est conservée après 33 minutes d'irradiation à l'aide d'un spectrophotomètre.⁽²⁾ On notera toutefois que ce phénomène de photoblanchiment est mise à profit dans certaines techniques de fluorescence telles que le FRAP.

(iv) Leur sensibilité à « l'autoquenching » qui limite le nombre de sondes fluorescentes que l'on peut conjuguer à un vecteur biologique (et donc la sensibilité d'analyse). Ainsi Voss et al.⁽³⁾ ont montré que le couplage covalent de 25 molécules de fluorescéine sur la protéine BSA entraîne une extinction de fluorescence de 98%.

(v) Leur durée de vie d'émission de fluorescence relativement courte (de l'ordre de la nanoseconde).

Ce dernier point prend toute son importance lorsque l'on désire réaliser des analyses en milieu biologique. En effet, certains composants biologiques (acides aminés aromatiques, bases puriques ou pyrimidiques, NADH, ...) que l'on nomme fluorophores intrinsèques, génèrent un signal de fluorescence entre 320 et 600 nm et présentent une durée de vie de fluorescence analogue à ces marqueurs traditionnels (de l'ordre de la nanoseconde). Les

Chapitre I

principales caractéristiques photophysiques de fluorophores intrinsèques cellulaires sont rassemblées dans le tableau 1.

Composé	Absorption		Fluorescence		
	λ_{\max} (nm)	ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	Φ	τ_F (ns)
Tryptophane	280	5600	348	0,20	11
Tyrosine	274	1400	303	0,14	2
Phénylalanine	257	200	282	0,04	0,08
Y-base*	320	1300	460	0,07	0,91
Adénine	260	13400	321	2,6 10 ⁻⁴	0,032
Guanine	275	8100	329	3 10 ⁻⁴	0,024
Cytosine	267	6100	313	0,8 10 ⁻⁴	0,005
Uracile	260	9500	308	0,4 10 ⁻⁴	0,004
NADH	340	6200	470	0,019	1,2

Tableau 1. Caractéristiques photophysiques des principaux fluorophores cellulaires. * ARN de transfert de levure (t-ARN).

Cette autofluorescence des milieux à analyser conduit donc à des signaux parasites qui augmentent considérablement le bruit de fond au détriment du signal spécifique du marqueur fluorophore. Cette limitation peut être contournée, en partie, en utilisant un fluorophore qui peut être excité à une longueur d'onde supérieure à 500 nm qui ne correspond pas aux longueurs d'onde d'excitation du milieu biologique.

I.3. Fluorophores inorganiques

Les Quantum Dots sont des cristaux semiconducteurs de formes sphériques et de dimensions nanométriques qui présentent des propriétés de fluorescence ajustables par le contrôle de leur diamètre. Ils présentent des propriétés optiques qui permettent de reculer certaines limitations inhérentes aux fluorophores organiques. Ils sont en effet caractérisés par une bande d'émission étroite et symétrique, une durée de vie d'émission plus longue (10-100 ns, typiquement), une meilleure brillance ($\epsilon \times \Phi$) due à un fort coefficient d'extinction molaire, une meilleure résistance au photoblanchiment. Ils permettent également de visualiser simultanément des colorants de couleurs différentes. Ainsi dans le cas de Quantum Dots formés de CdSe/ZnS et pour une même longueur d'onde d'excitation de 450 nm, les particules de 2 nm de diamètre émettent autour de 520 nm, tandis que celles de 6 nm émettent autour de 620 nm.

L'appellation nanoparticules de ces quantum dots et leur structure inorganique qui contient le plus souvent des métaux lourds présentant une toxicité aiguë et chronique (Cd, Se, Te, etc...) peuvent constituer malgré tout un frein à leur développement.

I.4. Fluorophores organométalliques

Les complexes organométalliques (complexes de métaux de transition et complexes d'ions lanthanide) présentent d'une manière générale des rendements quantiques d'émission plus faibles que les fluorophores organiques mais sont caractérisés par une très longue durée d'émission à température ambiante (μs / ms).

Un certain nombre de complexes métalliques dérivés de ligands polypyridine et de métaux de transition notamment le ruthénium(II),⁽⁴⁾ rhénium(I),^(5,6) rhodium(III),⁽⁷⁾ iridium(III)⁽⁸⁾ et platine(II)⁽⁹⁾ ont été rapportés comme marqueurs biologiques fluorescents potentiels. Quelques exemples sont représentés dans la figure 2.

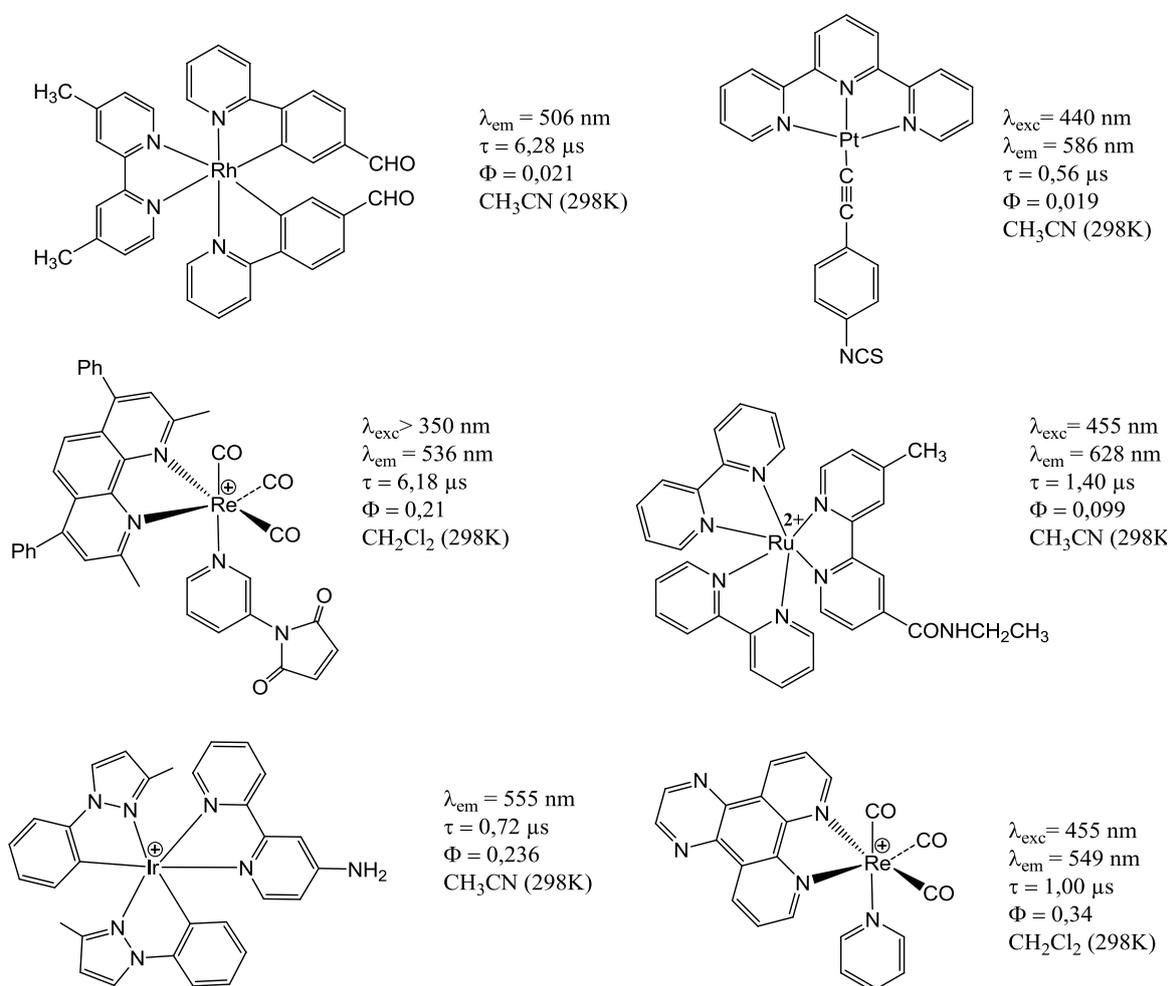


Figure 2. Exemples de complexes de métaux de transition fluorescents et leurs caractéristiques de luminescence.

Ils développent une émission dans le domaine du visible (500-600 nm) et une durée de vie d'émission de l'ordre de la microseconde. Dans le cas de la plupart de ces complexes, cette

émission correspond à une relaxation radiative d'un état triplet à transfert de charge $^3\text{MLCT}$ ($d\pi(\text{M}) \rightarrow \pi^*(\text{N-N})$) vers l'état fondamental. Il est à noter qu'un certain nombre de travaux relatent la bioconjugaison de ces complexes.

La seconde catégorie de complexes organométalliques fluorescents présentant un intérêt dans le domaine de la biologie est constituée par les complexes d'ions lanthanide Ln(III). Dans la série des lanthanides plusieurs ions ont la faculté d'émettre une radiation dans le visible ou le proche infrarouge lorsqu'ils sont soumis à une excitation lumineuse. Les ions terbium(III) et europium(III) présentent des durées de vie d'émission de l'ordre de la milliseconde et émettent dans le vert ($\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$) et le rouge ($\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$), respectivement. Ce sont actuellement les ions Ln(III) les plus utilisés pour la bioanalyse et le diagnostic médical comme en témoigne la commercialisation de plusieurs de ces complexes (Figure 3).⁽¹⁰⁾

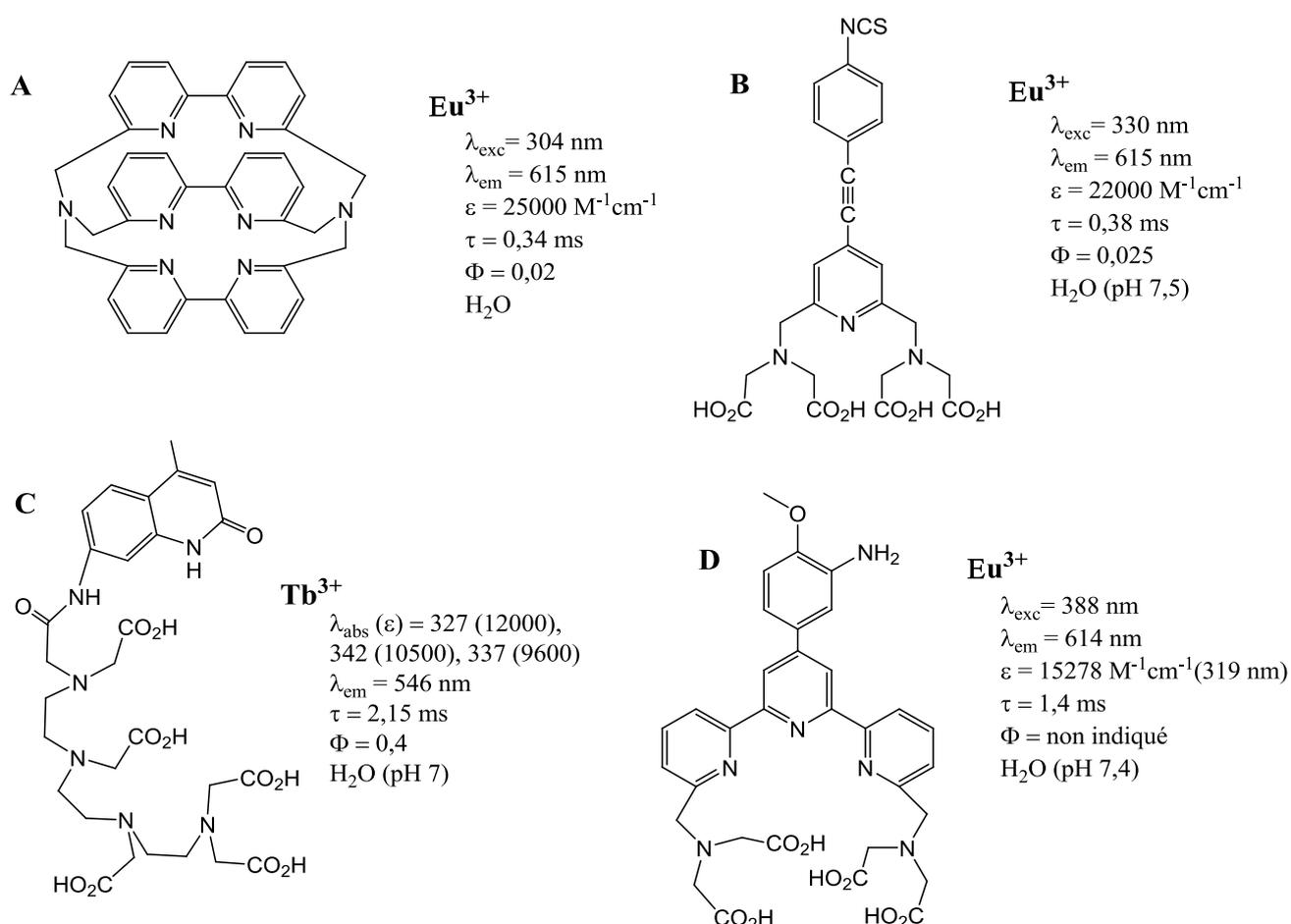


Figure 3. Exemples de ligands photoactifs d'ions Eu^{3+} et Tb^{3+} développés par CISBIO International (A), Perkin Elmer Life Sciences (B), Invitrogen (C) et Amersham (D).

Chapitre I

Les ions Samarium(III) (émission orange, $\lambda_{em} = 590$ nm) et Dysprosium(III) (émission jaune-orange, $\lambda_{em} = 570$ nm) caractérisés par des durées de vie d'émission plus faibles (10 – 100 μ s) sont également employés. L'utilisation des ions Ln(III) émettant dans l'infrarouge (Nd(III) : $\lambda_{em} = 1065$ nm, Er(III) : $\lambda_{em} = 1509$ nm et Yb(III) : $\lambda_{em} = 978$ nm) est actuellement en cours d'études. Caractérisés par une durée de vie d'émission de l'ordre de la microseconde et par un rendement quantique assez faible (souvent $< 1\%$), leur intérêt réside dans leur capacité à être excités dans le domaine du visible et d'émettre dans le proche infrarouge, et donc susceptible d'être utilisés *in vivo* du moins chez le petit animal. L'ion Gd(III) dont les complexes sont utilisés comme agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) est peu utilisé car son émission, dans l'ultraviolet, interfère avec les processus d'absorption ou d'émission des composés organiques et biologiques.

En dehors de leur longue durée de vie d'émission, ces complexes d'ions Ln(III) présentent des déplacements de Stokes relativement importants (supérieur à 10000 cm^{-1} pour les exemples rapportés dans la figure 3) et sont résistants au phénomène de photoblanchiment. D'autre part, contrairement aux fluorophores cités précédemment, leurs spectres d'émission sont constitués par plusieurs bandes d'émission fines (quelques nanomètres). Cette dernière caractéristique permet de les utiliser en tant que sondes fluorescentes simultanément pour doser de deux à quatre composés différents dans une même solution (analyses multiplex).

Bien que présentant des rendements quantiques de fluorescence plus faibles que les fluorophores organiques, tout l'intérêt de ces complexes organométalliques à durée de vie d'émission supérieure à $1\ \mu$ s réside dans leur association avec la technique de fluorescence en temps résolu.

En effet cette technique permet d'éliminer tous les artefacts lumineux dus à l'appareillage et à l'autofluorescence des milieux biologiques. Le principe de cette technique est schématisé dans la figure 4.

Dans le cadre de cette technique, une courte impulsion de lumière est envoyée sur l'échantillon, provoquant l'excitation de toutes les molécules fluorescentes du milieu d'analyse. La décroissance du signal des biofluorophores à courte durée de vie d'émission (\sim ns) sera beaucoup plus rapide que celle des fluorophores à longue durée de vie d'émission ($>$ $1\ \mu$ s). En respectant un délai (Td) suffisamment long avant l'analyse du signal lumineux, celui

dû à l'autofluorescence du milieu s'éteint en premier et ne subsiste que celui dû au marqueur fluorophore. Ainsi seul le signal émis par le marqueur est pris en compte, ce qui augmente considérablement le rapport signal / bruit de fond. De plus, il est possible d'accumuler le signal du marqueur pendant un temps (T_g) proportionnel à sa durée de vie d'émission, améliorant d'autant la sensibilité de la mesure.⁽¹¹⁾

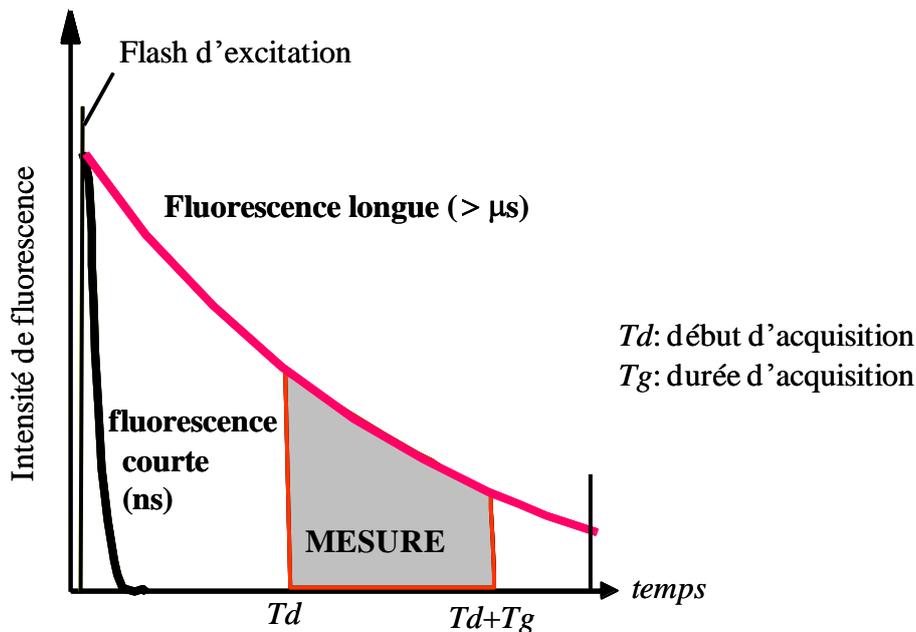


Figure 4. Principe de la technique de fluorescence en temps en résolu.

En supposant que l'intensité de fluorescence du signal d'autofluorescence (I_{auto}) est 1000 fois plus élevée que celui du marqueur (I_{marq}) au temps zéro et que la durée de vie d'émission des 2 signaux est de 10 ns et de 1 μs respectivement, le rapport des intensités $I_{\text{auto}} / I_{\text{marq}}$ sera de 88/12, 5/95 et 0 après des délais de 50, 100 et 150 ns.

L'analyse est rapide, s'effectuant en quelques minutes et ne nécessite pas un appareillage coûteux, tout au moins avec des marqueurs présentant un $\tau > 100 \mu\text{s}$.

Afin de convaincre le lecteur de la pertinence de cette association fluorophores à longue durée de vie d'émission et technique de fluorescence en temps résolu, nous rapportons ci-après une expérience réalisée au sein de notre équipe.

Le milieu à analyser est constitué d'un mélange de milieux membranaires, de GFP et d'un complexe de terbium présentant une durée de vie de 1,71 ms. La figure 5a représente le spectre d'émission de ce milieu après une excitation à 290 nm et en mode fluorescence

classique (c'est-à-dire enregistrement du spectre aussitôt après la fin du pulse d'excitation). Le spectre d'émission observé présente plusieurs bandes dues à la diffusion Rayleigh ($\lambda = 290$ nm), à la fluorescence des protéines membranaires ($\lambda = 350$ nm), à la fluorescence de la GFP ($\lambda = 500$ nm) ainsi qu'aux harmoniques de second ordre correspondantes à la diffusion de Rayleigh et à la fluorescence des protéines. On ne distingue pas le signal dû au complexe de terbium ($\lambda = 540$ nm). La figure 5b représente le spectre d'émission du même milieu après une excitation à 290 nm, mais enregistré en temps résolu ($t_d = 0,1$ ms et $t_g = 1$ ms). Ainsi que l'on peut le constater, le signal du marqueur Tb(III) est totalement discriminé des artefacts lumineux dus à l'appareillage et à l'autofluorescence du milieu à analyser.

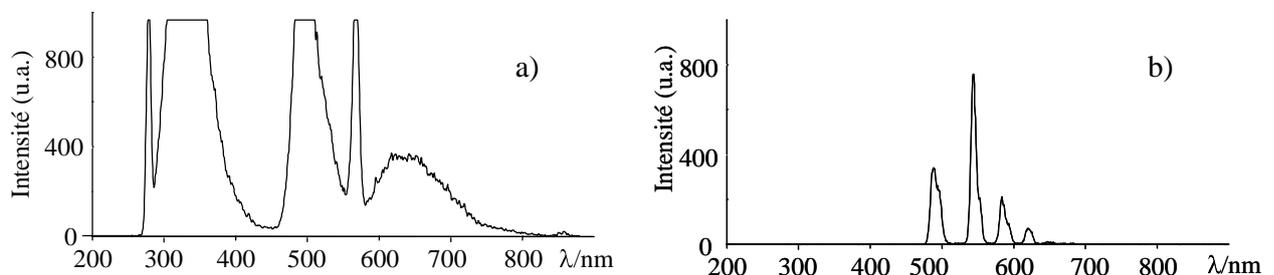


Figure 5. Spectres d'émission d'un milieu d'analyse (voir texte) enregistrés en mode fluorescence classique (a) et en mode fluorescence en temps résolu (b).

II Luminescence des ions lanthanide

Tous les ions lanthanides, excepté les ions La(III) et le Lu(III) (de configurations respectives $4f^0$ et $4f^{14}$) sont luminescents. Les électrons f étant des électrons de cœur, ils sont peu affectés par l'environnement autour de l'ion. Les transitions $f-f$ sont d'autre part théoriquement interdites par les règles de sélection électrique dipolaire (règle de Laporte et règle du spin). En pratique, le couplage des états électroniques avec les états vibrationnels et les mélanges de fonctions d'ondes de différents nombres quantiques J ou de différentes parités atténuent cette interdiction.

Il en résulte :

- des bandes d'absorption et d'émission très fines (~ 10 nm à mi-hauteur).
- un coefficient d'extinction molaire faible (entre 1 et $10 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Chapitre I

- une durée de vie d'émission de luminescence longue pour certains lanthanides (de l'ordre de la milliseconde pour les ions Eu(III) et Tb(III)).

Les raies d'émission des ions lanthanide correspondent aux différentes transitions spécifiques à chaque élément, ainsi que l'on peut le constater dans la figure 6 où est représenté le diagramme des niveaux d'énergie des ions Ln(III) les plus utilisés pour leur fluorescence (excepté Gd(III)).⁽¹²⁾ L'intensité de ces raies d'émission dépend de la différence d'énergie ΔE entre le niveau excité de l'ion Ln(III) le plus bas et son état fondamental le plus proche. Plus la différence entre ces deux niveaux est faible, plus l'état excité subit des désactivations non radiatives provenant des niveaux vibrationnels, qui sont nombreux dans les complexes organiques. Dans ce cadre les ions les plus intéressants pour des applications seraient donc les ions Eu(III) et Tb(III) avec des différences ΔE de 12300 cm^{-1} ($^5D_0 \rightarrow ^7F_6$) et de 14200 cm^{-1} ($^5D_4 \rightarrow ^7F_6$), respectivement.

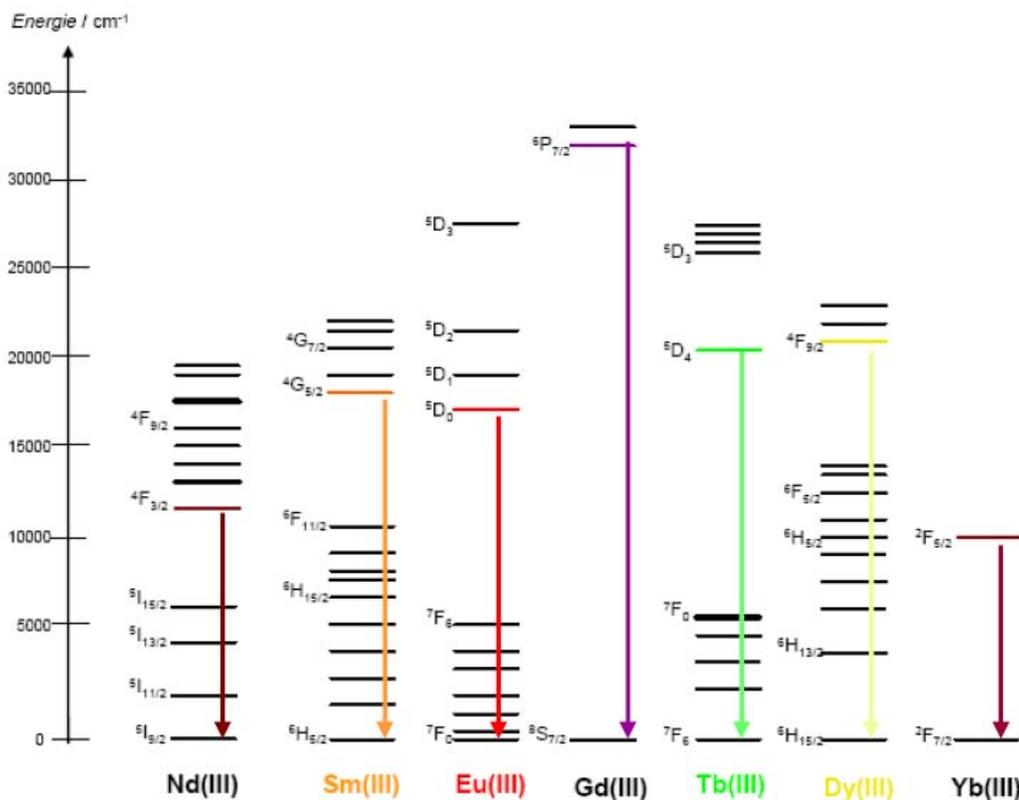


Figure 6. Diagramme partiel d'énergies pour les ions Ln(III) aqueux : principaux niveaux luminescents (en couleur) et leurs niveaux fondamentaux.⁽¹²⁾

II.1. Effet d'antenne

Les coefficients d'extinction molaires des ions Ln(III) étant faibles, il est nécessaire d'utiliser des sources intenses (Laser) pour pouvoir les exciter de manière directe. On peut toutefois les exciter de manière indirecte en les associant à un chromophore possédant un coefficient d'extinction molaire élevé et jouant ainsi le rôle de collecteur de photons. Ainsi l'excitation de ce dernier peut être suivie d'un transfert d'énergie vers le lanthanide, permettant ainsi le peuplement efficace des états excités du métal, ainsi que l'émission radiative à partir de ces états : c'est ce qu'on appelle l'effet d'antenne ou processus « A.TE.E. » (Absorption – Transfert d'énergie – Emission) (Figure 7). Cet effet d'antenne fût décrit pour la première fois par S. I. Weissman en 1942. ⁽¹³⁾

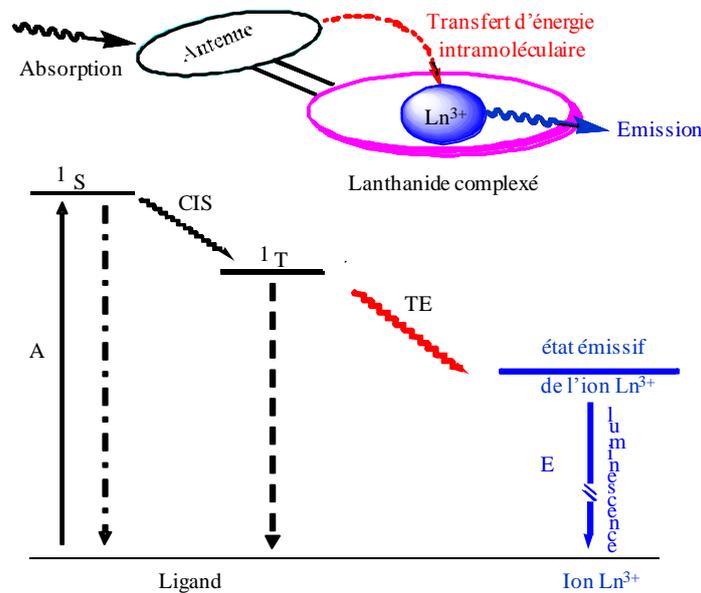


Figure 7. Principe de l'effet d'antenne (A.TE.E.).

Le processus le plus souvent impliqué met en jeu l'état triplet du ligand. Il se déroule en quatre étapes illustrées à la Figure 7, sous forme d'un diagramme de Perrin-Jablonski simplifié. Le chromophore organique absorbe l'énergie lumineuse et peuple ses états excités singlets 1S . Le ligand est adapté si d'une part, un croisement inter-système permet le peuplement de son état excité triplet 1T et, d'autre part, un transfert d'énergie efficace a lieu de cet état triplet vers les états excités du lanthanide. Les états excités du lanthanide sont ensuite relaxés par un processus radiatif, conduisant à l'émission de la lumière. Cette suite de transferts d'énergie implique une importante différence d'énergie entre l'absorption de

Chapitre I

photons par l'antenne et l'émission de photons lors de la relaxation du métal. Cela se traduit par un déplacement de Stokes important.

Ce mécanisme est le plus raisonnable pour les raisons suivantes :

- Une probabilité importante du croisement inter-système, favorisé par la présence d'un atome lourd (l'ion lanthanide).
- Une durée de vie longue de 1T (μs - ms) par rapport à 1S (ns).
- Un faible couplage entre les niveaux vibrationnels de 1S et les niveaux électroniques 4f. ⁽¹⁴⁾

Il faut cependant noter quelques cas particuliers où l'émission de l'ion ne peut se justifier que par une excitation directe des niveaux 4f à partir de l'état 1S . ^(14, 15)

Le transfert de l'état triplet du chromophore vers les états excités du lanthanide peut être expliqué par les théories de Dexter⁽¹⁶⁾ et Förster⁽¹⁷⁾ :

- 1) Le mécanisme de Dexter fait intervenir un transfert électronique entre le donneur et l'accepteur. Dans ce cas un électron du niveau excité du ligand (1T) est transféré sur un état excité de l'ion de terre rare tandis que simultanément un électron provenant de l'état fondamental du lanthanide est transféré sur le niveau 0S du ligand. Ce mécanisme nécessite donc un contact entre les orbitales moléculaires des deux entités. L'efficacité du transfert est fonction de $1/e^R$ (R = distance entre le donneur et l'accepteur).
- 2) Le mécanisme de Förster repose sur des interactions coulombiennes de type dipôle-dipôle entre le ligand et le métal. L'efficacité du transfert dans ce cas est inversement proportionnelle à R^6 .

Quelque soit le modèle retenu, l'efficacité du transfert intramoléculaire dépend donc de la distance entre le chromophore et l'ion lanthanide. Ainsi, plus le chromophore est proche du lanthanide, plus le transfert d'énergie sera efficace et plus l'émission de luminescence du lanthanide sera importante.

A ce titre, les nombreux chromophores utilisés dans la littérature comme photosensibilisateurs des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} ,⁽¹⁸⁾ possèdent pour la plupart d'entre eux des sites de coordination susceptibles de participer directement à la coordination de l'ion lanthanide. On peut citer entre autres des β -dicétones aromatiques,⁽¹⁹⁾ des hétérocycles azotés (polypyridine, phénanthroline, quinoléine)⁽²⁰⁾, des dérivés oxygénés (phénol, 1-hydroxy-2-pyridone)⁽²¹⁾....

Chapitre I

Des chromophores dépourvus de sites de coordination tels que les groupes arène et polyarènes (benzène, naphthalène, triphenylène,.....)⁽²²⁾ sont cependant également utilisés pour photosensibiliser les ions Eu(III) et Tb(III).

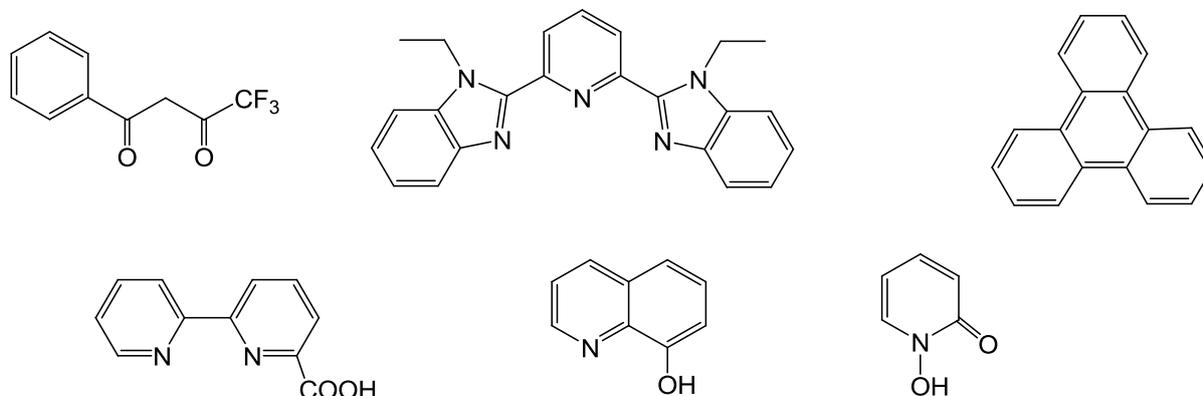


Figure 8. Quelques exemples de chromophores photosensibilisant les ions Eu^{3+} et (ou) Tb^{3+} .

II.2. Processus de désactivation non radiative

L'intégration d'un chromophore possédant un coefficient d'extinction molaire élevé est une condition nécessaire mais pas suffisante pour obtenir des complexes fortement luminescents. En effet, cette luminescence peut être affectée par plusieurs mécanismes de désactivation (Figure 9) :

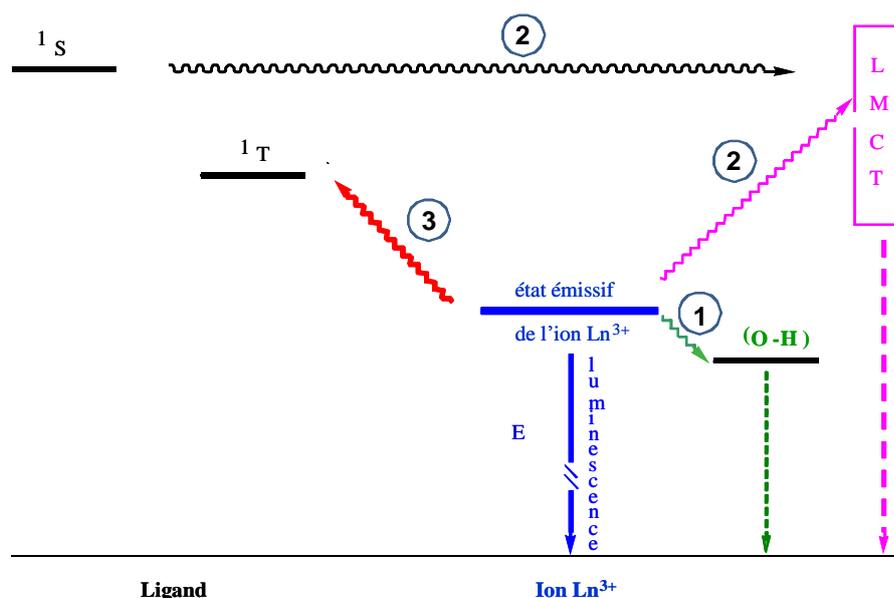


Figure 9. Facteurs influençant la luminescence des ions Ln(III) photosensibilisés par un chromophore.

Il s'agit de la présence :

- 1) de molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination du métal.
- 2) d'état LMCT.
- 3) de transfert d'énergie en retour.

II.2.1. Influence des molécules d'eau coordonnées au métal

La présence d'oscillateurs moléculaires de type O-H ou N-H dans la première sphère de coordination du lanthanide affecte la durée de vie de luminescence et le rendement quantique du complexe. Ainsi, lorsque des molécules de solvants protiques (H₂O) sont coordonnées au centre métallique, leurs modes vibrationnels peuvent interagir avec les niveaux électroniques excités de l'ion (⁵D₀ pour Eu³⁺ et ⁵D₄ pour Tb³⁺), conduisant à un « quenching » de la fluorescence ⁽²⁰⁾.

L'efficacité de ce « quenching » dû à des couplages vibroniques est fonction :

- de la fréquence d'élongation vibrationnelle de l'oscillateur. L'effet de « quenching » suivra l'ordre OH > NH > CH.

- de la distance entre l'oscillateur et le métal. Il a été estimé qu'une molécule d'eau présente dans la première sphère de coordination du métal (2,36 Å) apporte une contribution sept fois plus importante au « quenching » de fluorescence qu'une molécule d'eau située dans la seconde sphère de coordination (4,50 Å).⁽²³⁾

- De la différence d'énergie ΔE entre le niveau le plus bas de l'état excité et le niveau le plus élevé de l'état fondamental. Pour un vibrateur donné, la désactivation est d'autant plus faible que ΔE est grand. L'efficacité de désactivation par des molécules d'eau sera donc plus grande dans le cas des complexes d'euporium(III) ($\Delta E = 12300 \text{ cm}^{-1}$) que dans le cas des complexes de terbium(III) (14200 cm^{-1}).

En effet, dans le cas de l'euporium, le couplage vibrationnel s'effectue entre l'état ⁵D₀ et l'état ν_3 pour le vibrateur O-H, tandis que pour le terbium c'est la 4^{ème} harmonique vibrationnelle du groupe OH qui est sollicitée. De même pour les deux ions, la désactivation par les vibrateurs O-H sera supérieure à celle provoquée par les vibrateurs O-D. La figure 10 permet d'illustrer ces données.

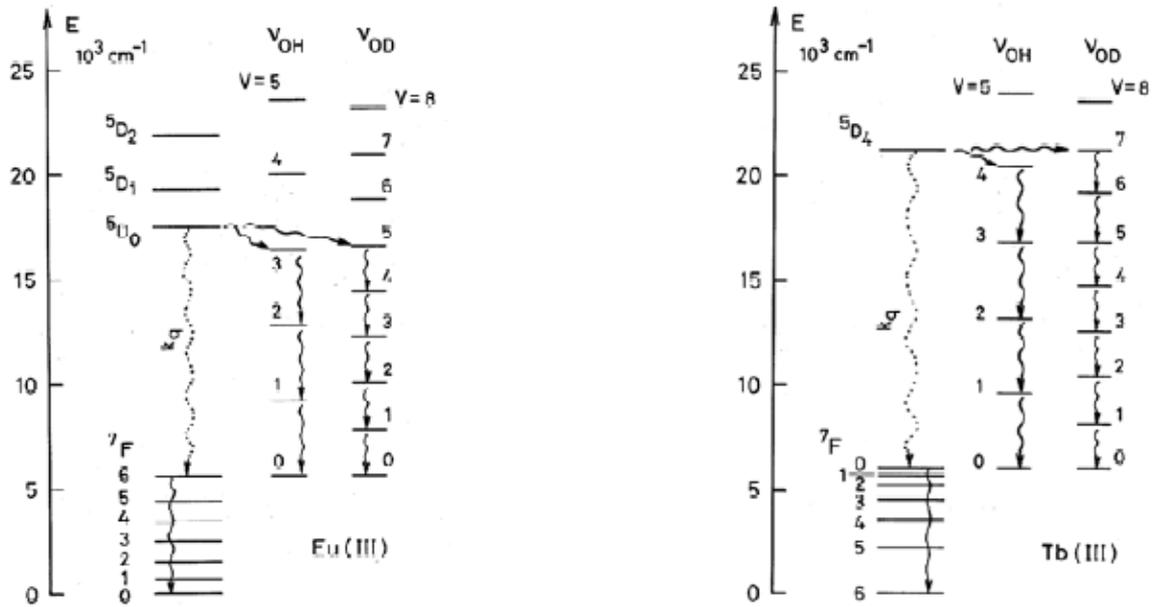


Figure 10. Désexcitations vibrationnelles des complexes Eu(III) et Tb(III) dans H₂O et D₂O.⁽²⁴⁾

II.2.2. Etat LMCT

L'état LMCT (Transfert de Charge Ligand Métal) est issu d'un transfert d'électron photoinduit du chromophore vers le métal. Ce processus, est favorisé par la présence de groupements donneurs d'électrons (comme les amines) sur le ligand^(25, 26) ; il est observé dans le cas de l'ion Eu³⁺ qui possède un potentiel de réduction plus élevé ($E^0 = -0,35$ V pour Eu³⁺/Eu²⁺) que celui du terbium ($E^0 = -3,47$ V pour Tb³⁺/Tb²⁺). Ainsi, la formation d'un ion Eu²⁺ et d'un cation radical entraîne une désactivation non radiative des états excités de l'antenne.

Il a été établi que la coordination d'anions fluorure à l'euporium permet de déplacer les états LMCT du ligand vers des niveaux d'énergie plus élevée, réduisant de ce fait ce processus de désactivation non radiative⁽²⁷⁾. En plus, l'état LMCT est activé thermiquement c'est-à-dire que le peuplement sera d'autant plus important que la température sera élevée, l'expression de la vitesse de transfert selon l'équation de type Arrhenius est proportionnelle au terme $(-\Delta E/kT)$. Ainsi, l'abaissement de la température permet donc de minimiser ce processus de désactivation non radiative et par conséquent révèle son existence.

II.2.3. Transfert d'énergie en retour

Un transfert en retour du niveau émetteur du lanthanide (Tb³⁺, ⁵D₄, E= 20500 cm⁻¹; Eu³⁺, ⁵D₀, E= 17300 cm⁻¹) vers l'état triplet du ligand peut se produire lorsque la différence

Chapitre I

énergétique entre ces deux niveaux est faible. Une étude détaillée a été réalisée par M. Latva et al. ⁽²⁸⁾ sur une série de complexes de Tb(III) et d'Eu(III) dérivés de ligands polyaminocarboxylates. Ils ont démontré que le transfert était irréversible à partir d'une différence d'énergie entre ces deux états supérieure à 1850 cm^{-1} . Cette même étude a révélé un transfert efficace pour un état triplet du ligand positionné autour de $22\,000 \text{ cm}^{-1}$, pour laquelle le rendement quantique après excitation du ligand devient significatif dans le cas d'un complexe Tb(III).

Dans le cas d'une différence énergétique plus faible, un processus de transfert en retour de type vibrationnel a lieu, processus qui dépend de la température, selon une équation de type Arrhenius.

Donc, il faut que le niveau énergétique de l'état triplet du ligand soit correctement positionné par rapport aux états excités de l'ion étudié.

III Edifices Ln(III) luminescents

Pour qu'un complexe lanthanidique puisse être utilisé comme marqueur fluorescent à des fins d'analyses biologiques, plusieurs critères doivent être requis que ce soit au niveau du ligand ou de son complexe :

- 1) Le ligand doit intégrer dans sa structure un motif chromophore, jouant le rôle de collecteur de photons (antenne), il doit transférer de manière efficace cette énergie lumineuse à l'ion lanthanide.
- 2) La longueur d'onde d'excitation (et donc d'absorption) du chromophore doit être la plus élevée possible afin de minimiser les dommages occasionnés par une photoexcitation du matériel biologique. D'un autre côté, afin d'optimiser le processus de transfert d'énergie entre le chromophore et l'ion lanthanide, il a été établi que la longueur d'onde d'absorption doit se situer à une longueur d'onde inférieure à 385 nm pour les complexes d'euporium et 346 nm pour les complexes de terbium.⁽²²⁾
- 3) Le produit des valeurs de rendement quantique et de coefficient d'extinction molaire ($\Phi \times \epsilon$) doit être le plus élevé possible, car c'est ce terme appelé " brillance " qui détermine le seuil de sensibilité de la sonde fluorescente.
- 4) Le ligand doit être capable de complexer fortement l'ion lanthanide afin d'induire une bonne stabilité du complexe en milieu aqueux ($\text{pH} = 7$).

- 5) Le nombre des fonctions coordinantes ou des atomes donneurs (N, O) doit être supérieur ou égal à 9, de manière à éviter la coordination au niveau du métal d'une ou plusieurs molécules d'eau, protégeant ainsi le lanthanide des oscillateurs désactivants (vibrateurs O-H) conduisant au « quenching » de luminescence.
- 6) Le complexe doit présenter une bonne solubilité dans l'eau.
- 7) Le schéma de synthèse du ligand doit permettre l'introduction d'un groupement fonctionnel réactif afin de permettre un greffage covalent du complexe sur un vecteur d'intérêt biologique.

Les ligands qui ont été développés en vue de telles applications peuvent se différencier suivant l'agencement des différentes composantes (squelette complexant et chromophore). On peut distinguer quatre familles : les cryptands, les macrocycles, les acycliques, les podands.

III.1. Les cryptands

Il s'agit de la famille de ligands la moins décrite dans la littérature, peut être en raison de leur synthèse plus délicate. Dans cette famille, le ligand le plus connu est le cryptand trisbipyridine (A, figure 11) initialement décrit par J. M. Lehn⁽²⁹⁾ puis développé par la société Cis Bio International. En raison de leur structure tridimensionnelle, les complexes d'ions Ln(III) correspondants sont caractérisés généralement par des constantes de stabilité très élevées en milieu aqueux et surtout par une excellente stabilité cinétique.

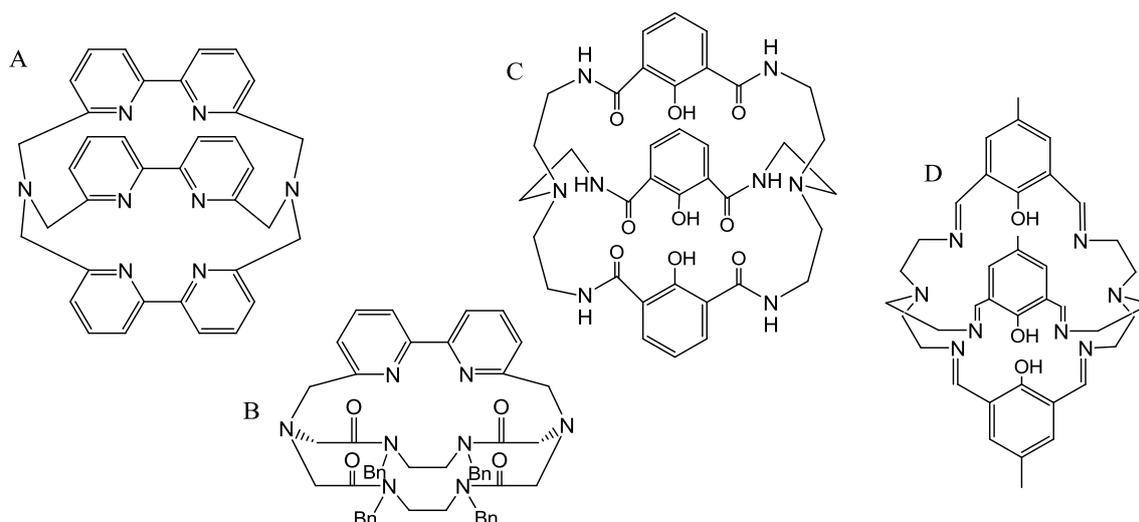


Figure 11. Exemples de cryptands : A⁽²⁹⁾, B⁽³⁰⁾, C⁽³¹⁾, D⁽³²⁾.

La nature rigide de ces récepteurs ne permet pas toujours de protéger de façon optimale le métal vis-à-vis des molécules d'eau ou de former des complexes 1 ligand : 1 métal. Ainsi 2-3

molécules d'eau sont coordonnées au métal dans le complexe Eu-trisbipyridine⁽³³⁾, tandis que le cryptand C (Figure 11) conduit à la formation de complexes de stœchiométrie 2 ligands : 1 Eu⁽³¹⁾. D'autre part, la possibilité d'introduire 3 motifs chromophores dans ce type d'architecture permet d'optimiser leur capacité d'absorption (coefficients ϵ élevés).

III.2. Les macrocycles multibranchés

L'introduction de bras latéraux constitués d'unités monodentes (ou polydentes) sur des macrocycles permet d'obtenir des récepteurs combinant forte stabilité et flexibilité structurale. La cavité macrocyclique assure une rigidité à l'ensemble tandis que les bras latéraux assurent une structure tridimensionnelle.

L'une des structures macrocycliques la plus utilisée est sans aucun doute le cyclen (tétraaza-1,4,7,10-cyclododécane) où l'un des bras latéraux porte un chromophore et les trois autres bras des fonctions complexantes (acide carboxylique, acide phosphonique, amide,). Des complexes très stables en milieu aqueux sont obtenus avec les ions Ln(III), tant au niveau stabilité thermodynamique que cinétique. Quelques structures sont représentées dans la figure 12. Le même type d'architectures a été également construit à partir de plateformes calixarènes.⁽²²⁾

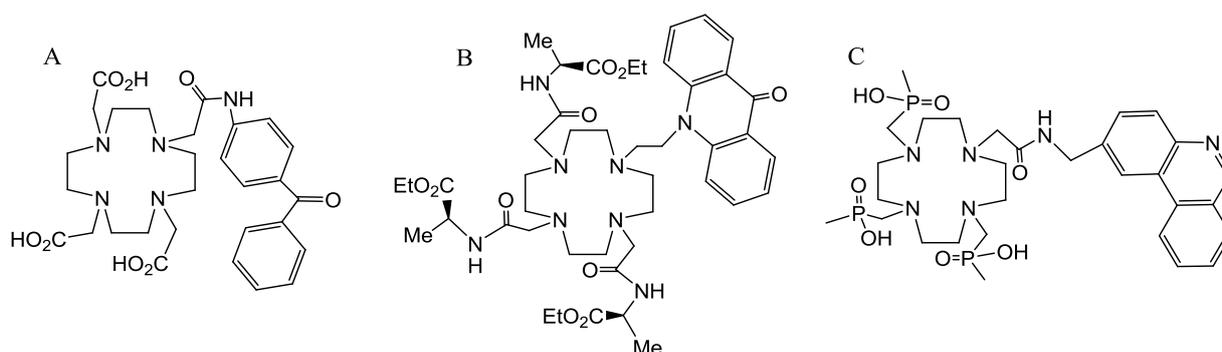


Figure 12. Exemples de ligands dérivés du cyclen : A⁽³⁴⁾, B⁽³⁵⁾, C⁽³⁶⁾.

L'autre alternative repose sur l'utilisation d'un macrocycle intégrant dans sa structure un chromophore intracyclique (Figure 13). Dans ces structures, l'étape de photosensibilisation chromophore \rightarrow Ln(III) s'effectue entre deux partenaires dans une conformation rigide, situation qui est susceptible d'améliorer les vitesses de transfert d'énergie. D'autre part, le nombre d'atomes donneurs peut être facilement modulé en ajustant le nombre de bras ou la

nature du chromophore (mono-, di-, tri-hétérocycle). Les complexes Ln(III) dérivés de ces ligands présentent des stabilités satisfaisantes.

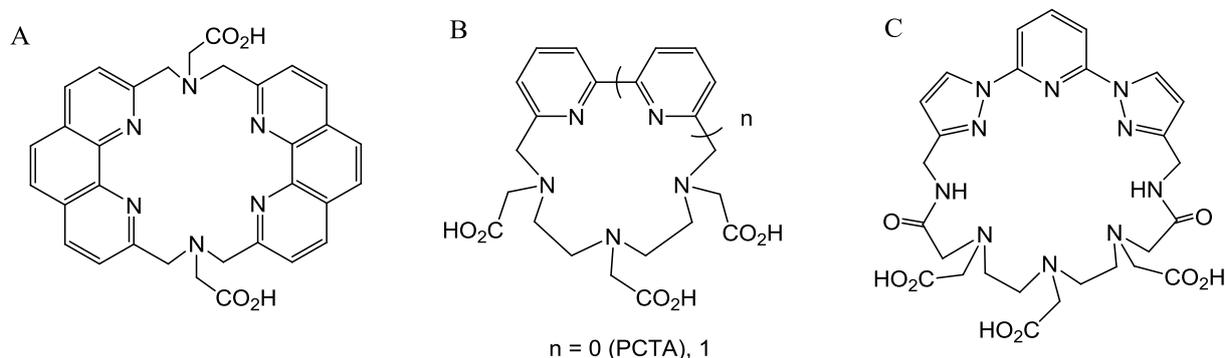


Figure 13. Exemples de macrocycles multibranchés: A⁽³⁸⁾, B^(37, 39), C⁽⁴⁰⁾.

Ainsi récemment A. D. Sherry et coll.⁽³⁷⁾ ont rapporté une constante de stabilité thermodynamique $\text{Log } K = 20,26$ en milieu aqueux pour le complexe d'euprômium dérivé du ligand PCTA (Figure 13). De plus ces auteurs rapportent que bien que les complexes Ln(PCTA) se dissocient plus rapidement que les complexes Ln(DOTA) (DOTA = 1,4,7,10-tétracarboxyméthyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécane) en milieu acide, ces complexes présente une stabilité cinétique suffisante pour pouvoir être utilisés *in vivo*.

III.3. Les ligands acycliques

Cette famille de ligands est la plus décrite dans la littérature.

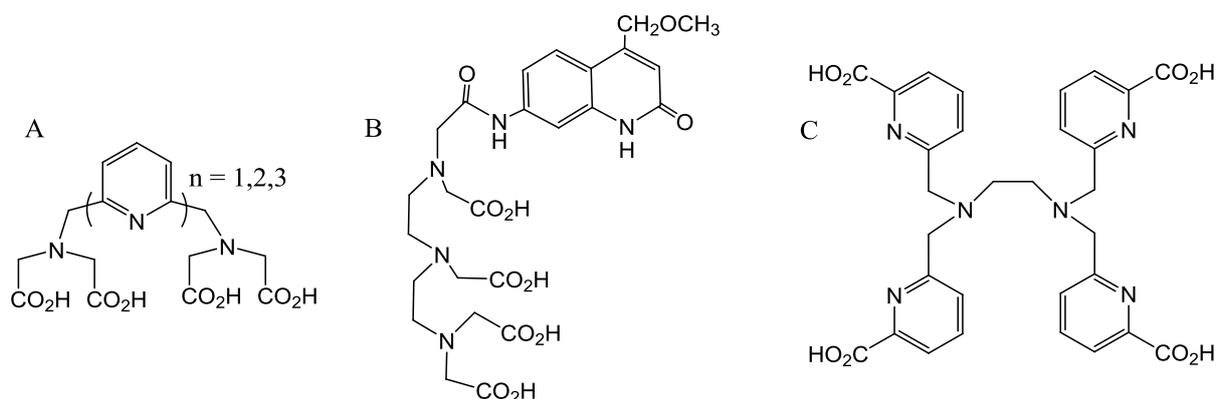


Figure 14. Exemples de ligands acycliques: A⁽²⁸⁾, B⁽⁴¹⁾, C⁽⁴²⁾.

On citera les travaux de la société Wallace (Perkin-Elmer) concernant les ligands incorporant deux motifs iminodiacétique. Dans cette série, une variation systématique du chromophore

(mono-, di-, tri-hétérocycles azotés) a été effectuée.⁽²⁸⁾ L'utilisation d'un squelette poly-aminoacide tels que le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) ou TTHA (acide triéthylènetétraaminehexaacétique) où l'une des fonctions acide carboxylique est remplacée par un chromophore constitue la seconde catégorie de cette famille de ligands. Le troisième exemple reporté dans la figure 14 est représentatif de ligands construits à partir de motifs polyamines tels que l'éthylène diamine ou la tris(2-aminoethyl) amine (TREN).

III.4. Les podands

Les podands sont constitués par l'association de plusieurs « bras » multidentés avec un motif de base, appelé support ou plateforme. Ce dernier ne participe pas à la complexation de l'ion Ln(III) et peut être constitué soit par un atome, un noyau aromatique, un macrocycle... (Figure 15). Le rôle du support est de prédisposer la complexation en formant une cavité.

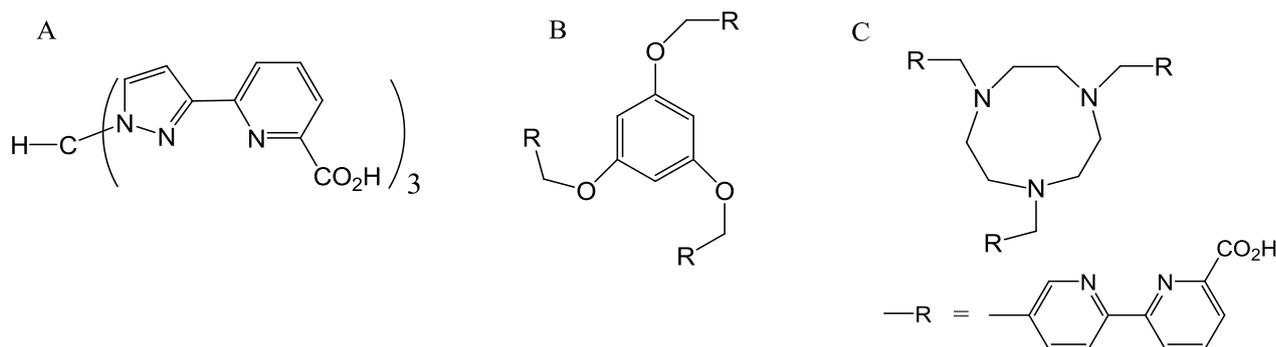


Figure 15. Exemples de ligands acycliques: A⁽⁴³⁾, B⁽⁴⁴⁾, C⁽⁴⁵⁾.

Ce type d'architectures permet d'optimiser le coefficient d'extinction molaire du ligand (avec l'introduction de plusieurs antennes), mais implique la présence d'une fonction fortement complexante sur le chromophore (par exemple une fonction acide carboxylique) afin d'assurer une stabilité adéquate des complexes Ln(III) correspondants en milieu aqueux.

IV Applications des complexes Ln(III) fluorescents en biologie

Les domaines d'application des sondes fluorescentes basées sur les ions lanthanide sont très nombreux et variés, allant de la sonde à protons à l'imagerie cellulaire.

Nous avons choisi de présenter quelques illustrations basées sur l'observation d'une augmentation significative de la fluorescence ou de sa diminution. Ces phénomènes sont liés à l'état d'hydratation de l'ion lanthanide, au chromophore, à un mécanisme de transfert d'électron photoinduit (PET) ou à un mécanisme de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Leur utilisation dans l'imagerie (microscopie de fluorescence) et comme sondes bimodales (IRM et fluorescence) sera également abordée.

IV.1. Sondes à pH

Le spectre d'émission des complexes d'euprium (III) est particulièrement sensible en fonction de l'environnement local de coordination fourni par le ligand. La symétrie locale autour du métal, la charge et la polarisabilité des atomes donneurs déterminent l'intensité relative des bandes d'émission de l'état excité 5D_0 surtout au niveau des raies $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ à 610-630 nm et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ à 680-710 nm.

Dans le but de mesurer le pH d'un milieu, Parker et al. ⁽⁴⁶⁾ ont utilisé un complexe d'euprium macrocyclique [LEu] (Figure 16) dérivé du DOTA et intégrant dans sa structure un chromophore azathiaxanthone ($\lambda_{exc} = 355$ à 405 nm) et une chaîne latérale comportant une fonction N-sulfonamide sensible au pH. En milieu basique, la fonction sulfonamide est déprotonée et son atome d'azote est coordonné au métal. En milieu acide (pour un pH inférieur au pKa de la constante d'acidité apparente du complexe), cette fonction est protonée et donc n'est plus coordonnée au métal, laissant ainsi la place à une molécule d'eau qui est, rappelons-le, un « quencher » efficace de fluorescence.

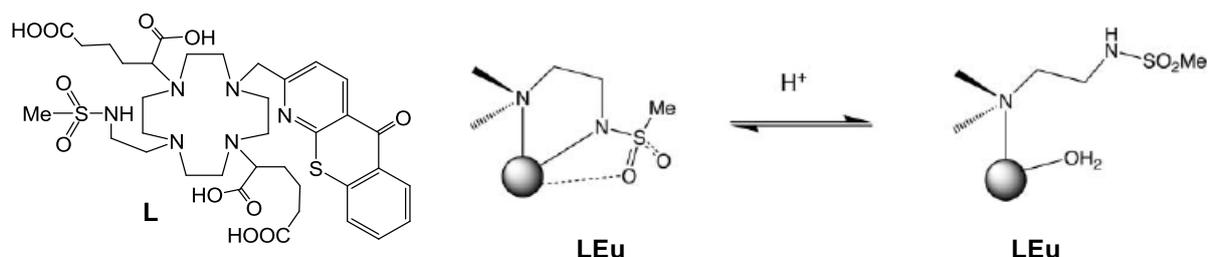


Figure 16. Comportement du complexe LEu en fonction du pH.

Différents spectres d'émission du complexe L_{Eu} ont été enregistrés en fonction du pH (0,1 M NaCl, 298K) en milieu aqueux. Le spectre d'émission (Figure 17a) montre des modifications importantes au niveau de la raie $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et dans la forme des raies $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ et $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$; en plus il y a apparition de nouvelles bandes à 627 nm et 680 nm quand le pH augmente de 5 à 8 (Figure 17b). La courbe obtenue en mesurant la variation du rapport des intensités I_{680}/I_{587} en fonction du pH révèle une augmentation de l'intensité d'émission de 80% en passant du pH = 4,5 à pH = 8. Ceci est dû à l'augmentation du nombre de sites de coordination du ligand (NC = 7 pH < 5; NC= 8 pH > 5) en milieu basique par l'intervention de l'azote du sulfonamide dans la complexation de l'euprium (Figure 17b).

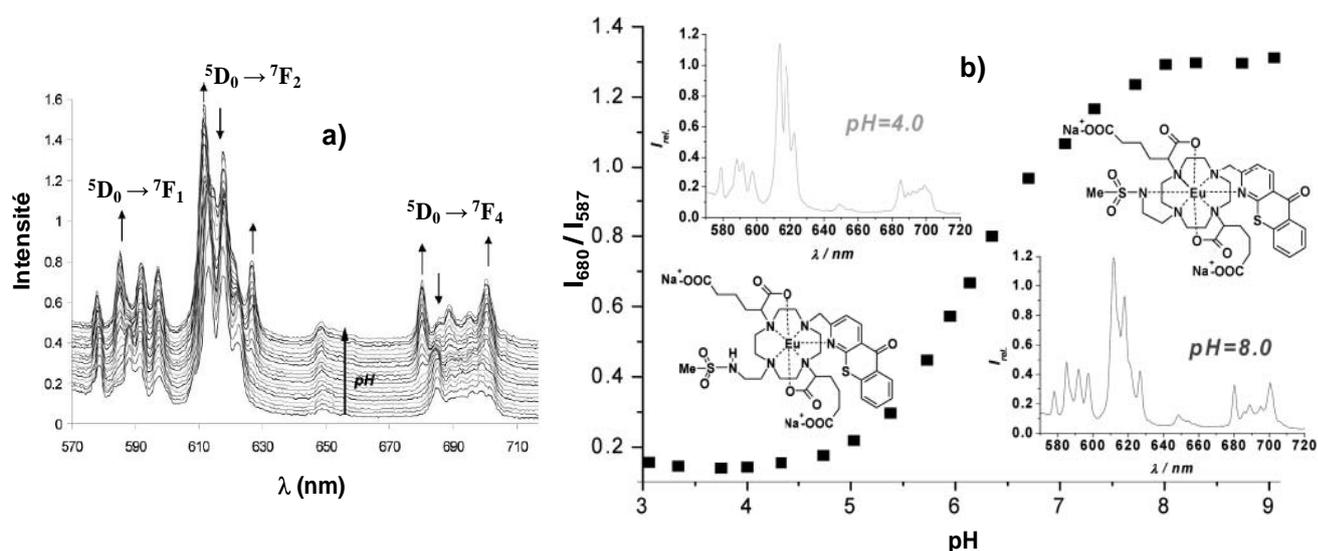


Figure 17. a) Spectres d'émission du complexe L_{Eu} (Figure 16) à différents pH (λ_{ex} 380 nm, 0,1 M NaCl, 298K). b) Variation du rapport des intensités d'émission à 680 et 587 nm du complexe en fonction du pH.

Les auteurs rapportent également dans cet article l'utilisation de ce complexe pour la mesure du pH d'un milieu intracellulaire.

IV.2. Sondes à anions

Il s'agit de nouvelles méthodes de détection et de dosages d'anions capables de se complexer aux ions lanthanide par déplacement de molécules d'eau présentes dans la première sphère de coordination du métal.

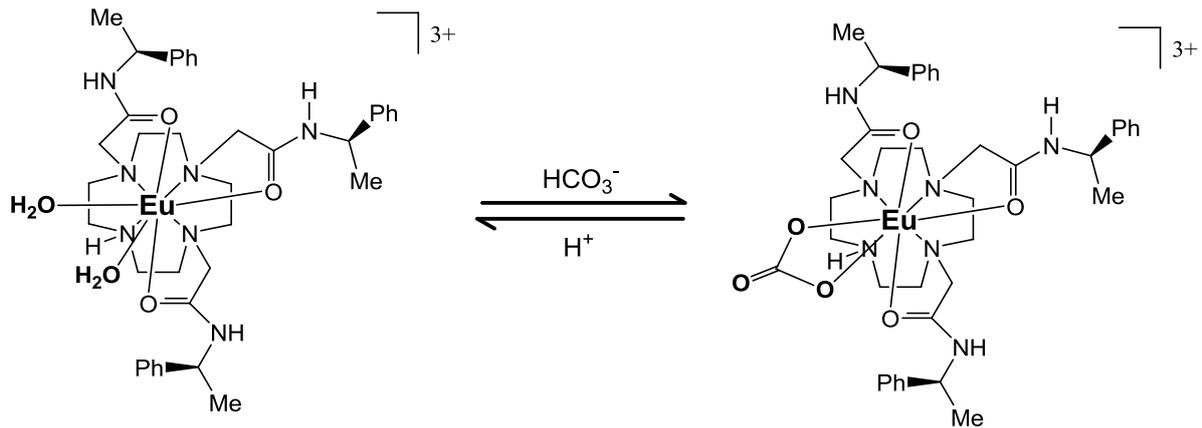


Figure 18. Principe du dosage des ions hydrogénocarbonate par un complexe d'euprium.⁽⁴⁷⁾

L'exemple que nous avons retenu est le dosage des ions hydrogénocarbonate (HCO_3^-). Dans ce but, Parker et coll.⁽⁴⁷⁾ ont utilisé un complexe d'euprium $[\text{LEu}]^{3+}$ porteur d'une charge 3+ et présentant deux molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination du métal (Figure 18). L'ajout d'ions HCO_3^- à ce complexe d'euprium se traduit par une augmentation de la durée de vie d'émission de l'ion euprium (de 0,25 à 0,40 ms) et par une augmentation de l'intensité de ses bandes d'émission, notamment celle située à 620 nm (Figure 19), par suite de la substitution des 2 molécules d'eau coordonnées au métal par l'ion hydrogénocarbonate, ligand bidente.

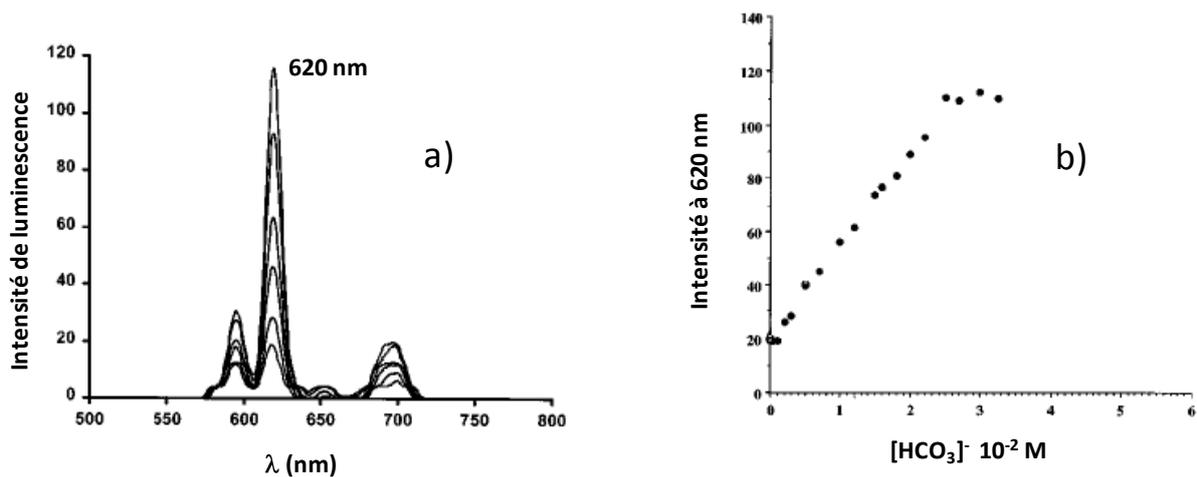


Figure 19. Variation du spectre d'émission (a) et de l'intensité de la bande d'émission située à 620 nm (b) du complexe $[\text{LEu}]^{3+}$ (Figure 18) en fonction d'ajouts de NaHCO_3 (0 à 30 mM, 0,1M Tampon MES à pH 6,5-7,3 ; $\lambda_{\text{exc}} = 257$ nm).

Le même principe a été appliqué à la détection d'ions nitrate, Cl^- , F^- , CH_3COO^- .⁽⁴⁸⁾

D'autre part, un choix judicieux du chromophore permet de doser des anions qui provoquent un « quenching » de son état excité singulet. Ainsi, il est bien établi que la fluorescence d'hétérocycles N-alkylés tels que l'acridine, la quinoline, ou la phénanthridine est « quenchée » par les anions halogénures en milieu aqueux. En conséquence, l'addition d'ions halogénures (I^- , Br^- , Cl^-) à des complexes Eu(III), Tb(III) incorporant un tel chromophore se traduit par une diminution de l'émission de fluorescence du centre métallique, puisque dans ce cas l'état triplet du chromophore n'est pas peuplé et donc que le transfert d'énergie chromophore \rightarrow métal ne peut pas se faire. Il a été également démontré que la détection de ces ions halogénures avec de tels systèmes est indépendante de la présence d'autres anions tels que des bicarbonate, hydrogénocarbonate, lactate, ou citrate.⁽⁴⁹⁾

IV.3. Sondes à cations

La présence dans un complexe de groupements donneurs d'électrons non coordonnés à l'ion lanthanide peut entraîner un transfert d'électrons phototoinduit (PET), responsable d'un « quenching » de fluorescence. Plusieurs auteurs ont tiré profit de ce mécanisme de désactivation non radiative pour réaliser des dosages de cations.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

Ainsi le ligand représenté à la figure 20 comporte deux récepteurs: le premier récepteur constitué par un motif DOTA amide sert à complexer un ion europium, tandis que le second récepteur constitué par un motif acyclique sert à chélater l'ion Zn^{2+} ; le motif aryle servant de chromophore pour photosensibiliser l'ion Eu(III).

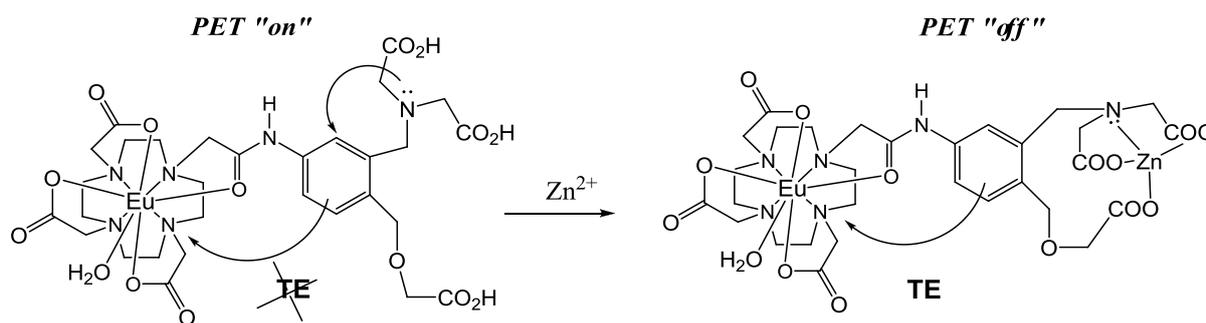


Figure 20. Processus PET engagé dans un complexe d'euprium en présence et en absence d'ions Zn^{2+} .⁽⁵⁰⁾

A pH 7,4 et en absence d'ion métallique, la fluorescence de l'ion europium est inhibée par un transfert d'électrons photoinduit de l'atome d'azote benzylique vers l'état excité singulet du noyau aryle. Ce dernier ne peut plus jouer son rôle d'antenne. En présence d'ion Zn^{2+} , le

doublet électronique de l'atome d'azote benzylique est engagé dans la complexation de cet ion et en conséquence le processus PET n'est plus actif. Le noyau aryle peut alors jouer son rôle d'antenne, et on observe une augmentation de l'intensité de l'émission de l'ion Eu(III) de 42%.⁽⁵⁰⁾

Un second exemple de dosage d'ions Zn^{2+} met en jeu un complexe de terbium et repose sur une amélioration du transfert d'énergie entre le chromophore et le métal (Figure 21). La complexation de l'ion Zn^{2+} par les deux motifs (2-pyridylméthyl) amine modifie la conformation du complexe et rapproche les antennes pyridine de l'ion lanthanide, améliorant ainsi le transfert d'énergie. La complexation du métal de transition se traduit donc par une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'ion terbium. Les auteurs ont, d'autre part, montré une excellente sélectivité de ce système vis-à-vis de l'ion Zn^{2+} par rapport à des ions alcalinoterreux (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ou d'autres métaux de transition (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}) et de certains anions.⁽⁵¹⁾

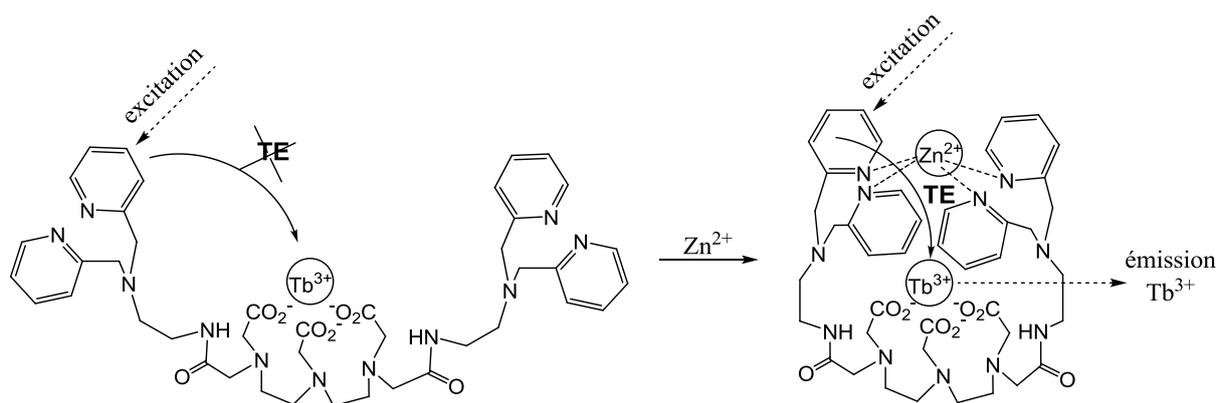


Figure 21. Variation du transfert d'énergie *via* une modification conformationnelle du complexe Tb(III) en présence de Zn^{2+} .⁽⁵¹⁾

IV.4. Dosages d'activités enzymatiques

Plusieurs complexes fluorescents d'ions Eu(III), Tb(III) ont été utilisés pour la détection de l'activité d'enzymes. Cette détection est basée soit sur l'intervention d'un processus PET, soit sur celui d'un processus FRET.

IV.4.1. Intervention d'un processus PET

Terai et al.⁽⁵³⁾ ont développé une sonde lanthanidique [Ln-13] (Figure 22) afin de doser l'activité enzymatique d'une protéase, la leucine aminopeptidase LAP, un enzyme qui clive spécifiquement des aminoacides N-terminaux (préférentiellement la leucine et l'alanine) de la plupart d'oligopeptides non substitués.

Le complexe [Ln-13] est constitué de trois parties: 1) un chélate (DTPA) qui forme un complexe très stable avec l'ion Ln^{3+} ; 2) un hétérocycle, le 7-amino-4-méthyl-2(1H)-quinolinone, qui joue le rôle d'un sensibilisateur efficace des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} dans l'eau; 3) un aminoacide (L-leucine) qui est lié de manière covalente par une liaison amide à l'antenne par l'intermédiaire d'un motif aminobenzyle. Ce motif aminobenzyle va jouer le rôle d'un interrupteur (switch on/off) de luminescence. Le complexe [Ln-13] sert de substrat pour l'enzyme LAP.

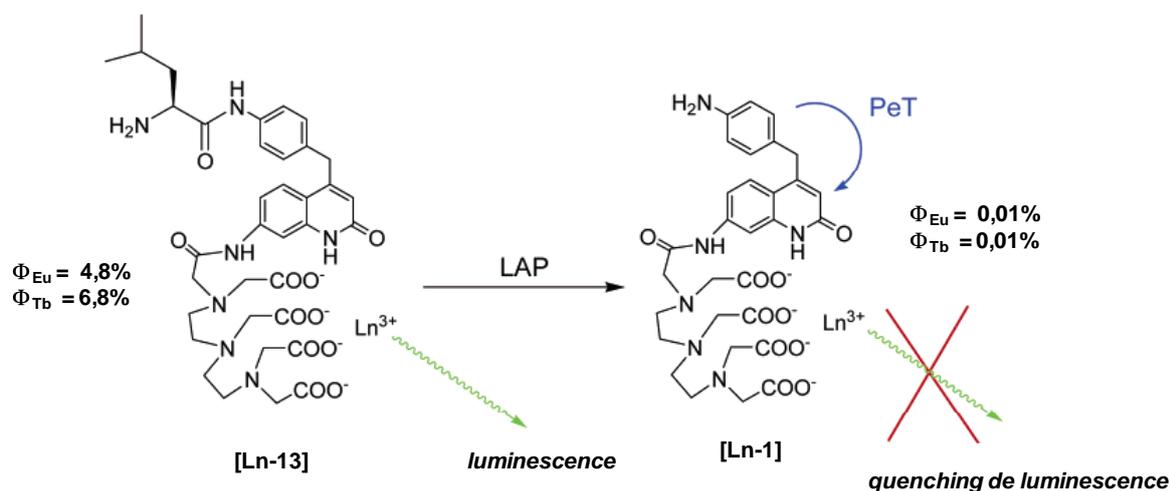


Figure 22. Clivage de la liaison peptidique du complexe [Ln-13] luminescent par l'enzyme LAP pour donner le complexe [Ln-1] non luminescent. (Ln= Tb, Eu).⁽⁵³⁾

En absence d'enzyme, le complexe [Ln-13] d'euprium ou de terbium est fluorescent ($\Phi_{\text{Eu}} = 4,8\%$, $\Phi_{\text{Tb}} = 6,8\%$). En présence d'enzyme, la liaison amide du motif Leucine est clivée, générant le complexe [Ln-1]. La fonction amine libre de ce complexe induit un processus PET au niveau de l'état singulet excité de l'antenne et donc une extinction de fluorescence des ions $\text{Eu}(\text{III})$ et $\text{Tb}(\text{III})$. En présence d'enzyme, on observe donc une décroissance de la fluorescence au cours du temps et une extinction complète de fluorescence au bout de 60 minutes (conditions expérimentales: [Ln-13] 2 μM , 0,01 U de LAP, tampon Tris-HCl, pH 7,4, 37°C). Avec le complexe de terbium une limite de détection de 1 μU d'enzyme LAP a pu être observée.

IV.4.2. Intervention d'un processus FRET

Avant de présenter un exemple portant sur l'utilisation de la technique FRET dans le cadre de dosages d'enzyme, nous rappellerons dans un premier temps le principe de cette technique qui est largement utilisée dans les applications biologiques des complexes fluorescents des ions lanthanide. On retrouvera cette technique au niveau des paragraphes "hybridation d'oligonucléotides" et "fluoroimmunosages".

Rappel sur la technique FRET

Le FRET (Transfert d'Énergie par Résonance de Fluorescence) d'après la théorie de Förster, est défini comme un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) résultant d'une interaction dipôle - dipôle entre deux entités, la première étant fluorescente et la seconde ne l'étant pas forcément. Ces deux entités sont appelées respectivement le donneur (D) et l'accepteur (A). Le transfert d'énergie du donneur à l'accepteur s'effectue quand le donneur et l'accepteur sont très proches l'un de l'autre ($R < 100 \text{ \AA}$) (Figure 23).

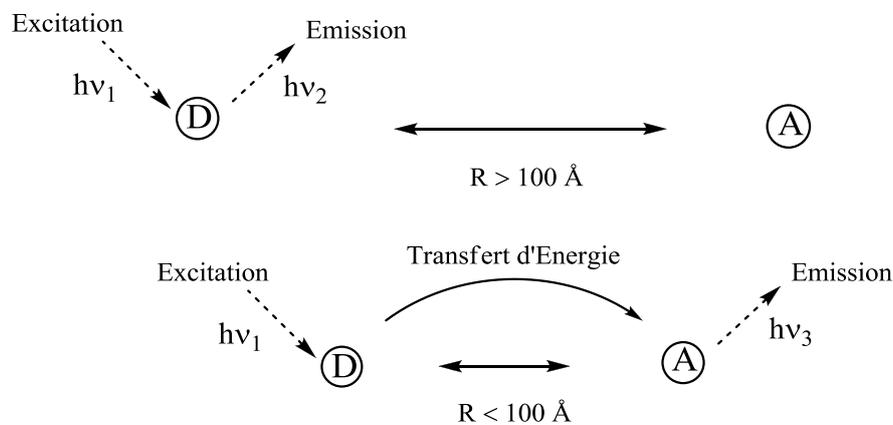


Figure 23. Principe de la technique FRET.

Lorsque les partenaires donneur (D) et accepteur (A) sont éloignés d'une distance $R > 100 \text{ \AA}$, l'excitation de D par des photons $h\nu_1$ se traduit uniquement par l'émission de D ($h\nu_2$). Mais, lorsque D et A sont proches l'un de l'autre ($R < 100 \text{ \AA}$), l'excitation de D par $h\nu_1$ induit l'émission de A ($h\nu_3$).

Chapitre I

L'efficacité du FRET est proportionnelle à l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux molécules selon l'équation: $E = 1 / 1 + (R/R_0)^6$ où E est l'efficacité de transfert d'énergie définie comme le rapport entre l'énergie transférée du donneur à l'accepteur sur l'énergie absorbée par le donneur; R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R_0 le rayon de Förster c'est à dire la distance entre le donneur et l'accepteur correspondant à une efficacité de transfert de 50%.⁽⁵⁴⁾

La technique FRET permet donc de mettre en évidence le voisinage entre deux molécules. Lorsque le couple donneur/accepteur se trouve au sein de la même molécule, cette technique peut être appliquée entre autres exemples à la détermination d'activités de protéase ou de nucléase. Lorsque chaque fluorophore est porté par un partenaire différent, on peut utiliser cette technique pour l'étude d'hybridation de brins ADN et ARN, pour des dosages fluoro-immunologiques ou encore l'étude d'interactions protéine-protéine, ligand-récepteur,...

L'utilisation d'un complexe de lanthanide comme donneur présente un certain nombre d'avantages par comparaison aux systèmes n'utilisant que des fluorophores organiques. Leur large déplacement de Stokes permet d'éviter une excitation directe de l'accepteur. De plus la composante temporelle du signal émis par l'accepteur présente une contribution égale à celle du donneur, de ce fait, la fluorescence émise par l'accepteur a également une durée de vie longue et donc peut être mesurée en temps résolu.⁽⁵⁵⁾

Applications à la détermination d'une activité protéolytique

L'exemple que nous rapportons traite de l'utilisation d'un complexe d'euporium comme motif donneur dans le cadre d'une détection par processus FRET de l'activité de l'enzyme caspase-3.⁽⁵⁶⁾

Pour cela un hexapeptide, présentant l'enchaînement Asp-Glu-Val-Asp (motif caractéristique reconnu par la caspase-3), une cystéine N-acétylée en partie N-terminale et en partie C-terminale une lysine dont la fonction acide carboxylique a été transformée en fonction amide a été synthétisé. D'autre part, cet hexapeptide a été substitué en partie N-terminale par un complexe d'euporium et en partie C-terminale par le fluorophore organique Cy5.0 (Figure 24).

En absence d'enzyme, l'excitation de la sonde à 298 nm a permis de mettre en évidence un phénomène de FRET qui se traduit par une faible émission du donneur à 616 nm et une émission de l'accepteur à 672 nm.

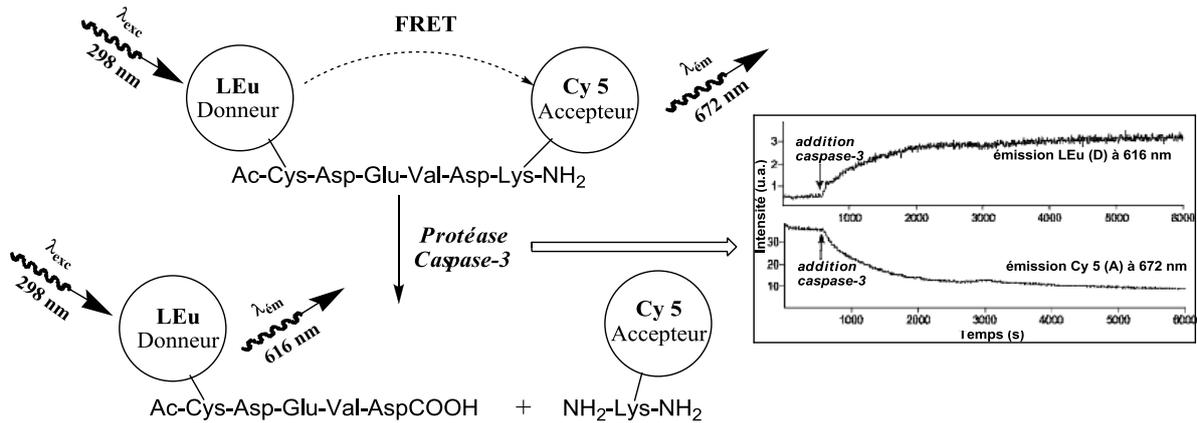


Figure 24. Expérience caspase-3 : représentation schématique de la sonde constituée par un accepteur fluorescent et évolution des intensités d'émission du donneur (616 nm) et de l'accepteur (672 nm) après ajout de caspase-3. ⁽⁵⁶⁾

L'ajout de caspase-3 se traduit par le clivage de la liaison peptidique entre les résidus Asp et Lys de l'extrémité C-terminale et par conséquent par un éloignement des deux partenaires donneur/accepteur et donc une diminution du processus FRET. On observe ainsi une augmentation de l'intensité d'émission du donneur à 616 nm ainsi qu'une diminution de l'intensité d'émission de l'accepteur à 672 nm, mettant ainsi en évidence l'activité protéolytique de l'enzyme.

A partir du même exemple, d'autres auteurs ont utilisé comme molécule acceptrice une molécule non fluorescente (QSY7) à la place du fluorophore Cy5.⁽⁵⁷⁾ Dans ce cas, l'hexapeptide n'est pas fluorescent ; la molécule QSY7 est en effet capable de provoquer un « quenching » de 99,97% de l'émission du chélate d'euporium suite au processus FRET. L'apparition de la fluorescence du complexe d'euporium traduit donc l'activité de l'enzyme.

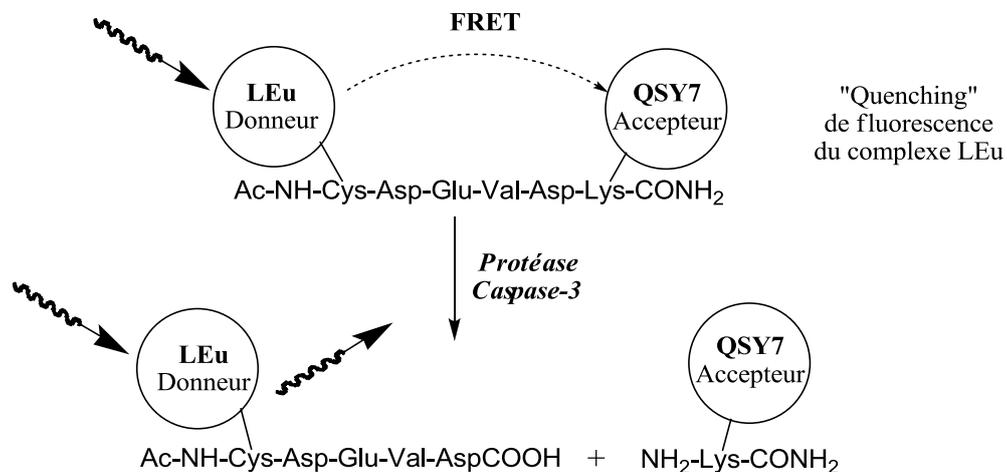


Figure 25. Expérience caspase-3 : représentation schématique de la sonde constituée d'un accepteur non fluorescent.⁽⁵⁷⁾

IV.5. Hybridation d'oligonucléotides

La détection de l'hybridation de l'ADN peut être également réalisée par une étude du transfert d'énergie en milieu homogène et mettant en jeu un complexe d'ion Ln(III) comme motif donneur. Citons en exemple celle développée par K. Matsumoto, mettant en jeu un complexe de terbium (BPTA-Tb) et l'accepteur Cy3 (Figure 26).

Les auteurs⁽⁵⁸⁾ utilisent deux sondes ADN complémentaires de deux régions contiguës d'un ADN cible. L'une de ces sondes a été greffée à l'extrémité 3' par la biotine et la seconde à l'extrémité 5' par le fluorophore organique accepteur (Cy3). Lors de l'hybridation de ces 3 éléments, on assiste à un rapprochement entre l'accepteur et le motif biotine. Lorsque la streptavidine marquée par le complexe d'ion Ln est ajoutée au milieu, celle-ci fixe la biotine en raison de sa forte affinité spécifique pour celle-ci ($K_a = 10^{13} M^{-1}$)⁽⁵⁹⁾. Un processus FRET peut alors s'opérer entre le complexe BPTATb et le motif Cy. La reconnaissance de l'ADN cible se traduit donc par l'apparition d'un signal propre au fluorophore accepteur. La limite de détection de l'ADN cible est de 30 pM.

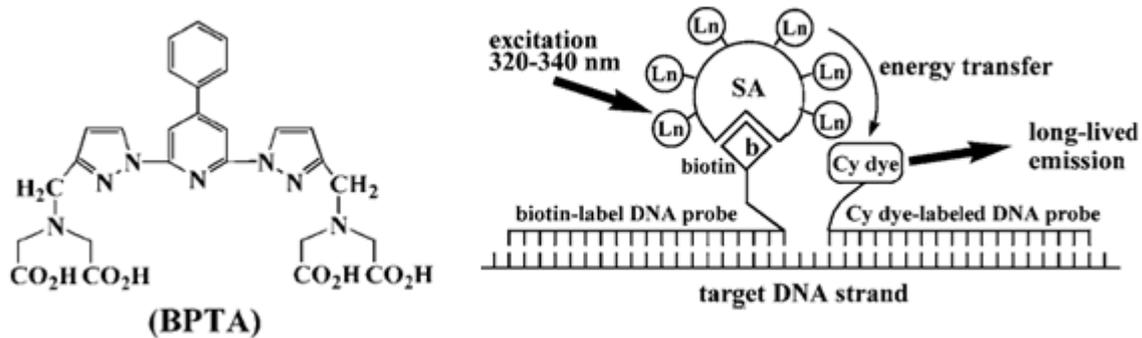


Figure 26. Structure du BPTA et principe de l'analyse d'hybridation d'ADN par la technique FRET (Ln = Tb, Cy dye = Cy3).⁽⁵⁸⁾

Une seconde méthode d'étude d'hybridation d'ADN a également été proposée mettant en jeu simplement le mécanisme de photosensibilisation d'un ion lanthanide (processus A.T.E.E.). Le principe de la méthode est montré dans la figure 27. Cette fois-ci une sonde est marquée à son extrémité 5' par un complexe d'euprium EDTA-Eu, complexe très faiblement fluorescent car n'intégrant pas de chromophore dans sa structure. La seconde sonde est marquée à son extrémité 3' par un ligand bidentate, une β -dicétone. L'hybridation de ces deux sondes complémentaires de l'ADN cible rapproche suffisamment les motifs EDTA-Eu et β -

dicétone pour conduire à la formation d'un complexe ternaire. Dans ce complexe ternaire la β -dicétone peut alors jouer son rôle d'antenne, photosensibiliser l'ion europium et ainsi induire une forte fluorescence du métal. L'ADN cible est ainsi directement détecté par une mesure de fluorescence en temps résolu, avec une limite de détection rapportée de 6 pM.⁽⁶⁰⁾

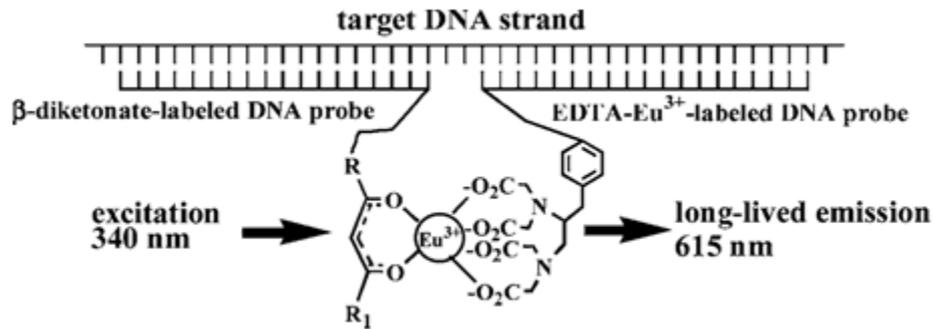


Figure 27. Principe de l'analyse d'hybridation d'ADN par formation d'un complexe ternaire fluorescent EDTA-Eu - β -dicétone.⁽⁶⁰⁾

IV.6. Fluoroimmunosages

Une application importante des complexes d'ions Ln(III) est le dosage immunologique par la méthode de fluoro-immunoassay en temps résolu (TR-FIA). Plusieurs méthodes ont été développées dont plusieurs sont commercialisées. Parmi ces dernières, on peut notamment citer : (1) la technologie DELFIA® (Dissociation Enhancement Lanthanide Fluoro-ImmunoAssay) qui est adaptée pour des dosages hétérogènes et qui met en jeu au final une complexation d'ions Ln(III) par des β -dicétones et leur dosage par fluorescence ;⁽⁶¹⁾ (2) la technologie TRACE® (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) qui est réalisée en milieu homogène et qui fait intervenir un processus FRET.⁽⁶²⁾

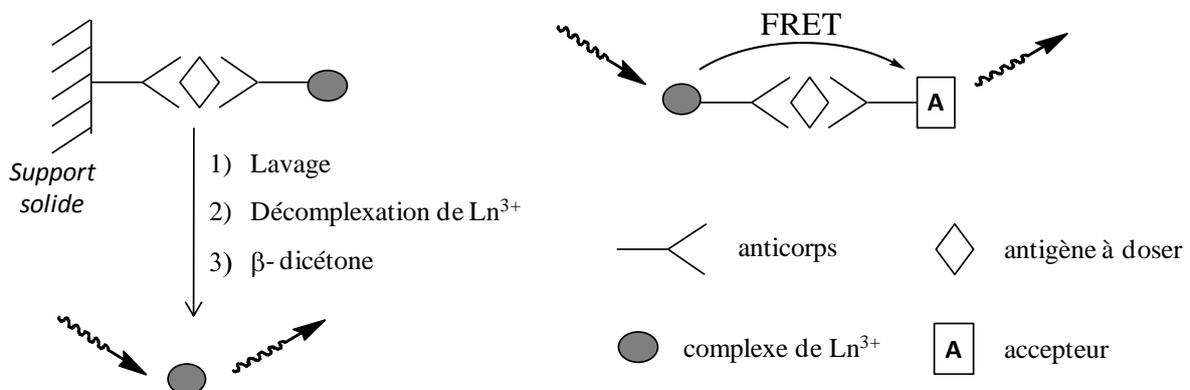


Figure 28. Principe de dosages fluoroimmunologiques DELFIA (a), TRACE (b).

Afin d'illustrer ce type de dosages, nous avons pris comme exemple une méthode permettant de mesurer simultanément deux marqueurs tumoraux, l' α -foetoprotéine (AFP) et l'antigène carcinoembryonique (CEA), dans le sérum humain ⁽⁶³⁾ (Figure 29).

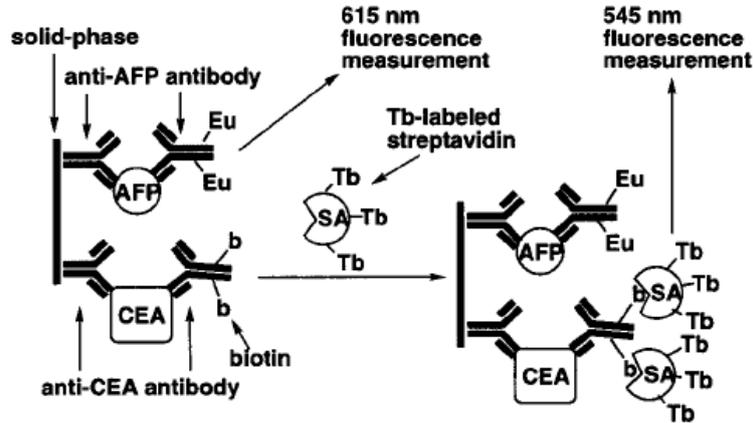


Figure 29. Représentation schématique du système de mesures simultanées des marqueurs AFP et CEA à l'aide de complexes d'Europium et de Terbium. ⁽⁶³⁾

Cette méthode fait intervenir des anticorps monoclonaux anti-AFP et anti-CEA fixés par adsorption physique sur une phase solide (plaque de 96 puits). Après incubation et lavage des puits, un mélange d'anticorps anti-AFP marqués par un complexe Eu(III) et d'anticorps anti-CEA marqués par un motif biotine est ajouté à chaque puit. Après incubation et lavages, une analyse fluorimétrique du complexe d'euporium en temps résolu permet de quantifier l'analyte AFP. Dans un second temps, après addition d'une solution de streptavidine marquée par un complexe de terbium, incubation et lavages, une analyse fluorimétrique du complexe de terbium permet de quantifier l'analyte CEA.

Cette séquence d'additions permet d'éviter la «pollution» du signal à 620 nm du complexe d'euporium par la bande $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$ du terbium. Cet effet est pénalisant lorsque la fluorescence du complexe Tb(III) est plus intense que celle du complexe Eu(III). Les limites de détection de cette méthode sont de 44 pg/mL pour le marqueur AFP et 76 pg/mL pour le marqueur CEA.

IV.7. Imagerie de fluorescence

La littérature fournit plusieurs exemples de l'emploi de complexes fluorescents de lanthanide associé à la technique de microscopie de fluorescence en temps résolu.

Chapitre I

Ainsi, Seveus et al.⁽⁶⁴⁾ ont conjugué un chélate d'europium ($\tau = 0,28$ ms dans l'eau à pH 7,4) à un anticorps afin de localiser l'antigène C242 dans des cellules épithéliales malades de la muqueuse du côlon humaine (cancer du colon). La figure 30 montre la localisation de l'antigène C242 dans ce type de cellules à l'aide du complexe d'europium. La figure 30a représente l'image enregistrée par imagerie de fluorescence classique (c'est-à-dire avec un temps de délai d'enregistrement après l'excitation de zéro); la figure 30b représente l'image obtenue par imagerie de fluorescence en temps résolu. Les flèches indiquent les régions où la forte autofluorescence du tissu a été supprimée, en ayant recours à des mesures en temps résolu.

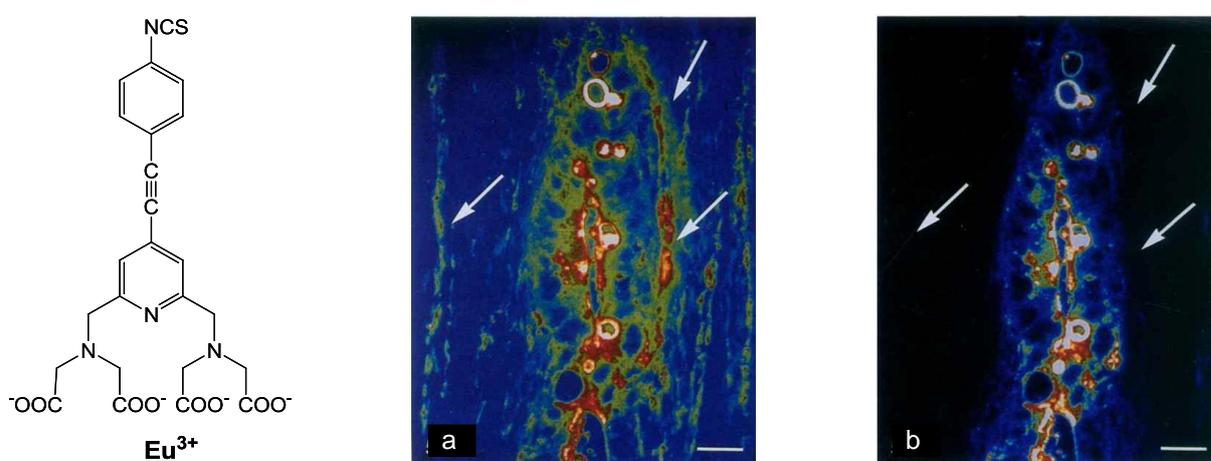


Figure 30. Localisation de l'antigène C242 dans des cellules épithéliales malades de la muqueuse du côlon humaine à l'aide d'un complexe d'europium : a) imagerie de fluorescence classique; b) imagerie de fluorescence en temps résolu.⁽⁶⁴⁾

L'équipe de D. Parker⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ a réalisé des images de cellules (fixées ou vivantes) avec plusieurs complexes Eu(III) et Tb(III) et a étudié leur localisation au niveau des différents compartiments cellulaires. Leurs travaux ont permis de classer ces complexes en trois catégories suivant leur localisation: régions riches en protéines (nucléoles, ribosomes), mitochondries cellulaires ou lysosomes/endosomes.

A titre d'exemple, la figure 31 représente le profil de la localisation de la mitochondrie par la technique de microscopie d'épifluorescence (nouvelle technique rapide pour quantifier les micro-organismes vivants) en utilisant un complexe Eu(III) . Ce résultat a été confirmé par une expérience utilisant le colorant Mitotracker Green (indicateur fluorescent sélectif pour les mitochondries).⁽⁶⁶⁾ Le complexe Eu(III) utilisé n'est pas toxique et ne perturbe pas la membrane mitochondriale d'où son intérêt comme sonde fluorescente intracellulaire.

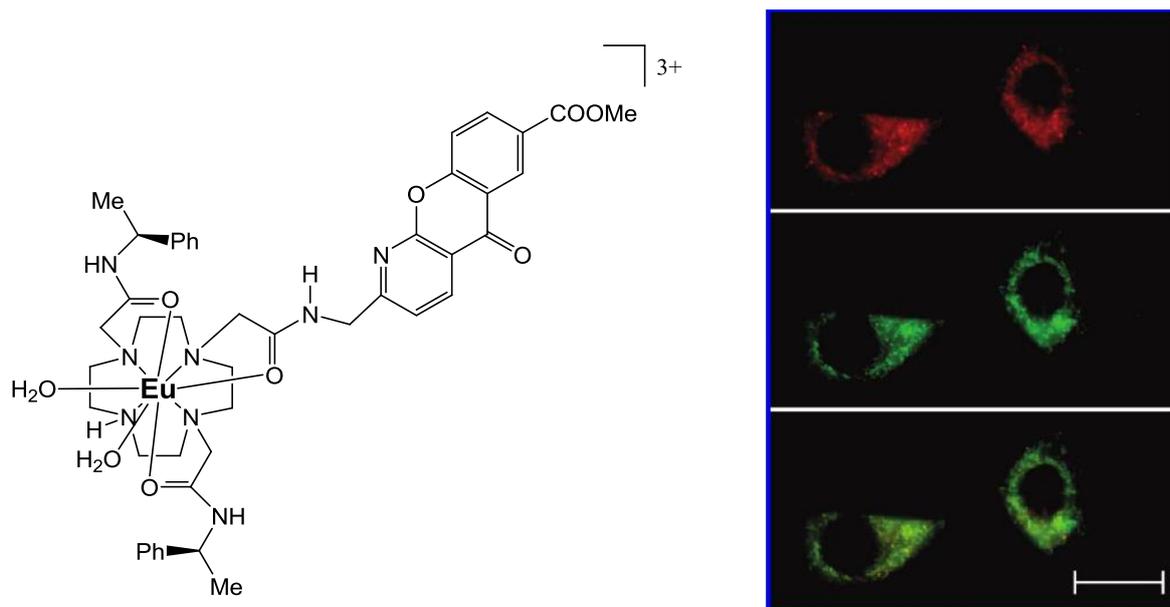


Figure 31. Images de microscopie d'épifluorescence du complexe d'euporium (4h d'incubation, 50 μM du complexe). Profil de la localisation mitochondriale (en haut, émission du complexe d'Eu(III); au centre, émission de Mitotracker Green; en bas, images fusionnées).⁽⁶⁶⁾

Le troisième exemple que nous reportons concerne la détection d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) dans les cellules vivantes. Dans ce but, Song et al.⁽⁶⁸⁾ ont utilisé un complexe MTTA-Eu³⁺, caractérisé par une faible émission de fluorescence. Ce complexe peut réagir spécifiquement avec $^1\text{O}_2$ (et non avec d'autres espèces oxygénées telles que ONOO^- , H_2O_2 , OH^\cdot ou $\text{O}_2^{\cdot-}$) pour former l'endoperoxyde EP-MTTA-Eu³⁺ qui lui est fortement fluorescent (Figure 32).

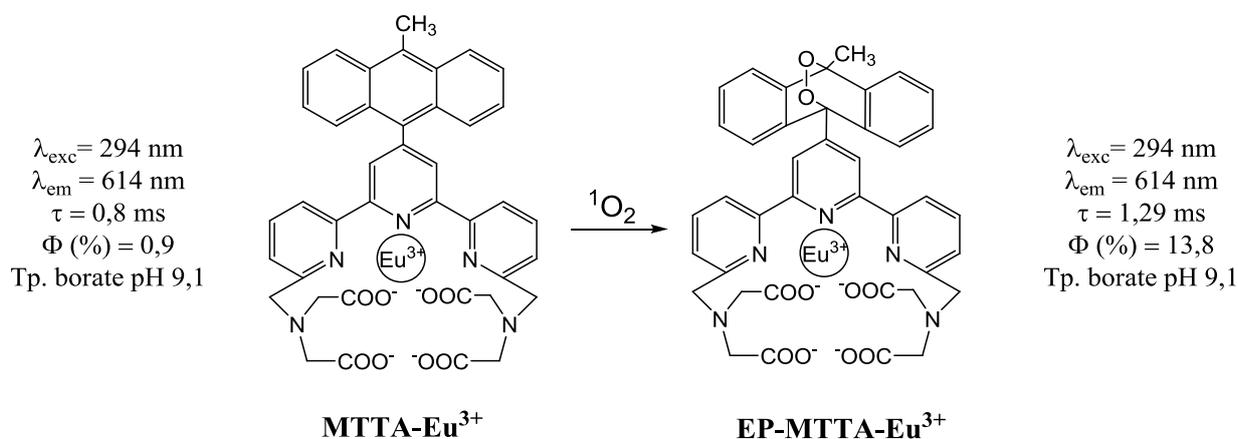


Figure 32. Réaction du MTTA-Eu³⁺ avec $^1\text{O}_2$.⁽⁶⁸⁾

A l'aide du complexe MTTA-Eu³⁺, ces auteurs ont démontré la possibilité de détecter par microscopie de fluorescence la présence d'oxygène singulet, généré par irradiation d'un photosensibilisateur de type porphyrine (TMPyP), à l'intérieur de cellules vivantes (type Hela). Par incubation en solution les deux composantes MTTA-Eu³⁺ et TMPyP forment une paire cation-anion [TMPyP]⁺-[MTTA-Eu³⁺]⁻ permettant leur transfert par endocytose à l'intérieur des cellules, avec un rapport [noyau] / [cytoplasme]= 3. Un temps d'irradiation prolongée des cellules permet une augmentation de la production de ¹O₂ avec formation de EP-MTTA-Eu³⁺ d'où une augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure 33).

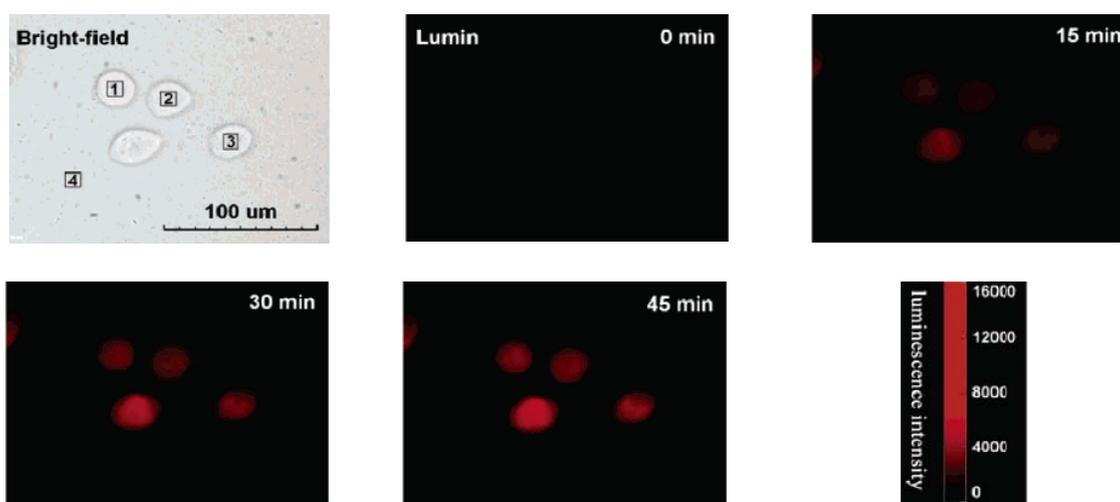


Figure 33. Images de luminescence ($\lambda = 615$ nm) du TMPyP-MTTA-Eu³⁺-cellules Hela à différents temps d'irradiation. Avec 1-3 les régions centre de trois cellules Hela et 4 une région extracellulaire.

IV.8. Sondes bimodales pour l'imagerie

Depuis quelques années, un intérêt croissant s'est porté sur l'utilisation de sondes bimodales, c'est-à-dire de sondes permettant d'associer au sein d'une même structure deux modes d'imagerie. Ainsi l'utilisation d'une sonde associant imagerie de fluorescence et imagerie par résonance magnétique nucléaire permettrait de corréler des observations réalisées avec une grande sensibilité (microscopie de fluorescence) avec celles réalisées avec une excellente résolution (IRM).

L'ensemble des ions lanthanide présentant une chimie de coordination comparable, il est possible de définir des ligands bivalents, c'est-à-dire des ligands dont les complexes Gd^{III}

Chapitre I

sont actifs en IRM et dont les complexes Eu^{III} , Tb^{III} ou $\text{Nd}(\text{III})$, $\text{Yb}(\text{III})$ sont fluorescents. Cette approche se heurte cependant aux exigences propres aux deux techniques. Rappelons en effet que les complexes de gadolinium pouvant induire une réponse efficace en Imagerie par Résonance Magnétique doivent présenter au moins une molécule d'eau coordonnée au métal afin de permettre un échange (aussi rapide que possible) avec les molécules d'eau du milieu extérieur (c'est-à-dire du milieu à analyser). Alors que dans le cas des complexes d'ions $\text{Ln}(\text{III})$ fluorescents, la coordination de molécules d'eau à l'ion métallique a un effet défavorable sur leurs propriétés photophysiques (« quenching » de fluorescence).

Dans ce cadre plusieurs ligands potentiels ont été décrits dans la littérature associant ion $\text{Gd}(\text{III})$ d'une part et ion $\text{Eu}(\text{III})$, $\text{Tb}(\text{III})$ ou $\text{Nd}(\text{III})$ d'autre part. ⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾

Nous prendrons comme exemple significatif les travaux de Manning et al. ⁽⁷⁵⁾ qui ont permis de mettre en évidence l'utilisation de telles sondes pour une application directe dans le domaine de la biologie. Le problème posé est de pouvoir visualiser par IRM et imagerie de fluorescence la PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor), une protéine présente dans diverses pathologies (par exemple, le cancer du sein et la maladie d'Alzheimer). Dans ce but, les auteurs ont élaboré un chélate de lanthanide ($\text{Eu}(\text{III})$, $\text{Gd}(\text{III})$) trifonctionnel, constitué d'un résidu cyclen porteur de fonctions acide phosphonique (récepteur d'ions $\text{Ln}(\text{III})$), d'une quinoléine (chromophore pour photosensibiliser l'ion $\text{Eu}(\text{III})$) et d'un motif PK11195 connu comme ligand spécifique de la PBR (Figure 34).

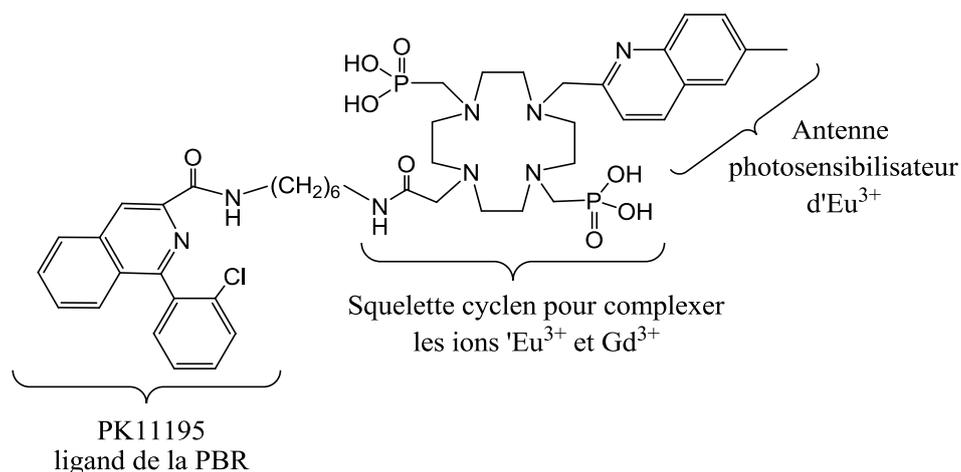


Figure 34. Ligand trifonctionnel utilisé pour visualiser la présence de PBR. ⁽⁷⁵⁾

Au niveau des expériences d'imagerie, les auteurs ont utilisé une approche « cocktail », c'est-à-dire une administration d'un mélange de complexes $\text{Eu}(\text{III})$ (40%) et $\text{Gd}(\text{III})$ (60%) pour

étudier une population de cellules gliales. Les images obtenues (Figure 35) montrent que cette démarche a été couronnée de succès, en contribuant à une amélioration de contraste en imagerie de fluorescence de 9:1 et de contraste en IRM de 1,7:1.

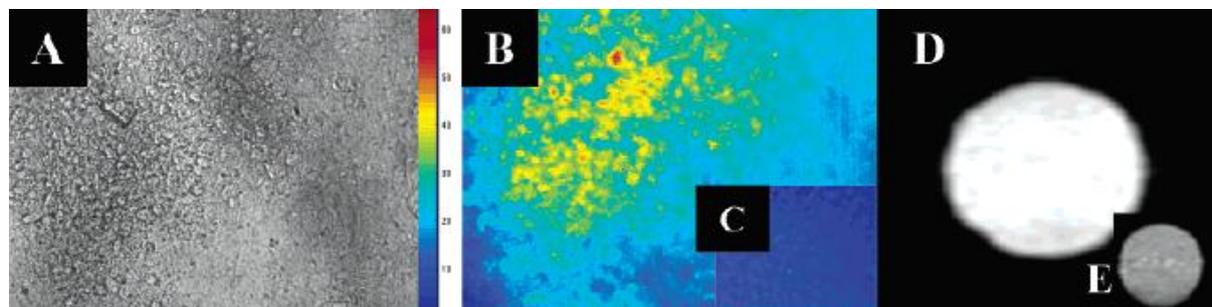


Figure 35. Images en mode imagerie de fluorescence et IRM d'une population de cellules gliales C6 dosées avec un cocktail L_{Eu} (40%) et L_{Gd} (60%) (La structure L est indiquée Figure 34). (A) images en lumière blanche ; (B) et (C) visualisation en imagerie de fluorescence de cellules gliales dosées et non dosées, respectivement ; (D) et (E) visualisation en mode IRM de cellules gliales dosées et non dosées, respectivement.⁽⁷⁵⁾

V Objectifs de ce travail

L'idée directrice de nos travaux porte sur l'élaboration de nouveaux fluorophores basés sur l'émission d'ions lanthanide, fluorophores potentiellement utilisables pour des applications dans le domaine de la biologie. Nous avons privilégié l'étude de complexes d'euprium(III) et de terbium(III), en raison de leurs durées de vie d'émission pouvant atteindre quelques millisecondes et de leurs rendements quantiques appréciables en milieu aqueux.

Pour de telles applications, l'analyse des données de la littérature nous a permis de dégager trois caractéristiques essentielles auxquelles doit répondre un ligand efficace :

- 1) Assurer la stabilité du complexe Ln(III) en milieu aqueux à pH physiologique.
- 2) Intégrer dans sa structure un chromophore aux propriétés photophysiques adéquates afin d'exalter les propriétés fluorescentes de l'ion lanthanide (effet A.TE.E).
- 3) Exclure toute molécule d'eau de la sphère de coordination du métal afin de limiter les désactivations non radiatives générées par les oscillateurs OH.

Chapitre I

Pour satisfaire ces critères, nous avons retenu en premier lieu des ligands macrocycliques incorporant un chromophore intracyclique et des chaînes latérales acide acétique. De tels ligands présentent plusieurs caractéristiques notables: i) en raison de « l'effet macrocyclique »,⁽⁷⁶⁾ on peut présumer qu'une structure macrocyclique sera plus efficace qu'une structure acyclique pour assurer une stabilité satisfaisante des complexes; ii) la présence de fonctions acide carboxylique permet d'induire une solubilité et une forte stabilité an milieu aqueux des complexes. De plus, la coordination initiale de tels groupes anioniques permet de rompre la sphère d'hydratation du lanthanide et permet ainsi à des atomes neutres (atomes d'azote par exemple) incorporés dans le ligand de coordonner l'ion ;⁽²⁴⁾ iii) au niveau de telles structures, l'étape de photosensibilisation chromophore \rightarrow Ln(III) s'effectue entre partenaires situés dans une conformation rigide, susceptible d'améliorer cette étape de transfert d'énergie.

Une telle famille de ligands est toutefois peu décrite dans la littérature. Ceci peut être relié à la difficulté présumée à l'obtention de telles molécules mettant en jeu un processus de macrocyclisation, malgré tout pas toujours maîtrisé. Jusqu'à présent, de tels ligands sont principalement dérivés du motif diéthylènetriamine N,N',N''-triacétique, DTTA (Figure 36). Ces ligands affichent un nombre de coordination de 7 à 9 en fonction de la nature de l'hétérocycle utilisé, ce qui se traduit par la présence d'une ou deux molécules d'eau dans la sphère de coordination du lanthanide lorsque qu'un hétérocycle bidente ou monodente est mis en jeu.

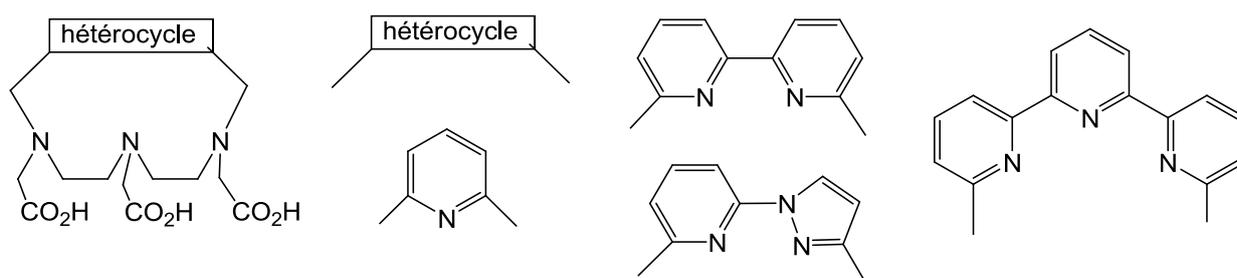


Figure 36. Macrocycles incorporant un hétérocycle intracyclique et des chaînes latérales acide acétique décrits dans la littérature.^(70,77,78,79)

Dans ce cadre et à la suite des travaux antérieurs effectués au sein de l'équipe, décrivant les propriétés de fluorescence significatives de complexes Eu(III) et/ou Tb(III) dérivés de tels macrocycles construits sur le squelette DTTA,^(70,77,78) nous avons entrepris la synthèse de nouveaux ligands macrocycliques. Ces derniers sont dérivés d'un motif triéthylènetétramine N,N',N''N'''-tétraacétique (TTTA). A notre connaissance, le motif TTTA

Chapitre I

n'a pas été étudié pour la complexation de cations, et a fortiori pour les ions lanthanide. Un tel motif, potentiellement octadente (4 atomes d'azote et 4 fonctions acide carboxylique), permet à priori de compléter plus efficacement la sphère de coordination du métal. Rappelons que le nombre de coordination d'un ion lanthanide est généralement compris entre 8 et 10.

Les ligands envisagés sont représentés dans la figure 37. Ce sont des macrocycles à 15, 18 ou 21 chaînons et affichant 9, 10 ou 11 sites de coordination potentiels.

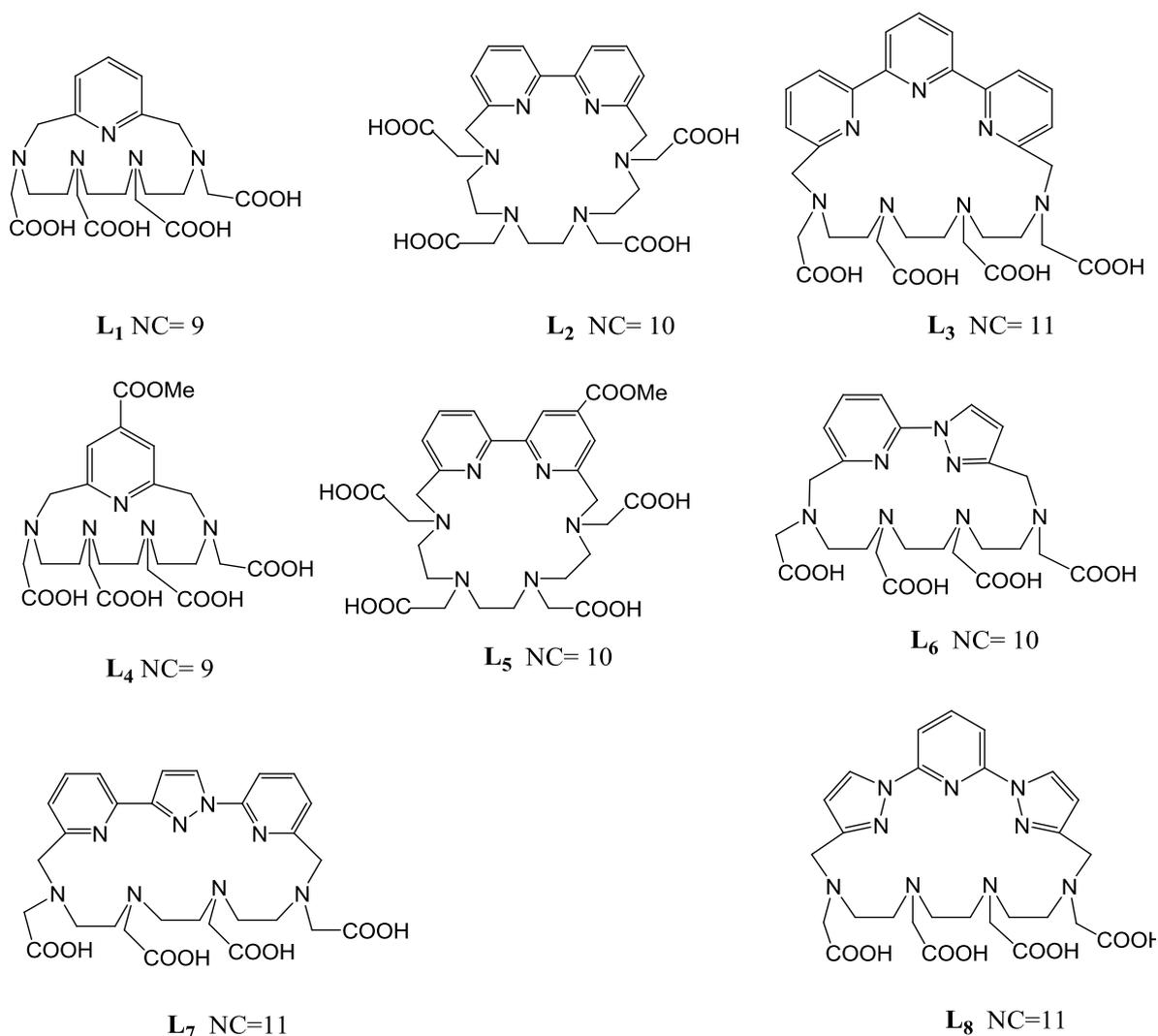


Figure 37. Structure des ligands macrocycliques **L₁-L₈** envisagés pour la complexation d'ions Eu^{3+} et Tb^{3+} (NC est le nombre de coordination potentiel).

Nous avons retenu comme collecteur de lumière des chromophores conventionnels, des mono-, di-, tri-hétérocycles azotés dérivés de la pyridine et du pyrazole. Ces chromophores sont connus pour leur capacité à absorber l'énergie lumineuse et à la transférer efficacement à l'ion lanthanide. Ils présentent une bande d'absorption relativement intense

dans la région du proche UV ($\lambda_{\text{max}} \sim 270 - 320 \text{ nm}$) et possèdent un état excité triplet d'énergie suffisamment élevé pour transférer l'énergie aux états excités des ions Eu(III) et Tb(III).^(28,78) D'autre part, les ligands **L**₄ et **L**₅ comportent une fonction ester de méthyle branchée sur l'hétérocycle. Cette fonction ester aromatique a été envisagée car elle est susceptible d'être déclinée en plusieurs autres fonctions réactives permettant un branchement du complexe sur une biomolécule.⁽⁸⁰⁾

Nous avons également favorisé dans nos travaux une seconde approche, à savoir l'utilisation de ligands dérivés du DOTA (1,4,7,10-tétracarboxyméthyl-1,4,7,10-tétraazacyclododécane) où l'une des branches acide acétique est remplacée par un hétérocycle jouant le rôle d'antenne. Ce type de ligands est bien connu pour engendrer une excellente stabilité de leurs complexes Ln(III). Le chromophore utilisé est constitué d'un motif N,C-pyrazolyl-pyridine. Ce chromophore s'est révélé efficace pour photosensibiliser l'ion Tb(III) dans des structures acycliques ou macrocycliques,^(71,78) mais a conduit à des résultats décevants au niveau de son introduction dans des structures tripodes.^(81,82)

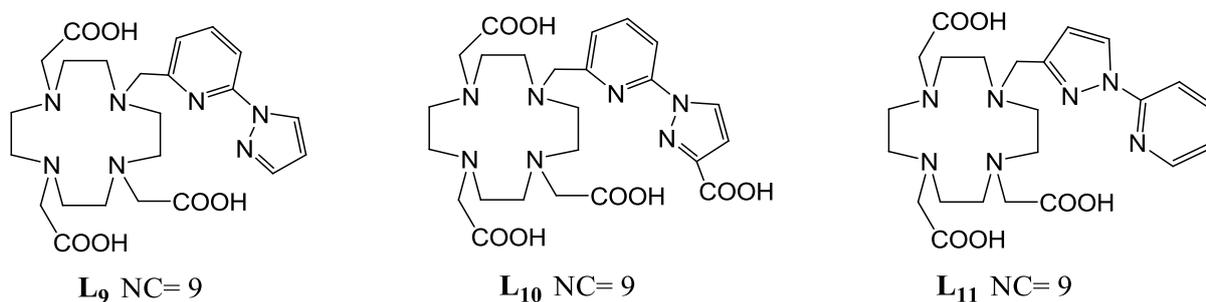


Figure 38. Structure des ligands **L**₉, **L**₁₀ et **L**₁₁ envisagés pour la complexation d'ions Eu³⁺ et Tb³⁺ (NC est le nombre de coordination potentiel).

La suite de ce manuscrit est organisée de la manière suivante: après avoir décrit la synthèse des ligands à chromophore intracyclique, **L**₁ – **L**₈ (chapitre II), nous présenterons l'étude photophysique en milieu aqueux des complexes d'euporium(III) et de terbium (III) correspondants à ces ligands (chapitre III). Le chapitre IV sera consacré à la synthèse des ligands à chromophore extracyclique, **L**₉ – **L**₁₁ et aux propriétés de fluorescence de leurs complexes Eu(III) et Tb(III). La partie expérimentale de nos travaux est regroupée dans un dernier chapitre (chapitre V).

VI Bibliographie

- (1) <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
- (2) Sun, W.C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.
- (3) Voss, E. W.; Workman, C. J., Mummert, M. E. *Biotechniques* **1996**, *20*, 286-291
- (4) Lo, K. K.-W.; Lee, T. K.-M.; Zhang, K. Y. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1845-1854.
- (5) Lo, K. K.-W.; Hui, W.-K.; Ng, D. C.-M.; Cheung, K.-K. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 40-46.
- (6) Lo, K. K.-W.; Tsang, K. H.-K.; Sze, K.-S. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1714-1722.
- (7) Lo, K. K.-W.; Li, C.-K.; Lau, K.-W.; Zhu, N. *Dalton Trans.* **2003**, 4682-4689.
- (8) Lo, K. K.-W.; Hui, W.-K.; Chung, C.-K.; Tsang, K. H.-K.; Ng, D. C.-M.; Zhu, N.; Cheung, K.-K. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1434-1450.
- (9) Wong, K. M.-C.; Tang, W.-S.; Chu, B. W.-K.; Zhu, N.; Yam, V. W.-W. *Organometallics* **2004**, *23*, 3459-3465.
- (10) Hemmilä, I.; Laitala, V. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 529-542.
- (11) Yuan, J.; Wang, G. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 559-568.
- (12) Bunzli, J. C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 1048-1077.
- (13) Weissman, S. I. *J. Chem. Phys.* **1942**, *10*, 214-217.
- (14) Yang, C.; Fu, L.-M.; Wang, Y.; Zhang, J.-P.; Wong, W.-T.; Ai, X.-C.; Qiao, Y.-F.; Zou, B.-S.; Gui, L.-L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5010-5013.
- (15) Rodríguez-Cortiñas, R.; Avecilla, F.; Platas-Iglesias, C.; Imbert, D.; Bünzli, J.-C. G.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5336-5349.
- (16) Dexter, D. L. *Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- (17) Forster, T. H. *Discussion Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7-17.
- (18) Lis, S.; Elbanowski, M.; Makowska, B.; Hnatejko, Z. *J. Photochem. Photobiol., A* **2002**, *150*, 233-247.
- (19) Sato, S.; Wada, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 1955-1962.
- (20) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J.-M. *Coord. Chem. Rev.* **1993**, *123*, 201-228.
- (21) Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N. *Acc. Chem. Res* **2009**, *42*, 542-552.
- (22) Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; van der Tol, E. B.; Verhoeven, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9408-9414.
- (23) Ermolaev, V. L.; Sveshnikova, E. B. *Russ. Chem. Rev.* **1994**, *63*, 905-922.
- (24) Sammes, P. G.; Yahioğlu, G. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 1-28.

Chapitre I

- (25) Silva, A. P. D.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2116-2118.
- (26) Silva, A. P. D.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, T. J.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566.
- (27) Sabbatini, N.; Perathoner, S.; Lattanzi, G.; Dellonte, S.; Balzani, V. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6136-6139.
- (28) Latva, M.; Takalo, H.; Mikkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J.-C.; Kankare, J. *J. Lumin.* **1997**, *75*, 149-169.
- (29) Alpha, B.; Balzani, V.; Lehn, J.-M.; Perathoner, S.; Sabbatini, N. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 1266-1267.
- (30) Galaup, C.; Azéma, J.; Tisnès, P.; Picard, C.; Ramos, P.; Juanes, O.; Brunet, E.; Rodríguez-Ubis, J. C. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 1613-1625.
- (31) Petoud, S.; Cohen, S. M.; Bünzli, J.-C. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13324-13325.
- (32) Platas, C.; Avecilla, F.; de Blas, A.; Rodríguez-Blas, T.; Geraldès, C. F. G. C.; Tóth, É.; Merbach, A. E.; Bünzli, J.-C. G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 611-618.
- (33) Alpha, B.; Ballardini, R.; Balzani, V.; Lehn, J.-M.; Perathoner, S.; Sabbatini, N. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 299-306.
- (34) Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 348-357.
- (35) Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2085-2094.
- (36) Parker, D.; Senanayake, P. K.; Williams, J. A. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2129-2139.
- (37) Tircsó, G.; Kovács, Z.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9269-9280.
- (38) Sasamoto, K.; Horiguchi, D.; Nobuhara, M.; Mochizuki, H. Eur. Pat. Appl. EP 493,745, 1992; *Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 3409f.
- (39) Couchet, J. M.; Galaup, C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4869-4872.
- (40) Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodríguez-Ubis, J. C. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 213-216.
- (41) Ge, P.; Selvin, P. R. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1088-1094.
- (42) Chatterton, N.; Bretonnière, Y.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7595-7598.
- (43) Charbonnière, L. J.; Ziessel, R. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3402-3410.
- (44) Ulrich, G.; Bedel, S.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8835-8837.
- (45) Charbonnière, L.; Ziessel, R.; Guardigli, M.; Roda, A.; Sabbatini, N.; Cesario, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2436-2437.

Chapitre I

- (46) Pal, R.; Parker D. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1020-1033.
- (47) Dickins, R.S.; Gunnlaugsson, T.; Parker, D.; Peacock, R.D. *Chem. Commun.* **1998**, 1643-1644.
- (48) Charbonnière, L. J.; Ziessel, R.; Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Boehme, C.; Wipff, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7779-7788.
- (49) Parker, D. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 109-130.
- (50) Reany, O.; Gunnlaugsson, T.; Parker, D. *Chem. Commun.* **2000**, 473-474.
- (51) Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Urano, Y.; Nagano, T. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 2996-2999.
- (52) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Rice, T. E.; Stewart, R. *Chem. Com.* **1997**, 1891-1892.
- (53) Terai, T.; Kikuchi, K.; Iwasawa, S.-Y.; Kawabe, T.; Hirata, Y.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6938-6946.
- (54) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4588.
- (55) Selvin P R *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, *7*, 730-734.
- (56) Poupart, S.; Boudou, C.; Peixoto, P.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4165-4177.
- (57) Karvinen, J.; Laitala, V.; Mäkinen, M.-L.; Mulari, O.; Tamminen, J.; Hermonen, J.; Hurskainen, P.; Hemmilä, I. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1429-1436.
- (58) Sueda, S.; Yuan, J.; Matsumoto, K., *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 200-205.
- (59) Freitag ,S.; Le Trong , I.; Klumb , L.; Stayton, P.; Stenkamp, R., *Protein Science* **1997**, *6*, 1157-1166.
- (60) Marriott, G.; Heidecker, M. E.; Diamandis, P.; Yan-Marriott,Y., *Biophys. J.* **1994**, *67*, 957-965.
- (61) Hemmilä, I.; Webb, S. *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 373-381.
- (62) Bazin, H.; Trinquet, E.; Mathis, G. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *82*, 233-250.
- (63) Yuan, J.; Wang, G.; Majima, K.; Matsumoto, K., *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1869-1876.
- (64) Seveus, L.; Vaisala, M.; Syrjanen, S.; Sandberg, M.; Kuusisto, A.; Harju, R.; Salo, J.; Hemmila, I.; Kojola, H.; Soini, E. *Cytometry* **1992**, *13*, 329-338.
- (65) New, E. J.; Parker, D.; Smith, D. G.; Walton, J. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 238-246.
- (66) Montgomery, C. P.; Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 925-937.
- (67) Pandya, S.; Yu, J.; Parker, D. *Dalton Trans.* **2006**, 2757-2766.

Chapitre I

- (68) Song, B.; Wang, G.; Tan M.; Yuan J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13442-13450.
- (69) Lowe, M. P.; Parker, D.; Reany, O.; Aime, S.; Botta, M.; Castellano, G.; Gianolio, E.; Pagliarin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7601–7609.
- (70) Nasso, I.; Galaup, C.; Havas, F.; Tisnès, P.; Picard, C.; Laurent, S.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8293-8305.
- (71) Picard, C.; Geum, N.; Nasso, I.; Mestre, B.; Tisnes, P.; Laurent, S.; Muller, R. N.; Vander Elst, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5309-5312.
- (72) Nonat, A.; Gateau, C.; Fries, P. H.; Mazzanti, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7133-7150.
- (73) Laurent, S.; Vander Elst, L.; Wautier, M.; Galaup, C.; Muller, R. N.; Picard, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6230-6233.
- (74) Pellegatti, L.; Zhang, J.; Drahos, B.; Villette, S.; Suzenet, F.; Guillaumet, G.; Petoud, S.; Tóth, É. *Chem. Commun.* **2008**, 6591 - 6593.
- (75) Manning, H. C.; Goebel, T.; Thompson, R. C.; Price, R. R.; Lee, H.; Bornhop, D. J. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1488-1495.
- (76) Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J. *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 271-339.
- (77) Galaup, C.; Couchet, J.-M.; Bedel, S.; Tisnès, P.; Picard, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2274-2284.
- (78) Nasso, I.; Bedel, S.; Galaup, C.; Picard, C. *Eur. J. Inorg. Chem* **2008**, 2064-2074.
- (79) Kim, W. D.; Kiefer, G. E.; Maton, F.; McMillan, K.; Muller, R. N.; Sherry, A. D. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2233-2243.
- (80) Havas, F.; Leygue, N.; Danel, M.; Mestre, B.; Galaup, C.; Picard, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7673-7686.
- (81) Bedel, S. Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse 2004.
- (82) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodríguez-Blasco, M. A.; Pereira Vila-Nova, S.; Rodríguez-Ubis, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1353-1355.

Chapitre I

**Chapitre II : Synthèse de ligands
macrocycliques à motif acide triéthylène
tétraamine tétraacétique et intégrant un
chromophore intracyclique**

Chapitre II

I Introduction

L'objectif des travaux décrits dans ce chapitre est de réaliser la synthèse de macrocycles polyazotés intégrant dans leur structure un motif chromophore (mono, bi, tri-hétérocycle) permettant d'exalter la fluorescence d'ions lanthanide (Eu^{3+} et Tb^{3+}) et un motif polyaminocarboxylique (acide triéthylène tétramine N, N', N'', N'''-tétraacétique) assurant la stabilité du complexe lanthanidique en milieu aqueux.

Les différentes structures envisagées sont représentées dans le schéma 1.

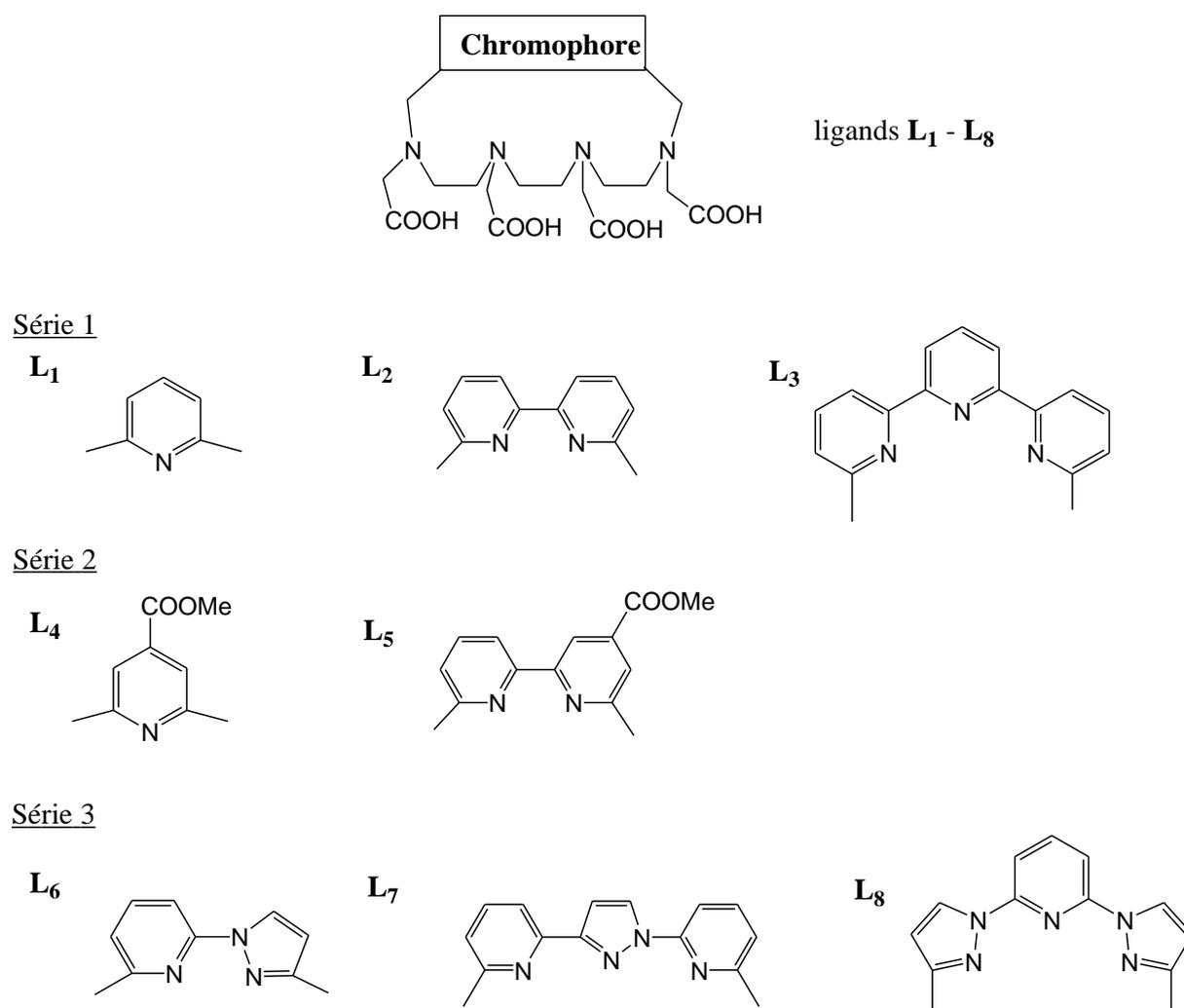


Schéma 1. Molécules cibles.

Chapitre II

Afin d'accéder aux molécules cibles représentées dans le schéma 1, deux stratégies de synthèse peuvent être envisagées (Schéma 2).

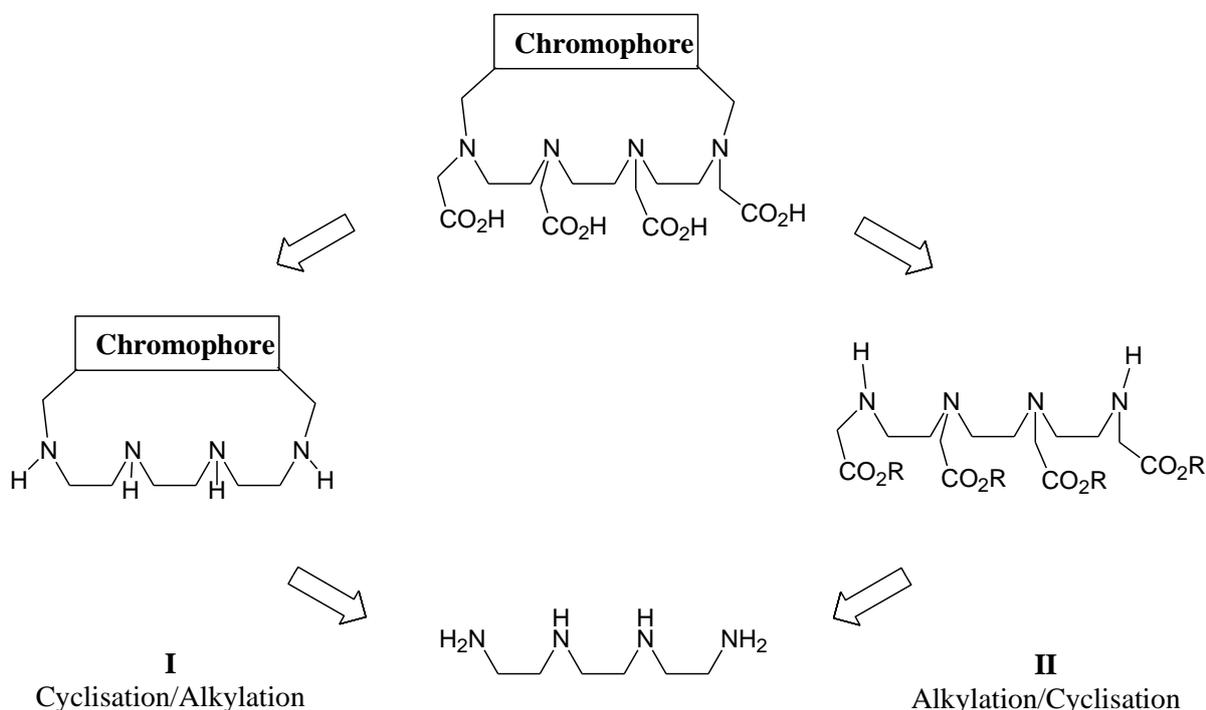


Schéma 2. Stratégies de synthèse envisageables.

La première voie décrite dans le schéma 2 est la voie classiquement utilisée pour la préparation de polyazamacrocycles porteurs de motifs latéraux acide acétique. Elle met en jeu une séquence macrocyclisation/alkylation : i) synthèse d'un polyazamacrocycle porteur de fonctions amine secondaire, ii) introduction de motifs acide acétique sur cette plateforme macrocyclique.

L'intérêt de ce schéma de synthèse est de pouvoir s'appuyer sur de nombreuses données de la littérature pour la construction de ce type de polyazamacrocycles. Toutefois les différentes voies de synthèse de ces composés proposées par la littérature ne sont pas toujours compatibles avec la présence de fonctions ester au niveau des unités hétérocycliques. D'autre part, l'introduction de motifs acide acétique sur cette plateforme macrocyclique peut se révéler délicate et ainsi contrebalancer les bons rendements obtenus lors de l'étape de macrocyclisation.

La seconde voie, initiée au niveau de notre équipe, implique une séquence alkylation/macrocyclisation : i) préparation de dérivés polyamines porteurs de fonctions acide acétique (protégées sous forme ester), ii) réaction de macrocyclisation.

Chapitre II

Ce schéma de synthèse permet de limiter le nombre d'étapes postérieures à la réaction de macrocyclisation (étape pouvant être limitante), mais implique la préparation de précurseurs polyamines présentant deux fonctions amine secondaire terminales. Cette dernière contrainte nécessite un travail prospectif pour l'obtention de ces dérivés polyamines, en regard de l'absence relative de la littérature les concernant.

Pour chacune de ces voies de synthèse, l'étape critique est la réaction de macrocyclisation (fermeture de cycle). En effet, lorsque l'on fait réagir entre elles des entités bifonctionnelles, plusieurs phénomènes peuvent se produire (voir schéma 3) :

- cyclisation (formation d'un monomère, dimère ou oligomère cyclique)
- polymérisation (formation d'une chaîne linéaire)

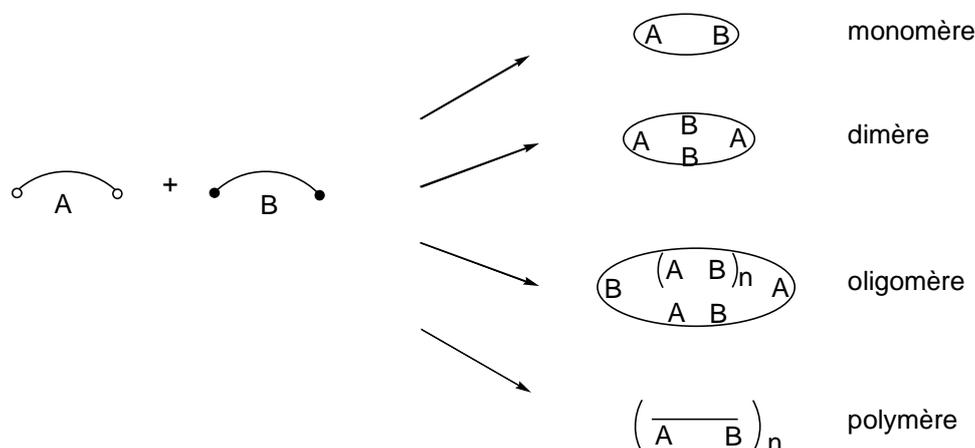


Schéma 3. Cyclisation et polymérisation.

Il faut donc pouvoir orienter la réaction vers la fermeture du cycle souhaitée (monomère) plutôt que vers la formation de cycles de taille supérieure ou (et) de formes polymériques. Il existe plusieurs moyens de favoriser la cyclisation.

1) Le recours au principe de haute dilution

Dans le cas de macrocyclisation à partir de deux segments, la haute dilution est réalisée par une addition lente et simultanée des deux réactifs à un volume important de solvant. Une vitesse d'addition suffisamment lente minimise le risque de formation de polymères. D'autre part, les réactions mises en jeu doivent être aussi rapides que possible, de façon à maintenir les conditions de haute dilution; c'est-à-dire une très faible concentration stationnaire en réactifs de 10^{-6} M.

2) La présence dans les chaînes à cycliser de facteurs structuraux

Chapitre II

Les groupes rigides (liaisons multiples ou liaisons aromatiques réduisent le nombre de degré de liberté conformationnelle d'une molécule par diminution de rotations internes; on augmente ainsi la probabilité pour que la molécule soit dans une conformation favorable à la cyclisation. Des substituant volumineux à proximité des groupes réactifs peuvent également augmenter la probabilité de cyclisation non seulement par leur effet sur la conformation de la chaîne à cycliser mais aussi parce qu'ils peuvent créer un empêchement stérique aux réactions intermoléculaires.

3) Un effet de matrice

Celui-ci est en règle générale généré par un ion métallique et correspond à une contribution entropique favorable. L'ion métallique agit dans ce cas pour organiser le précurseur du macrocycle autour de lui suivant une conformation pseudo-cyclique, prédisposant ainsi les deux extrémités réactives de la molécule à proximité l'une de l'autre et facilitant ainsi la cyclisation. Cet effet de matrice exige la présence d'hétéroatomes dans les chaînes à cycliser afin d'induire des interactions électrostatiques avec l'ion métallique.

En prenant comme fil conducteur les deux stratégies de synthèse décrites dans le schéma 2, nous ferons, dans une première partie de ce chapitre, un rappel bibliographique sur les différentes voies d'accès proposées par la littérature pour accéder à ce type de composés macrocycliques. Cet examen de la littérature nous permettra de conforter ou de limiter chacune de ces deux stratégies.

Dans une seconde partie, nous exposerons les voies de synthèse explorées pour l'obtention du synthon tétramine-tétraester, synthon indispensable pour la mise en œuvre de la stratégie Alkylation/Cyclisation (voie II, Schéma 2).

Nous décrirons ensuite les résultats que nous avons obtenu en appliquant cette stratégie (Alkylation/Cyclisation) lors de la préparation des macrocycles dérivés des chromophores pyridine, 2,2'-bipyridine et 2,2':6'-2''-terpyridine (Série 1, Schéma 1). Cette étude permettra notamment de valider cette stratégie tout en précisant l'influence de la taille du cycle à former (15, 18 et 21 chaînons) sur le rendement de la réaction de macrocyclisation.

Cette même stratégie sera appliquée à la synthèse des deux macrocycles dérivés des motifs pyridine et 2,2'-bipyridine substitués par une fonction ester, puis à celle de macrocycles dérivés de motifs mixtes pyridine-pyrazole (Séries 2 et 3, Schéma 2).

II Rappels bibliographiques sur les voies d'accès aux polyazamacrocycles

De nombreuses méthodes de cyclisation pour la préparation de polyazamacrocycles ont été décrites. Aussi, pour une revue exhaustive, nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage de Bradshaw et Izatt sur la synthèse de macrocycles aza-couronne.⁽¹⁾ Notre rappel bibliographique se limitera aux données de la littérature décrivant l'accès à des polyazamacrocycles intégrant dans leur structure un hétérocycle intracyclique.

II.1. Stratégie 1 : Cyclisation / Alkylation

II.1.1. Cyclisation

II.1.1.a. Voie de Richman-Atkins et variantes

La réaction de macrocyclisation peut mettre en jeu soit la formation de deux fonctions amine, soit la formation de deux fonctions imine ou amide qui peuvent ensuite être réduites en fonctions amine. En ce qui concerne la stratégie la plus directe (formation de fonctions amine), la méthode de cyclisation la plus employée est probablement la méthode de Richman et Atkins (1974)⁽²⁾ qui consiste à faire réagir des disulfonates (ou bien des dihalogénures) sur des sels dimétalliques de bis-sulfonamides. Ainsi, par exemple:

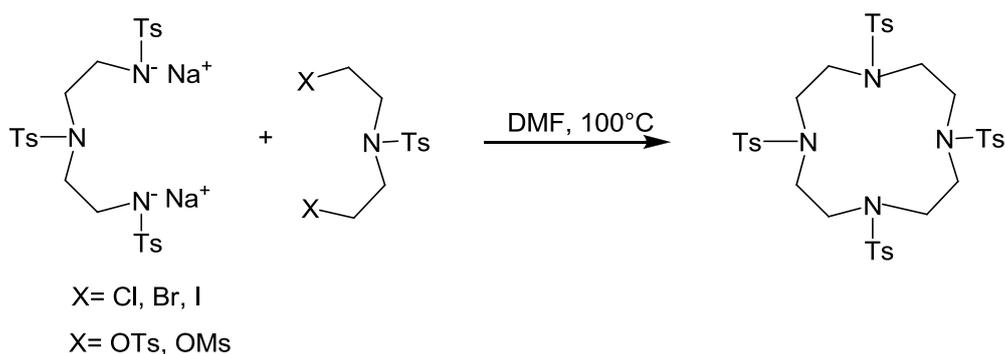


Schéma 4. Méthode de Richman-Atkins.

Cette réaction conduit généralement aux polyazamacrocycles avec de bons rendements, tout en évitant l'utilisation de la technique de haute dilution ($[\text{réactants}] \approx 0.1 \text{ M}$). Bien qu'un cation métallique (Na^+) soit présent dans le milieu réactionnel, aucun effet de matrice ionique

Chapitre II

n'a été mis en évidence. La substitution de l'ion sodium par un cation organique (tétraméthylammonium) n'a pas en effet d'incidence sur le rendement de macrocyclisation. Dans cette méthode de Richman et Atkins, les groupements tosyloxy sont utilisés comme groupements protecteurs des fonctions amines, mais servent surtout à favoriser la réaction de macrocyclisation aux dépens des réactions de polymérisation. Ces groupements volumineux gênent en effet la libre rotation des liaisons voisines des groupes N-Ts, et par voie de conséquence diminuent la mobilité rotationnelle de l'intermédiaire cyclique. Ceci se traduit par une faible perte d'entropie interne lors de la cyclisation. En d'autres termes, la présence de groupes tosyloxy contribue à la préorganisation de l'intermédiaire réactionnel et favorise l'état de transition conduisant à une cyclisation intramoléculaire.

Deux points sont à relever au niveau de cette méthode de cyclisation :

- Le rendement de cyclisation est dépendant des longueurs des chaînes à cycliser. Les travaux de Iwata et Kuzuhara⁽³⁾ ont en effet montré que les meilleurs rendements ont été obtenus lors de couplage de réactants électrophiles présentant la longueur de chaîne la plus courte et de réactants nucléophiles présentant la longueur de chaîne la plus grande.
- L'utilisation de dihalogénures au lieu de disulfonates implique des rendements de cyclisation plus modestes.

Cette méthode a été notamment employée pour la préparation de macrocycles incorporant un noyau pyridine ou 2,2'-bipyridine.^(4,5)

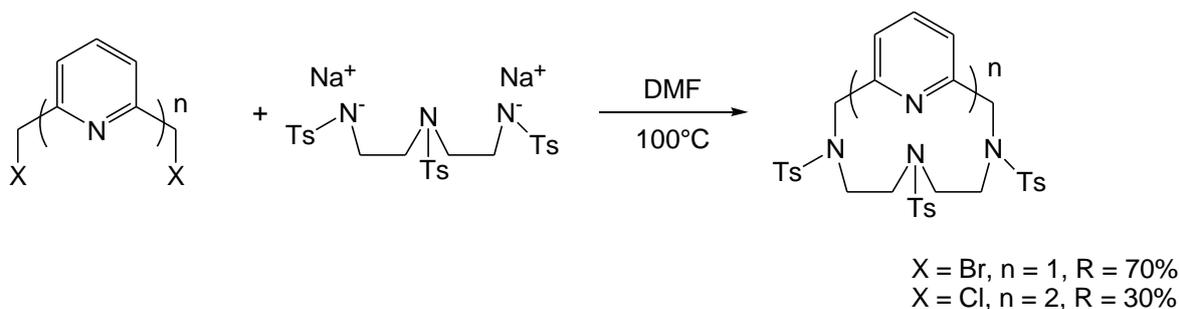


Schéma 5. Rendements de cyclisation de macrocycles à 12 et 15 chaînons selon Stetter et al.⁽⁴⁾ et Newkome et al.⁽⁵⁾ respectivement.

En 1997, Aime et al.⁽⁶⁾ ont introduit une modification à cette procédure : substitution du DMF par l'acétonitrile, utilisation de bis-sulfonamides et de carbonate de potassium comme base. De bons rendements de cyclisation ont été ainsi obtenus dans le cas de polyazamacrocycles à motif pyridine (60-90%)⁽⁶⁻⁸⁾ ou 2,2'-bipyridine (77%)⁽⁹⁾. Cette même procédure a également été utilisée pour des macrocycles à motif phénanthroline⁽¹⁰⁾.

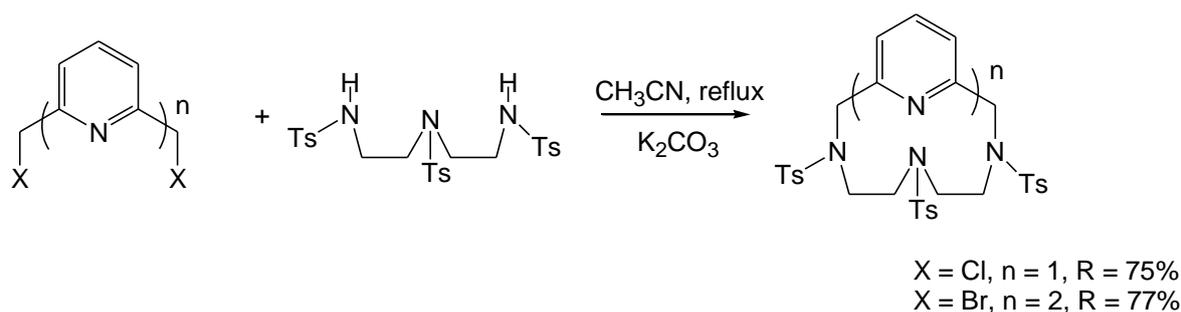


Schéma 6. Rendements de cyclisation de macrocycles à 12 et 15 chaîons selon Aime et al.⁽⁶⁾ et Nasso et al.⁽⁹⁾ respectivement.

Dans le cas des macrocycles dérivés de la 2,2':6'-2''-terpyridine, on pourra noter que l'orientation de la réaction de macrocyclisation vers le cycle monomère ou dimère dépend de la longueur de chaîne du dérivé polyamine. L'utilisation du dérivé triamine ne conduit en effet qu'à l'obtention du macrocycle résultant d'une condensation du type 2:2,⁽¹¹⁾ tandis que dans le cas du dérivé pentaamine la formation du produit de condensation 1:1 est prépondérante.⁽¹²⁾

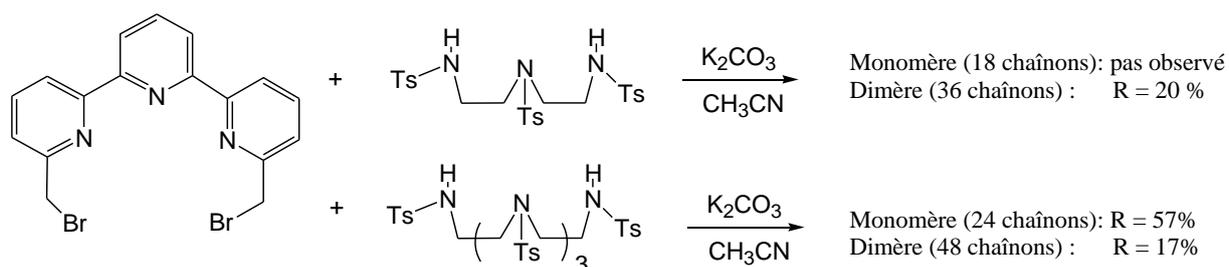


Schéma 7. Réactions de macrocyclisation mettant en jeu la 2,2':6'-2''-terpyridine.^(11, 12)

La méthode de Richman-Atkins comporte en fait deux parties distinctes: la réaction de macrocyclisation, mais aussi la réaction de déprotection des groupements tosyloxy afin de régénérer les fonctions amine secondaires. L'inconvénient majeur du groupe tosylé est sa déprotection difficile, nécessitant des conditions opératoires souvent drastiques: acide sulfurique concentré à 100°C, acide bromhydrique en solution dans l'acide acétique à 90°C, acide bromhydrique en présence de phénol,... Ces conditions ne sont pas compatibles avec la présence de groupements fonctionnels labiles (fonctions ester, éther) au niveau de l'hétérocycle.

Chapitre II

L'utilisation récente de groupements nosyle (2-nitrobenzène sulfonyle), développé par Fukuyama et al, ^(13,14) permet d'obtenir des rendements de cyclisation aussi élevés qu'avec les groupements tosyle et autorise le recours à des protocoles de déprotection à température ambiante (PhSH- Na₂CO₃, HSCH₂CH₂OH- Cs₂CO₃ ou DBU, HSCH₂COOH-LiOH par exemple). Quelques exemples de synthèse sont représentés dans le schéma 8. Cette voie a notamment été utilisée pour la constitution par chimie combinatoire de bibliothèques de polyazapyridinocyclophanes. ^(15,16)

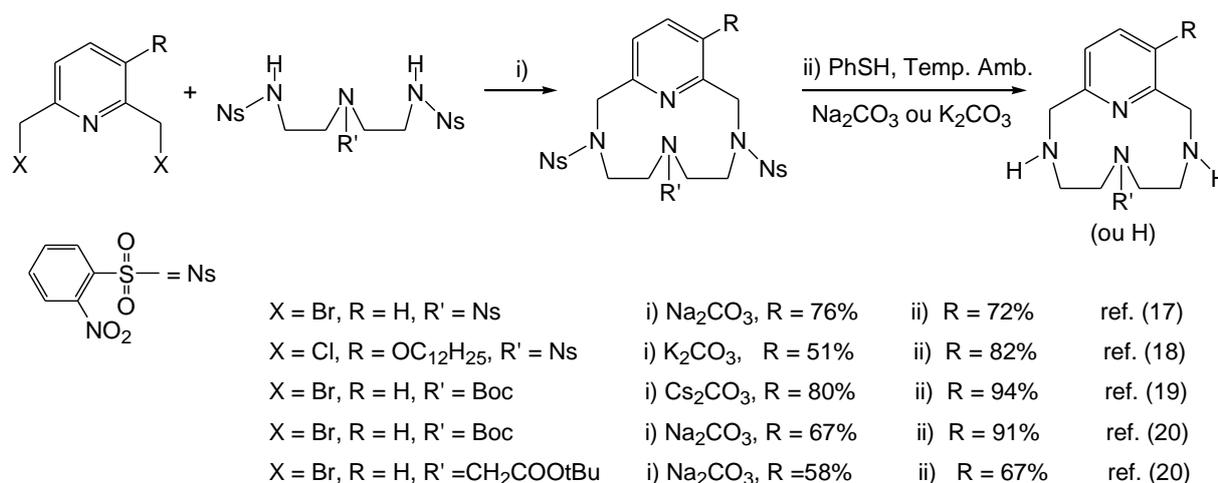
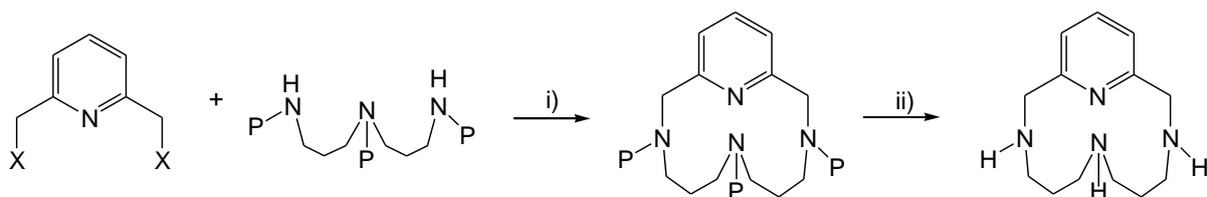


Schéma 8. Réactions de macrocyclisation et de déprotection impliquant les groupements nosyle.

Nous avons également relevé l'utilisation du groupement triméthylsilyléthylsulfonyle (SES-sulfonamide) comme substitutif aux groupes tosyle et nosyle lors de la préparation de polyazamacrocycles dérivés de la pyridine. ⁽²¹⁾ Dans ce cas, uniquement des sous-produits volatils sont formés lors de la réaction de déprotection (CsF).

Chellini et al. ⁽²²⁾ préconisent quant à eux le recours à un groupement diéthoxyphosphoryle ([EtO]₂P[O]) dans la réaction de Richman-Atkins. Le principal avantage de l'utilisation de ce groupement est sa facilité de clivage (HCl gaz à température ambiante). La réaction de macrocyclisation, bien que conduisant à de bons rendements, nécessite toutefois le recours à un système biphasique (toluène –soude aqueuse à 50%) en présence d'un catalyseur de transfert de phase Bu₄N(HSO₄).

L'utilisation de ces deux types de groupement protecteur est illustrée dans le schéma 9.



X = Cl, P = (EtO)₂P(O)

i) Toluène-50% NaOHaq, Bu₄N(HSO₄), reflux, 4h, R = 68%

ii) dioxane-HClgaz, 12h, t.a., R = 90%

X = Br, P = Me₃SiCH₂CH₂SO₂

i) DMF, Cs₂CO₃, t.a., 48h, R = 61%

ii) DMF, CsF, 95°C, 24h, R = 83%

Schéma 9. Autres groupements protecteurs du motif polyamine utilisés dans la réaction de Richman-Atkins.^(21,22)

II.1.1.b. Voie des imines

Cette voie met en jeu la condensation d'un dialdéhyde (ou d'une dicétone) sur une polyamine présentant des fonctions amines primaires terminales, suivie d'une réduction de la base de Schiff ainsi formée (Schéma 10). Pour une telle réaction de condensation, on utilise un ion métallique (en général un métal de transition) qui va servir de matrice pour la construction du macrocycle (effet template).

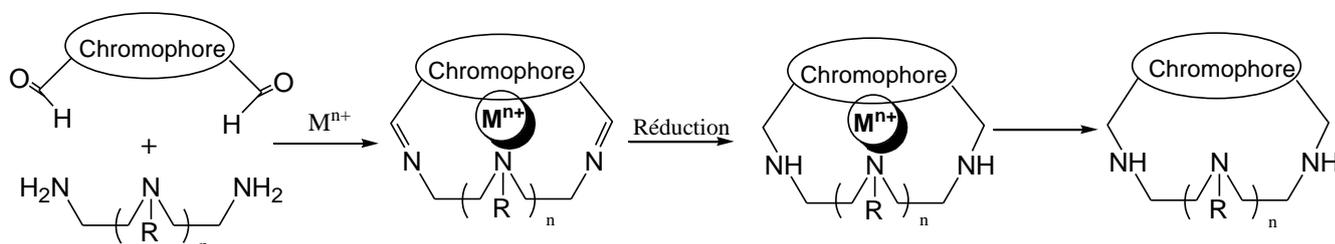
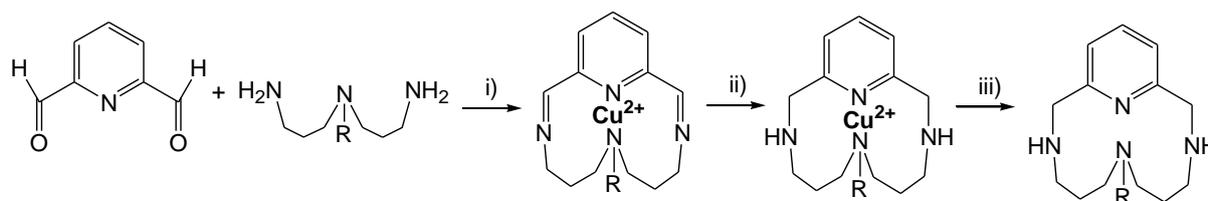


Schéma 10. Méthode de macrocyclisation impliquant la formation de bases de Schiff.

Par cette méthode de synthèse, P. Moore et coll.⁽²³⁾ ont réussi à avoir de bons rendements pour des macrocycles à 14 chaînons incorporant un motif pyridine, en utilisant l'ion cuivrique (Cu(NO₃)₂) pour générer l'effet de matrice (Schéma 11). Il est à noter que ces auteurs ont utilisé une concentration en réactants particulièrement élevée, 0,22 M. En utilisant la même voie de synthèse, Delgado et Costa⁽²⁴⁾ rapportent des rendements analogues pour ces mêmes macrocycles. D'autres exemples de tétraazamacrocycles dérivés de la pyridine et de diamines du type H₂N(CH₂)₃X(CH₂)₃NH₂ ont été synthétisés selon le même mode opératoire avec des rendements globaux (3 étapes) satisfaisants (55-60 %).^(25, 26)

Chapitre II



i) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{EtOH-H}_2\text{O}$, reflux, 2h; ii) NaBH_4 , t.a.; iii) Na_2S .

R = H, $R_{\text{tot}} = 82,3\%$
R = Me, $R_{\text{tot}} = 73,1\%$

Schéma 11. Effet de Matrice de $\text{Cu}(\text{II})$.⁽²³⁾

De même, Rybak-Akimova et coll. al.⁽²⁷⁾ rapportent un rendement total de 27 % (96 % pour la réaction de macrocyclisation) pour l'obtention d'un macrocycle analogue à 14 chaînons (Schéma 11, R = $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$) en utilisant l'ion Ni^{2+} comme cation métallique.

Toutefois aucune trace de produits cycliques n'a été observée lors de réactions analogues mettant en jeu des triamines du type $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ou $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ et la 2,6-dialdéhyde pyridine, et ceci même en faisant varier la nature du métal ($\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Ag}(\text{I})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$).⁽⁶⁾

L'influence de la nature du métal employé sur l'orientation de la réaction de macrocyclisation vers la forme macrocyclique monomère ou dimère est d'autre part un critère important. C'est ainsi que Krakowiak et al.⁽²⁸⁾ rapportent que l'utilisation de $\text{Pb}(\text{II})$ lors de la réaction entre la 2,6-dialdéhyde pyridine et la bis(3-aminopropyl) amine, conduit uniquement au produit de condensation 2:2 (Schéma 12).

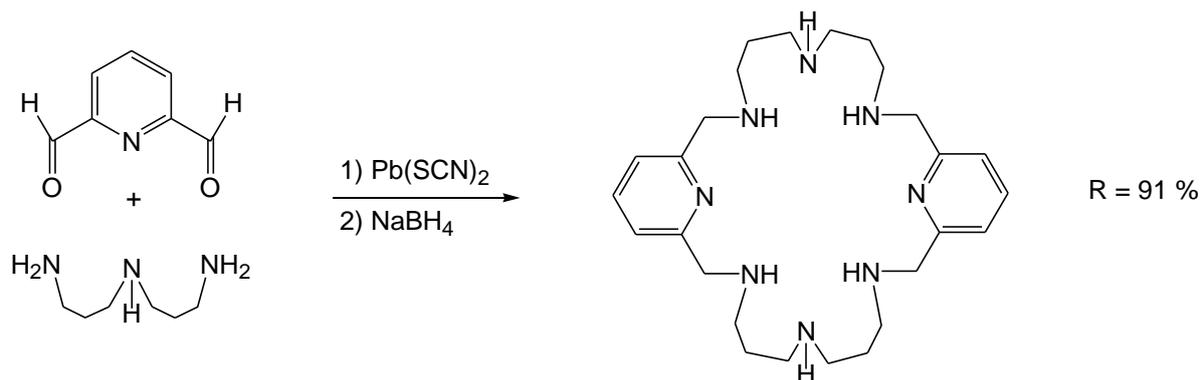


Schéma 12. Effet de matrice de $\text{Pb}(\text{II})$.²⁸

Des bases de Schiff macrocycliques dérivés de la 1,10-phénanthroline ont été également préparées^(29, 30), par contre un examen de la littérature ne nous a pas permis de relever des

Chapitre II

travaux concernant l'obtention de bases de Schiff macrocycliques dérivées de la 2,2'-bipyridine ou de la 2,2':6'-2''-terpyridine.

L'intérêt majeur de cette stratégie de synthèse réside dans l'absence d'utilisation de groupements protecteurs au niveau du motif polyamine, et donc permet d'éviter à priori les étapes fastidieuses de protection/déprotection. Toutefois les bases de schiff peuvent être instables et ne pas résister aux conditions mises en jeu lors de la réduction des fonctions imines. La libération du cation inducteur de la réaction de macrocyclisation peut d'autre part ne pas être toujours aisée si le polyazamacrocycle formé a une grande affinité pour ce cation. A notre connaissance, cette stratégie de synthèse n'a pas été utilisée pour la construction de polyazamacrocycles à fonctions latérales acide acétique.

II.1.1.c.Voie des amides

La préparation d'un diamide macrocyclique à partir de fragments diacide activés et diamine, suivie par la réduction des deux fonctions amide constitue une voie importante pour l'obtention de polyazamacrocycles (Schéma 13).⁽¹⁾

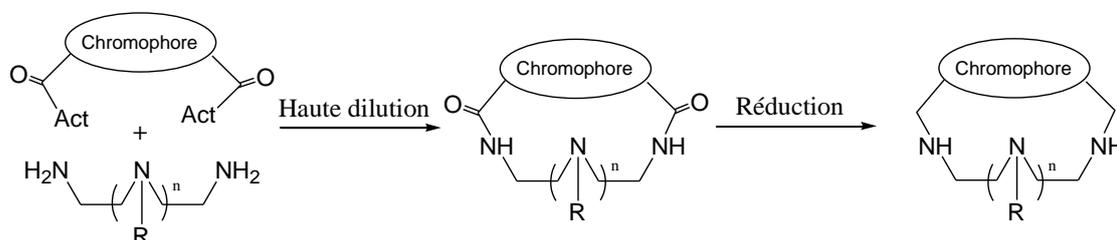


Schéma 13. Méthode de macrocyclisation impliquant la formation de diamide macrocyclique.

Au niveau de cette stratégie de synthèse nous n'avons cependant noté que deux publications mettant en jeu un synthon dérivé d'un noyau hétérocyclique. Ces deux travaux^(31, 32) sont présentés dans le schéma 14. Malgré l'utilisation de techniques de haute dilution la condensation d'un chlorure d'acide avec une diamine conduit à des rendements faibles en diamides macrocycliques (~ 10 %). Par contre l'utilisation du dérivé diester en milieu concentré ([réactants] = 0,06M) conduit à des rendements de macrocyclisation satisfaisants (45-72 %). Dans ce cas, c'est l'étape de réduction des fonctions amide qui est l'étape limitante (R = 10 %).

Chapitre II

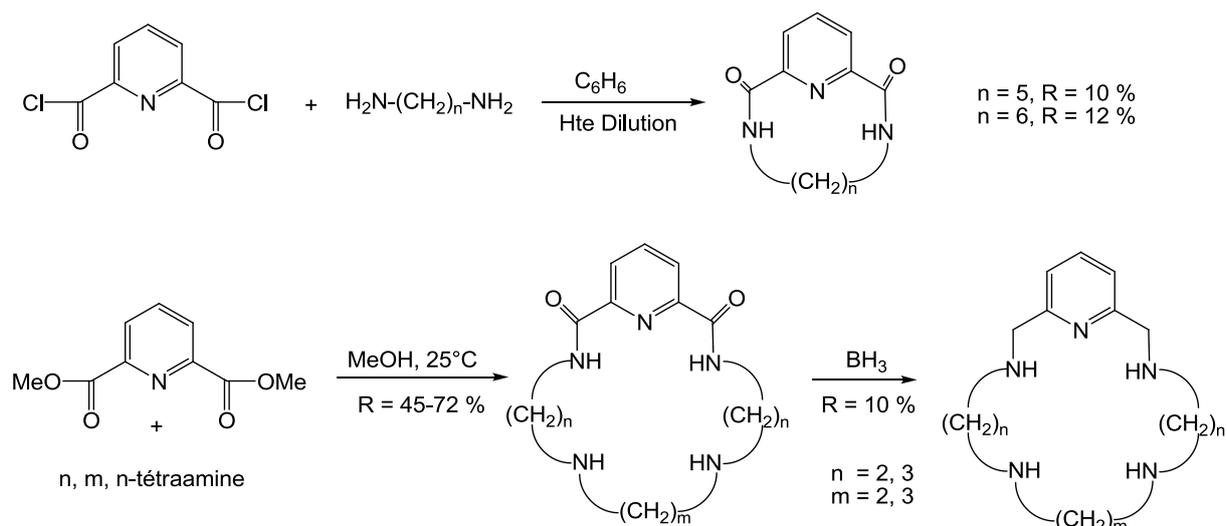


Schéma 14. Dilactames macrocycliques dérivés de la pyridine. ^(31, 32)

Au vu de ces résultats, cette voie de synthèse ne paraît pas être, pour l'instant, une voie privilégiée (avec des rendements satisfaisants) pour l'obtention de polyazamacrocycles intégrant dans leur structure un ou plusieurs noyaux hétérocycliques.

II.1.1.d. Voie mettant en jeu la réaction de Mitsunobu

Rappelons tout d'abord que la réaction de Mitsunobu permet de convertir un alcool en une variété de groupes fonctionnels en utilisant la triphénylphosphine (TPP) et le diisopropyl azodicarboxylate (DIAD).⁽³³⁾ Le mécanisme en 3 étapes de cette réaction est illustré dans le schéma 15 pour la réaction entre un nucléophile (NuH) avec un alcool primaire. Dans un premier temps, la TPP réagit avec le DIAD pour former un adduit P-N zwitterionique, lequel se protonne en présence de NuH pour former un sel de phosphonium. Il est important de remarquer, à ce stade, que le nucléophile employé doit être acide pour être en mesure de protoner l'adduit ($\text{pK}_a < 13$). Dans l'étape de l'activation de l'alcool, le groupement phosphore est transféré à l'alcool pour former un sel d'oxyphosphonium. Finalement, le nucléophile déprotoné réagit avec ce sel pour conduire au produit désiré.

Chapitre II

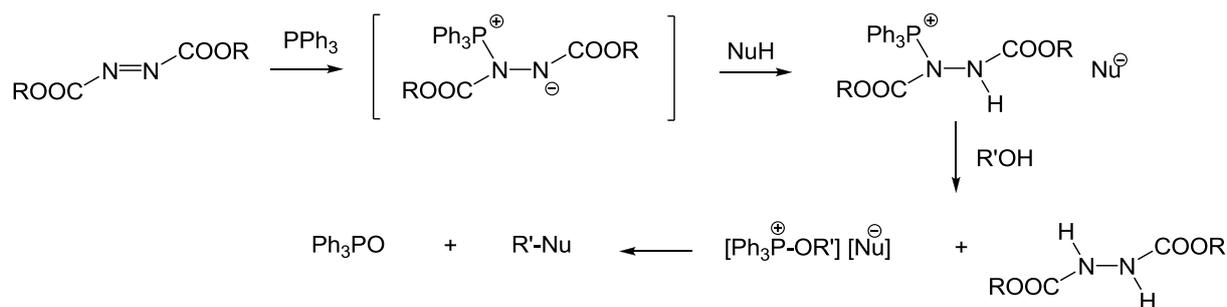


Schéma 15. Mécanisme généralement accepté de la réaction de Mitsunobu.

Récemment, Hovinen⁽³⁴⁾ a montré que la réaction de Mitsunobu pouvait être exploitée avec succès pour la préparation d'azamacrocycles. Dans ce cas, des dérivés sulfonamides dans lesquels le groupe NH est connecté à un groupe électro-négatif (2-nitrobenzène sulfonyle) sont utilisés comme nucléophiles.

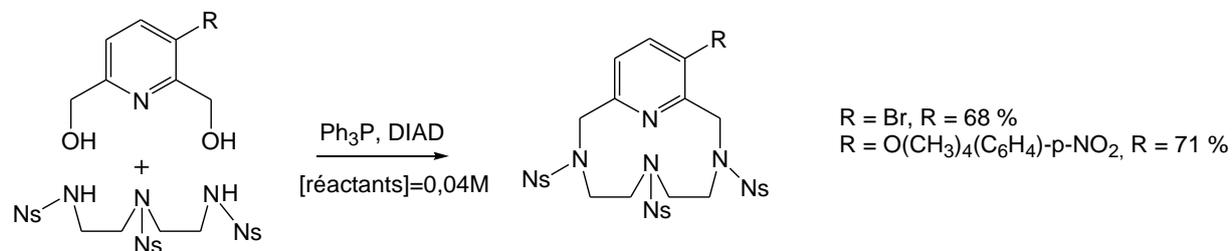


Schéma 16. Utilisation de la réaction de Mitsunobu à la préparation d'un tétraazamacrocycle.

Lors de la préparation de dérivés macrocycliques analogues, Lin et al.⁽³⁵⁾ ont établi que l'utilisation de Bu_3P à la place de Ph_3P pouvait légèrement améliorer les rendements de macrocyclisation.

II.1.2. Alkylation

L'introduction des chaînes latérales acide acétique sur les fonctions amine secondaire du polyazamacrocycle constitue la dernière étape de cette méthode de synthèse. D'après les données de la littérature cette réaction de pluri-alkylation peut s'effectuer suivant deux protocoles :

→ réaction d'acide chloroacétique dans des conditions de pH élevé (pH 10). Dans ce cas un contrôle très strict du pH du milieu réactionnel est indispensable pour le succès de la réaction d'alkylation. Les rendements d'alkylation varient entre 21 et 78% (Schéma 17).

Chapitre II

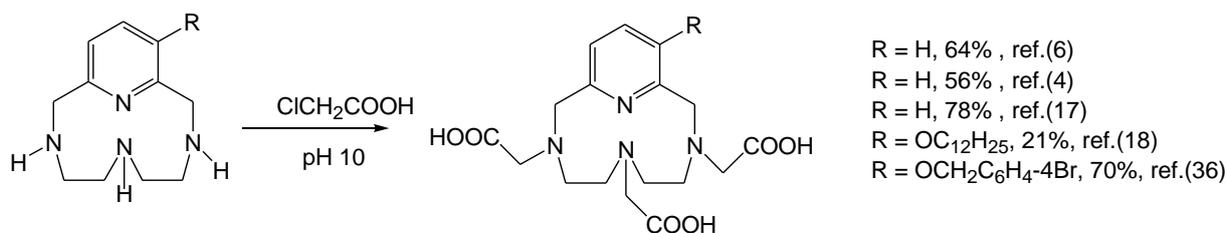


Schéma 17. Alkylation de tétraazamacrocyclus.

→ réaction de bromoacétate de *tert*iobutyle (ou de méthyle, éthyle) en présence d'une base inorganique ou organique. Suivant la nature de la base utilisée (Ag₂CO₃, K₂CO₃, Et₃N, iPr₂EtN), on peut observer la formation de mélanges de produits alkylés quelquefois impossibles à purifier.^(6, 35, 37) Des essais d'alkylation avec différentes bases sont donc parfois nécessaires afin d'optimiser cette réaction d'alkylation. Cette méthode peut conduire à de meilleurs rendements que celle mettant en jeu l'acide chloroacétique; des rendements de 80-90% ont été ainsi rapportés.^(6, 35)

II.2. Stratégie II : Alkylation/Cyclisation

Cette méthode, élaborée au niveau de l'équipe, consiste à utiliser comme synthon une polyamine dont les atomes d'azote sont déjà substitués par des groupements acétate protégés sous forme ester. Les atomes d'azote ainsi que les fonctions ester présents sur le squelette de ces dérivés sont susceptibles de coordiner et d'induire un effet de matrice lors d'une réaction de macrocyclisation.

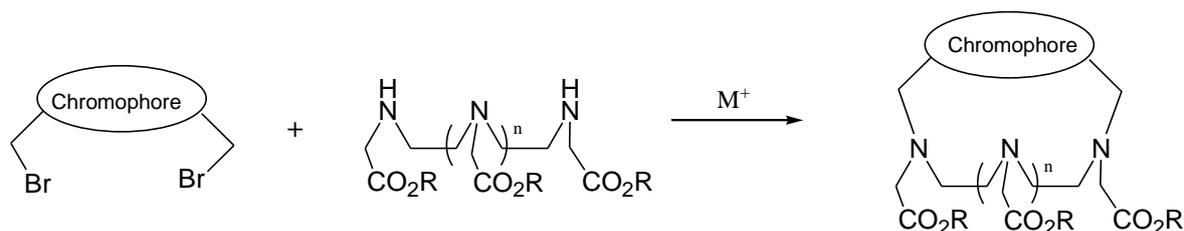


Schéma 18. Stratégie Alkylation/Cyclisation.

II.2.1. Synthon polyamine

Les premiers travaux ont porté sur l'utilisation d'un dérivé de la diéthylènetriamine présentant trois groupements acétate de *tert*iobutyle. La préparation de ce composé en trois étapes est présentée dans le schéma 19 et correspond à un rendement global de 59 % à partir de la diéthylènetriamine commerciale.⁽¹¹⁾ Un rendement comparable a été récemment obtenu

Chapitre II

en utilisant le groupe nosyle comme groupe protecteur des fonctions amine primaire de la diéthylènetriamine.⁽³⁸⁾

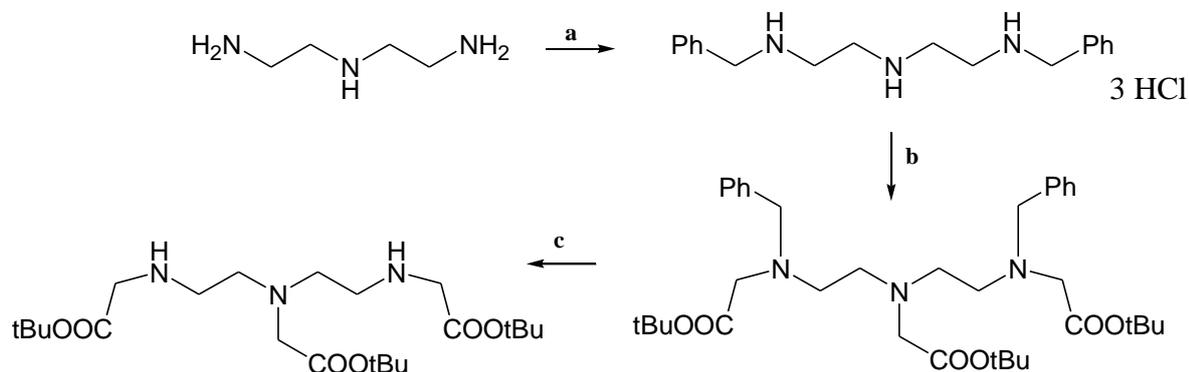


Schéma 19. Réactifs et conditions : (a) i. PhCHO, EtOH, 50°C ii. NaBH₄, 50°C iii. HCl (94%), (b) BrCH₂COOtBu, *i*-Pr₂NEt, DMF (63%), (c) H₂, 3 bars, Pd/C, MeOH (100%).⁽¹¹⁾

Dans cette synthèse, le choix du groupement *tert*butyle comme groupement protecteur des fonctions acide permet d'éviter des réactions parasites. En effet, il a été démontré au laboratoire que l'utilisation du bromoacétate de méthyle lors de la réaction de trialkylation conduisait à la formation de sous produits provenant d'une cyclisation intramoléculaire (lactamisation) entre une fonction amine et une fonction ester des intermédiaires réactionnels (Schéma 20).⁽³⁹⁾ Cette formation de cétopiperazines a été observée lors de la synthèse de dérivés du DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) et du TTHA (acide triéthylènetétraaminehexaacétique) lorsque des fonctions ester de méthyle, d'éthyle ou de benzyle sont engagées.^(40, 41, 42)

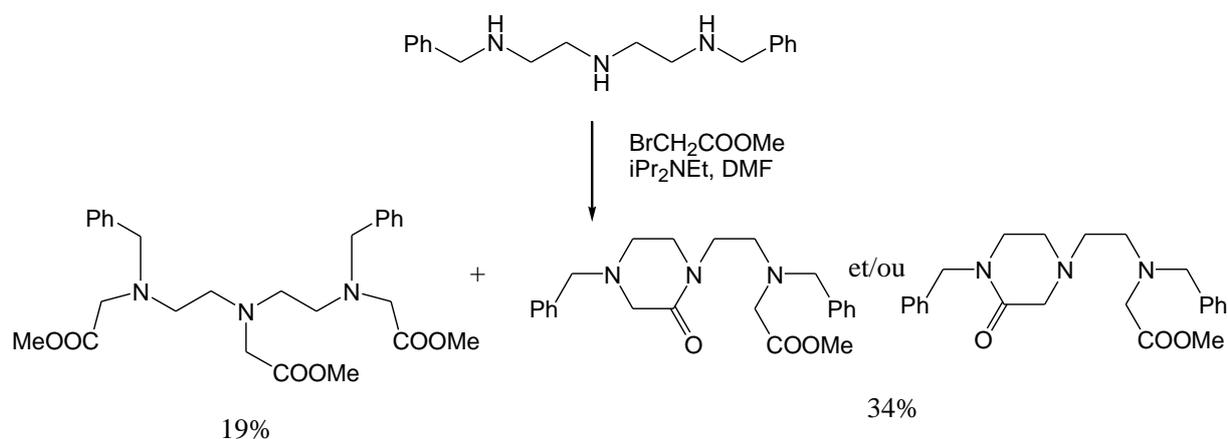


Schéma 20. Réactions secondaires lors de l'utilisation du bromoacétate de méthyle.

II.2.2. Cyclisation

La réaction de macrocyclisation entre ce synthon polyamine trisubstitué (Schéma 19) et des dérivés hétérocycliques dibromométhylés a été conduite dans l'acétonitrile en évitant les techniques de haute dilution et en utilisant Na_2CO_3 comme base et l'ion Na^+ comme inducteur d'effet de matrice. Des exemples mettant en jeu les motifs pyridine, 2,2'-bipyridine et 2,2':6'-2''-terpyridine et conduisant à des macrocycles à 12, 15 et 18 chaînons sont représentés dans le schéma 21.

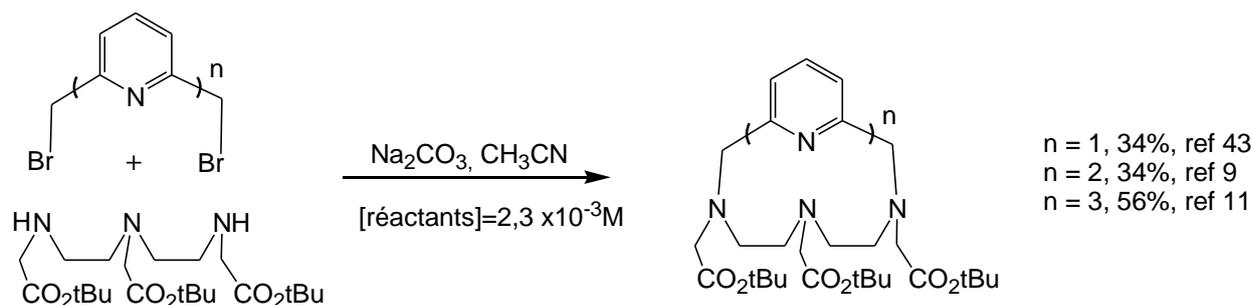


Schéma 21. Rendements de macrocyclisation obtenus suivant la stratégie Alkylation/Cyclisation.

Cette méthode de synthèse a été étendue à la préparation de polyazamacrocyclus dérivés d'autres bi-, tri-hétérocycles^(11, 43) ou d'autres triamines⁽⁴³⁾ et utilisée par d'autres équipes de recherche^(37, 38). L'effet de matrice de l'ion sodium (par rapport aux autres ions alcalins, Li^+ , K^+ , Cs^+) a été bien établi^(11, 38, 44) et les rendements de macrocyclisation se situent entre 30 et 65%.

Il nous paraît d'autre part intéressant de signaler que le synthon à motif diéthylènetriamine décrit dans le schéma 19 a été utilisé dans une réaction de macrocyclisation originale conduisant à l'obtention d'un polyazamacrocycle et mettant en jeu une condensation de Mannich et un dérivé pyridine dihydroxysubstitué (Schéma 22).⁽⁴⁵⁾

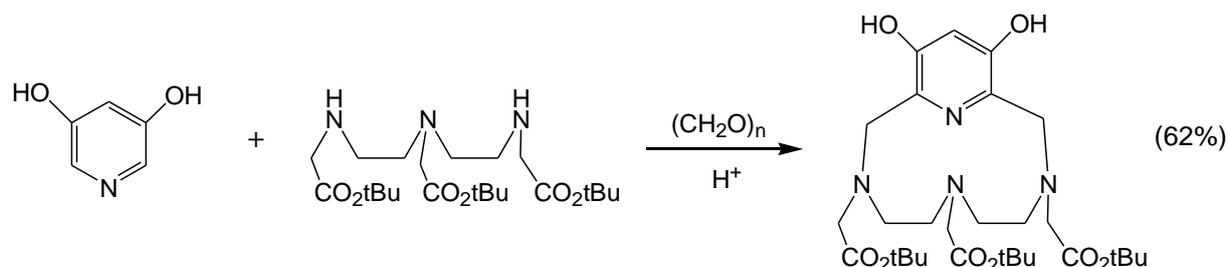


Schéma 22. Macrocyclisation par réaction de Mannich.⁽⁴⁵⁾

Chapitre II

On notera cependant que le recours à un motif pyridine monosubstitué (3-hydroxypyridine) ne permet pas d'atteindre le dérivé macrocyclique correspondant, mais uniquement le dérivé acyclique résultant d'une réaction de monométhylation.

II.3. Bilan de la revue bibliographique

Après cette étude bibliographique sur les voies d'accès à des polyazamacrocycles à chaînes latérales acide acétique, nous pouvons conclure que :

Pour la stratégie de synthèse Cyclisation/Alkylation, la méthode Richman-Atkins modifiée (utilisation de bis-sulfonamides, de carbonate de potassium comme base et l'acétonitrile comme solvant) est la méthode la plus utilisée et conduit à des rendements de macrocyclisation élevés (pouvant être supérieurs à 70%). De plus l'utilisation de groupements nosyle (2-nitrobenzène sulfonyl) évite des conditions drastiques de déprotection. Cette voie comporte 3 ou 4 étapes : réaction de macrocyclisation, de déprotection, d'alkylation et éventuellement hydrolyse des fonctions ester. La méthode de Richman/Atkins présente un intérêt supplémentaire : celui d'obtenir comme composés intermédiaires des polyazamacrocycles à fonctions amine secondaire. On peut ainsi, à partir d'un seul squelette macrocyclique atteindre plusieurs types de ligands présentant des fonctions complexantes autres que des fonctions acide acétique (fonctions acétamide, phosphonate,...).

La seconde stratégie de synthèse Alkylation/Cyclisation est caractérisée par des rendements de macrocyclisation moins élevés (entre 30 et 65%), mais permet de limiter le nombre d'étapes postérieures à la réaction de macrocyclisation. Cette voie ne comporte que deux étapes : réaction de macrocyclisation et hydrolyse des fonctions ester. Si l'on se place au niveau du rendement global pour l'obtention des macrocycles cibles, cette méthode peut se révéler compétitive par rapport à la méthode Richman-Atkins. Ainsi, le macrocycle à 12 chaînons dérivé de la pyridine, représenté dans le schéma 23, a été obtenu avec un rendement global de 34% en mettant en jeu la stratégie Alkylation/Cyclisation et de 26 à 43% en utilisant la stratégie Cyclisation/Alkylation.

Chapitre II

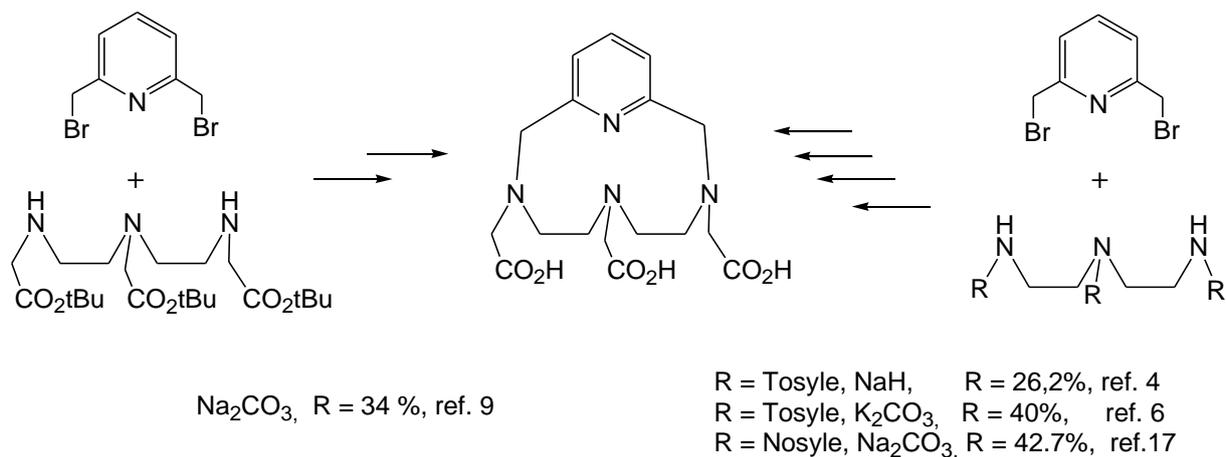


Schéma 23. Rendement global pour l'obtention d'un polyazamacrocycle à 12 chaînons suivant les stratégies utilisées.

Les propriétés de luminescence des complexes d'euprium et de terbium étant tributaires de la nature du chromophore utilisé comme « antenne » au niveau du ligand, un atout important de cette stratégie est de pouvoir diversifier plus aisément la structure du chromophore en un nombre d'étapes limité.

C'est pour cette raison que nous avons choisi dans le cadre de nos travaux d'explorer plus en avant les potentialités de la stratégie de synthèse Alkylation/Cyclisation et donc de l'étendre à l'obtention de macrocycles dérivés de la triéthylènetétraamine. Cette stratégie est décrite dans le schéma 24.

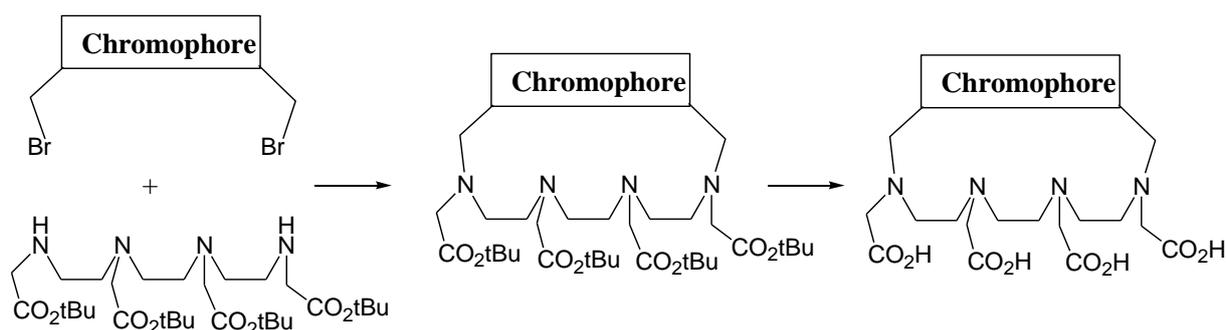


Schéma 24. Stratégie de synthèse retenue.

III Préparation du synthon tétraester dérivé de la triéthylènetétraamine

Le dérivé tétra-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-N,N',N'',N'''-triéthylènetétraamine (composé **4**, schéma 25) constitue un synthon pivot dans la stratégie suivie et en conséquence doit pouvoir être synthétisé à une échelle de plusieurs grammes. Ce dérivé de l'acide triéthylènetétraamine tétraacétique (TTTA) n'étant pas décrit dans la littérature, nous avons entrepris sa préparation.

Il est d'ailleurs à noter que le tétraacide TTTA lui-même n'a été décrit dans aucune publication académique. Il est uniquement cité dans quatre brevets,⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾ mais aucune information sur sa synthèse et ses caractéristiques physicochimiques n'y sont rapportés.

III.1. Première voie d'accès étudiée

Dans un premier temps, nous avons logiquement appliqué à ce composé le schéma de synthèse utilisé avec succès dans le cas du composé analogue dérivé de la diéthylènetriamine.⁽¹¹⁾ Cette stratégie de synthèse est reportée dans le schéma 25.

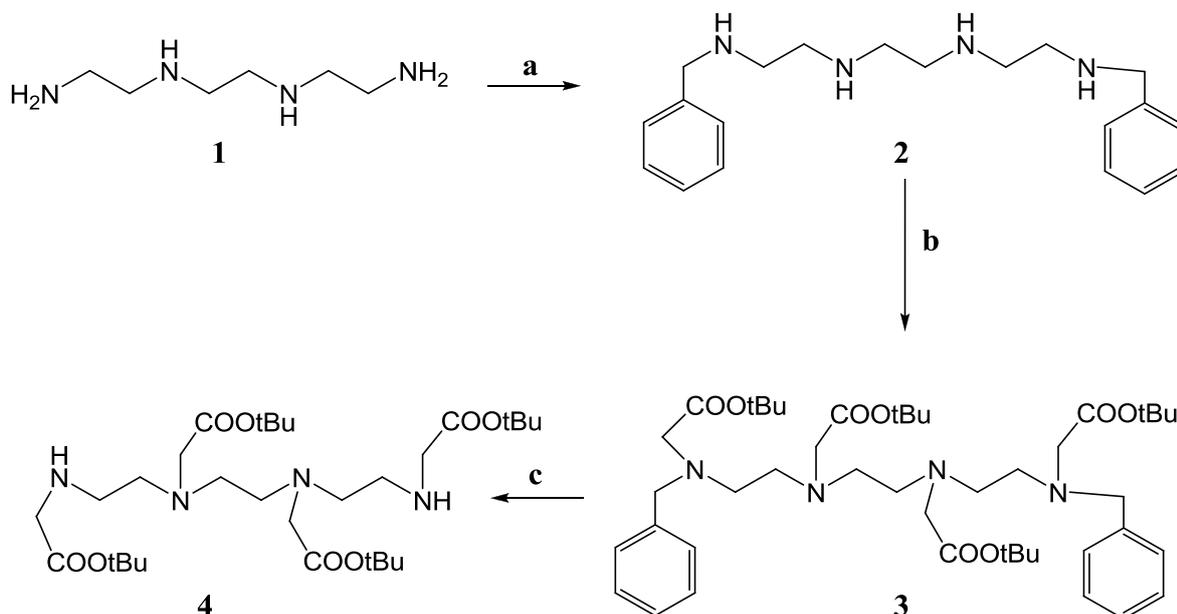


Schéma 25. Réactifs et conditions. a) (i) PhCHO, CHCl₃, reflux 2h, (ii) NaBH₄, MeOH, 48% ; b) BrCH₂COOtBu, iPr₂NEt, T.A., 48h, 19% ; c) Pd/C (10%), H₂ (2 bars), MeOH, T.A., 12h, 100%.

(i) la première étape consiste en la protection des fonctions amine primaire de la triéthylènetétraamine (disponible commercialement) par des groupements benzyle. Une

Chapitre II

double séquence d'amination/réduction est mise en jeu. En suivant le protocole utilisé au laboratoire pour le composé analogue dérivé de la diéthylènetriamine, nous avons utilisé deux équivalents d'une solution de benzaldéhyde dans l'éthanol pour la formation de l'intermédiaire diimine et un excès de borohydrure de sodium pour la réduction in situ de cet intermédiaire. Les analyses RMN ^1H et de spectrométrie de masse du brut réactionnel révèlent la présence de produits mono-, di-, tri- et tétraalkylés. Un second protocole décrit par Denat et al.⁽⁵⁰⁾ et utilisant trois équivalents de benzaldéhyde dans l'éthanol ne nous a pas permis non plus d'accéder à ce composé. Il est à noter que, dans ce dernier protocole, l'utilisation de trois équivalents de benzaldéhyde conduit à un composé diimine intermédiaire contenant une fonction aminal (schéma 26).

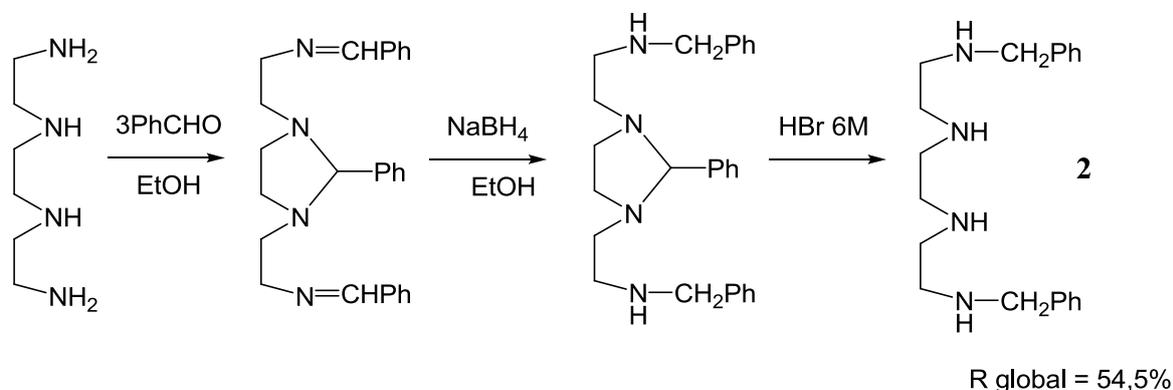


Schéma 26. Protocole utilisé par Denat et al.⁽⁵⁰⁾ pour l'obtention de la tétraamine **2**.

Finalement, l'utilisation de deux équivalents de benzaldéhyde dans du chloroforme lors de l'étape d'amination nous a permis d'isoler la tétraamine **2** avec un rendement de 48%.

(ii) La tétraamine à fonctions amine secondaire **2** a ensuite été soumise à une réaction de tétraalkylation avec le bromoacétate de tertiobutyle. Rappelons que le choix de la fonction ester de tertiobutyle repose sur la possibilité de réactions secondaires (réaction de lactamisation) lorsque des fonctions ester plus réactives (COOMe, COOEt, COOBn) sont mises en jeu. Cette réaction a été effectuée à température ambiante dans le DMF et en utilisant la diisopropyléthylamine comme base. Après deux purifications successives par chromatographie sur colonne de silice puis d'alumine, le composé attendu **3** a été isolé avec un rendement de 19%. En fait, la purification chromatographique est rendue complexe en raison de la formation de sous-produits polyalkylés difficiles à différencier du produit désiré par chromatographie sur couche mince.

Chapitre II

(iii) La dernière étape consiste en un clivage des groupements protecteurs benzyles. Cette étape est effectuée par hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon (10%) sous pression d'hydrogène (2 bars) pendant une nuit à température ambiante. Cette réaction conduit au composé **4** avec un rendement quantitatif.

Avec cette séquence de réactions, le rendement global en synthon **4** est de seulement 9% , l'étape limitante étant l'étape de tétraalkylation. Différents essais au niveau de cette étape en faisant varier le solvant (CH₃CN), la nature de la base (K₂CO₃), la stœchiométrie des réactifs ou le temps de réaction ne nous ont pas permis d'améliorer de façon notable ce rendement. Cela nous a conduit à rechercher une autre voie d'accès pour l'obtention du composé **3**.

III.2. Seconde voie d'accès étudiée

Afin de limiter la formation de sous produits diversement alkylés lors de réactions de pluri N-alkylation, nous avons mis en œuvre une stratégie ayant recours à l'utilisation de dérivés pré N-alkylés par le groupe acétate de tertio-butyle : un dérivé dialkylé, le di-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-*N,N'*-éthylènediamine, et un dérivé monoalkylé, le [benzyl-(2-bromoéthyl)-amino]acétate de tertio-butyle (composés **5** et **6** respectivement, schéma 27). Cette approche consiste à mettre en œuvre uniquement des réactions de mono et de di N-alkylation plus faciles à maîtriser et à purifier.

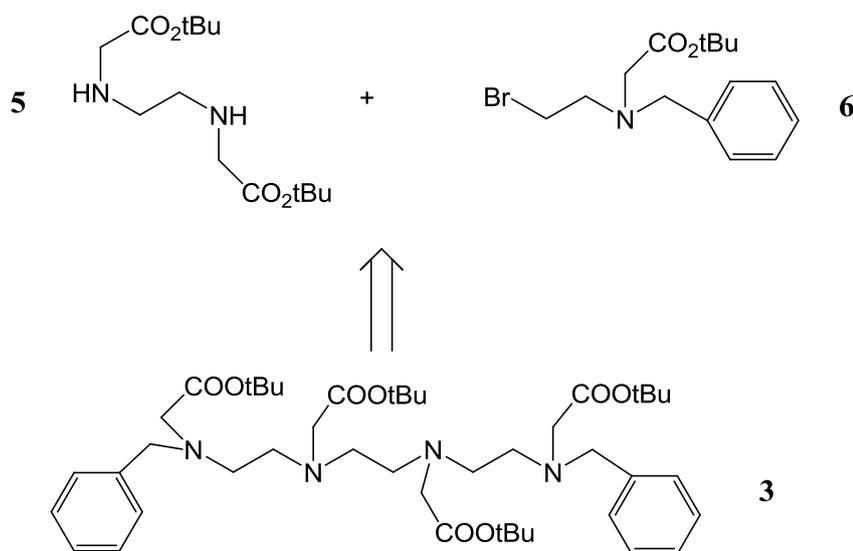


Schéma 27. Nouvelle voie rétrosynthétique pour l'obtention de la tétraamine **3**.

III.2.1. Synthèse du précurseur 5

Ce composé a été déjà décrit par C. G. Pitt et al. ⁽⁵¹⁾ en trois étapes à partir de l'acide éthylènediamine N,N'-diacétique **7**, ce composé étant disponible commercialement (schéma 28). Après protection des fonctions amine par le groupement Z (benzyloxycarbonyl), les deux fonctions acide sont estérifiées en milieu acide à l'aide d'isobutène. Dans la dernière étape, les groupements carbamate sont clivés par hydrogénation catalysée par du palladium sur charbon activé. Le rendement global en diamine **5** est faible, de l'ordre de 15%.

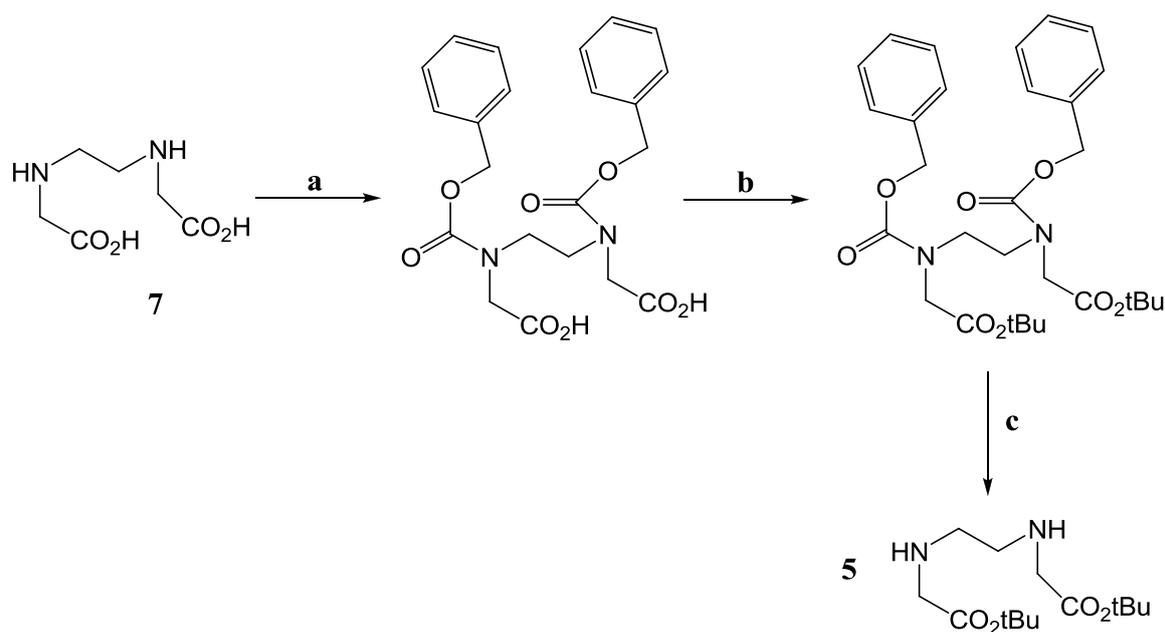


Schéma 28. Réactifs et conditions a) benzyle chloroformate, Na₂CO₃, 89% ; b) H₂SO₄, isobutène, 17% ; c) Pd/C (10%), H₂, EtOH, 72h, 100%. ⁽⁴⁷⁾

Pour notre part, en nous basant sur une méthode utilisée en chimie peptidique ⁽⁵²⁾, nous avons réussi à préparer la diamine **5** en une seule étape à partir de l'acide éthylènediamine N,N'-diacétique **7** par une réaction de transestérification avec de l'acétate de tertio-butyle en présence d'acide perchlorique. La diamine **5** est ainsi obtenue avec un rendement de 43% (schéma 29). Cette réaction permet d'isoler la diamine **5** par de simples opérations de lavage et d'extraction, mais est pénalisée par sa durée.

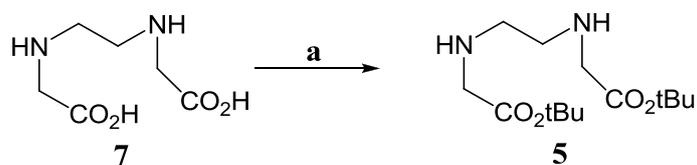


Schéma 29. Réactifs et conditions a) CH₃COOtBu, HClO₄, 12 jours à T. A., 43%

Chapitre II

Afin d'améliorer ce rendement, nous avons également réalisé une synthèse de **5** en deux étapes à partir de la N,N'-dibenzyl éthylènediamine commerciale **8** (schéma 30). Une double alkylation des atomes d'azote de **8** par du bromoacétate de tertiobutyle dans l'acétonitrile en présence de K_2CO_3 nous permet d'obtenir par simple filtration le composé **9** avec un rendement quantitatif. Un rendement quantitatif est également obtenu lors de la réaction de déprotection des fonctions benzyle de **9** par hydrogénation catalysée sur Pd/C, à 2 bars de H_2 pendant 12 h.

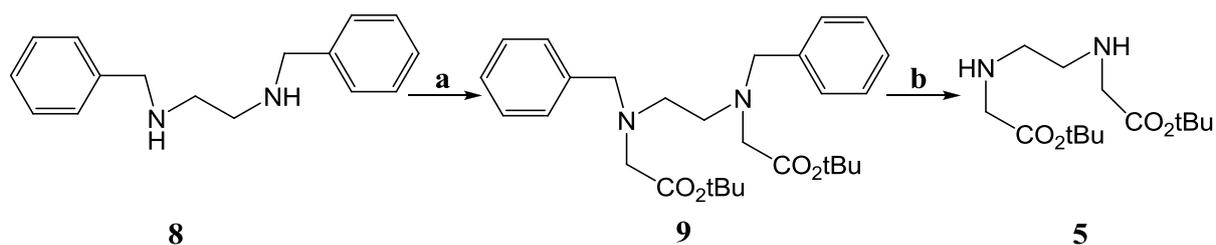


Schéma 30. Réactifs et conditions a) $BrCH_2CO_2tBu$, K_2CO_3 , CH_3CN , reflux 24h, 100% ; b) Pd/C (10%), H_2 (2 bars), MeOH, T.A., 12h, 100%.

En complément de ce dernier résultat, Burdinski et coll.⁽⁵³⁾ ont également décrit en 2009 la préparation à l'échelle de plusieurs grammes du composé **5**. Ces auteurs utilisent le même schéma de synthèse avec un protocole expérimental différent et rapportent un rendement de 53% sur les deux étapes.

III.2.2. Synthèse du précurseur 6 et analogues

Avec comme ligne directrice l'intention de conserver le groupe benzyle comme groupement protecteur de fonctions amine (conditions neutres et excellents rendements pour leur clivage dans des conditions neutres) nous avons choisi tout naturellement de prendre la N-benzyl éthanolamine **10** (disponible commercialement) comme point de départ pour la préparation du second précurseur requis, le dérivé bromé **6**.

A priori, deux étapes simples (i) l'alkylation de l'amine secondaire de la N-benzyl éthanolamine par du bromoacétate de tertiobutyle, (ii) la bromation de la fonction alcool par une méthode classique, devraient nous permettre d'atteindre le composé désiré **6** avec des rendements convenables.

Chapitre II

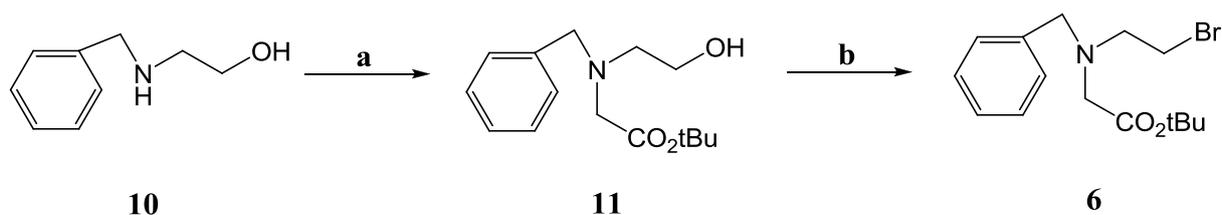


Schéma 31. Réactifs et conditions a) $\text{BrCH}_2\text{COOtBu}$, iPr_2NEt , DMF, T.A. 24h, 100% ; b) NBS/ PPh_3 , CH_2Cl_2 , T. A. 4h, 82%.

La 1^{ère} étape a permis d'atteindre le composé **11** avec un rendement quantitatif en utilisant la diisopropyléthylamine comme base et le DMF comme solvant. La bromation de la fonction alcool résiduelle de **11** a été effectuée en ayant recours au couple N-bromosuccinimide et triphénylphosphine (NBS/ PPh_3) et a permis d'isoler le dérivé bromé **6** après purification par chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de 82%.

Récemment, Chong et al.⁽⁵⁴⁾ ont rapporté que l'alkylation de la N-benzyléthanolamine par le bromoacétate de benzyle en présence de K_2CO_3 comme base ne conduisait pas au composé attendu mais à la formation de la N-benzyl-morpholin-2-one **12** résultant d'une réaction de lactonisation entre la fonction alcool et la fonction ester de benzyle. L'utilisation du bromoacétate de tertibutyle dans les mêmes conditions (K_2CO_3 comme base) conduit par contre au produit attendu (schéma 32).

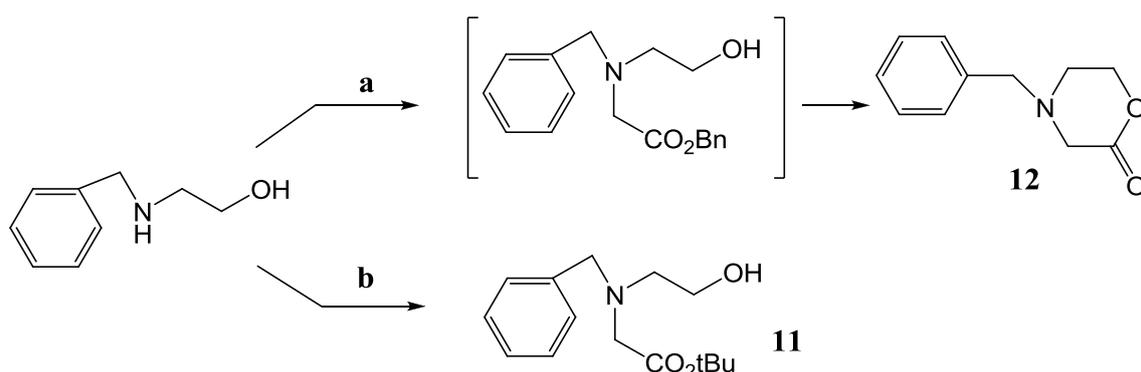


Schéma 32. Réactifs et conditions a) $\text{BrCH}_2\text{COOBn}$, K_2CO_3 , CH_3CN , T. A. 24h, b) $\text{BrCH}_2\text{COOtBu}$, K_2CO_3 , CH_3CN , T.A. 66h, 90% en composé **11**. D'après (54).

Afin d'élargir le champ d'application de notre procédure de synthèse mettant en jeu la diisopropyléthylamine comme base lors de ces réactions de N-alkylation, nous avons effectué

Chapitre II

d'azote résonne dans la plage 2,85-2,90 ppm pour les différents composés ester et dans la plage 2,65-2,70 ppm pour la lactone et surtout les signaux du groupe méthylène en α de l'oxygène apparaissent dans des zones complètement différentes (3,58-3,62 et 4,37-4,40 ppm pour les dérivés esters et la lactone respectivement). A titre d'exemple, la figure 1 montre le spectre RMN ^1H du brut réactionnel correspondant à l'essai 1 (Tableau 1).

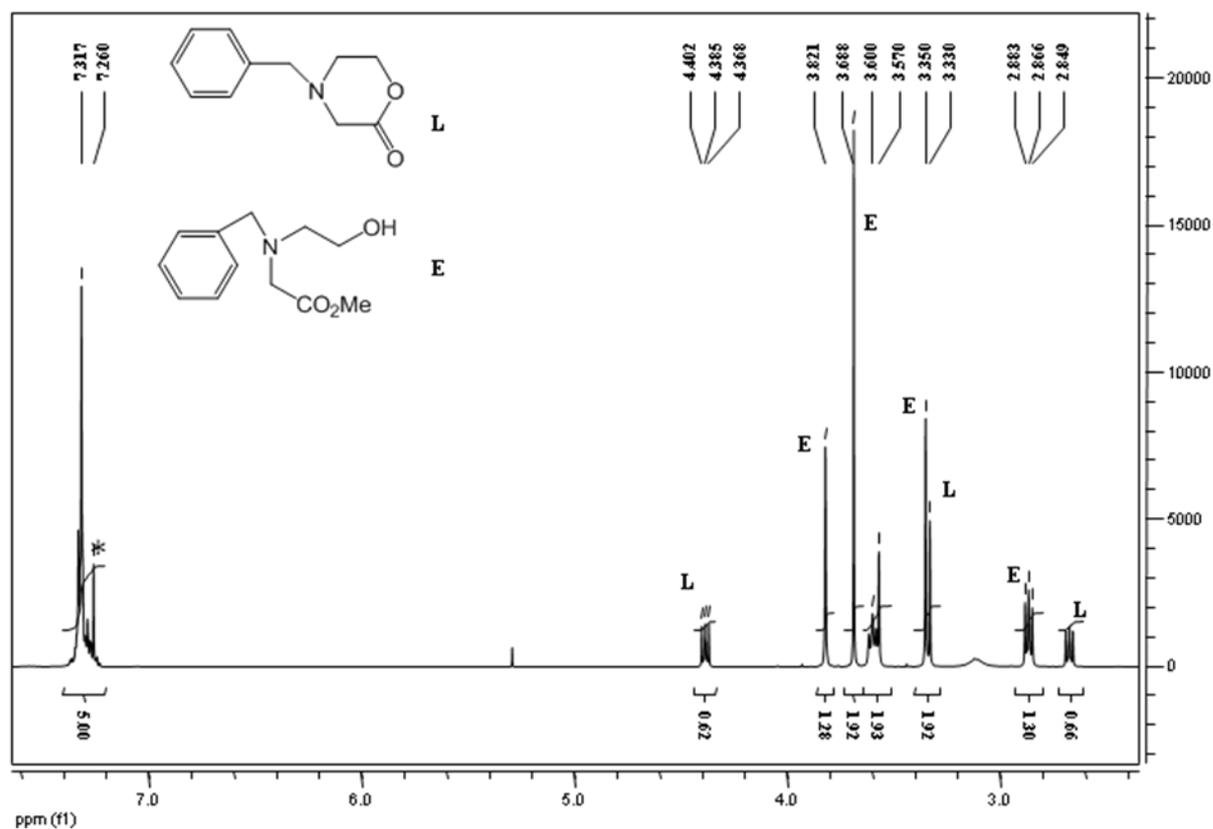


Figure 1. Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) du milieu réactionnel brut correspondant à l'essai 1 (Tableau 1).

Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation conjointe de $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ comme base et du DMF comme solvant permet d'obtenir le rapport le plus élevé ester/lactone dans le cas des dérivés ester de méthyle et de benzyle. Dans le cas du dérivé ester de tertio-butyle, nous n'observons pas de réarrangement intramoléculaire quelque soit les conditions utilisées. Ceci peut être relié à l'encombrement stérique engendré par le groupement tertio-butyle qui inhiberait cette réaction de transestérification intramoléculaire.

Il est cependant important de noter que toute tentative de purification des dérivés ester de méthyle et de benzyle par chromatographie sur colonne de silice se traduit par leur transformation complète en lactone. Une telle réaction de cyclisation intramoléculaire induite

Chapitre II

étapes à partir de la N-benzyl éthanolamine. Nous n'avons pas cherché à optimiser le rendement de **16**.

III.2.3. Synthèse de la tétraamine 3 et analogues

Le lecteur peut se reporter avec intérêt au schéma 36 afin de se remettre en mémoire l'ensemble des réactions mises en jeu lors de cette seconde stratégie de synthèse élaborée pour l'obtention du synthon pivot tétra-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-N,N',N'',N'''-triéthylène-tétraamine (composé **4**). Dans ce schéma nous avons récapitulé les résultats obtenus précédemment pour l'obtention des précurseurs **5** et **6** et pour l'étape de déprotection des groupements benzyles (**3** → **4**).

La validation de cette stratégie reposait sur l'obtention avec un rendement convenable en composé **3** à partir des deux composés précurseurs **5** et **6**. Cette condition a été satisfaite avec succès. En effet la condensation dans l'acétonitrile de deux équivalents du dérivé bromé **6** avec la diamine **5** en présence de K₂CO₃ conduit au dérivé tétra tertbutylester **3** avec un rendement élevé (92%) après une simple purification par chromatographie sur colonne de silice.

Cette seconde stratégie a donc conduit au composé cible **4** avec un rendement global de 75% à partir des produits commerciaux **8** et **10**. Dans le cadre de la première stratégie mise en œuvre, rappelons que le rendement global n'excédait pas 9% à partir de la triéthylènetétraamine.

Les bons résultats obtenus nous ont incités à valider cette seconde stratégie pour l'obtention d'autres tétraamines tétrasubstituées par des fonctions ester.

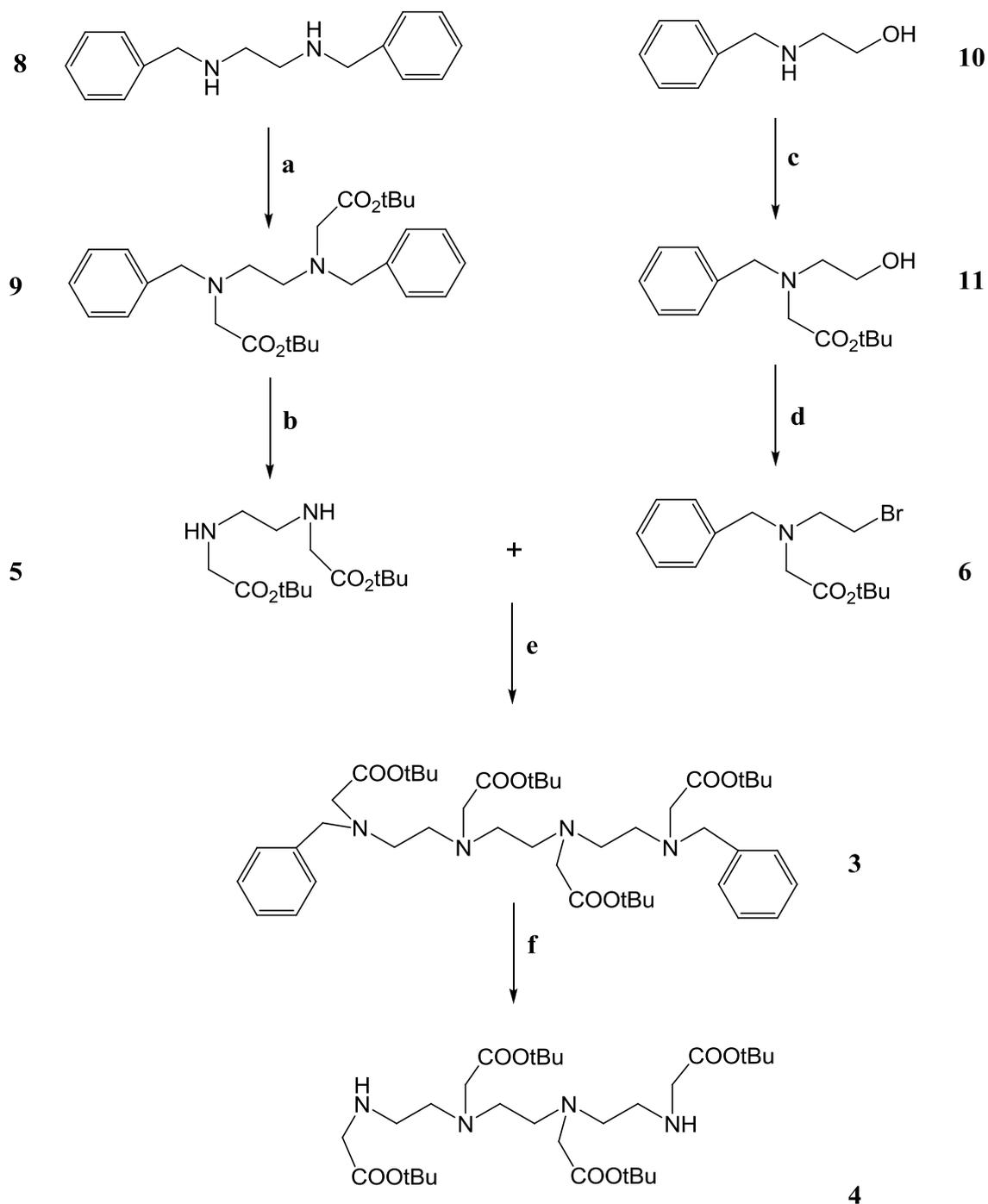


Schéma 36. Réactifs et conditions. a) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$ (2 équiv.), K_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 24h, 100 %; b) Pd/C (10%), H_2 (2 bar), MeOH , T. A., 12h, 100 %; c) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$, $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, DMF , T. A., 24h, 100 %; d) $\text{NBS}/\text{P}(\text{Ph})_3$, CH_2Cl_2 , T. A., 82 %; e) **6** (2 équiv.), K_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 24h, 92 %; f) Pd/C (10%), H_2 (2 bars), MeOH , T.A., 12h, 100%.

Chapitre II

Dans cette optique, nous avons préparé :

i) Un dérivé tétraamine analogue à **3** dans lequel deux des quatre fonctions ester de tertibutyle sont substituées par des fonctions ester de méthyle. Ainsi la condensation de 2 équivalents de dérivé bromé **15** sur la diamine **5** nous a permis d'isoler avec un rendement de 50% le composé mixte **17** (schéma 37). Dans ce dérivé **17**, les groupements protecteurs benzyle, ester de tertibutyle et ester de méthyle peuvent être clivés d'une manière sélective, une caractéristique qui autorise des modifications ultérieures pour l'accès à d'autres ligands.

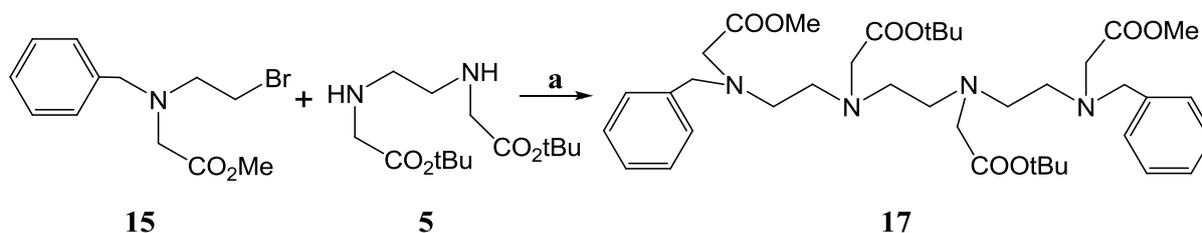


Schéma 37. Réactifs et conditions. a) **15** (2 équiv.), K_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 24h, 50 %.

ii) Un précurseur d'un analogue acyclique du DOTA, le composé **21** (Schéma 38). Le dérivé bromé NMe **20** nécessaire à cette synthèse a été préparé en deux étapes de la même façon que son homologue NBn avec un rendement de 65% à partir de la N-méthyl éthanolamine.

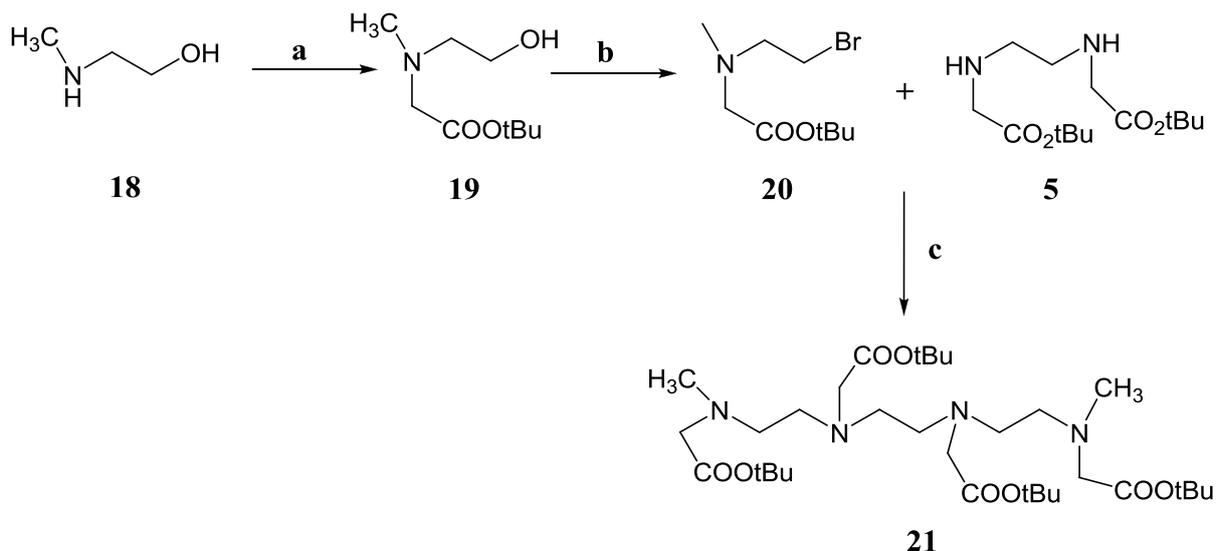


Schéma 38. Réactifs et conditions. a) $\text{BrCH}_2\text{COOtBu}$, K_2CO_3 , CH_3CN , T. A., 48h, 100 %; b) $\text{NBS}/\text{P}(\text{Ph})_3$, CH_2Cl_2 , T. A., 65 %; c) **20** (2 équiv.), K_2CO_3 , CH_3CN , reflux, 24h, 65 %.

IV Macrocycles (Poly) Pyridines L₁-L₃

Dans un premier temps, le synthon tétraamine tétraester **4** a été engagé dans des réactions de macrocyclisation devant conduire à des macrocycles dérivés des noyaux pyridine, 2,2'-bipyridine et 2,2':6'-2''-terpyridine et comportant 15, 18 et 21 chaîons respectivement (Schéma 39). Nous avons utilisé la réactivité de groupes dibromométhyle de ces différents hétérocycles vis-à-vis de réactions de substitution nucléophile par les deux fonctions amine secondaires de **4**.

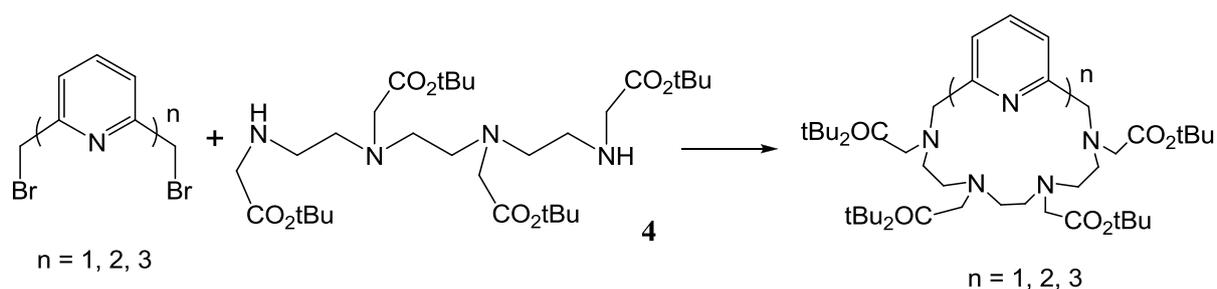


Schéma 39. Réactions de macrocyclisation étudiées pour l'obtention de macrocycles (poly) pyridines.

Il a donc été nécessaire de préparer les dérivés dibromométhyle des hétérocycles mis en jeu

IV.1. Précurseurs hétérocycliques dibromés

Le dérivé 2,6 dibromométhylpyridine a été obtenu en une seule étape par réaction de PBr_3 sur le 2,6 diméthanolpyridine dans le CCl_4 ⁽⁵⁶⁾. Le produit attendu est obtenu avec un rendement de 55% après une chromatographie sur silice permettant d'éliminer le produit de monosubstitution.

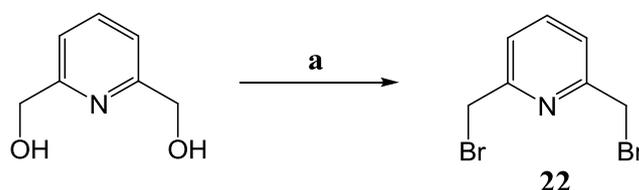


Schéma 40. Réactifs et conditions. a) PBr_3 , CCl_4 , 55%.

En ce qui concerne la préparation du dérivé dibromé de la 2,2'-bipyridine (Schéma 41), la première étape consiste à coupler deux équivalents de la 2-bromo-6-méthyl-pyridine en

Chapitre II

présence de nickel suivant la méthode de M. Tiecco et al.⁽⁵⁷⁾ Dans ce cas, le complexe réactif de Nickel(0) est préparé in situ à partir du complexe $\text{Ni}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_2\text{Cl}_2$ par réduction avec de la poudre de zinc. Un simple traitement du milieu réactionnel par HCl 2N / NH_4OH nous a permis d'obtenir le composé 6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine **23** avec un rendement de 84%. Dans un second temps les atomes d'azote sont oxydés par l'acide m-chloroperbenzoïque (mCPBA) afin d'augmenter la réactivité des groupes méthyles en α des atomes d'azote.⁽⁵⁸⁾ Ces derniers subissent le réarrangement de Boekelheide⁽⁵⁹⁾ en présence d'anhydride acétique pour donner le composé 6,6'-dicarboxyméthyl-2,2'-bipyridine **25**. Ce composé n'a pas été isolé, mais directement traité par de l'acide bromhydrique 33% dans l'acide acétique. Le dérivé 6,6'-di(bromométhyl)-2,2'-bipyridine désiré **26** est obtenu sans difficulté de purification avec un rendement de 36% sur deux étapes à partir de la 6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine. Il est à noter que la réaction de bromation radicalaire de la 6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine à l'aide du *N*-bromosuccinimide (NBS), catalysée par la lumière UV et le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN)⁽⁶⁰⁾ constitue une voie plus directe pour l'obtention de **26**, mais conduit à un mélange de **26** et de dérivés monobromé et polybromés difficiles à purifier par chromatographie en raison de la faible solubilité de ces dérivés.

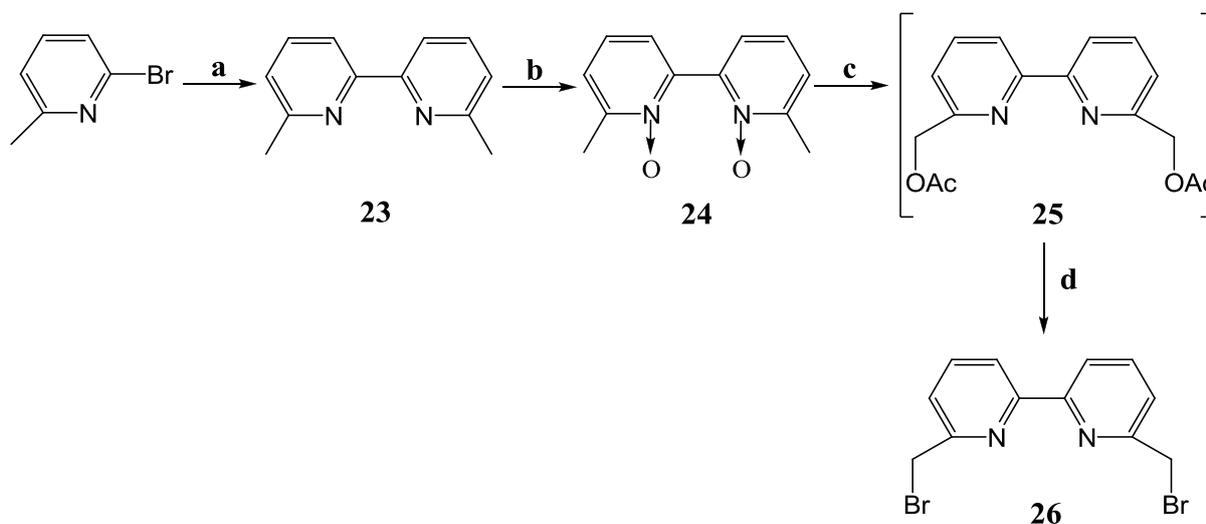


Schéma 41. Réactifs et conditions. a) NiCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$, PPh_3 , Zn , 84% ; b) mCPBA, CHCl_3 , 67% ; c) Ac_2O ; d) HBr 33% dans CH_3COOH , 54%.

Un mécanisme possible du réarrangement de Boekelheide est illustré dans le schéma 42. La première étape est l'acétylation du N-oxyde A pour donner B. L'anion acétate arrache ensuite le proton du groupe méthyle pour donner l'intermédiaire instable C, qui subit ensuite un

réarrangement [3,3]sigmatropique pour donner D. Récemment un mécanisme de paire d'ions a été postulé pour cette réaction.⁽⁶¹⁾

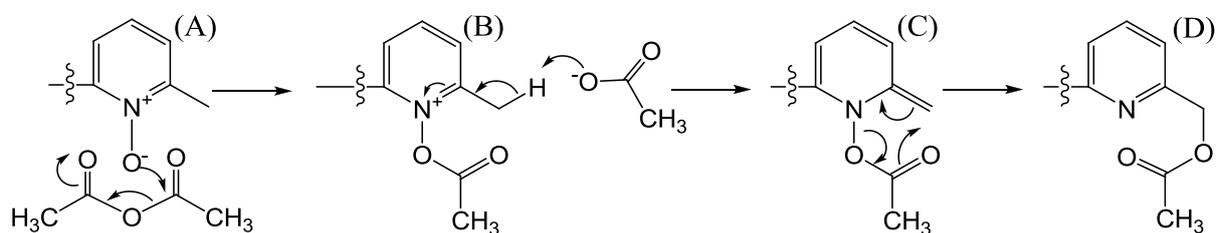


Schéma 42. Mécanisme possible du réarrangement de Boekelheide.

Pour l'accès au motif 6,6''-bis(bromométhyl)-2,2':6'2''-terpyridine, nous avons mis en œuvre une synthèse multi-étapes qui se déroule en deux parties : 1) préparation de la 2,2':6'2''-terpyridine, 2) fonctionnalisation des positions 6, 6'' de ce composé.

Le trihétérocycle terpyridine a été obtenu comme décrit par D.L Jameson⁽⁶²⁾ en deux étapes (Schéma 43).

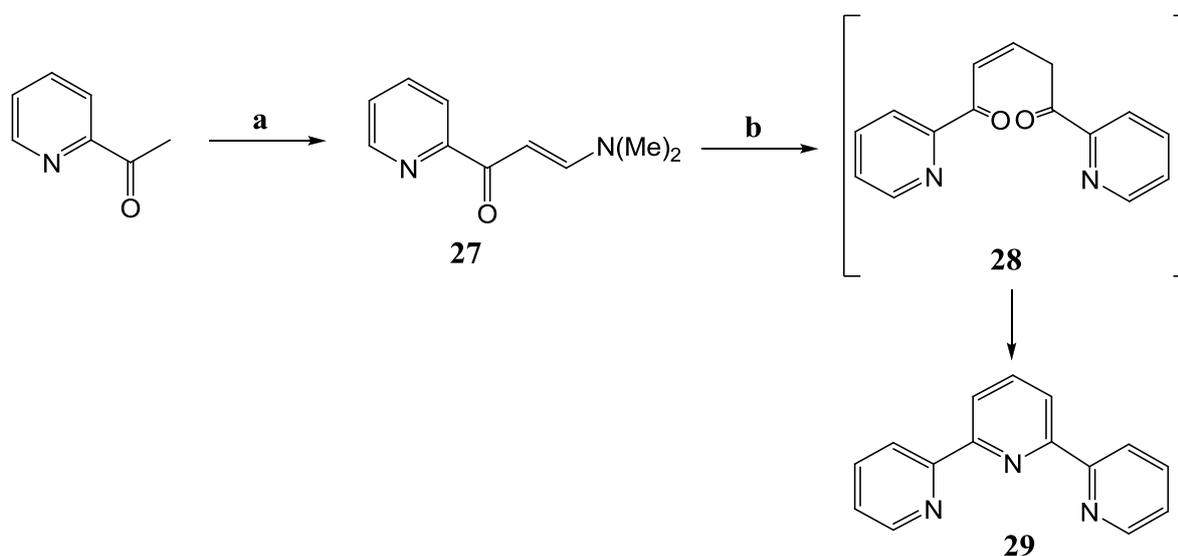


Schéma 43. Réactifs et conditions. a) DME, DMF, reflux, 89% ; b) i) 2-acétylpyridine, tBuOK, THF, T. A. ; ii) AcONH₄, AcOH, reflux, 24%.

L'énaminone **27** est obtenue avec un bon rendement (89%) en faisant réagir à reflux la 2-acétylpyridine avec l'acétal de diméthyle de *N,N'*-diméthylformamide (DME) dans le DMF.

Chapitre II

L'énolate de potassium de la 2-acétylpyridine est ensuite condensé avec l'énaminone **27** pour former un composé intermédiaire (1,5-ènedione) **28** par perte de diméthylamine. La fermeture du cycle de cet intermédiaire en présence d'acétate d'ammonium conduit à la 2,2':6',2''-terpyridine **29** avec un rendement de 24 % après une purification sur colonne alumine.

L'introduction de deux groupements bromométhyle en positions 6 et 6'' de la terpyridine **29** implique la mise en œuvre de sept étapes. Nous avons utilisé le protocole décrit par Galaup et al.⁽¹¹⁾ et qui est résumé dans le schéma 44.

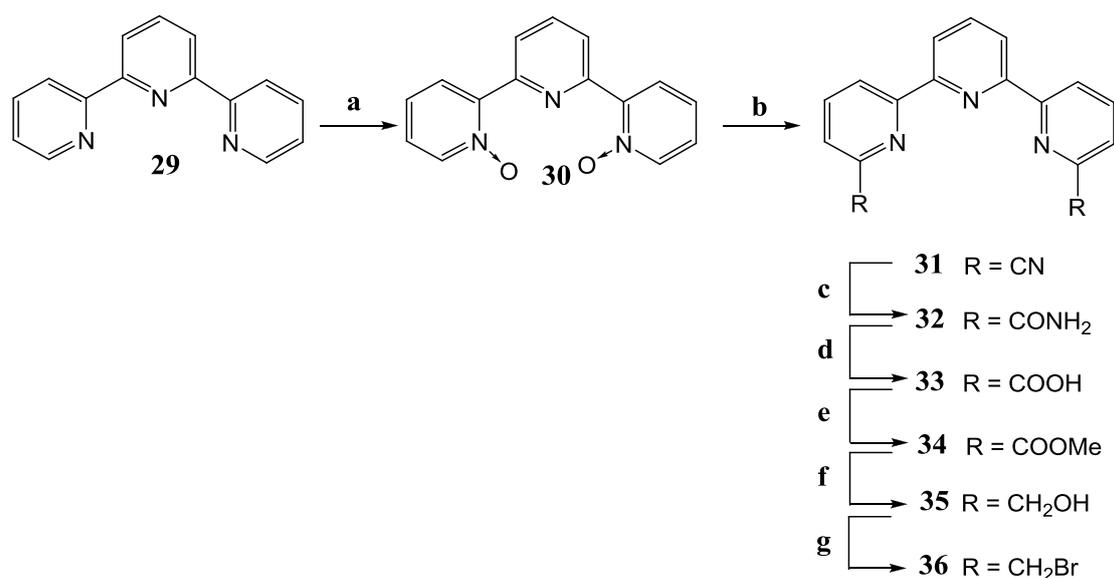


Schéma 44. Réactifs et conditions. a) 3-ClC₆H₄CO₃H, CH₂Cl₂, T.A., 62%; b) Me₃SiCN, PhCOCl, CH₂Cl₂, T.A., 82%; c) KOH, EtOH-H₂O, reflux, 82%; d) H₂SO₄-CH₃COOH, reflux, 94%; e) SOCl₂, MeOH, reflux, 81%; f) NaBH₄, EtOH, reflux, 43%; g) PBr₃, DMF, T.A., 75%.

La première étape consiste en la formation d'un dérivé N, N''-dioxyle **30** en faisant réagir la 2,2':6',2''-terpyridine **29** avec de l'acide méta-chloroperbenzoïque. La formation de ces groupes N-oxyde active les deux carbones 6, 6'' en α des azotes (effet attracteur des N-O) comme dans le cas du motif 2,2'-bipyridine et permet ainsi l'introduction de groupements nitrile en 6 et 6'' par la réaction de Reissert-Henze.⁽⁶³⁾ Nous reviendrons un peu plus loin dans ce chapitre sur le mécanisme de cette réaction. La 6,6''-dicarbonitrile-2,2':6',2''-terpyridine **31** est ensuite transformée en diamide **32** par hydrolyse basique puis en diacide **33** par un traitement dans le mélange acide sulfurique/acide acétique à chaud. Après estérification en présence de chlorure de thionyle dans le méthanol, le diester de méthyle **34** est réduit en diol

35 par le borohydrure de sodium. La 6,6''-bis(bromométhyl)-2,2':6'2''-terpyridine **36** est finalement obtenue par traitement de ce diol avec le tribromure de phosphore.

Le rendement global de cette synthèse multiétapes de la 6,6''-bis(bromométhyl)-2,2':6'2''-terpyridine **36** est de 10 % à partir de la 2,2':6',2''-terpyridine **29**. Notons que ce dérivé dibromé **36** peut également être obtenu par une autre voie de synthèse dont l'étape clé met en jeu un couplage de Stille ⁽⁶⁴⁾ suivie d'une bromation radicalaire; bien que cette méthode conduise à un meilleur rendement en dérivé dibromé,⁽¹¹⁾ elle fait intervenir des dérivés stanniques toxiques et difficilement purifiables ainsi qu'une étape de bromation radicalaire délicate à reproduire.

IV.2. Réactions de Macrocyclisation

Nous avons débuté cette étude par la préparation du macrocycle dérivé du motif 2,2'-bipyridine en raison de sa taille intermédiaire (18 chaînons) par rapport à celles des macrocycles dérivés des noyaux pyridine (15 chaînons) et terpyridine (21 chaînons).

IV.2.1. Motif 2,2-bipyridine

La réaction de macrocyclisation entre le synthon tétramine **4** et le dérivé 6,6' – bis(bromométhyl)-2,2'-bipyridine **26** (Schéma 45) a été effectuée dans de l'acétonitrile à reflux pendant une nuit, en présence de Na₂CO₃ comme base et sans avoir recours à des techniques de haute dilution. Les concentrations en réactifs sont de l'ordre de 2,7 10⁻³ M.

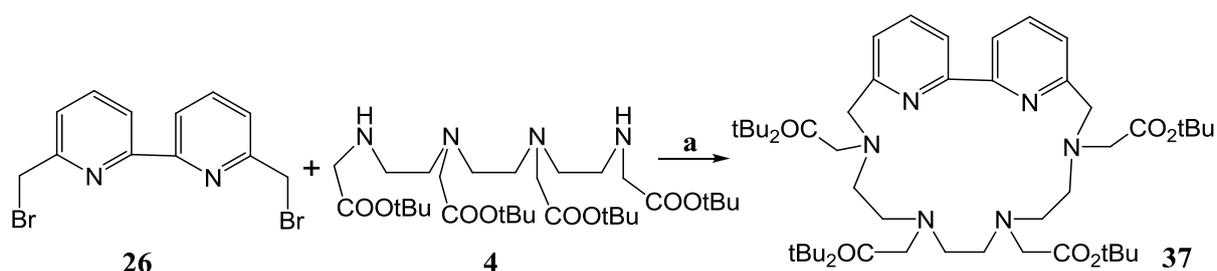


Schéma 45. Réactifs et conditions. a) CH₃CN, Na₂CO₃, [réactifs]= 2,7.10⁻³M, reflux, 24h, 58%.

Une analyse RMN ¹H du milieu réactionnel a permis de mettre en évidence la présence majoritaire d'une forme cyclique, que nous avons par la suite attribuée à la forme complexe de sodium. Cependant, après purification du milieu réactionnel sur colonne d'alumine, nous

Chapitre II

observons une dissociation partielle de ce complexe de sodium et nous isolons en fait un mélange de forme libre et de forme complexée (voir Figures 2 et 3).

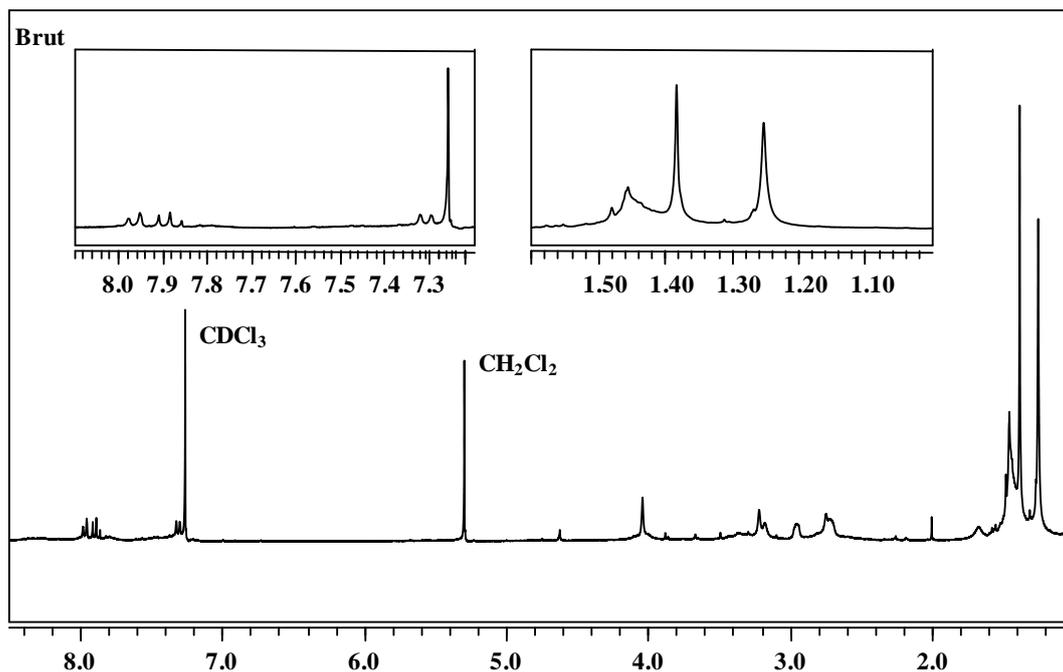


Figure 2. Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) du brut réactionnel du macrocycle **37** (Schéma 45).

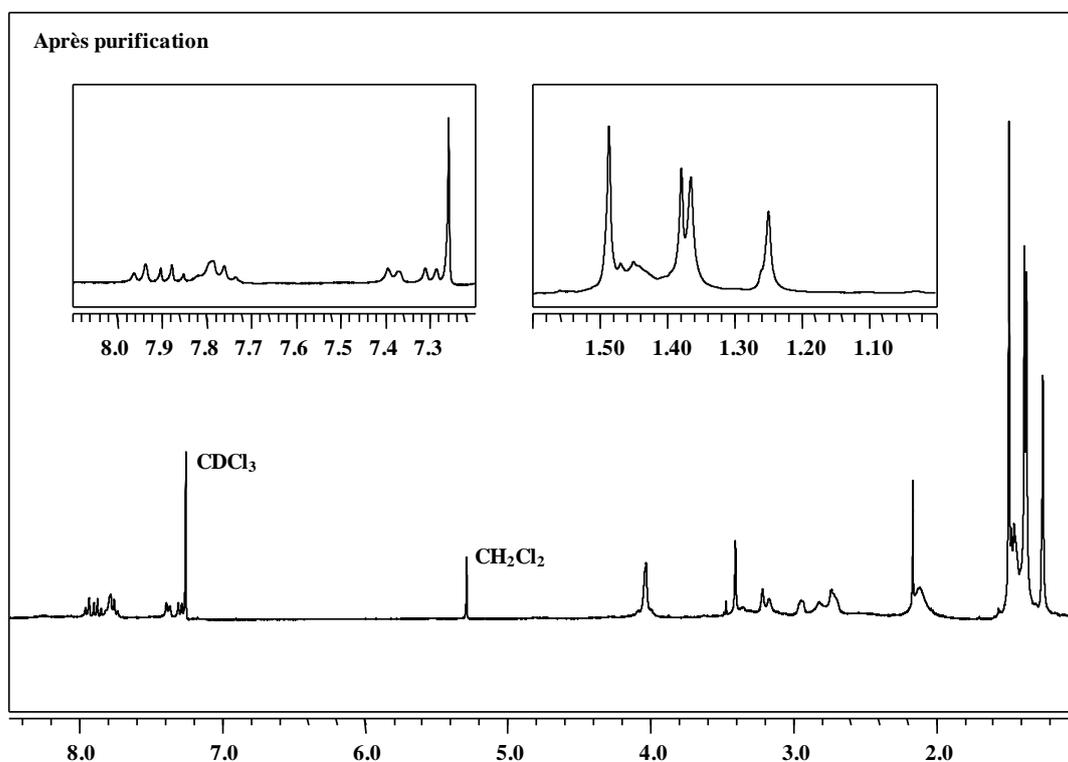


Figure 3. Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de deux formes complexée et libre du macrocycle **37** après purification sur alumine (Schéma 45).

Chapitre II

Afin d'obtenir les caractéristiques spectroscopiques de chacune de ces deux formes, nous avons effectué deux expérimentations:

- L'addition à une solution de ce mélange dans l'acétonitrile de cinq équivalents de NaCl et chauffage à reflux pendant 30 minutes nous a permis d'obtenir la forme **37.Na** pure.

- Le traitement de ce mélange par l'EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique), a permis de déplacer totalement ce mélange vers la forme **37**, ligand libre.

Les spectres RMN ^1H de ces deux formes sont reportés dans les figures 4 et 5.

La formation lors de la réaction de macrocyclisation du complexe sodé permet de conforter l'existence d'un effet de matrice de l'ion sodium.

A la suite de ces résultats, le protocole expérimental que nous avons mis en œuvre pour la purification du milieu de macrocyclisation consiste en un lavage du milieu réactionnel par une solution aqueuse saturée d'EDTA, suivi d'une chromatographie sur colonne d'alumine. Ce mode opératoire nous a permis d'isoler le composé **37**, sous forme ligand libre, avec un rendement de 58%.

La présence des ions pseudomoléculaires $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$ dans les spectres de masse de ces composés réalisés en mode electrospray (ESI) permettent d'attester la formation de cycles monomères à 18 chaînons. De plus l'observation d'ions dichargés correspondant à la perte de 4 groupes tertio-butyle (perte de 4×28 Da) permet de confirmer la présence de seulement quatre fonctions ester de tertio-butyle dans ces structures.

D'autre part, l'analyse des déplacements chimiques des protons du noyau 2,2'-bipyridine permet de confirmer la structure macrocyclique du composé **37**. En effet, le spectre RMN ^1H de ce composé montre une nette différence au niveau des déplacements chimiques des protons aromatiques H_3 , H_3' par rapport à la 2,2'-bipyridine elle-même ou par rapport à un ligand acyclique similaire (Schéma 46). Ces protons résonnent sous forme d'un doublet à 8,30 ppm dans la structure acyclique et à 7,86 ppm dans la structure macrocyclique. Ceci est dû à la conformation que le dihétero-cycle est contraint à adopter après son inclusion dans la structure macrocyclique.

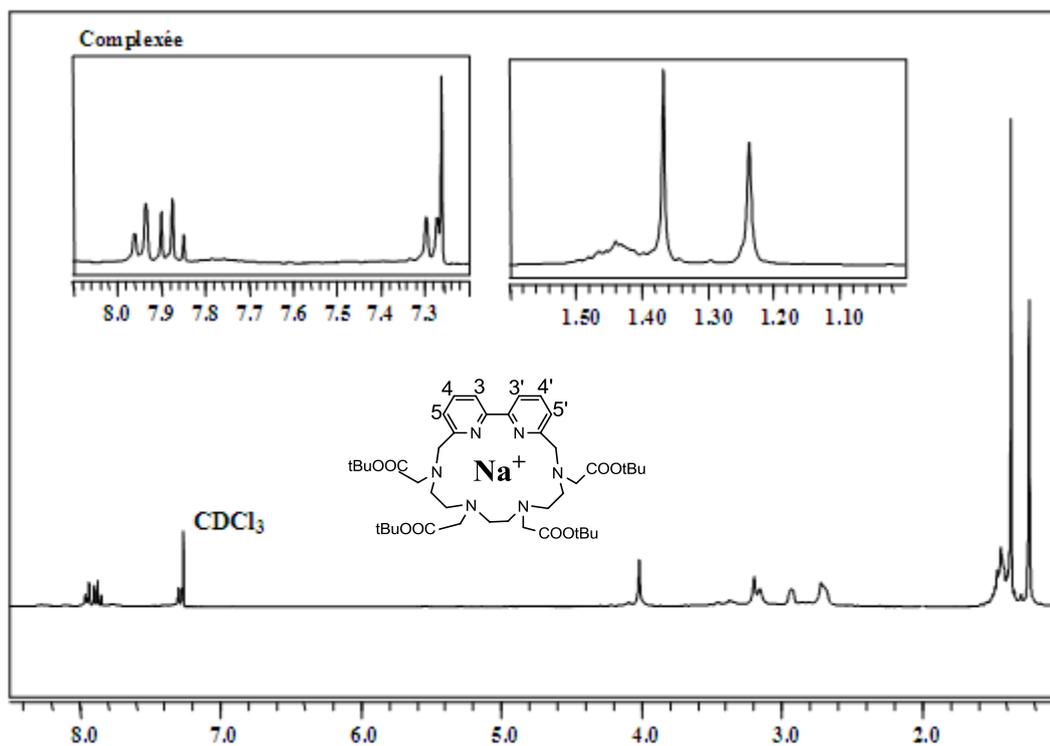


Figure 4. Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de la forme sodée pure du macrocycle **37** après complexation de la fraction purifiée avec NaCl.

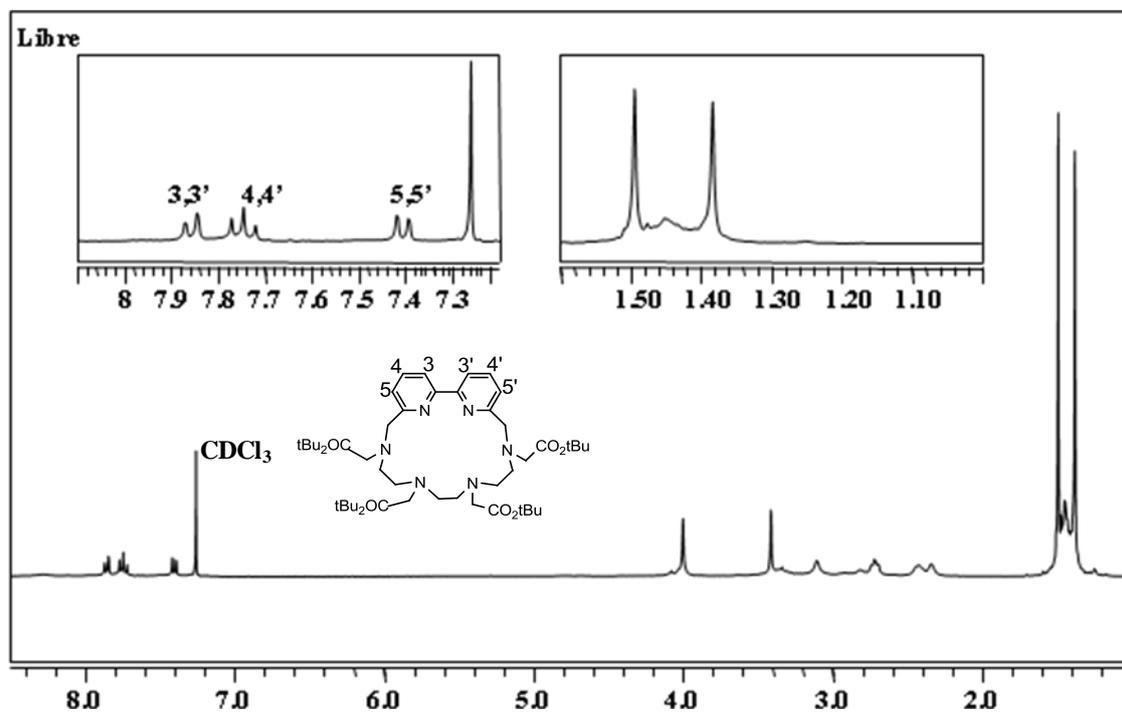


Figure 5. Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de la forme libre du macrocycle **37** après traitement avec l'EDTA.

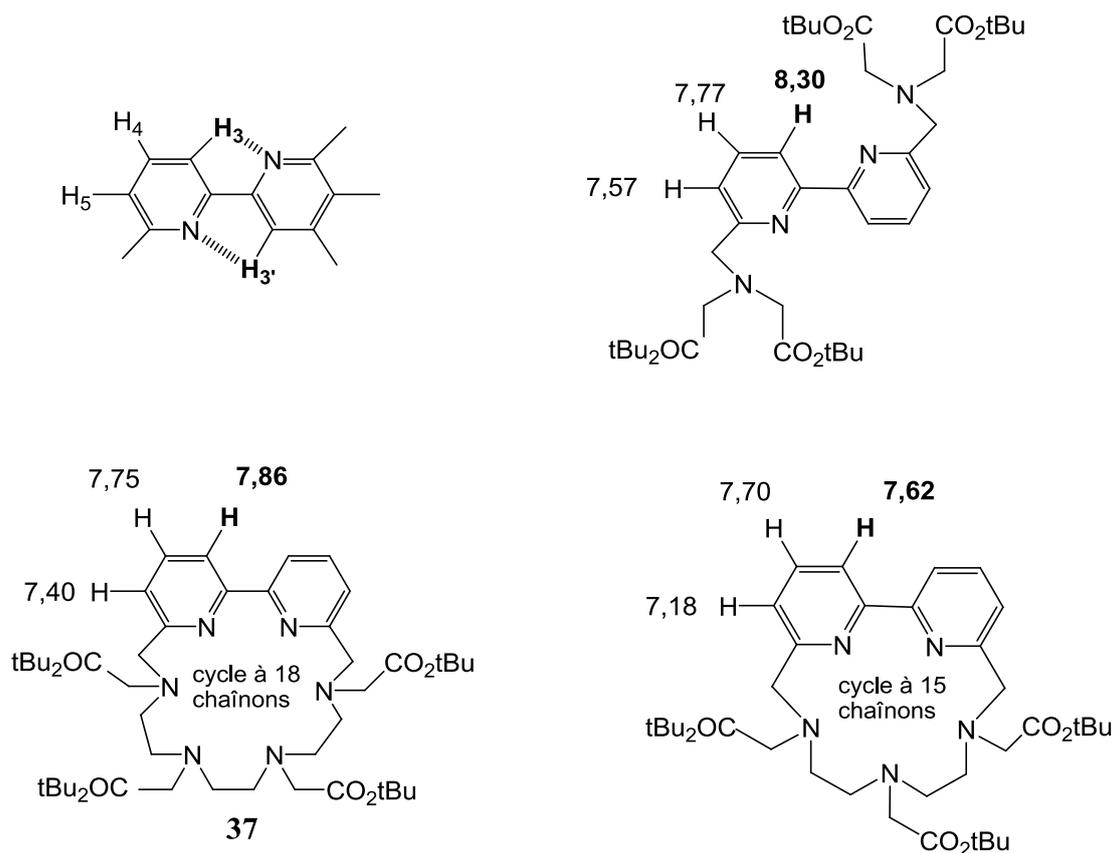


Schéma 46. Déplacements chimiques RMN¹H de dérivés 2,2'-bipyridine.

Dans une structure acyclique, le motif 2,2'-bipyridine adopte une conformation trans due à la répulsion des paires d'électrons libres de ses atomes d'azote. Dans ce cas, les protons H₃, H_{3'} se situent à champ faible en raison de leur interaction à courte distance avec les atomes d'azote hétérocycliques. Dans la structure macrocyclique **37**, où le motif 2,2'-bipyridine est contraint d'adopter une conformation cis ou voisine de cis, nous observons un déplacement à champ fort ($\Delta\delta = 0,44$ ppm) des protons H₃, H_{3'} qui ne sont plus soumis à l'influence des hétéroatomes.

Les protons H₃, H_{3'} dans cette structure à 18 chaînons se situent toutefois à champ plus faible que dans le cas de la structure analogue à 15 chaînons (7,86 ppm / 7,62 ppm). La plus grande taille (et donc flexibilité) du cycle dans **37** induit vraisemblablement un angle plus important entre les deux noyaux pyridine.

En RMN ¹³C, nous n'observons pas de modifications notables permettant de visualiser le passage d'une forme trans à une forme cis du noyau bipyridine.

Chapitre II

L'examen des figures 4 et 5 montre que le spectre RMN ^1H du complexe sodé **37.Na** est nettement différencié par rapport à celui du ligand libre **37** : i) nous observons notamment une plage de résonance différente des groupements tBu : $\delta = 1,38$ et $1,49$ ppm pour la forme libre et $1,24$ et $1,37$ ppm pour la forme complexée ; ii) cette différence se retrouve également au niveau des groupes méthylènes de ces bras acétate de tertiobutyle ; $\delta = 3,15$ et $3,42$ ppm d'une part et $3,15$ et $3,19$ ppm d'autre part pour les formes **37** et **37.Na** respectivement ; iii) la répartition des résonances des protons aromatiques permet également de distinguer aisément ces deux formes (cf Figures 4 et 5). On note ainsi des variations de $0,12$ ppm pour les protons $\text{H}_{5,5'}$ et $\text{H}_{4,4'}$ et de $0,08$ ppm pour les protons $\text{H}_{3,3'}$.

La participation des atomes d'azotes hétérocycliques à la complexation de l'ion sodium est plus clairement mise en évidence par spectroscopie UV-visible et se traduit dans l'acétonitrile par un déplacement bathochrome de 6 nm de la bande d'absorption de plus faible énergie ($\lambda_{\text{max}} = 295$ nm dans le cas de **37.Na**).

Au niveau des spectres infra-rouge, nous notons un déplacement de la fréquence d'élongation $\nu_{\text{C=O}}$ vers les basses fréquences entre le ligand libre (1733 cm^{-1}) et le complexe sodé (1728 cm^{-1}). Ce déplacement de 5 cm^{-1} peut être associé à la coordination des fonctions ester avec le cation sodium. Il est relié à la diminution du caractère double de la liaison C=O lors de la formation d'une liaison du type C=O-Na .

IV.2.2. Motifs pyridine et 2,2':6'-2''-terpyridine

Le même protocole expérimental que celui décrit précédemment a été utilisé pour la préparation de ces deux macrocycles (Schéma 47).

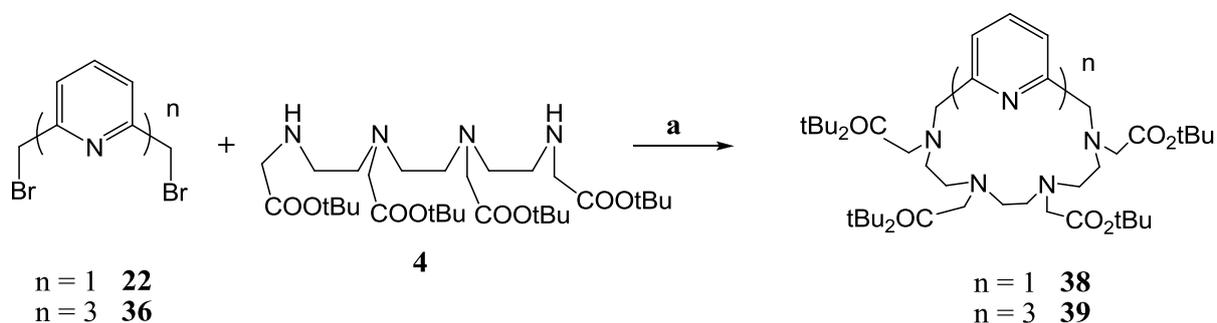


Schéma 47. Réactifs et conditions. a) CH_3CN , Na_2CO_3 , [réactifs] = $2,7 \cdot 10^{-3}\text{ M}$, reflux, 24h, 54% (**38**) et 39% (**39**).

Pour le macrocycle **38** à motif pyridine (15 chaînons), les spectres RMN ^1H et ^{13}C du brut réactionnel mettent en évidence la présence d'une seule espèce, le complexe **38.Na**.

Chapitre II

Comme dans le cas de la préparation du macrocycle **37**, dérivé de la 2,2'-bipyridine, nous recueillons après purification du brut réactionnel sur colonne d'alumine un mélange de forme libre et de complexe sodé dans les proportions de 75/25 (évaluation d'après les données RMN ^1H). Ce mélange traité par une solution aqueuse saturée en EDTA permet de récupérer le macrocycle libre pur **38** avec un rendement de 54%.

Ces deux formes peuvent être facilement distinguées par RMN ^1H (Figure 6). En effet, dans le complexe Na^+ , les deux protons H_3 et H_5 du noyau pyridine apparaissent sous la forme d'un doublet à 7,15 ppm par contre ceux de la forme libre sont plus déblindés et présentent un doublet à 7,33 ppm. Pour les signaux correspondant aux tertibutyles, on observe dans la forme complexée deux singulets résonant à 1,38 et 1,41 ppm tandis que ceux de la forme libre sont situés à 1,41 et 1,47 ppm. En RMN ^{13}C , certains signaux relatifs aux groupes méthylènes présentent des différences de déplacements chimiques allant jusqu'à 3,1 ppm. De plus les atomes de carbone de l'hétérocycle résonnent à des fréquences différentes dans les deux formes ($0,7 < \Delta\delta < 1,5$ ppm).

Au niveau de l'étude infra-rouge de ces deux formes, on observe un déplacement de 5 cm^{-1} de la fréquence d'élongation $\nu\text{C}=\text{O}$ des fonctions ester vers les basses fréquences sous l'effet de la complexation de l'ion sodium.

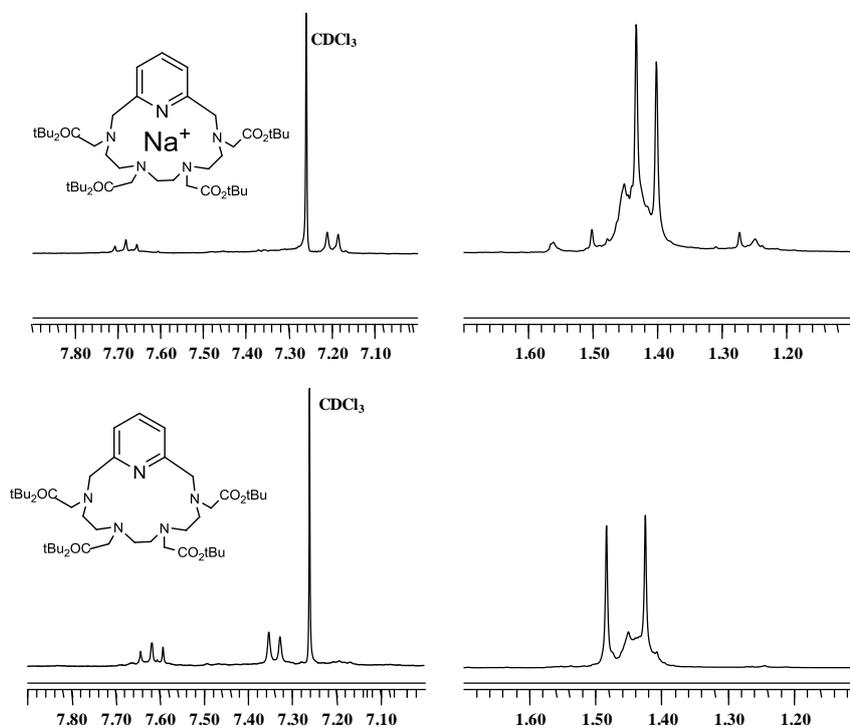


Figure 6. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) des composés **38** et **38.Na**. Résonance des protons tertibutyles et des protons hétérocycliques.

Chapitre II

Contrairement aux résultats obtenus dans le cas des macrocycles à motifs pyridine et 2,2'-bipyridine, le spectre RMN ^1H du brut de réaction mettant en jeu la 2,2':6'-2''-terpyridine met en évidence la présence de plusieurs espèces. Après lavage de ce milieu brut avec une solution d'EDTA et purification sur colonne d'alumine, le macrocycle libre **39** a été isolé avec un rendement de 39%.

Cette diminution de rendement par rapport à ceux observés pour les macrocycles dérivés de la pyridine (54%) et de la 2,2'-bipyridine (58%) peut être due à l'augmentation de la taille de la cavité du macrocycle **39** (21 chaînons) qui diminue l'effet matrice de l'ion sodium impliqué dans la réaction de macrocyclisation et donc diminue sa sélectivité.

IV.3. Obtention des Ligands L_1 - L_3

La dernière étape pour l'obtention des ligands L_1 - L_3 consiste en l'hydrolyse des fonctions ester de tertibutyle.

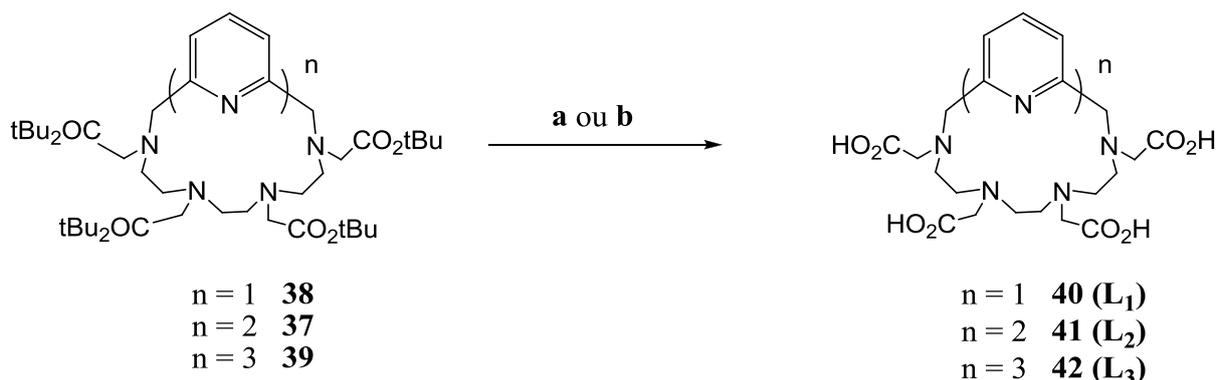


Schéma 48. Obtention des ligands L_1 – L_3 par hydrolyse des fonctions ester de tertibutyle.
a) HCOOH , 60°C , 24h, 100% (L_1), 98% (L_2); b) $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, T. A., 24h, 92% (L_3).

L'hydrolyse des fonctions ester a été réalisée en milieu acide. Nous avons utilisé l'acide formique dans le cas des macrocycles **37** et **38** et l'acide trifluoroacétique dans le cas du macrocycle **39**. Les dérivés tétraacides correspondants ont été isolés avec des rendements de 92 à 100%.

Ces ligands L_1 – L_3 ont été caractérisés par RMN ^1H et ^{13}C , par spectrométrie de masse haute résolution et leur pureté a été analysée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse. Nous avons reporté dans la figure 7, les chromatogrammes de l'analyse HPLC des ligands L_2 et L_3 . Dans les conditions utilisées pour cette analyse, le

Chapitre II

chromatogramme du ligand **L**₁ montre un composé élué dans le front du solvant. On peut ainsi remarquer que le temps de rétention du ligand augmente avec le nombre de noyaux pyridine intégrés dans sa structure : $tr(\mathbf{L}_1) < tr(\mathbf{L}_2) < tr(\mathbf{L}_3)$; ceci en accord avec le caractère hydrophobe du ligand combiné à la mise en œuvre d'analyses HPLC en phase inverse.

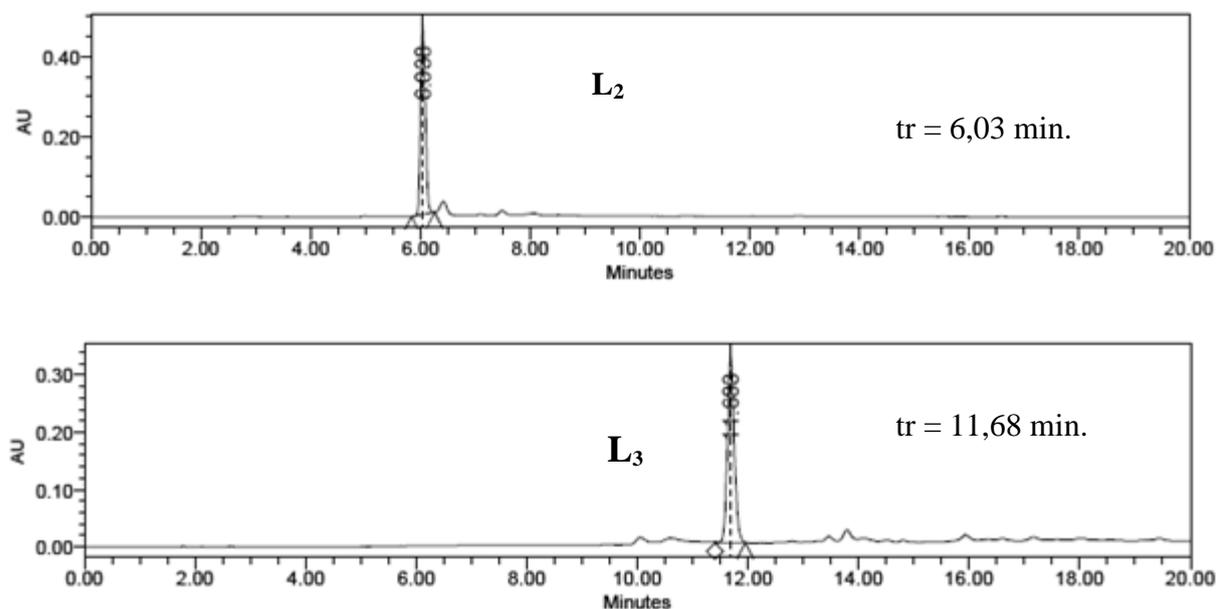


Figure 7. Chromatogrammes HPLC en phase inverse des ligands **L**₂ et **L**₃. Conditions : colonne : C8 ; éluant : HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min.

Dans le cas de la préparation du ligand **L**₁, nos résultats peuvent être directement comparés avec les données de la littérature. Stetter et Frank⁽⁴⁾ rapportent en effet un rendement global de 17% en ligand **L**₁ en mettant en œuvre la stratégie cyclisation/alkylation et la méthode de macrocyclisation de Richman et Atkins (Schéma 49). Dans notre cas, le rendement global en ligand **L**₁ à partir de la tétraamine tétraester **4** est de 54%. Ces résultats confortent l'utilisation de la stratégie alkylation / cyclisation.

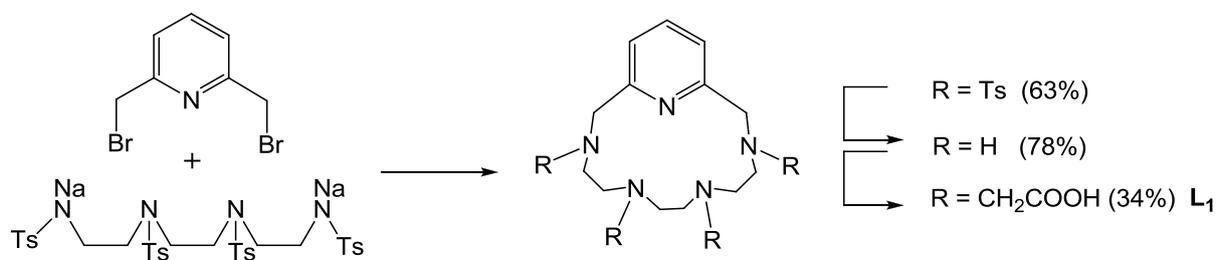


Schéma 49. Préparation du ligand **L**₁ selon Stetter et Frank.⁽⁴⁾

V Macrocycles bifonctionnels Pyridine et 2,2'-Bipyridine L₄ et L₅

Les macrocycles à 15 et 18 chaînons dérivés de motifs pyridine et 2,2'-bipyridine fonctionnalisés par une fonction ester de méthyle en position 4 de l'hétérocycle ont été préparés de la même façon que leurs analogues non substitués à partir du synthon tétraamine tétraester **4** et des dérivés 4-carboxyméthyl-2,6-bis(bromométhyl) pyridine (**47**) et 4-carboxyméthyl-6,6'-bis(bromométhyl)-2,2'-bipyridine (**52**).

V.1. Précurseurs hétérocycliques dibromés

Le premier dérivé bromé **47** a été préparé en 5 étapes à partir de la *N*-oxyde 2,6-lutidine disponible commercialement. Un premier processus consiste à introduire tout d'abord une fonction nitrile en position 4 du noyau 2,6-lutidine (composé **44**), et ensuite à transformer cette fonction nitrile en ester méthylique (composé **46**). Un second processus permet ensuite d'activer les deux fonctions méthyle de l'aromatique par une réaction d'halogénéation. Le schéma 50 montre les réactifs et les conditions mises en œuvre pour chacune des étapes.

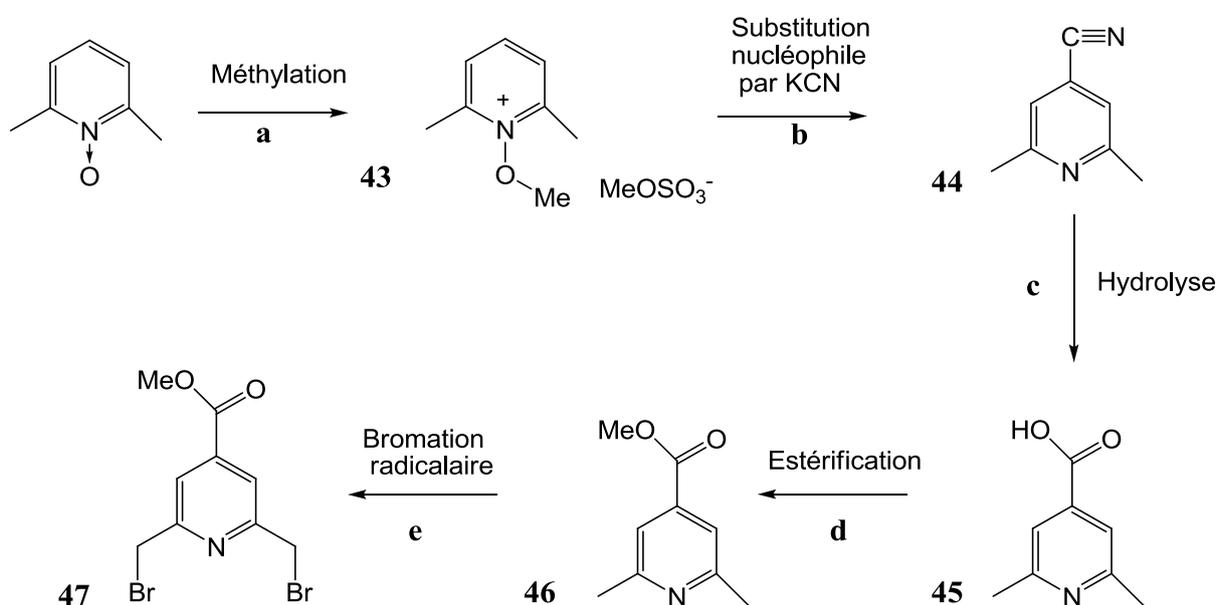


Schéma 50. Réactifs et conditions. a) DMS, 80°C, 87% ; b) KCN, H₂O, T. A., 33% ; c) H₂SO₄, 100°C, 5h ; d) H₂SO₄, MeOH, 85°C, 24h, 78% ; e) i) NBS, (PhCOO)₂, CCl₄, hv, reflux; ii) HPO(OEt)₂, iPr₂NEt, T. A., 57%.

Chapitre II

La préparation du dérivé nitrile fait intervenir une substitution nucléophile avec le cyanure de potassium sur un sel de pyridinium : le sulfate de 1-méthyle-2,6-diméthylpyridinium **43**. En effet, l'introduction du groupement nitrile ne peut se faire directement sur le noyau pyridine. Seuls des réactifs nucléophiles très puissants comme NH_2^- , OH^- peuvent attaquer les noyaux pyridine en position ortho et éventuellement para. Par contre, dans le cas des cations pyridinium, la charge portée par l'atome d'azote du cycle facilite une attaque nucléophile au niveau des positions ortho et para.⁽⁶⁵⁾

Les conditions opératoires utilisées pour l'obtention de **44** sont celles décrites par Feely et Beavers.⁽⁶⁶⁾ La condensation du diméthylsulfate sur la *N*-oxyde 2,6-lutidine conduit à une réaction exothermique. Le sel attendu cristallise à partir du milieu réactionnel et est obtenu avec un rendement de 87% après recristallisation dans l'acétone. Le dérivé nitrile **44** a été obtenu avec un rendement plus faible 33% après purification par chromatographie sur gel de silice. Une hydrolyse en milieu acide du nitrile suivie d'une estérification de la fonction acide de ce dernier composé, également en milieu acide conduit à l'ester méthylique **46**. Le dérivé acide **45** n'a pas été purifié et a été utilisé tel quel pour l'étape d'estérification. Le rendement global de ces quatre étapes est de 22%, l'étape limitante étant l'introduction de la fonction cyanure. Nous n'avons pas cherché à optimiser cette étape, le rendement que nous avons obtenu étant plus élevé que celui rapporté dans deux publications récentes (16 et 18%).^(67, 68)

L'étape de fonctionnalisation des deux groupements méthyle de **46** en groupements bromométhyle peut être envisagée en utilisant le réarrangement de Boekelheide à partir du dérivé *N*-oxyde de **46**. Toutefois, l'application de cette méthode à un noyau pyridine nécessite de dupliquer les étapes. D'après le mécanisme de ce réarrangement (Schéma 42), on ne peut en effet introduire qu'un seul groupement CH_2Br à la fois (Schéma 51).

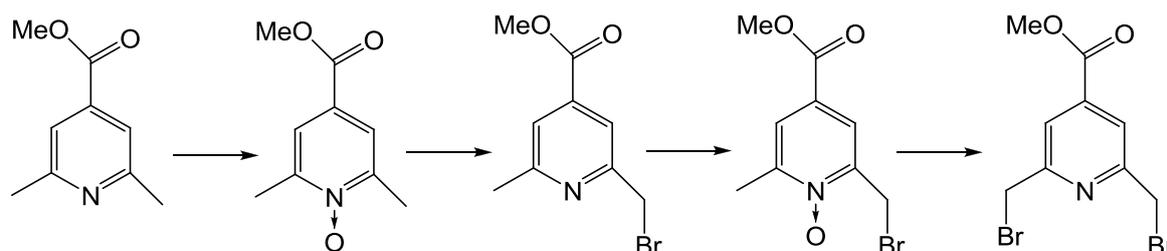


Schéma 51. Application du réarrangement de Boekelheide dans le cas d'un noyau pyridine.

Chapitre II

Nous avons opté pour une réaction de bromation radicalaire mettant en jeu le N-bromosuccinimide (NBS) et le peroxyde de benzoyle. Le peroxyde de benzoyle permet de générer une faible quantité du radical Br^\cdot qui va ensuite initier les étapes de propagation (équation 1-3, Schéma 52). Le NBS joue un double rôle comme générateur de brome Br_2 et consommateur de l'acide bromhydrique libéré, évitant ainsi l'inhibition de la réaction (équation 4, Schéma 52).⁽⁶⁹⁾

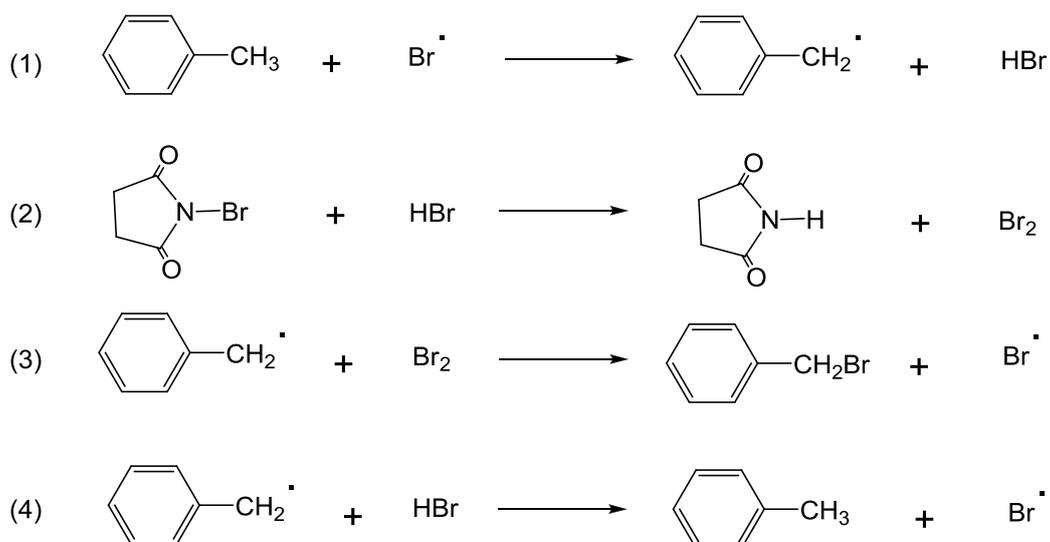


Schéma 52. Mécanisme de bromation radicalaire.

Cette méthode est sans doute la plus utilisée pour la bromation d'un groupement pseudobenzyle. Elle présente l'avantage d'être compatible avec la présence de différentes fonctions dans la structure du composé à bromer, mais s'accompagne de la formation de dérivés polybromés. Ce problème est d'autant plus aigu lorsqu'il s'agit de composés présentant deux groupements pseudobenzyles, rendant l'étape de purification très délicate. Dans notre cas (Schéma 53), la bromation a été effectuée dans CCl_4 , à reflux sous irradiation UV, en présence de deux équivalents de NBS et d'une quantité catalytique de peroxyde de benzoyle. Après un temps de réaction de 6h, le milieu réactionnel orange au départ dû à la présence de brome s'est décoloré. Après un traitement classique, une purification minutieuse sur gel de silice a permis d'isoler le dérivé **47** désiré (14%) ainsi que deux autres produits polybromés.

Afin de résoudre le manque de sélectivité de cette réaction de bromation radicalaire, nous avons eu recours à la méthode en deux étapes de Liu et al.⁽⁷⁰⁾ cette méthode consiste après la

Chapitre II

réaction de bromation à réaliser dans un second temps une réaction de débromination sélective à l'aide de diéthyle phosphite en présence de *N,N*-diisopropyléthylamine. L'utilisation de cette méthode nous a permis d'isoler le produit cible **47** après une simple purification par chromatographie avec un rendement de 57%.

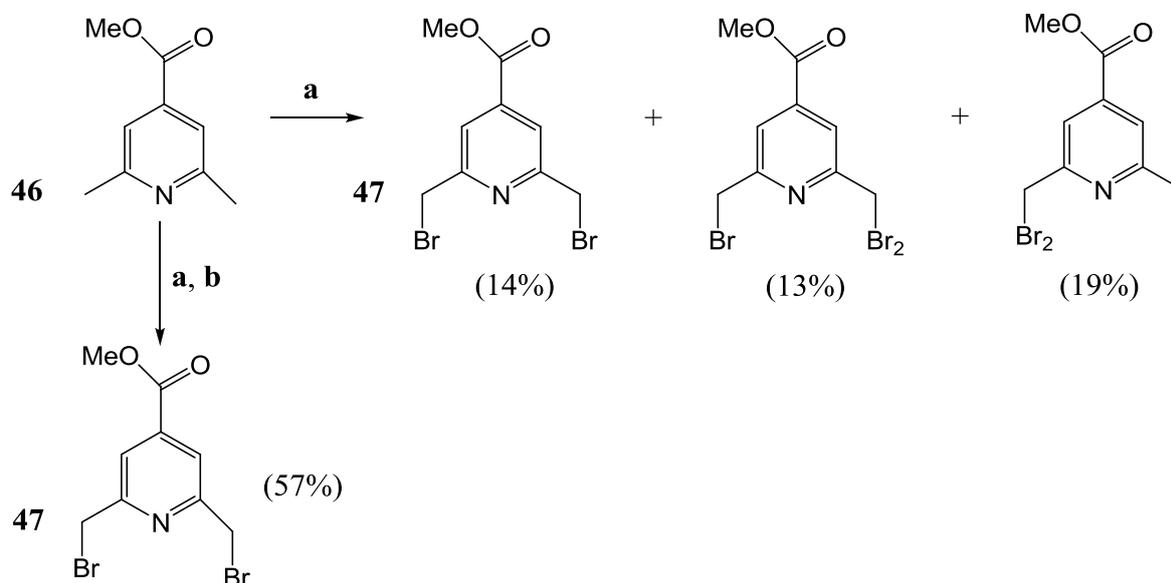


Schéma 53. Réactifs et conditions. a) NBS 2 équiv., (PhCOO)₂ cat., CCl₄, hv, reflux 6h; b) HPO(OEt)₂, iPr₂NEt, T. A. 18h.

La stratégie de synthèse du second composé bromé **52** dérivé de la 2,2'-bipyridine (Schéma 54) avait déjà été mise au point au niveau de l'équipe.^(71,72)

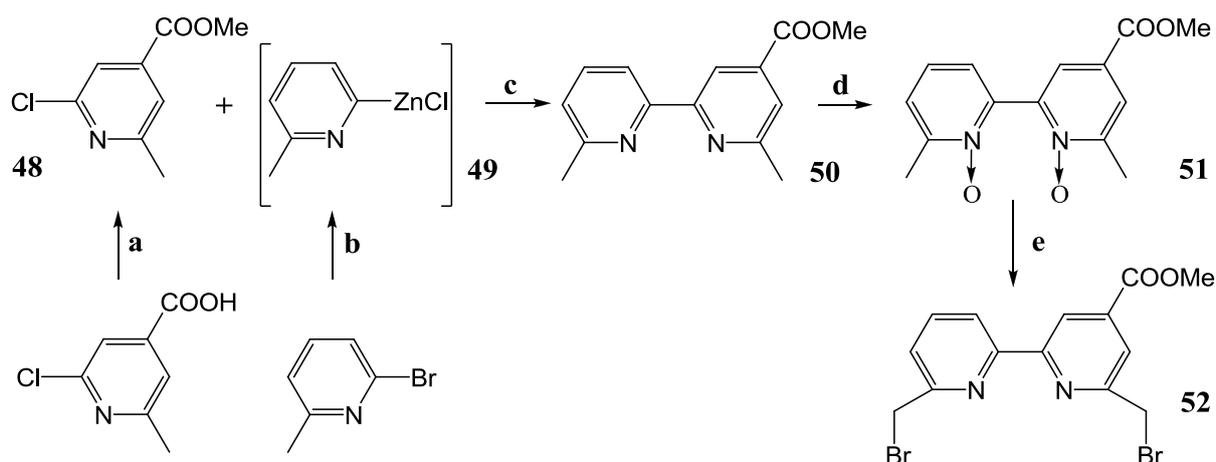


Schéma 54. Réactifs et conditions. a) MeOH, HCl, reflux, 6 h, 92% ; b) n-BuLi, THF, ZnCl₂, -78 °C à T. A.; c) Pd, THF, reflux, 1,5h, 84%. d) mCPBA, CH₂Cl₂, T. A. 19h, 95%; e) i) Ac₂O, 120°C, 16h ; ii) HBr 33% dans CH₃COOH, 70°C 7h, 62%.

Chapitre II

Cette stratégie consiste en un couplage de Negishi entre le dérivé pyridine trisubstitué **48** et le dérivé organozincique **49** préparé à partir de la 2-bromo-6-méthylpyridine par un échange halogène-métal avec *n*-BuLi, suivi par une transméallation par ZnCl₂. Après une oxydation du noyau bipyridine de **50**, le recours au réarrangement de Boekelheide permet d'atteindre le dérivé dibromé avec un rendement global de 46%.

V.2. Obtention des ligands L₄ et L₅

Les réactions mises en jeu sont représentées dans le schéma 55.

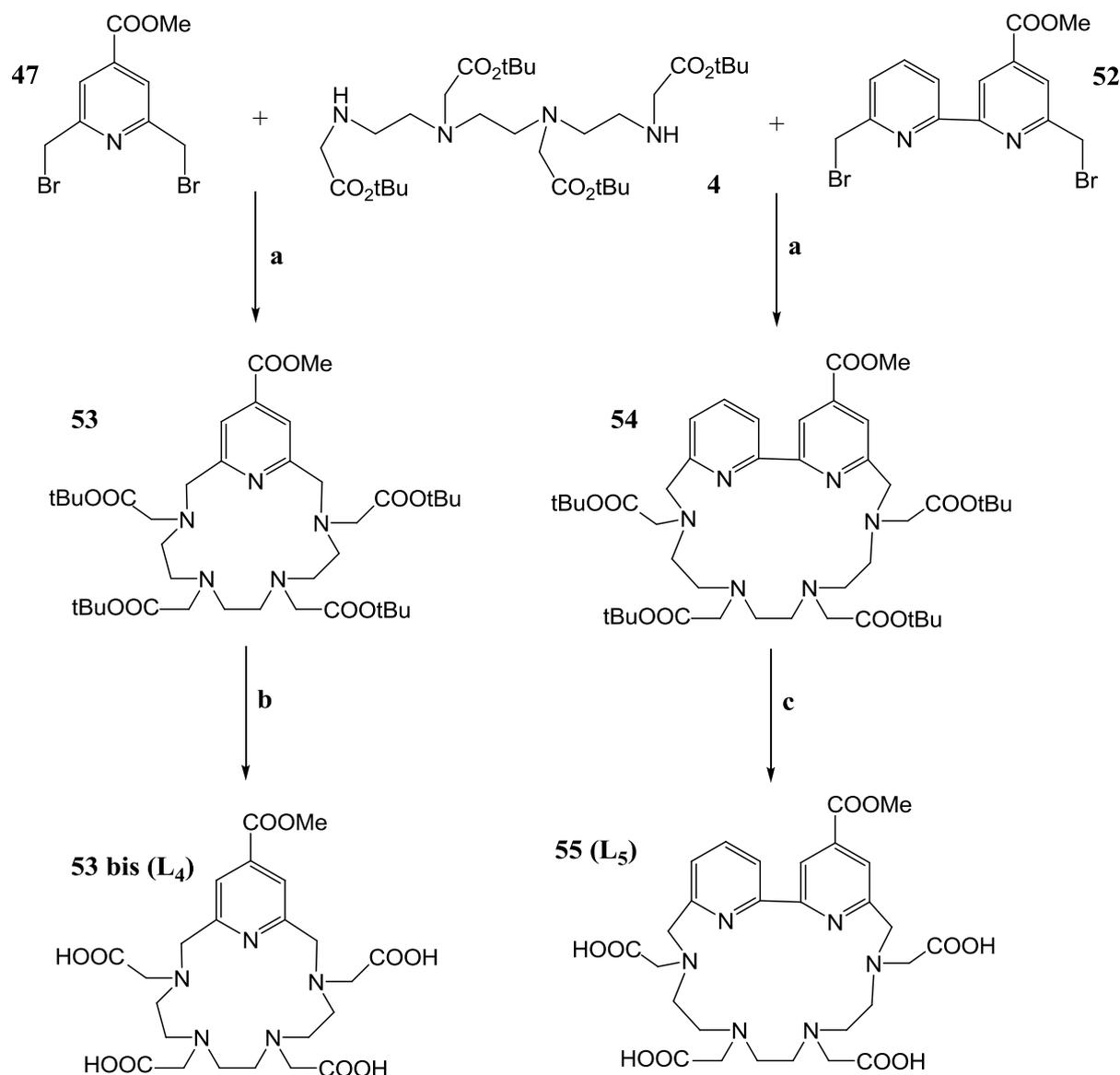


Schéma 55. Réactifs et conditions. a) CH₃CN, Na₂CO₃, [réactifs]= 2,7.10⁻³M, reflux, 24h, 56% (**53**), 40% (**54**) ; b) TFA/CH₂Cl₂, T. A., 24h, 100% (**L₄**). c) HCOOH, 60°C, 24h, 90% (**L₅**).

Chapitre II

Les réactions de macrocyclisation ont été conduites de la même façon que celles décrites pour les ligands à motif (poly)pyridine non substitué. L'examen des spectres RMN ^1H des milieux réactionnels met en évidence pour les deux cas la forme complexe de sodium. Une purification sur colonne d'alumine nous a permis d'obtenir le macrocycle **53** sous forme libre avec un rendement de 56%. Les caractéristiques RMN ^1H permettant de différencier la forme libre de la forme complexe de sodium sont analogues à celles observées pour le macrocycle correspondant **38** présentant un noyau pyridine non substitué. Au niveau des groupes tertiobutyles deux singulets sont observés à 1,27 et 1,42 ppm dans le complexe de sodium et à 1,43 et 1,48 ppm dans la forme libre. Les protons aromatiques résonant sous la forme d'un singulet subissent un déplacement vers les champs forts lors du passage de la forme libre vers la forme complexée (7,86 vs 7,69 ppm respectivement). Dans le cas du macrocycle **54**, nous n'avons pas réussi à obtenir le ligand libre exempt de forme sodée malgré plusieurs traitements avec l'EDTA. Aussi nous l'avons isolé sous forme de complexe de sodium avec un rendement de 40%.

Les fonctions esters de tertiobutyle des macrocycles **53** et **54** sont hydrolysées de manière sélective en milieu acide (CF_3COOH ou HCOOH) pour conduire aux ligands **L4**, **L5** avec des rendements supérieurs à 90 %.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C du ligand **L5** révèlent parfaitement la dissymétrie de la structure induite par la fonction ester de méthyle. Les protons méthyléniques des deux groupes pseudobenzyls et des quatre chaînes latérales acide acétique sont différenciés. En RMN ^{13}C , on note en particulier 12 signaux différents pour les 12 groupes méthyléniques et 4 signaux pour les quatre fonctions acides.

VI Macrocyces dérivés du motif mixte Pyridine-Pyrazole L₆-L₈

On termine ce chapitre par la préparation des macrocyces à 15 et 21 chaînons dérivés du motif mixte Pyridine-Pyrazole. Comme pour les autres macrocyces étudiés précédemment, nous avons suivi la méthode de préparation mettant en jeu une substitution nucléophile à partir du synthon tétraamine tétraester **4** et de dérivés hétérocycliques dibromés, les composés : 6-bromométhyl-2(3'-bromométhyl-pyrazol-1'-yl) pyridine (**57**), 1,3-bis(6-bromométhylpyridin-2-yl) pyrazole (**64**) et 2,6-bis(3-bromométhylpyrazol-1-yl) pyridine (**65**).

VI.1. Précurseurs hétérocycliques dibromés

Le premier dérivé bromé (**57**) a été préparé par un couplage aryl-aryl entre la 2-bromo-6-méthylpyridine et le 3-méthyl pyrazole suivie d'une bromation radicalaire par le couple NBS / AIBN (Schéma 56).

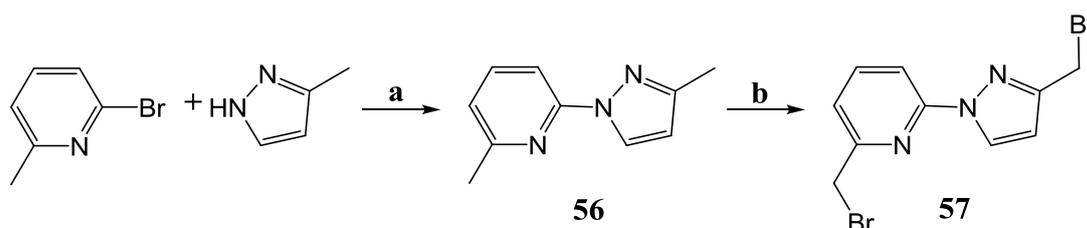


Schéma 56. Réactifs et conditions. a) 1 éq. CuI, 1,2 éq. *trans*-1,2-cyclohexanediamine, K₂CO₃, dioxanne, reflux, 59% ; b) NBS, AIBN, CCl₄, hv, reflux, 20%.

Pour obtenir le composé *N,C*-pyrazolypyridine nous avons opté pour une méthode de couplage au cuivre en raison de sa facilité de mise en œuvre, due à un catalyseur stable à l'air, un co-ligand diamine disponible commercialement ainsi qu'un rendement de couplage satisfaisant. La méthode classiquement utilisée pour l'obtention de dérivés *N,C*-pyrazolypyridine à l'aide du sel potassique de dérivés pyrazoles nécessite un temps de réaction de plusieurs jours à reflux du diglyme.⁽⁷³⁾

Le couplage a été réalisé au reflux du dioxane dégazé en utilisant 1 équivalent de CuI, 2,4 équivalents de K₂CO₃ comme base et 1,2 équivalent de *trans*-cyclohexanediamine. La première étape de purification consiste à extraire le cuivre qui semble être complexé par le motif pyridine-pyrazole formé. Pour cela, le brut réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée en EDTA. Le produit de couplage **56** a été ensuite isolé après purification par chromatographie sur gel de silice avec 59% de rendement.

Afin d'obtenir le dérivé dibromé, une bromation radicalaire est mise en jeu par le NBS dans CCl₄ porté à reflux avec irradiation UV et en utilisant l'AIBN comme initiateur des radicaux

Chapitre II

Br[•]. Une purification sur silice permet d'isoler le produit attendu **57** avec un rendement de 20%. Il a été montré précédemment au laboratoire que dans le cas de dérivés *N,C*-pyrazolylpyridine, la voie N-oxyde / réarrangement de Boekelheide ne pouvait pas être exploitée pour introduire un groupement bromométhyle en α du cycle pyrazole.⁽⁴³⁾

Comme pour le motif 6,6''-bis(bromométhyl)-2,2':6',2''-terpyridine (**36**), pour avoir accès au motif 1,3-bis(6-bromométhylpyridin-2-yl) pyrazole nous avons mis en œuvre une synthèse multi-étapes divisée en deux parties : 1) préparation du tri-hétérocycle pyridine-pyrazole-pyridine, 2) fonctionnalisation des positions 6,6'' de ce composé (Schéma 57).

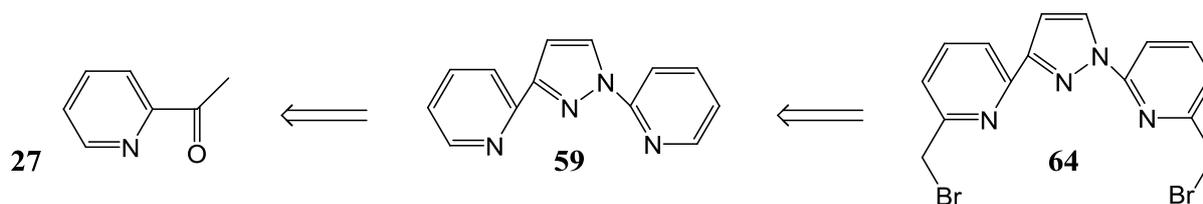


Schéma 57. Voie rétrosynthétique pour l'obtention du trihétérocycle fonctionnalisé **64**.

Préparation du tri-hétérocycle pyridine-pyrazole-pyridine **59**

La préparation du tri-hétérocycle **59** a été réalisée à partir du di-hétérocycle *C,C*-pyrazolylpyridine **58** (Schéma 58)⁽⁷⁴⁾ obtenu par l'action de l'hydrazine sur l'énaminone, le 3-(diméthylamino)-1-(2-pyridyl)prop-2-èn-1-one **27** (déjà préparé, schéma 43).

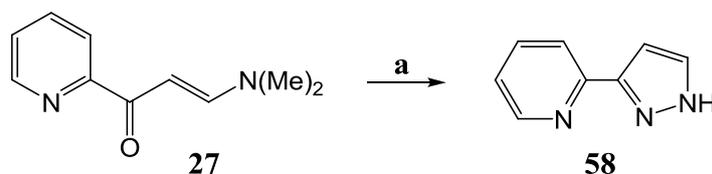


Schéma 58. Réactifs et conditions. a) hydrazine, EtOH, T. A., 24h, 99%.

Deux voies de synthèse ont été utilisées pour la préparation du tri-hétérocycle 1,3-bis(pyridin-2-yl) pyrazole **59** (Schéma 59). La voie A (couplage par un métal) mettant en jeu 1 équivalent de CuI, 2,4 équivalents K₂CO₃, 1,2 équivalent de *trans*-1,2-cyclohexanediamine dans le dioxane permet d'obtenir après purification sur gel de silice le produit attendu avec un rendement de 30%. Ce rendement ne permettant pas d'obtenir le tri-hétérocycle cible en quantité suffisante pour le but poursuivi, nous avons décidé d'exploiter une seconde voie (voie B, voie thermique), déjà décrite dans la littérature.⁽⁷⁴⁾ C'est ainsi que le chauffage des

Chapitre II

deux partenaires en absence de solvant pendant 3 jours a permis d'obtenir le dérivé **59** avec 83% de rendement.

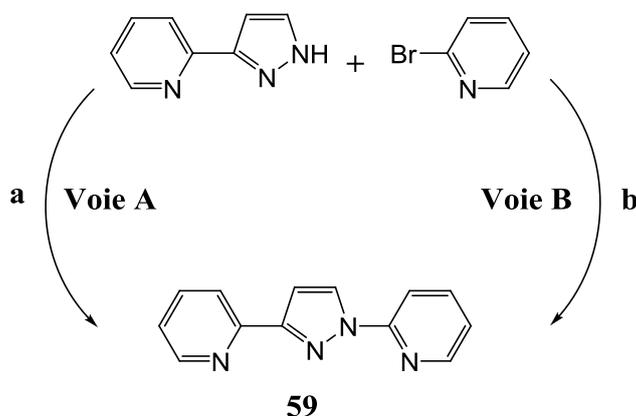


Schéma 59. Les deux voies de préparation du composé **59**. a) CuI, K₂CO₃, trans-cyclohexanediamine, dioxane, reflux, 6 jours, 30% ; b) 190°C, 70 h, 83%.

Fonctionnalisation des positions 6,6''

La fonctionnalisation en position 6 et 6'' du tri-hétérocycle **59** par deux groupements bromométhyle a été décrite par Latva et al.⁽⁷⁴⁾ (Schéma 60). Cette voie en 5 étapes fait intervenir la même démarche que celle utilisée pour la fonctionnalisation de la terpyridine (Schéma 44).

Deux commentaires peuvent être formulés au niveau de cette synthèse multiétapes :

1) Au cours de cette synthèse, l'étape limitante nous a paru être l'étape d'oxydation des deux noyaux pyridine (composé **60**). Cette réaction de *N*-oxydation par l'acide méta-chloroperbenzoïque nécessite un temps de réaction excessivement long (27 jours d'agitation à T.A., suivi par analyses CCM) et un gros excès d'agent d'oxydation afin d'éviter la formation exclusive de la forme mono-oxyde. Le composé dioxyde **60** a été obtenu avec 47% de rendement après plusieurs lavages (NaHCO₃, Na₂S₂O₃, et H₂O) afin d'éliminer l'excès de *m*-CPBA et après purification par chromatographie sur silice. On recueille également 16% de forme mono-oxyde. L'utilisation du monoperoxyphthalate de magnésium comme agent oxydant en place de *m*-CPBA pourrait permettre de diminuer le temps de réaction et d'augmenter le rendement.⁽⁷⁵⁾

Chapitre II

2) L'étape de bromation du diol **63** par le tribromure de phosphore telle que reportée dans la publication de Latva et al. (rendement indiqué de 40% après chromatographie colonne) ⁽⁷⁴⁾ ne nous a pas permis d'isoler avec un rendement satisfaisant le dérivé dibromé **64**, et ceci malgré l'utilisation de plusieurs conditions de réaction (chauffage, durée de réaction, excès de réactif). L'action de l'acide bromhydrique ⁽⁷⁶⁾ sur le diol **63** a par contre permis d'obtenir le dérivé attendu avec un rendement de 81 % après une étape de neutralisation au carbonate de sodium et une simple filtration sans avoir recours à une purification par chromatographie sur colonne.

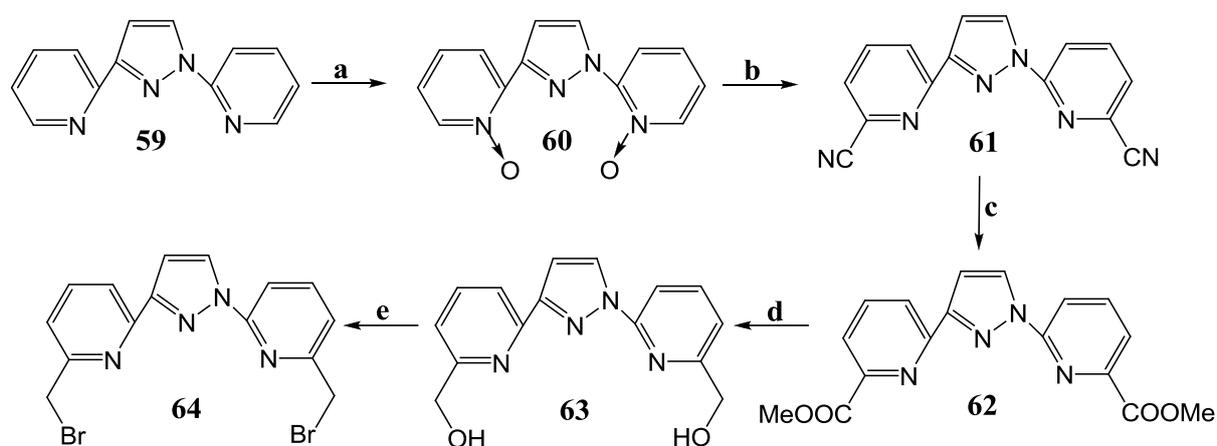


Schéma 60. Réactifs et conditions. a) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, T. A., 47%; b) Me₃SiCN, PhCOCl, CH₂Cl₂, T. A., 58%; c) H₂SO₄, CH₃COOH, reflux, SOCl₂, MeOH, reflux 92%; d) NaBH₄, EtOH, reflux, 68%; e) HBr 48% dans H₂O, reflux, 2h, 81%.

Le rendement global de cette synthèse multiétapes de la 1,3-bis(6-bromométhylpyridin-2-yl)pyrazole **64** est de 14 % à partir du 1,3-bis(pyridin-2-yl)pyrazole **59**.

On peut noter, en se référant aux travaux de Jaakkola et al. ⁽⁷⁵⁾, que l'utilisation de 2-acétyl-6-méthylpyridine au lieu de la 2-acétylpyridine (Schéma 57) et de 2-bromo-6-méthylpyridine (Schéma 59) permet d'obtenir l'analogue du dérivé **59** fonctionnalisé par deux groupements méthyle en position 6 et 6''. L'utilisation de la voie *N*-oxyde/réarrangement de Boekelheide permettrait ensuite de réduire le nombre d'étapes pour l'obtention du dérivé **64**, mais implique toujours l'étape d'oxydation des deux noyaux pyridine.

Chapitre II

Dans le schéma 61 est illustré le mécanisme d'introduction de groupements nitrile en positions 6 et 6'' du dérivé di-N-oxyde **60**, en présence de chlorure de benzoyle et de cyanure de triméthylsilyle, selon la réaction de Reissert-Henze⁽⁶³⁾.

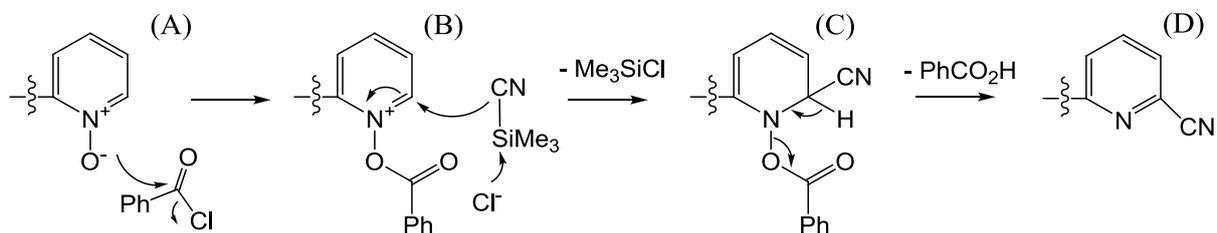


Schéma 61. Mécanisme de Reissert-Henze.

La première étape est la formation du cation benzopyridinium B (formé in situ avec PhCOCl). L'ion chlorure libéré attaque le groupement silyle avec libération de l'anion cyanure. La charge portée par l'atome d'azote du cycle B facilite l'attaque nucléophile par l'ion cyanure du carbone activé en α de l'azote (position ortho) pour donner l'intermédiaire C, qui subit ensuite un réarrangement intramoléculaire pour donner D.

Le dernier composé bromé **65** était disponible au laboratoire. Il peut être préparé selon Rodriguez-Ubis et al.⁽⁷⁷⁾ (Schéma 62).

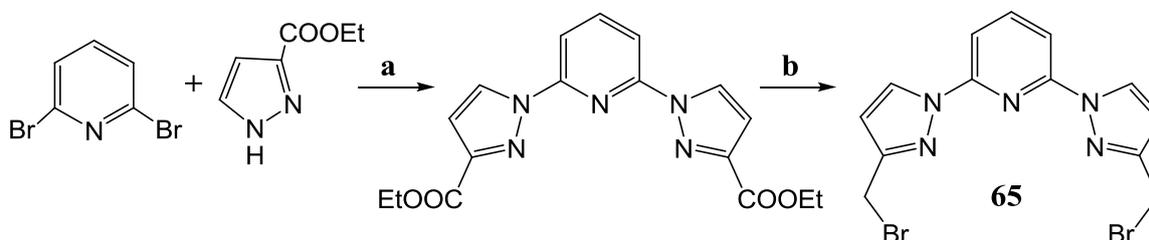


Schéma 62. Réactifs et conditions. a) Diglyme, K, 130°C, 55 % ; b) i) LiAlH₄, THF, T. A., 89 % ; ii) PBr₃, CH₃CN, 70 %.

VI.2. Réactions de Macrocyclisation

VI.2.1. Motif Pyridine-Pyrazole

Comme pour les macrocycles précédents le même protocole a été utilisé pour la préparation du macrocycle **66** (Schéma 63).

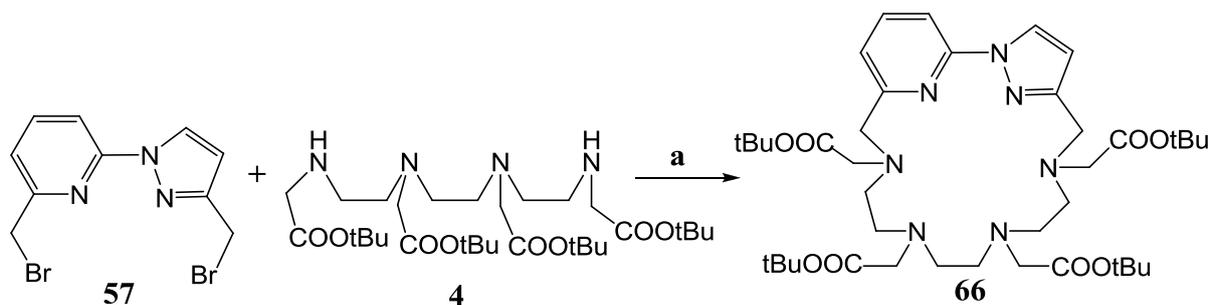


Schéma 63. Réactifs et conditions. a) CH_3CN , Na_2CO_3 , $[\text{réactifs}] = 2,7 \cdot 10^{-3} \text{M}$, reflux, 24h, 40 %.

Pour le macrocycle **66** et contrairement aux résultats obtenus dans le cas du macrocycle **37** à motif 2,2'-bipyridine ayant la même taille (18 chaînons), le spectre RMN ^1H du brut réactionnel met en évidence la présence de plusieurs espèces. Le lavage du brut réactionnel avec une solution d'EDTA et une purification sur colonne d'alumine, nous permet d'isoler le macrocycle **66** sous forme libre avec 40% de rendement (58% dans le cas du macrocycle **37**).

La présence de plusieurs espèces au niveau du milieu réactionnel semble indiquer que l'effet de matrice de l'ion sodium n'est pas optimum lors de cette réaction de macrocyclisation, contrairement à ce que l'on avait pu constater pour le macrocycle dérivé de la 2,2'-bipyridine. Ceci pourrait être relié à l'existence d'une interaction plus faible avec l'ion sodium d'un noyau pyrazole par rapport à un noyau pyridine. Il est en effet établi qu'un atome d'azote du type pyrazolyl est moins coordonnant qu'un atome d'azote pyridyl.⁽⁷⁸⁾ Ceci peut être illustré par les différences de pKa entre ces deux hétérocycles : 5,2 pour la pyridinium et 2,48 pour le pyrazolium.⁽⁷⁹⁾ L'intermédiaire réactionnel résultant d'une première réaction de substitution nucléophile serait alors moins contraint par le cation à adopter une conformation favorable à la macrocyclisation.

VI.2.2. Motifs PyPzPy et PzPyPz

Les réactions mises en jeu sont représentées dans le schéma 64.

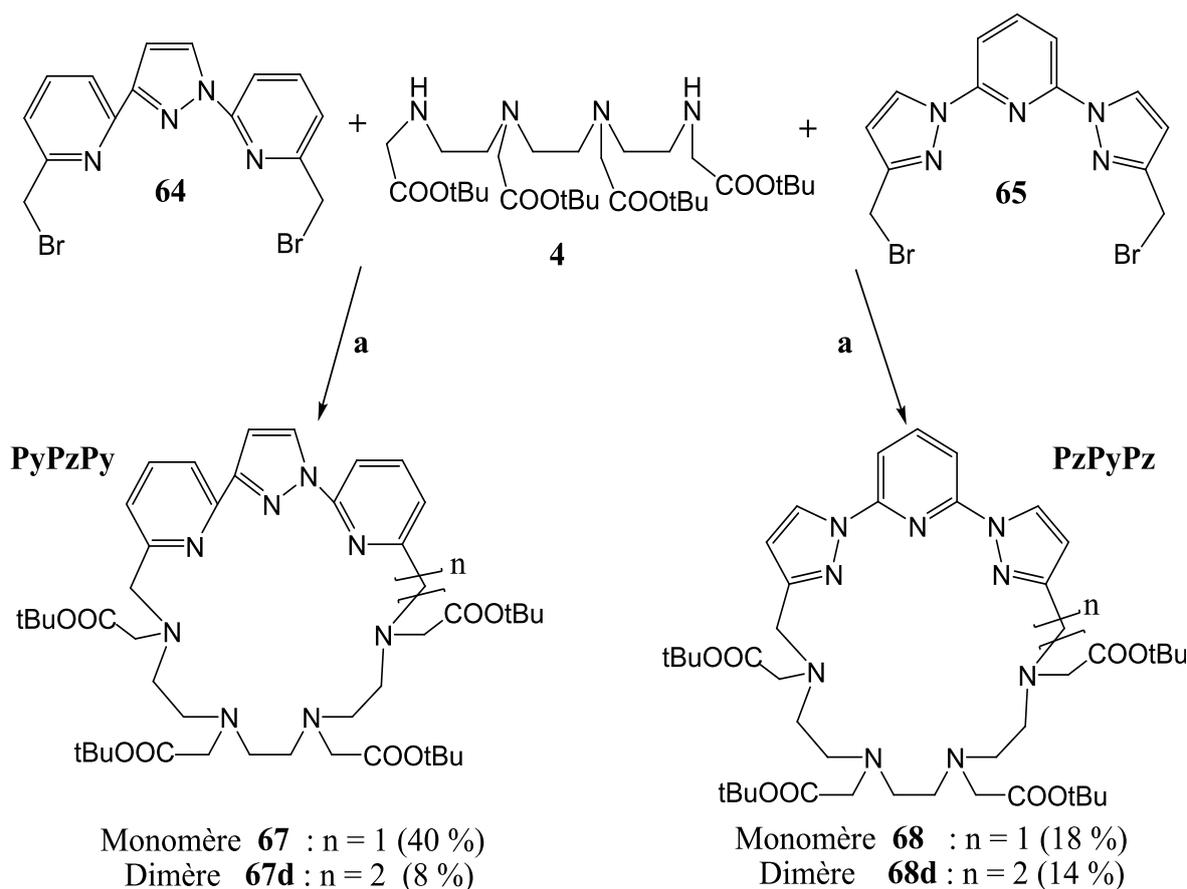


Schéma 64. Réactifs et conditions. a) CH_3CN , Na_2CO_3 , $[\text{réactifs}] = 2,7 \cdot 10^{-3} \text{M}$, reflux, 24h.

Comme dans le cas précédent, l'analyse RMN ^1H des bruts réactionnels issus de ces deux réactions met en évidence plusieurs espèces qui peuvent être des monomères sous forme libre, complexé, des dimères ou des formes polymères. Après lavage du brut réactionnel à l'EDTA et purification sur colonne d'alumine, les macrocycles à 21 chaîons et à motifs PyPzPy et PzPyPz ont été isolés avec des rendements de 40% (**67**) et 18% (**68**). A côté de ces formes monomères, nous avons également réussi à isoler les formes dimères correspondantes **67d** et **68d**, macrocycles à 42 chaîons.

A notre connaissance, les composés **67** et **67d** sont les premiers exemples de composés où un motif PyPzPy est intégré dans une structure macrocyclique. En ce qui concerne le motif PzPyPz, Rodriguez-Ubis et al. ont reporté en 2002 l'existence de formes monomère et dimère dans le cas d'un système macrocyclique dérivé de ce motif et du DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique).⁽⁸⁰⁾ Ces auteurs rapportent des rendements en forme monomère (dilactame à 24 chaîons) de 10% et de forme dimère (tétralactame à 48 chaîons) de 15-20%.

Chapitre II

L'enchaînement PyPzPy conduit à des résultats comparables à ceux observés avec le motif terpyridine (~ 40% de rendement en monomère), alors que l'enchaînement PzPyPz semble inhiber la formation du cycle monomère (18% de rendement). Le passage du motif PyPzPy (Monomère/Dimère (M/D) = 5) au motif PzPyPz (M/D = 1,3) s'accompagne d'une diminution de sélectivité en monomère d'un facteur 3,8.

En l'absence d'études de modélisation et de calculs quantiques permettant d'apprécier la "facilité" d'inter-conversion des conformations *trans-trans*, *cis-cis* et *cis-trans* que peuvent adopter ces trihétérocycles, il nous paraît raisonnable d'évoquer là aussi les plus faibles propriétés coordinantes du motif pyrazole par rapport à un motif pyridine pour essayer de rationaliser ces résultats. Dans le cas de la formation de ces cycles à 21 chaîons, la conformation du ligand dans l'intermédiaire réactionnel, formé en premier lieu, contrôle l'orientation de la réaction de macrocyclisation vers les composés 1+1 et 2+2.

D'un autre côté, il nous a paru instructif de connaître le comportement de ces deux trihétérocycles, PyPzPy et PzPyPz, dans la construction d'un macrocycle à 18 chaîons. Dans ce but, nous avons utilisé la triamine **69** et les conditions expérimentales habituelles (CH₃CN, Na₂CO₃, reflux 24 h). Ces réactions sont décrites dans le schéma 65 où nous avons également reporté les résultats obtenus précédemment dans l'équipe dans le cas du motif terpyridine.⁽¹¹⁾

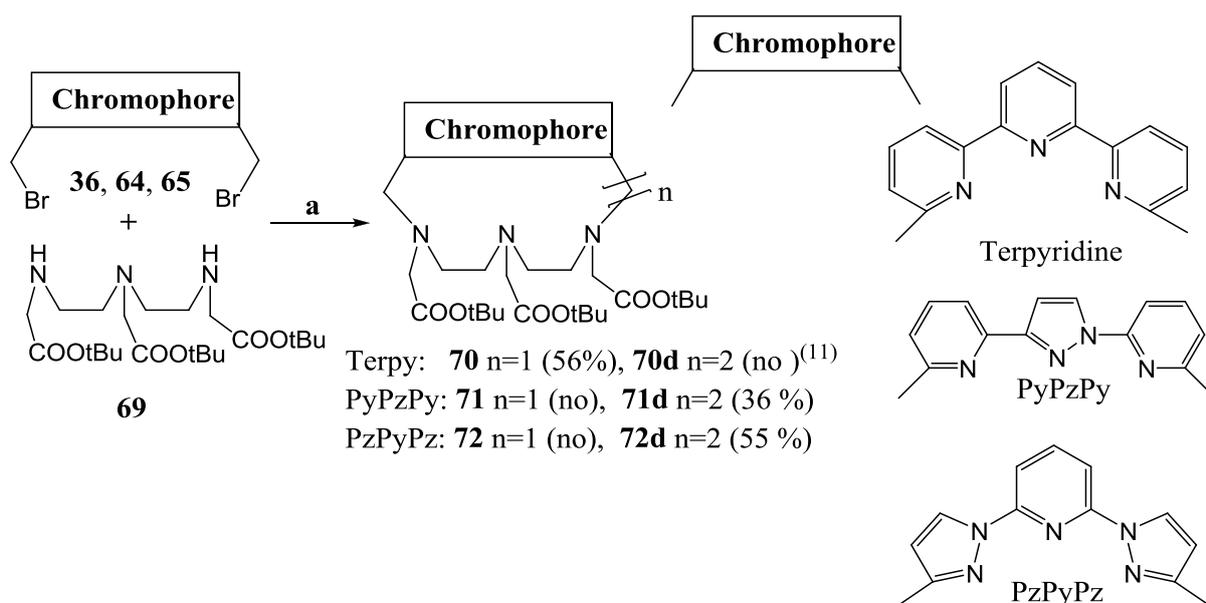


Schéma 65. Réactifs et conditions. a) CH₃CN, Na₂CO₃, [réactifs]= 2,7.10⁻³M, reflux, 24h. (no = non observé).

Chapitre II

Lors de ces deux réactions de macrocyclisation, seules les formes dimères (cycles à 36 chaînons) résultant d'une condensation du type 2:2 ont été isolées et ceci avec des rendements appréciables (36 et 55%). L'effet de matrice de l'ion sodium favorisant la formation du cycle monomère paraît inopérant dans le cas de ces deux réactions de macrocyclisation. Par rapport aux résultats précédents obtenus avec une tétraamine, il apparaîtrait que la triamine a une chaîne trop courte pour joindre les deux extrémités des deux trihétérocycles PyPzPy et PzPyPz, le cycle 2 + 2 est alors formé. Toutefois, le résultat décrit dans le cas du motif terpyridine où l'on observe très majoritairement la formation du cycle monomère (56%) démontre que d'autres facteurs tels que la nature de l'hétérocycle mis en jeu peuvent être prépondérants.

VI.3. Obtention des ligands L₆-L₈

L'hydrolyse acide des fonctions ester de tertiobutyle des macrocycles **66**, **67** et **68** par l'acide trifluoroacétique (Schéma 66), suivie d'une précipitation dans un mélange méthanol - éther éthylique nous a permis d'isoler les dérivés tétraacides correspondant L₆, L₇ et L₈ avec 97, 76 et 86 % de rendement, respectivement.

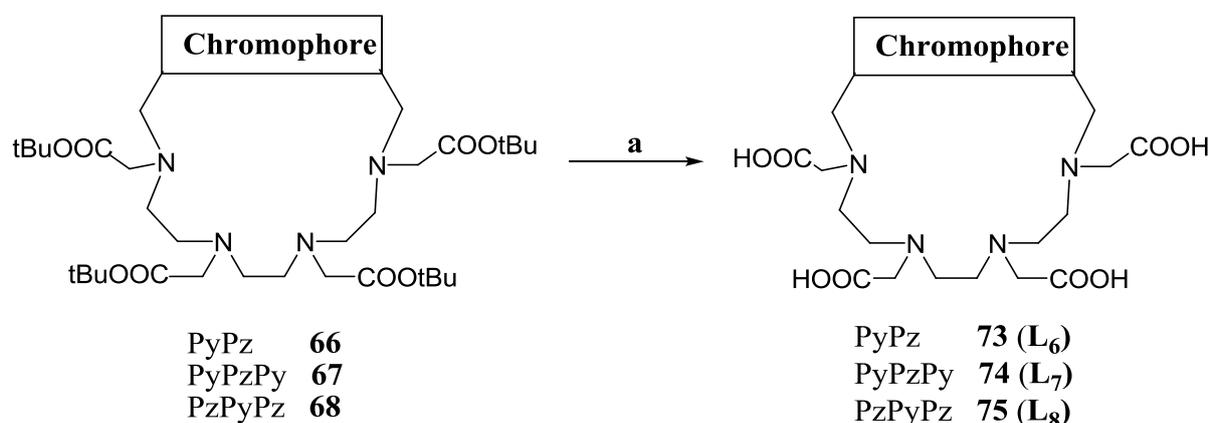


Schéma 66. Obtention des ligands L₆-L₈ par hydrolyse des fonctions ester de tertiobutyle. a) TFA/CH₂Cl₂, T. A., 24h, 97% (L₆), 76% (L₇), 86% (L₈).

Comme pour les autres ligands décrits dans ce mémoire, les ligands L₆-L₈ ont été caractérisés par RMN ¹H et ¹³C, par spectrométrie de masse haute résolution et leur pureté déterminée par analyse HPLC.

Chapitre II

A titre d'illustration, nous avons reporté dans les figures 8-10, les spectres RMN ^1H , ^{13}C et le profil HPLC du ligand L_7 . Dans ce ligand la présence d'un motif pyrazolyl relié à deux motifs pyridyl par des liaisons C-C ou C-N introduit une dissymétrie dans la structure macrocyclique.

Cette dissymétrie est révélée en RMN ^1H par les protons méthyléniques (i) des groupes pseudobenzyls (présence de deux singulets), (ii) des motifs acide acétique (présence de quatre singulets), (iii) du squelette tétraamine. De plus chaque proton du trihétérocycle se singularise par un signal présentant un déplacement chimique ou une multiplicité propre. Dans cette région des protons aromatiques, les signaux observés à champ le plus fort (7,15 ppm) et à champ le plus faible (8,45 ppm) caractérisent les deux protons du cycle pyrazolyl. En RMN ^{13}C , les 29 atomes de carbone de la molécule sont différenciés ; nous notons en effet la présence de 12 signaux CH_2 , 8 signaux CH et 9 signaux C_q .

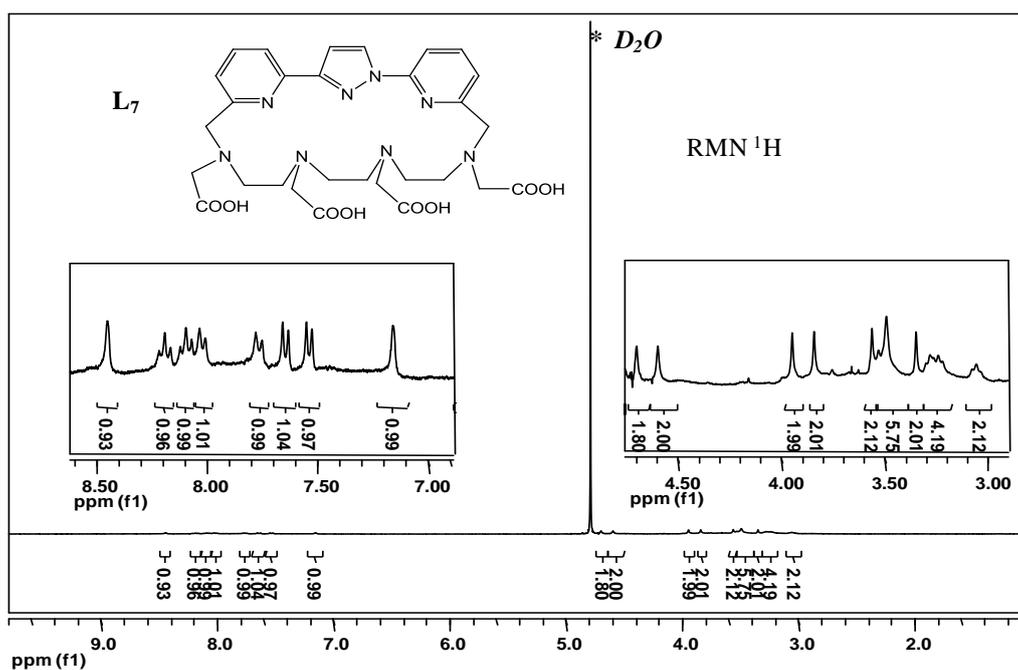


Figure 8. Spectre RMN ^1H (300 MHz, D_2O) du ligand L_7 .

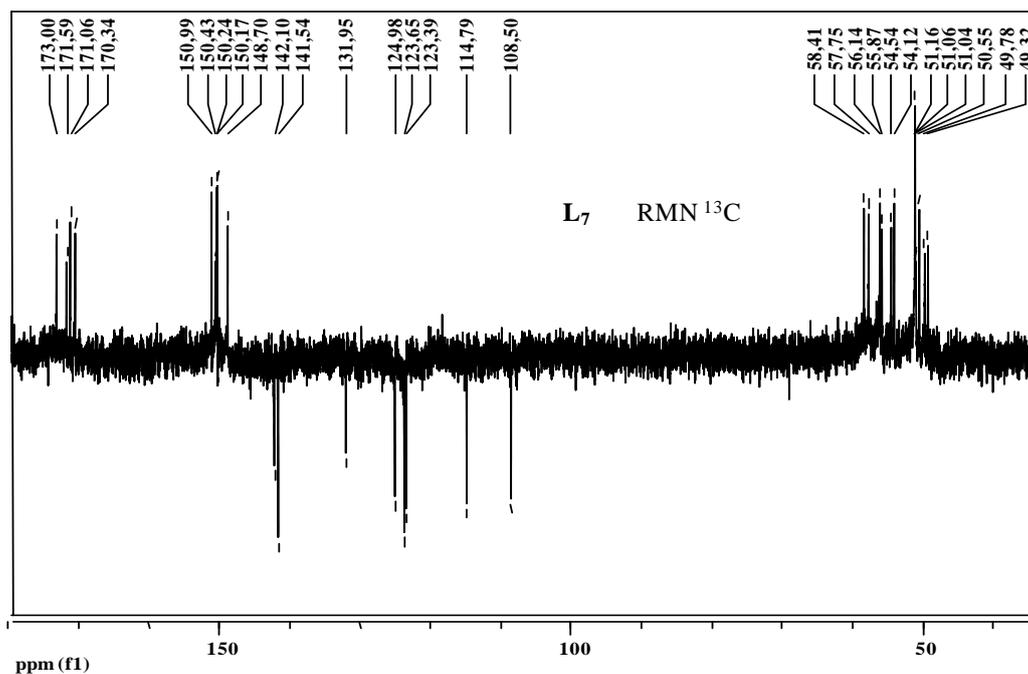


Figure 9. Spectre RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) du ligand L_7 .

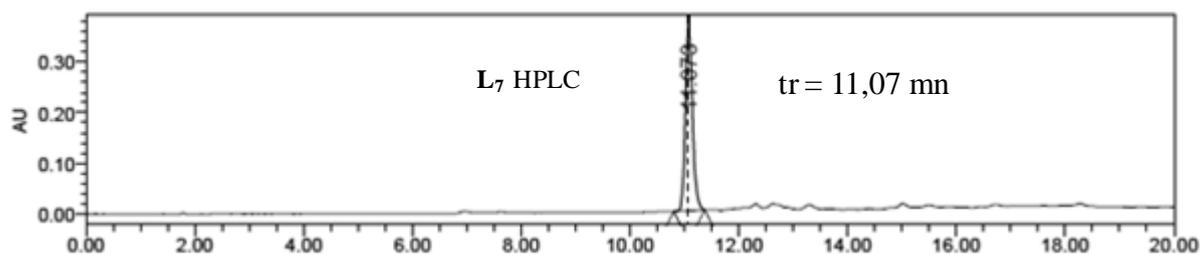


Figure 10. Chromatogramme HPLC en phase inverse du ligand L_7 . Conditions : colonne : C8 ; éluant : HCOONH_4 10 mM pH 4 / CH_3CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min.

VII Conclusion

Dans ce chapitre nos travaux ont porté sur la préparation d'une nouvelle famille de polyazamacrocycles de 15 à 21 chaîons. Cette famille de ligands est basée sur un squelette acide triéthylènetétraamine tétraacétique et incorpore un mono-, di- ou tri-hétérocycle intracyclique.

L'étape clé pour l'obtention de ces ligands se situe au niveau de la réaction de macrocyclisation. Après une étude bibliographique et afin de pouvoir réduire le nombre

Chapitre II

d'étapes postérieures à cette réaction de macrocyclisation, nous avons opté pour une stratégie de synthèse qui se démarque de celle classiquement utilisée (méthode de Richman-Atkins).

Dans le cadre de la stratégie utilisée, nous avons préparé un dérivé de la triéthylènetétraamine tétrasubstitué par des groupements acétate de tertio-butyle. Lors de cette synthèse nous avons mis à profit l'utilisation de précurseurs préalkylés, ce qui nous a permis d'obtenir ce synthon clé avec un rendement satisfaisant (75% à partir de produits commerciaux) et en limitant le nombre d'étapes de purification. Cette méthode a été validée par l'obtention de deux autres tétraamines tétrasubstitués par des fonctions ester.

Une part importante de nos travaux a d'autre part porté sur la fonctionnalisation par des groupements bromométhyles de divers hétérocycles. L'obtention de ces composés a nécessité la mise en œuvre de synthèses multi-étapes et a impliqué divers types de réactions : couplage aryl-aryl, réactions de Boekelheide, de Reissert-Henze, bromation radicalaire,

L'étape cruciale de macrocyclisation a été effectuée sans recourir à l'utilisation de techniques de haute dilution et a conduit à des rendements de cyclisation satisfaisants ($40\% < \text{Rdt} < 60\%$), à l'exception du macrocycle dérivé du motif bis(Pyrazolyl)pyridine (18%). Dans le cas des cycles à 15 et 18 chaînons, nous avons pu établir sans ambiguïté l'intervention d'un effet de matrice généré par l'ion sodium. En ce qui concerne les réactions de macrocyclisation mettant en jeu un tri-hétérocycle, l'obtention avec de bons rendements de macrocycles à 18 ou 21 chaînons paraît fortement tributaire de la nature de l'hétérocycle.

Nous avons donc réussi la synthèse de 8 ligands macrocycliques intégrant dans leur structure divers types de chromophores en vue de la complexation et de la photosensibilisation d'ions Ln(III). Chacun de ces ligands présente au moins 9 sites de coordination. Le chapitre suivant va être consacré à la détermination des propriétés photophysiques en milieu aqueux des complexes Eu(III) et Tb(III) correspondants.

VIII Bibliographie

- (1) Bradshaw, J. S.; Krakowiak, K. E.; Izatt, R. M. *Aza-crown macrocycles*, J. Wiley & Sons, New-York **1993**.
- (2) Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268-2270.
- (3) Iwata, M.; Kuzuhara, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 198-210.
- (4) Stetter, H.; Frank, W.; Mertens, R. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 767-772.
- (5) Newkome, G. R.; Pappalardo, S.; Gupta, V. K.; Fronczek, F. R. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4848-4851.
- (6) Aime, S.; Botta, M.; Crich, S. G.; Giovenzana, G. B.; Jommi, G.; Pagliarin, R.; Sisti, M. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 2992-3000.
- (7) Aime, S.; Botta, M.; Frullano, L.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Riccardi Sirtori, F.; Sisti, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4017-4024.
- (8) Aime, S.; Gianolio, E.; Corpillo, D.; Cavallotti, C.; Palmisano, G.; Sisti, M.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 615-632.
- (9) Nasso, I.; Galaup, C.; Havas, F.; Tisnès, P.; Picard, C.; Laurent, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8293-8305.
- (10) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoletti, P.; Valtancoli, B. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 393-399.
- (11) Galaup, C.; Couchet, J.-M.; Bedel, S.; Tisnès, P.; Picard, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2274-2284.
- (12) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Berni, E.; Bianchi, A.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Valtancoli, B.; Lodeiro, C.; Lima, J. C.; Pina, F.; Bernardo, M. A. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 5134-5146.
- (13) Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373-6374.
- (14) Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C.-K.; Hidai, Y.; Kan, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5831-5834.
- (15) Wang, T.; An, H.; Vickers, T. A.; Bharadwaj, R.; Dan Cook, P. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7955-7976.

Chapitre II

- (16) An, H.; Cummins, L. L.; Griffey, R. H.; Bharadwaj, R.; Haly, B. D.; Fraser, A. S.; Wilson-Lingardo, L.; Risen, L. M.; Wyatt, J. R.; Cook, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3696-3708.
- (17) Siaugue, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Favre-Réguillon, A.; Madic, C.; Foos, J.; Guy, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7443-7446.
- (18) Hovland, R.; Glogard, C.; Aasen, A. J.; Klaveness, J. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 644-647.
- (19) An, H.; Dan Cook, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7233-7236.
- (20) Siauge, J.-M.; Segat-Dioury, F.; Sylvestre, I.; Favre-Réguillon, A.; Foos, J.; Madic, C.; Guy, A. *Tetrahedron.* **2001**, *57*, 4713-4718.
- (21) Hoyer, R. C.; Richman, J. E.; Dantas, G. A.; Lightbourne, M. F.; Shinneman, L. S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2722-2725.
- (22) Chellini, A.; Pagliarin, R.; Giovenzana, G. B.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 793-800.
- (23) Balakrishnan, K. P.; Omar, H. A. A.; Moore, P.; Alcock, N. W.; Pike, G. A. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, 2965-2969.
- (24) Costa, J.; Delgado, R. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 5257-5265.
- (25) Autzen, S.; Korth, H.-G.; de Groot, H.; Sustmann, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3119-3125.
- (26) Autzen, S.; Korth, H.-G.; Boese, R.; de Groot, H.; Sustmann, R. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 1401-1410.
- (27) Herrera, A. M.; Staples, R. J.; Kryatov, S. V.; Nazarenko, A. Y.; Rybak-Akimova, E. V. *Dalton Trans.* **2003**, 846-856.
- (28) Krakowiak, K. E.; Bradshaw, J. S.; Jiang, W.; Dalley, N. K.; Wu, G.; Izatt, R. M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2675-2680.
- (29) Keypour, H.; Goudarziafshar, H.; Brisdon, A. K.; Pritchard, R. G.; Rezaeivala, M. *Inorg. Chim. Acta* **2008**, *361*, 1415-1420.
- (30) Keypour, H.; Dehghani-Firouzabadi, A. A.; Khavasi, H. R. *Polyhedron* **2009**, *28*, 1546-1550.
- (31) Krakowiak, K. *Pol. J. Chem.* **1986**, *60*, 277-281.

Chapitre II

- (32) Dierck, I.; Herman, G. G.; Goeminne, A. M.; Van der Kelen, G. P. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1993**, *102*, 63-66.
- (33) Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651.
- (34) Hovinen, J.; Sillanpää, R. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4387-4389.
- (35) Lin, Y.; Favre-Réguillon, A.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3463-3466.
- (36) Aime, S.; Botta, M.; Frullano, L.; Geninatti Crich, S.; Giovenzana, G. B.; Pagliarin, R.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1253-1260.
- (37) Dioury, F.; Sambou, S.; Guéné, E.; Sabatou, M.; Ferroud, C.; Guy, A.; Port, M. *tetrahedron* **2007**, *63*, 204-214.
- (38) Ferroud, C.; Borderies, H.; Lasri, E.; Guy, A.; Port, M. *tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5972-5975.
- (39) M. P. Durrieu, Mémoire du DEA Chimie des Biomolécules et applications, Université Paul Sabatier, 2004.
- (40) Pickersgill, F. I.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4048-4057.
- (41) Davies, J. S.; Al-Jamri, L. *J. Peptide Sci.* **2002**, *8*, 663-670.
- (42) Burdinski, D.; Lub, J.; Pikkemaat, J. A.; Moreno Jalón, D.; Sophie Martial; Del Pozo Ochoa, C. *Dalton Trans.* **2008**, 4138-4151.
- (43) Nasso Isabelle, Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse 2006.
- (44) Couchet, J. M.; Galaup, C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4869-4872.
- (45) Aime, S.; Cavallotti, C.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Palmisano, G.; Sisti, M. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1201-1204.
- (46) Maruyama, T.; Miho, T. Jpn Patent 63,128,017, 1988; *Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 191057.
- (47) Gibby, W. A. U.S. Patent 4,822,594, 1989; *Chem. Abstr.* **1989**, *111*, 228130.
- (48) Nakabayashi, M.; Okabe, K.; Mishima, T.; Mano, H.; Haraya, K. Eur. Patent 638,353, 1995; *Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 191535.

Chapitre II

- (49) Mori, T.; Ogawa, M.; Amano, Y. Eur. Patent 708,335, 1996; *Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 29567.
- (50) Denat, F.; Tripier, R.; Boschetti, F.; Espinosa, E.; Guillard, R. *Arkivoc* **2006**, 212-233.
- (51) Pitt, C. G.; Bao, Y.; Thompson, J.; Wani, M. C.; Rosenkrantz, H.; Metterville, J. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1231-1237.
- (52) Bodanszky, M.; Bodanszky, A. "The practice of peptide synthesis", Springer-Verlag, Berlin 1984.
- (53) Burdinski, D.; Pikkemaat, J. A.; Lub, J.; de Peinder, P.; Nieto Garrido, L.; Weyhermuller, T. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 6692-6712.
- (54) Chong, H.-S.; Ma, X.; Lee, H.; Bui, P.; Song, H. A.; Birch, N. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2208-2215.
- (55) Grote, C. W.; Jin Kim, D.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6987-6997.
- (56) Scheytza, H.; Rademacher, O.; Reibig, H. U. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *9*, 2373-2381.
- (57) Tiecco, M.; Testaferri, L.; Tingoli, M.; Chianelli, D.; Montanucci, M. *Synthesis* **1984**, 736-738.
- (58) Regnouf de Vains, J.-B.; Papet, A. L.; Marsura, A. *J. Heterocyclic Chem.* **1994**, *31*, 1069-1077.
- (59) Traynelis, V. J.; Martello, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6590-6593.
- (60) Rodriguez-Ubis, J. C.; Alpha, B.; Plancherel, D.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 2264-2269.
- (61) Li, J. J. "Name Reactions in Heterocyclic Chemistry", J Wiley & Sons 2005, p 340.
- (62) Jameson, D. L.; Guise, L. E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *18*, 1999-2002.
- (63) Fife, W. K. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1375-1377.
- (64) Heller, M.; Schubert, U.S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8269-8272.
- (65) Katritzky, A. R.; Lagowski, J. M. dans "Principes de la chimie des composés hétérocycliques", Gauthier-Villars, Paris, 1968, chapitre 2, pp 12-80.
- (66) Feely, W. E.; Beavers, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4004-4007.
- (67) Achmatowicz, M.; Hegedus, L. S.; David S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7661-7666.
- (68) Charier, S.; Ruel, O.; Baudin, J.-B.; Alcor, D.; Allemand, J.-F.; Meglio, A.; Jullien, L.; Valeur, B. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1097-1113.

Chapitre II

- (69) Walling, C.; Rieger, A. L.; Tanner, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3129–3134.
- (70) Liu, P.; Chen, Y.; Deng, J.; Tu, Y. *Synthesis* **2001**, 2078-2080.
- (71) Havas, F.; Danel, M.; Galaup, C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 999-1002.
- (72) Havas, F.; Leygue, N.; Danel, M.; Mestre, B.; Galaup, C.; Picard, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7673-7686.
- (73) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodriguez-Blasco, M.A.; Pereira Vila-Nueva, S.; Garayalde, D.; Rodriguez-Ubis, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7801-7805.
- (74) Latva, M.; Takalo, H.; Mikkala, V.-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J. C.; Kankare, J. *J. Lum.* **1997**, *75*, 149-169.
- (75) Jaakkola, L.; Peuralahti, J.; Hakala, H.; Kunttu, J.; Tallqvist, P.; Mikkala, V.-M.; Ylikoski, A.; Hovinen, J. *Bioconjugate, Chem.* **2005**, *16*, 700-709.
- (76) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1981**, *18*, 599-601.
- (77) Remuinan, M. J.; Roman, H.; Alonso, M.-T.; Rodriguez-Ubis, J. C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 1099-1102.
- (78) Halcrow, M.A. *Coord. Chem. Rev.*, **2005**, *249*, 2880-2908.
- (79) Lopez, V.; Catalan J.; M^A Claramunt, R.; Lopez C.; Cayon E.; Elguero J. *Can. J. Chem.*, **1990**, *68*, 958-959.
- (80) Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodriguez-Ubis, J.-C. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 213-216.

**Chapitre III : Etude des propriétés
photophysiques des complexes Eu^{3+} , Tb^{3+}
dérivés des ligands macrocycliques à motif
acide triéthylène tétraamine tétraacétique**

Chapitre III

Dans ce troisième chapitre, nous allons nous intéresser aux propriétés photophysiques des complexes d'euprium (III) et de terbium (III) issus de la série de ligands macrocycliques **L**₁-**L**₃ et **L**₅-**L**₈ à motifs acide triéthylène tétraamine tétraacétique rassemblés dans la figure 1.

Nous examinerons dans une première partie les propriétés d'absorption et d'émission de luminescence de la série de complexes à motifs mono, bi ou terpyridine **L**₁-**L**₃ et **L**₅ ainsi que leurs stabilités dans différents milieux d'intérêt ou en présence de ligand compétiteur. Une comparaison avec leurs homologues macrocycliques à motif acide diéthylène triamine triacétique précédemment obtenus au laboratoire permettra de clore cette étude.

Dans une seconde partie, nous présenterons les résultats photophysiques obtenus avec la série de complexes à motifs pyridine-pyrazole **L**₆-**L**₈ avant de terminer par une application de l'un d'entre eux en tant que donneur pour la technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence résolue dans le temps.

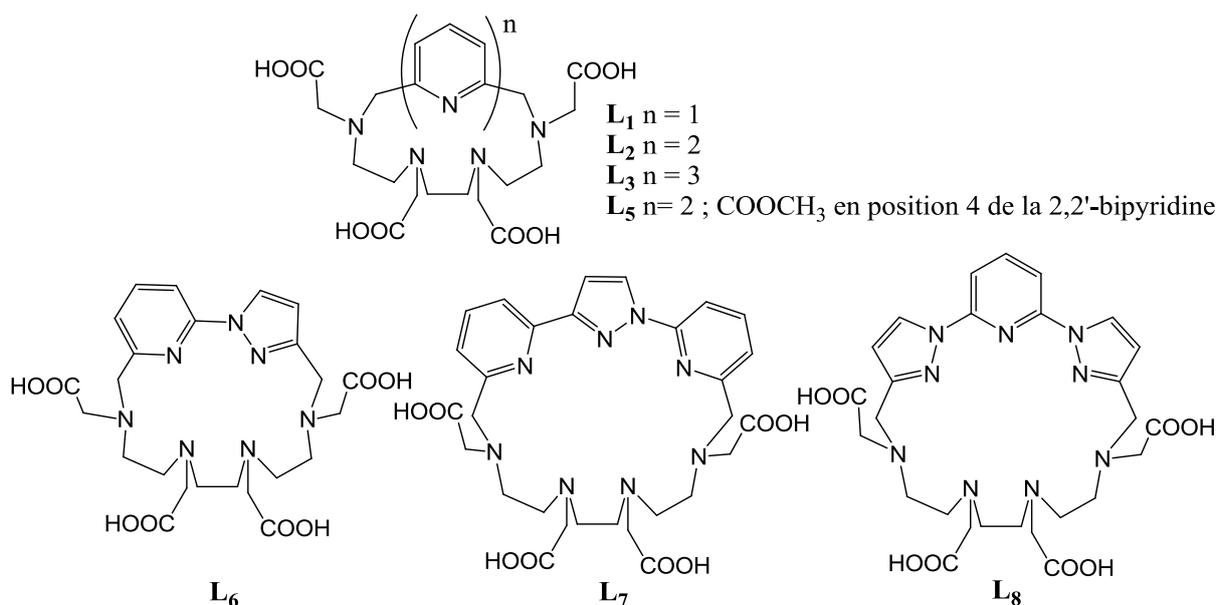


Figure 1. Structure des ligands **L**₁-**L**₃ et **L**₅-**L**₈.

I Macrocyclus incorporant un chromophore pyridine (**L**₁), bipyridine (**L**₂, **L**₅), terpyridine (**L**₃)

Les complexes d'ions Eu^{3+} et Tb^{3+} associés aux ligands **L**₁-**L**₃, **L**₅ n'ont pas été isolés mais été préparés *in situ*, c'est-à-dire en mélangeant des solutions équimolaires de ligand et de sels de lanthanide ($\text{LnCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) en solution aqueuse de manière à obtenir des solutions de

Chapitre III

concentrations de l'ordre de 10^{-3} M pour leurs caractérisations par spectrométrie de masse et HPLC analytique. Les propriétés d'absorption des ligands et des complexes ont été étudiées par dilution des solutions de complexes dans un tampon Tris (50 mM, pH 7,4) à une concentration de l'ordre de 10^{-4} M afin de respecter la loi de Beer-Lambert. Les propriétés d'émission de luminescence des complexes ont été obtenues par dilution des solutions de complexes dans un tampon Tris (50 mM, pH 7,4) à une concentration de l'ordre de 10^{-5} - 10^{-6} M afin d'analyser des solutions de D.O inférieure à 0,1.

L'analyse par spectrométrie de masse Electrospray en mode négatif a été réalisée sur les complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} issus des ligands L_1 , L_2 et L_3 (tableau 1). Les spectres de masse obtenus montrent clairement la formation d'un complexe mononucléaire du type $(\text{L} - 3\text{H})\text{Ln}$ où trois des fonctions acide carboxylique sont déprotonées et complexées à l'ion Ln^{3+} . Pour chacun d'entre eux, on note l'absence de signaux correspondants au ligand libre. Les profils isotopiques expérimentaux des espèces monochargées observées $[(\text{L} - 3\text{H})\text{Ln} - \text{H}]^-$ sont en parfaite adéquation avec les profils isotopiques théoriques. Pour les complexes Eu^{3+} , la présence de l'ion est aisément établie en raison de l'existence de deux isotopes ^{151}Eu et ^{153}Eu d'abondance relative 47,82 % et 52,18 % respectivement.

Complexes	m/z observés	m/z théoriques	Attributions
L₁.Eu	630,1	630,1	$[(\text{L}_1 - 3\text{H})\text{Eu} - \text{H}]^-$
L₁.Tb	636,1	636,1	$[(\text{L}_1 - 3\text{H})\text{Tb} - \text{H}]^-$
L₂.Eu	707,1	707,1	$[(\text{L}_2 - 3\text{H})\text{Eu} - \text{H}]^-$
L₂.Tb	713,1	713,1	$[(\text{L}_2 - 3\text{H})\text{Tb} - \text{H}]^-$
L₃.Eu	784,3	784,2	$[(\text{L}_3 - 3\text{H})\text{Eu} - \text{H}]^-$
L₃.Tb	790,3	790,2	$[(\text{L}_3 - 3\text{H})\text{Tb} - \text{H}]^-$

Tableau 1. Attributions des signaux observés par spectrométrie de masse Electrospray en mode négatif. (Pour les complexes d'euporium(III), le signal indiqué correspond à l'isotope ^{153}Eu).

A titre d'exemple, nous indiquons dans la figure 2 les spectres de masse obtenus pour les complexes **L₃.Eu** et **L₃.Tb**.

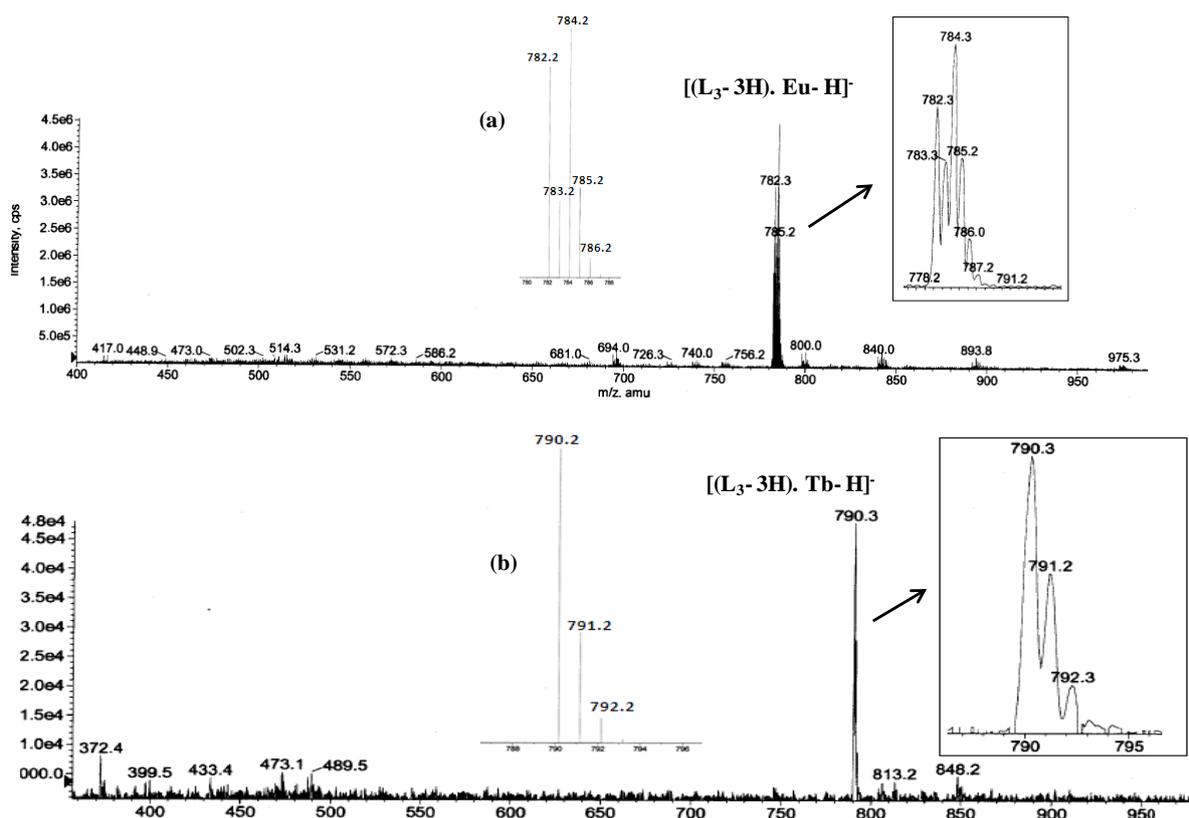


Figure 2. Spectres de masse Electrospray en mode négatif des complexes $L_3.Eu$ et $L_3.Tb$. Profils isotopiques théoriques et calculés pour $[(L - 3H)Ln - H]^-$.

Par HPLC analytique en phase inverse, des conditions similaires de gradient et de colonne (gradient d'éluion : tampon $HCOONH_4$ 10 mM pH 4 / CH_3CN ; colonne C8) ont été appliquées pour caractériser d'une part les ligands L_2 et L_3 et d'autre part leurs complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} (tableau 2). Dans ces mêmes conditions, le ligand L_1 et ses complexes correspondants ne sont pas assez retenus et un autre type de colonne, de type C18, a donc été utilisé.

Ces analyses permettent tout d'abord d'attester d'une bonne pureté analytique (à la longueur d'onde de l'analyse) pour les trois ligands $L_1 - L_3$. On observe que le ligand L_3 , le plus hydrophobe (trois noyaux pyridines), est comme attendu le plus retenu sur phase inverse. Pour les complexes, concernant ceux issus des ligands L_1 et L_2 , l'analyse permet de les caractériser avec des temps de rétention bien distincts de leur ligand ($\Delta t_r \geq 1$ min.) et avec une bonne pureté analytique (Figure 3). Pour les trois séries de composés étudiés, on constate que les complexes de l'ion Eu^{3+} ou de l'ion Tb^{3+} présentent des temps de rétention comparables pour un même ligand.

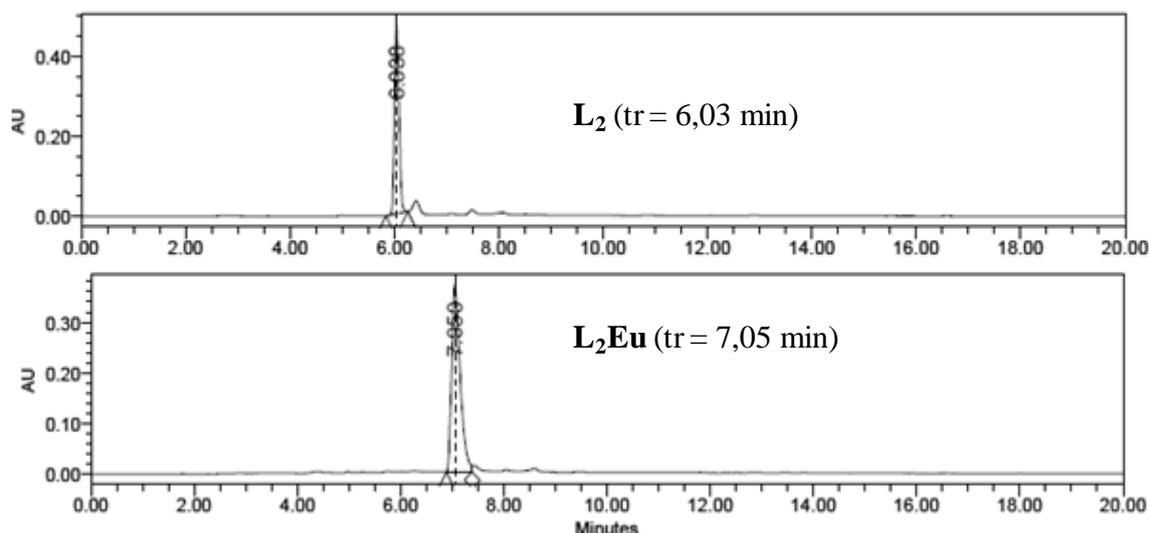


Figure 3. Chromatogrammes HPLC en phase inverse du ligand **L₂** et de son complexe d'euporium **L₂.Eu**. Conditions : colonne : C8 ; éluant : HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min.

La forte similitude des deux ions (charge 3+, Δ (rayons ioniques) = 0,025 Å pour un nombre de coordination de 9) ne permet pas en effet de différencier leurs complexes par HPLC. Dans les conditions de l'analyse, seuls les complexes **L₃.Eu** et **L₃.Tb** présentent moins d'affinité chromatographique que leur ligand et présentent dans ces conditions de pH, plutôt acides, une certaine labilité. Nous reviendrons sur cette différence de stabilité dans le paragraphe I.3 où des études de stabilité ont été réalisées sur les complexes d'euporium issus de cette série de ligands.

Ligands / Complexes	Temps de rétention en minute ^[1] (PIC %) ^[3]
L₁	6,83 ^[2] (93 % à 260 nm)
L₁.Eu	8,77 ^[2] (98 % à 260 nm)
L₁.Tb	8,73 ^[2] (97 % à 260 nm)
L₂	6,03 (90 % à 315 nm)
L₂.Eu	7,05 (97 % à 315 nm)
L₂.Tb	7,17 (96 % à 315 nm)
L₃	11,68 (86 % à 315 nm)
L₃.Eu	8,52 (50%) ; 11,68 (50%) à 315 nm
L₃.Tb	8,38 (50%) ; 11,68 (50%) à 315 nm

Tableau 2. Analyses HPLC des ligands et de leurs complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ correspondants. Gradient: Tampon HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min. ^[1] Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm. ^[2] Colonne : Luna Phenomenex C18(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm. ^[3] PIC = pourcentage de l'espèce d'intérêt à la longueur d'onde du suivi analytique.

Chapitre III

I.1. Propriétés d'absorption des ligands et de leurs complexes avec Eu^{3+} et Tb^{3+}

Les caractéristiques d'absorption UV des ligands et de leurs complexes déterminées dans un tampon Tris 50 mM, pH 7,4 à 20 °C sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Ligand	Ln^{3+}	λ nm (ϵ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
L_1	-	264 (4300)
	Eu^{3+}	266 (4900)
	Tb^{3+}	266 (4900)
L_2	-	240 (7820); 304 (8950) ; 315 ^{ép} (3340)
	Eu^{3+}	243 (7820); 305 (8950) ; 318 ^{ép} (3450)
	Tb^{3+}	243 (6100); 305 (7820) ; 318 ^{ép} (4465)
L_3	-	230 (14900) ; 287 (10700); 302 (9850)
	Eu^{3+}	232 (14800); 284 (9200); 292 (9500); 320 (7900)
	Tb^{3+}	232 (12200); 284 (8000); 292 (8000); 320 (6800)
L_5	-	243 ^{ép} (9500) ; 315 (8050)
	Eu^{3+}	243 ^{ép} (10200) ; 318 (8500)
	Tb^{3+}	243 ^{ép} (10200) ; 318 (8800)

Tableau 3. Caractéristiques d'absorption des ligands L_1 , L_2 , L_3 et L_5 et de leurs complexes dans un tampon Tris (50 mM pH 7,4).

Au niveau des ligands libres, on constate que l'augmentation de la conjugaison lors du passage d'un motif pyridine à un motif bipyridine ou terpyridine entraîne un déplacement du λ_{max} (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$) ainsi qu'une augmentation du coefficient d'extinction molaire. L'introduction d'une fonction ester de méthyle en position 4 de la 2,2'-bipyridine (ligand L_5) se traduit également par un déplacement bathochrome du λ_{max} ; il est de 11 nm par rapport au λ_{max} du ligand L_2 non fonctionnalisé. Ce déplacement bathochrome traduit l'augmentation de conjugaison au sein du chromophore bipyridine consécutive à l'introduction d'un groupement électroattracteur.

Le ligand L_2 présente deux bandes d'absorption principales à 240 et 304 nm ainsi qu'un épaulement à 315 nm; comparées à celles de la 2,2'-bipyridine libre (232 et 279 nm) en solution aqueuse qui adopte une conformation *trans* et à celles de la 2,2'-bipyridine monoprotonée (241 et 301 nm) dans laquelle les cycles pyridine sont en position *cis*⁽¹⁾, ces

résultats suggèrent que le chromophore bipyridine du ligand **L**₂ adopte une conformation plutôt *cis* dans sa forme libre.

Le ligand **L**₃ présente trois bandes d'absorption à 230, 287 et 302 nm. Ces données UV sont plutôt indicatives d'une conformation twistée ou d'un équilibre entre les formes *trans-trans* et *cis-trans* du tris-hétérocycle. En effet, le spectre d'absorption de la 2,2':6',2''-terpyridine libre en solution aqueuse présente des bandes d'absorption situées à 227 et 290 nm pour une conformation *trans-trans* qui sont déplacées à 232, 279 et 320 nm pour une conformation *cis-trans* monoprotonée ⁽¹⁾.

Au niveau des complexes, on observe des déplacements bathochromes plus ou moins importants des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ observées. Ces déplacements sont de quelques nanomètres dans le cas des complexes issus des ligands **L**₁, **L**₂ et **L**₅ où la complexation induit essentiellement une augmentation de la polarisation des atomes d'azote hétérocyclique des chromophores pyridine et bipyridine sans modification de conformation. Pour les complexes **L**₃.**Eu** et **L**₃.**Tb**, les changements par rapport au ligand libre sont plus importants. Ainsi que l'illustre la figure 4, la complexation induit un déplacement de 18 nm pour la bande d'absorption de plus faible énergie. Ce déplacement vers le rouge n'est toutefois pas en accord avec une conformation *cis-cis* attendue que le tris-hétérocycle serait contraint de prendre pour une complexation optimale de l'ion Ln^{3+} ; les données spectroscopiques des complexes sont en effet plus proches de celles observées pour la 2,2':6',2''-terpyridine en conformation *cis-trans* monoprotonée ⁽¹⁾.

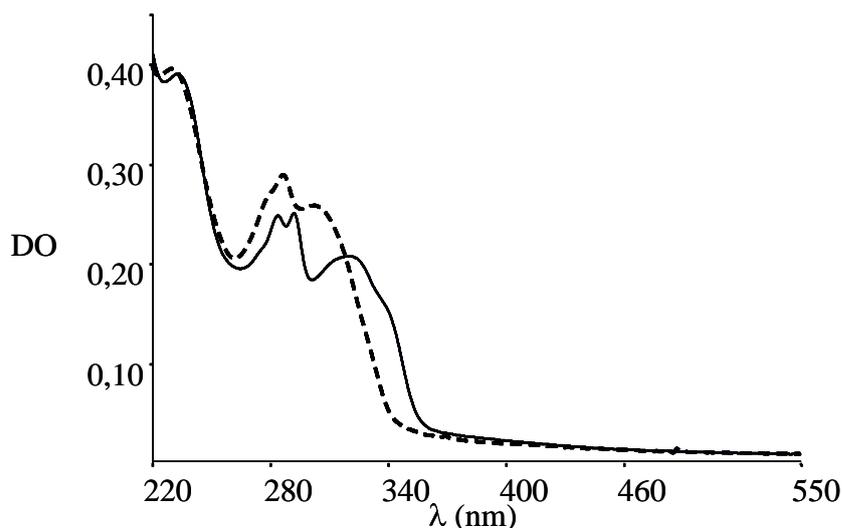


Figure 4. Spectres d'absorption du ligand **L**₃ (---) et du complexe **L**₃.**Eu** (—) en tampon Tris (50 mM pH 7,4) à une concentration de $2,6 \cdot 10^{-5}$ M.

En conclusion, ces données UV permettent de mettre en évidence une interaction entre les ions Eu^{3+} ou Tb^{3+} et le motif chromophore présent dans chacun des ligands macrocycliques étudiés, ce qui devrait permettre d'assurer un transfert d'énergie plus ou moins efficace du ligand vers le métal et conduire à la luminescence de l'ion lanthanide. C'est ce que nous allons examiner dans le détail dans les paragraphes suivants.

I.2. Propriétés de luminescence des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+}

Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre, la luminescence des complexes de lanthanide est un processus en quatre étapes : Absorption du ligand ($^1\text{S}_0 \rightarrow ^1\text{S}_1$), Croisement inter-système ($^1\text{S}_1 \rightarrow ^3\text{S}_1$), Transfert d'énergie (Ligand \rightarrow Métal) et Luminescence de l'ion lanthanide (Figure 5).

Nous venons d'examiner les propriétés d'absorption des complexes Eu^{3+} , Tb^{3+} obtenus avec cette série de ligands L_1 - L_3 et L_5 . Nous allons maintenant caractériser ces complexes au niveau de leurs propriétés luminescentes par l'enregistrement des spectres d'émission et d'excitation de luminescence. A partir des mesures de durées de vie d'émission et de rendements quantiques de luminescence, nous discuterons aussi de l'efficacité des processus de transfert d'énergie et de désactivations radiatives et non radiatives impliqués dans ces complexes.

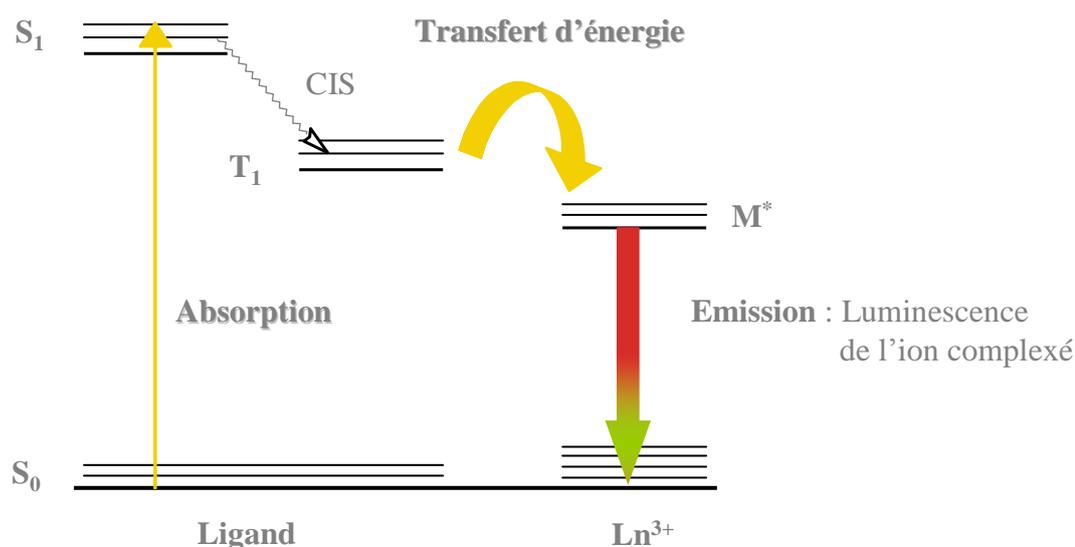


Figure 5. Processus en 4 étapes : luminescence d'un complexe de lanthanide.

I.2.1. Spectres d'émission de luminescence

Les spectres d'émission des complexes ont été obtenus par excitation au niveau de la bande d'absorption typique du chromophore c'est-à-dire vers 268, 310, 326 et 317 nm pour **L**₁, **L**₂, **L**₃ et **L**₅ respectivement. Ces spectres ont été réalisés « en mode phosphorescence » c'est-à-dire en appliquant un temps de délai, généralement de 0,1 ms, et un temps d'acquisition de l'ordre de 0,4 à 1 ms. Dans ces conditions, tout phénomène de fluorescence ou de diffusion (Rayleigh, Raman) pouvant se superposer aux spectres d'émission des complexes n'est pas observé du fait de leurs très courtes durées de vie (< μs) et du temps de délai appliqué (> ms). Les spectres d'émission des complexes sont ainsi caractérisés par la présence de raies fines propres aux ions, dans le domaine du visible, le rouge pour les complexes d'ion Eu³⁺ et le vert pour les complexes d'ion Tb³⁺.

Pour les complexes d'ion Eu³⁺, les spectres d'émission sont caractérisés par la présence des raies associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ ($j = 0 \rightarrow 6$) situées entre 580 et 840 nm; la raie la plus intense correspond à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ et les bandes associées aux transitions $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ ($j = 3, 5, 6$) sont d'intensités beaucoup plus faibles. Les intensités des principales transitions observées pour les complexes Eu³⁺ dérivés des ligands **L**₁-**L**₃ et **L**₅ sont rassemblées dans le tableau 4. A titre d'exemple, nous reportons dans la figure 6 les spectres d'émission obtenus pour les complexes **L**₁.**Eu**, **L**₂.**Eu** et **L**₃.**Eu**. A titre de comparaison, nous avons également représenté les spectres d'émission du sel EuCl₃ ainsi que du complexe **A.Eu** où **A** est un ligand polyaminocarboxylique pouvant mimer le motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique présent dans les ligands macrocycliques **L**₁-**L**₃, **L**₅ étudiés.

Les spectres d'émission des complexes d'ion Eu³⁺ ont la particularité d'être sensibles à une modification de l'environnement autour de l'ion ⁽²⁾. Les longueurs d'onde des différentes raies d'émission $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ ($j = 0 \rightarrow 6$) sont peu modifiées, mais des changements aux niveaux de l'allure et de l'intensité relative de certaines de ces raies peuvent être très importants. En effet, il est admis que la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ de part sa nature dipolaire électrique est une transition « hypersensible », c'est-à-dire que son intensité est variable selon la nature de l'environnement de l'ion. De même, mais de manière moindre, la structure et l'intensité de la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ dépendent également de la nature de la sphère de coordination du métal. En revanche, la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, du fait de son caractère dipolaire magnétique, est peu

affectée par l'environnement de l'ion. Ainsi, il a été établi que la valeur du rapport des surfaces des raies ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2 / {}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ est une mesure de la symétrie de la sphère de coordination du métal ⁽²⁾. En effet, pour un environnement centrosymétrique de l'ion Eu^{3+} , ce rapport ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2 / {}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ est inférieur à 1 alors qu'une distorsion de symétrie autour du métal se traduit par une augmentation de l'intensité de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ qui a pour conséquence d'augmenter ce rapport.

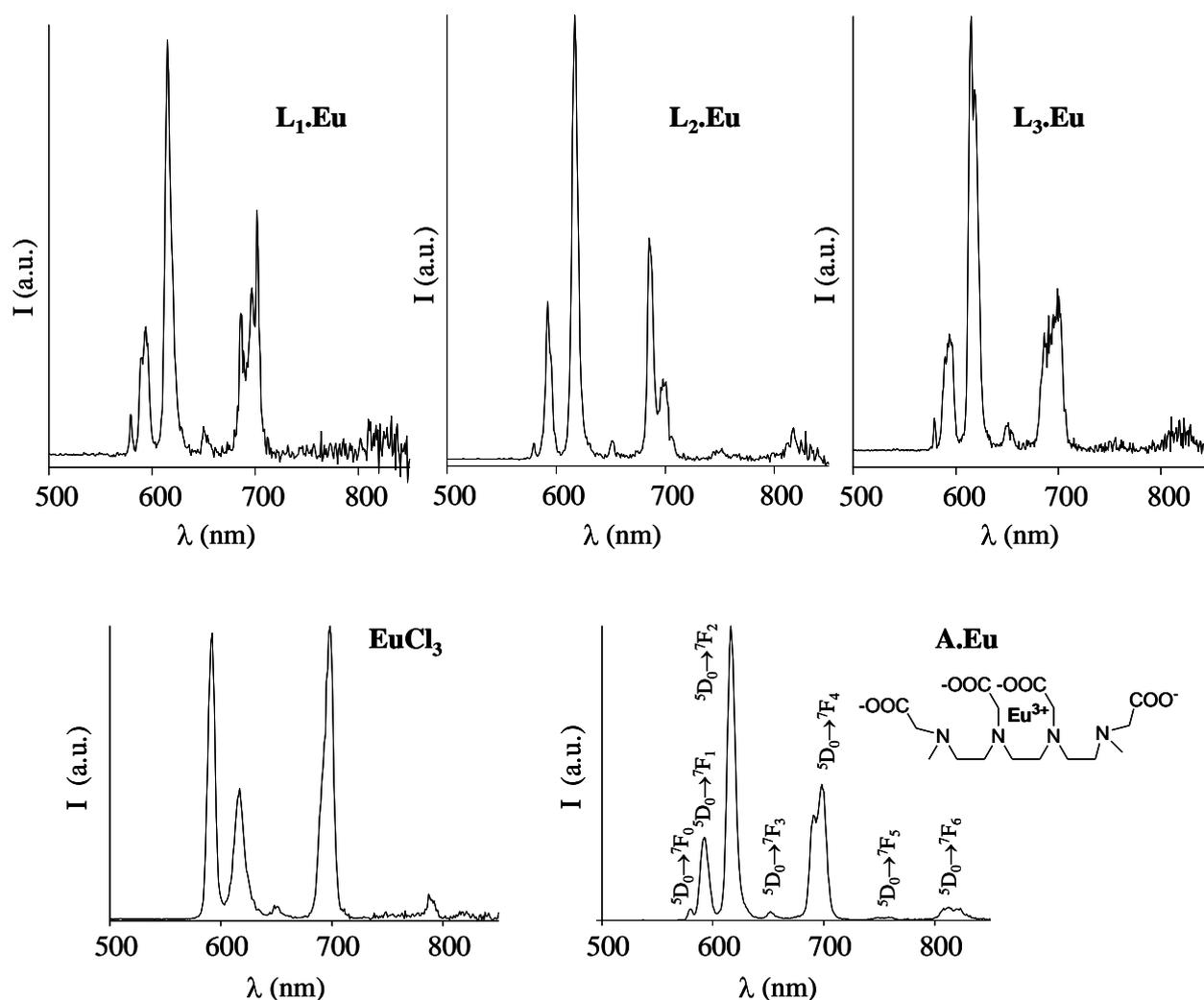


Figure 6. Spectres d'émission de luminescence corrigés et normalisés de EuCl_3 (à 10^{-2} M dans l'eau; $\lambda_{\text{ex}} = 393$ nm) et des complexes AEu (à 10^{-2} M; $\lambda_{\text{ex}} = 393$ nm), L_1Eu (à 10^{-5} M; $\lambda_{\text{ex}} = 268$ nm) L_2Eu (à 10^{-6} M; $\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm), L_3Eu (à 10^{-6} M; $\lambda_{\text{ex}} = 326$ nm) en tampon Tris 50 mM pH 7,4. Fentes exc./em. = 5/5 nm. Mode phosphorescence : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 0,4 ms.

Chapitre III

	7F_0	7F_1	7F_2	7F_3	7F_4	${}^7F_2/{}^7F_1$	${}^7F_4/{}^7F_1$
EuCl₃	0,2	69,5	50,9	4,9	100	0,7	1,4
A.Eu	2,2	29,3	100	3,8	74,8	3,4	2,5
L₁.Eu	4,1	35,6	100	5,8	90,2	2,8	2,5
L₂.Eu	1,7	32,5	100	3,4	72,3	3,1	2,2
L₃.Eu	1,9	28,4	100	5,8	65,8	3,5	2,3
L₅.Eu	2,2	31,2	100	5,5	75,9	3,2	2,4

Tableau 4. Intensités relatives des raies de l'ion Eu^{3+} libre et complexé calculées à partir des spectres d'émission de luminescence corrigés. **A.Eu**, **L₁.Eu**, **L₂.Eu**, **L₃.Eu** et **L₅.Eu** dans le tampon Tris 50 mM pH 7,4 ; **EuCl₃** dans l'eau.

A la lecture du tableau 4 et d'après la figure 6 :

- on peut noter que la complexation effective de l'ion Eu^{3+} par les ligands **L₁-L₃**, **L₅** se traduit par une augmentation du rapport ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2 / {}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$. En effet, pour une solution aqueuse de EuCl_3 où l'ion Eu^{3+} est entouré de manière symétrique par 9 molécules d'eau, ce rapport est de 0,7 en accord avec un environnement centrosymétrique. Dans le cas des complexes Eu^{3+} dérivés des ligands **L₁-L₃**, **L₅**, où les atomes coordonnants se substituent aux molécules d'eau, ce rapport se situe entre 2,8 - 3,5. On observe ainsi une inversion des intensités des raies ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ comparé à EuCl_3 en accord avec une distorsion de symétrie autour du métal complexé. Les mêmes constatations peuvent être faites lors de la complexation de l'ion par le motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique **A**.

- on constate que dans ces macrocycles, l'introduction d'un motif pyridine (**L₁**), bipyridine (**L₂**, **L₅**) puis terpyridine (**L₃**) augmente sensiblement le rapport ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2 / {}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ et modifie significativement l'allure de la raie ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ (Figure 6). Ceci suggère donc un environnement structural différent pour l'ion au sein de ces trois types de ligands avec une augmentation de la distorsion de symétrie de l'ion lors du passage d'une structure nonadentée (**L₁**) → à décadentée (**L₂**, **L₅**) → à undécadentée (**L₃**).

Pour les complexes d'ion Tb^{3+} , ce sont les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_j$ ($j = 0 \rightarrow 6$) qui caractérisent le spectre d'émission, observées dans la plage 470 - 660 nm. La raie la plus intense est toujours la transition ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ qui apparaît vers 545 nm. Les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_{0,1}$ sont d'intensités très faibles et les intensités relatives des autres raies suivent l'ordre ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_6 > {}^5D_4 \rightarrow {}^7F_4 > {}^5D_4 \rightarrow {}^7F_3 > {}^5D_4 \rightarrow {}^7F_2$. Les transitions ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_j$ de l'ion Tb^{3+} sont

dites « sensibles » et non « hypersensibles » comme dans le cas de l'ion Eu^{3+} (3); c'est pour cette raison que peu d'informations structurales est extrait des spectres d'émission de l'ion Tb^{3+} . Nous avons reporté dans la figure 7 les spectres d'émission des complexes $\text{L}_1\cdot\text{Tb}$, $\text{L}_2\cdot\text{Tb}$ et $\text{L}_3\cdot\text{Tb}$ ainsi que celui du sel TbCl_3 en solution aqueuse. Comme on peut le constater, les spectres d'émission des trois complexes sont analogues à celui de l'ion Tb^{3+} non complexé.

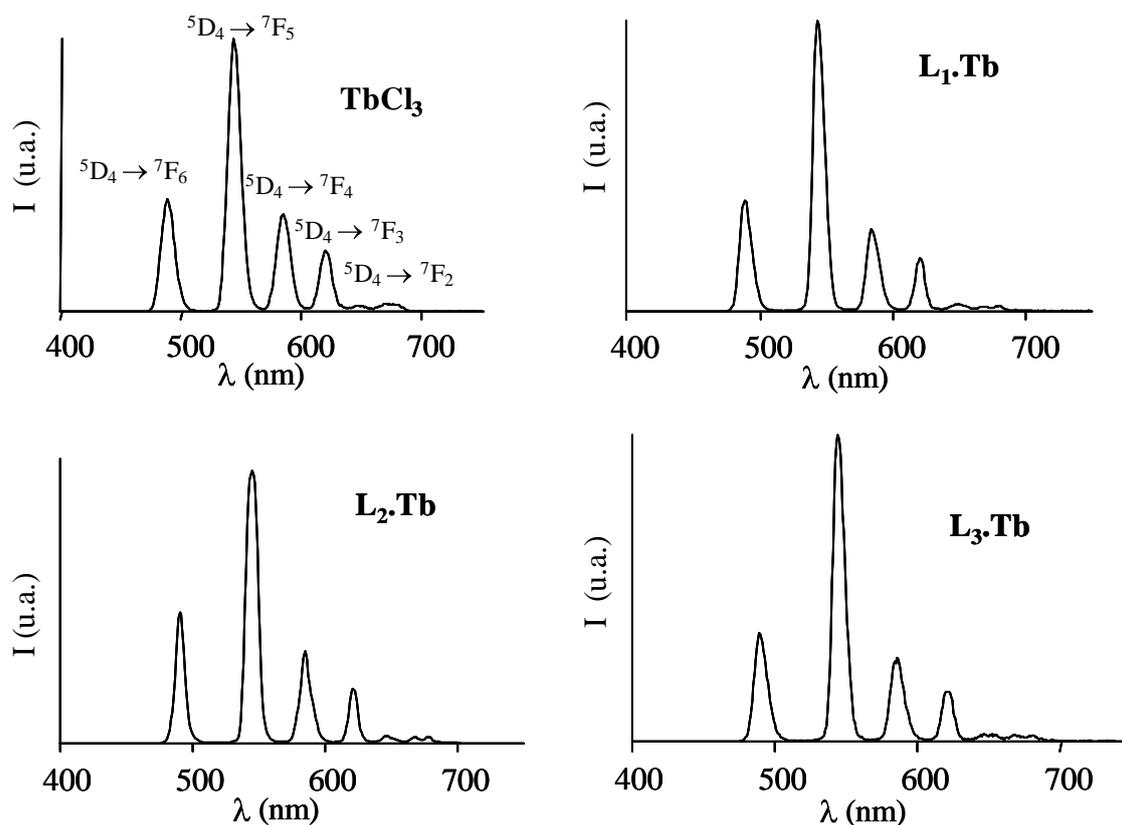


Figure 7. Spectres d'émission de luminescence corrigés et normalisés de TbCl_3 (à 10^{-2} M dans l'eau; $\lambda_{\text{ex}} = 369$ nm) et des complexes L_1Tb (à 10^{-5} M; $\lambda_{\text{ex}} = 268$ nm) L_2Tb (à 10^{-6} M; $\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm), L_3Tb (à 10^{-6} M; $\lambda_{\text{ex}} = 326$ nm) en tampon Tris 50 mM pH 7,4. Fentes exc./em. = 5/5 nm. Mode phosphorescence : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 0,4 ms.

Pour réaliser les spectres d'émission des différents complexes étudiés, nous avons travaillé avec des solutions de concentrations de l'ordre de $10^{-5} - 10^{-6}$ M, et en fixant une longueur d'onde d'excitation en rapport avec la bande d'absorption $\pi-\pi^*$ du chromophore pyridine, bipyridine ou terpyridine présent dans le macrocycle. Dans le cas des sels EuCl_3 , TbCl_3 et du dérivé A.Eu , aucun signal luminescent n'est détecté en travaillant dans ces conditions. En effet, les ions lanthanides sont caractérisés par de très faibles coefficients d'extinction molaires ($< 3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et cela implique que, pour réaliser les spectres d'émission des ions libres ou complexés par un ligand dépourvu de chromophore, il est

Chapitre III

nécessaire d'une part, de travailler avec des solutions 10^3 à 10^4 fois plus concentrées ($> 10^{-2}$ M) et d'autre part, de fixer une longueur d'onde d'excitation en rapport avec les bandes f-f du lanthanide : soit 393 nm (${}^7F_0 \rightarrow {}^7L_6$) pour l'ion Eu^{3+} et 369 nm (${}^7F_6 \rightarrow {}^5L_{10}$) pour l'ion Tb^{3+} . Ces différences sont donc une première indication concernant la présence d'un transfert d'énergie Ligand \rightarrow Métal dans cette série de complexes ; et c'est ce que nous allons maintenant mettre en évidence dans le paragraphe suivant.

I.2.2. Spectres d'excitation de luminescence : mise en évidence de l'effet d'antenne

Toute molécule luminescente est caractérisée par deux spectres de luminescence : un spectre d'émission et un spectre d'excitation ; le premier indique les variations de l'intensité de luminescence pour une longueur d'excitation fixe, le second indique l'efficacité relative des différentes longueurs d'onde d'excitation pour une longueur d'onde d'émission fixe.

Pour obtenir un spectre d'excitation d'un complexe de lanthanide, on maintient constante la longueur d'onde d'émission correspondant à un maximum d'intensité de luminescence (la raie ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ vers 545 nm pour les complexes Tb^{3+} et la raie ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ vers 616 nm pour les complexes Eu^{3+}) et on fait varier la longueur d'onde de la lumière excitatrice. L'allure du spectre d'excitation, corrigé des variations d'intensité de la lumière incidente avec la longueur d'onde excitatrice, est généralement identique à celle du spectre d'absorption à condition qu'une seule espèce soit présente à l'état fondamental. Ce spectre d'excitation nous renseigne plus précisément sur la nature des transitions de l'état fondamental qui conduisent, directement ou indirectement, à la population des états émissifs de l'ion complexé (5D_0 pour Eu^{3+} ou 5D_4 pour Tb^{3+}).

A titre d'exemples, nous reportons dans la figure 8 les spectres d'excitation de luminescence qui ont été obtenus dans le cas des complexes **L₁.Eu**, **L₂.Eu** et **L₃.Eu** dilués en solution aqueuse dans un tampon Tris (50 mM, pH 7,4). Les spectres d'excitation des complexes de terbium correspondants sont très semblables. Comme on peut le constater, ces spectres d'excitation reproduisent bien l'allure des bandes d'absorption des chromophores pyridine, bipyridine ou terpyridine incorporés dans les ligands **L₁**, **L₂** ou **L₃** respectivement.

Ces résultats permettent donc de montrer sans ambiguïté que l'émission de luminescence de l'ion complexé s'effectue indirectement *via* un processus de transfert d'énergie non radiatif du chromophore vers le métal, permettant l'observation de la

luminescence de l'ion lanthanide à de faibles concentrations grâce à l'effet d'antenne du chromophore.

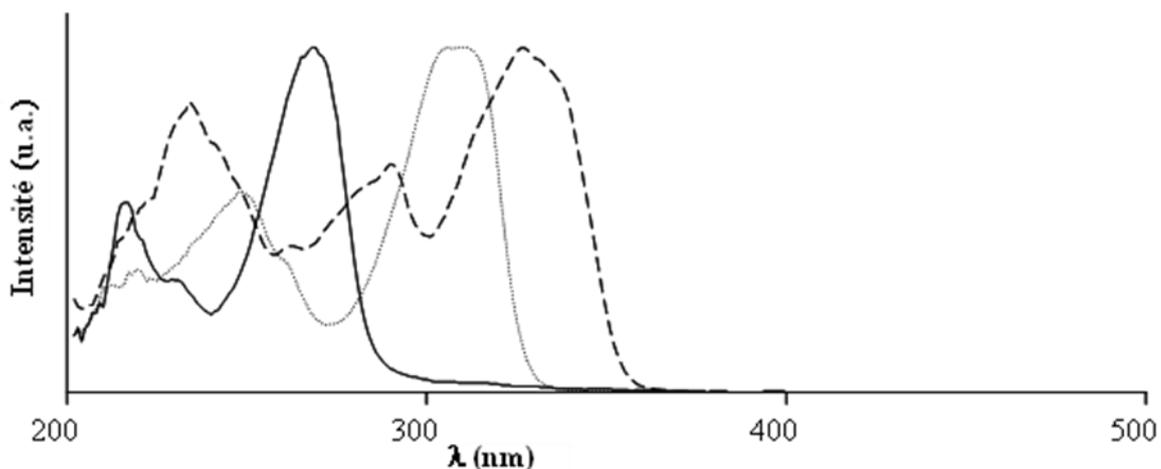


Figure 8. Spectres d'excitation de luminescence normalisés des complexes **L₁.Eu** (—), **L₂.Eu** (····), **L₃.Eu** (---) en tampon Tris (50 mM, pH 7,4) à $\lambda_{em} = 616$ nm. Fentes exc./em. = 5/5 nm. Temps résolu : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 1 ms. $[L_1.Eu] = 10^{-5}$ M ; $[L_2.Eu] = [L_3.Eu] = 10^{-6}$ M.

L'efficacité du transfert d'énergie chromophore-métal opérant dans ces complexes sera quantifiée à partir de mesures de durées de vie d'émission et de rendement quantique d'émission lumineuse, mais une première appréciation peut être faite en comparant la position énergétique de l'état triplet $^3\pi\pi^*$ du chromophore à celle des niveaux émissifs des deux ions 5D_0 (Eu³⁺) et 5D_4 (Tb³⁺).

1.2.3. Spectres de phosphorescence à 77K des complexes Gd³⁺ : détermination de la position énergétique des états triplet $^3\pi\pi^*$

Pour estimer la position énergétique de l'état triplet des ligands dans les différents complexes étudiés, nous avons eu recours à l'étude de complexes Gd³⁺. En effet, le niveau résonant de l'ion se situe au-delà de 30000 cm⁻¹ ce qui rend tout transfert d'énergie ligand – métal impossible (le niveau émissif de l'ion Gd³⁺, $^6P_{1/2}$ est à 32224 cm⁻¹). En revanche, la présence de cet atome lourd favorise le croisement intersystème $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ au sein du ligand et facilite ainsi l'observation de la désactivation radiative à partir de l'état $^3\pi\pi^*$ c'est-à-dire la phosphorescence. D'autre part, l'ion Gd³⁺ présente une taille et une structure électronique proches des ions Eu³⁺ et Tb³⁺. Il est donc possible de visualiser l'état triplet du ligand dans un environnement semblable à celui où il se trouve dans les complexes d'euporium et de terbium.

La position en énergie des états triplets des complexes **L₁.Gd**, **L₂.Gd**, **L₃.Gd** et **L₅.Gd** a été déterminée en enregistrant des spectres de phosphorescence à 77K et en utilisant une

longueur d'onde d'excitation en rapport avec la bande d'absorption $\pi-\pi^*$ du chromophore pyridine, bipyridine ou terpyridine présent dans le macrocycle. Les complexes Gd^{3+} ont été étudiés dans un mélange de solvants MeOH / EtOH (4/1) de manière à obtenir une bande de phosphorescence structurée ; l'énergie de l'état triplet le plus bas (${}^3\pi\pi^*$) est estimée à partir de la fréquence de la raie située à la plus courte longueur d'onde (λ_{00}) sur le spectre de phosphorescence (Figure 9).

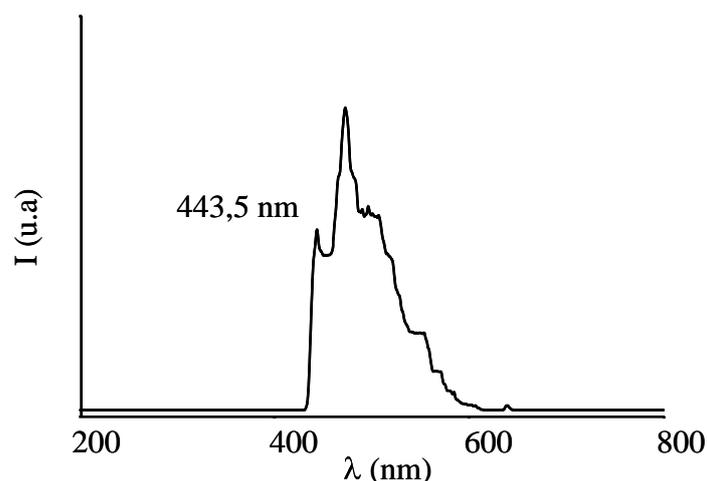


Figure 9. Spectre de phosphorescence du complexe **L₂.Gd** à 77 K (à 10^{-4} M; $\lambda_{ex} = 310$ nm) dans MeOH / EtOH (4/1). Fentes exc./em. = 15/5 nm. Mode phosphorescence : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 10 ms.

Le tableau 5 rassemble les différentes caractéristiques de phosphorescence obtenues pour les quatre complexes Gd^{3+} ainsi que la différence d'énergie ΔE entre l'état triplet (${}^3\pi\pi^*$) du ligand et l'état excité de l'ion lanthanide Eu^{3+} (5D_0) ou Tb^{3+} (5D_4).

Complexes	λ_{max} (nm)	τ_P (ms)	λ_{00} (nm)	${}^3\pi\pi^*$ (cm^{-1})	$\Delta E({}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^5D_0)$	$\Delta E({}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^5D_4)$
L₁.Gd	401	-	363	27550	10250	7050
L₂.Gd	473	5,3	443,5	22550	5200	2000
L₃.Gd	490	4,6	450	22200	4900	1700
L₅.Gd	483	5,7	452	22100	4800	1600

Tableau 5. Caractéristiques de phosphorescence des complexes de Gd^{3+} . Niveaux de résonance : 5D_0 à 17300 cm^{-1} pour Eu^{3+} . 5D_4 à 20500 cm^{-1} pour Tb^{3+} .

La valeur de l'énergie de l'état triplet ${}^3\pi\pi^*$ suit la séquence **L₁.Gd** > **L₂.Gd** > **L₃.Gd** > **L₅.Gd**. Les valeurs $E\ {}^3\pi\pi^*$ des complexes à base de bipyridine (**L₂.Gd**) et de terpyridine (**L₃.Gd**) sont assez proches de celles des motifs hétérocycliques libres. En effet, le niveau d'énergie de l'état triplet de la 2,2'-bipyridine se situe à 23529 cm^{-1} ($\tau_P = 0,9$ s) et celui de la 2,2':6',2''-terpyridine est estimé à 22962 cm^{-1} ($\tau_P = 2,1$ s) dans l'éthanol ⁽⁴⁾. L'effet de la

Chapitre III

complexation est plus sensible sur les valeurs des durées de vie de phosphorescence; alors qu'elles se situent dans le domaine de la seconde pour les motifs hétérocycliques libres, elles sont de l'ordre de la milliseconde dans le cas des complexes. Cet effet est du à la présence de l'atome lourd (Gd^{3+}) qui favorise le croisement inter-système $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ et augmente la constante de vitesse du processus de désactivation radiatif.

En se basant sur la position énergétique des états triplet $\pi\pi^*$ par rapport aux états émissifs des deux ions Eu^{3+} et Tb^{3+} (valeurs de ΔE), les complexes Gd^{3+} peuvent se répartir en deux catégories: d'une part, ceux pour lesquels l'état triplet se situe à au moins 2000 cm^{-1} au dessus de l'état émissif des ions Eu^{3+} , Tb^{3+} et d'autre part, ceux pour lesquels cette différence ΔE reste en dessous de 2000 cm^{-1} . La première catégorie de complexes, largement majoritaire, est assurée d'un transfert d'énergie ligand-métal sans possibilité de retour métal-ligand pouvant conduire à une diminution de l'efficacité de luminescence. En effet, Latva et al. ⁽⁵⁾ ont établi que pour des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} dérivés de ligands polyaminocarboxylates, le rendement quantique après excitation du ligand devient significatif lorsque la différence d'énergie ΔE ($^3\pi\pi^* \rightarrow ^5D_j$) entre l'état triplet du ligand et l'état excité de l'ion est supérieure à 2000 cm^{-1} . Lorsque cette différence est inférieure à 2000 cm^{-1} un transfert d'énergie en retour ($^5D_j \rightarrow ^3\pi\pi^*$) se produit. Ce phénomène de transfert d'énergie en retour est supposé se produire dans le cas de la seconde catégorie de complexes : les complexes de Tb^{3+} issus des ligands **L₃** et **L₅** pour lesquels le niveau énergétique $\pi\pi^*$ est situé respectivement à 1700 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} de l'état émissif 5D_4 de l'ion Tb^{3+} .

En conclusion, la mesure de la position en énergie des états triplets des complexes **L₁.Gd**, **L₂.Gd**, **L₃.Gd** et **L₅.Gd** permet d'exclure tout phénomène de désactivation non radiatif du à un transfert d'énergie en retour dans le cas de l'ion Eu^{3+} lorsqu'il est complexé aux ligands **L₁**, **L₂**, **L₃**, **L₅**. Pour l'ion Tb^{3+} , seuls les complexes issus des ligands **L₃** et **L₅** sont susceptibles de présenter cette voie de désactivation non radiative. Nous reviendrons sur ce phénomène de désactivation dans le paragraphe suivant ; en effet, le transfert d'énergie en retour est un phénomène activé thermiquement et qui peut être quantifié par des mesures de durées de vie à température ambiante et à 77K.

I.2.4. Durées de vie de luminescence

La durée de vie de luminescence est un paramètre photophysique important à déterminer dans le cas des complexes de lanthanides luminescents. En effet, la durée de vie de luminescence mesurée sous différentes conditions apporte des informations quantitatives sur

Chapitre III

les phénomènes de désactivations non radiatif et radiatif propres à chaque complexe. Les phénomènes de désactivations non radiatifs sont en effet d'autant plus efficaces qu'ils induisent une diminution de la durée de vie.

Les mesures de durées de vie de luminescence consistent à suivre la variation d'intensité lumineuse I en fonction du temps t . Soit N le nombre d'ions excités au temps t , alors :

$$dN / dt = -N / \tau \quad [1]$$

D'où :

$$N = N_0 e^{(-t/\tau)} \quad [2]$$

avec N_0 le nombre d'ions excités à l'instant $t = 0$.

L'intensité de luminescence I étant proportionnelle au nombre d'ions excités, l'équation devient :

$$I = I_0 e^{(-t/\tau)} \quad [3]$$

avec I_0 l'intensité de luminescence à l'instant $t = 0$.

L'intensité de luminescence décroît donc de façon monoexponentielle en fonction du temps (Figure 10). La durée de vie se définit comme le temps au bout duquel cette intensité d'émission est égale à $1/e$ de sa valeur initiale.

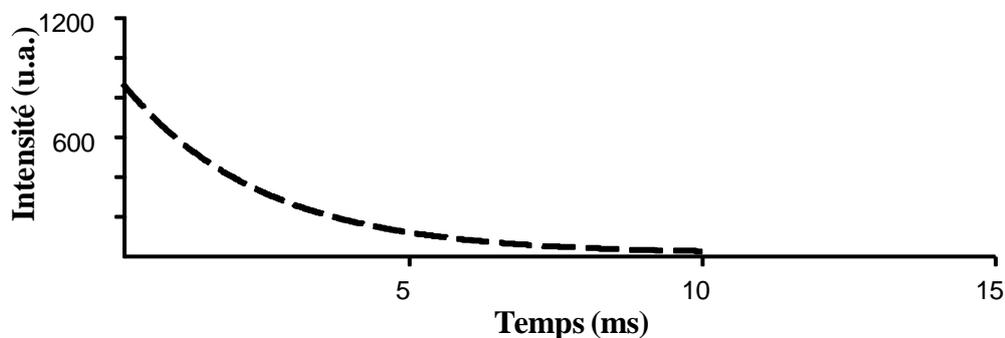


Figure 10. Courbe de décroissance de l'intensité de luminescence en fonction du temps pour le complexe $L_2.Tb$ (tampon Tris deutéré).

De l'équation [3], il vient :

$$\ln I = \ln [I_0 e^{(-t/\tau)}] \quad [4]$$

$$\ln I = -t/\tau + \ln I_0 \quad [5]$$

Où $\ln I_0$ est une constante.

Chapitre III

L'analyse des courbes de décroissance obtenues permet ainsi de déterminer les durées de vie des différents complexes, en déterminant la pente de droite égale à $-1/\tau$ de l'équation $\ln I = f(t)$ (Figure 11).

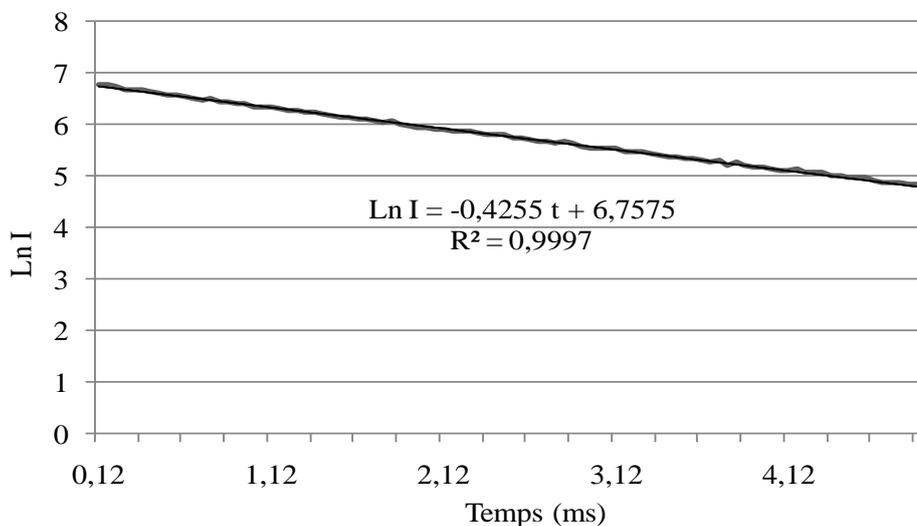


Figure 11. Logarithme népérien de l'intensité d'émission en fonction du temps pour le complexe $L_2.Tb$ dans le tampon Tris deutéré.

Les durées de vie d'émission de luminescence des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} dérivés des ligands L_1-L_3 , L_5 (tableau 6) ont été mesurées à différentes températures (298K et 77K) dans le tampon Tris (H) ainsi que dans son homologue deutéré (D). Toutes les durées de vie calculées sont indépendantes de la longueur d'onde d'excitation et d'émission, et dans tous les cas, la décroissance de luminescence peut être représentée par une courbe monoexponentielle. Ceci suggère donc fortement l'existence d'un seul type de complexe en solution pour tous les composés étudiés si on suppose l'absence de plusieurs complexes en échange rapide par rapport à l'échelle du temps des états excités des ions Eu^{3+} ou Tb^{3+} .

Les complexes Eu^{3+} , Tb^{3+} présentent des durées de vie d'émission élevées autour de la milliseconde (0,67 à 2,18 ms) en milieu aqueux, à pH physiologique, et à température ambiante. Comparées à celles des sels de lanthanide ($\tau = 0,11$ ms pour $EuCl_3$ et $\tau = 0,43$ ms pour $TbCl_3$), la complexation se caractérise par une augmentation significative de la durée de vie qui traduit la substitution totale ou partielle des molécules d'eau entourant l'ion Ln^{3+} par les atomes complexants des ligands. L'environnement coordinant des ligands permet d'assurer une protection compétitive de l'ion Ln^{3+} vis-à-vis des molécules d'eau, ce qui supprime la voie de désactivation non radiative *via* les vibreurs O-H des molécules d'eau et augmente la durée de vie. Le motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique **A**, dans une moindre mesure, assure également une protection de l'ion vis-à-vis des molécules d'eau.

Chapitre III

Toutefois, le phénomène de désactivation non radiatif *via* les vibreurs O-H n'est pas supprimé entièrement si on compare ces durées de vie à celles mesurées dans le milieu deutéré. Excepté pour **L₂.Tb** et **L₅.Tb**, on constate que ce phénomène réside dans le cas de tous les autres complexes : on observe en effet une augmentation des durées de vie d'un facteur 1,5 à 2,7 en passant d'un milieu non deutéré à un milieu deutéré (rapport $\tau_D^{298K} / \tau_H^{298K}$).

L'abaissement de la température 298K \rightarrow 77K pour la mesure des durées de vie permet de mettre en évidence la présence d'une autre voie de désactivation non radiative, une voie activée thermiquement. On constate que les deux complexes, **L₃.Tb** et **L₅.Tb**, sont sensibles à une diminution de la température : on observe une augmentation des durées de vie d'un facteur 2,2 à 2,6 en passant d'un milieu deutéré à 298K à un milieu deutéré à 77K (rapport $\tau_D^{77K} / \tau_D^{298K}$). Pour tous les autres complexes, on peut considérer comme négligeables les processus non radiatifs activés thermiquement.

Complexes		τ_H^{298K}	τ_D^{298K}	τ_H^{77K}	τ_D^{77K}	$\tau_D^{298K} / \tau_H^{298K}$	$\tau_D^{77K} / \tau_D^{298K}$
L₁	Eu³⁺	0,67	1,8	0,92	1,97	2,7	1,1
	Tb³⁺	1,54	3	1,94	3	1,9	1
L₂	Eu³⁺	1,13	1,81	1,21	1,93	1,6	1,1
	Tb³⁺	2,18	2,35	2,34	2,87	1,1	1,2
L₃	Eu³⁺	0,76	1,73	0,87	1,86	2,3	1,1
	Tb³⁺	0,89	1,25	1,85	2,78	1,4	2,2
L₅	Eu³⁺	1,09	1,92	1,27	1,93	1,8	1
	Tb³⁺	1,08	1,08	2,51	2,78	1	2,6
A.Eu		0,35	1,48	-	-	4,2	-
EuCl₃⁽⁴⁾		0,11	2,27	-	-	20,6	-
TbCl₃⁽⁴⁾		0,43	3,30	-	-	7,7	-

Tableau 6. Durées de vie de luminescence (ms) des complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ issus des ligands **L₁**, **L₂**, **L₃** et **L₅** dans un tampon TRIS (50 mM, pH 7,4) non deutéré (τ_H) et deutéré (τ_D) à 298K et à 77K . Comparaison avec le complexe **A.Eu** et les sels EuCl₃ et TbCl₃.

Chapitre III

Une analyse plus formelle des durées de vie mesurées dans H₂O et D₂O peut nous renseigner sur le nombre de molécules d'eau coordonnées à l'ion lanthanide. Dans ce but, plusieurs méthodes de calcul empirique ont été appliquées :

1- La 1^{ère} méthode mise au point est celle de Horrocks et Sudnick ⁽⁶⁾. Ces auteurs ont établi une corrélation entre le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal et les durées de vie de luminescence des complexes mesurées dans H₂O et D₂O (ou dans des solvants hydroxylés et leurs homologues deutérés) ; les nombres de molécules d'eau estimés à partir de ces données de luminescence ont été corroborés avec les valeurs connues sur la base des structures RX des complexes.

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,05 (1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}) \text{ (Eu) [6]}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 4,20 (1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}}) \text{ (Tb) [7]}$$

avec τ exprimée en ms.

L'incertitude de cette équation est de $\pm 0,5$ molécule d'eau.

Les constantes de 1,05 et 4,20 utilisées quelque soit le ligand reflètent la plus grande sensibilité de l'euprium(III) vis-à-vis de ce processus de désactivation.

2- Kimura et al. ⁽⁷⁾ ont étudié l'hydratation des complexes Ln(III) (Ln= Sm, Eu, Tb et Dy) avec une série de ligands polyaminocarboxylates en se basant sur la corrélation linéaire entre la vitesse de décroissance de luminescence observée k_{obs} et le nombre de molécules d'eau directement coordonnées aux ions samarium, europium, terbium et dysprosium. Ils proposent ainsi quatre équations permettant de déterminer le nombre de molécules liées à l'ion lanthanide à partir de la mesure de durée de vie dans H₂O:

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 2,54 \cdot 10^{-5} k_{\text{obs}} \text{ (Sm) - 0,37 [8]}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,05 \cdot 10^{-3} k_{\text{obs}} \text{ (Eu) - 0,44 [9]}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 4,03 \cdot 10^{-3} k_{\text{obs}} \text{ (Tb) - 0,87 [10]}$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 2,11 \cdot 10^{-5} k_{\text{obs}} \text{ (Dy) - 0,60 [11]}$$

avec $k_{\text{obs}} = 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ en s⁻¹.

D'autres relations, pour calculer le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal à partir de la durée de vie dans H₂O, ont été décrites dans la littérature ^(8,9) par exemple la relation de Barthelemy et Choppin, équation [12] :

Chapitre III

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,05 \times 1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 0,70 \quad [12]$$

avec τ exprimée en ms.

Ces relations tiennent compte de l'existence que d'un seul type de vibreurs O-H : ceux de la première sphère de coordination du métal, c'est-à-dire ceux faisant intervenir les molécules d'eau directement liées au métal. Parker et al.⁽¹⁰⁾ ont montré l'influence d'autres vibreurs O-H, ceux provenant des molécules d'eau de la deuxième sphère de coordination du métal, c'est-à-dire des molécules d'eau non liées au métal mais pouvant être proches du centre métallique en établissant des liaisons hydrogènes avec les atomes donneurs du ligand.

3- Dans ce contexte, Parker et al.⁽¹⁰⁾ ont établi deux nouvelles relations dérivées de deux équations [6] et [7] en introduisant des facteurs correctifs correspondant aux oscillateurs O-H des molécules d'eau non directement liées au métal.

Les deux relations [13] et [14] permettent de calculer le nombre de molécules d'eau directement liées au métal avec une incertitude de $\pm 0,1$ molécule d'eau.

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,2 \times (1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}} - 0,25) \text{ pour l'Eu}^{3+} \quad [13]$$

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 5 \times (1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}} - 0,06) \text{ pour le Tb}^{3+} \quad [14]$$

avec τ exprimée en ms.

4- De même, Horroks et Supkowski⁽¹¹⁾ ont établi une nouvelle relation permettant de calculer le nombre de molécules d'eau pour les complexes d'Eu(III) toujours en prenant en compte la 2^{ème} sphère de coordination de l'ion Eu^{3+} .

$$n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,11 \times (1/\tau_{\text{H}_2\text{O}} - 1/\tau_{\text{D}_2\text{O}} - 0,31) \quad [15]$$

Nous avons rassemblé dans le tableau 7 les valeurs des nombres de molécules d'eau liées au métal déterminées à partir des équations précédemment citées.

Chapitre III

Complexes	τ_H (ms)	τ_D (ms)	Equation 6/7	Equation 9/10	Equation 12	Equation 13/14	Equation 15
L₁.Eu	0,67	1,8	0,98	1,12	0,86	0,8	0,69
L₁.Tb	1,54	3	1,32	1,74	-	1,3	-
L₂.Eu	1,13	1,81	0,35	0,49	0,23	0	0,02
L₂.Tb	2,18	2,35	0,14	0,97	-	-0,13	-
L₃.Eu	0,76	1,73	0,77	0,94	0,68	0,59	0,47
L₃.Tb	0,89	1,25	1,36	3,65	-	1,3	-
L₅.Eu	1,09	1,92	0,41	0,52	0,26	0,17	0,09
L₅.Tb	1,08	1,08	0	2,86	-	-0,3	-

Tableau 7. Détermination du nombre de molécules d'eau coordonnées au métal.

Concernant les complexes d'euporium, les différentes équations mettent en évidence la présence d'une molécule d'eau dans le cas des structures nonadentée (**L₁**) et undécadentée (**L₃**) et d'aucune molécule d'eau pour les structures décadentées (**L₂**, **L₅**). Si on considère un nombre de coordination de 9 pour l'ion Eu^{3+} , ces résultats suggèrent la non-participation d'un site de complexation dans le cas du ligand **L₁** et de trois sites dans le cas du ligand **L₃**. Les structures décadentées (**L₂**, **L₅**) permettent en revanche de saturer complètement la sphère de coordination du métal.

Pour les complexes de terbium, les résultats concordent avec ceux des complexes d'euporium excepté dans l'utilisation de l'équation 10 qui conduit à un nombre anormalement élevé de molécules d'eau surtout pour les complexes **L₃.Tb** et **L₅.Tb**. Ces deux complexes ont en commun de présenter, comme on l'a vu précédemment, un processus non négligeable de désactivation non radiative dépendant de la température. L'utilisation de l'équation 10 qui tient compte d'une seule mesure de durée de vie et non pas d'une différence entre deux durées de vie conduit vraisemblablement à des valeurs erronées de $n_{\text{H}_2\text{O}}$ car elle ne permet pas de s'affranchir des processus dépendants de la température.

La part prise par les différents processus de désactivation peut être estimée en revenant à l'expression générale de la durée de vie de décroissance de luminescence :

$$1/\tau_{\text{obs}} = k_{\text{obs}} = k_r + k_{\text{nr}} + k_{\text{nr}}f(T) \quad [16]$$

Avec k_{obs} , la constante de vitesse apparente du processus de désactivation

Chapitre III

k_r , la constante de vitesse du processus radiatif

k_{nr} , la constante de vitesse du processus non radiatif indépendant de la température

$k_{nr f(T)}$, la constante de vitesse du processus non radiatif dépendant de la température

La constante de vitesse non radiative k_{nr} peut elle-même se décomposer en deux constantes de vitesse :

$$k_{nr} = k_{OH} + k_{XH} \quad [17]$$

Avec k_{OH} , la constante de vitesse non radiative due aux oscillateurs OH

k_{XH} , la constante de vitesse non radiative due aux autres oscillateurs

Soit :

$$k_{obs} = k_r + k_{OH} + k_{XH} + k_{nr f(T)} \quad [18]$$

Ainsi, dans H_2O , nous avons l'équation suivante:

$$k_{obs}^{H_2O} = k_r + k_{OH} + k_{XH} + k_{nr f(T)} \quad [19]$$

Dans D_2O , la constante de vitesse k_{OH} étant considérée comme négligeable, il vient :

$$k_{obs}^{D_2O} = k_r + k_{XH} + k_{nr f(T)} \quad [20]$$

Il en découle donc que:

$$k_{OH} = k_{obs}^{H_2O} - k_{obs}^{D_2O} = 1/\tau^{298K}_{H_2O} - 1/\tau^{298K}_{D_2O} \quad [21]$$

Si l'on considère qu'à 77 K tout processus activé thermiquement est peu probable, la constante de vitesse $k_{nr f(T)}$ devient négligeable, d'où :

$$k_{obs}^{D_2O, 77K} = k_r + k_{XH} \quad [22]$$

Il en découle donc que :

$$k_{nr f(T)} = k_{obs}^{D_2O, 298K} - k_{obs}^{D_2O, 77K} = 1/\tau^{298K}_{D_2O} - 1/\tau^{77K}_{D_2O} \quad [23]$$

Dans le tableau 8 sont rassemblées les différentes constantes de vitesse k_{obs} , k_{OH} et $k_{nr f(T)}$ calculées pour les complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} dérivés des ligands L_1 - L_3 , L_5 .

Chapitre III

Ligand	Ln ³⁺	k _{obs}	k _{OH}	k _{nr f(T)}	k _{OH} /k _{obs}	k _{nr f(T)} /k _{obs}
L ₁	Eu ³⁺	1492	936	48	63%	3%
	Tb ³⁺	649	316	0	49%	0
L ₂	Eu ³⁺	885	333	34	38%	4%
	Tb ³⁺	459	33	77	7%	17%
L ₃	Eu ³⁺	1316	738	40	56%	3%
	Tb ³⁺	1124	324	440	29%	39%
L ₅	Eu ³⁺	917	396	3	43%	< 1%
	Tb ³⁺	926	0	566	0	61%

Tableau 8. Constantes de vitesse k_{obs}, k_{OH} et k_{nr f(T)} en s⁻¹ déterminées dans le tampon Tris (50 mM, pH 7,4).

Ce tableau permet d'évaluer la contribution prise par les vibrateurs O-H et/ou les processus activés thermiquement dans la désactivation radiative des états excités des ions Eu³⁺, Tb³⁺.

Concernant les complexes d'euporium, la désactivation non radiative est largement dominée par les processus liés aux oscillateurs O-H (k_{OH} >> k_{nr f(T)}). Les valeurs de k_{OH} sont 2 à 3 fois plus élevées pour les complexes **L₁.Eu** et **L₃.Eu** (n_{H₂O} = 1) que pour **L₂.Eu** et **L₅.Eu** (n_{H₂O} = 0). Les valeurs négligeables de k_{nr f(T)} (< 4 %) pour l'ensemble des complexes d'euporium permettent d'exclure la présence de phénomènes activés thermiquement pouvant se produire à partir de l'état émissif de l'ion Eu³⁺. Le transfert d'énergie en retour ⁵D₀ → ³ππ* et la désactivation de l'état excité ⁵D₀ vers un état LMCT accessible thermiquement sont donc exclus.

On retrouve pour les complexes **L₁.Tb** et **L₃.Tb** une contribution importante des vibrateurs O-H dans la désactivation de l'état excité de l'ion Tb³⁺. Les valeurs de k_{OH} calculées sont toutefois 2 à 3 fois plus faibles que dans le cas des complexes d'euporium correspondants étant donné que l'état émissif de l'ion Tb³⁺ est moins sensible à la désactivation non radiative *via* les vibrateurs O-H. En revanche, les processus dépendants de la température prennent une part non négligeable dans la désactivation de l'état excité de l'ion Tb³⁺ pour les complexes **L₃.Tb**, **L₅.Tb** (39% et 61 % respectivement). Ces complexes présentent des valeurs de k_{nr f(T)} d'autant plus élevées que l'écart énergétique ΔE entre l'état triplet (³ππ*) du ligand et l'état excité de l'ion Tb³⁺ (⁵D₄) est faible. Nous avons en effet vu précédemment à l'aide des complexes Gd³⁺ que cet écart était respectivement de 1700 et 1600

cm⁻¹, c'est-à-dire en dessous du seuil permettant un transfert irréversible ligand → métal. Ces deux observations sont donc cohérentes avec l'existence d'un transfert d'énergie en retour ⁵D₄ → ³ππ* au sein des entités **L₃.Tb** et **L₅.Tb**.

I.2.5. Rendements quantiques des complexes Eu³⁺ et Tb³⁺

Le rendement quantique de fluorescence est défini par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés :

$$\Phi = \text{nombre de photons émis par fluorescence} / \text{nombre de photons absorbés}$$

Il caractérise pour un fluorophore l'efficacité du processus de fluorescence. Φ se rapproche de 1 (ou 100%) pour les fluorophores les plus efficaces et Φ est égal à 0 pour les composés non fluorescents. La mesure directe d'un rendement quantique est difficile à réaliser car elle nécessite de mesurer le flux lumineux total émis dans toutes les directions.

En pratique, le rendement quantique est relatif, c'est-à-dire qu'il est mesuré par rapport à une substance de référence dont le rendement quantique absolu est connu. Pour cela, on mesure pour l'échantillon x et la référence, les surfaces des spectres d'émission de fluorescence S_x , $S_{\text{réf}}$ obtenues aux longueurs d'onde d'excitation λ_x , $\lambda_{\text{réf}}$ ainsi que les densités optiques des deux solutions à la longueur d'onde d'excitation utilisée DO_x , $DO_{\text{réf}}$. On obtient alors la valeur du rendement quantique en utilisant la relation suivante :

$$\Phi_X = \Phi_{\text{réf}} \cdot (DO_{\text{réf}} \cdot S_x \cdot n_x^2) / (DO_x \cdot S_{\text{réf}} \cdot n_{\text{réf}}^2)$$

(n_x , $n_{\text{réf}}$ sont les indices de réfraction du milieu de mesure pour l'échantillon et la référence).

On peut considérer que le rendement quantique expérimental (Φ) est le résultat du processus A.TE.E., produit des rendements des trois étapes impliquées dans le mécanisme de photoluminescence^(12,13) (Figure 5) : Φ_{CIS} : rendement du croisement intersystème (¹ππ* → ³ππ*), Φ_{ET} : rendement du transfert d'énergie (³ππ* → Ln*) et Φ_{Ln} : rendement quantique d'émission intrinsèque de l'ion lanthanide, c'est-à-dire quand ce dernier est excité dans ses propres niveaux électroniques:

$$\Phi = \Phi_{\text{CIS}} \cdot \Phi_{\text{ET}} \cdot \Phi_{\text{Ln}}$$

Φ_{Ln} peut être calculé à partir du rapport de la durée de vie de luminescence observée dans H₂O à température ambiante ($\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{298\text{K}}$) et la durée de vie dans D₂O à 77K ($\tau_{\text{D}_2\text{O}}^{77\text{K}}$) c'est-à-dire sa durée de vie de luminescence en absence de tout processus de quenching :

$$\Phi_{\text{Ln}} = \tau_{\text{H}_2\text{O}}^{298\text{K}} / \tau_{\text{D}_2\text{O}}^{77\text{K}}$$

Chapitre III

Les rendements quantiques des complexes, après excitation dans la bande d'absorption de plus basse énergie du ligand, sont rassemblés dans le tableau 9 :

Complexes		Φ_H (Φ_D) (%)	$\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$ (%)	Φ_{Ln} (%)
L₁	Eu³⁺	0,6 (1,6)	1,8	34
	Tb³⁺	8,5 (13)	16	53
L₂	Eu³⁺	5 (6)	9	58
	Tb³⁺	26 (27)	34	76
L₃	Eu³⁺	4,5 (10)	11	41
	Tb³⁺	9,2 (---)	29	32
L₅	Eu³⁺	3,6 (5)	6,5	56
	Tb³⁺	3 (3,1)	7,7	39

Tableau 9. Valeurs des rendements Φ_H , $\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$ et Φ_{Ln} déterminés en tampon Tris (50 mM, pH 7,4).

Les rendements quantiques des complexes d'euporium sont compris entre 0,6% et 5%. La présence d'une molécule d'eau résiduelle pour **L₁.Eu** et **L₃.Eu** diminue au moins d'un facteur 2 le rendement quantique global Φ_H . On constate toutefois que le processus A.ET.E des complexes d'euporium est principalement affecté par l'étape de transfert d'énergie ligand-métal, représenté ici par $\Phi_{CIS} \cdot \Phi_{ET}$, qui s'effectue avec des efficacités comprises entre 1,8% et 11%. Si on considère que les rendements quantiques de croisement inter-système Φ_{CIS} sont comparables à ceux des motifs simples (par exemple pyridine, $\Phi_{CIS} = 0,9$ ⁽¹⁴⁾; 2,2'-bipyridine, $\Phi_{CIS} = 0,83$ ⁽¹⁵⁾), c'est donc l'étape de transfert d'énergie $^3\pi\pi^* \rightarrow Eu^*$ qui est l'étape limitante. Dans le cas de **L₁.Eu**, l'état triplet, situé à 10250 cm^{-1} de l'état émissif 5D_0 de l'ion est vraisemblablement à un niveau d'énergie trop élevé pour que le transfert d'énergie soit efficace. En ce qui concerne **L₂.Eu** et **L₃.Eu**, l'étape de transfert d'énergie $^1\pi\pi^* \rightarrow Eu^*$ s'effectue avec des efficacités comparables (9-11%), mais inférieures à celles obtenues avec leurs homologues macrocycliques à 15 et 18 chaînons respectivement ($\sim 30\%$ ⁽¹⁶⁾). L'efficacité du transfert d'énergie est un processus qui dépend aussi de la distance entre le chromophore et le métal. Comme on l'a vu au cours du premier chapitre, le processus de transfert d'énergie est décrit comme pouvant s'opérer suivant un mécanisme de type Förster⁽¹⁷⁾ ou de type Dexter⁽¹⁸⁾ dans lequel la vitesse de transfert d'énergie est dépendante de la distance R entre le chromophore et le métal : la vitesse de transfert diminue comme R^6 (Forster) ou e^R (Dexter). Il est donc probable que dans le cas de **L₂.Eu** et **L₃.Eu**, macrocycles

à 18 et 21 chaînons respectivement, la distance chromophore-métal ne soit pas optimale et que cela induise des efficacités du transfert d'énergie ${}^3\pi\pi^* \rightarrow \text{Eu}^*$ plus faibles qu'attendues.

Les rendements quantiques des complexes de terbium, compris entre 3 et 26%, sont dans tous les cas équivalents ou supérieurs à ceux des complexes d'euporium correspondants ; le ligand **L₂** apparaît comme étant le meilleur photosensibilisateur de l'ion Tb^{3+} . Comparés aux complexes d'euporium et excepté pour **L₅.Tb**, l'étape de transfert d'énergie ${}^3\pi\pi^* \rightarrow \text{Tb}^*$ s'effectue avec de meilleures efficacités (16-34%). On constate que l'introduction d'un motif COOMe sur le chromophore bipyridine (comparaison **L₅.Tb**/ **L₂.Tb**) affecte particulièrement la luminescence du complexe : le rendement quantique chute de 26% à 3 %. Nous avons en effet vu précédemment que cette modification structurale entraîne un abaissement de la position énergétique de l'état triplet du chromophore ce qui engendre la présence d'un processus non radiatif de transfert d'énergie en retour $\text{Tb}^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$.

I.3. Stabilité des complexes en solution aqueuse

La stabilité des complexes de lanthanide en solution aqueuse est d'une importance majeure dans le cadre de leur utilisation pour des applications biologiques. Nous avons ainsi réalisé des cinétiques de stabilités des complexes en tampon Tris à pH physiologique ainsi que des cinétiques de compétition en présence d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) comme ligand compétiteur. Les propriétés de luminescence (surfaces d'émission et durées de vie) des complexes ont également été évaluées dans d'autres milieux tampons (phosphate et HEPES) et en présence de protéine (l'albumine de sérum bovin). Enfin, une stabilité en milieu sérique a été réalisée avec le complexe **L₂.Tb** qui présente les propriétés de luminescence les plus intéressantes.

I.3.1. Cinétique de complexation et stabilité en tampon TRIS

La cinétique de complexation des ligands **L₁**, **L₂** et **L₃** vis-à-vis de l'ion Eu^{3+} a été explorée par spectroscopie de luminescence. Après addition d'un équivalent de sel EuCl_3 à une solution de ligand ($[\text{L}_1] = 2.10^{-5} \text{ M}$; $[\text{L}_2] = [\text{L}_3] = 9.10^{-6} \text{ M}$) dans le tampon Tris, l'évolution de l'intensité de la raie d'émission ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ (à 616 nm) est suivie en fonction du temps (Figure 12).

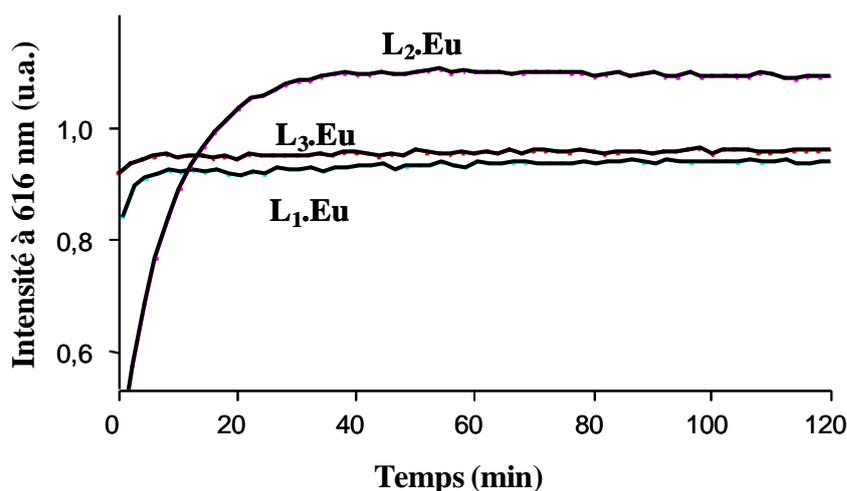


Figure 12. Cinétiques de complexation des ligands **L₁**, **L₂** et **L₃** avec Eu^{3+} (tampon Tris pH 7,4. Fentes exc./em. 5/5 nm).

L'étude de la figure 12 montre une cinétique de complexation de l'ion Eu^{3+} pour le ligand **L₂** bien distincte des deux autres ligands **L₁** et **L₃**. L'équilibre est atteint au bout de 40 minutes pour le complexe dérivé du ligand **L₂** et 10 minutes pour les complexes dérivés des ligands **L₁** et **L₃**. L'augmentation de la vitesse de complexation du ligand **L₃** par rapport au **L₂** provient probablement de l'augmentation de la taille de la cavité du macrocycle : 18 chaînons pour **L₂** et 21 chaînons pour **L₃**. En revanche, dans le cas du ligand **L₁**, nous constatons une cinétique de complexation plus rapide par rapport à **L₂**, bien qu'il ait une cavité plus restreinte (15 chaînons). Il est possible que la complexation de l'ion Eu^{3+} s'effectue plus à l'extérieur de la cavité dans le cas de ce ligand.

Il est d'autre part intéressant de noter que les propriétés de luminescence des complexes étudiés restent inchangées après plusieurs jours d'observation dans ce milieu tampon. Dans le paragraphe suivant, nous avons cherché à déterminer leur constante de stabilité conditionnelle.

1.3.2. Constantes de stabilité conditionnelle à pH physiologique

Afin d'évaluer la constante de stabilité conditionnelle des complexes **L₁.Eu**, **L₂.Eu** et **L₃.Eu**, nous avons eu recours de manière classique à des expériences de compétition avec l'EDTA comme ligand compétiteur. Il s'agit d'un ligand polyaminocarboxylique dont la constante de stabilité thermodynamique vis-à-vis de l'ion Eu^{3+} est connue ($K_{\text{EDTA}/\text{Eu}} = 10^{17,32}$)⁽¹⁹⁾. Le complexe EDTA/Eu est dépourvu de chromophore, il n'est donc pas luminescent sous une excitation UV et dans le domaine de concentration utilisée (10^{-5} - 10^{-6} M).

Les expériences de compétition ont consisté à suivre l'évolution de l'intensité de luminescence en fonction du temps d'une solution de complexe à $2,2 \cdot 10^{-5}$ M (**L₁.Eu**) ; $9,2 \cdot 10^{-6}$

Chapitre III

M (**L₂.Eu**) ; $9,2 \cdot 10^{-6}$ M (**L₃.Eu**) dans le tampon Tris (pH 7,3), après l'ajout de 10 équivalents de ligand compétiteur EDTA (sous forme disodé).

L'addition de 10 équivalents d'EDTA à une solution de complexes **L₁.Eu**, **L₂.Eu** et **L₃.Eu** se traduit par une diminution de l'intensité de luminescence de 28%, 22% et 96% respectivement au bout de 51 heures, temps au terme duquel l'équilibre est clairement établi (Figure 13). On observe donc une décomplexation partielle dans le cas de **L₁.Eu** et **L₂.Eu** et une décomplexation pratiquement totale avec **L₃.Eu**. La cinétique de décomplexation décroît aussi plus rapidement pour ce dernier; ces observations indiquent donc clairement une meilleure capacité de coordination de l'ion lanthanide par les macrocycles pyridine (**L₁**) et bipyridine (**L₂**).

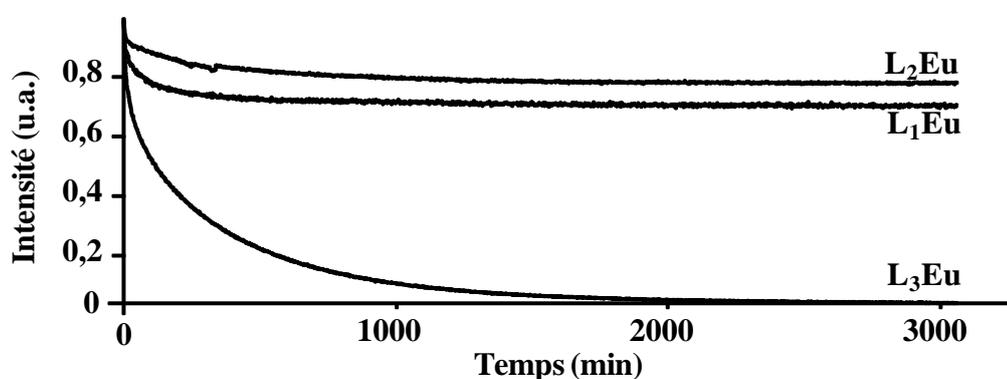


Figure 13. Courbes normalisées des cinétiques de compétition de **L₁.Eu**, **L₂.Eu** et **L₃.Eu** en présence de 10 équivalents d'EDTA en tampon Tris (50 mM, pH 7,3).

Dans le tableau 10 ci-dessous sont rassemblées les durées de vie des complexes avant l'ajout d'EDTA (τ avant compétition) et en fin de cinétique soit au bout de 51 h d'incubation avec 10 équivalents d'EDTA (τ après compétition). Les spectres d'excitation et d'émission de luminescence des complexes, réalisés à l'issue de ces cinétiques, ne montrent pas de modifications significatives.

Complexes	τ avant compétition	τ après compétition (51 h)
L₁.Eu	0,59 ms	1,01 ms
L₂.Eu	1,20 ms	1,31 ms
L₃.Eu	0,57 ms	0,57 ms

Tableau 10. Durée de vie de luminescence des complexes **L₁.Eu**, **L₂.Eu** et **L₃.Eu** avant et après compétition avec 10 équivalents d'EDTA.

Chapitre III

On constate que la durée de vie de luminescence du complexe **L₁.Eu** est modifiée, elle est augmentée d'un facteur 1,7. La molécule d'eau présente dans la sphère de coordination de Eu^{3+} pour ce complexe est donc partiellement substituée par l'EDTA (τ après compétition $< \tau_D = 1,8$ ms). Bien que les propriétés spectrales ne soient pas modifiées, il est possible que l'addition de 10 équivalents d'EDTA se traduise par un équilibre dans lequel un complexe ternaire du type **L₁.Eu.EDTA** serait impliqué. Dans ces conditions, on ne peut extraire de cette cinétique de compétition une constante de stabilité conditionnelle pour le complexe **L₁.Eu**.

Pour les complexes **L₂.Eu** et **L₃.Eu**, leurs durées de vie de luminescence n'ont pas significativement variées en fin de cinétique de compétition ce qui permet de s'assurer que les entités complexantes sont restées intactes. De ces cinétiques, les valeurs des constantes conditionnelles en tampon Tris à pH 7,3 ont été déterminées pour les deux complexes, à savoir : $\log K_{\text{cond}} = 13,9$ pour **L₃.Eu** et $\log K_{\text{cond}} = 16,6$ pour **L₂.Eu**. (Voir partie expérimentale, pour le calcul de ces constantes K_{cond}).

Le complexe **L₃.Eu** à pH 7,3 présente ainsi une constante de stabilité conditionnelle égale à $7,93 \cdot 10^{13}$ soit 3 fois plus faible que celle du complexe d'euporium avec l'EDTA ($2,5 \cdot 10^{14}$). En revanche, le complexe **L₂.Eu** présente une stabilité beaucoup plus élevée, avec une constante de stabilité conditionnelle égale à $3,98 \cdot 10^{16}$, soit du même ordre de grandeur que celle calculée pour le complexe d'euporium avec le DTPA (acide diéthylène triamine pentaacétique) à pH 7,3 ($9,6 \cdot 10^{17}$).

Comparées à celles de leurs homologues macrocycliques à motif acide diéthylène triamine triacétique précédemment obtenus au laboratoire (macrocycles à 15 et 18 chaînons : **L_{2a}.Eu** et **L_{3a}.Eu** : Figure 14), les valeurs de constantes de stabilité conditionnelles pour **L₂.Eu** (cycle à 18 chaînons) et **L₃.Eu** (cycle à 21 chaînons) sont plus faibles. La stabilité est en particulier fortement altérée dans le cas du complexe **L₃.Eu** où la partie aminocarboxylique a été remplacée par le motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique pour conduire à une cavité finalement moins appropriée pour une complexation efficace de l'ion lanthanide.

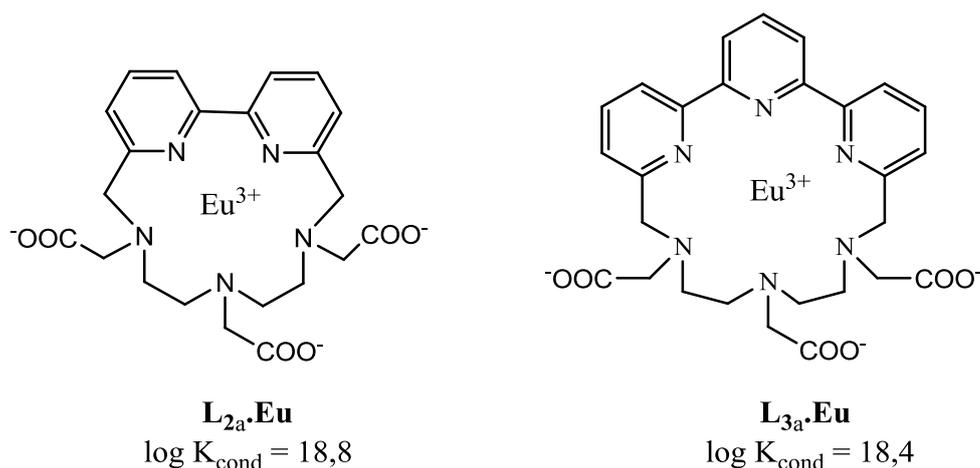


Figure 14. Constantes de stabilité conditionnelles des homologues macrocycliques à motif acide diéthylène triamine triacétique ⁽¹⁶⁾ **L_{2a}.Eu** et **L_{3a}.Eu** déterminées à pH 7,3.

I.3.3. Influence du milieu tampon

Afin d'étudier l'effet d'autres milieux tampons (tampon phosphate à 50 mM, pH 8 et tampon Hepes à 50 mM, pH 7,3) ainsi que la présence de protéine (l'albumine de sérum bovin à 5 mg/mL) sur la luminescence des complexes **L₁.Ln**, **L₂.Ln** et **L₃.Ln** (Ln= Eu et Tb), nous avons mesuré les durées de vie de luminescence et calculé les surfaces d'émission corrigées des complexes après 24h d'incubation dans ces différents milieux. Les valeurs obtenues sont comparées à celles obtenues en tampon Tris (tableau 11).

Complexes		Tp Tris	Tp Phosphate	Tp Hepes	BSA /Tp Tris
L₁.Tb	τ_H (ms)	1,55	2,62	1,31	----
	S _{corrigée}	1	0,5	1,1	----
L₂.Tb	τ_H (ms)	2	2,6	2	2,2
	S _{corrigée}	1	0,96	1,00	1,20
L₃.Tb	τ_H (ms)	0,89	0,89	0,66	0,85
	S _{corrigée}	1	0,15	0,77	0,75
L₁.Eu	τ_H (ms)	0,59	0,93	0,60	---
	S _{corrigée}	1	0,49	1,19	---
L₂.Eu	τ_H (ms)	1,24	1,25	1,22	1,16
	S _{corrigée}	1	0,87	1,25	1,02
L₃.Eu	τ_H (ms)	0,55	0,56	0,56	0,78
	S _{corrigée}	1	0,06	1,01	0,87

Tableau 11. Durées de vie de luminescence et surfaces d'émission corrigées des complexes **L₁.Ln**, **L₂.Ln** et **L₃.Ln** (Ln= Eu et Tb) dans différents milieux.

Chapitre III

On observe que les propriétés de luminescence des complexes **L₂.Ln** sont indépendantes du milieu de mesure. Parmi les différents tampons utilisés nous n'observons pas de grandes variations que ce soit au niveau des durées de vie d'émission ou au niveau des intensités d'émission de luminescence. On remarque également que la présence de protéine dans le milieu n'altère pas ses propriétés de luminescence ce qui suggère l'absence d'interaction entre la protéine et les complexes **L₂.Ln**.

Pour les deux autres types de complexes, **L₁.Ln** et **L₃.Ln**, on constate des modifications de leurs propriétés de luminescence essentiellement dans le milieu tampon phosphate. Pour les complexes **L₁.Ln**, la présence d'ions phosphates se traduit par une augmentation des durées de vie de luminescence (0,59 à 0,93 ms pour **L₁.Eu** et 1,55 à 2,62 ms pour **L₁.Tb**). Les ions phosphates peuvent en effet déplacer partiellement les molécules d'eau résiduelles de la sphère de coordination du lanthanide et réduire ainsi l'effet désactivant des molécules d'eau. On observe aussi une diminution de moitié des surfaces d'émission de luminescence, ce qui indique que le tampon phosphate entraîne une dissociation partielle des complexes **L₁.Ln**.

Pour les complexes **L₃.Ln**, la présence d'ions phosphate se traduit par une chute des surfaces d'émission de luminescence sans altérer les durées de vie ce qui est significatif d'une dissociation importante des complexes dans ce milieu.

Les propriétés de luminescence des complexes **L₁.Ln** et **L₃.Ln** sont conservées dans les deux autres milieux (tampon Hepes et Tris + BSA à 5 mg/mL). A noter que l'interaction éventuelle entre la BSA et les complexes du type **L₁.Ln** ne peut être évaluée. En effet, l'albumine de sérum bovin utilisée en large excès ici est une protéine qui absorbe dans la région d'absorption des complexes à base de pyridine (vers 260-280 nm) ce qui masque leur photoluminescence.

Les complexes du type **L₂.Ln** étant ceux présentant une plus grande inertie vis-à-vis des autres milieux étudiés, nous avons poursuivi notre étude de stabilité avec le complexe **L₂.Tb** qui possède d'autre part les meilleures caractéristiques de luminescence.

1.3.4. Stabilité en milieu sérique

La figure 15 montre que l'intensité de fluorescence du complexe **L₂.Tb** ($3,2 \cdot 10^{-5}$ M) dans un mélange tampon Tris/sérum humain (1/3 à pH 7,3) reste constante après 48 heures d'incubation. Nous n'observons pas de démétallation/transmétallation par les protéines ou les

ions présents dans le sérum. La durée de vie reste inchangée ce qui suggère qu'il n'y a pas d'interaction entre le complexe et les protéines du sérum. Toutes ces observations confirment donc une stabilité élevée pour le complexe **L₂.Tb**.

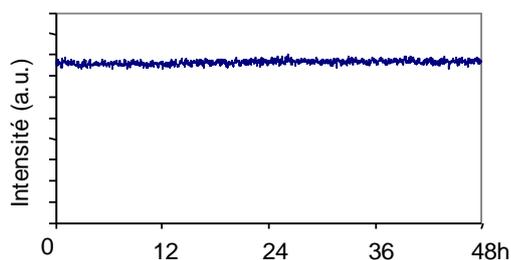


Figure 15. Cinétique du complexe **L₂.Tb** ($3,2 \cdot 10^{-5}$ M) pendant 48h dans le tampon Tris/sérum humain 1/3 à pH 7,3 ($\lambda_{exc} = 319$ nm).

L'utilisation de ce complexe comme sonde luminescente dans un milieu sérique est donc possible. Nous rappelons ici que l'intérêt d'une telle sonde à longue durée de vie permet de s'affranchir de la fluorescence parasite du milieu biologique et améliore la spécificité du signal. Ainsi, comme cela est illustré dans la figure 16, la détection non résolue dans le temps du signal fluorescent de **L₂.Tb** en milieu sérique conduit à un spectre complexe : les raies d'émission de **L₂.Tb** sont « noyées » sous la fluorescence des protéines à laquelle se rajoutent les bandes de diffusions Rayleigh. En appliquant un délai d'enregistrement de 100 μ s, on observe un signal temporellement stable, précis et exempt de toute perturbation induite par le milieu biologique.

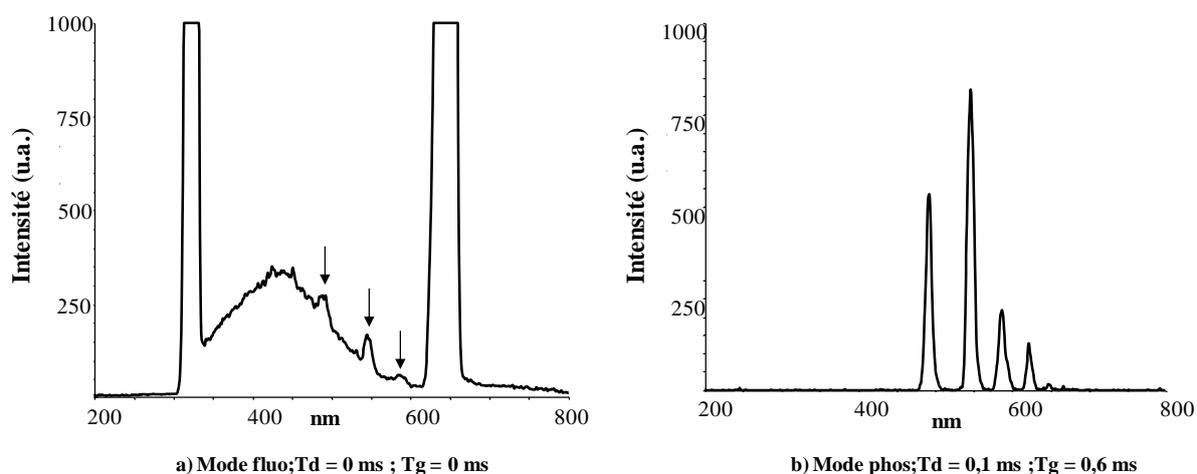


Figure 16. Spectres d'émission de luminescence de **L₂.Tb** dans le tampon Tris/sérum sanguin 1/3 à pH 7,3 (ex./em. 5/5 nm ; $\lambda_{exc} = 319$ nm). **a)** Détection non résolue dans le temps; **b)** détection résolue dans le temps : temps de délai = 0,1 ms ; temps d'acquisition = 0,6 ms.

I.3.5. Comparaison avec leurs homologues macrocycliques à motif acide diéthylène triamine triacétique

Nous allons maintenant comparer les propriétés photophysiques des complexes $L_1.Ln$, $L_2.Ln$ et $L_3.Ln$ à celles de leurs homologues macrocycliques à motif acide diéthylène triamine triacétique $L_{1a}.Ln$, $L_{2a}.Ln$ et $L_{3a}.Ln$ représentés figure 17.

Le tableau 12 compare les principales caractéristiques photophysiques des complexes en solution dans le tampon Tris (50 mM, pH 7,3) pour la série $L_1.Ln$, $L_2.Ln$ et $L_3.Ln$ et en tampon Hepes (50 mM, pH 7,3) pour la série homologue $L_{1a}.Ln$, $L_{2a}.Ln$ et $L_{3a}.Ln$. Bien que les deux milieux tampons utilisés soient différents, nous avons vu dans le paragraphe I.3.3 que les propriétés de luminescence de la série $L_1.Ln$, $L_2.Ln$ et $L_3.Ln$ étaient comparables dans ces deux tampons.

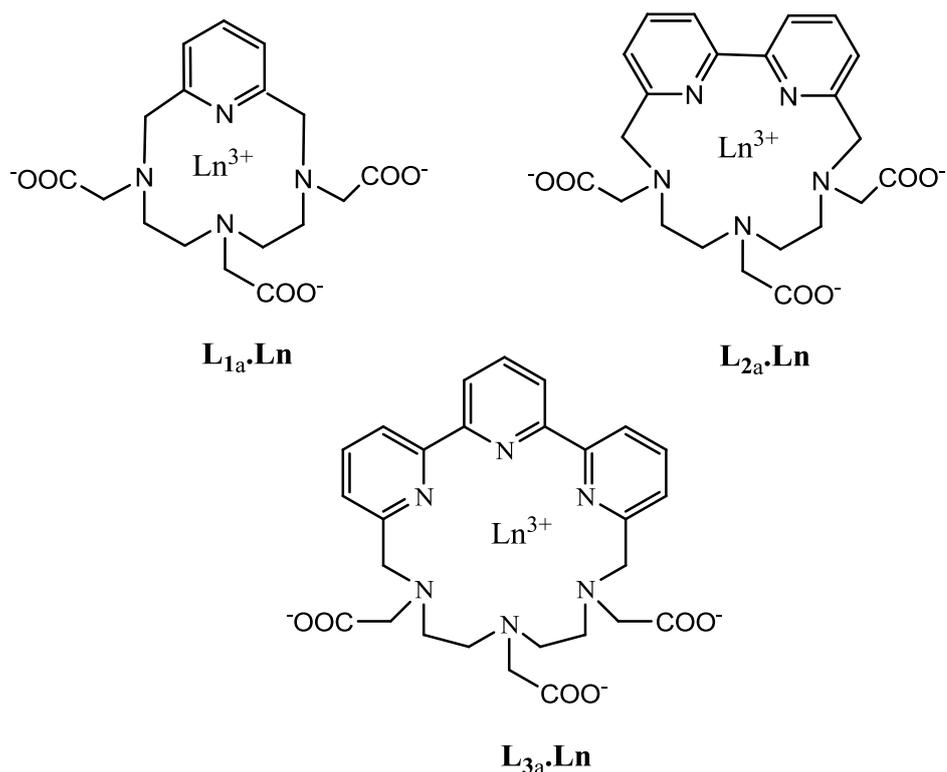


Figure 17. Structure des dérivés $L_{1a}.Ln$, $L_{2a}.Ln$ et $L_{3a}.Ln$.

Complexes		λ_{exc} (nm)	$\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms)	n (H ₂ O)	Φ_{H} (%)	$\Phi_{\text{CIS}} \cdot \Phi_{\text{ET}}$ (%)
L₁^(a)	Eu ³⁺	268	0,67	0,8	0,6	1,8
	Tb ³⁺	268	1,54	1,3	8,3	16
L_{1a}^(b)	Eu ³⁺	268	0,41	2	3	14
	Tb ³⁺	268	1,31	1,69	13	27
L₂^(a)	Eu ³⁺	309	1,13	0	5	9
	Tb ³⁺	309	2,18	0	26	34
L_{2a}^(b)	Eu ³⁺	310	0,56	1,2	10	33
	Tb ³⁺	310	1,28	1,2	21	42
L₃^(a)	Eu ³⁺	326	0,76	0,59	4,5	11
	Tb ³⁺	326	0,89	1,3	9,2	29
L_{3a}^(b)	Eu ³⁺	335	1,08	0,1	17	27
	Tb ³⁺	335	0,42	0,1	6	-

Tableau 12. Caractéristiques photophysiques des complexes **L₁.Ln**, **L₂.Ln** et **L₃.Ln** et de **L_{1a}.Ln**, **L_{2a}.Ln** et **L_{3a}.Ln**. (a) dans le tampon TRIS, pH 7,4 ; (b) dans le tampon HEPES, pH 7,3.

Commençons par l'examen des durées de vie de luminescence et du nombre de molécules d'eau. On observe que l'introduction du motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique dans ces macrocycles a permis d'augmenter la durée de vie de luminescence et d'améliorer la protection de l'ion dans le cas des structures à base de pyridine ou bipyridine. En effet, on a supprimé une molécule d'eau résiduelle en passant des complexes **L_{1a}.Ln** → **L₁.Ln** et **L_{2a}.Ln** → **L₂.Ln** ; et la durée de vie d'émission a été, en particulier, presque doublée pour les complexes **L₂.Ln** : $\tau = 0,56$ ms à 1,13 ms pour **L_{2a}.Eu** → **L₂.Eu** ; $\tau = 1,28$ ms à 2,18 ms pour **L_{2a}.Tb** → **L₂.Tb**.

Pour les structures incorporant le chromophore terpyridine (**L₃** et **L_{3a}**), la situation est plus complexe. La protection de l'ion, qui était optimale avec **L_{3a}**, est bien moins assurée avec le ligand **L₃** ($n_{\text{H}_2\text{O}} = 0,6-1,3$). Alors que le ligand **L_{3a}** utilisait ses neuf hétéroatomes pour complexer l'ion, ce nouveau ligand **L₃** avec ses onze sites de coordination potentiels ne permet pas de saturer complètement la sphère de coordination de l'ion. La cavité du macrocycle **L₃** étant probablement beaucoup trop grande, elle ne peut s'ajuster convenablement à la taille de l'ion. La comparaison des valeurs de λ_{exc} montre en effet une interaction amoindrie entre le lanthanide et le chromophore pour les complexes du type **L₃.Ln**.

La série des complexes à motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique présente pour la plupart des rendements quantiques plus faibles. L'introduction de ce motif a en effet pour

conséquence d'agrandir la taille du macrocycle de 3 chaînons par rapport à la série homologue ce qui modifie l'interaction entre le chromophore et le métal et diminue ainsi significativement le rendement de transfert d'énergie ligand –métal. A noter toutefois que cette modification structurale n'affecte pas les propriétés luminescentes du complexe **L₂.Tb** qui se caractérise par une durée de vie d'émission particulièrement longue ($\tau = 2,18$ ms) et un rendement quantique élevé de 26 %.

II Macrocycles incorporant un chromophore pyridine-pyrazole (**L₆**), pyridine-pyrazole-pyridine (**L₇**), pyrazole-pyridine-pyrazole (**L₈**)

Des rendements quantiques supérieurs à 29% ont été rapportés par Rodriguez-Ubis et coll ⁽²⁰⁾ pour des complexes Tb³⁺ dérivés de ligands polyaminocarboxyliques intégrant dans leurs structures soit le motif 2,6-bis (N-pyrazolyl) pyridine, soit le motif 1,3-bis(pyridin-2-yl)pyrazole (Figure 18). L'excellent effet d'antenne de ces chromophores tridentés pour photosensibiliser l'ion terbium a été relié à la bonne position énergétique des états triplet ($23200 < E_{3\pi\pi^*} < 26500$ cm⁻¹) ⁽⁵⁾.

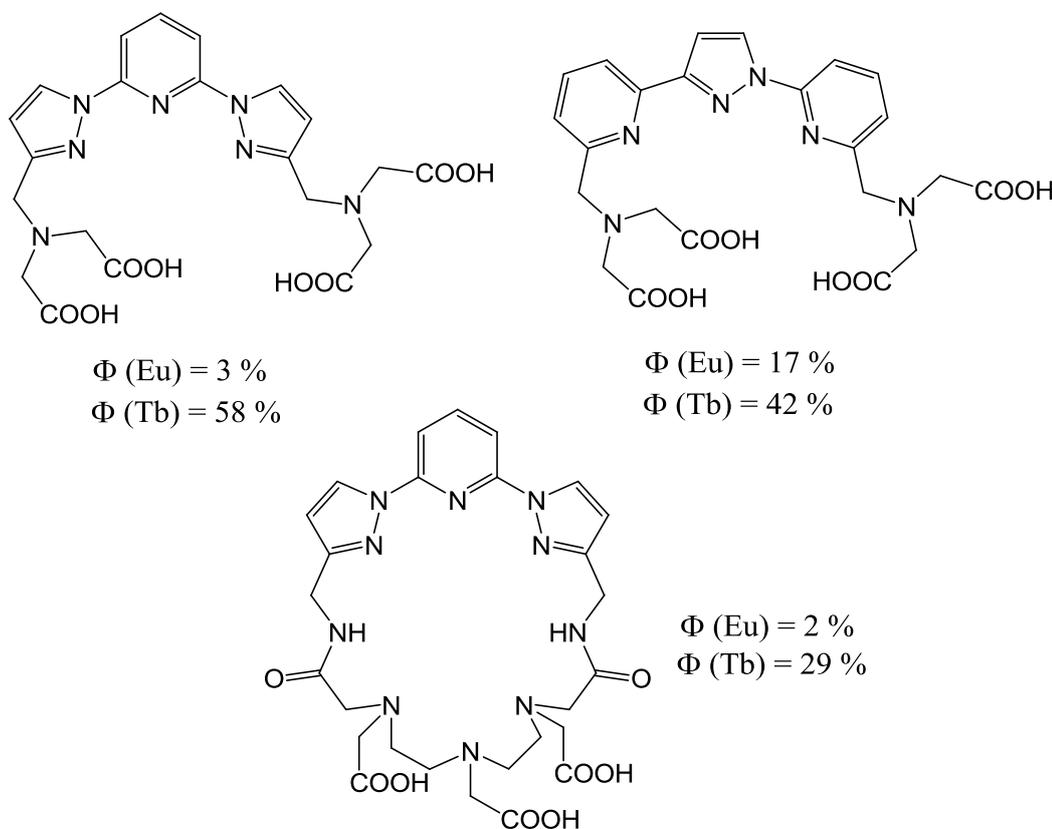


Figure 18. Rendements quantiques des complexes d'Eu³⁺ et Tb³⁺ de ligands polyaminocarboxyliques à motifs 2,6-bis (N-pyrazolyl) et 1,3-bis(pyridin-2-yl)pyrazole ⁽²⁰⁾.

Chapitre III

Récemment, l'émission sensibilisée de l'ion Tb^{3+} complexé par des ligands porteurs du motif N,C-pyrazolypyridine a été rapportée par plusieurs groupes ^(21,22) y compris notre équipe ^(23,24). Bien que le motif N, C-pyrazolypyridine ait fait l'objet de moins d'attention que le motif bidenté 2,2'-bipyridine, il présente des propriétés particulièrement intéressantes pour collecter les photons et les transférer à l'ion terbium.

Ainsi, par exemple, le complexe Tb^{3+} du macrocycle à motif pyridine-pyrazole (Figure 19) présente un rendement quantique de 49 % (une des valeurs les plus élevées de la littérature ^(5, 25-28) avec une efficacité de transfert ligand-métal de 84 %. Ces valeurs sont deux fois plus grandes que celles de l'analogue macrocyclique à motif bipyridine (Figure 19) et sont reliées à la position tout à fait appropriée de l'état triplet du ligand par rapport à l'état émissif de l'ion Tb^{3+} ($E_{3\pi\pi^*} = 26250 \text{ cm}^{-1}$ pour $L_{6a}\cdot Gd$ ⁽²³⁾ et 22400 cm^{-1} pour $L_{2a}\cdot Gd$ ⁽²⁹⁾). Les propriétés de luminescence du complexe $L_{6a}\cdot Tb$ pourraient être encore améliorées si la molécule d'eau présente dans la première sphère de coordination de l'ion était supprimée.

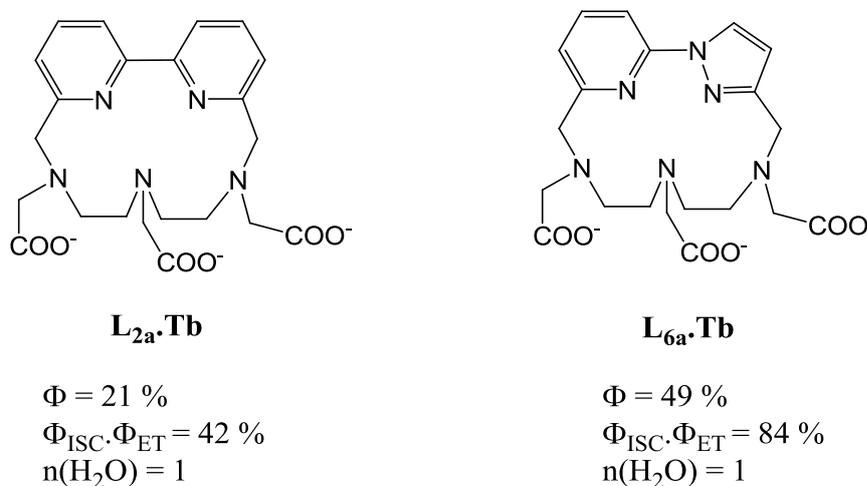


Figure 19. Complexes Tb^{3+} des macrocycles à motif bipyridine et N, C-pyrazolypyridine.

C'est dans ce contexte que nous rapportons l'évaluation des propriétés photophysiques des complexes macrocycliques à motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique incorporant les trois types de chromophores pyrazole-pyridine tridentés et bidenté précédemment cités. La structure des ligands complexants est rappelée dans la figure 20 ci-dessous.

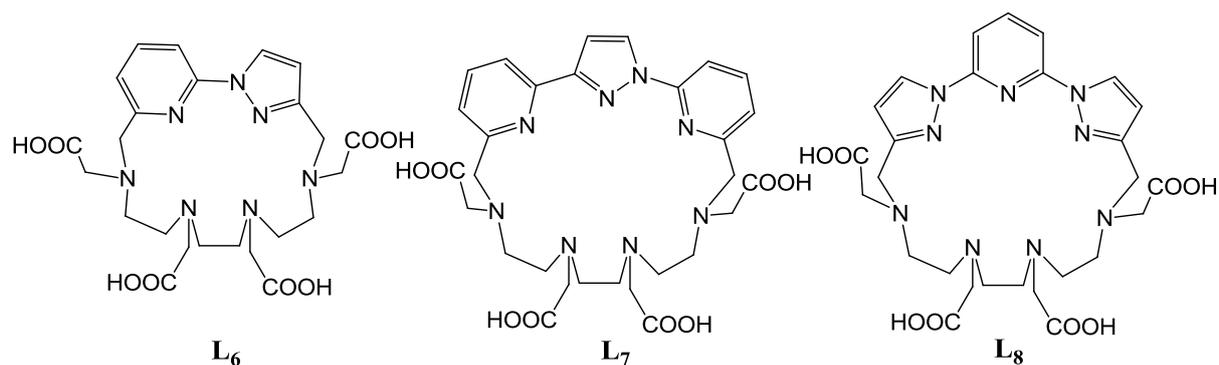


Figure 20. Structure des ligands L_6 , L_7 et L_8 .

II.1. Propriétés d'absorption des ligands et de leurs complexes Eu^{3+} et Tb^{3+}

Le tableau 13 rassemble les caractéristiques spectroscopiques UV des ligands et de leurs complexes :

Ligand	Ln^{3+}	λ nm (ϵ $M^{-1}.cm^{-1}$)
L_6	-	255 (6200); 288 (6300)
	Eu^{3+}	255 (8100); 292 (7800)
	Tb^{3+}	255 (7500); 292 (7450)
L_7	-	259 ^{ép} (6400); 302 (13700)
	Eu^{3+}	257 ^{ép} (7720); 309 (13320)
	Tb^{3+}	257 ^{ép} (7000); 308 (12320)
L_8	-	263 (8825); 302 (10800)
	Eu^{3+}	269 (9970); 277 (9000); 307 (8800)
	Tb^{3+}	269 (9290); 277 (8400); 307 (8200)

Tableau 13. Caractéristiques d'absorption des ligands L_6 , L_7 et L_8 et de leurs complexes dans un tampon Tris (50 mM pH 7,4).

Les spectres d'absorption des ligands L_6 , L_7 et L_8 présentent deux régions d'absorption intenses centrées autour de 255-263 nm et de 288-302 nm attribuées aux transitions $\pi-\pi^*$ des chromophores (Figure 21) ; les coefficients d'extinction molaires les plus élevés sont observés pour les macrocycles incorporant les chromophores tridentés. Ces

transitions subissent un déplacement bathochrome de 4 à 7 nm lors de la complexation des ions $\text{Eu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ ce qui permet de mettre évidence une interaction chromophore-métal dans ces structures macrocycliques.

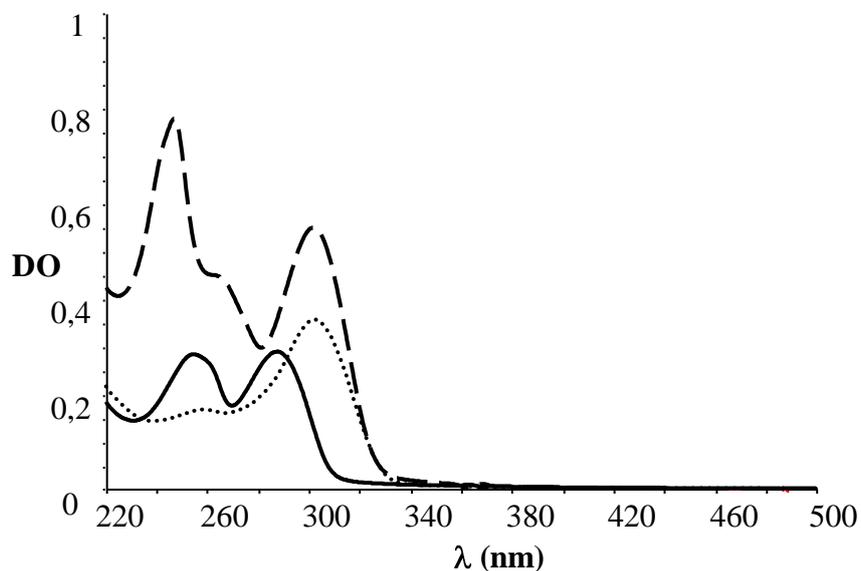


Figure 21. Spectres d'absorption UV des ligands L_6 (—), L_7 (⋯), L_8 (---) en tampon Tris (50 mM, pH 7,4). $[\text{L}_6] = 4,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{L}_7] = 2,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{L}_8] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

II.2. Propriétés photophysiques des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+}

L'excitation, au niveau des bandes d'absorption de plus faible énergie, pour des solutions de complexes à des concentrations de l'ordre de 10^{-5} M en tampon Tris, nous a conduit à l'obtention des spectres d'émission de luminescence caractéristiques des ions Eu^{3+} ou Tb^{3+} complexés. De manière qualitative, nous avons observé des émissions nettement plus intenses avec les complexes Tb^{3+} . Les spectres d'émission de luminescence des complexes Eu^{3+} ont montré des allures, au niveau de la raie ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_4$, significativement différentes, ce qui est en accord avec un environnement structural de l'ion différent au sein de ces trois types de ligands (Figure 22). Enfin, les spectres d'excitation de luminescence des complexes reproduisent bien l'allure des bandes d'absorption UV ce qui démontre l'effet d'antenne du chromophore.

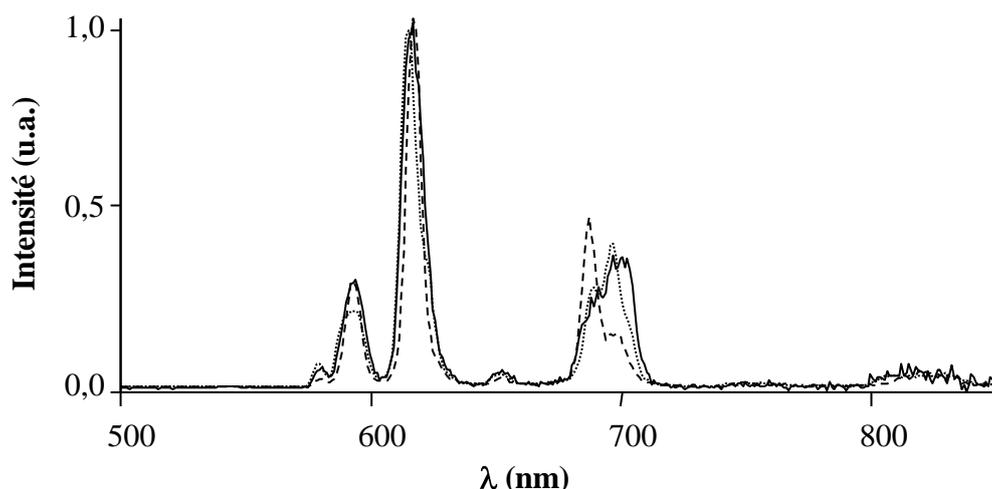


Figure 22. Spectres d'émission de luminescence corrigés et normalisés des complexes **L₆Eu** (---) (à $1,5 \cdot 10^{-5}$ M; $\lambda_{\text{ex}} = 293$ nm) ; **L₇Eu** (.....) (à $1,3 \cdot 10^{-5}$ M; $\lambda_{\text{ex}} = 309$ nm) ; **L₈Eu** (—) (à 10^{-5} M; $\lambda_{\text{ex}} = 307$ nm) en tampon Tris 50 mM pH 7,4. Fentes exc./em. = 5/5 nm. Mode phosphorescence : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 0,4 ms.

Les caractéristiques photophysiques des complexes ont été déterminées en tampon Tris (50 mM, pH 7,3) et sont rassemblées dans le tableau 14 ci-dessous.

Complexes		$\tau_{\text{H}}^{298\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}}^{298\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{H}}^{77\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}}^{77\text{K}}$ (ms)	$n_{\text{H}_2\text{O}}^{(a)}$	$\Phi_{\text{H}}(\%)$	$\Phi_{\text{D}}(\%)$
L₆	Eu³⁺	1,28	1,92	1,49	1,92	0	5	7
	Tb³⁺	2,53	3	2,53	3	0	31	31
L₇	Eu³⁺	0,93	1,66	1,14	1,74	0,26	4	7
	Tb³⁺	2,33	2,93	2,33	2,93	0,13	17	28
L₈	Eu³⁺	0,48	1,4	0,79	1,63	1,34	0,1	0,2
	Tb³⁺	2	2,7	2,35	2,86	0,34	7	8

Tableau 14. Caractéristiques photophysiques des complexes d'Eu³⁺ et Tb³⁺ issus des ligands **L₆**, **L₇** et **L₈**. (a) Calculé selon la formule de Parker ⁽¹⁰⁾.

A la lecture de ce tableau, les commentaires suivants peuvent être formulés :

Chapitre III

- L'utilisation de la relation de Parker ⁽¹⁰⁾ met en évidence l'absence de molécules d'eau coordonnées à l'ion Eu^{3+} ou Tb^{3+} dans les complexes dérivés des ligands **L₆** et **L₇**. Ces structures utilisent une partie de leurs 10 à 11 sites de coordination pour assurer une protection efficace des ions Eu^{3+} , Tb^{3+} . Concernant le ligand **L₈**, un nombre de molécules d'eau différent est calculé selon la nature du métal complexé. Alors que pour **L₈.Tb** la sphère de coordination de l'ion ne semble pas présenter de molécules d'eau ($n_{\text{H}_2\text{O}} = 0,34$), nous observons une valeur de $n_{\text{H}_2\text{O}}$ égale à 1,34 pour **L₈.Eu**. Calculés à basse température, ces nombres de molécules d'eau sont plus faibles et paraissent plus proches de la réalité: $n_{\text{H}_2\text{O}} = 0,08$ pour **L₈.Tb**, $n_{\text{H}_2\text{O}} = 0,48$ pour **L₈.Eu**. Ces différences pourraient s'expliquer par la présence à température ambiante d'un équilibre entre différents états d'hydratation des complexes.
- Les durées de vie à température ambiante des complexes de terbium, supérieures à 2 ms, sont particulièrement longues. La durée de vie du complexe **L₆.Tb** en solution aqueuse à température ambiante, égale à 2,53 ms, fait partie de celles qui sont les plus élevées de la littérature ⁽²⁰⁾. Les durées de vie d'émission en milieu deutéré varient peu lorsqu'on abaisse la température à 77K : les processus non radiatifs activés thermiquement sont donc peu efficaces pour l'ensemble des complexes ($k_{\text{nr}}f(T) < 100 \text{ s}^{-1}$).
- D'après les valeurs de rendements quantiques, on constate que les trois types de chromophore pyrazole-pyridine sensibilisent plus efficacement l'ion Tb^{3+} ($7\% < \Phi_{\text{H}} < 31\%$) que l'ion Eu^{3+} ($\Phi_{\text{H}} < 5\%$). Le complexe **L₆.Tb** est celui qui présente le rendement quantique le plus élevé (31 %) ; comparé à son homologue à motif acide diéthylène triamine triacétique **L_{6a}.Tb** ($\Phi_{\text{H}} = 49 \%$, $\tau_{\text{H}} = 1,85 \text{ ms}$ ⁽²³⁾) ; le rendement quantique est plus faible mais la protection de l'ion est mieux assurée ce qui lui confère une durée de vie plus longue. Les complexes **L₇.Tb** et **L₈.Tb** présentent également des rendements quantiques bien moins élevés que ceux des homologues acycliques ou macrocycliques décrits par Rodriguez-Ubis et coll ⁽²⁰⁾ (Figure 18). Afin de mieux comprendre le mécanisme de photoluminescence impliqué dans ces complexes, nous avons déterminé les différents rendements du processus A-TE-E ainsi que les valeurs des niveaux d'énergie d'état triplet (tableau 15).

Complexes		$\Phi_{\text{obsH}_2\text{O}}$ (%)	$\Phi_{\text{CIS x ET}}$ (%)	Φ_{Ln} (%)	${}^3\pi\pi^*$ (cm^{-1}) (ΔE (${}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^5\text{D}_4$) cm^{-1})
L₆	Eu³⁺	5	7,2	69	26250
	Tb³⁺	31	37	84	(5750)
L₇	Eu³⁺	4	7,5	53	22900
	Tb³⁺	17	21	79,5	(2400)
L₈	Eu³⁺	0,1	0,3	29	25000
	Tb³⁺	7	10	70	(4500)

Tableau 15. Valeurs des rendements Φ_{H} , $\Phi_{\text{CIS x ET}}$ et Φ_{Ln} des complexes d'euporium et de terbium des ligands **L₆**, **L₇** et **L₈**. Niveaux d'énergie ${}^3\pi\pi^*$ (cm^{-1}) déterminés à partir des spectres de phosphorescence des complexes **L₆.Gd**, **L₇.Gd** et **L₈.Gd** dans MeOH/EtOH 4/1 à 77K. ΔE (${}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^5\text{D}_4$) avec ${}^5\text{D}_4$ à 20500 cm^{-1} pour **Tb³⁺** est indiqué entre parenthèses.

Au niveau du processus A-TE-E, on peut observer que la désactivation radiative à partir de l'état émissif de l'ion **Tb³⁺** s'effectue avec d'excellentes efficacités de luminescence : $\Phi_{\text{Tb}} > 70$ %. Pour les complexes **Eu³⁺**, ces efficacités sont moins élevées et en particulier pour **L₈.Eu** où la présence de vibrateurs O-H à température ambiante affecte le processus de désactivation radiative à hauteur de 66 % ($k_{\text{OH}} / k_{\text{obs}} = 66$ %).

Au niveau du rendement $\Phi_{\text{CIS x ET}}$, les valeurs observées montrent que les processus de transfert d'énergie ligand-Tb* sont peu efficaces bien que les valeurs de niveaux d'énergie d'état triplet sont correctement positionnées par rapport au niveau émissif de l'ion **Tb³⁺** ($\Delta E({}^3\pi\pi^* \rightarrow {}^5\text{D}_4) > 2000$ cm^{-1}). Ces efficacités, comprises entre 10 et 37 %, décroissent selon l'ordre **L₆.Tb** → **L₇.Tb** → **L₈.Tb**. L'augmentation de la taille du cycle (18 à 21 chaînons) ainsi que le passage d'un chromophore tridenté pyridine-pyrazole-pyridine à pyrazole-pyridine-pyrazole (**L₇.Tb** → **L₈.Tb**) se traduit par une diminution du transfert d'énergie ligand-métal. Les macrocycles **L₇** et **L₈** à motif acide triéthylène tétraamine tétraacétique apparaissent donc bien moins appropriés pour une photosensibilisation efficace de l'ion **Tb³⁺** que leurs homologues acycliques décrits par Rodriguez-Ubis (Figure 18). La raison principale est probablement liée à des facteurs géométriques: une distance ou une orientation inadéquate entre le chromophore et le métal qui ne permet pas d'assurer un transfert d'énergie ligand-métal performant.

Chapitre III

De cette nouvelle série de complexes à motifs pyrazole-pyridine, il ressort que le complexe **L₆Tb**, avec un rendement quantique de 31 % et une durée de vie de luminescence de 2,53 ms, possède des caractéristiques de luminescence tout à fait intéressantes et compatibles pour une application comme par exemple en tant que fluorophore donneur dans la technique de transfert d'énergie par résonance de luminescence. C'est ce que nous allons montrer dans le paragraphe suivant.

II.3. Application de la technique de LRET au cas du complexe L₆Tb

Le transfert d'énergie par résonance de fluorescence appelée FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est une technique d'analyse largement utilisée en biologie, notamment pour étudier des interactions biologiques mettant en jeu des distances de l'ordre de 10 à 80 Å. C'est une technique précieuse pour les biologistes car elle leur offre la possibilité d'effectuer des mesures d'interaction entre biomolécules dans des conditions physiologiques, avec une résolution proche de l'Angström et la sensibilité élevée d'une mesure de fluorescence ⁽³⁰⁾. Comme on l'a vu au cours du premier chapitre, le FRET repose sur l'utilisation d'un composé donneur fluorescent et d'un composé accepteur, éventuellement fluorescent, chacun couplé à une molécule biologique. Lorsque l'interaction biologique que l'on veut étudier provoque le rapprochement des deux biomolécules, l'excitation lumineuse du composé donneur conduit à un transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur qui se traduit par une modification de la luminescence émise dans le milieu de mesure.

L'efficacité du FRET est proportionnelle à l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux molécules donneur / accepteur selon l'équation 24.

$$E = 1 / (1 + (R/R_0)^6) \quad [24]$$

où E est l'efficacité de transfert d'énergie définie comme le rapport entre l'énergie transférée du donneur à l'accepteur sur l'énergie absorbée par le donneur ; R est la distance effective qui sépare les deux molécules et R₀ est le rayon de Förster c'est à dire la distance entre le donneur et l'accepteur correspondant à une efficacité de transfert de 50%.

La distance R₀ est une caractéristique spectrale du couple donneur-accepteur utilisé qui est déterminée à l'aide des équations suivantes :

$$J = \int \epsilon_A(\lambda) \cdot F_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda / \int F(\lambda) d\lambda \quad (\text{en } M^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4) \quad [25]$$

Chapitre III

$$R_0 = (8,785 \cdot 10^{-5} \cdot \Phi_D \cdot \kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot J)^{1/6} \text{ (en \AA)} [26]$$

Dans l'équation [25], J représente l'intégrale de recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur; ϵ_A est le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur; F_D est l'intensité de fluorescence du donneur exprimée en unité arbitraire et λ la longueur d'onde exprimée en nm.

Dans l'équation [26], Φ_D est le rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur, κ^2 est un facteur géométrique en rapport avec l'orientation relative des dipôles de transition du couple donneur-accepteur, J l'intégrale de recouvrement et n l'indice de réfraction du milieu.

L'efficacité E est déterminée expérimentalement par des mesures d'intensités ou de durées de vie d'émission de luminescence du donneur en l'absence (I_D , τ_D) et en présence de l'accepteur (I_{DA} , τ_{DA}) :

$$E = 1 - (\tau_{DA} / \tau_D) = 1 - (I_{DA} / I_D) [27]$$

Ainsi les équations [24] et [27] montrent que l'efficacité E augmente rapidement lorsque la distance donneur – accepteur (R) diminue et cela se traduit aussi par une diminution de la durée de vie du donneur en présence de l'accepteur (τ_{DA}).

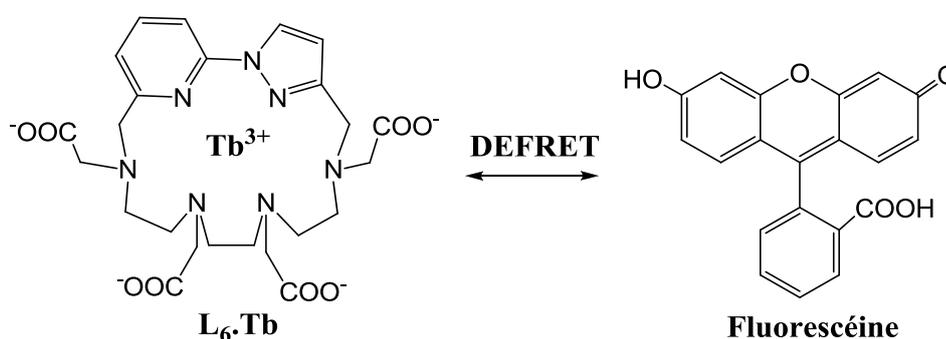
Les complexes de lanthanide sont des composés donneurs de FRET particulièrement intéressants car ils produisent, par rapport à un donneur conventionnel (fluorophore organique), un transfert d'énergie conduisant à une variation spécifique de la luminescence dans un milieu biologique. En effet, d'une part, leur déplacement de Stokes élevé permet de limiter l'excitation directe du composé accepteur. Et d'autre part, leur spectre d'émission sous forme de raies fines associé à une longue durée de vie d'émission permet la mesure spécifique d'un signal lumineux issu d'un milieu biologique en appliquant une résolution spectrale et temporelle lors de la mesure du signal. L'utilisation d'un donneur « complexe de lanthanide » permet de plus de corriger l'effet de filtre interne que peut générer l'excitation d'un milieu biologique dans le domaine UV (domaine d'excitation des complexes de lanthanide) ⁽³¹⁾. En effet, l'effet de filtre interne, variable selon les milieux biologiques, induit une diminution de l'intensité du signal émise par le donneur et par l'accepteur. La rationalisation du signal de l'accepteur par rapport à celui du donneur apporte une correction efficace du signal de FRET. Cette technique conduite avec des composés donneurs « complexe de lanthanide », souvent désignée par LRET (Luminescence Resonance Energy Transfer), est développée dans de

Chapitre III

nombreuses applications biologiques *in vitro* comme nous l'avons signalé au cours du premier chapitre.

Plus récemment, le phénomène de transfert d'énergie entre deux composés donneur (complexe de lanthanide) et accepteur en mode « dynamique », c'est-à-dire un transfert d'énergie reposant sur la diffusion libre d'un ou des deux partenaires de FRET (technique désignée par l'acronyme DEFRET pour Diffusion Enhanced Fluorescence Resonance Energy Transfer), a été utilisé pour des études *in cellulo*. Par exemple, Zheng et al ⁽³²⁾ ont synthétisé une série de complexes Tb³⁺ macrocycliques lipophiles capables de s'insérer dans les membranes lipidiques pour des applications de marquage cellulaire. La localisation cellulaire des complexes Tb³⁺ lipophiles a été démontrée par la technique DEFRET en utilisant comme accepteur une calcéine estérifiée (un dérivé de la fluorescéine) insérée à l'intérieure de la cellule. En 2010, la Société Cis bio international a déposé un brevet pour détecter l'internalisation des protéines membranaires basée sur l'utilisation de cette technique également ⁽³³⁾. Ils utilisent des complexes Eu³⁺ ou Tb³⁺ pour marquer les protéines d'intérêt. Après ajouts dans le milieu réactionnel d'un composé susceptible de provoquer l'internalisation de la protéine et de l'accepteur qui va diffuser librement à la surface de la cellule, ils détectent cette internalisation par la mesure du signal luminescent résultant du DEFRET.

Sur la base de ces résultats récemment publiés, nous avons donc voulu tester le potentiel du complexe **L₆.Tb** à agir en tant que donneur dans une expérience de transfert d'énergie en mode « dynamique » ou DEFRET avec comme partenaire accepteur, la fluorescéine :



La fluorescéine en solution aqueuse (pH 7,4) présente un spectre d'absorption, avec un maximum situé à 491 nm ($\epsilon = 76500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), qui recouvre partiellement le spectre d'émission du complexe **L₆.Tb** comme on peut le constater dans la figure 23(a). Le maximum

du pic d'émission de la fluorescéine est à 518 nm soit situé entre deux raies d'émission du complexe **L₆Tb** (Figure 23(b)), ce qui permettra de mettre en évidence sans ambiguïté une émission sensibilisée de ce fluorophore, étant donné qu'il n'y a aucune émission significative de l'ion terbium à cette longueur d'onde.

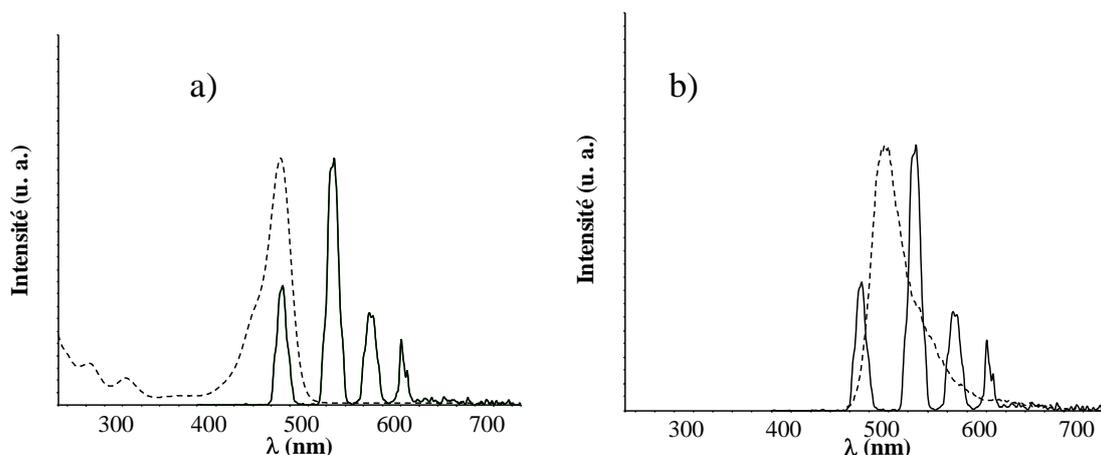


Figure 23. a) Spectres normalisés d'absorption de la fluorescéine (---) et d'émission de **L₆Tb** (—). b) Spectres normalisés d'émission de la fluorescéine (---) et de **L₆Tb** (—) dans le tampon TRIS pH 7,4.

Le recouvrement spectral du spectre d'absorption de la fluorescéine (accepteur) avec le spectre d'émission du complexe **L₆Tb** (donneur) conduit à une intégrale de recouvrement J calculée de $1,72 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$. En considérant un rendement quantique Φ_D pour le donneur **L₆Tb** de 84 % (Φ_{Ln} du tableau 15) et les valeurs suivantes pour le facteur d'orientation du couple dipôle-dipôle et l'indice de réfraction du milieu, $\kappa^2 = 2/3$ et $n = 1,334$, une valeur de 55 Å est calculée pour R_0 .

En considérant que les efficacités de FRET entre 10% et 90% peuvent être déterminées avec précision, des distances donneur-accepteur comprises entre 40 et 80 Å peuvent être mesurées expérimentalement avec le couple **L₆Tb** / fluorescéine (Figure 24). Le composé donneur présente une durée de vie d'émission de luminescence de 2,53 ms, cela devrait se traduire par une variation théorique de la durée de vie du donneur τ_{DA} de 2,28 ms à 0,25 ms pour une variation de l'efficacité de FRET de 10 % à 90 %. De plus, la composante temporelle du donneur étant transférée à l'accepteur en présence de FRET, le signal de l'accepteur sensibilisé mesuré à 518 nm devrait donc présenter des durées de vie τ_{AD} équivalentes à celles du donneur τ_{DA} mesurées en présence de l'accepteur.

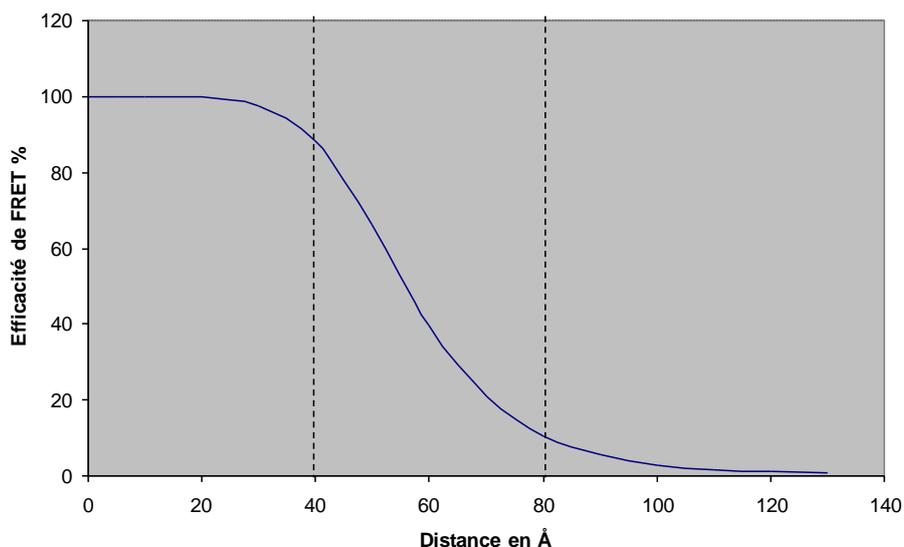


Figure 24. Influence de la distance de l'efficacité de FRET pour le couple L_6Tb /fluorescéine. Les deux lignes pointillé délimitent la zone expérimentale accessible pour la détermination des distances avec ce couple donneur-accepteur ($10\% < E < 90\%$).

L'expérience de DEFRET a consisté à additionner à une solution de donneur ($[L_6Tb] = 0,48 \mu M$) des solutions d'accepteur de concentrations croissantes ($[fluorescéine] = 0,48 \mu M$ à $4,32 \mu M$) dans un tampon Tris (50 mM, pH 7,4). Les spectres d'émission ont été enregistrés (Figure 25), ainsi que les durées de vie d'émission du donneur (τ_{DA}) à différentes longueurs d'onde caractéristiques ($\lambda = 491, 545$ et 585 nm) et celles de l'accepteur (τ_{AD}) à sa longueur d'onde caractéristique de 518 nm (tableau 16).

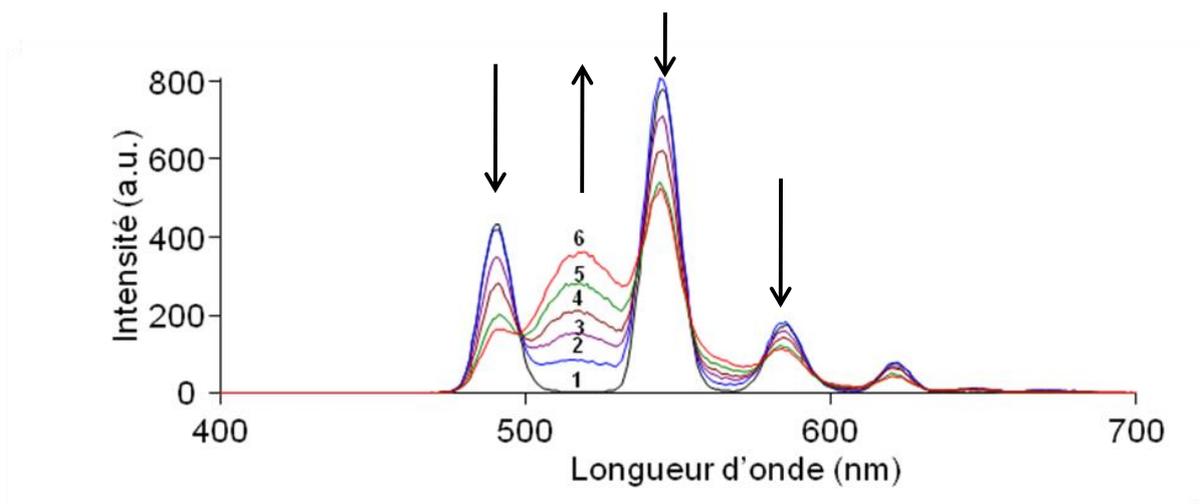


Figure 25. Spectres d'émission de luminescence du système L_6Tb / fluorescéine où $[L_6Tb]$ (spectre 1, $0,48 \mu M$) est mélangé avec $0,48 \mu M$ (spectre 2), $1,44 \mu M$ (spectre 3), $2,40 \mu M$ (spectre 4), $3,36 \mu M$ (spectre 5) et $4,32 \mu M$ (spectre 6) de fluorescéine dans le tampon TRIS pH 7,4. Fentes exc./em. = 5/5 nm. Mode phosphorescence : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 0,4 ms.

Chapitre III

Le spectre **1** correspond au spectre d'émission du donneur en l'absence d'accepteur, obtenu après excitation à 292 nm (bande d'absorption caractéristique du complexe **L₆Tb**). On constate que ce spectre est modifié par les ajouts successifs d'accepteur (spectres **2-6** obtenus à $\lambda_{\text{ex}} = 292$ nm) : les intensités des raies d'émission caractéristiques du donneur **L₆Tb** diminuent et l'intensité de la bande d'émission caractéristique de la fluorescéine à 518 nm augmente. La diminution et l'augmentation respectives de ces bandes caractérisent l'émission sensibilisée de la fluorescéine par un transfert d'énergie par diffusion.

L'enregistrement des spectres d'excitation à $\lambda_{\text{em}} = 518$ nm (longueur d'onde d'émission caractéristique de la fluorescéine) sont caractérisés par la présence des bandes caractéristiques à 255 nm et 292 nm correspondant aux bandes d'absorption du chromophore pyridine-pyrazole du partenaire donneur (Figure 26). Ceci constitue un indice supplémentaire que l'émission de la fluorescéine est bien sensibilisée par un transfert d'énergie provenant du partenaire donneur.

D'autre part, la durée de vie d'émission de **L₆Tb** (solution à 0,48 μM) passe de 2,76 ms en l'absence de fluorescéine à 2 ms en présence de 3 équivalents de fluorescéine et diminue jusqu'à 1 ms avec 9 équivalents de fluorescéine (tableau 16). Les durées de vie d'émission mesurées à 491, 545 et 585 nm (raies caractéristiques de l'émission du donneur **L₆Tb**) sont comparables avec celles déterminées à 518 nm (tableau 16). La diminution de la durée de vie du donneur en fonction du rapport $[A] / [D]$ et la coïncidence avec celles mesurées au niveau de l'accepteur sont une preuve supplémentaire de l'existence d'un transfert d'énergie par diffusion entre les deux partenaires.

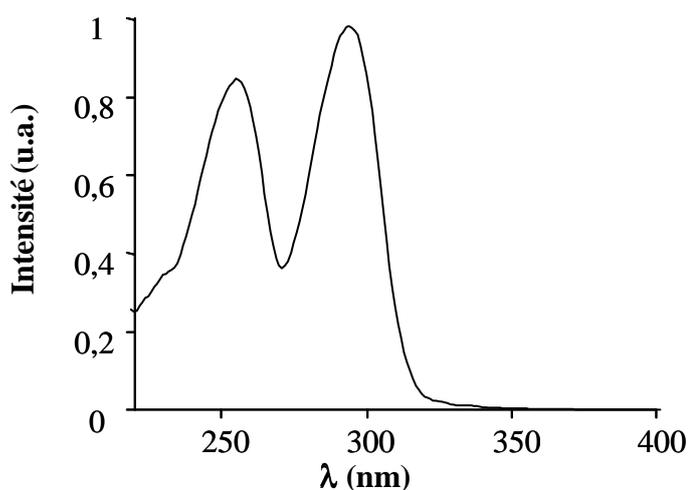


Figure 26. Spectre d'excitation de luminescence à $\lambda_{\text{em}} = 518$ nm (longueur d'onde d'émission caractéristique de la fluorescéine) du système **L₆Tb**/ fluorescéine pour un rapport $[A] / [D] = 3$ dans le tampon Tris 50 mM pH 7,4. Fentes exc./em. = 5/5 nm. Mode phosphorescence : temps de délai 0,1 ms/ temps d'acquisition 0,4 ms.

Chapitre III

Spectres	[A]/ [D]	τ_{DA} (ms) (491 nm)	τ_{DA} (ms) (545 nm)	τ_{DA} (ms) (585 nm)	τ_{AD} (ms) (518 nm)	E %
1	0	2,76	2,76	2,76	-	-
2	1	2,30	2,31	2,28	2,12	23
3	3	2	2,02	2	1,72	38
4	5	1,64	1,63	1,61	1,51	45
5	7	1,22	1,22	1,22	1,26	54
6	9	1,11	1,05	1,02	0,95	66

Tableau 16. Variations des paramètres de fluorescence du couple **L₆Tb** / fluorescéine. E est l'efficacité de transfert d'énergie calculée selon l'équation : $E = 1 - (\tau_{DA} / \tau_D)$, τ_D la durée de vie d'émission de **L₆Tb** en l'absence de fluorescéine et τ_{DA} sa durée de vie d'émission en présence de fluorescéine.

Pour un rapport [A] / [D] = 3, la durée de vie de la fluorescéine sensibilisée par **L₆Tb** est de 1,72 ms, par contre la durée de vie d'émission de la fluorescéine seule est de 4,1 ns⁽³⁴⁾. Cette augmentation d'un facteur de $4 \cdot 10^5$ permet l'utilisation de la technique de fluorescence en temps résolu pour suivre l'émission de l'accepteur sensibilisée.

III Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons rapporté les propriétés photophysiques en milieu aqueux des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} dérivés des ligands **L₁-L₃** et **L₅-L₈**. La figure 26 résume sous forme de diagrammes les principales caractéristiques de fluorescence (durée de vie et rendement quantique) ainsi que le nombre d'hydratation observés pour ces différents complexes.

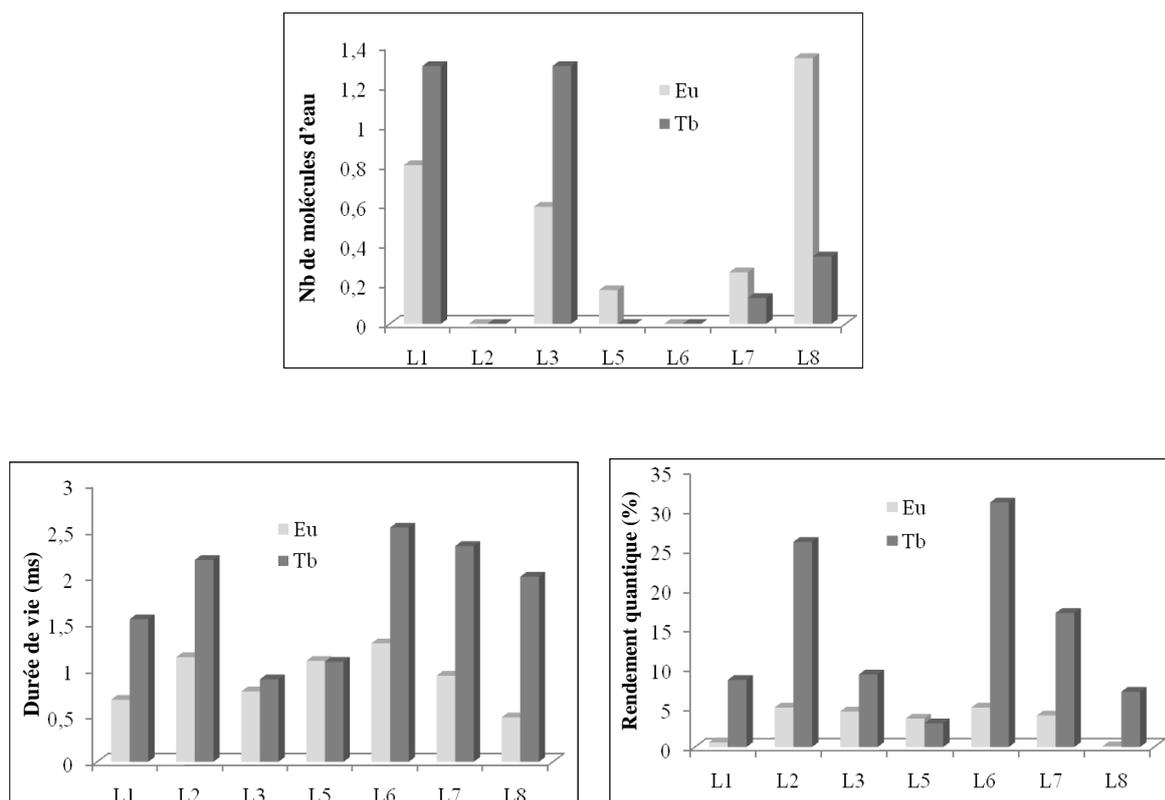


Figure 26. Récapitulatif des nombres d'hydratation, durées de vie et rendements quantiques de luminescence des différents complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ étudiés (tampon Tris , 50 mM, pH 7,4).

L'étude de la sphère d'hydratation des complexes Ln³⁺ a permis d'évaluer dans quelle mesure ces systèmes macrocycliques protègent le métal des interactions avec des molécules d'eau, sources de « quenching » de fluorescence. Nous rappellerons à ce propos que chacun des ligands étudiés dispose d'au moins 9 sites de coordination potentiels ; un nombre a priori suffisant pour saturer la sphère de coordination du métal.

Il est clairement apparu que les macrocycles **L₂**, **L₅**, **L₆** à 18 chaînons dérivés de motifs dihérocycliques (bipyridine, pyrazolylpyridine) permettent d'exclure toute molécule d'eau liée au métal. D'autre part, les résultats obtenus avec les complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ dérivés des macrocycles à 21 chaînons intégrant dans leur structure un trihérocycle (**L₃**, **L₇**, **L₈**) permettent de suggérer que (i) ces deux ions peuvent présenter une chimie de coordination différente bien que voisins dans le tableau de la classification périodique, (ii) que la nature du trihérocycle reste un facteur prépondérant dans la maîtrise de la sphère de coordination du métal, tout au moins dans le cas de macrocycles à 21 chaînons.

Chapitre III

Un dernier point à souligner est que l'utilisation de tels systèmes macrocycliques dérivés d'un squelette TTTA et d'un chromophore mono- ou di-hétérocyclique permet d'exclure une molécule d'eau de la sphère de coordination du métal par rapport aux ligands correspondants décrits dans la littérature : ligands acycliques (type bis(diaminoacétique)) ou macrocycliques (type DTTA).

Les durées de vie d'émission des différents complexes s'étalent sur une plage comprise entre 0,48 ms et 2,53 ms à température ambiante, valeurs compatibles avec l'utilisation de la technique de fluorescence en temps résolu. La plus longue durée de vie observée pour un complexe d'euporium est de 1,28 ms (**L₆.Eu**) et celle d'un complexe de terbium est de 2,53 ms (**L₆.Tb**).

D'une manière générale, pour un même ligand, le complexe de terbium est plus luminescent que le complexe d'euporium, avec des rapports de rendements quantiques LTb / LEu allant d'un facteur 2 (**L₃.Ln**) à un facteur 70 (**L₈.Ln**). Ces résultats peuvent être reliés (i) à la nature du chromophore impliqué dans le processus A.TE.E (cas des chromophores caractérisés par un état triplet d'énergie supérieure à 25000 cm⁻¹), (ii) à la présence d'états LMCT non accessibles thermiquement à partir de l'état émissif ⁵D₀ de l'euporium (notamment si des atomes d'azote du squelette TTTA ne participent pas à la complexation), (iii) à une différence de structure entre le complexe LEu et LTb, impliquant entre autres un état d'hydratation différent.

En ce qui concerne les complexes de terbium on peut relever les rendements quantiques des complexes **L₂.Tb** (26%), **L₆.Tb** (31%) et **L₇.Tb** (17%), rendements quantiques particulièrement élevés en regard des données de la littérature, pour des mesures réalisées en milieu aqueux.

Lors de ces études photophysiques nous avons d'autre part recherché à appréhender les différentes voies de désactivation non radiative intervenant dans ces complexes notamment par des mesures à basse température et par la détermination de la position énergétique de l'état triplet du ligand. La figure 27 illustre à titre d'exemple le processus général de désactivation impliqué dans la luminescence du complexe de terbium du ligand **L₃**.

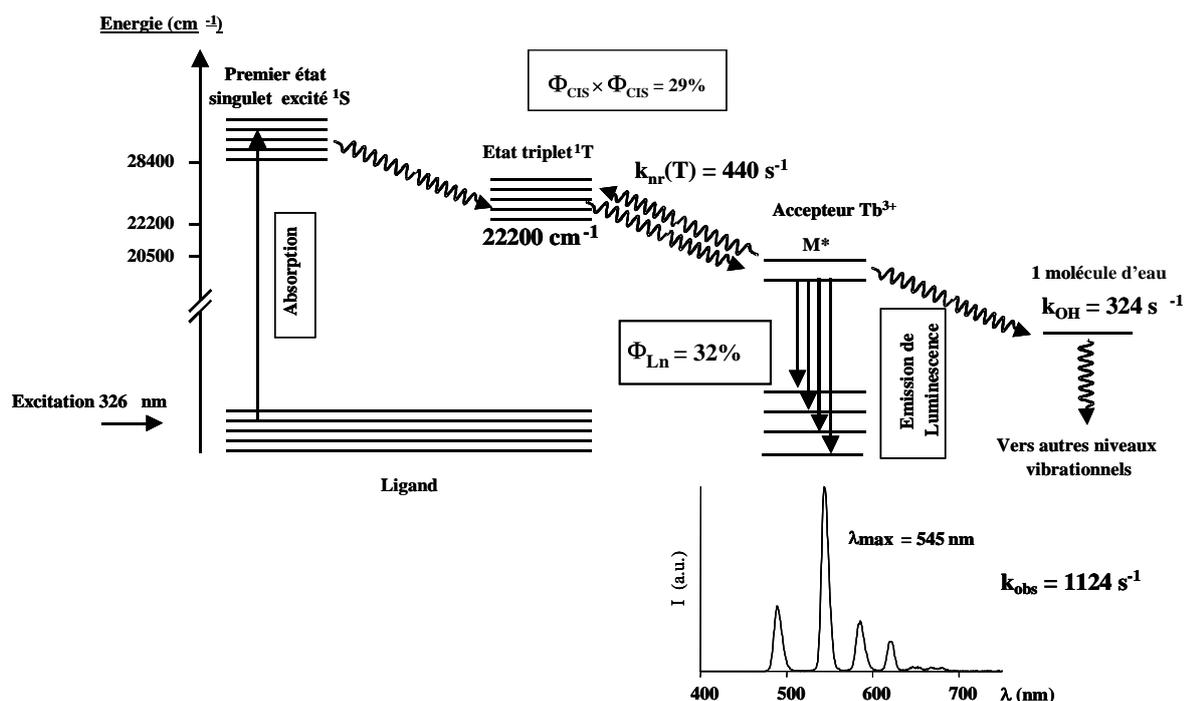


Figure 27. Processus de désactivation impliqués dans la luminescence du complexe $L_3.Tb$.

Les expériences de compétition réalisées entre les complexes $L_{1-3}.Eu$ dérivés d'un motif polypyridine et l'EDTA nous ont permis d'établir les premières bases d'une relation stabilité / taille du cycle dans cette famille de ligands macrocycliques. Cette étude a permis notamment d'attribuer une constante de stabilité conditionnelle à pH 7,4 de $4 \cdot 10^{16}$ pour le complexe macrocyclique à 18 chaînons. Cette valeur peut être comparée favorablement à celle établie pour un complexe de gadolinium utilisé de nos jours en examen clinique IRM (Gd-DTPA-BMA ; K_{cond} à pH 7,4 = $8 \cdot 10^{14}$).⁽³⁵⁾ Cette valeur de K_{cond} associée à une excellente stabilité en milieu sérique des complexes $L_2.Ln$ suggèrent que ces complexes peuvent être utilisés pour des applications biologiques. Ces résultats demandent à être confirmés pour la série de ligands dérivés d'un motif mixte pyridine-pyrazole.

Enfin nous avons engagé le complexe $L_6.Tb$ dans une expérience de transfert d'énergie en mode dynamique. En utilisant la fluorescéine comme molécule accepteur, nous avons ainsi montré que ce complexe pouvait jouer efficacement le rôle de molécule donneur dans la technique DEFRET ; le couple $L_6.Tb$ / fluorescéine étant susceptible de mesurer des distances comprises entre 40 et 80 Å.

IV Bibliographie

- (1) Nakamoto, K. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 1420-1425.
- (2) a) Kirby, A. F.; Richardson, F. S. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2544-2556. b) Kirby, A. F.; Foster, D.; Richardson, F. S. *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *95*, 507-512.
- (3) Richardson, F. S. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541-552.
- (4) Sarkar, A.; Chakravorti, S. *J. Lum.* **1995**, *63*, 143-148.
- (5) Latva, M.; Takalo, H.; Mikkola, V.-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J.-C.; Kankare, J. *J. Lum.* **1997**, *75*, 149-169.
- (6) Horrocks, W.; Sudnick, D. R. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 384-392.
- (7) Kimura, T.; Kato, Y. *J. Alloys Comp.* **1998**, *275-277*, 806-810.
- (8) Barthelemy, P. P.; Choppin, G. R. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 3354-3357.
- (9) Lis, S. *Alloys Comp.* **2002**, *341*, 45-50.
- (10) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; De Sousa, A. S.; Gareth Williams, J. A.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **1999**, 493-503.
- (11) Supkowski, R. M.; W. Horrocks, W. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *340*, 44-48.
- (12) Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; van der Tol, E. B.; Verhoeven, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9408-9414.
- (13) van der Tol, E. B.; van Ramesdonk, H. J.; Verhoeven, J. W.; Steemers, F. J.; Kerver, E. G.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur.* **1998**, *4*, 2315-2323.
- (14) Terazima, M.; Azumi, T. *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *153*, 27-32.
- (15) Saini, R. D.; Dhanya, S.; Bhattacharyya, P. K. *J. Photochem. Photobiol.* **1988**, *43A*, 91-103.
- (16) Isabelle NASSO, Doctorat, Université Paul Sabatier, **2006**.
- (17) Förster, T. H. *Discussion Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7-17.
- (18) Dexter, D. L. *Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
- (19) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*. **1974**, Vol. 1, Plenum: New York.
- (20) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodriguez-Ubis, J. C. *Current Chemical Biology* **2007**, *1*, 11-39.
- (21) Bodar-Houillon F., Heck, R.; Bohnenkamp, W.; Marsura, A. *J. Lum.* **2002**, *99*, 335-341.

Chapitre III

- (22) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodriguez-Blasco, M. A.; Vila-Nueva, S. P.; Garayalde, D.; Rodriguez-Ubis, J.-C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7801-7805.
- (23) Nasso, I.; Bedel, S.; Galaup, C.; Picard, C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 2064-2074.
- (24) Picard C.; Geum, N.; Nasso, I.; Mestre, B.; Tisnes, P.; Laurent, S.; Muller, R. N.; Vander Elst, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5309-5312.
- (25) Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Lehn, J.-M. *Coord. Chem. Rev.* **1993**, *123*, 201-228.
- (26) Chatterton N.; Bretonnière, Y.; Pécaut, J.; Mazzanti, M. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7595–7598.
- (27) Petoud, S.; Cohen, S. M.; Bünzli, J.-C. G.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13324–13325.
- (28) Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodriguez-Ubis, J.-C. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 613–618.
- (29) Couchet, J.-M.; Galaup, C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4869-4872.
- (30) Selvin, P.R. *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.* **1996**, *2*, 1077-1087.
- (31) Vogel, K. W.; Vedik, K. L. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 439-443.
- (32) Zheng, Q.; Dai, H.; Merritt, M. E.; Malloy, C.; Pan, C. Y.; Li, W.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16178-16188.
- (33) Zwier, J.; Poole, R.; Ansanay, H.; Fink, M.; Trinquet, E. WO 2010/ 012962 A₂.
- (34) <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
- (35) Wedeking, P.; Kumar, K.; Tweedle, M. F. *Magn. Reson. Imaging* **1992**, *10*, 641-648.

Chapitre III

**Chapitre IV : Synthèse et propriétés
photophysiques de complexes Eu(III) et
Tb(III) dérivés du DOTA incorporant un
chromophore extracyclique à motif N,C-
pyrazolyl-pyridine**

Chapitre IV

Chapitre IV

Jusqu'à présent, le motif *N,C*-pyridine-pyrazole a été introduit dans plusieurs types de structures: acyclique bis(aminodiacétate),⁽¹⁾ macrocyclique,⁽²⁾ et cryptand.⁽³⁾ L'analyse des propriétés de luminescence des complexes de terbium correspondants a permis de mettre en avant des durées de vie d'émission comprises entre 1,30 et 1,85 ms et des rendements quantiques de l'ordre 38-49% en milieu aqueux. D'un autre côté, l'introduction de ce type de chromophore dans des structures podands n'a pas conduit à des résultats probants. Ainsi trois motifs *N,C*-pyridine-pyrazole-COOH ont été introduits soit sur une plateforme phloroglucinol soit sur un atome d'azote (Schéma 1). Dans le premier cas, la très faible solubilité du ligand en milieu aqueux et organique n'a pas permis d'évaluer les propriétés photophysiques de son complexe Tb(III).⁽⁴⁾ Le complexe de terbium dérivé du second ligand est caractérisé par des propriétés de luminescence médiocres ($\Phi < 0,1\%$, $\tau = 0,9$ ms en milieu méthanolique).⁽⁵⁾ Il a été suggéré que dans ce complexe seules les fonctions carboxylates intervenaient en tant que fonctions bidentes dans la complexation du métal, laissant ainsi la place à 4 molécules d'eau dans la première sphère de coordination de l'ion.⁽⁶⁾

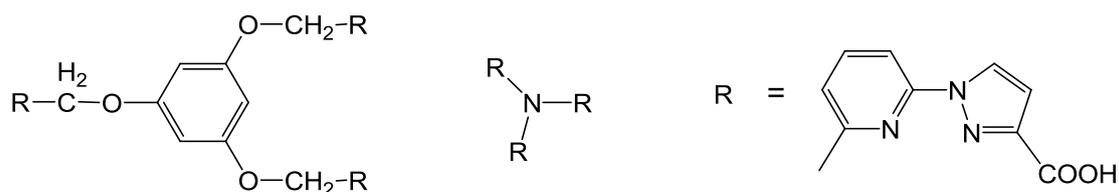


Schéma 1. Podands décrits dans la littérature.^(4,5)

Dans ce contexte, il nous a paru intéressant d'introduire ce chromophore *N,C*-pyridine-pyrazole dans une autre structure, largement utilisée pour l'élaboration de complexes Ln(III) luminescents: une structure de type DOTA. Le schéma 2 rassemble les structures que nous projetons d'étudier.

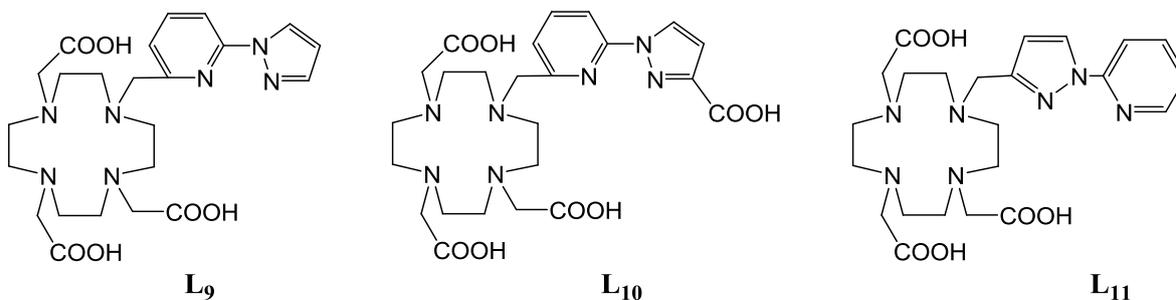


Schéma 2. Structure des ligands L₉, L₁₀ et L₁₁.

Chapitre IV

Le ligand **L₉** nous permettra de confirmer ou d'infirmer l'intérêt de substituer un chromophore 2,2'-bipyridine par un chromophore *N,C*-pyridine-pyrazole dans ce type de structure DOTA.

L'étude du ligand **L₁₀** devrait nous permettre d'établir si l'introduction d'une fonction carboxylate sur le noyau pyrazole perturbe les propriétés de luminescence des complexes Ln(III)

Les structures **L₉** et **L₁₁** ne diffèrent que par le mode de branchement du chromophore sur la plateforme cyclène: soit au niveau du cycle pyridine (**L₉**), soit au niveau du cycle pyrazole (**L₁₁**). A l'aide de ces deux exemples, il nous a paru intéressant d'évaluer l'impact d'une légère modification (à priori) du ligand sur les propriétés photophysiques de ses complexes Ln(III).

Ce chapitre sera donc dévolu à la synthèse de ces trois nouveaux ligands et à l'étude des propriétés luminescentes de leurs complexes Eu(III) et Tb(III).

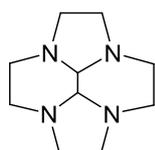
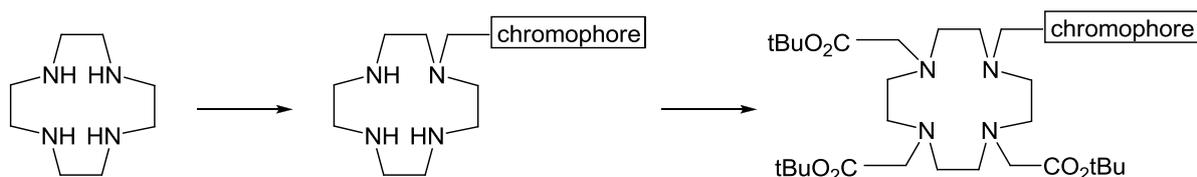
I Schéma de synthèse

A priori deux schémas de synthèse peuvent être envisagés pour l'obtention des ligands cibles **L₉**-**L₁₁** en prenant comme point de départ le cyclène, produit commercialement disponible quoique relativement coûteux (Schéma 3).

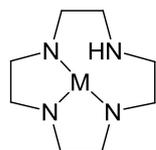
- 1) Soit on envisage en premier lieu l'introduction du chromophore au niveau du cyclène et dans une seconde étape l'introduction des 3 groupements acétate de tertibutyle.
- 2) Soit on suit la séquence inverse, tri-alkylation du cyclène par le bromoacétate de tertibutyle suivie de l'introduction de l'unité chromophorique.

L'analyse succincte que nous faisons ci-après de ces deux approches n'est pas exhaustive en raison des très nombreux travaux relatifs aux réactions de mono-, tri-alkylation / protection du cyclène. Dans ce cadre, la microrevue récente de M. Suchy et R. H. E. Hudson intitulée « Synthetic strategy toward N-functionalized cyclènes » peut apporter un certain nombre d'autres informations.⁽⁷⁾

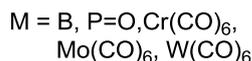
Voie 1



Bis-aminal



Cyclène tri-protégé



Voie 2

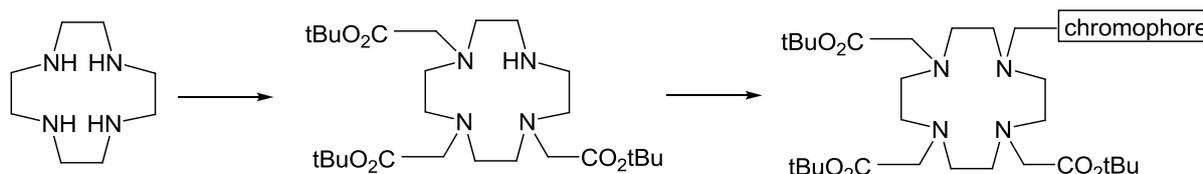


Schéma 3. Voies de synthèse des ligands **L₉-L₁₁**.

En ce qui concerne la première approche (Voie 1), plusieurs voies de mono-N-alkylation ont été décrites, notamment :

- Une alkylation directe en utilisant un excès du cyclène par rapport aux réactifs d'alkylation : 1,5 équivalents du cyclène par Kruper et al.⁽⁸⁾, Chappell et al.⁽⁹⁾ ; 2 équivalents par Wong et al.⁽¹⁰⁾ et récemment 4 équivalents par Gunnlaugsson et al.⁽¹¹⁾. L'expérience acquise au niveau de l'équipe a montré en fait que l'utilisation de cette voie nécessitait plusieurs purifications laborieuses afin d'isoler le produit monoalkylé avec une pureté suffisante.
- La deuxième voie consiste en la formation d'un bis aminal par réaction du cyclène avec du glyoxal, mono-alkylation puis déprotection du bis aminal.⁽¹²⁾
- Une réaction de protection utilisant un réactif trifonctionnel qui bloque 3 des 4 atomes d'azote du cyclène. Pour cette réaction de triprotection des dérivés du bore,⁽¹³⁾ du phosphore (P=O)⁽¹⁴⁾ ou des métaux carbonyles M(CO)₆ (M= Cr, Mo, W)⁽¹⁵⁾ ont été utilisés.

Chapitre IV

Pour la mise en place de la seconde stratégie (Voie 2), une séquence monoprotection /trialkylation /déprotection/ alkylation peut être envisagée au vu des données disponibles dans la littérature; cette méthodologie reste toutefois laborieuse. Aussi notre attention s'est portée sur les travaux de P. G. Sammes et al. qui décrivent la synthèse du cyclène fonctionnalisé par 3 chaînes acétate de *tertiobutyle* en une seule étape à partir du cyclène et ceci avec un rendement de 42% et sans nécessiter une purification du milieu réactionnel par chromatographie sur colonne.⁽¹⁶⁾ Ces auteurs ont en effet montré que la trialkylation sélective de 3 des 4 atomes du cyclène par le bromoacétate de *tertiobutyle* pouvait être réalisée; le 4^{ème} atome d'azote étant relativement inerte vis-à-vis de la réaction d'alkylation si celle-ci est effectuée dans des conditions douces. De plus cette sélectivité d'alkylation est également favorisée par la formation du sel de bromhydrate du produit tri-alkylé qui précipite du milieu réactionnel dans les conditions utilisées. Un autre point important à souligner est que la préparation de ce composé en utilisant le mode opératoire décrit par P.G. Sammes a été rapportée par d'autres auteurs.⁽¹⁷⁻²⁰⁾

Le schéma de synthèse que nous avons retenu se base sur la réaction directe de tri-alkylation du cyclène par le bromoacétate de *tertiobutyle*, suivie d'une alkylation par un dérivé bromométhyle du motif chromophore.

Le second point de synthèse à résoudre dans le cas de l'obtention des ligands **L₉-L₁₁** réside dans l'obtention des unités *N,C*-pyrazolylpyridine, c'est-à-dire dans la mise au point de couplage carbone – azote entre deux noyaux hétérocycliques.

Dans le second chapitre, nous avons fait état de la préparation traditionnelle de l'utilisation de sel potassique de dérivés pyrazole pour la préparation de tels dihérocycles. Cette méthodologie reste d'actualité.⁽⁵⁾ Cependant, afin de conforter notre stratégie pour la préparation de tels dérivés pyridine-pyrazole, nous avons mis en œuvre l'utilisation de sels de cuivre (CuI) et de *trans* 1,2-cyclohexanediamine comme ligand auxiliaire.

D'autre part, considérant que la bromation radicalaire est synonyme de la voie la plus directe pour accéder à des dérivés bromométhyles d'hétérocycles azotés à partir de leurs analogues méthyles, nous avons retenu ce type de réactions pour l'obtention de nos composés cibles. La présence d'un seul groupe méthyle dans les composés cibles diminue le nombre de produits multibromés susceptibles de se former lors de telle réaction de bromation radicalaire.

Cette séquence de réactions est résumée dans le schéma 4.

Chapitre IV

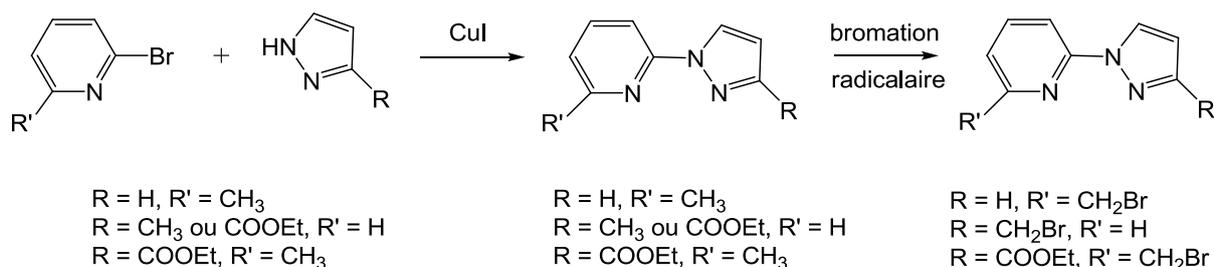


Schéma 4. Voie de synthèse des motifs chromophores N,C-pyrazolypyridine.

II Synthèse des ligands

II.1. Synthèse des chromophores N,C-pyrazolypyridine

II.1.1. Synthèse du chromophore fonctionnalisé sur le cycle pyridine 77

Cette synthèse se fait dans deux étapes : a) un couplage au cuivre selon^(21,4), entre le 2-bromo-6-méthylpyridine et le dérivé pyrazole dans du dioxane au reflux en utilisant 1 équivalent de CuI comme catalyseur, 2,4 équivalents de K₂CO₃ comme base et 1,2 équivalent de *trans*-1,2-cyclohexanediamine (Schéma 5). La purification consiste à extraire le cuivre complexé par le motif pyridine-pyrazole ; pour cela le brut réactionnel est lavé avec une solution saturée en EDTA ; puis par chromatographie sur colonne de silice le produit de couplage attendu **76** est isolé avec 85% de rendement. b) la 2^{ème} étape est une bromation radicalaire du groupe méthyle de la pyridine en utilisant le NBS (activateur de brome) et le peroxyde de benzoyle (initiateur) dans du CCl₄ à reflux. Le produit bromé **77** est isolé avec 51% de rendement.

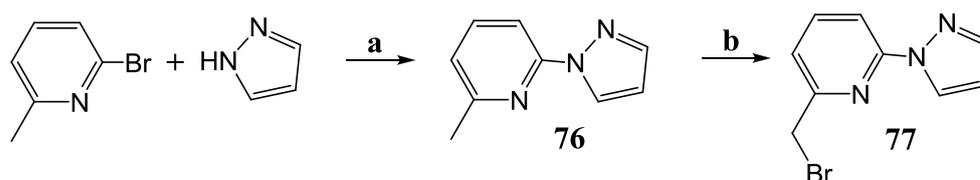


Schéma 5. Réactifs et conditions. a) 1 éq. CuI, 1,2 éq. *trans*-1,2-cyclohexanediamine, 2,4 éq. K₂CO₃, dioxane, reflux, **85%**; b) NBS, peroxyde de benzoyle, CCl₄, reflux, **51%**.

II.1.2. Synthèse du chromophore fonctionnalisé sur le cycle pyrazole 84

Nous avons utilisé dans un premier temps la même démarche que celle utilisée pour la préparation du composé **77** en mettant en jeu la 2-bromopyridine et le 3-méthylpyrazole (Schéma 6). Le produit de couplage a été obtenu avec un excellent rendement ; cependant la réaction de bromation radicalaire ne nous a pas permis d'isoler le produit attendu. Lors de

Chapitre IV

cette réaction nous n'avons isolé uniquement un produit secondaire, résultant d'une bromation sur l'un des atomes de carbone du cycle pyrazole. De telles réactions parasites ont été déjà décrites dans la littérature.⁽²²⁾

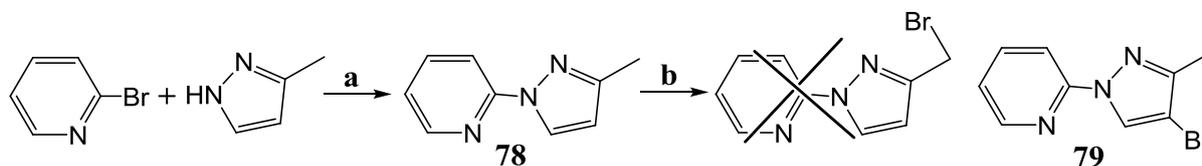


Schéma 6. Réactifs et conditions. a) CuI, K₂CO₃, trans-1,2-cyclohexanediamine, dioxanne, reflux, **86%** ; b) NBS, peroxyde de benzoyle, CCl₄, reflux, **35%**.

La structure du composé **79** a été établie par RMN ¹H, ¹³C et par spectrométrie de masse. Notamment, sur le spectre RMN ¹H nous notons l'absence d'un doublet vers 6,24 ppm correspondant au proton H_{4'} du pyrazole et la présence d'un singulet (au lieu d'un doublet) vers 8,4 ppm correspondant au proton H_{5'} du pyrazole (Figure 1).

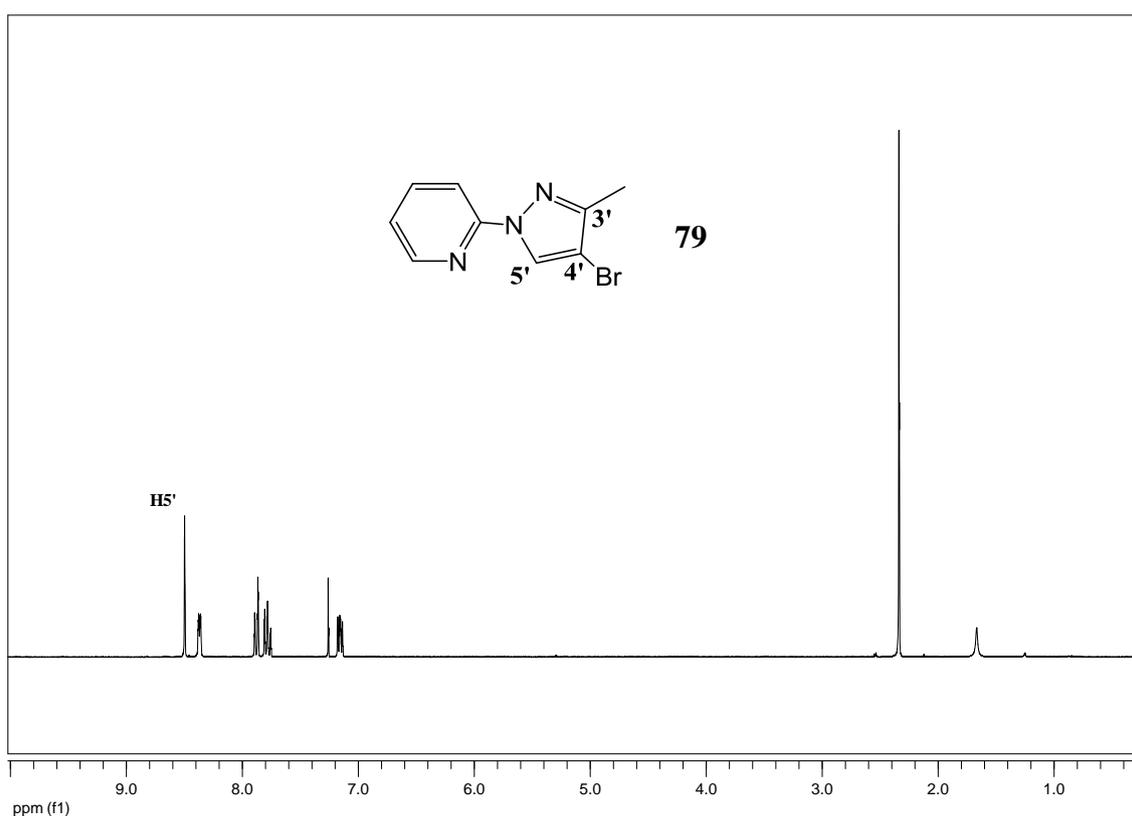


Figure 1. RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃) du composé **79**.

Chapitre IV

Afin de pouvoir réaliser une réaction de bromation d'une fonction alcool et ainsi éviter la substitution d'un proton du cycle pyrazole, nous avons dans un second temps opté pour l'introduction d'une fonction ester d'éthyle en position 3 du pyrazole.

Cette fonctionnalisation du cycle pyrazole était décrite par Bunzli et al.⁽²³⁾ Elle consiste en l'oxydation du groupement méthyle du 3-méthylpyrazole à l'aide de permanganate de potassium, suivie d'une estérification de la fonction carboxylique en milieu acide avec de l'éthanol (Schéma 7).

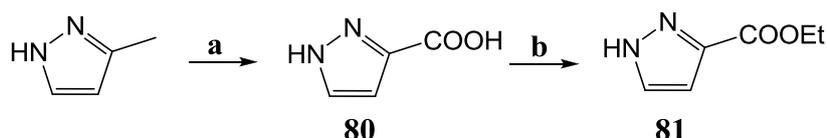


Schéma 7. Réactifs et conditions. a) KMnO_4 , H_2O , reflux 4h, **87%** ; b) H_2SO_4 conc., EtOH absolu, reflux 5h, **23%**.

A partir de cet ester **81**, une synthèse en 3 étapes nous a permis d'obtenir le dérivé bromé **84** avec un rendement global de 35% (schéma 8). Le couplage entre la 2-bromopyridine et l'ester **81** est suivi d'une réduction du groupement ester du dihérocycle par LiAlH_4 dans le THF. L'alcool **83** est alors isolé avec un rendement de 63% après purification sur colonne de silice. On termine cette séquence par une bromation de cet alcool par action de PBr_3 dans l'acétonitrile. Après neutralisation du milieu réactionnel et une simple extraction au dichlorométhane, le dérivé attendu **84** est isolé avec un rendement quantitatif.

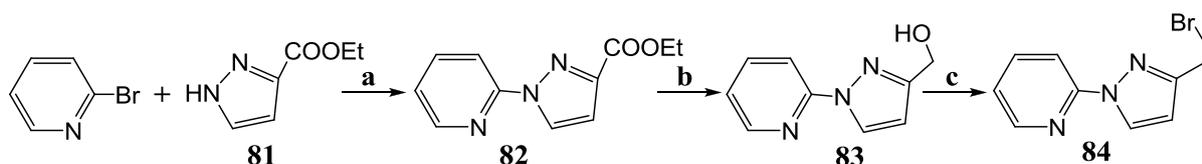


Schéma 8. Réactifs et conditions. a) CuI , K_2CO_3 , trans-1,2-cyclohexanediamine, dioxanne, reflux **56%** ; b) LiAlH_4 , THF, T.A., 3h, **63%** ; c) PBr_3 , CH_3CN , reflux, 3h, **100%**.

II.1.3. Synthèse du chromophore fonctionnalisé sur les cycles pyridine et pyrazole

On a appliqué la même démarche que celle utilisée pour la synthèse du chromophore **77**: couplage entre la 2-bromo-6-méthylpyridine et l'ester du pyrazole **81** suivie d'une bromation radicalaire pour avoir le composé bromé **86** avec 41% de rendement (Schéma 9).

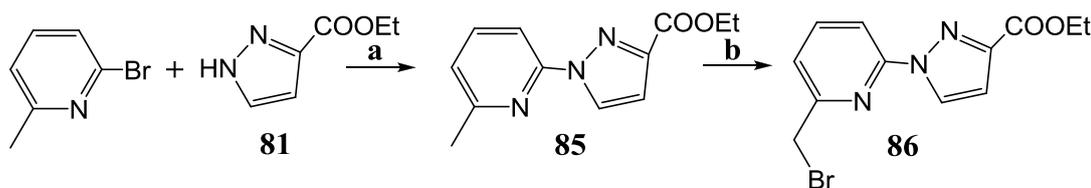


Schéma 9. Réactifs et conditions. a) CuI, K₂CO₃, trans-1,2-cyclohexanediamine, dioxanne, reflux, **54%**; b) NBS, peroxyde de benzoyle, CCl₄, reflux, **41%**.

II.1.4. Remarques générales

Le couplage au cuivre que nous avons mis en œuvre nous a donc permis d'atteindre quatre motifs N,C-pyrazolylpyridine avec des rendements de l'ordre de 85 ou 55%. Les rendements de 55% que nous avons obtenus lorsque le dérivé 3-pyrazole-carboxylate d'éthyle est engagé dans la réaction de couplage peuvent être vraisemblablement améliorés en utilisant d'autres sels de cuivre et (ou) des ligands auxiliaires non commerciaux.⁽²⁴⁾

Lors des réactions de couplage entre un dérivé 2-bromopyridine et un noyau pyrazole substitué en position 3 (CH₃, COOEt), nous n'avons pas mis en évidence la formation du composé isomère dans lequel le cycle pyrazole est lié par l'intermédiaire de son atome d'azote β au cycle pyridine.

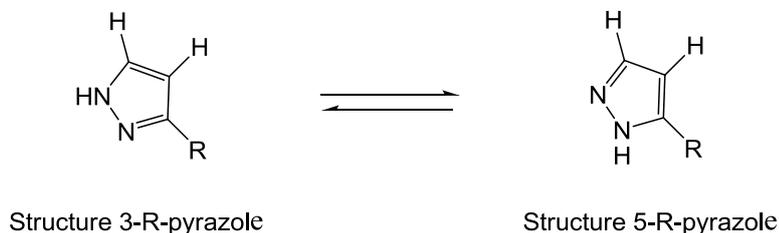
En effet le pyrazole substitué en position 3 présente deux formes tautomères, mettant en jeu un échange rapide du proton entre les deux atomes d'azote hétérocyclique : le 3-R-pyrazole est donc en équilibre avec le 5-R-pyrazole (Schéma 10a).

L'attribution des structures des deux régioisomères possibles **78**, **82**, **85** d'une part et **78b**, **82b**, **85b** (Schéma 10b) d'autre part peut se faire sans ambiguïté sur la base des déplacements chimiques et des constantes de couplage ³J_{HH} des atomes d'hydrogène du cycle pyrazole.^(4,24) Notamment, le proton H_a (Schéma 10c) présente un déplacement chimique de l'ordre de 8,40 ppm dans une structure 3-R-pyrazole, alors qu'il résonne vers 7,60 ppm dans une structure 5-R-pyrazole. Ceci peut s'expliquer par la conformation *trans*, induite par la répulsion des doublets libres des atomes d'azote, dans laquelle doit se trouver le motif pyridine-pyrazole.

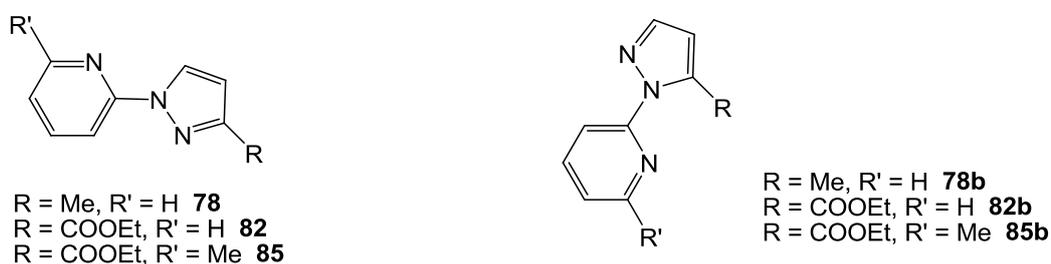
Chapitre IV

A priori, l'encombrement stérique du substituant R (CH₃, COOEt) permet de contrôler la régiosélectivité de ces réactions de couplage.

a)



b)



c)

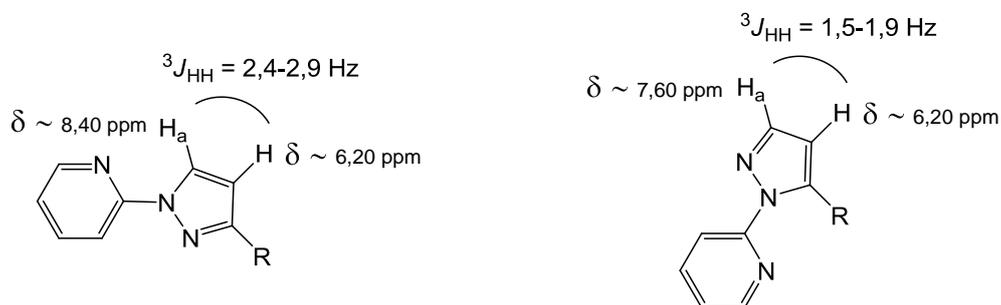


Schéma 10. a) Formes tautomères du pyrazole substitué en position 3. b) Structures des formes régioisomères. c) Déplacements chimiques et constantes de couplage ${}^3J_{\text{HH}}$ dans des cycles 1-pyridinylpyrazole

II.2. Synthèse du DO3AtBu (87)

La synthèse directe du tris-*tert*butyl ester de DO3A (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7-triacétique) a été réalisée selon la procédure de P. G. Sammes et al.⁽¹⁶⁾ Ceci permet d'éviter la démarche initialement utilisée pour accéder aux dérivés du type DO3A, qui exige la protection du quatrième azote.⁽²⁵⁾

A une solution du cyclène sont ajoutés lentement et à 0°C 3,3 équivalents de bromoacétate de *tert*butyle et 3,3 équivalents de NaHCO₃ dans l'acétonitrile anhydre (Schéma 11). Après

48h d'agitation à température ambiante et évaporation, le triester attendu **87** est isolé avec 46% de rendement, après une recristallisation dans le toluène.

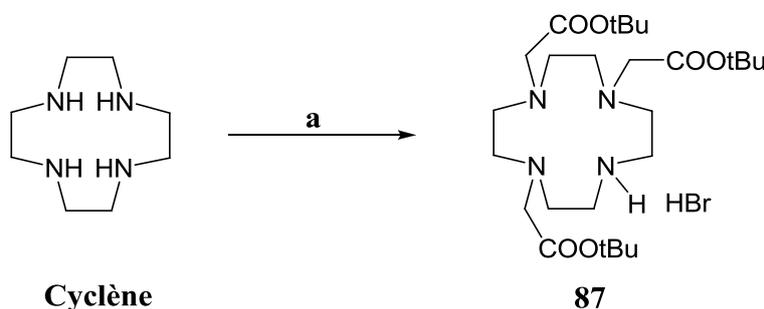


Schéma 11. Réactifs et conditions. a) BrCH₂COOtBu, NaHCO₃, CH₃CN, T.A., 48 h, **46%**.

II.3. Synthèse des ligands L₉, L₁₀, L₁₁

Les ligands **L₉**, **L₁₀**, **L₁₁** ont été obtenus par l'alkylation du quatrième atome d'azote du DO3AtBu **87** à l'aide des trois dérivés bromés **77**, **84** et **86**, dans l'acétonitrile en utilisant K₂CO₃ comme base (Schéma 12). Une purification sur alumine nous permet d'isoler les produits attendus **88**, **89** et **90** avec 47%, 94% et 71% de rendement, respectivement.

La déprotection des fonctions ester de tertio-butyle des précurseurs **88** et **90** par un mélange TFA/ CH₂Cl₂, permet d'accéder aux ligands **L₉** et **L₁₁** avec 99% de rendement pour chacun. Dans le cas du dérivé **89** l'hydrolyse des fonctions ester de *tertio*-butyle et ester d'éthyle a été effectuée dans un mélange NaOH/ MeOH en chauffant une nuit à reflux et on obtient le ligand **L₁₀** avec 96% de rendement.

Les différents ligands ont été caractérisés par RMN ¹H, ¹³C et par spectrométrie de masse haute résolution. Leur pureté a été établie par une analyse HPLC (Figure 2).

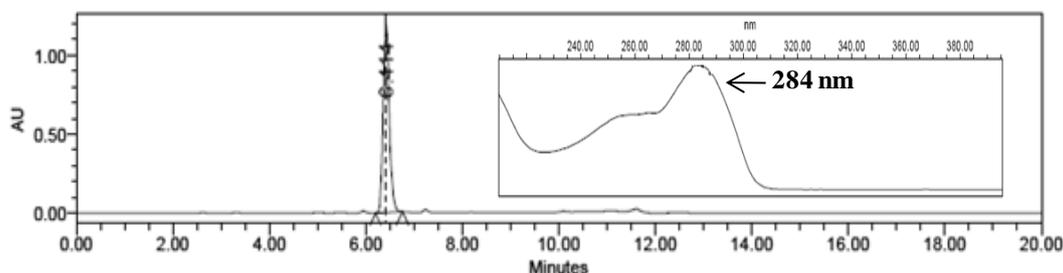


Figure 2. Chromatogramme HPLC en phase inverse du ligand **L₁₀**. Conditions : colonne : C8 ; éluant : HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN, 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min. L'insert représente le spectre UV du ligand.

Chapitre IV

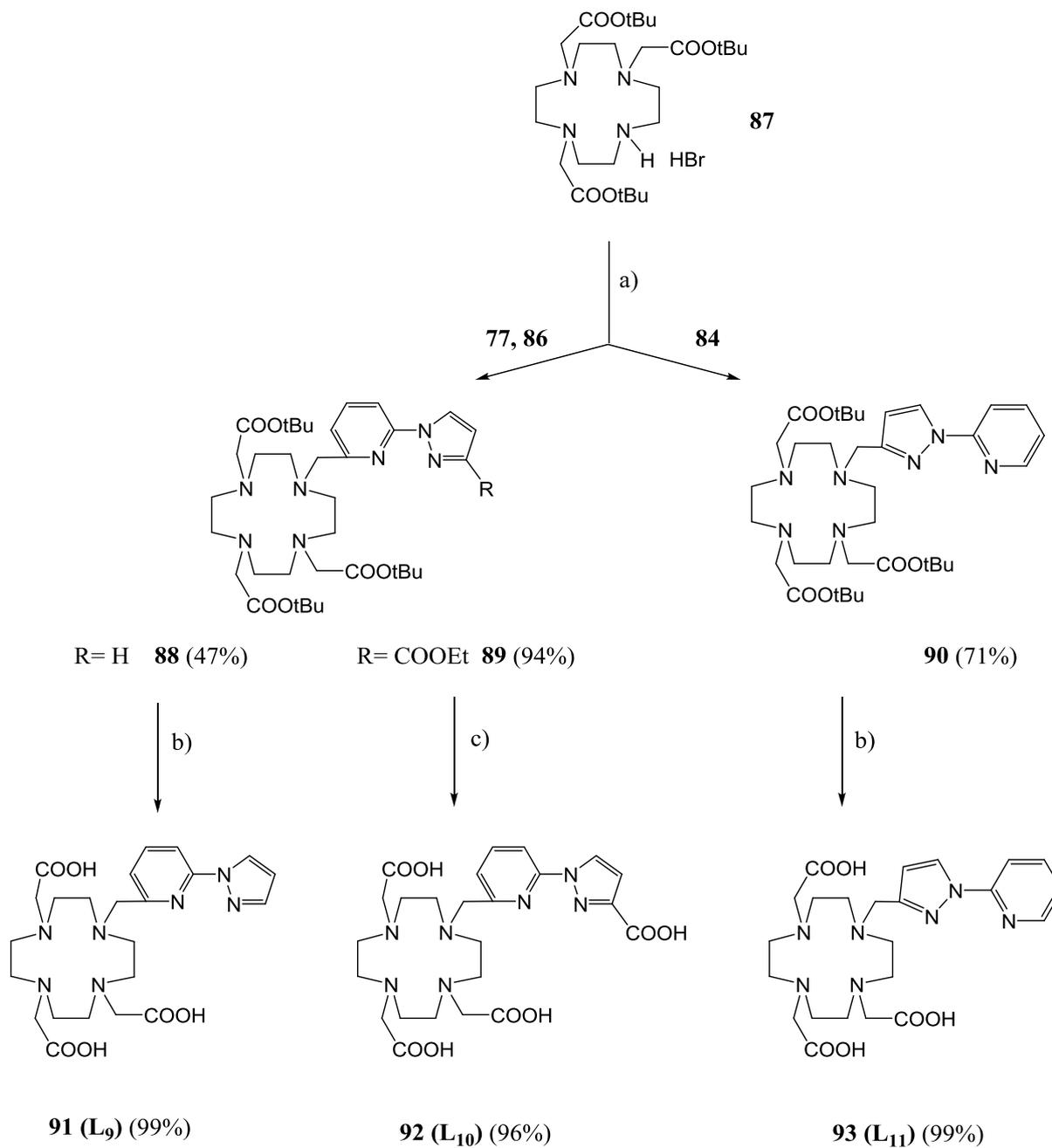


Schéma 12. Réactifs et conditions. a) CH₃CN, K₂CO₃, reflux, 24 h ; b) TFA/ CH₂Cl₂, T.A., 24 h ; c) NaOH/ MeOH, reflux, 24 h.

III Propriétés photophysiques des ligands L₉, L₁₀ et L₁₁ et de leurs complexes Eu³⁺ et Tb³⁺

Comme dans le chapitre précédent, la préparation des complexes d'ions lanthanides Eu³⁺ et Tb³⁺ a été réalisée *in situ* en ajoutant un léger excès d'un sel de lanthanide (LnCl₃, 6 H₂O) dans une solution mère de ligand, puis dilution dans le tampon TRIS (50 mM, pH 7,4) de manière à avoir des solutions de concentrations de l'ordre de 10⁻³ M pour leurs caractérisations par HPLC analytique et des solutions de concentrations de l'ordre de 10⁻⁵-10⁻⁶ M afin d'étudier leurs propriétés d'émission de luminescence à pH physiologique.

Une analyse HPLC de ces différents complexes nous a permis de s'assurer que leur pureté était supérieure à 95%.

III.1. Spectres d'absorption des ligands L₉₋₁₁ et de leurs complexes.

Les spectres d'absorption des ligands libres sont caractérisés par deux bandes d'absorption dans le domaine UV vers 250-260 et 280-285 nm attribuées aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ centrées sur les noyaux aromatiques. La bande d'absorption de plus faible énergie subit un déplacement bathochrome et en général hypochrome lors de la complexation (tableau 1, Figure 3).

Ligand	Ln ³⁺	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
L ₉	-	251 ; 284	7490 ; 7960
	Eu ³⁺	255 ; 298	6700 ; 7180
	Tb ³⁺	255 ; 299	6540 ; 7340
L ₁₀	-	259 ; 286	7090 ; 11020
	Eu ³⁺	258 ; 297	7090 ; 7960
	Tb ³⁺	260 ; 297	7090 ; 7960
L ₁₁	-	250 ; 279	6500 ; 6666
	Eu ³⁺	252 ; 282	6630 ; 6740
	Tb ³⁺	252 ; 282	6210 ; 6570

Tableau 1. Caractéristiques d'absorption des ligands L₉, L₁₀ et L₁₁ et de leurs complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ (tampon TRIS, 50 mM, pH 7,4).

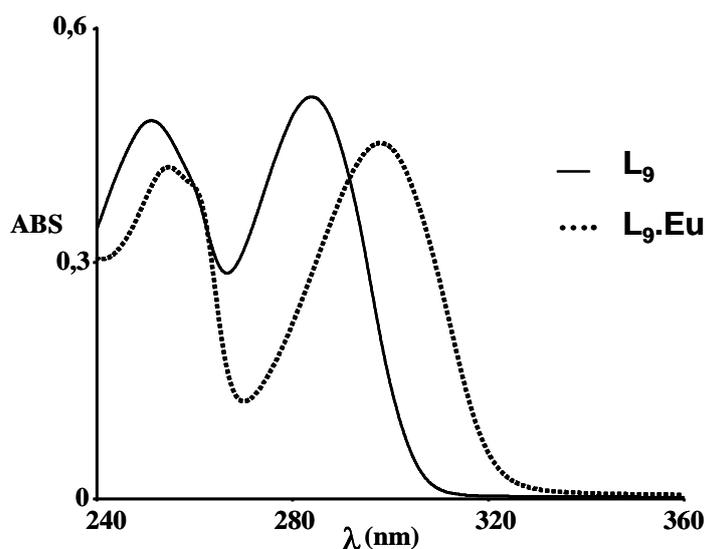


Figure 3. Spectres d'absorption du ligand L_9 (—) et du complexe $L_9.Eu$ (---) en tampon Tris (50 mM pH 7,4) à une concentration de $6,2 \cdot 10^{-5}$ M.

Ce déplacement bathochrome peut être relié à la participation des chromophores à la coordination du métal, résultant du passage d'une conformation *trans* à une conformation *cis*. Cet effet bathochrome est indépendant de la nature du lanthanide et est plus important dans le cas des complexes $L_9.Ln$ et $L_{10}.Ln$ ($\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$) que pour $L_{11}.Ln$ ($\sim 400 \text{ cm}^{-1}$). Cette dernière observation pourrait suggérer une plus forte interaction du chromophore avec le métal dans le cas des ligands L_9 , L_{10} . Nous n'observons pas de différence notable lors de l'introduction d'une fonction acide sur le noyau pyrazole (L_{10} / L_9).

III.2 Propriétés de luminescence des ligands libres et de leurs complexes Gd^{3+}

L'excitation des ligands au niveau de leur bande d'absorption de plus faible énergie se traduit par une large bande d'émission autour de 320-330 nm pour L_9 , L_{10} et L_{11} respectivement. Cette bande d'émission disparaît dès qu'un délai de quelques μs est appliqué à la mesure. Il s'agit donc d'une bande de fluorescence à partir de l'état singulet. La même bande d'émission est observée dans le cas des complexes de gadolinium (Figure 4).

L'enregistrement de spectres d'émission à basse température et en temps résolu nous a permis d'accéder aux données relatives à l'état triplet de ces ligands et de leurs complexes Gd^{3+} .

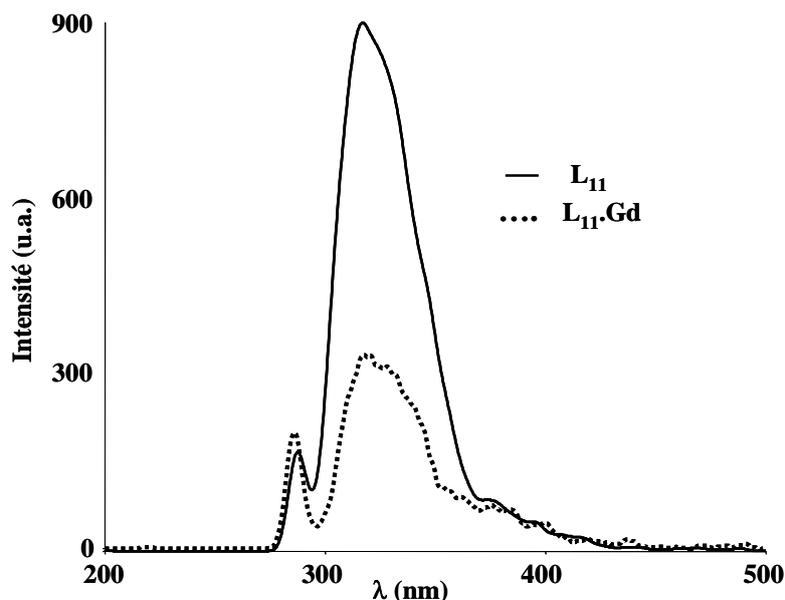


Figure 4. Spectres de fluorescence du ligand L_{11} et de son complexe Gd^{3+} à température ambiante (tampon Tris 50 mM pH 7,4).

Nous avons rassemblé dans le tableau 2 les principales caractéristiques de fluorescence et de phosphorescence de ces différentes molécules. La position de l'état singulet de plus faible énergie a été évaluée en considérant le point d'intersection des spectres d'absorption et de fluorescence (Figure 5a). La position de l'état triplet a été déterminée en tenant compte de la raie d'émission située à plus haute énergie, c'est-à-dire à plus basse longueur d'onde (Figure 5b).

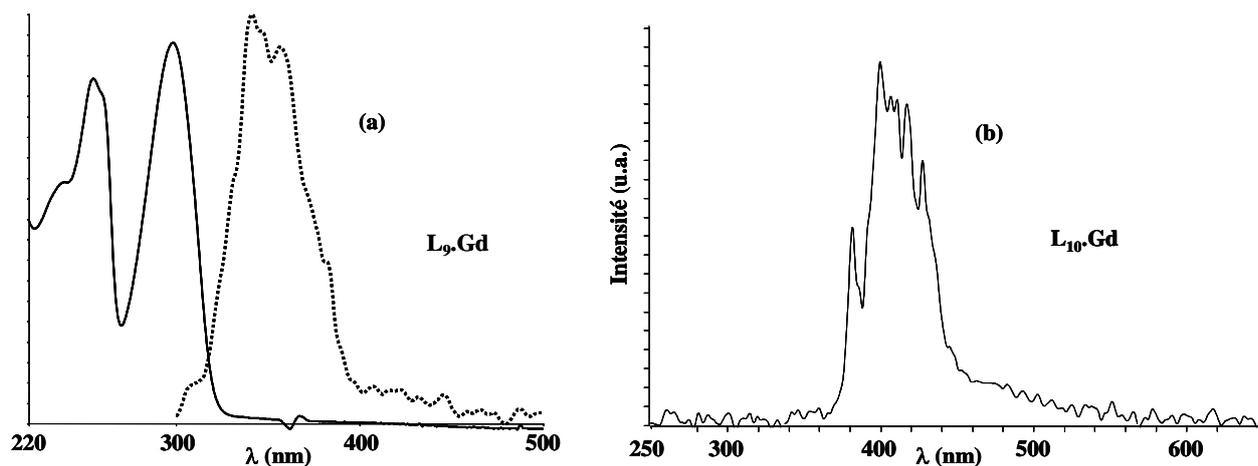


Figure 5. (a) Spectre d'absorption (—) et d'émission (.....) de fluorescence du complexe $L_9·Gd$ en tampon Tris 50 mM, pH 7,4. (b) Spectre de phosphorescence du complexe $L_{10}·Gd$ à 77K dans un mélange tampon TRIS/glycérol (1/1).

Chapitre IV

	Fluorescence ($^1\pi\pi^*$) ^a		Phosphorescence ($^3\pi\pi^*$) ^b		
	λ_{\max} (nm)	λ_{0-0} (nm) [cm ⁻¹]	λ_{\max} (nm)	λ_{0-0} (nm) [cm ⁻¹]	τ (ms) ^c
L₉	328	313,5 [31900]	420	386 [25900]	> 500
L₉.Gd	348	318 [31450]	430	410 [24400]	26
L₁₀	330	307 [32570]	400	---	> 800
L₁₀.Gd	335	311 [32150]	410	381 [26200]	212
L₁₁	319	298 [33560]	---	---	---
L₁₁.Gd	327	300 [33330]	403	381 [26200]	24

Tableau 2. Données de fluorescence et de phosphorescence des ligands **L₉**, **L₁₀** et **L₁₁** et de leurs complexes de gadolinium. ^a dans tampon TRIS (pH 7,4) à 298K. ^b dans un mélange tampon TRIS / glycérol (1/1) à 77K. ^c durée de vie d'émission de l'état $^3\pi\pi^*$.

Si l'on considère l'état singulet, celui-ci est faiblement déplacé vers les faibles énergies lors de la complexation avec l'ion Gd³⁺. L'effet de cet ion est plus significatif si l'on considère les intensités de fluorescence (Figure 4). Celles-ci sont diminuées d'un facteur 2 lors de la complexation, indiquant qu'un ion lanthanide active de manière efficace le passage intersystème $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ (effet d'atome lourd).

La différence d'énergie entre l'état singulet (1S_0) et l'état triplet (1T_0) dans les complexes de gadolinium est comparable pour les 3 complexes ($\Delta E \sim 6000-7000 \text{ cm}^{-1}$). Les travaux de Reinhoudt et al. ont établi que le croisement intersystème est optimal lorsque la différence d'énergie entre les états singulet et triplet se situe autour de 5000 cm^{-1} .⁽²⁶⁾ On peut donc estimer que le croisement intersystème de ces différents complexes est efficace et en tout cas comparable.

Comme nous l'avons vu précédemment, le niveau d'énergie de l'état triplet du ligand au sein du complexe Ln³⁺ constitue une caractéristique essentielle dans l'efficacité de photosensibilisation des ions Eu³⁺ et Tb³⁺. L'énergie de ces états triplets se trouve bien au-dessus de celui de l'état émissif 5D_4 du terbium (20500 cm^{-1}). La différence énergétique est supérieure à 3900 cm^{-1} , donc bien au delà de la valeur de 2000 cm^{-1} établie par Latva et al.⁽²⁷⁾ au-dessous de laquelle on observe un transfert d'énergie en retour $^5D_4 \rightarrow ^3\pi\pi^*$. D'autre part, l'énergie du niveau 5D_3 de l'ion Tb³⁺ étant supérieur à 26250 cm^{-1} , l'énergie ne peut être transférée qu'à son niveau émissif 5D_4 . Par contre, dans le cas de l'euporium, cette valeur élevée de l'énergie de l'état triplet des ligands peut impliquer un transfert d'énergie non pas

directement vers l'état 5D_0 (17300 cm^{-1}) de l'euporium, mais vers des états excités Eu^* d'énergie supérieure à savoir les états 5D_1 , 5D_2 , 5D_3 situés respectivement à 19000 , 21500 , et 24500 cm^{-1} respectivement. Le transfert de ces niveaux $5D_j$ vers le niveau émissif 5D_0 s'effectue alors de manière non radiative et en conséquence des pertes d'énergie appréciables peuvent se produire lors de cette migration.

III.3. Propriétés de luminescence des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+}

L'excitation des complexes a été effectuée au niveau de la bande d'absorption de plus faible énergie du ligand : 298 , 300 et 283 nm pour $\text{L}_9\cdot\text{Ln}$, $\text{L}_{10}\cdot\text{Ln}$ et $\text{L}_{11}\cdot\text{Ln}$ respectivement. L'émission caractéristique des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} obtenue dans ces conditions ainsi que l'enregistrement des spectres d'excitation permettent d'établir sans ambiguïté que les états 5D_0 et 5D_4 de ces ions sont peuplés par l'intermédiaire des états excités du ligand comme le montre la figure 6 dans le cas des complexes d'euporium.

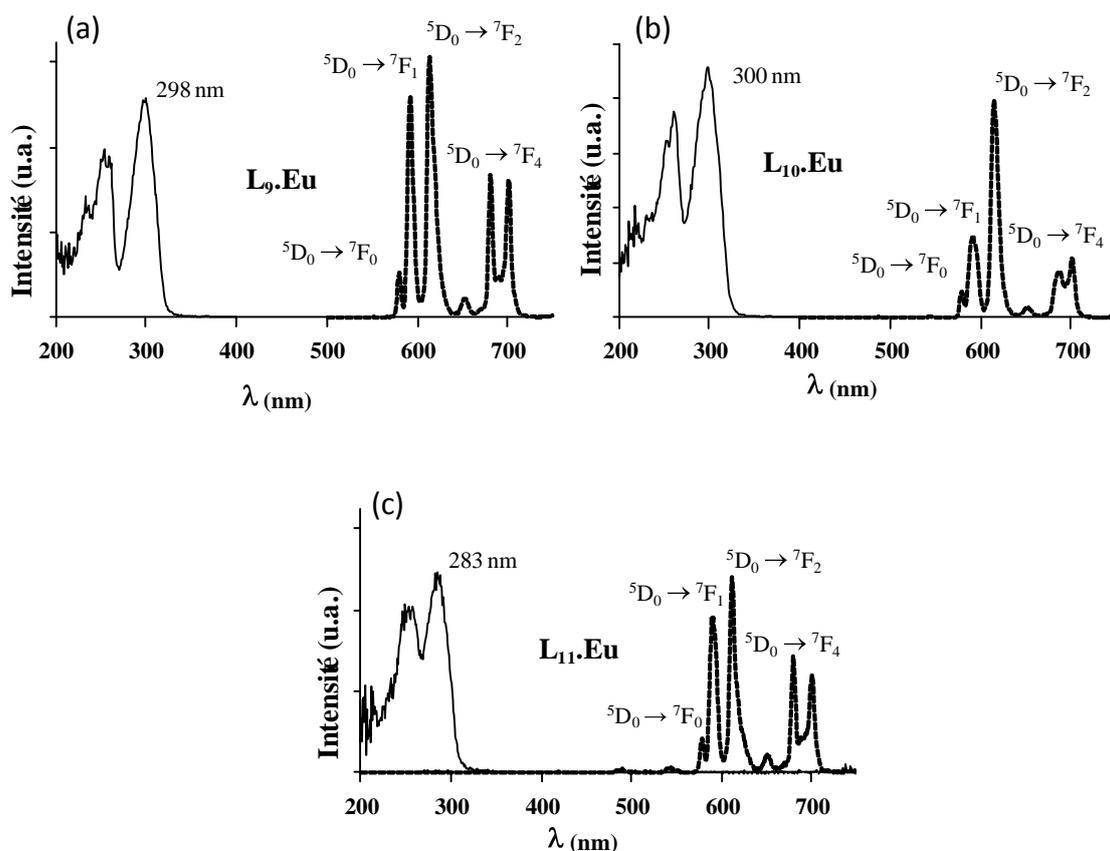


Figure 6. Spectres corrigés et normalisés d'excitation (—) et d'émission (...) des complexes $\text{L}_9\cdot\text{Eu}$ (a) [$\text{à } 10^{-6}\text{ M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 298\text{ nm}$], $\text{L}_{10}\cdot\text{Eu}$ (b) [$\text{à } 10^{-6}\text{ M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 300\text{ nm}$], $\text{L}_{11}\cdot\text{Eu}$ (c) [$\text{à } 10^{-5}\text{ M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 283\text{ nm}$] en tampon Tris 50 mM $\text{pH } 7,4$. Fentes exc./em. = $5/5\text{ nm}$.

Chapitre IV

Les spectres d'émission des complexes **L₉.Eu** et **L₁₁.Eu** sont similaires quant à la répartition et à la forme des différentes raies d'émission. Le rapport des intensités des raies ${}^7F_2 / {}^7F_1$, indicateur d'un changement d'environnement de l'ion Eu^{3+} , est dans le cas de ces deux complexes assez voisin : 1,97 et 1,59 pour **L₉.Eu** et **L₁₁.Eu**, respectivement. Le complexe **L₁₀.Eu** se distingue par un rapport ${}^7F_2 / {}^7F_1$ de 2,86, ce qui suggère une distorsion de symétrie plus importante autour de l'ion. Ce complexe se distingue également par une allure différente de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_4$ située vers 690 nm.

Les déclin de luminescence des différents complexes, obtenus après excitation dans les bandes d'absorption intra-ligand, sont monoexponentielles dans les deux solvants (H_2O et D_2O) et aux deux températures (298K et 77K) étudiées (Tableau 3). Tous les complexes présentent des durées de vie d'émission particulièrement longues dans H_2O à température ambiante : $0,8 < \tau_{\text{LEu}} < 1,1$ ms pour les complexes d'euporium et $2,3 < \tau_{\text{LTb}} < 3,1$ ms pour ceux de terbium. Dans cette série, les complexes **L₁₀.Ln** présentent les durées de vie d'émission les plus faibles.

Complexes		$\tau_{\text{H}}^{298\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}}^{298\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{H}}^{77\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}}^{77\text{K}}$ (ms)	$n_{\text{H}_2\text{O}}^{(a)}$
L₉	Eu^{3+}	1,07	1,60	1,30	1,61	0,07
	Tb^{3+}	2,94	3,20	2,98	3,20	-0,15
L₁₀	Eu^{3+}	0,84	1,63	1,08	1,68	0,40
	Tb^{3+}	2,30	3,00	2,49	3,05	0,20
L₁₁	Eu^{3+}	0,96	1,60	1,26	1,73	0,2
	Tb^{3+}	3,08	3,34	3,10	3,36	-0,17

Tableau 3. Caractéristiques de luminescence des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} des ligands **L₉**, **L₁₀** et **L₁₁** en tampon TRIS 50 mM pH 7,4. (a) Calculé selon la relation de Parker et al.⁽²⁸⁾

La détermination des durées de vie de luminescence en milieu deutéré et l'utilisation de la relation de Parker et al.⁽²⁸⁾ indiquent sans ambiguïté qu'aucune molécule d'eau est coordonnée à l'ion métallique dans les complexes **L₉.Eu** et **L₁₁.Eu**. Ces résultats sont en accord avec l'existence dans ces complexes d'un ion lanthanide nonacoordonné et des structures nonadentate de ces deux ligands. La participation à la complexation du métal des chromophores mixtes pyrazolylpyridine se trouve ainsi confirmée. Bien que le ligand **L₁₀** soit potentiellement décadente, nous observons 0,4 (0,3 dans le cas de l'utilisation de la relation de Horrocks)⁽²⁹⁾ et 0,2 molécule d'eau dans la sphère de coordination des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} , respectivement. Cela peut signifier l'existence dans ce cas d'un équilibre rapide à l'échelle du

Chapitre IV

temps de la spectroscopie de luminescence entre un complexe « déshydraté » et un complexe « monoquo », le complexe sans molécule H₂O liée étant toutefois prépondérant. On peut noter d'autre part qu'à 77K le nombre d'hydratation du complexe **L₁₀.Eu** est inférieur à 0,1 correspondant à la précision des mesures expérimentales et des relations empiriques utilisées.

Les mesures effectuées dans D₂O à basse température permettent d'exclure tout effet notable de la température sur ces durées de vie. La plus grande variation observée entre τ_D^{77K} et τ_D^{298K} est seulement de 8% (**L₁₁.Eu**). On peut donc conclure que la luminescence de ces complexes n'est pas affectée par un processus de désactivation tel qu'un transfert d'énergie en retour métal – ligand, $L_n^* \rightarrow {}^3\pi\pi^*$. Ces résultats sont en parfaite concordance avec la position énergétique des états triplet des ligands que nous avons établie à partir des complexes Gd³⁺.

Nous avons reporté dans le tableau 4 les rendements quantiques des différents complexes **L₉₋₁₁.Ln**. Nous y avons associé les données relatives aux différentes constantes de vitesse radiatives et non radiatives, ainsi que les valeurs de l'efficacité de transfert $\Phi_{CIS} \times \Phi_{ET}$.

Complexes		k_r	$k_{(OH)}$	$k_{nr f(T)}$	$\Phi_{Ln} (\%)$	$\Phi_{CIS} \times \Phi_{ET} (\%)$	$\Phi_H (\%)$
L₉	Eu ³⁺	621	310	0	66,4	7,5	5
	Tb ³⁺	313	28	0	96	50	48
L₁₀	Eu ³⁺	595	577	18	50	8	4
	Tb ³⁺	328	101	4	75,5	59,6	45
L₁₁	Eu ³⁺	578	417	47	55,5	1,8	1
	Tb ³⁺	298	25	0	92	30	28

Tableau 4. Constantes de vitesse k_r , k_{OH} , $k_{nr f(T)}$ en s⁻¹ et valeurs des rendements Φ_H , $\Phi_{CIS} \times \Phi_{ET}$ et Φ_{Ln} des complexes d'euporium et de terbium des ligands **L₉**, **L₁₀** et **L₁₁**.

Un examen rapide des données du tableau 4 permet de mettre en évidence les faibles rendements quantiques des complexes Eu³⁺ ($\Phi_H < 5\%$) par rapport aux complexes Tb³⁺ ($\Phi_H > 28\%$). Le nombre d'hydratation de ces différents complexes étant négligeable, les faibles rendements quantiques observés pour les complexes Eu³⁺ trouvent leur origine dans la position énergétique de l'état triplet du ligand (cf paragraphe III.2). Ce comportement différent entre les complexes Eu³⁺ et Tb³⁺ est attribué à une différence énergétique plus importante entre l'état triplet du ligand et le niveau accepteur de l'ion Eu(III), défavorisant le

Chapitre IV

transfert énergétique intramoléculaire : $7100 < \Delta E (3\pi\pi^* - {}^5D_0) < 8900 \text{ cm}^{-1}$ par rapport à $3900 < \Delta E (3\pi\pi^* - {}^5D_4) < 5700 \text{ cm}^{-1}$.

Ces données sont en parfait accord avec les travaux de Latva et al.,⁽²⁷⁾ en particulier avec leur analyse des valeurs du rendement quantique (Eu) en fonction de l'énergie de l'état triplet du ligand ($\Phi(\text{Eu}) = f[E({}^3\pi\pi^*)]$) dans le cas de chélates Eu(III) dérivés de ligands de type bis(iminodiacétate). Les énergies des états triplets de **L₉₋₁₁.Gd** (24400 et 26200 cm^{-1}) correspondent aux deux minima de la courbe proposée par ces auteurs (Figure 7).

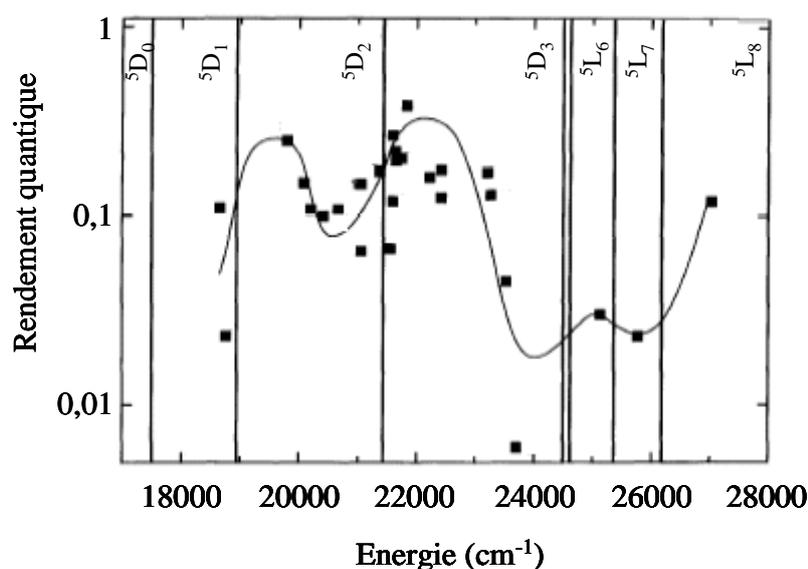


Figure 7. Rendements quantiques de luminescence de chélates Eu(III) en fonction de l'énergie de l'état triplet du ligand. La courbe correspond à la dépendance proposée par les auteurs. D'après Latva et al.⁽²⁷⁾

Les rendements quantiques Φ_H des complexes **L₉.Tb** et **L₁₀.Tb** (48 et 45% respectivement) sont parmi les plus élevés observés en milieu aqueux d'après les données de la littérature.⁽³⁰⁾ Le rendement quantique de **L₁₁.Tb** quoique notable (28%) est cependant nettement plus faible.

L'analyse de Latva et al. ($\Phi(\text{Tb}) = f[E({}^3\pi\pi^*)]$) dans le cas de chélates Tb(III) (Figure 8) d'une part et la similitude de l'énergie de l'état triplet des complexes **L₁₀.Gd** et **L₁₁.Gd** d'autre part permet d'exclure le facteur énergie $E({}^3\pi\pi^*)$ comme facteur responsable de cette diminution du rendement quantique observée pour **L₁₁.Tb**.

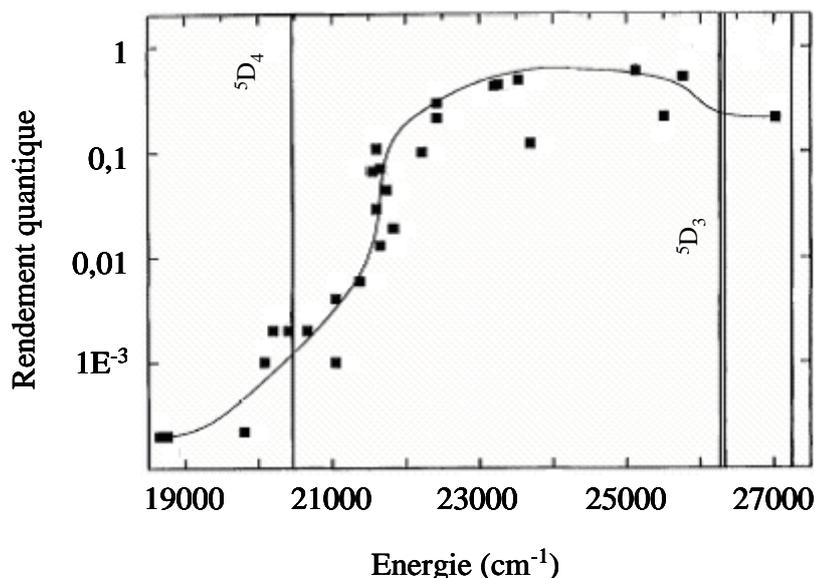


Figure 8. Rendements quantiques de luminescence de chélates Tb(III) en fonction de l'énergie de l'état triplet du ligand. La courbe correspond à la dépendance proposée par les auteurs. D'après Latva et al.⁽²⁷⁾

Une analyse basée sur l'implication des différents termes intervenant dans l'expression du rendement quantique ($\Phi_H = \Phi_{CIS} \times \Phi_{ET} \times \Phi_{Tb}$) permet d'apporter un élément de réponse. Dans ce but nous opposerons les deux complexes **L₁₁.Tb** et **L₉.Tb** de structure similaire, se différenciant seulement par la nature du point d'attachement du chromophore au motif complexant DO3A (unité pyrazole ou unité pyridine). On constate (Tableau 4) que pour ces deux complexes la valeur du terme Φ_{Tb} est similaire (96 ou 92%) alors que le terme $\Phi_{CIS} \times \Phi_{ET}$ est nettement différencié : 50% pour **L₉.Tb** et 30% pour **L₁₁.Tb**. En ce qui concerne le terme Φ_{CIS} , nos données expérimentales laissent penser que ce terme est semblable dans ces deux complexes. Nous notons en effet une différence d'énergie ΔE ($^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$) comparable et une activation du passage intersystème sous l'effet d'un ion lanthanide similaire (cf. paragraphe III.2.).

Actuellement, avec les données expérimentales disponibles, nous émettrons comme hypothèse que le plus faible rendement quantique Φ_H observé avec le complexe **L₁₁.Tb** provient d'un transfert d'énergie Φ_{ET} moins efficace. Ceci suggère une interaction chromophore – lanthanide plus faible dans **L₁₁.Tb**, en accord avec les données d'absorption. Dans le cas de ce complexe, l'interaction chromophore – métal se traduit par un déplacement bathochrome de la bande d'absorption de plus faible énergie de seulement 3 nm, à comparer à un déplacement de 15 nm observé pour **L₉.Tb**.

IV Cinétiques de complexation des ligands L₉₋₁₁ en tampon Tris, 50 mM pH 7,4

Cette étude sur la cinétique de formation des complexes a été réalisée par spectroscopie de luminescence. Après addition d'un équivalent de sel EuCl₃ ou TbCl₃ à une solution de ligand dans le tampon TRIS (pH 7,4), nous avons suivi l'intensité de la raie d'émission ⁵D₀ → ⁷F₂ à 615 nm (complexes Eu³⁺) ou de la raie d'émission ⁵D₄ → ⁷F₅ à 545 nm (complexes Tb³⁺) en fonction du temps. La concentration des entités est de 1×10⁻⁵ M. Quelques profils de cinétique de formation de ces complexes sont représentés dans la figure 9.

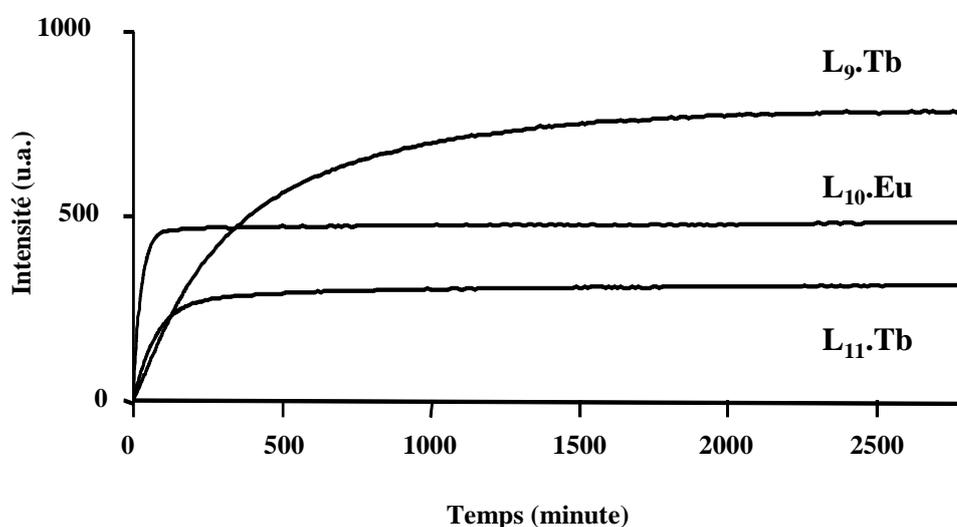


Figure 9. Cinétiques de complexation des ligands L₉, L₁₁ avec l'ion Tb³⁺ et L₁₀ avec l'ion Eu³⁺.

Cette étude permet de montrer que la cinétique de complexation est dépendante de la structure des ligands. L'équilibre est atteint au bout de 2 h dans le cas du ligand L₁₀, 5 h et 28 h pour les ligands L₁₁ et L₉ respectivement. La vitesse de complexation plus rapide observée pour L₁₀ par rapport à L₉ est vraisemblablement due à la présence de la fonction acide carboxylique présente sur le chromophore pyrazolylpyridine dans L₁₀. Cette fonction peut jouer le rôle d'« ancre » permettant d'impliquer plus rapidement la participation du chromophore dans la sphère de coordination du lanthanide. Nous pouvons suggérer la même hypothèse en ce qui concerne les ligands L₁₁ et L₉. L'unité pyridine, motif coordinant plus efficace qu'une unité pyrazole (cf chapitre 2) jouerait le rôle d'ancre dans le cas du ligand L₁₁,

assistant le motif pyrazole à adopter une conformation *cis* dans le dihétero-cycle, conformation favorable à une complexation du type bidente du dihétero-cycle. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour étayer ces hypothèses : par exemple l'étude du ligand DO3A comportant un chromophore 2,2'-bipyridine.

D'autre part nous observons aucune diminution de luminescence des complexes L_9Tb et $L_{11}Tb$ lorsque ceux-ci sont mis en compétition pendant plus de quatre jours avec 100 équivalents de DTPA dans un milieu tampon TRIS 50 mM pH 7,4. Ces complexes montrent donc une stabilité cinétique élevée, en accord avec leur structure dérivée du motif DO3A.

V Etude comparative des propriétés lumineuses de complexes Tb(III) dérivés de ligands à motif *N,C*-pyrazolypyridine

Nous avons rassemblé dans le tableau 5 les principales caractéristiques de luminescence de complexes de terbium(III) photosensibilisés par un chromophore *N,C*-pyrazolypyridine introduit d'une manière extracyclique dans une structure dérivée du DO3A (L_9 et L_{11}) ou bien intégré dans une structure macrocyclique (L_a) ou acyclique (L_b). A des fins de comparaison, nous avons également introduit dans ce tableau les données correspondantes à un complexe Tb(III) photosensibilisé par un chromophore bipyridine dans une structure DO3A (L_c). La structure de ces différents ligands est rapportée dans la figure 10.

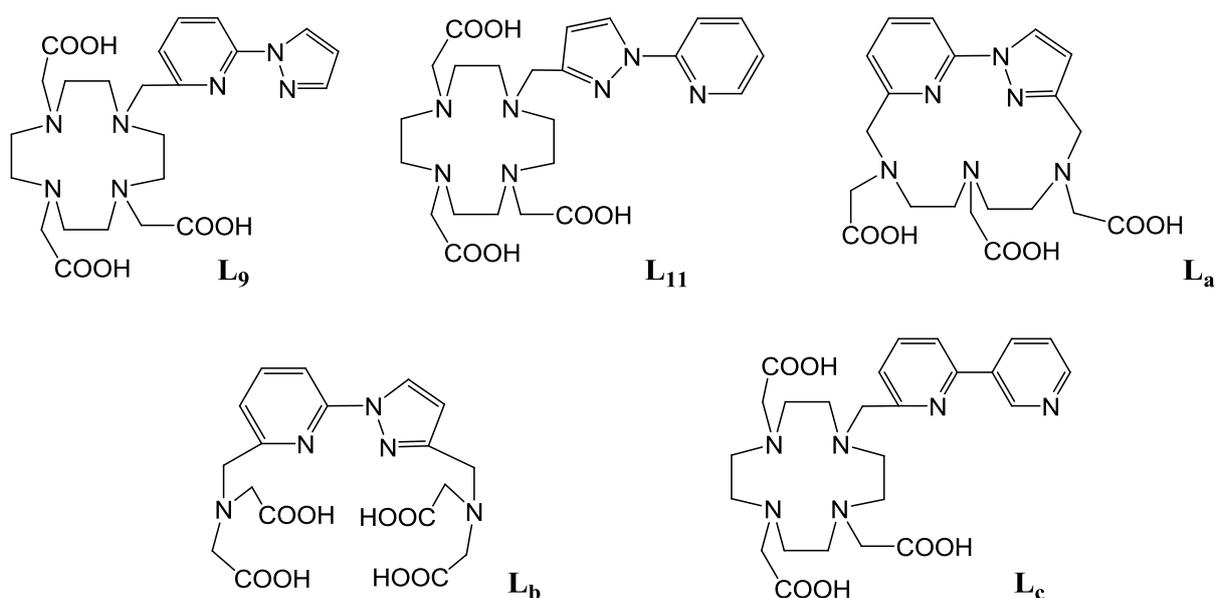


Figure 10. Structure des ligands L_9 , L_{11} et L_{a-c} .

Chapitre IV

Complexes	τ_H^{298K} (ms)	n_{H_2O}	$\Phi_{CIS} \times \Phi_{ET}$ (%)	Φ_{Ln} (%)	Φ_H (%)
L₉.Tb	2,94	0	50	96	48
L₁₁.Tb	3,08	0	30	92	28
L_a.Tb	1,85	1	83	59	49
L_b.Tb	1,71	1	80	51	41
L_c.Tb	0,59	0,36	30	24	7

Tableau 5. Caractéristiques de luminescence des complexes de terbium dérivés des ligands **L₉**, **L₁₁**, **L_a**,⁽²⁾ **L_b**,⁽¹⁾ et **L_c**.⁽³¹⁾

L'introduction d'un chromophore *N,C*-pyrazolypyridine dans un ligand de type DO3A, macrocyclique ou acyclique se traduit au niveau de leurs complexes de terbium(III) par des rendements quantiques appréciables, supérieurs à 30%.

Par rapport aux dérivés macrocyclique ou acyclique, **L_a.Tb** ou **L_b.Tb**, l'introduction d'un tel chromophore dans une structure de type DO3A assure une protection totale de l'ion lanthanide contre les interactions avec les molécules de solvant (H₂O). Ceci est dû à la différence de denticité des différents ligands engagés : structure octadentate (**L_{a,b}.Tb**) ou structure nonadentate (**L_{9,11}.Tb**). En conséquence les durées de vie d'émission sont améliorées au moins par un facteur 1,5 et se situent dans le domaine des 3 millisecondes.

Cette absence de molécules d'eau liées au métal dans les complexes **L₉.Tb** et **L₁₁.Tb** se traduit également par un meilleur rendement quantique intrinsèque, Φ_{Tb} , proche de l'unité dans le cas de ces complexes.

En revanche, si l'on considère que dans ces différents systèmes le rendement du passage intersystème, $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$, est similaire, le recours à un ligand type dérivé DO3A se traduit par une efficacité de transfert Φ_{ET} moins performante. Par rapport aux complexes **L_{a,b}.Tb**, cette efficacité de transfert est de 40% (**L₉.Tb**) à 60% (**L₁₁.Tb**) plus faible. Une structure macrocyclique à 15 chaînons ou une structure acyclique semble donc favoriser une interaction chromophore-métal plus forte, c'est-à-dire à plus courte distance.

Nos résultats permettent également de confirmer que dans le cas d'une structure dérivée du DO3A, la substitution d'un chromophore 2,2'-bipyridine par un chromophore *N,C*-pyrazolypyridine permet d'améliorer sensiblement les propriétés luminescentes des complexes Tb³⁺. L'examen des données photophysiques indiquées dans le tableau 5 permet de mettre en relief une augmentation de la durée de vie et du rendement quantique de luminescence d'un facteur 5 et 7 respectivement.

VI Conclusion

Ce chapitre a été consacré à la synthèse de trois ligands macrocycliques dérivés du motif DO3A (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécan-1,4,7-triacétique) comportant un chromophore extracyclique *N,C*-pyrazolylpyridine et à l'évaluation de leur capacité à photosensibiliser la luminescence des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} dans un milieu aqueux.

La synthèse de ces ligands a été effectuée de manière efficace par l'introduction dans une première étape de trois chaînes acétate de *tert*iobutyle sur le motif cyclène, suivie de l'introduction de la chaîne dihérocyclique. Lors de ces travaux, nous avons eu recours comme méthodologie de couplage entre un noyau pyrazole et un noyau pyridine (liaison azote-carbone) à celle utilisant un sel de cuivre (CuI) et la *trans* 1,2-cyclohexanediamine comme ligand auxiliaire. Cette méthodologie s'est révélée être une alternative intéressante par rapport aux données de la littérature, conduisant à des rendements de couplage compris entre 54 et 86%.

L'étude de la sphère d'hydratation des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} a permis de montrer que les ligands saturent la sphère de coordination du métal. La détermination des énergies de l'état triplet des ligands a mis en évidence que leurs positions relatives par rapport aux niveaux émetteurs des deux ions n'autorisait pas un transfert d'énergie en retour métal \rightarrow ligand. L'absence de ce processus de désactivation non radiative a été confirmée par la détermination des durées de vie d'émission à basse température. En conséquence, tous les complexes présentent des durées de vie d'émission particulièrement longues dans H_2O à température ambiante : $0,8 < \tau_{\text{LEu}} < 1,1$ ms pour les complexes d'euporium et $2,3 < \tau_{\text{LTb}} < 3,1$ ms pour ceux de terbium.

Les complexes d'euporium présentent des rendements quantiques de luminescence relativement faibles ($< 5\%$), en raison d'une énergie trop élevée de l'état triplet des ligands. Par contre les complexes de terbium sont caractérisés par des rendements quantiques de luminescence particulièrement satisfaisants : 28% (**L₁₁.Tb**) et 45, 48% (**L₁₀.Tb**, **L₉.Tb**). Le plus faible rendement quantique observé pour le complexe **L₁₁.Tb** a été relié à une moindre efficacité de transfert d'énergie état triplet du ligand \rightarrow lanthanide (Φ_{ET}), dû à une plus faible interaction chromophore – métal par rapport aux complexes **L₉.Tb** et **L₁₀.Tb**.

Chapitre IV

Bien que présentant des cinétiques de formation différentes, les complexes Tb^{3+} sont caractérisés par une excellente stabilité cinétique, comme nous avons pu l'observer lors de réactions de compétition avec le DTPA ($\log K_{\text{cond}}(Tb) = 18,3$ à pH 7,3).

VII Bibliographie

- (1) Picard, C.; Geum, N.; Nasso, I.; Mestre, B.; Tisnes, P.; Laurent, S.; Muller, R. N.; Vander Elst, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5309-5312.
- (2) Nasso, I.; Bedel, S.; Galaup, C.; Picard, C. *Eur. J. Inorg. Chem* **2008**, 2064-2074.
- (3) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodriguez-Blasco, M. A.; Vila-Nueva, S. P.; Garayalde, D.; Rodriguez-Ubis, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7801-7805.
- (4) Bedel, S. Doctorat, Université Paul Sabatier, **2004**, p129.
- (5) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodriguez-Blasco, M. A.; Vila-Nova, S. P.; Rodriguez-Ubis, J. C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1353-1355.
- (6) Freire, R. O.; Vila-Nova, S. P.; Brunet, E.; Juanes, O.; Rodríguez-Ubis, J. C.; Alves Jr, S. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *443*, 378-382.
- (7) Suchý, M.; Hudson, R. H. E. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4847-4865.
- (8) Kruper, W. J.; Rudolph, P. R.; Langhoff, C. A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3869-3876.
- (9) Chappell, L. L.; Voss, D. A.; Horroks, W. D., Jr.; Morrow, J. R. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 3989-3998.
- (10) Li, C.; Wong, W.-T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3217-3220.
- (11) Gunnlaugsson, T.; Massue, J.; Plush, S. E.; Bonnet, C. S.; Moore, D. A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8052-8055.
- (12) Rohovec, J.; Gyepes, R.; Cisarova, I.; Rudovsky, J.; Lukes, I. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1249-1253.
- (13) Bernard, H.; Yaouanc, J.-J.; Clément, J. C.; Des Abbayes, H.; Handel, H. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 639-642.
- (14) Filali, A.; Yaouanc, J.-J.; Handel, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 560-561.
- (15) Patinec, V.; Yaouanc, J.-J.; Clément, J. C.; Handel, H.; Des Abbayes, H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 79-82.
- (16) Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 348-357.

Chapitre IV

- (17) Duimstra, J. A.; Femia, F. J.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12847-12855.
- (18) Gunnlaugsson, T.; Leonard, J. P. *Dalton Trans.* **2005**, 3204 – 3212.
- (19) Mizukami, S.; Akikawa, R. T.; Sugihara, F.; Hori, Y.; Tochio, H.; Walchli, M.; Shirakawa, M.; Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 794–795.
- (20) Tu, C.; Nagao, R.; Louie, A. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6547 –6551.
- (21) Klapars, A.; Antilla, J. C.; Huang, X.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7727-7729.
- (22) Bodar-Houillon, F.; Heck, R.; Bohnenkamp, W.; Marsura, A. *J. Lumin.* **2002**, *99*, 335-341.
- (23) Fatin-Rouge, N.; Toth, E.; Perret, D.; Backer, R. H.; Merbach, A. E.; Bunzli, J.-C. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10810-10820.
- (24) Cristau, H.-J.; Cellier, P. P.; Spindler, J.-F.; Taillefer, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 695-709.
- (25) Dischino, D. D.; Delaney, E. J.; Emswiler, J. E.; Gaughan, G. T.; Prasad, J. S.; Srivastava, S. K.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 1265-1269.
- (26) Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; Van der Tol, E. B.; Verhoeven, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9408-9414.
- (27) Latva, M.; Takalo, H.; Mikkola, V.-M.; Matachescu, C.; Rodriguez-Ubis, J.-C.; Kankare, J. *J. Lum.* **1997**, *75*, 149-169.
- (28) Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; De Sousa, A. S.; Gareth Williams, J. A.; Woods, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2*, **1999**, 493-503.
- (29) Supkowski, R. M.; W. Horrocks, W. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *340*, 44-48.
- (30) Brunet, E.; Juanes, O.; Rodriguez-Ubis, J. C. *Current Chemical Biology* **2007**, *1*, 11-39.
- (31) Cross, J. P.; Dadabhoy, A.; Sammes, P. G. *J. Lumin* **2004**, *110*, 113-124.

Chapitre V : Partie expérimentale

Chapitre V

I Général

Toutes les manipulations effectuées avec des solvants anhydres ont été réalisées sous atmosphère d'argon. L'acétonitrile a été distillé sur P₂O₅. Le tétrahydrofurane a été distillé sur sodium/benzophénone. La diisopropyléthylamine ainsi que la triéthylamine ont été distillées sur KOH. Tous les autres réactifs ou solvants ont été utilisés sans purification préalable.

Les purifications par chromatographies ont été effectuées avec du gel de silice 60 (Merck, 60-200 µm, porosité 60 Å) ou du gel d'oxyde d'aluminium (Macherey-Nagel, activité IV, 50-200 µm).

La pureté des produits a été vérifiée par chromatographie sur couche mince sur plaque d'alumine ou de silice Merck 150 F₂₅₄ prêtes à l'emploi.

Les analyses par HPLC ont été effectuées en phase inverse sur une chaîne de type Alliance Waters 2696 associée à un détecteur à barette de diodes (Waters PDA 2996) avec une température de four de 30°C.

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Electrothermal IA9200.

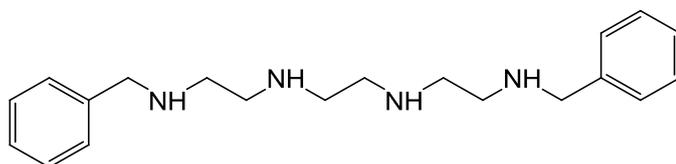
Les spectres RMN ¹H ont été réalisés sur un spectromètre Bruker AC300 ; les déplacements chimiques sont donnés en ppm en se calant sur le pic du solvant non deutéré résiduel ; les multiplicités des signaux sont données comme suit : s pour singulet, t pour triplet, q pour quadruplet et m pour multiplet. Les spectres RMN ¹³C ont été enregistrés en mode J modulé sur un spectromètre Bruker AC300.

Les spectres infrarouge ont été enregistrés à partir de pastilles de KBr ou entre lames de NaCl sur un spectromètre PerkinElmer FT/IR 1725X.

Les spectres de masse (ES) ont été obtenus sur un spectromètre API 365 Perkin Elmer Sciex équipé d'une source d'ionisation Electrospray. Les spectres de masse (DCI) ont été obtenus sur un spectromètre TSQ 7000 Thermo Electron équipé d'une source d'ionisation chimique. Les spectres de masse haute résolution ont été obtenus sur un spectromètre Waters équipé d'une source d'ionisation Electrospray.

II Partie synthèse des composés

1,10-Dibenzyl-1,4,7,10-tétraazadécane 2



$C_{20}H_{30}N_4$
Exact Mass: 326,25
Mol. Wt.: 326,48

Une solution de 0,72 g (6,78 mmol) de benzaldéhyde et de 0,50 g de 1,4,7,10-tétraazadécane (3,42 mmol) dans 50 mL de $CHCl_3$ est chauffée à reflux pendant 2h puis évaporée à sec. L'huile jaune clair obtenue dissoute dans 50 mL de méthanol est additionnée goutte à goutte à une solution de 0,43 g (11,36 mmol) de $NaBH_4$ dans 15 mL de méthanol. Le mélange résultant est chauffé à reflux pendant 1,5 h puis laissé sous agitation une nuit à température ambiante. Après évaporation à sec du milieu réactionnel, le résidu blanc obtenu est repris dans 75 mL de $CHCl_3$ et lavé avec 35 mL de NaOH 1M puis 140 mL de NaOH 1M. La phase organique est traitée avec 4 mL de HCl 37% puis 30 mL d'eau y sont ajoutés : le précipité blanc formé est isolé par filtration puis redissout dans un minimum d'eau. Cette solution aqueuse est traitée par ajouts de pastilles de KOH jusqu'au pH > 11 puis extraite avec 6 x 20 mL de CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées à sec. On obtient 0,53 g de composé attendu sous la forme d'une huile jaune.

Rdt : 48 %.

Rf : 0,32 (Alumine, éther de pétrole).

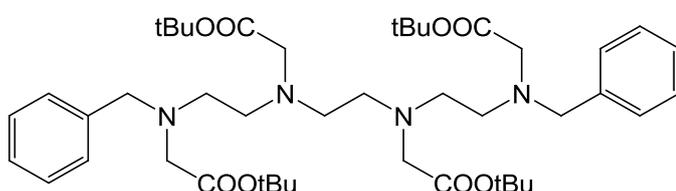
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 1,82 (s, 4H, NH) ; 2,70 (s, 4H, $-CH_2-N$) ; 2,74 (s, 8H, $-CH_2-N$) ; 3,78 (s, 4H, $-CH_2-Ph$) ; 7,20-7,32 (m, 10H, CH Ph).

RMN ^{13}C JMOD (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 48,60 ($-CH_2-N$) ; 49,20 ($-CH_2-N$) ; 53,90 ($-CH_2-Ph$) ; 126,90 (CH Ph) ; 128,30 (CH Ph) ; 129,30 (CH Ph) ; 140,30 (Cq Ph).

SM (DCI/ NH_3) : m/z (%) = 349,4 [$M+Na$] $^+$ (100) ; 327,5 [$M+H$] $^+$ (70).

1,10-dibenzyl-1,4,7,10-tétra(tert-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane 3

(1^{ère} voie)



$C_{44}H_{70}N_4O_8$
Exact Mass: 782,52
Mol. Wt.: 783,05

Chapitre V

1,88 mL (10,8 mmol) de diisopropyléthylamine est ajouté à une solution de **2** (0,53 g ; 1,62 mmol) dans 8 mL du DMF anhydre sous flux d'argon. Après 1 h d'agitation à température ambiante, 1,60 g (8,60 mmol) de bromoacétate de *tert*iobutyle est ajouté au mélange qui est laissé sous agitation à température ambiante pendant 2 jours sous atmosphère inerte. Après évaporation à sec, le résidu marron obtenu est repris dans 100 mL de CH₂Cl₂ et lavé avec 3 x 40 mL d'eau. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée à sec. L'huile marron ainsi obtenue est préalablement purifiée sur colonne ouverte de silice (CH₂Cl₂/méthanol : 100/0 → 98/2) afin d'éliminer l'excès de bromoacétate de *tert*iobutyle puis sur colonne d'alumine (éther de pétrole/ CH₂Cl₂ : 80/20 → 0/100) pour conduire à 247 mg de composé attendu sous la forme d'une huile jaune.

Rdt : 19 %.

Rf : 0,52 (Alumine, CH₂Cl₂/ éther de pétrole 8/2)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,43 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 1,45 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,68 (m, 4H, -CH₂-N) ; 2,75 (m, 8H, -CH₂-N) ; 3,23 (s, 4H, -CH₂-COOtBu) ; 3,29 (s, 4H, -CH₂-COOtBu) ; 3,78 (s, 4H, -CH₂-Ph) ; 7,28-7,31 (m, 10H, CH Ph).

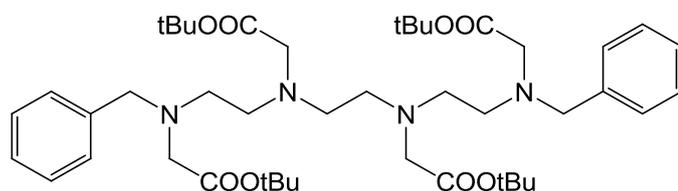
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,20 (CH₃ tBu) ; 52,10 (-CH₂-N) ; 52,60 (-CH₂-N) ; 55,20 (-CH₂-COOtBu) ; 56,10 (-CH₂-COOtBu) ; 58,40 (-CH₂-Ph) ; 80,62 (Cq tBu) ; 80,67 (Cq tBu) ; 126,90 (CH Ph) ; 128,30 (CH Ph) ; 128,90 (CH Ph) ; 139,20 (Cq Ph) ; 170,87 (COOtBu) ; 170,98 (COOtBu).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1733 (C=O ester) ; 1455 (C=C aromatique) ; 700 (C-H aromatique hors du plan) ; 733 (C-H aromatique hors du plan).

SM (DCI/NH₃) : m/z (%) = 783,6 [M+H]⁺ (100).

1,10-dibenzyl-1,4,7,10-tétra(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane **3**

(2^{ème} voie)



C₄₄H₇₀N₄O₈
Exact Mass: 782,52
Mol. Wt.: 783,05

A une suspension de 1,4-di(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane **5** (686 mg ; 2,37 mmol) et de K₂CO₃ (3,3 g ; 23,7 mmol) dans 85 mL de CH₃CN anhydre portée à reflux pendant 1 h sont ajoutés deux équivalents de 2-[N-benzyl, N-(2-bromoéthyl)]amino acétate de *tert*iobutyle **6** (1,55 g ; 4,75 mmol). Le mélange résultant est chauffée à reflux pendant 24 h

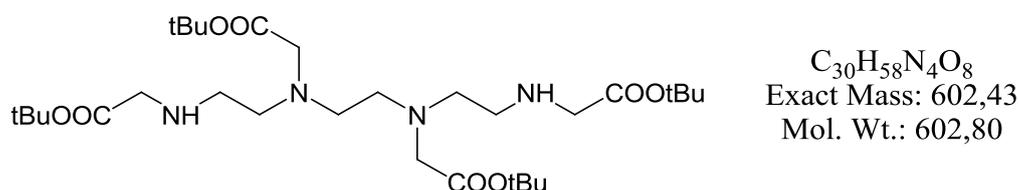
Chapitre V

sous atmosphère inerte. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans le CH₂Cl₂ puis filtré à nouveau afin d'éliminer les sels résiduels et évaporé à sec. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne de silice (CH₂Cl₂/méthanol 100/0 → 98/2) pour conduire à 1,70 g de composé **3** attendu sous la forme d'une huile jaune.

Rdt : 92 %.

Rf : 0,34 (silice, CH₂Cl₂/ méthanol 98/2).

1,4,7,10-tétra(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane **4**



Du palladium sur charbon actif à 10% (106 mg) est ajouté à une solution de 1,10-dibenzyl-1,4,7,10-tétra(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane **3** (319 mg ; 0,40 mmol) dans 14 mL de méthanol. La suspension résultante est agitée une nuit à température ambiante sous 5 bars de dihydrogène. Après filtration sur célite et rinçage au méthanol, le filtrat est évaporé à sec pour donner 241 mg d'une huile jaune.

Rdt : quantitatif

Rf : 0,4 (alumine ; CH₂Cl₂/méthanol 98/2).

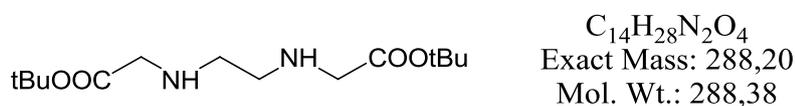
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,44 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 1,46 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,81 (m, 4H, -CH₂-N) ; 3,01 (m, 8H, -CH₂-N) ; 3,40 (s, 4H, -CH₂-COOtBu) ; 3,59 (s, 4H, -CH₂-COOtBu).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) = 28,15 (CH₃ tBu) ; 28,29 (CH₃ tBu) ; 45,46 (-CH₂-N) ; 49,04 (-CH₂-N) ; 50,16 (-CH₂-N) ; 51,32 (-CH₂-COOtBu) ; 55,27 (-CH₂-COOtBu) ; 81,04 (Cq tBu) ; 82,53 (Cq tBu) ; 168,45 (C=O) ; 171,25 (C=O).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 603,5 [M+H]⁺ (100).

1,4-di(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane **5**

(2^{ème} voie)



Chapitre V

A une solution refroidie à 0°C d'acide éthylène diamine-N,N'-diacétique (3 g; 17 mmol) dans 135 mL d'acétate de *tert*butyle, sont ajoutés goutte à goutte 4,5 mL d'acide perchlorique à 70%. Après 12 jours d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel devenu laiteux est refroidi à 0°C puis lavé avec 5 x 60 mL (HCl 0,5 N). Les phases aqueuses sont neutralisées directement avec NaHCO₃ solide puis extraites par 6 x 100 mL d'éther diéthylique. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées à sec. L'huile jaune ainsi obtenue est solubilisée dans 100 mL d'éther diéthylique puis lavée par 3 x 15 mL d'eau distillée afin d'éliminer le *tert*butanol formé. Après séchage, filtration et évaporation à sec de la phase organique, on obtient 2,1 g de produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt: 43 %

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,46 (s, 18H, CH₃ tBu); 2,71 (s, 4H, -CH₂-N); 3,30 (s, 4H, -CH₂-COOtBu).

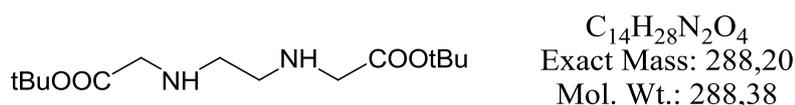
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,11 (CH₃ tBu); 48,90 (-CH₂-N); 51,59 (-CH₂-COOtBu); 81,06 (Cq tBu); 171,81 (COOtBu).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1733 (C=O ester).

SM (DCI/NH₃) : m/z (%) = 289,5 [M+H]⁺ (100).

1,4-di(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane 5

(3^{ème} voie)

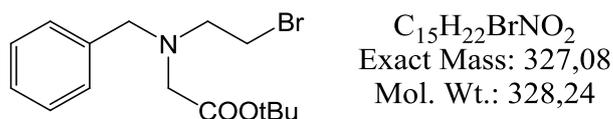


Du Palladium sur charbon actif à 10% (180 mg) est ajouté à une solution de 1,4-dibenzyl-1,4-di(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane **9** (540 mg ; 1,15 mmol) dans 20 mL de méthanol. La suspension résultante est agitée une nuit à température ambiante sous 5 bars de dihydrogène. Après filtration sur célite et rinçage au méthanol, le filtrat est évaporé à sec pour donner 330 mg d'une huile jaune.

Rdt : quantitatif

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,46 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,73 (s, 4H, -CH₂-N) ; 3,32 (s, 4H, -CH₂-COOtBu).

2-[N-benzyl, N-(2-bromoéthyl)]amino acétate de *tert*iobutyle **6**



A une solution refroidie à 0°C de **11** (3,2 g ; 12 mmol) et de N-bromosuccinimide (2,5 g ; 14,3 mmol) dans 50 mL de CH₂Cl₂, est ajoutée par portions sur 1 h la triphénylphosphine (3,7 g ; 14,3 mmol). Le milieu réactionnel est laissé 30 minutes sous agitation à 0°C puis 4 h à TA. Après évaporation à sec, le résidu jaunâtre obtenu est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/éther éthylique 95/5) pour conduire à 3,2 g de composé attendu sous la forme d'une huile jaune claire.

Rdt : 82 %.

Rf : 0,42 (silice, éther de pétrole/éther diéthylique 95/05).

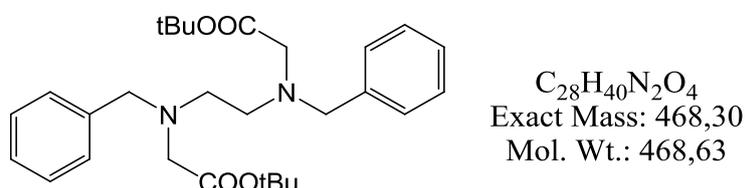
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,47 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 3,16 (t, 2H, J= 6 Hz, -CH₂-N) ; 3,30 (s, 2H, -CH₂-COOtBu) ; 3,38 (t, 2H, J= 6 Hz, -CH₂-Br) ; 3,88 (s, 2H, -CH₂-Ph) ; 7,29-7,34 (m, 5 H, CH Ph).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,21 (CH₃ tBu) ; 30,53 (CH₂) ; 55,19 (CH₂) ; 55,90 (CH₂) ; 58,08 (CH₂) ; 81,19 (Cq tBu) ; 127,32 (CH Ph) ; 128,39 (CH Ph) ; 128,83 (CH Ph) ; 138,72 (Cq Ph) ; 170,58 (COOtBu).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1733 (C=O ester) ; 1455 (C=C aromatique) ; 699 (C-H aromatique hors du plan) ; 740 (C-H aromatique hors du plan).

SM (DCI/CH₄) : m/z (%) = 330,1 (20) / 328,1 (25) [M+H]⁺ ; 274,0 (80) / 272,0 (85) [(MH - tBu) + H]⁺ ; 248,2 [M+H - HBr]⁺ (100).

1,4-dibenzyl-1,4-di(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane **9**



A une suspension chauffée à reflux pendant 1 h de N,N'-dibenzyléthylènediamine (3 g ; 12,48 mmol) et de K₂CO₃ (17 g ; 124 mmol) dans 300 mL d'acétonitrile anhydre, est ajouté le bromoacétate de *tert*iobutyle (4,86 g ; 25 mmol). Le mélange résultant est chauffé à reflux pendant 24 h puis filtré et évaporé à sec. Le résidu blanc obtenu est repris dans CH₂Cl₂ et les

Chapitre V

restes de sels sont éliminés par filtration. Le filtrat évaporé à sec conduit à 5,8 g de produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rdt : quantitatif

Pf : 70-71 °C

Rf : 0,24 (silice, CH₂Cl₂/MeOH 99/1).

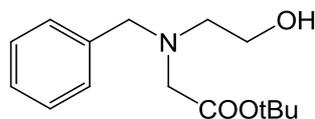
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,45 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,80 (s, 4H, -CH₂-N) ; 3,25 (s, 4H, -CH₂-COOtBu) ; 3,78 (s, 4H, -CH₂-Ph) ; 7,22-7,30 (m, 10H, CH Ph).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,22 (CH₃ tBu) ; 51,72 (-CH₂-N) ; 55,18 (-CH₂-COOtBu) ; 58,39 (-CH₂-Ph) ; 80,68 (Cq tBu) ; 126,97 (CH Ph) ; 128,20 (CH Ph) ; 128,96 (CH Ph) ; 139,26 (Cq Ph) ; 170,96 (COOtBu).

SM (ES, mode positif) : m/z (%) = 469,3 [M+H]⁺ (100) ; 413,4 [M+H-tBu]⁺ (16) ; 357,3 [M+H-2tBu]⁺ (14) ; 491,4 [M+Na]⁺ (7).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1718 (C=O ester) ; 1456 (C=C aromatique).

2-[N-benzyl, N-(2-hydroxyéthyl)]amino acétate de *tertiobutyle* **11**



C₁₅H₂₃NO₃
Exact Mass: 265,17
Mol. Wt.: 265,35

A une solution à 0°C de N-(2-hydroxyéthyl)benzylamine (500 mg ; 3,3 mmol) et de diisopropyléthylamine (426 mg ; 3,3 mmol) dans 4 mL de DMF anhydre, est ajouté goutte à goutte le bromoacétate de *tertiobutyle* (644 mg ; 3,3 mmol). Le milieu réactionnel est laissé 24 h sous agitation à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris dans 50 mL de CH₂Cl₂, lavé avec 4 × 20 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec pour conduire à une huile jaune clair correspondant à 875 mg de produit attendu.

Rdt : quantitatif

Rf : 0,44 (silice, CH₂Cl₂/ méthanol 99/1).

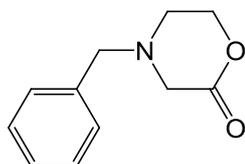
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,45 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 2,92 (t, 2H, J= 6 Hz, -CH₂-N) ; 3,27 (s, 2H, -CH₂-COOtBu) ; 3,63 (t, 2H, J= 6 Hz, -CH₂-OH) ; 3,88 (s, 2H, -CH₂-Ph) ; 7,29-7,35 (m, 5H, CH Ph).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,11 (CH₃ tBu) ; 55,38 (CH₂) ; 56,63 (CH₂) ; 58,59 (CH₂) ; 58,95 (CH₂) ; 81,41 (Cq tBu) ; 127,39 (CH Ph) ; 128,48 (CH Ph) ; 128,94 (CH Ph) ; 138,36 (Cq Ph) ; 171,14 (COOtBu).

Chapitre V

SM (DCI/CH₄) : m/z (%) = 210,1 [M+H-tBu]⁺ (100) ; 266,2 [M+H]⁺ (23).

N-Benzylmorpholin-2-one 12



C₁₁H₁₃NO₂
Exact Mass: 191,09
Mol. Wt.: 191,23

A une suspension refroidie à 0°C de N-(2-hydroxyéthyl)benzylamine (250 mg ; 1,70 mmol) et de K₂CO₃ (250 mg ; 1,8 mmol) dans 7 mL de CH₃CN anhydre, sont ajoutés des portions de bromoacétate de méthyle (280 mg ; 1,80 mmol). Le mélange résultant est agité 24 h à température ambiante sous atmosphère inerte. Le milieu réactionnel est ensuite filtré, concentré sous vide et repris dans le dichlorométhane, puis à nouveau filtré et évaporé sous vide pour donner uniquement 314 mg de composé **10** non attendu sous la forme d'une huile jaune.

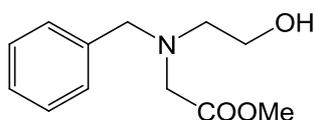
Rdt : 97 %.

Rf : 0,19 (silice, CH₂Cl₂/éther de pétrole 1/1).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 2,68 (t, 2H, J= 6 Hz, NCH₂), 3,33 (s, 2H, NCH₂CO), 3,57 (s, 2H, CH₂Ph), 4,39 (t, 2H, J= 6 Hz, CH₂O), 7,28-7,36 (m, 5H, CH Ph).

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 48,6 (NCH₂) ; 55,7 (NCH₂Ph) ; 61,7 (NCH₂CO) ; 68,8 (CH₂O) ; 127,8 (CH Ph) ; 128,6 (CH Ph) ; 129,1 (CH Ph), 136,1 (Cq), 167,5 (CO).

2-[N-benzyl, N-(2-hydroxyéthyl)]aminoacétate de méthyle 13



C₁₂H₁₇NO₃
Exact Mass: 223,12
Mol. Wt.: 223,27

A une solution refroidie à 0°C de N-(2-hydroxyéthyl)benzylamine (1 g ; 6,6 mmol) et de diisopropyléthylamine (0,85 g ; 6,6 mmol) dans 7 mL de DMF anhydre, est ajouté goutte à goutte du bromoacétate de méthyle (1 g ; 6,6 mmol). Le milieu réactionnel est laissé 24 h sous agitation à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans CH₂Cl₂, lavé trois fois à l'eau distillée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée à sec pour conduire à 1,1 g de produit attendu sous forme d'une huile jaune. Ce composé est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

Rf : 0,66 (silice, CH₂Cl₂/méthanol 99/1).

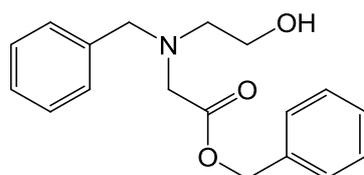
Chapitre V

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ = 2,87 (t, 2H, $J= 5$ Hz, NCH_2); 3,35 (s, 2H, CH_2CO); 3,60 (t, 2H, $J= 5$ Hz, CH_2OH); 3,69 (s, 3H, CH_3); 3,82 (s, 2H, PhNCH_2), 7,26-7,33 (m, 5H, CH Ph).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ = 51,7 (CH_3); 54,2 (NCH_2CO); 56,5 (NCH_2); 58,4 (PhCH_2N); 58,9 (CH_2OH); 127,5 (CH Ph); 128,5 (CH Ph); 128,9 (CH Ph); 138,1 (Cq); 172,2 (CO).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 246 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (100); 224 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (52); 262 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$ (11).

2-[N-benzyl, N-(2-hydroxyéthyl)]aminoacétate de benzyle **14**



$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$
Exact Mass: 299,15
Mol. Wt.: 299,36

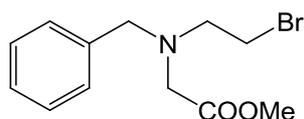
A une solution refroidie à 0°C de N-(2-hydroxyéthyl)benzylamine (2 g ; 13,3 mmol) et de diisopropyléthylamine (1,5 g ; 11,6 mmol) dans 15 mL de DMF anhydre, est ajouté goutte à goutte du bromoacétate de benzyle (3,05 g ; 13,3 mmol). Le milieu réactionnel est laissé 24 h sous agitation à température ambiante puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans CH_2Cl_2 , lavé trois fois à l'eau distillée. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée à sec pour conduire à une huile jaune correspondant à 3,37 g de mélange suivant : composé attendu **14** / lactone **12** (74/13). Ce mélange est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 2,92 (t, 2H, $J= 6$ Hz, CH_2N); 3,42 (s, 2H, CH_2COOBz); 3,62 (t, 2H, $J= 6$ Hz, CH_2OH); 3,86 (s, 2H, CH_2Ph); 5,14 (s, 2H, OCH_2Ph); 7,30-7,39 (m, 10H, CH Ph).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 54,1 (CH_2); 56,5 (CH_2); 58,4 (CH_2); 58,8 (CH_2); 66,5 (CH_2); 127,6 (CH Ph); 128,3 (CH Ph); 128,4 (CH Ph); 128,5 (CH Ph); 128,6 (CH Ph); 129,0 (CH Ph); 135,4 (Cq); 138,0 (Cq); 171,5 (C=O).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 322,3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ (100), 300,4 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (39).

2-[N-benzyl, N-(2-bromoéthyl)]amino acétate de méthyle **15**



$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{BrNO}_2$
Exact Mass: 285,04
Mol. Wt.: 286,16

A une solution refroidie à 0°C de **13** (1 g ; 4,5 mmol) et de triphénylphosphine (1,4 g ; 5,2 mmol) dans 20 mL de CH_2Cl_2 , est ajoutée par portions (environ 1/10 par minute) la N-bromosuccinimide (1 g ; 5,7 mmol). Le milieu réactionnel est laissé 16 h sous agitation à

Chapitre V

température ambiante. Après évaporation à sec, le résidu orangé est récupéré, puis broyé et repris dans l'éther diéthylique. La solution résultante est filtrée et le filtrat est évaporé à sec. L'ajout d'éther diéthylique suivi d'une filtration et d'une concentration sous vide permet d'éliminer davantage d'oxyde de triphénylphosphine (précipité blanc insoluble dans l'éther diéthylique). Cette opération est réalisée trois fois en tout, puis une chromatographie sur colonne de silice (éther diéthylique) permet d'obtenir 0,9 g d'une huile jaune correspondant au produit attendu.

Rdt : 70 % (sur les deux étapes, calculé à partir de la N-(2-hydroxyéthyl)benzylamine).

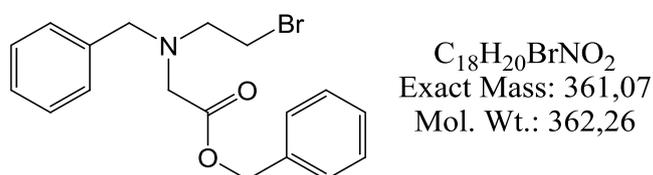
Rf : 0,38 (silice, éther de pétrole/acétate d'éthyle 95/05).

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) : δ = 3,10-3,15 (m, 2H, NCH₂), 3,34-3,39 (m, 2H, CH₂Br), 3,44 (s, 2H, CH₂CO), 3,70 (s, 3H, CH₃), 3,90 (s, 2H, PhCH₂), 7,24-7,33 (m, 5H, CH Ph).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 30,3 (CH₂Br), 51,4 (CH₃), 54,0 (NCH₂CO), 55,8 (BzNCH₂), 58,1 (CH₂Ph), 127,4 (CH Ph); 128,4 (CH Ph); 128,8 (CH Ph) ; 138,4(Cq) ; 171,6 (CO).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 288,0 (35) / 286,0 (44) [M+H]⁺, 206,1 [M + H - HBr]⁺ (100).

2-[N-benzyl, N-(2-bromoéthyl)]amino acétate de benzyle **16**



A une solution refroidie à 0°C de **14** (2,15 g ; 7,2 mmol) et de triphénylphosphine (3,36 g ; 9,0 mmol) dans 50 mL de CH₂Cl₂, est ajoutée par portions (environ 1/10 par minute) la N-bromosuccinimide (1,6 g ; 9,0 mmol). Le milieu réactionnel est laissé 16 h sous agitation à température ambiante. Après évaporation à sec, le résidu orangé est récupéré, puis broyé et repris dans l'éther diéthylique. La solution résultante est filtrée et le filtrat est évaporé à sec. L'ajout d'éther diéthylique suivi d'une filtration et d'une concentration sous vide permet d'éliminer davantage d'oxyde de triphénylphosphine (précipité blanc insoluble dans l'éther diéthylique). Cette opération est réalisée trois fois en tout, puis une première chromatographie sur colonne de silice (éther diéthylique) permet d'obtenir une huile jaune contenant le composé attendu et du PPh₃ résiduel (13% en masse). Une seconde purification (colonne de silice, éther de pétrole / éther diéthylique 95/5 → 90/10) permet d'isoler le composé **16** pur (1,16 g, huile jaune pâle).

Chapitre V

Rdt : 44% (sur les deux étapes, calculé à partir de la N-(2-hydroxyéthyl)benzylamine).

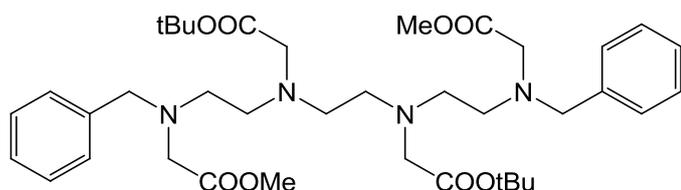
Rf : 0,24 (silice, éther de pétrole/acétate d'éthyle 98/2).

RMN¹H (300MHz, CDCl₃) : δ = 3,15 (t, 2H, J= 7 Hz, CH₂N); 3,37 (t, 2H, J= 7Hz, CH₂Br); 3,48 (s, 2H, CH₂CO); 3,90 (s, 2H, CH₂N); 5,15 (s, 2H, CH₂O); 7,26-7,36 (m, 10H, CH Ph).

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ = 30,52 (CH₂Br); 54,33 (CH₂CO); 55,91 (BzNCH₂); 58,07 (NCH₂Ph); 66,25 (PhCH₂O); 127,39 (CH Ph); 128,36 (CH Ph); 128,40 (CH Ph); 128,43 (CH Ph); 128,64 (CH Ph); 128,81 (CH Ph); 135,50 (Cq Ph); 136,54 (Cq Ph); 171,12 (CO).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 386,5 (100) / 384,4 (78) [M + Na]⁺; 364,1 (60) / 362,3 (65) [M + H]⁺; 282,4 [M+H - HBr]⁺ (80).

1,10-dibenzyl-1,10-di(méthoxycarbonylméthyl)-4,7-di(tert-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane **17**



C₃₈H₅₈N₄O₈
Exact Mass: 698,43
Mol. Wt.: 698,89

Une suspension de 1,4-di(tert-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane **5** (75 mg ; 0,26 mmol) et de K₂CO₃ (0,36 g ; 2,6 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (20 mL) est chauffée à reflux pendant 1 h ; 2 équivalents de 2-[N-benzyl, N-(2-bromoéthyl)]amino acétate de méthyle **15** (1,50 g ; 0,52 mmol) sont ajoutés au mélange puis le chauffage est poursuivi durant 24 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et évaporé à sec. Le résidu est repris dans CH₂Cl₂, filtré (afin d'éliminer les restes de sels) puis évaporé à sec. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne de silice (CH₂Cl₂/éther de pétrole 1/1) pour conduire à 92 mg de composé **17** sous la forme d'une huile jaune.

Rdt : 50%.

Rf : 0,31 (silice, CH₂Cl₂/ méthanol 95/05).

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,42 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,7-3,0 (m, 12H, -CH₂-N) ; 3,37 (s, 4H, -CH₂-COOtBu) ; 3,42 (bs, 4H, -CH₂-COOMe) ; 3,66 (s, 6H, Me) ; 3,79 (s, 4H, -CH₂-Ph) ; 7,28-7,31 (m, 10H, CH Ph).

RMN¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,06 (CH₃ tBu); 28,14 (CH₃ tBu) ; 47,01 (CH₂) ; 50,06 (CH₂) ; 51,32 (CH₃) ; 51,62 (CH₂) ; 52,37 (CH₂) ; 52,50 (CH₂) ; 54,07 (CH₂) ; 55,74 (CH₂) ; 58,51 (CH₂) ; 81,30 (Cq) ; 82,66 (Cq) ; 127,24 (CH) ; 128,33 (CH) ; 129,06 (CH) ; 138,40 (Cq) ; 169,75 (CO) ; 170,38 (CO) ; 171,86 (CO).

Chapitre V

IR (KBr) en cm^{-1} : 1738 (C=O ester) ; 1455 (C=C aromatique) ; 701 (C-H aromatique hors du plan) ; 754 (C-H aromatique hors du plan).

SM (ESI, mode positif) : 699,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100).

2-[N-(2-hydroxyéthyl), N-méthyl]amino acétate de *tertiobutyle* **19**



A un mélange refroidi à 0°C de N-(2-hydroxyéthyl)méthylamine **18** (1,5 g ; 20 mmol) et de K_2CO_3 (2,93 g ; 21,3 mmol) dans 80 mL de CH_3CN anhydre est additionné le bromoacétate de *tertiobutyle* (4,15 g ; 21,3 mmol). Le milieu réactionnel est agité 48 h à température ambiante, puis filtré et évaporé à sec. Le composé brut obtenu est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

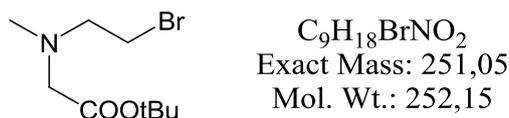
Rf : 0,25 (silice ; acétate d'éthyle)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 1,41 (s, 9H, tBu); 2,35 (s, 3H, Me); 2,62 (t, 2H, J = 5 Hz, CH_2OH); 3,15 (s, 2H, CH_2CO); 3,53 (t, 2H, J = 5 Hz, CH_2N).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 28,12 (tBu); 42,06 (Me); 58,52 (CH_2); 58,73 (CH_2); 59,38 (CH_2); 81,33 (Cq tBu); 170,72 (CO).

SM (DCI/ NH_3) : m/z (%) = 190,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100).

2-[N-(2-bromoéthyl), N-méthyl] amino acétate de *tertiobutyle* **20**



A une solution refroidie à 0°C de composé **19** (0,380 g ; 2 mmoles) et de triphénylphosphine (0,672 g ; 2,56 mmoles) dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre, est additionnée en 4 portions la N-bromosuccinimide (0,455 g ; 2,56 mmoles). Après 20 min. d'agitation à température ambiante, le milieu est concentré sous vide. L'huile obtenue est reprise par 20 mL d'éther diéthylique et le précipité d'oxyde de triphénylphosphine est éliminé par filtration. Le filtrat est purifié sur colonne de silice (éther diéthylique) pour conduire à 330 mg de composé **20** (huile incolore).

Rdt : 65 % (sur les deux étapes, calculé à partir de la N-(2-hydroxyéthyl)méthylamine).

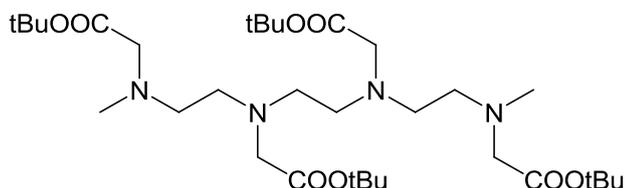
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 1,46 (s, 9H, tBu); 2,45 (s, 3H, NMe); 3,01 (t, 2H, J = 7 Hz, CH_2Br); 3,26 (s, 2H, CH_2CO); 3,42 (t, 2H, J = 7 Hz, CH_2N).

Chapitre V

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 28,16 (tBu); 29,82 (NMe); 41,81 (CH_2Br); 58,09 (CH_2N); 58,88 ($\underline{\text{CH}_2\text{CO}}$); 81,21 (Cq tBu); 170,05 (CO).

SM (DCI/ NH_3) : m/z (%) = 252,1 (100) / 254,1 (80) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

1,10-diméthyl-1,4,7,10-tétra(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane 21



$\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_8$
Exact Mass: 630,46
Mol. Wt.: 630,86

Une suspension de 1,4-di(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4-diazabutane **5** (1 g ; 3,47 mmol) et de K_2CO_3 (4,92 ; 35 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (120 mL) est chauffée à reflux pendant 1 h ; 2 équivalents de 2-[N-(2-bromoéthyl), N-méthyl] amino acétate de *tertiobutyle* **20** (1,74 g ; 6,94 mmol) sont ajoutés au mélange puis le chauffage est poursuivi durant 24 h. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et évaporé à sec. L'huile beige obtenue est purifiée sur colonne de silice (acétate d'éthyle / MeOH 85/15) pour conduire à 1,43 g de composé **21** sous la forme d'une huile beige.

Rdt : 65 %.

Rf : 0,27 (silice ; acétate d'éthyle/ MeOH 85/15)

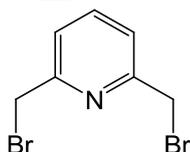
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm)= 1,42 (s, 18H, tBu); 1,43 (s, 18H, tBu); 2,34 (s, 6H, NMe); 2,57-2,62 (m, 4H, CH_2N); 2,72 (s, 4H, CH_2N); 2,72-2,77 (m, 4H, CH_2N); 3,15 (s, 4H, CH_2COOtBu); 3,30 (s, 4H, CH_2COOtBu).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ (ppm)= 28,17 (tBu); 28,20 (tBu); 42,40 (Me); 52,34 (CH_2); 52,95 (CH_2); 55,03 (CH_2) ; 56,19 (CH_2); 59,50 (CH_2); 80,69 (Cq tBu); 80,77 (Cq tBu); 170,28 (CO tBu); 170,92 (CO tBu).

IR (cm^{-1}) : 1733 (C=O).

SM (ESI, mode positif) : 631,7 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (100).

2,6 dibromométhylpyridine 22



$\text{C}_7\text{H}_7\text{Br}_2\text{N}$
Exact Mass: 262,89
Mol. Wt.: 264,95

A une solution de 2,6-dihydroxyméthylpyridine (400 mg, 2,88 mmol) dans 8 mL de CCl_4 anhydre, est ajouté, lentement et à -10°C , le PBr_3 (0,8 mL ; 8,5 mmol). Après une nuit à reflux

Chapitre V

et retour à température ambiante, le milieu est hydrolysé par 8 mL d'eau distillée. La phase aqueuse est neutralisée par NaHCO₃ solide puis extraite au CHCl₃. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées à sec. Le résidu ainsi obtenu est purifié sur silice (CH₂Cl₂ / MeOH 98/2) pour conduire à 420 mg de cristaux incolores.

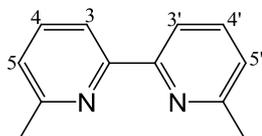
Rdt : 55 %.

Rf : 0,17 (CH₂Cl₂ / MeOH 98/2).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 4,54 (s, 4H, CH₂Br); 7,37 (d, 2H, J= 7,92 Hz, H_{py}); 7,71 (t, 1H, 7,92 Hz, H_{py}).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 34,09 (CH₂); 123,51 (CH); 138,85 (CH); 157,37 (Cq).

6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine 23



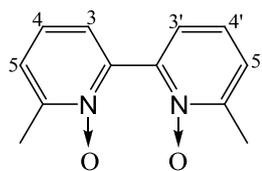
C₁₂H₁₂N₂
Exact Mass: 184,10
Mol. Wt.: 184,24

Sous atmosphère inerte, sont introduits 13,8 g (58,2 mmol) de NiCl₂.6H₂O et 60,8 g (232,7 mmol) de triphénylphosphine dans 270 mL DMF. Au bout de 1h d'agitation à 50°C, 3,79 g (58,2 mmol) de Zn (s) sont ajoutés au mélange réactionnel et le chauffage est poursuivi 1 h de plus. 1,13 g (58,2 mmol) de 2-bromo-6-méthylpyridine (1,13 g ; 58,2 mmol) est alors additionné et le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 50°C pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est versé dans 400 mL NH₄OH 15 % et extrait par 3 x 400 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées par 3 x 150 mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur Na₂SO₄ et évaporées. La 6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine est solubilisée sous forme de chlorhydrate par ajout de 150 mL de HCl (2 N) (élimination de la triphénylphosphine insoluble). Le filtrat est basifié par addition de 300 mL de NH₄OH 15 % puis extrait par 3 x 200 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées par 3 x 100 mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl, filtrées et évaporées à sec pour conduire à 8,96 g du produit attendu sous forme de cristaux jaunes.

Rdt : 84 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 2,63 (s, 6H, CH₃) ; 7,15 (d, 2H, H_{5,5'}, J= 7,6 Hz) ; 7,68 (t, 2H, H_{4,4'}, J= 7,8 Hz) ; 8,70 (d, 2H, H_{3,3'}, J= 7,8 Hz).

6,6'-diméthyl-2,2'-bipyridine-N,N'-dioxyde 24



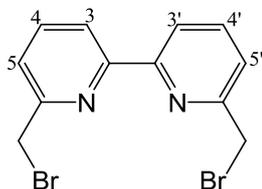
$C_{12}H_{12}N_2O_2$
Exact Mass: 216,09
Mol. Wt.: 216,24

A une solution de **23** (3,2 g ; 17,3 mmol) dans 400 mL de $CHCl_3$ est ajoutée goutte à goutte une solution de *m*-CPBA 70% (15,6 g ; 69,2 mmol) dans 400 mL de $CHCl_3$. Le mélange réactionnel, laissé sous agitation 24 h à température ambiante à l'abri de la lumière, est ensuite successivement lavé par 5 x 100 mL de NaOH 2N, 3 x 40 mL de solution aqueuse saturée de Na_2CO_3 , 3 x 40 mL de solution aqueuse saturée de $Na_2S_2O_3$ puis extrait par 3 x 100 mL CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont séchées, filtrées et évaporées ; le résidu blanc obtenu est purifié sur colonne d'alumine (CH_2Cl_2 /méthanol 100/0 → 98/02) pour conduire à 2,5 g de produit sous la forme des cristaux blancs.

Rdt : 67 %.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 2,50 (s, 6H, CH_3) ; 7,18 (d, 2H, $H_{5,5'}$, $J = 6$ Hz) ; 7,23 (t, 2H, $H_{4,4'}$, $J = 6$ Hz) ; 7,34 (d, 2H, $H_{3,3'}$, $J = 6$ Hz).

6,6'-di(bromométhyl)-2,2'-bipyridine 26



$C_{12}H_{10}Br_2N_2$
Exact Mass: 339,92
Mol. Wt.: 342,03

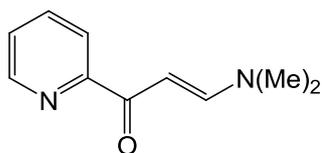
Sous atmosphère inerte, **24** (1 g ; 4,62 mmol) est mélangé à l'anhydride acétique (1,9 g ; 203 mmol) et le milieu est chauffé une nuit à 120°C. Après évaporation à sec, 32 mL de HBr à 33% dans l'acide acétique sont ajoutés et le milieu est chauffé à 70°C pendant 7 h. Le milieu réactionnel est dilué dans 200 mL d'eau distillée et neutralisé par $NaHCO_{3(s)}$. La phase aqueuse est extraite par 3 x 100 mL CH_2Cl_2 et les phases organiques obtenues sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. La poudre marron obtenue est recristallisée dans CCl_4 . Les cristaux sont lavés avec du dichlorométhane et de l'éther diéthylique pour conduire à 0,85 g de produit attendu.

Rdt : 54 %.

Rf : 0,6 (silice, CH_2Cl_2).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 4,66 (s, 4H, $-CH_2Br$) ; 7,5 (d, 2H, $H_{5,5'}$, $^3J = 7,6$ Hz) ; 7,86 (t, 2H, $H_{4,4'}$, $^3J = 7,7$ Hz) ; 8,43 (d, 2H, $H_{3,3'}$, $^3J = 7,8$ Hz).

3-(diméthylamino)-1-(2-pyridyl)prop-2-èn-1-one 27



$C_{10}H_{12}N_2O$
Exact Mass: 176,09
Mol. Wt.: 176,22

9,9 mL d'acétal de diméthyle de N,N'-diméthylformamide (0,074 mol) sont additionnés goutte à goutte à une solution de 4,50 g de 2-acétylpyridine (0,037 mol) dans 12 mL de DMF anhydre. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux sous argon pendant 4 h. Après évaporation à sec, le solide obtenu est repris dans le cyclohexane puis filtré et lavé au cyclohexane. Le produit attendu est obtenu sous la forme d'une poudre verte et séché à l'étuve à vide une nuit (5,78 g).

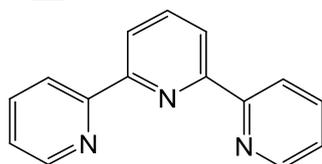
Rdt : 89 %.

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 3,0 (s, 3H), 3,2 (s, 3H), 6,4 (d, 1H, $J= 12,6$ Hz), 7,3 (ddd, 1H, $J= 7,5$ Hz, $J= 4,8$ Hz, $J= 1,3$ Hz), 7,7 (td, 1H, $J= 7,7$ Hz, $J= 1,8$ Hz), 7,8 (d, 1H, $J= 12,6$ Hz), 8,1 (dd, 1H, $J= 7,8$ Hz, $J= 1$ Hz), 8,6 (ddd, 1H, $J= 4,8$ Hz, $J= 1,7$ Hz, $J= 0,9$ Hz).

IR (KBr) en cm^{-1} : 1639 (C=O ester).

RMN ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 37,5 (CH_3), 45,2 (CH_3), 91,2 (CH), 122,1 (CH), 125,5 (CH), 136,9 (CH), 148,1 (CH), 154,9 (CH), 156,1 (Cq), 186,6 (C=O).

2,2':6',2''-terpyridine 29



$C_{15}H_{11}N_3$
Exact Mass: 233,10
Mol. Wt.: 233,27

6,29 g (0,056 mol) de tBuOK sont dissous dans 100 mL de THF anhydre fraîchement distillé. A cette solution refroidie à 0°C, est ajoutée une solution de 3,45 g de 2-acétylpyridine (0,029 mol) dans 50 mL de THF anhydre. Au mélange réactionnel agité 45 min à température ambiante, est additionnée une solution de 5,09 g (0,029 mol) de **27** dans 70 mL de THF anhydre. Après agitation du mélange réactionnel pendant 21 h à température ambiante, 22,41 g (0,29 mol) d'acétate d'ammonium et 70 mL d'acide acétique sont additionnés. Le mélange résultant est chauffé à reflux pendant 2 h 30. Le résidu noir obtenu après évaporation à sec est repris dans 200 mL d'eau distillée. La phase aqueuse est neutralisée avec $NaHCO_3$ solide puis extraite au CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées à sec. L'huile noire obtenue est reprise dans 200 mL de toluène et filtrée sur célite. Le filtrat est évaporé à sec et purifié sur colonne d'alumine (toluène). Le composé attendu est obtenu sous forme d'un solide verdâtre (1,65 g)

Rdt : 24 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7,3 (ddd, 2H, J= 1,2 Hz, J= 4,8 Hz, J= 7,5 Hz), 7,85 (td, 2H, J= 1,8 Hz, J= 7,5 Hz), 7,95 (t, 1H, J= 7,8 Hz), 8,5 (d, 2H, J= 7,8 Hz), 8,6 (td, 2H, J= 1,1 Hz, J= 8,0 Hz) 8,7 (ddd, 2H, J= 0,9 Hz, J= 1,8 Hz, J= 4,8 Hz).

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 121,0 (CH), 121,2 (CH), 123,8 (CH), 136,9 (CH), 137,9 (CH), 149,1 (CH), 155,3 (Cq), 156,2 (Cq).

2,2':6',2''-terpyridine-*N,N*''-dioxyde 30



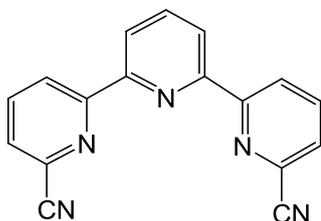
C₁₅H₁₁N₃O₂
Exact Mass: 265,09
Mol. Wt.: 265,27

Une solution de 6,36 g (36,8 mmol) de *m*-CPBA à 70 % dans 50 mL de CH₂Cl₂, préalablement séchée sur sulfate sodium, est additionnée goutte à goutte à une solution de **29** (1,95 g; 8,36 mmol) dans 70 mL de dichlorométhane. Le mélange réactionnel est agité une nuit à température ambiante. Le mélange résultant est dilué dans 100 mL de CH₂Cl₂ puis lavé trois fois avec une solution aqueuse de carbonate de sodium à 5%. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée à sec. Le composé attendu est obtenu sous forme d'une poudre blanche (1,38 g).

Rdt : 62 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7,3 (m, 2H), 7,4 (td, 2H, J= 7,8 Hz, J= 1,3 Hz), 7,9 (t, 1H, J= 8 Hz), 8,1 (dd, 2H, J= 8 Hz, J= 2,1 Hz), 8,35 (dd, 2H, J= 6,5 Hz, J= 0,9 Hz), 8,85 (d, 2H, J= 8 Hz).

6,6''-dicarbonitrile-2,2':6',2''-terpyridine 31



C₁₇H₉N₅
Exact Mass: 283,09
Mol. Wt.: 283,29

6,4 mL (51 mmol) de cyanure de triméthylsilyle sont additionnés à une solution de **30** (1,26 g, 4,75 mmol) dans 60 mL de CH₂Cl₂. Après 5 min d'agitation à température ambiante, 2,2 mL de chlorure de benzoyle (19 mmol) sont ajoutés. Le mélange résultant est agité sous argon pendant 60 h à température ambiante. Le milieu réactionnel, neutralisé par 130 mL d'une

Chapitre V

solution aqueuse de carbonate de potassium à 10 %, est extrait avec du CHCl_3 . Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées à sec. Le solide obtenu est repris dans l'éther diéthylique puis filtré. Une poudre de couleur beige est obtenue (1,11 g).

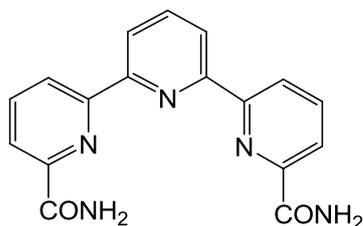
Rdt : 82 %.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 7,75 (dd, 2H, $J= 1,0$ Hz, $J= 7,6$ Hz), 8,0 (t, 2H, $J= 8,1$ Hz), 8,05 (t, 1H, $J= 7,9$ Hz), 8,6 (d, 2H, $J= 7,9$ Hz), 8,8 (dd, 2H, $J= 1,0$ Hz, $J= 8,1$ Hz).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 117,3 (CN), 122,6 (CH), 124,15 (CH), 128,35 (CH), 137,9 (CH), 138,6 (CH), 153,5 (Cq), 157,4 (Cq).

IR (KBr) en cm^{-1} : 2237 (CN).

6,6''-bis(carbamoyl)-2,2':6',2''-terpyridine 32



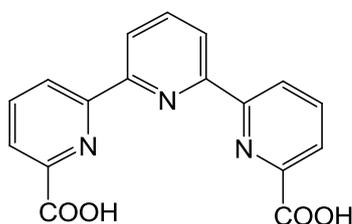
$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$
Exact Mass: 319,11
Mol. Wt.: 319,32

700 mg (2,47 mmol) de **31** sont mis en suspension dans un mélange eau/éthanol (10 mL/45 mL). 1,4 g (25 mmol) de potasse en poudre sont ajoutés au milieu réactionnel qui est chauffé à reflux une nuit. Après évaporation de l'éthanol, le milieu aqueux est acidifié à $\text{pH} = 4$ avec une solution aqueuse de HCl 1M et le précipité formé est filtré, lavé à l'eau puis à l'acétonitrile. La poudre blanche obtenue est séchée à l'étuve à vide (0,645 g).

Rdt : 82 %.

IR (KBr) en cm^{-1} : 1669 (CO amide).

6,6''-bis(carboxy)-2,2':6',2''-terpyridine 33



$\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$
Exact Mass: 321,07
Mol. Wt.: 321,29

615 mg (1,93 mmol) de **32** sont mis en solution dans un mélange acide acétique glacial / acide sulfurique concentré (9 mL / 9 mL). La solution est chauffée à reflux pendant 5 h puis refroidie à température ambiante. 90 mL d'eau glacée sont ajoutés au mélange réactionnel qui

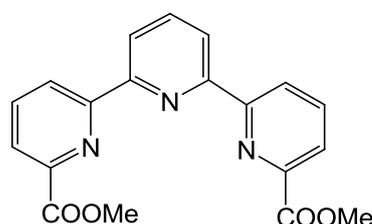
est agité 10 min. Le précipité formé est filtré, rincé à l'eau glacée et à l'acétonitrile. Le produit attendu est isolé sous forme d'une poudre blanche après un séchage à l'étuve (580 mg).

Rdt : 94 %.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d⁶) : δ (ppm) = 8,2 (m, 5H), 8,65 (d, 2H, J= 7,8 Hz), 8,9 (dd, 2H, J= 1,2 Hz, J= 7,8 Hz).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1708 (COOH).

6,6''-bis(méthoxycarbonyl)-2,2':6',2''-terpyridine 34



C₁₉H₁₅N₃O₄
Exact Mass: 349,11
Mol. Wt.: 349,34

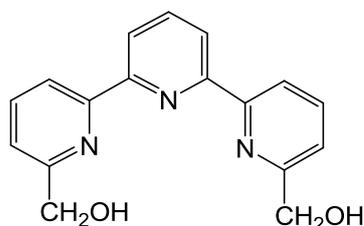
0,5 mL de SOCl₂ est additionné à 25 mL de méthanol anhydre à 0 °C. La solution est agitée 10 min à température ambiante puis 490 mg (1,52 mmol) de **33** sont ajoutés; le mélange résultant est chauffé à reflux pendant 5 h. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé dans 40 mL de chloroforme et 5 mL de méthanol, neutralisé avec 40 mL d'une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ puis extrait au chloroforme. Les phases organiques sont séchées, filtrées puis évaporées à sec. Un solide blanc est obtenu (430 mg).

Rdt : 81 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 4,1 (s, 6H, CH₃); 8,0 (t, 3H, J= 7,7 Hz) ; 8,2 (d, 2H, J= 7,7 Hz), 8,6 (d, 2H, J= 7,9 Hz), 8,8 (d, 2H, J= 7,9 Hz).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1723 (COOMe).

6,6''-bis(hydroxyméthyl)-2,2':6',2''-terpyridine 35



C₁₇H₁₅N₃O₂
Exact Mass: 293,12
Mol. Wt.: 293,32

200 mg (5,28 mmol) de NaBH₄ sont additionnés à une suspension de 400 mg (1,25 mmol) de **34** dans 15 mL d'éthanol. La solution est chauffée à reflux pendant 24 h. Après évaporation à sec, 15 mL d'une solution aqueuse de NaHCO₃ saturée sont ajoutés et le mélange résultant est

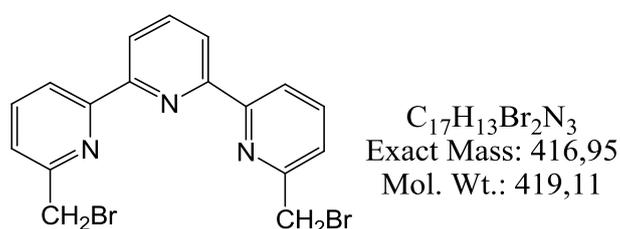
Chapitre V

porté à reflux pendant 10 min. Le milieu réactionnel est dilué avec 25 mL d'eau distillée et neutralisé avec une solution aqueuse de HCl 1M. Le précipité blanc formé est filtré, lavé à l'eau, à l'acétonitrile et à l'éther diéthylique. Le produit attendu est obtenu sous forme de poudre blanche et séché à l'étuve (156 mg).

Rdt : 43 %.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d⁶) : δ (ppm) = 4,7 (d, 4H, J= 5,7 Hz), 5,5 (t, 2H, OH, J= 5,7 Hz), 7,6 (d, 2H, J= 7,4 Hz), 8,0 (t, 2H, J= 7,8 Hz), 8,1 (t, 1H, J= 7,7 Hz), 8,4 (d, 2H, J= 7,8 Hz), 8,5 (d, 2H, J= 7,5 Hz).

6,6''-bis(bromométhyl)-2,2':6',2''-terpyridine **36**



0,15 mL (1,58 mmol) de PBr₃ sont mis en solution dans 9 mL de DMF anhydre. Après 15 min d'agitation à température ambiante, 130 mg (0,44 mmol) de **35** sont ajoutés et le mélange résultant est chauffé à 60 °C pendant 1 h puis laissé sous agitation à température ambiante une nuit. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, traité avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. Le précipité formé est filtré puis lavé à l'eau froide et à l'éther diéthylique (140 mg).

Rdt : 75 %.

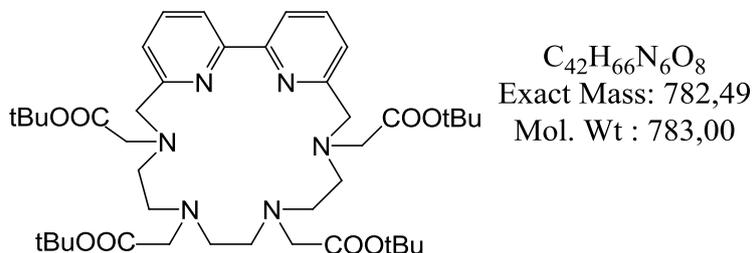
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 4,6 (s, 4H), 7,5 (d, 2H, J= 9 Hz), 7,9 (t, 2H, J= 9 Hz), 8,0 (t, 1H, J= 9 Hz), 8,5 (d, 4H, J= 9 Hz).

Réactions de macrocyclisation avec le dérivé 1,4,7,10-tétra(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane **4** : procédure générale

10 équivalents de carbonate de sodium sont ajoutés à une solution de 1,4,7,10-tétra(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazadécane **4** dans l'acétonitrile anhydre ([**4**] ~ 2,8 10⁻³ mol. L⁻¹). La suspension est portée à reflux et chauffée pendant 1 h sous atmosphère inerte. 1 équivalent de dérivé bromé est ajouté et le mélange résultant est chauffé à reflux durant 24h. Après refroidissement du milieu réactionnel, les sels de sodium sont filtrés et le filtrat est évaporé à sec. Celui-ci est repris dans le dichlorométhane et les restes de sels sont à nouveau

éliminés. Après évaporation à sec, le résidu est purifié sur colonne d'alumine (Act. IV) afin d'obtenir le macrocycle désiré.

Macrocycle 37



4 (150 mg ; 0,25 mmol), Na_2CO_3 (260 mg ; 2,5 mmol) dans 90 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 85 mg (0,25 mmol) de 6,6'-dibromométhyl-2,2'-bipyridine **26**. Le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine (CH_2Cl_2 /méthanol : 1/0 \rightarrow 1/1) pour conduire à 113 mg d'un mélange de macrocycle attendu sous forme « libre » / forme complexée avec Na^+ (55/45). Une fraction de ce mélange (30 mg) est repris dans 10 mL de chloroforme et lavé avec une solution saturée d'EDTA disodé (3×10 mL) et à l'eau (2×10 mL). La phase organique est séchée, filtrée et évaporée à sec pour conduire à 24 mg de macrocycle **37** sous forme « libre » (huile jaune). Une autre fraction de mélange (30 mg) est reprise dans 3 mL d'acétonitrile, chauffée à reflux $\frac{1}{2}$ h en présence de 5 équiv. de NaCl, filtrée puis évaporée à sec pour conduire à 26 mg de macrocycle sous forme complexée **37.Na⁺**.

Rdt : 58%.

Forme libre :

RMN ¹H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 1,38 (s, 18H, $\underline{CH_3}$ tBu) ; 1,49 (s, 18H, $\underline{CH_3}$ tBu) ; 2,34-2,43 (m, 4H, $-\underline{CH_2}N-$) ; 2,70-2,74 (m, 8H, $-\underline{CH_2}N-$) ; 3,0-3,30 (m, 4H, $-\underline{CH_2}COOtBu$) ; 3,42 (s, 4H, $-\underline{CH_2}COOtBu$) ; 4,00 (s, 4H, $-\underline{CH_2}$ bpy) ; 7,40 (d, 2H, $H_{5,5'}$, $^3J = 7,5$ Hz, H bpy) ; 7,75 (t, 2H, $H_{4,4'}$, $^3J = 7,6$ Hz, H bpy) ; 7,86 (d, 2H, $H_{3,3'}$, $^3J = 7,5$ Hz, H bpy).

RMN ¹³C (75,4 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 28,06 (CH_3) ; 28,19 (CH_3) ; 51,40 (CH_2) ; 52,49 (CH_2) ; 52, 68 (CH_2) ; 56,15 (CH_2) ; 58,12 (CH_2) ; 60,47 (CH_2) ; 80,56 (Cq) ; 80,98 (Cq) ; 120,69 (CH bpy 3,3') ; 124,00 (CH bpy 5,5') ; 136,99 (CH bpy 4,4') ; 156,55 (Cq bpy) ; 158,88 (Cq bpy) ; 170,77 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 299,4 $[M+K+H-4tBu]^{2+}$ (100) ; 805,6 $[M+Na]^+$ (67) ; 783,7 $[M+H]^+$ (19).

IR (CaF₂) en cm^{-1} : 1733 (C=O ester) ; 1573 (C=C, C=N pyridine).

UV (Acétonitrile) : λ (ϵ en $M^{-1}cm^{-1}$) nm: 237 (13195) ; 289 (14920).

Chapitre V

Forme complexée:

R_f : 0,22 (alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 98/2).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,24 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 1,37 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,6-2,8 (m, 8H, -CH₂N-) ; 2,83-2,96 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,15-3,19 (m, 8H, -CH₂COOtBu) ; 4,01 (s, 4H, -CH₂ bpy) ; 7,28 (d, 2H, H_{5,5'}, ³J= 7,5 Hz, H bpy) ; 7,87 (t, 2H, H_{4,4'}, ³J= 7,5 Hz, H bpy) ; 7,94 (d, 2H, H_{3,3'}, ³J= 7,5 H bpy).

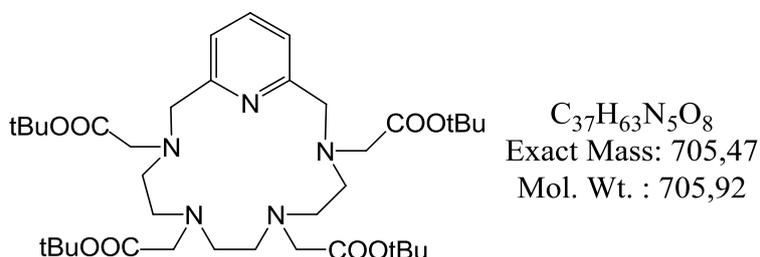
RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,01 (CH₃) ; 28,20 (CH₃) ; 52,04 (CH₂) ; 52,64 (CH₂) ; 56,01 (CH₂) ; 56,66 (CH₂) ; 81,80 (Cq) ; 82,20 (Cq) ; 120,27 (CH bpy) ; 123,68 (CH bpy) ; 138,48 (CH bpy) ; 154,74 (Cq bpy) ; 157,75 (Cq bpy) ; 170,78 (COOtBu) ; 171,42 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 805,7 [M+Na]⁺ (100) ; 411,6 [M+K+H]²⁺ (92) ; 299,5 [M+K+H-4tBu]²⁺ (54) ; 355,5 [M+K+H-2tBu]²⁺ (25) ; 327,4 [M+K+H-3tBu]²⁺ (21) ; 383,6 [M+K+H-tBu]²⁺ (20) ; 783,8 [M+H]⁺ (17).

IR (CaF₂) en cm⁻¹ : 1728 (C=O ester) ; 1576 (C=C aromatique).

UV (Acétonitrile) : λ (ε en M⁻¹cm⁻¹) nm: 242 (7814) ; 295 (9056).

Macrocycle 38



4 (150 mg ; 0,25 mmol), Na₂CO₃ (260 mg ; 2,5 mmol) dans 90 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 66 mg (0,25 mmol) de 6,6'-dibromométhylpyridine **22**. Le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine (CH₂Cl₂/méthanol : 1/0 → 1/1) pour conduire à un mélange de macrocycle attendu sous forme « libre » / forme complexée avec Na⁺ (75/25). Ce mélange est repris dans 50 mL de chloroforme et lavé avec une solution saturée d'EDTA disodé (2 × 50 mL) et à l'eau (2 × 50 mL). La phase organique est séchée, filtrée et évaporée à sec pour conduire à 95 mg de macrocycle **38** sous forme « libre » (huile jaune).

Rdt : 54 %.

Brut de la Forme complexée :

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,38 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 1,41 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,66 (m, 12H, -CH₂N-) ; 3,09 (s, 4H, -CH₂COOtBu) ; 3,28 (s, 4H, -CH₂COOtBu) ; 3,81 (m, 4H

Chapitre V

, -CH₂ py); 7,15 (d, 2H, ³J= 7,7 Hz, H py); 7,65 (t, 1H, ³J= 7,7 Hz, H py).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 27,9 (CH₃); 28,1(CH₃); 53,5 (CH₂); 53,6 (CH₂); 54,1 (CH₂); 54,4 (CH₂); 58,4 (CH₂); 60,4 (CH₂); 81,8 (Cq); 81,9 (Cq); 122,2 (CH py); 138,1 (CH py); 157,7 (Cq Py); 171,3 (COOtBu); 171,6 (COOtBu).

IR (KBr) en cm⁻¹: 2975 ; 2922 ; 2841 ; 1728 ; 1455 ; 1368 ; 1157.

Forme libre :

R_f : 0,42 (Alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 99/1).

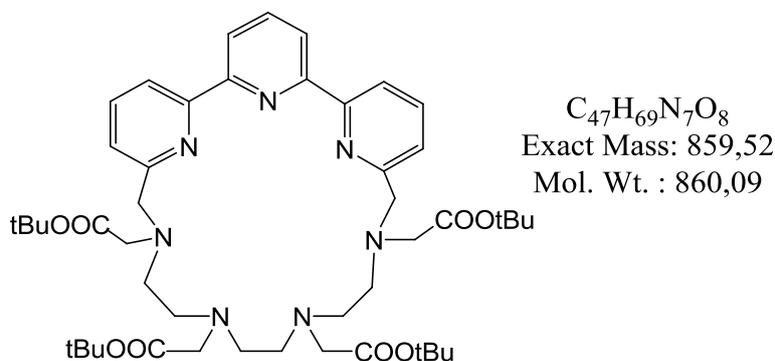
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,41 (s, 18H, CH₃ tBu); 1,47 (s, 18H, CH₃ tBu); 2,47 (s, 4H, -CH₂N-); 2,50-2,80 (m, 8H, -CH₂N-); 3,15 (s, 4H, -CH₂COOtBu); 3,38 (s, 4H, -CH₂COOtBu); 3,87 (s, 4H, -CH₂ py); 7,33 (d, 2H, ³J= 7,7 Hz, H py); 7,60 (t, 1H, ³J= 7,7 Hz, H py).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,1 (CH₃); 28,2 (CH₃); 50,8 (CH₂); 51,8 (CH₂); 51,9 (CH₂); 57,5 (CH₂); 57,7 (CH₂); 60,4 (CH₂); 80,7 (Cq); 80,9 (Cq); 123,0 (CH py); 136,6 (CH py); 158,4 (Cq py); 170,7 (COOtBu); 170,8 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 260,5 [M+K+H-4tBu]²⁺ (100) ; 728,8 [M+Na]⁺ (28).

IR (KBr) en cm⁻¹: 1733 (C=O ester) ; 1593 et 1577 (C=C, C=N pyridine) ; 733 (C-H aromatique hors du plan).

Macrocycle 39



4 (199 mg ; 0,33 mmol), Na₂CO₃ (350 mg ; 3,3 mmol) dans 120 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 138 mg (0,33 mmol) de 6,6''-bis(bromométhyl)-2,2':6',2''-terpyridine **36**. Le résidu brut obtenu est repris dans 100 mL de dichlorométhane et lavé à l'eau (4 × 100 mL), avec une solution saturée d'EDTA disodé (3 × 100 mL) et à l'eau (1 × 100 mL). La phase organique est séchée, filtrée, évaporée à sec puis purifiée sur colonne d'alumine (CH₂Cl₂/méthanol : 1/0 → 1/1) pour conduire à 110 mg d'une huile jaune correspondant au macrocycle **39** attendu (forme « libre »).

Rdt : 39 %.

Chapitre V

R_f : 0,3 (alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 95/5).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,36 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,48 (s, 27H, CH₃ tBu) ; 2,47 (bs, 4H, -CH₂N-) ; 2,67-2,76 (m, 4H, -CH₂N-) ; 2,80-2,85 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,10 (s, 2H, -CH₂COOtBu) ; 3,47 (bs, 6H, -CH₂COOtBu) ; 4,09 (bs, 4H, -CH₂ Terpy) ; 7,48-7,54 (m, 2H) ; 7,77 -7,90 (m, 5H) ; 8,50 (bs, 2H).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,03 (CH₃) ; 28,24 (CH₃) ; 51,63 (CH₂) ; 52,34 (CH₂) ; 52,71 (CH₂) ; 55,85 (CH₂) ; 56,87 (CH₂) ; 59,74 (CH₂) ; 80,53 (Cq) ; 80,91 (Cq) ; 120,82 (CH) ; 121,71 (CH) ; 123,11 (CH) ; 137,13 (CH) ; 137,37 (CH) ; 156,30 (Cq) ; 157,20 (Cq) ; 159,80 (Cq) ; 170,93 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 882,5 [M+Na]⁺ (100) ; 860,5 [M+H]⁺ (80) ; 898,4 [M+K]⁺ (20).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₄₇H₆₉N₇O₈ + H⁺ = 860,5286 ; exp. 860,5261 (100 %)

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1733 (C=O ester) ; 1570 (C=C, C=N pyridine) ; 753 (C-H aromatique hors du plan).

Réactions d'hydrolyse des fonctions COOtBu des ligands macrocycliques: procédures générales.

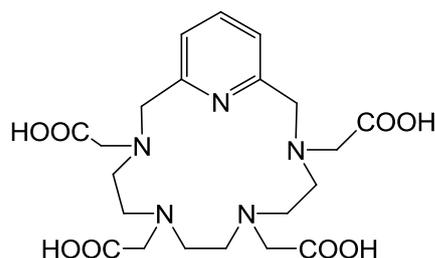
Procédure 1 : déprotection à chaud par de l'acide formique.

Une solution de ligand macrocyclique (concentration de l'ordre de 0,025 M) dans l'acide formique à 99% est chauffée 24 h à 60°C. Le ligand macrocyclique déprotégé est isolé après élimination de l'acide formique et coévaporation plusieurs fois avec du méthanol et de l'eau.

Procédure 2 : déprotection à température ambiante par de l'acide trifluoroacétique.

Une solution de ligand macrocyclique (concentration de l'ordre de 0,025 M) dans un mélange 1/1 d'acide trifluoroacétique et de dichlorométhane est agitée 24 h à température ambiante. Après évaporation des solvants, le ligand macrocyclique déprotégé est isolé par précipitation, solubilisé dans un minimum de méthanol puis précipité par ajout d'éther diéthylique.

Ligand L₁ (40)



C₂₁H₃₁N₅O₈
Exact Mass: 481,22
Mol. Wt. : 481,50

Chapitre V

Le macrocycle **38** (35 mg ; 0,05 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 1* pour conduire à 24 mg de produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt : 100 %

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,42 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,55-3,66 (m, 8H, -CH₂N) ; 3,71 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 3,87 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 4,67 (s, 4H, -CH₂ py) ; 7,58 (d, 2H, ³J= 7,8 Hz, H py) ; 8,05 (t, 1H, ³J= 7,8 Hz, H py).

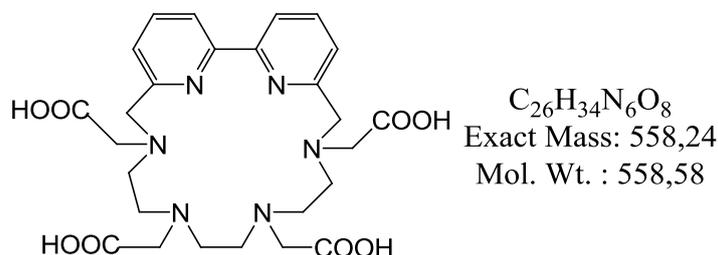
RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 50,99 (CH₂) ; 51,63 (CH₂) ; 53,02 (CH₂) ; 54,84 (CH₂) ; 56,70 (CH₂) ; 58,13 (CH₂) ; 124,69 (CH py) ; 140,58 (CH py) ; 150,40 (Cq py) ; 170,27 (COOH) ; 172,28 (COOH).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 558,3 [M-H+2K]⁺ (100) ; 542,3 [M-H+Na+K]⁺ (59).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₂₁H₃₁N₅O₈ + H⁺ = 482,2251 ; exp. = 482,2244 (100 %).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C18(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ; débit : 1 mL/min, λ = 260 nm) : **Temps de rétention** = 6,83 min.

Ligand L₂ (41)



Le macrocycle **37** (40 mg ; 0,05 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 1* pour conduire à 27,5 mg de produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt : 98 %.

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,20-3,40 (m, 8H, -CH₂N-) ; 3,49-3,60 (m, 4H, -CH₂N) ; 3,63 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 3,67 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 4,63 (s, 4H, -CH₂ bpy) ; 7,88 (d, 2H, ³J= 7,41 Hz, H bpy) ; 7,94 (t, 2H, ³J= 7,36 Hz, H bpy) ; 8,49 (d, 2H, ³J= 7,82 Hz, H bpy).

RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 50,99 (CH₂) ; 51,20 (CH₂) ; 51,92 (CH₂) ; 54,51 (CH₂) ; 55,64 (CH₂) ; 57,07 (CH₂) ; 123,73 (CH bpy) ; 127,96 (CH bpy) ; 147,85 (Cq bpy) ; 151,42 (Cq bpy) ; 165,68 (COOH) ; 172,62 (COOH).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 597,5 [M+K]⁺ (100) ; 619,3 [M-H+Na+K]⁺ (61).

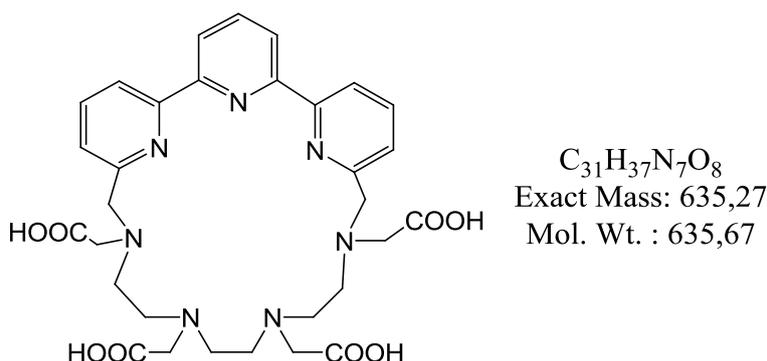
Chapitre V

SM (ESI, mode négatif) : m/z (%) = 595,7 $[M-2H+K]^-$ (100) ; 617,5 $[M-3H+Na+K]^-$ (18).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $C_{26}H_{34}N_6O_8 + K^+ = 597,2075$; exp. = 597,2070 (50 %).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100 \AA 150 \times 4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 310$ nm): **Temps de rétention** = 6,03 min.

Ligand L₃ (42)



Le macrocyle **39** (65 mg ; 0,075 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* pour conduire à 44 mg de produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 92 %.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO) : δ (ppm) = 2,60-3,30 (m, 12H, -CH₂N-) ; 3,30-3,70 (m, 8H, -CH₂COOH) ; 3,90-4,20 (m, 4H, -CH₂ tpy) ; 7,53 (m, 2H, tpy) ; 7,80-8,26 (m, 5H, tpy) ; 8,45 (m, 2H, tpy).

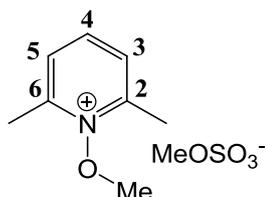
RMN ¹³C (75,4 MHz, DMSO) : δ (ppm) = 50,23 (CH₂) ; 50,49 (CH₂) ; 51,54 (CH₂) ; 54,97 (CH₂) ; 55,70 (CH₂) ; 59,22 (CH₂) ; 122,31 (CH tpy) ; 123,51 (CH tpy) ; 124,54 (CH tpy) ; 138,70 (CH tpy) ; 139,09 (CH tpy) ; 156,52 (Cq tpy) ; 157,29 (Cq tpy) ; 158,68 (Cq tpy) ; 170,78 (COOH) ; 172,56 (COOH).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 674,5 $[M+K]^+$ (100) ; 696,4 $[M-H+Na+K]^+$ (73) ; 658,5 $[M+Na]^+$ (36).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $C_{31}H_{37}N_7O_8 + H^+ = 636,2782$; exp. = 636,2754 (75 %).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100 \AA 150 \times 4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm): **Temps de rétention** = 11,68 min.

Sulfate de méthyle de 1-méthoxy-2,6-diméthylpyridinium 43



$C_9H_{15}NO_5S$
Exact Mass: 249,07
Mol. Wt.: 249,28

Sur 18,7 g (0,152 mol) de 2,6-lutidine-N-oxyde, sont ajoutés goutte à goutte 19,2 g (0,152 mol) de sulfate de diméthyle (la température du milieu réactionnel ne doit pas dépasser 80°C). Après 3 h de chauffage à 80 °C, le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante et recristallisé dans l'acétone pour conduire à 33 g de cristaux blancs hygroscopiques.

Rdt : 87 %.

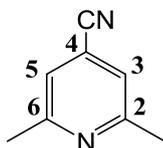
Rf : 0,38 (silice, MeOH).

RMN 1H (300 MHz ; DMSO- d_6): δ (ppm)= 2,76 (s, 6H, CH₃) ; 3,29 (s, 3H, OCH₃) ; 4,22 (s, 3H, CH₃OSO₃) ; 7,90 (d, 2H, H₃-H₅, $J_{3-4} = J_{4-5} = 7,8$ Hz) ; 8,29 (t, 1H, H₄, $J_{3-4} = J_{4-5} = 7,8$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz ; DMSO- d_6): δ (ppm) = 17,44 (CH₃); 53,48 (CH₃O); 67,45 (CH₃OSO₃); 128,55 (C₃-C₅ Pyr); 144,35 (C₄ Pyr); 153,60 (C₂-C₆ Pyr).

IR (KBr) en cm^{-1} = 1266 (OSO₃⁻).

4-cyano-2,6-diméthylpyridine 44



$C_8H_8N_2$
Exact Mass: 132,07
Mol. Wt.: 132,16

A une solution de **43** (0,133 mol ; 33 g) dans 35 mL d'eau, est additionnée goutte à goutte une solution de KCN (0,4 mol ; 25,9 g) dans 55 mL d'eau distillée. Après 4 jours à température ambiante sous agitation, le milieu réactionnel hétérogène est filtré et le précipité rose obtenu est mis de côté. Le filtrat est extrait avec 3 x 50 mL d'éther diéthylique ; les phases étherées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le solide obtenu ainsi que le précipité rose sont purifiés sur colonne de silice (CH₂Cl₂) pour conduire à 5,8 g de produit sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 33 %.

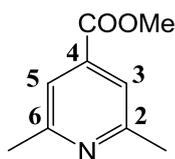
Rf : 0,22 (silice, CH₂Cl₂).

RMN 1H (300 MHz ; CDCl₃): δ (ppm)= 2,58 (s, 6H, CH₃) ; 7,18 (s, 2H, pyridine).

RMN ^{13}C (75 MHz ; CDCl₃): δ (ppm) = 24,31 (CH₃); 118,84 (CN); 120,85 (C₄ pyridine), 121,88 (C_{3,5} pyridine); 159,38 (C_{6,2} pyridine).

IR (KBr) en cm^{-1} = 2235 (CN).

4-méthoxycarbonyl-2,6-diméthyl pyridine 46



$C_9H_{11}NO_2$
Exact Mass: 165,08
Mol. Wt.: 165,19

Un mélange de composé **44** (3,78 mmol ; 0,5 g), de soude en solution aqueuse (2,5 M, 3 mL) et d'éthanol (3 mL) est chauffé à 100 °C pendant 5 heures. Après refroidissement à température ambiante, la solution est concentrée puis acidifiée à pH = 3 par une solution d'acide chlorhydrique à 10%. Après évaporation à sec, l'acide 2,6-diméthylisonicotinique (1,1 g) est obtenu sous forme d'un solide blanc qui est utilisé tel quel pour l'étape suivante. Un mélange d'acide 2,6-diméthylisonicotinique (1,1 g), d'acide sulfurique 98 % (0,75 mL) et de méthanol (75 mL) est chauffé à reflux pendant 24 h. Après refroidissement, le milieu réactionnel est neutralisé par une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. Le méthanol est évaporé et la phase aqueuse est extraite par 5 × 60 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques rassemblées sont alors séchées sur MgSO₄ puis concentrées. Une chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/acétate d'éthyle 8/2) permet d'obtenir 0,49 g de solide blanc.

Rdt = 78 %.

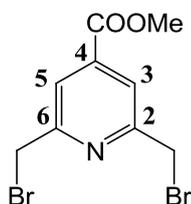
Rf : 0,52 (silice, dichlorométhane /acétate d'éthyle 7/3).

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃): δ (ppm)= 2,53 (s, 6H, CH₃); 3,87 (s, 3H, COOCH₃); 7,45 (s, 2H, pyridine).

RMN ¹³C (75 MHz ; CDCl₃): δ (ppm)= 24,48 (CH₃); 52,53 (OCH₃); 119,48 (C_{3,5} pyridine); 137,87 (C₄ pyridine); 158,87 (C_{2,6} pyridine); 166,17 (C=O).

IR (KBr) en cm⁻¹ = 1723 (C=O ester).

2,6-dibromométhyl-4-méthoxycarbonyl pyridine 47



$C_9H_9Br_2NO_2$
Exact Mass: 320,90
Mol. Wt.: 322,98

A une solution de **46** (17,93 mmol ; 2,96 g) dans 200 mL de CCl₄, sont ajoutés la N-bromosuccinimide (35,86 mmol ; 6,38g) et le peroxyde de benzoyle (100 mg). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux sous N₂ et sous irradiation d'une lampe halogène (150 W) pendant 2 h; sur ce milieu décoloré, sont additionnés à nouveau 5,18 g (29,11 mmol) de N-

Chapitre V

bromosuccinimide. La réaction, suivie par CCM, est arrêtée après 5 h 30 d'irradiation. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est traité par une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (100 mL) puis extrait 3 fois avec du CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 et évaporées à sec pour donner un solide orange (10,5 g). A une solution de ce solide orange dans 70 mL de THF anhydre à 0°C , sont additionnés sous atmosphère inerte le diéthyl phosphite (0,079 mol; 10,2 mL) et la diisopropyléthylamine (0,079 mol; 13,8 mL). Le milieu réactionnel est agité $\frac{1}{2}$ h à 0°C puis laissé à température ambiante pendant 18 h. Le milieu réactionnel blanc est versé dans 100 mL d'eau glacée et extrait à l'éther diéthylique. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. L'huile marron foncé est purifiée sur colonne de silice (CH_2Cl_2 / éther de pétrole, 50 / 50) pour conduire à 3,3 g d'un solide blanc.

Rdt = 57 %

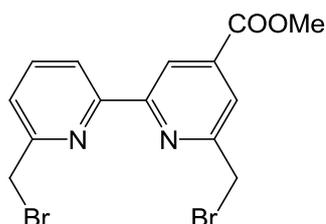
Rf : 0,32 (Silice, éther de pétrole / CH_2Cl_2 50/50).

Pf : 92°C .

RMN ^1H (CDCl_3 ; 300 MHz) δ (ppm)= 3,97 (s, 3H, OCH_3) ; 4,58 (s, 4H, CH_2Br), 7,92 (s, 2H, $\text{H}_{\text{pyridine}}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 ; 75 MHz) δ (ppm)= 32,85 (CH_2Br); 52,97 (OCH_3); 122,25 ($\text{C}_{3,5}$ Pyr) ; 139,79 (C_4 Pyr) ; 157,96 ($\text{C}_{2,6}$ Pyr) ; 164,76 ($\text{C}=\text{O}$).

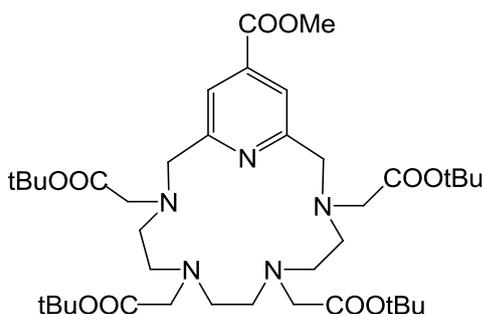
6,6'-bis(bromométhyl)-4-méthoxycarbonyl-2,2'-bipyridine 52 ^(1,2)



$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$
Exact Mass: 397,93
Mol. Wt.: 400,07

Ce composé a été préparé selon ^(1,2).

Macrocycle 53



$\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{10}$
Exact Mass: 763,47
Mol. Wt. : 763,96

Chapitre V

La réaction de macrocyclisation est réalisée selon la procédure générale décrite **page 230**.

4 (150 mg ; 0,25 mmol), Na₂CO₃ (260 mg ; 2,5 mmol) dans 90 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 80 mg (0,25 mmol) de 4-méthoxycarbonyl-2,6-bis(bromométhyl)pyridine **47**. Le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine (CH₂Cl₂/méthanol : 1/0 → 1/1) pour conduire à 107 mg d'une huile jaune correspondant au macrocycle attendu **53** sous forme « libre ».

Rdt : 56%.

R_f : 0,18 (alumine ; CH₂Cl₂).

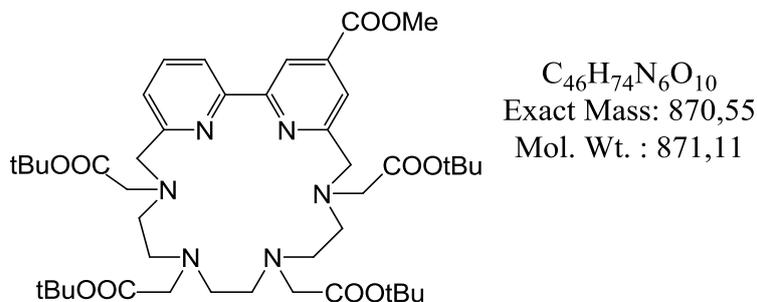
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,43 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 1,50 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,50-2,90 (m, 12H, -CH₂N-) ; 3,20-3,34 (m, 4H, -CH₂COOtBu) ; 3,40 (s, 4H, -CH₂COOtBu) ; 3,94 (s, 3H, CH₃) ; 3,99 (s, 4H, -CH₂ py) ; 7,86 (s, 2H, H_{3,5} py).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,16 (CH₃) ; 50,91 (CH₂) ; 51,87 (CH₂) ; 52,01 (CH₂) ; 52,53 (CH₃) ; 56,11 (CH₂) ; 57,37 (CH₂) ; 57,51 (CH₂) ; 60,14 (CH₂) ; 80,89 (Cq) ; 81,14 (Cq) ; 122,14 (CH py) ; 138,24 (Cq py) ; 159,86 (Cq py) ; 165,87 (COOMe) ; 170,59 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 786,8 [M+Na]⁺ (43) ; 764,9 [M+H]⁺ (100).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1733 (C=O ester) ; 1572 (C=C, C=N pyridine) ; 755 (C-H aromatique hors du plan).

Macrocycle **54**



La réaction de macrocyclisation est réalisée selon la procédure générale décrite **page 230**.

4 (150 mg ; 0,25 mmol), Na₂CO₃ (260 mg ; 2,5 mmol) dans 90 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 100 mg (0,25 mmol) de 4-méthoxycarbonyl-6,6'-bis(bromométhyl)-2,2'-bipyridine **52**. Le résidu obtenu est purifié sur colonne d'alumine (CH₂Cl₂/méthanol : 1/0 → 1/1) pour conduire à 100 mg d'un mélange de macrocycle attendu sous forme « libre » / forme complexée avec Na⁺ (30/70). Ce mélange est repris dans 9 mL d'acétonitrile, chauffé à reflux ½ h en présence de 5 équiv. de NaCl, filtré puis évaporé à sec pour conduire à 90 mg de macrocycle sous forme complexée **54.Na⁺**.

Rdt : 40%.

Chapitre V

R_f : 0,26 (alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 98 / 02).

Forme complexée:

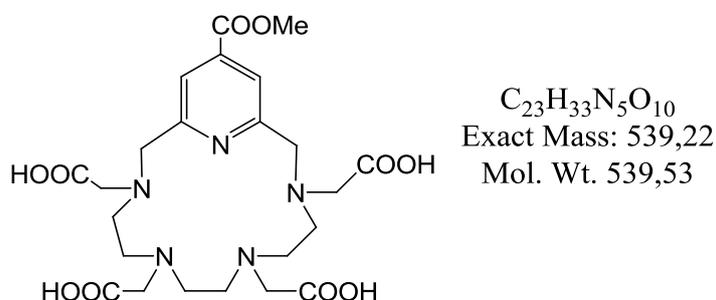
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,22 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,23 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,36 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,37 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 2,60-2,80 (m, 8H, -CH₂N-) ; 2,90-3,10 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,10-3,30 (m, 8H, -CH₂COOtBu) ; 4,01 (s, 3H, CH₃) ; 4,04 (s, 2H, -CH₂ bpy) ; 4,12 (s, 2H, -CH₂ bpy) ; 7,35 (d, 1H, ³J= 7,8 Hz, H(5')bpy) ; 7,80 (s, 1H, H(5)bpy) ; 7,92 (t, 1H, ³J= 7,8 Hz, H(4')bpy) ; 7,96 (d, 1H, ³J= 7,5 Hz, H(3')bpy) ; 8,41 (s, 1H, H(3) bpy).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 27,92 (CH₃) ; 27,94 (CH₃) ; 52,10 (CH₂) ; 52,89 (CH₃) ; 55,87 (CH₂) ; 56,04 (CH₂) ; 56,89 (CH₂) ; 81,81 (Cq) ; 81,88 (Cq) ; 82,26 (Cq) ; 119,35 (CH) ; 120,37 (CH) ; 122,68 (CH) ; 124,29 (CH) ; 138,61 (CH) ; 139,69 (Cq) ; 153,89 (Cq) ; 155,95 (Cq) ; 158,19 (Cq) ; 159,35 (Cq) ; 165,08 (COOMe) ; 170,43 (COOtBu) ; 170,70 (COOtBu) ; 171,84 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 863,5 [M+Na]⁺ (100) ; 328,1 [M+K+H-4tBu]²⁺ (65) ; 841,6 [M+H]⁺ (7).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1729 (C=O ester) ; 1568 (C=C, C=N pyridine) ; 753 (C-H aromatique hors du plan).

Ligand L₄ (**54 bis**)



Le macrocycle **53** (50 mg ; 0,065 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* décrite **page 234** pour conduire à 35 mg du produit attendu sous forme d'une poudre jaune pâle.

Rdt : 100 %.

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,34 (s, 4H, -CH₂N-) ; 3,49 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,60 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,70 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 3,90 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 3,92 (s, 3H, CH₃) ; 4,62 (s, 4H, -CH₂ py) ; 7,95 (s, 2H, H_{3,5} py).

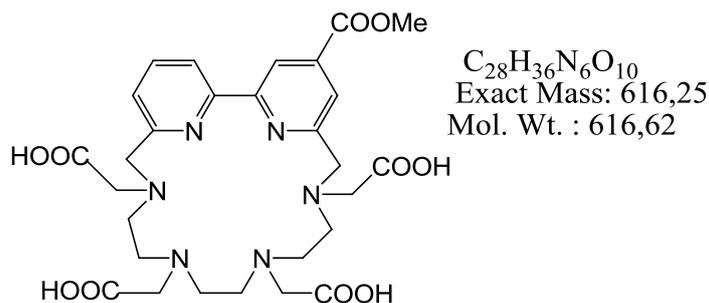
RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 50,72 (CH₂) ; 51,55 (CH₂) ; 52,47 (CH₂) ; 53,45 (CH₃) ; 53,70 (CH₂) ; 55,37 (CH₂) ; 57,98 (CH₂) ; 123,69 (CH py) ; 140,61 (Cq py) ; 152,36 (Cq py) ; 165,92 (COOMe) ; 169,76 (COOH) ; 171,50 (COOH).

Chapitre V

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $C_{23}H_{33}N_5O_{10} + H^+ = 540,2306$;
exp. = 540,2304 (100%).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μ m 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0
HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 20 min ;
débit : 1 mL/min, $\lambda = 280$ nm): **Temps de rétention = 6,68 min.**

Ligand L₅ (**55**)



Le macrocycle **54** (30 mg ; 0,035 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 1* décrite **page 234** pour conduire à 19,5 mg du produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt : 90 %.

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,00-3,24 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,26-3,43 (m, 4H, -CH₂N) ; 3,44-3,58 (m, 4H, -CH₂N) ; 3,63 (s, 2H, -CH₂COOH) ; 3,70 (s, 2H, -CH₂COOH) ; 3,75-3,93 (m, 4H, -CH₂COOH) ; 4,04 (s, 3H, CH₃) ; 4,52 (s, 2H, -CH₂ bpy) ; 4,87 (s, 2H, -CH₂ bpy) ; 7,90 (d, 1H, ³J= 5,1 Hz, H bpy) ; 8,20 (bs, 1H, H bpy) ; 8,51 (bs, 2H, H bpy) ; 8,77 (bs, 1H, H bpy).

RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 50,15 (CH₂) ; 50,94 (CH₂) ; 52,04 (CH₂) ; 52,52 (CH₂) ; 53,55 (CH₃) ; 53,77 (CH₂) ; 54,62 (CH₂) ; 55,12 (CH₂) ; 55,47 (CH₂) ; 55,93 (CH₂) ; 57,11 (CH₂) ; 58,23 (CH₂) ; 63,56 (CH₂) ; 122,46 (CH bpy) ; 123,98 (CH bpy) ; 125,94 (CH bpy) ; 127,33 (CH bpy) ; 129,72 (CH bpy) ; 141,15 (Cq bpy) ; 152,18 (Cq bpy) ; 152,28 (Cq bpy) ; 162,85 (COOH) ; 163,12 (COOH) ; 165,74 (COOMe) ; 170,65 (COOH) ; 174,17 (COOH).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 617,3 [M+H]⁺ (100) ; 639,3 [M+Na]⁺ (80).

SM (ESI, mode négatif) : m/z (%) = 615,5 [M-H]⁻ (100).

SM (ESI, mode négatif ; haute résolution) : m/z calculé pour $C_{28}H_{36}N_6O_{10} - H^- = 615,2420$;
exp. = 615,2136 (100 %).

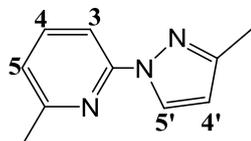
SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $C_{28}H_{36}N_6O_{10} + Na^+ = 639,2391$;
exp. = 639,2374 (100%).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μ m 100Å 150×4,6 mm ; gradient: H₂O + TFA

Chapitre V

0,1% / CH₃OH 95/5 à 80/20 en 35 min; débit : 1 mL/min, $\lambda = 310$ nm): **Temps de rétention** = 9,54 min.

2-(3'-méthyl-pyrazol-1'-yl)-6-méthyl-pyridine **56**



C₁₀H₁₁N₃
Exact Mass: 173,10
Mol. Wt.: 173,21

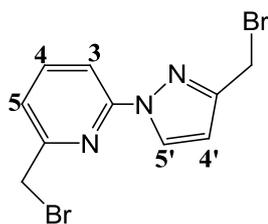
6,62 g (34,8 mmol) de CuI, 11,5 g (93,5 mmol) de K₂CO₃ et 2,85 g (34,8 mmol) de 3-méthylpyrazole sont mis en solution dans 120 mL de dioxanne dégazé. La 2-bromo-6-méthylpyridine (6g ; 34,8 mmol) et la *trans*-1,2-cyclohexanediamine (4,75 g ; 41,76 mmol) sont ensuite ajoutées. Après 6 jours à reflux (110 °C) puis retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée d'EDTA disodé, séché sur Na₂SO₄ et évaporé. L'huile marron obtenue est purifiée sur colonne de silice (CH₂Cl₂/éther de pétrole 80/20 → 100/0) pour conduire à 3,54 g de produit sous la forme d'une huile jaune pâle.

Rdt : 59 %.

Rf : 0,35 (silice, CH₂Cl₂/éther de pétrole 8/2).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 2,37 (s, 3H, CH₃) ; 2,53 (s, 3H, CH₃) ; 6,23 (d, 1H, H₄, ³J = 2,52 Hz) ; 6,97 (d, 1H, H₅, ³J = 6,94 Hz) ; 7,61-7,70 (m, 2H, H_{3,4}) ; 8,45 (d, 1H, H₅, ³J = 2,52 Hz).

6-bromométhyl-2(3'-bromométhyl-pyrazol-1'-yl) pyridine **57**



C₁₀H₉Br₂N₃
Exact Mass: 328,92
Mol. Wt.: 331,01

A une solution du composé **56** (400 mg ; 2,3 mmol) dans le CCl₄, sont ajoutés la N-bromosuccinimide (820 mg ; 4,6 mmol) et l'azoisobutyronitrile (20 mg ; 0,12 mmol). Le milieu est mis à reflux à l'aide d'une lampe halogène (150 W) jusqu'à la décoloration du milieu. Après évaporation à sec, le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (éther de pétrole/CH₂Cl₂ 60/40) pour donner 150 mg de produit attendu sous la forme de cristaux blancs.

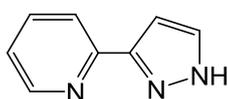
Rdt : 20%.

Chapitre V

Rf : 0,30 (silice, CH₂Cl₂/éther de pétrole 4/6).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 4,52 (s, 2H, -CH₂Br) ; 4,56 (s, 2H, -CH₂Br) ; 6,52 (d, 1H, H₄, ³J= 2,5 Hz) ; 7,31 (d, 1H, H₅, ³J= 7,2 Hz) ; 7,79-7,87 (m, 2H, H_{3,4}) ; 8,55 (d, 1H, H₅, ³J= 2,5 Hz).

3'-(pyridin-2-yl) pyrazole **58**



C₈H₇N₃
Exact Mass: 145,06
Mol. Wt.: 145,16

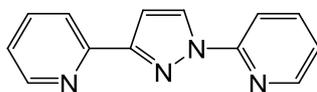
A une solution de 3-(diméthylamino)-1-(2-pyridyl)prop-2-èn-1-one **27** (21,9 g ; 0,12 mol) dans 135 mL d'éthanol est additionnée l'hydrazine monohydratée (20,2 g ; 0,40 mol). Le mélange résultant est agité 24 h à température ambiante puis évaporé à sec pour donner 17,2 g de composé attendu sous la forme d'un solide marron.

Rdt : 99 %.

Rf : 0,29 (silice, CH₂Cl₂/acétate d'éthyle 1/9).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 6,83 (d, 1H, J = 2,3 Hz) ; 7,22-7,28 (m, 1H) ; 7,68 (d, 1H, J = 2,3 Hz) ; 7,77 (m, 2H) ; 8,66 (d, 1H, J = 4,6 Hz).

1,3-bis(pyridin-2-yl) pyrazole **59**



C₁₃H₁₀N₄
Exact Mass: 222,09
Mol. Wt.: 222,25

Voie A : couplage catalysé par le cuivre

A un mélange de CuI (0,26 g ; 1,38 mmol), de K₂CO₃ (0,46 g ; 3,31 mmol) et de 3'-(pyridin-2-yl) pyrazole **58** (0,22 g ; 1,38 mmol) dans le dioxanne, sont ajoutées la 2-bromopyridine (0,19 g ; 1,66 mmol) et la *trans*-1,2-cyclohexanediamine (0,19 g ; 1,66 mmol). La solution est portée à reflux pendant 6 jours jusqu'à ce que le mélange devienne marron. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée d'EDTA disodé et séché sur Na₂SO₄. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Une chromatographie sur colonne de silice (CH₂Cl₂/acétate d'éthyle 1/9) permet d'obtenir 93 mg de solide jaune correspondant au composé attendu.

Rdt : 30%

Voie B : voie thermique

Un mélange de 3'-(pyridin-2-yl) pyrazole (9 g ; 62 mmol) et de 17,4 g (108 mmol) de 2-bromopyridine est chauffé à 190°C pendant 70 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dissous dans l'eau et amené à pH basique avec du Na₂CO₃ solide. Le

Chapitre V

précipité ainsi obtenu est filtré et lavé à l'eau froide. Une purification par sublimation permet d'obtenir 11,5 g d'un solide blanc correspondant au composé attendu.

Rdt : 83%

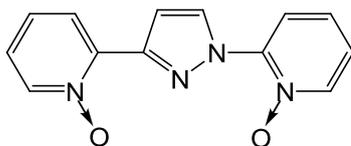
Rf : 0,58 (silice, CH₂Cl₂/acétate d'éthyle 1/9).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 7,11 (d, 1H, J = 2,7 Hz); 7,19 (ddd, 1H, J = 0,9 Hz, J = 4,8 Hz, J = 5,7 Hz); 7,26 (ddd, 1H, J = 1,2 Hz, J = 4,8 Hz, J = 6 Hz); 7,76 (td, 1H, J = 1,8 Hz, J = 7,5 Hz); 7,83 (ddd, 1H, J = 1,8 Hz, J = 7,5 Hz, J = 8,4 Hz); 8,11 (dt, 1H, J = 0,9 Hz, J = 3,6 Hz); 8,13 (dt, 1H, J = 0,9 Hz, J = 3,9 Hz); 8,42 (ddd, 1H, J = 0,9 Hz, J = 1,8 Hz, J = 4,8 Hz); 8,62 (d, 1H, J = 2,4 Hz); 8,67 (ddd, 1H, J = 0,9 Hz, J = 1,8 Hz, J = 5,1 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 106,63 (CH); 112,58 (CH); 120,45 (CH); 121,52 (CH); 122,92 (CH); 128,45 (CH); 136,59 (CH); 138,63 (CH); 148,05 (CH); 149,52 (CH); 151,47 (Cq); 151,84 (Cq), 154,00 (Cq).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1578 (CN).

1,3-bis (N-oxyde pyridin-2-yl) pyrazole **60**



C₁₃H₁₀N₄O₂
Exact Mass: 254,08
Mol. Wt.: 254,24

48,4 g (216 mmol) de *m*-CPBA divisés en 7 portions (6,9 g dans 60 mL CH₂Cl₂) sont ajoutés goutte à goutte à une solution de 1,3-bis (pyridin-2-yl) pyrazole **59** (3 g ; 13,4 mmol) dans 50 mL de CH₂Cl₂. Après 27 jours d'agitation à température ambiante, 220 mL d'eau distillée sont ajoutés et le milieu est basifié à pH = 10 par ajout de Na₂CO₃ (s). La phase aqueuse est extraite par un mélange CHCl₃/EtOH 3/1 (3 x 200 mL puis 6 x 100 mL) et les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na₂SO₄ puis filtrées et évaporées à sec. Le solide blanc obtenu est redissout dans 500 mL CH₂Cl₂ et lavé par 3 x 200 mL de solution aqueuse saturée de Na₂S₂O₃, par 4 x 200 mL de solution aqueuse saturée de NaHCO₃ et par 2 x 100 mL d'eau distillée. La phase organique est séchée, filtrée et évaporée. Le solide obtenu est purifié sur alumine (CH₂Cl₂/méthanol 100/0 → 98/2) pour conduire à 1,6 g de produit attendu sous la forme d'un solide jaune.

Rdt: 47 %.

Pf: 195°C

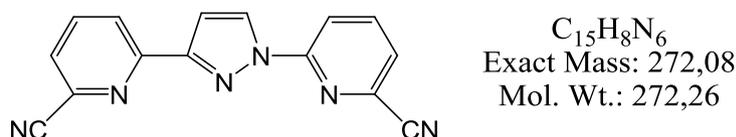
Rf: 0,48 (alumine, CH₂Cl₂/ MeOH 98/2).

Chapitre V

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :δ(ppm) = 7,18-7,25 (m, 2H); 7,27-7,35 (m, 1H); 7,36-7,45 (m, 1H); 7,83 (d, J= 3,7 Hz, 1H); 8,18 (dd, J= 1,8 Hz, J= 8,4 Hz, 1H); 8,25 (dd, J= 2,1 Hz, J= 8,1 Hz, 1H); 8,34 (td, J= 0,9 Hz, J= 6,6 Hz, 2H); 9,42 (d, J= 3 Hz, 1H).

SM (ES, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 276,5 [M+Na]⁺ (100) ; 255,1 [M+H]⁺ (23).

1,3-bis(6-cyanopyridin-2-yl) pyrazole **61**



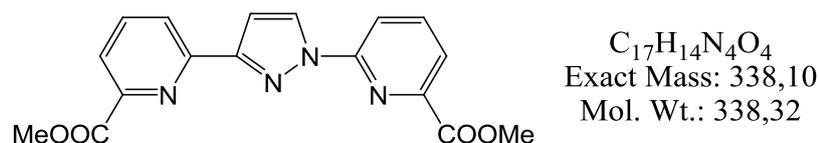
Un mélange de composé **60** (1,6 g ; 6,29 mmol) et de cyanure de triméthylsilyle (8,3 mL ; 62,9 mmol) dans 65 mL CH₂Cl₂ est agité pendant 15 min puis 2,9 mL (25,16 mmol) de chlorure de benzoyle sont ajoutés. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le mélange est concentré à moitié et 80 mL d'une solution aqueuse de K₂CO₃ à 10% sont ajoutés. Après 2 h d'agitation, le précipité est filtré puis purifié par sublimation. On obtient 1 g de produit attendu sous forme d'un solide beige.

Rdt : 58 %.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) :δ(ppm) = 7,25 (d, J= 2,7 Hz, 1H) ; 8,08 (d, J= 7,9 Hz, 2H) ; 8,21 (t, J= 7,9 Hz, 1H) ; 8,31 (t, J= 7,9 Hz, 1H) ; 8,40 (d, J= 7,9 Hz, 1H) ; 8,44 (d, J= 7,9 Hz, 1H) ; 8,80 (d, J= 2,7 Hz, 1H).

SM (ES, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 295 [M+Na]⁺ (100) ; 273 [M+H]⁺ (71).

1,3-bis(6-méthoxycarbonylpyridin-2-yl) pyrazole **62**



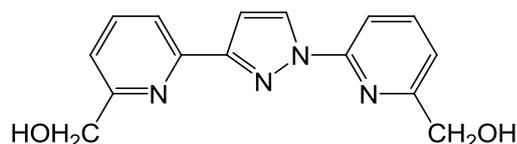
Un mélange de composé **61** (1 g ; 3,6 mmol), d'acide acétique glacial (15 mL) et d'acide sulfurique concentré (15 mL) est porté 2 h à reflux. Après retour à température ambiante, 120 mL d'H₂O froide sont ajoutés et le précipité blanc (diacide) ainsi formé est filtré, rincé et séché à l'étuve. A un mélange de 0,8 mL (11,88 mmol) de SOCl₂ dans 65 mL de MeOH à 0°C est additionné 0,67 g (2,16 mmol) de diacide obtenu ci-dessus. Le milieu réactionnel est chauffé 4,5 h à reflux. Après concentration du milieu réactionnel à moitié, celui-ci est dilué dans 65 mL de CHCl₃. Le mélange est neutralisé par une solution aqueuse de NaHCO₃ saturé (20 mL) puis la phase aqueuse est extraite par 3 x 30 mL de CHCl₃. Les phases organiques

sont séchées, filtrées et évaporées. On obtient 1,12 g de produit attendu sous forme d'une poudre blanche.

Rdt : 92 %.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) = 4,03 (s, 3 H) ; 4,04 (s, 3 H) ; 7,28 (d, J= 2,7 Hz, 1H) ; 7,92 (t, J= 7,8 Hz, 1H) ; 8,00 (t, J= 7,6 Hz, 1H) ; 8,04 (dd, J= 1,5 Hz, J= 7,6 Hz, 1H) ; 8,10 (dd, J= 0,9 Hz, J= 7,5 Hz, 1H) ; 8,31 (dd, J= 0,9 Hz, J= 7,8 Hz, 1H) ; 8,33 (dd, J= 1,8 Hz, J= 7,2 Hz, 1H) ; 8,79 (d, J= 2,7 Hz, 1H).

1,3-bis(6-hydroxyméthylpyridin-2-yl) pyrazole 63



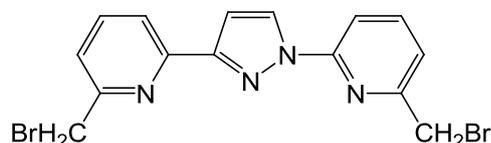
C₁₅H₁₄N₄O₂
Exact Mass: 282,11
Mol. Wt.: 282,30

A une suspension de composé **62** (1,1 g ; 3,25 mmol) dans 30 mL d'éthanol absolu est ajouté 0,51 g (13,5 mmol) de NaBH₄. Après 3 h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est chauffé 1 h à reflux puis évaporé à sec. Le solide brut est hydrolysé en présence d'une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (25 mL) par chauffage à reflux pendant 10 minutes ; la solution est refroidie à 0°C et le précipité formé est filtré. On obtient 0,62 g de produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 68 %.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) = 4,63 (d, J= 5,4 Hz, 4 H) ; 5,46 (t, J= 5,7 Hz, 1 H) ; 5,54 (t, J= 5,7 Hz, 1 H) ; 7,09 (d, J= 2,4 Hz, 1 H) ; 7,46 (t, J= 6,6 Hz, 2 H) ; 7,91(t, J= 7,8 Hz, 2 H) ; 7,97 (d, J= 7,2 Hz, 1 H) ; 8,04 (t, J= 7,8 Hz, 1 H) ; 8,68 (d, J= 2,7 Hz, 1 H).

1,3-bis(6-bromométhylpyridin-2-yl) pyrazole 64



C₁₅H₁₂Br₂N₄
Exact Mass: 405,94
Mol. Wt.: 408,09

25 mL de HBr à 48% dans l'eau sont ajoutés à 0,61 g (2,16 mmol) de **63**. Le mélange obtenu est mis une nuit à reflux et laissé 2 jours à température ambiante. Après refroidissement à 0°C, le milieu réactionnel est neutralisé par Na₂CO₃ (s) puis filtré. On obtient 0,71 g de produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 81 %.

Rf : 0,4 (silice, CH₂Cl₂).

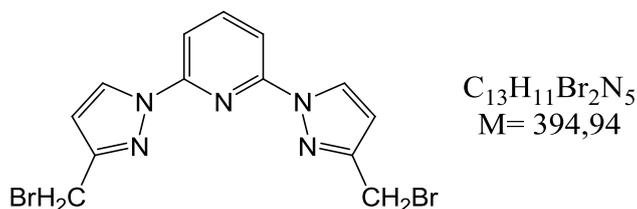
Chapitre V

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta(\text{ppm}) = 4,56$ (s, 2H) ; 4,63 (s, 2H) ; 7,16 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H) ; 7,34 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H) ; 7,43 (dd, $J = 7,7$ Hz, $J = 0,9$ Hz, 1H) ; 7,78 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H) ; 7,84 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H) ; 8,04 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H) ; 8,67 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 33,23 (CH_2Br) ; 34,12 (CH_2Br) ; 107,06 (CH) ; 111,84 (CH) ; 119,59 (CH) ; 120,97 (CH) ; 122,72 (CH) ; 128,64 (CH) ; 137,55 (CH) ; 139,66 (CH) ; 151,01 (Cq) ; 151,49 (Cq) ; 153,92 (Cq) ; 155,52 (Cq) ; 156,61 (Cq).

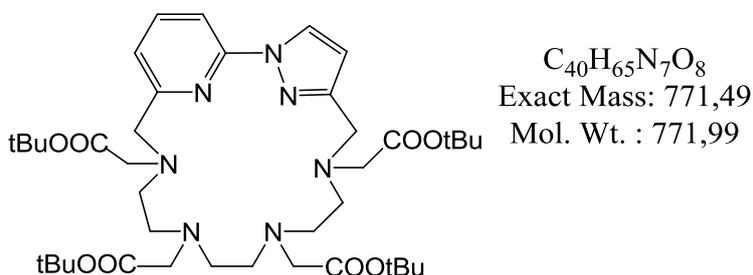
SM (ES, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 409 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (79) ; 431 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (34).

2,6-bis(3-bromométhylpyrazol-1-yl) pyridine **65**



Ce composé était disponible au laboratoire. Il peut être préparé selon Rodriguez-Ubis et al. ⁽³⁾

Macrocycle **66**



La réaction de macrocyclisation est réalisée selon la procédure générale décrite **page 230**.

4 (220 mg ; 0,36 mmol), Na_2CO_3 (387 mg ; 3,65 mmol) dans 130 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 120 mg (0,36 mmol) de 6-bromométhyl-2-(3-bromométhylpyrazol-1-yl) **57**. L'huile jaune obtenue est solubilisée dans 50 mL de CH_2Cl_2 , lavée à l'eau (2×50 mL), avec une solution aqueuse saturée d'EDTA disodé (3×50 mL) et à l'eau ($(2 \times 50$ mL). La phase organique est séchée, filtrée, évaporée à sec puis purifiée sur colonne d'alumine ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{méthanol}$: 1/0 \rightarrow 1/1) pour conduire à 113 mg de macrocycle attendu (huile jaune) sous forme « libre ».

Rdt : 40 %.

R_f : 0,28 (alumine ; CH_2Cl_2 / méthanol 99/1).

Chapitre V

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 1,40 (s, 18H, $\underline{\text{CH}_3}$ tBu); 1,49 (s, 18H, $\underline{\text{CH}_3}$ tBu); 2,34-2,89 (m, 12H, $-\underline{\text{CH}_2}\text{N}-$); 3,15 (bs, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOtBu}$); 3,29-3,35 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOtBu}$); 3,40 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOtBu}$); 3,39 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOtBu}$); 3,90 (s, 2H, $-\text{CH}_2$ pzpy); 3,95 (s, 2H, $-\text{CH}_2$ pzpy); 6,46 (d, 1H, $^3\text{J}=2,40$ Hz); 7,24 (d, 1H, $^3\text{J}=7,68$ Hz); 7,6 (d, 1H, $^3\text{J}=7,68$ Hz); 7,78 (t, 1H, $^3\text{J}=7,68$ Hz); 8,30 (d, 1H, $^3\text{J}=2,40$ Hz).

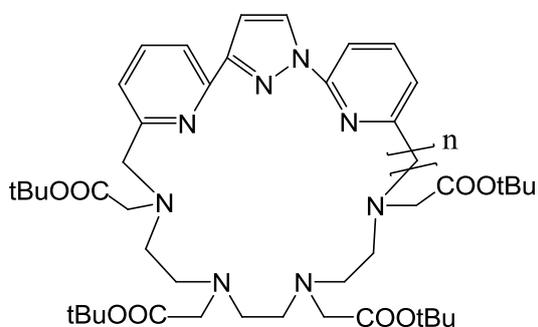
RMN ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) = 28,16 (CH_3); 28,23 (CH_3); 51,05 (CH_2); 51,36 (CH_2); 52,14 (CH_2); 52,94 (CH_2); 56,01 (CH_2); 56,41 (CH_2); 58,04 (CH_2); 58,57 (CH_2); 59,70 (CH_2); 80,60 (Cq); 81,01 (Cq); 81,10 (Cq); 108,94 (CH); 111,63 (CH); 122,02 (CH); 128,53 (CH); 139,04 (CH); 150,84 (Cq); 153,15 (Cq); 158,13 (Cq); 170,63 (COOtBu); 170,67 (COOtBu); 170,89 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 794,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100); 772,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (42); 810,5 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (18).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{N}_7\text{O}_8 + \text{H}^+ = 772,4973$; exp. = 772,4942 (100 %).

IR (KBr) en cm^{-1} : 1728 (C=O ester); 1598; 1578 (C=C, C=N aromatique); 753 (C-H aromatique hors du plan).

Macrocycle **67**



Monomère (n = 1) **67**

$\text{C}_{45}\text{H}_{68}\text{N}_8\text{O}_8$
Exact Mass: 848,52
Mol. Wt. : 849,07

Dimère (n = 2) **67d**

$\text{C}_{90}\text{H}_{136}\text{N}_{16}\text{O}_{16}$
Exact Mass: 1697,03
Mol. Wt. : 1698,14

La réaction de macrocyclisation est réalisée selon la procédure générale décrite **page 230**.

4 (270 mg ; 0,44 mmol), Na_2CO_3 (475 mg ; 4,48 mmol) dans 135 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 182 mg (0,44 mmol) de 1,3-bis(6-bromométhylpyridin-2-yl)pyrazole **64**. L'huile jaune obtenue est solubilisée dans 100 mL de CH_2Cl_2 , lavée successivement à l'eau (2 \times 100 mL), avec une solution aqueuse saturée d'EDTA disodé (2 \times 100 mL) et à l'eau (2 \times 100 mL). La phase organique est séchée, filtrée, évaporée à sec puis purifiée sur colonne d'alumine (CH_2Cl_2 /méthanol : 1/0 \rightarrow 1/1) pour conduire à 29 mg de macrocycle dimère **67d** (impur) et à 150 mg de macrocycle monomère attendu **67** (forme « libre »).

Chapitre V

Rdt : 40 % (monomère **67**) ; 8% (dimère **67d**).

Monomère 67 :

R_f : 0,26 (alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 98/02).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,36 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,40 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,44 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,47 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 2,57-2,81 (m, 12H, -CH₂N-) ; 3,04-3,24 (m, 2H, -CH₂COOtBu) ; 3,30 (bs, 2H, -CH₂COOtBu) ; 3,34-3,46 (m, 4H, -CH₂COOtBu) ; 4,01 (s, 2H, -CH₂ pypzpy) ; 4,02 (s, 2H, -CH₂ pypzpy) ; 6,89 (d, 1H, ³J= 2,56 Hz) ; 7,28 (bs, 1H) ; 7,33 (d, 1H, ³J= 7,16 Hz) ; 7,48 (d, 1H, ³J= 7,86 Hz) ; 7,57 (d, 1H, ³J= 7,28 Hz) ; 7,69 (t, 1H, ³J= 7,63 Hz) ; 7,78 (t, 1H, ³J= 7,63 Hz) ; 8,17 (d, 1H, ³J= 2,53 Hz).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,09 (CH₃) ; 28,11 (CH₃) ; 28,18 (CH₃) ; 28,23 (CH₃) ; 51,28 (CH₂) ; 51,56 (CH₂) ; 52,47 (CH₂) ; 52,81 (CH₂) ; 52,99 (CH₂) ; 56,02 (CH₂) ; 56,08 (CH₂) ; 56,54 (CH₂) ; 56,83 (CH₂) ; 59,32 (CH₂) ; 59,82 (CH₂) ; 60,42 (CH₂) ; 80,63 (Cq) ; 80,85 (Cq) ; 80,91 (Cq) ; 80,98 (Cq) ; 107,04 (CH) ; 110,44 (C₆) ; 121,90 (CH) ; 122,40 (CH) ; 122,91 (CH) ; 128,31 (CH) ; 136,94 (CH) ; 139,01 (CH) ; 150,87 (Cq) ; 150,99 (Cq) ; 153,57 (Cq) ; 158,97 (Cq) ; 159,22 (Cq) ; 170,72 (COOtBu) ; 170,87 (COOtBu) ; 170,93 (COOtBu).

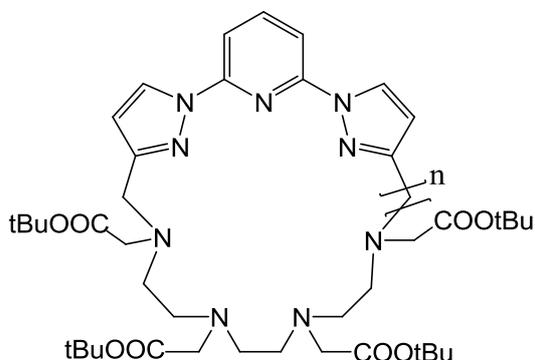
SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 849,4 [M+H]⁺ (100) ; 871,4 [M+Na]⁺ (42) ; 887,4 [M+K]⁺ (12).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1729 (C=O ester) ; 1599,1577 (C=C, C=N aromatique) ; 756 (C-H aromatique hors du plan).

Dimère 67d :

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 1720,1 [M+Na]⁺ (20) ; 872,0 [M+2Na]²⁺ (75).

Macrocycle **68**



Monomère (n = 1) 68	Dimère (n = 2) 68d
C ₄₃ H ₆₇ N ₉ O ₈	C ₈₆ H ₁₃₄ N ₁₈ O ₁₆
Exact Mass: 837,51	Exact Mass: 1675,02
Mol. Wt. : 838,05	Mol. Wt. : 1676,10

La réaction de macrocyclisation est réalisée selon la procédure générale décrite **page 230**.

4 (228 mg ; 0,37 mmol), Na₂CO₃ (400 mg ; 3,7 mmol) dans 140 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 150 mg (0,37 mmol) de 2,6-bis(3-bromométhylpyrazol-1-yl) pyridine **65**.

Chapitre V

L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne d'alumine (CH₂Cl₂/méthanol : 1/0 → 1/1) pour conduire à 57 mg de macrocycle monomère attendu **68** sous forme d'une huile jaune et à 43 mg de macrocycle dimère **68d** (impur).

Rdt : 18 % (monomère **68**) ; 14% (dimère **68d**)

Monomère 68 :

R_f : 0,22 (alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 99/01).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,36 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,41-1,43 (m, 9H, CH₃ tBu) ; 1,46-1,47 (m, 9H, CH₃ tBu) ; 1,49 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 2,54 (bs, 4H, -CH₂N-) ; 2,50-2,90 (m, 8H, -CH₂N-) ; 3,16 (s, 2H, -CH₂COOtBu) ; 3,28-3,45 (m, 6H, -CH₂COOtBu) ; 3,92 (bs, 2H, -CH₂ pzpypz) ; 3,98 (s, 2H, -CH₂ pzpypz) ; 6,44 (d, 2H, ³J= 2,54 Hz) ; 7,37 (d, 2H, ³J= 7,86 Hz) ; 7,88 (t, 1H, ³J= 7,86 Hz) ; 8,16 (d, 2H, ³J= 2,54 Hz).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,07 (CH₃) ; 28,19 (CH₃) ; 50,93 (CH₂) ; 51,66 (CH₂) ; 52,87 (CH₂) ; 55,84 (CH₂) ; 55,89 (CH₂) ; 57,03 (CH₂) ; 80,63 (Cq) ; 81,04 (Cq) ; 109,06 (CH) ; 109,65 (CH) ; 128,86 (CH) ; 141,22 (CH) ; 150,32 (Cq) ; 153,00 (Cq) ; 170,68 (COOtBu) ; 170,93 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₄₃H₆₇N₉O₈ + H⁺ = 838,5191 ; exp. = 838,5214 (100 %).

IR (KBr) en cm⁻¹ : 1729 (C=O ester).

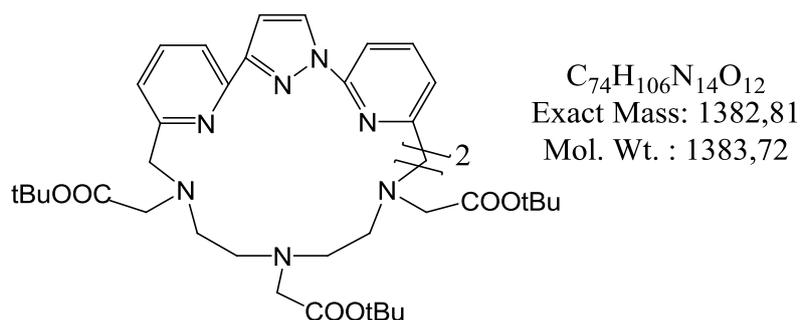
Dimère 68d :

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 838,8 [M+2H]²⁺ (100) ; 1677,2 [M+H]⁺ (12).

Réactions de macrocyclisation avec le dérivé **1,4,7-tri(tert-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7-triazaheptane 69** ⁽⁴⁾: procédure générale

10 équivalents de carbonate de sodium sont ajoutés à une solution de 1,4,7-tri(tert-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7-triazaheptane **69** dans l'acétonitrile anhydre ([réactif] ~ 2,8 10⁻³ mol. L⁻¹). La suspension est portée à reflux et chauffée pendant 1 h sous atmosphère inerte. 1 équivalent de dérivé bromé est ajouté et le mélange résultant est chauffé à reflux durant 24 h. Après refroidissement du milieu réactionnel, les sels de sodium sont filtrés et le filtrat est évaporé à sec. Celui-ci est repris dans le dichlorométhane et les restes de sels sont à nouveau éliminés. Après évaporation à sec, le résidu est purifié sur colonne d'alumine (Act. IV) afin d'obtenir le macrocycle désiré.

Dimère 71d



Triamine **69** (171 mg ; 0,38 mmol), Na_2CO_3 (406 mg ; 3,83 mmol) dans 140 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 163 mg (0,38 mmol) de 1,3-bis(6-bromométhylpyridin-2-yl)pyrazole **64**. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne d'alumine (CH_2Cl_2 /méthanol : 1/0 \rightarrow 1/1) puis sur silice (CH_2Cl_2 /méthanol : 98/02 \rightarrow 90/10) pour conduire à 96 mg de macrocycle dimère **71d** sous forme d'une huile jaune.

Rdt : 36 %

R_f : 0,37 (alumine ; CH_2Cl_2 / méthanol 98/2).

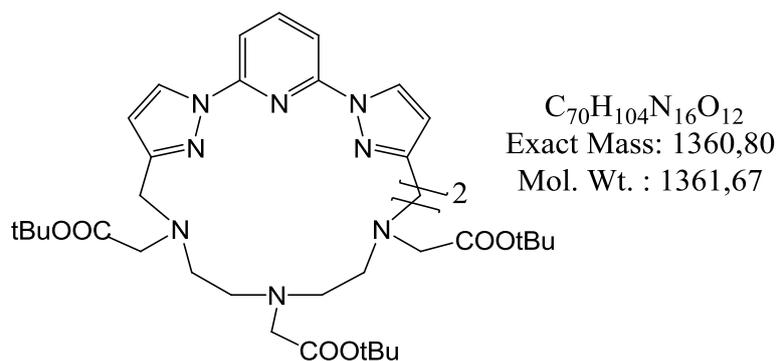
RMN ¹H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 1,39-1,43 (m, 54H, $\underline{CH_3}$ tBu); 2,58-3,05 (m, 16H, - $\underline{CH_2}N$ -) ; 3,17-3,59 (m, 12H, - $CH_2COOtBu$) ; 3,82-4,18 (m, 8H, - CH_2 pypzpy) ; 7,07 (bs, 2H) ; 7,40 (bs, 2H) ; 7,56-7,86 (m, 6H) ; 7,95 (bs, 4H) ; 8,60 (bs, 2H).

RMN ¹³C (75,4 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 28,18 (CH_3) ; 52,36 (CH_2) ; 55,94 (CH_2) ; 56,11 (CH_2) ; 59,67 (CH_2) ; 63,89 (CH_2) ; 64,19 (CH_2) ; 81,01 (Cq) ; 103,26 (CH) ; 106,55 (CH) ; 110,49 (CH) ; 118,75 (CH) ; 122,13 (CH) ; 128,23 (CH) ; 137,02 (CH) ; 139,08 (CH) ; 150,61 (Cq) ; 151,08 (Cq) ; 153,50 (Cq) ; 154,07 (Cq) ; 158,51 (Cq) ; 170,64 ($COOtBu$).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 1384,4 $[M+H]^+$ (100) ; 1406,4 $[M+Na]^+$ (42) ; 1328,3 $[M-tBu+H]^+$ (19).

IR (KBr) en cm^{-1} : 1734 (C=O ester) ; 1599, 1577 (C=C, C=N aromatique) ; 756 (C-H aromatique hors du plan).

Dimère 72d



Chapitre V

Triamine **69** (173 mg ; 0,38 mmol), Na₂CO₃ (412 mg ; 3,88 mmol) dans 180 mL d'acétonitrile anhydre puis ajout de 154 mg (0,38 mmol) de 2,6-bis(3-bromométhylpyrazol-1-yl)pyridine **65**. L'huile jaune obtenue est purifiée sur colonne d'alumine (CH₂Cl₂/méthanol : 1/0 → 1/1) pour conduire à 144 mg de macrocycle dimère **72d** sous forme d'une huile incolore.

Rdt : 55 %.

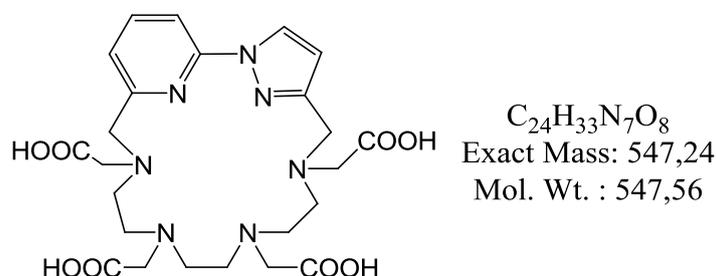
R_f : 0,20 (alumine ; CH₂Cl₂ / méthanol 95/5).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,39 (s, 9H, CH₃tBu); 1,44 (s, 45H, CH₃tBu); 2,60-2,90 (m, 16H, -CH₂N-); 3,10-3,31 (m, 12H, -CH₂COOtBu); 3,78-3,90 (m, 8H, -CH₂ pzpy); 6,31 (d, 2H, ³J= 2,4 Hz); 6,41 (d, 2H, ³J= 2,7 Hz); 7,59 (d, 2H, ³J= 7,5 Hz); 7,70 (m, 4H); 8,16 (d, 2H, ³J= 2,4 Hz); 8,39 (d, 2H, ³J= 2,4 Hz).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 28,03 (CH₃); 28,09 (CH₃); 51,06 (CH₂); 51,31 (CH₂); 51,40 (CH₂); 51,69 (CH₂); 52,20 (CH₂); 52,26 (CH₂); 55,53 (CH₂); 55,69 (CH₂); 56,09 (CH₂); 80,83 (Cq); 80,89 (Cq); 108,17 (CH); 108,23 (CH); 108,49 (CH); 108,81 (CH); 127,23 (CH); 127,50 (CH); 140,71 (CH); 140,97 (CH); 149,40 (Cq); 149,69 (Cq); 152,76 (Cq); 170,42 (COOtBu).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 1362,4 [M+H]⁺ (15); 681,7 [M+2H]²⁺ (100).

Ligand L₆ (**73**)



Le macrocycle **66** (52 mg ; 0,067 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* décrite **page 234** pour conduire à 35,5 mg du produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 97 %

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,07-3,28 (m, 4H, -CH₂N-); 3,36-3,43 (m, 6H, -CH₂N- et -CH₂COOH); 3,51-3,70 (m, 6H, -CH₂N- et -CH₂COOH); 3,90 (s, 2H, -CH₂COOH); 3,94 (s, 2H, -CH₂COOH); 4,51 (s, 2H, -CH₂pz); 4,67 (s, 2H, -CH₂py); 6,81 (d, 1H, pz, ³J= 2,4 Hz); 7,52 (d, 1H, py, ³J= 7,5 Hz); 7,79 (d, 1H, py, ³J= 8,1 Hz); 8,12 (t, 1H, py, ³J= 8,1 Hz); 8,46 (d, 1H, pz, ³J= 2,1 Hz).

RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 49,50 (CH₂); 49,85 (CH₂); 50,19 (CH₂); 50,32 (CH₂); 51,15 (CH₂); 51,38 (CH₂); 51,50 (CH₂); 53,38 (CH₂); 54,72 (CH₂); 56,11 (CH₂);

Chapitre V

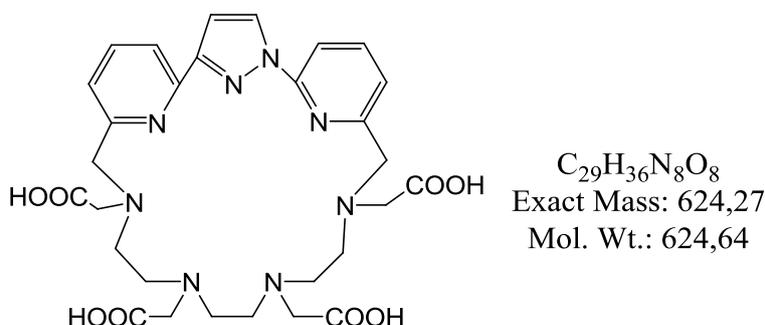
56,48 (CH₂) ; 58,49 (CH₂) ; 110,63 (CHpz) ; 114,40 (CHpy) ; 123,09 (CHpy) ; 131,554 (CHpz) ; 141,76 (CHpy) ; 146,02 (Cq) ; 149,80 (Cq) ; 149,89 (Cq) ; 170,28 (COOH) ; 170,64 (COOH) ; 171,45 (COOH) ; 172,42 (COOH).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 586,2 [M+K]⁺ (100) ; 608,2 [M-H+Na+K]⁺ (50) ; 570,2 [M+Na]⁺ (25).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₂₄H₃₃N₇O₈ + K⁺ = 586,2028 ; exp. = 586,1997 (50 %).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ; débit : 1 mL/min, λ = 315 nm): **Temps de rétention** = 8,12 min.

Ligand L₇ (74)



Le macrocyclole **67** (45 mg ; 0,053 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* décrite **page 234** pour conduire à 25 mg du produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 76 %

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,00-3,12 (m, 2H, -CH₂N-) ; 3,15-3,32 (m, 4H, -CH₂N-) ; 3,34 (s, 2H, -CH₂COOH) ; 3,49 (bs, 6H, -CH₂N-) ; 3,56 (s, 2H, -CH₂COOH) ; 3,84 (s, 2H, -CH₂COOH) ; 3,94 (s, 2H, -CH₂COOH) ; 4,59 (s, 2H, -CH₂ pypzpy) ; 4,69 (s, 2H, -CH₂ pypzpy) ; 7,15 (bs, 1H, pz) ; 7,53 (d, 1H, py, ³J=7,51 Hz) ; 7,64 (d, 1H, py, ³J=7,72 Hz) ; 7,76 (d, 1H, py, ³J=8,20 Hz) ; 8,02 (d, 1H, py, ³J=7,37 Hz) ; 8,09 (t, 1H, py, ³J=7,31 Hz) ; 8,19 (t, 1H, py, ³J=7,73 Hz) ; 8,45 (bs, 1H, pz).

RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 49,32 (CH₂) ; 49,78 (CH₂) ; 50,55 (CH₂) ; 51,04 (CH₂) ; 51,06 (CH₂) ; 51,16 (CH₂) ; 54,12 (CH₂) ; 54,54 (CH₂) ; 55,87 (CH₂) ; 56,14 (CH₂) ; 57,75 (CH₂) ; 58,41 (CH₂) ; 108,50 (CH) ; 114,79 (CH) ; 123,39 (CH) ; 123,65 (CH) ; 124,98 (CH) ; 131,95 (CH) ; 141,54 (CH) ; 142,10 (CH) ; 148,70 (Cq) ; 150,17 (Cq) ; 150,24 (Cq) ; 150,43 (Cq) ; 150,99 (Cq) ; 170,34 (COOH) ; 171,06 (COOH) ; 171,59 (COOH) ; 173,00 (COOH).

Chapitre V

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 647,3 $[M+Na]^+$ (100) ; 625,3 $[M+H]^+$ (65) ; 663,3 $[M+K]^+$ (50).

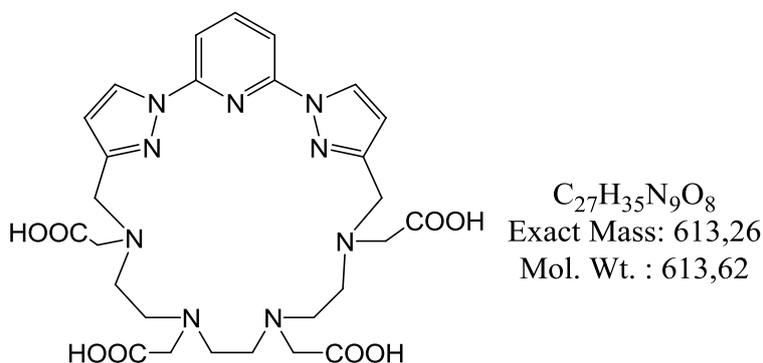
SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $C_{29}H_{36}N_8O_8 + K^+ = 663,2293$; exp. = 663,2274 (100 %).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0

HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ;

débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm): **Temps de rétention** = 11,07 min.

Ligand L₈ (75)



Le macrocyle **68** (49 mg ; 0,058 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* décrite **page 234** pour conduire à 30,5 mg de produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt : 86 %.

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,35 (bs, 4H, -CH₂N-) ; 3,40-3,60 (m, 8H, -CH₂N-) ; 3,71 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 4,02 (s, 4H, -CH₂COOH) ; 4,54 (s, 4H, -CH₂ pzpypz) ; 6,73 (d, 2H, ³J= 2,48 Hz) ; 7,58 (d, 2H, ³J= 8,10 Hz) ; 8,08 (t, 1H, ³J= 7,88 Hz) ; 8,37(d, 2H, ³J= 2,48 Hz).

RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 49,59 (CH₂) ; 51,03 (CH₂) ; 54,15 (CH₂) ; 55,24 (CH₂) ; 110,79 (CHpz) ; 112,24 (CHpy) ; 131,62 (CHpz) ; 143,11 (CHpy) ; 145,17 (Cq) ; 149,06 (Cq) ; 169,64 (COOH) ; 171,58 (COOH).

SM (ESI, mode positif) : m/z (%) = 326,6 $[M+H+K]^{2+}$ (100) ; 652,2 $[M+K]^+$ (90) ; 614,3 $[M+H]^+$ (35) ; 636,3 $[M+Na]^+$ (30).

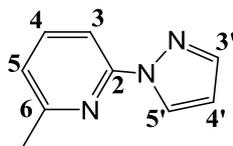
SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour $C_{27}H_{35}N_9O_8 + H^+ = 614,2687$; exp. = 614,2680 (100 %).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0

HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ;

débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm): **Temps de rétention** = 10,48 min.

6-méthyl-2-(pyrazol-1'-yl)-pyridine 76



$C_9H_9N_3$
Exact Mass: 159,08
Mol. Wt. : 159,19

1,30 g (5,82 mmol) de CuI, 1,92 g (13,94 mmol) de K_2CO_3 et 395 mg (5,81 mmol) de pyrazole sont mis en solution dans 20 mL de dioxanne dégazé. La 2-bromo-6-méthylpyridine (1,0 g ; 5,81 mmol) et la *trans*-1,2-cyclohexanediamine (795 mg ; 6,97 mmol) sont ensuite ajoutées. Après 5 jours à reflux (110 °C) puis retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée d'EDTA disodé, séché sur $MgSO_4$ et évaporé à sec. L'huile marron obtenue est purifiée sur colonne de silice (CH_2Cl_2) pour conduire à 717 mg de produit attendu sous la forme d'une huile jaune.

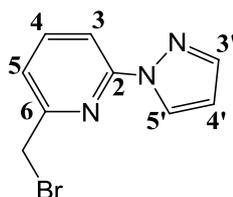
Rdt = 85%

Rf : 0,24 (silice, CH_2Cl_2).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 2,59 (s, 3H, CH_3 py) ; 6,47 (d, 1H, $^3J = 3$ Hz, $H_{4'}$) ; 7,04 (d, 1H, $^3J = 9$ Hz, H_3) ; 7,69-7,81 (m, 3H, $H_{4,5,3'}$) ; 8,64 (d, 1H, $^3J = 3$ Hz, $H_{5'}$).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 24,17 (CH_3) ; 107,50 (CH) ; 109,27 (CH) ; 120,83 (CH) ; 127,10 (CH) ; 138,93 (CH) ; 141,89 (CH) ; 150,90 (Cq) ; 157,34 (Cq).

6-bromométhyl-2-(pyrazol-1'-yl)-pyridine 77



$C_9H_8BrN_3$
Exact Mass: 236,99
Mol. Wt. : 238,08

A une solution de composé **76** (135 mg ; 0,84 mmol) dans 30 mL de CCl_4 , sont ajoutés la N-bromosuccinimide (150 mg ; 0,84 mmol) et le peroxyde de benzoyle (10 mg ; 0,04 mmol). Le milieu réactionnel est mis à reflux à l'aide d'une lampe halogène (150 W) jusqu'à décoloration du milieu. Après évaporation à sec, le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (CH_2Cl_2) pour donner 103,5 mg de produit attendu sous la forme d'une huile jaune.

Rdt = 51 %.

Rf : 0,36 (silice, CH_2Cl_2)

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 4,53 (s, 2H, CH_2 -Br) ; 6,46 (dd, 1H, $^3J = 2,4; 1,6$ Hz,

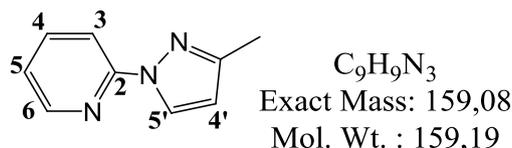
Chapitre V

); 7,30 (dd, 1H, $^3J = 7,5$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, H₃); 7,73 (m, 1H, H_{3'}); 7,80 (t, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, H₄); 7,90 (dd, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, H₅); 8,60 (dd, 1H, $^3J = 2,4$ Hz, $^4J = 0,6$ Hz, H_{5'}).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 33,28 (CH₂); 107,83 (CH); 111,69 (CH); 120,78 (CH); 127,25 (CH); 139,68 (CH); 142,22 (CH); 151,15 (Cq); 155,46 (Cq).

SM (DCI⁺, NH₃) : m/z (%) = 238 [M+H]⁺ (100); 255 [M+NH₄]⁺ (67)

2-(3'-méthylpyrazol-1'-yl)-pyridine **78**



A un mélange de CuI (3,6 g ; 18,98 mmol), de K₂CO₃ (6,28 g ; 45,54 mmol) et de 3-méthylpyrazole (1,57 g ; 18,98 mmol) dans du dioxanne dégazé (66 mL), sont ajoutés le 2-bromopyridine (3 g ; 18,98 mmol) et la *trans*-1,2-cyclohexanediamine (2,59 mg ; 22,68 mmol). La solution est portée à reflux pendant cinq jours. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée en EDTA disodé et séché sur MgSO₄. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et chromatographié sur colonne de silice (CH₂Cl₂ → Acétate d'éthyle 8/2) pour donner 2,6 g du produit attendu sous forme d'une huile jaune.

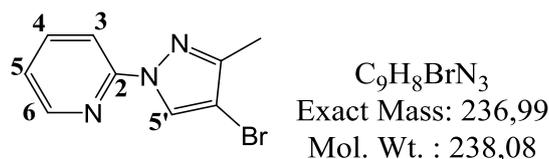
Rdt : 86%.

Rf : 0,45 (silice, éther de pétrole / Ether 8/2).

RMN 1H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 2,27 (s, 3H, CH₃); 6,13 (d, 1H, H_{4'}, $^3J = 3$ Hz); 6,97 (t, 1H, H₅, $^3J = 4,3$); 7,62 (t, 1H, H₄, $^3J = 8,6$); 7,80 (d, 1H, H₃, $^3J = 6,4$ Hz); 8,25 (d, 1H, H₆, $^3J = 4,3$); 8,35 (d, 1H, H_{5'}, $^3J = 3$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 13,88 (CH₃); 107,96 (CH); 112,08 (CH); 120,79 (CH); 127,66 (CH); 138,52 (CH); 147,99 (CH); 151,55 (Cq); 151,66 (Cq).

2-(3'-méthyl-4'-bromo-pyrazol-1'-yl) pyridine **79**



A une solution du composé **78** (400 mg ; 2,51 mmol) dans 80 mL de CCl₄, sont ajoutés la N-bromosuccinimide (447 mg ; 2,51 mmol) et le peroxyde de benzoyle (30 mg ; 0,12 mmol). Le milieu réactionnel est mis à reflux à l'aide d'une lampe halogène (150 W) jusqu'à

Chapitre V

décoloration du milieu. Après évaporation à sec, le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (éther de pétrole / acétate d'éthyle 98/02) pour donner 210 mg du composé **79** sous forme d'un solide blanc.

Rdt : 35%.

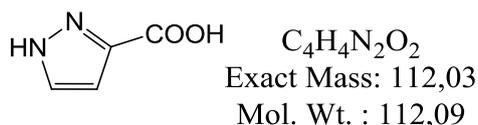
Rf : 0,33 (silice, éther de pétrole / acétate d'éthyle 98/02).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 2,33 (s, 3H, CH₃) ; 7,16 (t, 1H, H₅, ³J = 3 Hz) ; 7,78 (t, 1H, H₄, ³J = 6 Hz) ; 7,87 (d, 1H, H₃, ³J = 9 Hz) ; 8,37 (d, 1H, H₆, ³J = 3 Hz) ; 8,35 (s, 1H, H₅).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 12,26 (CH₃) ; 97,62 (Cq) ; 111,60 (CH) ; 121,31 (CH) ; 127,57 (CH) ; 138,72 (CH) ; 148,09 (CH) ; 150,34 (Cq) ; 150,89 (Cq).

SM (DCI⁺, NH₃) : m/z (%) = 238,2 (98) / 240,2 (100) [M+H]⁺ ; 255,2 (20) / 257,2 (18) [M+NH₄]⁺.

Acide 3-pyrazole carboxylique **80**

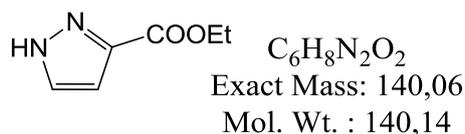


A une solution de 3-méthylpyrazole (5 g ; 60 mmol) dans 230 mL d'eau, est ajoutée lentement une solution aqueuse de KMnO₄ (21,17 g dans 420 mL d'eau ; 133 mmol). Le mélange réactionnel violet est porté à reflux 4 h. Après filtration et concentration du filtrat (jusqu'à 1/10 du volume), celui-ci est acidifié par une solution de HCl 37 % jusqu'à pH = 2. Après refroidissement une nuit à 4°C, un précipité blanc correspondant au produit attendu est filtré et séché à l'étuve (5,85 g).

Rdt : 87%.

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 6,89 (d, 1H, ³J = 2,4 Hz) ; 7,77 (d, 1H, ³J = 2,4 Hz).

Ethyl 3-pyrazole carboxylate **81**



Sous atmosphère inerte, un mélange de 5,5 g d'acide 3-pyrazole carboxylique **80** (49 mmol) en solution dans 110 mL d'éthanol absolu et 8 mL de H₂SO₄ concentré est chauffé à reflux durant 5 h puis évaporé à sec. Le résidu obtenu est solubilisé dans 200 mL d'eau et neutralisé par NaHCO₃ (s). La phase aqueuse est extraite avec 4 x 100 mL d'acétate d'éthyle, les phases

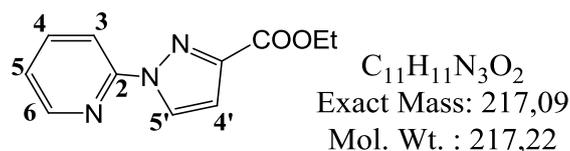
Chapitre V

organiques obtenues sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre, filtrées et évaporées à sec. Après une recristallisation dans l'éther de pétrole (20 mL), le composé **81** est isolé sous la forme de cristaux jaunes (1,6 g).

Rdt : 23%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,41 (t, 3H, CH₃, ³J= 7,1 Hz) ; 4,41 (q, 2H, CH₂, ³J= 7,1 Hz) ; 6,85 (d, 1H, ³J= 2,3 Hz) ; 7,81 (d, 1H, ³J= 2,3 Hz).

Ethyl 1-(pyridin-2-yl)-pyrazole-3-carboxylate **82**



A un mélange de 0,683 g (3,59 mmol) de CuI, 1,18 g (8,61mmol) de K₂CO₃ et 0,6 g (4,28 mmol) d'éthyl 3-pyrazole carboxylate **81** en solution dans 15 mL de dioxanne dégazé, sont ajoutés 0,566 g (3,59 mmol) de 2-bromopyridine et 0,408 g (3,59 mmol) de *trans*-1,2-cyclohexanediamine. Après deux jours à reflux, le mélange jaune est dilué avec 60 mL d'acétate d'éthyle puis lavé avec 20 mL d'une solution aqueuse saturée en EDTA disodé. La phase aqueuse est séparée puis extraite avec 3 x 50 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. L'huile marron obtenue est purifiée sur colonne de silice (CH₂Cl₂) pour conduire à 0,44 g de produit sous la forme d'une huile jaune.

Rdt : 56%.

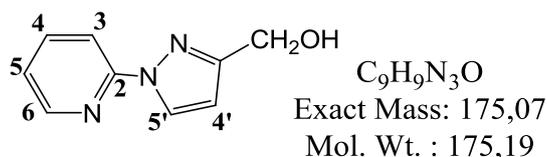
Rf : 0,48 (silice, CH₂Cl₂).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,43 (t, 3H, CH₃ ester, ³J= 7,1 Hz) ; 4,44 (q, 2H, CH₂ ester, ³J= 7,1 Hz) ; 6,96 (d, 1H, H_{4'}, ³J= 2,7 Hz) ; 7,25 (td, 1H, H₅, ³J= 7,5 Hz, ⁴J= 0,9 Hz) ; 7,84 (td, 1H, H₄, ³J= 7,5 Hz, ⁴J= 1,8 Hz) ; 8,13 (d, 1H, H₃, ³J= 8,2 Hz) ; 8,44 (dd, 1H, H₆, ³J= 4,8 Hz, ⁴J= 0,9 Hz) ; 8,60 (d, 1H, H_{5'}, ³J= 2,7 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 14,34 (CH₃ Et) ; 61,23 (CH₂ Et) ; 110,11 (CH) ; 113,21 (CH) ; 122,50 (CH) ; 128,34 (CH) ; 138,85 (CH) ; 145,91 (Cq) ; 148,06 (CH) ; 150,95 (Cq) ; 162,20 (-COOEt).

SM (DCI⁺, NH₃) : m/z (%) = 235 [M+NH₄]⁺ (100) ; 218 [M+H]⁺ (12).

2-(3'-hydroxyméthylpyrazol-1'-yl) pyridine 83



Une solution de LiAlH₄ (0,39 g ; 10,3 mmol) dans 40 mL de THF anhydre est ajoutée à une solution d'ester **82** (1,12 g ; 5,15 mmol) dans 370 mL de THF anhydre. Le mélange est agité 3 h à température ambiante puis traité successivement par de l'eau (0,38 mL), une solution aqueuse de NaOH à 15% (0,38 mL) et de l'eau (1,14 mL). Le milieu réactionnel est filtré et évaporé à sec. Le solide jaunâtre obtenu est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂/méthanol 100/0 → 98/2) pour conduire à 0,57 g de produit sous forme de cristaux blancs.

Rdt: 63%

Pf: 62-63 °C

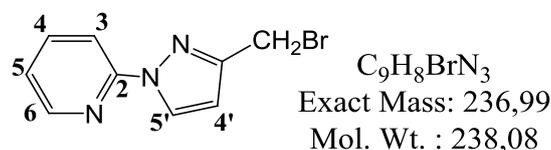
Rf: 0,34 (silice, CH₂Cl₂/méthanol 98/02).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 3,05 (t, 1H, OH, ³J= 4,9 Hz); 4,78 (d, 2H, CH₂OH, ³J= 4,6 Hz); 6,45 (d, 1H, H₄, ³J= 2,6 Hz); 7,16 (ddd, 1H, H₅, ⁴J=0,94 Hz, ³J= 7,4 Hz, ³J= 7,5 Hz); 7,78 (td, 1H, H₄, ³J=8,1 Hz, ⁴J= 1,9 Hz); 7,90 (dt, 1H, H₃, ³J= 8,1 Hz, ⁴J= 0,9 Hz); 8,38 (dd, 1H, H₆, ³J= 4,90 Hz, ³J= 0,9 Hz); 8,49 (d, 1H, H₅, ³J= 2,6 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 59,01 (CH₂OH) ; 106,40 (CH 4') ; 112,29 (CH 3) ; 121,32 (CH 5) ; 128,14 (CH 5') ; 138,70 (CH 4) ; 148,00 (CH 6) ; 151,28 (Cq 2) ; 155,01 (Cq 3').

SM (ES, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 158 [M+H-H₂O]⁺ (100) ; 198 [M+Na]⁺ (93).

2-(3'-bromométhylpyrazol-1'-yl) pyridine 84



A une solution de **83** (0,5 g ; 2,85 mmol) dans 120 mL de CH₃CN anhydre est ajouté le PBr₃ (0,37 mL ; 4 mmol). La solution jaune claire est chauffée 3 h à reflux puis agitée une nuit à température ambiante; après évaporation à sec, le résidu solide obtenu est neutralisé par une solution aqueuse saturée en Na₂CO₃, extrait par 6 x 100 mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées à sec. On obtient 0,68 g de produit attendu sous la forme d'une poudre jaunâtre.

Rdt : quantitatif

Chapitre V

Pf : 79-81 °C

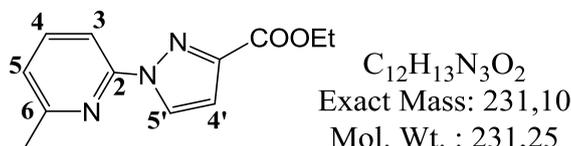
Rf : 0,39 (silice, CH₂Cl₂/éther de pétrole 50/50).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 4,56 (s, 2H, CH₂ Br) ; 6,51 (d, 1H, H₄, ³J= 2,6 Hz) ; 7,18 (ddd, 1H, H₅, ⁴J= 0,75 Hz, ³J= 7,2 Hz, ³J= 7,36 Hz) ; 7,80 (td, 1H, H₄, ³J= 8,5 Hz, ⁴J= 1,9 Hz) ; 7,93 (d, 1H, H₃, ³J= 8,4 Hz) ; 8,40 (dd, 1H, H₆, ³J= 5,1 Hz, ⁴J= 0,9 Hz) ; 8,50 (d, 1H, H₅, ³J= 2,6 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 24,98 (CH₂ Br) ; 107,89 (CH 4') ; 112,49 (CH 3) ; 121,60 (CH 5) ; 128,39 (CH 5') ; 138,70 (CH 4) ; 148,05 (CH 6) ; 151,15 (Cq 2) ; 151,55 (Cq 3').

SM (ES, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 262 (100) / 260 (97) [M+Na]⁺.

6-méthyl-2-(3'-éthoxycarbonyl pyrazol-1'-yl)-pyridine **85**



A un mélange de CuI (1,12 g ; 5,95 mmol), de K₂CO₃ (1,97 g ; 14,28 mmol) et d'éthyl-3-pyrazole carboxylate **81** (1 g ; 7,14 mmol) dans du dioxanne (20 mL), sont ajoutées la 2-bromo-6-méthyl pyridine (1,02 g ; 5,95 mmol) et la *trans*-1,2-cyclohexanediamine (0,68 g ; 5,95 mmol). La solution est portée à reflux pendant deux jours. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution aqueuse saturée en EDTA disodé et séché sur MgSO₄. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et chromatographié sur colonne de silice (CH₂Cl₂) pour donner 739 mg du produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt = 54%

Rf : 0,5 (silice, éther de pétrole / AcOEt 98/02)

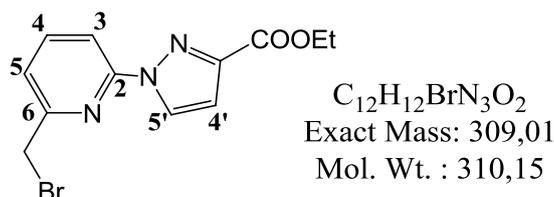
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,37 (t, 3H, ³J= 6 Hz, CH₂-CH₃) ; 2,51 (s, 3H, CH₃ py) ; 4,39 (q, 2H, ³J= 6 Hz, CH₂-CH₃) ; 6,90 (d, 1H, ³J= 3 Hz, H₄') ; 7,04 (d, 1H, ³J= 9 Hz, H₃) ; 7,66 (t, 1H, ³J= 9 Hz, H₄) ; 7,86 (d, 1H, ³J= 9 Hz, H₅) ; 8,57 (d, 1H, ³J= 3 Hz, H₅').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 14,35 (CH₃ Et) ; 24,16 (CH₃ py) ; 61,19 (CH₂) ; 109,85 (CH) ; 110,00 (CH) ; 121,94 (CH) ; 128,31 (CH) ; 138,94 (CH) ; 145,72 (Cq) ; 150,34 (Cq) ; 157,53 (Cq) ; 162,30 (CO).

SM (ES) : m/z (%) = 270 [M+K]⁺ (49) ; 254 [M+Na]⁺ (100) ; 232 [M+H]⁺ (36).

IR : ν (cm⁻¹) = 1738 (C=O ester).

6-bromométhyl-2(3'-éthoxycarbonyl pyrazol-1'-yl)-pyridine 86



A une solution de composé **85** (100 mg ; 0,43 mmol) dans 15 mL de CCl_4 , sont ajoutés la N-bromosuccinimide (77 mg ; 0,433 mg) et le peroxyde de benzoyle (5 mg ; 0,02 mmol). Le milieu est porté à reflux à l'aide d'une lampe halogène (150 W) jusqu'à décoloration (\approx 3h). Après évaporation à sec, le résidu obtenu est purifié sur gel de silice (éther de pétrole / AcOEt 8/2) pour donner 55 mg de composé **86** sous forme d'une huile jaune.

Rdt = 41%

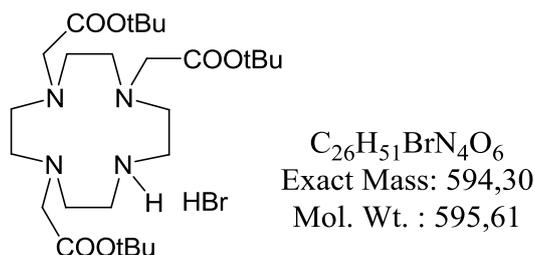
Rf : 0,28 (silice, éther de pétrole / AcOEt 8/2).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 1,47 (t, 3H, $^3J=6$ Hz, CH_2-CH_3) ; 4,48 (q, 2H, $^3J=6$ Hz, CH_2-CH_3) ; 4,58 (s, 2H, CH_2-Br) ; 7,01 (d, 1H, $^3J=3$ Hz, H_4') ; 7,42 (d, 1H, $^3J=6$ Hz, H_3) ; 7,88 (t, 1H, $^3J=6$ Hz, H_4) ; 8,10 (d, 1H, $^3J=6$ Hz, H_5) ; 8,67 (d, 1H, $^3J=3$ Hz, H_5').

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 14,37 (CH_3) ; 32,96 (CH_2) ; 61,30 (CH_2) ; 110,15 (CH) ; 112,48 (CH) ; 121,99 (CH) ; 128,59 (CH) ; 139,93 (CH) ; 146,10 (Cq) ; 150,49 (Cq) ; 155,63 (Cq) ; 162,14 (CO).

SM (DCI^+ , NH_3): m/z (%) = 310 $[M+H]^+$ (5) ; 327 $[M+NH_3+H]^+$ (100).

Tris-1,4,7-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane 87



A un mélange refroidi à $0^\circ C$ de 2,5 g (14,51 mmol) de 1,4,7,10-tétraazacyclododécane et 4,02 g (47,89 mmol) de $NaHCO_3$ dans 85 mL de CH_3CN anhydre, sont ajoutés goutte à goutte 9,34 g (47,89 mmol) de bromoacétate de *tertiobutyle* (durée de l'addition : 40 min. environ). Après 2 jours d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est filtré puis évaporé à sec ; le résidu jaunâtre obtenu est recristallisé dans le toluène pour conduire à 4 g de composé **87** sous la forme d'un solide blanc.

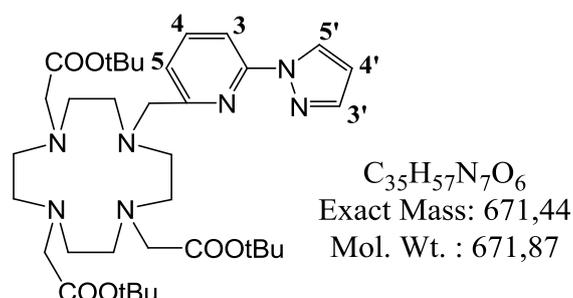
Rdt : 46%

Rf : 0,39 (silice, $CH_2Cl_2/MeOH$ 95/05).

Chapitre V

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,44 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,45 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,88 (bs, 4H, -CH₂-N) ; 2,91 (bs, 8H, -CH₂-N) ; 3,23 (bs, 4H, -CH₂-N) ; 3,28 (s, 2H, -CH₂-COOtBu) ; 3,37 (s, 4H, -CH₂-COOtBu); 10,02 (bs, 1H, NH).

Tris-1,4,7-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-10-[6-méthyl-(2(pyrazol-1'-yl)-pyridine)]-1,4,7,10-tétrazacyclododécane **88**



A un mélange de composé **87** (98,9 mg ; 0,166 mmol) et de K₂CO₃ (114,5 mg ; 0,830 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (10 mL), est ajouté le composé **77** (39,6 mg ; 0,166 mmol). La solution est portée à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le milieu est évaporé à sec puis repris dans le CH₂Cl₂. Les sels de potassium sont filtrés puis le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est purifié sur colonne de silice (CH₂Cl₂/MeOH 97/3) pour donner 53 mg de produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt = 47%

Rf : 0,26 (silice, CH₂Cl₂/MeOH 97/3).

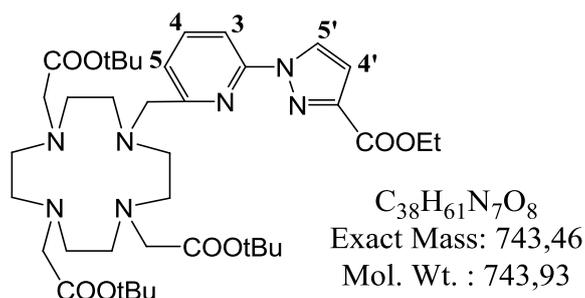
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 1,41 (s, 9H, CH₃ tBu) ; 1,43 (s, 18H, CH₃ tBu) ; 2,06-3,10 (m, 24H, CH₂ cyclène, CH₂COOtBu, CH₂ py) ; 6,24 (dd, 1H, ³J= 2,4 Hz, ³J= 1,6 Hz, H₄) ; 7,18 (d, 1H, ³J= 7,6 Hz, H₃) ; 7,56 (d, 1H, ³J= 1,6 Hz, H₃) ; 7,80 (t, 1H, ³J= 7,6 Hz, H₄) ; 7,89 (d, 1H, ³J= 7,6 Hz, H₅) ; 9,13 (d, 1H, ³J= 2,4 Hz, H₅).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) = 27,74 (CH₃) ; 27,85 (CH₃) ; 28,05 (CH₃) ; 55,62 (CH₂) ; 55,88 (CH₂) ; 56,27 (CH₂) ; 60,18 (CH₂) ; 81,93 (Cq tBu) ; 82,13 (Cq tBu) ; 82,34 (Cq tBu) ; 107,95 (CH) ; 111,34 (CH) ; 123,18 (CH) ; 128,36 (CH) ; 139,54 (CH) ; 141,77 (CH) ; 152,26 (Cq) ; 156,54 (Cq) ; 172,41 (COOtBu) ; 172,56 (COOtBu) ; 172,86 (COOtBu).

SM (ESI) : m/z (%) = 672,7 [M+H]⁺ (43) ; 694,7 [M+Na]⁺ (100).

Tris-1,4,7-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-10-[6-méthyl-(2(3'-éthoxycarbonylpyrazol-1'-yl)-pyridine)]-1,4,7,10-tétrazacyclododécane **89**

Chapitre V



A un mélange de composé **87** (101 mg ; 0,169 mmol) et de K_2CO_3 (116,57 mg ; 0,845 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (10 mL), est ajouté le composé **86** (52,2 mg ; 0,169 mmol). La solution est portée à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, le milieu est évaporé à sec puis repris dans le CH_2Cl_2 . Les sels de potassium sont filtrés puis le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est purifié sur colonne d'alumine ($CH_2Cl_2/MeOH$ 1/0 \rightarrow 96/4) pour donner 118 mg du produit attendu sous forme d'une huile jaune.

Rdt = 94%

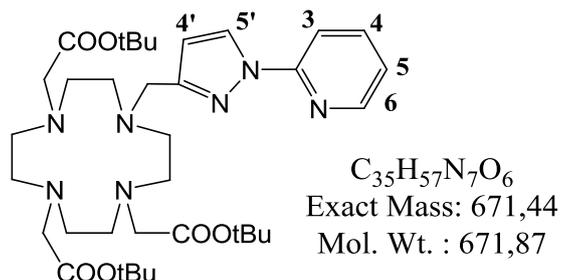
Rf : 0,26 (silice, $CH_2Cl_2/MeOH$ 96/4).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 1,36-1,45 (m, 30H, CH_2 - CH_3 , CH_3 tBu) ; 2,14-2,94 (m, 24H, CH_2 cyclène, $CH_2COOtBu$, CH_2 py) ; 4,40 (quadr., 2H, $^3J = 6$ Hz, CH_2 - CH_3) ; 6,76 (d, 1H, $^3J = 3$ Hz, $H_{4'}$) ; 7,29 (d, 1H, $^3J = 9$ Hz, H_3) ; 7,86 (t, 1H, $^3J = 9$ Hz, H_4) ; 8,06 (d, 1H, $^3J = 9$ Hz, H_5) ; 9,12 (d, 1H, $^3J = 3$ Hz, $H_{5'}$).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 14,35 (CH_3) ; 27,73 (CH_3) ; 27,87 (CH_3) ; 28,05 (CH_3) ; 29,65 (CH_2) ; 49,20 (CH_2) ; 50,18 (CH_2) ; 51,30 (CH_2) ; 52,33 (CH_2) ; 55,65 (CH_2) ; 55,94 (CH_2) ; 56,57 (CH_2) ; 60,18 (CH_2) ; 61,17 (CH_2) ; 81,92 (Cq tBu) ; 82,13 (Cq tBu) ; 82,39 (Cq tBu) ; 110,20 (CH) ; 112,28 (CH) ; 124,42 (CH) ; 129,73 (CH) ; 139,77 (CH) ; 145,74 (Cq) ; 151,70 (Cq) ; 156,97 (Cq) ; 162,06 (COOEt) ; 170,56 (COOtBu) ; 172,56 (COOtBu) ; 172,82 (COOtBu).

SM (ESI) : m/z (%) = 744,8 $[M+H]^+$ (13) ; 766,7 $[M+Na]^+$ (100).

Tris-1,4,7-(*tert*-butoxycarbonylméthyl)-10-[3'-méthyl-(2(pyrazol-1'-yl)-pyridine)]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane **90**



Chapitre V

A une suspension de **87** (0,75 ; 1,26 mmol) et de K_2CO_3 (0,87g ; 6,3 mmol) dans l'acétonitrile anhydre (80 mL), est ajouté le composé **84** (0,3 g ; 1,26 mmol). Le mélange réactionnel est laissé une nuit à reflux. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré et évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans le CH_2Cl_2 , les restes de sels de potassium sont filtrés et le filtrat est évaporé à sec. La mousse jaune obtenue est purifiée sur colonne d'alumine (CH_2Cl_2 /méthanol 100/0 \rightarrow 90/10) pour conduire à 0,60 g de produit sous forme d'une huile jaune.

Rdt : 71%.

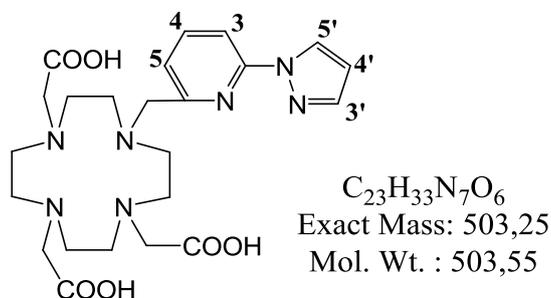
Rf : 0,38 (alumine, CH_2Cl_2 / méthanol 95/05).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 1,28 (s, 18H, CH_3 tBu) ; 1,48 (s, 9H, CH_3 tBu) ; 1,83 (m, 4H, $-CH_2-N$) ; 2,01-2,80 (m, 12H, $-CH_2-N$) ; 2,81-2,94 (m, 4H, $-CH_2-COOtBu$) ; 2,98 (s, 2H, $-CH_2-COOtBu$) ; 3,57 (bs, 2H, $-CH_2$ pzpy) ; 6,46 (d, 1H, H_4 , $^3J= 2,45$ Hz) ; 7,12 (ddd, 1H, H_5 , $^3J= 7,55$ Hz, $^3J= 7,36$ Hz, $^4J= 0,75$ Hz) ; 7,65 (td, 1H, H_4 , $^3J= 7,36$ Hz, $^4J= 1,88$ Hz) ; 8,06 (d, 1H, H_3 , $^3J= 8,30$ Hz) ; 8,34 (dd, 1H, H_6 , $^3J= 4,91$ Hz, $^4J= 0,75$ Hz) ; 8,45 (d, 1H, H_5 , $^3J= 2,45$ Hz).

RMN ^{13}C (75,4 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 27,99 (CH_3 tBu) ; 28,09 (CH_3 tBu) ; 50,23 (CH_2) ; 51,61 (CH_2) ; 55,78 (CH_2) ; 56,28 (CH_2) ; 81,98 (Cq tBu) ; 82,15 (Cq tBu) ; 108,57 (CH) ; 113,05 (CH) ; 121,52 (CH) ; 128,21 (CH) ; 138,49 (CH) ; 147,94 (CH) ; 151,30 (Cq py) ; 152,66 (Cq pz) ; 172,58 ($\underline{C}OOtBu$) ; 172,66 ($\underline{C}OOtBu$).

SM (ES, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 694,8 $[M+Na]^+$ (100) ; 638,8 $[M-tBu+Na]^+$ (31) ; 582,7 $[M-2tBu+Na]^+$ (22) ; 526,6 $[M-3tBu+Na]^+$ (18) ; 672,9 $[M+H]^+$ (67) ; 616,8 $[M-tBu+H]^+$ (22) ; 560,7 $[M-2tBu+H]^+$ (9) ; 504,7 $[M-3tBu+H]^+$ (9).

Tris-1,4,7-(carboxyméthyl)-10-[6-méthyl-(2(pyrazol-1'-yl)-pyridine)]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane **L₉ (91)**



Le composé **88** (53 mg ; 0,079 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* décrite **page 234** pour conduire à 39 mg de produit attendu.

Rdt = 99%

Chapitre V

RMN ¹H (400 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 3,24-3,68 (m, 22H, CH₂ cyclène, CH₂COOH) ; 4,24 (s, 2H, CH₂-py) ; 6,63 (d, 1H, ³J = 3 Hz, H_{4'}) ; 7,63 (d, 1H, ³J = 9 Hz, H₃) ; 7,75 (d, 1H, ³J = 9 Hz, H₅) ; 7,87 (d, 1H, ³J = 3 Hz, H_{3'}) ; 7,98 (t, 1H, ³J = 9 Hz, H₄) ; 8,52 (d, 1H, ³J = 3 Hz, H_{5'}).

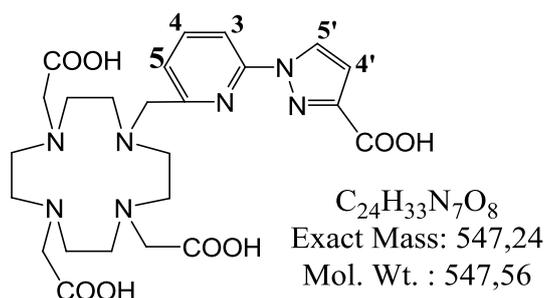
RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 48,57 (CH₂) ; 50,40 (CH₂) ; 53,03 (CH₂) ; 54,69 (CH₂) ; 57,93 (CH₂) ; 108,84 (CH) ; 113,32 (CH) ; 114,34 (Cq) ; 118,20 (Cq) ; 123,55 (CH) ; 129,40 (CH) ; 141,58 (CH) ; 143,13 (CH) ; 150,63 (Cq) ; 162,57 (CO) ; 163,04 (CO).

SM (ESI) : m/z (%) = 504,3 [M+H]⁺ (90) ; 526 [M+Na]⁺ (100) ; 542,3 [M+K]⁺ (43).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₂₃H₃₃N₇O₆ + H⁺ = 504,2571 ; exp. = 504,2574 (100).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 μm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ; débit : 1 mL/min, λ = 315 nm) : **Temps de rétention** = 9,70 min.

Tris-1,4,7-(carboxyméthyl)-10-[6-méthyl-(2(3'-carboxypyrazol-1'-yl)-pyridine)]-1,4,7,10-tétrazacyclododécane L₁₀ (**92**)



A une solution de composé **89** (114 mg ; 0,153 mmol) dans le méthanol (1,5 mL) est ajoutée une solution de soude (24 mg ; 0,613 mmol) dans un mélange eau/méthanol 1/1 (2 mL). La solution est portée à reflux pendant une nuit. Après retour à température ambiante, les sels sont éliminés par centrifugation et le surnageant est évaporé à sec pour donner 81 mg du produit attendu.

Rdt = 96%

RMN ¹H (300 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 2,01-2,76 (m, 18H, CH₂ cyclène, CH₂-COOH) ; 2,94 (s, 4H, CH₂-COOH) ; 3,68 (s, 2H, CH₂-py) ; 6,79 (d, 1H, ³J = 3 Hz, H_{4'}) ; 7,34 (d, 1H, ³J = 6 Hz, H₃) ; 7,75 (d, 1H, ³J = 6 Hz, H₅) ; 7,87 (t, 1H, ³J = 6 Hz, H₄) ; 8,42 (d, 1H, ³J = 3 Hz, H_{5'}).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O) : δ (ppm) = 52,00 (CH₂) ; 52,81 (CH₂) ; 53,34 (CH₂) ; 61,01 (CH₂) ; 61,13 (CH₂) ; 61,25 (CH₂) ; 61,47 (CH₂) ; 114,81 (CH) ; 126,00 (CH) ; 131,24 (CH) ; 132,08 (CH) ; 142,99 (CH) ; 152,72 (Cq) ; 153,85 (Cq) ; 159,67 (Cq) ; 171,88 (CO) ; 182,47 (CO) ; 182,53 (CO) ; 182,86 (CO).

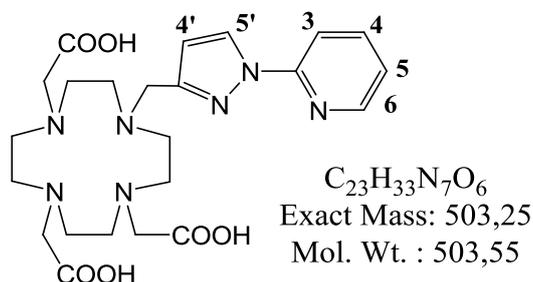
Chapitre V

SM (ESI) : m/z (%) = 546,3 [M-H]⁻ (86) ; 568,3 [M-2H+Na]⁻ (100).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₂₄H₃₃N₇O₈ + H⁺ = 548,2469; exp. = 548,2478 (100).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 µm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ; débit : 1 mL/min, λ = 315 nm): **Temps de rétention** = 6,42 min.

Tris-1,4,7-(carboxyméthyl)-10-[3'-méthyl-(2(pyrazol-1'-yl)-pyridine)]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane L₁₁ (93)



Le composé **90** (50 mg ; 0,074 mmol) est hydrolysé selon la *procédure 2* décrite **page 234** pour conduire après précipitation dans le méthanol à 37 mg de produit attendu sous forme d'un solide blanc verdâtre.

Rdt : 99%

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 2,95-3,27 (m, 8H, -CH₂-N) ; 3,35-3,58 (m, 8H, -CH₂-N) ; 3,59-3,88 (m, 4H, -CH₂-COOH) ; 4,00-4,29 (m, 2H, -CH₂-COOH) ; 4,56 (bs, 2H, -CH₂ pzpy) ; 6,88 (d, 1H, H₄, ³J = 2,16 Hz) ; 7,29-7,39 (m, 1H) ; 7,90-8,07 (m, 2H) ; 8,45 (d, 1H, ³J = 4,6 Hz) ; 8,64 (d, 1H, H₅, ³J = 2,16 Hz).

RMN ¹³C (75 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 48,93 (CH₂) ; 49,72 (CH₂) ; 50,95 (CH₂) ; 52,48 (CH₂) ; 54,27 (CH₂) ; 109,68 (CH) ; 112,46 (CH) ; 122,22 (CH) ; 128,78 (CH) ; 139,16 (CH) ; 149,42 (CH) ; 150,78 (Cq) ; 151,01 (Cq). Les signaux correspondants aux COOH ne sont pas observés.

SM (ESI, MeOH, mode positif) : m/z (%) = 542,2 [M+K]⁺ (100) ; 271,9 [M+K+H]²⁺ (42) ; 290,8 [M+2K]²⁺ (40).

SM (ESI, MeOH, mode négatif) : m/z (%) = 540,3 [M-2H+K]⁻ (30).

SM (ESI, mode positif ; haute résolution) : calculé pour C₂₃H₃₃N₇O₆ + K⁺ = 542,2129; exp. = 542,1697 (100).

HPLC (Colonne : Luna Phenomenex C8(2) 5 µm 100Å 150×4,6 mm ; gradient: 100/0 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN à 80/20 HCOONH₄ 10 mM pH 4 / CH₃CN en 18 min ;

débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm): **Temps de rétention** = 9,35 min.

III Partie Photophysique

Les complexes d'ions lanthanides Eu^{3+} et Tb^{3+} ont été préparés *in situ* en ajoutant un léger excès de chlorure de lanthanide ($\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à une solution mère de ligand. Après 24 h d'agitation à température ambiante, les solutions obtenues ont été diluées dans le tampon TRIS 50 mM, pH 7,4 pour avoir une concentration finale de l'ordre de 10^{-5} M et 10^{-6} M.

- Les spectres UV ont été réalisés sur un spectrophotomètre Hewlett Packard 8453 UV-Vis.
- Les spectres d'excitation et d'émission de luminescence ont été réalisés sur un spectrofluorimètre Varian Cary Eclipse équipé d'une lampe Xénon (60-75 kW, durée de flash de 2 à 3 μs) et d'un photomultiplicateur Hamamatsu R928.
- Les spectres d'émission de phosphorescence à basse température des complexes de gadolinium et les durées de vie à basse température des complexes d'euporium et de terbium ont été réalisés sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS50B adapté d'un accessoire pour la basse température n° L225 0136. La cellule de mesure a été refroidie à 77K dans un bain d'azote liquide sous un balayage continu d'azote gazeux et la mesure a été effectuée dans un tube capillaire préalablement refroidi dans l'azote liquide.
- Détermination des rendements quantiques

La détermination des rendements quantiques de luminescence a été réalisée selon la méthode décrite par Haas et Stein ⁽⁵⁾ en utilisant comme référence le dichlorure de ruthénium tris-bipyridine dans l'eau pour les complexes d'euporium et le sulfate de quinine dans l'acide sulfurique 0,5N pour les complexes de terbium.

$$\Phi_{\text{éch}} = \Phi_{\text{réf}} \cdot (\text{DO}_{\text{réf}} \cdot S_x \cdot n_{\text{éch}}^2) / (\text{DO}_{\text{éch}} \cdot S_{\text{réf}} \cdot n_{\text{réf}}^2)$$

Avec :

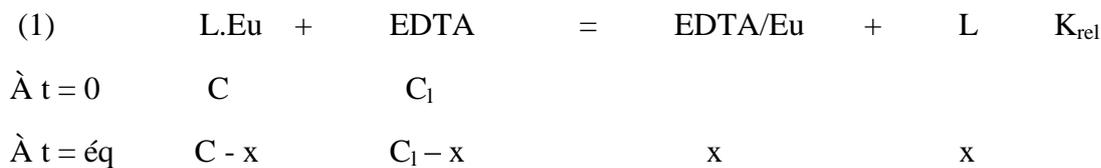
$\Phi_{\text{réf}}$, rendement quantique de la référence ($\Phi_{436\text{nm}} = 0,028$ pour le dichlorure de ruthénium tris-bipyridine ⁽⁶⁾ et $\Phi_{365\text{nm}} = 0,546$ pour le sulfate de quinine ⁽⁷⁾) ; DO, valeur de l'absorbance à la concentration de mesure et à la longueur d'onde d'excitation utilisée ; S,

Chapitre V

surface du spectre d'émission après correction ; n, indice de réfraction du milieu ; Ech. : échantillon ; Ref. : référence.

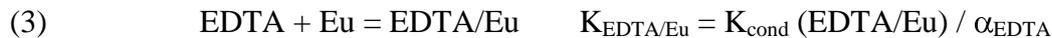
- Détermination des constantes de stabilité conditionnelle à pH physiologique

Les expériences de compétition ont consisté à suivre l'évolution de l'intensité de luminescence d'un complexe **L.Eu** en présence d'un compétiteur EDTA et en fonction du temps. Une diminution de l'intensité de luminescence suivie d'une stabilisation en fonction du temps peut traduire la décomplexation partielle du complexe **L.Eu** et indiquer que l'équilibre (1) suivant s'est établi dans les conditions de pH de l'expérience.



avec $K_{\text{rel}} = x^2 / (C - x)(C_1 - x) = K_{\text{cond}}(\text{EDTA/Eu}) / K_{\text{cond}}(\text{L.Eu})$

Si on pose :



La mesure du rapport (I) des intensités de luminescence à $t = 0$ et à l'équilibre $t = \text{éq}$ correspond à :

$$I = I_t / I_0 = (C - x) / C$$

On obtient alors:

$$K_{\text{cond}}(\text{L.Eu}) = K_{\text{cond}}(\text{EDTA/Eu}) \times (I^2 + I(C_1/C - 1)) / (I^2 - 2I + 1)$$

On peut donc en déduire $K_{\text{cond}}(\text{L.Eu})$ connaissant la constante de complexation conditionnelle du complexe EDTA/Eu à pH 7,3 soit $K_{\text{cond}}(\text{EDTA/Eu})$.

D'après la littérature :

$$K_{\text{EDTA/Eu}} = 10^{17,32}$$

$$\text{D'où } K_{\text{cond}}(\text{EDTA/Eu}) = K_{\text{EDTA/Eu}} \times \alpha_{\text{EDTA}}$$

$$\text{Avec } \alpha_{\text{EDTA}} = (1 + K_1^{\text{H}}[\text{H}^+] + K_1^{\text{H}} K_2^{\text{H}} [\text{H}^+]^2 + K_1^{\text{H}} K_2^{\text{H}} K_3^{\text{H}} [\text{H}^+]^3 + K_1^{\text{H}} K_2^{\text{H}} K_3^{\text{H}} K_4^{\text{H}} [\text{H}^+]^4 + \\
 K_1^{\text{H}} K_2^{\text{H}} K_3^{\text{H}} K_4^{\text{H}} K_5^{\text{H}} [\text{H}^+]^5 + K_1^{\text{H}} K_2^{\text{H}} K_3^{\text{H}} K_4^{\text{H}} K_5^{\text{H}} K_6^{\text{H}} [\text{H}^+]^6)^{-1}$$

Les K_i^{H} correspondent aux constantes de protonation successives de l'EDTA ($\log K_1^{\text{H}} = 10,17$; $\log K_2^{\text{H}} = 6,11$; $\log K_3^{\text{H}} = 2,68$; $\log K_4^{\text{H}} = 2$; $\log K_5^{\text{H}} = 1,5$; $\log K_6^{\text{H}} = 0$).

Chapitre V

A pH = 7,3 : il en résulte que $\alpha_{\text{EDTA}} = 1,265 \cdot 10^{-3}$ et $K_{\text{cond}}(\text{EDTA/Eu}) = K_{\text{EDTA/Eu}} \times \alpha_{\text{EDTA}} = 2,644 \cdot 10^{14}$ soit $\log K_{\text{cond}}(\text{EDTA/Eu}) = 14,42$.

Caractéristiques des complexes :

L₁Eu : SM (ESI, H₂O) : m/z (%) = 630,1 (100) [L₁Eu - H]⁻. HPLC (colonne C18, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 260$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,77 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : $\lambda_{\text{max}} (\epsilon, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 266 (4900)$ nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 268$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (4), 593 (34), 615 (100), 652 (7), 694 (85) nm.

L₁Tb : SM (ESI, H₂O) : m/z (%) = 636,1 (100) [L₁Tb - H]⁻. HPLC (colonne C18, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 260$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,73 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : $\lambda_{\text{max}} (\epsilon, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 266 (4900)$ nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 268$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 488 (41), 544 (100), 584 (32), 620 (26) nm.

L₂Eu : SM (ESI, H₂O) : m/z (%) = 707,1 (100) [L₂Eu - H]⁻. HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 310$ nm) : temps de rétention (t_r) = 7,05 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : $\lambda_{\text{max}} (\epsilon, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 243 (7820)$; 305 (8950) ; 318^{ép} (3450) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (2), 593 (31), 616 (100), 652 (5), 694 (72) nm.

L₂Tb : SM (ESI, H₂O) : m/z (%) = 713,1 (100) [L₁Tb - H]⁻. HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 310$ nm) : temps de rétention (t_r) = 7,17 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : $\lambda_{\text{max}} (\epsilon, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 243 (6100)$; 305 (7820) ; 318^{ép} (4465) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 310$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 490 (40), 544 (100), 585 (33), 621 (24) nm.

L₃Eu : SM (ESI, H₂O) : m/z (%) = 784,3 (100) [L₃Eu - H]⁻. HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,52 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : $\lambda_{\text{max}} (\epsilon, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = 232 (14800)$; 284 (9200); 292 (9500); 320 (7900) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 326$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (2), 593 (31), 616 (100), 652 (5), 694 (76) nm.

Chapitre V

L₃Tb : SM (ESI, H₂O) : m/z (%) = 790,3 (100) [L₃Tb - H]⁻. HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,38 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 232 (12200); 284 (8000); 292 (8000); 320 (6800) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 326$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 488 (40), 544 (100), 585 (32), 621 (17) nm.

L₅Eu : HPLC (colonne C8, éluant : H₂O, TFA 0,1% / CH₃OH 95/5 à 80/20 en 35 min; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 11,38 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 243^{ép} (10200) ; 277 (6000) ; 318 (8500) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 317$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (2), 593 (31), 616 (100), 652 (6), 694 (75) nm.

L₅Tb : HPLC (colonne C8, éluant : H₂O, TFA 0,1% / CH₃OH 95/5 à 80/20 en 35 min; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 11,95 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 243^{ép} (10200) ; 277 (6000) ; 318 (8800) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 317$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 490 (40), 545 (100), 585 (34), 622 (16) nm.

L₆Eu : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 6,18 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 255 (8100) ; 292 (7800). Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 293$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (1), 593 (29), 617 (100), 653 (4), 687 (64) nm.

L₆Tb : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 6,17 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 255 (7500) ; 292 (7450). Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 296$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 490 (40), 545 (100), 585 (32), 621 (15) nm.

L₇Eu : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,40 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 257^{ép} (7720) ; 309 (13320). Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 309$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (3), 593 (26), 615 (100), 651 (4), 689 (63) nm.

Chapitre V

L₇Tb : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,42 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 257^{ép} (7000) ; 308 (12320). Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 312$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 488 (38), 545 (100), 586 (30), 622 (17) nm.

L₈Eu : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 10,33 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 272 (11600) ; 307 (8800). Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 302$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (3), 594 (29), 617 (100), 653 (5), 690 (66) nm.

L₈Tb : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 10,27 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 272 (10400) ; 307 (8200). Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 307$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 489 (38), 545 (100), 586 (31), 621 (17) nm.

L₉Eu : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 3,99 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 298 (7010) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 297$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (4), 592 (33), 613 (65), 652 (6), 690 (100) nm.

L₉Tb : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 3,98 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 298 (6570) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 298$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 489 (46), 543 (100), 585 (34), 621 (16) nm.

L₁₀Eu : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 8,32 minutes. UV/Vis (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , M⁻¹.cm⁻¹) = 297 (7960) nm. Luminescence (Tampon TRIS, pH 7,4 ; $\lambda_{\text{exc}} = 291$ nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (5), 592 (35), 615 (100), 652 (7), 690 (99) nm.

L₁₀Tb : HPLC (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, $\lambda = 315$ nm) : temps de rétention (t_r) = 7,98 minutes. UV/Vis (Tampon

Chapitre V

TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , $M^{-1}.cm^{-1}$) = 297 (7960) nm. *Luminescence* (Tampon TRIS, pH 7,4 ; λ_{exc} = 296 nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 488 (44), 544 (100), 586 (34), 621 (16) nm.

L₁₁Eu : *HPLC* (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, λ = 315 nm) : temps de rétention (t_r) = 5,40 minutes. *UV/Vis* (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , $M^{-1}.cm^{-1}$) = 283 (6740) nm. *Luminescence* (Tampon TRIS, pH 7,4 ; λ_{exc} = 287 nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 580 (4), 592 (34), 614 (54), 653 (7), 690 (100) nm.

L₁₁Tb : *HPLC* (colonne C8, éluant : HCOONH₄, 10 mM pH 4/ CH₃CN 100/0 à 80/20 en 18 min ; débit : 1 mL/min, λ = 315 nm) : temps de rétention (t_r) = 5,40 minutes. *UV/Vis* (Tampon TRIS pH 7,4) : λ_{\max} (ϵ , $M^{-1}.cm^{-1}$) = 283 (6570) nm. *Luminescence* (Tampon TRIS, pH 7,4 ; λ_{exc} = 287 nm) : λ_{em} (intensité relative, spectre corrigé) : 490 (43), 544 (100), 585 (34), 621 (17) nm.

IV Bibliographie

- (1) Havas, F.; Danel, M.; Galaup, C.; Tisnès, P.; Picard, C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 999-1002.
- (2) Havas, F.; Leygue, N.; Danel, M.; Mestre, B.; Galaup, C.; Picard, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 7673-7686.
- (3) Remuinan, M. J.; Roman, H.; Alonso, M.-T.; Rodriguez-Ubis, J. C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 1099-1102.
- (4) Galaup, C.; Couchet, J.-M.; Bedel, S.; Tisnès, P.; Picard, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2274-2284.
- (5) Haas, Y.; Stein, G. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3668-3677.
- (6) Nakamaru, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 2697-2705.
- (7) Meech, S. R.; Phillips, D. *J. Photochem.* **1983**, *23*, 193-217.

Chapitre V

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux vise au développement de nouveaux ligands aptes à exalter la luminescence à longue durée de vie des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} en milieu aqueux. De tels luminophores associés à la technique de fluorescence en temps résolu trouvent tout leurs intérêts dans de nombreuses applications bioanalytiques : dosages immunologiques, dosages d'enzymes, études d'interactions entre biomolécules,...

Dans ce cadre, nos travaux ont porté sur la synthèse de onze ligands et sur l'étude des propriétés spectroscopiques de leurs complexes Eu^{3+} , Tb^{3+} en solution aqueuse (absorption et émission, durées de vie et rendements quantiques de luminescence). Les études photophysiques réalisées ont également permis de mieux appréhender les phénomènes de désactivations non radiatives mis en jeu dans ces complexes (nombre de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du métal, effets de la température, détermination de la position énergétique de l'état triplet à l'aide des complexes de gadolinium).

Les ligands décrits dans ce mémoire répondent « à priori » aux trois critères primaires indispensables permettant de disposer de ligands efficaces en vue de telles applications. Ils comportent :

- Un motif chromophore hétérocyclique permettant de collecter les photons incidents et de transférer cette énergie lumineuse à l'ion lanthanide.
- Des unités aminoacide acétique aptes à complexer fortement l'ion lanthanide et ainsi à assurer une bonne stabilité du complexe métallique en milieu aqueux.
- Suffisamment de fonctions coordinantes ($n \geq 9$) permettant de saturer la sphère de coordination de l'ion lanthanide et ainsi d'éviter toute molécule d'eau liée au métal, source de « quenching » de luminescence.

Deux familles de ligands macrocycliques ont été étudiées. Elles se différencient par la présence au niveau de leur structure d'un chromophore soit intracyclique, soit extracyclique.

Nous avons d'abord conçu une première famille de huit ligands macrocycliques incorporant un squelette triéthylènetétraamine $\text{N,N',N'',N'''}\text{-tétracétique}$ (TTTA) et un chromophore (mono-, bi-, tri-hétérocycle) intracyclique. De telles structures permettent de moduler la taille du cycle de 15 à 21 chaînons et la dendicité du ligand de 9 à 11.

Conclusion générale

La synthèse de ces macrocycles a été effectuée selon une séquence « Alkylation / Macrocyclisation »: i) préparation d'un motif tétraamine porteur de fonctions acide acétique (protégées sous forme ester) ; ii) réaction de macrocyclisation entre ce dérivé polyamine et divers hétérocycles fonctionnalisés par des groupements bromométhyle obtenus par synthèses multistapés. Cette stratégie de synthèse se démarque de la méthodologie habituellement utilisée pour l'accès à de tels dérivés. Elle limite le nombre d'étapes postérieures à la réaction de macrocyclisation (étape clé), permet de diversifier aisément la structure du chromophore (introduit lors d'une dernière étape), et ainsi de répondre plus facilement aux critères requis suivant l'ion lanthanide.

La synthèse du squelette triéthylènetétraamine tétrasubstitué par des groupements acétate de *tertiobutyle* a été effectuée en ayant recours à des précurseurs préalkylés, ce qui nous a permis d'obtenir ce synthon clé avec un rendement global de 75% ceci en partant de produits commerciaux et en limitant le nombre d'étapes de purification. Cette méthode a été validée par l'obtention de deux autres tétraamines tétrasubstitués par des fonctions ester.

Pour les réactions de macrocyclisation, nous avons obtenu des rendements satisfaisants ($40\% < \text{Rdt} < 60\%$) à l'exception du macrocycle dérivé du motif bis(Pyrazolyl)pyridine (18%) et ceci en opérant dans des conditions de dilution normale ($2,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) avec l'intervention d'un effet de matrice généré par l'ion sodium dans le cas des cycles à 15 et 18 chaînons.

Les études des propriétés de luminescence en milieu aqueux des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} dérivés de cette famille de ligands, ont permis de mettre en évidence dans tous les cas un transfert d'énergie Ligand \rightarrow lanthanide par effet antenne. L'étude de la sphère d'hydratation de l'ion lanthanide a permis de montrer l'absence de molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination du lanthanide à l'exception des complexes **L₁.Eu**, **L₁.Tb** (15 chaînons) et **L₃.Tb**, **L₈.Eu** (21 chaînons) dans lesquels une molécule d'eau reste liée au centre métallique. La détermination de l'énergie de l'état triplet des ligands a d'autre part révélé que seuls les complexes de terbium issus des ligands **L₃** et **L₅** sont susceptibles de présenter un phénomène de désactivation non radiative du à un transfert d'énergie en retour $\text{Tb}^* \rightarrow \text{Ligand}$. Il a été enfin établi que le transfert d'énergie ligand-métal était le moins efficace dans le cas des cycles à 21 chaînons.

Dans cette famille, les complexes Tb^{3+} dérivés des macrocycles à 18 chaînons et intégrant les motifs bipyridine (**L₂.Tb**) et pyridine-pyrazole (**L₆.Tb**) présentent les rendements quantiques

Conclusion générale

de luminescence les plus élevés, 26 et 31 % respectivement, associés à des durées de vie d'émission supérieures à 2,1 ms. Les bonnes propriétés de luminescence de (**L₆.Tb**) nous ont permis d'exploiter avec succès ce complexe dans une expérience de LRET en mode dynamique.

En ce qui concerne les stabilités thermodynamique et cinétique des complexes de cette famille de ligands, une étude très préliminaire a permis de mettre en avant la bonne stabilité cinétique du complexe macrocyclique à 15 chaînons **L₂.Tb** dans différents milieux tampons et sérique, associée à une constante de stabilité conditionnelle à pH 7,3 de l'ordre de 10^{16} . Cette étude suggère également une chute significative de ces propriétés lors d'un passage à un cycle à 21 chaînons.

Dans une seconde approche, nous avons synthétisé trois ligands dérivés du DOTA (1,4,7,10-tétracarboxyméthyl-1,4,7,10-tetraazacyclododécane) où l'une des branches acide acétique est remplacée par un motif *N,C*-pyrazolylpyridine jouant le rôle d'antenne. Au niveau de l'élaboration de ces dihérocycles, nous avons développé une stratégie de synthèse basée sur un couplage catalysé au cuivre (réaction d'Ullmann). La mise au point des conditions de cette réaction nous a permis d'atteindre des rendements de 60-90 % en produits isolés. Cette voie de synthèse s'est révélée être une alternative intéressante par rapport à la voie classique mettant en jeu le sel de potassium du pyrazole.

Dans cette série ce sont également les complexes Tb^{3+} qui présentent les meilleures caractéristiques de luminescence en solution aqueuse : absence totale de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du métal ; absence de transfert d'énergie en retour ligand → métal (bon positionnement du niveau d'énergie de leur état triplet) ; des durées de vie d'émission supérieures à 2,30 ms. Ceci se traduit par des rendements quantiques de luminescence élevés compris entre 28 et 48 %.

Cette étude a également permis de révéler qu'une faible modification du ligand (nature du point d'attachement du dihérocycle au motif DO3A) pouvait avoir des répercussions non négligeables sur les propriétés photophysiques du complexe métallique.

Conclusion générale

En conclusion, ces travaux de recherche ont permis d'explorer les potentialités d'une nouvelle famille de luminophores macrocycliques à base d'ions Eu^{3+} et Tb^{3+} . Nos résultats ont permis de cibler les complexes dérivés de cycles à 18 chaînons, facilement accessibles et offrant des critères de luminescence et de stabilité en milieu aqueux attrayants. L'utilisation d'autres chromophores dihétero-cycliques devrait permettre d'affiner ces propriétés. Il serait d'autre part intéressant d'étudier les complexes Tb^{3+} , Gd^{3+} dérivés de cycles à 15 chaînons, caractérisés par la présence d'une molécule d'eau liée au métal, comme sondes bimodales, c'est-à-dire comme contrastophore pour l'IRM et comme luminophore pour l'imagerie de fluorescence.

Dans la famille des luminophores basés sur une structure DO3A, nous avons établi que l'introduction d'un chromophore *N,C*-pyrazolylpyridine permettait de disposer de luminophores Tb^{3+} prometteurs. Un prolongement de ce travail consiste dans l'étude de la possibilité d'utiliser la fonction acide carboxylique présente dans le ligand **L₁₀** dans des réactions de bioconjugaison.

Ligands macrocycliques d'ions Lanthanide : Synthèse et évaluation comme marqueurs luminescents

Dans ce travail, nous avons synthétisé et étudié les propriétés photophysiques en milieu aqueux de deux séries de complexes lanthanidiques présentant des durées de vie d'émission particulièrement longues (ordre de la milliseconde), autorisant ainsi des détections résolues dans le temps.

La première série porte sur des macrocycles polyazotés de 15 à 21 chaînons intégrant dans leur structure un motif chromophore (mono, bi, tri-hétérocycle) intracyclique permettant d'exalter la fluorescence d'ions lanthanide (Eu^{3+} et Tb^{3+}) et un motif polyaminocarboxylique (acide triéthylène tétraamine N, N', N'', N'''-tétraacétique) assurant la solubilité et la stabilité du complexe lanthanidique en milieu aqueux.

La deuxième série concerne des macrocycles dérivés du cyclène (1,4,7,10-tétraazacyclododécane) fonctionnalisés par trois groupements acide acétique et intégrant dans leur structure d'une manière extracyclique un motif chromophore di-hétérocycle N, C-pyridine-pyrazole.

L'étude des propriétés de luminescence des complexes Eu^{3+} et Tb^{3+} révèle pour certains complexes des rendements quantiques particulièrement élevés (48%), des durées de vie de luminescence longues comprises entre 1 et 3 ms ainsi qu'une solubilité et stabilité en milieu aqueux autorisant l'utilisation de tels complexes dans différentes applications biologiques et dans la technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).

Lanthanide ion macrocyclic ligands : Synthesis and evaluation as luminescent probes

In this work, we synthesized and studied the photophysical properties in aqueous medium of two series of lanthanide complexes showing particularly long-emission lifetimes (in the millisecond range), and allowing a luminescence time-resolved detection.

The first series relates to polyazamacrocycles of 15-21 membered ring incorporating in their structure an intracyclic chromophore unit (mono-, bi-, tri-heterocycle) for photosensitizing lanthanide ions (Eu^{3+} and Tb^{3+}) and a polyaminocarboxylic core (triethylenetetraaminetetraacetic acid) to ensure solubility and stability of lanthanide complexes in aqueous medium.

The second series concerns cyclen macrocycles derivatives (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) functionalized by three acetic acid groups and incorporating in their structure an extracyclic chromophore unit based on a di-heterocyclic N, C-pyridine-pyrazole-moiety.

The study of the luminescence properties of the Tb^{3+} and Eu^{3+} complexes reveals for some complexes: particularly high quantum yields (48%), long luminescence lifetimes between 1 and 3 ms, solubility and stability in aqueous media, allowing the use of these complexes in various bioanalytical applications and fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments.